

TruSight™ Oncology 500 및 TruSight Oncology 500 High-Throughput

FFPE 샘플로 유연하고 확장 가능한 포괄적인 유전체 프로파일링 수행.

요점

- 포괄적인 통합 assay**
한 번의 assay로 가이드라인과 임상 실험에서 DNA 및 RNA 전반에 걸쳐 523개의 유전자 내 다양한 종양 변이 유형을 동시에 분석
- 빠른 통합형 워크플로우**
자동화가 용이한 Library Prep Kit 및 최적화된 데이터 분석 솔루션으로 샘플에서 결과 단계까지 4~5일 소요
- 신뢰할 수 있는 검증된 결과**
까다로운 성능 사양을 충족하는 assay를 사용하여 정확한 데이터 생성
- 가치를 더하는 기관 내 자체 분석 솔루션**
해당 지역 기관 및 사회와 가장 관련성이 높은 데이터를 수집하여 기관 내 검체 보유 가능

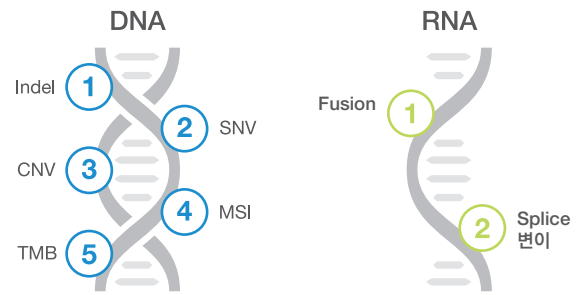


그림 1: TruSight Oncology 500 및 TruSight Oncology 500 High-Throughput으로 검출할 수 있는 변이 유형

제공하고 있습니다(표 1). 이들 제품은 검증된 기술, 관련 바이오마커 콘텐츠, 여러 제약 분야 파트너십을 기반으로 개발된 assay로, 향후 종양 프로파일링 진단 분석의 기반을 마련하였습니다.

소개

최근 대규모 코호트 연구에서 포괄적인 유전체 프로파일링(comprehensive genomic profiling, CGP)이 샘플의 최대 90%에서 관련 유전학적 변화를 식별할 수 있는 가능성을 지닌 것으로 나타났습니다.¹⁻⁶ 다양한 바이오마커의 평가에 포괄적인 단일 assay를 사용하면 더 적은 샘플을 사용할 수 있고 반복적인 검사를 여러 번 수행하는 것보다 더 빠르게 결과를 생성할 수 있다는 추가적인 이점도 있습니다. Illumina는 조직(tissue)이 제한적으로 공급되고 시간이 불충분한 환경에서 작업하는 연구자들을 지원하기 위해 TruSight Oncology 500 및 TruSight Oncology 500 High-Throughput을

단일 워크플로우로 다양한 종양 유형 및 바이오마커 분석

TruSight Oncology 500과 TruSight Oncology 500 High-Throughput은 차세대 시퀀싱(next-generation sequencing, NGS) assay로, 하나의 통합된 워크플로우로 DNA와 RNA에서 한 번에 암 관련 유전자 523개를 분석합니다(표 2). 해당 assay는 DNA와 RNA의 여러 변이 유형을 동시에 분석(그림 1)하므로 반복적인 검사가 필요 없어, 소중한 조직 샘플과 시간을 절약할 수 있습니다.

표 1: TruSight Oncology 500 및 TruSight Oncology 500 High-Throughput의 사양

파라미터	TruSight Oncology 500	TruSight Oncology 500 High-Throughput
시스템	NextSeq 500, NextSeq 550 또는 NextSeq 550Dx(Research Mode) 시스템	NovaSeq 6000 시스템
패널 크기	1.94 Mb DNA, 358 Kb RNA	1.94 Mb DNA, 358 Kb RNA
DNA 사용량	40 ng	40 ng
RNA 사용량	40 ng	40~80 ng
FFPE 사용량	FFPE 조직 샘플 사용시 최소 2 mm ³ 권장	FFPE 조직 샘플 사용시 최소 2 mm ³ 권장
총 assay 시간	핵산에서 변이 보고 단계까지 4~5일 소요	핵산에서 변이 보고 단계까지 4~5일 소요
시퀀싱 런 타임	24시간	19시간(SP 및 S1), 25시간(S2) 또는 36시간(S4)
시퀀싱 런	2 x 101사이클	2 x 101사이클
샘플 처리량	런당 샘플 8개	런당 샘플 16~192개
검출 한계	작은 변이: 5% VAF Fusion: copy 5개/ng RNA CNV: 2.2배 변화	작은 변이: 5% VAF Fusion: copy 5개/ng RNA(80 ng 투입) CNV: 2.2배 변화
분석 민감도	> 96%(5% VAF에서 모든 변이 유형에 대해)	> 96%(5% VAF에서 모든 변이 유형에 대해)
분석 특이도	99.9998%	99.9998%

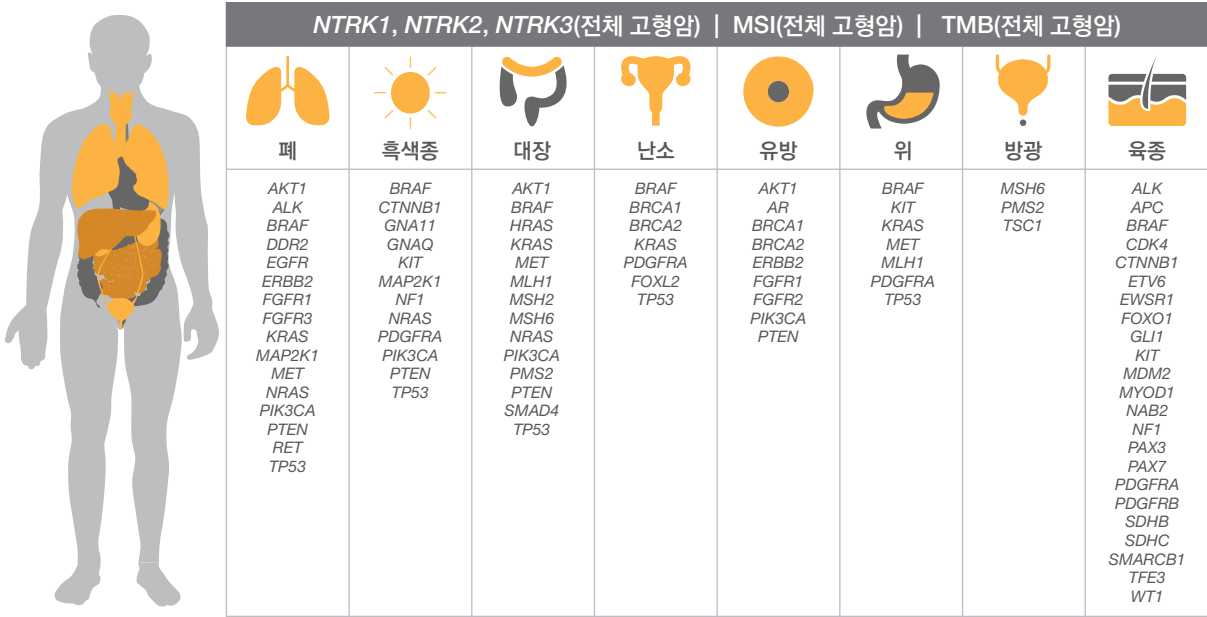


그림 2: 여러 암 유형에 대한 유전체 중앙 프로파일링 바이오마커 — TruSight Oncology 500 및 TruSight Oncology 500 High-Throughput의 콘텐츠는 여러 암 유형에 대한 주요 가이드라인 바이오마커와 더불어 MSI, NTRK1, NTRK2, NTRK3, TMB와 같은 전체 고형암(pan-cancer) 바이오마커를 포함.

