



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111968702 B

(45) 授权公告日 2024.04.19

(21) 申请号 202010859550.4

CN 111549131 A, 2020.08.18

(22) 申请日 2020.08.24

US 2019355438 A1, 2019.11.21

(65) 同一申请的已公布的文献号

WO 2018204657 A1, 2018.11.08

申请公布号 CN 111968702 A

陈实富. 循环肿瘤DNA测序的数据分析方法. 中国博士学位论文全文数据库 信息科技辑. 2018, (第2期), I140-9.

(43) 申请公布日 2020.11.20

(73) 专利权人 西安时代基因健康科技股份有限公司

s.chennakrishnaiah.leukocytes as a reservoir of circulating oncogenic dna and regulatory targets of tumor-derived extracellular vesicles. journal of thrombosis and haemostasis. 2018, 全文.

地址 710000 陕西省西安市高新区沣惠南路科技六路西北角摩尔中心第3幢1单元14层11404号房

(72) 发明人 张伟 孟涛 马少杰 李文娟

季凤俊; 秦恺; 叶飞; 陆松华. 循环肿瘤脱氧核糖核酸基因突变检测在非小细胞肺癌中的应用价值. 癌症进展. 2020, (第10期), 全文.

(74) 专利代理机构 西安通大专利代理有限责任公司 61200

专利代理师 范巍

禹金良; 闫兆月; 盛致远; 孙勇; 高玉帅; 步星耀. 脑脊液ctDNA液体活检在脑恶性肿瘤中的临床研究. 医药论坛杂志. 2020, (第06期), 全文.

(51) Int. Cl.

G16B 20/50 (2019.01)

G16H 50/30 (2018.01)

戚丽娜; 郑树. 循环肿瘤细胞及循环肿瘤DNA检测在乳腺癌中的研究进展. 中华乳腺病杂志(电子版). 2018, (第03期), 全文.

(56) 对比文件

CN 106480017 A, 2017.03.08

CN 107447258 A, 2017.12.08

CN 109411015 A, 2019.03.01

CN 110272985 A, 2019.09.24

CN 111402952 A, 2020.07.10

赵晓; 杜楠; 杨全胜. 循环肿瘤DNA在恶性肿瘤诊疗中的应用. 感染、炎症、修复. 2015, (第01期), 全文.

审查员 王晟哲

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

一种基于循环肿瘤DNA的恶性肿瘤早期筛查系统

对恶性肿瘤进行早期筛查, 并提高筛查的敏感性和特异性。

(57) 摘要

本发明公开了一种基于循环肿瘤DNA的恶性肿瘤早期筛查系统, 该恶性肿瘤早期筛查系统同时利用了样本循环游离DNA和白细胞基因组DNA中存在的突变, 结合恶性肿瘤突变捕获文库及恶性肿瘤相关的病理性突变位点比对, 对非肿瘤特异性的基因突变进行剔除, 可以从样本的基因突变中提取恶性肿瘤细胞释放入血液循环系统的特异性的分子标志物, 即循环肿瘤DNA突变位点。本发明基于人体循环肿瘤DNA的变异情况, 可以

1. 一种基于循环肿瘤DNA的恶性肿瘤早期筛查系统,其特征在于:该恶性肿瘤早期筛查系统包括循环游离DNA突变分析模块、白细胞基因组DNA突变分析模块、突变位点筛选模块以及恶性肿瘤筛查与风险评估模块;

所述循环游离DNA突变分析模块用于根据目标区域捕获文库的测序结果,对样本循环游离DNA相应目标区域发生突变的情况进行分析,从而得到样本循环游离DNA中的候选突变位点;

所述白细胞基因组DNA突变分析模块用于根据目标区域捕获文库的测序结果,对样本白细胞基因组DNA相应目标区域发生突变的情况进行分析,从而得到样本白细胞基因组DNA中的候选突变位点;

所述突变位点筛选模块用于依据测序深度、突变频率、单个突变位点的突变条带数目以及突变来源,并通过对样本循环游离DNA及白细胞基因组DNA中的候选突变位点进行阈值比较和序列比对,从样本循环游离DNA的候选突变位点中提取得到具有恶性肿瘤细胞特异性的循环肿瘤DNA突变位点;

