



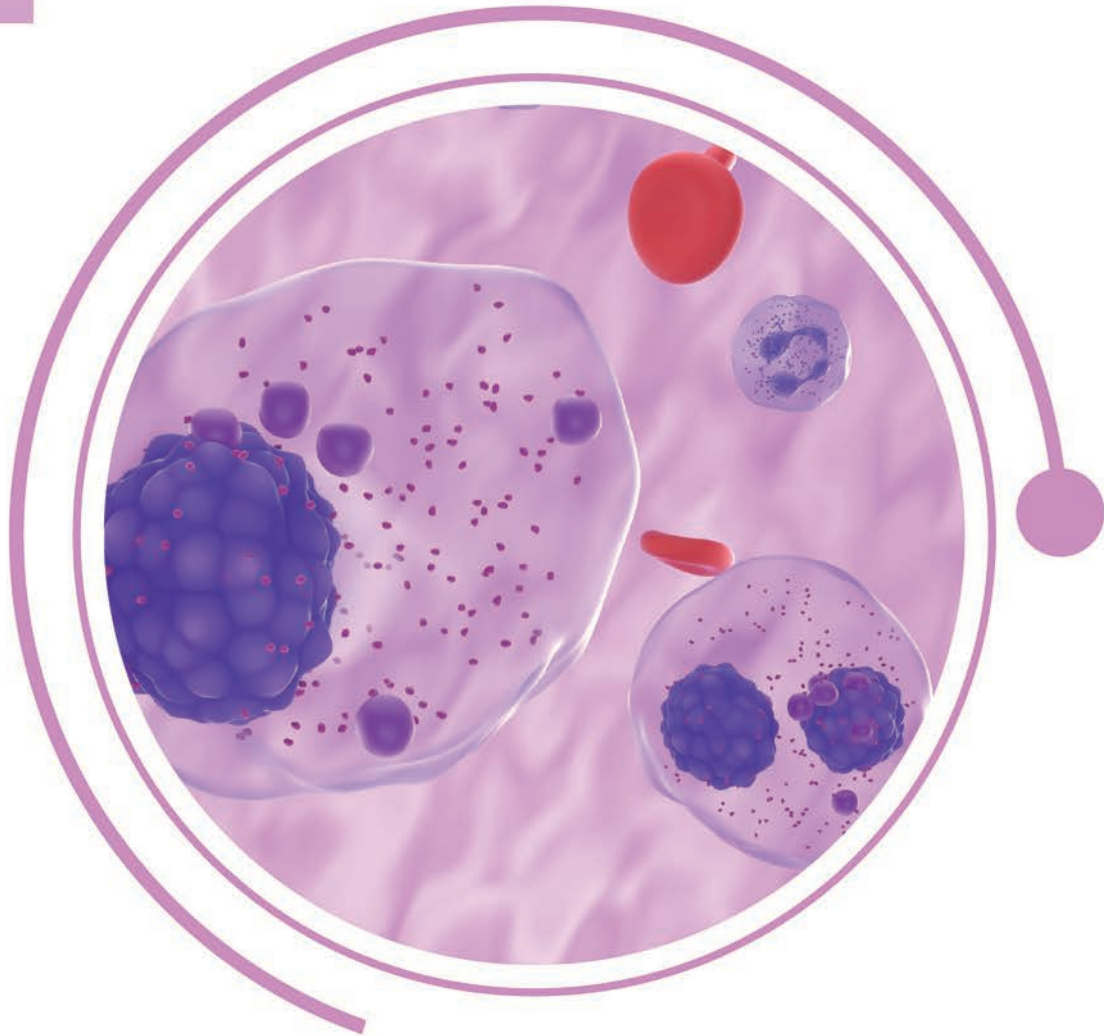
# ddPCR

 **다우 바이오메디카**  
DOW BIOMEDICA

**BIO-RAD**

eNewsletter book





# ddPCR

## eNewsletter

2019

PCR의 한계를 넘어선 임상 연구용 검사 플랫폼  
Droplet Digital™ PCR System

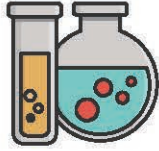


# ddPCR 연구 사례 소개

## CML 환자 대상 BCR-ABL1 MRD 검출

- Standard Curve 없는 절대 정량 측정
- 기존 검사 대비 약 1,000배 가량 더 민감

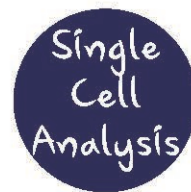




## Bio-Rad ddPCR™ System



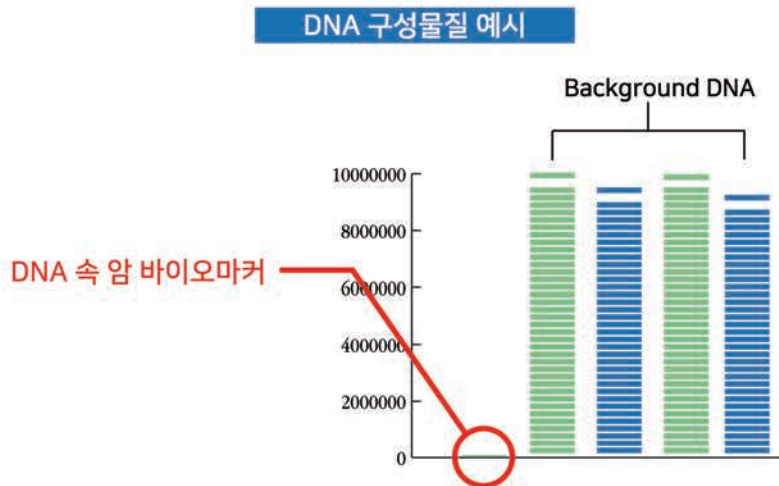
### 다양한 임상 연구 분야 활용성





## 암관련 바이오마커 정량분석

ddPCR 은 기존 검사 방법에서 제시하는 민감도 수치를 뛰어넘는 암 바이오마커 절대 정량 결과값을 제공합니다. 이를 통해 정상 DNA 와 변이 DNA 의 미세한 정량적 차이를 확인할 수 있고, 이 차이가 암에 미치는 잠재적인 영향을 확인할 수 있습니다. 그러나 암에 관련된 변이는 DNA 안의 다른 구성물질보다 낮은 농도로 존재하는 경우가 있어 검출이 쉽지 않았습니다.

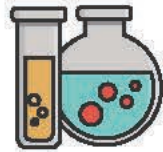


ddPCR™ System 은 1,000,000 카피 중 1 카피 만큼의 낮은 농도에도 바이오마커 수치를 정량화 할 수 있습니다. 이는 qPCR 과 대략 1,000배 가량 차이 나는 수치입니다.

ddPCR™ System 은 BRAF V600E 변이를 대상으로 한 TaqMan 프로브를 사용한 이중 PCR 반응에서 입증되었듯이 0.001%의 돌연변이 분율을 탐지할 수 있다. 이 검출 한계는 qPCR 보다 1,000배 이상 낮다.

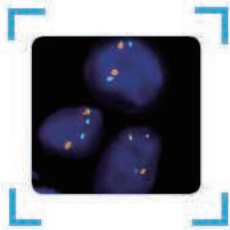
Frank Biozouam. Digital PCR: Improving Nucleic Acid Quantification. Genetic Engineering & Biotechnology News. Vol32, No. 9 (2012)

또한 MRD를 위해서는 정확한 CNV 측정이 필요합니다. 예후 예측, 치료 효과 모니터링에 표준 곡선 없이 정확한 Real 1 Copy, CNV 를 측정하는 것이 도움이 될 수 있습니다.



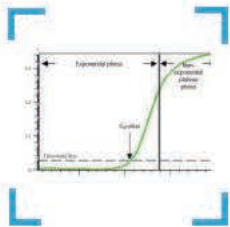
## BCR-ABL 1 검사법

### FISH



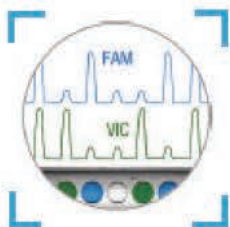
염색체 검사보다 더 예민하게 BCR-ABL 확인가능  
세포의 형태까지 어느정도 관찰할 수 있음  
MRD 측정은 불가능

### qPCR

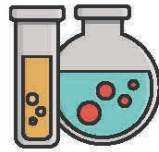


현재 MRD 검사에 가장 널리 사용됨  
 $10^{-5}$ 의 검출한계  
정량값을 위해 Standard Curve 가 필요

### ddPCR



$10^{-7}$ 의 검출한계  
Standard Curve 없는 절대정량값 도출  
Real 1 Copy 측정 가능



## 관련 논문 소개

[www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)

Oncotarget, 2018, Vol. 9, (No. 13), pp: 10978-10986

Research Paper

### Genomic BCR-ABL1 breakpoint characterization by a multi-strategy approach for “personalized monitoring” of residual disease in chronic myeloid leukemia patients

Cosimo Cumbo<sup>1,\*</sup>, Luciana Impera<sup>1,\*</sup>, Crescenzo Francesco Minervini<sup>1</sup>, Paola Orsini<sup>1</sup>, Luisa Anelli<sup>1</sup>, Antonella Zagaria<sup>1</sup>, Nicoletta Coccaro<sup>1</sup>, Giuseppina Tota<sup>1</sup>, Angela Minervini<sup>1</sup>, Paola Casieri<sup>1</sup>, Claudia Brunetti<sup>1</sup>, Antonella Russo Rossi<sup>1</sup>, Elisa Parciante<sup>1</sup>, Giorgina Specchia<sup>1</sup> and Francesco Albano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Emergency and Organ Transplantation, Hematology Section, University of Bari, 70124 Bari, Italy

\*These authors contributed equally to this work

### RT-qPCR 검사의 한계점

반복되는 염기서열이 많은 genome 영역의 타겟 검출의 기술적인 문제

환자별 프로브 검사의 표준 물질 필요

극복

NGS

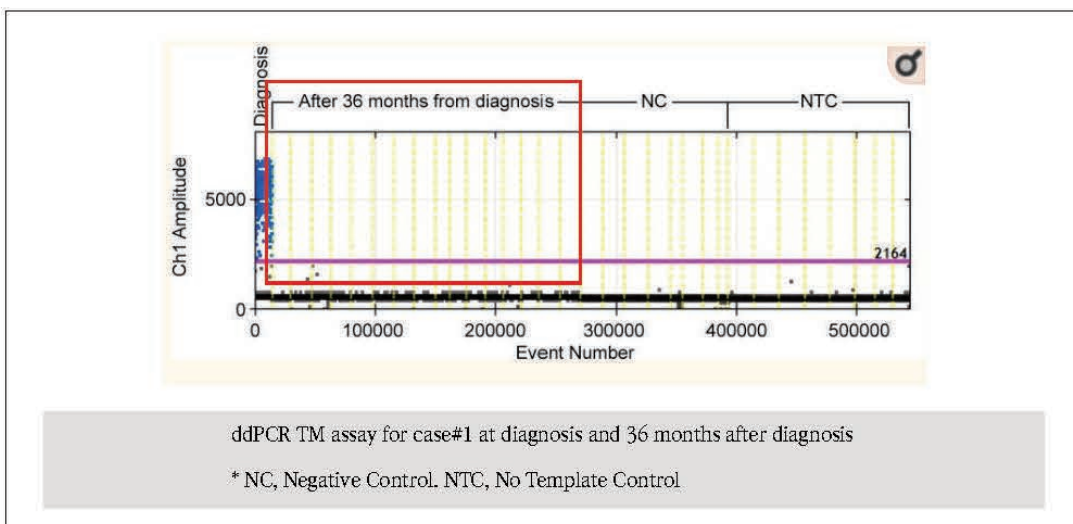
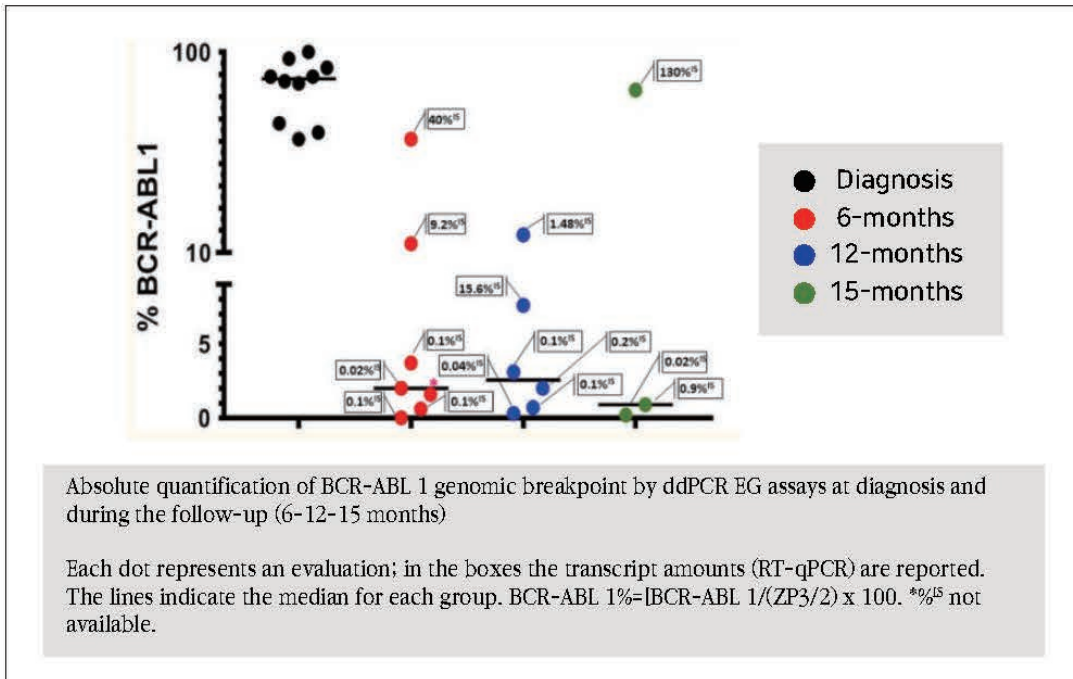
극복

ddPCR



### TKI 치료를 받고 있는 CML 환자 대상 치료 경과 모니터링 결과

치료 경과 3, 6, 15개월차에 모니터링 검사 결과 RT-qPCR 0.1% 이하는 ddPCR 에서 CNV 4 이하로 측정되었고, RT-qPCR 에서 1% 이상은 ddPCR 에서 CNV 7 이상으로 측정되었습니다. 이 중 ddPCR 결과값이 4.5 인 환자를 약 36개월간 추적 관찰한 결과 BCR-ABL1 유전자가 검출되지 않았습니다.