표 2: 동일 샘플 내 DNA 및 RNA를 사용하여 다수의 폐암 바이오마커를 동시에 분석

	DNA 콘텐츠	RNA 콘텐츠
바이오마커		
MSI	√	
TMB	√	
바이오마커 유전자	작은 변이	Fusion
AKT1	√	
ALK	√	√
BRAF	√	√
DDR2	√	
EGFR	√	√
ERBB2	√	√
FGFR1	√	√
FGFR3	√	√
KRAS	√	
MAP2K1	√	
MET	√	√
NRAS	√	
NTRK1	√	√
NTRK2	√	√
NTRK3	√	√
PIK3CA	√	√
PTEN	√	
RET	√	√
TP53	√	

포괄적인 콘텐츠 설계

Illumina는 TruSight Oncology 500 및 TruSight Oncology 500 High-Throughput 콘텐츠의 설계를 위해 중앙학 분야 유수의 기관들과 협력 관계를 맺었습니다. 이렇게 개발된 패널은 단일 염기서열 변이 (single nucleotide variant, SNV), 삽입/결실(Insertion/deletion, Indel), 유전자 복제수 변이(copy number variation, CNV)와 관련된 유전자 523개와 더불어 알려져 있거나 새로운 유형의 fusion 및 splice 변이와 관련된 유전자 55개를 포함해(표 3, 표 4), 다양한 암 유형에서 흔히 변이를 보이는 바이오마커에 대한 포괄적인 커버리지(그림 2)를 제공합니다. 해당 콘텐츠는 현 가이드라인에 정리되어 있는 유전자로 구성되어 있으며, 여러 가지 중앙 유형(그림 3)에 대한 주요 가이드라인과 1,000건 이상의 임상시험과 관련된 유전자를 아우르는 폭넓은 커버리지를 제공합니다. 또한, TruSight Oncology 500 패널은 치료 반응과의 상관관계가 이미 잘 알려진 현미부수체 불안정성(microsatellite instability, MSI) 바이오마커⁷⁻⁹와 중앙 변이 부담(tumor mutational burden, TMB) 바이오마커¹⁰를 포함합니다.

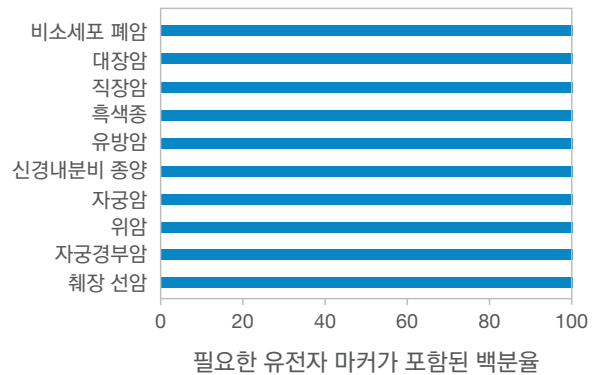


그림 3: 암 유형별 주요 가이드라인에 대한 TruSight Oncology 500 콘텐츠 비교 — 전체 콘텐츠 비교가 아닌 일부 콘텐츠 비교의 예시를 그래프로 표현.

