

TruSight™ Oncology 500 ctDNA

연구 수행 시 액체 생검으로
포괄적인 유전체 프로파일링 가능

- 최소 침습적인 방식으로 채취한 혈액 샘플을 조직 생검의 보완 또는 제한적인 조직 샘플의 대안으로 활용.
- 500개 이상의 유전자에 대한 DNA 바이오마커뿐만 아니라 TMB, MSI 등의 면역항암제 시그니처 분석.
- UMI 기반의 하이브리드 캡처 라이브러리 준비 방법과 NovaSeq™ 6000 시스템을 이용한 딥 시퀀싱(deep sequencing)으로 낮은 검출 한계(LOD) 실현.
- Illumina의 DRAGEN™ 파이프라인과 Pierian사의 통합형 분석 솔루션을 통해 cfDNA 채취부터 보고서 해석까지 5일 안에 완료.



소개

연구 시 액체 생검(liquid biopsy)을 이용하면 혈장 내 순환 세포유리 DNA(cell-free DNA, cfDNA)를 포괄적으로 연구할 수 있기 때문에 비침습적인 방식으로 고형 종양을 프로파일링할 수 있습니다. 액체 생검을 제대로 활용하기 위해서는 낮은 빈도로 존재하는 체세포 돌연변이(somatic mutation)를 검출할 수 있는 고감도의 특수 분석 검사가 필수입니다. TruSight Oncology 500 ctDNA는 Illumina의 입증된 차세대 시퀀싱(next-generation sequencing, NGS) 기술을 사용해 우수한 분석 민감도를 구현하며 cfDNA에서 발견되는 순환 종양 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)에 대한 포괄적인 유전체 프로파일링(comprehensive genomic profiling, CGP) 연구를 가능하게 합니다(그림 1, 표 1). 이러한 진보된 연구 솔루션에 DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software의 바이오인포매틱스(bioinformatics) 역량을 접목하면 한 번의 assay로 수백 가지의 유전자에서 다양한 변이 유형을 연구하고 DNA 추출에서 변이 보고까지 모두 처리하는 솔루션으로 활용할 수 있습니다(그림 2).

TruSight Oncology 500 ctDNA는 NovaSeq 6000 v1.5 시퀀싱 시약과 호환이 가능합니다. 해당 시약은 샘플당 비용을 35% 이상 절감할 수 있도록 운영 효율을 높여줄 뿐만 아니라 6개월 연장된 유통기한과 향상된 Q30 점수를 지원합니다.¹



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

* Illumina 내부 데이터에 근거한 수치. 연구 전용이며, 본 사양은 임상/진단 용도로 승인되지 않음.

액체 생검의 장점

종양 분획(tumor fraction)을 이용해야만 정보를 얻을 수 있는 조직 생검과 달리, 액체 생검은 신체 전반의 종양 내 이질성(heterogeneity)과 종양 간 이질성에 관한 통찰력을 제공합니다. 연구에 따르면 cfDNA 분석은 매치되는 조직 생검에서는 발견되지 않고 가이드라인에서는 권장하는 바이오마커(biomarker)나 저항성 변이(resistance alteration)도 상당수 검출하는 것으로 나타났습니다.² 또한 한 비소세포폐암에 관한 연구에서는 cfDNA 분석과 조직 기반 분석 데이터 간의 일치성이 매우 높은 것으로 밝혀졌습니다.³

포괄적인 콘텐츠의 토대

종양학 분야의 권위자들과 공동 설계한 TruSight Oncology 500 ctDNA의 콘텐츠는 기존 바이오마커와 새로운 바이오마커를 포함할 뿐만 아니라 여러 종류의 종양 유전자에 대한 포괄적인 커버리지(coverage)도 제공합니다. 패널 프로브(panel probe)는 알려진 gene fusion(유전자 융합)과 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)과 같은 면역항암제의 유전체 시그니처를 포함합니다(표 2).