이 과정에서 ddPCR 분석은 CNV를 직접적으로 측정할 수 있으며, 보다 높은 정밀도와 재현성을 제공하며, 수행하기 쉽고, 반복 분석이나 표준화를 위한 표준 곡선 생성이 필요하지 않습니다.

이 연구를 통해 매우 낮은 수준의 잔류 질환을 정량화하기 위한 DNA 기반 ddPCR 접근법의 타당성을 설명하였으며, MRD를 검출하기 위한 접근법이 RT-qPCR 분석보다 더 민감하다고 결론 내렸습니다.



## 관련 논문 소개

### - TKI 치료 받는 CML 환자 모니터링

Indian J Hematol Blood Transfus (Apr-June 2018) 34(2):197-203  
<https://doi.org/10.1007/s12288-018-0933-1>



REVIEW ARTICLE

### Laboratory Monitoring of Chronic Myeloid Leukemia in Patients on Tyrosine Kinase Inhibitors

Richa Chauhan<sup>1</sup> · Sudha Sazawal<sup>1</sup> · H. P. Pati<sup>1</sup>

#### - 간단 요약 -

CML 은 TKI 치료 반응을 모니터링 하는 것이 중요합니다. 모니터링을 통해 TKI 치료 반응이 나쁜 환자, 좋은 환자, 심지어는 기능적 완치(free remission) 환자를 찾아내고자 합니다.

이 연구에서 사용된 ddPCR은 파티셔닝 된 각각의 드롭렛 안에서 타겟 DNA 의 하나 혹은 그 이상의 CNV를 절대 정량화합니다. End-Point PCR 결과를 분석하므로 결과에 PCR 효율이 미치는 영향이 줄어들고, 내부 표준 물질이나 Calibration Curve 에 대한 필요성 또한 줄어듭니다.

높은 민감도와 신뢰성으로 매우 낮은 농도의 BCR-ABL1 유전자를 확인할 수 있습니다. ddPCR 의 장점은 표준 물질이 필요하지 않다는 점과 Ct 값에 영향을 받지 않는다는 점입니다. 민감도가 매우 높기 때문에 심지어 환자 샘플 내의 BCR-ABL1 의 카피 하나(single copy)도 검출할 수 있습니다.



서울특별시 송파구 양산로 29 다우빌딩 2·3·5·6F  
Tel. 02-2201-3602 Fax. 02-2201-2166

E-mail [contact@dowbiomedica.co.kr](mailto:contact@dowbiomedica.co.kr)  
H.P [www.dowbiomedica.co.kr](http://www.dowbiomedica.co.kr)

PCR의 한계를 넘어선 임상 연구용 검사 플랫폼  
Droplet Digital™ PCR System

# ddPCR 연구 사례 소개

## NSCLC 환자 대상 EGFR T790M 변이 연구

- ctDNA 정량분석, 정확한 CNV 측정
- Background DNA 중 미량의 타겟 DNA 만을 검출



## 다양한 임상 연구 분야 활용성



### 혈액 속 미량의 ctDNA 검출

혈액 속의 ctDNA는 매우 미량이라 DNA 안의 다른 구성물질보다 낮은 농도로 존재하는 경우가 있어 검출이 쉽지 않았습니다. 그러나 ddPCR™은 1,000,000 카피 중 1 카피 만큼의 농도에도 바이오 마커 수치를 정량화 할 수 있습니다. qPCR 과 비교했을 때 약 1,000배 가량 차이는 수치입니다.



Frank Biazaum, Digital PCR: Improving Nucleic Acid Quantification, Genetic Engineering & Biotechnology News, Vol 32, No. 9 (2012)



### 관련 연구 논문 소개

<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.02.014>

Journal of Thoracic Oncology

#### Cell-Free Plasma DNA-Guided Treatment With Osimertinib in Patients With Advanced EGFR-Mutated NSCLC

Anna Buder, MSc, Maximilian J. Hochmair, MD, Sophia Schwab, Tatjana Bundalo, MD, Peter Schenk, MD, Peter Erhalt, MD, Romana E. Mikes, MD, Gudrun Absenger, MD, Kurt Patocka, MD, Bernhard Baumgartner, MD, Ulrike Setinek, MD, Otto C. Burghuber, MD, Helmut Prosch, MD, Robert Pirker, MD, Martin Filipits, PhD



### 연구 개요

EGFR T790M 검출을 위해 cfDNA의 임상 사용 가능 여부 확인

### 연구 대상

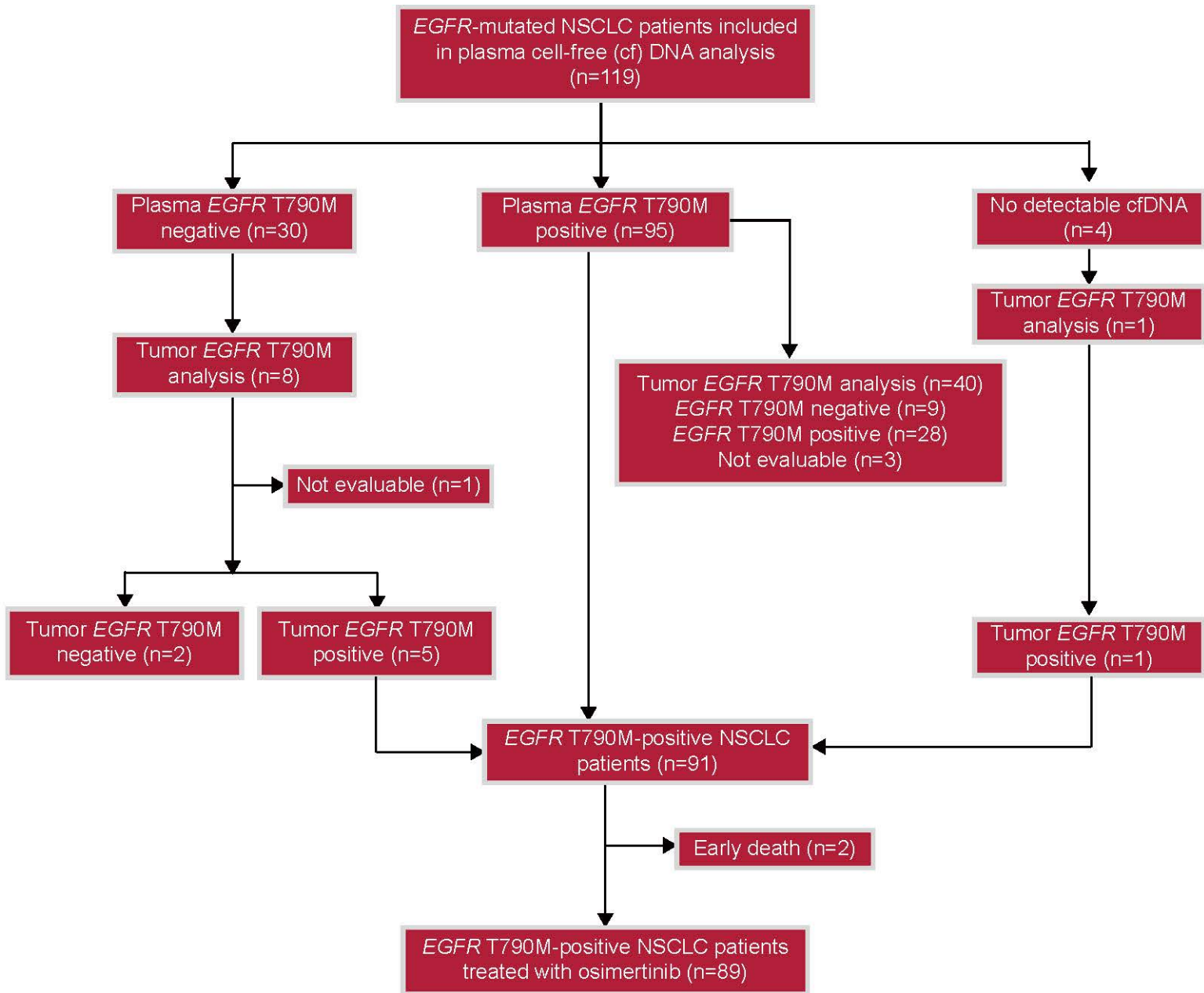


2015년 4월 - 2016년 11월  
EGFR-TKI 치료를 받은  
진행성 EGFR 변이 LSCLC 환자 119명



EGFR T790M 변이  
ddPCR 로 확인

### Osimertinib 처방 환자 결정과정



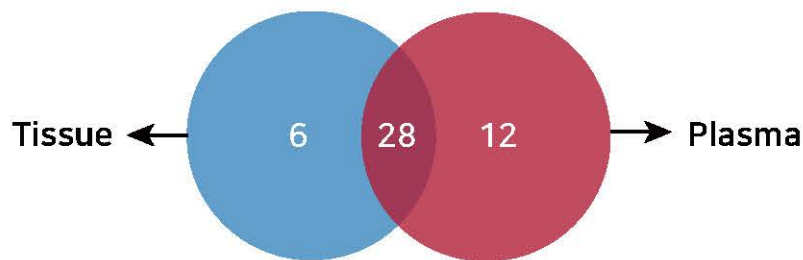
## EGFR T790M 변이의 검출

종양 재검사 환자 49명 대상 혈장, 조직 검사 결과

Plasma, n	Tissue, n		
	Positive	Negative	Not evaluable
Positive	28	9	3
Negative	5	2	1
Not evaluable	1	0	0

\* 혈장 분석 결과와 별개로 주치의가 결정한 환자군

각 검사에서 T790M 변이가 검출된 환자의 수



\* 혈장이나 조직검사로 T790M 양성인 환자가 밝혀지지 않은 3가지 경우는 제외

T790M 양성 환자 91명 중 89명이 osimertinib를 처방 받았습니다. PFS는 10.1개월(95% CI 8.1-12.1)이었습니다. Median survival에 도달하지 못했고, 1년 생존율은 64%였습니다. 치료 목적 개체군에서 T790M 양성 환자(n=91)의 response rate(RR)는 70%였습니다.

T790M copy number가 높은 환자( $\geq 10$  copies/mL)에 비해 낮은 T790M copy number( $< 10$  copies/mL)의 경우 PFS가 더 긴 것으로 추이되었습니다(hazard ratio [HR] for PFS 1.72, 95% confidence interval [CI] 0.92-3.2,  $p=0.09$ ). 전반적인 생존률에 대해 비교 가능한 추세가 관찰되었습니다(HR for OS 2.16, 95% CI 0.89-5.25,  $p=0.09$ ). T790M copy number에 따라 RR의 차이가 관찰되지 않았습니다.

...

결론적으로 혈장 음성의 경우 종양 조직 분석에서 T790M 검출에 ddPCR을 이용한 혈장 분석을 사용하는 것은 osimertinib 치료를 위한 EGFR 변이 NSCLC 환자를 선정하는데 임상적으로 유용합니다.





