

TruSight™ Oncology 500 ctDNA

Permite crear perfiles genómicos completos a partir de muestras de biopsia líquida en el propio centro.

Puntos destacados

- **Permite crear perfiles genómicos completos a partir de sangre**

Evalúe variantes del ADN en 523 genes en el propio centro, incluidos los marcadores bTMB y bMSI*

- **Libera biopsias líquidas en el propio centro**

Aproveche las muestras de plasma obtenidas de manera no invasiva como una alternativa, o como un complemento, a las muestras de tejido escasas

- **Genera resultados fiables**

Obtenga límites de detección bajos gracias a la preparación de bibliotecas de captura híbrida basada en UMI, a la secuenciación de alta intensidad con el sistema NovaSeq™ 6000 y a los procesos bioinformáticos avanzados

- **Permite aprovechar un flujo de trabajo integrado**

Pase del cfDNA a la interpretación de informes con la plataforma de tecnología bioinformática DRAGEN™ Bio-IT para la llamada de variantes en cinco días

* bTMB y bMSI son marcadores de plasma (sangre)

Introducción

La biopsia líquida permite un análisis completo del ADN libre circulante (cfDNA, cell-free DNA) en el plasma, logrando un enfoque no invasivo de la creación de perfiles de tumores sólidos. Para aprovechar las ventajas de la biopsia líquida, es fundamental utilizar un ensayo que sea muy sensible y específico y pueda detectar mutaciones somáticas de baja frecuencia. TruSight Oncology 500 ctDNA utiliza la demostrada tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS, next-generation sequencing) de Illumina para lograr esta alta sensibilidad y poder crear perfiles genómicos completos del ADN tumoral circulante (ctDNA, circulating tumor DNA) que se encuentra en el cfDNA (Figura 1, Tabla 1). La combinación de esta avanzada solución con la potencia bioinformática del software de análisis TruSight Oncology 500 ctDNA de DRAGEN proporciona a los investigadores clínicos una solución de ADN a informe para evaluar varios tipos de variantes de cientos de genes en un único ensayo.

TruSight Oncology 500 ctDNA es compatible con los reactivos de secuenciación NovaSeq 6000 v1.5. Además de aumentar las eficiencias operativas, que se traducen en potenciales reducciones del precio por muestra superiores al 35 %, estos reactivos ofrecen una mayor vida útil de seis meses y mejoran las puntuaciones Q30.



Figura 1. La biopsia líquida permite la creación de perfiles de biomarcadores para varios tipos de variantes y tipos de cáncer: los sofisticados algoritmos de llamada de variantes y la gran profundidad de secuenciación permiten la detección de biomarcadores clave en el cfDNA con un límite de detección (LoD, limit of detection) del 0,5 %.

Tabla 1: información básica de TruSight Oncology 500 ctDNA

| Parámetro | Detalles |
|---|--|
| Instrumento | Sistema NovaSeq 6000 |
| Tamaño del panel | 1,94 Mb para ADN |
| Contenido del panel | 523 genes 59 genes para CNV 23 genes para fusiones génicas MSI (>2400 locus) TMB |
| Cantidad necesaria de ADN de entrada | 30 ng de cfDNA ^a |
| Tipo de muestra | cfDNA obtenido de la sangre |
| Duración total del ensayo | 5 días de la preparación de la biblioteca al informe de variantes |
| Duración del experimento de secuenciación | Experimento 36 horas, análisis 10 horas (celda de flujo S2) Experimento 45 horas, análisis 22 horas (celda de flujo S4) |
| Experimento de secuenciación | 2 de 151 pb cada uno |
| Productividad de las muestras | 8 muestras por experimento (celda de flujo S2) 24 muestras por experimento (celda de flujo S4) 48 muestras por kit de preparación de bibliotecas |
| Límite de detección | VAF del 0,5 % en el caso de las variantes pequeñas Cambio $\geq 1,4$ veces para amplificaciones génicas Cambio $\leq 0,6$ veces para deleciones génicas ≥ 2 % de fracción tumoral para MSI |
| Sensibilidad del análisis | ≥ 95 % (en el LoD para todos los tipos de variantes) |
| Especificidad del análisis | ≥ 95 % |

a. Cuantificación recomendada con los sistemas TapeStation o de análisis de fragmentos de Agilent

