



(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 I485254 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 05 月 21 日

(21)申請案號：102131625

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 09 月 03 日

(51)Int. Cl. : C12Q1/68 (2006.01)

(71)申請人：陳明 (中華民國) CHEN, MING (TW)

臺中市西區中興街 359 號 3 樓之 1

(72)發明人：楊振翔 YEANG, CHEN HSIANG (TW)；陳明 CHEN, MING (TW)；許紘瑋 HSU, HUNG WEI (TW)；馬國欽 MA, GWO CHIN (TW)；林怡杏 LIN, YI SHING (TW)；張舜閔 CHANG, SHUN MIN (TW)；陳富鈐 CHEN, FU CHAN (TW)；郭守仁 KUO, SHOU JEN (TW)

(74)代理人：陳天賜

(56)參考文獻：

TW 201313895A1

Chiu RWK et al., "Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study", British Medical Journal, 2011:342:c7401, p.1-9, 2011/01/11

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：2 項 圖式數：5 共 18 頁

(54)名稱

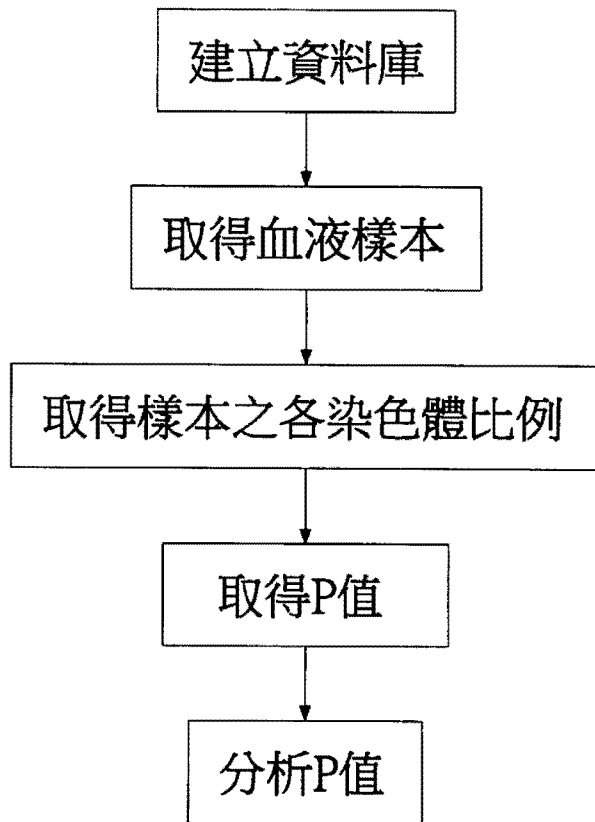
以全基因體趨勢記分為基礎之非侵入性產前檢測方法

NON-INVASIVE PRENATAL DETECTION METHOD ON THE BASIS OF THE WHOLE GENOME TREND SCORE

(57)摘要

一種以全基因體趨勢記分為基礎之非侵入性產前檢測方法，用以檢測孕婦之胎兒之染色體是否為非整倍體，包括下列步驟：建立具有正常人之第 k 對染色體之片段數量比率之平均值 m_k 之資料庫；自待測孕婦之血漿取得待測孕婦及其胎兒之染色體數據 y_k ；以各該 y_k 值分別對於各該 m_k 值之比值而取得 p 值；分析 p 值，確定是否有染色體為非整倍體。藉由比較各該 p 值以及資料庫中之各該 p 值之大小，增加可對比之數據，以提高檢測之準確性；此外，由於做為比較之數據較多，故即使於妊娠早期，本發明仍具有相當之準確性，以利孕婦早日得知胎兒之染色體是否正常。

A non-invasive prenatal detection method on the basis of the whole genome trend score, which is used to detect whether the fetal chromosome is aneuploid and comprises the following steps: establishing a database having the average value m_k of the ratio of the length of human chromosome k , obtaining the chromosome data y_k of the pregnant woman and the fetus from the blood plasma of the pregnant woman, obtaining P -value from the ratio of the data y_k to the value m_k , and analyzing the P -value so as to confirm whether the fetal chromosome is aneuploid. Thereby, the comparable data can improve the detection accuracy and enable the pregnant woman to know whether the fetal chromosome is normal.



