



诺辉健康  
NEW HORIZON HEALTH

香港交易所上市公司(6606.HK)

改变生命的轨迹

# cfDNA甲基化在癌症筛查和MRD中的应用

马士清

2022年09月16日



香港交易所上市公司 (6606.HK)

# 中国癌症居家筛查市场的 开创者和领跑者

---



表观遗传学

Part 1

DNA甲基化

Part 2

MRD

Part 3

总结

Part 4



CONTENTS



# 癌症常见筛查技术

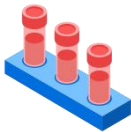
技术手段	检测对象	适用阶段	诊断标准	优点	缺点
液体活检	2-10ml外周血	1, 2, 3, 4	数值超过参考值, 或与癌症靶标基因匹配即判定阳性	可用于肿瘤的早期诊断和定位	捕获技术要求高, 成本昂贵
					个体化差异大
				可追踪治疗过程	依赖于肿瘤基因组的认知完善
穿刺活检	病灶组织	2	分子检测, 病理实验	准确性高	有创, 操作难度大, 患者接受度低
					加大肿瘤转移风险
医学影像	病灶怀疑位置	1, 3, 4	组织密度发生变化	准确性高	可观测肿瘤最小尺寸为5 mm, 此时肿瘤细胞数高达 $10^9$
肿瘤标记物	10ml外周血	1, 3, 4	肿瘤生殖或机体应答产生的物质, 以蛋白质为主	传统检测手段	假阴性、假阳性率较高

注： 1.早期筛查；2.指导治疗方案（诊断分型）；3.治疗监测；4.复发监控





# 液体活检技术



**循环肿瘤细胞(CTC):**因自发或者诊疗操作由原发或转移肿瘤中，进入外周血液循环中的肿瘤细胞。可在基因组、转录组、蛋白组和代谢组水平分析CTC特性，在癌症的诊断和治疗领域拥有广阔的发展潜力

**检测难度:**难。捕获率低、灵敏度差。

**肿瘤细胞外泌体(Exosomes):**即肿瘤细胞脱落的囊泡，携带肿瘤细胞的DNA、RNA和蛋白质等。介导肿瘤细胞增生、肿瘤微环境血管的形成、肿瘤细胞的免疫耐受和化学抵抗，且其miRNA在肿瘤中有重要应用

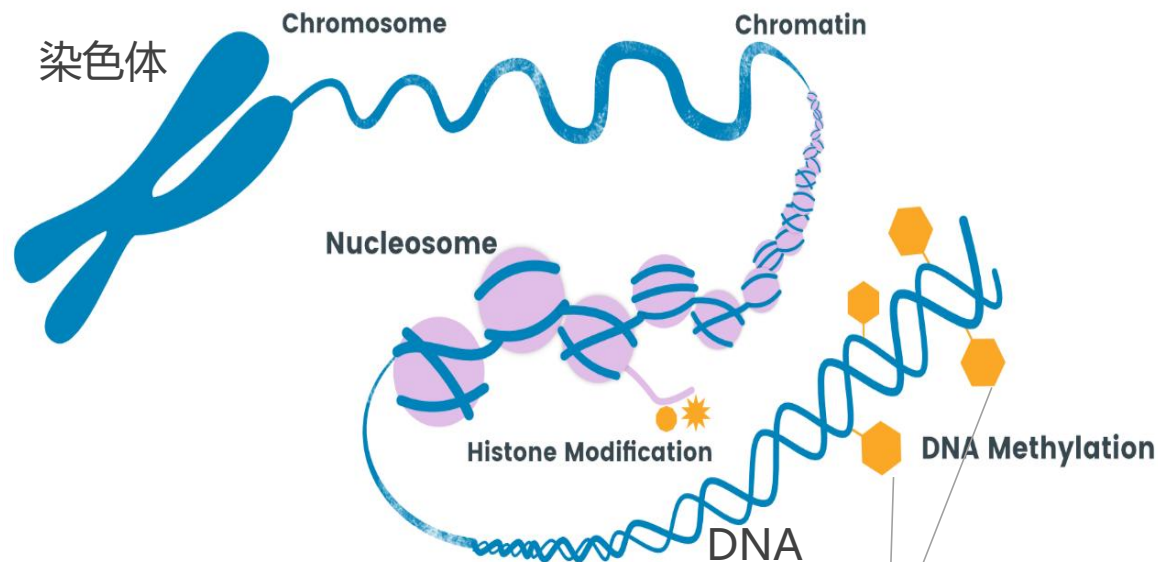
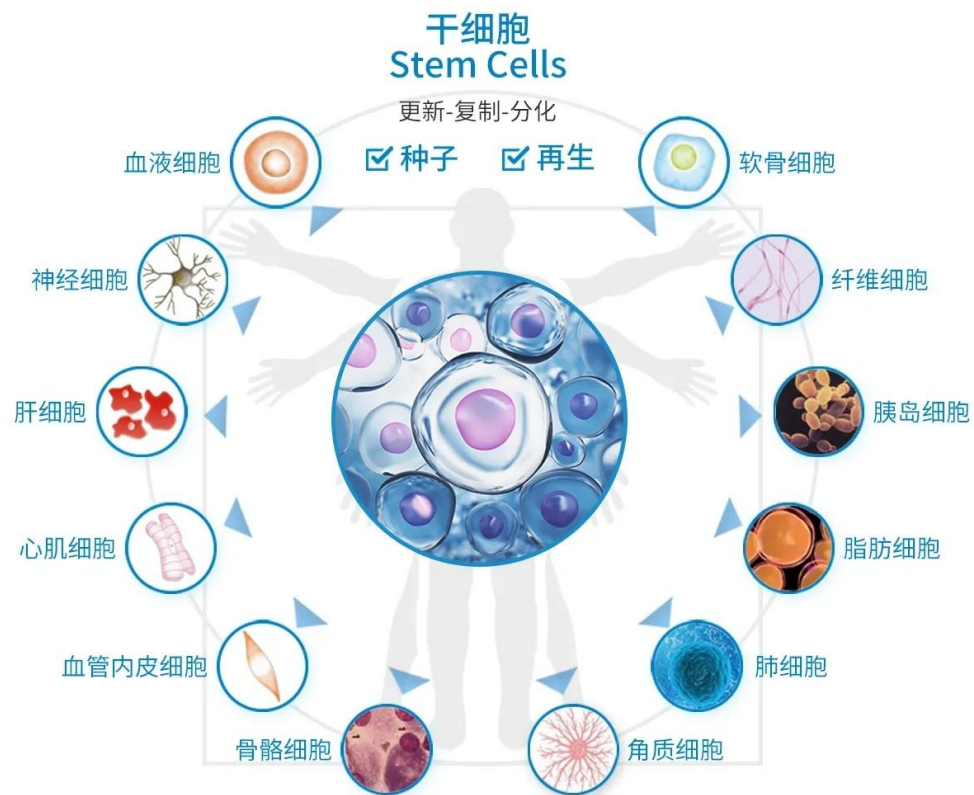
**检测难度:**较难。起步阶段，技术非常不成熟。**优势:**稳定性强，可长期储存。

**循环肿瘤DNA(cfDNA):**坏死或者凋亡的肿瘤细胞释放到外周血中的肿瘤DNA片段。可以通过特定的PCR引物设计，或全基因组测序后比对已知肿瘤基因突变库进行超早期诊断或者肿瘤定位

**检测手段:**易。较为成熟的技术手段，技术依赖肿瘤基因组认知水平。



# 表观遗传学



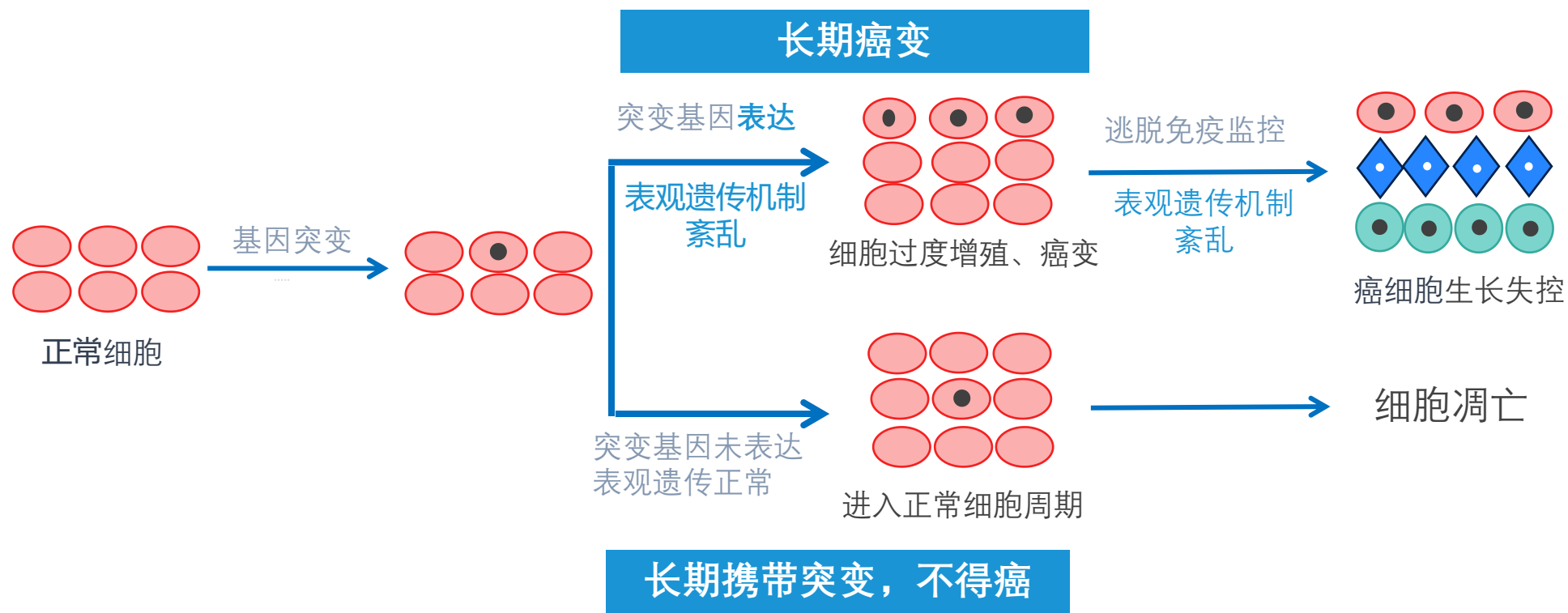
DNA表观遗传修饰，包括甲基化和各种衍生甲基化等

DNA上存在一系列**表观遗传修饰**（如**甲基化**、衍生甲基化），表观遗传在胚胎发育过程中告诉不同细胞该表达哪些基因和抑制哪些基因的表达，指引不同细胞向不同组织方向分化



