

cobas[®]



Rx Only

cobas[®] EGFR Mutation Test v2

Для диагностики *in vitro*



cobas[®] EGFR Mutation Test v2

24 Tests P/N: 07248563190

При работе с фиксированными в формалине и залитыми в парафин образцами ткани (FFPET) для пробоподготовки используют набор для подготовки образцов ДНК **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

При работе с образцами плазмы крови для пробоподготовки используют набор для подготовки образцов сцДНК **cobas**[®] cfDNA Sample Preparation Kit (M/N 07247737190).

СОДЕРЖАНИЕ

Назначение	6
Описание теста	7
Введение	7
Процедуры, лежащие в основе теста.....	9
Пробоподготовка	9
Аmplификация при проведении ПЦР	9
РАЗДЕЛ А: ПРИНЦИПЫ РАБОТЫ С ОБРАЗЦАМИ ТКАНЕЙ	11
Реагенты и материалы	11
Реагенты и материалы в комплекте.....	11
Хранение реагентов и работа с ними	13
Необходимые дополнительные материалы	13
Необходимое оборудование и программное обеспечение, не включенное в поставку.....	14
Меры предосторожности и правила работы.....	14
Меры предосторожности.....	14
Надлежащая лабораторная практика	14
Контаминация	15
Целостность.....	15
Утилизация	15
Разлив жидкости и очистка	16
Сбор, транспортировка и хранение образцов.....	16
Сбор образцов	16
Транспортировка, хранение и обеспечение стабильности образцов.....	16
Срок хранения и стабильность обработанных образцов.....	16
Процедура тестирования.....	17
Постановка теста.....	17
Инструкция по работе с набором	17
Объем постановки.....	17
Контроль всей процедуры.....	17
Выделение ДНК	18
Макродиссекция образца	18
Количественный анализ ДНК	18
Аmplификация и детекция.....	19
Подготовка оборудования.....	19
Подготовка к проведению исследования.....	19
Расчет разведений исходного образца ДНК.....	20
Разведение образцов	21

Подготовка реакции.....	21
Запуск ПЦР.....	23
Результаты.....	24
Интерпретация результатов.....	24
Повторный анализ образцов, результаты которых признаны невалидными.....	24
Контроль качества и валидности результатов.....	25
Мутантный контроль.....	25
Отрицательный контроль.....	25
Ограничения процедуры.....	25
Результаты неклинических испытаний теста.....	26
Аналитическая чувствительность (предел измерения холостой пробы).....	27
Предел обнаружения при использовании смешанных фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани (FFPET).....	27
Минимальное содержание опухолевых тканей.....	29
Перекрестная реактивность с другими мутациями в экзонах 18, 19, 20 и 21.....	30
Образцы из клинического исследования EURTAC.....	30
Образцы из клинического исследования AURA2.....	30
Специфичность: микроорганизмы и гомологичные EGFR последовательности.....	31
Микроорганизмы, способные вызывать заболевания легких.....	31
Плазмиды с содержанием гомологичных EGFR последовательностей.....	31
Интерферирующее влияние.....	31
Некротизированные ткани.....	31
Воспроизводимость.....	32
Воспроизводимость на этапе обработки образцов.....	32
Оценка клинических показателей.....	33
Воспроизводимость в клинических условиях — исследование 1.....	33
Воспроизводимость в клинических условиях — исследование 2.....	34
Корреляция результатов с методом контроля при использовании образцов, полученных в исследовании III фазы EURTAC.....	35
Корреляция результатов с эталонным методом при использовании образцов, полученных в исследовании II фазы AURA2.....	38
Данные о клинических результатах.....	39
Исследование EURTAC.....	39
Исследование AURA2.....	41
Исследование FLAURA.....	42
РАЗДЕЛ Б: ПРИНЦИП РАБОТЫ С ОБРАЗЦАМИ ПЛАЗМЫ.....	46
Пробоподготовка.....	46
Реагенты и материалы.....	46
Реагенты и материалы в комплекте.....	46

Хранение реагентов и работа с ними	47
Необходимые дополнительные материалы	48
Необходимое оборудование и программное обеспечение, не включенное в поставку.....	48
Меры предосторожности и правила работы.....	49
Меры предосторожности.....	49
Надлежащая лабораторная практика	49
Контаминация	49
Целостность.....	50
Утилизация	50
Разлив жидкости и очистка	50
Сбор, транспортировка и хранение образцов.....	51
Сбор и обработка образцов	51
Транспортировка, хранение и обеспечение стабильности образцов.....	51
Срок хранения и стабильность обработанных образцов	52
Процедура тестирования.....	53
Постановка теста.....	53
Инструкция по работе с набором	53
Объем постановки.....	53
Контроль всей процедуры.....	53
Выделение ДНК	53
Аmplификация и детекция.....	54
Подготовка оборудования.....	54
Подготовка к проведению исследования.....	54
Подготовка реакции.....	55
Запуск ПЦР.....	56
Результаты	57
Интерпретация результатов	57
Полуколичественный показатель (SQI)	58
Повторный анализ образцов, результаты которых признаны невалидными.....	58
Контроль качества и валидности результатов.....	58
Мутантный контроль	58
Отрицательный контроль	58
Ограничения процедуры	58
Результаты неклинических испытаний теста	60
Аналитические характеристики	60
Аналитическая чувствительность (предел измерения холостой пробы)	60
Предел обнаружения с использованием ДНК клеточной линии	60

Перекрестная реактивность с другими мутациями в экзонах 18, 19, 20 и 21	61
Образцы, полученные в дополнительном клиническом исследовании AURA и в исследовании AURA2.....	61
Специфичность — микроорганизмы.....	61
Интерферирующее влияние	61
Линейность	62
Воспроизводимость	65
Оценка клинических показателей	66
Клиническая воспроизводимость при использовании образцов плазмы крови с ЭДТА в пробирках K2.....	66
Клиническая воспроизводимость при использовании образцов плазмы крови в пробирках Roche cfDNA	67
Предел обнаружения (LoD) для образцов плазмы пациентов с НМРЛ	69
Корреляция результатов, полученных при использовании образцов плазмы крови с ЭДТА в пробирках Roche cfDNA и в пробирках K2	70
Корреляция результатов с методом контроля при использовании образцов плазмы крови, полученных в исследованиях III фазы (когорты ASPIRATION).....	71
Корреляция между образцами плазмы и ткани при использовании тест-системы cobas EGFR для обнаружения мутаций делеции в экзоне 19 и мутации L858R в гене EGFR при использовании образцов исследования III фазы ENSURE	72
Корреляция результатов с эталонным методом при использовании образцов, полученных в исследовании II фазы AURA2.....	74
Корреляция между результатами исследования образцов плазмы крови и тканей при обнаружении мутации T790M с использованием образцов, полученных в исследовании II фазы AURA2	75
Данные о клинических результатах	76
Исследование ENSURE	76
Исследование AURA2	78
Исследование FLAURA.....	79
Сигнальные сообщения для результатов	83
Объяснение сигнальных сообщений для результатов	83
Дополнительная информация.....	85
Условные обозначения	85
Техническая поддержка	86
Производитель	86
Товарные знаки и патенты	86
Авторское право.....	86
Литература.....	87
Редакция документа.....	88

Назначение

Тест-система **cobas**® EGFR Mutation Test v2 представляет собой тест для диагностики *in vitro* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, предназначенный для качественного выявления мутаций гена рецептора эпидермального фактора роста (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). Обнаружение определенных мутаций EGFR осуществляется с использованием ДНК, полученной из фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани (FFPET) или из свободно-циркулирующей ДНК (сцДНК) опухолевых клеток, выделенной из плазмы крови, которая была получена из цельной периферической крови с добавлением ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Тест-система предназначена для использования в качестве вспомогательного метода диагностики для отбора пациентов с НМРЛ, у которых целесообразно лечение ингибиторами тирозинкиназы EGFR (включая варианты таргетной терапии, перечисленные в Табл. 1 ниже) в соответствии с утвержденными инструкциями по применению соответствующих препаратов:

Табл. 1

Препарат	FFPET	Плазма
ТАРЦЕВА® (эрлотиниб)	Делеции в экзоне 19 и мутация L858R	Делеции в экзоне 19 и мутация L858R
TAGRISO® (осимертиниб)	Делеции в экзоне 19 и мутации L858R и T790M	Делеции в экзоне 19 и мутации L858R и T790M
IRESSA® (гефитиниб)	Делеции в экзоне 19 и мутация L858R	Делеции в экзоне 19 и мутация L858R

Анализ образцов плазмы крови лучше всего подходит для пациентов, у которых невозможно получить образцы опухоли путем биопсии. Пациентам, у которых при анализе образцов плазмы крови с помощью данной тест-системы не обнаружены упомянутые выше мутации, следует по возможности провести стандартную биопсию тканей с последующим исследованием образца типа FFPET для выявления мутаций гена EGFR.

