

TruSight™ Oncology 500 ctDNA v2

액체 생검 샘플을 활용한
신속하고 포괄적인
높은 민감도의
유전체 프로파일링 연구

- 20 ng의 ctDNA를 사용해 0.2%의 낮은 VAF로 존재하는 바이오마커 검출 가능
- 수동 또는 자동* 옵션을 통해 4일 안에 포괄적인 결과 획득
- 하나의 assay로 500개 이상의 유전자와 MSI, TMB 등의 면역항암제 유전체 시그니처 분석 가능

* 자동화 지원 키트 및 방법 2024년 제공 예정.



CGP와 액체 생검

암의 유전체학적 근거를 이해하면 암을 유발하는 변이를 더 쉽게 찾아내고 정밀의료(precision medicine) 분야의 발전에도 기여할 수 있습니다. 포괄적인 유전체 프로파일링(Comprehensive genomic profiling, CGP)은 바로 이러한 종양학 연구 방법 중 하나입니다. CGP는 정밀의료 분야에서 차세대 시퀀싱(next-generation sequencing, NGS)을 활용하여 하나의 assay로 다양한 바이오마커(biomarker)를 연구할 수 있어 사용하는 샘플의 수가 적고, 반복적인 실험을 요하는 전략에 비해 더 신속하게 결과를 제공할 수 있습니다.^{1,2} 연구자는 CGP를 통해 단일 유전자(single gene) 검사나 핫스팟 NGS 패널(hotspot NGS panel)과 같은 기존의 방법보다 더 많은 임상적 관련이 있는 변이를 탐구해 볼 수 있습니다.³⁻⁶ 특히 대형 NGS 패널(1 Mb 이상)이 있어야 정확한 식별이 가능한 종양 변이 부담(tumor mutational burden, TMB)과 같은 면역항암제 유전체 시그니처를 비롯해 발견되는 바이오마커의 수가 계속해서 증가하고 있는 지금, 더 많은 변이를 검출할 수 있는 능력에 대한 중요성이 더욱더 대두되고 있습니다.^{7,8}

일반적인 CGP 연구 방법에는 포르말린 고정, 파라핀 포매(formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) 샘플과 같은 고형 종양 조직 샘플이 사용됩니다. 다만, 충분한 양의 조직 샘플이 없거나(최대 25%의 샘플에서 발생 가능⁹), 종양에 접근할 수 없거나, 조직 생검 결과 보고가 크게 지연되는 경우도 있습니다. 이 경우 액체 생검(liquid biopsy)을 통해 얻은 순환 종양 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)로 CGP 연구를 수행하면 종양의 유전체학적 배경을 살펴볼 수 있습니다. 액체 생검은 다음과 같은 장점을 가지고 있습니다.

- 종양 프로파일링 시 비침습적인 접근 방식을 통해 혈장에서 ctDNA 포함 세포유리 DNA(cell-free DNA, cfDNA)를 얻을 수 있음(그림 1).
- 여러 종양 또는 동일한 종양의 클론(clone)을 나타내는 ctDNA의 연구가 가능하며,¹⁰ 종양 조직 생검 시 발생하는 샘플링 편향(sampling bias)을 피하고 더 많은 변이를 검출할 수 있음.¹⁰⁻¹³
- 점점 더 많은 가이드라인(12가지 질병 이상)에서 분자 프로파일링 시 샘플 수집 방법으로 언급되고 있음.¹⁴⁻¹⁶

액체 생검을 제대로 활용하기 위해서는 cfDNA에 낮은 빈도로 존재하는 체세포(somatic) 변이를 검출할 수 있는 민감도(sensitivity)가 높은 특별한 분석 assay를 사용하는 것이 매우 중요합니다. 기존의 TruSight Oncology 500 ctDNA assay¹⁷는 입증된 Illumina의 NGS 기술을 기반으로 CGP 연구에 필요한 높은 분석 민감도를 제공한 바 있습니다. 이보다 한층 더 향상된 chemistry와 워크플로우가 적용된 TruSight Oncology 500 ctDNA v2는 더 높은 민감도를 지원하며 더 신속하게 분석 결과를 도출합니다(표 1, 표 2, 표 3).

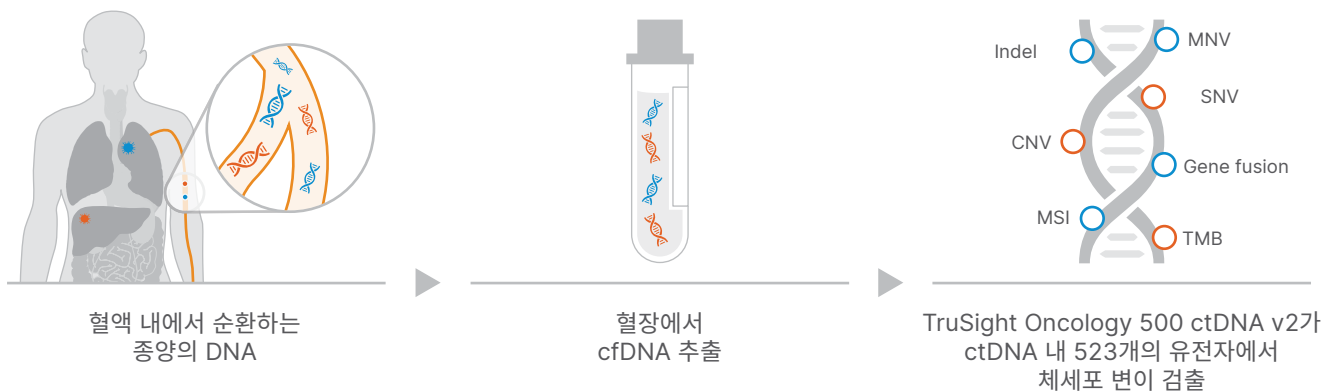


그림 1: 액체 생검을 활용한 비침습적 CGP 연구 방법 – 간단한 채혈을 통해 혈장 내 cfDNA에 포함되어 있는 ctDNA를 얻은 후 이를 TruSight Oncology 500 ctDNA v2로 분석하여 주요 가이드라인에 기술된 암 관련 바이오마커의 존재 유무를 확인할 수 있음.

CGP 연구 시 ctDNA의 가치

종양 세포는 사멸(apoptosis) 또는 괴사(necrosis)하면 DNA가 말초 혈액으로 방출되며 이는 극소량의 cfDNA로서 혈액 속을 순환하게 됩니다.¹⁸ ctDNA는 모든 암 병기에 걸쳐 폐암, 유방암, 대장암, 난소암 등 다양한 고형암에서 검출되었습니다.¹⁸ 비소세포폐암(Non-small cell lung cancer, NSCLC)과 같은 일부 암종의 경우, 조직 분석 시 액체 생검을 활용한 CGP 연구를 추가로 실시하면 임상적 관련이 있는 변이의 검출력을 15~48% 높일 수 있습니다.^{11, 12, 19} 또한 몇 건의 NSCLC 연구에 따르면 cfDNA 분석은 조직 기반의 분석 결과와 일치성이 높은 것으로 나타났습니다.¹²

ctDNA는 CGP 연구 시 많은 장점을 제공합니다.