표 1: TruSight Oncology 500 ctDNA의 사양

파라미터	TruSight Oncology 500 ctDNA
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 ^a
샘플 유형	혈액에서 유래된 cfDNA
총 Assay 시간	라이브러리(library) 준비부터 변이 보고 단계까지 5일 소요
시퀀싱 런 타임(Run Time)	36시간 런, 10시간 분석(S2 플로우 셀) 45시간 런, 22시간 분석(S4 플로우 셀)
시퀀싱 런	2 × 151 bp
샘플 처리량	런당 샘플 8개(S2 플로우 셀) 런당 샘플 24개(S4 플로우 셀) Library Prep Kit당 샘플 48개
검출 한계(LOD)*	작은 변이: 0.5% VAF 유전자 증폭: ≥ 1.4배 변화 유전자 결실: ≤ 0.6배 변화 MSI: ≥ 2% 중앙 분획
분석 민감도(Sensitivity)*	≥ 95%(모든 변이 유형에 대한 LOD 측정 시)
분석 특이도(Specificity)*	≥ 95%

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

* Illumina 내부 데이터에 근거한 수치. 연구 전용이며, 본 사양은 임상/진단 용도로 승인되지 않음.

표 2: 연구 시 TruSight Oncology 500 ctDNA로 검출한 변이의 예

변이 유형	관련 예시
SNV 및 Indel	EGFR, POLE, TMPRSS2, 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) chemistry를 적용한 TruSight Oncology 500 ctDNA는 30 ng의 cfDNA만으로도 CGP 연구를 가능하게 해주어 조직 이용이 쉽지 않은 상황에서 이상적인 대안을 제시하거나 조직 분석을 보완해 줍니다. 라이브러리 준비 단계에는 표적 인리치먼트(target enrichment)의 장점을 활용하여 DNA 기반의 라이브러리로부터 선택한 표적을 인리치할 수 있도록 바이오틴화된 프로브(biotinylated probe)와 스트렙타비딘이 코팅된 마그네틱 비드(streptavidin-coated magnetic bead)를 사용하고 있습니다. 하이브리드 캡처(hybrid-capture)에 의해 표적화된 인리치먼트 과정에는 높은 결합 특이도를 보이면서도 작은 돌연변이를 포함하는 표적의 하이브리드화(hybridization)가 가능할 정도로 크게 설계된 프로브가 사용됩니다. 이러한 접근 방식은 자연적으로 발생한 대립유전자 변이(allelic variation)와 시퀀싱 artifact의 존재에서 샘플 드롭아웃(dropout)을 줄여 줍니다.



그림 2: TruSight Oncology 500 ctDNA assay 워크플로우 — TruSight Oncology 500 ctDNA assay는 기존의 검사실 워크플로우에 통합할 수 있어 cfDNA 추출부터 변이 보고 단계까지 5일 안에 완료 가능함. DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software는 로컬 Illumina DRAGEN Server 또는 Illumina Connected Analytics를 통해 클라우드에서 실행 가능함.

ctDNA는 극소량의 cfDNA를 나타내기 때문에 시그널(signal)과 노이즈(noise)를 분리할 수 있는 강력한 기술이 필요합니다. 이를 위해 라이브러리 준비 단계에는 초저빈도로 존재하는 변이의 식별을 가능하게 해주는 고유한 분자 식별자(unique molecular identifier, UMI)가 포함되어 있습니다.⁴ TruSight Oncology 500 ctDNA 라이브러리는 민감도 향상을 위해 NovaSeq 6000 시스템을 통해 높은 데프에서 시퀀싱을 수행(즉, 약 35,000x에서 샘플당 리드(read)의 수 400 M)합니다. 이를 토대로 작은 변이의 경우 0.5%의 대립유전자 빈도(variant allele frequency, VAF), 95%의 분석 민감도* 그리고 > 99.995%의 분석 특이도*로 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% 중앙 분획에서)	≥ 95%	≥ 95%

a. 분석 민감도는 명시된 변이 레벨에서의 검출률(%)을 의미함.
 b. 분석 특이도는 알려진 음성 변이를 검출하는 능력을 의미함.
 * Illumina 내부 데이터에 근거한 수치. 연구 전용이며, 본 사양은 임상/진단 용도로 승인되지 않음.

