

TruSight™ Oncology 500 ctDNA

액체 생검으로 기관 내 포괄적인 유전체 프로파일링 자체 수행 가능.

요점

- **혈액을 이용한 포괄적인 유전체 프로파일링**
기관 내에서 523개의 유전자에 대한 DNA 변이를 자체적으로 검사 가능(bTMB 및 bMSI* 분석 포함)
- **기관 내 액체 생검 도입**
제한된 조직 샘플의 대안 혹은 보완책으로 비침습적인 혈장 샘플 활용
- **신뢰할 수 있는 결과 도출**
UMI 기반의 하이브리드 캡처 라이브러리 준비, NovaSeq™ 6000 시스템을 통한 고효율 sequencing by synthesis(SBS) 지원 및 고급 바이오인포매틱스로 낮은 검출 한계 실현
- **통합형 워크플로우의 장점 활용**
변이 검출에 DRAGEN™ Bio-IT Platform을 이용하여 cfDNA 단계부터 보고서 해석 단계까지 단 5일 소요

* bTMB 및 bMSI는 혈장 기반(혈액) 마커를 의미

소개

액체 생검을 이용하면 혈장 내 순환 세포유리 DNA(cell-free DNA, cfDNA)를 포괄적으로 분석할 수 있기 때문에 비침습적인 방식으로 고품종양을 프로파일링할 수 있습니다. 액체 생검을 제대로 활용하기 위해서는 낮은 빈도로 존재하는 체세포 돌연변이를 검출할 수 있는 고감도의 특수 검사가 필수입니다. TruSight Oncology 500 ctDNA는 Illumina의 입증된 차세대 시퀀싱(next-generation sequencing, NGS) 기술을 사용해 우수한 민감도를 구현하며 cfDNA에서 발견되는 순환 종양 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)에 대한 포괄적인 유전체 프로파일링(comprehensive genomic profiling, CGP)을 가능하게 합니다(그림 1, 표 1). 이러한 진보된 솔루션에 DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software의 바이오인포매틱스 역량을 접목하면 한 번의 assay로 수백 가지의 유전자에서 다양한 변이 유형을 평가하고 DNA에서 보고 단계까지 처리하는 솔루션으로 활용할 수 있습니다.

TruSight Oncology 500 ctDNA는 NovaSeq 6000 v1.5 시퀀싱 시약과 호환 가능합니다. 해당 시약은 샘플당 비용을 35% 이상 절감할 수 있도록 운영 효율을 높여줄 뿐만 아니라 6개월 연장된 유통기한과 향상된 Q30 점수를 지원합니다.



그림 1: 액체 생검으로 다양한 변이 유형과 암 종류에 대한 바이오마커 프로파일링 수행—정교한 변이 검출 알고리즘과 높은 시퀀싱 템스를 통해 0.5%의 검출 한계(limit of detection, LOD)로 cfDNA에서 주요 바이오마커 검출 가능.

표 1: TruSight™ Oncology 500 ctDNA의 사양

파라미터	세부 정보
시스템	NovaSeq 6000
패널 크기	1.94 Mb DNA
패널 콘텐츠	유전자 523개 CNV: 유전자 59개 Gene fusion: 유전자 23개 MSI(> 2400 loci) TMB
DNA 사용량	cfDNA 30 ng*
샘플 유형	혈액에서 유래된 cfDNA
총 assay 시간	라이브러리 준비부터 변이 보고 단계까지 5일 소요
시퀀싱 런 타임	36시간 런, 10시간 분석(S2 Flow Cell) 45시간 런, 22시간 분석(S4 Flow Cell)
시퀀싱 런	2 × 151 bp
샘플 처리량	런당 샘플 8개(S2 Flow Cell) 런당 샘플 24개(S4 Flow Cell) Library Prep Kit당 샘플 48개
검출 한계	작은 변이: 0.5% VAF 유전자 증폭: ≥ 1.4배 변화 유전자 결실: ≤ 0.6배 변화 MSI: ≥ 2% 종양 분획
분석 민감도	≥ 95%(모든 변이 유형에 대한 검출 한계로 측정 시)
분석 특이도	≥ 95%

a. Agilent TapeStation 또는 Fragment Analyzer 시스템으로 정량화하는 것을 권장.