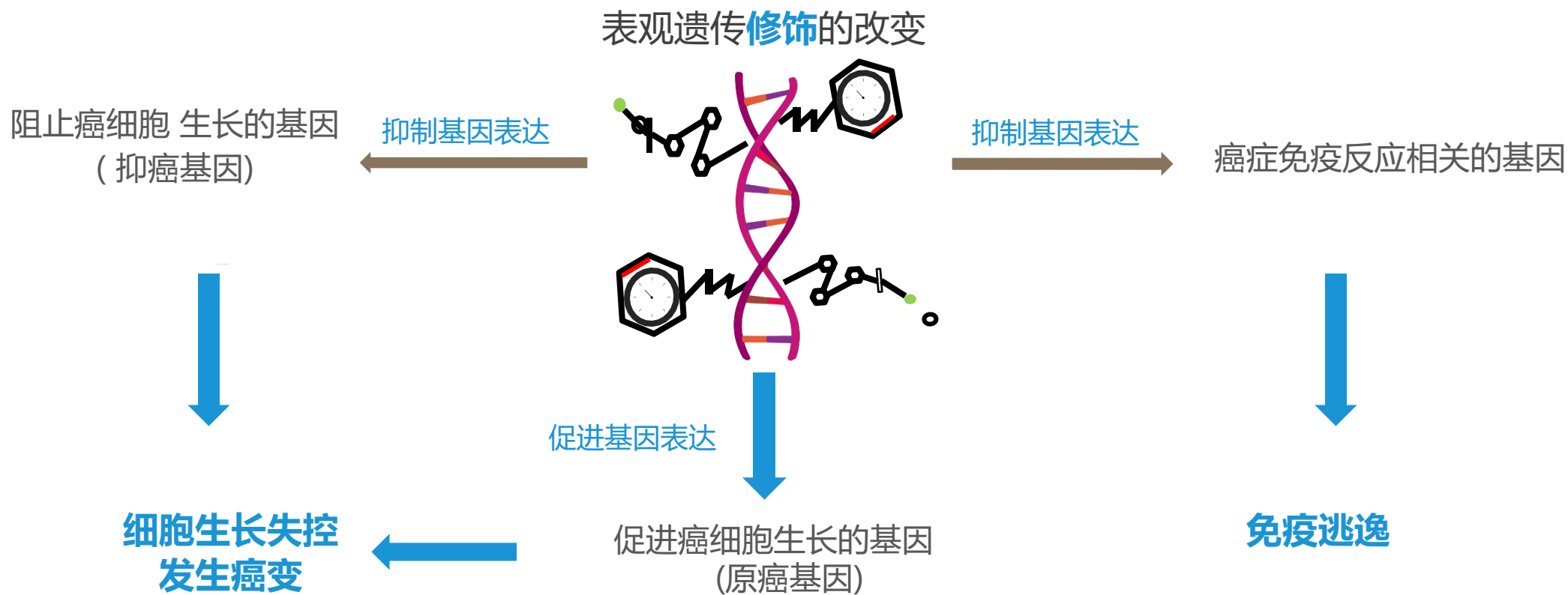
# 表观遗传学与癌症

检测基因的表达遗传修饰，反映基因的表达状态





# 表观遗传学与癌症





表观遗传学

Part 1

DNA甲基化

**Part 2**

MRD

Part 3

总结

Part 4

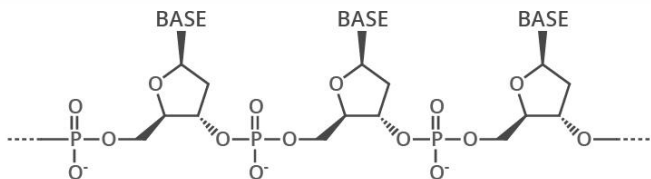


CONTENTS



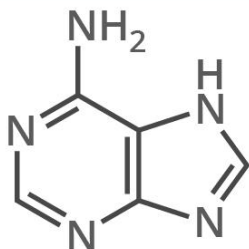
# 什么是甲基化

## THE SUGAR PHOSPHATE 'BACKBONE'

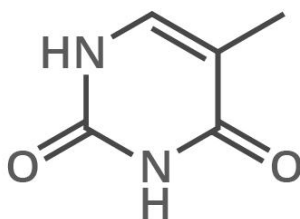


DNA is a polymer made up of units called nucleotides. The nucleotides are made of three different components: a sugar group, a phosphate group, and a base. There are four different bases: adenine, thymine, guanine & cytosine.

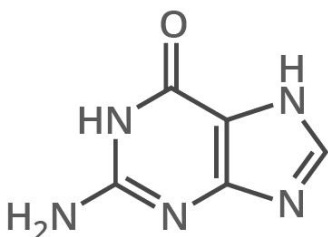
### A ADENINE



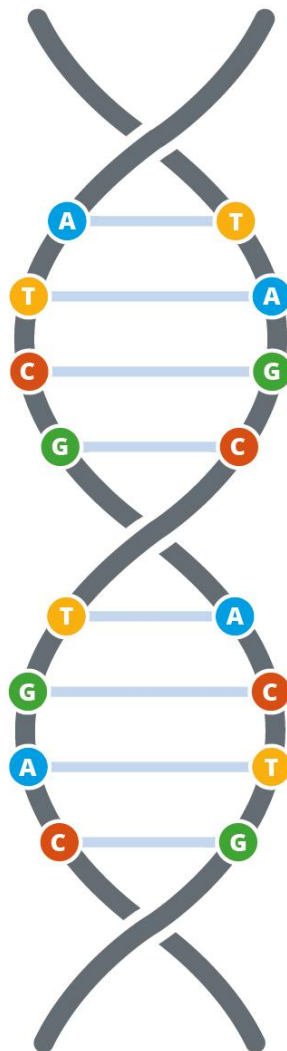
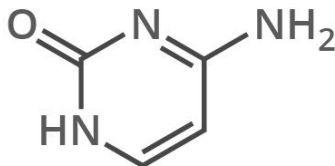
### T THYMINE



### G GUANINE

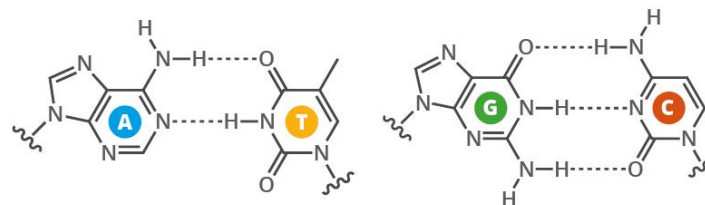


### C CYTOSINE



## WHAT HOLDS DNA STRANDS TOGETHER?

DNA strands are held together by hydrogen bonds between bases on adjacent strands. Adenine (A) always pairs with thymine (T), whilst guanine (G) always pairs with cytosine (C).



## FROM DNA TO PROTEINS



The bases along a single strand of DNA act as a code. The letters form three letter 'words', or codons, which code for different amino acids - the building blocks of proteins.

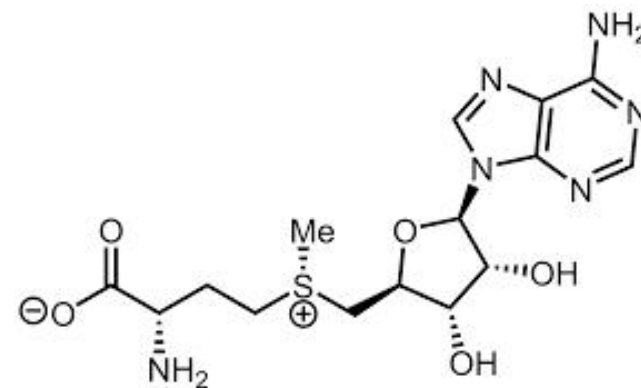
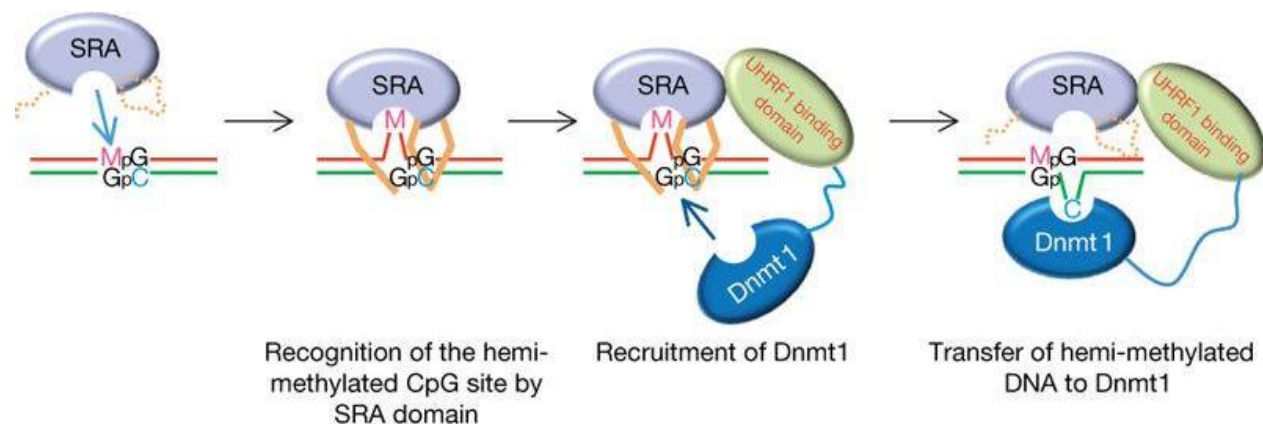
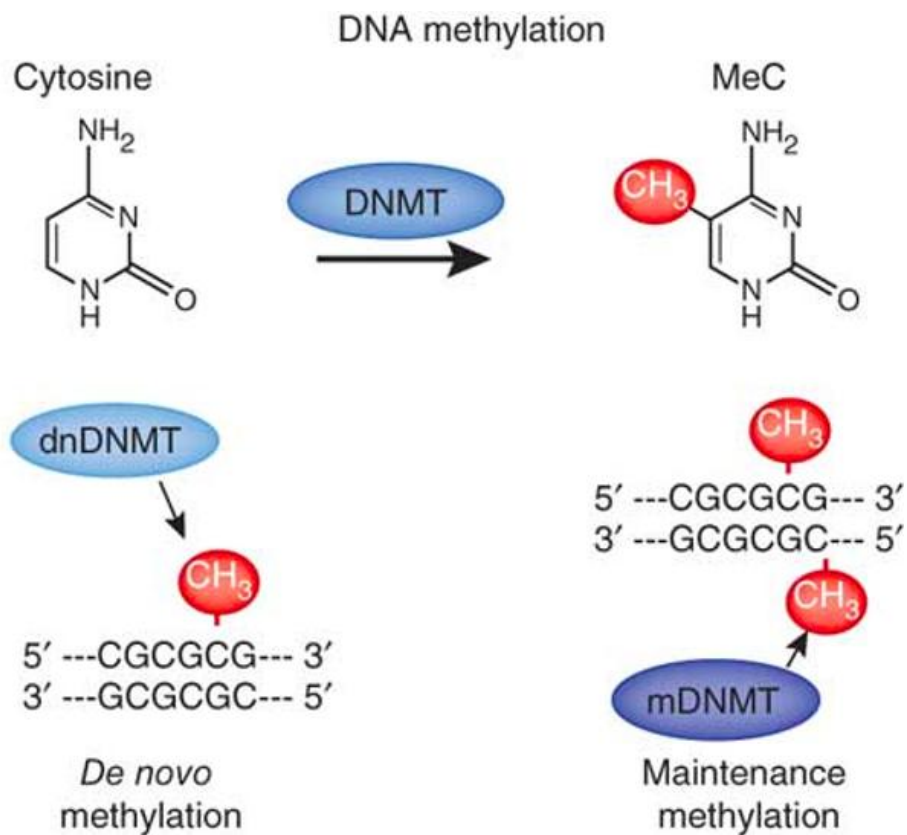
An enzyme, RNA polymerase, transcribes DNA into mRNA (messenger ribonucleic acid). It does this by splitting apart the two strands that form the double helix, then reading a strand and copying the sequence of nucleotides. The only difference between the RNA and the original DNA is that in the place of thymine (T), another base with a similar structure is used: uracil (U).