- 최소 침습 채혈을 통해 손쉽게 샘플 수집²⁰
- 종양 내 및 종양 간 이질성(heterogeneity)에 대한 시공간적 정보 획득²⁰
- 클론 선별 확인을 위한 반복 분석 가능

표 1: TruSight Oncology ctDNA v2의 향상된 기능

장점	TruSight Oncology 500 ctDNA v2	TruSight Oncology 500 ctDNA(기존)
향상된 Assay 민감도	말단 복구(End repair) 단계와 말단 A-테일링(A-tailing) 단계 분리	말단 복구 단계와 말단 A-테일링 단계 통합
간소해진 워크플로우와 향상된 사용자 경험	플레이트 기반 인덱스/UMI	튜브 기반 인덱스/UMI
하루 안에 완료되는 신속한 워크플로우	한 번의 하이브리드화(hybridization)/캡처 단계	두 번의 하이브리드화 및 캡처 단계
강화된 확장성	인덱스 192개	인덱스 16개

UMI = unique molecular identifier(고유한 분자 식별자)

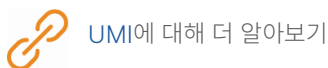


표 2: TruSight Oncology ctDNA v2의 사양

파라미터	사양
시스템	NovaSeq™ 6000 시스템 NovaSeq 6000Dx 시스템(RUO Mode) ^a NovaSeq X 시스템 ^a
샘플 처리량	8개, 24개 또는 48개
자동화 역량	Hamilton사의 Microlab STAR에 적합한 Illumina Qualified 방법 제공 ^a
자동화 지원 키트	48개의 샘플을 처리 가능한 키트
패널 크기	1.94 Mb DNA
패널 콘텐츠	SNV & Indel: 523 genes CNV: 59 genes Gene rearrangement: 23 genes MSI(> 2300 loci) TMB(> 1 Mb)
샘플 유형	혈장에서 유래된 cfDNA
DNA 사용량	cfDNA 20 ng(5~30 ng 사용 가능) ^b
총 Assay 시간	라이브러리 준비부터 변이 보고까지 4일 안에 완료 가능
수작업 시간	샘플 8~24개(수동): 약 2.5시간 샘플 48개(자동): 미정 ^c
라이브러리 준비 시간	샘플 8~24개(수동): < 8.5시간 샘플 48개(자동): 미정 ^c
시퀀싱 런 타임 (Run Time)	샘플 8개: 36시간(S2 플로우 셀) 샘플 24개: 44시간(S4 플로우 셀 1개) 샘플 48개: 44시간(S4 플로우 셀 2개)
시퀀싱 런 리드 길이 (Read Length)	2 × 151 bp
시퀀싱 커버리지 (Coverage)	35,000×
변이 분석 시간	샘플 8개: 9~12시간 샘플 24개: 20~24시간 샘플 48개: 미정 ^c

a. 2024년 출시 예정.
b. Agilent사의 TapeStation 시스템 또는 Fragment Analyzer 시스템으로 정량화 권장.
c. 2024년 출시 예정.

표 3: TruSight Oncology ctDNA v2의 성능#

파라미터	사양
검출 한계 (Limit of Detection, LOD)#	SNV: 0.2% VAF MNV & Indel: 0.5% VAF Gene rearrangement: 0.5% VAF Gene amplification: ≥ 1.3 -fold change Gene deletion: ≤ 0.6 -fold change MSI: $\geq 0.3\%$ tumor fraction
분석 민감도(LOD 측정 시)#	$\geq 90\%$ (0.2% VAF의 SNV에 대한 LOD 측정 시) $\geq 95\%$ (0.2% VAF의 SNV 핫스팟에 대한 LOD 측정 시) $\geq 95\%$ (0.5% VAF의 기타 모든 변이 유형에 대한 LOD 측정 시)
분석 특이도(Specificity)#	$\geq 99.999\%$

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

바이오마커는 단일 염기서열 변이(single-nucleotide variant, SNV), 다중 염기서열 변이(multi-nucleotide variant, MNV), 삽입/결실(insertion/deletion, Indel), 유전자 복제수 변이(copy number variation, CNV), gene rearrangement, 그리고 혈액 기반 현미부수체 불안정성(blood-based microsatellite instability, bMSI)과 bTMB와 같은 복잡한 면역항암제의 유전체 시그니처를 포함합니다(표 4).

표 4: TruSight Oncology 500 ctDNA v2로 검출한 변이형의 예시

변이형	예시
SNV 및 Indel	<i>EGFR, POLE, TMPRSS2, BRAF</i>
Gene rearrangement	<i>ALK, ROS1, NTRK1, NTRK2, RET</i>
CNV	<i>HER2</i>
MSI	MSI-Score
TMB	TMB-Score

포괄적인 연구용 콘텐츠

종양학 분야의 권위자들과 공동 설계한 TruSight Oncology 500 ctDNA v2의 콘텐츠는 연구 시 기존의 바이오마커와 새로운 바이오마커를 포함할 뿐만 아니라 여러 종류의 종양 유전자에 대한 포괄적인 커버리지도 제공합니다. 패널 프로브는 알려진 gene rearrangement(유전자 재배열)와 새로운 gene rearrangement를 모두 고려하여 설계되었으며, 현재 그리고 향후 종양 형성(tumorigenesis)에 관여할 가능성이 있는 변이의 검출을 위한 523개의 유전자를 포함하고 있습니다.

