

cobas[®] 4800 BRAF V600 Mutation Test



FÖR *IN VITRO*-DIAGNOSTISK ANVÄNDNING.

cobas[®] 4800 BRAF V600 Mutation Test

BRAF

24 Tests

M/N: 05985595190

Se **cobas[®]** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) för information om provberedning.

AVSEDD ANVÄNDNING

Det primära användningssyftet med **cobas[®]** 4800 BRAF V600 Test är detektion av BRAF V600-mutationer i DNA som extraherats från formalinfixerad, paraffinbäddad mänsklig melanomvävnad och vävnad från papillärt tyreoidakarcinom (PTC). I melanom är testet avsett som en hjälp för att kunna välja ut patienter vars tumörer bär på BRAF V600-mutationer för behandling med antingen enbart ZELBORAF[®] (vemurafenib), eller med COTELLIC[®] (kobimetinib) i kombination med ZELBORAF[®] (vemurafenib).

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING AV TESTET

Aktiverande mutationer i proto-onkogenen BRAF uppstår i många cancerformer hos människor, t.ex. malignt melanom, kolorektal cancer, äggstockscancer och sköldkörtelcancer.^{1, 2} BRAF-mutationer har identifierats i 40–60 % av fallen med malignt melanom³ och i 36–46 % av fallen med papillärt tyreoidakarcinom.^{4, 5} BRAF-mutationer är också vanliga vid benigna nevi,⁶ vilket indikerar att sådana mutationer uppstår väldigt tidigt. Upptäckten av sådana somatiska mutationer i BRAF-genen i melanom, PTC och andra mänskliga tumörer har hjälpt till att klargöra den centrala roll som BRAF-kinas spelar för signaleringsvägar som kontrollerar celltillväxt, celldifferentiering och celldöd. I normala celler är BRAF en del av en strikt reglerad signaleringsväg som åstadkommer effekterna på tillväxtfaktorreceptorer (t.ex. EGFR) genom RAS, RAF, MEK och ERK. Onkogen mutationer i BRAF resulterar i en ökning av kinasaktiviteten, vilket gör signaleringsvägen RAF-MEK-ERK konstitutivt aktiv i frånvaro av de typiska tillväxtfaktorerna.

Majoriteten av BRAF-mutationerna i melanom, PTC och andra mänskliga tumörer uppstår i kodon 600.⁷ Den dominerande mutationen i kodon 600 är V600E-mutationen (GTG > GAG). Ett antal dinukleotidmutationer som påverkar kodon 600 [V600K (GTG > AAG), V600R (GTG > AGG), V600E2 (GTG > GAA) och V600D (GTG > GAT)] har också observerats (fast inte lika ofta), huvudsakligen i melanom och sällan i andra tumörer som kolorektal cancer.

cobas[®] 4800 BRAF V600 Mutation Test är en realtids-PCR-analys som är utformad för att detektera förekomst av mutationen V600E (T1799A). **cobas[®]** 4800 BRAF V600 Mutation Test är ett så kallat companion diagnostics-test som är kopplat till vemurafenib, en substans som hämmar den mutanta V600E-versionen av BRAF. Kliniska studier av vemurafenib hos patienter med långt framskriden melanom har visat att patienter med en V600E-mutant tumör sannolikt kommer att uppvisa klinisk nytta av substansen.^{8, 9} En efterföljande studie av kobimetinib i kombination med vemurafenib hos patienter med långt framskriden melanom visade att patienter med antingen en V600E- eller V600K-mutant tumör som detekteras av **cobas[®]** 4800 BRAF V600 Mutation Test sannolikt kommer att uppvisa klinisk nytta av den här behandlingen.^{10, 11} V600K förekommer i ungefär 10–15 % av melanomprover med BRAF V600-mutationer.¹²

ANVÄNDNINGSPRINCIPER

cobas[®] 4800 BRAF V600 Mutation Test (**cobas** BRAF Test) baseras på två processer: (1) manuell provberedning för att få fram genomiskt DNA från formalinfixerad paraffinbäddad vävnad (FFPET); (2) PCR-amplifiering och detektion av mål-DNA med hjälp av komplementära primerpar och två oligonukleotidprober märkta med olika fluorokromer. En prob är utformad för att detektera vildtyp-BRAF V600-sekvensen och en är utformad för att detektera V600E-mutationssekvensen. Två externa körningskontroller medföljer och vildtypsallelen fungerar som en internkontroll som går igenom hela processen.

Extraktion

FFPET-prover bearbetas och genomiskt DNA isoleras med **cobas[®]** DNA Sample Preparation Kit, en manuell provberedning baserad på nukleinsyrabindning till glasfiber. Ett avparaffinerat 5 µm snitt av ett FFPET-prov lyseras genom inkubering i förhöjd temperatur med proteas och en kaotropisk lyserings-/bindningsbuffert som frigör nukleinsyror och skyddar det frigjorda genomiska DNA:t mot DNaser. Därefter tillsätts isopropanol i lyseringsblandningen som sedan centrifugeras genom en kolonn med ett glasfiberfilter. Under centrifugeringen binds genomiskt DNA till glasfiberfiltrets yta. Obundna ämnen, t.ex. salter, proteiner och andra cellulära föroreningar tas bort genom centrifugering. De adsorberade nukleinsyrorna tvättas och elueras sedan med en vattenbaserad lösning. Mängden genomiskt DNA bestäms spektrofotometriskt och justeras till en fastställd koncentration som ska tillsättas i amplifierings- och detektionsblandningen. Mål-DNA amplificeras och detekteras sedan med analysinstrumentet **cobas z** 480 med hjälp av de amplifierings- och detektionsreagens som medföljer i **cobas** BRAF Test-kitet.

PCR-amplifiering och -detektion

Val av målsekvens

cobas BRAF Test använder primers som definierar en 116 baspar lång sekvens i humant genomiskt DNA som innehåller BRAF kodon 600 i exon 15. Hela BRAF-genen amplifieras inte. **cobas** BRAF Test är utformat för att detektera nukleotidförändringen 1799 T > A i BRAF-genen, vilket resulterar i en valin-till-glutamin-syrasubstitution i kodon 600 (V600E). BRAF-vildtyps- och mutant DNA-målspecifika TaqMan-prober märkta med fluorokromer binder till vildtyps- respektive mutantsekvenserna. Vildtyps- och mutantsekvensen detekteras med hjälp av en dedikerad optisk kanal för varje sekvens.

Målsekvensamplifiering

DNA-polymeras från Thermusarten Z05 används för målsekvensamplifiering. Först värms PCR-reaktionsblandningen så att det genomiska DNA:t denatureras och primer-målsekvenserna exponeras. När blandningen svalnar binder uppströms- och nedströmsprimers till mål-DNA-sekvenserna. Z05 DNA-polymeras, i närvaro av divalenta metalljoner och överskott av dNTPs, förlänger varje bunden primer och syntetiserar därmed en andra DNA-sträng. Detta slutför den första PCR-cykeln och ger en dubbelsträngad DNA-kopia av målregionen med 116 baspar för BRAF-genen. Proceduren upprepas i cykler, där varje cykel effektivt fördubblar mängden amplikon-DNA. Endast området mellan primrarna i BRAF-genen amplifieras.

Automatisk realtidsdetektion

I **cobas** BRAF Test används realtids-PCR-teknik. Varje målspecifik oligonukleotidprob i reaktionen är märkt med en fluorokrom som fungerar som reporterfluorokrom, och med en quencher-molekyl som absorberar (släcker) den fluorescerande emissionen från reporterfluorokromen i en intakt prob. Under varje amplifieringscykel binder prober som är komplementära till den enkelsträngade DNA-sekvensen i amplicon och klyvs sedan av 5' till 3'-nukleasaktiviteten i Z05 DNA-polymeras. När reporterfluorokromen har separerats från quencher genom denna nukleasaktivitet kan fluorescens med en specifik våglängd mätas när reporterfluorokromen exciteras av rätt ljusspektrum. Två olika reporterfluorokromer används för att märka den målspecifika BRAF-vildtypsproben (WT) och BRAF V600E-mutationsproben. Amplifiering av de två BRAF-sekvenserna kan detekteras oberoende av varandra i en enkel reaktionsbrunn genom att mäta fluorescensen vid de fyra specifika våglängderna i separata optiska kanaler.

Selektiv amplifiering

Selektiv amplifiering av mål-nukleinsyra från provet kan göras med **cobas** BRAF Test genom användning av AmpErase (uracil-N-glykosylas) och deoxiuridintrifosfat (dUTP).¹³ AmpErase-enzymet känner igen och katalyserar nedbrytning av DNA-strängar som innehåller deoxiuridin, men inte DNA som innehåller tymidin. Deoxiuridin finns inte i naturligt förekommande DNA men finns däremot alltid i amplicon på grund av att dUTP används som en av nukleotidtrifosfaterna (dNTP) i reaktionsmixreagenset, varför endast amplicon innehåller deoxiuridin. Deoxiuridin gör kontaminerande amplikon känsligt för nedbrytning av AmpErase-enzym före DNA-amplifieringen. AmpErase-enzymet, som ingår i reaktionsmixreagenset, katalyserar klyvning av DNA innehållande deoxiuridin vid deoxiuridinnukleosiderna genom att öppna deoxiriboskedjan vid C1-positionen. Vid uppvärmning i det första termocyklingssteget vid alkaliskt pH bryts amplikon-DNA-kedjan vid deoxiuridinets position vilket ger icke amplifierbart DNA. AmpErase-enzymet är inaktivt vid temperaturer över 55 °C, dvs. genom alla termocyklingssteg. Därför förstörs inte nybildade amplikon.

REAGENS

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test (BRAF) 24 tester (M/N: 05985595190)			
Kitkomponenter	Reagensingredienser	Kvantitet per kit	Säkerhetssymbol och varning ^a
RXNMIX (reaktionsmix)	Tricinbuffert Kaliumacetat Kaliumhydroxid Glycerol Tween 20 EDTA 5 % dimetylsulfoxid < 0,09 % dNTPs < 0,10 % Z05 DNA-polymeras (mikrobiellt) < 0,10 % AmpErase-enzym (uracil-N-glykosylas) (mikrobiellt) < 0,003 % oligonukleotid-aptamer 0,08 % natriumazid	3 × 0,16 ml	N/A
MGAC (magnesiumacetat)	Magnesiumacetat 0,09 % natriumazid	3 × 0,15 ml	N/A
BRAF OM (BRAF Oligo Mix)	Tris-HCl-buffert EDTA 0,09 % natriumazid Poly rA RNA (syntetiskt) < 0,01 % uppströms- och nedströms-BRAF-primers < 0,01 % fluorescensmärkta BRAF-prober	3 × 0,13 ml	N/A
BRAF MUT (BRAF-mutations-kontroll)	Tris-HCl-buffert EDTA Poly rA RNA (syntetiskt) 0,05 % natriumazid < 0,001 % plasmid-DNA (mikrobiellt) innehållande BRAF-mutantsekvens < 0,001 % plasmid-DNA (mikrobiellt) innehållande BRAF-vildtypssekvens	2 × 0,13 ml	N/A
BRAF WT (BRAF-vildtypskontroll)	Tris-HCl-buffert EDTA Poly rA RNA (syntetiskt) 0,05 % natriumazid < 0,001 % plasmid-DNA (mikrobiellt) innehållande BRAF-vildtypssekvens	2 × 0,13 ml	N/A
DNA SD (DNA-spädnings-buffert)	Tris-HCl-buffert 0,09 % natriumazid	2 × 1 ml	N/A

^a Produktsäkerhetsmärkingen följer huvudsakligen EU:s GHS-system.