DNA SEQUENCE	T	T	C	C	T	G	A	A	C	C	C	G	T	T	A
mRNA SEQUENCE	U	U	C	C	U	G	A	A	C	C	C	G	U	U	A
AMINO ACID	Phenylalanine			Leucine			Asparagine			Proline			Leucine		

In multicellular organisms, the mRNA carries genetic code out of the nucleus, to the cell's cytoplasm. Here, protein synthesis takes place. 'Translation' is the process of converting turning the mRNA's 'code' into proteins. Molecules called ribosomes carry out this process, building up proteins from the amino acids coded for.



# 甲基化的结构与产生



**S- 腺苷甲硫氨酸**

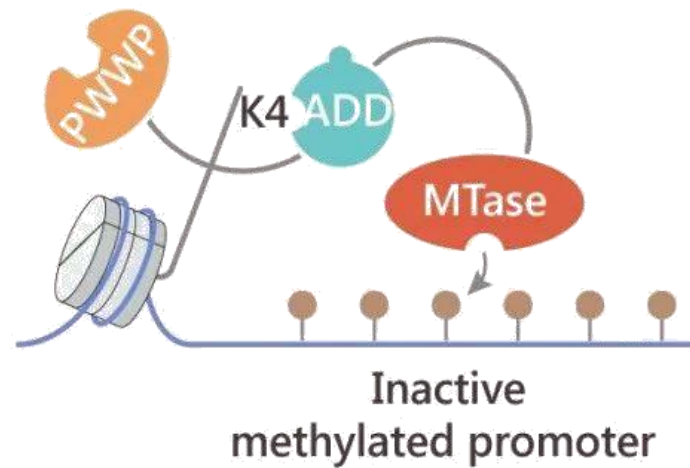
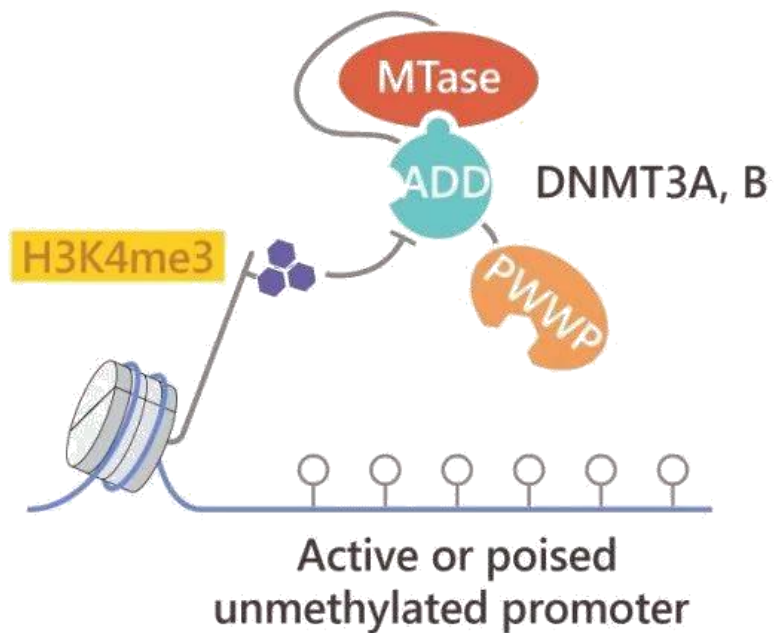
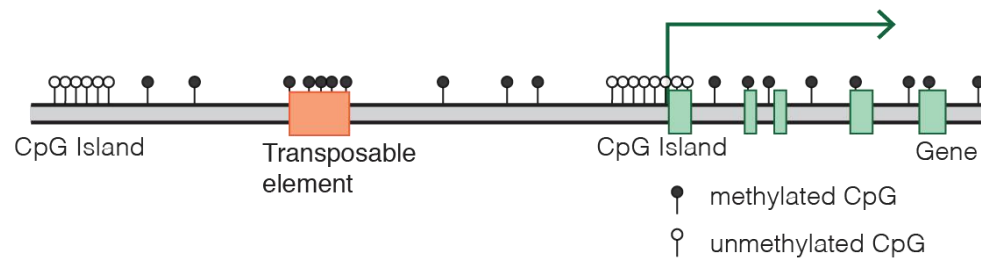
Arita et al., 2008, *Nature*  
Day and Sweatt, *Nat Neuro*, 2010