표 3: TruSight Oncology 500 및 TruSight Oncology High-Throughput 패널에 포함된 DNA 콘텐츠

ABL1	BRD4	CUX1	FAM175A	GATA6	IGF1	MAP3K13	NOTCH4	POLE	RPTOR	TAF1
ABL2	BRIP1	CXCR4	FAM46C	GEN1	IGF1R	MAP3K14	NPM1	PPARG	RUNX1	TBX3
ACVR1	BTG1	CYLD	FANCA	GID4	IGF2	MAP3K4	NRAS	PPM1D	RUNX1T1	TCEB1
ACVR1B	BTK	DAXX	FANCC	GLI1	IKBKE	MAPK1	NRG1	PPP2R1A	RYBP	TCF3
AKT1	C11orf30	DCUN1D1	FANCD2	GNA11	IKZF1	MAPK3	NSD1	PPP2R2A	SDHA	TCF7L2
AKT2	CALR	DDR2	FANCE	GNA13	IL10	MAX	NTRK1	PPP6C	SDHAF2	TERC
AKT3	CARD11	DDX41	FANCF	GNAQ	IL7R	MCL1	NTRK2	PRDM1	SDHB	TERT
ALK	CASP8	DHX15	FANCG	GNAS	INHBA	MDC1	NTRK3	PREX2	SDHC	TET1
ALOX12B	CBFEB	DICER1	FANCI	GPR124	INHBA	MDM2	NUP93	PRKAR1A	SDHD	TET2
ANKRD11	CBL	DIS3	FANCL	GPS2	INPP4A	MDM4	NUTM1	PRKCI	SETBP1	TFE3
ANKRD26	CCND1	DNAJB1	FAS	GREM1	INPP4B	MED12	PAK1	PRKDC	SETD2	TFRC
APC	CCND2	DNMT1	FAT1	GRIN2A	INSR	MEF2B	PAK3	PRSS8	SF3B1	TGFBF1
AR	CCND3	DNMT3A	FBXW7	GRM3	IRF2	MEN1	PAK7	PTCH1	SH2B3	TGFBF2
ARAF	CCNE1	DNMT3B	FGF1	GSK3B	IRF4	MET	PALB2	PTEN	SH2D1A	TMEM127
ARFRP1	CD274	DOT1L	FGF10	H3F3A	IRS1	MGA	PARK2	PTPN11	SHQ1	TMPRSS2
ARID1A	CD276	E2F3	FGF14	H3F3B	IRS2	MITF	PARP1	PTPRD	SLIT2	TNFAIP3
ARID1B	CD74	EED	FGF19	H3F3C	JAK1	MLH1	PAX3	PTPRS	SLX4	TNFRSF14
ARID2	CD79A	EGFL7	FGF2	HGF	JAK2	MLL	PAX5	PTPRT	SMAD2	TOP1
ARID5B	CD79B	EGFR	FGF23	HIST1H1C	JAK3	MLL2	PAX7	QKI	SMAD3	TOP2A
ASXL1	CDC73	EIF1AX	FGF3	HIST1H2BD	JUN	MPL	PAX8	RAB35	SMAD4	TP53
ASXL2	CDH1	EIF4A2	FGF4	HIST1H3A	KAT6A	MRE11A	PBRM1	RAC1	SMARCA4	TP63
ATM	CDK12	EIF4E	FGF5	HIST1H3B	KDM5A	MSH2	PDCD1	RAD21	SMARCB1	TRAF2
ATR	CDK4	EML4	FGF6	HIST1H3C	KDM5C	MSH3	PDCD1LG2	RAD50	SMARCD1	TRAF7
ATRX	CDK6	EP300	FGF7	HIST1H3D	KDM6A	MSH6	PDGFRA	RAD51	SMC1A	TSC1
AURKA	CDK8	EPCAM	FGF8	HIST1H3E	KDR	MST1	PDGFRB	RAD51B	SMC3	TSC2
AURKB	CDKN1A	EPHA3	FGF9	HIST1H3F	KEAP1	MST1R	PDK1	RAD51C	SMO	TSHR
AXIN1	CDKN1B	EPHA5	FGFR1	HIST1H3G	KEL	MTOR	PDPK1	RAD51D	SNCAIP	U2AF1
AXIN2	CDKN2A	EPHA7	FGFR2	HIST1H3H	KIF5B	MUTYH	PGR	RAD52	SOCS1	VEGFA
AXL	CDKN2B	EPHB1	FGFR3	HIST1H3I	KIT	MYB	PHF6	RAD54L	SOX10	VHL
B2M	CDKN2C	ERBB2	FGFR4	HIST1H3J	KLF4	MYC	PHOX2B	RAF1	SOX17	VTCN1
BAP1	CEBPA	ERBB3	FH	HIST2H3A	KLHL6	MYCL1	PIK3C2B	RANBP2	SOX2	WISP3
BARD1	CENPA	ERBB4	FLCN	HIST2H3C	KMT2B	MYCN	PIK3C2G	RARA	SOX9	WT1
BBC3	CHD2	ERCC1	FLI1	HIST2H3D	KMT2C	MYD88	PIK3C3	RASA1	SPEN	XIAP
BCL10	CHD4	ERCC2	FLT1	HIST3H3	KMT2D	MYOD1	PIK3CA	RB1	SPOP	XPO1
BCL2	CHEK1	ERCC3	FLT3	HLA-A	KRAS	NAB2	PIK3CB	RBM10	SPTA1	XRCC2
BCL2L1	CHEK2	ERCC4	FLT4	HLA-B	LAMP1	NBN	PIK3CD	RECQL4	SRC	YAP1
BCL2L11	CIC	ERCC5	FOXA1	HLA-C	LATS1	NCOA3	PIK3CG	REL	SRSF2	YES1
BCL2L2	CREBBP	ERG	FOXL2	HNF1A	LATS2	NCOR1	PIK3R1	RET	STAG1	ZBTB2
BCL6	CRKL	ERRF1	FOXO1	HNRNP	LMO1	NEGR1	PIK3R2	RFWD2	STAG2	ZBTB7A
BCOR	CRLF2	ESR1	FOXP1	HOXB13	LRP1B	NF1	PIK3R3	RHEB	STAT3	ZFH3
BCORL1	CSF1R	ETS1	FRS2	HRAS	LYN	NF2	PIM1	RHOA	STAT4	ZNF217
BCR	CSF3R	ETV1	FUBP1	HSD3B1	LZTR1	NFE2L2	PLCG2	RICTOR	STAT5A	ZNF703
BIRC3	CSNK1A1	ETV4	FYN	HSP90AA1	MAGI2	NFKBIA	PLK2	RIT1	STAT5B	ZRSR2
BLM	CTCF	ETV5	GABRA6	ICOSLG	MALT1	NKX2-1	PMAIP1	RNF43	STK11	
BMPR1A	CTLA4	ETV6	GATA1	ID3	MAP2K1	NKX3-1	PMS1	ROS1	STK40	
BRAF	CTNNA1	EWSR1	GATA2	IDH1	MAP2K2	NOTCH1	PMS2	RPS6KA4	SUFU	
BRCA1	CTNNA1	EZH2	GATA3	IDH2	MAP2K4	NOTCH2	PNRC1	RPS6KB1	SUZ12	
BRCA2	CUL3	FAM123B	GATA4	IFNGR1	MAP3K1	NOTCH3	POLD1	RPS6KB2	SYK	

회색 음영 처리된 콘텐츠는 CNV 검출 분석 대상.

표 4: TruSight Oncology 500 및 TruSight Oncology High-Throughput 패널에 포함된 RNA 콘텐츠

ABL1	BCL2	CSF1R	ESR1	EWSR1	FLI1	KIF5B	MSH2	NRG1	PAX7	RAF1
AKT3	BRAF	EGFR	ETS1	FGFR1	FLT1	KIT	MYC	NTRK1	PDGFRA	RET
ALK	BRCA1	EML4	ETV1	FGFR2	FLT3	MET	NOTCH1	NTRK2	PDGFRB	ROS1
AR	BRCA2	ERBB2	ETV4	FGFR3	JAK2	MLL	NOTCH2	NTRK3	PIK3CA	RPS6KB1
AXL	CDK4	ERG	ETV5	FGFR4	KDR	MLL2	NOTCH3	PAX3	PPARG	TMPRSS2

상기 유전자는 모두 알려진 fusion 및 새로운 fusion 평가 대상. 회색 음영 처리된 콘텐츠는 splice 변이 분석 대상.

통합형 워크플로우

샘플 투입에서 최종 보고 단계까지 해결해 주는 포괄적이고 간소화된 워크플로우로 기간 내 CGP 구현이 더욱 쉬워졌습니다(그림 4). 자동화된 Library Prep Kit 및 Method, 변이 검출 도구, 해석 및 보고 소프트웨어를 활용함으로써 짧게는 4일 안에 완료되는 원활한 워크플로우가 실현 가능합니다.

DNA 또는 RNA로 시작

TruSight Oncology 500 assay에는 동일한 샘플에서 추출한 RNA 또는 DNA를 사용할 수 있습니다. DNA를 사용하는 경우 샘플 준비는 유전체 DNA(genomic DNA, gDNA) 절단(shearing)으로 시작됩니다. RNA를 사용하는 경우 먼저 샘플을 cDNA로 역전사(reverse transcription)해야 합니다. 절단된 gDNA와 cDNA는 바로 시퀀싱에 사용될 수 있는 라이브러리로 동시에 변환됩니다.

속도 향상을 위한 자동화

자동화가 용이한 TruSight 500 Oncology Kit와 TruSight Qualified Methods는 라이브러리 준비 시 비용 면에서 큰 부담 없이 확장성을 지원합니다. Automation Kit는 액체 처리 로봇의 작동에 추가적인 시약이 필요하다는 점을 고려해 기존의 Kit와 비슷한 비용으로 더 많은 양의 시약을 제공하도록 구성되어 있습니다. Illumina의 R&D팀이 업계 선두의 액체 처리 로봇 제조사와 공동 개발한 TruSight Qualified Methods는 자동화 옵션을 선택해도 수동 프로토콜과 동일한 고품질의 결과를 얻을 수 있도록 최적화된 프로토콜과 스크립트를 제공합니다. 자동화된 프로토콜을 따르면 수작업 시간을 약 50% 절감할 수 있으므로 검사실의 인건비를 절감하고 수동 오류도 줄일 수 있습니다.

