

From RUO to IVD , NGS and digital PCR in liquid biopsy

Yan Wang, Ph.D.

President and CEO , QuestGenomics



南京科維思生物科技股份有限公司

www.questgenomics.com

Content

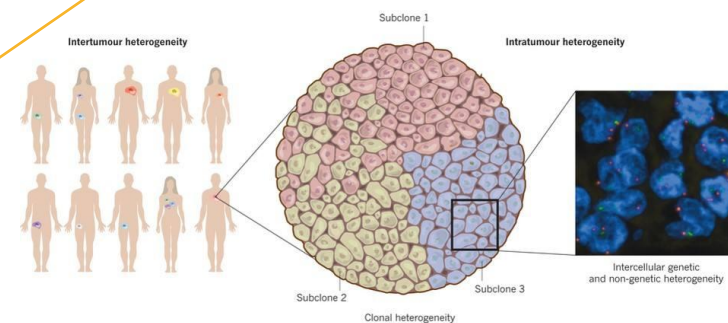
- **Why digital PCR**
 - What NGS can and can not do
- All about digital PCR
 - The principle
 - QuantStudio 3D vs. droplet digital PCR
 - The application
- What digital PCR can not do
 - The future of liquid biopsy

影像学检测：迟到的判断



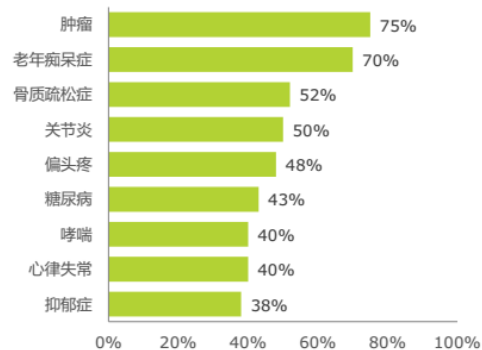
高灵敏度
高特异性
绝对定量

组织活检：时空异质性

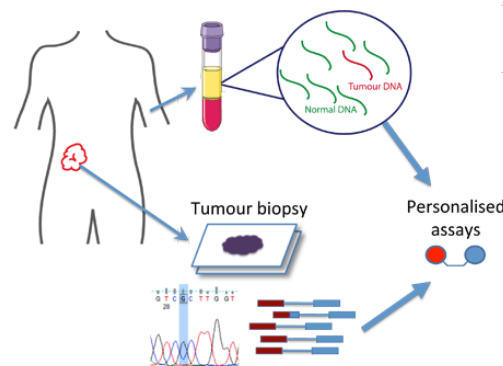


晚期肿瘤患者治疗有效率
低于30%

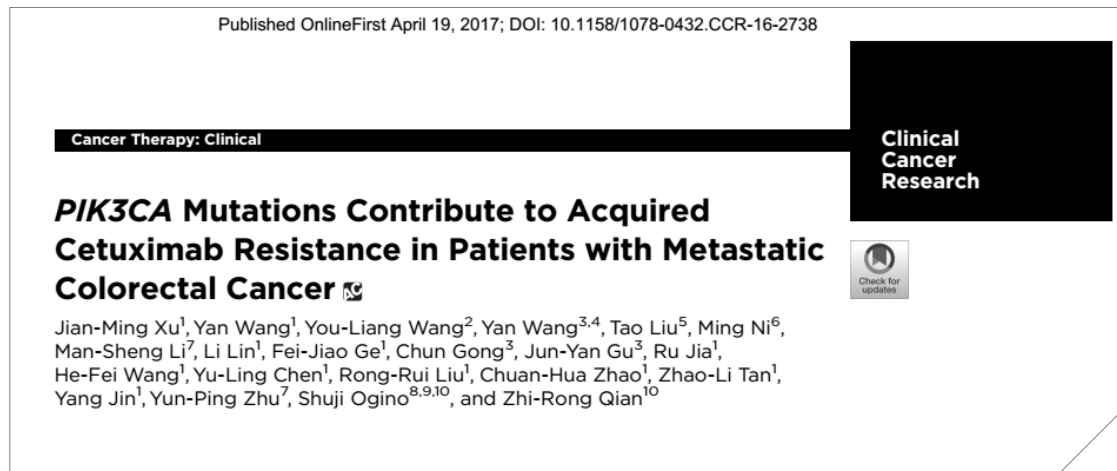
传统医疗在复杂疾病治疗上的用药无效率



肿瘤患者的疗效动态监控
是延长寿命的核心



PIK3CA mutations contribute to acquired cetuximab resistance in metastatic colorectal cancer patients

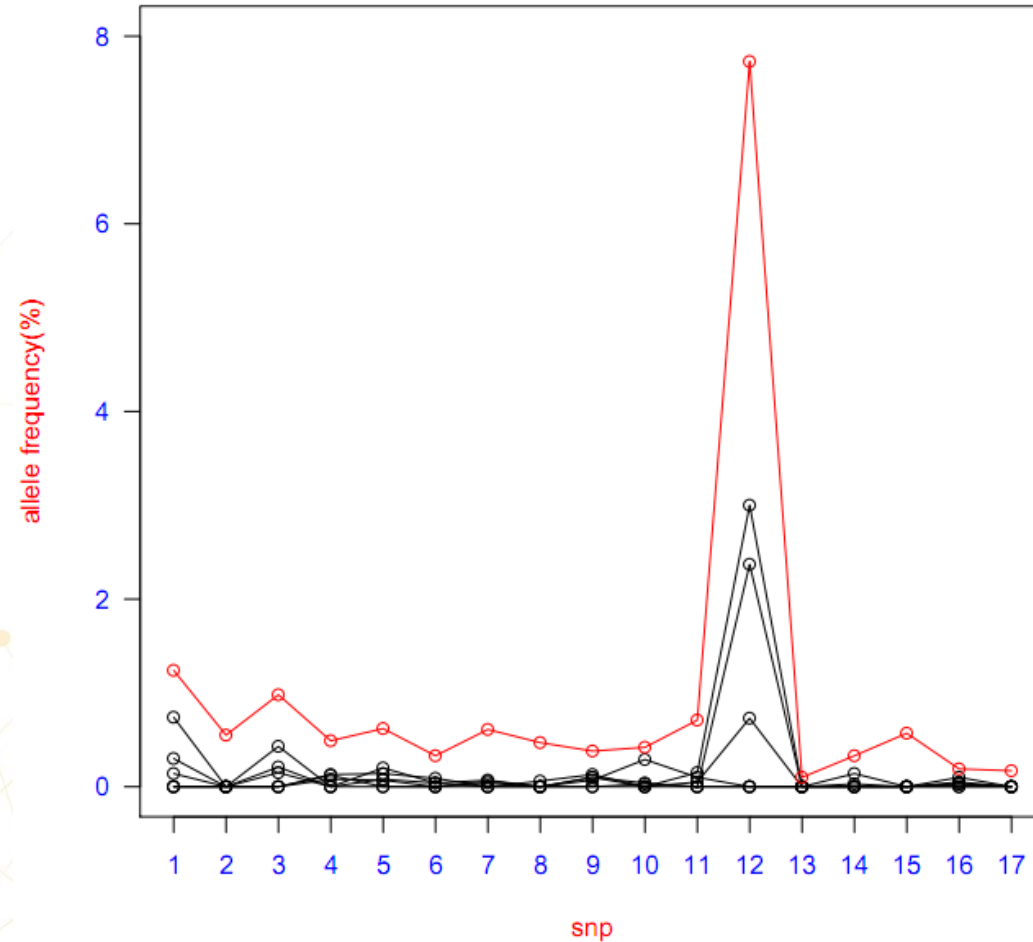


- 56 patients recruited;
- Longitudinal blood samples collected from before Cetuximab treatments until PD
- Designed focused panel with only 42 amplicons
- Developed a novel bioinformatics pipeline to identify acquired resistance mutations
- Validated identified mutations in cell based assay