La potencia de la biopsia líquida

A diferencia de la biopsia de tejido, que proporciona información de solo una parte del tumor, la biopsia líquida proporciona información acerca de la heterogeneidad intra e intertumoral en todo el organismo. Estudios recientes muestran que el análisis de cfDNA detectó una cantidad significativa de biomarcadores recomendados en las guías, además de alteraciones de la resistencia que no se hallaron en las biopsias de tejido equiparables.¹ Además, un estudio sobre el cáncer de pulmón no microcítico reveló que los análisis de cfDNA coinciden en gran medida con los análisis realizados en tejidos.²



Figura 2. Flujo de trabajo del ensayo TruSight Oncology 500 ctDNA: el ensayo TruSight Oncology 500 ctDNA se integra en los flujos de trabajo actuales del laboratorio, permitiendo pasar del cfDNA al informe de variantes en cinco días.

Cimientos para un contenido integral

El contenido de TruSight Oncology 500 ctDNA ha sido diseñado por autoridades de reconocido prestigio en la comunidad oncológica e incluye biomarcadores actuales y emergentes, con una amplia cobertura de genes implicados en directrices y ensayos clínicos clave de varios tipos de tumores. El diseño de la sonda del panel captura tanto fusiones genéticas conocidas como novedosas, e incluye 523 genes para detectar variantes con probabilidad de desempeñar un papel en la carcinogénesis. Los biomarcadores incluyen variantes de nucleótido único (SNV, single-nucleotide variants), inserciones/delecciones (indels), variantes en el número de copias (CNV, copy-number variants), fusiones génicas y firmas genómicas complejas de inmunooncología, como inestabilidad de microsatélites (MSI, microsatellite instability) y la carga mutacional del tumor (TMB, tumor mutational burden) (Tabla 2). Para conocer la lista completa de genes, visite www.illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/trusight-oncology-500-ctdna.html.

Tabla 2: ejemplos de variantes detectadas con TruSight Oncology 500 ctDNA

| Tipo de variante | Ejemplos relevantes |
|------------------|----------------------------------|
| SNV e indels | <i>EGFR, POLE, TMPRSS2, BRAF</i> |
| Fusiones génicas | <i>ALK, ROS1, NTRK, RET</i> |
| CNV | <i>HER2</i> |
| MSI | Puntuación MSI |
| TMB | Puntuación TMB |

Tecnología demostrada para detectar biomarcadores de bajo nivel

Mediante el demostrado proceso químico de secuenciación por síntesis (SBS, sequencing by synthesis) de Illumina TruSight Oncology 500 ctDNA, se puede realizar un perfil genómico completo a partir de tan solo 30 ng de cfDNA, lo que lo convierte en una alternativa ideal cuando no se dispone de pruebas en tejido. La preparación de las bibliotecas aprovecha el proceso químico de enriquecimiento selectivo con sondas biotiniladas y bolas magnéticas recubiertas con estreptavidina, para enriquecer objetivos seleccionados de las bibliotecas de ADN. El proceso químico de enriquecimiento mediante hibridación selectiva de captura utiliza sondas con un tamaño lo suficientemente grande como para proporcionar una elevada especificidad en la unión, pero permitiendo la hibridación con objetivos que contienen pequeñas mutaciones. Este enfoque reduce la pérdida de muestras en presencia tanto de variaciones alélicas naturales como de artefactos de secuenciación.

Dado que el ctDNA representa una pequeña fracción del cfDNA, se requieren métodos potentes para separar la señal del ruido. En la preparación de la biblioteca se incorporan identificadores moleculares

exclusivos (UMI, unique molecular identifiers) que permiten identificar variantes de frecuencia ultrabaja.³ Las bibliotecas de TruSight Oncology 500 ctDNA se secuencian en el sistema NovaSeq 6000 con una gran profundidad (400 millones de lecturas por muestra a aproximadamente 35 000x) para mejorar la sensibilidad. Como resultado se pueden detectar mutaciones a una frecuencia de variantes de alelos (VAF, variant allele frequency) del 0,5 % para variantes pequeñas con una sensibilidad analítica del 95 % y una especificidad analítica de más del 99,995 % (Tabla 3).