## 관련 논문 소개

# SCIENTIFIC REPORTS

**OPEN**

Received: 8 May 2017  
Accepted: 15 December 2017  
Published online: 11 January 2018

## Droplet digital PCR-based *EGFR* mutation detection with an internal quality control index to determine the quality of DNA

Sung-Su Kim<sup>1,2</sup>, Hyun-Jeung Choi<sup>1,3</sup>, Jin Ju Kim<sup>1,3</sup>, M. Sun Kim<sup>4</sup>, In-Seon Lee<sup>5</sup>, Bohyun Byun<sup>6</sup>, Lina Jia<sup>7</sup>, Myung Ryuri Oh<sup>8</sup>, Youngho Moon<sup>9</sup>, Sarah Park<sup>1</sup>, Joon-Seok Choi<sup>1</sup>, Seoung Wan Chae<sup>1</sup>, Byung-Ho Nam<sup>1</sup>, Jin-Soo Kim<sup>10</sup>, Jihun Kim<sup>11</sup>, Byung Soh Min<sup>12</sup>, Jae Seok Lee<sup>13</sup>, Jae-Kyung Won<sup>14</sup>, Soo Youn Cho<sup>15</sup>, Yoon-La Choi<sup>16</sup> & Young Kee Shin<sup>1,17</sup>

중개 연구와 체외 진단 분야에서 유전적 돌연변이 검출의 주요 난제는 저품질의 FFPE-DNA (formalin-fixed paraffin-embedded tissue-derived DNA)에 의한 결과를 극복하는 것입니다. 이 연구에서는 PCR 기반 분석에 대한 DNA 최소 품질을 판단하기 위한 기준으로 '내부 품질 관리 지수(iQC)'를 사용할 것을 제안합니다. EGFR 돌연변이 테스트 (ddEGFR 테스트)와 qPCR 기반 EGFR 돌연변이 테스트 (cobas EGFR 테스트)의 결과를 비교 한 전임 연구에서 iQC 지수는 0.5 이상 (iQC는 500 이상, 3.3 ng의 FFPE 사용) -DNA)이 확립되어 입력 DNA의 절반 이상이 증폭 될 수 있음을 나타냅니다.

이 기준을 사용하여 비소세포 폐암 (NSCLC) FFPE-DNA 샘플에서 EGFR 변이 검출을 위한 ddEGFR 및 cobas EGFR 테스트의 후향적 비교 임상 연구를 수행했습니다. cobas EGFR 테스트와 비교하여, ddEGFR 테스트는 무수한 분석 성능 및 동등 이상의 임상 성능을 나타냈습니다. 또한 iQC 지수는 FFPE-DNA 품질의 신뢰할 수 있는 지표이며 저품질 샘플로 인한 잘못된 진단을 방지하는 데 사용될 수 있습니다.

## 진단검사의학회 ddPCR 임상적용 심포지움 안내



2019년 대한진단검사의학회 춘계심포지움 중 1일차에 ddPCR 의 임상적용 관련 심포지움이 진행될 예정입니다. 관심 있는 선생님들의 많은 참여를 부탁드립니다.

<b>일시</b>	2019년 4월 11일 (목) 14:30 - 16:00	
<b>장소</b>	강의실 1	
<b>연제</b>	Digital PCR 의 개요 및 적용	공선영 (국림암센터)
	Digital PCR 기반 신장 이식 거부반응의 비침습적 모니터링	이상호 (경희의대)
	Digital PCR 의 정도관리와 Troubleshooting	박정선 (메스디 지노믹스)



서울특별시 송파구 양산로 29 다우빌딩 2·3·5·6F  
Tel. 02-2201-3602 Fax. 02-2201-2166

E-mail [contact@dowbiomedica.co.kr](mailto:contact@dowbiomedica.co.kr)  
H, P [www.dowbiomedica.co.kr](http://www.dowbiomedica.co.kr)

PCR의 한계를 넘어선 임상 연구용 검사 플랫폼  
Droplet Digital™ PCR System

# ddPCR 연구 사례 소개

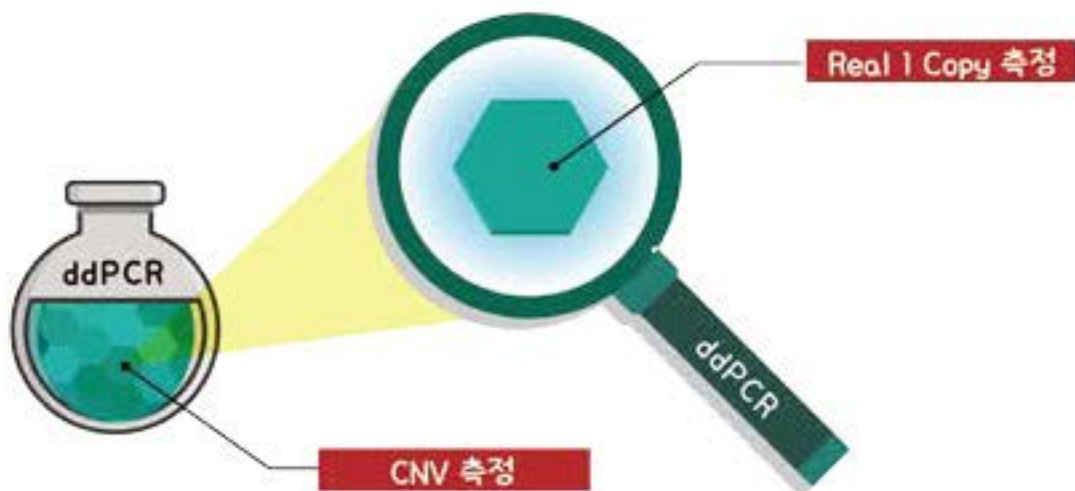
## KRAS exon 변이와 CNV 탐지, 정량화 방법 제시

- ctDNA 정량분석, 변이 확인 및 정도 예측
- KRAS 검사방법 표준화의 필요성



## Copy Number Variation

기본적으로 Copy Number가 증가하면 타겟 DNA의 비율이 감소하여 타겟 DNA 상태를 측정하기가 어려워집니다. ddPCR 시스템은 PCR 증폭 반응을 수만 개의 드롭렛으로 분할하여 측정하므로 높은 수준의 통계 신뢰도로 Copy number 상태를 확인할 수 있습니다. 정확한 Copy Number 측정, Real 1 Copy 측정이 가능합니다.





관련 연구 논문 소개

<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2018.09.007>

The Journal of Molecular Diagnostics

A Novel Multiplex Droplet Digital PCR Assay to Identify and Quantify *KRAS* Mutations in Clinical Specimens

Miquel Alcalde\*, Matthew Cheung\*, Kevin Bushell\*, Sarah E. Arthur\*, Hui-Li Wong†, Joanna Karasinska†, Daniel Renouf†, David F. Schaeffer†, Suzan McNamara‡, Mathilde Couetoux du Tertre‡, Gerald Batist‡, Hagen F. Kennecke§, Aly Karsan¶, Ryan D. Morin\*\*✉

KRAS 검사의 현상황



연구 검체



총 100개의 검체

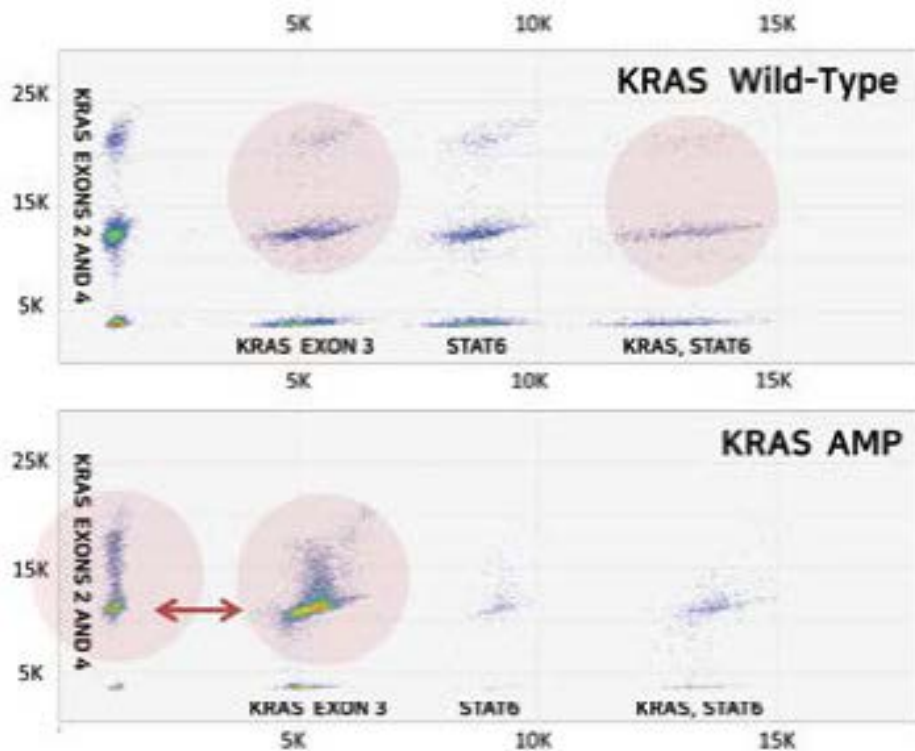
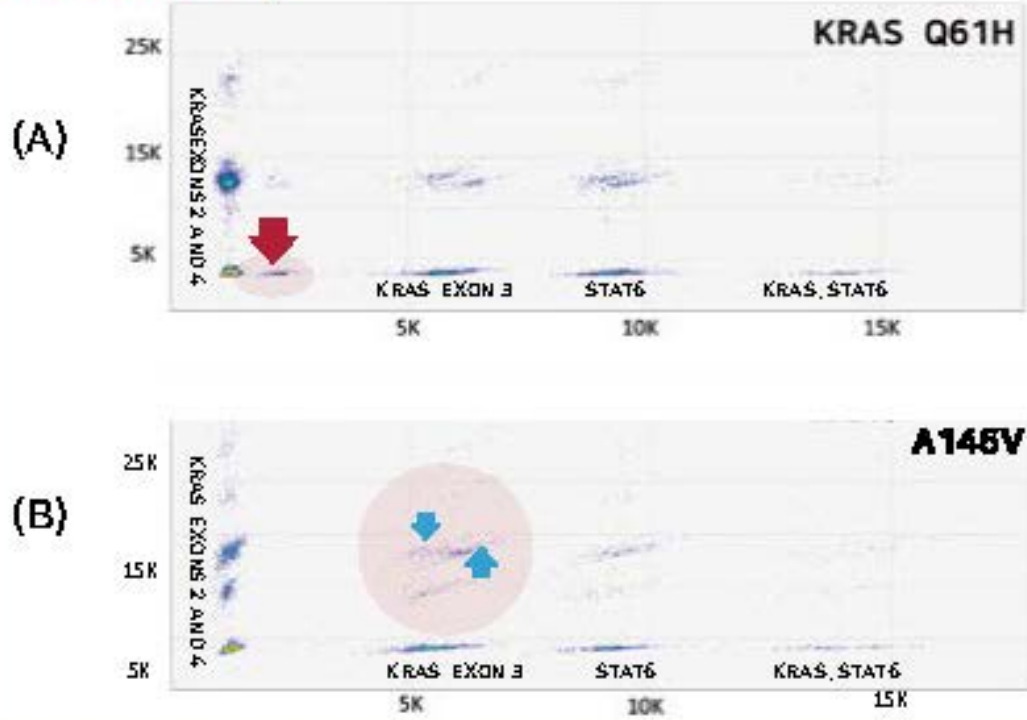
KRAS 유전자 13개의 변이와 증폭을 확인

G12D, G12V, G12R, G12A, G12C, G12D, G13D, Q61H, Q61L, G60V, A146V, A146T, A146V



# KRAS 변이 확인

검사 결과창 일부 예시



wild-type 음성 대조군에서는 관찰되지 않는 KRAS 변이 샘플의 추가적인 형광 클러스터의 출현은 다량의 변이의 존재를 나타냅니다(A, 빨간 화살표).

파란색 화살표(B)로 표시된 두 클러스터 내의 불균형은 변이가 exon 2 또는 exon 4와 관련이 있는지를 밝히는데 도움이 됩니다.

▶ 상부 클러스터 결손 : exon 4 변이 / 하부 클러스터 결손 : exon 2 변이

이 분석은 KRAS 유전자 (exon 3)와 chromosome 12에 위치한 다른유전자 (STAT6)에 양성인 드롭렛 수에 대한 양성 드롭렛 수 사이의 높은 불균형을 발견함으로써 국소 KRAS 증폭 (AMP 적색화살표)을 검출할 수 있습니다.