Тест-система **cobas**® EGFR Mutation Test v2 также позволяет обнаруживать указанные ниже EGFR мутации, которые не были изучены в качестве критериев оценки эффективности и безопасности лекарственных препаратов:

Табл. 2

Препарат	FFPET	Плазма
ТАРЦЕВА® (эрлотиниб)	Мутация G719X, вставки в экзоне 20, мутации T790M, S768I и L861Q	Мутация G719X, вставки в экзоне 20, мутации T790M, S768I и L861Q
TAGRISO® (осимертиниб)	Мутация G719X, вставки в экзоне 20, мутации S768I и L861Q	Мутация G719X, вставки в экзоне 20, мутации S768I и L861Q
IRESSA® (гефитиниб)	Мутация G719X, вставки в экзоне 20, мутации T790M, S768I и L861Q	Мутация G719X, вставки в экзоне 20, мутации T790M, S768I и L861Q

Тест-система **cobas**® EGFR Mutation Test v2 для образцов плазмы крови также позволяет проводить полуколичественный анализ мутаций в экзонах 18, 19, 20 и 21 гена EGFR. Результаты такого определения (их также называют полуколичественными показателями) коррелируют с уровнем искомой мутантной сцДНК в плазме крови и могут использоваться для оценки изменений уровня мутантной сцДНК в плазме крови конкретного пациента с течением времени.

Пробоподготовка вручную для получения ДНК из фиксированных в формалине образцов ткани в парафиновых блоках (FFPET) осуществляется с использованием набора **cobas**® DNA Sample Preparation Kit, а пробоподготовка для получения ДНК из образцов плазмы крови — с использованием набора **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit. Для автоматизированной амплификации и детекции используется анализатор **cobas**® z 480.

Описание теста

Введение

Активирующие мутации в гене, кодирующем последовательность EGFR, преимущественно встречаются у пациентов с НМРЛ и приводят к конститутивному повышению киназной активности белка EGFR, что создает предпосылки для онкогенеза.¹ Распространенность этих мутаций в неотсортированной выборке случаев НМРЛ составляет приблизительно 10–30%.^{2,3} Однако данные мутации встречаются чаще (но не только) в подгруппе некурящих и малокурящих женщин азиатского происхождения, у которых гистологическим типом опухоли является аденокарцинома.⁴

Наиболее распространенные мутации гена EGFR у пациентов с НМРЛ включают различные делеции в экзоне 19 и мутацию замены L858R в экзоне 21; в совокупности на долю этих мутаций приходится приблизительно 85% от общего количества мутаций гена EGFR, наблюдаемых при НМРЛ.⁵ Тест-система cobas® EGFR Mutation Test v2 (тест-система cobas EGFR) представляет собой тест ПЦР в реальном времени и предназначена для выявления таких мутаций, как замена G719X в экзоне 18, делеция в экзоне 19, мутации замены T790M и S768I в экзоне 20, вставки в экзоне 20, а также мутации замены L858R и L861Q в экзоне 21.

Тест-система cobas EGFR используется в качестве сопроводительного диагностического теста при назначении препарата ТАРЦЕВА® (эрлотиниба), который обратимо ингибирует киназную активность EGFR и тем самым предотвращает аутофосфорилирование связанных с рецептором остатков тирозина, что, в свою очередь, ингибирует последующие этапы передачи сигнала по нисходящему сигнальному пути, который обеспечивает выживаемость и пролиферацию клеток. Избирательность связывания препарата ТАРЦЕВА® с мутированным рецептором EGFR (при наличии делеции в экзоне 19 или мутации замены L858R в экзоне 21) выше, чем с рецептором дикого типа.⁶ В клинических исследованиях было показано, что при наличии делеций в экзоне 19 или мутации замены L858R в экзоне 21 пациенты с распространенным НМРЛ, получавшие препарат ТАРЦЕВА® в качестве терапии первой линии, имели повышенную вероятность клинического улучшения по сравнению с пациентами, получавшими химиотерапию.^{3,7}

Тест-система cobas EGFR используется в качестве сопроводительного диагностического теста при назначении препарата ТАГРИССО® (осимертиниба), который является необратимым ингибитором тирозинкиназы (ИТК) EGFR при наличии сенсibiliзирующих мутаций гена EGFR и мутации T790M, связанной с развитием резистентности к ИТК, при распространенном НМРЛ. Препарат ТАГРИССО® ингибирует киназную активность EGFR, что в свою очередь подавляет нисходящий каскад передачи внутриклеточных сигналов, которые повышают выживаемость и пролиферацию клеток и усиливают ангиогенез.⁸ В клинических исследованиях было показано, что терапия препаратом ТАГРИССО® чаще обеспечивала клиническое улучшение у пациентов с распространенным неплоскоклеточным раком легкого с наличием сенсibiliзирующих к ИТК мутаций гена EGFR, у которых ранее во время терапии ИТК EGFR первого поколения произошло прогрессирование заболевания и формирование мутации резистентности T790M в экзоне 20.⁹ В клиническом исследовании III фазы было показано, что у пациентов с распространенным НМРЛ (с наличием делеции в экзоне 19 или мутации замены L858R в экзоне 21), которые получали препарат ТАГРИССО® в качестве терапии первой линии, улучшение было более выраженным по сравнению с пациентами, получавшими лечение ИТК EGFR первого поколения (гефитинибом или эрлотинибом).¹⁰

Тест-система cobas EGFR используется в качестве сопроводительного диагностического теста при назначении препарата IRESSA® (гефитиниба), который обратимо ингибирует киназную активность EGFR и тем самым предотвращает аутофосфорилирование связанных с рецептором остатков тирозина, что, в свою очередь, ингибирует последующие этапы передачи сигнала по нисходящему сигнальному пути, который обеспечивает выживаемость клеток и пролиферацию клеток. В клинических исследованиях было показано, что при наличии делеций в экзоне 19 или мутации замены L858R в экзоне 21 пациенты с распространенным НМРЛ, получавшие препарат IRESSA® в качестве терапии первой линии, имели повышенную вероятность клинического улучшения по сравнению с пациентами, получавшими химиотерапию.^{11, 12, 13}

В Табл. 3 приведен перечень мутаций гена EGFR, которые могут быть обнаружены с помощью тест-системы cobas EGFR.

Табл. 3 Тест-система cobas EGFR позволяет обнаруживать нижеперечисленные мутации

Экзон	Группа мутаций гена EGFR	Последовательность нуклеиновых кислот гена EGFR	Номенклатура белков HGVS *	Номенклатура нуклеотидов HGVS *	Идентификатор COSMIC ¹⁴
Экзон 18	G719X	2156G>C	LRG_304p1:p.(Gly719Ala)	LRG_304t1:c.2156G>C	6239
		2155G>A	LRG_304p1:p.(Gly719Ser)	LRG_304t1:c.2155G>A	6252
		2155G>T	LRG_304p1:p.(Gly719Cys)	LRG_304t1:c.2155G>T	6253
Экзон 19	Ex19Del	2240_2251del12	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsSer)	LRG_304t1:c.2240_2251delTAAGAGAAGCAA	6210
		2239_2247del9	LRG_304p1:p.(Leu747_Glu749del)	LRG_304t1:c.2239_2247delTTAAGAGAA	6218
		2238_2255del18	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsAsp)	LRG_304t1:c.2238_2255delATTAAGAGAAGCAACATC	6220
		2235_2249del15	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750del)	LRG_304t1:c.2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC	6223
		2236_2250del15	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750del)	LRG_304t1:c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA	6225
		2239_2253del15	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751del)	LRG_304t1:c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT	6254
		2239_2256del18	LRG_304p1:p.(Leu747_Ser752del)	LRG_304t1:c.2239_2256delTTAAGAGAAGCAACATCT	6255
		2237_2254del18	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsAla)	LRG_304t1:c.2237_2254delAATTAAGAGAAGCAACAT	12367
		2240_2254del15	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751del)	LRG_304t1:c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT	12369
		2240_2257del18	LRG_304p1:p.(Leu747_Pro753delinsSer)	LRG_304t1:c.2240_2257delTAAGAGAAGCAACATCTC	12370
		2239_2248TTAAGAAG>C	LRG_304p1:p.(Leu747_Ala750delinsPro)	LRG_304t1:c.2239_2248delinsC	12382
		2239_2251>C	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsPro)	LRG_304t1:c.2239_2251delinsC	12383
		2237_2255>T	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsVal)	LRG_304t1:c.2237_2255delinsT	12384
		2235_2255>AAT	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsIle)	LRG_304t1:c.2235_2255delinsAAT	12385
		2237_2252>T	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsVal)	LRG_304t1:c.2237_2252delinsT	12386
		2239_2258>CA	LRG_304p1:p.(Leu747_Pro753delinsGln)	LRG_304t1:c.2239_2258delinsCA	12387
		2239_2256>CAA	LRG_304p1:p.(Leu747_Ser752delinsGln)	LRG_304t1:c.2239_2256delinsCAA	12403
		2237_2253>TTGCT	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsValAla)	LRG_304t1:c.2237_2253delinsTTGCT	12416
		2238_2252>GCA	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsGln)	LRG_304t1:c.2238_2252delinsGCA	12419
		2238_2248>GC	LRG_304p1:p.(Leu747_Ala750delinsPro)	LRG_304t1:c.2238_2248delinsGC	12422
		2237_2251del15	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsAla)	LRG_304t1:c.2237_2251delAATTAAGAGAAGCAA	12678
		2236_2253del18	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751del)	LRG_304t1:c.2236_2253delGAATTAAGAGAAGCAACA	12728
		2235_2248>AATTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750delinsIlePro)	LRG_304t1:c.2235_2248delinsAATTC	13550
		2235_2252>AAT	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsIle)	LRG_304t1:c.2235_2252delinsAAT	13551
		2235_2251>AATTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsIlePro)	LRG_304t1:c.2235_2251delinsAATTC	13552
		2253_2276del24	LRG_304p1:p.(Ser752_Ile759del)	LRG_304t1:c.2253_2276delATCTCCGAAAGCCAAACAAGGAAAT	13556
		2237_2257>TCT	LRG_304p1:p.(Glu746_Pro753delinsValSer)	LRG_304t1:c.2237_2257delinsTCT	18427
2238_2252del15	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751del)	LRG_304t1:c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT	23571		
2233_2247del15	LRG_304p1:p.(Lys745_Glu749del)	LRG_304t1:c.2233_2247delAAGGAATTAAGAGAA	26038		
Экзон 20	S768I	2303G>T	LRG_304p1:p.(Ser768Ile)	LRG_304t1:c.2303G>T	6241
	T790M	2369C>T	LRG_304p1:p.(Thr790Met)	LRG_304t1:c.2369C>T	6240
	Ex20Ins	2307_2308ins9GCCAGCGTG	LRG_304p1:p.(Ala767_Val769dup)	LRG_304t1:c.2300_2308dupCCAGCGTGG	12376
		2319_2320insCAC	LRG_304p1:p.(His773dup)	LRG_304t1:c.2317_2319dupCAC	12377
		2310_2311insGGT	LRG_304p1:p.(Asp770_Asn771insGly)	LRG_304t1:c.2310_2311insGGT	12378
		2311_2312ins9GCGTGGACA	LRG_304p1:p.(Ser768_Asp770dup)	LRG_304t1:c.2303_2311dupGCGTGGACA	13428
		2309_2310AC>CCAGCGTGGAT	LRG_304p1:p.(Ala767_Val769dup)	LRG_304t1:c.2309_2310delinsCCAGCGTGGAT	13558
Экзон 21	L858R	2573T>G	LRG_304p1:p.(Leu858Arg)	LRG_304t1:c.2573T>G	6224
		2573_2574TG>GT	LRG_304p1:p.(Leu858Arg)	LRG_304t1:c.2573_2574delinsGT	12429
	L861Q	2582T>A	LRG_304p1:p.(Leu861Gln)	LRG_304t1:c.2582T>A	6213