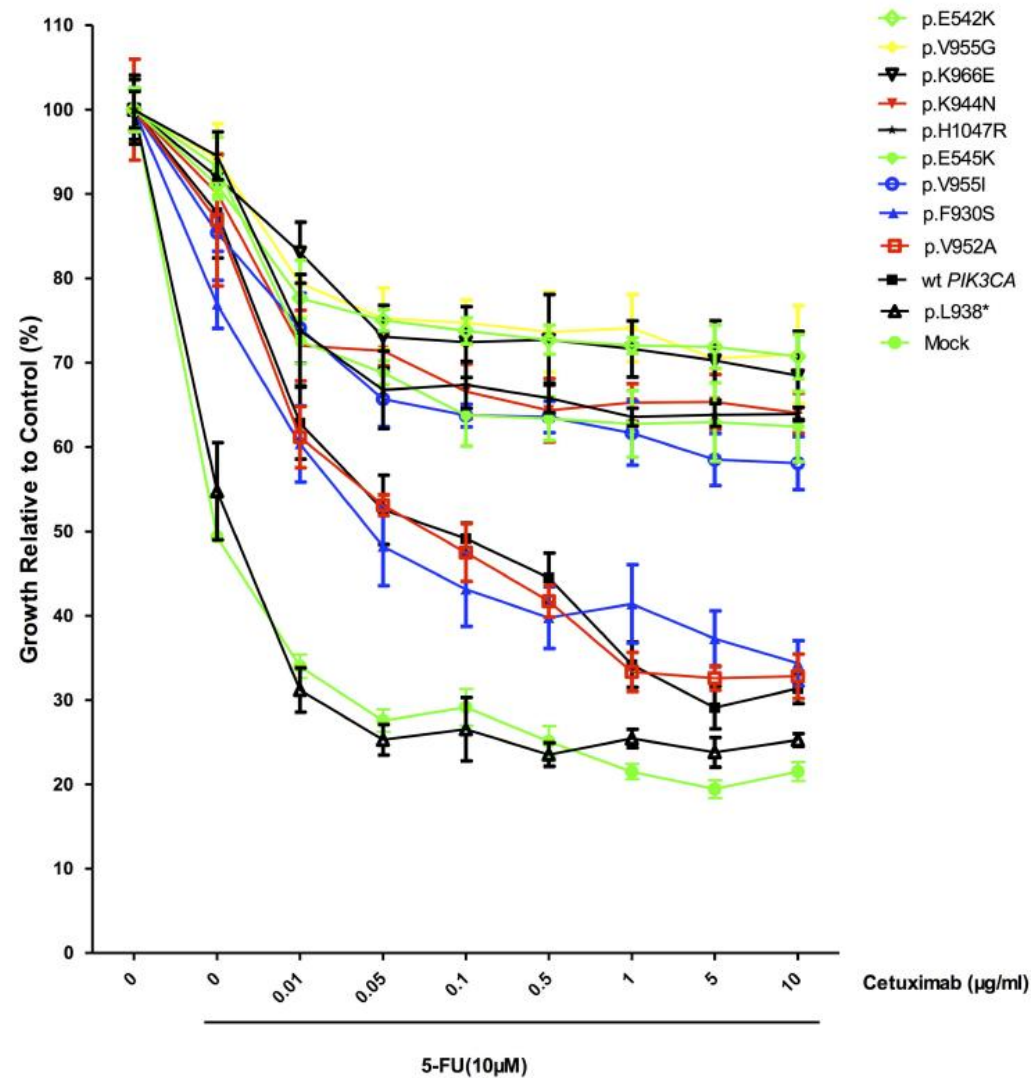
Xu JM et al. Clinical Cancer Research, 2017 April 19.

Finding the needle in the haystack: Candidate mutation identification

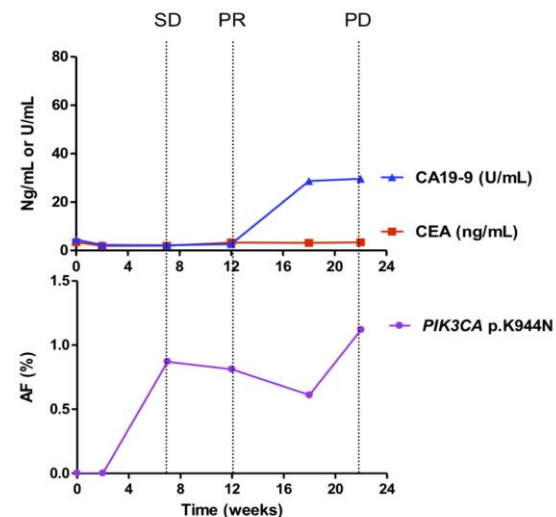
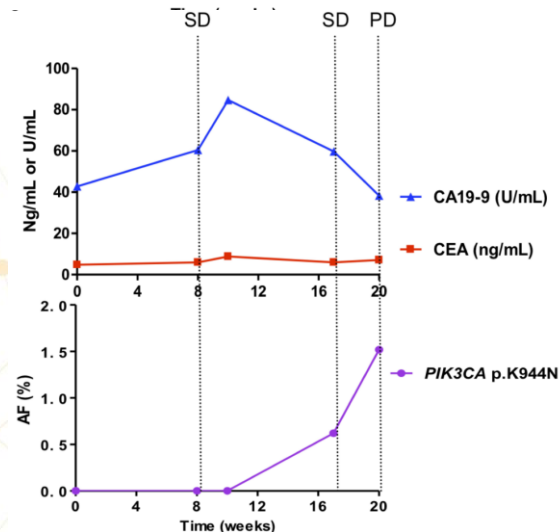
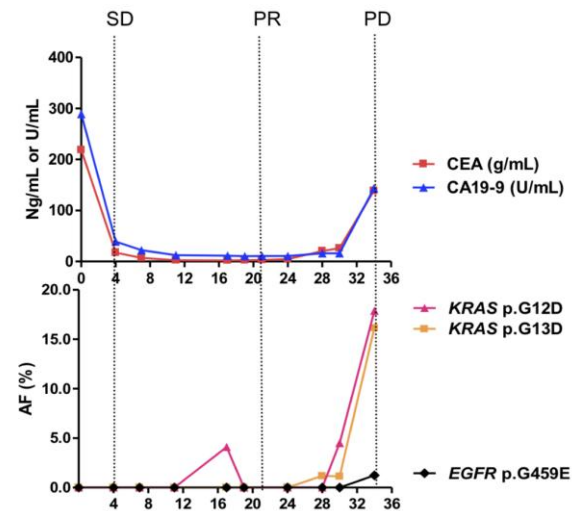
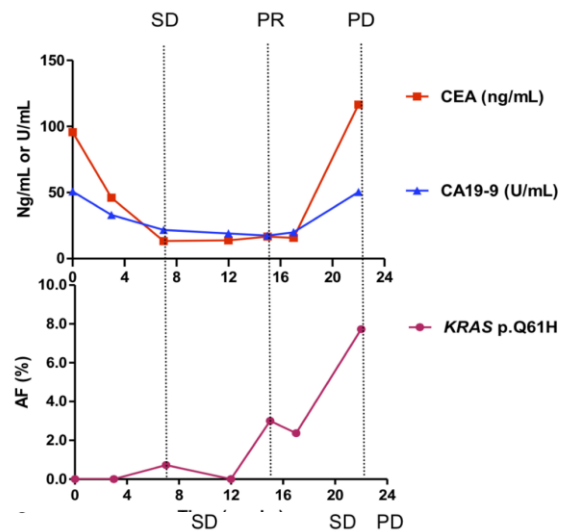
somatic mutation at different time in ctDNA



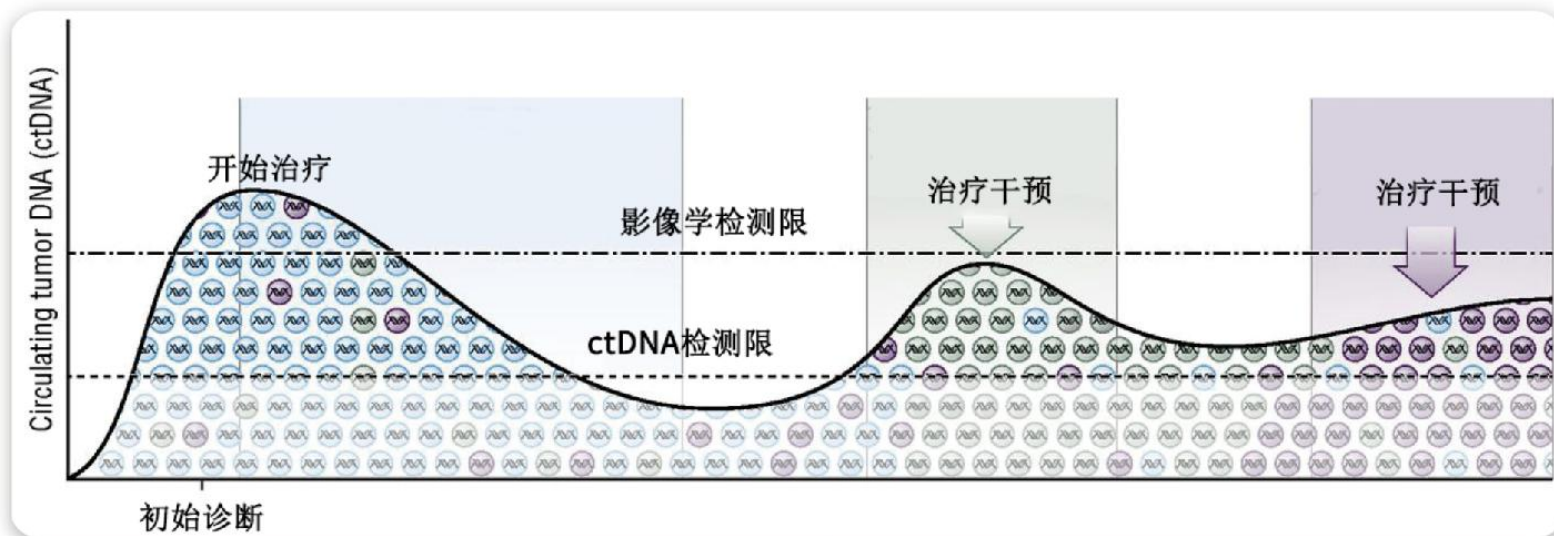
Resistance validated in cell based assays