4일 안에 완료

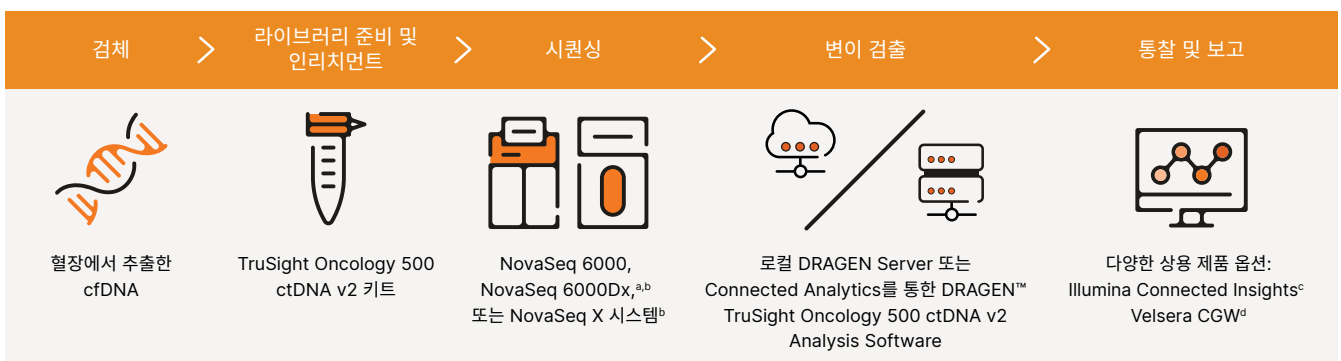


그림 2: TruSight Oncology 500 ctDNA v2 워크플로우 – TruSight Oncology 500 ctDNA v2는 기존의 랩 워크플로우에 통합되어 cfDNA 추출부터 변이 보고 단계까지 4일 안에 완료 가능함. DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA v2 Analysis Software는 로컬 Illumina DRAGEN Server 또는 Illumina Connected Analytics를 통해 클라우드에서 실행할 수 있음. a. NovaSeq 6000Dx 기기(RUO Mode). b. 2024년 출시 예정. c. 일부 국가에서는 지원되지 않음. Illumina Connected Insights는 서드 파티 지식 소스(third-party knowledge source)의 API 호출을 통해 사용자 정의 3차 분석 지원. d. Velsera는 Pierian의 새로운 이름이며, 기타 상용 제품 옵션도 이용 가능함.

신속한 통합 워크플로우

TruSight Oncology 500 ctDNA v2는 샘플 준비부터 최종 보고까지 전 단계를 아우르는 통합 CGP 워크플로우의 한 구성 요소입니다(그림 2). 자동화된 라이브러리 프렙 키트(library prep kit) 및 방법, 변이 검출(variant calling) 도구 그리고 해석 및 보고 소프트웨어를 활용하여 4일 안에 완료되는 원활한 워크플로우를 실현할 수 있습니다.

최적화된 라이브러리 준비 절차

TruSight Oncology 500 ctDNA v2는 Illumina의 입증된 sequencing by synthesis(SBS) chemistry를 적용하여 20 ng의 cfDNA만으로도 CGP 연구를 가능하게 해 주어 조직 이용이 쉽지 않은 상황에서 대안을 제시하거나 조직 분석을 보완해 줍니다. ctDNA는 극소량의 cfDNA[†](일반적으로 total cfDNA의 5% 미만)를 나타내기 때문에 시그널(signal)과 노이즈(noise)를 분리할 수 있는 강력한 기술이 필요합니다. 라이브러리 준비 단계에는 초저빈도로 존재하는 변이의 식별을 위해 표적 인리치먼트(target enrichment)를 활용하여 오류율을 낮춰주는 DNA 기반의 라이브러리와 UMI[‡]로부터 선택한 표적을 인리치할 수 있도록 바이오틴화된 프로브(biotinylated probe)와 스트렙타비딘이 코팅된 마그네틱 비드(streptavidin-coated magnetic bead)를 사용하고 있습니다(그림 3). TruSight Oncology 500 ctDNA v2는 향상된 제품 chemistry를 토대로 하이브리드화 횟수를 2회에서 1회로 줄여 라이브러리 준비 단계를 하루 안에 완료하여 더 신속하게 결과를 제공할 수 있습니다. 또한 SNV의 분석 민감도[‡]도 0.2% VAF로 한층 더 향상되었습니다. 이러한 표적화된 하이브리드 캡처(hybrid-capture) 접근 방식은 자연적으로 발생한 대립유전자 변이와 시퀀싱 artifact의 존재에서 샘플 드롭아웃(dropout)을 줄여 줍니다.

자동화 지원 워크플로우

TruSight Oncology 500 ctDNA v2는 연구자가 라이브러리 준비 시 원하는 대로 처리량을 조정할 수 있도록 수동 및 자동* 옵션을 제공합니다. Illumina는 업계 선두의 리퀴드 핸들링(liquid handling) 제조 업체인 Hamilton사와 협력 관계를 맺고 STAR 리퀴드 핸들링 로봇에 적용 가능한 완전히 자동화된 TruSight Oncology 500 ctDNA v2 assay 워크플로우를 만들었습니다. Illumina는 향후 시약 낭비를 줄여 주는 자동화 지원 라이브러리 프렙 키트의 출시를 통해 STAR 로봇 사용 시 불용체적(dead volume)을 감안해 48개의 라이브러리를 준비할 수 있는 충분한 양의 시약을 제공할 예정입니다. 이렇게 자동화된 워크플로우는 수동 프로토콜과 동일한 고품질의 결과를 제공할 뿐만 아니라 작업자의 수작업 시간을 단축해 주므로 인건비를 절감하고 효율성도 향상할 수 있습니다.²³

강력한 시퀀싱 성능

TruSight Oncology 500 ctDNA v2 라이브러리는 민감도 향상을 위해 NovaSeq 6000, NovaSeq 6000Dx(RUO Mode) 또는 NovaSeq X 시스템[†]을 통해 높은 디프스(depth)에서 시퀀싱을 수행(즉, 약 35,000x로 샘플당 400M 개의 리드 분석)합니다. 이를 토대로 SNV의 경우 0.2%의 VAF, $\geq 90\%$ 의 분석 민감도[‡], $\geq 95\%$ 의 분석 특이도[‡]로 변이를 검출할 수 있습니다(표 5).

* Illumina Qualified 자동화 방법 및 키트 2024년 출시 예정.

† NovaSeq 6000 Dx(RUO Mode) 및 NovaSeq X 시스템을 통한 시퀀싱 2024년 지원 예정.