Tabla 3: detección de variantes de bajo nivel de gran precisión

| Tipo de variante | Sensibilidad del análisis ^a | Especificidad del análisis ^b |
|--|--|---|
| Variantes pequeñas (VAF de $\geq 0,5$ %) | ≥ 95 % | $\geq 99,995$ % |
| Amplificaciones génicas (cambio $\geq 1,4$ veces) | ≥ 95 % | ≥ 95 % |
| Delecciones génicas (cambio $\leq 0,6$ veces) | ≥ 95 % | ≥ 95 % |
| Fusiones génicas (0,5 %) | ≥ 95 % | ≥ 95 % |
| Detección de MSI alta (\geq al 2 % de fracción tumoral) | ≥ 95 % | ≥ 95 % |

- a. La sensibilidad analítica se define como el porcentaje de detección a nivel de la variante indicada
- b. La especificidad analítica se define como la capacidad para detectar un negativo conocido

Análisis preciso y rápido

El software de análisis TruSight Oncology 500 ctDNA de DRAGEN utiliza algoritmos bioinformáticos rápidos y totalmente integrados para superar los desafíos del cfDNA y garantizar un rendimiento óptimo de los ensayos. El software lleva a cabo la alineación de secuencias, la corrección de errores mediante el colapso de la secuencia y la posterior llamada de variantes basada en los datos sin procesar. Se eliminan las lecturas duplicadas y los errores de secuenciación sin pérdida de señal para las variantes de baja frecuencia, produciendo resultados de llamada de variantes de alta sensibilidad.

A diferencia de los resultados cualitativos de ensayos basados en PCR, el software de análisis TruSight Oncology 500 ctDNA de DRAGEN ofrece una puntuación de MSI cuantitativa obtenida de más de 2400 sitios de marcadores de MSI de homopolímeros. En el caso de los análisis de TMB, el software de DRAGEN optimiza la sensibilidad mediante la medición de SNV sinónimas y no sinónimas, así como de indels. Después de las llamadas de variantes y la corrección de errores, la precisión de las mediciones de TMB se mejora aún más mediante la filtración de variantes de líneas germinales, variantes de poca confianza y variantes asociadas a la hematopoyesis clonal de potencial indeterminado.

El software de análisis TruSight Oncology 500 ctDNA de DRAGEN se ejecuta en un servidor local DRAGEN v3 de Illumina.* Esta plataforma ultrarrápida proporciona un hardware y un software mejorados que reducen la duración del análisis de los datos en aproximadamente un 85 %, o de nueve días a unas 20 horas (tabla 4).

PierianDx Clinical Genomics Workspace completa el análisis terciario. Tan solo tiene que cargar los archivos de informe de las variantes en la nube de Clinical Genomics Workspace. Clinical Genomics Workspace realiza la anotación y el filtrado de las variantes para una interpretación y generación de informes fluida. A partir de miles de variantes del genoma, Clinical Genomics Workspace filtra y da prioridad a las variantes biológicamente pertinentes para el informe genómico final, que es automatizado y personalizable. El flujo de trabajo completo, desde el cfDNA hasta la notificación consolidada de variantes, tarda solo cinco días (figura 2).

Una amplia validación proporciona resultados precisos y altamente reproducibles

Para demostrar los resultados de alta calidad que se logran con TruSight Oncology 500 ctDNA, Illumina realizó varios estudios que evaluaban la capacidad de llamada de SNV, CNV, fusiones génicas, TMB y MSI (figuras 3 y 4, tablas 5 y 6).