所述恶性肿瘤筛查与风险评估模块用于根据所述具有恶性肿瘤细胞特异性的循环肿瘤DNA突变位点的提取结果以及提取得到的循环肿瘤DNA突变位点与恶性肿瘤临床诊断结果的关系,对恶性肿瘤早期患病情况或恶性肿瘤风险增加情况进行判定;

所述突变位点筛选模块中,将低于测序深度阈值、突变频率阈值及单个突变位点的突变条带数目阈值的候选突变位点排除;

所述测序深度阈值为 $10000 \times \sim 40000 \times$,突变频率阈值为 $3\% \sim 1\%$,单个突变位点的突变条带数目阈值为 ≥ 10 ;

所述突变位点筛选模块中,对于经过阈值比较后保留的任意一候选突变位点,若该候选突变位点同时存在于样本的循环游离DNA和白细胞基因组DNA中,则将所述候选突变位点排除。

2. 根据权利要求1所述一种基于循环肿瘤DNA的恶性肿瘤早期筛查系统,其特征在于:所述目标区域选自恶性肿瘤驱动基因突变位点。

3. 根据权利要求1或2所述一种基于循环肿瘤DNA的恶性肿瘤早期筛查系统,其特征在于:所述恶性肿瘤选自肺癌、胃癌、食管癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌、宫颈癌、胰腺癌、甲状腺癌、淋巴瘤、膀胱癌、肾癌、子宫内膜癌、鼻咽癌、前列腺癌、卵巢癌、神经胶质瘤、胆囊癌、白血病、黑色素瘤、口腔癌、喉癌、睾丸癌、骨肉瘤中的一种或多种。

4. 根据权利要求1所述一种基于循环肿瘤DNA的恶性肿瘤早期筛查系统,其特征在于:所述样本选自人外周血,样本采集量为 $7.5 \sim 10\text{mL}$ /人。

5. 根据权利要求1所述一种基于循环肿瘤DNA的恶性肿瘤早期筛查系统,其特征在于:所述恶性肿瘤筛查与风险评估模块中,若未提取得到具有恶性肿瘤细胞特异性的循环肿瘤DNA突变位点或提取得到的循环肿瘤DNA突变位点与恶性肿瘤的临床诊断无关,则判定样本不是来自恶性肿瘤早期患者或样本对应的个体罹患恶性肿瘤的风险与一般人群相同;若提取得到具有恶性肿瘤细胞特异性的循环肿瘤DNA突变位点,且提取得到的循环肿瘤DNA突变位点与恶性肿瘤的临床诊断相关,则判定样本是来自恶性肿瘤早期患者或样本对应的个体罹患恶性肿瘤的风险高于一般人群。

一种基于循环肿瘤DNA的恶性肿瘤早期筛查系统

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术和医疗检测技术领域,具体涉及通过检测人体外周血中循环肿瘤DNA(ctDNA)分子变异对恶性肿瘤进行早期筛查和风险评估。

背景技术

[0002] 癌症在医学上统称为恶性肿瘤,是严重威胁人类健康的复杂重大疾病,是全球仅次于心脑血管疾病的导致人类死亡的第二大原因。恶性肿瘤具有起病隐匿、发病时间长、进展迅速、筛查和治疗手段有限等特征,待患者觉察到有相应症状出现时,往往已发展至中晚期,给临床干预和治疗带来困难。恶性肿瘤的死亡率与其临床确诊的时期密切相关,临床确诊的时间越早,患者生存率越高、死亡率越低。据统计大多数恶性肿瘤晚期患者的五年生存率不足20%,而如果能在早期确诊并给与治疗和干预,大多数恶性肿瘤晚期患者的五年生存率可提高至70%以上。目前恶性肿瘤的防治压力巨大,并且不同的国家和地区高发病率恶性肿瘤的种类往往并不相同,且存在性别差异,恶性肿瘤的早发现、早诊断、早治疗是降低其死亡率的关键环节。