novo identification of mutations correlate with acquired resistance



基于数字PCR的实体肿瘤微小残留病变的检测 是患者延长生存的保障



- 在血液肿瘤中，通常需要在分子水平进行微小残留病变（minimal residual disease, MRD）的检测，可以在细胞学水平之前提示复发转移征兆。
- 科维思芯片式数字PCR的技术优势，可以实现在实体瘤中进行ctDNA的检测，在临床影像学提示进展之前发现肿瘤进展的征兆，为疗效评估、及时调整治疗方案提供依据，最大可能延长患者生存期。

低频突变检测的技术挑战和操作流程规范性

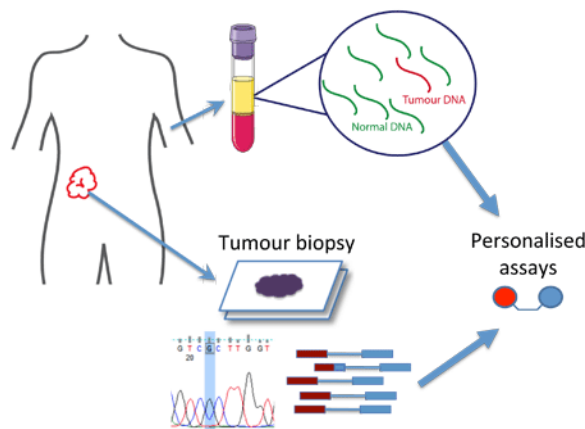
低频突变检测的技术挑战

检测血液中ctDNA驱动一管血有多少拷贝ctDNA？基因突变面临如下挑战：突变的浓度非常低，有大量的来自正常细胞的野生型DNA，突变位点只有一个位置的差异（如EGFR L858R），同一位置上有多种不同的变化（如不同的外显子缺失EGFR 19del）。数字PCR能够从大量野生型背景下鉴别出突变基因：通过将样本分到芯片的数万个单独的PCR反应中，使含有靶标的微反应体系释放较强的荧光信号，而野生型的反应体系就作为背景，通过这样的区分，可以将稀有的低频突变检测出来，具有极高的灵敏度、特异性和精确性。

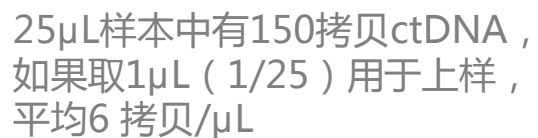
一管血有多少拷贝ctDNA？

- 每个人体细胞有6.6pg基因组DNA，含两个拷贝
- 10ml外周血通常可以纯化出10-100ng 游离DNA
- 33ng 游离DNA含10,000个拷贝的基因组
- 于是：0.1%突变频率的突变只有10个拷贝
- 在检测限附近的突变有效拷贝数为5-10个

因此，ctDNA的检测对检测技术的灵敏度和特异性要求极高。而且挑战整个操作流程的规范性

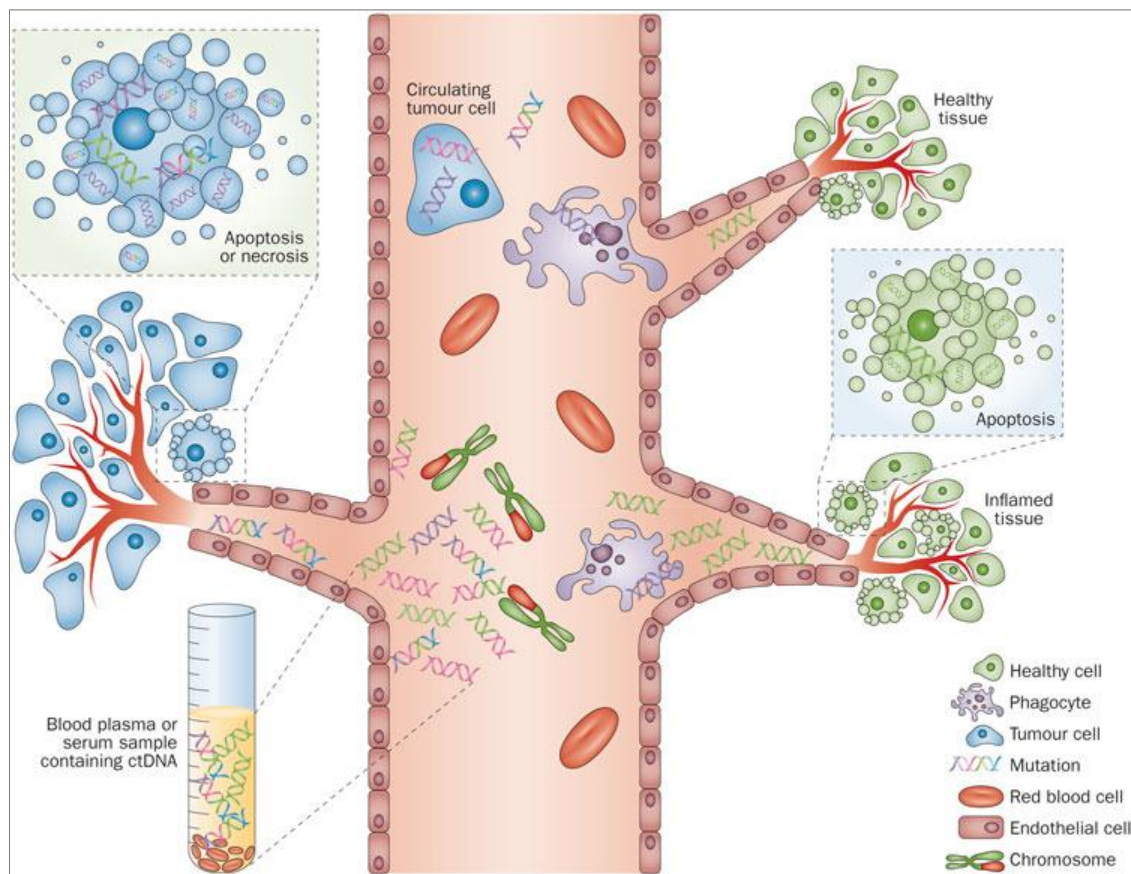


血液中ctDNA的低拷贝数对检测灵敏度和特异性提出了更高的要求



二次取样误差 (Subsampling error)

期望测的6拷贝，但是可能会测得4/5/6/7/8拷贝，这种不确定性被称为二次取样误差，可通过泊松分布函数来描述



- 正常人平均每天有5000~7000万个细胞凋亡，肿瘤病人的凋亡细胞少量来自肿瘤病灶。
- 凋亡细胞中的DNA 会裂解成小片段并以游离的形式存在于血液和其它体液中，称之为游离DNA (cell free DNA, cfDNA)。其中少量来自肿瘤细胞的游离DNA 称之为循环肿瘤DNA (ctDNA)。
- ctDNA在大量来自正常细胞的游离DNA中只占很少的比例,可能低至0.1%，甚至0.01%。

Content

- Why digital PCR
 - What NGS can and can not do
- **All about digital PCR**
 - The principle
 - QuantStudio 3D vs. droplet digital PCR
 - The application
- What digital PCR can not do
 - The future of liquid biopsy

