

# TruSight™ Oncology 500 ctDNA

Umfassendes genomisches Profiling anhand von Liquid-Biopsy-Proben in der eigenen Einrichtung.

### Vorteile

- Umfassendes genomisches Profiling anhand von Blutproben**  
 Bestimmung von DNA-Varianten bei 523 Genen, einschließlich bTMB und bMSI, in der eigenen Einrichtung\*
- Liquid Biopsy in der eigenen Einrichtung**  
 Nichtinvasive Blutplasmaproben als Alternative oder Ergänzung zu nur in begrenzter Menge verfügbaren Gewebeproben
- Belastbare Ergebnisse**  
 Niedrige Nachweisgrenzen dank UMI-basierter Bibliotheksvorbereitung auf Basis von Hybriderfassung und Sequenzierung mit hoher Intensität auf dem NovaSeq™ 6000-System erzielen und fortschrittliche Bioinformatik nutzen
- Integrierter Workflow**  
 Dank Varianten-Calling auf der DRAGEN™ Bio-IT-Plattform in fünf Tagen von cfDNA zur Berichtsauswertung

\* bTMB und bMSI bezeichnen plasmabasierte (Blut-)Marker

### Einleitung

Die Liquid Biopsy ermöglicht die umfassende Analyse zirkulierender zellfreier DNA (Cell-free DNA, cfDNA) aus Plasma und bietet damit einen nichtinvasiven Ansatz für das Profiling solider Tumore. Um die Vorteile der Liquid Biopsy nutzen zu können, ist ein hochgradig sensitiver und spezifischer Assay erforderlich, der somatische Mutationen bei niedriger Variantenhäufigkeit erkennt. TruSight Oncology 500 ctDNA bietet diese hohe Sensitivität anhand der Leistung bewährter Sequenzierung der nächsten Generation (Next-Generation Sequencing, NGS) von Illumina und ermöglicht das umfassende genomische Profiling zirkulierender Tumor-DNA (Circulating Tumor DNA, ctDNA) aus cfDNA (Abbildung 1, Tabelle 1). Die Kombination dieser fortschrittlichen Lösung mit der Bioinformatikleistung der DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis-Software gibt Wissenschaftlern in der klinischen Forschung eine DNA-zu-Bericht-Lösung an die Hand, mit der sich in einem einzigen Assay mehrere Variantentypen Hunderter Gene auswerten lassen.

TruSight Oncology 500 ctDNA ist kompatibel mit NovaSeq 6000 v1.5-Sequenzierungsreagenzien. Zusätzlich zur höheren Betriebseffizienz, die die Kosten je Probe um über 35 % verringern kann, zeichnen sich diese Reagenzien durch eine verlängerte Haltbarkeit von sechs Monaten sowie verbesserte Q30-Scores aus.

Tabelle 1: TruSight Oncology 500 ctDNA im Überblick

Parameter	Details
Gerät	NovaSeq 6000-System
Panelgröße	1,94 Mb DNA
Panel-Inhalt	523 Gene 59 Gene für CNVs 23 Gene für Genfusionen MSI (> 2.400 Loci) TMB
Erforderliche DNA-Zugabe	30 ng cfDNA <sup>a</sup>
Probenotyp	Aus Blut gewonnene cfDNA
Assay-Zeit insgesamt	5 Tage von der Bibliotheksvorbereitung bis zum Variantenbericht
Laufzeit der Sequenzierung	36 Std. Lauf, 10 Std. Analyse (S2-Fließzelle) 45 Std. Lauf, 22 Std. Analyse (S4-Fließzelle)
Sequenzierungslauf	2 × 151 bp
Probanddurchsatz	8 Proben pro Lauf (S2-Fließzelle) 24 Proben pro Lauf (S4-Fließzelle) 48 Proben je Bibliotheksvorbereitungskit
Nachweisgrenze	0,5 % VAF für kleine Varianten ≥ 1,4-fache Änderung für Genamplifikationen ≤ 0,6-fache Änderung für Gendeletionen ≥ 2 % Tumorfraction für MSI
Analytische Sensitivität	≥ 95 % (bei Nachweisgrenze für alle Variantentypen)
Analytische Spezifität	≥ 95 %

a. Quantifizierung mit den Systemen Agilent TapeStation oder Fragment Analyzer empfohlen