정확하고 빠른 분석

DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software는 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. 추가적인 성능 향상 및 효율성을 위해 DRAGEN 플랫폼 안에 모든 파이프라인 구성 요소가 포함되어 있습니다.

* Illumina 내부 데이터에 근거한 수치. 연구 전용이며, 본 사양은 임상/진단 용도로 승인되지 않음.

PCR 기반 assay의 정성 분석 결과와 달리, DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software는 2,400곳 이상의 동종중합체(homopolymer) MSI 마커 위치에서 얻은 정량적인 MSI 점수를 제공합니다. TMB 분석의 경우 DRAGEN 소프트웨어는 비동의(nonsynonymous) 및 동의(synonymous) SNV와 Indel을 모두 측정하여 민감도를 최적화합니다. 이 소프트웨어는 변이를 검출하고 오류를 수정한 후에 생식세포 변이(germline variant), 신뢰도가 낮은 변이(low-confidence variant) 및 클론성 조혈증(clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP)과 관련된 변이를 필터링하여 TMB 측정 정확도를 한층 더 높여줍니다.

DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software는 로컬 Illumina DRAGEN Server v3나 v4에서 또는 Illumina Connected Analytics(ICA)를 통해 클라우드에서 실행됩니다. 이 초고속 플랫폼은 데이터 분석 시간을 9일에서 약 20시간까지 85%가량 줄여주는 향상된 하드웨어와 소프트웨어를 지원합니다(그림 3). ICA는 검사실에서 로컬 인프라를 확충하거나 유지할 필요 없이 2차 분석을 확대할 수 있도록 해주는 클라우드 기반의 안전한 유전체학 연구 플랫폼을 제공합니다.⁵

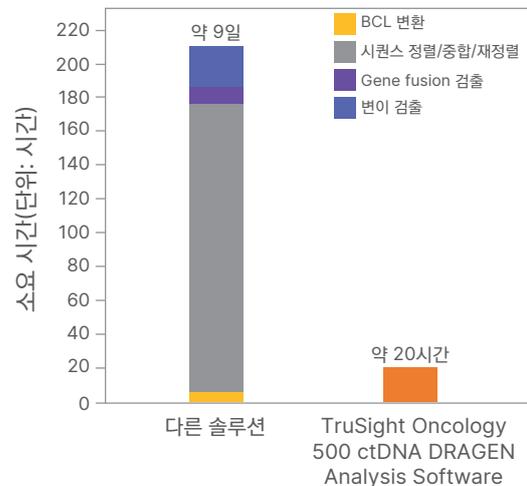


그림 3: 온사이트 DRAGEN Server v4의 사용으로 감소되는 데이터 분석 시간 — TruSight Oncology 500 ctDNA DRAGEN Analysis Software는 다양한 데이터 분석 단계를 통합하여 다른 솔루션보다 소요 시간이 약 85% 단축된 20시간 내외의 단일 과정을 제공함. 24개의 샘플에 S4 플로우 셀을 사용한 DRAGEN v4 서버상의 DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA v2.1 파이프라인과 24개의 샘플에 S4 플로우 셀을 사용한 단일 노드(128G 메모리, 24코어 CPU) 비병렬 파이프라인(nonparallelized pipeline)을 활용하는 다른 솔루션 간의 분석 시간을 비교한 그래프.

또한 DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software는 고품종 종양 조직 분석 시 TruSight Oncology 500 assay와 사용하는 것과 동일한 소프트웨어 버전인 DRAGEN v3.10 소프트웨어와 호환이 가능합니다. 검사실은 이와 같은 공동 플랫폼 사용을 통해 유연성을 추가로 확보할 수 있습니다.