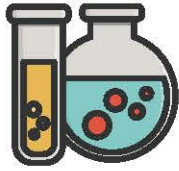
## KRAS 변이 검출에 ddPCR의 역할

변이 상태가 알려진 검체에 **Multiplex ddPCR 검사**를 통해 **13개의 KRAS 지점 변이를 활성화 시키는 KRAS 증폭의 명확한 사례를 검증**하였습니다. KRAS 변이의 존재는 Wild-type KRAS 샘플이나 일반적인(commercial) 인간 DNA 음성 대조군에서 발견되지 않았던 형광 반응클러스터들의 출현과 관련이 있었습니다.

KRAS 유전자의 exon 2, 3, 4에 위치하는 변이 핫스팟을 대상으로 한 **Multiplex ddPCR**은 다중 **활성화 지점의 변이 및 focal KRAS amplification** 과 **정량화**를 가능하게 합니다.

... 종략 ...

이 검사는 KRAS 변이를 운반하는 생체검사 샘플의 순도를 추론하는 데 **빠르고 비용 효율적인 수단**이 될 것이며, 순환 종양 DNA(circulating tumor DNA)의 **비침습적 연속 모니터링에 활용하여 임상 반응을 평가하거나 조기 재발 징후를 검출**할 수 있을 것입니다.



## KRAS, NRAS, BRAF 검사법의 한계 극복

Analysis of KRAS, NRAS and BRAF mutational profile by combination of in-tube hybridization and universal tag-microarray in tumor tissue and plasma of colorectal cancer patients

[Francesco Damio](#), Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing,<sup>#1,\*</sup> [Silvia Galbiati](#), Investigation, Methodology, Validation, Writing – review & editing,<sup>#2</sup> [Nadia Soriani](#), Validation, Visualization,<sup>2</sup> [Valentina Burgio](#), Validation, Visualization,<sup>3</sup> [Monica Ronzoni](#), Validation, Visualization,<sup>3</sup> [Maurizio Ferrari](#), Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing – review & editing,<sup>2,4,5</sup> and [Marcella Ghiani](#), Conceptualization, Investigation, Methodology, Supervision, Writing – review & editing<sup>1</sup>

Surinder K. Batra, Editor

이 연구는 현재의 마이크로어레이 검사의 민감성과 특이성을 극복하고, 조직 생검에서 진단과 관련있는 암 유전자의 변이(KRAS, NRAS, BRAF)의 multiplex 검출을 위한 빠르고 민감한 마이크로어레이 분석을 도입하기 위해 설계되었습니다.

... 중략 ...

ddPCR 검사법을 사용하여 KRAS, NRAS 및 BRAF 유전자에서 가장 흔한 변이를 확인한 결과 전이성 대장암 환자의 조직 생검과 혈장 검체에서 변이가 90분 이내에 검출되었습니다. 게다가 이 검사방법으로 전체 DNA의 0.3% 미만으로 존재하는 변이 대립 유전자를 밝혀냈습니다. 우리는 액체 생검을 활용한 KRAS, BRAF 유전자의 superfamily 변이 검출에 현재 다른 기술들이 제공하는 것보다 우수한 검출 한계를 증명했습니다.



서울특별시 송파구 양산로 29 다우빌딩 2·3·5·6F  
Tel, 02-2201-3602 Fax, 02-2201-2166

E-mail [contact@dowbiomedica.co.kr](mailto:contact@dowbiomedica.co.kr)  
H.P [www.dowbiomedica.co.kr](http://www.dowbiomedica.co.kr)

PCR의 한계를 넘어선 임상 연구용 검사 플랫폼  
Droplet Digital™ PCR System



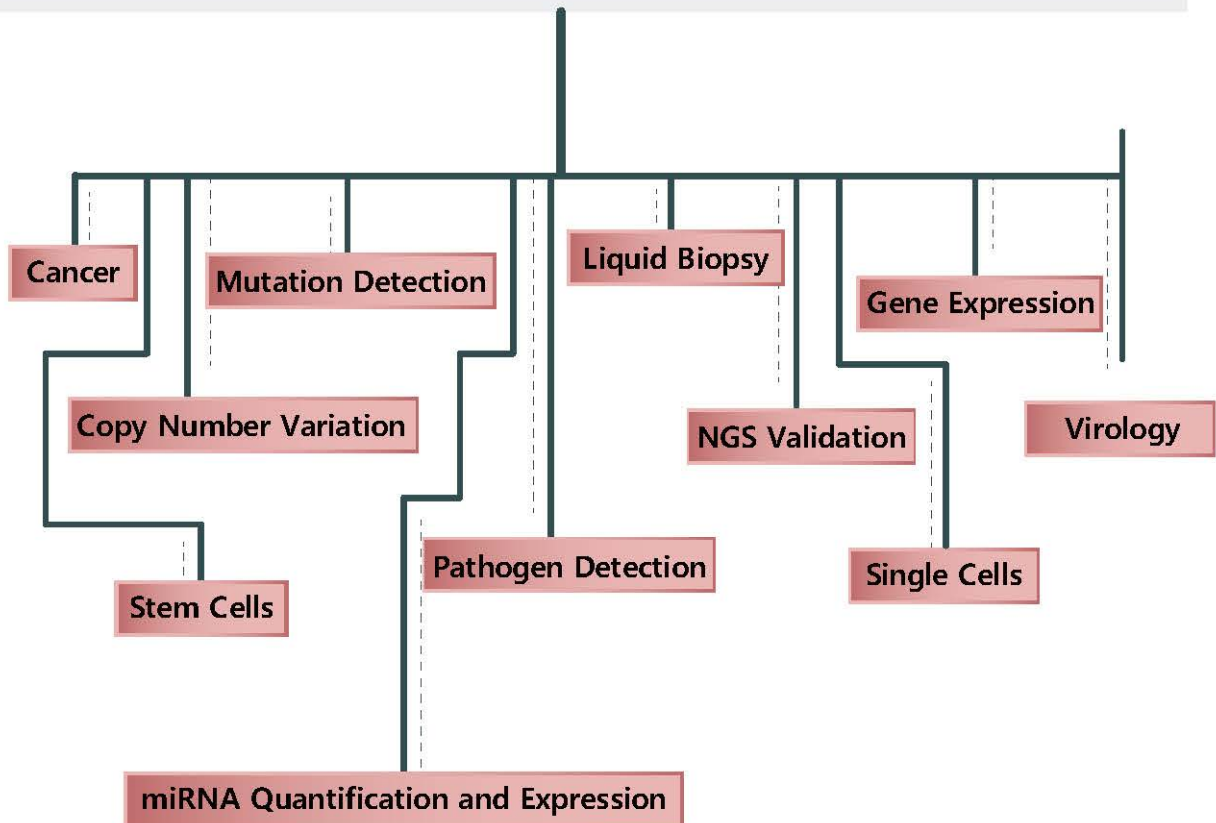
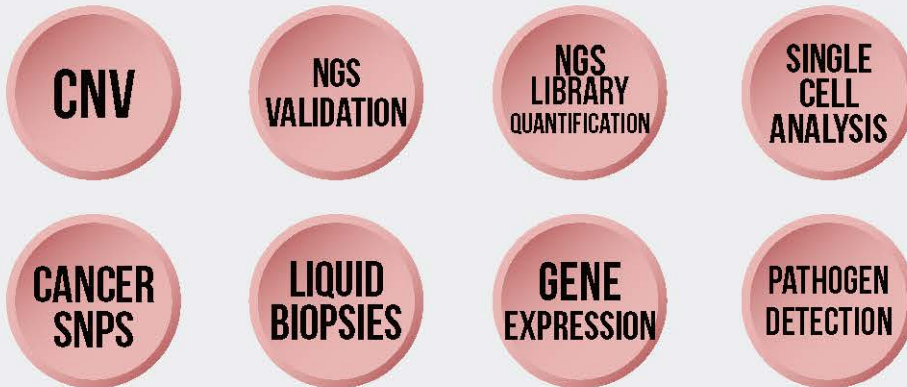
# ddPCR 연구 사례 소개

## 방광암 환자 대상 tumor DNA, cfDNA 검사 비교

- NGS 검사법과 일치도 92%, 높은 등급 종양 환자 대상 100% 일치도 보여
- ddPCR 검사, 방광암 환자 대상 모니터링 검사로 유용



### 다양한 임상 연구 분야 활용성





관련 연구 논문 소개

DOI 10.3233/BLC-170152

Bladder Cancer 4 (2018) 41-48

Bladder Cancer 4 (2018) 41 - 48  
DOI 10.3233/BLC-170152  
IOS Press

Research Report

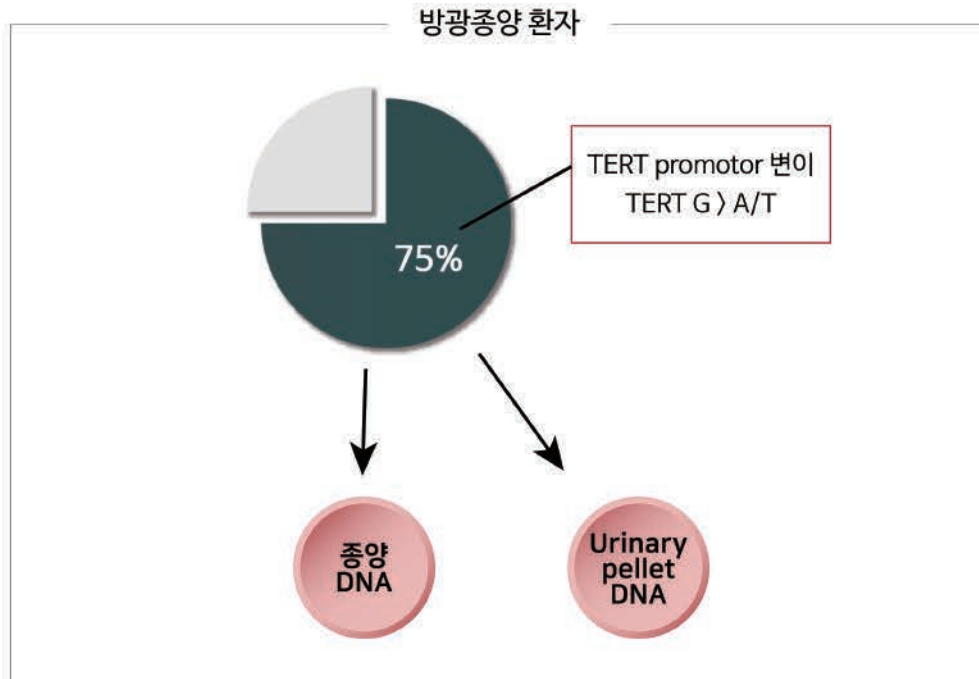
Toward Personalised Liquid Biopsies for Urothelial Carcinoma: Characterisation of ddPCR and Urinary cfDNA for the Detection of the TERT228 G>A/T Mutation

Ilaria J. Russo<sup>a,1</sup>, Yongwon Ju<sup>a,1</sup>, Naheema S. Gordon<sup>a,1</sup>, Maurice P. Zeeger<sup>§</sup>, K.K. Cheng<sup>‡</sup>, Nicholas D. James<sup>§</sup>, Richard T. Bryant<sup>a,2</sup> and Douglas G. Ward<sup>a,2,✉</sup>

<sup>a</sup>Institute of Cancer and Genomic Sciences, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Birmingham, UK

<sup>b</sup>NUTRIM School for Nutrition and Translational Research in Metabolism, Maastricht University, Maastricht, the Netherlands

<sup>c</sup>Institute of Applied Health Research, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Birmingham, UK



Urinary pellet DNA → 매우 낮은 변이 allele frequencies → 수치가 너무 낮아 기존 연구에서 해왔던 반정량적 검사 방법 부적합