액체 생검의 장점

종양 분획(tumor fraction)을 이용해야만 정보를 얻을 수 있는 조직 생검과 달리 액체 생검은 신체 전반의 종양 내 이질성과 종양 간 이질성에 관한 통찰력을 제공합니다. 최근 연구에 따르면 cfDNA 분석은 매치되는 조직 생검에서는 발견되지 않고 가이드라인에서는 권장하는 바이오마커나 저항성 변이도 상당수 검출하는 것으로 나타났습니다.¹ 또한 한 비소세포성 폐암에 관한 연구에서는 cfDNA 분석과 조직 기반 분석 데이터 간의 일치성이 매우 높은 것으로 밝혀졌습니다.²

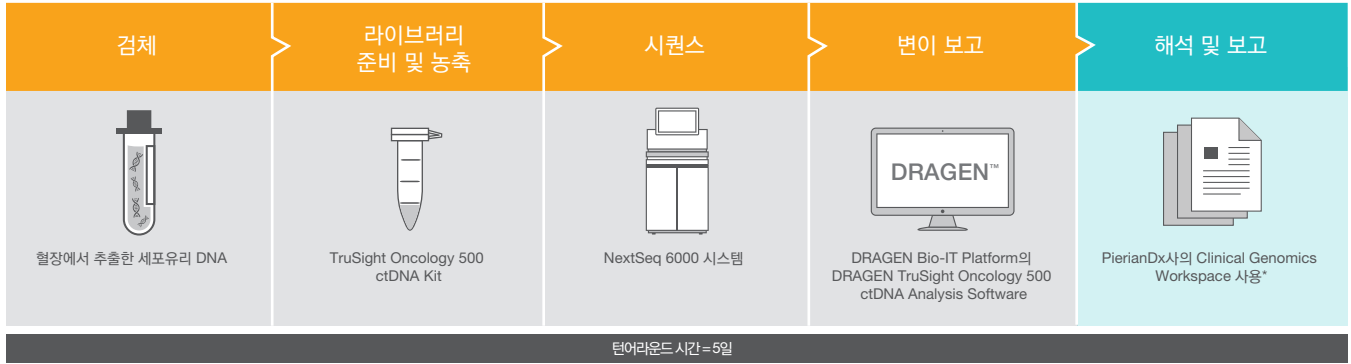


그림 2: TruSight Oncology 500 ctDNA assay 워크플로우 – TruSight Oncology 500 ctDNA assay는 기존의 검사실 워크플로우에 통합이 가능하며, cfDNA 단계부터 변이 보고 단계까지 단 5일 소요.

포괄적인 콘텐츠의 토대

종양학 분야의 권위자들과 공동 설계한 TruSight Oncology 500 ctDNA의 콘텐츠는 기존 바이오마커와 새로운 바이오마커를 포함할 뿐만 아니라 다수의 종양 종류에 대한 주요 가이드라인과 임상시험과 연관이 있는 유전자에 대한 포괄적인 커버리지도 제공합니다. 패널 프로브는 알려진 gene fusion과 새로운 gene fusion을 모두 고려하여 설계되었으며, 종양 형성에 관여할 가능성이 있는 변이의 검출을 위한 523개의 유전자를 포함하고 있습니다. 바이오마커는 단일 염기서열 변이(single-nucleotide variant, SNV), 삽입/결실(insertion/deletion, Indel), 유전자 복제수 변이(copy number variation, CNV), gene fusion, 그리고 현미부수체 불안정성(microsatellite instability, MSI) 및 종양 변이 부담(tumor mutational burden, TMB) 같은 면역항암제의 유전체 시그니처를 포함합니다(그림 2). 전체 유전자 목록은 www.illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/trusight-oncology-500-ctdna.html에서 확인하실 수 있습니다.