# 甲基化的分布

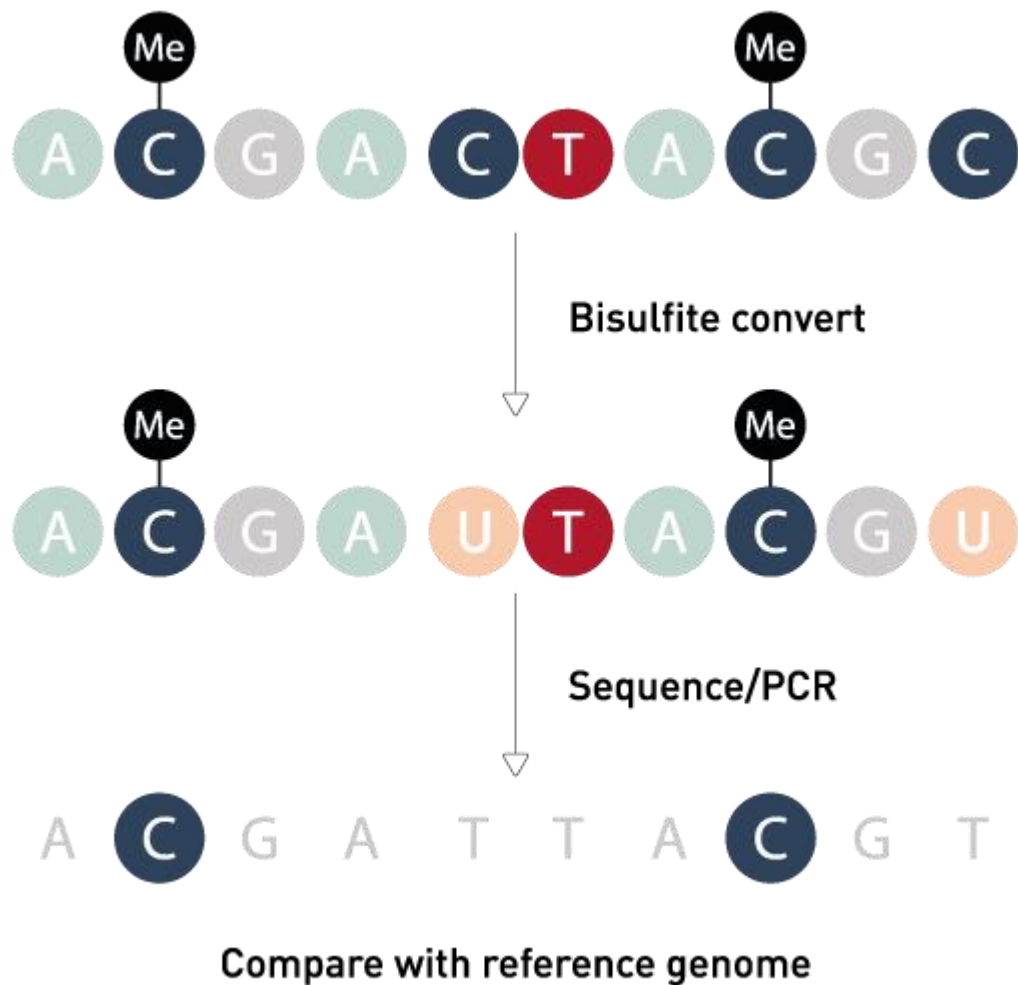


Typical mammalian DNA methylation landscape

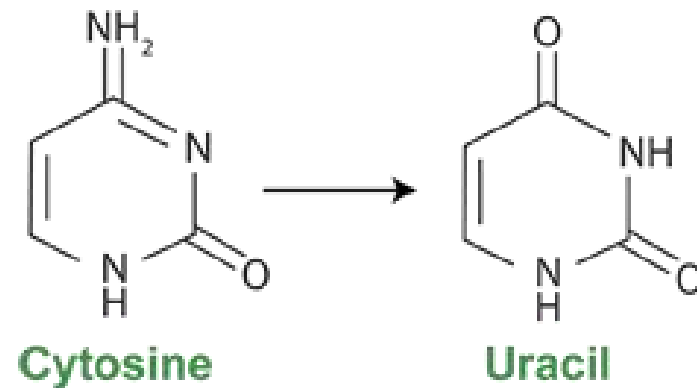




# 甲基化的检测技术



## 亚硫酸氢盐转化

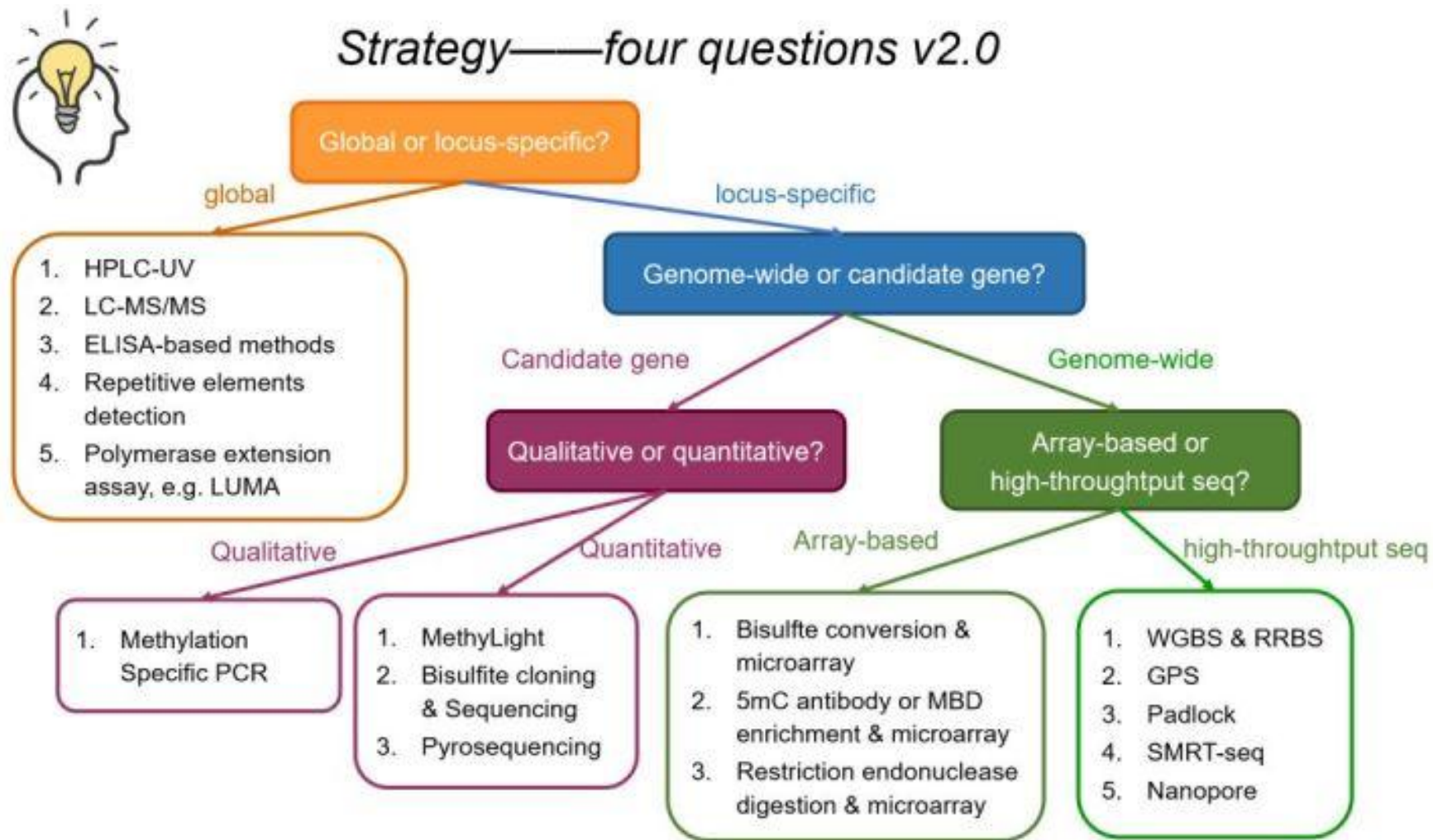


KRAS 基因突变及BMP3/NDRG4 基因甲基化  
和便隐血联合检测试剂盒  
(PCR 荧光探针法-胶体金法)