### 연구 방법

TERT 변이를 가지고 있는  
방광암 환자 104명의  
Urinary cfDNA 분석

DNA 수를 세기 위해  
ddPCR 검사방법 사용

wild type DNA  
변이 TART 시퀀스 DNA  
검출

cfDNA와 종양 DNA 사이의 일치도 분석  
cfDNA와 pellet DNA 비교, cfDNA 양과 크기 분포 분석

방광암 단계, 등급에 걸친  
allele 등급 결정

종양 DNA  
NGS 방법으로 분석

Urinary cfDNA  
ddPCR로 분석

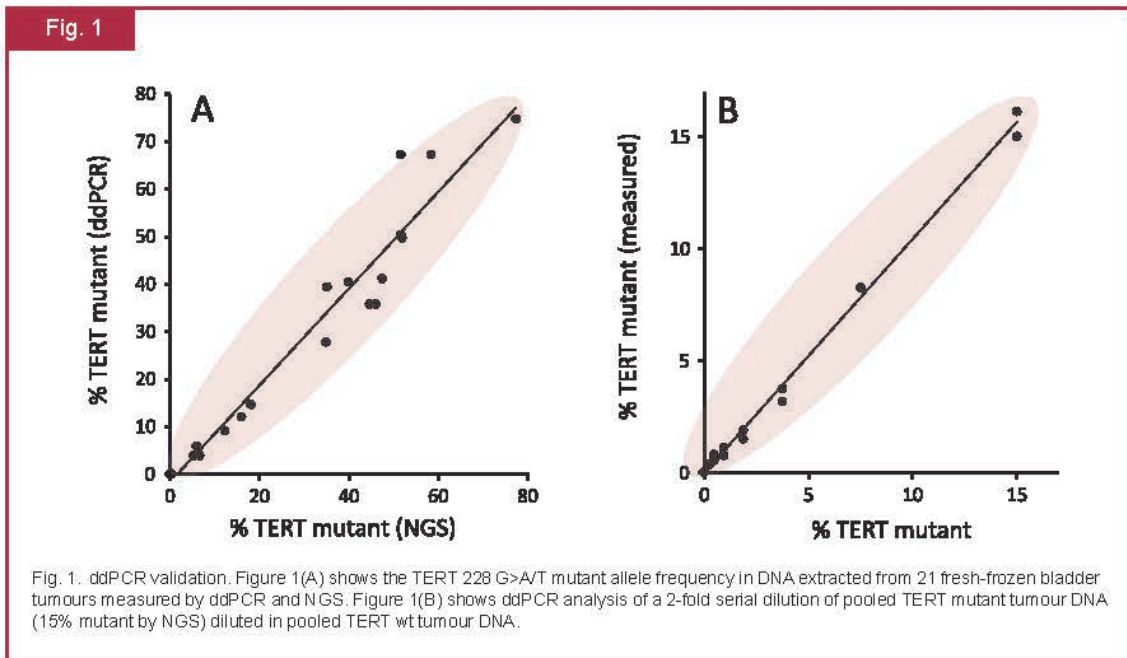
### Bio-Rad사의 Droplet Digital PCR



- Standard Curve 없는 완전 정량
- CNV 탐지 가능

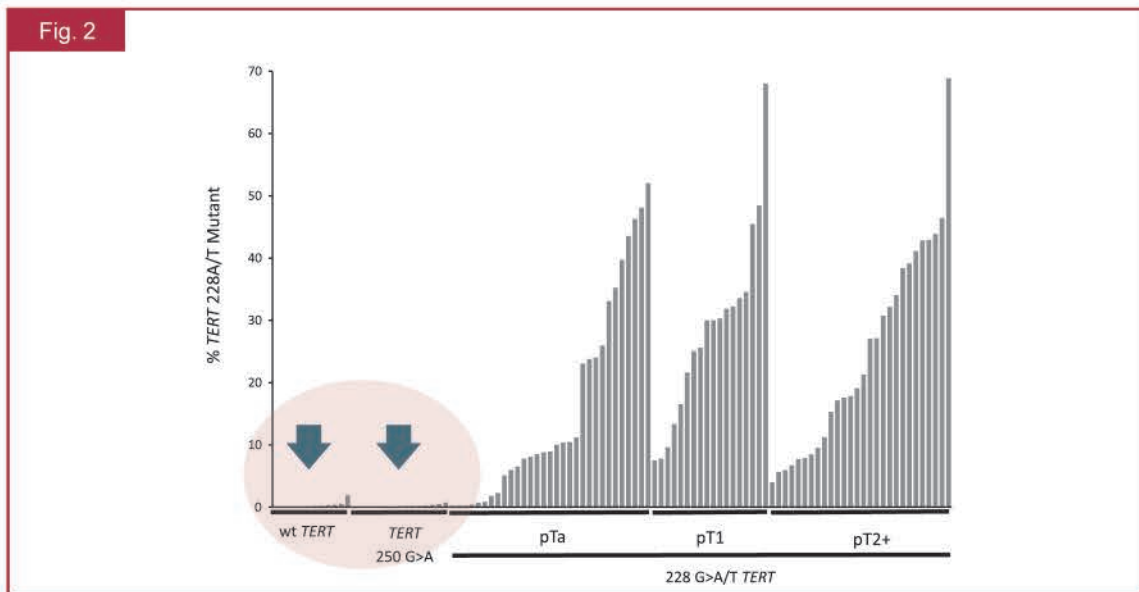


## Urinary cfDNA 에서 TERT 변이 확인



TERT promotor sequence 는 증폭이 어려워 21개의 fresh-frozen 종양에서 추출한 DNA 에서 ddPCR 과 NGS 로 발견한 TERT 변이 레벨을 비교했습니다. Fig 1A 와 같이 두 방법 사이의 높은 일치도가 관찰되었습니다. ddPCR 방법을 통해 일반적으로 검출하기 어려운 288 G > T 변이와 228 G > A 변이를 발견할 수 있었습니다. ddPCR 분석 방법은 serial dilution 검출에도 역시 효과적이었습니다. (Fig 1B))





NGS 로 종양 DNA 에서 TERT promotor sequence 변이가 확인된 104명의 환자의 소변 샘플에서 cfDNA 를 분석하기 위해 ddPCR 검사법이 사용되었습니다.

ddPCR 로 분석된 cfDNA 의 변이 allele frequency 는 (Fig 2) 228개의 변이에 음성을 나타낸 27명의 환자는 매우 적은 positive droplet 수를 보였고, 1% MAF(mutant allele frequench) threshold 를 정의할 수 있었습니다.

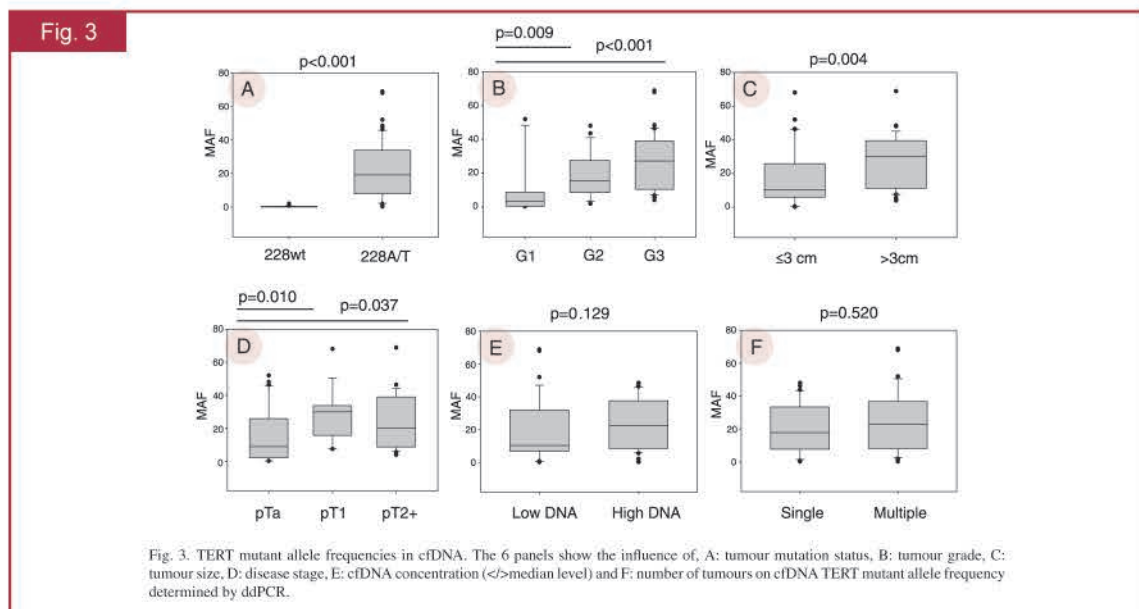


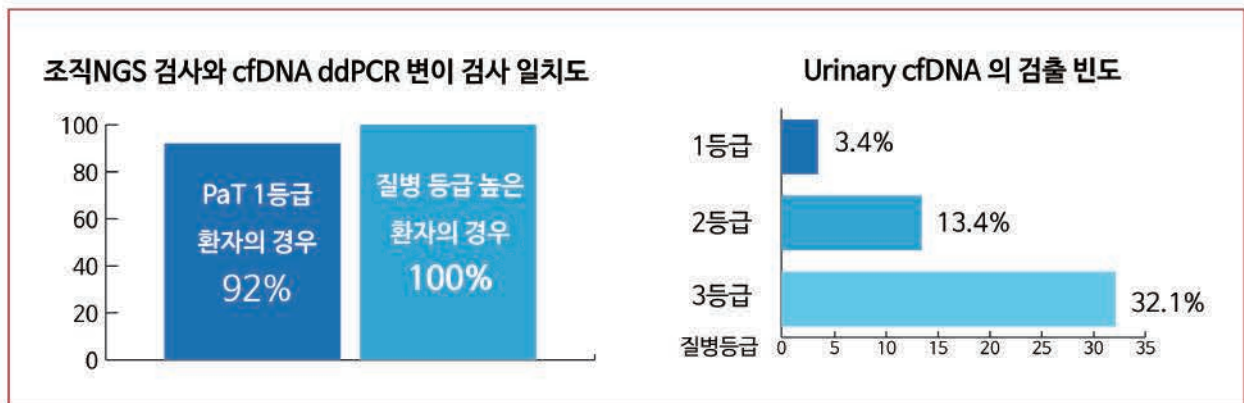
Fig. 3. TERT mutant allele frequencies in cfDNA. The 6 panels show the influence of, A: tumour mutation status, B: tumour grade, C: tumour size, D: disease stage, E: cfDNA concentration (</>median level) and F: number of tumours on cfDNA TERT mutant allele frequency determined by ddPCR.

NGS 로 확인된 TERT 228G>A/T 양성 종양 환자의 cfDNA 를 분석한 결과 77건 중 71건 (92%)이 양성으로 나타났습니다.

이 중 24/30 pTa tumours 양성 (80%), 모든 pT1(n=19), MIBC(n=27) 환자의 경우 양성으로 나타났습니다. 6명의 위음성 결과는 1등급의 pTa 질병 환자였고 높은 등급이나 단계의 환자에서는 위음성이 나오지 않았습니다(Fig. 3).



### TERT 변이 검출에 ddPCR 의 역할 - 변이 환자 모니터링 검사로 유용



조직과 cfDNA 변이 검사 결과의 일치도는 92% 이며, 질병 등급이 높은 환자의 경우 100% 였습니다. 중증 변이는 1, 2, 3급 질병에서 urinary cfDNA 의 검출 빈도가 각각 3.4, 13.4, 32.1% 로 나타났습니다.

종양 DNA 와 urinary cfDNA 의 일치도가 높으며, TERT 228 G>A/T 검사에서 ddPCR 검사는 이러한 변이를 가진 환자들을 모니터링 하는데 유용할 수 있습니다.



서울특별시 송파구 양산로 29 다우빌딩 2·3·5·6F  
Tel. 02-2201-3602 Fax. 02-2201-2166

E-mail [contact@dowbiomedica.co.kr](mailto:contact@dowbiomedica.co.kr)  
H.P [www.dowbiomedica.co.kr](http://www.dowbiomedica.co.kr)

