

Informationen zur Probenvorbereitung sind dem **cobas[®]** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) zu entnehmen.

VERWENDUNGSZWECK

Der **cobas[®]** 4800 BRAF V600 Mutation Test ist hauptsächlich für die Detektion von BRAF-V600-Mutationen in DNA vorgesehen, die aus formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Melanomgewebe sowie Gewebe des papillären Schilddrüsenkarzinoms (PTC, papillary thyroid carcinoma) humanen Ursprungs extrahiert wurde. Bei Melanomen dient der Test als Hilfsmittel zur Auswahl von Patienten mit Tumoren mit BRAF-V600-Mutationen für die Behandlung mit entweder nur ZELBORAF[®] (Vemurafenib) oder mit COTELLIC[®] (Cobimetinib) in Kombination mit ZELBORAF[®] (Vemurafenib).

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG DES TESTS

Aktivierende Mutationen im Protoonkogen BRAF kommen in vielen humanen Karzinomen vor, so z. B. in malignen Melanomen, Kolorektalkarzinomen, Ovarialkarzinomen und Schilddrüsenkarzinomen.^{1, 2} BRAF-Mutationen wurden in 40 bis 60 % aller malignen Melanome³ und in 36–46 % der papillären Schilddrüsenkarzinome nachgewiesen.^{4, 5} BRAF-Mutationen kommen ebenfalls häufig in benignen Nävi vor⁶, was darauf schließen lässt, dass sie in einem sehr frühen Stadium auftreten. Die Entdeckung derartiger somatischer Mutationen im BRAF-Gen von Melanomen, PTC und anderen humanen Tumoren hat dazu beigetragen, die zentrale Bedeutung der BRAF-Kinase in den Signaltransduktionswegen aufzuklären, die die Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zellen regulieren. In normalen Zellen gehört BRAF zu einem hoch-regulierten Signaltransduktionsweg, der die Effekte von Wachstumsfaktor-Rezeptoren (wie z. B. EGFR) über RAS, RAF, MEK und ERK vermittelt. Onkogene Mutationen im BRAF-Gen führen zu einer Verstärkung der Kinasefunktion, die den RAF-MEK-ERK-Signaltransduktionsweg bei Abwesenheit typischer Wachstumsfaktoren konstitutiv aktiviert.

Die meisten BRAF-Mutationen in Melanomen und anderen humanen Tumoren treten in Codon 600 auf.⁷ Die gängigste Mutation in Codon 600 ist die V600E-Mutation (GTG > GAG). Weniger häufig wurden Dinukleotid-Mutationen in Codon 600 [V600K (GTG > AAG), V600R (GTG > AGG), V600E2 (GTG > GAA) und V600D (GTG > GAT)] beobachtet, die vorwiegend in Melanomen, in seltenen Fällen auch in anderen Tumoren, wie z. B. Kolorektalkarzinomen vorkommen.

Beim **cobas[®]** 4800 BRAF V600 Mutation Test handelt es sich um einen Echtzeit-PCR-Test, der für die Detektion von V600E (T1799A)-Mutationen vorgesehen ist. Der **cobas[®]** 4800 BRAF V600 Mutation Test dient als Begleitdiagnostik für Vemurafenib, eine Verbindung, die die V600E-Mutation des BRAF-Gens hemmt. Klinische Studien zu Vemurafenib bei Patienten mit Melanomen im fortgeschrittenen Stadium haben gezeigt, dass Patienten mit einem Tumor mit V600E-Mutation wahrscheinlich von einer Behandlung mit dem Arzneimittel klinisch profitieren.^{8, 9} Eine im Anschluss durchgeführte klinische Studie zu Cobimetinib in Kombination mit Vemurafenib bei Patienten mit Melanomen im fortgeschrittenen Stadium hat gezeigt, dass Patienten mit einem Tumor mit entweder V600E- oder V600K-Mutation, die mit dem **cobas[®]** 4800 BRAF V600 Mutation Test nachgewiesen werden, wahrscheinlich von dieser Behandlung klinisch profitieren.^{10, 11} Etwa 10–15 % der Melanomproben mit BRAF V600-Mutationen weisen den Mutationstyp V600K auf.¹²

TESTPRINZIPIEN

Der **cobas[®]** 4800 BRAF V600 Mutation Test (**cobas** BRAF-Test) beruht auf zwei Schritten: (1) manuelle Probenvorbereitung zur Gewinnung der genomischen DNA aus formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem (FFPE)-Gewebe und (2) PCR-Amplifikation und Detektion der Ziel-DNA unter Verwendung eines komplementären Primer-Paars und zweier Oligonukleotidsonden, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Eine Sonde dient zur Detektion der Wildtyp-BRAF-V600-Sequenz und die andere zur Detektion der V600E-Mutationssequenz. Es gibt zwei externe Laufkontrollen und das Wildtyp-Allel dient als interne Kontrolle des gesamten Prozesses.

Probenvorbereitung

Die Verarbeitung der FFPE-Gewebeproben und die Isolation der genomischen DNA erfolgen mit dem **cobas[®]** DNA Sample Preparation Kit. Dabei handelt es sich um eine manuelle Probenvorbereitung, die auf der Bindung der Nukleinsäuren an Glasfasern beruht. Ein entparaffinierter 5-µm-Gewebeschnitt einer FFPE-Gewebeprobe wird durch die Inkubation bei erhöhter Temperatur mit einer Protease und einem chaotropen Lyse-/Bindungspuffer lysiert. Dabei werden Nukleinsäuren freigesetzt und die freigesetzte genomische DNA vor DNasen geschützt. Anschließend wird der Lysemischung Isopropanol zugegeben, die dann durch eine Säule mit Glasfaser-Filtereinsatz zentrifugiert wird. Beim Zentrifugieren wird die genomische DNA an der Oberfläche des Glasfaserfilters gebunden. Außerdem werden durch das Zentrifugieren ungebundene Substanzen wie Salze, Proteine und andere Zellverunreinigungen entfernt. Die adsorbierten Nukleinsäuren werden mit einer wässrigen Lösung gewaschen und anschließend eluiert. Die genomische DNA wird mittels Spektralphotometrie quantitativ bestimmt und auf eine bestimmte Konzentration eingestellt, die dem Amplifikations- und Detektionsgemisch zugefügt wird. Die Ziel-DNA wird anschließend unter Verwendung der Amplifikations- und Detektionsreagenzien des **cobas** BRAF-Testkits mit dem **cobas z** 480 Analyzer amplifiziert und detektiert.

Amplifikation und Detektion mittels PCR

Wahl der Zielsequenz

Beim **cobas** BRAF-Test werden Primer verwendet, die eine aus 116 Basenpaaren bestehende Sequenz der humanen genomischen DNA abdecken, die das BRAF-Codon 600 in Exon 15 enthält. Es wird nicht das gesamte BRAF-Gen amplifiziert. Der **cobas** BRAF-Test dient zur Detektion des T>A-Austausches in Nukleotid 1799, der im BRAF-Gen stattfindet und zu einer Valin-Glutaminsäure-Substitution in Codon 600 (V600E) führt. Fluoreszenzmarkierte TaqMan-Sonden, die für BRAF-Wildtyp- und mutierte DNA-Zielsequenzen spezifisch sind, binden jeweils an die Wildtyp- und die mutierten Sequenzen. Die Wildtyp-Sequenz und die mutierte Sequenz werden über einen dedizierten optischen Kanal für jede Sequenz nachgewiesen.

Amplifikation der Zielsequenz

Für die Amplifikation der Zielsequenz wird Thermus-Spezies Z05 DNA-Polymerase verwendet. Das PCR-Reaktionsgemisch wird zuerst erwärmt, um die genomische DNA zu denaturieren und die Primer-Zielsequenzen freizulegen. Beim Abkühlen des Gemischs lagern sich die Upstream- und Downstream-Primer an die Ziel-DNA-Sequenzen an. Die Z05-DNA-Polymerase verlängert in der Gegenwart zweiwertiger Metallionen und eines Überschusses an dNTPs die angelagerten Primer, wodurch ein zweiter DNA-Strang synthetisiert wird. Mit Abschluss dieses ersten PCR-Zyklus liegt nun eine doppelsträngige DNA-Kopie von der aus 116 Basenpaaren bestehenden Zielregion des BRAF-Gens vor. Dieser Prozess wird für eine Reihe von Zyklen wiederholt, wobei jeder Zyklus die Menge an Ziel-DNA in Form von Amplifikaten effektiv verdoppelt. Die Amplifikation erfolgt nur in der Region des BRAF-Gens, die zwischen den Primern liegt.

Automatisierte Echtzeit-Detektion

Der **cobas** BRAF-Test basiert auf Echtzeit-PCR-Technologie. Jede für eine Zielsequenz spezifische Oligonukleotidsonde wird in der Reaktion mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der als Reporter dient, und mit einem Quencher-Molekül, das die Fluoreszenzemission des Reporter-Farbstoffes in einer intakten Sonde absorbiert. Während jedes Amplifikationszyklus wird die Sonde, die zur einsträngigen DNA-Sequenz im Amplikat komplementär ist, gebunden und anschließend durch die 5'-3'-Nukleaseaktivität der Z05-DNA-Polymerase abgespalten. Nachdem der Reporter-Farbstoff durch diese Nukleaseaktivität vom Quencher abgespalten wurde, kann Fluoreszenzlicht einer charakteristischen Wellenlänge gemessen werden, wenn der Reporter-Farbstoff durch das entsprechende Lichtspektrum angeregt wird. Die zielsequenzspezifische Sonde des BRAF-Wildtyps (WT) und die BRAF-V600E-Mutationssonde werden mit zwei verschiedenen Reporter-Farbstoffen markiert. Die Amplifikation der beiden BRAF-Sequenzen kann durch die Messung der Fluoreszenz an den beiden charakteristischen Wellenlängen in separaten optischen Kanälen unabhängig voneinander in einer einzelnen Reaktionskavität nachgewiesen werden.

Selektive Amplifikation

Die selektive Amplifikation der Ziel-Nukleinsäure aus der Probe wird beim **cobas** BRAF-Test durch die Verwendung des Enzyms AmpErase (Uracil-N-Glykosylase) und von Desoxyuridintriphosphat (dUTP) erreicht.¹³ Das Enzym AmpErase erkennt desoxyuridin-haltige – nicht aber desoxythymidin-haltige – DNA-Stränge und katalysiert deren Zerstörung. Desoxyuridin ist in natürlich vorkommender DNA nicht enthalten, jedoch in den Amplifikaten immer vorhanden, da dUTP als eines der Nukleotid-Triphosphate im Reaktionsgemisch verwendet wird. Deshalb enthalten nur die Amplikate Desoxyuridin. Vor der Amplifikation der Ziel-DNA werden kontaminierende Amplikate durch das Desoxyuridin anfällig für die Zerstörung durch das Enzym AmpErase. Das im Reaktionsgemisch enthaltene Enzym AmpErase katalysiert die Spaltung desoxyuridin-haltiger DNA an den Desoxyuridin-Resten durch Öffnen der Desoxyribosekette an der C1-Position. Während der Erwärmung im ersten thermostatischen Schritt bei alkalischem pH-Wert tritt ein Bruch des DNA-Strangs des Amplikats an der Desoxyuridin-Position auf, so dass die DNA nicht weiter amplifiziert werden kann. Das Enzym AmpErase ist bei Temperaturen über 55 °C, d. h. während aller thermostatischen Schritte, inaktiv und zerstört deshalb keine Zielamplikate.

REAGENZIEN

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test (BRAF) 24 Tests (M/N: 05985595190)			
Kitkomponenten	Reagenzienbestandteile	Menge je Kit	Sicherheitssymbole und -hinweise ^a
RXNMIX (Reaktionsgemisch)	Tricinpuffer Kaliumacetat Kaliumhydroxid Glyzerin Tween 20 EDTA 5 % Dimethylsulfoxid < 0,09 % dNTPs < 0,10 % Z05-DNA-Polymerase (mikrobiell) < 0,10 % AmpErase-Enzym (Uracil-N-Glykosylase) (mikrobiell) < 0,003 % Oligonukleotid-Aptamer 0,08 % Natriumazid	3 × 0,16 ml	k. A.
MGAC (Magnesiumacetat)	Magnesiumacetat 0,09 % Natriumazid	3 × 0,15 ml	k. A.
BRAF OM (BRAF-Oligo-Mix)	Tris-HCl-Puffer EDTA 0,09 % Natriumazid Poly rA RNA (synthetisch) < 0,01 % Upstream- und Downstream-BRAF-Primer < 0,01 % fluoreszenzmarkierte BRAF-Sonden	3 × 0,13 ml	k. A.
BRAF MUT (BRAF-Mutationskontrolle)	Tris-HCl-Puffer EDTA Poly rA RNA (synthetisch) 0,05 % Natriumazid < 0,001 % Plasmid-DNA (mikrobiell) mit BRAF-Mutantensequenz < 0,001 % Plasmid-DNA (mikrobiell) mit BRAF-Wildtyp-Sequenz	2 × 0,13 ml	k. A.
BRAF WT (BRAF-Wildtyp-Kontrolle)	Tris-HCl-Puffer EDTA Poly rA RNA (synthetisch) 0,05 % Natriumazid < 0,001 % Plasmid-DNA (mikrobiell) mit BRAF-Wildtyp-Sequenz	2 × 0,13 ml	k. A.
DNA SD (DNA-Probenverdünnungs- lösung)	Tris-HCl-Puffer 0,09 % Natriumazid	2 x 1 ml	k. A.