第1圖

104年 2月 13日修(更)正本

104年 2月 13日修正替換頁

發明摘要

※ 申請案號：102131675

※ 申請日：102.9.3

※IPC 分類：C12Q 1/68 (2006.01)

【發明名稱】以全基因體趨勢記分為基礎之非侵入性產前檢測方法

NON-INVASIVE PRENATAL DETECTION METHOD ON THE BASIS OF THE WHOLE GENOME TREND SCORE

【中文】

一種以全基因體趨勢記分為基礎之非侵入性產前檢測方法，用以檢測孕婦之胎兒之染色體是否為非整倍體，包括下列步驟：建立具有正常人之第 k 對染色體之片段數量比率之平均值 m_k 之資料庫；自待測孕婦之血漿取得待測孕婦及其胎兒之染色體數據 y_k ；以各該 y_k 值分別對於各該 m_k 值之比值而取得 p 值；分析 p 值，確定是否有染色體為非整倍體。藉由比較各該 p 值以及資料庫中之各該 p 值之大小，增加可對比之數據，以提高檢測之準確性；此外，由於做為比較之數據較多，故即使於妊娠早期，本發明仍具有相當之準確性，以利孕婦早日得知胎兒之染色體是否正常。

【英文】

A non-invasive prenatal detection method on the basis of the whole genome trend score, which is used to detect whether the fetal chromosome is aneuploid and comprises the following steps: establishing a database having the average value m_k of the ratio of the length of human chromosome k , obtaining the chromosome data y_k of the pregnant woman and the fetus from the blood plasma of the pregnant woman, obtaining P-value from the ratio of the data y_k to the value m_k , and analyzing the P-value so as to confirm whether the fetal chromosome is aneuploid. Thereby, the comparable data can improve the detection accuracy and enable the pregnant woman to know whether the fetal chromosome is normal.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

發明專利說明書

【發明名稱】 以全基因體趨勢記分為基礎之非侵入性產前檢測方法

NON-INVASIVE PRENATAL DETECTION METHOD ON THE BASIS OF THE WHOLE GENOME TREND SCORE

【技術領域】

【0001】 本發明係有關於一種可取得胎兒染色體數量之產前檢查方法，特別是指一種非侵入性之檢查，藉由抽取懷孕母親血液即可得知腹中胎兒染色體是否為非整倍體之方法者。

【先前技術】

【0002】 產前診斷是針對懷孕中，出生之前的胎兒所作的檢查，目的是偵測生育缺陷，例如神經管缺陷、染色體異常、遺傳疾病……等症狀。而在篩檢染色體是否異常之方法中，係以羊膜腔穿刺最為常用。

【0003】 建立在細胞培養和去氧核糖核酸(DNA)分析的基礎上，羊膜穿刺可做為醫學上的產前診斷，羊膜穿刺診斷的樣本是利用長針頭穿過母親的腹壁，取自於發育中之胎兒週圍的羊水，羊水中含有胎兒的皮膚和其他發育過程中脫落的細胞，檢驗時主要是針對這些細胞中的 DNA，來檢驗遺傳性和先天性缺陷的可能性。由於可直接取得胎兒之 DNA，所以羊膜穿刺的準確性是無庸置疑的。最適當的羊膜穿刺時機為約在懷孕的第 16 至 18 周。雖說羊膜穿刺術是一項相當可靠

的診斷方法，其分析準確率幾可達百分之百，但由於羊膜穿刺係為侵入性之檢驗，故可能會造成 0.1 至 0.2% 的流產風險，也有 0.05% 的機率會造成新生兒外型的傷害，因此醫學界發展出各種染色體異常之篩檢方法。

【0004】 例如 1997 年盧煜明教授等人發現在孕婦的血漿內可以分離出胎兒的小片段游離 DNA，這一發現使得非侵入性之產前染色體檢測有了新進展，僅需要抽取孕婦之血液，配合利用次世代基因序列分析(Next generation sequencing，或簡稱 NGS)的技術，即可進行染色體非整倍體分析。然而，由於並非直接取得胎兒之染色體，因此，以此一方法檢驗仍會有部份之錯誤率。

【0005】 習知的母血篩檢方法大多係利用染色體特定序列數期望值(Z-score)來區分風險族群並以偵測率及偽陽性率來做篩選標準的評估。在此將此方法稱為 Z-score。

【0006】 依據 Z-score 之方法，係先選定一目標染色體，並測得孕婦血液中之目標染色體之 DNA 片段數量以及孕婦血液中之全部染色體之 DNA 片段數量，並定義該目標染色體 DNA 片段數量與該全部染色體 DNA 片段數量之比值為 y_k 。藉由比較受測者之 y_k 值與染色體無異常者之 y_k 值，即可得知受測者之胎兒染色體異常之機率。

【0007】 另一方面有另一種名為 NCV(Normalized chromosome value)的血液篩檢方法被提出。其係除了 y_k 以外，

再選定一參考染色體，且該參考染色體與該目標染色體係呈正相關之關係，且將該參考染色體 DNA 片段數量與該全部染色體 DNA 片段數量之比值定義為 y_R ，藉此，則可新得到一 S_k 值，該 S_k 值係為 y_k 與 y_R 之比值。