PCR의 한계를 넘어선 임상 연구용 검사 플랫폼  
Droplet Digital™ PCR System



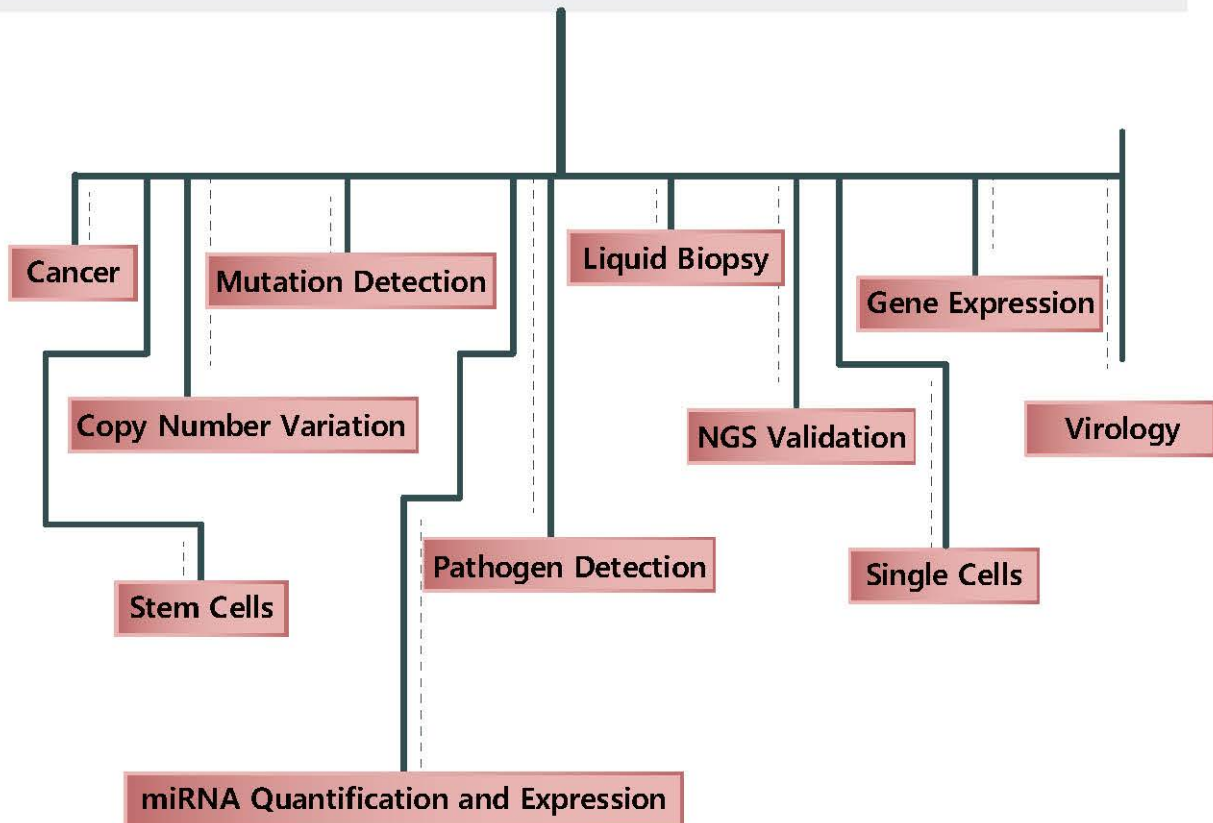
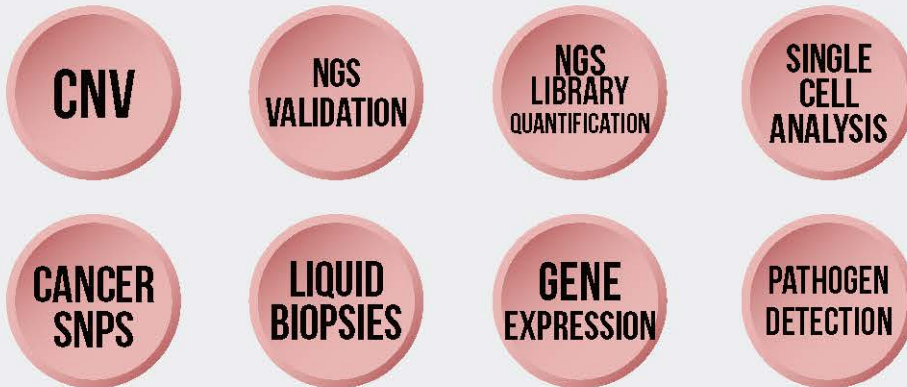
# ddPCR 연구 사례 소개

## BC 환자 대상 BRCA, HER2 유전자 검사 연구

- BRCA 검출을 위한 기존 검사법, ddPCR 검사법 비교 연구
- HER2 검출에 ddPCR+FISH / IHC+FISH 검사의 일치도 확인 연구



### 다양한 임상 연구 분야 활용성





### 연구 논문 소개

Clinical Chemistry 64:12  
300-000 (2018)

Molecular Diagnostics and Genetics

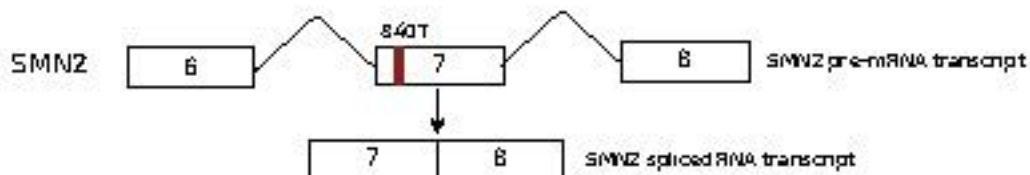
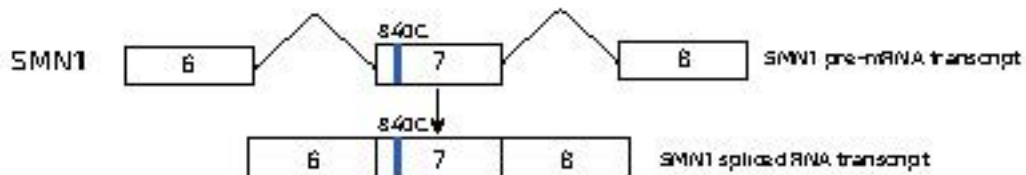
## Multiplex Droplet Digital PCR Method Applicable to Newborn Screening, Carrier Status, and Assessment of Spinal Muscular Atrophy

Noemi Vidal Felch,<sup>1</sup> Dimitar Gavrilov,<sup>1,2</sup> Kimyo Raymond,<sup>1,2</sup> Piero Rinaldo,<sup>1,2,3</sup> Silvia Tortorelli,<sup>1,2</sup> Dietrich Matern,<sup>1,2,3</sup> and Debra Ogilvie<sup>1,2\*</sup>

[논문 원본 보러가기 Click!](#)



### SMN gene Variants



불안정하고 기능 떨어지는 SMN Protein 생성



Spinal Muscular Atrophy



## 검사 대상

DBS  
1530명

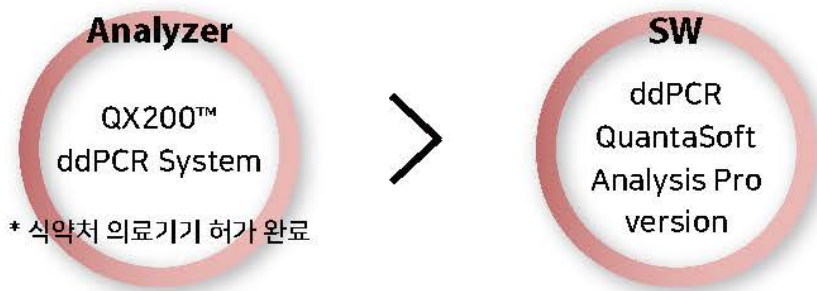
SMA  
12명

**Table 1.** Study sample demographics.<sup>a</sup>

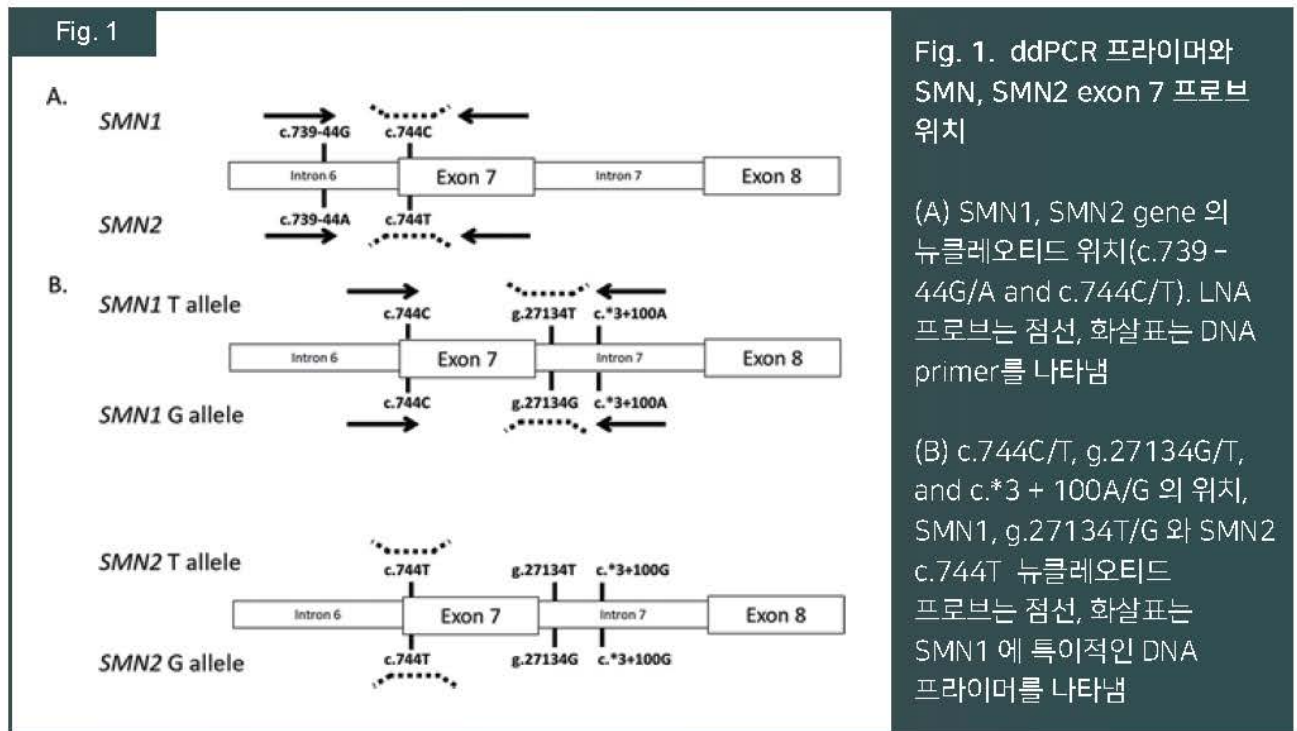
Cohort	Sex	Age at collection	Gestational age, weeks	Birth weight, g
Infants ≤7 days (n = 1388)	677 Females	0-7 days	23.4-42.1	600-6290
	711 Males	(1.2 days)	(39.1)	(3400)
Infants >7 days and adults (n = 142)	73 Females	8 days to 72.8 years	24.3-38	680-4387
	69 Males	(28 days)	(33.4)	(1630)
SMA-positive cases (n = 12)	6 Females	12 days to 38 years	NA <sup>b</sup>	NA
	6 Males	(77 days)		



### 검사 과정



### 프라이머 제작 과정

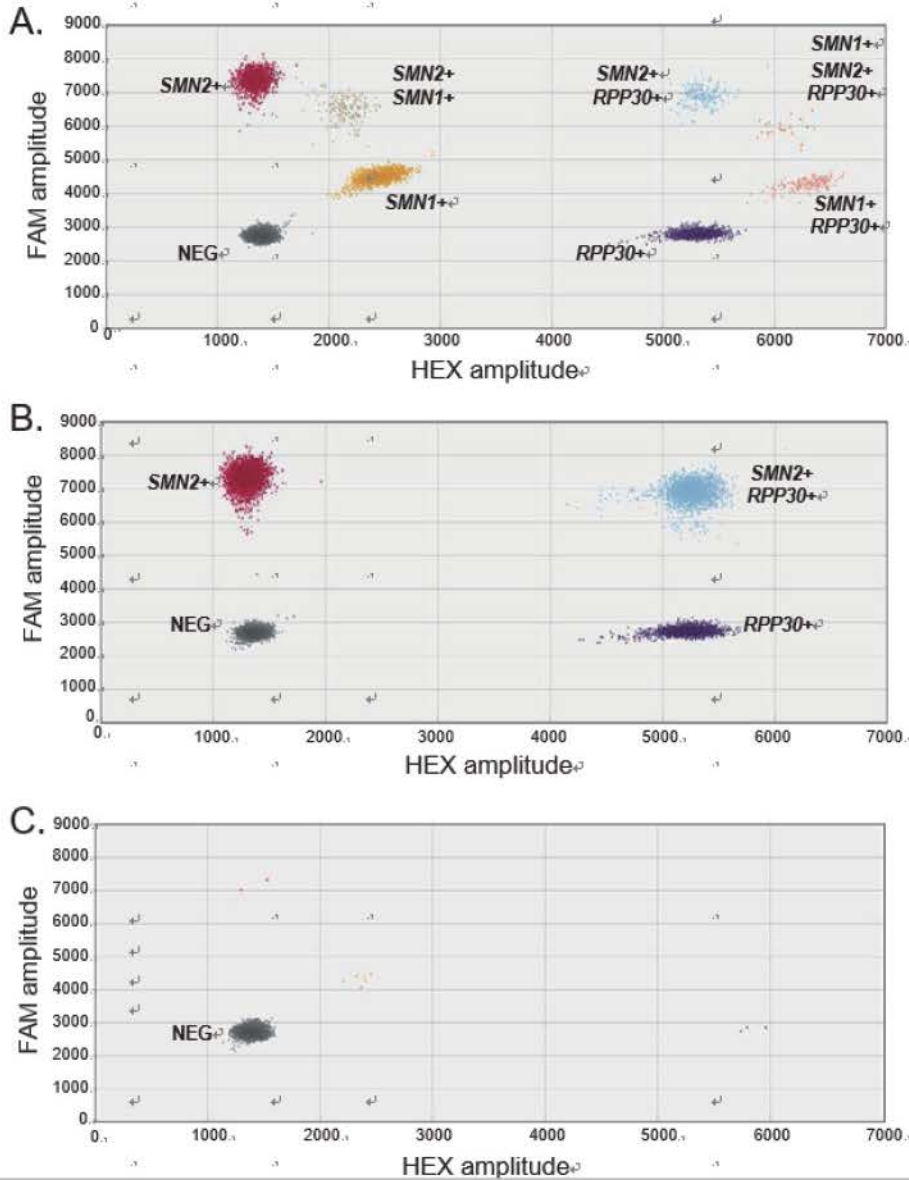






## 결과 분석

Fig. 2



ddPCR 결과를 Quanta-Soft SW 분석한 결과 double positive, triple positive 결과값 역시 확인이 가능했습니다. (Figure 2A)

SMA 양성 환자의 표본은 그림 2B에 표시된 것처럼 4 개의 cluster 만 생성했습니다. 이러한 클러스터는 SMN1 + droplet 이 없었기 때문에 음성 droplet, SMN2 +, RPP30 + 및 SMN2 + / RPP30 + droplet 으로 구성되었습니다. (Figure 2C). 반응 당 생성된 총 droplet 는 평균 15188 방울 (범위, 5179 ~21077)입니다.

ddPCR 은 CNV 감지 및 다른 변이를 확인하기 위한 강력한 플랫폼입니다. 이 연구에서 ddPCR 이 전혈 또는 배양 세포의 single DBS punch 에서 SMN1 exon7 과 SM2 CNV 를 측정할 수 있음을 성공적으로 증명했습니다. 동시에 측정된 internal control 인 RPP30 으로 반복된 테스트 없이 positive 결과값에 대한 신뢰를 획득했습니다. SMN1, SMN2 의 정량 측정을 위한 표준 곡선이 없다는 것이 이 검사법의 이점입니다. 우리는 이 연구를 통해 NBS 에 대한 새로운 접근 방법, 유전된 SMN1 변이에 대한 계층화된 접근법을 제안합니다.