芯片式数字PCR系统

产品组成



芯片上样仪



PCR扩增仪



芯片读取仪



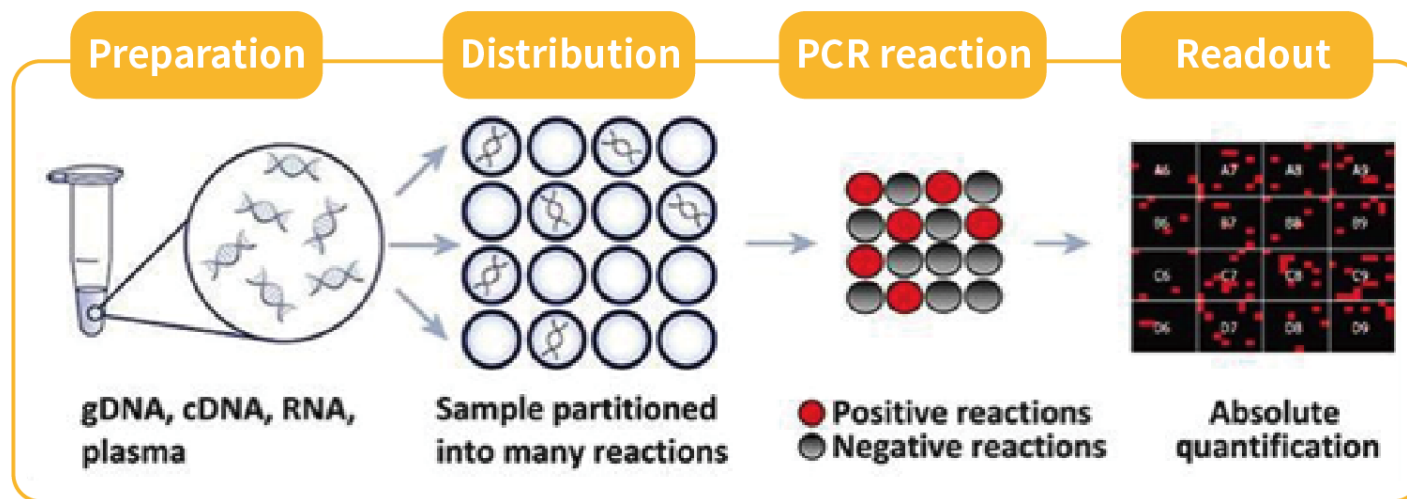
数据分析服务器

芯片式数字PCR系统

因创新而精准

将荧光定量PCR数字化（“0”或“1”），实现对目标序列拷贝数的绝对定量

- 将一个反应平分至2万个微反应中，每个微反应有0或1个目标序列，独立检测，提高信噪比，实现对样品的绝对定量，支持高灵敏度的检测需求。
- 实现了对低频信号的富集，并能通过计数含有PCR产物的微反应，对目标序列进行绝对定量，适用于低频突变，拷贝数变异，融合基因，及微量病原体的检测及生殖的应用（含NIPT）。



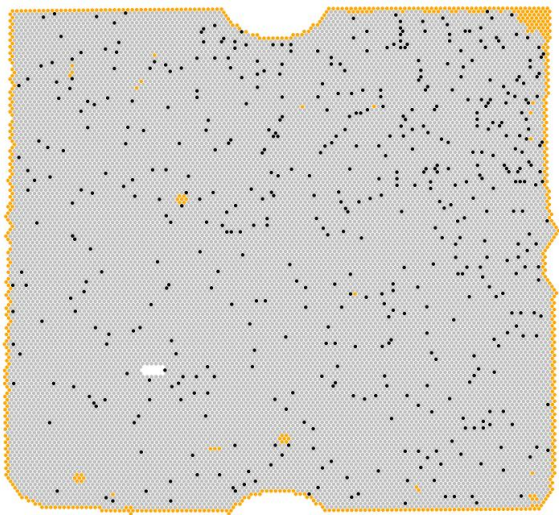
芯片式数字PCR系统

因创新而精准

通过两个阈值的设定提高“信噪比”，同时提高准确性和特异性

阈值1

基于PCR反应后每个微孔的荧光强度值，评判每个微孔中目标序列的是否存在（“0”或“1”）。



芯片上有20,000个微孔，

有样品填充的孔分别以黄色、黑色和灰色标识：

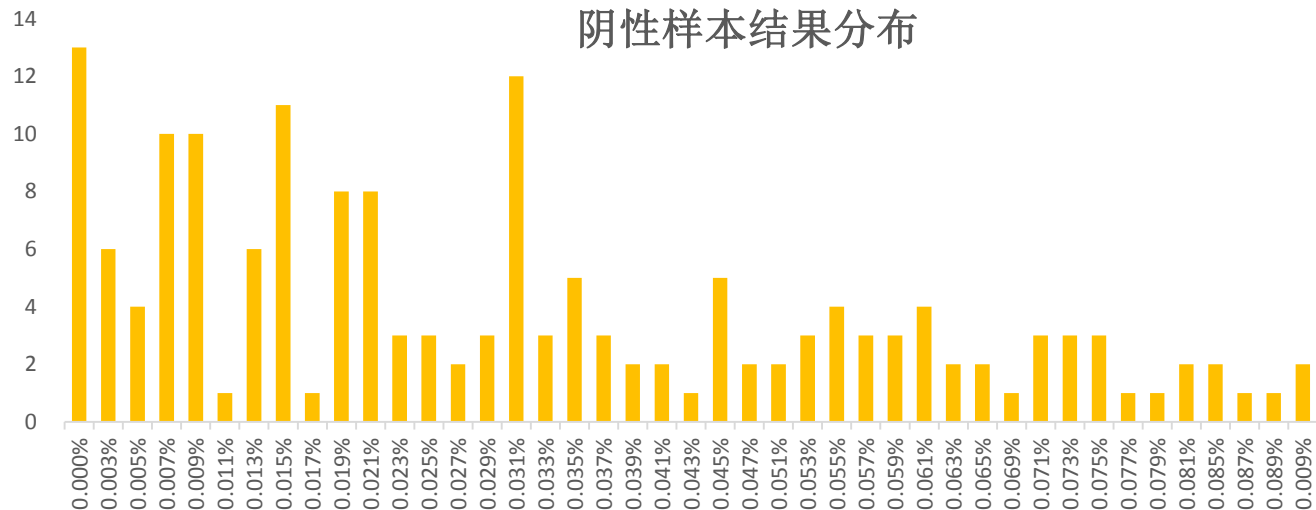
黄色：质量值较低的微孔；

黑色：荧光强度值高于阈值（即目标序列存在“1”）；

灰色：荧光强度值低于阈值（即目标序列不存在“0”）；

阈值2

基于分析性能验证的结果，设置每个检测的阴阳性评判的阈值。

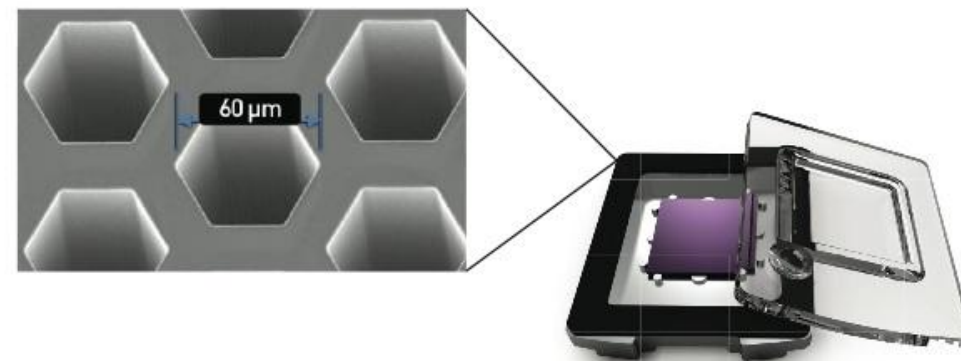
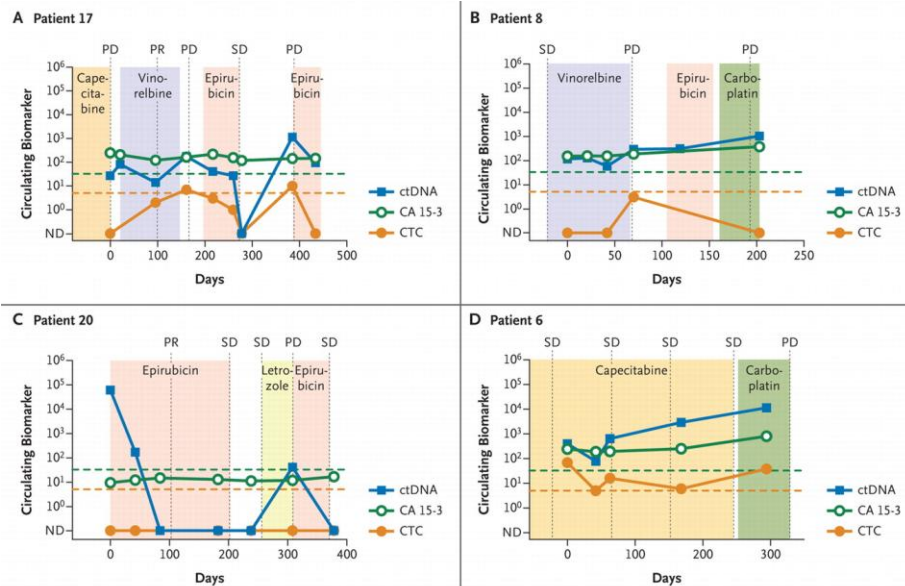