^a Die Sicherheitskennzeichnung der Produkte erfolgt in erster Linie gemäß GHS-Verordnung der EU.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

A. **IN VITRO-DIAGNOSTIKUM.**

- B. Dieser Test ist für die Verwendung mit formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeproben vorgesehen.
- C. Nicht mit dem Mund pipettieren.
- D. In den Arbeitsbereichen des Labors nicht essen, trinken oder rauchen.
- E. Kontamination der Reagenzien durch Mikroorganismen und DNA vermeiden.
- F. Nicht verbrauchte Reagenzien und Abfall gemäß den einschlägigen regionalen und überregionalen Vorschriften entsorgen.
- G. Kits nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- H. Reagenzien aus verschiedenen Kits oder Chargen nicht vermischen.
- I. Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheets; SDS) sind auf Anfrage bei der zuständigen Roche-Vertretung erhältlich.
- J. Um Kontaminationen zu vermeiden, müssen Laborhandschuhe getragen und zwischen der Handhabung von Proben und **cobas® 4800**-Reagenzien gewechselt werden.
- K. Um eine Kontamination des Gebrauchs-Master-Mixes mit DNA-Proben zu vermeiden, sind Amplifikation und Detektion in einem anderen Bereich als die DNA-Isolierung durchzuführen. Der Arbeitsbereich für Amplifikation und Detektion ist vor der Herstellung des Master-Mix gründlich zu reinigen. Zur optimalen Reinigung sind alle Oberflächen sowie die Racks und Pipetten zunächst mit einer 0,5%igen Natriumhypochlorit-Lösung* und anschließend mit einer 70%igen Ethanollösung gründlich abzuwischen.
*** HINWEIS: Handelsübliche flüssige Haushaltsbleiche enthält in der Regel Natriumhypochlorit in einer Konzentration von 5,25 %. Durch Verdünnung im Verhältnis 1:10 erhält man eine 0,5%ige Natriumhypochloritlösung.**
- L. Proben sind als potenziell infektiös und gemäß den Vorschriften für sicheres Arbeiten im Labor, wie in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁴ und dem CLSI-Dokument M29-A4¹⁵ beschrieben, zu behandeln.
- M. **RXNMIX, MGAC, BRAF MUT, BRAF WT** und **DNA SD** enthalten Natriumazid. Natriumazid kann bei der Reaktion mit Blei- und Kupferleitungen hochexplosive Metallazide bilden. Beim Ausgießen natriumazidhaltiger Lösungen in Laborwaschbecken mit reichlich kaltem Wasser nachspülen, um Azidansammlung zu vermeiden.
- N. Beim Umgang mit Reagenzien Schutzbrille, Laborkittel und Laborhandschuhe tragen. Haut, Augen und Schleimhäute vor Kontakt mit diesen Materialien schützen. Bei Kontakt sofort mit reichlich Wasser abspülen. Unbehandelt können Verätzungen entstehen. Verschüttete Flüssigkeiten vor dem Aufwischen zunächst mit Wasser verdünnen.
- O. Alle Einwegkomponenten sind für den einmaligen Gebrauch vorgesehen. Nicht wiederverwenden.
- P. Einwegkomponenten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Q. Zum Reinigen des **cobas z 480** Analyzers keine Natriumhypochloritlösung (Bleiche) verwenden. Den **cobas z 480** Analyzer gemäß den Anweisungen im Benutzerhandbuch und/oder in der Benutzerunterstützung des **cobas® 4800** Systems reinigen.
- R. Weitere Warnhinweise, Vorsichtsmaßnahmen und Verfahren zur Verringerung der Kontaminationsgefahr für den **cobas z 480** Analyzer sind dem Benutzerhandbuch und/oder der Benutzerunterstützung des **cobas® 4800** Systems zu entnehmen.
- S. Es wird empfohlen, sterile Einwegpipetten und DNase-freie Pipettenspitzen zu verwenden.

LAGERUNG UND HANDHABUNG

- A. Reagenzien nicht einfrieren.
- B. **RXNMIX, MGAC, BRAF OM, BRAF MUT, BRAF WT** und **DNA SD** bei 2–8 °C lagern. Geöffnet bleiben diese Reagenzien für bis zu 4 Anwendungen über 60 Tage bzw. maximal bis zum Verfallsdatum stabil.
- C. **BRAF OM** und der Gebrauchs-Master-Mix (durch Zugabe von **BRAF OM** und **MGAC** zu **RXNMIX** hergestellt) sind über längere Zeiträume lichtgeschützt aufzubewahren.
- D. Der Gebrauchs-Master-Mix (durch Zugabe von **BRAF OM** und **MGAC** zu **RXNMIX** hergestellt) muss bei 2–8 °C im Dunkeln gelagert werden. Die vorbereiteten Proben und Kontrollen müssen innerhalb von 1 Stunde nach der Zubereitung des Gebrauchs-Master-Mix zugegeben werden.
- E. Verarbeitete Proben (extrahierte DNA) sind bei 15 °C bis 30 °C maximal 24 Stunden, bei 2 °C bis 8 °C maximal 14 Tage und bei –15 °C bis –25 °C maximal 60 Tage, sowie bei Lagerung bei –15 °C bis –25 °C für 3 Einfrier-Auftau-Zyklen haltbar. Extrahierte DNA sollte innerhalb des empfohlenen Lagerzeitraums bzw. spätestens vor Erreichen des Verfallsdatums des **cobas® DNA Sample Preparation Kit**, mit dem die DNA extrahiert wird, amplifiziert werden.
- F. Die Amplifikation muss innerhalb von 1 Stunde nach der Zugabe der verarbeiteten Proben und Kontrollen zum Gebrauchs-Master-Mix (durch Zugabe von **BRAF OM** und **MGAC** zu **RXNMIX** hergestellt) gestartet werden.

MITGELIEFERTE MATERIALIEN

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test
(M/N: 05985595190)

BRAF

24 Tests

RXNMIX

(Reaktionsgemisch) (Deckel mit milchigem Knopf)

MGAC

(Magnesiumacetat) (Deckel mit gelbem Knopf)

BRAF OM

(BRAF-Oligo-Mix) (schwarzer Deckel mit weißem Knopf)

BRAF MUT

(BRAF-Mutationskontrolle) (Deckel mit rotem Knopf)

BRAF WT

(BRAF-Wildtyp-Kontrolle) (Deckel mit blauem Knopf)

DNA SD

(DNA-Probenverdünnungslösung) (Deckel mit violetter Knopf)

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

- **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N 05985536190)
- Mikrotiterplatte und Versiegelungsfolie für das **cobas®** 4800 System (Roche M/N: 05232724001)
- Verstellbare Pipetten*: (Kapazität 10 µl, 20 µl, 200 µl und 1000 µl) mit DNase-freien Aerosolfilter- oder Kolbenhub-Pipettenspitzen
- Mikrozentrifugenröhrchen mit Einrastverschluss (1,5 ml, steril, RNase-/DNase-frei, PCR-Qualität) (beliebiger Hersteller)
- Spektralphotometer zum Messen der DNA-Konzentration**
- Vortexer**
- Mikrozentrifugenröhrchen-Racks
- Laborhandschuhe, puderfrei
- Gefrierschrank mit einem Temperaturbereich von -25 °C bis -15 °C

* *Die Pipetten müssen gemäß den Anweisungen des Herstellers gepflegt werden und eine Genauigkeit von ± 3 % des Nennvolumens aufweisen. Wo angegeben, müssen DNase-freie Aerosolfilter- oder Kolbenhub-Pipettenspitzen verwendet werden, um eine Zersetzung und Kreuzkontamination der Proben zu verhindern.*

** *Alle Geräte müssen gemäß den Anweisungen des Herstellers gewartet werden.*

Geräte und Software

- **cobas z** 480 Analyzer
- **cobas®** 4800 SR2 System Control Unit mit Windows XP-Image
- **cobas®** 4800 SR2 Systemsoftware, Version 2.0 oder höher
- BRAF Analysis Package Software, Version 1.0 oder höher
- Barcodeleser (Roche M/N: 05339910001)
- Drucker HP P2055d (Roche M/N: 05704375001)

ENTNAHME, TRANSPORT UND LAGERUNG VON PROBEN

HINWEIS: *Alle Proben wie potenzielle Überträger von Infektionserregern behandeln.*

A. Probenentnahme

FFPE-Gewebeproben wurden für die Verwendung mit dem **cobas** BRAF-Test validiert.

B. Probentransport

FFPE-Gewebeproben können bei 15–30 °C transportiert werden. Beim Transport von FFPE-Gewebeproben sind die geltenden Vorschriften für den Transport von Krankheitserregern zu beachten.¹⁶

C. Lagerung von Proben

Für FFPE-Gewebeproben wurde bei einer Lagerung bei 15–30 °C eine Haltbarkeit von bis zu 12 Monaten nach der Probenentnahme nachgewiesen. Auf Objektträger aufgezogene 5-µm-FFPE-Gewebeschnitte können bei 15–30 °C bis zu 60 Tage gelagert werden.

GEBRAUCHSANWEISUNG

HINWEIS: Mit Ausnahme von RXNMIX, MGAC und BRAF OM müssen alle Reagenzien vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden. RXN MIX, MGAC und BRAF OM können direkt von der Aufbewahrung bei 2–8 °C zur Herstellung des Gebrauchs-Master-Mixes verwendet werden.

HINWEIS: Es dürfen nur FFPE-Melanom- und FFPE-PTC-Gewebeschnitte mit einer Dicke von 5 µm und mindestens 50 % Tumorzellen für den cobas BRAF-Test verwendet werden. Alle Proben mit weniger als 50 % Tumorzellen müssen nach der Entparaffinierung einer Makrodissektion unterzogen werden.

HINWEIS: Detaillierte Anweisungen zum Betrieb des cobas z 480 Analyzers sind dem Benutzerhandbuch und/oder der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems zu entnehmen.

Umfang eines Laufs

Das cobas BRAF-Testkit ist für die Analyse von mindestens 3 Proben plus Kontrollen bis zu maximal 24 Proben plus Kontrollen ausgelegt. Es können zwar auch jeweils weniger als 3 Proben plus Kontrollen analysiert werden, dies kann bei einem Lauf mit insgesamt 24 Proben plus Kontrollen jedoch dazu führen, dass das Volumen der Kit-Reagenzien nicht ausreicht. Der cobas BRAF-Test enthält ausreichend Reagenzien für 8 Läufe mit jeweils 3 Proben plus Kontrollen. Bei jedem Lauf muss eine cobas BRAF-Mutationskontrolle [BRAF MUT] und eine cobas BRAF-Wildtypkontrolle [BRAF WT] mitgeführt werden (siehe Abschnitt „Qualitätskontrolle“).

Arbeitsablauf

HINWEIS: Der cobas BRAF-Test kann für bis zu 24 Proben pro Lauf verwendet werden.

HINWEIS: Um die Reagenzien optimal auszunutzen, sollte ein Lauf mindestens drei (3) Patientenproben plus Kontrollen enthalten.

DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung aus FFPE-Gewebeproben erfolgt mithilfe des cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

Makrodissektion

Wenn der Tumorgehalt der Probe weniger als 50 % des Gewebeareals beträgt, muss die Probe im Rahmen der Probenvorbereitung einer Makrodissektion unterzogen werden.

DNA-Quantifizierung:

HINWEIS: Die DNA-Konzentration muss unmittelbar nach der DNA-Isolierung und vor der Lagerung gemessen werden.

- A. Jede DNA-Stammlösung vor der Quantifizierung 5 Sekunden lang vortexen.
- B. Die DNA mit einem Spektralphotometer gemäß den Anweisungen des Herstellers quantifizieren. DNA EB aus dem cobas® DNA Sample Preparation Kit als Leerprobe für das Gerät verwenden. Es wird ein Mittelwert aus 2 konsistenten Messwerten benötigt. Die beiden Messungen dürfen nicht um mehr als ±10 % voneinander abweichen, wenn die DNA-Konzentrationen bei ≥20,0 ng/µl liegen. Bei DNA-Konzentrationen < 20,0 ng/µl dürfen die beiden Messungen nicht um mehr als ±2,0 ng/µl voneinander abweichen.
- C. Die Konzentration der DNA-Stammlösung muss ≥ 5 ng/µl betragen, damit der cobas BRAF-Test durchgeführt werden kann.

HINWEIS: Jede DNA-Stammlösung muss eine Konzentration von mindestens 5 ng/µl aufweisen, damit der cobas BRAF-Test durchgeführt werden kann. Wenn die Konzentration einer DNA-Stammlösung < 5 ng/µl beträgt, die Entparaffinierung, DNA-Isolierung und DNA-Quantifizierung für diese Probe unter Verwendung von zwei 5-µm-FFPE-Gewebeschnitten wiederholen. Bei aufgezogenen Proben die Gewebe von beiden Gewebeschnitten nach der Entparaffinierung zusammen in ein Röhrchen geben, das Gewebe in TLB und PK aus dem cobas® DNA Sample Preparation Kit eintauchen und anschließend die DNA-Isolierung und -Quantifizierung durchführen. Bei nicht aufgezogenen Proben die Gewebe von beiden Gewebeschnitten zusammen in ein Röhrchen geben und die Entparaffinierung, DNA-Isolierung und -Quantifizierung durchführen. Wenn die Konzentration der DNA-Stammlösung weiterhin < 5 ng/µl ist, einen anderen FFPE-Gewebeprobenschnitt vom Klinikauftraggeber anfordern.

HINWEIS: Verarbeitete Proben (extrahierte DNA) sind bei 15 °C bis 30 °C maximal 24 Stunden, bei 2 °C bis 8 °C maximal 14 Tage und bei –15 °C bis –25 °C maximal 60 Tage, sowie bei Lagerung bei –15 °C bis –25 °C für 3 Einfrier-Auftau-Zyklen haltbar. Extrahierte DNA sollte innerhalb des empfohlenen Lagerzeitraums bzw. spätestens vor Erreichen des Verfallsdatums des cobas® DNA Sample Preparation Kit, mit dem die DNA extrahiert wird, amplifiziert werden.

AMPLIFIKATION UND DETEKTION

HINWEIS: Um eine Kontamination des Gebrauchs-Master-Mixes mit DNA-Proben zu vermeiden, sind Amplifikation und Detektion in einem anderen Bereich als die DNA-Isolierung durchzuführen. Der Arbeitsbereich für Amplifikation und Detektion ist vor der Herstellung des Master-Mix gründlich zu reinigen. Zur optimalen Reinigung sind alle Oberflächen sowie die Racks und Pipetten zunächst mit einer 0,5%igen Natriumhypochlorit-Lösung und anschließend mit einer 70%igen Ethanol-Lösung gründlich abzuwischen. Handelsübliche flüssige Haushaltsbleiche enthält in der Regel Natriumhypochlorit in einer Konzentration von 5,25 %. Durch Verdünnung im Verhältnis 1:10 erhält man eine 0,5%ige Natriumhypochlorit-Lösung.

Analyser-Setup

Detaillierte Anweisungen zur Einrichtung des **cobas z 480** Analyzers sind dem Benutzerhandbuch und/oder der Benutzerunterstützung des **cobas® 4800** Systems zu entnehmen.

Arbeitsablauf

Ausführliche Anweisungen zum Arbeitsablauf des **cobas** BRAF-Tests sind dem Benutzerhandbuch und/oder der Benutzerunterstützung des **cobas® 4800** Systems zu entnehmen.

Berechnung der Verdünnung der DNA-Probenstammlösung

Pro Probe wird nur eine Amplifikation/Detektion durchgeführt. Dafür werden 25 µl einer 5 ng/µl-Verdünnung der DNA-Stammlösung benötigt (insgesamt 125 ng). In den folgenden Anweisungen wird beschrieben, wie je nach Konzentration der ursprünglichen DNA-Stammlösung mindestens 35 µl DNA-Stammlösung in einem Verdünnungsverhältnis von 5 ng/µl herzustellen ist. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass für jede Probe mindestens 5 µl DNA-Stammlösung verwendet werden, um Variationen aufgrund der Pipettierung kleinerer Probenmengen zu vermeiden.