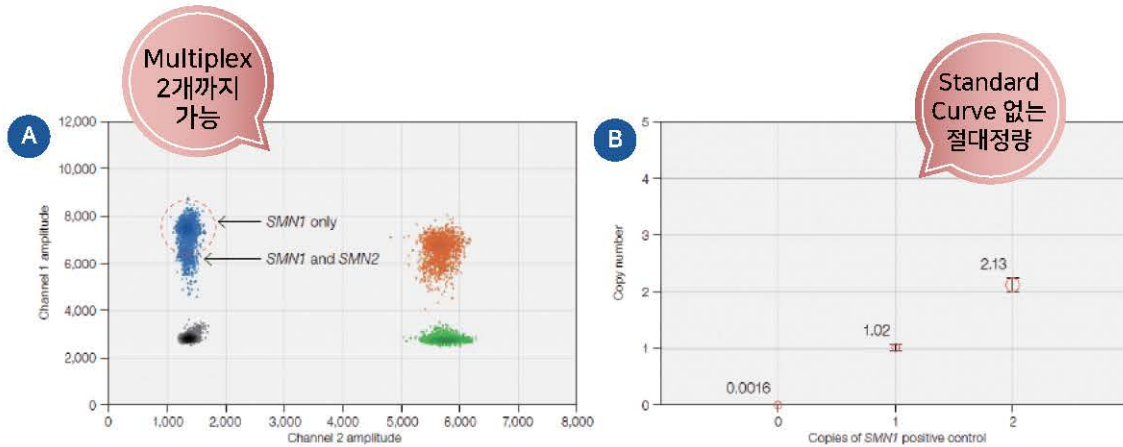
ddPCR 방법은 민감도 높고 구체적이며 SMA의 신생아 선별 및 진행 상태 결정에 도움을 줄 수 있습니다.

### SMA Copy Number Determination Kit Demo

SMN gene 을 간편하게 검사할 수 있는 SMN1, SMN2 copy number determination kit 가 출시되었습니다. Bio-Rad사의 QX100™, QX200™, or QX200™ AutoDG™ Droplet Digital PCR (ddPCR) System 과 호환됩니다.

### 정확하고 재현가능한 SMN CNV 측정

#### 결과 예시



**A : SMN Copu Number 측정** - 회색 클러스터는 Negative droplet 을 나타내고, 녹색 클러스터는 reference Positive droplet 을 나타냅니다. 빨간 동그라미 안의 파란 클러스터는 SMN1 (only) Positive droplet 클러스터이고, 오렌지 클러스터는 SMN1 과 reference 모두 Positive인 droplet 입니다.

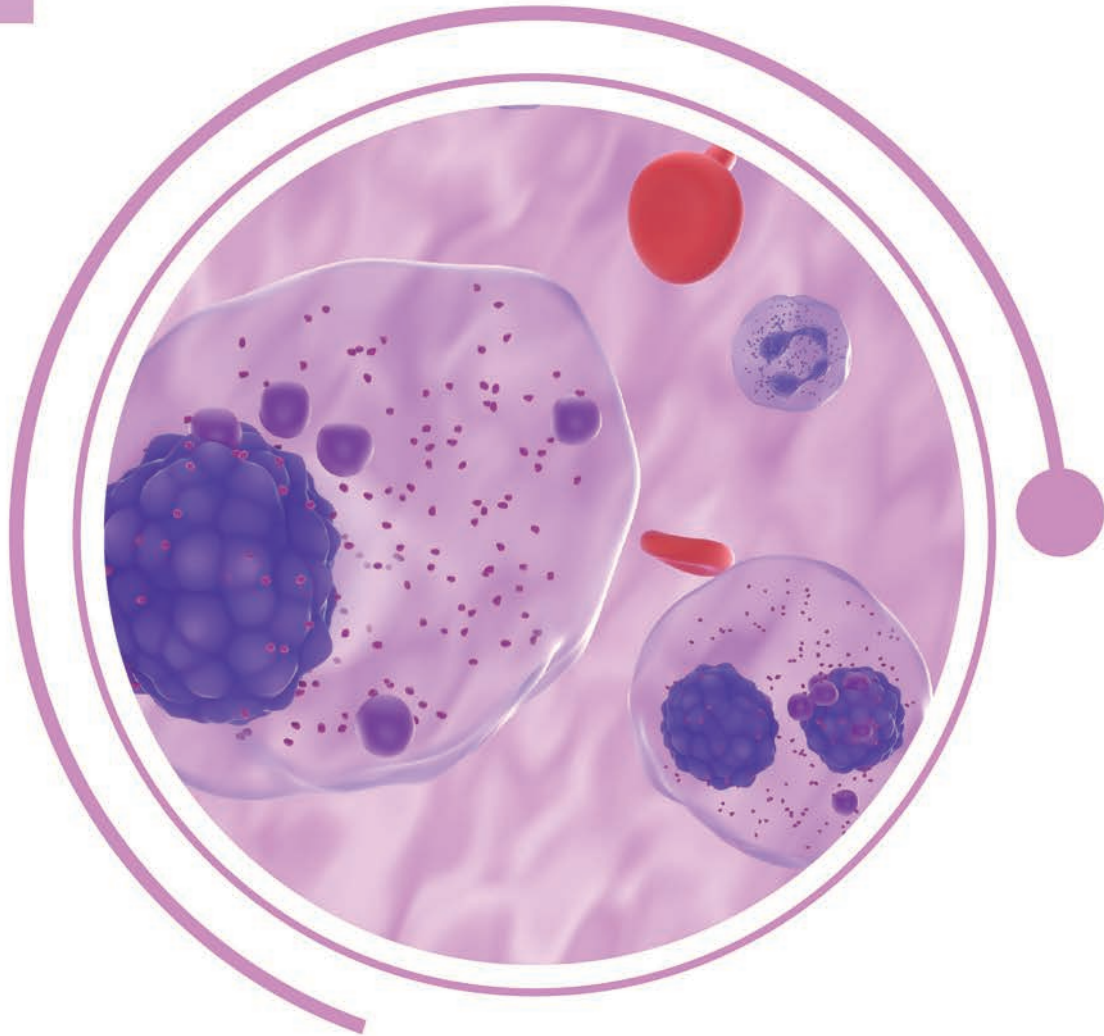
**B : 정확하고 재현가능한 CNV 측정** - Copy number 플롯은 0~2 범위의 Positive control를 나타냅니다. 모든 에러바는 QuantaSoft™ Software 에 의해 생성되며, 95% 신뢰 구간을 나타냅니다.



서울특별시 송파구 양산로 29 다우빌딩 2·3·5·6F  
Tel. 02-2201-3602 Fax. 02-2201-2166

E-mail [contact@dowbiomedica.co.kr](mailto:contact@dowbiomedica.co.kr)  
H.P [www.dowbiomedica.co.kr](http://www.dowbiomedica.co.kr)





# ddPCR

## eNewsletter

2022

# 만성 골수성 백혈병 진단, 모니터링 ddPCR 검사 허가 완료

- 미국 NCCN guidelines 기준 민감도 MR\* > 4.5 충족한 검사
- 기존 검사 대비 높은 정확도, standard curve 불필요

\*Molecular Response

혈액암은 표적항암제 효과가 좋아지며 진단 외에도  
치료중단시점을 결정할 때 민감도 높은 검사의 필요성이 높아지고 있습니다.  
특히 CML(만성 골수성 백혈병)은 특히 BCR-ABL1 농도 모니터링이 중요합니다.

이에 낮은 농도의 유전자도 검출이 가능한 ddPCR BCR-ABL 검사가  
식약처 허가를 받아 임상에서도 사용할 수 있게 되었습니다.

## BCR-ABL %IS Kit (ddPCR 기반)

- ▶ 국제, 국내 임상 모두 증명된 검사
- ▶ LOD/LOQ Claims 검증완료 (CLSI EP17-A2기준)
- ▶ 미국의 NCCN에서 규정한 민감도 MR >4.5 충족\*

\*국내 시장에서 Bio-Rad QXDx BCR-ABL % IS Kit 제품만 이 기준 충족



## 만성 골수성 백혈병과 검사 특성

만성 골수성 백혈병(CML; chronic myeloid leukemia) 환자는 전체 성인 백혈병 환자의 약 10~15%를 차지하며 매년 500명가량이 새로 발병하는 혈액암입니다. 최근 개발된 표적항암제의 치료 효과가 검증되며 **만성 골수성 백혈병 환자의 6년 생존율은 88% 달할 정도로 예후가 좋아졌습니다.**

혈액암은 혈액 내에 존재하는 암 세포를 확인하는 검사를 통해 진단, 치료 중단을 결정하기 때문에, 혈액 속의 적은 양의 암세포를 확인할 수 있는 민감도 높은 검사가 필요합니다. 특히 **치료를 중단하는 시점에는 BCR-ABL 유전자가 혈액 PCR 검사에서 보이지 않아야 합니다.**

민감도가 낮은 검사로 유전자 검사 결과가 음성이 나오는 경우 투약 중지 이후 만성 골수성 백혈병이 재발하는 양상을 보일 수 있기 때문입니다.

### CML

- 전체 성인 백혈병의 약 10-15% 차지
- 표적항암제 치료효과 ▲ 6년 생존율 88%에 달해



### BCR-ABL1 농도 모니터링이 중요해짐

- ▶ 글리벡(이마티닙) 치료성패결정에 가장 중요한 예측 변수
- 최소 MR4.5에서 신뢰할 수 있는 측정 민감도 보장
- 3년이상 MR4.0 이하 유지



2019 NCCN CML 지침 및 droplet digital PCR을 이용한 BCR-ABL1 fusion transcript 검사 (대한진단혈액학회 vol.28. 2019. 8.)  
Chronic Myeloid Leukemia, Version 1.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology



## BCR-ABL % IS Kit 식의약처 허가 완료

(ddPCR 기반)

아주 낮은 농도의 유전자(BCR-ABL)를 검출할 수 있는 디지털 PCR 검사법이 식의약처 허가를 받아 임상에서 사용이 가능해졌습니다. 디지털 PCR법은 미국의 종합암네트워크(NCCN)에서 규정하는 민감도 기준인  $MR > 4.5$  을 충족하는 유일한 검사법입니다.