计算出若干阴性结果的Mean+2SD和Mean+3SD,最终确定阴阳性判断的阈值。

芯片式数字PCR系统

因创新而精准

独立的微反应体系，稳定性和重复性好，保证检测结果的精密度（accuracy），使不同时间，甚至地点的检测结果有可比性，适用于动态监控



乳腺癌患者用药过程中用数字PCR对其拥有的突变进行动态监测，可以显示微小差异的检测。 *N Engl J Med.* 2013, 368(13):1199-1209.
 Patient 17: Chr8 deletion,
 Patient 8: TP53 exon 8 mutation
 Patient 20: TP53 exon 6 mutation
 Patient 6: PIK3CA exon 10 mutation

芯片式数字PCR结果分析和解读

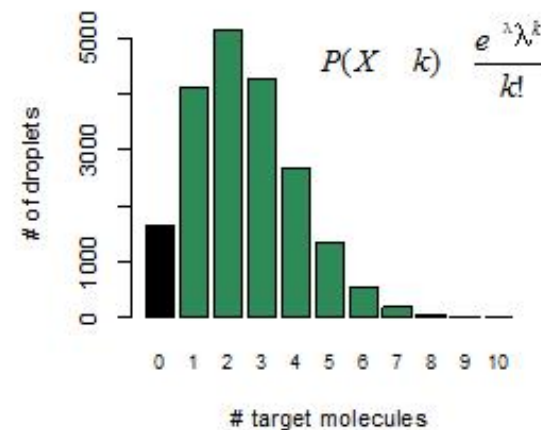
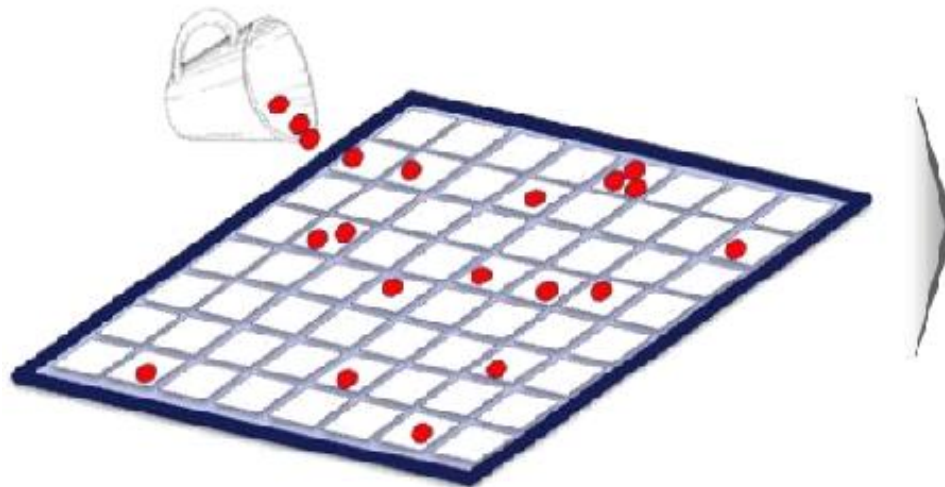
微孔数：20,000

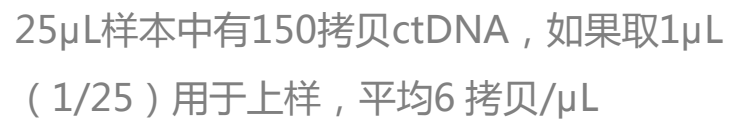
芯片式数字PCR的统计学

每个反应孔中分子数分布情况符合泊松分布模型

- 根据芯片荧光信号结果，计算出芯片中阳性孔和阴性孔的比例
- 该比例带入泊松分布模型，计算出平均每孔的拷贝数拷贝数/孔体积得出数据结果

$$\lambda = -\ln\left(1 - \frac{k}{n}\right)$$





二次取样误差 (Subsampling error)

期望测的6拷贝，但是可能会测得4/5/6/7/8拷贝，
这种不确定性被称为二次取样误差，可通过泊松分布函数来描述

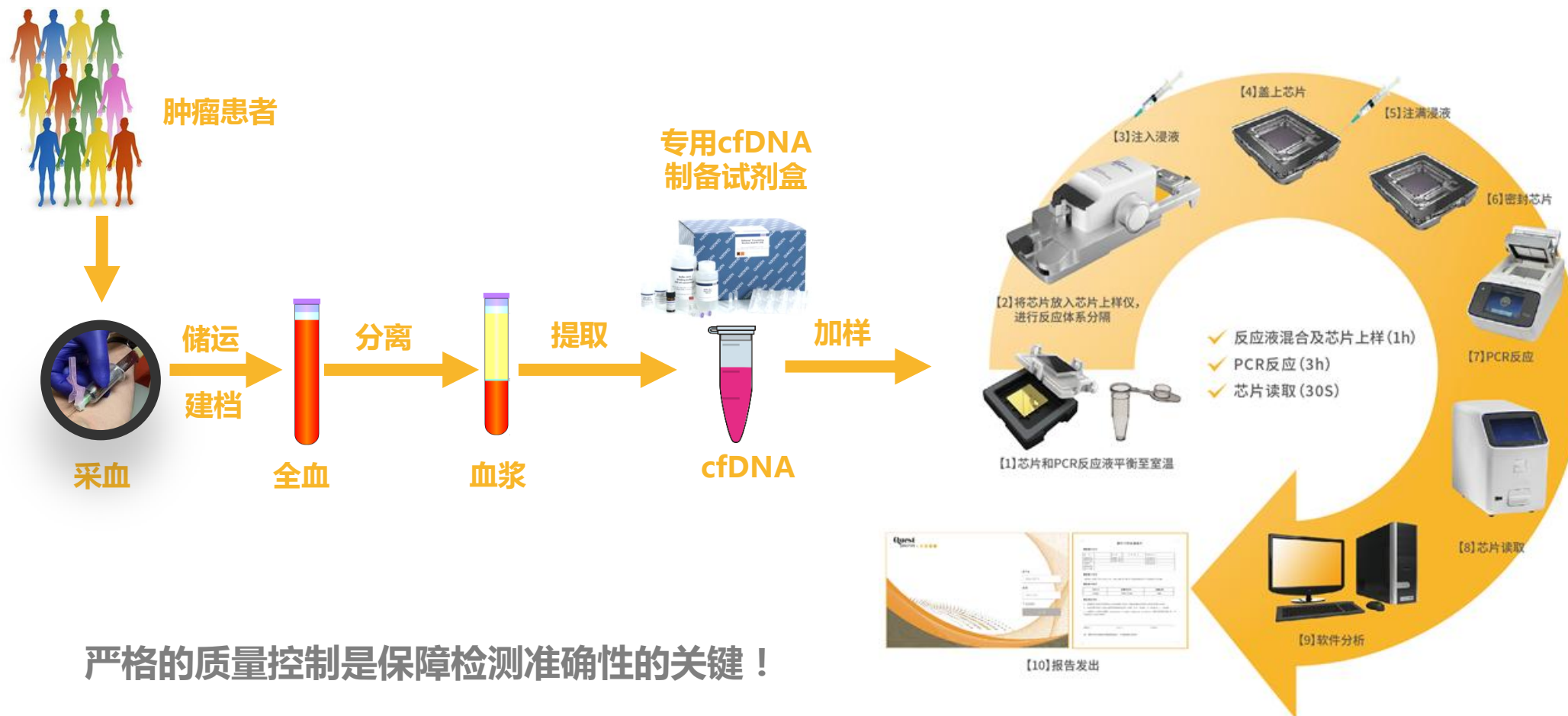
数字PCR的统计学

- 尽可能大的上样量（影响阳性检出率）
- 3X原则（The rule of three）：In order to reach 95% confidence that a sample frequency is 1 in 1,000, you need to identify 3 in 3,000 events.