분석 특이성 태그 추가

라이브러리 준비 과정 중 고유한 분자 식별자(unique molecular identifier, UMI)¹¹가 gDNA 또는 cDNA 분절에 추가됩니다. 추가된 UMI는 낮은 대립유전자 빈도(low variant allele frequency, VAF)에서의 변이 검출을 가능하게 하는 동시에 오류를 억제함으로써 높은 분석 특이도를 확보해 줍니다.

중점적 분석을 위한 라이브러리 농축(Enrichment)

선택된 표적을 DNA 및 RNA 기반 라이브러리에서 정제하기 위해 바이오틴화(biotinylation)된 프로브와 스트렙타비딘(streptavidin)이 코팅된 마그네틱 비드를 사용하는 검증된 하이브리드 캡처(hybrid-capture) 기법을 바탕으로 라이브러리를 준비합니다. 관심 영역은 바이오틴화된 프로브와 혼성화(hybridization)된 후 자성을 이용해 아래로 끌어당겨진 다음 라이브러리 풀의 농축을 위해 용출됩니다. 혼성화 기반 농축은 샘플에서 특정 유전자 변이를 분석하는 데 유용하며, 견고하고 직관적인 워크플로우를 통해 엑솜이나 대량의 유전자(예: > 50개)를 확실하게 시퀀싱할 수 있습니다. 또한, 다양한 투입 유형과 투입량에서 믿을 수 있는 결과를 제공합니다.

하이브리드 캡처 기법은 애플리곤 시퀀싱보다 데이터에 포함된 artifact와 dropout이 비교적 적다는 점 등 여러 가지 장점이 있습니다. 또한, 하이브리드 캡처는 fusion 파트너에 대한 정보가 없이도 가능한(fusion agnostic) 기법이므로 이미 알려진 fusion과 새로운 fusion을 검출하고 그 특성을 규명할 수 있습니다.

8~192개의 샘플 시퀀싱

TruSight Oncology 500과 TruSight Oncology 500 High-Throughput은 동일한 샘플과 라이브러리 준비 워크플로우를 사용합니다. 두 assay의 주된 차이점은 바로 규모입니다. TruSight Oncology 500은 NextSeq™ 500 또는 NextSeq 550Dx* 시스템에서 실행되며 한 번에 최대 8개의 샘플을 batch 작업할 수 있습니다. 한편 TruSight Oncology 500 High-

* NextSeq 550Dx 시스템을 Research Mode로 사용 시



그림 4: TruSight Oncology 500 워크플로우 — TruSight Oncology 500 assay는 핵산 준비부터 변이 검출에 이르는 기존의 검사실 워크플로우를 4일로 통합. Local Run Manager(LRM)는 TruSight Oncology 500과만 사용 가능.

- a. 자동화가 용이한 TruSight Oncology 500 키트. 자동화는 라이브러리 준비 단계에서 수작업 시간을 약 50% 단축. 자동화가 용이한 TruSight Oncology 500 High-Throughput 키트는 2021년 1분기에 출시 예정.
- b. On-premise 및 cloud 기반 DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software 곧 출시 예정.
- c. Local Run Manager는 NextSeq 550 시스템에서만 사용 가능.

Throughput assay는 확장성을 제공하여 샘플 처리량을 크게 늘릴 수 있도록 해 줍니다. NovaSeq™ 6000 시스템에서 실행할 경우 16~192개의 샘플을 batch 작업할 수 있습니다. 192개의 고유한 TruSight Oncology 500 High-Throughput용 인덱스가 지원되고 NovaSeq 플로우 셀이 가변적인 처리량을 수용하기 때문에 이렇듯 유연한 assay가 가능하다고 할 수 있습니다(표 5). 각 샘플 인덱스는 품질 관리(quality control, QC) 기대치를 능가하는 시퀀싱 메트릭스(metrics)를 생성할 수 있도록 일관된 성능을 제공합니다.

표 5: 확장 가능한 솔루션

Assay	TruSight Oncology 500		TruSight Oncology 500 High-Throughput			
	NextSeq 550 또는 NextSeq 550Dx ^a 시스템	SP	S1	S2	S4	
기기	NextSeq 550 또는 NextSeq 550Dx ^a 시스템	NovaSeq 6000 시스템				
플로우 셀	High-output	SP	S1	S2	S4	
샘플 수	8	16	32	72	192	

a. NextSeq 550Dx 시스템을 Research Mode로 사용 시

데이터 분석

현재 TruSight Oncology 500과 TruSight Oncology 500 High-Throughput은 로컬 서버에서 로컬 앱을 사용해 변이 검출을 수행하고 있습니다. 로컬 DRAGEN Server를 사용해 기관 내에서 직접(on-premise) 실행 또는 cloud 기반의 솔루션으로 사용 가능한 DRAGEN™ 버전의 앱도 곧 출시될 예정입니다. 두 가지 앱 모두 오류, artifact, 생식세포 변이를 제거하는 정교한 상용 알고리즘을 사용합니다. 이를 토대로 99.9998%의 분석 특이도라는 매우 정확한 변이 검출 성능을 확보해 줍니다. 높은 분석 특이도는 중앙 전용 워크플로우를 통한 TMB 평가 시 Mb당 돌연변이 수를 정확히 파악해야 할 때 특히 유용합니다. TruSight Oncology 500 Local App과 TruSight Oncology 500 DRAGEN App[†]으로 분석한 DNA 변이 데이터는 서로 일치성을 보입니다(그림 5C, 그림 6C). 다만, DRAGEN App[†]은 Local App보다 2~4배 빠른 속도로 분석을 완료할 수 있어(표 6) 결과 도출 시간을 더욱 단축해 줍니다.

또한, 해석 및 보고를 위해 시퀀싱 시스템에서 PierianDx사의 Clinical Genomics Workspace 클라우드로 변이 보고서 파일을 직접 업로드할 수 있습니다. 포괄적이고 지속적으로 업데이트되며 전문적으로 선별된

† On-premise 및 cloud 기반 DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software 곧 출시 예정.

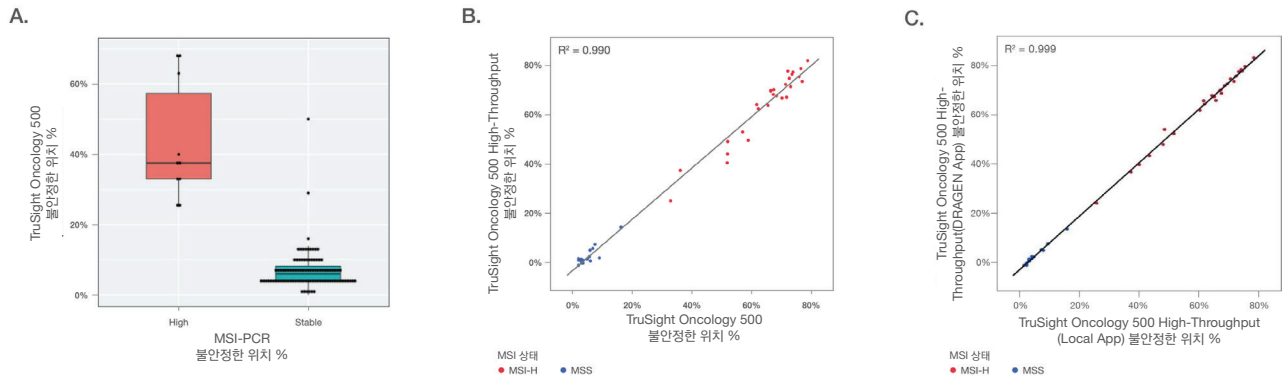


그림 5: 정확한 MSI 상태 평가 — (A) FFPE 조직 샘플 분석 시 MSI-PCR(x 축)은 정성적 점수를 생성하는 반면 TruSight Oncology 500은 정량적 점수(y 축)를 생성. (B) MSI 분석에 대한 TruSight Oncology 500과 TruSight Oncology 500 High-Throughput 간의 높은 일치성. (C) TruSight Oncology 500 DRAGEN App과 TruSight Oncology 500 Local App을 사용해 분석한 TruSight Oncology 500 High-Throughput 데이터 간 높은 일치성. 참고: On-premise 및 cloud 기반 DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software 곧 출시 예정.