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

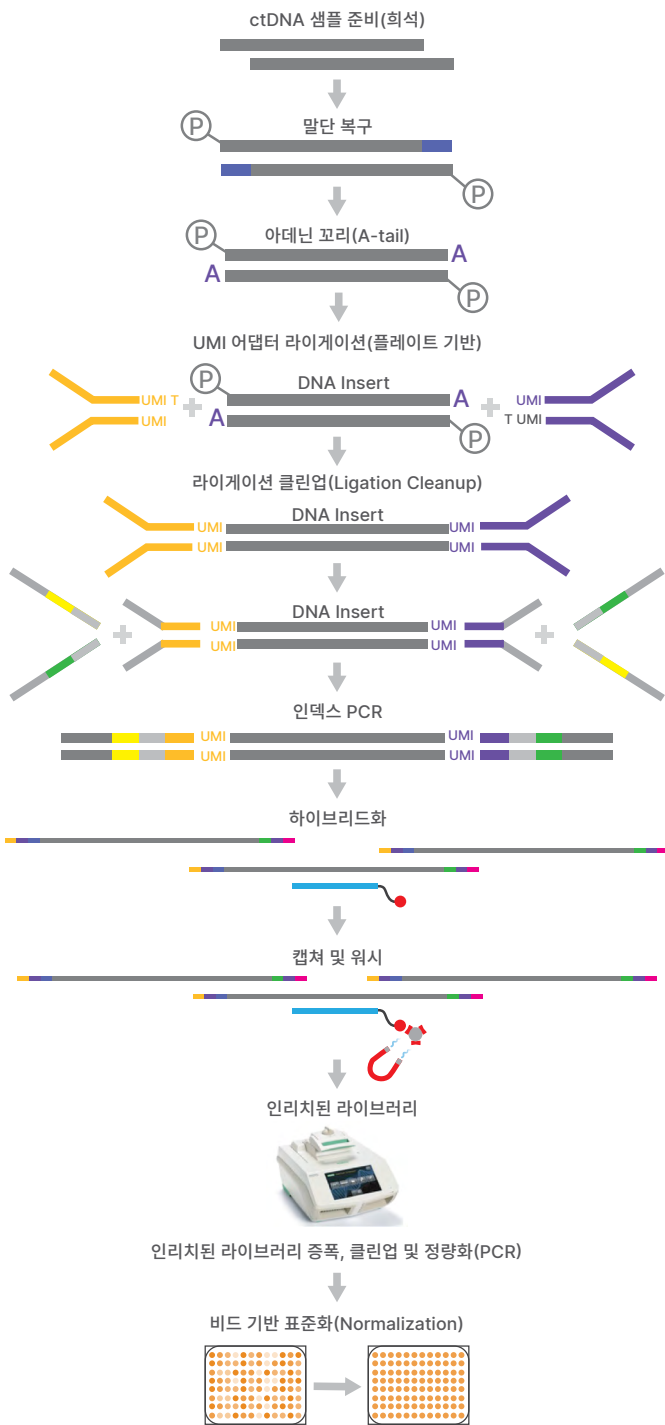


그림 3: UMI 기반 하이브리드 캡처 라이브러리 준비 - 표적화된 인리치먼트 과정에는 높은 결합 특이도를 보이면서도 변이를 포함하는 표적의 하이브리드화가 가능할 정도로 크게 설계된 프로브가 사용됨. UMI 시약은 오류율을 낮춰 분석 특이도를 높이고 신뢰도가 더 높은 변이 검출력을 보임.²²

표 5: 낮은 레벨 바이오마커의 정확한 검출^o

변이형	분석 민감도 ^{a,c}	분석 특이도 ^{b,c}
SNV(≥ 0.2% VAF)	≥ 90%	≥ 99.9994%
MNV(≥ 0.5% VAF)	≥ 90%	≥ 95%
Indel(≥ 0.5% VAF)	≥ 90%	≥ 95%
Gene amplification (≥ 1.3-fold change)	≥ 95%	≥ 95%
Gene deletion (≤ 0.6-fold change)	≥ 95%	≥ 95%
Gene rearrangement (≥0.5%)	≥ 95%	≥ 95%
MSI-high 검출 (≥ 0.3% tumor fraction)	≥ 95%	≥ 95%

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

정확하고 빠른 분석

포괄적이고 효율적인 변이 검출

DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis 파이프라인은 가속화되고 완전히 통합된 바이오인포매틱스 (bioinformatics, 생명정보학) 알고리즘을 사용하여 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 파이프라인은 2,300곳이 넘는 동종중합체(homopolymer) MSI 표지자 부위에서 얻은 정량적인 bMSI Score를 제공합니다. bTMB 분석의 경우 DRAGEN 파이프라인은 비동의(nonsynonymous) 및 동의(synonymous) SNV와 Indel을 모두 측정하여 민감도를 최적화합니다. 이 파이프라인은 변이를 검출하고 오류를 수정한 후에 생식세포(germline) 변이, 신뢰도가 낮은(low-confidence) 변이 및 클론성 조혈중(clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP)과 관련된 변이를 필터링하여 bTMB 측정 정확도를 한층 더 높여줍니다.

DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis 파이프라인은 로컬 Illumina DRAGEN Server v4에서 또는 Illumina Connected Analytics(ICA)를 통해 클라우드에서 실행됩니다. ICA는 랩에서 로컬 인프라를 확충하거나 유지할 필요 없이 2차 분석을 확대할 수 있도록 해주는 클라우드 기반의 안전한 유전체학 연구 플랫폼을 제공해 줍니다.²⁴ 향상된 DRAGEN 하드웨어와 소프트웨어는 데이터 분석 시간을 약 85% 단축시켜 줍니다(표 6).

표 6: S4 플로우 셀 사용 시 단축되는 24개 샘플의 데이터 분석 시간

데이터 분석 단계	TruSight Oncology 500 ctDNA DRAGEN Analysis 파이프라인
BCL conversion	1시간
Alignment + collapsing + realignment	11시간
Gene rearrangement calling	2시간
Variant calling	8시간
총 소요 시간	약 20시간 (약 85% 단축)

간소화된 데이터 해석 절차

2차 분석을 통해 변이 클래스와 바이오마커 유형을 확인한 후에는 데이터 해석을 통해 생물학적 관련이 있는 정보를 찾아야 합니다. 데이터 해석에는 Illumina Connected Insights,[§] Velsera사의 Clinical Genomics Workspace[¶] 또는 서드 파티 앱을 사용해 볼 수 있습니다.

§ 일부 국가에서는 지원되지 않음. Illumina Connected Insights는 서드 파티 지식 소스의 API 호출을 통해 사용자 정의 3차 분석 지원.

¶ Velsera: Pierian의 새로운 이름

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

사용자가 로컬 또는 ICA 기반의 2차 분석 환경에 저장되어 있는 변이 보고서 파일을 Velsera사의 Clinical Genomics Workspace 클라우드로 업로드하기만 하면 원활한 해석과 보고가 가능하도록 Clinical Genomics Workspace에서 변이 어노테이션(annotation, 주석) 및 필터링 작업을 수행합니다. Clinical Genomics Workspace는 맞춤형이 가능한 최종 유전체 보고서의 생성을 위해 수천 가지 유전체 변이로부터 생물학적으로 관련이 있는 변이를 필터링한 후 우선순위를 선정합니다.

신뢰할 수 있고 재현 가능한 결과

TruSight Oncology 500 ctDNA v2는 cfDNA 샘플에 존재하는 낮은 레벨의 유전체 변이와 바이오마커도 높은 민감도로 검출합니다. Illumina는 TruSight Oncology 500 ctDNA v2로 얻은 분석 결과의 높은 품질을 입증하기 위해 TruSight Oncology 500 ctDNA v2의 SNV 및 Indel, CNV, gene rearrangement, TMB 및 MSI 검출력을 측정하는 다양한 연구를 실시했습니다.