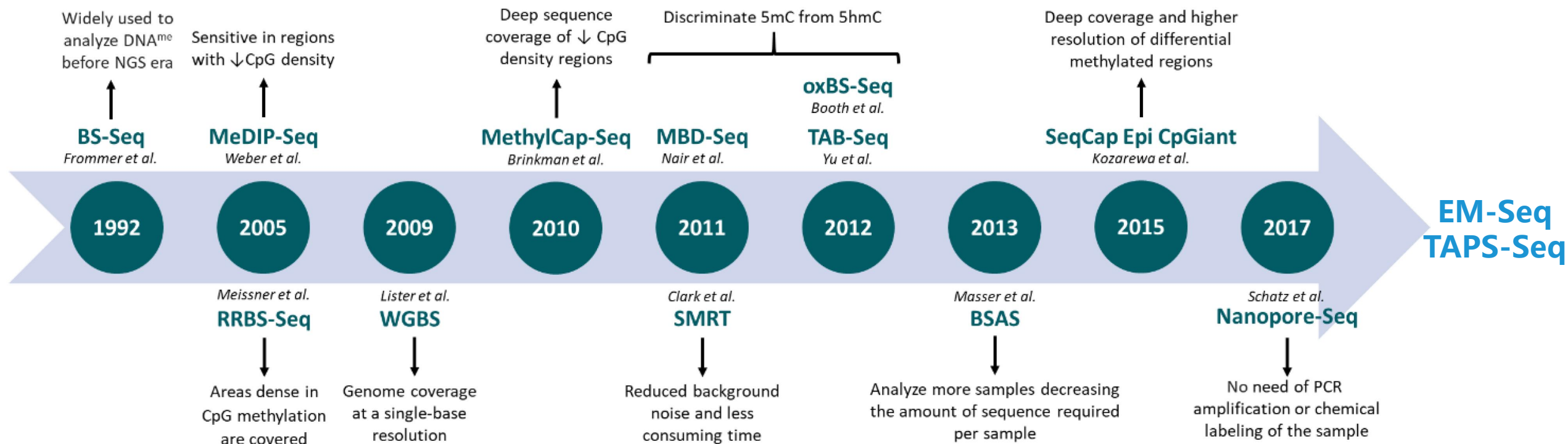


# 甲基化的检测技术





# NGS检测技术发展线

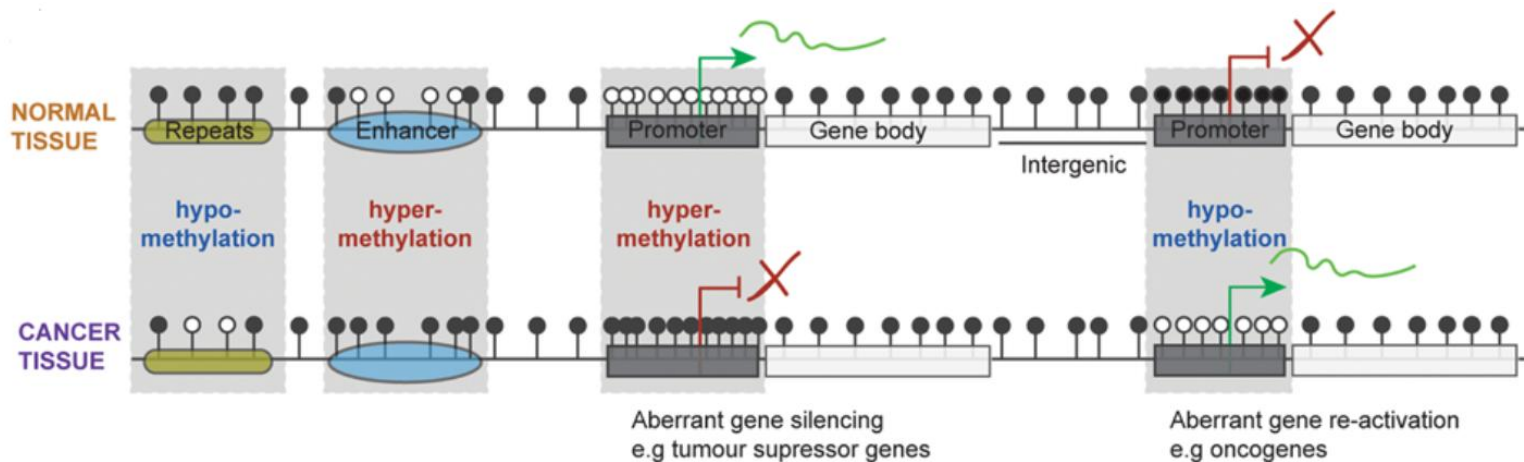


Carmen et al., 2018, *Genes*



# 甲基化信号在癌症检测中优于突变

- DNA甲基化参与细胞功能调节，人基因组约28 Million的CpG中有70%~80%的胞嘧啶被甲基化
- DNA甲基化和多种人类疾病密切相关，包括癌症



发生早

位置可预测

变化幅度大

数目多

行为共聚集

组织可溯源

早期结直肠癌

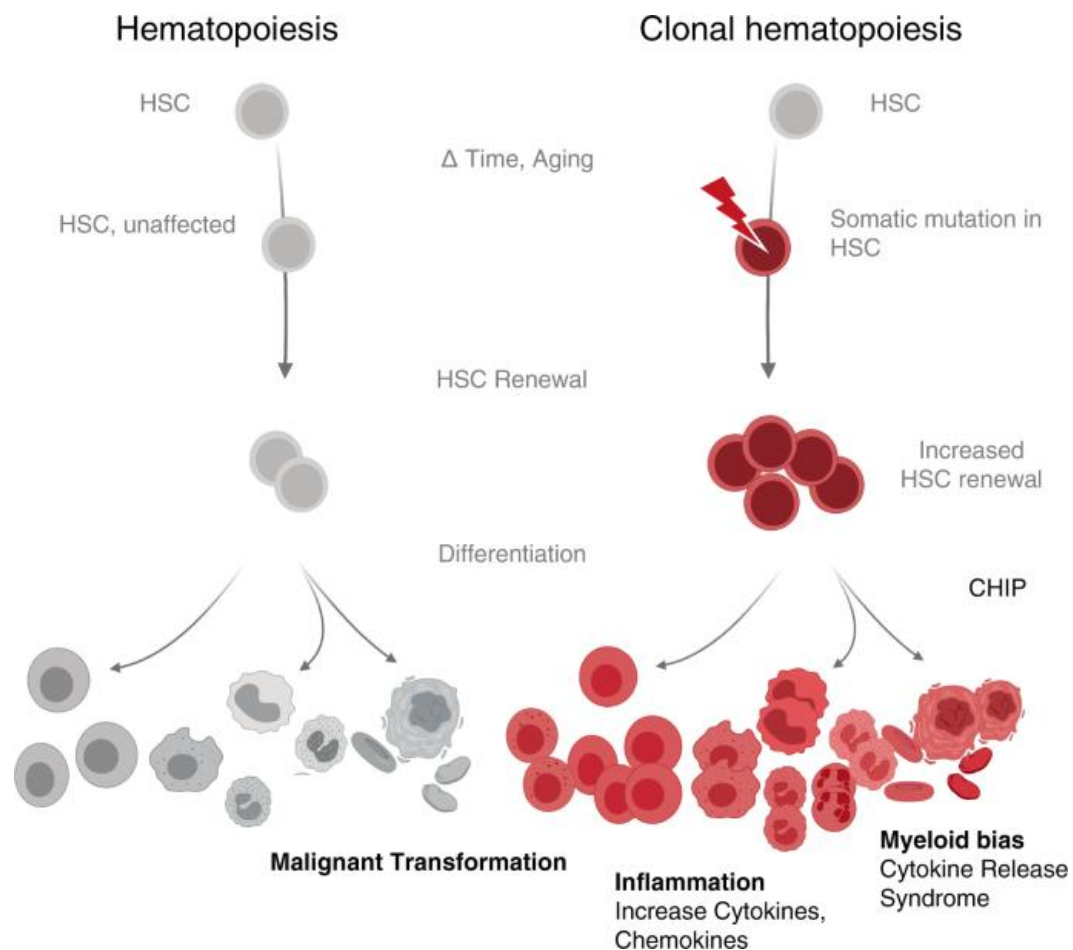
驱动基因突变  
3-6个

乘客基因突变  
33-66个

甲基化位点改变  
约2000个



# 血液基因突变检测易受克隆性造血的干扰




- 突变丰度低，90%的克隆性造血丰度<1%；
- 克隆性造血的负荷与年龄的增长呈正相关；
- 正常人和患者之间通常没有显著差异，且具有个体特异性，因此必须通过同深度配对白细胞进行过滤；
- 克隆性造血带有的基因变异一般是非恶性的。



# 研究进展

Hepatology

ORIGINAL ARTICLE

 OPEN ACCESS

Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosines in circulating cell-free DNA as a non-invasive approach for early detection of hepatocellular carcinoma

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

CANCER

**Circulating tumor DNA methylation profiles enable early diagnosis, prognosis prediction, and screening for colorectal cancer**

Can et al. *Clinical Epigenetics* 12(2012)112  
<https://doi.org/10.1186/s12148-020-00898-2>

Clinical Epigenetics

RESEARCH Open Access

Integrated epigenetic biomarkers in circulating cell-free DNA as a robust classifier for pancreatic cancer



nature materials

ARTICLES


PUBLISHED ONLINE: 9 OCTOBER 2017 | DOI: 10.1038/NMAT4997

**Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma**

nature medicine

BRIEF COMMUNICATION

<https://doi.org/10.1038/s41591-020-0933-4>



**Detection of renal cell carcinoma using plasma and urine cell-free DNA methylomes**

nature COMMUNICATIONS

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-020-17084-4> OPEN

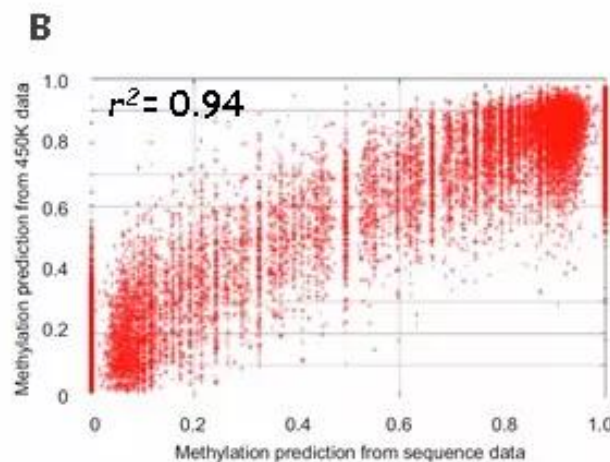
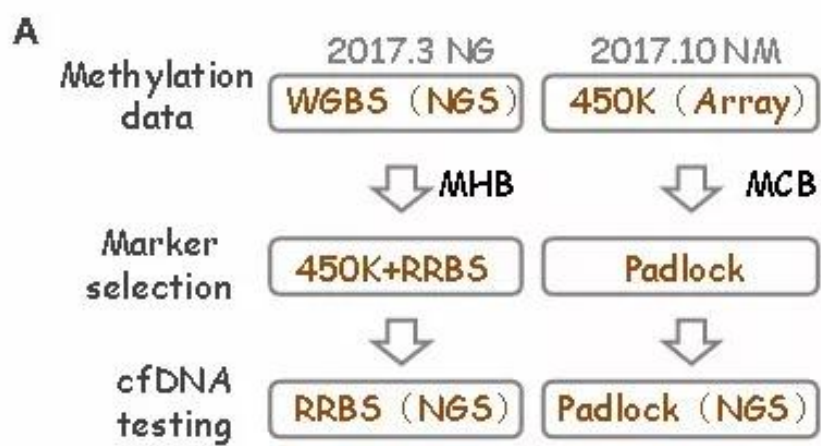
**Non-invasive early detection of cancer four years before conventional diagnosis using a blood test**





## 研究进展

时间	作者	杂志	意义
2017年3月	张鹄教授团队	Nature Genetics (NG)	利用更灵敏的算法配合组织甲基化模式开发的无创诊断技术， 可以检测并定位肿瘤
2017年10月	张康教授和 徐瑞华教授团队	Nature Materials (NM)	报道了一项更大规模的肝癌诊断和预后研究，与NG文章的结论相互印证，该研究成果就像是破译了肿瘤的特异指纹，使得 肝癌无处遁形





# Grail研发技术路线对比

## 基于超深度测序的靶向突变检测:

通过检测到血液游离DNA中明确的体细胞突变位点作为阳性信号，采用超高深度测序（6000X），并配合对克隆性造血突变的过滤

## 全基因组甲基化检测:

通过检测到血液游离DNA中有别于正常分布的甲基化谱作为阳性信号，采用全基因组甲基化检测，中等深度测序（~200X）

## CNV检测:

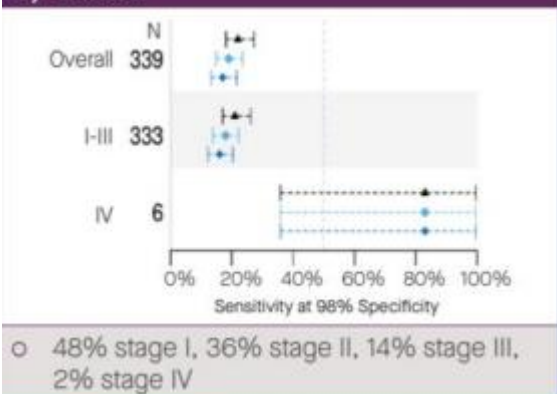
通过检测到血液游离DNA中有别于正常分布的CNV谱作为阳性信号，采用WGS全基因组测序，~50X