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

A. FÖR *IN VITRO*-DIAGNOSTISK ANVÄNDNING.

- B. Det här testet är avsett för användning med formalinfixerade paraffinbäddade vävnadsprover.
- C. Pipettera inte med munnen.
- D. Ät, drick eller rök inte i laboratoriet.
- E. Undvik mikrobiell kontamination och DNA-kontamination av reagens.
- F. Kassera oanvända reagens och avfall enligt gällande nationella, regionala och lokala föreskrifter.
- G. Använd inte kit efter utgångsdatum.
- H. Blanda inte reagens från olika kit eller loter.
- I. Säkerhetsdatablad (SDS) erhålls på begäran hos närmaste Roche-kontor.
- J. Handskar ska användas och ska bytas mellan hantering av prover och **cobas**[®] 4800-reagens för att undvika kontamination.
- K. För att undvika kontamination av working master mix med DNA-prover ska amplifiering och detektion utföras i ett område som är separerat från DNA-isolering. Arbetsområdet för amplifiering och detektion ska rengöras ordentligt innan beredning av working master mix. En korrekt rengöring innebär att alla rack och pipetter torkas av ordentligt med en lösning med 0,5 % natriumhypoklorit* och därefter torkas av med en lösning med 70 % etanol.
*** OBS! Vanliga hushållsblekmedel innehåller normalt 5,25 % natriumhypoklorit. En utspädning 1:10 med hushållsblekmedel ger en lösning med 0,5 % natriumhypoklorit.**
- L. Prover ska behandlas som smittbärande i enlighet med säkra laboratorierutiner, exempelvis de rutiner som beskrivs i *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁴ och i CLSI-dokumentet M29 A4.¹⁵
- M. **RXNMIX, MGAC, BRAF MUT, BRAF WT** och **DNA SD** innehåller natriumazid. Natriumazid kan reagera med bly- eller kopparrör och bilda mycket explosiva metallazider. Förhindra aziduppbyggnad genom att spola med mycket kallt vatten om lösningar som innehåller natriumazid hålls ut i avloppet.
- N. Använd engångshandskar, laboratorierock och skyddsglasögon vid hantering av reagens. Undvik att dessa material kommer i kontakt med hud, ögon och slemhinnor. Tvätta omedelbart med stora mängder vatten vid eventuell kontakt. Brännskador kan annars uppstå. Om spill förekommer, späd med vatten innan spillet torkas upp.
- O. Alla engångsartiklar är avsedda att användas en gång. Återanvänd dem inte.
- P. Använd inte engångsartiklar efter utgångsdatum.
- Q. Använd inte natriumhypokloritlösning (blekmedel) vid rengöring av analysinstrumentet **cobas z** 480. Rengör analysinstrumentet **cobas z** 480 enligt anvisningarna i användarhandboken till **cobas**[®] 4800-systemet eller i användarassistenten till **cobas**[®] 4800-systemet.
- R. Ytterligare varningar, försiktighetsåtgärder och procedurer för att minska kontaminationsrisken för analysinstrumentet **cobas z** 480 finns i användarhandboken till **cobas**[®] 4800-systemet eller i användarassistenten till **cobas**[®] 4800-systemet.
- S. Användning av sterila engångspipetter och DNase-fria pipettspetsar rekommenderas.

FÖRVARING OCH HANTERING

- A. Frys inte reagens.
- B. Förvara **RXNMIX, MGAC, BRAF OM, BRAF MUT, BRAF WT** och **DNA SD** i 2–8 °C. När förpackningen öppnats är reagensen hållbara i upp till 4 användningstillfällen under 60 dagar, dock längst till angivet utgångsdatum.
- C. **BRAF OM** och Working Master Mix (beredd genom tillsats av **BRAF OM** och **MGAC** i **RXNMIX**) ska skyddas mot långvarig exponering för ljus.
- D. Working Master Mix (beredd genom tillsats av **BRAF OM** och **MGAC** i **RXNMIX**) ska förvaras mörkt i 2–8 °C. De beredda proverna och kontrollerna måste tillsättas inom 1 timme efter beredning av Working Master Mix.
- E. Bearbetade prover (extraherat DNA) är hållbara i upp till 24 timmar i 15 °C till 30 °C eller upp till 14 dagar i 2 °C till 8 °C eller upp till 60 dagar i –15 °C till –25 °C eller när de har genomgått 3 frys-tiningscykler vid förvaring i –15 °C till –25 °C. Extraherat DNA ska amplifieras inom den rekommenderade förvaringstiden, dock före utgångsdatum för det **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit som användes för att extrahera DNA.
- F. Amplifieringen ska startas inom 1 timme efter att de bearbetade proverna och kontrollerna har tillsatts i Working Master Mix (beredd genom tillsats av **BRAF OM** och **MGAC** i **RXNMIX**).

MATERIAL SOM MEDFÖLJER

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test

(M/N: 05985595190)

BRAF

24 tester

RXNMIX

(reaktionsmix) (transparent lock)

MGAC

(magnesiumacetat) (gult lock)

BRAF OM

(BRAF Oligo Mix) (svartvitt lock)

BRAF MUT

(BRAF-mutationskontroll) (rött lock)

BRAF WT

(BRAF-vildtypskontroll) (blått lock)

DNA SD

(DNA-spädningsbuffert) (lila lock)

MATERIAL SOM BEHÖVS MEN INTE MEDFÖLJER

- **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (DNA-provberedningskit) (Roche M/N 05985536190)
- Mikrotiterplatta (AD-platta) och skyddsfilm (Roche M/N: 05232724001) till **cobas®** 4800-systemet
- Justerbara pipetter*: (kapacitet 10 µl, 20 µl, 200 µl och 1 000 µl) med DNase-fria spetsar och aerosolbarriär eller positiv förskjutning
- Mikrocentrifugrör med låsbart lock (1,5 ml sterila RNase/DNase-fria, PCR-grad) (valfri produkttillverkare)
- Spektrofotometer för mätning av DNA-koncentrationen**
- Vortexmixer**
- Mikrocentrifug-rörrack
- Engångshandskar, puderfria
- Frys som kan hantera förvaring i -25 °C till -15 °C

* Pipetter ska hanteras enligt tillverkarens instruktioner och ha en noggrannhet inom 3 % av angiven volym. DNase-fria spetsar med aerosolbarriär eller positiv förskjutning ska användas när så anges för att hindra nedbrytning av prov och korskontamination.

** All utrustning ska hanteras enligt tillverkarens instruktioner.

Instrument och programvara

- Analysinstrumentet **cobas z** 480
- Kontrollenhet till **cobas®** 4800 SR2-systemet med Windows XP
- **cobas®** 4800 SR2 systemprogram version 2.0 eller högre
- Programmet BRAF Analysis Package version 1.0 eller högre
- Streckkodsläsare (Roche M/N 05339910001)
- Skrivare HP P2055d (Roche M/N 05704375001)

PROVTAGNING, TRANSPORT OCH FÖRVARING AV PROVER

OBS! Hantera alla prover som potentiellt smittbärande.

A. Provtagning

FFPET-prover har validerats för användning med **cobas** BRAF Test.

B. Transportera prover

FFPET-prover kan transporteras i 15–30 °C. Vid transport av FFPET-prover ska gällande bestämmelser för transport av etiologiska agens följas.¹⁶

C. Förvaring av prover

Hållbarhet har bekräftats för FFPET-prover som förvaras i 15–30 °C i upp till 12 månader efter provtagning. FFPET-snitt på 5 µm som placeras på objektglas kan förvaras i 15–30 °C i upp till 60 dagar.

BRUKSANVISNING

OBS! Alla reagens förutom RXNMIX, MGAC och BRAF OM ska ha omgivningstemperatur före användning. RXN MIX, MGAC och BRAF OM kan tas direkt från förvaring i 2–8 °C för beredning av Working Master Mix.

OBS! Endast melanom- och PTC-FFPET-snitt med 5 µm tjocklek där minst 50 % utgörs av tumörceller får användas i cobas BRAF Test. Alla prover som innehåller mindre än 50 % tumörceller ska makrodissekeras efter avparaffinering.

OBS! Detaljerad information om användning av analysinstrumentet cobas z 480 finns i användarhandboken till cobas® 4800-systemet eller i användarassistenten till cobas® 4800-systemet.

Körningsstorlek

cobas BRAF Test-kitet är utformat för att köras med minst 3 prover plus kontroller upp till högst 24 prover plus kontroller. Färre än 3 prover plus kontroller kan köras vid samma tillfälle men kan resultera i otillräcklig reagensvolym för körning av totalt 24 prover plus kontroller. **cobas** BRAF Test innehåller reagens som räcker till 8 körningar med 3 prover plus kontroller. Ett replikat av **cobas** BRAF Test mutationskontroll [**BRAF MUT**] och ett replikat av **cobas** BRAF Test vildtypskontroll [**BRAF WT**] behövs för att utföra varje körning (se avsnittet "Kvalitetskontroll").

Arbetsflöde

OBS! **cobas** BRAF Test kan användas för upp till 24 prover i en körning.

OBS! För att maximera reagensanvändningen ska en testkörning inkludera minst tre (3) patientprover plus kontroller.

DNA-isolering

DNA isoleras från FFPET-prover med **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

Makrodissektion

Om mindre än 50 % av provets area utgörs av tumör måste provet makrodissekeras som en del av provberedningen.

DNA-kvantifiering

OBS! Mätning av DNA-koncentration ska utföras omedelbart efter DNA-isoleringsproceduren och innan förvaring.

- Blanda varje DNA-stamlösning genom att vortexa i 5 sekunder innan kvantifiering.
- Kvantifiera DNA med en spektrofotometer enligt tillverkarens instruktioner. Använd **DNA EB** från **cobas**® DNA Sample Preparation Kit som blankprov för instrumentet. Ett genomsnitt av 2 konsekventa avläsningar behövs. De två mätningarna ska ligga inom ±10 % av varandra när avläsningarna av DNA-koncentrationen är ≥20,0 ng/µl. För avläsningar av DNA-koncentrationen < 20,0 ng/µl ska de två mätningarna ligga inom ±2,0 ng/µl.
- DNA-stamlösningens koncentrationen måste vara ≥ 5 ng/µl för att utföra **cobas** BRAF Test.

OBS! Varje DNA-stamlösning måste ha en minimikoncentration på 5 ng/µl för att **cobas** BRAF Test ska kunna utföras. Om koncentrationen av en DNA-stamlösning är < 5 ng/µl ska avparaffinering, DNA-isolering och DNA-kvantifiering upprepas för det provet med två FFPET-snitt på 5 µm. För prover på objektglas: Avparaffinera och lägg vävnad från båda snitten tillsammans i ett rör, sänk ned vävnaden i TLB och PK från **cobas**® DNA Sample Preparation Kit och utför sedan DNA-isolering och -kvantifiering. För prover som inte är på objektglas: lägg vävnad från båda snitten tillsammans i ett rör och utför avparaffinering, DNA-isolering och -kvantifiering. Om DNA-stamlösningen fortfarande är < 5 ng/µl ska du beställa ett ytterligare FFPET-snitt från den aktuella kliniska enheten.

OBS! Bearbetade prover (extraherat DNA) är hållbara i upp till 24 timmar i 15 °C till 30 °C eller upp till 14 dagar i 2 °C till 8 °C eller upp till 60 dagar i –15 °C till –25 °C eller när de har genomgått 3 frys-tiningscykler vid förvaring i –15 °C till –25 °C. Extraherat DNA ska amplifieras inom den rekommenderade förvaringstiden, dock före utgångsdatum för det **cobas**® DNA Sample Preparation Kit som användes för att extrahera DNA.

AMPLIFIERING OCH DETEKTION

OBS! För att undvika kontamination av working master mix med DNA-prover ska amplifiering och detektion utföras i ett område som är separerat från DNA-isolering. Arbetsområdet för amplifiering och detektion ska rengöras ordentligt innan beredning av working master mix. En korrekt rengöring innebär att alla rack och pipetter torkas av ordentligt med en lösning med 0,5 % natriumhypoklorit och därefter torkas av med en lösning med 70 % etanol. Vanliga hushållsblekmedel innehåller normalt 5,25 % natriumhypoklorit. En utspädning 1:10 med hushållsblekmedel ger en lösning med 0,5 % natriumhypoklorit.

Förbereda instrumentet

Detaljerad information om inställning av analysinstrumentet **cobas z** 480 finns i användarhandboken till **cobas**[®] 4800-systemet eller i användarassistenten till **cobas**[®] 4800-systemet.

Förbereda testproceduren

Information om stegen i arbetsflödet för **cobas** BRAF Test finns i användarhandboken till **cobas**[®] 4800-systemet eller i användarassistenten till **cobas**[®] 4800-systemet.

Beräkning av spädning av DNA-stamlösning från prov

Endast en amplifiering/detektion körs per prov, där 25 µl av en 5 ng/µl spädning av DNA-stamlösningen (totalt 125 ng) används. Anvisningarna nedan beskriver beredning av minst 35 µl spädd DNA-stamlösning med 5 ng/µl, beroende på den initiala DNA-stamlösningskoncentrationen. Detta säkerställer att minst 5 µl DNA-stamlösning används i varje prov för att förhindra variation som kan uppstå vid pipettering av mindre provvolym.

Beräkning av spädning av prov-DNA-stamlösningar vid koncentrationer från 5 ng/µl till 35 ng/µl

OBS! DNA-stamlösningar från prover ska spädas omedelbart innan amplifiering och detektion.

OBS! Endast en amplifiering/detektion körs per prov, där 25 µl av en 5 ng/µl spädning av DNA-stamlösningen (totalt 125 ng) används.

- A. Beräkna volymen DNA-stamlösning som behövs för varje prov med hjälp av följande formel:
Volymen DNA-stamlösning som behövs = $(35 \text{ µl} \times 5 \text{ ng/µl}) \div \text{DNA-stamlösningens koncentration i ng/µl}$
- B. Beräkna volymen DNA-spädningsbuffert (**DNA SD**) som behövs för varje prov med hjälp av följande formel:
Volymen DNA SD som behövs i µl = $(35 \text{ µl} - \text{volymen DNA-stamlösning som behövs i µl})$
- Exempel:
DNA-stamlösningskoncentration = 21 ng/µl
- A. Volymen DNA-stamlösning som behövs = $(35 \text{ µl} \times 5 \text{ ng/µl}) \div 21 \text{ ng/µl} = 8,3 \text{ µl}$
- B. Volymen DNA SD som behövs i µl = $(35 \text{ µl} - 8,3 \text{ µl}) = 26,7 \text{ µl}$

Beräkning av spädning av DNA-stamlösning vid koncentrationer > 35 ng/µl

OBS! DNA-stamlösningar från prover ska spädas omedelbart innan amplifiering och detektion.