Material to screen (human)

LoD	Total copies to screen	Diploid cells	Amount of DNA to screen	# of wells
1 in 1,000	3,000	1,500	0.010 ug	1
1 in 10,000	30,000	15,000	0.10 ug	1
1 in 25,000	75,000	37,500	0.25 ug	1
1 in 100,000	300,000	150,000	1.0 ug	4
1 in 1,000,000	3,000,000	1,500,000	10 ug	40

From sample to results – every step counts



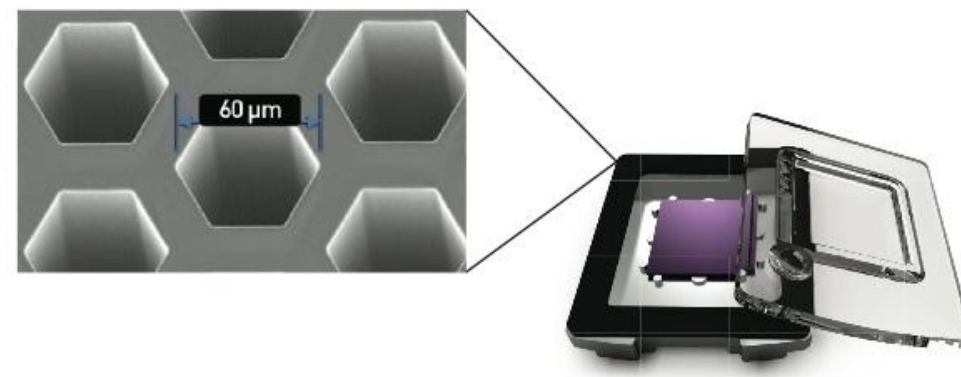
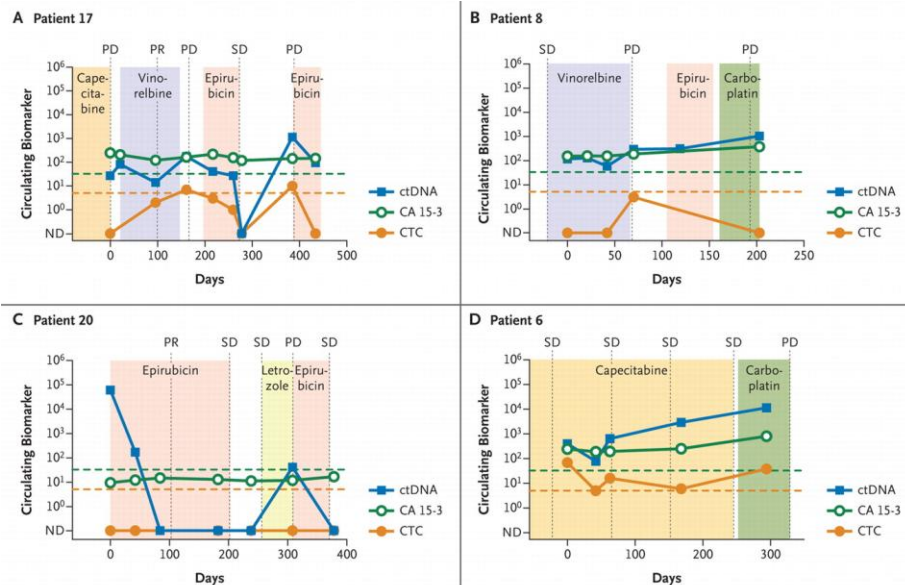
●●●●● 基于美国CLIA规程的解决方案 ●●●●●

以美国实验室改进法案修正案 (clinical laboratory improvement amendments, CLIA) 的检验标准生成标准操作程序 (standard operating procedures, SOPs) 及满足检验要求的结果分析平台, 保证终端检测质量, 确保检测结果的准确性和可靠性, 体现最佳性能; 科维思针对每一款试剂, 均有对应的软件自动判读, 避免人工判读带来的偏差, 保证各地区使用的一致性和结果的一致性。



SOPs和软件用户界面分析

二代测序和数字PCR的结合 是肿瘤患者疗效检测的解决方案



乳腺癌患者用药过程中用数字PCR对其拥有的突变进行动态监测，
可以显示微小差异的检测。 *N Engl J Med.* 2013, 368(13):1199-1209.

Patient 17: Chr8 deletion,

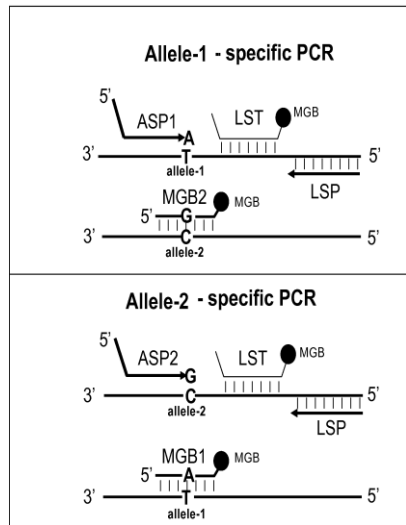
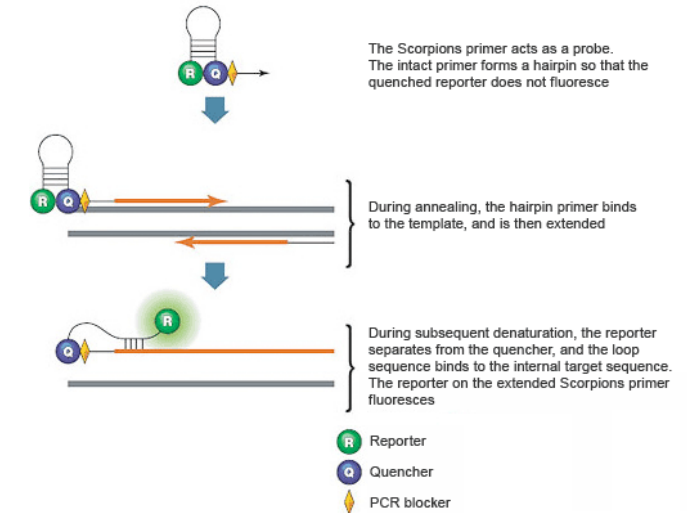
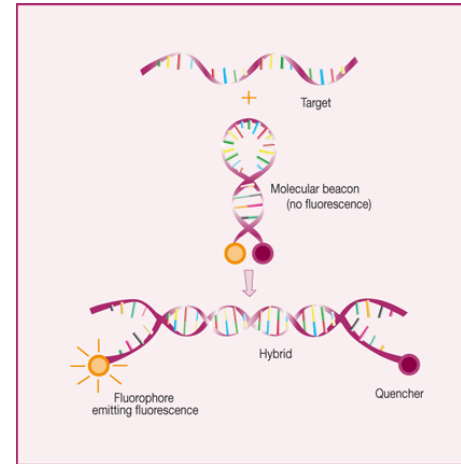
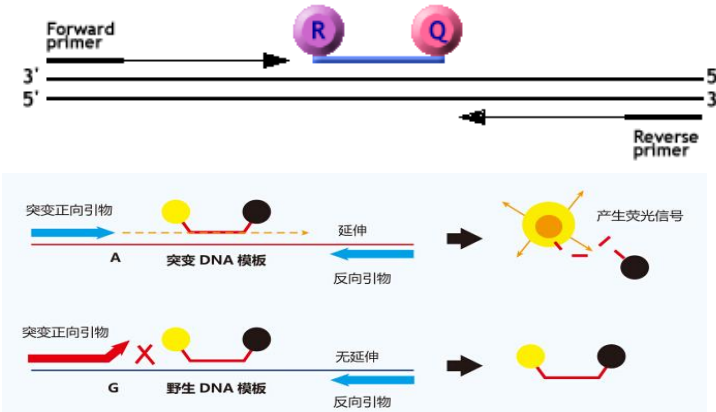
Patient 8: TP53 exon 8 mutation

Patient 20: TP53 exon 6 mutation

Patient 6: PIK3CA exon 10 mutation

Fluorescent detection in PCR

1. Polymerization.



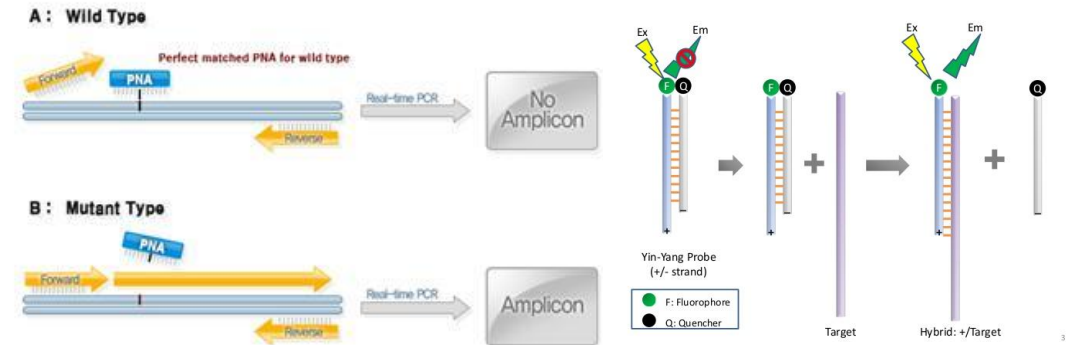
components

Locus specific Taqman Probe(LST) MGB blockers

- Allele 1-specific MGB blockers (ASB1)
- Allele 2- specific MGB blockers (ASB2)