SNV 및 Indel

표적 인리치먼트 chemistry의 한 가지 장점은 높은 결합 특이도를 보이면서도 SNV 및 Indel을 포함하는 표적에 하이브리드화가 가능할 정도로 크게 설계된 프로브를 사용한다는 것입니다. SNV는 다양한 종류의 암에서 암 감수성(cancer susceptibility)과 연관성을 보였으므로 어떤 CGP 연구 방법을 선택하든 낮은 레벨의 변이를 검출하는 능력이 매우 중요합니다. TruSight Oncology 500 ctDNA v2는 샘플에서 각각 최저 0.2% 및 0.5% VAF 레벨에 존재하는 SNV 및 Indel을 재현성 있게 검출합니다(그림 4 및 그림 5).

CNV

일부 유전자와 종양 유형에서 관찰된 복제수 변화는 종양 형성과 연관성이 있습니다.²⁴ TruSight Oncology 500 ctDNA v2는 59개의 CNV 연관 유전자에 대한 연구가 가능하며, ≥ 1.3 -fold change를 LOD로 한 gene amplification(유전자 증폭) 검출과 ≤ 0.6 -fold change를 LOD로 한 deletion 검출이 가능합니다(표 7).[#]

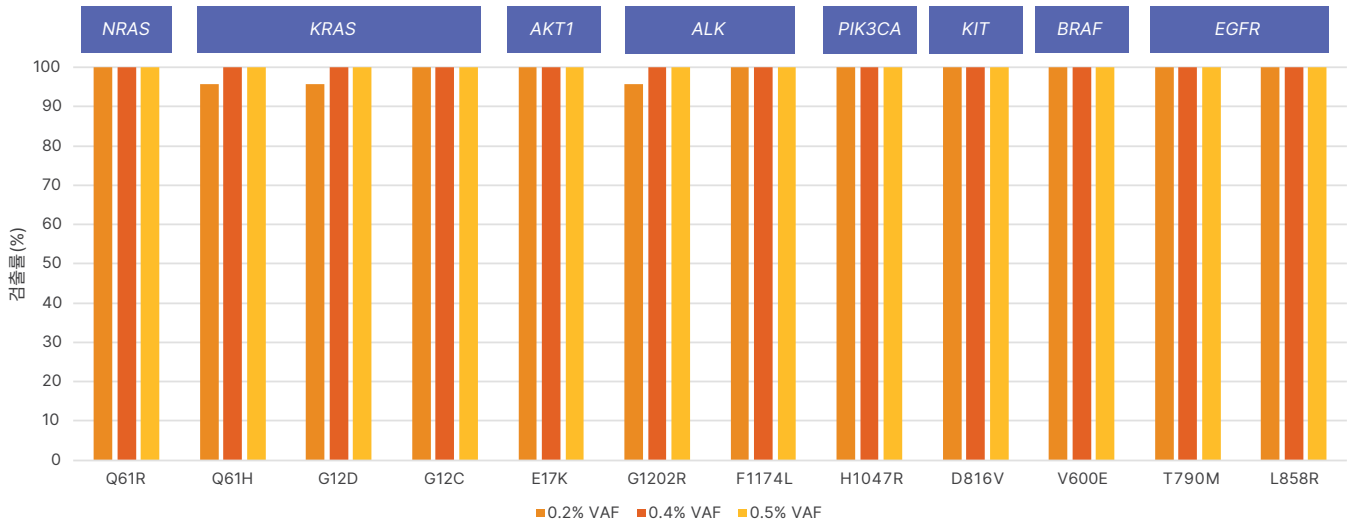


그림 4: LOD(0.2% VAF)에서 확인된 높은 주요 SNV 분석 성능* - 각각의 SNV에 대해 VAF가 알려진 합성 대조군 샘플을 0.20~0.50% 범위로 희석한 후 TruSight Oncology 500 ctDNA v2로 분석함. 최저 0.2% 레벨에 존재하는 SNV가 검출됨.

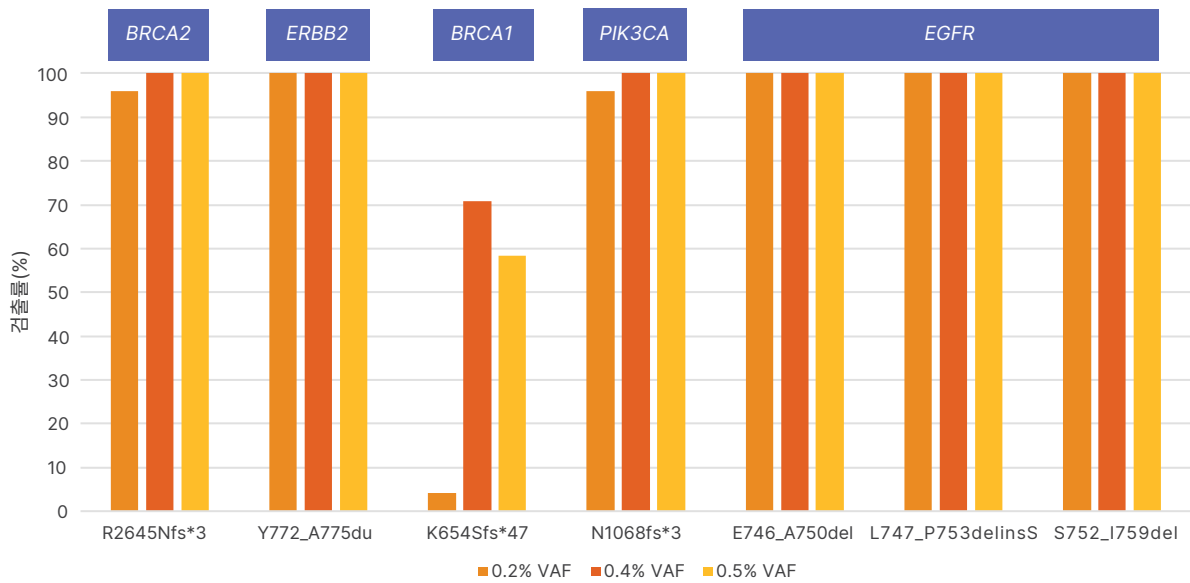


그림 5: LOD(0.5% VAF)에서 확인된 높은 Indel 분석 성능* - 각각의 insertion 또는 deletion에 대해 VAF가 알려진 합성 대조군 샘플을 0.20~0.50% 범위로 희석한 후 TruSight Oncology 500 ctDNA v2로 분석함. BRCA1는 변이가 동종중합체가 풍부한 영역에 존재하므로 검출률이 낮아 백그라운드 노이즈 레벨이 더 높은 것으로 나타남.