Berechnung der Verdünnung der DNA-Probenstammlösung für Konzentrationen von 5 ng/µl bis 35 ng/µl

HINWEIS: Die DNA-Stammlösungen von den Proben müssen unmittelbar vor der Amplifikation und Detektion verdünnt werden.

HINWEIS: Pro Probe wird nur eine Amplifikation/Detektion durchgeführt. Dafür werden 25 µl einer 5 ng/µl-Verdünnung der DNA-Stammlösung benötigt (insgesamt 125 ng).

- A. Für jede Probe nach der folgenden Formel die Menge der benötigten DNA-Stammlösung berechnen:

Benötigtes Volumen der DNA-Stammlösung = $(35 \text{ µl} \times 5 \text{ ng/µl}) \div \text{Konzentration der DNA-Stammlösung in ng/µl}$

- B. Für jede Probe nach der folgenden Formel die Menge der benötigten DNA-Probenverdünnungslösung (**DNA SD**) berechnen:

Benötigtes DNA SD-Volumen in µl = $(35 \text{ µl} - \text{benötigtes Volumen der DNA-Stammlösung in µl})$

Beispiel:

Konzentration der DNA-Stammlösung = 21 ng/µl

A. Benötigtes Volumen der DNA-Stammlösung = $(35 \text{ µl} \times 5 \text{ ng/µl}) \div 21 \text{ ng/µl} = 8,3 \text{ µl}$

B. Benötigtes DNA SD-Volumen in µl = $(35 \text{ µl} - 8,3 \text{ µl}) = 26,7 \text{ µl}$

Berechnung der Verdünnung der DNA-Probenstammlösung für Konzentrationen > 35 ng/µl

HINWEIS: Die DNA-Stammlösungen von den Proben müssen unmittelbar vor der Amplifikation und Detektion verdünnt werden.

HINWEIS: Pro Probe wird nur eine Amplifikation/Detektion durchgeführt. Dafür werden 25 µl einer 5 ng/µl-Verdünnung der DNA-Stammlösung benötigt (insgesamt 125 ng).

- A. Für Konzentrationen der DNA-Stammlösung von > 35 ng/µl die Menge der DNA-Verdünnungslösung (**DNA SD**), die zur Herstellung von mindestens 35 µl der verdünnten DNA-Stammlösung benötigt wird, anhand der folgenden Formel berechnen. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass für jede Probe mindestens 5 µl der DNA-Stammlösung verwendet werden.

Benötigtes DNA SD-Volumen in µl = $[(5 \text{ µl DNA-Stammlösung} \times \text{Konz. der DNA-Stammlösung in ng/µl}) \div 5 \text{ ng/µl}] - 5 \text{ µl}$

- B. 5 µl der DNA-Stammlösung mit dem berechneten Volumen von **DNA SD** verdünnen.

Beispiel:

Konzentration der DNA-Stammlösung = 42 ng/µl

A. Benötigtes DNA SD-Volumen in µl = $[(5 \text{ µl} \times 42 \text{ ng/µl}) \div 5 \text{ ng/µl}] - 5 \text{ µl} = 37 \text{ µl}$

B. 5 µl der DNA-Stammlösung mit dem berechneten Volumen von **DNA SD** verdünnen.

Verdünnung der Probe

- A. Die Anzahl von 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen vorbereiten, die für die Verdünnungen der DNA-Probenstammlösungen benötigt werden. Dazu die Röhrchen im für die Probenzugabe vorgesehenen Bereich mit der jeweiligen Probenbezeichnung beschriften.
- B. Das berechnete Volumen der DNA-Probenverdünnungslösung (**DNA SD**) mit einer Pipette mit Aerosol-undurchlässiger Pipettenspitze in jedes beschriftete Probenröhrchen geben.
- C. Alle DNA-Probenstammlösungen 10 Sekunden lang vortexen.

- D. Das berechnete Volumen jeder DNA-Probenstammlösung mit einer Pipette mit Aerosol-undurchlässiger Pipettenspitze vorsichtig in das entsprechend beschriftete Röhrchen mit **DNA SD** pipettieren. Für jede Probe eine neue Pipettenspitze verwenden.
- E. Alle verdünnten DNA-Probenstammlösungen verschließen und 10 Sekunden lang vortexen.
- F. Die Handschuhe wechseln.

Herstellung des Gebrauchs-Master-Mix (MMX)

HINWEIS: Der BRAF-Oligo-Mix und der Gebrauchs-Master-Mix sind lichtempfindlich. Alle geöffneten BRAF-OM- und Gebrauchs-MMX-Gemische sind über längere Zeiträume lichtgeschützt aufzubewahren.

- A. Das benötigte Volumen von **RXNMIX** anhand der folgenden Formel berechnen:
Benötigtes Volumen von **RXNMIX** = (Anzahl der Proben + 2 Kontrollen + 1) × 10 µl
- B. Das benötigte Volumen von **BRAF OM** anhand der folgenden Formel berechnen:
Benötigtes Volumen von **BRAF OM** = (Anzahl der Proben + 2 Kontrollen + 1) × 8 µl
- C. Das benötigte Volumen von **MGAC** anhand der folgenden Formel berechnen:
Benötigtes Volumen von **MGAC** = (Anzahl der Proben + 2 Kontrollen + 1) × 7 µl
Mit Hilfe von Tabelle 1 kann auf der Grundlage der Probenanzahl in einem Lauf das Volumen jedes Reagenzes bestimmt werden, das zur Herstellung des Gebrauchs-Master-Mix benötigt wird.

Tabelle 1

Für den Gebrauchs-Master-Mix benötigte Reagenzvolumina		Anzahl der Proben*									
		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
Gesamtvolumen (µl)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Anzahl der Proben + 2 Kontrollen + 1

- D. Die benötigte Anzahl von **RXNMIX**-, **BRAF OM**- und **MGAC**-Fläschchen aus der Lagerung bei 2–8 °C entnehmen. Jedes Reagenz vor dem Gebrauch 5 Sekunden lang vortexen, um die Flüssigkeit unten im Röhrchen zu sammeln. Ein steriles Mikrozentrifugenröhrchen für den Gebrauchs-Master-Mix (MMX) kennzeichnen.
 - E. Das berechnete Volumen von **RXNMIX** in das beschriftete MMX-Röhrchen geben.
 - F. Das berechnete Volumen von **BRAF OM** in das beschriftete MMX-Röhrchen geben.
 - G. Das berechnete Volumen von **MGAC** in das beschriftete MMX-Röhrchen geben.
 - H. Das Röhrchen 5 Sekunden lang vortexen, um die erforderliche Homogenität zu gewährleisten.
- HINWEIS: Es dürfen nur die Mikrotiterplatte und Versiegelungsfolie (Roche M/N: 05232724001) für das cobas® 4800 System verwendet werden.**
- I. Jeweils 25 µl Gebrauchs-Master-Mix in jede Reaktionskavität der Mikrotiterplatte geben, die für den Lauf benötigt wird. Die Pipettenspitze darf die Platte außerhalb dieser Kavität nicht berühren.

Zugabe von Kontrollen und Proben

- A. 25 µl der **BRAF MUT**-Kontrolle in Kavität **A01** der Mikrotiterplatte geben. Den Inhalt der Kavität durch mindestens zweimaliges Auf- und Abpipettieren der Flüssigkeit mit einer Pipette gut mischen.
- B. Mit einer neuen Pipettenspitze 25 µl der **BRAF WT**-Kontrolle in Kavität **B01** der Mikrotiterplatte geben. Den Inhalt der Kavität durch mindestens zweimaliges Auf- und Abpipettieren der Flüssigkeit mit einer Pipette gut mischen.

HINWEIS: Bei jedem Lauf muss sowohl eine BRAF MUT-Kontrolle in Position A01 als auch eine BRAF WT-Kontrolle in Position B01 mitgeführt werden. Anderenfalls wird der Lauf vom cobas z 480 Analyzer als ungültig betrachtet.

HINWEIS: Die Handschuhe nach Bedarf wechseln, um eine Kreuzkontamination der Proben und Verunreinigungen der Außenseite der PCR-Reaktionsröhrchen zu vermeiden.

- C. Mit einer Pipette mit Aerosol-undurchlässiger Spitze 25 µl der verdünnten Proben-DNA in die entsprechende Kavität mit Gebrauchs-Master-Mix geben. Mit Position **C01** auf der Mikrotiterplatte beginnen (siehe Plattenanordnung in Abbildung 1). Den Inhalt mischen, indem die Flüssigkeit in der Kavität mit der Pipette mindestens zweimal auf- und abpipettiert wird. Die gesamte Flüssigkeit muss sich unten in den Kavitäten sammeln.

HINWEIS: Proben-DNA und Kontrollen müssen innerhalb von 1 Stunde nach der Herstellung des Gebrauchs-Master-Mix (MMX) in die Mikrotiterplatte gegeben werden.

Abbildung 1

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

- D. Verfahren fortsetzen, bis alle Testproben in die Mikrotiterplatte gegeben wurden.
- E. Die Mikrotiterplatte mit der Versiegelungsfolie (im Lieferumfang der Platten enthalten) abdecken. Das Versiegelungsfolienwerkzeug verwenden, um sicherzustellen, dass die Versiegelungsfolie fest auf der Mikrotiterplatte haftet.
- F. Vor Beginn der Amplifikation und Detektion sicherstellen, dass sich die gesamte Flüssigkeit unten in den Kavitäten angesammelt hat.

HINWEIS: Amplifikation und Detektion müssen innerhalb von 1 Stunde nach Zugabe der Proben-DNA und der Kontrollen zum Gebrauchs-Master-Mix gestartet werden.

Starten der PCR

Ausführliche Anweisungen zum BRAF-Arbeitsablauf sind dem Benutzerhandbuch und/oder der Benutzerunterstützung des **cobas® 4800 Systems** zu entnehmen.

Interpretation der Ergebnisse

HINWEIS: Die gesamte Lauf- und Probenvalidierung wird von der cobas® 4800 BRAF AP-Software durchgeführt.

HINWEIS: Ein gültiger Lauf kann sowohl gültige als auch ungültige Probenergebnisse enthalten.

Bei einem gültigen Lauf werden die Probenergebnisse wie in Tabelle 2 dargestellt interpretiert.

Tabelle 2
Interpretation der Probenergebnisse

cobas BRAF-Testergebnis	Interpretation
Mutation Detected	V600-Mutation im BRAF-Codon 600 in Exon 15 nachgewiesen
Mutation Not Detected oder No Mutation Detected*	V600-Mutation im BRAF-Codon 600 in Exon 15 nicht nachgewiesen
Invalid	Ergebnis ist ungültig. Proben mit einem ungültigen Ergebnis gemäß den Anweisungen unter Testwiederholung für Proben mit ungültigem Ergebnis neu testen.
Failed	Lauf ist infolge eines Hardware- oder Software-Fehlers fehlgeschlagen.

* Das Vorliegen einer Mutation im BRAF-Codon 600 kann bei dem Ergebnis „Mutation Not Detected“ oder „No Mutation Detected“ nicht ausgeschlossen werden, da die Ergebnisse von der Menge der mutierten Sequenzkopien in der Probe abhängen und möglicherweise von der Probenintegrität, der Menge der isolierten DNA und dem Vorhandensein von Störsubstanzen beeinflusst werden.

Testwiederholung für Proben mit ungültigem Ergebnis

- A. Die Verdünnung der ungültigen DNA-Probenstammlösungen erneut vornehmen. Dabei mit den Anweisungen unter **Berechnung der Verdünnung der DNA-Probenstammlösung** und **Verdünnung der Probe** im Abschnitt **AMPLIFIKATION UND DETEKTION** beginnen.

Hinweis: *Ist nicht mehr ausreichend Proben-DNA-Stammlösung vorhanden, um eine weitere Verdünnung der DNA-Stammlösung vorzunehmen, einen neuen 5-µm-Gewebeschnitt entnehmen und die DNA mit dem cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) erneut isolieren. Anschließend mit Schritt B fortfahren.*

- B. Nach der Verdünnung der DNA-Stammlösungen auf 5 ng/µl gemäß den Anweisungen unter **Verdünnung der Probe** diese im Verhältnis 1:2 weiter verdünnen. Dazu werden 20 µl der verdünnten DNA-Stammlösung mit 20 µl DNA-Probenverdünnungslösung (**DNA SD**) versetzt.
- C. Mit den Anweisungen unter **Herstellung des Gebrauchs-Master-Mix (MMX)** und den verbleibenden Anweisungen zur Amplifikation und Detektion fortfahren.

Hinweis: *Wenn die Probe auch nach der Testwiederholung mit einer 1:2-Verdünnung weiterhin ungültig ist, muss das gesamte Testverfahren für diese Probe ab der DNA-Isolierung unter Verwendung des cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) und eines neuen 5-µm-FFPE-Gewebeschnitts wiederholt werden. Für die Amplifikation und Detektion sind standardgemäß 25 µl DNA mit einer Konzentration von 5 ng/µl (ohne weitere Verdünnung) zu verwenden.*

QUALITÄTSKONTROLLE

Mit jedem Lauf wird eine Mutationskontrolle (**BRAF MUT**) und eine Wildtyp-Kontrolle (**BRAF WT**) des **cobas** BRAF-Tests mitgeführt. Ein Lauf ist gültig, wenn sowohl in der Kavität mit der **BRAF MUT**-Kontrolle (**A01**) als auch in der Kavität mit der **BRAF WT**-Kontrolle (**B01**) ein gültiges Ergebnis erhalten wird. Wenn die **BRAF MUT**- oder die **BRAF WT**-Kontrolle ungültig ist, muss der Lauf wiederholt werden. Eine frische Verdünnung der zuvor isolierten DNA-Probenstammlösung ansetzen, um für die Amplifikation und Detektion eine neue Mikrotiterplatte mit Kontrollen vorzubereiten.

BRAF-Mutationskontrolle

Das Ergebnis der **BRAF MUT**-Kontrolle muss gültig („Valid“) sein. Wenn die **BRAF MUT**-Kontrolle durchweg ungültige Ergebnisse ergibt, den technischen Kundendienst der zuständigen Roche-Vertretung verständigen.

BRAF-Wildtyp-Kontrolle

Das Ergebnis der **BRAF WT**-Kontrolle muss gültig („Valid“) sein. Wenn die **BRAF WT**-Kontrolle durchweg ungültige Ergebnisse ergibt, den technischen Kundendienst der zuständigen Roche-Vertretung verständigen.

VORSICHTSMASSNAHMEN

Wie bei allen Testverfahren ist gute Laborpraxis eine unerlässliche Voraussetzung für die uneingeschränkte Leistung dieses Tests. Aufgrund der hohen analytischen Sensitivität PCR-basierter Tests ist Vorsicht geboten, um eine Verunreinigung der Reagenzien und Amplifikationsansätze zu verhindern.