유전체학 지식베이스¹²의 지원을 받는 PierianDx사의 Clinical Genomics Workspace는 원활한 해석 및 보고가 가능하도록 변이 주석(annotation) 및 필터링 작업을 수행합니다. PierianDx사의 Clinical Genomics Workspace는 자동화된 맞춤형이 가능한 최종 유전체 보고서의 생성을 위해 유전체의 수천 가지 변이로부터 생물학적 연관성이 있는 변이를 필터링한 후 우선순위를 선정합니다.

표 6: TruSight Oncology 500 DRAGEN App^a으로 더욱 빨라진 분석 시간

조직 생검 샘플 개수	평균 분석 소요 시간	
	Local App ^b	DRAGEN App ^c
8	5.5시간	2시간
16	12시간	3시간
32	18시간	5시간
72	24시간	10시간

상기 분석 시간은 실제 수행된 런 데이터를 기반으로 하며 런에 따라 상이할 수 있음.

- a. On-premise 및 cloud 기반 DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software 곧 출시 예정.
- b. 로컬 서버 사양: Amazon EC2, c5.9xlarge 인스턴스(36 vCPU, 72 GiB 메모리). 분석 시간은 서버 사양에 따라 상이.
- c. DRAGEN Server v3에서 실행된 DRAGEN App.

신뢰할 수 있는 검증된 결과

TruSight Oncology 500 및 TruSight Oncology 500 High-Throughput은 서로 다른 처리량 옵션을 제공하고 각기 다른 시퀀싱 플랫폼에서 실행되도록 설계되었으나, 두 assay의 변이 검출 유전체 콘텐츠와 성능 기대치는 동일합니다. 두 assay 모두 MSI, TMB, CNV, 작은 변이, fusion 검출 시 높은 일치성을 보입니다.

정확한 TMB 및 MSI 평가

TruSight Oncology 500 및 TruSight Oncology 500 High-Throughput은 복수의 유전체 좌위 분석에 의존하는 MSI와 TMB 검사에 적합합니다.

MSI 상태는 통상적으로 PCR(MSI-PCR)과 면역조직화학(immunohistochemistry) 검사를 통해 분석되어 왔습니다. 다른 검사 방식은 단순히 샘플을 MSI-stable 또는 MSI-high로 기술하는 정성적 결과를 제공하는 반면, TruSight Oncology 500 assay를 사용하는 NGS 기반의 평가는 MSI 상태에 대한 정확한 정량적 점수를 계산하기

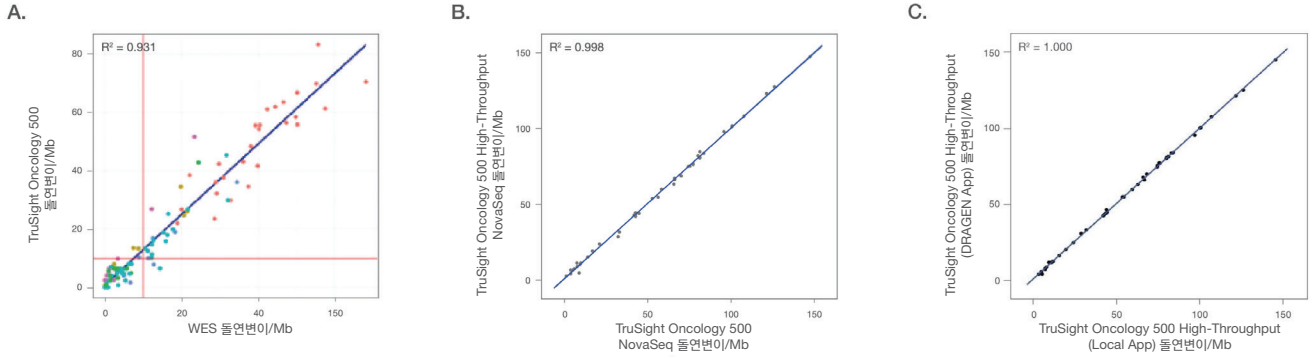


그림 6: 정확한 TMB 상태 평가 — (A) 108개의 FFPE 조직 샘플 분석 결과, WES와 TruSight Oncology 500의 TMB 측정치는 높은 일치성을 보임. 빨간 선은 임계값(돌연변이 10개/Mb)을 의미. (B) TMB 분석에 대한 TruSight Oncology 500과 TruSight Oncology 500 High-Throughput 간의 높은 일치성. (C) TruSight Oncology 500 DRAGEN App과 TruSight Oncology 500 Local App을 사용해 분석한 TruSight Oncology 500 High-Throughput 데이터 간 높은 일치성. 참고: On-premise 및 cloud 기반 DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software 곧 출시 예정.

위해 130개의 동중중합체(homopolymer) MSI 마커의 위치를 검사합니다(그림 5).¹³

작은 패널로는 낮은 돌연변이 레벨에서 정밀하고 재현 가능한 TMB 값을 얻기 힘들 수 있습니다. TruSight Oncology 500 패널은 전장 엑솜(whole-exome) 연구와 높은 일치성을 보이는 정확한 TMB 추정치를 제시하기 위해 포괄적인 유전체 콘텐츠와 정교한 인포매틱스 알고리즘을 통합하였습니다(그림 6, 표 7).¹³ 라이브러리 준비 과정에 UMI를 추가하고 상용 Illumina 인포매틱스를 함께 적용함으로써 시퀀싱 오류율이 10~20배 낮아집니다.¹¹ 또한, 탈아미노화 또는 산화와 같은 FFPE artifact의 제거를 통해 저품질의 DNA 샘플로도 최저 5% VAF 수준의 분석 민감도를 구현할 수 있습니다.

표 7: 돌연변이 10개/Mb에서 TMB 범주에 대한 WES와 TruSight Oncology 500 간의 높은 일치성

메트릭	값
양성 일치율	94.7%
음성 일치율	96.1%
전체 일치율	95.4%

108개의 FFPE 조직 샘플에서 얻은 TMB 값에 근거. 돌연변이 10개/Mb를 임계값으로 하여 TMB-high 또는 TMB-low 범주에 대한 일치율을 제시.