### Vorteile der Liquid Biopsy

Im Gegensatz zur Gewebebiopsie, die nur Informationen zu einem Teil des Tumors liefert, bietet die Liquid Biopsy Erkenntnisse über die Intra- und Intertumorheterogenität im gesamten Körper. Aktuelle Studien zeigen, dass sich mit der cfDNA-Analyse eine deutliche Anzahl von in Richtlinien empfohlenen Biomarkern und Resistenzänderungen bestimmen lassen, die mit Gewebebiopsien nicht ermittelt werden können.<sup>1</sup> Zusätzlich hat eine Studie zu nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen ergeben, dass cfDNA-Analysen sich durch eine hohe Übereinstimmung mit gewebebasierten Analysen auszeichnen.<sup>2</sup>

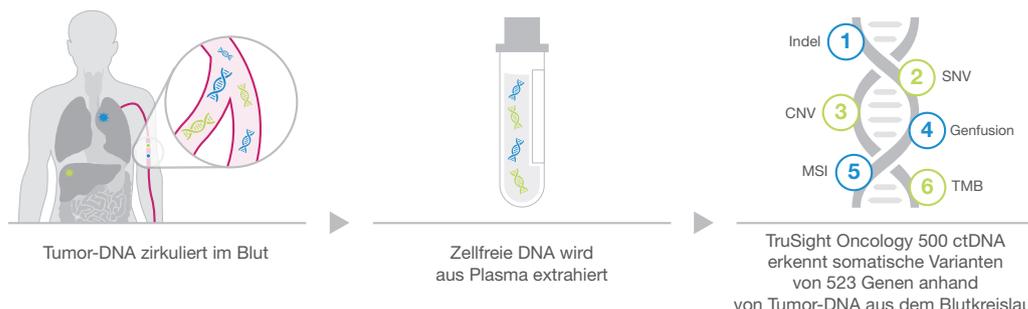
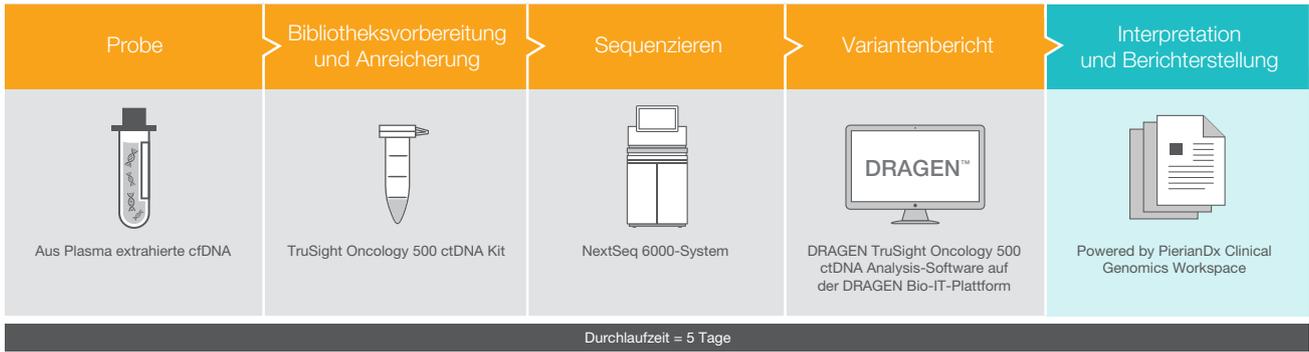


Abbildung 1: Liquid Biopsy ermöglicht das Profiling von Biomarkern für zahlreiche Varianten und Krebsarten: Komplexe Varianten-Calling-Algorithmen und eine hohe Sequenzierungstiefe ermöglichen die Erkennung wichtiger Biomarker in cfDNA mit einer Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) von 0,5 %.