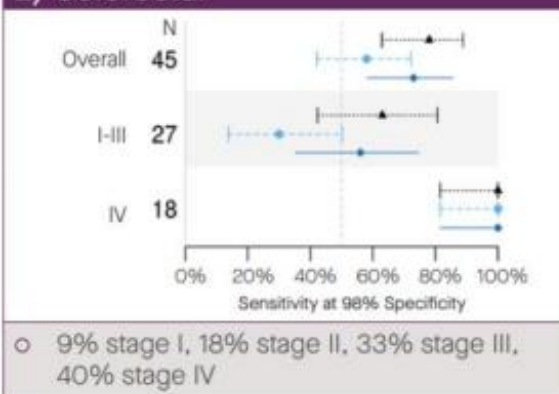
# DNA甲基化敏感性更佳

◆ Targeted ● WGS ▲ Methylation

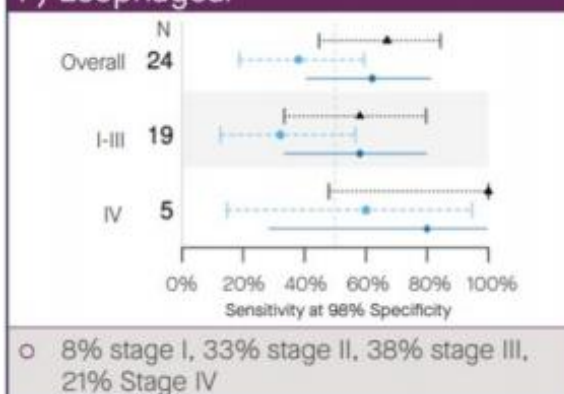
## C) Breast



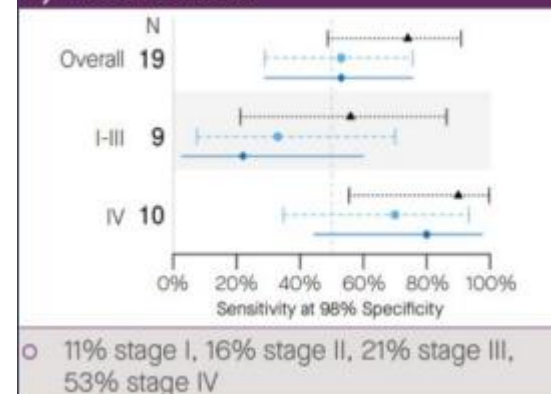
## E) Colorectal



## F) Esophageal

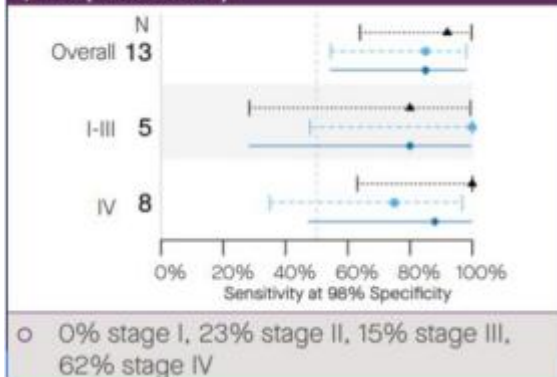


## H) Head & Neck

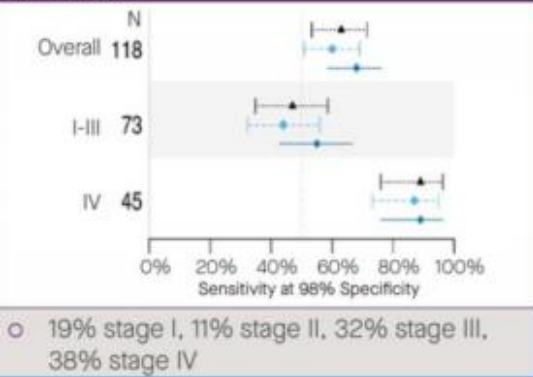


大多数癌症中的敏感性：DNA甲基化 > 突变 > CNV

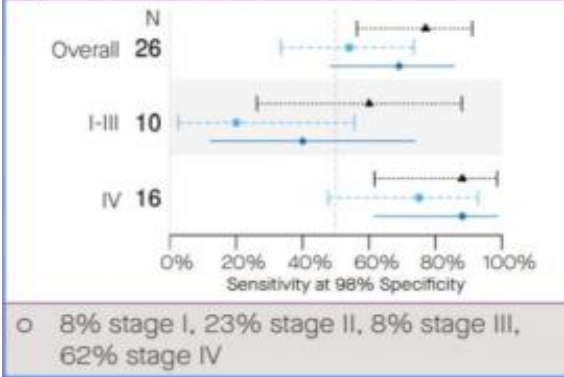
## I) Hepatobiliary



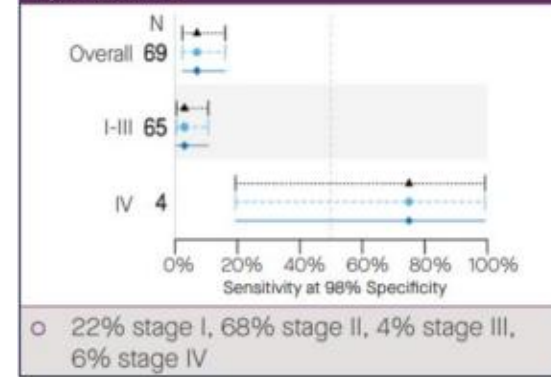
## J) Lung



## O) Pancreas



## P) Prostate





# Grail-实验结果

A

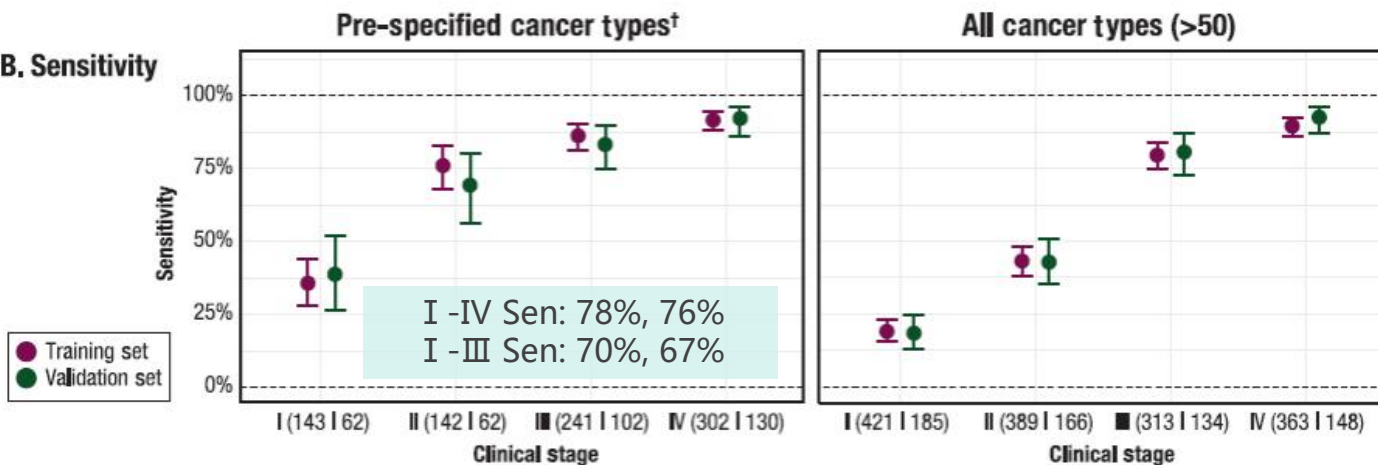
## A. Specificity

	<i>N</i>	Specificity
Training set	1521	99.8% (99.4–99.9%)
Validation set	610	99.3% (98.3–99.8%)

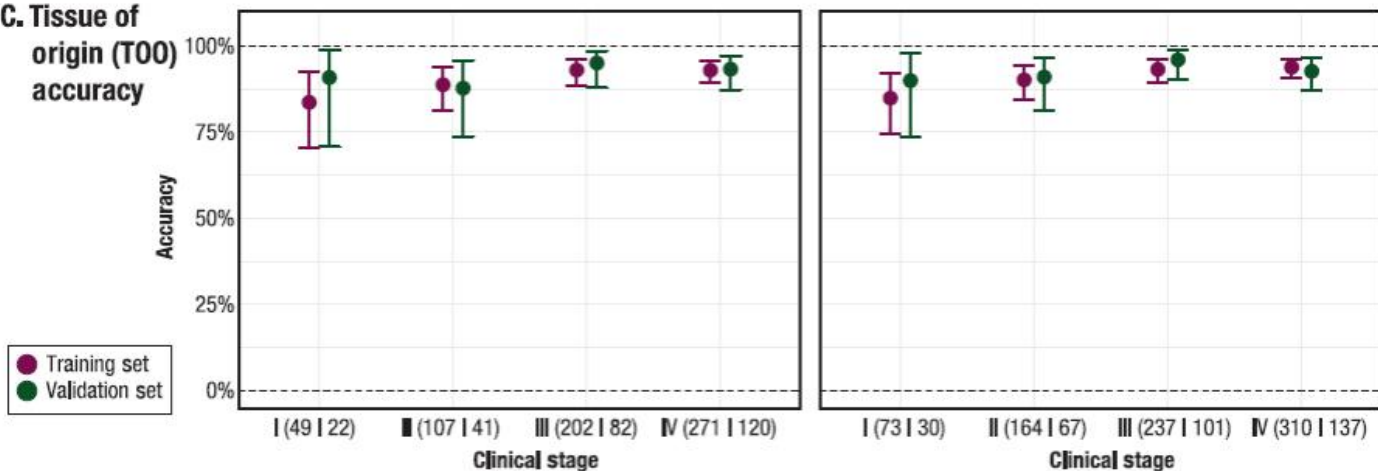
## B. Sensitivity

CCGA study  
15 254 patients  
(44% non  
50+ cancer)

\*As defined  
Staging Manual  
(supplemental)



## C. Tissue of origin (T00) accuracy



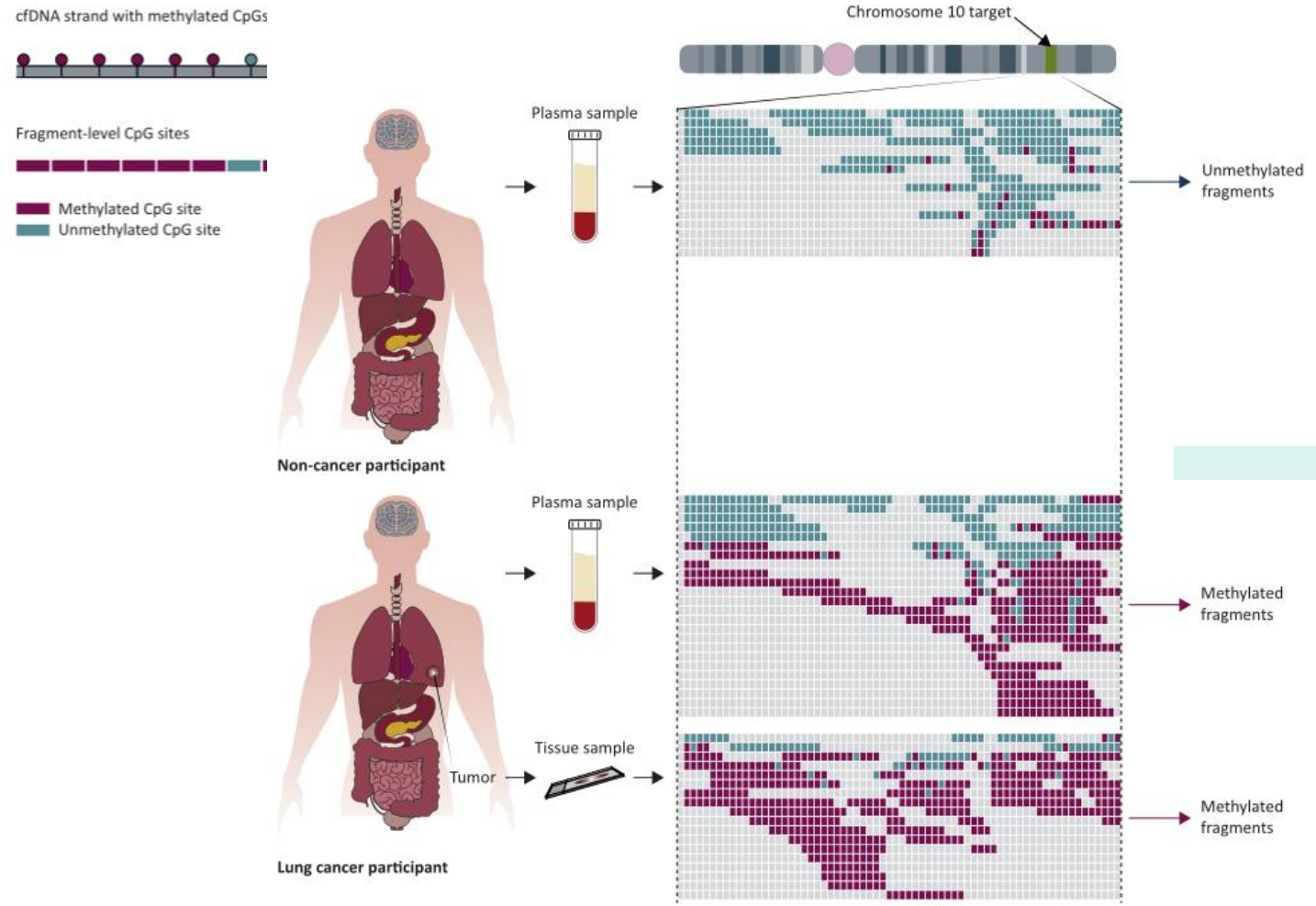
methylation assay  
active methylation regions