[0003] 目前,临床上常用的恶性肿瘤早期筛查手段主要包括影像学检查和血清肿瘤蛋白标志物检测。但包括PET-CT、核磁共振、内窥镜等在内的影像学筛查技术存在操作难度大、敏感性和特异性不足、对恶性肿瘤大小有一定的要求、费用较高等特点,尤其是对肿瘤大小的要求,导致大多数恶性肿瘤在通过影像学检查时已属中晚期,这使得影像学筛查技术在恶性肿瘤早期筛查中存在局限性,不能有效进行恶性肿瘤的早期筛查。血清肿瘤蛋白标志物检测具有操作简便的特点,可以用于恶性肿瘤的大规模筛查,但血清肿瘤蛋白标志物敏感性和特异性不足,主要体现在:某些其他疾病的发生也会对相应肿瘤蛋白标志物的含量产生明显的影响,进而影响恶性肿瘤的筛查效率,同时现有的血清肿瘤蛋白标志物往往只是针对某一种或某一类恶性肿瘤进行筛查,难以全面的反映人罹患恶性肿瘤的情况和风险。

[0004] 恶性肿瘤的发生是由于基因变异而导致细胞不受限制的增殖与分化,其特征是基因突变所导致的细胞生长异常和分化异常,同时,绝大多数恶性肿瘤的发生涉及基因与环境因素的复杂相互作用,其中,环境因素包括膳食营养、环境污染、药物、辐射和病原微生物感染等。恶性肿瘤驱动基因是恶性肿瘤发生发展过程中起决定性作用的基因,例如,人体内原癌基因的激活和抑癌基因的失活是细胞发生癌变的关键。

[0005] 从基因水平的改变到发展为临床可见的恶性肿瘤通常历经数年甚至更长时间。在恶性肿瘤生长初期,恶性肿瘤即可通过凋亡、坏死、主动释放等机制将自身特异性DNA片段释放进入人体血液循环系统,这些游离于外周血中的肿瘤特异性DNA片段即循环肿瘤DNA(ctDNA),ctDNA通常包含点突变(单个碱基的突变)、缺失、插入、重排、拷贝数异常和甲基化等变异,这些变异可以作为特异性的恶性肿瘤分子标志物,其中变异数量最大的为单个碱基的突变。因此,在恶性肿瘤发生的早期通过活检技术对血液中的ctDNA进行检测,对于恶性肿瘤的早期筛查具有一定意义。但基于循环肿瘤DNA进行恶性肿瘤早期筛查还存在一些

技术方面的不足,并最终影响了恶性肿瘤早期筛查的敏感性和特异性:第一,现有循环肿瘤DNA检测方法中对于循环肿瘤DNA的筛选不严格,不同检测方法采用的驱动基因及基因变异位点差异较大,对人群差异考虑较少。第二,在利用二代测序技术时采用的测序深度较低,不能有效检测出血液中痕量的循环肿瘤DNA变异;同时缺乏有效的测序误差消除或补偿措施。第三,血液中的多数循环游离DNA(cfDNA)的变异源自克隆性造血,在进行生物信息分析时,造成ctDNA检测存在大量的背景噪音。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种基于循环肿瘤DNA的恶性肿瘤早期筛查系统,该恶性肿瘤早期筛查系统基于人体循环肿瘤DNA的变异情况,可以对人体恶性肿瘤进行早期筛查,并提高筛查的敏感性和特异性。

[0007] 为达到上述目的,本发明采用了以下技术方案:

[0008] 该恶性肿瘤早期筛查系统包括循环游离DNA突变分析模块、白细胞基因组DNA突变分析模块、突变位点筛选模块以及恶性肿瘤筛查与风险评估模块;

[0009] 所述循环游离DNA突变分析模块用于根据目标区域捕获文库的测序结果,对样本循环游离DNA相应目标区域发生突变的情况进行统计分析,从而得到样本循环游离DNA中的突变位点,并作为候选突变位点;

[0010] 所述白细胞基因组DNA突变分析模块用于根据目标区域捕获文库的测序结果,对样本白细胞基因组DNA相应目标区域发生突变的情况进行统计分析,从而得到样本白细胞基因组DNA中的突变位点,并作为候选突变位点;