**Abbildung 2: TruSight Oncology 500 ctDNA-Assay-Workflow:** Der TruSight Oncology 500 ctDNA-Assay lässt sich in derzeitige Labor-Workflows integrieren. Von der cfDNA bis zum Variantenbericht sind fünf Tage erforderlich.

### Eine Basis mit umfassendem Inhalt

Der Inhalt von TruSight Oncology 500 ctDNA wurde unter Einbeziehung anerkannter Experten im Bereich Onkologie entwickelt und umfasst aktuelle sowie neue Biomarker mit umfassender Coverage von Genen, die in wichtigen Richtlinien und klinischen Studien für zahlreiche Tumorarten enthalten sind. Das Panelonddesign erfasst sowohl bekannte als auch neue Genfusionen und umfasst 523 Gene zur Bestimmung von Varianten, die wahrscheinlich zur Tumorgenese beitragen. Die Biomarker enthalten Einzelnukleotidvarianten (Single-Nucleotide Variants, SNVs), Insertionen/Deletionen (Indels), Kopienzahlvarianten (CNVs), Genfusionen und komplexe genomische Immunonkologie-Signaturen wie Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und Tumormutationslast (Tumor Mutational Burden, TMB) (Tabelle 2). Eine vollständige Genliste finden Sie unter [www.illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/trusight-oncology-500-ctdna.html](http://www.illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/trusight-oncology-500-ctdna.html).

**Tabelle 2: Beispiele für mit TruSight Oncology 500 ctDNA bestimmte Varianten**

Varianteigentyp	Relevante Beispiele
SNVs und Indels	<i>EGFR, POLE, TMPRSS2, BRAF</i>
Genfusionen	<i>ALK, ROS1, NTRK, RET</i>
CNVs	<i>HER2</i>
MSI	MSI-Score
TMB	TMB-Score

### Bewährte Technologie für die Bestimmung seltener Biomarker

Mithilfe bewährter SBS-Chemie (Sequencing by Synthesis, Sequenzierung durch Synthese) von Illumina ermöglicht TruSight Oncology 500 ctDNA das umfassende genetische Profiling anhand von nur 30 ng cfDNA. Damit stellt die Lösung eine ideale Alternative dar, wenn kein Gewebe getestet werden kann. Die Bibliotheksvorbereitung profitiert von der Target-Anreicherungschemie, bei der aus DNA-basierten Bibliotheken ausgewählte Targets mithilfe biotinylierter Sonden und streptavidinbeschichteter magnetischer Beads angereichert werden. Die Capture-Anreicherungschemie erlaubt eine zielgerichtete Hybridisierung durch eine hohe Bindungsspezifität der verwendeten Sonden, die eine Hybridisierung an Targets mit kleineren Mutationen spezifisch möglich machen. Dieser Ansatz verringert den Verlust von Proben, wenn natürliche Allelvarianten oder Sequenzierungsartefakte vorhanden sind.

Da ctDNA nur einen kleinen Anteil der cfDNA darstellt, sind leistungsstarke Methoden erforderlich, um Signal und Rauschen zu unterscheiden. Die Bibliotheksvorbereitung beinhaltet außerdem eindeutige molekulare Identifikatoren (Unique Molecular Identifiers,

UMIs), die die Identifizierung extrem seltener Varianten ermöglichen.<sup>3</sup> TruSight Oncology 500 ctDNA-Bibliotheken werden auf dem NovaSeq 6000-System bei einer hohen Tiefe (400 Mio Reads je Probe bei ca. 35.000-fach) sequenziert, um die Sensitivität zu erhöhen. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, Mutationen bei einer Variantenallelhäufigkeit (Variant Allele Frequency, VAF) für kleine Varianten von 0,5 % mit einer analytischen Sensitivität von 95 % und einer analytischen Spezifität von > 99,995 % zu bestimmen (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Hochpräzise Bestimmung seltener Varianten**

Varianteigentyp	Analytische Sensitivität <sup>a</sup>	Analytische Spezifität <sup>b</sup>
Keine Varianten (≥ 0,5 % VAF)	≥ 95 %	≥ 99,995 %
Genamplifikationen (≥ 1,4-fache Änderung)	≥ 95 %	≥ 95 %
Gendeletionen (≤ 0,6-fache Änderung)	≥ 95 %	≥ 95 %
Genfusionen (0,5 %)	≥ 95 %	≥ 95 %
„MSI high“-Erkennung (≥ bei 2 % Tumorfraction)	≥ 95 %	≥ 95 %

- a. Bei der analytischen Sensitivität handelt es sich um den Prozentsatz der Erkennung bei der angegebenen Variantenebene.
- b. Bei der analytischen Spezifität handelt es sich um die Fähigkeit zur Erkennung eines bekannten negativen Ergebnisses.