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

표 7: TruSight Oncology 500 ctDNA v2의 CNV 분석 성능**

유전자	예상된 배수 변화	관찰된 배수 변화	검출률
Amplification			
<i>ERBB2</i>	1.5	1.50	100%
<i>MET</i>	1.5	1.55	100%
<i>MYC</i>	1.5	1.27	100%
<i>ERBB2</i>	1.4	1.73	100%
<i>MET</i>	1.4	1.46	100%
<i>MYC</i>	1.4	1.22	100%
<i>ERBB2</i>	1.3	1.35	100%
<i>MET</i>	1.3	1.38	100%
<i>MYC</i>	1.3	1.19	8%
<i>ERBB2</i>	1.2	1.19	100%
<i>MET</i>	1.2	1.22	100%
<i>MYC</i>	1.2	N/A	0
Deletion			
<i>BRCA1</i>	0.85	0.86	16%
<i>BRCA2</i>	0.85	N/A	0
<i>BRCA1</i>	0.80	0.79	100%
<i>BRCA2</i>	0.80	0.80	100%
<i>BRCA1</i>	0.70	0.69	100%
<i>BRCA2</i>	0.70	0.69	100%

Gene amplification은 합성 대조군(synthetic control)을 사용하고, deletion은 세포주(cell line)를 사용해 배수 변화(fold change)가 알려진 샘플을 TruSight Oncology 500 ctDNA v2로 측정함. CNV는 세 가지 VAF 레벨로 해석함. Gene amplification은 LOD ≥ 1.3-fold change, deletion은 LOD ≤ 0.6-fold change임. 예상된 배수 변화와 관찰된 배수 변화 간의 높은 상관관계를 확인할 수 있음.

Gene rearrangement

Gene rearrangement는 암의 유전체학적 드라이버(driver) 역할을 할 수 있기 때문에 질병의 근간 파악을 목표로 하는 연구라면 gene rearrangement 검출력을 반드시 갖춰야 합니다. TruSight Oncology 500 ctDNA v2는 파트너(partner)와 무관한 낮은 농도로 존재하는 유전자도 검출이 가능하며 그 특성을 파악할 수 있습니다(표 8).

표 8: TruSight Oncology 500 ctDNA v2의 gene rearrangement 분석 성능**

Fusion (유전자 융합)	예상된 VAF	관찰된 VAF	검출률
<i>ALK:EML4</i>	0.60%	0.48%	100%
<i>GOPC;ROS1:CD74</i>	0.60%	0.39%	100%
<i>RET:NCOA4</i>	0.60%	0.31%	100%
<i>ALK:EML4</i>	0.50%	0.43%	100%
<i>GOPC;ROS1:CD74</i>	0.50%	0.33%	100%
<i>RET:NCOA4</i>	0.50%	0.27%	100%
<i>ALK:EML4</i>	0.40%	0.36%	100%
<i>GOPC;ROS1:CD74</i>	0.40%	0.24%	100%
<i>RET:NCOA4</i>	0.40%	0.19%	100%
<i>ALK:EML4</i>	0.20%	0.18%	88%
<i>GOPC;ROS1:CD74</i>	0.20%	0.11%	100%
<i>RET:NCOA4</i>	0.20%	0.12%	83%

세 가지 알려진 DNA fusion을 포함하는 0.2~0.6% 범위의 VAF 레벨로 해석된 샘플을 TruSight Oncology 500 ctDNA v2로 측정함. Gene rearrangement의 LOD = 0.5%. TruSight Oncology 500 ctDNA v2를 활용하는 NGS 기반의 연구는 2,300곳이 넘는 6~7 bp 크기의 동중중합체 영역을 확인함으로써 오류율뿐만 아니라 동중중합체 시퀀싱에서 흔히 발견되는 위양성(false positive) 발생 가능성도 낮출 수 있음. VAF = variant allele frequency(대립유전자 빈도).

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

면역항암제 유전자 시그니처: MSI 및 TMB

MSI 및 TMB의 검출은 복수의 유전체 좌위(locus) 분석을 통해 이루어집니다. TruSight Oncology 500 ctDNA v2를 활용하는 NGS 기반의 연구는 2,300곳이 넘는 6~7 bp 크기의 동종중합체 영역을 확인함으로써 오류율뿐만 아니라 동종중합체 시퀀싱에서 흔히 발견되는 위양성 발생 가능성도 낮출 수 있습니다.²⁵

TruSight Oncology 500 ctDNA v2는 높은 민감도의 라이브러리 프렙 chemistry와 고급 바이오인포매틱스 도구를 토대로 낮은 0.3% tumor fraction(종양 분획)에서도 MSI를 검출할 수 있습니다(그림 6).^{††}

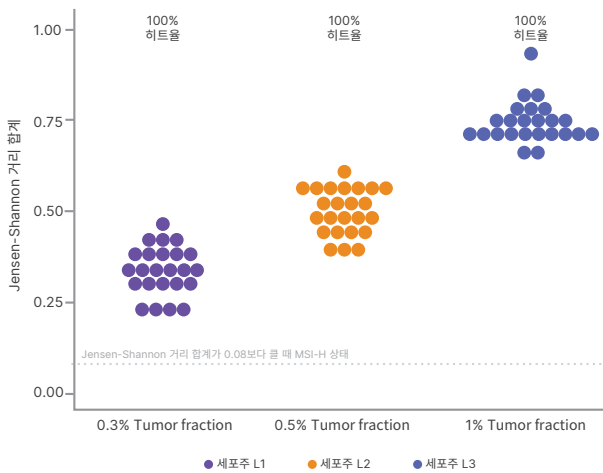


그림 6: 면역항암제 연구에 적합한 민감도 높은 MSI 검출력^{††} – 이전에 알려진 MSI-H Score가 있는 세포주로 준비한 뉴클레오솜(nucleosome)을 야생형(wildtype) 세포 주변에 적정(titration)하여 tumor fraction을 얻음. Illumina의 DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA v2.1 Analysis Software를 사용하여 높은 MSI 분석 민감도를 달성함. 2,300곳이 넘는 동종중합체 영역을 측정함.

소형 패널로는 낮은 변이 레벨에서 정밀하고 재현 가능한 bTMB 값을 얻기 힘들 수 있습니다.⁷ TruSight Oncology 500 ctDNA v2는 정확한 bTMB 추정치를 제공하기 위해 포괄적인 유전체 콘텐츠를 1.94 Mb 패널 및 정교한 인포매틱스 알고리즘과 통합했습니다. Illumina의 사유 DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA 바이오인포매틱스 파이프라인은 생식세포 변이 및 클론성 조혈증 관련 변이 모두에 고급 필터링을 적용하여 일치성이 매우 높은 Tumor-Normal(종양-정상) 워크플로우와 Tumor-Only(종양 단독) 워크플로우를 제공합니다($R^2 = 0.992$)(그림 7).²⁵