Tabla 4: el tiempo necesario para realizar el análisis de datos se reduce con el servidor de DRAGEN v3

| Paso de análisis de datos | Solución ajena a DRAGEN ^a | Software de análisis TruSight Oncology 500 ctDNA de DRAGEN |
|-------------------------------------|--------------------------------------|--|
| Conversión de BCL | 6 horas | 1 hora |
| Alineación + colapso + realineación | 170 horas | 11 horas |
| Llamada de fusión génica | 10 horas | 2 horas |
| Llamadas de variantes | 24 horas | 8 horas |
| Duración total | Aprox. 9 días | Aprox. 20 horas (Aprox. 85 % de reducción) |

a. Proceso de nodo único (128 G de memoria, CPU de 24 núcleos) no paralelizado de 24 muestras utilizando una celda de flujo S4

* Próximamente estará disponible una solución de software de análisis TruSight Oncology 500 ctDNA de DRAGEN basada en la nube.

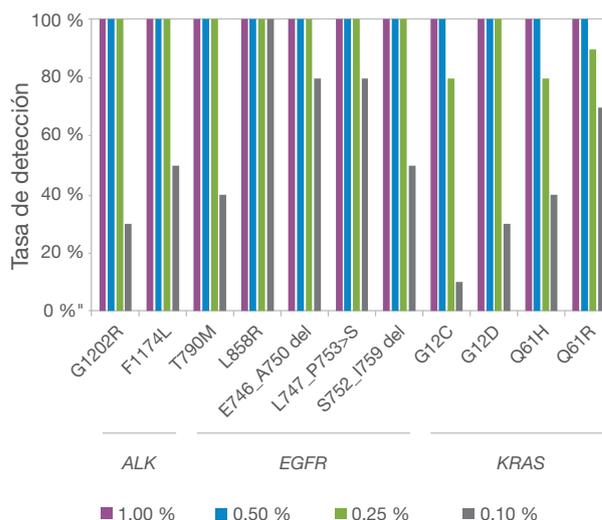


Figura 3. Detección de variantes pequeñas con una baja VAF: las muestras de VAF conocida para cada variante se diluyeron a valores de VAF que iban del 0,10 al 1,00 %. Se analizaron cinco duplicados de cada muestra con TruSight Oncology 500 ctDNA utilizando un aporte de ADN comercial de control de referencia de 30 ng.

Resumen

TruSight Oncology 500 ctDNA es un ensayo multiplexado basado en NGS que analiza simultáneamente cientos de biomarcadores del plasma relacionados con el cáncer. El contenido del ensayo se adapta a las directrices y ensayos clínicos actuales y puede detectar varios tipos de variantes a partir de 523 genes implicados en diversos tipos de tumores, sin necesidad de utilizar varias muestras para repetir las pruebas. Además, TruSight Oncology 500 ctDNA permite evaluar biomarcadores de inmunooncología y emergentes (TMB, MSI, *NTRK* y *ROS1*). Gracias al aprovechamiento del amplio contenido genómico, de la tecnología de secuenciación líder en el sector y del software mejorado, TruSight Oncology 500 ctDNA proporciona una solución integrada con la que acelerar los proyectos de investigación clínica en su propio laboratorio, con una complejidad operativa y de análisis mínima.