### Schnellere, genaue Analyse

Die DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software verwendet einen beschleunigten und vollständig integrierten Bioinformatikalgorithmus, um die Herausforderungen von cfDNA zu bewältigen und eine optimale Assay-Leistung sicherzustellen. Die Software führt das Sequenz-Alignment sowie die Fehlerkorrektur anhand von Collapsing der Sequenz und anschließend das Varianten-Calling auf Basis der Rohdaten durch. Doppelte Reads sowie Sequenzierungsfehler werden ohne Signalverlust für seltene Varianten entfernt, was Varianten-Calling-Ergebnisse mit hoher Sensitivität gewährleistet.

Im Gegensatz zu qualitativen Ergebnissen aus PCR-basierten Assays bietet DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software einen quantitativen MSI-Score, der anhand von über 2.400 Homopolymer-MSI-Markerloci ermittelt wird. Für die TMB-Analyse optimiert die DRAGEN-Software die Sensitivität, indem sowohl nicht synonyme als auch synonyme SNVs und Indels gemessen werden. Im Anschluss an Varianten-Calling und Fehlerkorrektur wird die Genauigkeit der TMB-Messung weiter erhöht, indem nach Keimbahnvarianten, Varianten mit geringer Konfidenz und Varianten gefiltert wird, die in Zusammenhang mit klonaler Hämatopoese unbestimmten Potenzials stehen.

DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis-Software wird auf einem lokalen Illumina DRAGEN Server v3 ausgeführt.\* Die ultraschnelle Plattform bietet erweiterte Hardware und Software, die die Dauer der Datenanalyse um ca. 85 % bzw. von neun Tagen auf ca. 20 Stunden verkürzen (Tabelle 4).

PierianDx Clinical Genomics Workspace führt die tertiäre Analyse durch. Laden Sie einfach die Variantenberichtsdateien in die Clinical Genomics Workspace-Cloud hoch. Clinical Genomics Workspace führt die Variantenannotation und -filterung durch und ermöglicht so eine problemlose Interpretation und Berichterstellung. Clinical Genomics Workspace filtert und priorisiert aus Tausenden Varianten im Genom die biologisch relevanten Varianten für den abschließenden, automatisch generierten und benutzerdefinierbaren Genomikbericht. Der gesamte Workflow, von der cfDNA bis hin zu konsolidierten Variantenberichten, nimmt lediglich fünf Tage in Anspruch (Abbildung 2).

### Umfassende Validierung für genaue und hochgradig reproduzierbare Ergebnisse

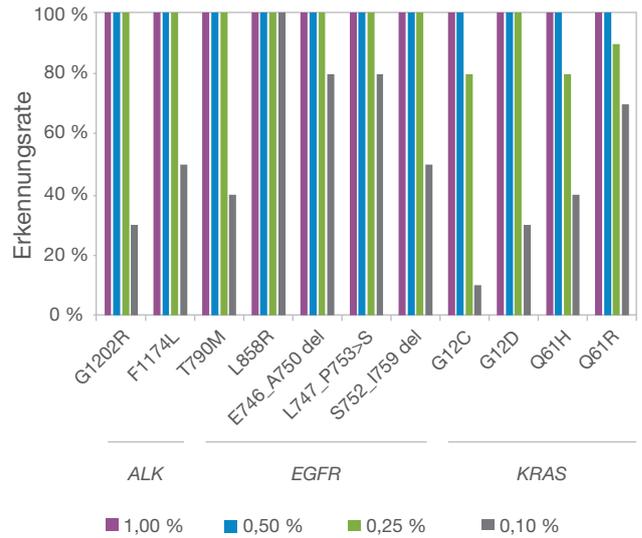
Zur Verdeutlichung der hohen Qualität der mit TruSight Oncology 500 ctDNA erzielten Ergebnisse hat Illumina zahlreiche Studien zur Calling-Fähigkeit bei SNVs, CNVs, Genfusionen, TMB und MSI durchgeführt (Abbildungen 3 und 4, Tabellen 5 und 6).