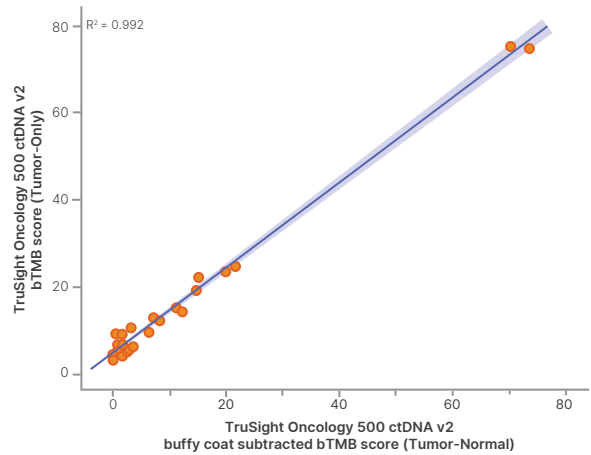


그림 7: Tumor-Only 워크플로우와 Tumor-Normal 워크플로우 간 높은 bTMB 데이터 상관관계^{††} – TruSight Oncology 500 ctDNA v2와 고급 바이오인포매틱스 도구 그리고 TMB (> 1 Mb) 검출이 가능한 대형 패널을 이용해 얻은 bTMB Score는 혈장과 연층(buffy coat) cfDNA를 사용하는 Tumor-Normal 워크플로우로 얻은 bTMB Score와 높은 일치성을 보임.

강화된 제품 특성

Illumina는 랩의 원활한 운영을 돕기 위해 높은 수준의 서비스와 지원을 제공하고 있습니다. TruSight Oncology 500 ctDNA v2는 다음과 같이 효율성을 한층 더 높여 줄 수 있는 기능을 제공합니다.

- 사전 제품 변경 고지 – TruSight Oncology 500 ctDNA에 중요한 변경 사항이 있을 경우, Illumina에서 변경 6개월 전에 미리 랩에 알립니다.
- Certificate of Analysis^{††} – 모든 TruSight Oncology 500 ctDNA v2 제품에는 제품이 사전 설정된 출시 사양과 품질을 충족했음을 알리는 Illumina Quality Assurance Department가 발급한 certificate of analysis(CoA)가 제공됩니다.
- 길어진 유통 기한 – TruSight Oncology 500 ctDNA v2 시약의 최소한 보장되는 유통 기한이 6개월로 연장되어 제품의 유통 기한 만료 위험이 줄었으며, 랩에서는 최신 검사 요구 사항에 따라 시약을 사용할 수 있습니다.

^{††} Illumina 내부 데이터에 근거한 수치. 연구 전용이며, 본 사양은 임상/진단 용도로 승인되지 않음.

^{‡‡} CoA는 2024년 제공 예정.

액체 생검을 활용한 CGP 연구를 지원하는 통합 솔루션

TruSight Oncology 500 ctDNA v2는 혈장 샘플에서 현재 가이드라인 및 임상 연구와 관련이 있는 수백 개의 암 관련 바이오마커를 동시에 분석하는 NGS 기반의 연구를 위한 멀티플렉스(multiplex) assay 제품입니다. 이 포괄적인 assay는 연구자가 반복적인 실험을 위해 여러 개의 샘플을 준비할 필요 없이 혈액 내 523개의 유전자에서 다양한 종류의 종양과 관련이 있는 여러 가지 변이형을 검출하며 면역항암제 및 새로운 바이오마커(bTMB, bMSI, *NTRK* 및 *ROS1*)를 확인할 수 있도록 해 줍니다.

향상된 chemistry^{§§}로 전반적인 워크플로우 시간이 4일 이내로 단축되었고, 필요한 cfDNA 사용량이 20 ng으로 줄었으며, SNV의 경우 LOD가 0.2% VAF까지 낮아졌습니다. 또한 자동화 지원 워크플로우^{¶¶}는 수작업 시간을 줄이고 랩 관계자의 부담을 최소화하여 효율성이 높은 랩을 만들어 줍니다. 광범위한 유전체 콘텐츠, 업계를 선도하는 시퀀싱 기술, 한층 더 강력해진 소프트웨어로 무장한 TruSight Oncology 500 ctDNA v2는 통합 솔루션을 제공하여, 연구자가 최소한의 운영 및 분석 절차만으로 CGP 연구를 수행할 수 있도록 해 줍니다.

상세 정보

[NovaSeq 6000 시스템](#)

[DRAGEN Secondary Analysis](#)

[Illumina Connected Analytics](#)

[Illumina Connected Insights](#)

제품 목록 - 라이브러리 프리프 키트(수동)

제품	카탈로그 번호
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 (24 samples)	20105899
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 for use with NovaSeq 6000 S2 (24 samples)	20105901
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 for use with NovaSeq 6000 S4 (24 samples)	20105902
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 (24 samples) plus Velsera Interpretation Report	20105905
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 plus Velsera Interpretation Report, for use with NovaSeq 6000 S2 (24 samples)	20105907
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 plus Velsera Interpretation Report, for use with NovaSeq 6000 S4 (24 samples)	20105908
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 (24 samples) plus Connected Insights Interpretation Report	출시 예정
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 plus Connected Insights Interpretation Report, for use with NovaSeq 6000 S2 (24 samples)	출시 예정
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 plus Connected Insights Interpretation Report, for use with NovaSeq 6000 S4 (24 samples)	출시 예정

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

¶¶ 자동화 지원 워크플로우 2024년 제공 예정.

제품 목록 – 라이브러리 프렙 키트(자동)

제품	카탈로그 번호
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 for Automation (48 samples)	출시 예정
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 Automation Kit, for use with NovaSeq 6000 S2 (48 samples)	출시 예정
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 Automation Kit, for use with NovaSeq 6000 S4 (48 samples)	출시 예정
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 for Automation (48 samples) plus Velsera Interpretation Report	출시 예정
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 Automation Kit plus Velsera Interpretation Report, for use with NovaSeq 6000 S2 (48 samples)	출시 예정
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 Automation Kit plus Velsera Interpretation Report, for use with NovaSeq 6000 S4 (48 samples)	출시 예정
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 for Automation (48 samples) plus Connected Insights Interpretation Report	출시 예정
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 Automation Kit plus Connected Insights Interpretation Report, for use with NovaSeq 6000 S2 (48 samples)	출시 예정
TruSight Oncology 500 ctDNA v2 Automation Kit plus Connected Insights Interpretation Report, for use with NovaSeq 6000 S4 (48 samples)	출시 예정

제품 목록 – 인덱스 어댑터

제품	카탈로그 번호
IDT for Illumina UMI DNA/RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20034701
IDT for Illumina UMI DNA/RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20034702
IDT for Illumina UMI DNA/DNA Index Anchors Set A for Automation	20066404
IDT for Illumina UMI DNA/DNA Index Anchors Set B for Automation	20063213

제품 목록 – 시퀀싱 시약

제품	카탈로그 번호
NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit v1.5 (300 cycles)	20028314
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5 (300 cycles)	20028312