GRENZEN DES VERFAHRENS

1. Nur das angegebene Probenmaterial testen. Der **cobas** BRAF-Test wurde ausschließlich für die Verwendung mit FFPE-Melanom- und FFPE-PTC-Gewebeproben validiert.
2. Der **cobas** BRAF-Test wurde nur mit dem **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (Roche M/N: 05985536190) zur Extraktion der genomischen DNA validiert.
3. Die Detektion einer Mutation hängt von der Anzahl der in der Probe enthaltenen mutierten Sequenzkopien ab und kann durch die Probenintegrität, die Menge der isolierten DNA und das Vorliegen von Störsubstanzen beeinflusst werden.
4. Zuverlässige Ergebnisse sind nur bei Anwendung sachgemäßer Verfahren für Fixierung, Transport, Lagerung und Bearbeitung der Proben gewährleistet. Die Vorgehensweisen in dieser Gebrauchsanweisung sowie im Benutzerhandbuch und/oder in der Benutzerunterstützung des **cobas**® 4800 Systems sind zu befolgen.
5. Die Zugabe des Enzyms AmpErase zum Reaktionsgemisch des **cobas** BRAF-Tests ermöglicht eine selektive Amplifikation der Ziel-DNA; es ist jedoch gute Laborpraxis sowie die genaue Einhaltung der in dieser Packungsbeilage beschriebenen Verfahren erforderlich, um eine Kontamination von Reagenzien zu vermeiden.
6. Dieses Produkt darf nur von Personal verwendet werden, das in der PCR-Technik und der Verwendung des **cobas**® 4800 Systems geschult ist.
7. Für die Verwendung mit diesem Produkt wurde ausschließlich das **cobas**® 4800 System validiert. Kein anderes PCR-System wurde zur Verwendung mit diesem Produkt validiert.
8. Bevor Benutzer zwischen verschiedenen Verfahren wechseln, sollten sie aufgrund der inhärenten Unterschiede zwischen den Verfahren in ihrem Labor Studien zur Korrelation der Methoden durchführen, um die Unterschiede der Verfahren zu ermitteln.
9. Die Auswirkungen anderer potenzieller Variablen, wie z. B. Variablen der Probenfixierung, wurden nicht evaluiert.
10. Mutationen und Varianten in den Regionen des BRAF-Gens, die durch die Primer oder Sonden des **cobas** BRAF-Tests abgedeckt sind, treten zwar selten auf, können jedoch dazu führen, dass das BRAF V600-Allel nicht amplifiziert oder eine Mutation in Codon 600 nicht nachgewiesen wird.
11. Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren kann zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen.

12. Melanin ist ein bekannter PCR-Inhibitor. Mit dem DNA-Probenvorbereitungskit wird während der Extraktion Melanin aus der Probe entfernt; dennoch kann das Melanin in einer Probe weiterhin zu ungültigen Ergebnissen führen. Bei Verdacht auf eine Melanin-Inhibition wird empfohlen, den Test mit einer Verdünnung im Verhältnis 1:2 zu wiederholen, wie unter „Testwiederholung für Proben mit ungültigem Ergebnis“ beschrieben.
13. Der **cobas** 4800 BRAF V600 Mutation Test zeigt eine begrenzte Kreuzreaktivität mit Mutationen, die nicht vom Typ V600E sind (V600K, V600D und V600E2). Detaillierte Informationen sind dem Abschnitt „Melanome – Nicht-klinische Leistungsmerkmale“ zu entnehmen.
14. Enthalten FFPE-Gewebeproben zersetzte DNA, so kann dies die Detektionsleistung des Tests in Bezug auf Mutationen beeinträchtigen.
15. Beim **cobas** 4800 BRAF Mutation Test handelt es sich um einen qualitativen Test. Er dient nicht zur quantitativen Mutationsbestimmung.

I. MELANOME

NICHT-KLINISCHE LEISTUNGSMERKMALE

Im Rahmen der im Folgenden beschriebenen nicht-klinischen Studien wurde der Gehalt an Tumorzellen in % von einem pathologischen Prüfpanel bestimmt; der Melaningehalt wurde von einem pathologischen Prüfpanel sowie einem intern durchgeführten Test zur Melaninbestimmung ermittelt. Die Proben zum Testen wurden anhand bidirektionaler Sanger-Sequenzierung ausgewählt. Der Mutationsgrad in % wurde anhand der 454-Sequenzierung (einer quantitativen, hochparallelen Pyrosequenzierungsmethode) ermittelt.

Analytische Sensitivität

Analytische Sensitivität und Nachweisgrenze (LoD)

Die niedrigste DNA-Menge, bei der in 95 % der Fälle korrekte Ergebnisse erzielt werden, wurde mit aus drei Arten von Proben hergestellten Verdünnungspanels bestimmt:

- Probenmischungen, die durch das Vermischen von DNA-Stammlösungen von FFPE-Gewebeproben mit BRAF-V600E-Mutation und FFPE-Gewebeproben vom BRAF-Wildtyp hergestellt wurden, um bestimmte Mutationsgrade zu erreichen
- Einzelne FFPE-DNA-Stammlösungen, die aus drei FFPE-Gewebeproben mit BRAF-V600E-Mutation hergestellt wurden
- Zelllinienmischung, die durch das Vermischen von DNA-Stammlösungen von einer Zelllinie mit BRAF-V600E-Mutation und einer Zelllinie vom BRAF-Wildtyp hergestellt wurde

Alle in dieser Untersuchung verwendeten Proben wurden zur Bestimmung ihres Mutationsgrades mittels 454-Sequenzierung sequenziert.

Analytische Sensitivität unter Verwendung von Probenmischungen

DNA-Stammlösungen der FFPE-Gewebeproben mit BRAF-V600E-Mutation wurden mit DNA-Stammlösungen von FFPE-Gewebeproben vom BRAF-Wildtyp vermischt, um eine Probe mit einem Mutationsgrad von ca. 10 %, drei Proben mit einem Mutationsgrad von ca. 5 % und eine Probe mit einem Mutationsgrad von ca. 3 % zu erhalten. Eine BRAF-Wildtyp-Probe wurde ebenfalls getestet. Der Mutationsgrad wurde nach dem Mischen mittels 454-Sequenzierung überprüft. Die fünf Probenmischungen mit V600E-Mutation (nicht jedoch die Wildtyp-Probe) wurden dann verdünnt, um die in Tabelle 3 beschriebenen Panelproben herzustellen.

Tabelle 3
Herstellung der Proben des Verdünnungspanels aus Probenmischungen

Mischung	Mittlerer Mutationsgrad (%) [*]	DNA-Menge in den Verdünnungspanel-Proben (ng/25 µl) ^{**}
10-%-Mischung	9 % (n = 6)	125, 62,5, 31,3
5-%-Mischung 1	5 % (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
5-%-Mischung 2	5 % (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
5-%-Mischung 3	6 % (n = 5)	125, 5, 2,5, 1,3, 0,6, 0,3
2,5-%-Mischung	3 % (n = 5)	125, 62,5, 31,3
0 % (nur Wildtyp)	- - -	125

^{*} Mittlerer prozentualer Mutationsgrad der Mischung anhand von 454-Sequenzierung.

^{**} Menge an genomischer DNA in jeder Panelprobe. Das Probeninputvolumen für den Test betrug 25 µl.

Es wurden 8 Replikate jeder Panelprobe mit jeweils 3 Chargen des **cobas** BRAF-Testkits getestet (n = 24/Panelprobe). In Tabelle 4 ist die Sensitivität der einzelnen FFPE-Gewebemischungen aufgeführt, die anhand der niedrigsten DNA-Menge bestimmt wurde, mit der eine „Mutation Detected“-Ergebnisrate für BRAF-V600E von mindestens 95 % erhalten wurde (Reihen mit schattiertem Hintergrund).

Tabelle 4
Sensitivität des cobas BRAF-Tests anhand von FFPE-Gewebemischungen

FFPE-Gewebemischung	Prozentualer Mutationsgrad mittels 454-Sequenzierung	DNA-Menge in der Panelprobe	„Mutation Detected“-Ergebnisrate (n = 24)
10-%-FFPE-Mischung	9 %	125 ng / 25 µl	100 %
		62,5 ng / 25 µl	100 %
		31,3 ng / 25 µl	100 %
5-%-FFPE-Mischung 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-%-FFPE-Mischung 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-%-FFPE-Mischung 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-%-FFPE-Mischung	3 %	125 ng / 25 µl	0 %
		62,5 ng / 25 µl	4 %
		31,3 ng / 25 µl	4 %
0 % (Wildtyp)	- - -	125 ng / 25 µl	0 %

Diese Untersuchung zeigt, dass die BRAF-V600E-Mutation mit einem Mutationsgrad von ≥ 5 % unter Verwendung einer Standardkonzentration von 125 ng/25 µl DNA mit dem **cobas** BRAF-Test nachgewiesen werden kann. Die Fähigkeit des Tests, die Mutation auch bei niedrigeren DNA-Konzentrationen nachzuweisen, zeigt, dass Mutationen der DNA auch dann noch in Proben nachgewiesen werden können, wenn diese durch Fixierung zersetzt wurde. Für alle BRAF-Wildtyp-Proben wurde das Testergebnis „Mutation Not Detected“ erhalten.

Analytische Sensitivität unter Verwendung von FFPE-Gewebebe- proben

Um die Sollvorgabe für den Nachweis eines Mutationsgrades von 5 % für die Patientenproben zu belegen, wurden achtundvierzig 5-µm-Gewebeschnitte von 3 FFPE-Gewebebe-
proben mit BRAF-V600E-Mutation und den Mutationsgraden 6 %, 12 % und 4 % unabhängig voneinander mit 3 Chargen des **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit verarbeitet, um die DNA zu isolieren. Zur Bewertung der Auswirkungen von Melanin auf den Test enthielt eine Probe (mit einem Mutationsgrad von 6 %) eine hohe Melaninkonzentration. Von jedem Gewebeschnitt wurden DNA-Reihenverdünnungen angesetzt, um die 6 Panelproben herzustellen. Eine Übersicht ist in Tabelle 5 enthalten.

Tabelle 5
**Herstellung der Proben des Verdünnungspanels aus FFPE-Gewebebe-
proben**

FFPE- Gewebebe- proben	Probeninformationen		DNA-Menge in den Verdünnungspanel-Proben (ng/25 µl)
	Mittlerer V600E- Mutationsgrad (%)*	Pigmentierung	
Probe 1	6 %	Hochpigmentiert**	125, 15,6, 7,8, 3,9, 2,0, 1,0
Probe 2	12 %	NHP***	125, 7,8, 3,9, 2, 1, 0,5
Probe 3	4 %	NHP	125, 31,3, 15,6, 7,8, 3,9, 2,0

* Mittlerer prozentualer Mutationsgrad der Probe anhand von 454-Sequenzierung

** Hochpigmentiert nach visueller Beurteilung, Melaninkonzentration = 0,17 µg/25 µl

*** NHP = Nicht hochpigmentiert nach visueller Beurteilung

Es wurden 16 Replikate jeder Panelprobe mit jeweils 3 Chargen des **cobas** BRAF-Testkits getestet (n = 48/Panelprobe). Die Sensitivität der einzelnen FFPE-Gewebebe-
proben wurde anhand der niedrigsten DNA-Menge bestimmt, mit der eine „Mutation Detected“-Ergebnisquote für BRAF-V600E von mindestens 95 % erhalten wurde (Reihen mit schattiertem Hintergrund). Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6
**Sensitivität des cobas BRAF-Tests anhand von FFPE-Gewebebe-
proben**

FFPE- Gewebebe- proben	Prozentualer Mutationsgrad mittels 454-Sequenzierung	DNA-Menge in der Panelprobe	„Mutation Detected“- Ergebnisrate (n = 48)
Probe 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 %
Probe 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 %
Probe 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 %

Diese Untersuchung zeigte, dass die BRAF-V600E-Mutation in klinischen FFPE-Gewebebe-
proben mit einem Mutationsgrad von ≥ 5 % unter Verwendung einer Standardkonzentration von 125 ng/25 µl DNA mit dem **cobas** BRAF-Test nachgewiesen werden kann. Die Fähigkeit des Tests, die Mutation auch bei niedrigeren DNA-Konzentrationen nachzuweisen, zeigt, dass Mutationen der DNA auch dann noch in Proben nachgewiesen werden können, wenn diese durch Fixierung zersetzt wurde. Eine hochpigmentierte Probe, die in die Untersuchung einbezogen wurde, hatte keinen Einfluss auf die Sensitivität des Tests.

Analytische Sensitivität unter Verwendung einer Zelllinienmischung

Es wurden die DNA-Stammlösungen von zwei Melanom-Zelllinien [SK-MEL 28 (BRAF-V600E-Mutation) und SK-MEL 2 (BRAF-Wildtyp)] vermischt, um eine Probe mit einem mittels 454-Sequenzierung bestimmten Mutationsgrad von 5 % herzustellen. Es wurden drei separate Verdünnungspanels mit einer DNA-Konzentration von 125 ng/25 µl bis 0 ng/25 µl hergestellt. Es wurden 20 Replikate jeder Panelprobe mit jeweils 3 Chargen des **cobas** BRAF-Testkits getestet (insgesamt 60 Replikate). Die Sensitivität wurde anhand der niedrigsten DNA-Menge bestimmt, mit der eine „Mutation Detected“-Ergebnisquote für BRAF-V600E von mindestens 95 % erhalten wurde (Reihen mit schattiertem Hintergrund). Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7
Sensitivität des cobas BRAF-Tests anhand einer Zelllinienmischung

Zelllinienmischung	Mittlerer prozentualer Mutationsgrad mittels 454-Sequenzierung	DNA-Menge in der Panelprobe	„Mutation Detected“-Ergebnisrate (n = 60)
Zelllinienmischung	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 %

Mit dem **cobas** BRAF-Test wurde eine „Mutation Detected“-Ergebnisrate von 95 % bei einer Konzentration von 3,9 ng/25 µl erhalten; das entspricht einer 1:32-Verdünnung der empfohlenen DNA-Konzentration von 125 ng/25 µl. Dies bedeutet, dass mit dem Test BRAF-V600E-Mutationen nachgewiesen werden können, wenn ca. 97 % der DNA durch die Fixierung zersetzt wurde, vorausgesetzt, die Zelllinie enthält zu 100 % intakte und amplifizierbare DNA.

Einsatzmenge für genomische DNA

Die empfohlene DNA-Menge für den **cobas** BRAF-Test liegt bei 125 ng. Liegen unterschiedliche Mengen genomischer DNA vor, kann dies eine Folge von Fehlern bei der DNA-Quantifizierung und/oder von unterschiedlichen Anteilen zersetzter DNA sein. Um die Auswirkungen unterschiedlicher Mengen genomischer DNA zu untersuchen, wurde genomische DNA aus 11 FFPE-Melanom-Gewebeproben extrahiert, die aufgrund ihres Mutationsstatus und ihrer Pigmentierungsstärke ausgewählt wurden, und mit einem Probeninputvolumen von 250 ng, 125 ng, 62,5 ng bzw. 31,3 ng/25 µl seriell verdünnt. Alle 4 DNA-Konzentrationen wurden anhand von 2 Chargen bewertet. Für alle DNA-Konzentrationen wurden die erwarteten Ergebnisse ermittelt.