[0011] 所述突变位点筛选模块用于依据测序深度、突变频率、单个突变位点的突变条带数目以及突变来源,并通过对样本循环游离DNA及白细胞基因组DNA中的候选突变位点进行阈值比较和序列比对,从样本循环游离DNA的候选突变位点中提取得到具有恶性肿瘤细胞特异性的循环肿瘤DNA突变位点;

[0012] 所述恶性肿瘤筛查与风险评估模块用于根据所述具有恶性肿瘤细胞特异性的循环肿瘤DNA突变位点的提取结果(即突变位点筛选模块的提取结果)以及这些提取得到的突变位点与恶性肿瘤临床诊断结果的关系,对恶性肿瘤早期患病情况或恶性肿瘤风险增加情况进行判定。

[0013] 优选的,所述目标区域选自恶性肿瘤驱动基因突变位点。

[0014] 优选的,所述恶性肿瘤选自肺癌、胃癌、食管癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌、宫颈癌、胰腺癌、甲状腺癌、淋巴瘤、膀胱癌、肾癌、子宫内膜癌、鼻咽癌、前列腺癌、卵巢癌、神经胶质瘤、胆囊癌、白血病、黑色素瘤、口腔癌、喉癌、睾丸癌、骨肉瘤中的一种或多种。

[0015] 优选的,所述样本选自人外周血,样本采集量为7.5~10mL/人。

[0016] 优选的,所述突变位点筛选模块中,将低于测序深度阈值、突变频率阈值及单个突变位点的突变条带数目阈值的所有候选突变位点(经上述测序和统计分析确定的,存在于样本的循环游离DNA及白细胞基因组DNA中的突变位点)排除,即这些位点不作为具有恶性肿瘤细胞特异性的循环肿瘤DNA突变位点。

[0017] 优选的,所述测序深度阈值为 $10000\times\sim 40000\times$,突变频率阈值为 $3\text{‰}\sim 1\%$,单个突变位点的突变条带数目阈值为 ≥ 10 。

[0018] 优选,所述突变位点筛选模块中,对于经过以上各阈值比较后保留(未排除的)的任意一候选突变位点,若该候选突变位点经过比对确定为同时存在于样本的循环游离DNA和白细胞基因组DNA中,则将所述候选突变位点排除,即这些位点也不作为具有恶性肿瘤细胞特异性的循环肿瘤DNA突变位点。至此,突变位点筛选模块将剩余仍未排除的候选突变位点作为具有恶性肿瘤细胞特异性的循环肿瘤DNA突变位点的提取结果并输出至恶性肿瘤筛查与风险评估模块。

[0019] 优选的,所述恶性肿瘤筛查与风险评估模块中,若未提取得到具有恶性肿瘤细胞特异性的循环肿瘤DNA突变位点或提取得到的循环肿瘤DNA突变位点与恶性肿瘤的临床诊断无关,则判定样本不是来自恶性肿瘤早期患者或样本对应的个体罹患恶性肿瘤的风险与一般人群(群体患病率)相同;若提取得到具有恶性肿瘤细胞特异性的循环肿瘤DNA突变位点,且提取得到的这些突变位点与恶性肿瘤的临床诊断相关,则判定样本是来自恶性肿瘤早期患者或样本对应的个体罹患恶性肿瘤的风险高于一般人群。

[0020] 本发明的有益效果体现在:

[0021] 本发明同时利用了样本的循环游离DNA和白细胞基因组DNA中存在的突变位点信息,结合恶性肿瘤突变捕获文库及恶性肿瘤相关的病理性突变位点比对,对非肿瘤特异性的基因突变进行剔除,可以从样本的基因突变中提取恶性肿瘤细胞释放入血液循环系统的特异性的分子标志物(即循环肿瘤DNA突变位点),从而提高恶性肿瘤早期筛查的敏感性和特异性。本发明可以在恶性肿瘤发生的早期就识别出其释放的分子变异迹象,能够更早发现并提示恶性肿瘤风险,为恶性肿瘤的早期干预提供宝贵的时间。