Pierian사의 Clinical Genomics Workspace로 3차 분석을 수행하면 워크플로우가 완료됩니다. 사용자가 로컬 또는 ICA 기반의 2차 분석 환경에 저장되어 있는 변이 보고서 파일을 Clinical Genomics Workspace 클라우드로 업로드하기만 하면 원하는 해석과 보고가 가능하도록 Clinical Genomics Workspace에서 변이 어노테이션(annotation, 주석) 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 추출 단계부터 통합 변이 보고 단계까지 전체 워크플로우의 완료에는 단 5일이 소요됩니다(그림 2).

광범위한 검증을 통한 정확하고 재현성이 높은 분석 결과

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

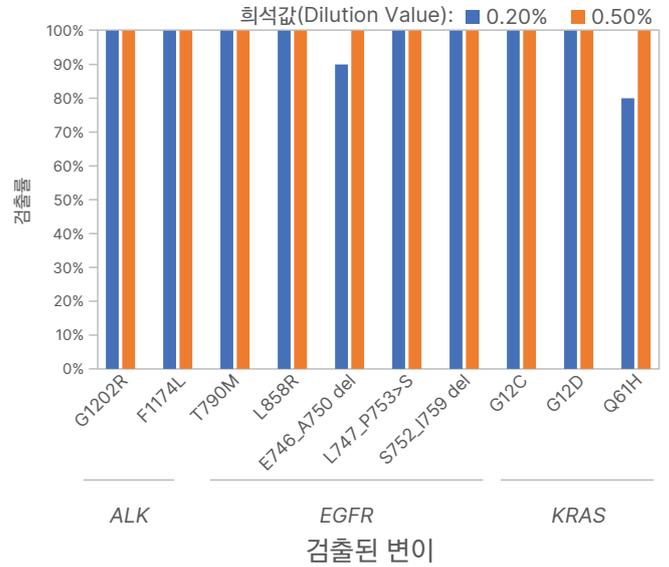


그림 4: 낮은 VAF에서의 작은 변이 검출* — 변이당 알려진 VAF가 있는 샘플을 0.10~1.00% VAF 수준까지 희석한 후 30 ng의 상용 표준 컨트롤 DNA를 사용해 TruSight Oncology 500 ctDNA로 샘플당 5회 반복 실험에 대한 분석을 실시함.

* Illumina 내부 데이터에 근거한 수치. 연구 전용이며, 본 사양은 임상/진단 용도로 승인되지 않음.