표 2: TruSight Oncology 500 ctDNA로 검출한 변이의 예

변이 유형	관련 예시
SNV 및 Indel	EGFR, POLE, TMRSS2, BRAF
Gene fusion	ALK, ROS1, NTRK, RET
CNV	HER2
MSI	MSI 점수
TMB	TMB 점수

낮은 레벨의 바이오마커를 검출하는 입증된 기술

Illumina의 입증된 sequencing by synthesis(SBS) 기법을 적용한 TruSight Oncology 500 ctDNA는 30 ng의 cfDNA만으로도 포괄적인 유전체 프로파일링을 가능하게 해주어 조직 검사가 불가능한 상황에서 이상적인 대안을 제시합니다. 라이브러리 준비 단계에는 표적 농축(target enrichment) 기법의 장점을 활용하여, DNA 기반의 라이브러리로부터 선택한 표적을 농축할 수 있도록 바이오틴화(biotinylation)된 프로브와 스트렙타비딘(streptavidin)이 코팅된 마그네틱 비드를 사용하고 있습니다. 하이브리드 캡처(hybrid-capture)에 의해 표적화된 농축 과정에는 높은 결합 특이도를 보이면서도 작은 돌연변이를 포함하는 표적의 혼성화(hybridization)가 가능할 정도로 크게 설계된 프로브가 사용됩니다. 이러한 접근 방식은 자연적으로 발생한 대립유전자 변이와 시퀀싱 artifact가 모두 존재할 때 샘플 dropout을 줄여 줍니다.

ctDNA는 극소량의 cfDNA를 나타내기 때문에 시그널과 노이즈를 분리할 수 있는 강력한 기술이 필요합니다. 따라서 라이브러리 준비 단계에 초저빈도로 존재하는 변이의 식별을 가능하게 해주는 고유한 분자 식별자(unique molecular identifier, UMI)를 포함했습니다.³ TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리는 민감도 향상을 위해 NovaSeq 6000 시스템을 통해 높은 디프스(depth)에서 시퀀싱을 수행(즉, 약 35,000x에서 샘플당 리드(read) 수 400 M)합니다. 이를 토대로 작은 변이의 경우 0.5%의 대립유전자 빈도(variant allele frequency, VAF), 95%의 분석 민감도, > 99.995%의 분석 특이도로 돌연변이를 검출할 수 있습니다(표 3).

표 3: 낮은 레벨의 변이를 높은 정확도로 검출

변이 유형	분석 민감도 ^a	분석 특이도 ^b
작은 변이(≥ 0.5% VAF)	≥ 95%	≥ 99.995%
유전자 증폭(≥ 1.4배 변화)	≥ 95%	≥ 95%
유전자 결실(≤ 0.6배 변화)	≥ 95%	≥ 95%
Gene fusion(0.5%)	≥ 95%	≥ 95%
MSI-high 검출 (≥ 2% 종양 분획에서)	≥ 95%	≥ 95%

a. 분석 민감도는 명시된 변이 레벨에서의 검출률(%)을 의미.

b. 분석 특이도는 알려진 음성 변이를 검출하는 능력을 의미.

정확하고 빠른 분석

DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software는 cfDNA로 인해 발생하는 문제를 극복하고 최적의 assay 성능을 보장하기 위해 빠르고 완벽히 통합된 바이오인포매틱스 알고리즘을 사용합니다. 이 소프트웨어는 시퀀스 정렬(sequence alignment) 및 시퀀스 중합(sequence collapsing)을 통한 오류 수정 작업을 거친 후, raw data를 바탕으로 변이를 검출합니다. 또한 저빈도 변이에 대한 시그널의 손실 없이 중복 리드 및 시퀀싱 오류를 제거하며 민감도가 높은 변이 검출 결과를 제공합니다.