Mindest-Tumorgehalt

Es wurden 33 Proben mit BRAF-V600E-Mutationen getestet, um den geringsten Tumoranteil zu bestimmen, ab dem die BRAF-V600E-Mutation bei Proben mit einem Tumorgehalt zwischen 5 % und 50 % ohne Makrodissektion nachgewiesen werden kann. Ein (1) Gewebeschnitt jeder Probe wurde mit dem **cobas** BRAF-Test getestet.

Mit dem **cobas** BRAF-Test wurde für alle Proben mit BRAF-V600E-Mutation, die einen Mindest-Mutationsgrad von über 5 % Mutations-DNA aufwiesen und deren Tumorgehalt bei mindestens 15 % lag, ein korrekter Nachweis erzielt (siehe Tabelle 8). Bei Proben, deren Tumorgehalt unter 15 % und deren Mutationsgrad unter 5 % lag, lautete das Ergebnis „Mutation Not Detected“. Außerdem wurden weitere 24 Wildtyp-Proben mit einem Tumorgehalt zwischen 5 und 45 % bei der empfohlenen DNA-Aufgabekonzentration von 125 ng/25 µl untersucht. Für all diese Wildtyp-Proben wurden korrekte Ergebnisse ermittelt. Wenn Proben < 50 % Tumorzellen je Bereich enthalten, ist eine Makrodissektion erforderlich.

Tabelle 8
Testergebnisse der 33 BRAF-V600E-Proben mit verschiedenen prozentualen Tumorgehalten und Mutationsgraden

Probennummer	Tumorgehalt*	Mutationsgrad	Testergebnis
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

Probennummer	Tumorgehalt*	Mutationsgrad	Testergebnis
10	15 % / 15 %	14 %	Mutation Detected
11	15 % / 15 %	14 %	Mutation Detected
12	15 % / 20 %	5 %	Mutation Detected
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

** Der Tumorgehalt der Proben wurde bestimmt, indem der erste und der letzte von zwölf benachbarten 5-µm-Schnitten jeder Probe von einem Pathologen untersucht wurden. Sowohl der Tumorgehalt des ersten Schnitts als auch der Tumorgehalt des letzten Schnitts sind angegeben (z. B. 95 % / 95 %).*

Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivität des **cobas** BRAF-Tests wurde anhand von Analysen der folgenden Probenarten evaluiert:

- FFPE-Melanom-Gewebeproben mit anderen BRAF-Mutationen als V600E und verschiedenen Mutationsgraden
- Plasmide mit anderen BRAF-Mutationen als V600E
- BRAF-homologe Plasmide
- Hautmikroorganismen

Die Kreuzreaktivität wurde zudem evaluiert, indem bestimmt wurde, ob die Gegenwart BRAF-homologer Plasmide oder Hautmikroorganismen die Detektion der BRAF-V600E-Mutation beeinträchtigt.

FFPE-Melanom-Gewebeproben mit anderen BRAF-Mutationen als V600E

Es wurden 14 FFPE-Melanom-Gewebeproben mit anderen BRAF-Mutationen als V600E (V600D, V600E2, V600R oder V600K) mit dem **cobas** BRAF-Test in Dreifachbestimmung getestet. Alle drei Replikate von acht der Proben mit anderen BRAF-Mutationen als V600E zeigten eine Kreuzreaktivität mit dem **cobas** BRAF-Test. Diese acht Proben enthielten eine BRAF-V600D-Mutation (Mutationsgrad 18 %), eine BRAF-V600E2-Mutation (Mutationsgrad 68 %) oder eine BRAF-V600K-Mutation (Mutationsgrad über 30 %). Für die Probe mit BRAF-V600R-Mutation (Mutationsgrad 23 %) wurde keine Kreuzreaktivität beobachtet (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9
„Mutation Detected“-Ergebnisraten für den cobas BRAF-Test
bei anderen BRAF-Mutationen als V600E in FFPE-Gewebeproben

Proben-nummer	BRAF-Mutationsstatus	Mutationsgrad	Tumorgehalt*	Tumorstadium	„Mutation Detected“-Ergebnisrate (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 %

* Der Tumorgehalt der Proben wurde bestimmt, indem der erste und der letzte von zwölf benachbarten 5-µm-Schnitten jeder Probe von einem Pathologen untersucht wurden. Sowohl der Tumorgehalt des ersten Schnitts als auch der Tumorgehalt des letzten Schnitts sind angegeben (z. B. 95 % / 95 %).

Es wurde ein aus 11 Proben bestehendes Verdünnungspanel mit DNA-Konzentrationen von 5,0 ng/µl bis hinunter zu 0,0049 ng/µl hergestellt (entspricht 125 bis 0,1 ng DNA in dem für den Test verwendeten Inputvolumen von 25 µl) und jede Panelprobe wurde in Dreifachbestimmung getestet, um die niedrigste DNA-Menge zu bestimmen, mit der für die acht Proben, bei denen eine Kreuzreaktivität mit dem **cobas** BRAF-Test gefunden wurde, eine „Mutation Detected“-Ergebnisquote von 100 % erzielt wird. Die niedrigste DNA-Konzentration, bei der noch kein Verlust der Kreuzreaktivität zu verzeichnen war, erstreckte sich über den Bereich von 0,5 ng/25 µl für eine Probe mit BRAF-V600K-Mutation und einem Mutationsgrad von 69 % bis 15,6 ng/25 µl für eine Probe mit BRAF-V600D-Mutation und einem Mutationsgrad von 18 % (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10
Niedrigste DNA-Menge zum Nachweis von Kreuzreaktivität mit dem cobas BRAF-Test

Probennummer	BRAF-Mutationsstatus	Mutationsgrad	Niedrigste DNA-Menge ohne Verlust der Kreuzreaktivität (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

Plasmide mit anderen BRAF-Mutationen als V600E

Es wurden für die folgenden neun BRAF-Mutationen, die nicht vom Typ V600E sind, Plasmid-Verdünnungspanels mit Mutationsgraden von 5 % bis 75 % in einem Hintergrund von Wildtyp-Plasmid hergestellt: D594G, G596R, K601E, L597Q, L597S, V600D, V600E2, V600K und V600R. Aus den für jedes Plasmid vorbereiteten Verdünnungspanels wurden drei Replikate jeder Probe mit dem **cobas** BRAF-Test getestet. Für das BRAF-V600D-Plasmid mit einem Mutationsgrad von ≥ 10 %, das BRAF-V600K-Plasmid mit einem Mutationsgrad von ≥ 35 % und das BRAF-V600E2-Plasmid mit einem Mutationsgrad von ≥ 65 % wurde in allen 3 Replikaten eine Kreuzreaktivität nachgewiesen. Es wurde keine Kreuzreaktivität bei den Plasmiden der sechs anderen BRAF-Mutationen des Tests beobachtet.

BRAF-homologe Plasmide

Wie in Tabelle 11 beschrieben wurden Proben für die drei BRAF-homologen Plasmide (BRAF-Pseudogen, ARAF und RAF1), das BRAF-V600E-Mutationsplasmid und BRAF-Wildtyp-Plasmid vorbereitet. Drei bis sechs Replikate jeder Panelprobe wurden mit dem **cobas** BRAF-Test getestet.

Tabelle 11
BRAF-homologe Plasmidproben

Panel		Zusammensetzung nach Volumen	
Name	Probe	Bestandteil 1	Bestandteil 2
BRAF-Pseudogen	1	95 % BRAF-Pseudogen	5 % BRAF-V600E-Mutation
	2	100 % BRAF-Pseudogen	- - -
ARAF	1	95 % ARAF	5 % BRAF-V600E-Mutation
	2	100 % ARAF	- - -
RAF1	1	95 % RAF1	5 % BRAF-V600E-Mutation
	2	100 % RAF1	- - -
Kontrolle	1	95 % BRAF-Wildtyp	5 % BRAF-V600E-Mutation
	2	100 % BRAF-Wildtyp	- - -
	3	95 % DNA-Elutionspuffer	5 % BRAF-V600E-Mutation

Keines der drei getesteten BRAF-homologen Plasmide wurde in einem separaten Test mit dem **cobas** BRAF-Test nachgewiesen, was darauf schließen lässt, dass die BRAF-homologen Plasmide keine Kreuzreaktivität mit dem Test aufweisen.

Für das BRAF-V600E-Plasmid mit einem Mutationsgrad von 5 % wurde in Gegenwart von 95 % BRAF-homologer Plasmide in allen Fällen das erwartete Ergebnis „Mutation Detected“ erhalten, was darauf hinweist, dass die Detektion der BRAF-V600E-Mutation durch die homologen Plasmide nicht gestört wird.

Hautmikroorganismen

Die folgenden Hautmikroorganismen zeigten beim **cobas** BRAF-Test keine Kreuzreaktivität, als sie während der Gewebelyse mit 1×10^6 CFU zu einer Wildtyp-VFPE-Melanom-Gewebeprobe zugegeben wurden:

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

Die getesteten Mikroorganismen führten auch dann zu keiner Störung der Detektion, als während der Gewebelyse einer VFPE-Gewebeprobe mit einem BRAF-V600E-Mutationsgrad von 8 % 1×10^6 CFU zugegeben wurden.

Störeinflüsse

Triglyceride (≤ 74 mM, das 2fache der vom CLSI empfohlenen maximalen Konzentration¹⁷), Hämoglobin (≤ 2 mg/ml, die vom CLSI empfohlene maximale Konzentration¹⁷) und ≤ 95 % nekrotisches Gewebe führten bei einer Zugabe der potenziellen Störsubstanz während des Lyseschriffs der Probenvorbereitung nicht zu einer Störung des **cobas** BRAF-Tests.

Melanin

Anhand hochpigmentierter VFPE-Melanom-Gewebeproben wurde der Einfluss hoher Konzentrationen endogenen Melanins evaluiert. Es wurden insgesamt 41 einzelne VFPE-Melanom-Tumorgewebeproben aufgrund ihrer Pigmentierungsstärke ausgewählt: 33 hochpigmentierte Proben, 3 Proben von afroamerikanischen Patienten und 5 leicht pigmentierte Proben als Vergleichsgrundlage. Aus dem Gewebe wurde DNA extrahiert und für jede Probe wurde die Melaninkonzentration bestimmt. Für jeden der beiden Schnitte der 41 Proben wurde je ein Replikat der DNA-Stammlösung getestet. Für drei Proben wurden ungültige Ergebnisse ermittelt. Das Ergebnis einer Probe lautete „Mutation Not Detected“, jedoch lag der Mutationsgrad dieser Probe erwiesenermaßen unterhalb der Nachweisgrenze. Aus den 3 Proben, deren Ergebnis „Invalid“ lautete, wurden die empfohlenen DNA-Konzentrationen für den Test sowie Verdünnungen der empfohlenen DNA-Konzentration von 125 ng/PCR im Verhältnis 1:2, 1:4 und 1:8 hergestellt. Die so

hergestellten DNA-Proben (mit einer DNA-Konzentration von insgesamt 125 ng, 61,5 ng, 31,25 ng bzw. 15,6 ng pro 25 µl) wurden erneut getestet, um festzustellen, ob nach der Reduzierung des Melanins durch Verdünnung gültige Ergebnisse ermittelt werden konnten. Bei einer Verdünnung im Verhältnis 1:2 wurden für alle drei Proben die korrekten Ergebnisse gemessen.

Tabelle 12
Zusammenfassung der Leistung des cobas BRAF-Tests bei der Untersuchung von pigmentierten FFPE-Melanom-Gewebeproben

Proben-ID	Verdünnung	Melaninmenge in der Probe/PCR	Ergebnis
1	Keine (125 ng)	0,15 µg	Invalid/Invalid
	Verhältnis 1:2 (62,5 ng)	0,08 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Verhältnis 1:4 (31,3 ng)	0,04 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Verhältnis 1:8 (15,6 ng)	0,02 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
2	Keine (125 ng)	0,24 µg	Invalid/Invalid
	Verhältnis 1:2 (62,5 ng)	0,12 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Verhältnis 1:4 (31,3 ng)	0,06 µg	Mutation Detected/Mutation Not Detected
	Verhältnis 1:8 (15,6 ng)	0,03 µg	Mutation Not Detected/Invalid
3	Keine (125 ng)	0,34 µg	Invalid/Invalid
	Verhältnis 1:2 (62,5 ng)	0,17 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Verhältnis 1:4 (31,3 ng)	0,08 µg	Mutation Detected/Mutation Detected
	Verhältnis 1:8 (15,6 ng)	0,04 µg	Mutation Detected/Mutation Detected

Die Testergebnisse der 17 Wildtyp-Proben haben belegt, dass allen Proben das richtige Ergebnis „Mutation Not Detected“ zugewiesen wurde. Eine Ausnahme bildeten nur 2 hochpigmentierte Proben, für die falsch-positive Ergebnisse ermittelt wurden.

KLINISCHE LEISTUNG

Reproduzierbarkeit

Es wurde eine Untersuchung der Reproduzierbarkeit des **cobas** BRAF-Tests durchgeführt. Dazu wurde ein aus 8 Proben bestehendes DNA-Proben-Panel aus FFPE-Gewebeschnitten maligner Melanome an 3 externen Testorten (2 Anwender pro Standort) mit 3 Reagenzchargen an 5 nicht aufeinander folgenden Tagen getestet. Dieses Panel umfasste sowohl pigmentierte als auch nicht pigmentierte Proben sowie unterschiedliche prozentuale Tumorgehalte und Mutationsallel-Anteile; eine Probe lag im Bereich der Nachweisgrenze (LoD) von 5 %. 92 der 94 Läufe (97,9 %) waren gültig. Von den insgesamt 1442 getesteten Proben wiesen 2 Proben (0,14 %) ungültige Ergebnisse auf. Für alle Panel-Proben mit Ausnahme der LoD-Proben wurde bei 100 % der gültigen Tests das korrekte Ergebnis bestimmt, einschließlich der Panel-Proben mit einem Mutationsgrad von 20 % und der zwei hochpigmentierten Panel-Proben. Bei der LoD-Panel-Probe wurde die V600E-Mutation für 90 % der Proben (162/180) nachgewiesen. Keine der Wildtyp-Proben führte zu einem falsch-positiven Ergebnis. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der **cobas** BRAF-Test sowohl für pigmentierte als auch für nicht pigmentierte Proben, für Proben mit geringem Tumorgehalt und mit geringem Mutationsallel-Anteil sowie unabhängig von Testort, Anwender, Reagenzcharge und Testzeitraum in hohem Maße reproduzierbar war. Die analytische Spezifität lag bei 100 %.