OBS! Endast en amplifiering/detektion körs per prov, där 25 µl av en 5 ng/µl spädning av DNA-stamlösningen (totalt 125 ng) används.

- A. Vid DNA-stamlösningskoncentrationer > 35 ng/µl ska följande formel användas för att beräkna den mängd DNA-spädningsbuffert (**DNA SD**) som behövs för att bereda minst 35 µl spädd DNA-stamlösning. Det är för att säkerställa att minst 5 µl DNA-stamlösning används i varje prov.
Volymen DNA SD som behövs i µl = $[(5 \text{ µl DNA-stamlösning} \times \text{DNA-stamlösningskonc. i ng/µl}) \div 5 \text{ ng/µl}] - 5 \text{ µl}$
- B. Använd den beräknade volymen **DNA SD** för att späda 5 µl DNA-stamlösning.
- Exempel:
DNA-stamlösningskoncentration = 42 ng/µl
- A. Volymen DNA SD som behövs i µl = $[(5 \text{ µl} \times 42 \text{ ng/µl}) \div 5 \text{ ng/µl}] - 5 \text{ µl} = 37 \text{ µl}$
- B. Använd den beräknade volymen **DNA SD** för att späda 5 µl DNA-stamlösning.

Spädning av prov

- A. Förbered det antal 1,5 ml mikrocentrifugrör för spädningar av prov-DNA-stamlösning som behövs genom att märka dem med aktuell providentifiering i området för tillsats av prover.
- B. Använd en pipett med aerosolresistent pipettspets och pipettera den beräknade volymen DNA-spädningsbuffert (**DNA SD**) i varje märkt provrör.
- C. Vortexa varje prov-DNA-stamlösning i 10 sekunder.
- D. Använd en pipett med aerosolresistent spets och pipettera försiktigt den beräknade volymen av varje prov-DNA-stamlösning i motsvarande märkt rör med **DNA SD**. Använd en ny pipettspets för varje prov.

- E. Förslut och blanda varje spädd prov-DNA-stamlösning genom att vortexa i 10 sekunder.
- F. Byt handskar.

Beredning av Working Master Mix (MMX)

OBS! BRAF Oligo Mix och Working MMX är ljuskänsliga. Alla öppna blandningar av BRAF OM och Working MMX ska skyddas mot långvarig exponering för ljus.

- A. Beräkna volymen **RXNMIX** som behövs med hjälp av följande formel:

Volymen **RXNMIX** som behövs = (antal prover + 2 kontroller + 1) × 10 µl

- B. Beräkna volymen **BRAF OM** som behövs med hjälp av följande formel:

Volymen **BRAF OM** som behövs = (antal prover + 2 kontroller + 1) × 8 µl

- C. Beräkna volymen **MGAC** som behövs med hjälp av följande formel:

Volymen **MGAC** som behövs = (antal prover + 2 kontroller + 1) × 7 µl

Tabell 1 kan användas för att bestämma volymen för varje reagens som behövs för beredning av Working MMX baserat på antalet prover som ingår i körningen.

Tabell 1

		Volym reagens som behövs för Working MMX									
		Antal prover*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RXN MIX	10 µl	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BRAF OM	8 µl	32	40	48	56	64	72	80	88	96	104
MGAC	7 µl	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
Total volym µl		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Antal prover + 2 kontroller + 1

- D. Ta fram motsvarande antal rör med **RXNMIX**, **BRAF OM** och **MGAC** från förvaringen i 2–8 °C. Vortexa varje reagens i 5 sekunder för att samla upp vätska från botten av röret innan användning. Märk ett sterilt mikrocentrifugrör för Working Master Mix (MMX).
- E. Tillsätt den beräknade volymen **RXNMIX** i det märkta MMX-röret.
- F. Tillsätt den beräknade volymen **BRAF OM** i det märkta MMX-röret.
- G. Tillsätt den beräknade volymen **MGAC** i det märkta MMX-röret.
- H. Vortexa röret i 5 sekunder så att innehållet blandas tillräckligt.

OBS! Använd endast mikrotiterplatta (AD-platta) och skyddsfilm till cobas® 4800-systemet (Roche M/N: 05232724001).

- I. Tillsätt försiktigt 25 µl arbets-MMX i varje reaktionsbrunn på AD-plattan som behövs för körningen. Se till att pipettspetsen inte vidrör plattan utanför brunnen.

Tillsats av kontroller och prover:

- A. Tillsätt 25 µl **BRAF MUT**-kontroll i brunn **A01** på mikrotiterplattan (AD-platta). Blanda innehållet i brunnen noga genom att pipettera upp och ned minst två gånger.
- B. Använd en ny pipettspets och tillsätt 25 µl **BRAF WT**-kontroll i brunn **B01** på AD-plattan. Blanda innehållet i brunnen noga genom att pipettera upp och ned minst två gånger.

OBS! Varje körning måste innehålla både en BRAF MUT-kontroll i position A01 och en BRAF WT-kontroll i position B01, annars kommer körningen att ogiltigförklaras av analysinstrumentet cobas z 480.

OBS! Byt handskar för att motverka kontamination mellan prover och utvändigt kontamination av PCR-plattan.

- C. Tillsätt med hjälp av en pipett med aerosolbarriärspets 25 µl spädd prov-DNA i den aktuella brunnen med Working MMX. Starta från position **C01** på AD-plattan och följ mallen i Bild 1 nedan. Blanda innehållet i brunnen noga genom att pipettera upp och ned minst två gånger. Kontrollera att all vätska är samlad i botten av brunnen.

OBS! Prov-DNA och kontroller ska tillsättas på AD-plattan inom 1 timme efter beredning av Working Master Mix (MMX).

Bild 1

Layout för provplatta												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BRAF MUT	Prov 7	Prov 15	Prov 23								
B	BRAF WT	Prov 8	Prov 16	Prov 24								
C	Prov 1	Prov 9	Prov 17									
D	Prov 2	Prov 10	Prov 18									
E	Prov 3	Prov 11	Prov 19									
F	Prov 4	Prov 12	Prov 20									
G	Prov 5	Prov 13	Prov 21									
H	Prov 6	Prov 14	Prov 22									
												

D. Fortsätt tills alla testprover har tillsatts i AD-plattan.

E. Täck AD-plattan med skyddsfilm (medföljer plattorna). Använd skyddsfilmapplicatorn för att säkerställa att skyddsfilmens förslut noga mot AD-plattan.

F. Bekräfta att all vätska är uppsamlad i botten av varje brunn innan amplifiering och detektion startas.

OBS! Amplifiering och detektion ska påbörjas inom 1 timme efter tillsats av prov-DNA och kontroller i Working MMX.

Starta PCR-körning

Detaljerad information om stegen i BRAF-arbetsflödet finns i användarhandboken till **cobas[®] 4800**-systemet eller i användarassistansen till **cobas[®] 4800**-systemet.

Tolkning av resultat

OBS! All körnings- och provvalidering utförs av programmet cobas[®] 4800 BRAF AP.

OBS! En giltig körning kan innehålla både giltiga och ogiltiga provresultat.

Om körningen är giltig tolkas provresultaten enligt Tabell 2.

Tabell 2
Tolkning av provresultat

Resultat för cobas BRAF Test	Betydelse
Mutation Detected	V600-mutation detekterad i BRAF kodon 600 i exon 15
Mutation Not Detected eller No Mutation Detected*	V600-mutation inte detekterad i BRAF kodon 600 i exon 15
Invalid	Ogiltigt resultat. Upprepa testning av prover med ogiltiga resultat enligt instruktionerna i avsnittet Omtestning av prover med ogiltiga resultat nedan.
Failed	Misslyckad körning på grund av fel på maskin- eller programvara.

* Resultatet "Mutation Not Detected" utesluter inte förekomst av en mutation i BRAF kodon 600 eftersom resultaten beror på antalet mutantsekvenskopior i provet och kan påverkas av provets renhet, mängden isolerat DNA och förekomst av interfererande substanser.

Omtestning av prover med ogiltiga resultat

- A. Upprepa spädningen av den ogiltiga DNA-stamlösningen från prov med början från procedurerna **Beräkning av spädning av DNA-stamlösning från prov** och **Spädning av prov** i avsnittet **AMPLIFIERING OCH DETEKTION**.

Obs! Om det inte finns tillräcklig prov-DNA-stamlösning kvar för att utföra en ny spädning av DNA-stamlösningen, ta ett nytt vävnadssnitt på 5 µm och isolera DNA på nytt med **cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190)**. Fortsätt sedan med steg B nedan.

- B. Efter spädning av DNA-stamlösning till 5 ng/µl som beskrivs i **Spädning av prov**, utför en ytterligare spädning på 1:2 genom att ta 20 µl av den spädda DNA-stamlösningen och tillsätt 20 µl DNA-spädningsbuffert (**DNA SD**).

- C. Fortsätt med **Beredning av Working Master Mix (MMX)** och resten av amplifierings- och detektionsproceduren.

Obs! Om provet är ogiltigt efter omtestning med en spädning på 1:2, upprepa hela testproceduren för det provet och börja då med DNA-isolering med hjälp av **cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190)** och använd ett nytt FFPE-snitt på 5 µm. Standardvolymen 25 µl DNA med 5 ng/µl (utan ytterligare spädning) ska användas för amplifiering och detektion.

KVALITETSKONTROLL

cobas BRAF Test mutationskontroll (**BRAF MUT**) och vildtypskontroll (**BRAF WT**) ingår i varje körning. En körning är giltig om både **BRAF MUT**-kontrollbrunnen (**A01**) och **BRAF WT**-kontrollbrunnen (**B01**) har en giltig kontrollstatus. Om **BRAF MUT**-kontrollen eller **BRAF WT**-kontrollen är ogiltig måste provet upprepas. Bered en ny spädning av den tidigare isolerade prov-DNA-stamlösningen för att förbereda en ny AD-platta med kontroller för amplifiering och detektion.

BRAF-mutationskontroll

BRAF MUT-kontrollresultatet måste vara "Valid". Kontakta Roche kundsupport och begär teknisk hjälp om **BRAF MUT**-kontrollresultaten genomgående är ogiltiga.

BRAF-vildtypskontroll

BRAF WT-kontrollresultatet måste vara "Valid". Kontakta Roche kundsupport och begär teknisk hjälp om **BRAF WT**-kontrollresultaten genomgående är ogiltiga.

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

Liksom för alla testmetoder är det mycket viktigt att använda god laboratorieteknik för att denna analys ska fungera korrekt. Med hänsyn till PCR-baserade testers höga analytiska sensitivitet är noggrannhet nödvändig så att reagens- och amplifieringsblandningarna hålls rena.

TESTETS BEGRÄNSNINGAR

- Testa endast de angivna provtyperna. **cobas** BRAF Test har endast validerats för att användas med melanom- och PTC FFPE-prover.
- cobas** BRAF Test har endast validerats med användning av **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N: 05985536190) för att extrahera genomiskt DNA.
- Detektion av en mutation är beroende av antalet mutantsekvenskopior i provet och kan påverkas av provets renhet, mängden isolerat DNA och förekomst av interfererande substanser.
- Resultatens tillförlitlighet förutsätter rätt fixering, transport, förvaring och bearbetning av prover. Följ beskrivningarna i denna bipacksedel och i användarhandboken till **cobas®** 4800-systemet eller i användarassistansen till **cobas®** 4800-systemet.
- Tillsats av AmpErase-enzym i **cobas** BRAF Test Reaction Mix möjliggör selektiv amplifiering av mål-DNA. Kontaminering av reagens kan dock endast undvikas om god laboratoriesed tillämpas och de förfaranden som beskrivs i den här bipacksedeln följs noga.
- Produkten får endast användas av personal med utbildning i PCR-teknik och användning av **cobas®** 4800-systemet.
- Endast **cobas®** 4800-systemet har validerats för användning med denna produkt. Inget annat PCR-system har validerats med denna produkt.
- På grund av inneboende skillnader mellan metoder rekommenderas användaren, innan en metod byts ut mot en annan, att genomföra metodkorrelationsanalyser i laboratoriet för att bestämma skillnaderna mellan metoderna.
- Effekterna av andra möjliga variabler, t.ex. vid fixering av prover, har inte utvärderats.
- Mutationer och varianter inom regionerna för BRAF-genen som täcks av primers eller prober som används i **cobas** BRAF Test är visserligen sällsynta, men kan resultera i att BRAF V600-allelen inte amplifieras eller att mutationer i kodon 600 inte detekteras.
- Närvaron av PCR-hämmare kan orsaka falskt negativa eller ogiltiga resultat.
- Melanin är en känd hämmare för PCR-reaktioner. DNA-provberedningskitet avlägsnar melanin från provet under extraktionen. Det kan dock finnas kvar melanin i provet som orsakar ogiltiga resultat. Om du misstänker att melanin hämmar reaktionen rekommenderar vi att du upprepar testet med en 1:2-spädning enligt beskrivningen i "Omtestning av prover med ogiltiga resultat".
- cobas** 4800 BRAF V600 Mutation Test visar begränsad korsreaktivitet med icke-V600E-mutanta prover (V600K, V600D och V600E2). Mer information finns i avsnittet "Melanom – Utvärdering av icke-kliniska egenskaper".
- FFPE-prover som innehåller degraderat DNA kan påverka testets möjlighet att detektera mutationen.
- cobas** 4800 BRAF Mutation Test är ett kvalitativt test. Testet är inte avsett för kvantitativa mätningar av mutation.