【0008】 舉例來說，因有研究指出，人類的第 9 對染色體係與第 21 對染色體血漿中游離 DNA 有著正相關的關係，故在篩檢唐氏症（21-三體綜合症，Down syndrome 或 Down's syndrome，或簡稱 T21）方面，係以第 21 對染色體做為目標染色體，而可以第 9 對染色體做為參考染色體。

【0009】 然而，無論是 Z-score 或是 NCV，其最大的問題即為其所得的結果為一機率值，其無法百分之百準確地篩檢出染色體是否為正常或異常，當孕婦對自身所測得的機率值不放心時，通常仍須以羊膜穿刺做再進一步之確認。

【0010】 此外，一般之母血篩檢可分為妊娠早期（第 10 至 13 週）施行以及妊娠中期（第 14 至 20 週）施行二者，而胎兒的小片段游離 DNA 於孕婦的血漿之比例係隨著孕婦的懷孕週數漸長而提高，可想而知的，在妊娠中期能取得較多胎兒的小片段游離 DNA，故於妊娠中期所做之母血篩檢較為準確。然而，對於產婦來說，必然是希望能夠越早確知胎兒之染色體是否正常。

【0011】 有鑑於此，本發明人潛心構思並更深入研究，終於發明出一種以全基因體趨勢來記分之非侵入性產前檢測方

法。

【發明內容】

【0012】 本發明提供一種以全基因體趨勢記分為基礎之非侵入性產前檢測方法，其主要目的是提供一種能在妊娠早期即可施行，且具有一定準確率之非侵入性產前篩檢。

【0013】 為達前述目的，本發明提供一種以全基因體趨勢記分為基礎之非侵入性產前檢測方法，其係用以檢測一待測孕婦之胎兒是否有體染色體為非整倍體，該檢測方法係包括下列步驟：(a)建立資料庫：取得至少一孕婦之血漿中各染色體游離 DNA 片段數量作為對照樣本，該孕婦及該孕婦之胎兒係無異常染色體數量，並藉此取得一 m_k 值，其中，該 m_k 值為第 k 對染色體之片段數量比率之平均值， $k=1、2、\dots、22$ ，且 $\sum_{k=1}^{22} m_k = 1$ ；取得血液樣本：取得該待測孕婦之血液樣本，並將血漿自該血液樣本分離；(b)取得樣本之各染色體游離 DNA 片段數量比例：自該待測孕婦之血漿取得待測孕婦及其胎兒之染色體數據 y_k ，該 y_k 值為該待測孕婦之第 k 對染色體之被讀取量相對於該待測孕婦之全部染色體被讀取量的比例；(c)取得 p 值：各該 p 值係包含計算各該 y_k 值分別對於各該 m_k 值之比值，其可包括一目標染色體之 y_k 值對應於該 m_k 值之比值以及至少一參考染色體之 y_k 值對應於該 m_k 值之比值；以及(d)分析 p 值：藉由比較各該 p 值之大小，確定該目標染色體是否為染色體非整倍體。

【0014】 本發明利用所提供的以全基因體趨勢記分為基礎之非侵入性產前檢測方法，可以獲得的功效在於：藉由比較待測孕婦之各該 p 值以及資料庫中之各該 p 值之大小，增加可比對之數據，以提高檢測之準確性；此外，由於可做為比較之數據較多，故即使於妊娠早期，孕婦血漿中的胎兒的小片段游離 DNA 較少時，本發明仍具有相當之準確性，以利孕婦早日得知胎兒之染色體是否正常；除此之外，本發明僅需取樣待測孕婦之血液樣本，為非侵入性之檢測，對於胎兒及孕婦來說，係為一安全可靠之檢測方法。

【0015】 有關本發明為達成上述目的，所採用之技術、手段及其他之功效，茲舉一較佳可行實施例並配合圖式詳細說明如后。

【圖式簡單說明】

【0016】

第 1 圖係本發明實施例之流程圖。

第 2 圖係本發明於臨床實驗之結果之示意圖。

第 3 圖係習知之 Z-score 法於臨床實驗之結果之示意圖。

第 4 圖係習知之 NCV 法於臨床實驗之結果之示意圖。

第 5 圖係本發明與另二習知方法比較之模擬數據示意圖。

【實施方式】

【0017】 在本發明被詳細描述之前，要注意的是在以下的說明內容中，類似的元件是以相同的編號來表示。

【0018】 為使 貴審查委員對本發明之目的、特徵及功效能夠有更進一步之瞭解與認識，以下茲請配合【圖式簡單說明】詳述如后：

【0019】 本發明以全基因體趨勢記分為基礎之非侵入性產前檢測方法的較佳實施例如第 1 圖所示，其係用以檢測一待測孕婦之胎兒是否有體染色體為非整倍體，該檢測方法係包括下列步驟：