Korrelation mit der Referenzmethode für Proben aus klinischen Studien der Phase III

Auf Grundlage der Ergebnisse des **cobas** BRAF-Tests wurde in klinischen Studien der Phase III eine Prävalenz der V600E-Mutation von 46,5 % ermittelt. Dies deckt sich mit der in der Fachliteratur angegebenen Prävalenz der V600E-Mutation bei Melanompatienten.

Um die Leistung des **cobas** BRAF-Tests im Vergleich zur 2fachen bidirektionalen Sanger-Sequenzierung zu evaluieren, wurden 596 der im Rahmen der Vemurafenib-Studie der Phase III nacheinander untersuchten Patienten ausgewählt. Für diese Patienten wurden klinische und demografische Daten sowie Sanger-Sequenzierungsdaten erhoben. 94 dieser Patienten waren aufgrund fehlender Einschlusskriterien nicht geeignet, für 4 Fälle gab es kein pathologisches Prüfpanel und in 2 Fällen war das mit dem **cobas** BRAF-Test ermittelte Ergebnis ungültig. Von den verbleibenden 496 Fällen, die zur Aufnahme in die Untersuchung geeignet waren, wurden für 47 Proben ungültige Ergebnisse bei der Sanger-Sequenzierung ermittelt, so dass sich die Gesamtzahl der auswertbaren Fälle letztendlich auf 449 belief. Die Analyse der Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des **cobas** BRAF-Tests und den Ergebnissen der Sanger-Sequenzierung beim Nachweis der V600E-Mutation ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13
Zusammenfassung der Ergebnisse des cobas BRAF-Tests im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung

cobas BRAF-Test (Testmethode)	Sanger-Sequenzierung (Referenzmethode)		
	BRAF V600E-Mutation nachgewiesen^a	BRAF V600E-Mutation nicht nachgewiesen^b	Gesamt
Mutation Detected	216	35	251
Mutation Not Detected	6	192	198
Gesamt	222	227	449
Positive Übereinstimmung in Prozent (KI: 95 %)	$100 \% \times 216 / 222 = 97,3 \% (94,2 \%, 98,8 \%)$		
Negative Übereinstimmung in Prozent (KI: 95 %)	$100 \% \times 192 / 227 = 84,6 \% (79,3 \%, 88,7 \%)$		
Gesamtübereinstimmung in Prozent (KI: 95 %)	$100 \% \times 408 / 449 = 90,9 \% (87,8 \%, 93,2 \%)$		

^a Dieses Ergebnis weist auf das Vorhandensein des prädominanten BRAF-Mutationstyps V600E (1799 T>A) hin, wie bei der Sanger-Sequenzierung nachgewiesen.

^b Dieses Ergebnis weist auf das Nichtvorhandensein des prädominanten BRAF-Mutationstyps V600E hin, wie bei der Sanger-Sequenzierung nachgewiesen (d. h. Wildtyp bzw. keine Mutation V600D, V600E2, V600K, V600R oder andere Mutationen).

Hinweis: Melanomproben mit gültigen, übereinstimmenden Ergebnissen beim **cobas** BRAF-Test und bei der Sanger-Sequenzierung.

Hinweis: KI = (Score-)Konfidenzintervall.

Alle 41 Proben, für die beim **cobas** BRAF-Test und bei der Sanger-Sequenzierung unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden, wurden der 454-Sequenzierung (quantitative, hochparallele Pyrosequenzierung) als zweite Referenzmethode unterzogen. Außerdem wurden 33 Proben, deren Ergebnisse beim **cobas** BRAF-Test und bei der Sanger-Sequenzierung übereinstimmten, mittels 454-Sequenzierung getestet. Die Ergebnisse der zweiten Übereinstimmungsanalyse (nach erneuter Testung bei nicht übereinstimmenden Ergebnissen) sind in Tabelle 14 dargestellt.

Für 5 der 6 nicht übereinstimmenden Proben, deren Ergebnis beim **cobas** BRAF-Test „Mutation Not Detected“ lautete, während bei der Sanger-Sequenzierung eine V600E-Mutation nachgewiesen wurde, wurde bei der 454-Sequenzierung ein Wildtyp-Ergebnis ermittelt (bei einer Probe war das Ergebnis der 454-Sequenzierung ungültig).

Für die 8 der 35 nicht übereinstimmenden Proben, deren Ergebnis beim **cobas** BRAF-Test „Mutation Detected“ lautete, während bei der Sanger-Sequenzierung ein Wildtyp-Ergebnis ermittelt wurde, wurde bei der 454-Sequenzierung in 7 dieser 8 Proben eine V600E-Mutation nachgewiesen (bei einer Probe war das Ergebnis der 454-Sequenzierung ungültig).

Für 27 der 35 nicht übereinstimmenden Proben, deren Ergebnis beim **cobas** BRAF-Test „Mutation Detected“ lautete, während bei der Sanger-Sequenzierung eine andere Mutation als die V600E-Mutation festgestellt wurde, wurde bei der 454-Sequenzierung in 24 Proben eine V600K-Mutation sowie in jeweils einer Probe eine V600E2-Mutation bzw. eine V600E-Mutation nachgewiesen. Bei einer Probe wurde bei der Sanger-Sequenzierung eine V600D-Mutation festgestellt, während bei der 454-Sequenzierung ein Wildtyp-Ergebnis ermittelt wurde.

In Bezug auf die V600K-Mutation zeigte der **cobas** BRAF-Test eine Kreuzreaktivität von 66 % (25/38).

Die Übereinstimmung mit der 454-Sequenzierung lag für die 33 beim **cobas** BRAF-Test und der Sanger-Sequenzierung übereinstimmenden V600E- bzw. Wildtyp-Probenenergebnisse bei 100 %.

Tabelle 14
Ergebnisse des cobas BRAF-Tests im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung nach erneuter Testung bei nicht übereinstimmenden Ergebnissen mittels 454-Sequenzierung

cobas BRAF-Test (Testmethode)	Nach erneuter Testung mittels 454-Sequenzierung		
	BRAF V600E-Mutation nachgewiesen	BRAF V600E-Mutation nicht nachgewiesen	Gesamt
Mutation Detected	224	27	251
Mutation Not Detected	1	197	198
Gesamt	225	224	449
Positive Übereinstimmung in Prozent (KI: 95 %)	100 % × 224 / 225 = 99,6 % (97,5 %, 99,9 %)		
Negative Übereinstimmung in Prozent (KI: 95 %)	100 % × 197 / 224 = 87,9 % (83,0 %, 91,6 %)		
Gesamtübereinstimmung in Prozent (KI: 95 %)	100 % × 421 / 449 = 93,8 % (91,1 %, 95,7 %)		

Verteilung der BRAF-Mutationen im Codon 600

Die Verteilung der Mutationen im Codon 600 wurde auf der gemeinsamen Grundlage der Ergebnisse von Sanger-Sequenzierung und 454-Sequenzierung für die 496 geeigneten Proben bestimmt. Von diesen 496 Proben waren 182 Wildtyp-Proben, während in 314 Proben Mutationen nachgewiesen wurden. Die Verteilung der Mutationen im Codon 600 ist für die 314 mutationspositiven Proben in Tabelle 15 aufgeschlüsselt. In 13,4 % aller Fälle von Mutationen im Codon 600 wurden V600K-Mutationen festgestellt.

Tabelle 15
Auf der Grundlage der Sanger- und/oder 454-Sequenzierung ermittelte Verteilung der BRAF-Mutationen im Codon 600 innerhalb der mutationspositiven Population

Aminosäuresequenz (Codon 600)	Nukleotidsequenz (1798–1800)	N	Verteilung in %
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
Mutationen im Codon 600 insgesamt		314	100
Wildtyp-Ergebnisse für Codon 600 insgesamt		182	---

Klinische Wirksamkeit von ZELBORAF® (Vemurafenib)⁹

Der **cobas** BRAF-Test wurde als Begleittest zur Auswahl von Patienten für die Behandlung mit ZELBORAF® eingesetzt. Die klinische Sicherheit und Alltagswirksamkeit von ZELBORAF® wurde in der NO25026-Studie (BRIM3) belegt, einer internationalen, randomisierten, offenen, kontrollierten, multizentrischen Phase-III-Studie mit nicht vorbehandelten Patienten mit BRAF-V600E-Mutation-positivem inoperablem Melanom im Stadium IIIC oder IV zur Beurteilung der klinischen Wirksamkeit von ZELBORAF® gegenüber Dacarbazin (Standardtherapie). Es wurden FFPE-Gewebeproben aller Patienten mit Melanom, die für die Behandlung infrage kamen, mit dem **cobas** BRAF-Test getestet. Patienten, deren Testergebnis „Mutation Detected“ lautete, waren für die Teilnahme an der Arzneimittelstudie geeignet, sofern sie die anderen Aufnahmekriterien erfüllten. Patienten, deren Testergebnis „Mutation Not Detected“ lautete, waren für die Teilnahme an der Arzneimittelstudie nicht geeignet. Die Studie wurde an rund 104 Zentren weltweit durchgeführt (22 Zentren davon in den USA).

675 Patienten nahmen an der Studie teil: 337 wurden der Behandlungsgruppe mit Vemurafenib und 338 der Behandlungsgruppe mit Dacarbazin zugeteilt. Co-primäre Endpunkte der Studie waren das Gesamtüberleben (OS) und das vom Prüfarzt beurteilte progressionsfreie Überleben (PFS). Zu den sekundären Endpunkten gehörte unter anderem die bestätigte, vom Prüfarzt beurteilte beste Gesamtansprechrate.

Bei den Baseline-Eigenschaften gab es zwischen beiden Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede. Die Mehrheit der Patienten war männlich (56 %) und die meisten weiß (99 %), das mediane Alter lag bei 54 Jahren (24 % waren ≥ 65 Jahre alt), alle Patienten hatten einen ECOG-Leistungsstatus von 0 oder 1, und bei den meisten Patienten hatten sich Metastasen gebildet (95 %).

Die Ergebnisse der Wirksamkeitsuntersuchung der Studie sind nachfolgend in Tabelle 16 und Abbildung 2 dargestellt:

Tabelle 16
Wirksamkeit von Vemurafenib bei nicht vorbehandelten Patienten mit BRAF-V600E-Mutation-positivem Melanom^a

	Vemurafenib (n = 337)	Dacarbazin (n = 338)	p-Wert^d
Gesamtüberleben			
Anzahl Todesfälle	78 (23 %)	121 (36 %)	-
Hazard Ratio (95-%-KI) ^b	0,44 (0,33, 0,59)		< 0,0001

Medianes Überleben (Monate) (95-%-KI) ^c	N.e. ^e (9,6, N.e.)	7,9 (7,3, 9,6)	-
Mediane Nachbeobachtungszeit (Monate) (Bereich)	6,2 (0,4, 13,9)	4,5 (< 0,1, 11,7)	
Hazard Ratio für progressionsfreies Überleben (95-%-KI) ^b	0,26 (0,20, 0,33)		< 0,0001
Medianes PFS (Monate) ^c	5,3 (4,9, 6,6)	1,6 (1,6, 1,7)	-

^a Gemäß Nachweis mit dem **cobas** BRAF-Test

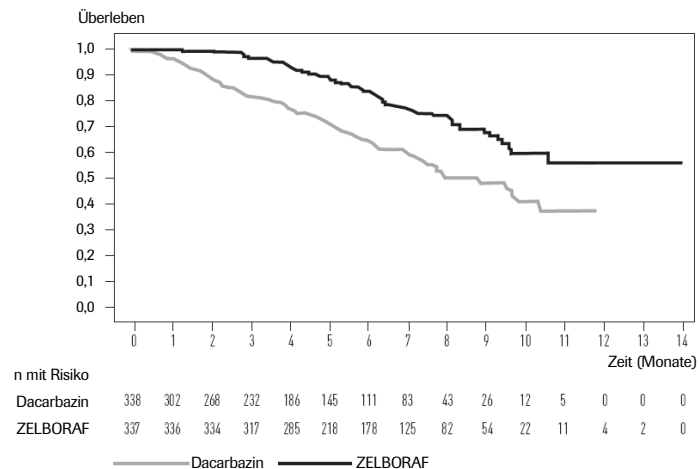
^b Hazard Ratio gemäß Cox-Modell geschätzt; eine Hazard Ratio < 1 bedeutet eine bessere Wirksamkeit von Vemurafenib

^c Kaplan-Meier-Schätzung

^d Nicht stratifizierter Log-rank-Test

^e Nicht erreicht

Abbildung 2
Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens – nicht vorbehandelte Patienten



Die bestätigte, vom Prüfarzt beurteilte beste Gesamtansprechrate lag im ZELBORAF®-Arm bei 48,4 % (95-%-KI: 41,6 %, 55,2 %) gegenüber 5,5 % (95-%-KI: 2,8 %, 9,3 %) im Dacarbazin-Arm.

Klinische Wirksamkeit von COTELLIC® (Cobimetinib)^{10, 11}

Im Rahmen der coBRIM-Studie wurde der MEK-Inhibitor COTELLIC® in Kombination mit ZELBORAF® im Vergleich zu ZELBORAF® plus Placebo getestet. Der **cobas** BRAF-Test wurde eingesetzt, um die Eignung von Patienten für die Teilnahme an dieser klinischen Studie zu bestimmen. Die Sicherheit und Wirksamkeit der Kombination aus COTELLIC® und ZELBORAF® wurde in einer multi-zentrischen, randomisierten (1:1), doppelblinden, placebokontrollierten Studie mit 495 nicht vorbehandelten Patienten mit BRAF-V600-Mutation-positivem inoperablem oder metastasierendem Melanom ermittelt. Primärer Endpunkt war das vom Prüfarzt beurteilte progressionsfreie Überleben (PFS) gemäß RECIST 1.1. Sekundäre Endpunkte waren die vom Prüfarzt beurteilte, bestätigte objektive Ansprechrates, das Gesamtüberleben, das von einem unabhängigen Überprüfungsgremium beurteilte PFS und die Ansprechdauer.

Bei den Baseline-Eigenschaften gab es zwischen beiden Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede. Die Mehrheit der Patienten war männlich (58 %) und die meisten weiß (93 %), das mediane Alter lag bei 55 Jahren, 72 % der Patienten hatten einen ECOG-Leistungsstatus von 0, und 60 % der Patienten waren im Stadium M1c.

Es wurden FFPE-Gewebeproben aller Patienten, die für die Behandlung infrage kamen, mit dem **cobas** BRAF-Test getestet. Patienten, deren Testergebnis „Mutation Detected“ lautete, waren für die Teilnahme an der Studie geeignet, sofern sie die anderen Aufnahme-kriterien erfüllten. Patienten, deren Testergebnis „No Mutation Detected“ lautete, waren für die Teilnahme an der Studie nicht geeignet. Es wurden auch Patienten mit BRAF-V600K-Mutationen, die mit dem **cobas** BRAF-Test nachgewiesen wurden, in die Studie aufgenommen. So konnten Sicherheit und Wirksamkeit der Therapie bei dem Anteil der Patientenpopulation mit V600K-Mutation gezeigt werden.