I. MELANOM

UTVÄRDERING AV ICKE-KLINISKA EGENSKAPER

För de icke-kliniska studier som beskrivs nedan fastställdes procentandelen tumörinnehåll genom patologigranskning och melaninandelen fastställdes genom patologigranskning och en intern melaninbestämningsanalys. Bidirektionell Sanger-sekvensering användes för att välja prover för testning. Procentandelen mutationsnivå bestämdes med 454-sekvensering (kvantitativ massiv parallell pyrosekvenseringsmetod).

Analytisk sensitivitet

Analytisk sensitivitet och detektionsgräns (LoD)

Den minsta mängden input-DNA som producerar korrekta resultat i 95 % av fallen bedömdes med spädningspaneler som beretts från tre typer av prover:

- Provblandningar som beretts genom att blanda DNA-stamlösningar som erhållits från BRAF V600E-mutant-FFPET-prover och BRAF-vildtyp-FFPET-prover för att uppnå specifika mutationsnivåer.
- Individuella FFPET DNA-stamlösningar som beretts från tre BRAF V600E-mutant-FFPET-prover.
- Cellinjeblandning som beretts genom att blanda DNA-stamlösningar som erhållits från en BRAF V600E-mutant-cellinje och en BRAF-vildtyp-cellinje.

Alla prover som användes i den här studien sekvenserades med 454-sekvensering för att bestämma procentandelen mutation i varje prov.

Analytisk sensitivitet med provblandningar

BRAF V600E-mutant-FFPET-prov-DNA-stamlösningar blandades med BRAF-vildtyp-FFPET-prov-DNA-stamlösningar för att uppnå ett prov vid ~10 %, tre prover vid ~5 % och ett prov vid ~3 % mutationsnivå. Ett BRAF-vildtyp-prov testades också. Efter blandning verifierades mutationsnivåerna med 454-sekvensering. Var och en av de fem provblandningarna med V600E-mutation (dock inte vildtyp-provet) späddes sedan för att producera de panelprover som redovisas i Tabell 3.

Tabell 3
Beredning av spädda panelprover från provblandningar

Blandning	Genomsnittlig procentandel mutation*	Mängd DNA i spädda panelprover (ng/25 µl)**
10 % blandning	9 % (n = 6)	125, 62,5, 31,3
5 % blandning 1	5 % (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
5 % blandning 2	5 % (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
5 % blandning 3	6 % (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
2,5 % blandning	3 % (n = 5)	125, 62,5, 31,3
0 % (endast vildtyp)	- - -	125

* Genomsnittlig procentandel mutation av blandningen, testad med 454-sekvensering.

** Mängden genomiskt DNA i varje panelprov. 25 µl är provvolym för testet.

Åtta (8) replikat av varje panelprov kördes med vardera 3 **cobas** BRAF Test-kitloter (n = 24/panelprov). I Tabell 4 visas sensitiviteten hos varje FFPET-blandning, som bestämts av den lägsta mängd DNA som gav ett BRAF V600E "Mutation Detected"-värde på minst 95 % (skuggade rader).

Tabell 4
Sensitivitet för cobas BRAF Test med FFPET-blandningar

FFPET-blandning	Procentandel mutation med 454-sekvensering	Mängd DNA i panelprovet	"Mutation Detected"-värde (n = 24)
10 % FFPET-blandning	9 %	125 ng/25 µl	100 %
		62,5 ng/25 µl	100 %
		31,3 ng/25 µl	100 %
5 % FFPET-blandning 1	5 %	125 ng/25 µl	96 %
		5,0 ng/25 µl	100 %
		2,5 ng/25 µl	100 %
		1,3 ng/25 µl	75 %
		0,6 ng/25 µl	88 %
		0,3 ng/25 µl	71 %
5 % FFPET-blandning 2	5 %	125 ng/25 µl	100 %
		5,0 ng/25 µl	92 %
		2,5 ng/25 µl	100 %
		1,3 ng/25 µl	96 %
		0,6 ng/25 µl	58 %
		0,3 ng/25 µl	50 %
5 % FFPET-blandning 3	6 %	125 ng/25 µl	100 %
		5,0 ng/25 µl	100 %
		2,5 ng/25 µl	100 %
		1,3 ng/25 µl	100 %
		0,6 ng/25 µl	96 %
		0,3 ng/25 µl	71 %
2,5 % FFPET-blandning	3 %	125 ng/25 µl	0 %
		62,5 ng/25 µl	4 %
		31,3 ng/25 µl	4 %
0 % (vildtyp)	- - -	125 ng/25 µl	0 %

Denna studie visar att **cobas** BRAF Test kan detektera BRAF V600E-mutationen vid ≥ 5 % mutationsnivå med standard-input på 125 ng/25 µl. Testets förmåga att detektera mutation vid lägre DNA-input-nivåer visar att proverna kan innehålla degraderat DNA från fixeringsprocessen och mutationen ändå detekteras. Alla testresultat som erhöles för BRAF vildtyp-provet var "Mutation Not Detected".

Analytisk sensitivitet med FFPET-prover

För att bekräfta mutationsdetektionsvärdet på 5 % i patientprover har 48 enskilda snitt på 5 µm från vardera 3 BRAF V600E-mutant-FFPET-prover med mutationsnivåer på 6 %, 12 % och 4 % bearbetats individuellt med 3 loter av **cobas**® DNA Sample Preparation Kit för att isolera DNA. För att bedöma påverkan av melanin på analysen inkluderades ett prov (6 % mutation) med hög melaninkoncentration. Seriella spädningar av DNA från varje snitt bereddades för att producera en uppsättning om 6 panelprover som redovisas i Tabell 5.

Tabell 5
Beredning av spädda panelprover från FFPET-prover

FFPET-prov	Provinformation		Mängd DNA i spädda panelprover (ng/25 µl)
	Genomsnittlig procentandel V600E-mutation*	Pigmentering	
Prov 1	6 %	Högpigmenterat**	125, 15,6, 7,8, 3,9, 2,0, 1,0
Prov 2	12 %	NHP***	125, 7,8, 3,9, 2, 1, 0,5
Prov 3	4 %	NHP	125, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9, 2,0

* Genomsnittlig procentandel mutation av blandningen, bestämd med 454-sekvensering

** Högpigmenterat baserat på visuell bedömning, melaninkoncentration = 0,17/25 µl

*** NHP = Inte högpigmenterat baserat på visuell bedömning

Sexton (16) replikat av varje panelprov kördes med vardera 3 **cobas** BRAF Test-kitloter (n = 48/panelprov). Sensitiviteten hos varje FFPET-prov bestämdes av den lägsta mängd DNA som gav ett BRAF V600E "Mutation Detected"-värde på minst 95 % (skuggade rader). Resultaten från studien visas i Tabell 6.

Tabell 6
Sensitivitet för cobas BRAF Test med FFPET-prover

FFPET-prov	Procentandel mutation med 454-sekvensering	Mängd DNA i panelprovet	"Mutation Detected"-värde (n = 48)
Prov 1	6 %	125 ng/25 µl	100 %
		15,6 ng/25 µl	100 %
		7,8 ng/25 µl	98 %
		3,9 ng/25 µl	98 %
		2,0 ng/25 µl	81 %
		1,0 ng/25 µl	71 %
Prov 2	12 %	125 ng/25 µl	100 %
		7,8 ng/25 µl	100 %
		3,9 ng/25 µl	100 %
		2,0 ng/25 µl	98 %
		1,0 ng/25 µl	98 %
		0,5 ng/25 µl	94 %
Prov 3	4 %	125 ng/25 µl	98 %
		31,3 ng/25 µl	98 %
		15,6 ng/25 µl	85 %
		7,8 ng/25 µl	90 %
		3,9 ng/25 µl	90 %
		2,0 ng/25 µl	67 %

Studien visade att **cobas** BRAF Test kan detektera BRAF V600E-mutationen i faktiska kliniska FFPET-prover vid ≥ 5 % mutationsnivå med standard-input på 125 ng/25 µl. Testets förmåga att detektera mutation vid lägre DNA-input-nivåer visar att proverna kan innehålla degraderat DNA från fixeringsprocessen och mutationen ändå detekteras. Ett högpigmenterat prov som ingick i studien föreföll inte påverka testets sensitivitet.

Analytisk sensitivitet med cellinjeblandningar

DNA-stamlösningar från två melanom-cellinjer [SK-MEL 28 (BRAF V600E-mutant) och SK-MEL 2 (BRAF-vildtyp)] blandades för att uppnå ett prov vid 5 % mutation, verifierat med 454-sekvensering. Tre separata spädningspaneler innehållande DNA från 125 ng/25 µl till 0 ng/25 µl bereddes. Tjugo (20) replikat av varje panelprov testades med vardera 3 **cobas** BRAF Test-kitloter (totalt 60 replikat). Sensitiviteten bestämdes av den lägsta mängd DNA som gav ett BRAF V600E "Mutation Detected"-värde på minst 95 % (skuggad rad). Resultaten från studien visas i Tabell 7.

Tabell 7
Sensitivitet för cobas BRAF Test med cellinjeblandningar

Cellinjeblandning	Genomsnittlig procentandel mutation med 454-sekvensering	Mängd DNA i panelprovet	"Mutation Detected"-värde (n = 60)
Cellinjeblandning	5 %	125,0 ng/25 µl	97 %
		31,3 ng/25 µl	100 %
		15,6 ng/25 µl	95 %
		7,8 ng/25 µl	98 %
		3,9 ng/25 µl	95 %
		2,0 ng/25 µl	82 %
		1,0 ng/25 µl	78 %
		0,5 ng/25 µl	77 %

cobas BRAF Test gav ett "Mutation Detected"-värde på 95 % vid 3,9 ng/25 µl, vilket representerar en spädning på 1:32 av rekommenderad DNA-input på 125 ng/25 µl. Detta indikerar att testet detekterar BRAF V600E-mutation när ~97 % av DNA är degraderat på grund av fixeringsprocessen, om man antar att cellinje-DNA innehöll 100 % intakt och amplifierbart DNA.

Genomiskt input-intervall

Rekommenderad DNA-input för **cobas** BRAF Test är 125 ng. Olika input-mängder av genomiskt DNA kan vara ett resultat av DNA-kvantitetsfel och/eller variationer i mängden degraderat DNA. För att utvärdera effekterna av olika input-mängder av genomiskt DNA extraherades genomiskt DNA från 11 melanom-FFPET-prover, valda på grund av mutationsstatus och pigmenteringsnivå, och spädades seriellt med prov-input som representerade 250 ng, 125 ng, 62,5 ng och 31,3 ng/25 µl. Alla 4 DNA-nivåerna utvärderades med 2 olika reagensloter. Förväntade resultat erhöles för alla input-nivåer av genomiskt DNA.

Lägsta tumörandel

Trettio (33) BRAF V600E-mutanta prover testades för att avgöra den lägsta andelen tumör som krävs för att detektera BRAF V600E-mutationen i prover med en tumörandel från 5 % till 50 %, utan makrodissektion. Ett (1) snitt från varje prov testades med **cobas** BRAF Test.

cobas BRAF Test detekterade korrekt alla BRAF V600E-mutanta prover som hade en lägsta procentandel mutant DNA över 5 % och när den lägsta tumörandelen var minst 15 % så som visas i Tabell 8. Prover vars tumörandel var lägre än 15 % och hade mindre än 5 % mutation rapporterades som "mutation-not-detected". Dessutom utvärderades ytterligare 24 vildtyp-prover med tumörandel från 5 till 45 % vid den rekommenderade DNA-input-koncentrationen på 125 ng/25 µl. Alla vildtyp-prover identifierades korrekt. Makrodissektion för prover vars area innehåller < 50 % tumörceller krävs.