【0020】 (a)建立資料庫：取得至少一孕婦之血漿中各染色體游離 DNA 片段數量作為對照樣本，該孕婦及該孕婦之胎兒係無異常染色體數量，並藉此取得一 m_k 值，其中，該 m_k 值為第 k 對染色體之片段數量比率之平均值， $k=1、2、\dots、22$ ，且 $\sum_{k=1}^{22} m_k = 1$ ；

【0021】 取得血液樣本：取得該待測孕婦之血液樣本，並將血漿自該血液樣本分離；

【0022】 (b)取得樣本之各染色體比例：自該待測孕婦之血漿取得待測孕婦及其胎兒之染色體數據 y_k ，該 y_k 值為該待測孕婦之第 k 對染色體之被讀取量相對於該待測孕婦之全部染色體被讀取量的比例；

【0023】 (c)取得 p 值：各該 p 值係包含計算各該 y_k 值分別對於各該 m_k 值之比值，其可包括一目標染色體之 y_k 值對應於該 m_k 值之比值以及至少一參考染色體之 y_k 值對應於該 m_k 值之比值；其中，依據所欲檢測之目標染色體不同，該目標染

色體可為第 13 對染色體、第 18 對染色體、第 21 對染色體，甚至其餘體染色體；以及

【0024】 (d)分析 p 值：藉由比較各該 p 值之大小，確定該目標染色體是否為染色體非整倍體。

【0025】 以上所述為本發明實施例主要構件及其組態說明。至於本發明實施例的使用方式及功效，請參閱第 2 圖所示，其係為本案發明人以 208 位孕婦所做之實際臨床實驗資料，其中，隨機選擇 55 位孕婦之染色體對照樣本做為資料庫，且該 55 位孕婦及該孕婦之胎兒係無異常染色體數量，並以此資料庫來檢測其它 124 位胎兒無異常染色體數量之孕婦、4 位胎兒為愛德華茲症候群(18-三體綜合症，或簡稱 T18)之孕婦 (T18)及 25 位胎兒為唐氏症(T21)之孕婦。此外，為了瞭解本發明能否適用於孕婦懷孕早期，血漿中的胎兒的小片段游離 DNA 較少時，故特別對 4 位懷有唐氏症的孕婦血漿 DNA 樣本進行連續稀釋，並針對 T21 做檢測後，其結果如圖中所示。圖中左側之數據(圖中記為 GWNS)為未稀釋前，以 GWNS 數值為 0.05 作為分界，可發現具有 T21 之實心圓形數據與其餘不具有 T21 之空心圓形(胎兒無染色體數量之異常)及三角形(胎兒為 T18)數據明顯地被分隔開，表示本發明之方法能可靠且明確地檢測出是否具有 T21，而圖中右方係為連續稀釋 T21 後之數據，其中 T21 之樣品範圍較被拉長，但可明顯知道，胎兒游離 DNA 濃度大於 3.9%之樣品可全數被正確判定為

T21。

【0026】 為了做為對照，請參閱第 3 圖及第 4 圖所示，其分別為與上述臨床實驗相同之 208 位孕婦以習知 Z-score 及 NCV 方法所得之數據圖。其中，請參閱第 3 圖所示，係以 Z-score 方法所得之數據，Z-score 方法在實際使用時，大約在妊娠 11 至 12 週時檢測，並以 Z-score 數值為 3 作為分界。圖中左側為未稀釋前之數據，其雖然空心圓形及三角形數據的非 T21 與實心圓形數據的 T21 稍微接近，但仍可明顯地將實心圓形數據與空心圓形及三角形數據區隔，但因為數據接近，故較有誤判之可能；而請參閱右側之連續稀釋後之數據，可發現實心圓形數據在大於 3.9%至 5.5%方能被正確判讀為 T21，此也是在實際檢測時，須在胎兒的小片段游離 DNA 較多時才能夠具有較高準確性之原因。

【0027】 請參閱第 4 圖所示，此則為利用 NCV 方法所得之數據，NCV 方法在實際使用時，大約在妊娠中期時檢測，並以 NCV 數值為小於 2.5 及大於 4 作為正常與異常分界。圖中左側為未稀釋前之數據，其空心圓形數據的非 T21 與實心圓形數據的 T21 已有部份混雜在一起，故在 2.5 至 4 之區間內，已難以將空心圓形數據及實心圓形數據做區隔；而請參閱右側之連續稀釋後之數據，可發現實心圓形數據在胎兒游離 DNA 濃度小於 5.5%至 7.7%之間具有明顯之模糊地帶，必須大於該數值方能被檢出。無法確定檢測結果之模糊範圍較