Die Ergebnisse der Wirksamkeitsuntersuchung der Studie sind nachfolgend in Tabelle 17 und Abbildung 3 dargestellt:

Tabelle 17

Wirksamkeit von Cobimetinib in Kombination mit Vemurafenib bei Patienten mit BRAF-Mutation-positivem Melanom^a

	Cobimetinib + Vemurafenib (n = 247)	Placebo + Vemurafenib (n = 248)	p-Wert
Progressionsfreies Überleben (vom Prüfarzt beurteilt)			
Anzahl Ereignisse (%)	143 (58 %)	180 (73 %)	
Progression	131	169	
Tod	12	11	
Medianes PFS (Monate) (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
Gesamtüberleben			
Anzahl Todesfälle (%)	79 (32 %)	109 (44 %)	
Medianes Überleben (Monate) (95-%-KI) ^c	Nicht schätzbar (20,7, nicht schätzbar)	17,0 (15,0, nicht schätzbar)	-
Hazard Ratio (95-%-KI) ^b	0,63 (0,47, 0,85)		0,0019 ^{d, e}
Objektive Ansprechrate			
Objektive Ansprechrate (95-%-KI) ^c	70 % (64 %, 75 %)	50 % (44 %, 56 %)	< 0,001
Vollständiges Ansprechen	16 %	10 %	
Teilweises Ansprechen	54 %	40 %	
Mediane Ansprechdauer in Monaten (95-%-KI) ^c	13,0 (11,1, 16,6)	9,2 (7,5, 12,8)	-

^a Gemäß Nachweis mit dem **cobas** BRAF-Test

^b Hazard Ratio gemäß Cox-Modell geschätzt; eine Hazard Ratio < 1 bedeutet eine bessere Wirksamkeit von Cobimetinib + Vemurafenib

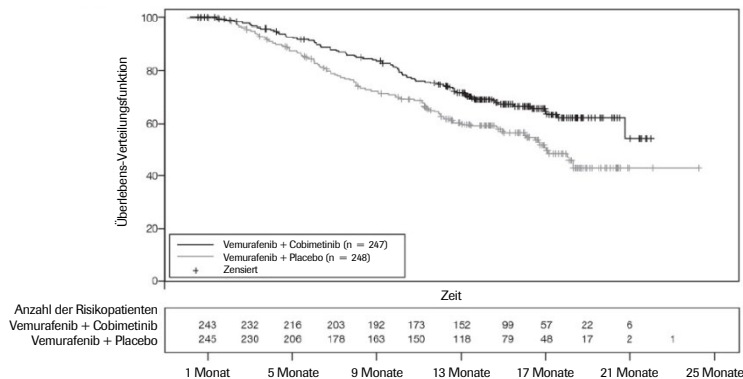
^c Kaplan-Meier-Schätzung

^d Stratifizierter Log-rank-Test

^e Die statistische Signifikanz hängt vom Vergleich mit dem zugewiesenen Alpha von 0,019 für diese Zwischenanalyse ab.

Abbildung 3

Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens



Verfügbare Tumorproben von randomisierten Patienten wurden mittels Next Generation Sequencing (NGS) retrospektiv analysiert, um die BRAF-Mutationen in V600E bzw. V600K zu klassifizieren. Für 81 % der randomisierten Patienten wurden Testergebnisse erzielt (400/495). Von den 400 Patienten, bei denen das NGS erfolgreich durchgeführt wurde, hatten 56 Patienten (14 %) Tumore mit BRAF-V600K-Mutationen und die übrigen Patienten hatten Tumore mit BRAF-V600E-Mutationen. Die 56 Tumore, für die retrospektiv eine BRAF-V600K-Mutation ermittelt wurde, hatten in dieser Analyse Mutationshäufigkeiten zwischen 5,1 und 36,6 %. In explorativen Subgruppen-Analysen des progressionsfreien Überlebens, des Gesamtüberlebens und der objektiven Ansprechrate für die BRAF-V600-Mutationssubtypen der 81 % der Patienten in dieser Studie, bei denen der BRAF-V600-Mutationstyp ermittelt wurde, wurde ein Trend zugunsten des Cobimetinib+Vemurafenib-Arms beobachtet.

II. PAPILLÄRES SCHILDDRÜSENKARZINOM (PTC)

NICHT-KLINISCHE LEISTUNGSMERKMALE

Bei den nachfolgend beschriebenen nicht-klinischen Studien wurden Tumormerkmale wie der prozentuale Tumorgehalt durch pathologische Untersuchungen bestimmt. Die Proben zum Testen wurden anhand bidirektionaler Sanger-Sequenzierung ausgewählt. Der Mutationsgrad in % wurde anhand der 454-Sequenzierung (einer quantitativen, hochparallelen Pyrosequenzierungsmethode) ermittelt.

Analytische Sensitivität

Analytische Sensitivität und Nachweisgrenze (LoD)

Die niedrigste DNA-Menge, bei der in 95 % der Fälle korrekte Ergebnisse erzielt werden, wurde mit aus zwei Arten von Proben hergestellten Verdünnungspanels bestimmt:

- Probenmischungen, die durch das Vermischen von DNA-Stammlösungen von FFPE-Gewebeproben mit BRAF-V600E-Mutation und FFPE-Gewebeproben vom BRAF-Wildtyp hergestellt wurden, um bestimmte Mutationsgrade zu erreichen
- Einzelne FFPE-DNA-Stammlösungen, die aus zwei FFPE-Gewebeproben mit BRAF-V600E-Mutation hergestellt wurden

Alle in dieser Untersuchung verwendeten Proben wurden zur Bestimmung ihres Mutationsgrades mittels 454-Sequenzierung sequenziert.

Analytische Sensitivität unter Verwendung von Probenmischungen

DNA-Stammlösungen der FFPE-Gewebeproben mit BRAF-V600E-Mutation wurden mit DNA-Stammlösungen von FFPE-Gewebeproben vom BRAF-Wildtyp vermischt, um eine Probe mit einem Mutationsgrad von ca. 10 %, eine Probe mit einem Mutationsgrad von ca. 5 % und eine Probe mit einem Mutationsgrad von ca. 2 % zu erhalten. Der Mutationsgrad wurde nach dem Mischen mittels 454-Sequenzierung überprüft. Alle drei Probenmischungen mit V600E-Mutation wurden anschließend verdünnt, um die in Tabelle 18 aufgeführten Panelproben herzustellen.

Tabelle 18
Herstellung der Proben des Verdünnungspanels aus Probenmischungen

Mischung	Mittlerer Mutationsgrad (%) [*]	DNA-Menge in den Verdünnungspanel-Proben (ng/25 µl) ^{**}
10-%-Mischung	10 %	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
5-%-Mischung	5 %	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
2,5-%-Mischung	2 %	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
0 % (nur Wildtyp)	- - -	125

^{*} Mittlerer prozentualer Mutationsgrad der Mischung anhand von 454-Sequenzierung.

^{**} Menge an genomischer DNA in jeder Panelprobe. Das Probeninputvolumen für den Test betrug 25 µl.

Es wurden 8 Replikate jeder Panelprobe mit jeweils 3 Chargen des **cobas** BRAF-Testkits getestet (n = 24/Panelprobe). In Tabelle 19 ist die Sensitivität der einzelnen FFPE-Gewebemischungen aufgeführt, die anhand der niedrigsten DNA-Menge bestimmt wurde, mit der eine „Mutation Detected“-Ergebnisrate für BRAF-V600E von mindestens 95 % erhalten wurde (Reihen mit schattiertem Hintergrund).

Tabelle 19
Sensitivität des cobas BRAF-Tests anhand von FFPE-Gewebemischungen

FFPE-Gewebemischung	Prozentualer Mutationsgrad mittels 454-Sequenzierung	DNA-Menge in der Panelprobe	„Mutation Detected“-Ergebnisrate (n = 24)
10-%-FFPE-Mischung	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-%-FFPE-Mischung	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-%-FFPE-Mischung	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 % (Wildtyp)	- - -	125 ng / 25 µl	0 %

Diese Untersuchung zeigt, dass die BRAF-V600E-Mutation mit einem Mutationsgrad von ≥ 5 % unter Verwendung einer Standardkonzentration von 125 ng/25 µl DNA mit dem **cobas** BRAF-Test nachgewiesen werden kann. Die Fähigkeit des Tests, die Mutation auch bei niedrigeren DNA-Konzentrationen nachzuweisen, zeigt, dass Mutationen der DNA auch dann noch in Proben nachgewiesen werden können, wenn diese durch Fixierung zersetzt wurde. Für alle BRAF-Wildtyp-Proben wurde das Testergebnis „Mutation Not Detected“ erhalten.

Analytische Sensitivität unter Verwendung von FFPE-Gewebeproben

Um die Sollvorgabe für den Nachweis eines Mutationsgrades von 5 % für die Patientenproben zu belegen, wurden vierundzwanzig 5-µm-Gewebeschnitte von zwei FFPE-Gewebeproben mit BRAF-V600E-Mutation und den Mutationsgraden 6 % und 11 % unabhängig voneinander mit 3 Chargen des **cobas**® DNA Sample Preparation Kit verarbeitet, um die DNA zu isolieren. Von jedem Gewebeschnitt wurden DNA-Reihenverdünnungen angesetzt, um die 8 Panelproben herzustellen. Eine Übersicht ist in Tabelle 20 enthalten.

Tabelle 20
Herstellung der Proben des Verdünnungspanels aus FFPE-Gewebeproben

	Mittlerer V600E-Mutationsgrad (%)*	DNA-Menge in den Verdünnungspanel-Proben (ng/25 µl)
Probe 1	6 %	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1
Probe 2	11 %	125, 41,7, 13,9, 4,6, 1,5, 0,5, 0,2, 0,1

* Mittlerer prozentualer Mutationsgrad der Probe anhand von 454-Sequenzierung

Es wurden 8 Replikate jeder Panelprobe mit jeweils 3 Chargen des **cobas** BRAF-Testkits getestet (n = 24/Panelprobe). Die Sensitivität der einzelnen FFPE-Gewebeproben wurde anhand der niedrigsten DNA-Menge bestimmt, mit der eine „Mutation Detected“-Ergebnisquote für BRAF-V600E von mindestens 95 % erhalten wurde (Reihen mit schattiertem Hintergrund). Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21
Sensitivität des cobas BRAF-Tests anhand von FFPE-Gewebeproben

FFPE-Gewebeproben	Prozentualer Mutationsgrad mittels 454-Sequenzierung	DNA-Menge in der Panelprobe	„Mutation Detected“-Ergebnisrate (n = 48)
Probe 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 %
Probe 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 %

Diese Untersuchung zeigte, dass die BRAF-V600E-Mutation in klinischen FFPE-Gewebeproben mit einem Mutationsgrad von ≥ 5 % unter Verwendung einer Standardkonzentration von 125 ng/25 µl DNA mit dem **cobas** BRAF-Test nachgewiesen werden kann. Die Fähigkeit des Tests, die Mutation auch bei niedrigeren DNA-Konzentrationen nachzuweisen, zeigt, dass Mutationen der DNA auch dann noch in Proben nachgewiesen werden können, wenn diese durch Fixierung zersetzt wurde.

Wiederholbarkeit

Zur Ermittlung der Wiederholbarkeit des **cobas** BRAF-Tests wurde eine Untersuchung mit zwei Reagenzchargen von zwei Anwendern an vier Testtagen mit fünf FFPE-Gewebeproben aus papillärem Schilddrüsenkarzinomgewebe durchgeführt. Diese FFPE-Gewebeproben hatten einen unterschiedlichen prozentualen Tumorgehalt (50 bis 70 %) und unterschiedliche Mutationsallel-Anteile (16 bis 22 %), darunter zwei Proben mit V600E-Mutation mit einem Mutationsgrad von ca. 16–18 % (ca. 3fache Nachweisgrenze). Bei 100 % der getesteten Proben (80/80) wurde das korrekte Ergebnis bestimmt. Keine der Wildtyp-Proben führte zu einem falsch-positiven Ergebnis. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der **cobas** BRAF-Test bei Proben mit geringem Tumorgehalt und mit geringem Mutationsallel-Anteil sowie unabhängig von Anwender, Reagenzcharge und Testzeitraum in hohem Maße wiederholbar war.

Korrelation mit der Referenzmethode

Um die Leistung des **cobas** BRAF-Tests im Vergleich zur 2fachen bidirektionalen Sanger-Sequenzierung zu evaluieren, wurden für 159 FFPE-PTC-Gewebeproben Sanger-Sequenzierungsdaten erhoben. Die erste Übereinstimmungsanalyse zwischen den Ergebnissen des **cobas** BRAF-Tests und den Ergebnissen der Sanger-Sequenzierung beim Nachweis der V600E-Mutation ist in Tabelle 22 für eine der beiden getesteten Reagenzchargen dargestellt. Mit der zweiten Charge wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, mit Ausnahme einer Probe, bei der das Ergebnis „Mutation Not Detected“ lautete. Die erneute Testung mittels 454-Sequenzierung ergab, dass die Probe einen Mutationsgrad von 1,4 % hatte und somit unterhalb der angegebenen Sensitivitätsgrenze des **cobas** BRAF-Tests von 5 % lag.

Tabelle 22
Zusammenfassung der Ergebnisse des cobas BRAF-Tests im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung

cobas BRAF-Test (Testmethode)	Sanger-Sequenzierung (Referenzmethode)		
	BRAF V600E-Mutation nachgewiesen^a	BRAF V600E-Mutation nicht nachgewiesen^b	Gesamt
Mutation Detected	88	13	101
Mutation Not Detected	1	57	58
Gesamt	89	70	159
Positive Übereinstimmung in Prozent (KI: 95 %)	$100 \% \times 88 / 89 = 98,9 \% (93,9 \%, 99,8 \%)$		
Negative Übereinstimmung in Prozent (KI: 95 %)	$100 \% \times 57 / 70 = 81,4 \% (70,8 \%, 88,8 \%)$		
Gesamtübereinstimmung in Prozent (KI: 95 %)	$100 \% \times 145 / 159 = 91,2 \% (85,8 \%, 94,7 \%)$		

^a Dieses Ergebnis weist auf das Vorhandensein des prädominanten BRAF-Mutationstyps V600E (1799 T>A) hin, wie bei der Sanger-Sequenzierung nachgewiesen.

^b Dieses Ergebnis weist auf das Nichtvorhandensein des prädominanten BRAF-Mutationstyps V600E hin, wie bei der Sanger-Sequenzierung nachgewiesen (d. h. Wildtyp bzw. keine Mutation oder andere Mutationen).

Hinweis: KI = (Score-)Konfidenzintervall.