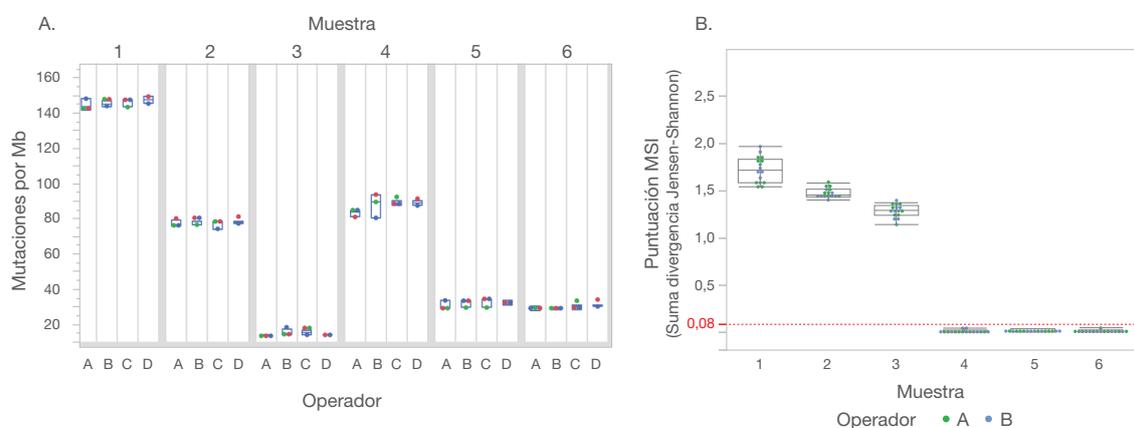


Figura 4. Medición reproducible de TMB y MSI: (A) Cuatro operadores evaluaron por duplicado el TMB en seis muestras de plasma diferentes. (B) Dos operadores diferentes (verde, azul) evaluaron la MSI en tres estirpes celulares mediante la preparación de nucleosomas con un estado conocido de MSI alta (1-3) y en tres muestras de cfDNA de tumores con baja prevalencia de MSI alta (4-6).

Tabla 5: detección sensible de las CNV

| Gen | Múltiplo del cambio previsto | Media observada | Desviación estándar | Tasa de detección |
|------------------------|------------------------------|-----------------|---------------------|-------------------|
| Amplificaciones | | | | |
| 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 % |
| Delecciones | | | | |
| BRCA1 | 0,8 | 0,8 | 0,01 | 100 % |
| BRCA2 | 0,8 | 0,8 | 0,01 | 100 % |
| AR | 0,7 | 0,8 | 0,01 | 100 % |

Se evaluaron muestras con magnitudes de cambio conocidas de amplificaciones y supresiones génicas mediante TruSight Oncology 500 ctDNA con un aporte de cfDNA de 30 ng. Se analizaron cinco duplicados de cada muestra.

Tabla 6: detección de fusión génica con una VAF baja

| Fusión génica | VAF prevista | VAF observada | Desviación estándar | Tasa de detección |
|----------------|--------------|---------------|---------------------|-------------------|
| 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 % |

Se evaluaron muestras con frecuencias alélicas de fusión génica conocidas que oscilaban entre el 0,5 y el 4 % aproximadamente. Se analizaron cinco réplicas de cada muestra mediante TruSight Oncology 500 ctDNA, utilizando un aporte de cfDNA de 30 ng.

Direccionalidad de la fusión génica notificada en función de la expresión conocida. Consulte la guía del usuario de la aplicación local TruSight Oncology 500 ctDNA para obtener más información sobre la direccionalidad de la fusión basada en el ADN.

Información adicional

Para saber más sobre TruSight Oncology 500 ctDNA, visite www.illumina.com/tso500-ctDNA.

Para obtener más información sobre la plataforma de tecnología bioinformática DRAGEN, visite www.illumina.com/DRAGEN.

Referencias

- 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.
- 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.
- Illumina (2017) TruSight Oncology UMI Reagents. www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-oncology-umi-reagents-datasheet-100000050425.pdf. Consultado el 4 de mayo de 2020.

Datos para realizar pedidos

| Producto | Cantidad | N.º de catálogo |
|--|----------------------------|-----------------|
| TruSight Oncology 500 ctDNA Kit | 48 muestras/ 16 índices | 20039252 |
| TruSight Oncology 500 ctDNA Kit plus PierianDx Interpretation Report | 48 muestras/ 16 índices | 20043410 |
| Kits de reactivos NovaSeq | | |
| NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit v1.5 | 300 ciclos | 20028314 |
| NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5 | 300 ciclos | 20028312 |
| NovaSeq Xp 4-Lane Kit v1.5 | 1 kit | 20043131 |
| Informes de variantes en las instalaciones | | |
| DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 1 | Licencia de un año | 20042100 |
| DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 2 | Licencia de un año | 20042101 |
| DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 3 | Licencia de un año | 20042102 |
| DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 4 | Licencia de un año | 20042103 |
| DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 5 | Licencia de un año | 20042104 |
| DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 6 | Licencia de un año | 20042105 |
| DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 7 | Licencia de un año | 20042106 |
| DRAGEN TruSight Oncology 500 ctDNA Analysis Software, Level 8 | Licencia de un año | 20042107 |
| Illumina DRAGEN Server v3 | 1 servidor | 20040619 |
| Illumina DRAGEN Server Advance Exchange Plan | | 20032797 |
| Illumina DRAGEN Server Installation | | 20031995 |