**Tabelle 4: Der lokale DRAGEN Server v3 verkürzt die Dauer der Datenanalyse.**

Datenanalyse-schritt	Alternative Lösung (nicht DRAGEN) <sup>a</sup>	TruSight Oncology 500 ctDNA DRAGEN Analysis-Software
BCL-Konvertierung	6 Stunden	1 Stunde
Alignment + Collapsing + Realignment	170 Stunden	11 Stunden
Calling von Genfusionen	10 Stunden	2 Stunden
Variante-Calling	24 Stunden	8 Stunden
Gesamtdauer	ca. 9 Tage	ca. 20 Stunden (Verkürzung um ca. 85 %)

a. Einzelknoten (128 GB Speicher, CPU mit 24 Kernen), nicht parallel ausgeführte Pipeline für 24 Proben mit einer S4-Fließzelle

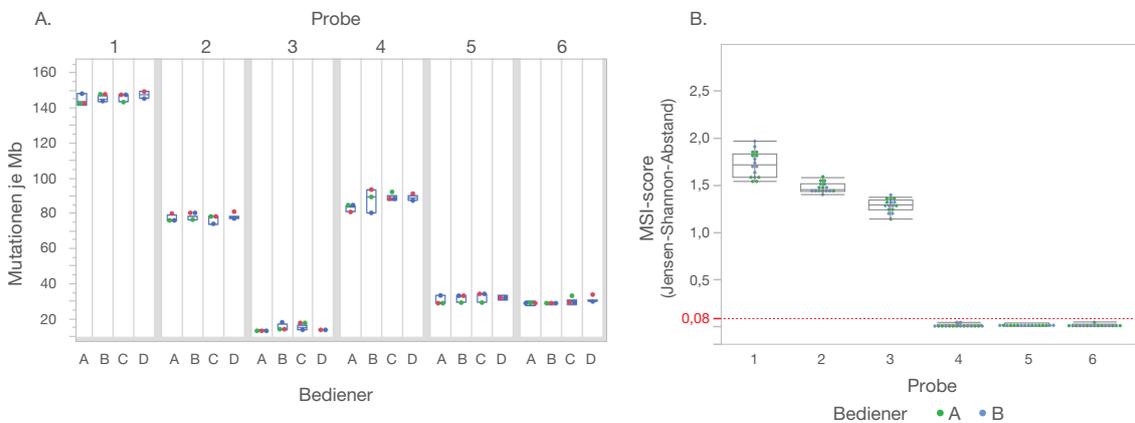
\* Die cloudbasierte DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software-Lösung steht demnächst zur Verfügung.



**Abbildung 3: Erkennung kleiner Varianten mit geringer VAF:** Proben mit bekannter VAF für jede Variante wurden auf Werte zwischen 0,10 und 1,00 % VAF verdünnt. Fünf Replikate für jede Probe wurden mit TruSight Oncology 500 ctDNA unter Verwendung von 30 ng kommerzieller Referenzkontroll-DNA analysiert.

### Zusammenfassung

TruSight Oncology 500 ctDNA ist ein NGS-basierter Multiplex-Assay, der Hunderte krebsrelevante, aus Plasma extrahierte Biomarker gleichzeitig analysiert. Der Assay-Inhalt entspricht aktuellen Richtlinien und klinischen Studien. Er ermöglicht die Erkennung von zahlreichen Variantentypen bei 523 Genen, die mit der kompletten Coding Sequence abgedeckt sind und mehrere Tumorarten abdecken, ohne dass mehrere Proben für wiederholte Tests erforderlich sind. TruSight Oncology 500 ctDNA ermöglicht außerdem die Auswertung von Immunonkologie- und neuen Biomarkern (TMB, MSI, *NTRK* und *ROS1*). Mit umfassendem Geninhalt, branchenführender Sequenzierungstechnologie und hochentwickelter Software bietet TruSight Oncology 500 ctDNA eine Komplettlösung zur Beschleunigung klinischer Forschungsprojekte, die dank einfacher Anwendung und Analyse im eigenen Labor durchgeführt werden können.