Z-score 方法更大。

【0028】 由上述三實驗數據可得知，在妊娠中期或晚期，目前技術已有相當準確之非侵入性檢測方法，如 Z-score。但對於孕婦或其家屬來說，必然是希望能越早確之胎兒是否具有 T21 或其他染色體數量異常。但隨著妊娠期間之提早，代表著孕婦血漿中的胎兒的小片段游離 DNA 亦較少，故習知之方法在越早施行檢測時，係無法保證其具有穩定之準確率。

【0029】 請參閱第 5 圖所示，為了瞭解本發明之方法是否能於妊娠早期有效地檢測出 T21 或其他染色體數量異常，因此，本案發明人將從 64 位胎兒無異常染色體數量及 22 位胎兒為 T21 異常之孕婦位孕婦之樣本所獲得的 NGS 定序結果，進行 iso-quality curves 比較。並分別以 Z-score 方法、NCV 方法以及本案之方法，檢測在特定的檢測準確性下，各個方法所需要的 NGS DNA 定序量與所需胎兒 DNA 濃度比例關係而做成圖中之折線圖。如圖中所示，橫軸為胎兒 DNA 於樣本中之濃度比例，比例越少時，可視為在妊娠早期所取得之孕婦樣本；反之，胎兒 DNA 於樣本中的濃度比例越大時，則可視為妊娠中後期所取得之孕婦樣本；縱軸則表示在某一胎兒 DNA 濃度比例時，以某一方法為達一定之檢測準確性時所需讀取之 NGS DNA 定序量。如圖中所示，可以發現以本案之方法(圖中記為 GWNS)，在數線中永遠是低於其他二方法，因此可得知，本案之方法在檢測 T21 或其他染色體數量異常方面，

在相同之妊娠期間，且相同之 NGS DNA 定序量的情況下，本案之方法係為最準確之方法。

【0030】 由上述得知本發明確實符合「具有產業可利用性」、「新穎性」、「進步性」，爰依法提出發明專利申請，祈請惠予審查並早日賜准專利，實感德便。

【符號說明】

無

104年2月13日修(更)正本

104年2月13日修正替換頁

申請專利範圍

1. 一種以全基因體趨勢記分為基礎之非侵入性產前檢測方法，其係用以檢測一待測孕婦之胎兒是否有體染色體為非整倍體，該檢測方法係包括下列步驟：

(a)建立資料庫：取得至少一孕婦之血漿中各染色體游離DNA片段數量作為對照樣本，該孕婦及該孕婦之胎兒係無染色體數量之異常，並藉此取得一 m_k 值，其中，該 m_k 值為第 k 對染色體之片段數量比率之平均值， $k=1、2、\dots、22$ ，且

$$\sum_{k=1}^{22} m_k = 1;$$

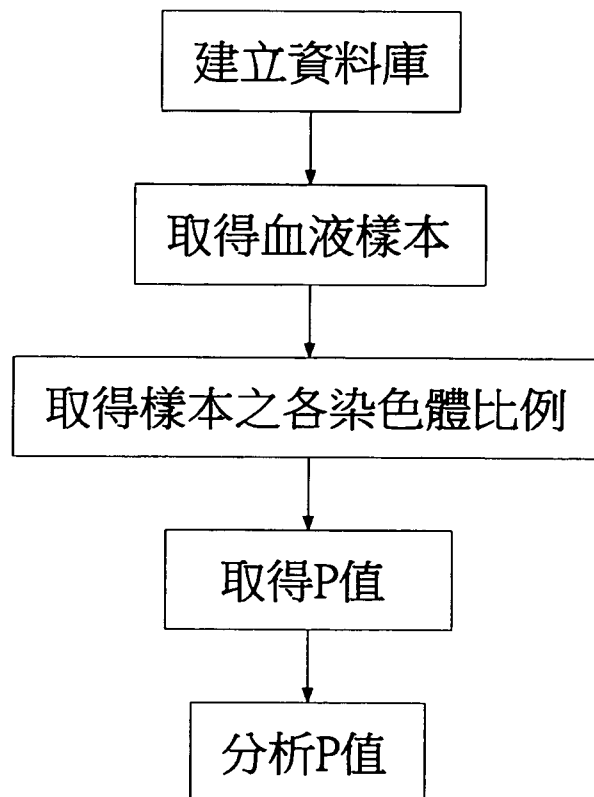
(b)取得樣本之各染色體比例：自該待測孕婦之血漿取得待測孕婦及其胎兒之染色體數據 y_k ，該 y_k 值為該待測孕婦之第 k 對染色體之被讀取量相對於該待測孕婦之全部染色體被讀取量的比例；