methylation assay  
on of targeted methylation classifier

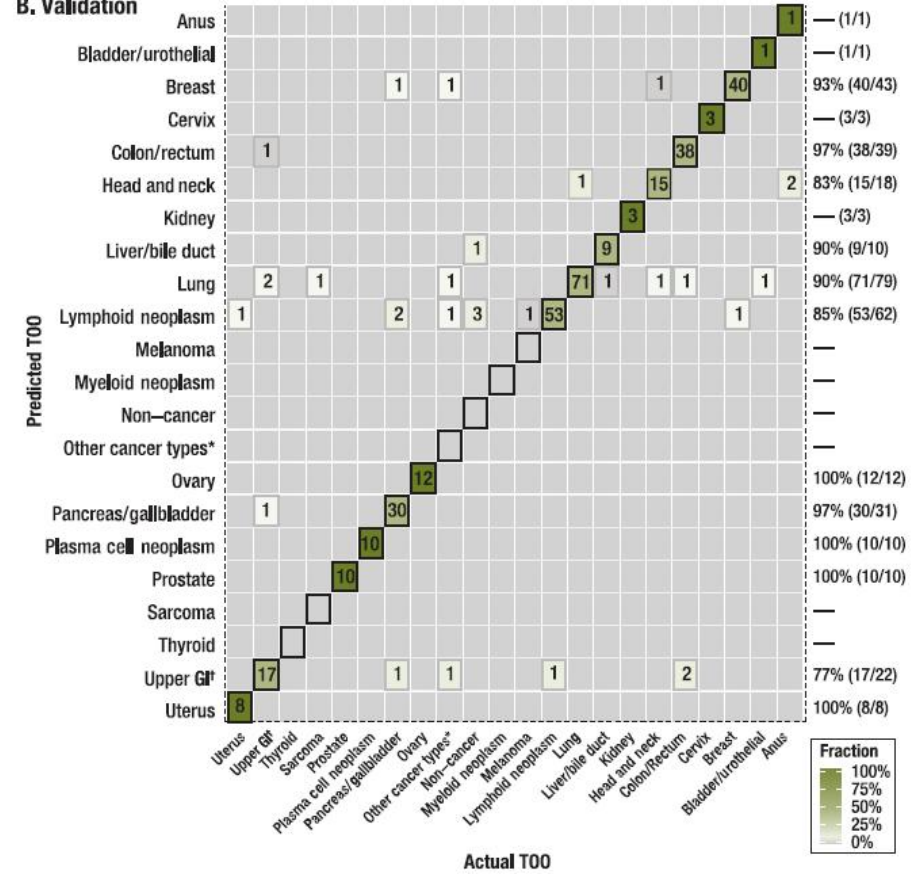




# DNA甲基化可用于组织溯源



## B. Validation

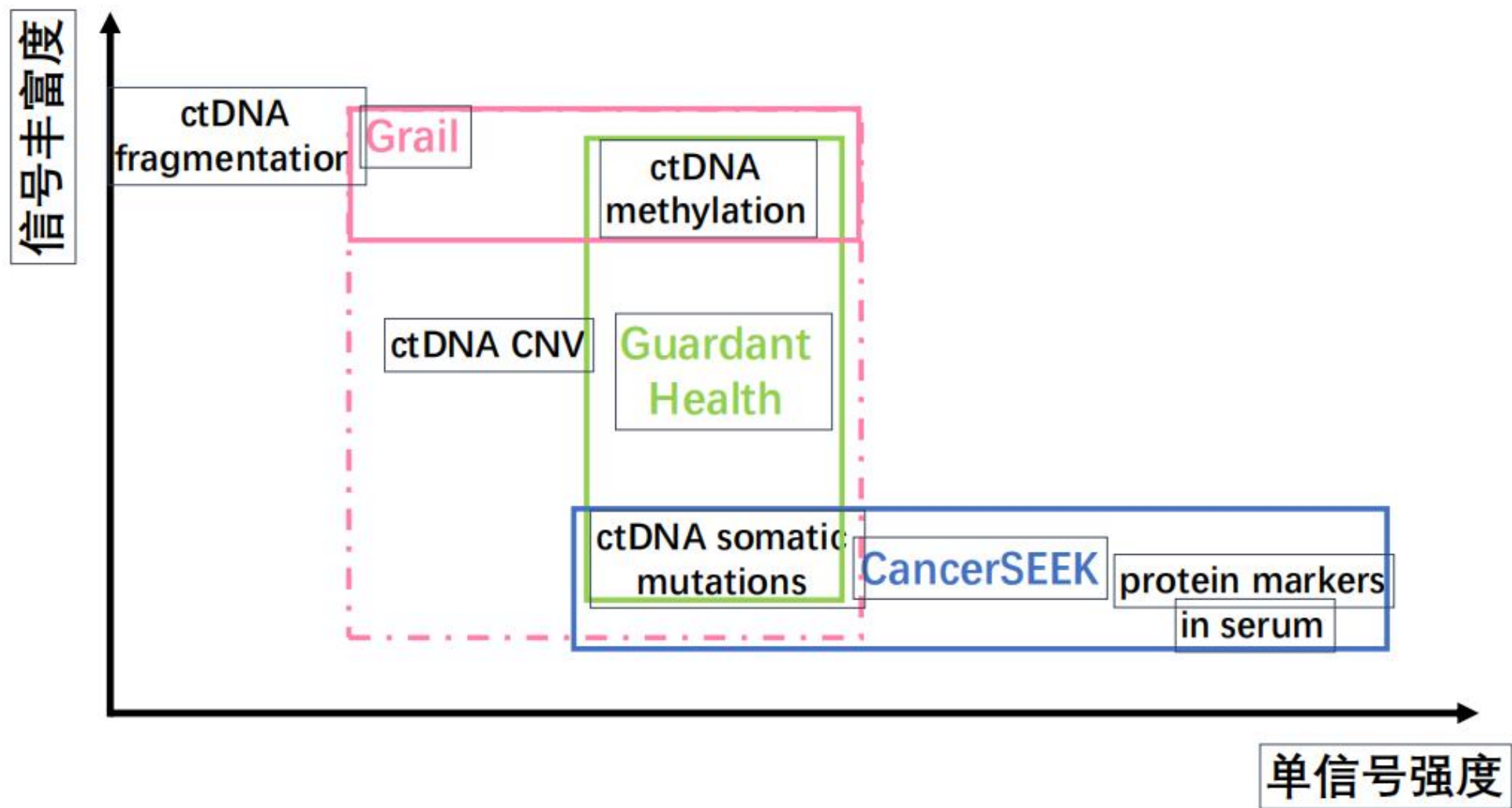


单癌种准确率90%





# 组织溯源技术对比





# DNA甲基化应用于早期肿瘤诊断的商业化探索



- ◆ 2014年8月，Exact Sciences的粪便DNA甲基化结直肠癌早筛早诊检测试剂盒**Cologuard**获得FDA批准。是第一款真正意义上用于I-II期癌症筛查的体外诊断试剂盒。
- ◆ 2016年2月，Epigenomics的结直肠癌血液DNA甲基化早筛早诊检测试剂盒获得FDA批准。
- ◆ 2019年5月，Grail的血液DNA甲基化早筛早诊检测获得FDA的“突破性设备认定”
- ◆ 2019年11月，Exact Sciences的**肝癌血液DNA甲基化早筛早诊检测**获得FDA的“突破性设备认定”
- ◆ 2020年4月，Grail发布数据可通过血液DNA甲基化检测50多种癌症
- ◆ 2020年9月，Exact Sciences发布数据可通过血液DNA甲基化检测6种癌症
- ◆ 2020年11月9日，诺辉健康科技有限公司的**KRAS 基因突变及BMP3/NDRG4 基因甲基化和便隐血联合检测试剂盒(PCR 荧光探针法-胶体金法)**获得国家药监局批准，获得中国首个癌症早筛产品证。