Tabell 8
Resultat vid test av 33 BRAF V600E-prover med olika procentandelar tumör respektive mutation

Provnummer	Tumörandel*	% mutation	Testresultat
1	5 % / 5 %	3 %	Mutation Not Detected
2	5 % / 5 %	5 %	Mutation Not Detected
3	5 % / 5 %	1 %	Mutation Not Detected
4	10 % / 10 %	4 %	Mutation Not Detected
5	10 % / 10 %	14 %	Mutation Detected
6	15 % / 10 %	6 %	Mutation Detected
7	15 % / 15 %	23 %	Mutation Detected
8	15 % / 15 %	3 %	Mutation Detected
9	15 % / 15 %	29 %	Mutation Detected
10	15 % / 15 %	14 %	Mutation Detected
11	15 % / 15 %	14 %	Mutation Detected
12	15 % / 20 %	5 %	Mutation Detected

Provnummer	Tumörandel*	% mutation	Testresultat
13	20 % / 20 %	28 %	Mutation Detected
14	20 % / 20 %	2 %	Mutation Detected
15	25 % / 20 %	13 %	Mutation Detected
16	25 % / 25 %	25 %	Mutation Detected
17	30 % / 25 %	20 %	Mutation Detected
18	30 % / 30 %	10 %	Mutation Detected
19	30 % / 35 %	4 %	Mutation Detected
20	30 % / 35 %	17 %	Mutation Detected
21	35 % / 30 %	8 %	Mutation Detected
22	35 % / 35 %	7 %	Mutation Detected
23	35 % / 35 %	12 %	Mutation Detected
24	35 % / 35 %	22 %	Mutation Detected
25	35 % / 40 %	36 %	Mutation Detected
26	40 % / 35 %	7 %	Mutation Detected
27	40 % / 35 %	12 %	Mutation Detected
28	40 % / 40 %	14 %	Mutation Detected
29	40 % / 40 %	21 %	Mutation Detected
30	40 % / 40 %	28 %	Mutation Detected
31	40 % / 45 %	36 %	Mutation Detected
32	45 % / 45 %	10 %	Mutation Detected
33	50 % / 40 %	8 %	Mutation Detected

** Tumörandelen i provet bedömdes genom att det första och sista av tolv angränsande snitt på 5 µm för varje prov undersöktes av en patolog. Tumörandelen för både det första och det sista snittet visas (t.ex. 95 % / 95 %).*

Korsreaktivitet

Korsreaktiviteten för **cobas** BRAF Test utvärderades genom att testa följande provtyper:

- BRAF icke-V600E mutanta melanom-FFPET-prover med olika mutationsnivåer,
- plasmider med BRAF icke-V600E-mutationer,
- plasmider med BRAF-homologer,
- hudrelaterade mikroorganismer.

Korsreaktiviteten utvärderades också genom att bestämma huruvida förekomsten av BRAF-homologa plasmider eller hudrelaterade mikroorganismer interfererade med detektion av BRAF V600E-mutationen.

BRAF icke-V600E melanom-FFPET-prover

Fjorton (14) melanom-FFPET-prover med BRAF icke-V600E-mutationer (V600D, V600E2, V600R eller V600K) testades tre gånger med **cobas** BRAF Test. För åtta av BRAF icke-V600E-proverna visade alla tre replikaten korsreaktivitet med **cobas** BRAF Test. Dessa åtta prover var: BRAF V600D-mutant (18 % mutation), BRAF V600E2-mutant (68 % mutation) och BRAF V600K-mutant (mer än 30 % mutation). Ingen korsreaktivitet observerades för provet BRAF V600R-mutant (23 % mutation) vilket visas i Tabell 9.

Tabell 9
cobas BRAF Test, "Mutation Detected"-värden för BRAF icke-V600E-mutationer i FFPET-prover

Provnummer	BRAF-mutationsstatus	Procentandel mutation	Tumörandel*	Tumörstadium	"Mutation Detected"-värde (n = 3)
1	V600D	18 %	30 % / 30 %	IV	100 %
2	V600E2	16 %	75 % / 75 %	IV	0 %
3		36 %	75 % / 80 %	III	0 %
4		68 %	75 % / 75 %	IV	100 %
5	V600R	23 %	15 % / 15 %	IV	0 %
6	V600K	17 %	25 % / 25 %	III	0 %
7		22 %	35 % / 40 %	IV	0 %
8		23 %	40 % / 40 %	IV	0 %
9		31 %	60 % / 60 %	IV	100 %
10		35 %	75 % / 75 %	IV	100 %
11		39 %	80 % / 80 %	IV	100 %
12		36 %	95 % / 95 %	IIC	100 %
13		62 %	75 % / 75 %	IV	100 %
14		69 %	80 % / 80 %	IV	100 %

* Tumörandelen i provet bedömdes genom att det första och sista av tolv angränsande snitt på 5 µm för varje prov undersöktes av en patolog. Tumörandelen för både det första och det sista snittet visas (t.ex. 95 % / 95 %).

En spädningspanel med elva prover med DNA-koncentrationer från 5,0 ng/µl ned till 0,0049 ng/µl (motsvarande mellan 125 till 0,1 ng DNA i provvolymen 25 µl för testet) bereddes och varje panelprov testades tre gånger för att bestämma den lägsta mängden DNA som gav ett "Mutation Detected"-värde på 100 % för de åtta prover som visade sig korsreagera i **cobas** BRAF Test. Den lägsta DNA-input-nivån innan förlust av korsreaktivitet observerades låg mellan 0,5 ng / 25 µl för ett BRAF V600K-mutant prov med 69 % mutation och 15,6 ng / 25 µl för ett BRAF V600D-mutant prov med 18 % mutation (Tabell 10).

Tabell 10
Lägsta DNA-input för detektion av korsreaktivitet i cobas BRAF Test

Provnummer	BRAF-mutationsstatus	Procentandel mutation	Lägsta mängd DNA-input innan förlust av korsreaktivitet (n = 3)
1	V600D	18 %	15,6 ng/25 µl
2	V600E2	68 %	7,8 ng/25 µl
3	V600K	31 %	3,9 ng/25 µl
4		35 %	3,9 ng/25 µl
5		39 %	3,9 ng/25 µl
6		36 %	2,0 ng/25 µl
7		62 %	3,9 ng/25 µl
8		69 %	0,5 ng/25 µl

BRAF-icke-V600E-plasmider

Plasmidspädningspaneler med mutationsnivåer från 5 % till 75 % i en bakgrund av vildtyp-plasmid bereddes för följande nio BRAF-icke-V600E-mutationer: D594G, G596R, K601E, L597Q, L597S, V600D, V600E2, V600K och V600R. Tre replikat av varje prov i spädningspanelerna som hade beretts för varje plasmid testades med **cobas** BRAF Test. Korsreaktivitet observerades i alla 3 replikat för BRAF V600D-plasmid vid ≥ 10 % mutation, BRAF V600K-plasmid vid ≥ 35 % mutation och BRAF V600E2-plasmid vid ≥ 65 % mutation. Ingen korsreaktivitet observerades med plasmider från de sex övriga BRAF-mutationer som testades.

Plasmider med BRAF-homologer

Prover bereddes för tre BRAF-homologa plasmider (BRAF-pseudogen, ARAF och RAF1), BRAF V600E-mutant plasmid och BRAF vildtyp-plasmid så som visas i Tabell 11. Tre till sex replikat av varje panelprov testades med **cobas** BRAF Test.

Tabell 11
BRAF-homologplasmidprover

Panel		Komposition efter volym	
Namn	Prov	Komponent 1	Komponent 2
BRAF-pseudogen	1	95 % BRAF-pseudogen	5 % BRAF V600E-mutant
	2	100 % BRAF-pseudogen	- - -
ARAF	1	95 % ARAF	5 % BRAF V600E-mutant
	2	100 % ARAF	- - -
RAF1	1	95 % RAF1	5 % BRAF V600E-mutant
	2	100 % RAF1	- - -
Kontroll	1	95 % BRAF-vildtyp	5 % BRAF V600E-mutant
	2	100 % BRAF-vildtyp	- - -
	3	95 % DNA-elueringsbuffert	5 % BRAF V600E-mutant

Ingen av de tre BRAF-homologplasmider som testades detekterades av **cobas** BRAF Test när de testades fristående, vilket indikerar att BRAF-homologplasmider inte korsreagerar med testet.

BRAF V600E-mutantplasmiden vid 5 % i närvaro av 95 % av BRAF-homologplasmiderna gav förväntade "Mutation Detected"-resultat för alla fall, vilket indikerar att homologplasmiderna inte interfererade med detektionen av BRAF V600E-mutationen.

Hudrelaterade mikroorganismer

Följande hudrelaterade mikroorganismer visade sig inte korsreagera i **cobas** BRAF Test när de tillsattes i ett vildtyp-melanom-FFPET-prov vid 1×10^6 kolonibildande enheter (CFU) under vävnadslyseringssteget:

1. *Staphylococcus epidermidis*
2. *Staphylococcus aureus*
3. *Corynebacterium xerosis*
4. *Corynebacterium jeikeium*
5. *Corynebacterium minutissimum*
6. *Corynebacterium ulcerans*

De testade mikroorganismerna interfererade inte heller med detektion av ett FFPET-prov med 8 % BRAF V600E-mutation när 1×10^6 kolonibildande enheter (CFU) tillsattes under vävnadslyseringssteget.

Interferens

Triglycerider (≤ 74 mM, $2\times$ rekommenderad nivå från CLSI för hög koncentration¹⁷), hemoglobin (≤ 2 mg/ml, $1\times$ rekommenderad nivå från CLSI för hög koncentration¹⁷), och ≤ 95 % nekrotisk vävnad har visat sig inte interferera med **cobas** BRAF Test när det potentiella interfererande ämnet tillsattes i lyseringssteget under provberedningen.

Melanin

Påverkan av höga koncentrationer av endogent melanin utvärderades med högpigmenterade melanom-FFPET-prover. Totalt 41 unika FFPET-melanom-prover från tumörvävnad valdes ut baserat på pigmenteringsnivå: 33 var högpigmenterade, 3 hade afrikanskt-amerikanskt ursprung och 5 var lätt pigmenterade för jämförelse. DNA extraherades från vävnaden och melaninkoncentrationen bestämdes för varje prov. Ett replikat av DNA-stamlösning från de två snitten som erhållits från vart och ett av de 41 proven testades. Tre prover gav ogiltiga resultat. Ett prov gav ett "Mutation Not Detected"-resultat men detta prov bedömdes att ligga under detektionsgränsen. De 3 proverna med "Invalid"-resultat användes för att bereda den rekommenderade koncentrationen av DNA för testet liksom tvåfaldiga, fyrfaldiga och åttafaldiga spädningar av rekommenderad DNA-input på 125 ng/PCR. De resulterande spädda DNA-proverna (innehållande totalt 125 ng, 61,5 ng, 31,25 ng eller 15,6 ng DNA i 25 μ l) testades om för att bestämma om giltiga resultat kunde erhållas med motsvarande reducering av melanin genom spädning. Alla tre proverna gav korrekta resultat när de späddes två gånger.

Tabell 12
Sammanfattning av prestanda hos cobas BRAF Test med pigmenterade melanom-FFPET-prover

Prov-ID	Spädning	Melaninmängd i prov/PCR	Resultat
1	Inget (125 ng)	0,15 µg	Invalid/Invalid
	Tvåfaldigt (62,5 ng)	0,08 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Fyrfaldigt (31,3 ng)	0,04 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Åttafaldigt (15,6 ng)	0,02 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
2	Inget (125 ng)	0,24 µg	Invalid/Invalid
	Tvåfaldigt (62,5 ng)	0,12 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Fyrfaldigt (31,3 ng)	0,06 µg	Mutation Detected/Mutation Not Detected
	Åttafaldigt (15,6 ng)	0,03 µg	Mutation Not Detected/Invalid
3	Inget (125 ng)	0,34 µg	Invalid/Invalid
	Tvåfaldigt (62,5 ng)	0,17 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Fyrfaldigt (31,3 ng)	0,08 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Åttafaldigt (15,6 ng)	0,04 µg	Mutation Detected/Mutation Detected

Resultaten från de 17 testade vildtyp-proverna visade att alla prover tilldelades ett korrekt "Mutation Not Detected"-resultat med undantag för 2 högpigmenterade prover som gav falskt positiva resultat.

KLINISKA EGENSKAPER

Reproducerbarhet

En studie utfördes för att bedöma reproducerbarheten hos **cobas** BRAF Test på 3 externa testlaboratorier (2 operatörer per labb), 3 reagensloter och 5 testdagar (ej i följd), med en panel på 8 DNA-prover från FFPET-snitt av malignt melanom. Panelen inkluderade både pigmenterade och icke-pigmenterade prover samt ett intervall av procentuellt tumörinnehåll och mutantalleler, inklusive ett prov vid detektionsgränsen 5 % (LoD). Av 94 körningar var 92 giltiga (97,9 %). Av 1 442 testade prover gav 2 prover (0,14 %) ogiltiga resultat. För alla panelprover med undantag för LoD-proverna angavs ett korrekt värde för 100 % av giltiga test, inklusive panelprover med 20 % mutation och två panelprover som bedömdes som högpigmenterade. För LoD-panelprovet detekterades V600E-mutation i 90 % (162/180) av proverna. Det fanns inga falskt positiva resultat för något testat vildtyp-prov. Sammanfattningsvis har **cobas** BRAF Test hög reproducerbarhet för både pigmenterade och icke-pigmenterade prover, i prover med lågt tumörinnehåll och med låg procentandel mutantalleler, med olika testlaboratorier, operatörer, reagensloter och testdagar. Analytisk specificitet var 100 %.