* HGVS — Общество изучения вариативности генома человека (Human Genome Variation Society)

Процедуры, лежащие в основе теста

Принцип работы тест-системы **cobas** EGFR включает два основных процесса: (1) пробоподготовка вручную для получения ДНК из фиксированных в формалине образцов ткани в парафиновых блоках (FFPET) или плазме; (2) амплификация и детекция в процессе ПЦР ДНК-мишени с помощью пар комплементарных праймеров и олигонуклеотидных зондов, меченных флуоресцентными красителями. Тест-система **cobas** EGFR позволяет обнаруживать нижеперечисленные мутации:

- Экзон 18: G719X (G719A, G719C и G719S)
- Экзон 19: делеции и сложные мутации (комбинации делеций и вставок)
- Экзон 20: S768I, T790M и вставки
- Экзон 21: L858R и L861Q

Обнаружение мутаций происходит путем проведения ПЦР с использованием анализатора **cobas**® z 480. Мутантный контроль и отрицательный контроль включаются в каждую постановку для подтверждения валидности.

Пробоподготовка

Наборы **cobas**® DNA Sample Preparation Kit и **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit используются для пробоподготовки путем выделения ДНК из фиксированных в формалине образцов ткани в парафиновых блоках (FFPET) и из плазмы крови соответственно по ручной методике, основанной на связывании нуклеиновых кислот со стекловолокном. Протеаза и хаотропный лизирующий/связывающий буфер обеспечивают высвобождение нуклеиновых кислот и защиту высвобожденной ДНК от ДНКаз. Далее в лизирующую смесь добавляется изопропанол, после чего смесь центрифугируется через колонку с встроенным фильтром из стекловолокна. Во время центрифугирования ДНК связывается с поверхностью стекловолоконного фильтра. Несвязавшиеся вещества, такие как соли, белки и другие клеточные примеси, удаляются при центрифугировании. Связавшиеся нуклеиновые кислоты вымываются и затем элюируются водным раствором. ДНК мишени затем подвергается амплификации и детекции с использованием анализатора **cobas**® z 480 и реагентов для амплификации и детекции, входящих в комплектацию тест-системы **cobas** EGFR.

Амплификация при проведении ПЦР

Выбор мишени

В тест-системе **cobas** EGFR используются праймеры к каждой специфической последовательности пар оснований для каждой из определяемых мутаций. Для делеций в экзоне 19 в качестве мишеней используются последовательности длиной от 125 до 141 пар оснований, для мутации замены L858R в экзоне 21 — последовательность из 138 пар оснований, для мутации замены T790M в экзоне 20 — последовательность из 118 пар оснований, для мутации замены G719X в экзоне 18 — последовательности длиной от 104 до 106 пар оснований, для мутации замены S768I в экзоне 20 — последовательность из 133 пар оснований, для вставок в экзоне 20 — последовательности длиной от 125 до 143 пар оснований, для мутации замены L861Q в экзоне 21 — последовательность из 129 пар оснований. Амплифицируются только участки гена EGFR между праймерами; полный ген EGFR не амплифицируется.

Амплификация мишени

Для амплификации мишени используется ДНК-полимераза Z05-AS1 бактерий *Thermus*. Вначале реакционная смесь для ПЦР нагревается до температуры денатурации ДНК для открытия сайтов посадки праймеров. При охлаждении смеси прямой и обратный праймеры связываются с последовательностями ДНК-мишени. ДНК-полимераза Z05 в присутствии катиона двухвалентного металла и при избытке дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP) удлиняет каждый присоединившийся праймер с образованием второй цепи ДНК. Таким образом, первый цикл ПЦР завершается синтезом двуцепочной копии ДНК, которая включает определяемые последовательности

07340761001-03RU

пар оснований гена EGFR. Этот процесс повторяется заданное число циклов, и в каждом цикле количество копий ампликона ДНК удваивается.

Автоматизированная детекция мутаций в режиме реального времени

Тест-система **cobas** EGFR позволяет проводить исследование методом ПЦР в реальном времени. Каждый мишень-специфичный олигонуклеотидный зонд в составе реакционной смеси помечен флуоресцентным веществом, которое выступает в качестве репортерного красителя, а также гасящим красителем, который поглощает (гасит) флуоресцентное излучение от репортерного красителя, если зонд находится в интактном состоянии. Во время каждого цикла амплификации зонд, комплиментарный одноцепочечной последовательности ДНК в ампликоне, связывается и затем расщепляется ДНК-полимеразой Z05-AS1, обладающей 5'-3'-экзонуклеазной активностью. Под действием фермента с экзонуклеазной активностью репортерный краситель отделяется от гасителя и под воздействием светового излучения определенного спектра генерирует поддающийся измерению флуоресцентный сигнал со специфической длиной волны. Для выявления мутаций, включенных в данную тест-систему, используются четыре различных репортерных красителя. Амплификация семи определяемых последовательностей гена EGFR обнаруживается по отдельности в ходе трех реакций посредством измерения интенсивности флуоресцентного сигнала при четырех установленных вариантах длины волны в специальных каналах оптической системы обнаружения.

Избирательная амплификация

Избирательная амплификация нуклеиновой кислоты-мишени из образца в тест-системе **cobas** EGFR обеспечивается ферментом AmpErase (урацил-N-гликозилазой) и дезоксиуридин трифосфатом (dUTP).¹⁵ Фермент AmpErase распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей тимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК но всегда присутствует в ампликонах, поскольку dUTP входит в состав смеси реагентов мастермикс Master Mix вместо дезокситимидин трифосфата; таким образом, дезоксиуридин содержится только в ампликонах. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом AmpErase до начала амплификации ДНК-мишени. Фермент AmpErase, входящий в состав смеси реагентов мастермикс Master Mix, катализирует расщепление содержащей дезоксиуридин ДНК по дезоксиуридиновому основанию, открывая дезоксирибозную цепь в позиции C1. При нагревании на первом этапе термоциклирования в щелочной среде ДНК-цепь ампликона разрывается в позиции дезоксиуридина и, следовательно, ДНК больше не подлежит амплификации. Фермент AmpErase неактивен при температуре выше 55 °С, т. е. на этапах термоциклирования, и, следовательно, не разрушает ампликон мишени. Было подтверждено, что тест-система **cobas** EGFR инактивирует ампликоны, содержащие дезоксиуридин мутантные последовательности гена EGFR.

ПРИ РАБОТЕ С ОБРАЗЦАМИ ТКАНЕЙ СОБЛЮДАЙТЕ ИНСТРУКЦИИ, ПРИВЕДЕННЫЕ В РАЗДЕЛЕ А.

ПРИ РАБОТЕ С ОБРАЗЦАМИ ПЛАЗМЫ КРОВИ СОБЛЮДАЙТЕ ИНСТРУКЦИИ, ПРИВЕДЕННЫЕ В РАЗДЕЛЕ Б.