[0022] 进一步的,本发明将二代测序技术的平均测序深度提升至10000×以上,严格控制测序数据质量,提高突变检测能力。

[0023] 进一步的,本发明通过设置突变频率阈值和突变条带数目阈值,消除因测序设备等其他因素引入的突变检测误差。

[0024] 进一步的,本发明检测的样本为血液样本,采集方便并具有重复性,可通过不同时间点的采集分析,提供体内循环肿瘤DNA的动态变化,从而可间接反映恶性肿瘤的发展趋势或采用干预手段后的干预效果,具有安全、微创、实时等特点。

[0025] 进一步的,本发明通过构建恶性肿瘤类型集合,可提高对特定人群进行恶性肿瘤早期筛查和风险评估的水平。

具体实施方式

[0026] 下面结合实施例对本发明作进一步详细说明。所述实施例仅用于解释本发明,而非对本发明保护范围的限制。

[0027] (一) 构建本地数据库

[0028] 本地数据库存储有以下已知的数据:

[0029] 1.1) 恶性肿瘤驱动基因集合

[0030] 恶性肿瘤驱动基因可以是原癌基因、抑癌基因或恶性肿瘤相关信号通路基因;

[0031] 1.2) 恶性肿瘤驱动基因突变位点集合

[0032] 记录恶性肿瘤突变位点所在的位置、基因、基因组碱基改变情况,突变导致的氨基酸改变情况,以及位点变异在各种恶性肿瘤中发生的频率;

- [0033] 1.3) 恶性肿瘤驱动基因突变位点靶向捕获探针集合
- [0034] 委托罗氏合成靶向捕获探针,用于构建文库;
- [0035] 1.4) 恶性肿瘤类型集合
- [0036] 依据国家癌症中心2019年发布的全国癌症统计数据,经实验筛选与恶性肿瘤早期筛查相关的人群特异性恶性肿瘤类型,具体包括:肺癌、胃癌、食管癌、肝癌、结直肠癌、乳腺癌、宫颈癌、胰腺癌、甲状腺癌、淋巴瘤、膀胱癌、肾癌、子宫内膜癌、鼻咽癌、前列腺癌、卵巢癌、神经胶质瘤、胆囊癌、白血病、黑色素瘤、口腔癌、喉癌、睾丸癌和骨肉瘤;
- [0037] 以上数据库中所涉及的恶性肿瘤驱动基因及突变位点信息来自于美国国立生物技术信息中心NCBI(National Center for Biotechnology Information)、TCGA(The Cancer Genome Atlas)、COSMIC(Catalogue of Somatic Mutations in Cancer),及NCI(National Cancer Institute)等生物信息库;数据库具有数据更新和补充功能。
- [0038] (二) 恶性肿瘤早期筛查流程
- [0039] 1) 选用标准的含有EDTA抗凝剂和专用细胞稳定剂的 Streck Cell-Free DNA采血管采集受试人外周静脉血10mL。
- [0040] 2) 从受试人外周血中分离血清和白细胞。
- [0041] 具体可按照深圳市标准化指导性技术文件SZDB/Z 186—2016《用于高通量测序研究的人类血液样本采集、处理、运输和储存规范》进行血液样本的处理,分别获取血清和白细胞。
- [0042] 3) 循环游离DNA(cfDNA)提取与测序
- [0043] 3.1) 应用标准的人体血液样本cfDNA提取试剂盒对分离的血清进行cfDNA提取。
- [0044] 3.2) 样本质检流程:利用Nanodrop凝胶电泳技术对提取的cfDNA进行检测,评估核酸质量(包括纯度、浓度,及完整性或降解程度分析),制定SOP(cfDNA总量要求大于30ng,260nm和280nm处的吸光值的比值在1.8左右)。
- [0045] 3.3) 提取的cfDNA经检测合格后,采用标准的Illumina建库流程进行文库构建。
- [0046] 3.4) 文库质检流程:按现行的目标区域捕获建库质量要求、标准,对构建好的文库采用Agilent2100生物分析仪和ABI公司的7500型实时荧光定量PCR仪进行文库的质检,建立文库质检SOP(要求文库总量大于30ng,浓度大于20ng/ μ L,2100峰图主峰在310bp \pm 15bp)。
- [0047] 3.5) 测序流程:利用Illumina公司的NGS平台上机测序,cfDNA平均测序深度为10000 \times (不得低于此指标),测序质量Q30 \geq 80%。
- [0048] 3.6) 生物信息分析流程:对下机数据进行质控和基础生物信息分析,去除质控不能通过的结果,最终收集受试人循环游离DNA中与探针匹配的恶性肿瘤驱动基因及相应的突变位点、测序深度、突变频率、突变类型、突变位点单碱基测序质量和相应突变条带数目等信息。提取得到的受试人的循环游离DNA中,大多数是未发生变异的序列,而恶性肿瘤所释放进入血液的带有突变的DNA只占到所有cfDNA中的很少一部分,大多数的cfDNA是其他正常细胞凋亡或坏死所释放入血液的,这些cfDNA相应区段上并不携带肿瘤相关变异,通过测序,可获得受试人cfDNA突变频率和相应位点的突变条带数目。
- [0049] 4) 白细胞基因组DNA提取与测序
- [0050] 4.1) 应用标准的人基因组DNA提取试剂盒对分离的白细胞进行基因组DNA提取。