(c)取得 p 值：各該 p 值係包含計算各該 y_k 值分別對於各該 m_k 值之比值；以及

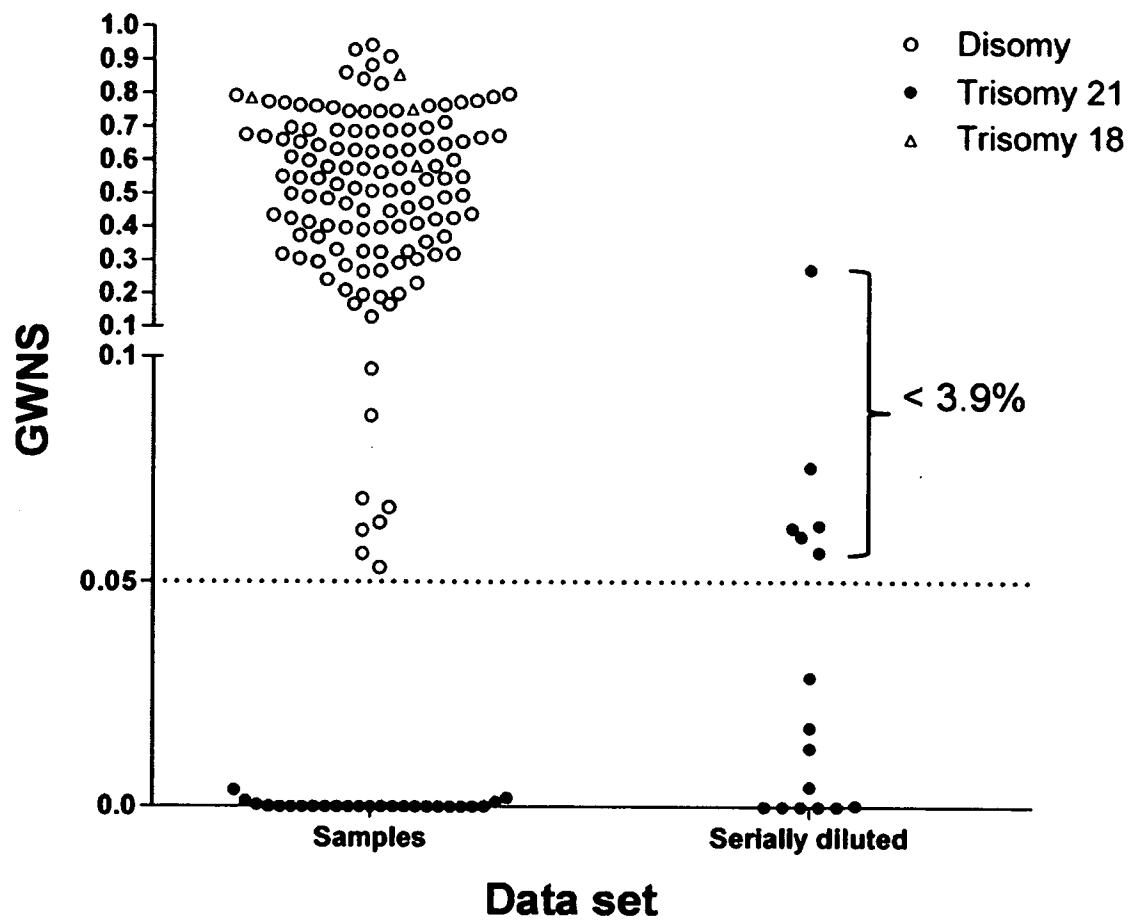
(d)分析 p 值：藉由比較各該 p 值之大小，確定該目標染色體是否為染色體非整倍體。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之以全基因體趨勢記分為基礎之非侵入性產前檢測方法，其中，該目標染色體係選自於第 13 對染色體、第 18 對染色以及第 21 對染色體所組成之群組之其中之一者。