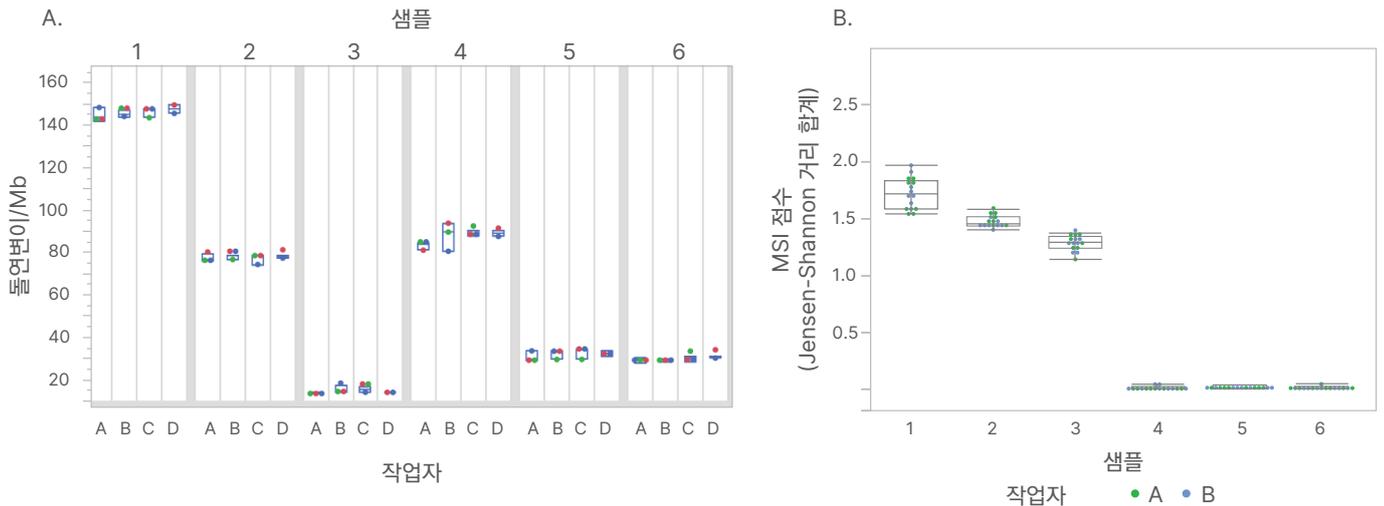


그림 5: 재현 가능한 TMB 및 MSI 측정치 — (A) TMB는 네 명의 작업자(A, B, C, D)가 여섯 개의 혈장 샘플(1~6번)로 3회 반복 시험(triplicate)(초록색, 파란색, 빨간색 점)에 대한 평가를 실시함. (B) MSI는 두 명의 작업자(초록색, 파란색)가 뉴클레오솜으로 준비한 MSI-high 상태의 세포주(cell line) 세 개(1~3번 샘플)와 발생 빈도가 낮은 MSI-high 종양으로부터 얻은 cfDNA 샘플 세 개(4~6번 샘플)로 평가를 실시함.

표 4: 민감한 CNV 검출

유전자	예상 배수 변화	관찰된 평균	표준 편차	검출률*
증폭				
<i>BRCA2</i>	1.8	1.4	0.01	100%
<i>CCND3</i>	1.5	1.3	0.01	100%
<i>FGF14</i>	1.3	1.5	0.01	100%
<i>FGF3</i>	1.6	1.4	0.01	100%
<i>FGF4</i>	1.7	1.4	0.01	100%
<i>FGFR2</i>	1.6	1.4	0.01	100%
<i>MET</i>	1.5	1.3	0.01	100%
<i>MYC</i>	1.9	1.7	0.02	100%
결실				
<i>BRCA1</i>	0.7	0.7	0	100%
<i>BRCA2</i>	0.6	0.6	0.01	100%

유전자 증폭 및 결실에서 배수 변화가 알려진 샘플을 30 ng의 cfDNA를 사용해 TruSight Oncology 500 ctDNA로 평가함. 샘플당 5회 반복 실험에 대한 분석을 실시함.

* Illumina 내부 데이터에 근거한 수치. 연구 전용이며, 본 사양은 임상/진단 용도로 승인되지 않음.

표 5: 낮은 VAF에서 Gene Fusion 검출

Gene fusion	예상 VAF	관찰된 VAF	표준 편차	검출률*
<i>FGFR2-COL14A1</i>	4.1%	4.1%	0.5%	100%
<i>NPM1-ALK</i>	3.4%	0.6%	0.1%	100%
<i>FGFR3-BAIAP2L1</i>	3.4%	0.8%	0.2%	100%
<i>NPM1-ALK</i>	2.4%	0.6%	0.1%	100%
<i>EML4-ALK</i>	1.7%	0.5%	0.1%	100%
<i>CCDC6-RET</i>	1.0%	0.7%	0.1%	100%
<i>FGFR2-COL14A1</i>	0.9%	0.4%	0.2%	100%
<i>EML4-ALK</i>	0.7%	0.2%	0.1%	100%
<i>EML4-ALK</i>	0.5%	0.5%	0.3%	100%
<i>NPM1-ALK</i>	0.5%	0.2%	0.0%	100%
<i>NCOA4-RET</i>	0.5%	0.2%	0.0%	100%
<i>CCDC6-RET</i>	0.2%	0.1%	0.1%	100%

알려진 gene fusion 대립유전자의 빈도가 약 0.5~4%인 샘플을 평가함. 30 ng의 cfDNA를 사용해 TruSight Oncology 500 ctDNA로 샘플당 5회 반복 실험에 대한 분석을 실시함. 알려진 발현을 바탕으로 gene fusion의 방향성(directionality)을 보고함. DNA를 기반으로 한 gene fusion의 방향성에 대한 자세한 내용은 [TruSight Oncology 500 ctDNA Local App User Guide](#) 참조.