PCR 기반 assay의 정성 분석 결과와 달리 DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software는 2400곳 이상의 동중중합체(homopolymer) MSI 마커 위치에서 얻은 정량적인 MSI 점수를 제공합니다. TMB 분석의 경우 DRAGEN 소프트웨어는 비동의(nonsynonymous) 및 동의(synonymous) SNV와 Indel을 모두 측정하여 분석 민감도를 최적화합니다. 이 소프트웨어는 변이를 검출하고 오류를 수정한 후에 생식세포 변이, 신뢰도가 낮은 변이 및 클론성 조혈증(clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP)과 관련된 변이를 필터링하여 TMB 측정 정확도를 한층 더 높입니다.

DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software는 로컬 Illumina DRAGEN Server v3^{*}에서 실행됩니다. 이 초고속 플랫폼은 데이터 분석 시간을 약 85%, 즉 9일에서 약 20시간까지 줄여주는 향상된 하드웨어와 소프트웨어를 지원합니다(표 4).

PierianDx사의 Clinical Genomics Workspace는 3차 분석을 수행합니다. Clinical Genomics Workspace 클라우드에 직접 변이 보고 파일을 업로드하기만 하면 원활한 해석과 보고가 가능하도록 Clinical Genomics Workspace에서 변이 주석(annotation) 및 필터링 작업을 수행합니다. Clinical Genomics Workspace는 자동화된 맞춤화가 가능한 최종 유전체 보고서의 생성을 위해 수천 가지 유전체 변이로부터 생물학적으로 관련이 있는 변이를 필터링한 후 우선순위를 선정합니다. cfDNA 단계부터 통합 변이 보고 단계까지 전체 워크플로우는 단 5일이 소요됩니다(그림 2).

광범위한 검증을 통한 정확하고 재현성이 높은 분석 결과

TruSight Oncology 500 ctDNA를 통한 분석 결과의 높은 품질을 입증하기 위해 Illumina는 TruSight Oncology 500 ctDNA의 SNV, CNV, gene fusion, TMB, MSI 검출력을 평가하는 다양한 연구를 실시했습니다(그림 3 및 4, 표 5 및 6).

표 4: 온사이트 DRAGEN Server v3의 사용으로 대폭 감소된 데이터 분석 시간

데이터 분석 단계	DRAGEN 외의 솔루션 ^a	TruSight Oncology 500 ctDNA DRAGEN Analysis Software
BCL 변환	6시간	1시간
시퀀스 정렬 + 중합 + 재정렬	170시간	11시간
Gene fusion 검출	10시간	2시간
변이 검출	24시간	8시간
총 소요 시간	약 9시간	약 20시간 (약 85% 감소)

a. 24개의 샘플에 S4 Flow Cell을 사용한 단일 노드(128 G 메모리, 24코어 CPU) 비병렬 파이프라인(nonparallelized pipeline).

* Cloud 기반 DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software 곧 출시 예정.

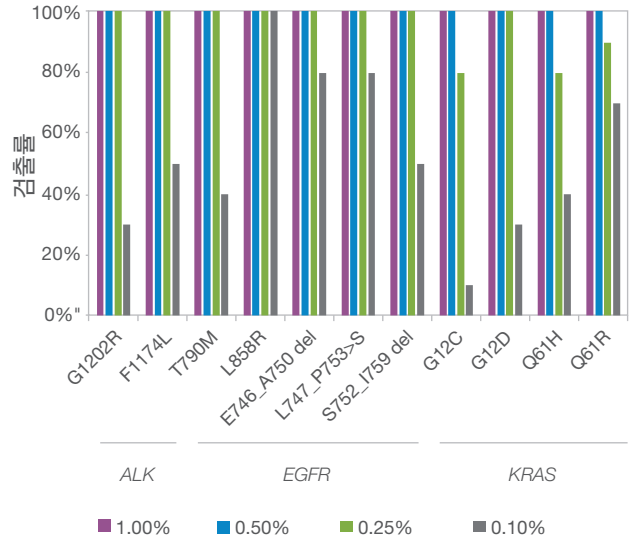


그림 3: 낮은 VAF에서의 작은 변이 검출 – 변이당 알려진 VAF가 있는 샘플을 0.10~1.00% VAF 수준까지 희석. 30 ng의 상용 표준 컨트롤 DNA를 사용해 TruSight Oncology 500 ctDNA로 샘플당 5회 반복 실험에 대한 분석을 실시.