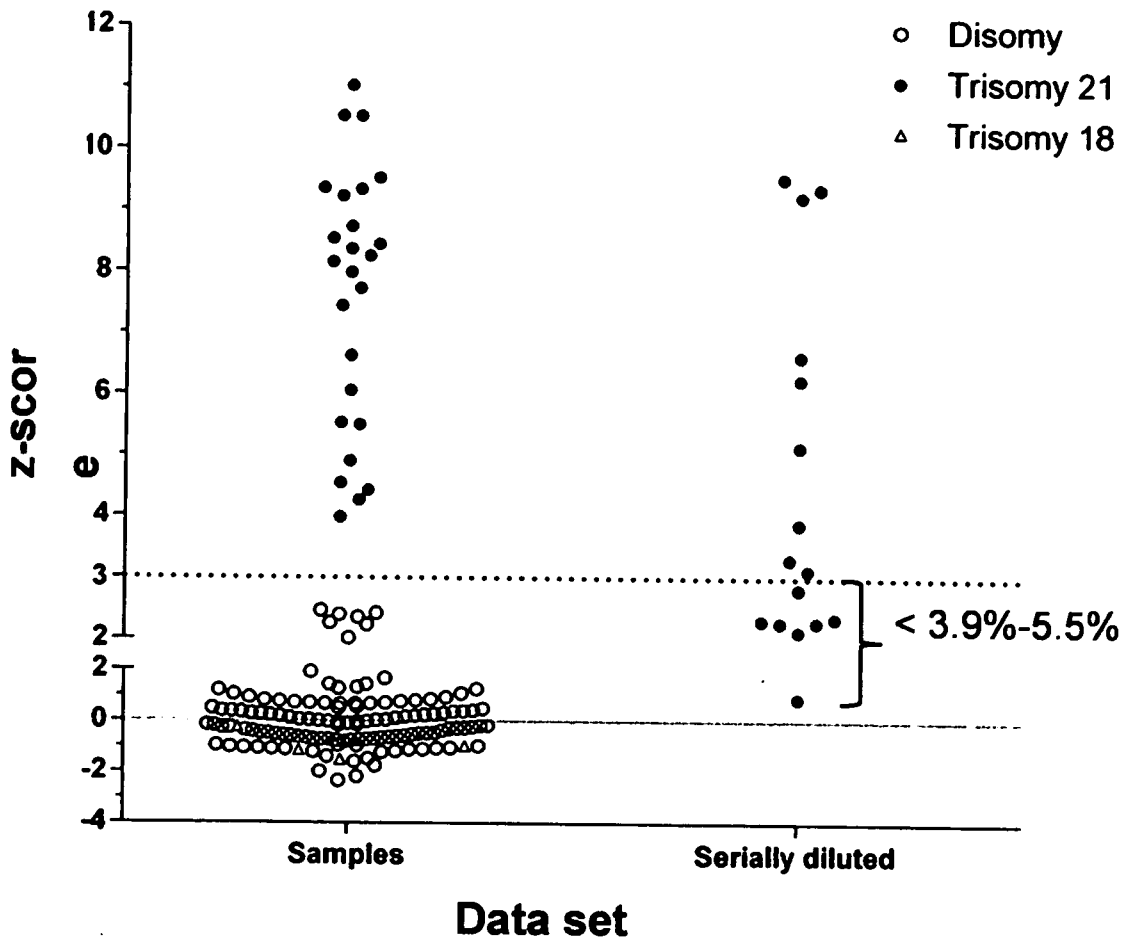
圖式



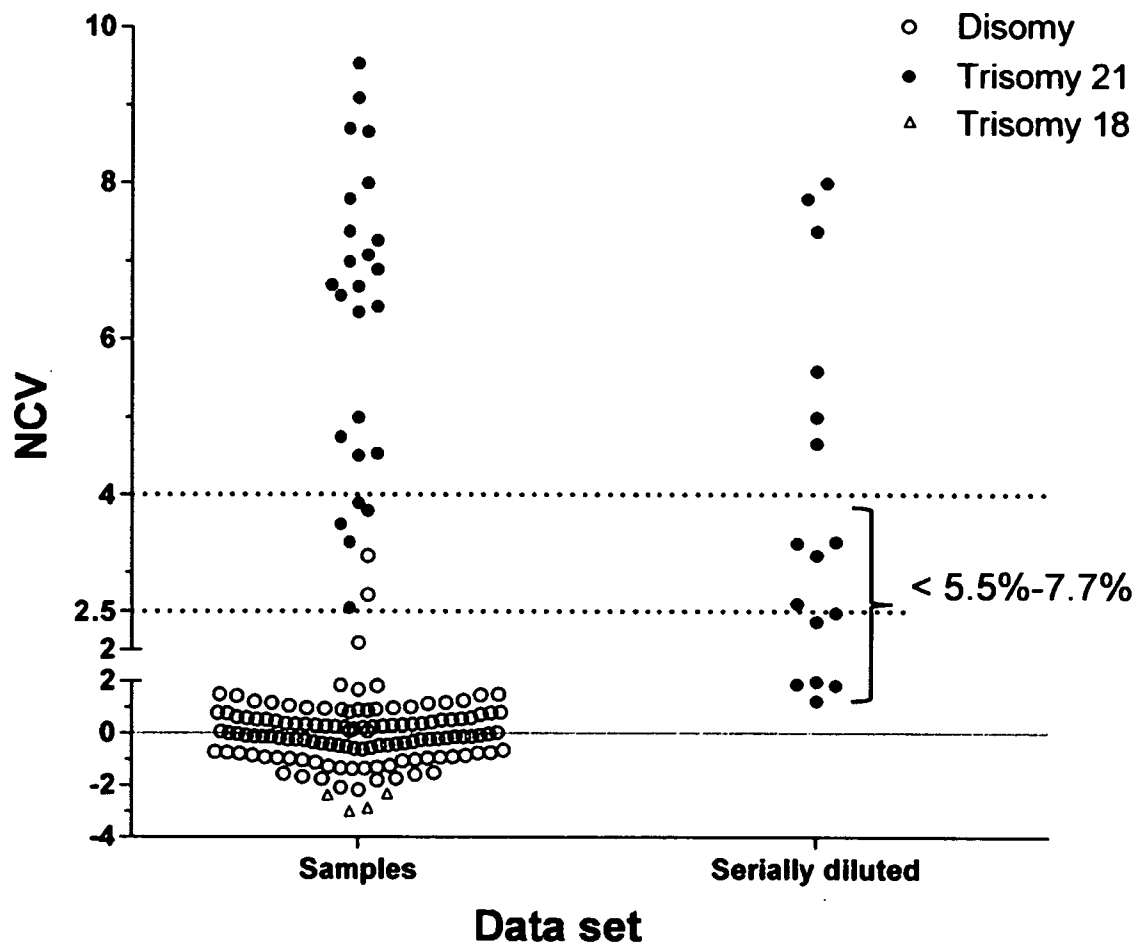