### CML 치료반응 Criteria

▶ BCR-ABL1 감시위해 검사법상 기술력 · 측정민감도 보완 필요

▶ Complete Molecular response 정의 위해 측정법 분석의 민감도 보장 및 MR4.5 필요 (현재 RT-QPCR의 LOD -> MR4.0 / LOQ -> 미제공)

Bio-Rad QXDx ddPCR System(CE-IVD)

LOD/LDQ Claims 검증완료

(CLSI EP17-A2 기준)



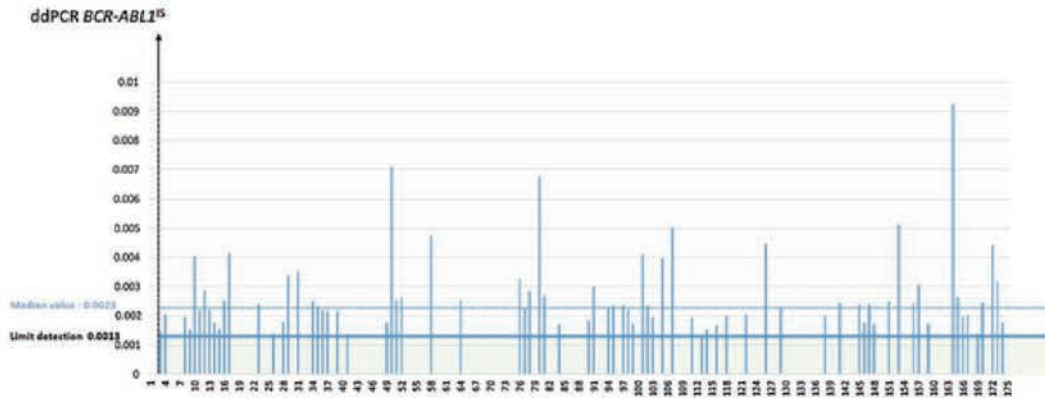
### Molecular response

- Early molecular response (EMR) - *BCR-ABL1* (IS)  $\leq 10\%$  at 3 and 6 months
- Major molecular response (MMR) - *BCR-ABL1* (IS)  $\leq 0.1\%$  or  $\geq 3$ -log reduction in *BCR-ABL1* mRNA from the standardized baseline, if qPCR (IS) is not available
- Complete molecular response (CMR) is variably described, and is best defined by the assay's level of sensitivity (eg, MR4.5)

2019 NCCN CML 지침 및 droplet digital PCR을 이용한 BCR-ABL1 fusion transcript 검사 (대한진단혈액학회 vol.28, 2019. 8.)  
EP17-A2 Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition (Clinical & Laboratory Standards Institute. June 18, 2012)



Figure 3



- ▶ **Bio-Rad QXDx™ ddPCR™ 0.0013% IS = MR4.9**
- ▶ Limit of detection (LOD) of RT-ddPCR  
; LOD = 3 × SD; 3 × 0.000499 = 0.0015 ⇒ **0.0013% IS** (conversion factor = 0.8889)
- ▶ 환자 샘플 175개 median value = 0.0026% IS

Evaluation of Residual Disease and TKI Duration Are Critical Predictive Factors for Molecular Recurrence after Stopping Imatinib First-line in Chronic Phase CML Patients (Clin Cancer Res (2019) 25 (22): 6606-6613. IF 9.81)

**Table 3.** Criteria for TKI Discontinuation by NCCN CML guideline v2019.01

5. **Stable molecular response (MR4; *BCR-ABL1* ≤0.01% IS)** for ≥2 years, as documented on at least 4 tests, performed at least 3 months apart.
6. **Access to a reliable qPCR test with a sensitivity of detection of at least MR4.5** (*BCR-ABL1* ≤0.0032% IS) and that provides results within 2 weeks.
7. Monthly molecular monitoring for one year, then every 6 weeks for the second year, and every 12 weeks thereafter (indefinitely) is recommended for patients who remain in **MMR (MR3; *BCR-ABL1* ≤0.1% IS)** after discontinuation of TKI therapy.

**Table 2.** Univariate analysis

	Variables	6-month probability (95% CI)	12-month probability (95% CI)	P
All patients (n = 199)	Relapse (Competing events n = 7)	47% (41-55)	49% (44-56)	—
Sokal (n = 194)	Low	46% (37-58)	48% (39-60)	0.8788
	Other	62% (39-57)	49% (41-58)	
ELTS (n = 161)	Low	46% (38-54)	48% (41-56)	0.0547
	Other	62% (50-77)	65% (51-83)	
Imatinib duration (n = 199)	<74.8 months	55% (46-66)	57% (49-67)	0.0166
	≥74.8 months	39% (31-49)	41% (32-51)	
CMR duration (n = 201)	<Median value	56% (47-66)	58% (51-67)	0.0092
	≥Median value	38% (30-49)	40% (32-51)	
ddPCR quantitation (n = 175)	<0.0023% <sup>IS</sup>	44% (36-53)	46% (38-56)	0.0053
	≥0.0023% <sup>IS</sup>	66% (55-79)	68% (56-83)	

NOTE: Factors of molecular recurrence, univariate analysis. Competing events: TKI reinitiation without loss of molecular response (n = 6; 5 with CML only, 1 with intercurrent disease); unrelated CML death without loss of molecular disease (n = 1).

**Tables 3.** Different multivariate analyses performed including ELTS, imatinib duration, DMR duration, and ddPCR results

	Variables	HR (95% CI)	P
<b>A</b>			
ELTS (n = 144)	Low	0.661 (0.39-1.119)	0.661
	Other		
Imatinib duration (n = 144)	<75 months	0.574 (0.359-0.916)	0.0201
	≥75 months		
ddPCR quantitation (n = 144)	<0.0023%	0.546 (0.337-0.885)	0.0141
	≥0.0023%		
<b>B</b>			
ELTS (n = 144)	Low	0.695 (0.396-1.221)	0.0216
	Other		
Median DMR duration (n = 144)	<75 months	0.749 (0.460-1.219)	0.2452
	≥75 months		
ddPCR quantitation (n = 144)	<0.0023% <sup>IS</sup>	0.560 (0.341-0.918)	0.0216
	≥0.0023% <sup>IS</sup>		
<b>C</b>			
Imatinib duration (n = 174)	<75 months	0.635 (0.415-0.972)	0.0366
	≥75 months		
ddPCR quantitation (n = 174)	<0.0023% <sup>IS</sup>	0.556 (0.3600-0.858)	0.0081
	≥0.0023% <sup>IS</sup>		
<b>D</b>			
Median DMR duration (n = 144)	<75 months	0.692 (0.451-1.063)	0.0927
	≥75 months		
ddPCR quantitation (n = 144)	<0.0023% <sup>IS</sup>	0.561 (0.360-0.876)	0.0110
	≥0.0023% <sup>IS</sup>		

NOTE: Different models of multivariate analyses including ELTS, imatinib duration, DMR duration, and ddPCR.

▶ 글리벡(이마티닙) 치료 기간이 길수록 RT-qPCR로 BCR-ABL1 transcripts 감지할 수 없음

▶ TKI Discontinuation 위해서는 RT-qPCR 검사 민감도 더 높아야 함

RT-qPCR에 의해 BCR-ABL1 transcripts 검출할 수 없는 CML 환자에 대한 TKI Discontinuation에 있어 RT-ddPCR(MR4.5)이 유망한 도구

2019 NCCN CML 지침 및 droplet digital PCR을 이용한 BCR-ABL1 fusion transcript 검사 (대한진단혈액학회 vol.28. 2019. 8.) Evaluation of Residual Disease and TKI Duration Are Critical Predictive Factors for Molecular Recurrence after Stopping Imatinib First-line in Chronic Phase CML Patients (Clin Cancer Res (2019) 25 (22): 6606-6613. IF 9.81)

# 국제, 국내 임상 모두에서 증명된 검사법

디지털 PCR검사법은 Bio-Rad사에서 개발한 첨단 진단검사법이며 국제적인 임상시험은 물론 국내 임상시험에서도 증명된 검사법입니다.

최근 ddPCR 기반 체외진단(IVD) 제품이 최초로 출시되었으며, CML-MRD를 위한 QXDx BCR-ABL% IS (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 미국 FDA 허가 및 CE 마크를 득하였습니다.

2019 NCCN CML 지침 및 droplet digital PCR을 이용한 BCR-ABL1 fusion transcript 검사 (대한진단혈액학회 vol.28, 2019, 8.)

We believe that RT-ddPCR is a promising tool in discontinuation of TKI trials for patients with CML with undetectable transcripts by qRT-PCR, even if it probably requires a new effort of standardization between laboratories using RT-ddPCR, this standardization is currently in progress in Europe with the EUTOS program.

Evaluation of Residual Disease and TKI Duration Are Critical Predictive Factors for Molecular Recurrence after Stopping Imatinib First-line in Chronic Phase CML Patients (Clin Cancer Res (2019) 25 (22): 6606-6613. IF 9.81)

## ddPCR 검사 특징



### 간편한 검사 과정

ddPCR은 amplification의 endpoint 단계에서 결과를 확인하기 때문에 증폭 효율이 결과에 크게 영향을 미치지 않으며, calibration curve가 필요하지 않습니다.



### 검증된 정확도

Calibrator와 dilution 으로 검사한 결과는 0.001%까지 매우 유사한 직선성, 정밀도, 정확성을 보였습니다.

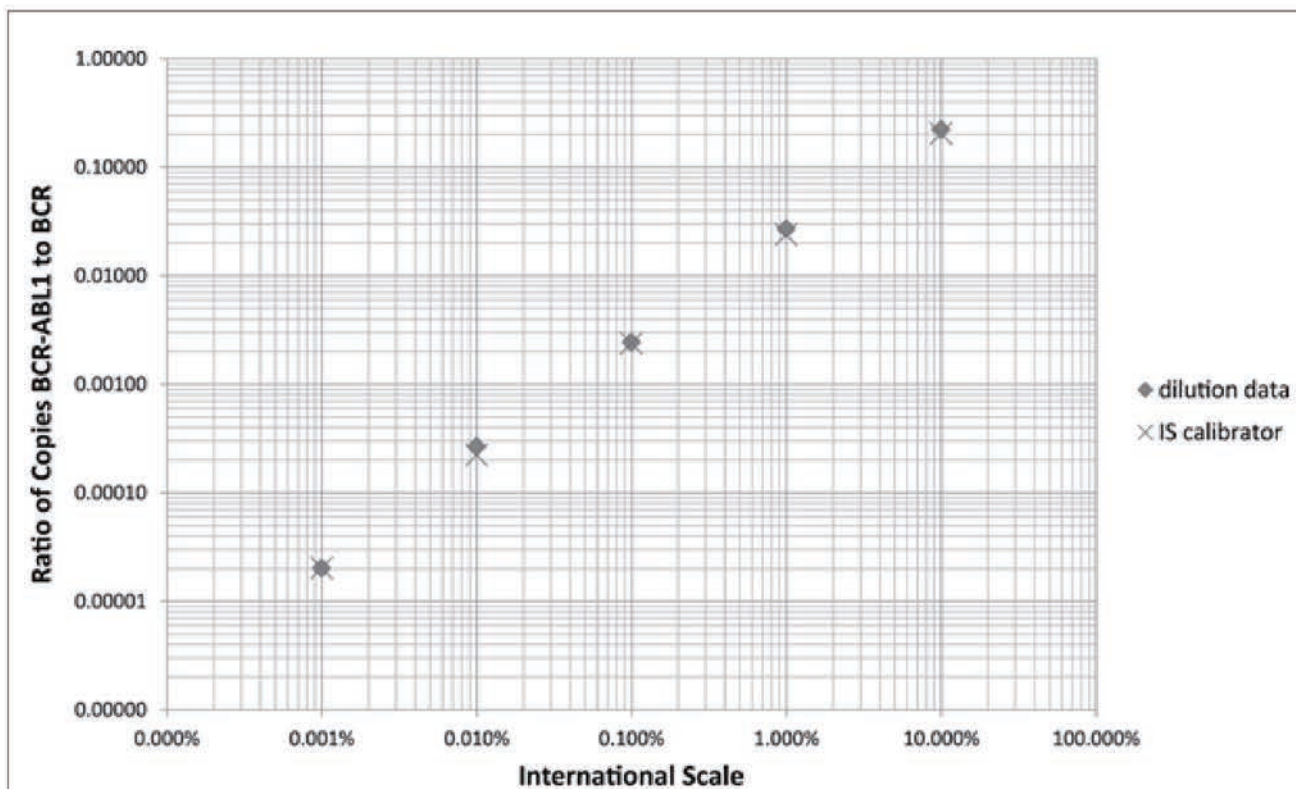


Figure 1 Log-log plot demonstrating correlation of BCR-ABL1/BCR ratios to IS calibrators. Total RNA was extracted from pooled patient samples and diluted in total RNA from healthy donors. Replicates were tested together with IS calibrators by two technologists over 20 days. Data show near perfect correlation between sample dilutions and calibrators.

Detection and quantification of BCR-ABL1 fusion transcripts by droplet digital PCR  
(J Mol Diagn. 2014 Mar;16(2):174-9. IF 3.95)







PCR 의 한계를 넘어선 임상 연구용 플랫폼  
**Droplet Digital™ PCR system**



서울특별시 송파구 양산로 29 다우빌딩 2·3·5·6F  
Tel. 02-2201-3602 Fax. 02-2201-2166

E-mail [contact@dowbiomedica.co.kr](mailto:contact@dowbiomedica.co.kr)  
H.P [www.dowbiomedica.co.kr](http://www.dowbiomedica.co.kr)