[0051] 4.2) 样本质检流程:利用Nanodrop凝胶电泳技术结合OD值进行基因组DNA质检,评估核酸质量(包括纯度、浓度,及完整性或降解程度分析)。

[0052] 4.3) 对检测合格的白细胞基因组DNA,采用标准的Illumina建库流程进行文库构建。

[0053] 4.4) 文库质检流程:按现行的目标区域捕获建库质量的要求、标准,对构建好的文库采用Agilent2100生物分析仪和ABI公司的7500型实时荧光定量PCR仪进行文库的质检。

[0054] 4.5) 测序流程:利用Illumina公司的NGS平台上机测序,白细胞基因组DNA平均测序深度为10000×(不得低于此指标),测序质量Q30≥80%。

[0055] 4.6) 生物信息分析流程:对下机数据进行质控和基础生物信息分析,去除质控不能通过的结果,最终收集受试人白细胞基因组DNA中与探针匹配的恶性肿瘤驱动基因及相应的突变位点、测序深度、突变频率、突变类型、突变位点单碱基测序质量和相应突变条带数目等信息。提取得到的受试人的白细胞基因组DNA,其中大多数是未发生变异的序列,因克隆性造血有些白细胞自身基因组DNA会发生变异,发生变异的DNA(即带有突变的DNA)序列只占到所有白细胞基因组DNA序列的很少一部分,造血干细胞亚克隆所携带的突变丰度较低(90%的克隆性造血丰度<1%),与来源于生殖细胞的胚系突变具有显著差异,但会显著影响ctDNA的检测结果,通过测序,可获得受试人白细胞基因组DNA突变频率和相应的突变条带数目。

[0056] 5) 在按照以上步骤对提取自受试人血清和白细胞的相应DNA进行文库构建、测序和基础生物信息分析基础上,可进一步利用计算机生物信息处理程序,对经测序后确定的存在于循环游离DNA和白细胞基因组DNA中的恶性肿瘤驱动基因突变进行分析,并根据分析结果判定受试人是否为恶性肿瘤早期患者或存在罹患恶性肿瘤风险;具体步骤如下:

[0057] 5.1) 将测序深度10000×设定为测序深度阈值,去除白细胞基因组DNA和循环游离DNA中测序深度不足10000×的恶性肿瘤驱动基因突变。

[0058] 5.2) 将突变频率为千分之三设定为突变频率阈值,去除白细胞基因组DNA和循环游离DNA中突变频率低于千分之三的恶性肿瘤驱动基因突变。

[0059] 5.3) 将单个突变位点的突变条带数目阈值设定为10,去除白细胞基因组DNA和循环游离DNA中突变条带数目低于10条的恶性肿瘤驱动基因突变。

[0060] 5.4) 经过步骤5.3之后,将针对受试人白细胞基因组DNA和循环游离DNA的测序结果(突变位点)进行相互比对分析,过滤掉白细胞基因组DNA测序所检测到的突变,这些突变不认为是肿瘤释放入血液的。