Korrelation till referensmetod för prover i klinisk fas III-studie

Prevalensen av V600E-mutation i den kliniska fas III-studien var 46,5 % baserat på resultat med **cobas** BRAF Test. Detta överensstämmer med prevalensen av V600E hos melanompatienter enligt publicerade rapporter.

För att utvärdera egenskaperna hos **cobas** BRAF Test vid jämförelse med 2× bidirektionell Sanger-sekvensering identifierades 596 patienter screenade för fas III-studien av vemurafenib, för vilka kliniska, demografiska och Sanger-sekvenseringsdata samlades in. Av dessa fall var 94 olämpliga på grund av ej uppfyllda inklusionskriterier, 4 fall utan patologigranskning, och 2 fall med ogiltiga resultat för **cobas** BRAF Test. Av återstående 496 lämpliga fall hade 47 prover ogiltiga resultat för Sanger-sekvensering, vilket lämnar 449 fall för utvärdering. Överensstämmelseanalysen mellan resultat för **cobas** BRAF Test och resultat för Sanger-sekvensering för detektion av V600E-mutationen visas i Tabell 13 nedan.

Tabell 13
Sammanfattning av resultat för cobas BRAF Test jämfört med Sanger-sekvensering

cobas BRAF Test (testmetod)	Sanger-sekvensering (referensmetod)		
	BRAF V600E Mutation Detected^a	BRAF V600E Mutation Not Detected^b	Totalt
Mutation Detected	216	35	251
Mutation Not Detected	6	192	198
Totalt	222	227	449
Positiv procentandel överensstämmelse (95 % KI)	100 % × 216 / 222 = 97,3 % (94,2 %, 98,8 %)		
Negativ procentandel överensstämmelse (95 % KI)	100 % × 192 / 227 = 84,6 % (79,3 %, 88,7 %)		
Total procentandel överensstämmelse (95 % KI)	100 % × 408 / 449 = 90,9 % (87,8 %, 93,2 %)		

^a "Mutation Detected" indikerar förekomst av den dominerande BRAF-mutationstypen, V600E (1799 T>A), identifierat med Sanger.

^b "Mutation Not Detected" indikerar frånvaro av den dominerande BRAF-mutationstypen, V600E, identifierat med Sanger (dvs. vildtyp eller ingen mutation, V600D, V600E2, V600K, V600R och övriga mutationer).

Obs! Melanomprover med giltiga parade resultat från både **cobas** BRAF Test och Sanger-sekvensering.

Obs! KI = konfidensintervall (score).

Alla 41 prover som gav avvikande resultat med **cobas** BRAF Test och Sanger-sekvensering fick genomgå 454-sekvensering (kvantitativ massiv parallell pyrosekvensering) som en andra referensmetod. Dessutom testades 33 överensstämmande prover för **cobas** BRAF Test och Sanger-sekvensering med 454-sekvensering. Den andra överensstämmelseanalysen, efter bestämning, visas i Tabell 14.

Av de 6 avvikande proverna som hade ett "Mutation Detected"-resultat med **cobas** BRAF Test och ett V600E-resultat med Sanger-sekvensering gav 454-sekvensering ett vildtyp-resultat i 5/6 prover (ett prov hade ett ogiltigt 454-resultat).

Av de 8/35 avvikande proverna som hade ett "Mutation Detected"-resultat med **cobas** BRAF Test och ett WT-resultat med Sanger-sekvensering detekterades en V600E-mutation i 7/8 prover med 454-sekvensering (ett prov hade ett ogiltigt 454-resultat).

Av de 27/35 avvikande proverna som hade ett "Mutation Detected"-resultat med **cobas** BRAF Test och ett icke-V600E-resultat med Sanger-sekvensering detekterades en V600K-mutation i 24 prover, en "V600E2" i ett prov och en V600E i ett prov med 454-sekvensering. I ett (1) prov detekterades en V600D-mutation med Sanger och ett vildtyp-resultat med 454-sekvensering.

Korsreaktiviteten hos **cobas** BRAF Test för V600K var 66 % (25/38).

Överensstämmelsen med 454-sekvensering var 100 % för de 33 V600E- och vildtyp-prover som överensstämde med **cobas** BRAF Test och Sanger-sekvensering.

Tabell 14
Jämförelse av resultat för cobas BRAF Test och Sanger-sekvensering efter bestämning med 454-sekvensering

cobas BRAF Test (testmetod)	Efter bestämning med 454-sekvensering		
	BRAF V600E Mutation Detected	BRAF V600E Mutation Not Detected	Totalt
Mutation Detected	224	27	251
Mutation Not Detected	1	197	198
Totalt	225	224	449
Positiv procentandel överensstämmelse (95 % KI)	100 % × 224 / 225 = 99,6 % (97,5 %, 99,9 %)		
Negativ procentandel överensstämmelse (95 % KI)	100 % × 197 / 224 = 87,9 % (83,0 %, 91,6 %)		
Total procentandel överensstämmelse (95 % KI)	100 % × 421 / 449 = 93,8 % (91,1 %, 95,7 %)		

Fördelning av BRAF kodon 600-mutationer

Fördelningen av kodon 600-mutationer bestämdes i de 496 lämpliga fallen baserat på en sammansättning av Sanger- och 454-sekvenseringsresultat. Av dessa 496 fall var 182 fall vildtyp och 314 fall mutanta. Fördelningen av kodon 600-mutationer bland 314 mutationspositiva fall visas i Tabell 15. V600K-mutationer identifierades i 13,4 % av alla fall med kodon 600-mutationer.

Tabell 15

Fördelning av BRAF kodon 600-mutationer i mutationspositiv population enligt bestämning med Sanger och/eller 454-sekvensering

Aminosyrasekvens (kodon 600)	Nukleotidsekvens (1798–1800)	N	% distribution
V600E	GAG	255	81,2
V600K	AAG	42	13,4
V600E2	GAA	13	4,1
V600R	AGG	3	1,0
V600D	GAC	1	0,3
Kodon 600-mutanter totalt		314	100
Kodon 600-vildtyp totalt		182	---

Klinisk effektivitet hos ZELBORAF® (vemurafenib)⁹

cobas BRAF Test användes som ett så kallat companion diagnostics-test för att välja ut patienter för behandling med ZELBORAF®. Den kliniska säkerheten och effektiviteten hos ZELBORAF® påvisades i NO25026-studien (BRIM3), en internationell, randomiserad, oblandad, kontrollerad, fas III-multicenterstudie av tidigare obehandlade patienter med icke-resektabelt melanom i stadie IIIC eller stadie IV med en V600E BRAF-mutation för att utvärdera den kliniska effektiviteten hos ZELBORAF® jämfört med dakarbazin (standardbehandling). FFPET-prover från alla melanompatienter som valts ut för behandling testades med **cobas** BRAF Test. Patienter med ett "Mutation Detected"-testresultat var lämpliga för deltagande i den här läkemedelsstudien om de även uppfyllde de andra kriterierna. Patienter med ett "Mutation Not Detected"-testresultat var olämpliga för deltagande i den här läkemedelsstudien. Studien genomfördes på ungefär 104 platser i hela världen (22 kliniker i USA).

I studien ingick 675 patienter, där 337 fick vemurafenib och 338 fick dakarbazin. De huvudsakliga mätparametrarna för effektiviteten i studien var total överlevnad (OS) och överlevnad utan progression (PFS) vid bedömning av prövare. Andra mätparametrar var bekräftad bästa totala responsgrad vid bedömning av prövare.

Baseline-karakteristiken balanserades mellan behandlingsgrupperna. De flesta patienterna var män (56 %) och kaukasier (99 %), medianåldern var 54 år (24 % var ≥ 65 år), samtliga patienter hade en ECOG-prestandastatus på 0 eller 1 och majoriteten av patienterna hade metastatisk sjukdom (95 %).

Resultaten för effektivitet från studien visas nedan i Tabell 16 och Bild 2:

Tabell 16

Effektivitet för vemurafenib hos behandlingsnaiva patienter med BRAFV600E mutationspositivt melanom^a

	Vemurafenib (N = 337)	Dakarbazin (N = 338)	p-värde ^d
Total överlevnad			
Antal dödsfall	78 (23 %)	121 (36 %)	-
Hazard ratio (95 % KI) ^b	0,44 (0,33, 0,59)		< 0,0001
Medianöverlevnad (månader) (95 % KI) ^c	NR ^e (9,6, NR)	7,9 (7,3, 9,6)	-
Mediantid för uppföljning (månader) (intervall)	6,2 (0,4, 13,9)	4,5 (< 0,1, 11,7)	
Hazard ratio för progressionsfri överlevnad (95 % KI) ^b	0,26 (0,20, 0,33)		< 0,0001
Median-PFS (månader) ^c	5,3 (4,9, 6,6)	1,6 (1,6, 1,7)	-

^a Enligt detektering med **cobas** BRAF Test

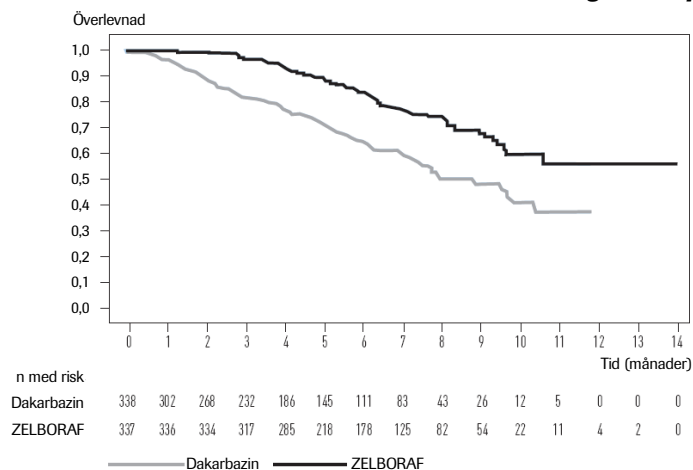
^b Hazard ratio uppskattad med hjälp av Cox-modellen; en hazard ratio på < 1 stödjer vemurafenib

^c Kaplan-Meier-uppskattning

^d Ostratifierat logrank-test

^e Ej uppnått (NR)

Bild 2
Kaplan-Meier-kurvor för total överlevnad – behandlingsnaiva patienter



Den bekräftade bästa totala responsgraden vid bedömning av prövare var 48,4 % (95 % KI: 41,6 %, 55,2 %) för ZELBORAF® jämfört med 5,5 % (95 % KI: 2,8 %, 9,3 %) för dakarbazin.

Klinisk effektivitet hos COTELLIC® (kobimetinib)^{10, 11}

COTELLIC®, en MEK-hämmare, testades i en klinisk studie (coBRIM) i kombination med ZELBORAF® jämfört med ZELBORAF® plus placebo. **cobas** BRAF Test användes för att bestämma lämpligheten för patienter att delta i den här kliniska studien. Säkerheten och effektiviteten hos kombinationen av COTELLIC® och ZELBORAF® fastställdes i en randomiserad (1:1), dubbelblindad, placebo-kontrollerad multicenterstudie som utfördes på 495 patienter med tidigare obehandlat, BRAF V600 mutationspositivt, icke-resektabelt eller metastatiskt melanom. Den huvudsakliga mätparametern var överlevnad utan progression (PFS) vid bedömning av prövare enligt RECIST v1.1. Ytterligare mätparametrar var objektiv responsgrad (ORR) vid bedömning av prövare, total överlevnad (OS), PFS enligt bedömning av blindad, oberoende central granskning och responsduration (DOR).

Baseline-karakteristiken balanserades mellan behandlingsgrupperna. De flesta patienterna var män (58 %) och kaukasier (93 %), medianåldern var 55 år, 72 % av patienterna hade en ECOG-prestandastatus på 0 och 60 % av patienterna hade sjukdom i stadiet M1c.

FFPET-prover från alla patienter som valts ut för behandling testades med **cobas** BRAF Test. Patienter med ett "Mutation Detected"-resultat var lämpliga för deltagande i studien om de även uppfyllde de andra kriterierna. Patienter med ett "No Mutation Detected"-resultat var olämpliga för deltagande i studien. I studien ingick patienter med BRAF V600K-mutationer enligt detektering med **cobas** BRAF Test, för att påvisa säkerhet och effektivitet vid behandling med produkten hos den del av patientpopulationen där tumörer som innehåller V600K hade detekterats.