РАЗДЕЛ А: ПРИНЦИПЫ РАБОТЫ С ОБРАЗЦАМИ ТКАНЕЙ

Выделение ДНК из образцов тканей описано в инструкции к набору **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

Реагенты и материалы

Реагенты и материалы в комплекте

Набор/кассеты	Реагенты и их состав	Количество в наборе	Маркировка безопасности и предупреждения
Тест-система cobas® EGFR Mutation Test v2 24 теста (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-1 (мастермикс EGFR Master Mix 1) (M/N 06471366001) Tris буфер Хлорид калия Глицерин ЭДТА Tween 20 3,13 % диметилсульфоксид 0,09 % азид натрия < 0,10 % dNTP < 0,01 % ДНК-полимераза Z05-AS1 (бактериальная) < 0,01 % фермент AmpErase (урацил-N-гликозилаза) (бактериальный) < 0,01 % аптамер < 0,01 % прямой и обратный праймеры гена EGFR < 0,01 % меченные флуоресцентным красителем зонды гена EGFR	2 × 0,48 мл	Нет

Набор/кассеты	Реагенты и их состав	Количество в наборе	Маркировка безопасности и предупреждения
Тест-система cobas® EGFR Mutation Test v2 24 теста (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-2 (мастермикс EGFR Master Mix 2) (M/N 06471382001) Tris буфер Хлорид калия Глицерин ЭДТА Tween 20 3,13 % диметилсульфоксид 0,09 % азид натрия < 0,10 % dNTP < 0,01 % ДНК-полимераза Z05-AS1 (бактериальная) < 0,01 % фермент AmpErase (урацил-N-гликозилаза) (бактериальный) < 0,01 % аптамер < 0,01 % прямой и обратный праймеры гена EGFR < 0,01 % меченные флуоресцентным красителем зонды гена EGFR	2 × 0,48 мл	Нет
	EGFR MMX-3 v2 (мастермикс EGFR Master Mix 3) (M/N 07248610001) Tris буфер Хлорид калия Глицерин ЭДТА Tween 20 3,13 % диметилсульфоксид 0,09 % азид натрия < 0,10 % dNTP < 0,01 % ДНК-полимераза Z05-AS1 (бактериальная) < 0,01 % фермент AmpErase (урацил-N-гликозилаза) (бактериальный) < 0,01 % аптамер < 0,01 % прямой и обратный праймеры гена EGFR < 0,01 % меченные флуоресцентным красителем зонды гена EGFR	2 × 0,48 мл	Нет
	MGAC (ацетат магния) (M/N 05854326001) Ацетат магния 0,09 % азид натрия	6 × 0,2 мл	Нет
	EGFR MC (мутантный контроль гена EGFR) (M/N 06471455001) Tris буфер ЭДТА Поли-гА-РНК (синтетическая) 0,05 % азид натрия < 0,1 % плазмидная ДНК, содержащая последовательности экзонов 18, 19, 20 и 21 гена EGFR (бактериальная) < 0,1 % ДНК гена EGFR дикого типа (культура клеток)	6 × 0,1 мл	Нет
	DNA SD (дилуэнт для образцов ДНК) (M/N 05854474001) Tris-HCl буфер 0,09 % азид натрия	2 × 3,5 мл	Нет

Хранение реагентов и работа с ними

Реагент	Температура хранения	Длительность хранения
Тест-система cobas® EGFR Mutation Test v2 *	2–8 °C	После вскрытия эта тест-система стабильна для 4 применений на протяжении 90 дней или до истечения указанного срока годности, если он наступит раньше.

* Реагенты **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** и рабочий MMX (готовится путем добавления **MGAC** к **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2** или **EGFR MMX-3 v2**) необходимо хранить в темном месте и предохранять от длительного воздействия света. Рабочий MMX необходимо хранить в темноте при температуре 2–8 °C. Подготовленные образцы и контроли необходимо внести в рабочий MMX в течение 1 часа с момента его приготовления. Амплификация должна начаться в течение 1 часа с момента добавления подготовленных образцов и контролей в рабочий MMX.

Необходимые дополнительные материалы

Материалы	M/N
Набор для пробоподготовки cobas® DNA Sample Preparation Kit	Roche 05985536190
Гипохлорит натрия	Любой поставщик
70 % этанол	Любой поставщик
Микропланшет (AD-планшет) системы cobas® 4800 и заклеивающая пленка	Roche 05232724001
Аппликатор для заклеивающей пленки системы cobas® 4800 (входит в комплект системы cobas® 4800)	Roche 04900383001
Дозаторы с регулируемым объемом * (для пипетирования реагентов объемом от 5 до 1000 мкл)	Любой поставщик
Свободные от ДНКаз наконечники для пипеток с аэрозольным барьером или прямым вытеснением	Любой поставщик
Микроцентрифужные пробирки с плотно закрывающимися крышками (1,5 мл, стерильные, свободные от РНКаз/ДНКаз, подходящие для ПЦР)	Любой поставщик
Штативы для микроцентрифужных пробирок	Любой поставщик
Спектрофотометр для измерения концентрации ДНК *	Любой поставщик
Вортекс *	Любой поставщик
Одноразовые перчатки, без талька	Любой поставщик
Морозильная камера, способная поддерживать температуру от –25 °C до –15 °C	Любой поставщик

* Все оборудование должно эксплуатироваться в соответствии с инструкциями производителя.

За дополнительной информацией о приобретаемых отдельно материалах обратитесь в местное представительство компании Roche.

Необходимое оборудование и программное обеспечение, не включенное в поставку

Необходимое оборудование и программное обеспечение, не включенное в поставку
Анализатор cobas® z 480
Управляющий компьютер системы cobas® 4800 с программным обеспечением версии 2.2 или более поздней версии
Программа EGFR Tissue P1 Analysis Package Software, версия 1.0 или более поздняя версия*
Сканер штрихкодов внешний с подключением через USB-порт
Принтер

* Актуальная версия программного обеспечения указана во вкладке к набору с описанием тест-системы cobas® EGFR Mutation Test v2 (M/N: 07335873001).

За дополнительной информацией о приобретаемых отдельно материалах обратитесь в местное представительство компании Roche.

Меры предосторожности и правила работы

Меры предосторожности

Как и при выполнении любых тестов, соблюдение правил надлежащей лабораторной практики является условием качественного выполнения данного теста.

- Только для диагностики *in vitro*.
- Паспорта безопасности материалов (SDS) доступны по запросу в вашем региональном представительстве компании Roche.
- Данная тест-система предназначена для работы с фиксированными в формалине и залитыми в парафин образцами ткани (FFPET), полученными от пациентов с НМРЛ. Образцы нужно рассматривать как потенциально инфекционные и соблюдать при работе с ними правила лабораторной безопасности, приведенные в документах Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories¹⁶ и CLSI Document M29-A4.¹⁷
- Рекомендуется использовать стерильные одноразовые пипетки и свободные от ДНКаз дозаторы.

Надлежащая лабораторная практика

- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте и не курите в рабочих лабораторных помещениях.
- Тщательно мойте руки после работы с образцами и реагентами набора.
- Работайте с любыми реагентами в средствах для защиты глаз, лабораторном халате и одноразовых перчатках. Избегайте попадания данных материалов в глаза, на кожу или слизистые оболочки. При попадании немедленно промойте большим количеством воды. В противном случае могут возникнуть ожоги. При разлиии реагентов залейте их водой, затем вытрите насухо.
- Тщательно очищайте и дезинфицируйте все рабочие поверхности свежеприготовленным 0,5%-м раствором гипохлорита натрия в дистиллированной или деионизированной воде (разведите бытовую хлорку в соотношении 1:10), затем протирайте их 70%-м этанолом.

Примечание. Коммерческий жидкий бытовой отбеливатель обычно содержит гипохлорит натрия в концентрации 5,25 %. Разведение 1:10 бытового хлорсодержащего моющего средства дает 0,5 % раствор гипохлорита натрия.

Контаминация

- Во избежание контаминации необходимо работать в одноразовых перчатках и менять их при переходе от работы с образцами к работе с реагентами тест-системы **cobas** EGFR. Не допускайте контаминации перчаток при работе с образцами.
- Необходимо часто менять перчатки, чтобы снизить риск контаминации.
- Также обязательно следует сменить перчатки перед выходом из зоны проведения работ по выделению ДНК или при подозреваемом загрязнении растворами реагентов или образцом.
- Не допускайте микробную и рибонуклеазную контаминацию реагентов.
- Перед приготовлением ММХ необходимо тщательно очистить зону амплификации и детекции. Для каждого этапа процедуры должны быть специально выделены запасы реактивов и отдельное оборудование, которые не будут применяться для других процедур или перемещаться из одной зоны в другую. Например, дозаторы и расходные материалы, использующиеся для выделения ДНК, нельзя использовать для приготовления реагентов для амплификации и детекции.
- Крайне желательно организовать рабочий процесс в лаборатории таким образом, чтобы все процедуры выполнялись в одном направлении и каждый следующий этап начинался только после завершения предыдущего. Например, выделение ДНК необходимо завершить до начала амплификации и детекции. Выделение ДНК должно осуществляться в зонах, отгороженных от зон амплификации и детекции. Во избежание контаминации рабочей смеси Мастермикс образцами ДНК необходимо тщательно очистить рабочую зону амплификации и детекции до начала приготовления смеси Мастермикс.

Целостность

- Не используйте набор по истечении срока годности.
- Не смешивайте реагенты из разных наборов или лотов.
- Не используйте одноразовые материалы с истекшим сроком годности.
- Все одноразовые материалы предназначены для однократного использования. Не используйте их повторно.
- Все оборудование должно эксплуатироваться в соответствии с инструкциями производителя.