表观遗传学

Part 1

DNA甲基化

Part 2

MRD

**Part 3**

总结

Part 4



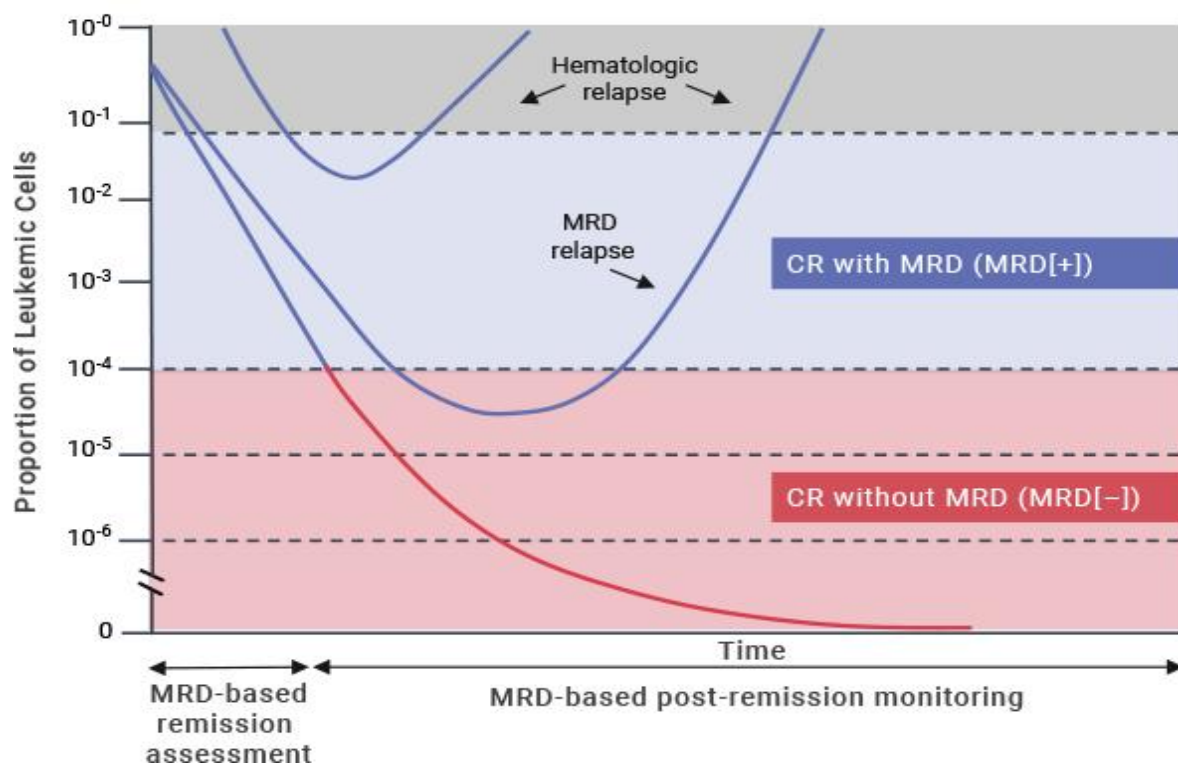
CONTENTS



# Minimal/Measurable Residual Disease

MRD (Minimal Residual Disease), 即微小残留病灶, 是指癌症治疗后残留在体内的少量癌细胞 (对治疗无反应或耐药的癌细胞)。

残留的癌细胞数量可能很少, 不会引起任何体征或症状 (但它们有可能导致癌症复发), 甚至无法通过传统方法检测到, 例如在显微镜下观察细胞和/或追踪血液中的异常血清蛋白标志物 (肿瘤标志物)





## Before MRD Detection

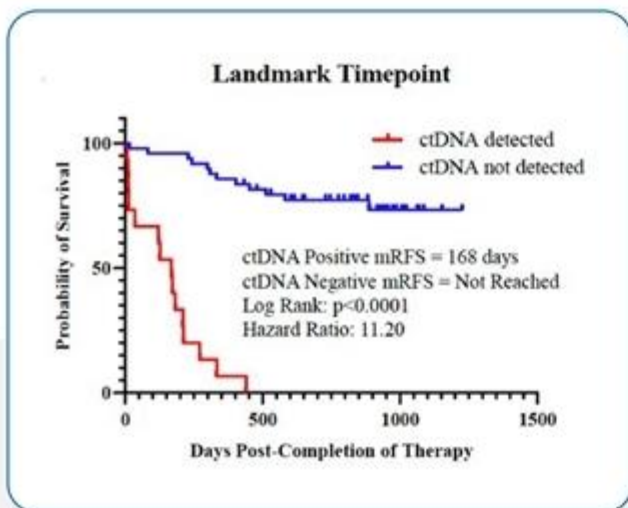






# Guardant Reveal

## LUNAR-1 CRC Data Demonstrates Industry-Leading Performance in the Detection of Minimal Residual Disease Without Need for Tissue Biopsy<sup>1</sup>



**91%**  
Sensitivity

For recurrence detection with surveillance samples

**100%**  
Specificity

For recurrence detection following completion of definitive therapy



**Somatic Alterations**  
SNVs and Indels



**Methylation**  
Differential methylation in normal vs. tumor DNA

Integration of genomic and epigenomic ctDNA signals increased sensitivity by 36%

表观遗传学

Part 1

DNA甲基化

Part 2

MRD

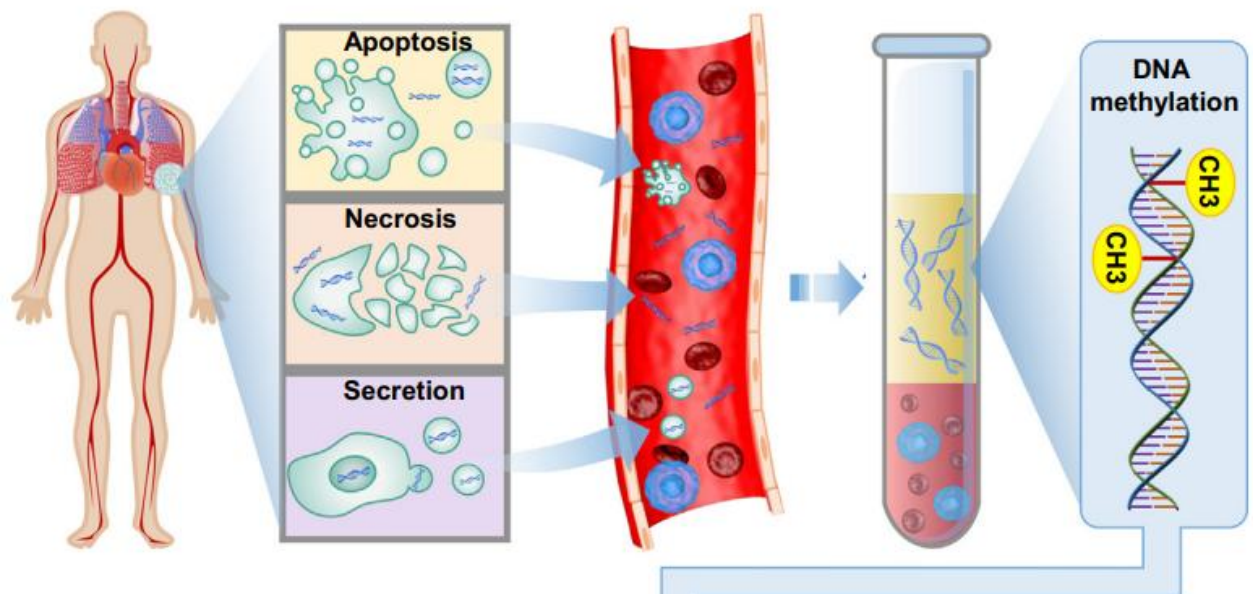
Part 3

总结

Part 4

目录

CONTENTS



Detection methods

Enrichment-based

- MeDIP-seq
- MBD-seq
- 5hmC-Seal

Bisulfite conversion-based

- WGBS
- RRBS
- MCTA-seq
- Targeted bisulfite-seq
- Methylation array
- MSP

Restriction enzyme-based

- MRE-seq
- HELP
- MSCC

Cancer detection: screening or earlier diagnosis

Molecular profiling or prognostication

Minimal residual disease monitoring

Assessing treatment response

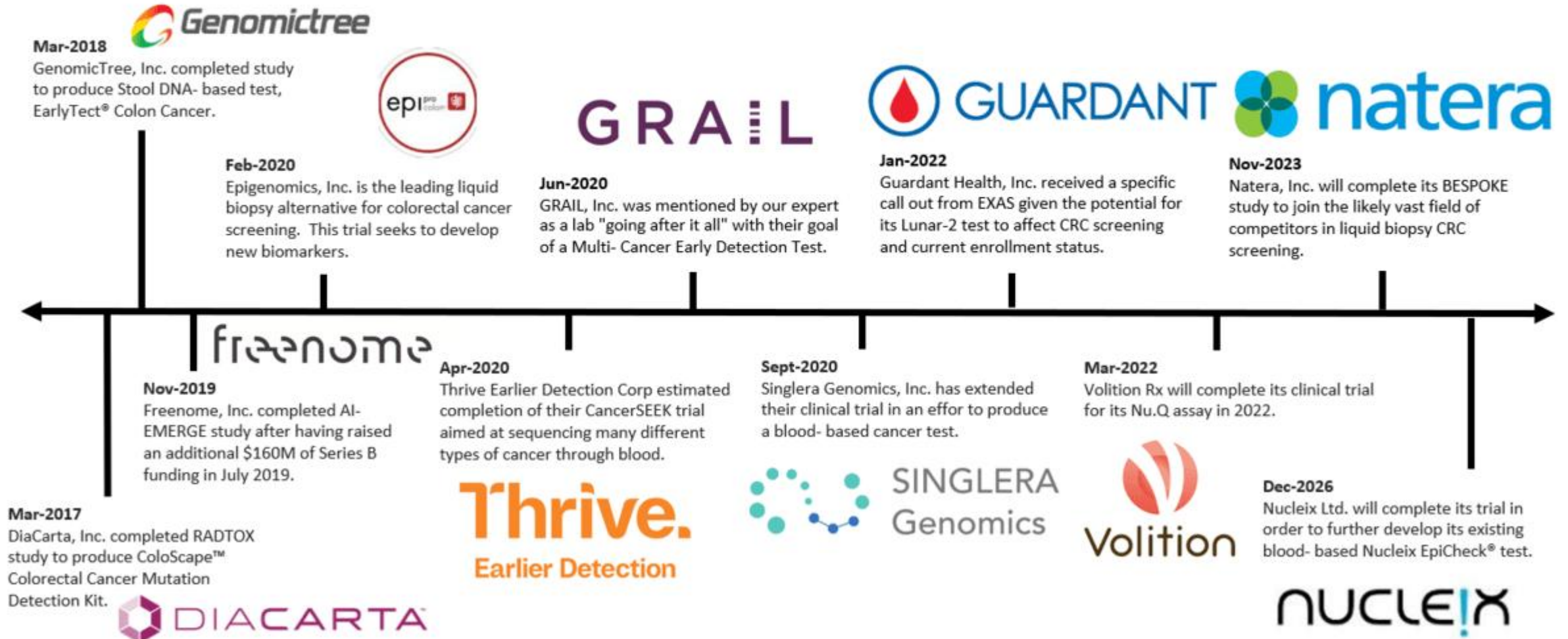
Tracing the tissue origin of ctDNA

Trends In Molecular Medicine

# Liquid Biopsy Competitor Timeline

HEDGEYE

## Upcoming Liquid Biopsy Trials





谢谢