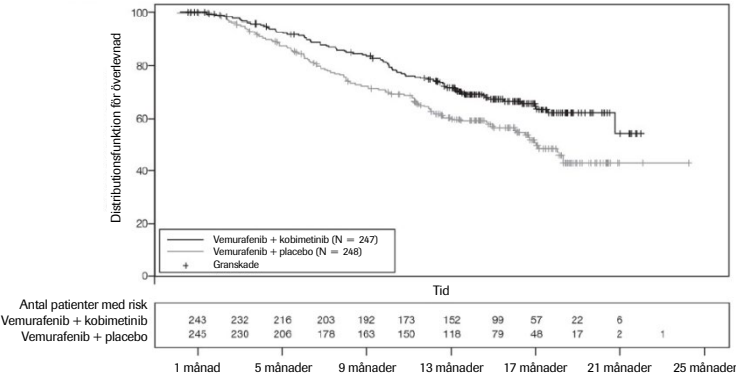
Resultaten för effektivitet från studien visas nedan i Tabell 17 och Bild 3:

Tabell 17
Effektivitet för kobimetinib i kombination med vemurafenib hos patienter med BRAF mutationspositivt melanom^a

	Kobimetinib + vemurafenib (N = 247)	Placebo + vemurafenib (N = 248)	p-värde
Progressionsfri överlevnad (bedömning av prövare)			
Antal händelser (%)	143 (58 %)	180 (73 %)	
Progression	131	169	
Dödsfall	12	11	
Median-PFS (månader) (95 % KI)	12,3 (9,5, 13,4)	7,2 (5,6, 7,5)	
Hazard ratio (95 % KI) ^b	0,56 (0,45, 0,70)		< 0,001 ^d
Total överlevnad			
Antal dödsfall (%)	79 (32 %)	109 (44 %)	
Medianöverlevnad (månader) (95 % KI) ^c	Ej uppskattningsb art (20,7, ej uppskattningsb art)	17,0 (15,0, ej uppskattnings bart)	-
Hazard ratio (95 % KI) ^b	0,63 (0,47, 0,85)		0,0019 ^{d,e}
Objektiv responsgrad			
Objektiv responsgrad (95 % KI) ^c	70 % (64 %, 75 %)	50 % (44 %, 56 %)	< 0,001
Fullständig respons	16 %	10 %	
Partiell respons	54 %	40 %	
Median-responsduration, månader (95 % KI) ^c	13,0 (11,1, 16,6)	9,2 (7,5, 12,8)	-

^a Enligt detektering med **cobas** BRAF Test
^b Hazard ratio uppskattad med hjälp av Cox-modellen; en hazard ratio på < 1 stödjer kobimetinib + vemurafenib
^c Kaplan-Meier-uppskattning
^d Stratifierat logrank-test
^e Statistisk signifikans beroende på jämförelsen med det allokerade alfa-värdet på 0,019 för den här interimanalysen

Bild 3
Kaplan-Meier-kurvor för total överlevnad



Tillgängliga tumörprover från randomiserade patienter analyserades retrospektivt med NGS (Next Generation Sequencing) för vidare klassificering av BRAF-mutationerna som V600E eller V600K; testresultaten erhöles med 81 % av de randomiserade patienterna (400/495). Bland de här patienterna där NGS utfördes med lyckat resultat så hade 56 av 400 (14 %) patienter tumörer med BRAF V600K-mutationer, och de återstående patienterna hade tumörer med BRAF V600E-mutationer. De 56 tumörer som retrospektivt visade sig ha BRAF V600K-mutationen hade mutationsfrekvenser på mellan 5,1 och 36,6 % i den här analysen. En trend som stödjer kobimetinib med vemurafenib observerades i explorativa undergruppsanalyser av PFS, OS och ORR för subtyper av BRAF V600-mutationen hos 81 % av patienterna i den här studien där BRAF V600-mutationstypen hade fastställts.

II. PAPILLÄRT TYREOIDEAKARCINOM (PTC)

UTVÄRDERING AV ICKE-KLINISKA EGENSKAPER

För de icke-kliniska studier som beskrivs nedan bedömdes tumöregenskaper såsom procentandel tumörinnehåll genom patologigranskning. Bidirektionell Sanger-sekvensering användes för att välja prover för testning. Procentandelen mutationsnivå bestämdes med 454-sekvensering (kvantitativ massiv parallell pyrosekvenseringsmetod).

Analytisk sensitivitet

Analytisk sensitivitet och detektionsgräns (LoD)

Den minsta mängden input-DNA som producerar korrekta resultat i 95 % av fallen bedömdes med spädningspaneler som beretts från två typer av prover:

- Provblandningar som beretts genom att blanda DNA-stamlösningar som erhöles från BRAF V600E-mutant-FFPET-prover och BRAF-vildtyp-FFPET-prover för att uppnå specifika mutationsnivåer.
- Individuella FFPET DNA-stamlösningar som beretts från två BRAF V600E-mutant-FFPET-prover.

Alla prover som användes i den här studien sekvenserades med 454-sekvensering för att bestämma procentandelen mutation i varje prov.

Analytisk sensitivitet med provblandningar

BRAF V600E-mutant-FFPET-prov-DNA-stamlösningar blandades med BRAF-vildtyp-FFPET-prov-DNA-stamlösningar för att uppnå ett prov vid ~10 %, ett prov vid ~5 % och ett prov vid ~2% mutationsnivå. Efter blandning verifierades mutationsnivåerna med 454-sekvensering. Var och en av de tre provblandningarna med V600E-mutation späddes sedan för att producera de panelprover som redovisas i Tabell 18.

Tabell 18
Beredning av spädda panelprover från provblandningar

Blandning	Genomsnittlig procentandel mutation*	Mängd DNA i spädda panelprover (ng/25 µl)**
10 % blandning	10 %	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
5 % blandning	5 %	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
2,5 % blandning	2 %	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
0 % (endast vildtyp)	- - -	125

* Genomsnittlig procentandel mutation av blandningen, testad med 454-sekvensering.

** Mängden genomiskt DNA i varje panelprov. 25 µl är provvolym för testet.

Åtta (8) replikat av varje panelprov kördes med vardera 3 **cobas** BRAF Test-kitloter (n = 24/panelprov). I Tabell 19 visas sensitiviteten hos varje FFPET-blandning, som bestämts av den lägsta mängd DNA som gav ett BRAF V600E "Mutation Detected"-värde på minst 95 % (skuggade rader).

Tabell 19
Sensitivitet för cobas BRAF Test med FFPET-blandningar

FFPET-blandning	Procentandel mutation med 454-sekvensering	Mängd DNA i panelprovet	"Mutation Detected"-värde (n = 24)
10 % FFPET-blandning	10 %	125 ng/25 µl	100 %
		41,7 ng/25 µl	100 %
		13,9 ng/25 µl	100 %
		4,6 ng/25 µl	100 %
		1,5 ng/25 µl	100 %
		0,5 ng/25 µl	92 %
		0,2 ng/25 µl	83 %
		0,1 ng/25 µl	29 %
5 % FFPET-blandning	5 %	125 ng/25 µl	96 %
		41,7 ng/25 µl	100 %
		13,9 ng/25 µl	100 %
		4,6 ng/25 µl	100 %
		1,5 ng/25 µl	83 %
		0,5 ng/25 µl	54 %
		0,2 ng/25 µl	67 %
		0,1 ng/25 µl	25 %
2,5 % FFPET-blandning	2 %	125 ng/25 µl	0 %
		41,7 ng/25 µl	0 %
		13,9 ng/25 µl	4 %
		4,6 ng/25 µl	21 %
		1,5 ng/25 µl	21 %
		0,5 ng/25 µl	33 %
		0,2 ng/25 µl	13 %
		0,1 ng/25 µl	8 %
0 % (vildtyp)	- - -	125 ng/25 µl	0 %

Denna studie visar att **cobas** BRAF Test kan detektera BRAF V600E-mutationen vid ≥ 5 % mutationsnivå med standard-input på 125 ng/25 µl. Testets förmåga att detektera mutation vid lägre DNA-input-nivåer visar att proverna kan innehålla degraderat DNA från fixeringsprocessen och mutationen ändå detekteras. Alla testresultat som erhöles för BRAF vildtyp-provet var "Mutation Not Detected".

Analytisk sensitivitet med FFPET-prover

För att bekräfta mutationsdetektionsvärdet på 5 % i patientprover har 24 enskilda snitt på 5 µm från vardera två BRAF V600E-mutant-FFPET-prover med mutationsnivåer på 6 % och 11 % bearbetats individuellt med 3 loter av **cobas**® DNA Sample Preparation Kit för att isolera DNA. Seriella spädningar av DNA från varje snitt bereddes för att producera en uppsättning om 8 panelprover som redovisas i Tabell 20.

Tabell 20
Beredning av spädda panelprover från FFPET-prover

	Genomsnittlig procentandel V600E-mutation*	Mängd DNA i spädda panelprover (ng/25 µl)
Prov 1	6 %	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
Prov 2	11 %	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1

* Genomsnittlig procentandel mutation av blandningen, bestämd med 454-sekvensering

Åtta (8) replikat av varje panelprov kördes med vardera 3 **cobas** BRAF Test-kitloter (n = 24/panelprov). Sensitiviteten hos varje FFPET-prov bestämdes av den lägsta mängd DNA som gav ett BRAF V600E "Mutation Detected"-värde på minst 95 % (skuggade rader). Resultaten från studien visas i Tabell 21.

Tabell 21
Sensitivitet för cobas BRAF Test med FFPET-prover

FFPET-prov	Procentandel mutation med 454-sekvensering	Mängd DNA i panelprovet	"Mutation Detected"-värde (n = 48)
Prov 1	6 %	125 ng/25 µl	100 %
		41,7 ng/25 µl	100 %
		13,9 ng/25 µl	100 %
		4,6 ng/25 µl	83 %
		1,5 ng/25 µl	71 %
		0,5 ng/25 µl	29 %
		0,2 ng/25 µl	17 %
		0,1 ng/25 µl	0 %
Prov 2	11 %	125 ng/25 µl	100 %
		41,7 ng/25 µl	100 %
		13,9 ng/25 µl	100 %
		4,6 ng/25 µl	71 %
		1,5 ng/25 µl	46 %
		0,5 ng/25 µl	17 %
		0,2 ng/25 µl	13 %
		0,1 ng/25 µl	8 %

Studien visade att **cobas** BRAF Test kan detektera BRAF V600E-mutationen i faktiska kliniska FFPET-prover vid ≥ 5 % mutationsnivå med standard-input på 125 ng/25 µl. Testets förmåga att detektera mutation vid lägre DNA-input-nivåer visar att proverna kan innehålla degraderat DNA från fixeringsprocessen och mutationen ändå detekteras.

Repeterbarhet

En studie utfördes för att bedöma repeterbarheten hos **cobas** BRAF Test på två reagensloter, två användare och fyra testdagar med fem FFPET-prover från papillär tyreoideacancer. Dessa FFPET-prover inkluderade ett intervall av procentuellt tumörinnehåll (50 till 70 %) och mutantalleler (16 till 22 %) inklusive 2 V600E-mutanta prover med ~16–18 % mutation ($\sim 3 \times \text{LoD}$). Ett korrekt värde angavs för 100 % av de testade proverna (80/80). Det fanns inga falskt positiva resultat för något testat vildtyp-prov. Sammanfattningsvis har **cobas** BRAF Test hög repeterbarhet i prover med lågt tumörinnehåll och med låg procentandel mutantalleler, med olika användare, reagensloter och testdagar.

Korrelation till referensmetod

För att utvärdera egenskaperna för **cobas** BRAF Test vid jämförelse med 2× bidirektionell Sanger-sekvensering samlades Sanger-sekvenseringsdata in för 159 PTC FFPET-prover. Den primära överensstämmelseanalysen mellan resultat för **cobas** BRAF Test och resultat för Sanger-sekvensering för detektion av V600E-mutationen visas i Tabell 22 för en av de två reagensloterna som testats. Den andra loten gav liknande resultat, förutom för ett prov som gav ett "Mutation Not Detected"-resultat. Bestämning med 454-sekvensering fastställde att provet innehöll 1,4 % mutation och låg under sensitivitetsnivån på 5 % för **cobas** BRAF Test.

Tabell 22
Sammanfattning av resultat för cobas BRAF Test jämfört med Sanger-sekvensering

cobas BRAF Test (testmetod)	Sanger-sekvensering (referensmetod)		
	BRAF V600E Mutation Detected^a	BRAF V600E Mutation Not Detected^b	Totalt
Mutation Detected	88	13	101
Mutation Not Detected	1	57	58
Totalt	89	70	159
Positiv procentandel överensstämmelse (95 % KI)	$100 \% \times 88 / 89 = 98,9 \% (93,9 \%, 99,8 \%)$		
Negativ procentandel överensstämmelse (95 % KI)	$100 \% \times 57 / 70 = 81,4 \% (70,8 \%, 88,8 \%)$		
Total procentandel överensstämmelse (95 % KI)	$100 \% \times 145 / 159 = 91,2 \% (85,8 \%, 94,7 \%)$		

^a "Mutation Detected" indikerar förekomst av den dominerande BRAF-mutationstypen, V600E (1799 T>A), identifierat med Sanger.

^b "Mutation Not Detected" indikerar frånvaro av den dominerande BRAF-mutationstypen, V600E, identifierat med Sanger (dvs. vildtyp eller ingen mutation, och övriga mutationer).

Obs! KI = konfidensintervall (score).

Alla prover som gav avvikande resultat med **cobas** BRAF Test och Sanger-sekvensering fick genomgå 454-sekvensering (kvantitativ massiv parallell pyrosekvensering) som en andra referensmetod. Den andra överensstämmelseanalysen, efter bestämning, visas i Tabell 23.