Утилизация

- Реагенты **MGAC**, **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2**, **EGFR MC** и **DNA SD** содержат азид натрия. Азид натрия может вступать в реакцию со свинцом и медью, которые содержатся в трубах канализации, что приводит к образованию взрывоопасных азидов. При сливе отходов, содержащих азид натрия, в лабораторную раковину смывайте их большим количеством холодной воды, чтобы предотвратить накопление азидов.
- Утилизируйте неиспользованные реагенты и отходы в соответствии с государственными, федеральными и региональными правилами.

Разлив жидкости и очистка

- Если разлив произошел в приборе **cobas® 4800**, выполните очистку в соответствии с инструкцией, приведенной в руководстве пользователя системы **cobas® 4800** или справочнике для поддержки пользователя системы **cobas® 4800**.
- Не используйте раствор гипохлорита натрия (хлорсодержащего моющего средства) для очистки анализатора **cobas® z 480**. Выполняйте очистку анализатора **cobas® z 480** в соответствии с инструкцией, приведенной в руководстве пользователя системы **cobas® 4800** или справочнике для поддержки пользователя системы **cobas® 4800**.
- Дополнительные предупреждения и сведения о мерах предосторожности и процедурах по снижению риска контаминации при работе с анализатором **cobas® z 480** приведены в руководстве пользователя системы **cobas® 4800** или справочнике для поддержки пользователя системы **cobas® 4800**.

Сбор, транспортировка и хранение образцов

Примечание. Работайте со всеми образцами как с потенциально инфекционными материалами.

Сбор образцов

Тест-система **cobas EGFR** одобрена для проведения исследований фиксированных в формалине образцов ткани в парафиновых блоках (FFPET), полученных от пациентов с НМРЛ.

Транспортировка, хранение и обеспечение стабильности образцов

Фиксированные в формалине и залитые в парафин образцы ткани (FFPET), полученные от пациентов с НМРЛ, могут транспортироваться при температурах от 15 °C до 30 °C. Транспортировка образцов FFPET должна выполняться в соответствии с общегосударственными, федеральными, региональными и местными нормативными требованиями в отношении транспортировки этиологических агентов.¹⁸

Фиксированные в формалине и залитые в парафин образцы ткани (FFPET) сохраняют стабильность до 12 месяцев при хранении в диапазоне температур от 15 °C до 30 °C. Срезы образцов толщиной в пять микрометров, зафиксированные на предметных стеклах, могут храниться при температуре от 15 °C до 30 °C на протяжении периода до 60 дней.

Фиксированные в формалине и залитые в парафин образцы ткани (FFPET) сохраняют стабильность при следующих условиях:

Образец типа FFPET	Блок FFPET	5-мкм срез FFPET
Температура хранения образца FFPET	15–30 °C	15–30 °C
Длительность хранения	До 12 месяцев	До 60 дней

Срок хранения и стабильность обработанных образцов

Обработанные образцы (выделенная ДНК) сохраняют стабильность при следующих условиях:

Температура хранения выделенной ДНК	–15...–25 °C	2–8 °C	15–30 °C
Длительность хранения	До 3 циклов замораживания-оттаивания на протяжении 60 дней	До 14 дней	До 1 дня

Выделенную ДНК необходимо использовать в течение рекомендованного срока хранения или до истечения срока годности набора **cobas® DNA Sample Preparation Kit**, который был использован для выделения ДНК, если этот срок наступит раньше.

07340761001-03RU

Doc. Rev. 8.0

Процедура тестирования

Постановка теста

Рис. 1 Рабочий процесс использования тест-системы cobas EGFR совместно с набором cobas® DNA Sample Preparation Kit

1	Запуск системы
2	Обслуживание прибора
3	Извлечение образцов и реагентов из хранения
4	Депарафинизация образцов
5	Выделение ДНК
6	Элюирование ДНК
7	Создание рабочего задания и распечатка схемы планшета
8	Подготовка реагентов для амплификации
9	Загрузка реагентов для амплификации в лунки AD-планшета
10	Загрузка образца в лунки AD-планшета
11	Запечатывание AD-планшета
12	Загрузка AD-планшета в анализатор cobas® z 480
13	Запуск постановки
14	Просмотр результатов
15	С использованием ЛИС: отправка результатов в ЛИС
16	Разгрузка анализатора

Инструкция по работе с набором

Примечание. Для проведения исследований с использованием тест-системы **cobas EGFR** пригодны только 5-мкм срезы фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани (FFPET), полученные от пациентов с НМРЛ, в которых опухолевые ткани занимают по меньшей мере 10 % от общей площади среза. Если образец содержит менее 10 % опухолевых тканей от общей площади среза, после депарафинизации необходимо провести макродиссекцию образца.

Примечание. Подробные инструкции по работе с анализатором **cobas® z 480** см. приведены в руководстве пользователя системы **cobas® 4800** или справочнике для поддержки пользователя системы **cobas® 4800**.

Объем постановки

Одна постановка может включать от 1 до 30 образцов (а также контроли) на 96-луночный микропланшет. При постановке более чем 24 образца понадобится использовать несколько наборов тест-системы **cobas EGFR**.

Тест-система **cobas EGFR** содержит достаточно реагентов для проведения 8 постановок по 3 образца (плюс контроли). Таким образом, одной тест-системы будет достаточно для анализа 24 образцов.

Контроль всей процедуры

При проведении этого исследования обязателен отрицательный контроль процедуры. Начиная с этапа **выделения ДНК**, в каждую постановку вместе с образцами в обязательном порядке включается отрицательный контроль.

Выделение ДНК

ДНК выделяется из фиксированных в формалине образцов ткани в парафиновых блоках (FFPET) с использованием набора для пробоподготовки **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

Макродиссекция образца

Если образец содержит менее 10 % опухолевых тканей от общей площади среза, в рамках пробоподготовки необходимо провести макродиссекцию образца.

Количественный анализ ДНК

Примечание. Измерение концентрации ДНК необходимо проводить сразу же после процедуры выделения ДНК и до отправки образца на хранение.

Примечание. Хранить исходный образец ДНК следует в соответствии с инструкциями, приведенными в разделе «Транспортировка, хранение и обеспечение стабильности образцов».

1. Каждую пробирку с исходным образцом ДНК перемешайте на вортексе на протяжении 5 секунд.
2. Проведите количественный анализ ДНК с помощью спектрофотометра в соответствии с протоколом производителя. В качестве пустого образца используйте реагент **DNA EB** из набора для пробоподготовки **cobas**® DNA Sample Preparation Kit. Необходимо получить среднее значение из двух согласующихся результатов измерений. В случае, когда концентрация ДНК составляет $\geq 20,0$ нг/мкл, два результата измерений должны отличаться друг от друга не более чем на ± 10 %. При концентрации ДНК $< 20,0$ нг/мкл два результата измерений не должны отличаться друг от друга более чем на ± 2 нг/мкл. Если результаты двух измерений отличаются более чем на ± 10 % (при концентрации ДНК $\geq 20,0$ нг/мкл) или более чем на ± 2 нг/мкл (при концентрации ДНК $< 20,0$ нг/мкл), необходимо провести еще 2 измерения. Если и в этом случае условие не соблюдено, повторять по 2 измерения, пока условие не будет выполнено. Затем следует рассчитать среднее из этих двух новых значений.

Примечание. Измерение исходной концентрации ДНК во включенном в постановку отрицательном контроле (**NEG**) не проводится.

3. Для проведения исследования с использованием тест-системы **cobas** EGFR концентрация ДНК в исходных образцах должна составлять ≥ 2 нг/мкл. Для каждого образца проводится три процедуры амплификации/детекции, для каждой из которых используется по 25 мкл разведенного до концентрации 2 нг/мкл исходного образца ДНК (в общей сложности используется 50 нг ДНК).

Примечание. Для проведения исследования с использованием тест-системы **cobas** EGFR концентрация ДНК в исходном образце должна составлять не менее 2 нг/мкл. Если концентрация ДНК в исходном образце составляет < 2 нг/мкл, повторите депарафинизацию, выделение ДНК и количественный анализ ДНК для этого образца, используя два 5-мкм среза фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани (FFPET). Если в качестве образцов используются срезы на предметных стеклах, после депарафинизации объедините ткани обоих срезов в одной пробирке, погрузите ткани в смесь растворов **TLB + PK** из набора для пробоподготовки **cobas**® DNA Sample Preparation Kit и проведите выделение и количественный анализ ДНК. Если образцы не закреплены на предметных стеклах, объедините ткани обоих срезов в одной пробирке и проведите депарафинизацию, а также выделение и количественный анализ ДНК. Если концентрация ДНК в исходном образце по-прежнему составляет < 2 нг/мкл, запросите другой фиксированный в формалине образец ткани в парафиновых блоках (FFPET) в соответствующей лаборатории.

Аmplификация и детекция

Примечание. Во избежание контаминации рабочего ММХ образцами ДНК процедуры амплификации и детекции следует проводить в зоне, отделенной от зоны выделения ДНК. Перед приготовлением ММХ необходимо тщательно очистить зону амплификации и детекции. Для обеспечения достаточной очистки все поверхности, включая штативы и дозаторы, необходимо тщательно протереть 0,5 % раствором гипохлорита натрия, а затем 70 % раствором этанола. Коммерческий жидкий бытовой отбеливатель обычно содержит гипохлорит натрия в концентрации 5,25 %. Разведение 1:10 бытового хлорсодержащего моющего средства дает 0,5 % раствор гипохлорита натрия.