第1圖



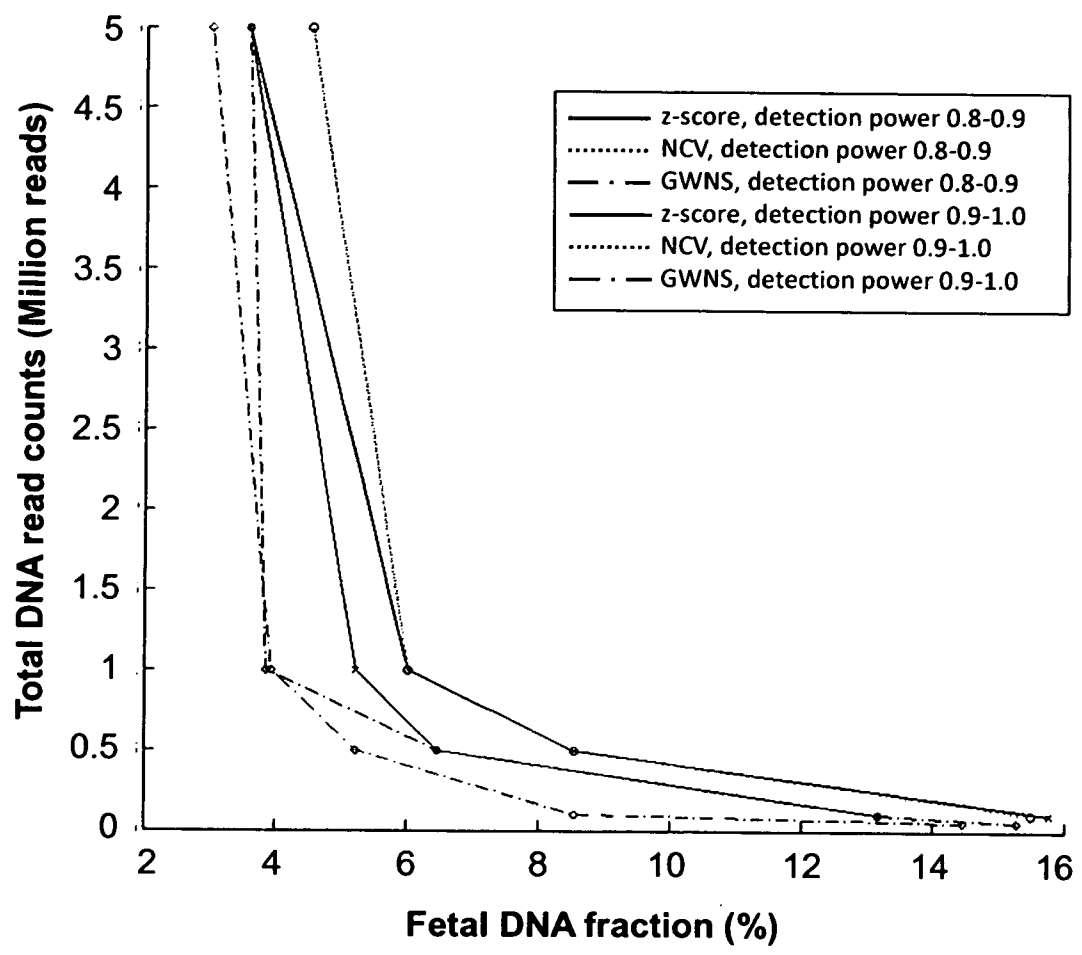
第 2 圖



第 3 圖



第 4 圖



第 5 圖