PCR primers

- Locus-specific PCR primer (LSP)
- Modified ASP1 (specific SNP allele 1)
- Modified ASP2 (specific SNP allele 2)



●●●●● EGFR T790M—检测限 ●●●●●

在突变反应终体系20ng核酸浓度下，通过检测EGFR基因T790M突变阳性与阴性参考品（0%，0.1%，1%，10%，50%），验证其最低检测限。具体结果如下：

重复次数	检测结果FAM/（FAM+VIC）				
	阴性参考品	0.1%突变参考品	1%突变参考品	10%突变参考品	50%突变参考品
1	0.09%	0.29%	1.65%	9.70%	38.79%
2	0.04%	0.34%	1.74%	9.37%	39.56%
3	0.07%	0.20%	1.72%	10.03%	39.17%
4	0.02%	0.23%	1.55%	8.69%	38.26%
5	0.05%	0.34%	2.17%	9.01%	38.22%
6	0.06%	0.37%	1.63%	9.24%	38.57%
7	0.00%	0.34%	1.93%	9.25%	39.45%
8	0.02%	0.20%	1.71%	9.50%	38.55%
9	0.05%	0.33%	1.72%	9.14%	39.45%
10	0.05%	0.24%	1.92%	9.84%	38.60%
11	0.02%	0.22%	1.90%	9.26%	38.31%
12	0.00%	0.29%	2.00%	8.97%	38.58%
13	0.07%	0.31%	1.92%	8.73%	38.83%
14	0.06%	0.23%	1.72%	9.46%	38.83%
15	0.09%	0.23%	1.97%	9.65%	38.66%
16	0.07%	0.30%	1.96%	9.19%	38.54%
17	0.09%	0.29%	1.81%	9.50%	39.54%
18	0.05%	0.19%	2.02%	9.19%	40.08%
19	0.05%	0.22%	2.14%	9.18%	38.60%
20	0.07%	0.27%	1.97%	9.73%	39.29%

上述结果表明：在突变反应终体系20ng核酸浓度下，可检测到0.1%的T790M突变。

●●●●● EGFR T790M—检测限 ●●●●●

在EGFR基因T790M突变率为0.1%时，研究反应终体系中核酸浓度（5ng，20ng，80ng）的最低检测限。具体结果如下：

重复次数	检测限参考品检测结果FAM/（FAM+VIC）		
	5ng/14.5μl	20ng/14.5μl	80ng/14.5μl
1	0.34%	0.29%	0.34%
2	0.07%	0.34%	0.41%
3	0.26%	0.20%	0.32%
4	0.49%	0.23%	0.31%
5	0.14%	0.34%	0.33%
6	0.13%	0.37%	0.42%
7	0.27%	0.34%	0.26%
8	0.13%	0.20%	0.36%
9	0.34%	0.33%	0.33%
10	0.26%	0.24%	0.26%
11	0.29%	0.22%	0.28%
12	0.40%	0.29%	0.28%
13	0.22%	0.31%	0.31%
14	0.15%	0.23%	0.38%
15	0.31%	0.23%	0.34%
16	0.14%	0.30%	0.22%
17	0.22%	0.29%	0.35%
18	0.14%	0.19%	0.29%
19	0.00%	0.22%	0.26%
20	0.15%	0.27%	0.35%

上述结果表明：在EGFR基因T790M突变率为0.1%时，14.5μl扩增反应终体系中，DNA浓度的最低检测限为20ng。

各检测平台比较



	3DPCR	ddPCR	荧光定量PCR	NGS
CFDA注册证	是	否	是	否
没有交叉污染	是	否	否	否
样本检测灵活性	是	否	否	否
绝对定量	是	是	否	否
临床适用性	适用临床	适用科研	临床和科研	适用科研
不受PCR扩增效率影响	是	是	否	否

Content

- Why digital PCR
 - What NGS can and can not do
- All about digital PCR
 - The principle
 - QuantStudio 3D vs. droplet digital PCR
 - The application
- **What digital PCR can not do**
 - The future of liquid biopsy

Somatic Mutations Burden Detected from ctDNA Correlates with PFS in mNSCLC Patients

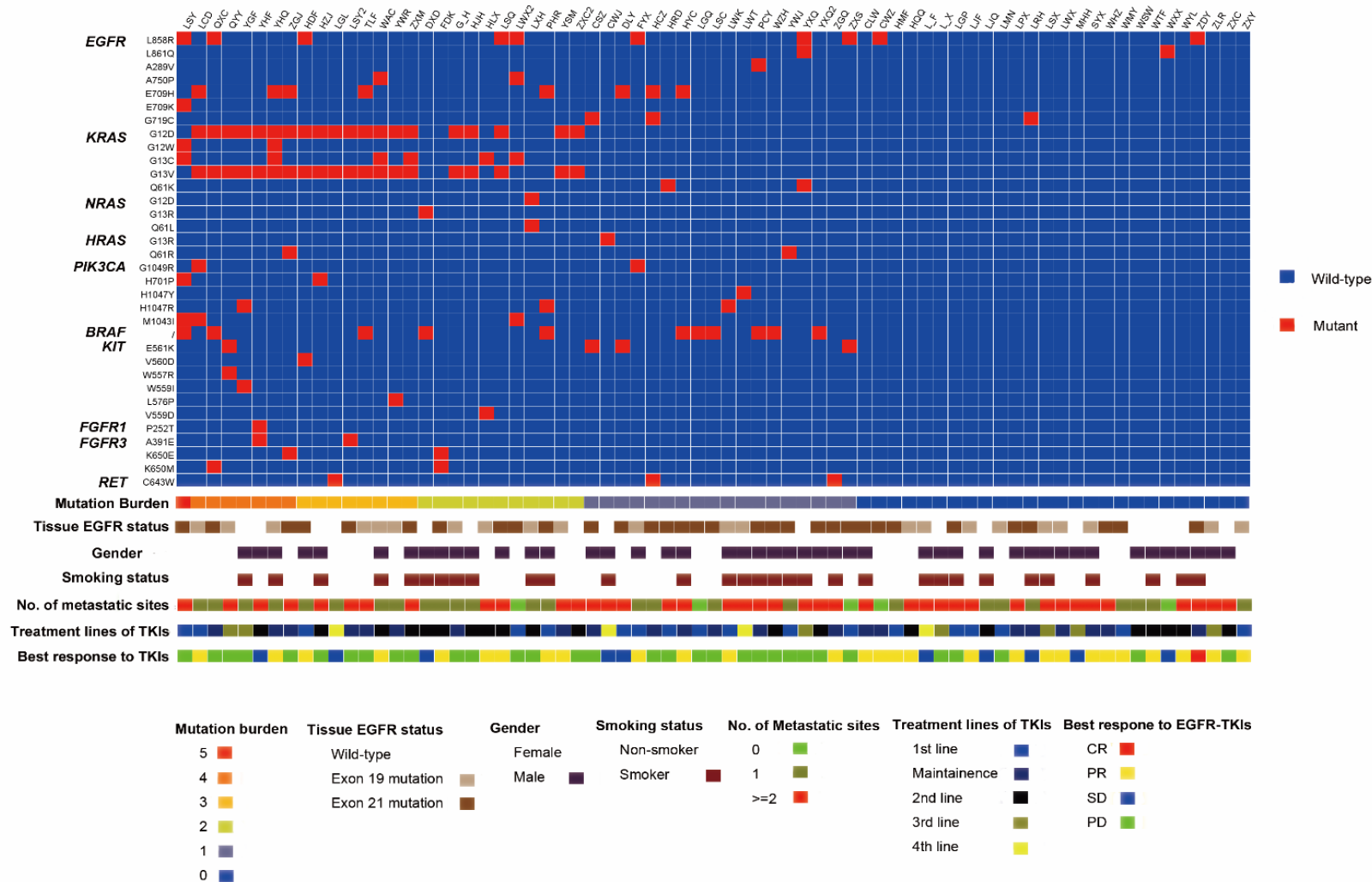
- Experimental Design

- 71 patients recruited
- Blood samples collected from before TKI treatments
- Designed focused panel targeting hot spot mutations in 35 genes related to NSCLC
- Point mutations identified through Amplicon sequencing