Подготовка оборудования

Подробные инструкции по подготовке к работе с анализатором **cobas® z 480** приведены в руководстве пользователя системы **cobas® 4800** или справочнике для поддержки пользователя системы **cobas® 4800**.

Подготовка к проведению исследования

Подробные инструкции по подготовке этапов рабочего процесса исследования на наличие мутаций гена EGFR приведены в руководстве пользователя системы **cobas® 4800** или справочнике для поддержки пользователя системы **cobas® 4800**.

Подготовьте схему планшета с указанием расположения всех образцов и контролей для текущей постановки. В постановке, в которой анализируются только образцы тканей, мутантный контроль вносят в ячейки планшета **A01–A03**. Отрицательный контроль вносят в лунки планшета **B01–B03**. Затем вносят разеденные образцы в 3 колонках, начиная с ячеек **C01–C03** и заканчивая ячейками **H10–H12**, как показано на Рис. 2.

Тест-система **cobas EGFR** может использоваться в смешанном режиме (то есть позволяет проводить исследование на наличие мутаций гена EGFR одновременно в образцах тканей и плазмы крови). В зависимости от выбранных вариантов исследования и количества образцов расположение контролей может различаться. Подробные инструкции по подготовке к проведению исследования в смешанном режиме приведены в руководстве пользователя системы **cobas® 4800** или справочнике для поддержки пользователя системы **cobas® 4800**.

Рис. 2 Схема планшета для тест-системы **cobas EGFR**

Ряд/ колонка	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	MC MMX 1	MC MMX 2	MC MMX 3 v2	S7 MMX 1	S7 MMX 2	S7 MMX 3 v2	S15 MMX 1	S15 MMX 2	S15 MMX 3 v2	S23 MMX 1	S23 MMX 2	S23 MMX 3 v2
B	NEG MMX 1	NEG MMX 2	NEG MMX 3 v2	S8 MMX 1	S8 MMX 2	S8 MMX 3 v2	S16 MMX 1	S16 MMX 2	S16 MMX 3 v2	S24 MMX 1	S24 MMX 2	S24 MMX 3 v2
C	S1 MMX 1	S1 MMX 2	S1 MMX 3 v2	S9 MMX 1	S9 MMX 2	S9 MMX 3 v2	S17 MMX 1	S17 MMX 2	S17 MMX 3 v2	S25 MMX 1	S25 MMX 2	S25 MMX 3 v2
D	S2 MMX 1	S2 MMX 2	S2 MMX 3 v2	S10 MMX 1	S10 MMX 2	S10 MMX 3 v2	S18 MMX 1	S18 MMX 2	S18 MMX 3 v2	S26 MMX 1	S26 MMX 2	S26 MMX 3 v2
E	S3 MMX 1	S3 MMX 2	S3 MMX 3 v2	S11 MMX 1	S11 MMX 2	S11 MMX 3 v2	S19 MMX 1	S19 MMX 2	S19 MMX 3 v2	S27 MMX 1	S27 MMX 2	S27 MMX 3 v2
F	S4 MMX 1	S4 MMX 2	S4 MMX 3 v2	S12 MMX 1	S12 MMX 2	S12 MMX 3 v2	S20 MMX 1	S20 MMX 2	S20 MMX 3 v2	S28 MMX 1	S28 MMX 2	S28 MMX 3 v2
G	S5 MMX 1	S5 MMX 2	S5 MMX 3 v2	S13 MMX 1	S13 MMX 2	S13 MMX 3 v2	S21 MMX 1	S21 MMX 2	S21 MMX 3 v2	S29 MMX 1	S29 MMX 2	S29 MMX 3 v2
H	S6 MMX 1	S6 MMX 2	S6 MMX 3 v2	S14 MMX 1	S14 MMX 2	S14 MMX 3 v2	S22 MMX 1	S22 MMX 2	S22 MMX 3 v2	S30 MMX 1	S30 MMX 2	S30 MMX 3 v2

Условные обозначения: MC = мутантный контроль, NEG = отрицательный контроль; S# = идентификатор образца, MMX # соответствует номеру мастермикс реагента Master Mix: 1, 2 или 3 v2.

Примечание. Для того чтобы получить валидные результаты, каждый образец необходимо внести в три последовательных столбца в один ряд.

Примечание. Рабочий мастермикс Master Mix 1 вносится в лунки планшета 01, 04, 07 и 10. Рабочий мастермикс Master Mix 2 вносится в лунки планшета 02, 05, 08 и 11. Рабочий мастермикс Master Mix 3 v2 вносится в лунки планшета 03, 06, 09 и 12.

Примечание. В лунки одного планшета может быть внесено не более 30 образцов. Если для внесения всех образцов в один планшет требуется использовать реагенты из нескольких наборов, все эти наборы должны быть из одного лота.

Расчет разведений исходного образца ДНК

Расчет разведений для исходного образца ДНК с концентрацией от 2 до 36 нг/мкл

Примечание. Разведение исходных образцов ДНК необходимо проводить непосредственно перед амплификацией и детекцией.

Примечание. Для каждого образца проводятся три процедуры амплификации/детекции; для исследования одного образца требуется 75 мкл (по 25 мкл для каждой реакции) разведенного исходного образца ДНК с концентрацией 2 нг/мкл (в общей сложности 150 нг ДНК).

1. Для каждого образца рассчитайте необходимый объем (в мкл) исходного образца ДНК:

$$\text{Объем исходного образца ДНК (мкл)} = (90 \text{ мкл} \times 2 \text{ нг/мкл}) \div \text{концентрация ДНК в исходном образце (нг/мкл)}$$

2. Для каждого образца рассчитайте необходимый объем (в мкл) реагента **DNA SD**:

$$\text{Объем реагента DNA SD (мкл)} = 90 \text{ мкл} - \text{объем исходного образца ДНК (мкл)}$$

Пример:

Концентрация ДНК в исходном образце = 6,5 нг/мкл

1. Объем исходного образца ДНК (мкл) = $(90 \text{ мкл} \times 2 \text{ нг/мкл}) \div 6,5 \text{ нг/мкл} = 27,7 \text{ мкл}$

2. Объем реагента **DNA SD** (мкл) = $(90 \text{ мкл} - 27,7 \text{ мкл}) = 62,3 \text{ мкл}$

Расчет разведений для исходного образца ДНК с концентрацией > 36 нг/мкл

Примечание. Разведение исходных образцов ДНК необходимо проводить непосредственно перед амплификацией и детекцией.

Примечание. Для каждого образца проводятся три процедуры амплификации/детекции; для исследования одного образца требуется 75 мкл (по 25 мкл для каждой реакции) разведенного исходного образца ДНК с концентрацией 2 нг/мкл (в общей сложности 150 нг ДНК).

1. Если концентрация ДНК в исходном образце превышает 36 нг/мкл, для расчета объема реагента **DNA SD**, необходимого для приготовления по меньшей мере 90 мкл разведенного исходного образца ДНК, используйте приведенную ниже формулу. Это позволит обеспечить использование по меньшей мере 5 мкл исходного раствора ДНК.

2. Для каждого образца рассчитайте объем (в мкл) реагента **DNA SD**, необходимый для разведения 5 мкл исходного раствора ДНК до концентрации 2 нг/мкл:

$$\text{Необходимый объем реагента DNA SD (мкл)} = [(5 \text{ мкл исходного образца ДНК} \times \text{концентрация ДНК в исходном растворе в нг/мкл}) \div 2 \text{ нг/мкл}] - 5 \text{ мкл}$$

Пример:

Концентрация ДНК в исходном образце = 100 нг/мкл

1. Необходимый объем реагента **DNA SD** (мкл) = $[(5 \text{ мкл} \times 100 \text{ нг/мкл}) \div 2 \text{ нг/мкл}] - 5 \text{ мкл} = 245 \text{ мкл}$

2. Используйте рассчитанный объем раствора **DNA SD**, чтобы развести 5 мкл исходного образца ДНК до требуемой концентрации.

Разведение образцов

1. Подготовьте необходимое количество микроцентрифужных пробирок с плотно закрывающимися крышками объемом 1,5 мл для разведений ДНК, промаркируйте их в соответствии с маркировкой образцов.
2. С помощью дозатора с наконечником с аэрозольным барьером пипетируйте рассчитанные объемы реагента **DNA SD** в пробирки с соответствующей маркировкой. Пипетируйте 45 мкл реагента **DNA SD** в микроцентрифужную пробирку с плотно закрывающейся крышкой, на которую нанесена маркировка **NEG**.
3. Перемешайте каждый исходный образец ДНК и отрицательный контроль на вортексе на протяжении 5–10 секунд.
4. С помощью дозатора с наконечником с аэрозольным барьером осторожно пипетируйте рассчитанный объем каждого исходного образца ДНК в соответствующую пробирку, содержащую реагент **DNA SD** (используйте отдельный наконечник для каждой следующей пробирки). Пипетируйте 45 мкл отрицательного контроля (элюат после выделения) в пробирку с маркировкой **NEG**.
5. Закройте пробирки крышками и перемешайте на вортексе в течение 5–10 секунд.
6. Смените перчатки.