요약

TruSight Oncology 500 ctDNA는 혈장에서 수백 개의 암 관련 바이오마커를 동시에 분석하는 NGS 기반의 멀티플렉스(multiplex) assay 제품입니다. Assay 콘텐츠는 현재 가이드라인과 임상시험에 부합하며 반복 검사를 위해 복수의 샘플을 준비할 필요 없이 다양한 종류의 종양과 연관이 있는 523개의 유전자에서 여러 변이 유형을 발견할 수 있습니다. 또한, TruSight Oncology 500 ctDNA는 면역항암제 바이오마커와 새로운 바이오마커(예: TMB, MSI, *NTRK*, *ROS1*)도 평가합니다. 광범위한 유전체 콘텐츠, 업계 최고의 시퀀싱 기술, 한층 더 강력해진 소프트웨어로 무장한 TruSight Oncology 500 ctDNA는 통합형 솔루션을 제공하고 있어, 사용자가 최소한의 운영 및 분석 절차를 거쳐 기관 내에서 자체적으로 임상 연구 프로젝트를 수행할 수 있도록 해 줍니다.

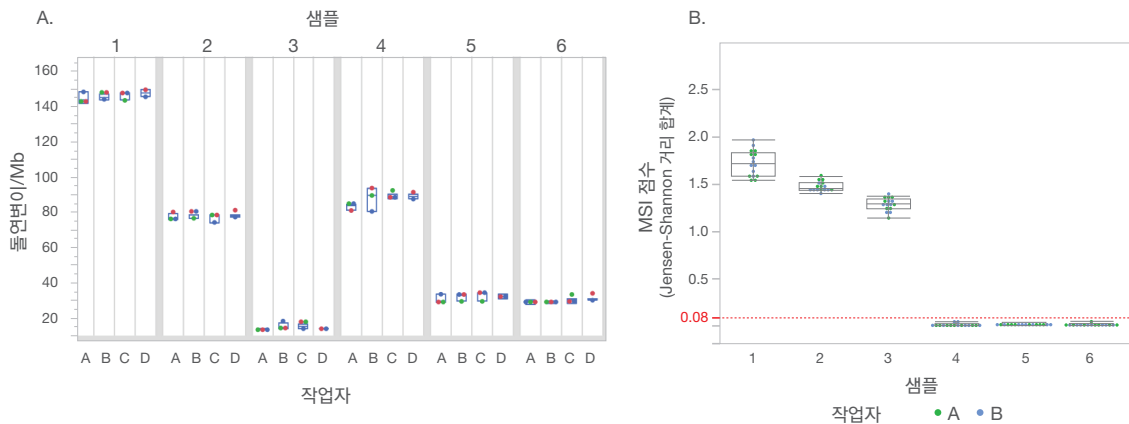


그림 4: 재현 가능한 TMB 및 MSI 측정치 – (A) TMB는 네 명의 작업자에 걸쳐 여섯 개의 혈장 샘플로 반복 평가. (B) MSI는 두 명의 작업자(초록색, 파란색)가 뉴클레옴으로 준비한 MSI-high 상태의 세포주(cell line) 세 개(1-3번)와 발생 빈도가 낮은 MSI-high 종양으로부터 얻은 ctDNA 샘플 세 개(4-6번)로 평가.

표 5: 민감한 CNV 검출

유전자	예상 배수 변화	관찰된 평균	표준편차	검출률
증폭				
AKT2	1.4	1.4	0.02	100%
BRAF	1.5	1.5	0.01	100%
BRCA2	1.8	1.5	0.01	100%
CCND3	1.5	1.4	0.01	100%
CDK6	1.5	1.5	0.01	100%
FGF14	1.3	1.5	0.01	100%
FGF3	2.1	1.6	0.01	100%
FGF4	1.4	1.2	0.01	100%
FGFR2	1.3	1.5	0.01	100%
MET	1.4	1.5	0.02	100%
MYC	1.7	1.8	0.02	100%
결실				
BRCA1	0.8	0.8	0.01	100%
BRCA2	0.8	0.8	0.01	100%
AR	0.7	0.8	0.01	100%

유전자 증폭 및 결실에서 배수 변화가 알려진 샘플을 30 ng의 cfDNA를 사용해 TruSight Oncology 500 ctDNA로 평가. 샘플당 5회 반복 실험에 대한 분석 실시.