Ett avvikande prov hade ett "Mutation Not Detected"-resultat med **cobas** BRAF Test och ett V600E-resultat med Sanger-sekvensering. 454-sekvensering gav ett vildtyp-resultat som var överensstämmande med **cobas** BRAF Test.

För tolv av de tretton avvikande proverna som fick en mutation detekterad med **cobas** BRAF Test och en vildtyp med Sanger-sekvensering gav 454-sekvensering en V600E-mutation (1,2 % till 19 % allel-frekvens), överensstämmande med **cobas** BRAF Test. Det återstående avvikande provet som fick en V600E-mutation detekterad med **cobas** BRAF Test var vildtyp med Sanger-sekvensering och var även vildtyp med 454-sekvensering. Efter ytterligare undersökning med 454-sekvensering bekräftades att provet hade en låg procentandel V600E-mutation.

Tabell 23
Jämförelse av resultat för cobas BRAF Test och Sanger-sekvensering efter bestämning med 454-sekvensering

cobas BRAF Test (testmetod)	Sanger-sekvensering efter bestämning med 454-sekvensering		
	BRAF V600E Mutation Detected	BRAF V600E Mutation Not Detected	Totalt
Mutation Detected	101	1	102
Mutation Not Detected	0	57	57
Totalt	101	58	159
Positiv procentandel överensstämmelse (95 % KI)	$100 \% \times 101 / 101 = 100,0 \% (96,3 \%, 100,0 \%)$		
Negativ procentandel överensstämmelse (95 % KI)	$100 \% \times 57 / 58 = 98,3 \% (90,9 \%, 99,7 \%)$		
Total procentandel överensstämmelse (95 % KI)	$100 \% \times 158 / 159 = 99,4 \% (96,5 \%, 99,9 \%)$		

LISTA MED RESULTATFLAGGOR

Resultatflaggor finns på fliken Results. Orsaken till en flagga indikeras i flaggkoden enligt beskrivningen i Tabell 24. I Tabell 25 listas alla flaggor för tolkning av resultat som är relevanta för användaren.

Tabell 24
Flaggorsak

Flaggkoden börjar med	Flaggorsak	Exempel
M*	Flera eller andra orsaker	M6
R	Tolkning av resultat	R200
Z*	Analysinstrument	Z1

* Mer information finns i användarhandboken till **cobas**[®] 4800-systemet eller i användarassistenten till **cobas**[®] 4800-systemet

Tabell 25
Lista över flaggor för tolkning av resultat

Flaggkod	Allvarlighetsnivå	Beskrivning	Rekommenderad åtgärd
R200	Fel	Mutationskontroll ogiltig.	Upprepa körningen. Se den testspecifika bipacksedeln. Den här flaggkoden indikerar antingen att: 1. Ett observerat elbow-värde för mutationskontrollen låg under det fastställda tröskelvärde (dvs. elbow är för låg). Detta kan uppstå i händelse av DNA-kontamination eller ett algoritmfel som orsakas av ett icke typiskt fluorescensmönster, eller 2. Ett observerat elbow-värde för mutationskontrollen låg över det fastställda tröskelvärde (dvs. elbow är för hög). Detta kan uppstå i händelse av 1) felaktig beredning av arbetsmastermix, 2) pipetteringsfel vid tillsättning av arbetsmastermix i en brunn på mikrotiterplattan, eller 3) pipetteringsfel vid tillsättning av mutationskontroll i en reaktionsbrunn på mikrotiterplattan.
R201	Fel	Vildtypskontrollen är ogiltig.	Upprepa körningen. Se den testspecifika bipacksedeln. Den här flaggkoden indikerar antingen att: 1. Ett observerat elbow-värde för vildtypskontrollen låg under det fastställda tröskelvärde (dvs. elbow är för låg). Detta kan uppstå i händelse av DNA-kontamination eller ett algoritmfel som orsakas av ett icke typiskt fluorescensmönster, eller 2. Ett observerat elbow-värde för vildtypskontrollen låg över det fastställda tröskelvärde (dvs. elbow är för hög). Detta kan uppstå i händelse av 1) felaktig beredning av arbetsmastermix, 2) pipetteringsfel vid tillsättning av arbetsmastermix i en brunn på mikrotiterplattan, eller 3) pipetteringsfel vid tillsättning av vildtypskontroll i en reaktionsbrunn på mikrotiterplattan.
R202	Fel	Mutations-Ct detekterades inte.	Upprepa provet. Se den testspecifika bipacksedeln. Den här flaggkoden indikerar att ett mutations-elbow-värde inte observerades för provet. Det kan indikera frånvaro av mutationen i provet eller kan indikera en eller flera av följande saker: 1. Låg procentandel mutantsekvenser som är under detektionsgränsen för testet. 2. Dålig kvalitet på genomiskt DNA från provet. 3. Otillräcklig provbearbetning. 4. Förekomst av PCR-hämmare i provet. 5. Sällsynta mutationer i regionerna för genomiskt DNA täcks av primers och/eller mutationsproben. 6. Provpipetteringsfel eller prov-DNA har eventuellt inte tillsatts i reaktionsbrunnen.

Flaggkod	Allvarlighetsnivå	Beskrivning	Rekommenderad åtgärd
R203	Fel	Vildtyps-Ct detekterades inte.	Upprepa provet. Se den testspecifika bipacksedeln. Den här flaggkoden indikerar att ett vildtyps-elbow-värde inte observerades för provet. Frånvaro av ett vildtyps-elbow-värde kan indikera en eller flera av följande saker: 1. Dålig kvalitet på genomiskt DNA från provet. 2. Otillräcklig provbearbetning. 3. Förekomst av PCR-hämmare i provet. 4. Sällsynta mutationer i regionerna för genomiskt DNA täcks av primers och/eller vildtypsproben. 5. Prov-DNA har eventuellt inte tillsatts i en eller flera brunnar.
R204	Fel	Ct-värdet för mutationen är utanför intervallet.	Upprepa provet. Se den testspecifika bipacksedeln. Den här flaggkoden indikerar antingen att: 1. Ett observerat mutations-elbow-värde för provet låg under det fastställda tröskelvärdet (dvs. elbow är för låg). Detta kan uppstå om PCR-blandningen innehåller avsevärt för mycket koncentrerat genomiskt DNA eller om det inträffar ett algoritmfel som orsakas av ett icke typiskt fluorescensmönster, eller 2. Ett observerat mutations-elbow-värde för provet låg över det fastställda tröskelvärdet (dvs. elbow är för hög). Det kan indikera en eller flera av följande saker: • Låg procentandel mutantsekvenser som är under detektionsgränsen för testet. • Pipetteringsfel vid tillsats av prov-DNA i reaktionsbrunnen. • Dålig kvalitet på genomiskt DNA från provet. • Otillräcklig provbearbetning. • Förekomst av PCR-hämmare i provet. • Sällsynta mutationer i regionerna för genomiskt DNA täcks av primers och/eller mutationssproben.
R205	Fel	Vildtyps-Ct är utanför intervallet.	Upprepa provet. Se den testspecifika bipacksedeln. Den här flaggkoden indikerar antingen att: 1. Ett observerat vildtyps-elbow-värde för provet låg under det fastställda tröskelvärdet (dvs. elbow är för låg). Detta kan uppstå om PCR-blandningen innehåller avsevärt för mycket koncentrerat genomiskt DNA eller om det inträffar ett algoritmfel som orsakas av ett icke typiskt fluorescensmönster, eller 2. Ett observerat vildtyps-elbow-värde för provet låg över det fastställda tröskelvärdet (dvs. elbow är för hög). Det kan indikera en eller flera av följande saker: • Pipetteringsfel vid tillsats av prov-DNA i reaktionsbrunnen. • Dålig kvalitet på genomiskt DNA från provet. • Otillräcklig provbearbetning. • Förekomst av PCR-hämmare i provet. • Sällsynta mutationer i regionerna för genomiskt DNA täcks av primers och/eller vildtypsproben.

REFERENSER

1. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002; 417:949-54.
2. Bauer J, Büttner P, Murali R, et al. BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor, and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011;24:345-51.
3. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005; 353:2135-47
4. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, et al. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*. 2003; 63:1454-7.
5. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene*. 2003; 22:4578-80.
6. Pollock PM, Harper UL, Hansen, KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature Genet*. 2003; 33:19-20.
7. COSMIC database (<http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic>), Release v.57 (July 2012)
8. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010; 363:809-19.
9. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011;364:2507-16.
10. Ascierto PA, McArthur GA, Dréno B, et al. Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (**coBRIM**): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17:1248-60.
11. COTELLIC (cobimetinib) U.S. package insert, Version 2.1, 2016.
12. Siroy AE, Boland GM, Milton DR, et al. Beyond BRAF(V600): clinical mutation panel testing by next-generation sequencing in advanced melanoma. *J Invest Dermatol*. 2015;135:508-15.
13. Longo MC, Berninger MS and Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8.
14. Chosewood LC and Wilson DE Biosafety and microbiological and biomedical laboratories. HHS Publication Fifth edition. (CDC) 21-1112. 2009.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4: Wayne, PA;CLSI, 2014.
16. International Air Transport Association. Dangerous goods regulations, 60th Edition. 2019.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Interference testing in clinical chemistry. Approved Guideline-Second Edition. CLSI Document EP7-A2 Appendix D: Wayne, PA;CLSI, 2005

Information om revidering av dokumentet	
Doc Rev. 10.0 08/2019	Avsnitten AVSEDD ANVÄNDNING och SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING AV TESTET har uppdaterats. Avsnitten Klinisk effektivitet hos ZELBORAF® (vemurafenib) och Klinisk effektivitet hos COTELLIC® (cobimetinib) har lagts till. Information om hållbarhet för objektglas har lagts till i avsnittet PROVTAGNING, TRANSPORT OCH FÖRVARING AV PROV. Information om melanin har lagts till i avsnittet TESTETS BEGRÄNSNINGAR. Allmänna språkuppdateringar har lagts till för att förtydliga och harmonisera med bruksanvisningen till cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test US-IVD. Kontakta Roche kundsupport vid eventuella frågor.
11/2019	Texten "FFFPET" har korrigerats till "FFPET" och typsnittet för symbolen "större än eller lika med" på sidan 24 har ändrats för att möjliggöra bättre pdf-rendering. Sidan med harmoniserade symboler har uppdaterats. Kontakta Roche kundsupport vid eventuella frågor.
Doc Rev. 11.0 06/2020	Följande information om DNA Sample Preparation Kit har tagits bort: • Lista över reagens och kompositionsinformation • Relaterade procedursteg och kommentarer Referens till bruksanvisningen för cobas® DNA Sample Preparation Kit har lagts till i början och i avsnittet "Testets begränsningar". System- och användarhandboken har genomgående uppdaterats till användarhandboken till cobas® 4800-systemet eller användarassistenten till cobas® 4800-systemet. Mindre korrigeringar och uppdateringar har utförts genomgående för konsekvens och standardisering av språket och för konsekvens med den amerikanska bruksanvisningen. Resultatflaggor har lagts till. Referensen till International Air Transport Association har uppdaterats. Sidan med harmoniserade symboler, avsnittet om varumärken och patent och adresser till distributörer har uppdaterats. Information har lagts till för att förtydliga att produktsäkerhetsmärkningen huvudsakligen följer EU:s GHS-system. Kontakta Roche kundsupport vid eventuella frågor.

Tillverkad i USA



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany
www.roche.com



Roche Diagnostics
9115 Hague Road
Indianapolis, IN 46250-0457 USA
(For Technical Assistance call the
Roche Response Center
toll-free: 1-800-526-1247)

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Varumärken och patent

COBAS, COBAS Z och AMPERASE är varumärken som tillhör Roche.

Alla andra produktnamn och varumärken tillhör respektive ägare.

Teknik för förhindrande av korskontaminering i AmpErase-enzym täcks av amerikanskt patentnummer 7,687,247 som ägs av Life Technologies och är licensierat till Roche Molecular Systems, Inc.

Se <http://www.roche-diagnostics.us/patents>

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.

06/2020

Doc Rev. 11.0

05952603001-12



Följande symboler används vid märkning av Roche PCR diagnostiska produkter.



Stödprogramvara



Lotnummer



Auktoriserad representant
i Europeiska gemenskapen



Biologisk risk



Streckkodsdatablad



Katalognummer



Se bruksanvisningen



Endast för IVD-egenskapsutvärdering



Innehåller tillräckligt med reagens
för $<n>$ analyser



Lägre gräns för tilldelat intervall



Utrustningen innehåller



Tillverkare



Distribueras av



Förvaras mörkt



Medicinteknisk produkt
för *in vitro*-diagnostik



Temperaturgräns



Testdefinitionsfil



Utgångsdatum



Övre gräns för tilldelat intervall

Rx Only

Endast USA: Särskilda nationella regler kan
gälla för försäljning av den här enheten.



GTIN-nummer



Tillverkningsdatum



CE-märkning om överensstämmelse: den här enheten uppfyller alla tillämpliga krav för CE-märkning
av en medicinteknisk produkt för *in vitro*-diagnostik.

Teknisk support för kunder i USA 1-800-526-1247