Подготовка реакции

Подготовка рабочих мастермиксов (MMX-1, MMX-2 и MMX-3 v2)

Примечание. Растворы **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** и рабочий **MMX** чувствительны к свету и необходимо защищать их от длительного воздействия света.

Примечание. В связи с высокой вязкостью реагентов **EGFR MMX** и рабочего **MMX** эти растворы необходимо типетировать медленно, чтобы обеспечить полный выход смеси из наконечника.

Примечание. Реагенты **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2** и **EGFR MMX-3 v2** могут иметь бледно-голубую или сиреневатую окраску. Это не влияет на рабочие характеристики реагента.

В отдельных микроцентрифужных пробирках с плотно закрывающимися крышками объемом 1,5 мл приготовьте три партии рабочего **MMX**, одну — с добавлением **EGFR MMX-1**, другую — с добавлением **EGFR MMX-2**, и третью — с добавлением **EGFR MMX-3 v2**.

1. Рассчитайте объемы реагентов **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2** или **EGFR MMX-3 v2**, необходимые для каждого рабочего **MMX** по следующей формуле:
 Необходимый объем **EGFR MMX-1** или **EGFR MMX-2** или **EGFR MMX-3 v2** = (количество образцов + 2 контроля + 1) × 20 мкл
2. Рассчитайте необходимый объем реагента **MGAC** для каждой партии рабочего **MMX** по следующей формуле:
 Необходимый объем реагента **MGAC** = (количество образцов + 2 контроля + 1) × 5 мкл

Для определения объема каждого реагента, необходимого для приготовления рабочего **MMX** исходя из количества образцов, включенных в постановку, руководствуйтесь Табл. 4.

Табл. 4 Объемы реагентов, необходимые для приготовления рабочих **MMX-1**, **MMX-2** и **MMX-3 v2**

		Количество образцов *									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMX	20 мкл	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260
MGAC	5 мкл	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Общий объем каждого рабочего MMX (мкл)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Значение параметра «количество образцов» определяется как количество анализируемых образцов + 2 контроля + 1.

3. Достаньте необходимое количество пробирок реагентов **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** и **MGAC** из холодильника с температурой камеры от 2 °С до 8 °С. Перемешайте каждый реагент на вортексе в течение 5 секунд и осадите капли со стенок пробирки на дно, прежде чем приступить к работе с реагентом. Промаркируйте стерильные микроцентрифужные пробирки для рабочих MMX-1, MMX-2 и MMX-3 v2.
4. Внесите рассчитанные объемы реагентов **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2** или **EGFR MMX-3 v2** в соответствующие пробирки для рабочих MMX.
5. Внесите рассчитанный объем реагента **MGAC** в пробирки с рабочими MMX.
6. Перемешайте содержимое пробирок на вортексте в течение 3–5 секунд для получения достаточно однородной смеси.

Примечание. Образцы и контроли необходимо внести в лунки AD-планшета в течение 1 часа после приготовления рабочих MMX.

Примечание. Используйте только AD-планшеты и заклеивающую пленку для системы cobas® 4800.

Подготовка планшета

1. Пипетируйте 25 мкл рабочего MMX в каждую реакционную лунку AD-планшета, которая задействована в постановке. Не касайтесь наконечниками дозатора поверхности планшета за пределами лунок.
 - Внесите рабочий MMX-1 (содержащий **EGFR MMX-1**) в лунки колонок 01, 04, 07 и 10 AD-планшета (по мере необходимости).
 - Внесите рабочий MMX-2 (содержащий **EGFR MMX-2**) в лунки колонок 02, 05, 08 и 11 AD-планшета (по мере необходимости).
 - Внесите рабочий MMX-3 v2 (содержащий **EGFR MMX-3 v2**) в лунки колонок 03, 06, 09 и 12 AD-планшета (по мере необходимости).
2. Пипетируйте по 25 мкл реагента **EGFR MC** в лунки **A01**, **A02** и **A03** AD-планшета, перемешайте содержимое лунок с помощью дозатора: наберите содержимое лунки в наконечник и вылейте обратно в лунку не менее двух раз.
3. Поменяв наконечник дозатора, пипетируйте по 25 мкл отрицательного контроля **NEG** в лунки **B01**, **B02** и **B03** AD-планшета, перемешайте содержимое лунок с помощью дозатора: наберите содержимое лунки в наконечник и вылейте обратно в лунку не менее двух раз.

Примечание. При каждой постановке обязательным является внесение реагента **EGFR MC** в лунки **A01**, **A02** и **A03**, а также отрицательного контроля **NEG** в лунки **B01**, **B02** и **B03**. В противном случае анализатор cobas® z 480 расценит эту постановку как невалидную.

Примечание. Во избежание перекрестной контаминации образцов, а также внешней контаминации реакционных пробирок для ПЦР, меняйте перчатки каждый раз, когда в этом возникает необходимость.

4. Пипетируйте по 25 мкл первого образца ДНК в лунки **C01**, **C02** и **C03** AD-планшета, используя новый наконечник для дозатора при наборе каждой новой дозы разведенного раствора образца ДНК и внесении образца ДНК в каждую новую лунку. Перемешайте содержимое лунок с помощью дозатора: наберите содержимое лунки в наконечник и вылейте обратно в лунку не менее двух раз. Повторите эту процедуру для ДНК каждого образца, соблюдая схему, приведенную на Рис. 2, до тех пор, пока все разведенные образцы ДНК не будут внесены в лунки AD-планшета. Убедитесь, что вся жидкость находится на дне лунок.
5. Покройте AD-планшет заклеивающей пленкой (входит в комплект поставки вместе с планшетами). Для того чтобы надежно приклеить заклеивающую пленку к AD-планшету, воспользуйтесь аппликатором.
6. Прежде чем запустить ПЦР, убедитесь, что вся жидкость находится на дне лунок.

Примечание. Амплификация и детекция должны начаться не позднее чем через 1 час после внесения первого разведенного образца ДНК в рабочий MMX.

Запуск ПЦР

Подробные инструкции по этапам рабочего процесса исследования на наличие мутаций гена EGFR приведены в руководстве пользователя системы **cobas**® 4800 или справочнике для поддержки пользователя системы **cobas**® 4800. При появлении всплывающего окна «Select test» (Выберите исследование), выберите вариант «EGFR Tissue P1» и нажмите кнопку «OK».

Результаты

Интерпретация результатов

Примечание. Валидность всех постановок и образцов проверяется программой **cobas® 4800**.

Примечание. Валидная постановка исследования может содержать как валидные, так и невалидные результаты исследования образцов.

В Табл. 5 приведена интерпретация результатов исследования образцов в случае валидной постановки.

Табл. 5 Интерпретация результатов исследования с использованием тест-системы **cobas EGFR**

Результат исследования	Результат определения мутации	Интерпретация
Mutation Detected	Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (Может присутствовать несколько мутаций.)	Обнаружена мутация в специфическом мишеневом участке гена EGFR.
No Mutation Detected (NMD) *	Нет	Мутации в мишеневых участках гена EGFR не обнаружены.
Invalid	Нет	Результат исследования образца невалидный. При получении невалидных результатов повторите исследование соответствующих образцов, соблюдая инструкции, приведенные в разделе «Повторное исследование образцов после получения невалидных результатов» ниже.
Failed	Нет	Невалидная постановка по причине сбоя оборудования или программного обеспечения. Обратитесь в местное представительство компании Roche за технической поддержкой.

* Результат «No Mutation Detected» (Ни одной мутации не обнаружено) не исключает наличия мутаций в мишеневых участках гена EGFR, поскольку результат исследования зависит от доли мутантных последовательностей, достаточной целостности образца, отсутствия ингибиторов и достаточного количества искомой ДНК.

Сигнальные сообщения для результатов могут появляться на вкладке «Result» (Результаты) на экране либо в колонке «Flags» (Сигнальные сообщения) в отчете. Подробные сведения приведены в разделе «Сигнальные сообщения для результатов».

Повторный анализ образцов, результаты которых признаны невалидными

1. Повторите разведение исходного образца ДНК, результат которого признан невалидным, начиная с этапа «Расчет разведений исходного образца ДНК» в разделе «Аmplification and detection».
2. После разведения исходного раствора ДНК до концентрации 2 нг/мкл по методике, описанной выше в разделе «Разведение образца», приступите к этапам процедуры «Подготовка рабочих мастермиксов (MMX-1, MMX-2 и MMX-3 v2)» и далее к остальным этапам процедур амплификации и детекции.

Примечание. Если после повторного анализа данного образца снова получен невалидный результат или объем исходного образца ДНК был недостаточен для приготовления еще одного разведения согласно этапу 1 процедуры, описанной в разделе «Повторный анализ образцов, результаты которых признаны невалидными», повторите анализ данного образца с самого начала, начиная с этапов депарафинизации и выделения ДНК, используя новый 5-мм срез фиксированного в формалине образца ткани в парафиновых блоках (FFPET).

Контроль качества и валидности результатов

Каждая постановка, предполагающая анализ до 30 образцов, должна включать мутантный контроль для тест-системы cobas EGFR (EGFR MC) [лунки A01, A02 и A03] и отрицательный контроль (NEG) [лунки B01, B02 и B03] для рабочих мастермиксов MMX-1, MMX-2 и MMX-3 v2. Результат постановки считается валидным, если результаты для контролей EGFR MC и NEG признаны валидными. Если для любого из контролей (EGFR MC или NEG) получен невалидный результат, вся постановка признается невалидной и анализ проводится повторно. Подготовьте свежие разведения исходного образца ранее выделенной ДНК для внесения в новый AD-планшет вместе с контролями для амплификации и детекции.