민감한 CNV 검출

복수의 유전자 및 종양 유형에서 복제수 변화가 관찰된다면 종양 형성과 연관성이 있을 수 있습니다.¹⁴ 두 TruSight Oncology 500 assay 모두 59개의 CNV 연관 유전자에 대한 분석을 포함하며 2.2배 변화를 검출 한계로 증폭 검출이 가능합니다(그림 7, 표 8).

FFPE 샘플로 고감도 변이 검출 가능

표적 농축(target enrichment) 기법의 한 가지 이점은 높은 결합 특이도를 보이면서도 작은 돌연변이를 포함하는 표적의 혼성화가 가능할 정도로 크게 설계된 프로브를 사용한다는 점입니다. 이 메커니즘은 FFPE 조직 샘플로부터 발생한 자연적인 대립유전자 변이와 시퀀스 artifact가 모두 존재할 때 샘플 dropout을 줄여 줍니다. Assay는 FFPE 샘플에서 낮게는 5% VAF 수준으로 변이를 재현성 있게 검출할 수 있습니다(그림 8, 표 9).

표 8: 민감한 CNV 검출^a

유전자	검출	배수 변화			조직
		TruSight Oncology 500	TruSight Oncology 500 High-Throughput	Local App DRAGEN App ^b	
ERBB2	✓	23.43	23.37	23.90	유방
MDM2	✓	8.50	9.34	10.58	폐
EGFR	✓	6.00	6.12	6.53	폐
EGFR	✓	4.32	4.31	4.31	폐
MET	✓	3.98	3.68	3.90	폐
MYC	✓	3.59	3.67	3.71	유방
ERBB2	✓	2.86	2.91	2.96	유방
BRAF	✓	2.31	2.12	2.07	폐
MYC	✓	2.22	2.24	2.25	직장
CCND1	✓	2.15	2.20	2.15	피부
KRAS	✓	1.82	1.86	1.87	유방
MDM4	✓	1.80	1.77	1.85	유방
CCNE1	✓	1.76	1.79	1.71	폐
FGF19	✓	1.73	1.74	1.70	피부
AR	✓	1.72	1.68	1.66	직장
MET	✓	1.69	1.62	1.66	직장
KRAS	✓	1.64	1.73	1.79	폐
MYCN	✓	1.63	1.66	1.60	직장
CDK6	✓	1.62	1.60	1.62	직장
CHEK2	✓	1.58	1.54	1.49	폐
FGF10	✓	1.54	1.51	1.58	폐
BRCA2	✓	1.53	1.53	1.51	유방
FGF7	✓	1.49	1.50	1.53	직장
FGFR1	✓	1.39	1.38	1.39	직장

a. 상기 정보는 단지 TruSight Oncology 500과 TruSight Oncology 500 High-Throughput의 일치성을 보여주는 예시로 검출된 모든 CNV를 포함하지 않음.
 b. On-premise 및 cloud 기반 DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software 곧 출시 예정.

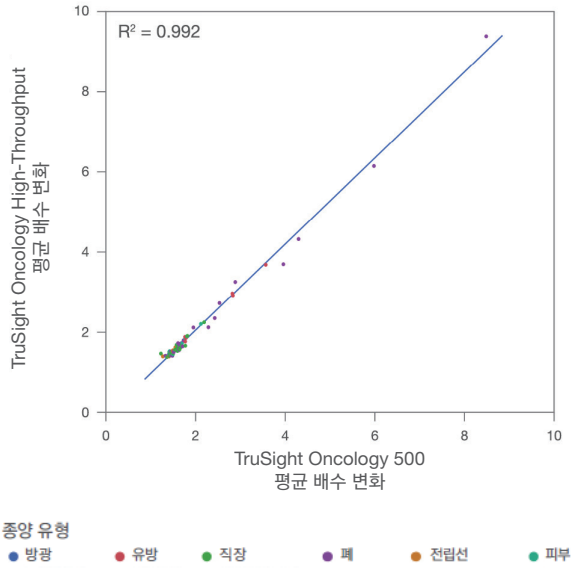


그림 7: CNV 검출에 대한 TruSight Oncology 500 및 TruSight Oncology 500 High-Throughput 간의 높은 일치성

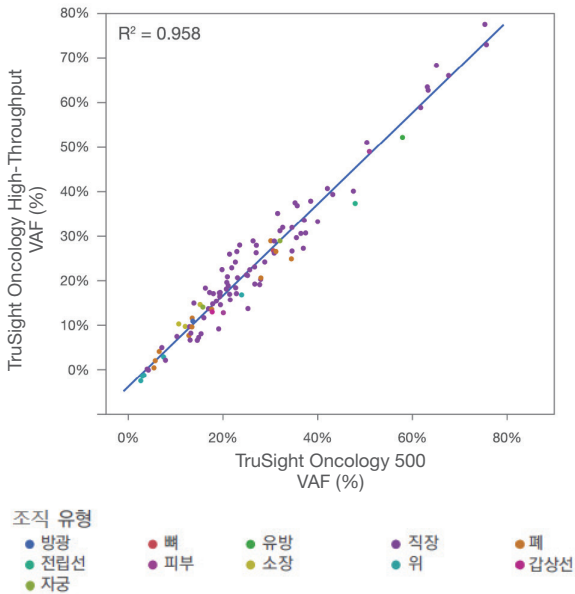


그림 8: 고감도 변이 검출 — TruSight Oncology 500 및 TruSight Oncology 500 High-Throughput 간의 높은 VAF 일치성

강력한 RNA fusion 검출 능력

암은 일반 시퀀싱으로는 발견이 불가능한 후성적 변화, 발현 수준 변화, gene fusion으로 인해 발생할 수 있습니다.^{15,16} TruSight Oncology 500 assay는 파트너에 무관한 fusion을 검출하고 그 특성을 규명하기 위해 표적 RNA 시퀀싱에 하이브리드 캡처 접근법을 적용합니다. 위양성 발생 가능성이 있어 별도의 확진 검사가 필요한 앵프리콘 기반의 접근법과는 달리, 하이브리드 캡처법은 민감도가 높고 알려진 fusion 유전자 파트너와 새로운 fusion 유전자 파트너로부터 gene fusion의 특성을 정확히 규명할 수 있습니다.

표 9: 고감도 작은 DNA 변이 검출^a

유전자	돌연변이	검출	VAF		
			TruSight Oncology 500	TruSight Oncology 500 High-Throughput	Local App / DRAGEN App ^b
변이형: SNV					
AKT1	E17K	✓	20%	18%	16%
BRAF	V600E	✓	19%	19%	19%
CDKN2A	R58*	✓	12%	14%	14%
CTNNA1	G34E	✓	16%	18%	18%
EGFR	L858R	✓	18%	17%	17%
EGFR	T790M	✓	13%	12%	12%
FBXW7	R465C	✓	8%	7%	7%
FGFR2	S252W	✓	32%	32%	31%
GNAS	R844C	✓	5%	5%	5%
H3F3B	K37M	✓	31%	30%	29%
IDH2	R140Q	✓	23%	22%	22%
KRAS	G12D	✓	6%	6%	6%
NRAS	Q61K	✓	15%	18%	18%
PIK3CA	E542K	✓	14%	15%	15%
PTCH1	A563V	✓	4%	4%	4%
SMARCA4	R973W	✓	3%	3%	3%
TP53	R248Q	✓	29%	27%	27%
변이형: MNV(multiple nucleotide variant, 다중 염기서열 변이)					
RET	A845V	✓	7%	8%	8%
변이형: 삽입					
APC	T1556Nfs*3	✓	21%	20%	20%
변이형: 결실					
ARID1A	D1850Tfs*33	✓	4%	5%	5%
EP300	H2324fs*29	✓	24%	20%	20%
KMT2A (MLL)	K3828Rfs*31	✓	3%	3%	3%
PTEN	K267Rfs*9	✓	21%	21%	19%
RNF43	G659Vfs*41	✓	18%	18%	18%

a. 상기 정보는 단지 TruSight Oncology 500과 TruSight Oncology 500 High-Throughput의 일치성을 보여주는 예시로 검출된 SNV 및 Indel을 모두 포함하지 않음.
b. On-premise 및 cloud 기반 DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software 곧 출시 예정.