[0061] 5.5) 当完成步骤5.1至步骤5.4之后,受试人的循环游离DNA的测序结果中还存在本地数据库中所存储的恶性肿瘤驱动基因突变,且与clinvar、cosmic、tcga等数据库比对后均显示为病理性或可能为病理性的基因位点,则判定该受试人为恶性肿瘤早期患者或罹患恶性肿瘤的风险增加,同时经过以上步骤处理后所存在的突变位点数目越高,则受试人罹患恶性肿瘤的风险也会增高。当完成步骤5.1至步骤5.4之后,受试人的循环游离DNA的测序结果中不存在本地数据库中所存储的恶性肿瘤驱动基因突变,则判定受试人未患有恶性肿瘤或罹患恶性肿瘤的风险等同于一般人群。

[0062] (三) 恶性肿瘤早期筛查和风险评估实例

[0063] 实例1

[0064] 采用上述恶性肿瘤早期筛查流程对162例I期或II期恶性肿瘤患者(恶性肿瘤种类符合以上本地数据库设定的类型集合,具体为肺癌、胃癌、食管癌、肝癌、结直肠癌及乳腺癌)和156例对照(健康和恶性肿瘤性疾病)的血液样本中循环游离DNA和白细胞基因组DNA进行突变检测和分析。

[0065] 156例对照样本和162例恶性肿瘤患者的血液样本均于2017年10月采集自陕西省西安市三级和二级医院的住院和门诊患者。

[0066] 在162例恶性肿瘤患者样本中,分析结果判定患有恶性肿瘤的样本为133例,即对恶性肿瘤患者筛查的敏感性可达82.1%。分析结果判定未患有恶性肿瘤或罹患恶性肿瘤的风险等同于一般人群的例数为29例,即存在17.9%的假阴性结果。

[0067] 在156例对照样本中,分析结果判定罹患恶性肿瘤的风险等同于一般人群的样本为148例,即对恶性肿瘤患者筛查的特异性可达94.8%。分析结果判定患有恶性肿瘤或罹患恶性肿瘤的风险升高的样本为8例,即存在约5.2%的假阳性结果。

[0068] 实例1表明,本发明基于循环肿瘤DNA(ctDNA)的恶性肿瘤早期筛查技术,较常规临床恶性肿瘤筛查方法(B超、X光、血清肿瘤蛋白标志物)和现有的基于循环肿瘤DNA的筛查方法具有更高的敏感性和特异性。

[0069] 另外,当测序结果的处理中未考虑设置突变频率阈值和突变条带数目阈值,则162例恶性肿瘤患者样本的假阴性结果比例为10.5%,156例对照样本的假阳性结果比例为46.7%。

[0070] 实例2

[0071] 采用上述恶性肿瘤早期筛查流程对75例健康和恶性肿瘤性疾病患者的血液样本中循环游离DNA和白细胞基因组DNA进行突变检测和分析。

[0072] 75例健康和恶性肿瘤性疾病患者为随机人群,来自于陕西省西安市某健康体检机构,血样采集时间为2017年11月。

[0073] 在75例样本中,分析结果判定患有恶性肿瘤或罹患恶性肿瘤的风险升高的样本为3例。随即对这3例个体在三级甲等医院进行了恶性肿瘤早期筛查(包括常规血清肿瘤蛋白标志物和影像学筛查),结果均为阴性,但在一年后,其中一例个体经三级甲等医院诊断为肺癌早期。

[0074] 实例2表明,本发明基于循环肿瘤DNA(ctDNA)的恶性肿瘤早期筛查技术可以在现有筛查技术手段确诊恶性肿瘤前更早的提示恶性肿瘤风险,即比传统恶性肿瘤筛查技术更早发现恶性肿瘤迹象。

[0075] 总之,本发明与现有的肿瘤早期筛查技术比较显示出多种优势,与常规的肿瘤蛋白标志物筛查技术比较,本发明具有更高的敏感性和特异性;与基于影像学的B超、CT相比,本发明对人体没有辐射,同时还具有更高的敏感性和特异性;与胃镜、直肠镜检等筛查技术比较,本发明不会带给受试者痛苦、受试者接受度更高。