* Illumina 내부 데이터에 근거한 수치. 연구 전용이며, 본 사양은 임상/진단 용도로 승인되지 않음.

요약

TruSight Oncology 500 ctDNA는 혈장에서 수백 개의 암 관련 바이오마커를 동시에 분석하는 NGS 기반의 멀티플렉스(multiplex) 연구용 assay 제품입니다. Assay 콘텐츠는 반복 검사를 위해 복수의 샘플을 준비할 필요 없이 한 번의 포괄적인 assay로 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 연구합니다. 광범위한 유전체 콘텐츠, 업계 최고의 시퀀싱 기술, 한층 더 강력해진 소프트웨어로 무장한 TruSight Oncology 500 ctDNA는 통합형 솔루션을 제공하며, 연구자가 최소한의 운영 및 분석 절차만으로 연구를 수행할 수 있도록 해 줍니다.

상세 정보

NovaSeq 6000 시스템에 대한 자세한 정보는 www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/novaseq.html에서 확인하실 수 있습니다.

Illumina Connected Analytics에 대한 자세한 정보는 <https://www.illumina.com/products/by-type/informatics-products/connected-analytics.html>에서 확인하실 수 있습니다.

제품 목록

제품	카탈로그 번호
TruSight Oncology 500 ctDNA Kit (48 samples, 16 indexes)	20039252
TruSight Oncology 500 ctDNA Kit plus Pierian Interpretation Report (48 samples, 16 indexes)	20043410
시퀀싱 시약 키트	
NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit v1.5 (300 cycles)	20028314
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5 (300 cycles)	20028312
NovaSeq Xp 4-Lane Kit v1.5	20043131
온프레미스 변이 보고	
Illumina DRAGEN Server v4	20051343
Illumina DRAGEN Server Advance Exchange Plan	20032797
Illumina DRAGEN Server Installation	20031995
클라우드 기반 변이 보고	
ICA Basic Annual Subscription	20044874
ICA Professional Annual Subscription	20044876
ICA Enterprise Annual Subscription	20038994
ICA Enterprise Compliance Add-on (applies to Basic only)	20066830
ICA Training and Onboarding	20049422
ICA Data Storage: Illumina Analytics, 1 credit	20042038
ICA Data Storage: Illumina Analytics Starter Pack, 1000 credits	20042039
ICA Data Storage: Illumina Analytics, 5000 credits	20042040
ICA Data Storage: Illumina Analytics, 50,000 credits	20042041
ICA Data Storage: Illumina Analytics, 100,000 credits	20042042

참고 문헌

1. Illumina. Enhanced sequencing capabilities with the NovaSeq 6000 v1.5 Reagent Kit. illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/novaseq-v1-5-reagents-tech-note-770-2020-013/novaseq-v1.5-reagents-tech-note-770-2020-013.pdf. Published 2020. Accessed March 30, 2022.
2. 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. doi:10.1038/s41591-019-0561-9
3. 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. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0624
4. Illumina. TruSight Oncology UMI Reagents. illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-oncology-umi-reagents-datasheet-100000050425.pdf. Published 2017. Accessed March 15, 2022.
5. Illumina. Illumina Connected Analytics Security Brief. illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/ica-security-brief-m-gl-00683/ica-security-brief-m-gl-00683.pdf. Published 2022. Accessed March 16, 2022.



무료 전화(한국) 080-234-5300
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 Illumina, Inc. All rights reserved.
모든 상표는 Illumina, Inc. 또는 각 소유주의 자산입니다.
특정 상표 정보는 www.illumina.com/company/legal.html을 참조하십시오.
M-KR-00122 KOR