Alle Proben, für die beim **cobas** BRAF-Test und bei der Sanger-Sequenzierung unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden, wurden der 454-Sequenzierung (quantitative, hochparallele Pyrosequenzierung) als zweite Referenzmethode unterzogen. Die Ergebnisse der zweiten Übereinstimmungsanalyse (nach erneuter Testung bei nicht übereinstimmenden Ergebnissen) sind in Tabelle 23 dargestellt.

Für eine nicht übereinstimmende Probe wurde mit dem **cobas** BRAF-Test das Ergebnis „Mutation Not Detected“ erzielt, während mittels Sanger-Sequenzierung eine V600E-Mutation nachgewiesen wurde. Bei der 454-Sequenzierung wurde ein Wildtyp-Ergebnis ermittelt, was wiederum dem Ergebnis des **cobas** BRAF-Tests entspricht.

Für 12 von 13 nicht übereinstimmenden Proben, bei denen mit dem **cobas** BRAF-Test eine Mutation nachgewiesen und mittels Sanger-Sequenzierung ein Wildtyp-Ergebnis erzielt wurde, wurde mittels 454-Sequenzierung eine V600E-Mutation (Häufigkeit des Allels: 1,2 % bis 19 %) ermittelt, was den Ergebnissen des **cobas** BRAF-Tests entspricht.

Die eine verbleibende nicht übereinstimmende Probe, bei der mit dem **cobas** BRAF-Test eine V600E-Mutation nachgewiesen wurde, erzielte sowohl bei der Sanger-Sequenzierung als auch bei der 454-Sequenzierung ein Wildtyp-Ergebnis. Bei einer weiteren 454-Sequenzierung zu einem späteren Zeitpunkt wurde bestätigt, dass die Probe eine V600E-Mutation mit geringem Mutationsgrad enthielt.

Tabelle 23
Ergebnisse des cobas BRAF-Tests im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung nach erneuter Testung bei nicht übereinstimmenden Ergebnissen mittels 454-Sequenzierung

cobas BRAF-Test (Testmethode)	Sanger-Sequenzierung nach erneuter Testung bei nicht übereinstimmenden Ergebnissen mittels 454-Sequenzierung		
	BRAF V600E-Mutation nachgewiesen	BRAF V600E-Mutation nicht nachgewiesen	Gesamt
Mutation Detected	101	1	102
Mutation Not Detected	0	57	57
Gesamt	101	58	159
Positive Übereinstimmung in Prozent (KI: 95 %)	$100 \% \times 101 / 101 = 100,0 \% (96,3 \%, 100,0 \%)$		
Negative Übereinstimmung in Prozent (KI: 95 %)	$100 \% \times 57 / 58 = 98,3 \% (90,9 \%, 99,7 \%)$		
Gesamtübereinstimmung in Prozent (KI: 95 %)	$100 \% \times 158 / 159 = 99,4 \% (96,5 \%, 99,9 \%)$		

LISTE DER ERGEBNIS-FLAGS

Die Ergebnis-Flags werden auf der Registerkarte „Results“ angezeigt. Die Herkunft eines Flags wird im Flag-Code angegeben (siehe folgende Tabelle 24). In Tabelle 25 sind alle Flags für die Ergebnisinterpretation aufgeführt, die für den Anwender relevant sind.

Tabelle 24
Flag-Herkunft

Flag-Code beginnt mit	Flag-Herkunft	Beispiel
M*	Mehrere oder andere Gründe	M6
R	Ergebnisinterpretation	R200
Z*	Analyzer	Z1

* Weitere Informationen finden Sie im Benutzerhandbuch und/oder in der Benutzerunterstützung des **cobas**[®] 4800 Systems.

Tabelle 25
Liste der Flags für die Ergebnisinterpretation

Flag-Code	Kategorie	Beschreibung	Empfohlene Maßnahme
R200	Fehler	Mutationskontrolle ungültig.	Den Lauf wiederholen. Weitere Informationen sind der testspezifischen Packungsbeilage zu entnehmen. Dieser Flag-Code gibt eines der folgenden Probleme an: 1. Ein für die Mutationskontrolle gemessener Elbow-Wert lag unter dem festgelegten Schwellenwert (d. h. Elbow-Wert zu niedrig). Dies kann bei einer DNA-Kontamination oder bei einem Algorithmusfehler aufgrund eines atypischen Fluoreszenzmusters auftreten. 2. Ein für die Mutationskontrolle gemessener Elbow-Wert lag über dem festgelegten Schwellenwert (d. h. Elbow-Wert zu hoch). Dies kann folgende Gründe haben: 1. Falsche Herstellung des Gebrauchs-Master-Mix; 2. Pipettierfehler bei der Zugabe von Gebrauchs-Master-Mix in eine Reaktionskavität der Mikrotiterplatte; 3. Pipettierfehler bei der Zugabe der Mutationskontrolle in eine Reaktionskavität der Mikrotiterplatte.
R201	Fehler	Wildtypkontrolle ungültig.	Den Lauf wiederholen. Weitere Informationen sind der testspezifischen Packungsbeilage zu entnehmen. Dieser Flag-Code gibt eines der folgenden Probleme an: 1. Ein für die Wildtypkontrolle gemessener Elbow-Wert lag unter dem festgelegten Schwellenwert (d. h. Elbow-Wert zu niedrig). Dies kann bei einer DNA-Kontamination oder bei einem Algorithmusfehler aufgrund eines atypischen Fluoreszenzmusters auftreten. 2. Ein für die Wildtypkontrolle gemessener Elbow-Wert lag über dem festgelegten Schwellenwert (d. h. Elbow-Wert zu hoch). Dies kann folgende Gründe haben: 1. Falsche Herstellung des Gebrauchs-Master-Mix; 2. Pipettierfehler bei der Zugabe von Gebrauchs-Master-Mix in eine Reaktionskavität der Mikrotiterplatte; 3. Pipettierfehler bei der Zugabe von Wildtypkontrolle in eine Reaktionskavität der Mikrotiterplatte.

Flag-Code	Kategorie	Beschreibung	Empfohlene Maßnahme
R202	Fehler	Mutations-Ct-Wert nicht detektiert.	Die Probe wiederholen. Weitere Informationen sind der testspezifischen Packungsbeilage zu entnehmen. Dieser Flag-Code gibt an, dass für die Probe kein Elbow-Wert für die Mutation gemessen wurde. Dies kann darauf hinweisen, dass die Probe keine Mutation aufweist oder dass eins oder mehrere der folgenden Probleme vorliegt: 1. Geringer Anteil an Mutantensequenzen, die unter der Nachweisgrenze des Tests liegen 2. Unzureichende Qualität der genomischen DNA aus der Probe 3. Unzureichende Probenverarbeitung 4. PCR-Inhibitoren in der Probe 5. Seltene Mutationen in den Regionen der genomischen DNA, die durch die Primer und/oder Mutationssonde abgedeckt sind 6. Es liegt ein Probenpipettierfehler vor oder in die Reaktionskavität wurde keine Proben-DNA gegeben.
R203	Fehler	Wildtyp-Ct-Wert nicht detektiert.	Die Probe wiederholen. Weitere Informationen sind der testspezifischen Packungsbeilage zu entnehmen. Dieser Flag-Code gibt an, dass für die Probe kein Elbow-Wert für den Wildtyp gemessen wurde. Dass kein Elbow-Wert für den Wildtyp ermittelt werden kann, kann auf eins oder mehrere der folgenden Probleme hinweisen: 1. Unzureichende Qualität der genomischen DNA aus der Probe 2. Unzureichende Probenverarbeitung 3. PCR-Inhibitoren in der Probe 4. Seltene Mutationen in den Regionen der genomischen DNA, die durch die Primer und/oder Wildtyp-Sonde abgedeckt sind 5. In mindestens eine Kavität wurde keine Proben-DNA gegeben.
R204	Fehler	Mutations-Ct-Wert liegt außerhalb des zulässigen Bereichs.	Die Probe wiederholen. Weitere Informationen sind der testspezifischen Packungsbeilage zu entnehmen. Dieser Flag-Code gibt eines der folgenden Probleme an: 1. Ein für die Probe gemessener Mutations-Elbow-Wert lag unter dem festgelegten Schwellenwert (d. h. Elbow-Wert zu niedrig). Dies kann auftreten, wenn das PCR-Gemisch deutlich zu viel konzentrierte genomische DNA enthält oder wenn aufgrund eines atypischen Fluoreszenzmusters ein Algorithmusfehler auftritt. 2. Ein für die Probe gemessener Mutations-Elbow-Wert lag über dem festgelegten Schwellenwert (d. h. Elbow-Wert zu hoch). Dies kann auf eins oder mehrere der folgenden Probleme hinweisen: • Geringer Anteil an Mutantensequenzen, die unter der Nachweisgrenze des Tests liegen • Pipettierfehler bei der Zugabe von Proben-DNA in die Reaktionskavität • Unzureichende Qualität der genomischen DNA aus der Probe • Unzureichende Probenverarbeitung • PCR-Inhibitoren in der Probe • Seltene Mutationen in den Regionen der genomischen DNA, die durch die Primer und/oder Mutationssonde abgedeckt sind

Flag-Code	Kategorie	Beschreibung	Empfohlene Maßnahme
R205	Fehler	Wildtyp-Ct-Wert liegt außerhalb des zulässigen Bereichs.	Die Probe wiederholen. Weitere Informationen sind der testspezifischen Packungsbeilage zu entnehmen. Dieser Flag-Code gibt eines der folgenden Probleme an: 1. Ein für die Probe gemessener Wildtyp-Elbow-Wert lag unter dem festgelegten Schwellenwert (d. h. Elbow-Wert zu niedrig). Dies kann auftreten, wenn das PCR-Gemisch deutlich zu viel konzentrierte genomische DNA enthält oder wenn aufgrund eines atypischen Fluoreszenzmusters ein Algorithmusfehler auftritt. 2. Ein für die Probe gemessener Wildtyp-Elbow-Wert lag über dem festgelegten Schwellenwert (d. h. Elbow-Wert zu hoch). Dies kann auf eins oder mehrere der folgenden Probleme hinweisen: • Pipettierfehler bei der Zugabe von Proben-DNA in die Reaktionskavität • Unzureichende Qualität der genomischen DNA aus der Probe • Unzureichende Probenverarbeitung • PCR-Inhibitoren in der Probe • Seltene Mutationen in den Regionen der genomischen DNA, die durch die Primer und/oder Wildtyp-Sonde abgedeckt sind

LITERATUR

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

Dokumentversionsübersicht	
Doc Rev. 10.0 08/2019	Die Abschnitte VERWENDUNGSZWECK und ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG DES TESTS wurden aktualisiert. Die Abschnitte Klinische Wirksamkeit von ZELBORAF® (Vemurafenib) und Klinische Wirksamkeit von COTELLIC® (Cobimetinib) wurden hinzugefügt. Im Abschnitt ENTNAHME, TRANSPORT UND LAGERUNG VON PROBEN wurden Informationen zur Haltbarkeit von Objektträgern hinzugefügt. Im Abschnitt GRENZEN DES VERFAHRENS wurde eine Erklärung zu Melanin hinzugefügt. Der Wortlaut wurde überarbeitet, um die Gebrauchsanweisung verständlicher zu formulieren und mit der Gebrauchsanweisung für den cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test (IVD) zu harmonisieren. Bei Fragen wenden Sie sich bitte an Ihre Roche-Vertretung vor Ort.
11/2019	Die Abkürzung „FFFPE“ wurde zu „FFPE“ korrigiert und das „Größer/Gleich“-Zeichen auf Seite 24 wurde zur korrekten PDF-Erstellung aktualisiert. Die Symbolbezeichnungen auf der letzten Seite wurden im Zuge der Harmonisierung aktualisiert. Bei Fragen wenden Sie sich bitte an Ihre Roche-Vertretung vor Ort.
Doc Rev. 11.0 06/2020	Die folgenden Informationen zum DNA Sample Preparation Kit wurden entfernt: • Bestimmte Reagenzien und Informationen zu deren Zusammensetzung • Zugehörige Verfahrensschritte und Hinweise Zu Beginn sowie im Abschnitt „Verfahrenseinschränkungen“ wurden Verweise auf das cobas® DNA Sample Preparation Kit und seine Gebrauchsanweisung hinzugefügt. Im gesamten Dokument wurden die Verweise auf das System- und Benutzerhandbuch aktualisiert zu: „Benutzerhandbuch und/oder Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems“. Im gesamten Dokument wurden Rechtschreibfehler korrigiert sowie Formulierungen aus Konsistenz- und Standardisierungsgründen aktualisiert (u. a. zur Harmonisierung mit der US-IFU). Es wurden Ergebnis-Flags hinzugefügt. Im Literaturverzeichnis wurden die Angaben unter „International Air Transport Association“ aktualisiert. Die Symbolbezeichnungen wurden im Zuge der Harmonisierung aktualisiert; außerdem wurden der Abschnitt Marken und Patente und die Vertriebsadressen aktualisiert. Es wurde die Angabe hinzugefügt, dass die Sicherheitskennzeichnung der Produkte in erster Linie gemäß GHS-Verordnung der EU erfolgt. Bei Fragen wenden Sie sich bitte an Ihre Roche-Vertretung vor Ort.

Hergestellt in den 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

Marken und Patente

COBAS, COBAS Z und AMPERASE sind Marken von Roche.

Alle anderen Produktnamen und Marken sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

Die beim AmpErase-Enzym eingesetzte Technologie zur Vermeidung einer Verschleppung wird durch das US-Patent Nr. 7,687,247 geschützt, dessen Inhaber Life Technologies ist und das an Roche Molecular Systems, Inc lizenziert wurde.

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

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.

06/2020

Doc Rev. 11.0

05952603001-11



Die folgenden Symbole werden bei der Kennzeichnung von Roche PCR-Diagnostikprodukten verwendet.

	Zusatz-Software		Chargenbezeichnung
	Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft		Biogefährdung
	Barcode-Datenblatt		Bestellnummer
	Gebrauchsanweisung beachten		Nur zur Beurteilung der IVD-Leistung
	Ausreichend für $\langle n \rangle$ Tests		Unterer Grenzwert des Sollbereichs
	Inhalt der Packung		Hersteller
	Vertrieb		Im Dunkeln aufbewahren
	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum		Temperaturbegrenzung
	Testdefinitionsdatei		Verwendbar bis
	Oberer Grenzwert des Sollbereichs		Nur für die USA: In den USA darf dieser Test nach den gesetzlichen Vorschriften nur durch einen Arzt oder auf ärztliche Verschreibung abgegeben werden.
	Globale Artikelnummer GTIN		Herstellungsdatum
	CE-Kennzeichnung für Konformität; dieses Gerät entspricht den geltenden Vorschriften der CE-Kennzeichnung für <i>In-vitro</i> -Diagnostika.		

Technischer Kundendienst in den USA: 1-800-526-1247