RNA 분석으로 비슷한 결과를 얻으려면 TruSight Oncology 500에는 40 ng의 RNA를, TruSight Oncology 500 High-Throughput에는 40~80 ng의 RNA를 사용할 것을 권장합니다. FFPE 조직의 FFPE RNA 수율이 낮을 때도 마찬가지로 40 ng의 RNA를 사용해 TruSight Oncology 500 High-Throughput으로 중간 내지 높은 수준에서 발현되는 변이를 검출할 수 있습니다. 그러나 RNA가 충분한 경우에는 80 ng을 사용하면 매우 낮은 농도로 존재하는 fusion에 대한 검출 민감도를 극대화할 수 있습니다(표 10).

표 10: 강력한 fusion 및 splice 변이 검출 능력

RNA fusion	검출	RNA 사용량			조직
		40 ng	60 ng	80 ng	
ALK-EML4	✓	15	21	40	폐
EGFR-RAB3IP	✓	5	9	19	뇌
EGFR-METTL1	✓	25	84	71	뇌
BRCA1-MPP2	✓	25	28	29	알 수 없음
ALK-BRE	✓	75	112	128	육종
CCDC170-ESR1	✓	122	59	168	신장
MYC-MRPL13	✓	27	35	52	유방
MYC-STK3	✓	11	39	28	유방
ROS1;GOPC-ENC1	✓	32	53	93	폐
ROS1;GOPC-CD74	✓	104	92	141	폐
ANKUB1;RNF13-ETV5;DGKG	✓	29	45	72	자궁
NTRK3-SEMA6A	✓	7	16	25	피부
RET-NCOA4	✓	74	78	154	갑상선
EWSR1-ATF1	✓	19	30	32	육종
EWSR1-CBY1	✓	44	30	97	육종
BRCA2-NRXN3	✓	33	60	84	뼈
FLT3-SMOX	✓	50	72	54	뼈
FLT3-VWA8	✓	29	51	69	뼈
FLT3-LCP1	✓	12	32	47	뼈
Splice 변이					
ARV7	✓	26	38	46	유방
EGFR v3	✓	567	884	937	뇌
EGFR v3	✓	1249	1614	2049	뇌

NovaSeq 6000 시스템에서 TruSight Oncology 500 High-Throughput을 사용해 검출한 fusion 및 splice 변이 포함. 데이터는 TruSight Oncology 500 Local App으로 분석. 상기 값은 명시된 RNA 사용량에서의 샘플당 서포팅 리드(supporting reads) 수를 의미. RNA fusion의 컷오프 값 = 5, Splice 변이의 컷오프 값 = 10.

앞으로의 계획

현재 NGS를 사용 중인 검사실이라면 손쉽게 TruSight Oncology 500과 TruSight Oncology 500 High-Throughput을 통합할 수 있으므로 완전히 새로운 기술을 배우지 않아도 포괄적인 유전체 프로파일링 기능을 사용할 수 있습니다. 검사실은 다수의 독립적인 단일 바이오마커 assay를 단 하나의 assay로 통합함으로써 샘플, 시간, 비용을 모두 절약하는 동시에 양성 바이오마커를 발견할 확률을 높일 수 있습니다. 또한, 자체적인 종양 assay를 수행함으로써 샘플과 raw data를 보존하고 유전자 종양 보드(molecular tumor board)에서 더 능동적인 역할을 할 수 있습니다.

요약

TruSight Oncology 500과 TruSight Oncology 500 High-Throughput은 NGS 기반의 하이브리드 캡처 assay로, 적은 양의 샘플을 이용해 단 한 번의 assay를 통해 가이드라인과 임상시험에 기술된 모든 주요 바이오마커를 분석함으로써 포괄적인 유전체 프로파일링을 제공합니다. 또한, DNA 및 RNA 하이브리드 캡처와 정교한 인포매틱스와의 결합을 통해 FFPE 샘플을 사용하는 경우에도 오류는 줄이면서 우수한 품질의 데이터를 생성합니다. 검사실은 TruSight Oncology 500 High-Throughput을 사용하여 batch의 크기와 한 주에 처리하는 샘플의 수를 늘릴 수 있습니다. 더불어 TruSight Oncology 500의 우수한 성능을 바탕으로 검사실의 효율성도 개선하고 의미미한 결과를 얻을 수 있습니다.

상세 정보

TruSight Oncology 500 및 TruSight Oncology 500 High-Throughput에 관한 자세한 정보는 www.illumina.com/tso500을 참조하시기 바랍니다.

참고 문헌

- Stransky N, Cerami E, Schalm S, Kim JL, Lengauer C. The landscape of kinase fusions in cancer. *Nat Commun.* 2014;5:4846. doi:10.1038/ncomms5846.
- Boland GM, Piha-Paul SA, Subbiah V, et al. Clinical next generation sequencing to identify actionable aberrations in a phase I program. *Oncotarget.* 2015;6(24):20099-20110.
- Massard C, Michiels S, Ferté C, et al. High-Throughput Genomics and Clinical Outcome in Hard-to-Treat Advanced Cancers: Results of the MOSCATO 01 Trial. *Cancer Discov.* 2017;7(6):586-595.
- Harris MH, DuBois SG, Glade Bender JL, et al. Multicenter Feasibility Study of Tumor Molecular Profiling to Inform Therapeutic Decisions in Advanced Pediatric Solid Tumors: The Individualized Cancer Therapy (iCat) Study. *JAMA Oncol.* 2016. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.5689.
- Parsons DW, Roy A, Yang Y, et al. Diagnostic Yield of Clinical Tumor and Germline Whole-Exome Sequencing for Children With Solid Tumors. *JAMA Oncol.* 2016. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.5699.
- Zehir A, Benayed R, Shah RH, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med.* 2017;23(6):703-713.
- Tray N, Weber JS, Adams S. Predictive Biomarkers for Checkpoint Immunotherapy: Current Status and Challenges for Clinical Application. *Cancer Immunol Res.* 2018;6(10):1122-1128.
- Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet.* 2019;51(2):202-206.
- U.S. Food & Drug Administration. FDA Approves First-Line Immunotherapy for Patients with MSI-H/bMMR Metastatic Colorectal Cancer. FDA website. www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-line-immunotherapy-patients-msi-hdmmr-metastatic-colorectal-cancer. Released June 29, 2020. Accessed October 7, 2020.
- U.S. Food & Drug Administration. FDA approves pembrolizumab for adults and children with TMB-H solid tumors. FDA website. www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-pembrolizumab-adults-and-children-tmb-h-solid-tumors. Released June 17, 2020. Accessed October 7, 2020.
- illumina (2017) TruSight Oncology UMI Reagents. (www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/tru-sight-oncology-umi-reagents-datasheet-1000000050425.pdf).
- PierianDx - Genomic Knowledgebase. PierianDx website. www.pieriandx.com/genomic-knowledgebase. Accessed October 8, 2020.
- illumina (2018) Analysis of TMB and MSI Status with TruSight Oncology 500. (www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/tru-sight-oncology-500-tmb-analysis-1170-2018-009.pdf).
- Beroukhi R1, Mermel CH, Porter D, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature.* 2010;463(7283):899-905.
- Green MR, Vicente-Duenas C, Romero-Camarero I, et al. Transient expression of BCL6 is sufficient for oncogenic function and induction of mature B-cell lymphoma. *Nat Commun.* 2014;5:3904 doi:10.1038/ncomms4904.
- Piskol R, Ramaswami G, Li JB. Reliable identification of genomic variants from RNA-seq data. *Am J Hum Genet.* 2013;93(4):641-651.