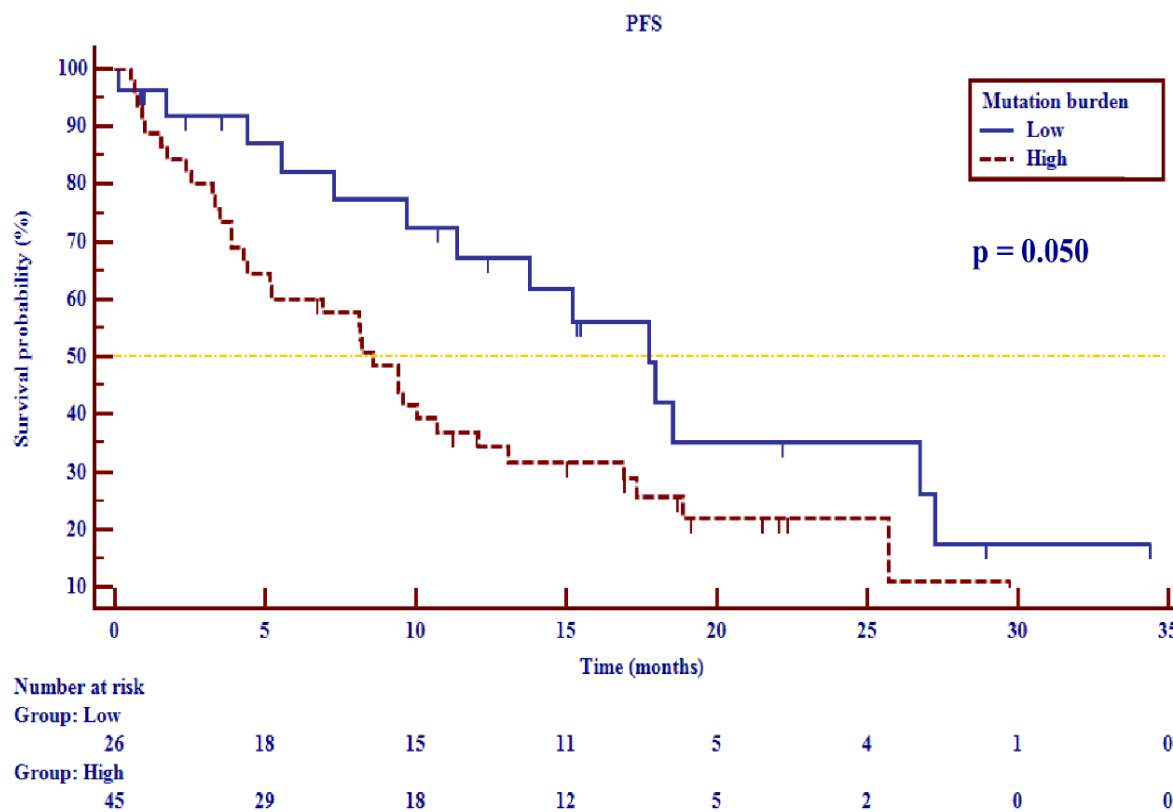
Zhang, Li, et al. "Deep Sequencing Reveals the Significance of Plasma DNA Concentration and Mutational Burden in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Patients." *JOURNAL OF THORACIC ONCOLOGY*. Vol. 10. No. 9. 360 PARK AVE SOUTH, NEW YORK, NY 10010-1710 USA: ELSEVIER SCIENCE INC, 2015.

Abstract :1409 by Li Zhang

Mutational Landscape of ctDNA in mNSCLS



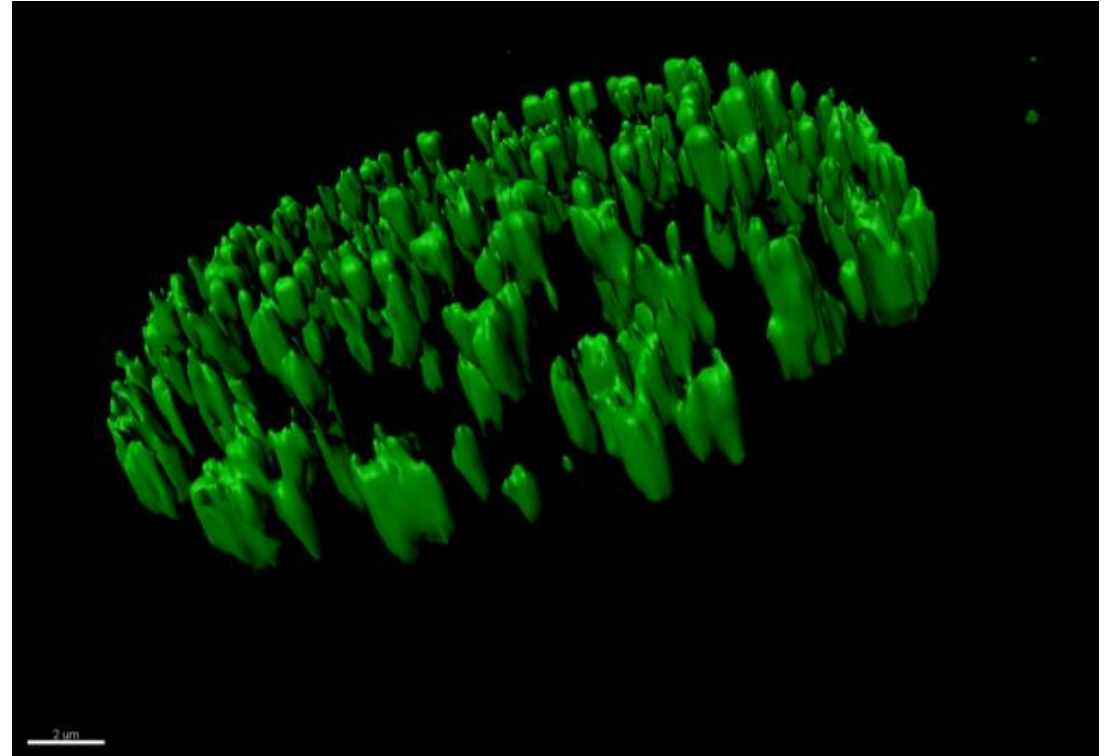
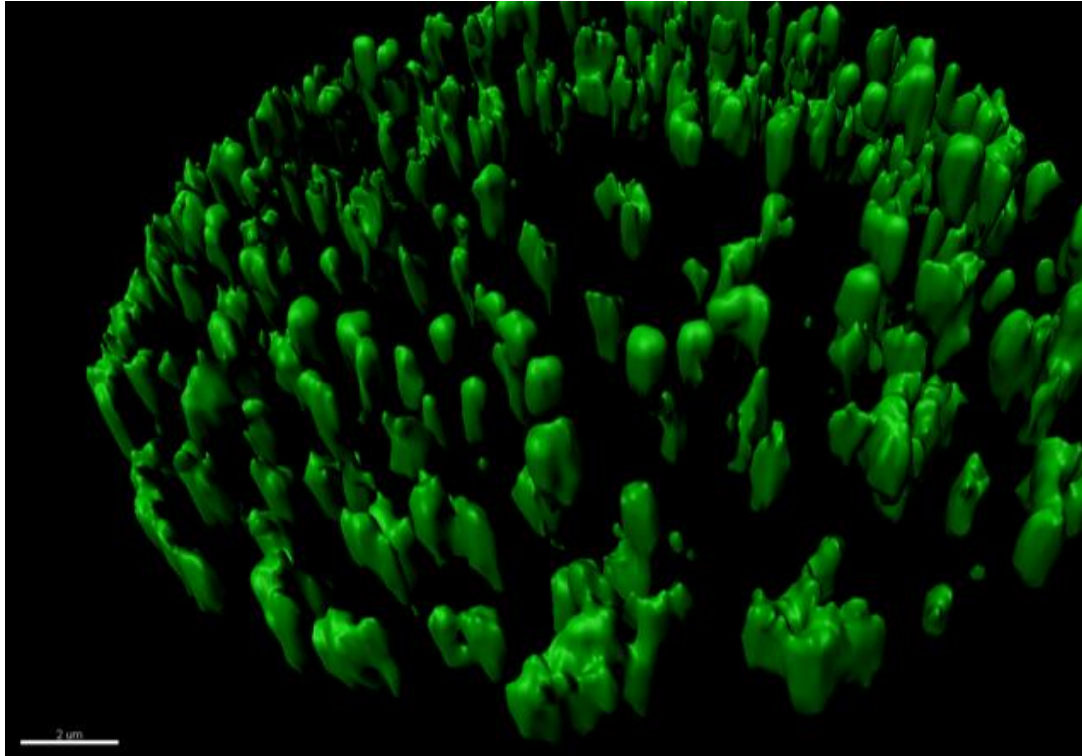
ctDNA Mutation Burden Associates with PFS



..... From RUO to IVD



••••• The sequencing chemistry •••••



●●●●● 创新：峡谷中的直通车 ●●●●●



Acknowledgement

北京307医院

徐建明 教授
王 岩 教授
王友亮 教授

北京中日友好医院

陈 皇 教授

TSRI

Dr. Steven Head

广州中山肿瘤医院

张 力 教授
洪少东 博士

科维思 & Gnomegen

THANKS