표 6: 낮은 VAF에서 gene fusion 검출

Gene fusion	예상 VAF	관찰된 VAF	표준편차	검출률
FGFR2-COL14A1	4.1%	4.2%	0.5%	100%
NPM1-ALK	3.4%	0.7%	0.2%	100%
FGFR3-BAIAP2L1	3.4%	0.7%	0.2%	100%
NPM1-ALK	2.4%	0.4%	0.1%	100%
EML4-ALK	1.7%	0.5%	0.1%	100%
CCDC6-RET	1.0%	0.7%	0.1%	100%
FGFR2-COL14A1	0.9%	0.4%	0.1%	100%
EML4-ALK	0.7%	0.2%	0.1%	100%
NCOA4-RET	0.5%	0.1%	0.0%	100%
EML4-ALK	0.5%	0.8%	0.2%	100%
NPM1-ALK	0.5%	0.1%	0.0%	100%
CCDC6-RET	0.2%	0.2%	0.1%	100%

알려진 gene fusion 대립유전자의 빈도가 약 0.5~4%인 샘플을 평가. cfDNA 30 ng를 사용해 TruSight Oncology 500 ctDNA로 샘플당 5회 반복 실험에 대한 분석을 실시. 알려진 발현을 바탕으로 gene fusion의 방향성(directionality)을 보고. DNA를 기반으로 한 fusion의 방향성에 대한 자세한 내용은 TruSight Oncology 500 ctDNA Local App User Guide 참조.

상세 정보

TruSight Oncology 500 ctDNA에 대한 자세한 정보는 www.illumina.com/tso500-ctDNA에서 확인하시기 바랍니다.

DRAGEN Bio-IT Platform에 대한 자세한 정보는 www.illumina.com/DRAGEN에서 확인하실 수 있습니다.

참고 문헌

1. Parikh AR, Leshchiner I, Elagina L, et al. Liquid versus tissue biopsy for detecting acquired resistance and tumor heterogeneity in gastrointestinal cancers. *Nat Med.* 2019;25(9):1415-1421.
2. Leighl NB, Page RD, Raymond VM, et al. Clinical Utility of Comprehensive Cell-free DNA Analysis to Identify Genomic Biomarkers in Patients with Newly Diagnosed Metastatic Non-small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2019;25(15):4691-4700.
3. Illumina(2017) TruSight Oncology UMI Reagents. www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-oncology-umi-reagents-datasheet-100000050425.pdf. Accessed May 4, 2020.

주문 정보

제품	수량	카탈로그 번호
TruSight Oncology 500 ctDNA Kit	샘플 48개/ 인덱스 16개	20039252
TruSight Oncology 500 ctDNA Kit plus PierianDx Interpretation Report	샘플 48개/ 인덱스 16개	20043410
NovaSeq Reagent Kit		
NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit v1.5	300 사이클	20028314
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5	300 사이클	20028312
NovaSeq Xp 4-Lane Kit v1.5	키트 1개	20043131
온프레미스 변이 보고		
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 1	1년 라이선스	20042100
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 2	1년 라이선스	20042101
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 3	1년 라이선스	20042102
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 4	1년 라이선스	20042103
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 5	1년 라이선스	20042104
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 6	1년 라이선스	20042105
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 7	1년 라이선스	20042106
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 8	1년 라이선스	20042107
Illumina DRAGEN Server v3	서버 1개	20040619
Illumina DRAGEN Server Advance Exchange Plan		20032797
Illumina DRAGEN Server Installation		20031995