주문 정보: TruSight Oncology 500 워크플로우

샘플 유형	라이브러리 준비			변이 검출			
	제품	카탈로그 번호	PierianDx 포함 여부	제품	카탈로그 번호		
배사	TruSight Oncology 500 DNA Kit ^a (16 indexes, 48 samples)			20028213	1년 라이선스		
	DNA	TruSight Oncology 500 DNA Kit, plus PierianDx ^a (16 indexes, 48 samples)		20032624	✓	DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software, On-Premise, Level 1(120 DNA or 96 DNA/RNA samples)	곧 출시 예정
		TruSight Oncology 500 DNA Kit, for Use with NextSeq ^b (16 indexes, 48 samples)		20028214		DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software, On-Premise, Level 2(360 DNA or 288 DNA/RNA samples)	곧 출시 예정
		TruSight Oncology 500 DNA Kit, for Use with NextSeq, plus PierianDx ^a (16 indexes, 48 samples)		20032625	✓	DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software, On-Premise, Level 3(600 DNA or 480 DNA/RNA samples)	곧 출시 예정
		TruSight Oncology 500 DNA/RNA Bundle ^a (16 indexes, 24 samples)		20028215		DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software, On-Premise, Level 4(925 DNA or 740 DNA/RNA samples)	곧 출시 예정
	DNA/RNA	TruSight Oncology 500 DNA/RNA Bundle, plus PierianDx ^a (16 indexes, 24 samples)		20032626	✓	DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software, On-Premise, Level 5(1850 DNA or 1480 DNA/RNA samples)	곧 출시 예정
		TruSight Oncology 500 DNA/RNA Bundle, for Use with NextSeq ^b (16 indexes, 24 samples)		20028216		DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software, On-Premise, Level 6(5550 DNA or 4440 DNA/RNA samples)	곧 출시 예정
		TruSight Oncology 500 DNA/RNA Bundle, for Use with NextSeq, plus PierianDx ^a (16 indexes, 24 samples)		20032627	✓	DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software, On-Premise, Level 7(9250 DNA or 7400 DNA/RNA samples)	곧 출시 예정
		TruSight Oncology 500 DNA Automation Kit		20045504		DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software, On-Premise, Level 8(18,500 DNA or 14,800 DNA/RNA samples)	곧 출시 예정
	배지	DNA	TruSight Oncology 500 DNA Automation Kit, plus PierianDx		20045506	✓	하드웨어(on-premise 분석용)
TruSight Oncology 500 DNA Automation Kit for Use with NextSeq			20045505		DRAGEN S3 Server	20040619	
TruSight Oncology 500 DNA Automation Kit, for Use with NextSeq, plus PierianDx			20045507	✓			
DNA/RNA		TruSight Oncology 500 DNA/RNA Automation Kit		20045508			
		TruSight Oncology 500 DNA/RNA Automation Kit, plus PierianDx		20045509	✓		
		TruSight Oncology 500 DNA/RNA Automation Kit, for Use with NextSeq		20045990			
		TruSight Oncology 500 DNA/RNA Automation Kit, for Use with NextSeq, plus PierianDx		20045991	✓		

a. DNA library prep reagent 및 enrichment reagent 포함, NextSeq 550 sequencing reagent 불포함.
 b. DNA library prep reagent, enrichment reagent, NextSeq 550 sequencing reagent 포함.

주문 정보: TruSight Oncology 500 High-Throughput 워크플로우

샘플 유형	라이브러리 준비		PierianDx 포함 여부	소모품		변이 검출	
	제품	카탈로그 번호		제품	카탈로그 번호	제품	카탈로그 번호
DNA	TruSight Oncology 500 DNA High-Throughput Kit (48 samples)	20040765		인덱스 키트		1년 라이선스	
	TruSight Oncology 500 DNA High-Throughput Kit (144 samples)	20040767		IDT for Illumina UMI DNA/RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 indexes, 96 samples)	20034701	DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software, On-Premise, Level 1(120 DNA or 96 DNA/RNA samples)	곧 출시 예정
	TruSight Oncology 500 DNA High-Throughput Kit with PierianDx(48 samples)	20040769	✓	IDT for Illumina UMI DNA/RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 indexes, 96 samples)	20034702	DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software, On-Premise, Level 2(360 DNA or 288 DNA/RNA samples)	곧 출시 예정
	TruSight Oncology 500 DNA High-Throughput Kit, with PierianDx(144 samples)	20040771	✓	시퀀싱 시약 키트		DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software, On-Premise, Level 3(600 DNA or 480 DNA/RNA samples)	곧 출시 예정
DNA/ RNA	TruSight Oncology 500 DNA/RNA High-Throughput Kit(24 samples)	20040764		NovaSeq 6000 SP Reagent Kit v1.5(200 cycles)	20040719	DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software, On-Premise, Level 4(925 DNA or 740 DNA/RNA samples)	곧 출시 예정
	TruSight Oncology 500 DNA/RNA High-Throughput Kit(72 samples)	20040766		NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit v1.5(200 cycles)	20028318	DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software, On-Premise, Level 5(1850 DNA or 1480 DNA/RNA samples)	곧 출시 예정
	TruSight Oncology 500 DNA/RNA High-Throughput Kit, with PierianDx(24 samples)	20040768	✓	NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit v1.5(200 cycles)	20028315	DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software, On-Premise, Level 6(5550 DNA or 4440 DNA/RNA samples)	곧 출시 예정
	TruSight Oncology 500 DNA/RNA High-Throughput Kit, with PierianDx(72 samples)	20040770	✓	NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5(200 cycles)	20028313	DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software, On-Premise, Level 7(9250 DNA or 7400 DNA/RNA samples)	곧 출시 예정
						DRAGEN TruSight Oncology 500 Analysis Software, On-Premise, Level 8(18,500 DNA or 14,800 DNA/RNA samples)	곧 출시 예정
						하드웨어(on-premise 분석용)	
						DRAGEN S3 Server	20040619