제품 목록 - 데이터 분석

제품	카탈로그 번호
로컬 변이 보고	
Illumina DRAGEN Server v4	20051343
Illumina DRAGEN Server Installation	20031995
Illumina DRAGEN Server v4 Support Plan	20085832
Field Delivered Applications Training	15032919
클라우드 기반 변이 보고	
ICA Basic Annual Subscription	20044874
ICA Professional Annual Subscription	20044876
ICA Enterprise Annual Subscription	20038994
ICA Enterprise Compliance Add-on	20066830
Subscription ICA Training and Onboarding	20049422
변이 해석	
Illumina Connected Insights - Annual Subscription	20090137
Illumina Connected Insights - Oncology Genome Equivalent Samples (VCF)	20090138
Illumina Connected Insights - Training and Onboarding	20092376
Informatics Professional Services	20071787
클라우드 스토리지	
Illumina Analytics - 1 iCredit	20042038
Illumina Analytics Starter Package - 1,000 iCredits	20042039
Illumina Analytics - 5,000 iCredits	20042040
Illumina Analytics - 50,000 iCredits	20042041
Illumina Analytics - 100,000 iCredits	20042042

참고 문헌

1. Lim C, Tsao MS, Le LW, et al. Biomarker testing and time to treatment decision in patients with advanced nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2015;26(7):1415-1421. doi:10.1093/annonc/mdv208
2. Yu TM, Morrison C, Gold EJ, Tradonsky A, Layton AJ. Multiple Biomarker Testing Tissue Consumption and Completion Rates With Single-gene Tests and Investigational Use of OncoPrint Dx Target Test for Advanced Non-Small-cell Lung Cancer: A Single-center Analysis. *Clin Lung Cancer*. 2019;20(1):20-29.e8. doi:10.1016/j.clcc.2018.08.010
3. Reitsma M, Fox J, Borre PV, et al. Effect of a Collaboration Between a Health Plan, Oncology Practice, and Comprehensive Genomic Profiling Company from the Payer Perspective. *J Manag Care Spec Pharm*. 2019;25(5):601-611. doi:10.18553/jmcp.2019.18309
4. Zehir A, Benayed R, Shah RH, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients [published correction appears in *Nat Med*. 2017 Aug 4;23 (8):1004]. *Nat Med*. 2017;23(6):703-713. doi:10.1038/nm.4333
5. Kopetz S, Mills Shaw KR, Lee JJ, et al. Use of a Targeted Exome Next-Generation Sequencing Panel Offers Therapeutic Opportunity and Clinical Benefit in a Subset of Patients With Advanced Cancers. *JCO Precis Oncol*. 2019;3:PO.18.00213. Published 2019 Mar 8. doi:10.1200/PO.18.00213
6. Drilon A, Wang L, Arcila ME, et al. Broad, Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing Identifies Actionable Genomic Alterations in Lung Adenocarcinomas Otherwise Negative for Such Alterations by Other Genomic Testing Approaches. *Clin Cancer Res*. 2015;21(16):3631-3639. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2683
7. Buchhalter I, Rempel E, Endris V, et al. Size matters: Dissecting key parameters for panel-based tumor mutational burden analysis. *Int J Cancer*. 2019;144(4):848-858. doi:10.1002/ijc.31878
8. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med*. 2017;9(1):34. Published 2017 Apr 19. doi:10.1186/s13073-017-0424-2
9. Hagemann IS, Devarakonda S, Lockwood CM, et al. Clinical next-generation sequencing in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer*. 2015;121(4):631-639. doi:10.1002/cncr.29089
10. Rapisuwon S, Vietsch EE, Wellstein A. Circulating biomarkers to monitor cancer progression and treatment. *Comput Struct Biotechnol J*. 2016;14:211-222. Published 2016 Jun 1. doi:10.1016/j.csbj.2016.05.004

11. Aggarwal C, Thompson JC, Black TA, et al. Clinical Implications of Plasma-Based Genotyping With the Delivery of Personalized Therapy in Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* 2019;5(2):173-180. doi:10.1001/jamaoncol.2018.4305
12. Leigh 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
13. Palmero R, Taus A, Viteri S, et al. Biomarker Discovery and Outcomes for Comprehensive Cell-Free Circulating Tumor DNA Versus Standard-of-Care Tissue Testing in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *JCO Precision Oncology.* 2021;5:93-102. doi:10.1200/PO.20.00241
14. Rolfo C, Mack P, Scagliotti GV, et al. Liquid Biopsy for Advanced NSCLC: A Consensus Statement From the International Association for the Study of Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2021;16(10):1647-1662. doi:10.1016/j.jtho.2021.06.017
15. Mosele F, Remon J, Mateo J, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol.* 2020;31(11):1491-1505. doi:10.1016/j.annonc.2020.07.014
16. Pascual J, Attard G, Bidard FC, et al. ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol.* 2022;33(8):750-768. doi:10.1016/j.annonc.2022.05.520
17. Illumina. TruSight Oncology 500 ctDNA data sheet. <https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/trusight-oncology-500-ctdna-data-sheet-m-gl-00843/trusight-oncology-500-ctdna-data-sheet-m-gl-00843.pdf>. Accessed September 20, 2023.
18. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014;6(224):224ra24. doi:10.1126/scitranslmed.3007094
19. Mack PC, Banks KC, Espenschied CR, et al. Spectrum of driver mutations and clinical impact of circulating tumor DNA analysis in non-small cell lung cancer: Analysis of over 8000 cases. *Cancer.* 2020;126(14):3219-3228. doi:10.1002/cncr.32876
20. Saarenheimo J, Eigeliene N, Andersen H, Tiirola M, Jekunen A. The Value of Liquid Biopsies for Guiding Therapy Decisions in Non-small Cell Lung Cancer. *Front Oncol.* 2019;9:129. doi:10.3389/fonc.2019.00129
21. Illumina. TruSight Oncology UMI Reagents data sheet. <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-oncology-umi-reagents-datasheet-1000000050425.pdf>. Accessed September 20, 2023.
22. Illumina. Sequencing accuracy with Unique Molecular Identifiers. <https://www.illumina.com/techniques/sequencing/ngs-library-prep/multiplexing/unique-molecular-identifiers.html>. Accessed September 20, 2023.
23. Socea JN, Stone VN, Qian X, Gibbs PL, Levinson KJ. Implementing laboratory automation for next-generation sequencing: benefits and challenges for library preparation. *Front Public Health.* 2023;11:1195581. doi:10.3389/fpubh.2023.1195581
24. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature.* 2010;463(7283):899-905. doi:10.1038/nature08822
25. Illumina. Analysis of TMB and MSI status with TruSight Oncology 500 application note. <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/trusight-oncology-500-tmb-analysis-1170-2018-009.pdf>. Accessed September 20, 2023.



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-00212 KOR