**Abbildung 4: Reproduzierbare TMB- und MSI-Messung:** (A) TMB wurde in sechs unterschiedlichen Plasmaproben bei vier Anwendern repliziert. (B) MSI wurde in drei nukleosomal vorbereiteten Zelllinien mit bekanntem MSI-high-Status (1–3) und drei ctDNA-Proben aus MSI-high-Tumoren mit geringer Prävalenz (4–6) bei zwei verschiedenen Anwendern (grün, blau) evaluiert.

**Tabelle 5: Sensitive Erkennung von CNVs**

Gen	Erwarteter Fold-Change	Gemessener Mittelwert	Standardabweichung	Erkennungsrate
<b>Amplifikationen</b>				
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 %
<b>Deletionen</b>				
BRCA1	0,8	0,8	0,01	100 %
BRCA2	0,8	0,8	0,01	100 %
AR	0,7	0,8	0,01	100 %

Proben mit bekannten Fold-Change-Werten für Genamplifikationen und Deletionen wurden mit TruSight Oncology 500 ctDNA mit 30 ng cfDNA-Zugabe analysiert. Es wurden fünf Replikate jeder Probe analysiert.

**Tabelle 6: Erkennung von Genfusionen bei niedrigerer VAF**

Genfusion	Erwartete VAF	Gemessene VAF	Standardabweichung	Erkennungsrate
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 %

Es wurden Proben mit bekannten Genfusions-Allelhäufigkeiten zwischen ca. 0,5 und 4 % untersucht. Fünf Replikate für jede Probe wurden mit TruSight Oncology 500 ctDNA unter Verwendung von 30 ng cfDNA analysiert. Richtung der Genfusionen auf Basis bekannter Expression. Weitere Informationen zur DNA-basierten Fusionsrichtung finden Sie im Benutzerhandbuch zur lokalen TruSight Oncology 500 ctDNA-App.

## Weitere Informationen

Weitere Informationen über TruSight Oncology 500 ctDNA finden Sie unter [www.illumina.com/tso500-ctDNA](http://www.illumina.com/tso500-ctDNA).

Weitere Informationen zur DRAGEN Bio-IT-Plattform finden Sie unter [www.illumina.com/DRAGEN](http://www.illumina.com/DRAGEN).

## Quellen

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](http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-oncology-umi-reagents-datasheet-100000050425.pdf). Aufgerufen am 4. Mai 2020.

## Bestellinformationen

Produkt	Menge	Katalog-Nr.
TruSight Oncology 500 ctDNA Kit	48 Proben/ 16 Indizes	20039252
TruSight Oncology 500 ctDNA Kit plus PierianDx Interpretation Report	48 Proben/ 16 Indizes	20043410
<b>NovaSeq-Reagenzien-Kits</b>		
NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit v1.5	300 Zyklen	20028314
NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5	300 Zyklen	20028312
NovaSeq Xp 4-Lane Kit v1.5	1 Kit	20043131
<b>Lokale Variantenberichte</b>		
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 1	Lizenz für ein Jahr	20042100
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 2	Lizenz für ein Jahr	20042101
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 3	Lizenz für ein Jahr	20042102
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 4	Lizenz für ein Jahr	20042103
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 5	Lizenz für ein Jahr	20042104
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 6	Lizenz für ein Jahr	20042105
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 7	Lizenz für ein Jahr	20042106
DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 8	Lizenz für ein Jahr	20042107
Illumina DRAGEN Server v3	1 Server	20040619
Illumina DRAGEN Server Advance Exchange Plan		20032797
Illumina DRAGEN Server Installation		20031995