Мутантный контроль

Результат анализа для мутантного контроля EGFR MC должен быть «Valid» (Валидный). Если результат для мутантного контроля EGFR MC стабильно невалиден, обратитесь в местное представительство компании Roche за технической поддержкой.

Отрицательный контроль

Результат анализа для отрицательного контроля NEG должен быть «Valid» (Валидный). Если результат для отрицательного контроля NEG стабильно невалиден, обратитесь в местное представительство компании Roche за технической поддержкой.

Ограничения процедуры

1. Тест проводится только для указанных типов образцов. Тест-система cobas EGFR была валидирована только для исследования фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани (FFPET), полученных у пациентов с НМРЛ.
2. Тест-система cobas EGFR может использоваться только вместе с набором для пробоподготовки cobas® DNA Sample Preparation Kit (Roche P/N: 05985536190).
3. Эффективность обнаружения мутаций не зависит от количества копий в образце, но на нее могут влиять качество образца, количество выделенной ДНК и наличие интерферирующих веществ.
4. Достоверность результатов теста зависит от соблюдения правил фиксации, транспортировки, хранения и обработки образцов. Соблюдайте процедуры, описанные в руководстве по работе с набором для пробоподготовки cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190), в данной инструкции по работе с тест-системой, а также в руководстве пользователя системы cobas® 4800 или справочнике для поддержки пользователя системы cobas® 4800.
5. Влияние на результат анализов других потенциальных переменных, таких как характеристик фиксации образцов, не изучалось.
6. Добавление фермента AmpErase в рабочие мастермиксы Master Mix тест-системы cobas EGFR позволяет выполнять избирательную амплификацию ДНК-мишени. в то же время для предотвращения контаминации реагентов требуется соблюдать стандарты надлежащей лабораторной практики, а также в точности следовать процедурам, описанным в данном руководстве по работе с тест-системой.

7. К работе с данным продуктом допускается только персонал, обученный проведению ПЦР и работе с системой **cobas**® 4800.
8. Данная тест-система валидирована для использования только с анализатором **cobas**® z 480. Другие термоциклеры с оптической детекцией в режиме реального времени не могут применяться с данной тест-системой.
9. Вследствие естественных различий между технологиями пользователю рекомендуется, прежде чем заменить одну технологию на другую, провести корреляционные испытания для двух методов, чтобы оценить возможные различия между технологиями.
10. Наличие ингибиторов ПЦР может обусловить получение ложноотрицательных или невалидных результатов.
11. В редких случаях мутации в пределах геномных участков ДНК гена EGFR, с которыми взаимодействуют используемые в тест-системе **cobas** EGFR праймеры или зонды, могут приводить к невозможности выявления мутаций в экзонах 18, 19, 20 и 21 (получению результата «No Mutation Detected» [Ни одной мутации не обнаружено]).
12. Тест-система **cobas** EGFR может проявлять перекрестную реактивность (с получением результата «Mutation Detected» [Мутация обнаружена]) при наличии мутации замены L747S в экзоне 19 — это редкая приобретенная мутация, связанная с резистентностью к лечению препаратами из группы ингибиторов тирозинкиназы (ИТК).¹⁹
13. Тест-система **cobas** EGFR валидирована для исследования образцов с 50 нг ДНК на одну реакционную лунку. Внесение образцов с содержанием ДНК меньше 50 нг не рекомендуется.
14. Тест-система **cobas** EGFR предназначена для качественного анализа. Она не обеспечивает количественного измерения и не позволяет определить процентное содержание мутантного гена.
15. Если фиксированные в формалине и залитые в парафин образцы ткани (FFPET), полученные от пациентов с НМРЛ, содержат разрушенную ДНК, это может отрицательно сказаться на способности тест-системы выявлять мутации гена EGFR.
16. Образцы, для которых по итогам анализа был получен результат «No Mutation Detected» (Ни одной мутации не обнаружено), могут содержать мутации EGFR, которые не определяются данной тест-системой.
17. Тест-система **cobas** EGFR позволяет обнаруживать мутации гена EGFR у пациентов с НМРЛ, в опухолевых клетках которого присутствуют замены в экзоне 18 (G719X), делеции в экзоне 19, вставки и замены (T790M, S768I) в экзоне 20 и замены в экзоне 21 (L858R, L861Q). Все прочие мутации гена EGFR не могут быть выявлены с помощью этой тест-системы.

Результаты неклинических испытаний теста

Примечание. Описания исследований, приведенные ниже, содержат совокупные данные, полученные с использованием тест-систем **cobas** EGFR v1 и v2.

В доклинических исследованиях, описания которых приведены ниже, процентное содержание опухолевых тканей оценивали при патоморфологическом исследовании. Отбор образцов для последующих исследований осуществлялся путем двунаправленного секвенирования по Сэнгеру и секвенирования нового поколения. Процентное содержание мутаций в фиксированных в формалине образцах тканей в парафиновых блоках (FFPET), полученных от пациентов с НМРЛ, определялось методом секвенирования нового поколения.

Аналитическая чувствительность (предел измерения холостой пробы)

Для оценки эффективности тест-системы **cobas** EGFR в условиях отсутствия ДНК, а также для подтверждения того факта, что контрольный (пустой) образец не генерирует сигнал, который мог бы быть интерпретирован как присутствие мутантного гена в низкой концентрации, было проведено исследование тест-системы с образцами, не содержащими ДНК, и фиксированными в формалине и залитыми в парафин образцами ткани (FFPET), полученными от пациентов с НМРЛ с геном EGFR дикого типа. По результатам проведения анализа, предписанного рекомендациями CLSI EP17-A2²⁰, предел измерения холостой пробы равнялся нулю для всех видов мутаций.

Предел обнаружения при использовании смешанных фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани (FFPET)

Для этого испытания был отобран ряд экстрактов ДНК, полученных из фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани (FFPET) — три образца с делециями в экзоне 19, четыре образца с мутацией L858R, два образца с двойной мутацией L858R и T790M, два образца с мутацией G719A, один образец с двойной мутацией T790M и G719A, один образец с двойной мутацией G719C и S768I, один образец с двойной мутацией S768I и G719S, три образца со вставками в экзоне 20, а также три образца с мутацией L861Q. Все эти образцы были смешаны с экстрактами ДНК из фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани (FFPET), полученных от пациентов с НМРЛ с геном EGFR дикого типа. в результате смешивания были получены образцы с содержанием мутации 10, 5,0, 2,5 и 1,25 % (по методу секвенирования нового поколения). Эти смеси с известным содержанием мутаций были валидированы для выявления мутаций в экзонах 18, 19, 20 и 21 гена EGFR. Были приготовлены серии разведений каждой смеси образцов, после чего были подготовлены восемь повторных постановок для каждого образца панели с использованием каждого из трех лотов наборов тест-системы **cobas** EGFR (n = 24/к-во образцов панели). Предел обнаружения для каждого образца был определен путем установления наименьшего количества ДНК, при котором результат «Mutation Detected» (Мутация обнаружена) для целевой мутации гена EGFR был получен с частотой не ниже 95 %, как показано в Табл. 6.

Табл. 6 Предел обнаружения для тест-системы cobas EGFR с применением смешанных фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани (FFPET)

Экзон гена EGFR	Группа мутаций гена EGFR	Последовательность нуклеиновых кислот гена EGFR	Процентное содержание мутации в образце панели, необходимое для получения результата «Mutation Detected» (Мутация обнаружена) с частотой $\geq 95\%$ при внесении 50 нг ДНК в реакционную лунку (N = 24 повтора)	Идентификатор COSMIC ¹⁴
18	G719X	2156 G>C	2,5	6239
		2156 G>C	4,7	6239
		2155 G>A	3,2	6252
		2155 G>T	5,6	6253
19	Делеция в экзоне 19	2235_2249del15	1,4	6223
		2236_2250del15	2,5	6225
		2239_2256del18*	4,7	6255
		2240_2254del15	7,2	12369
		2240_2257del18	13,4 **	12370
		2239_2248>C	2,2	12382
		2237_2255>T*	4,1	12384
		2237_2253>TTGCT*	6,3	12416
		2238_2252del15	2,4	23571
		2238_2252del15*	5,5	23571
2239_2257>GT*	6,0	Не выявлено		
20	T790M	2369 C>T	2,0	6240
		2369 C>T	2,4	6240
		2369 C>T	3,0	6240
	S768I	2303 G>T	1,3	6241
		2303 G>T	2,4	6241
	Вставка в экзоне 20	2307_2308insGCCAGCGTG	1,7	12376
		2319_2320insCAC	6,8	12377
2310_2311insGGT	1,3	12378		
21	L858RP	2573 T>G	4,0	6224
		2573 T>G	4,2	6224
		2573 T>G	4,3	6224
		2573 T>G	4,3	6224
		2573 T>G	5,3	6224
	L861Q	2582T>A	2,1	6213
		2582T>A	2,2	6213
		2582T>A	3,4	6213

* Для этих редко встречающихся делеций в экзоне 19, имевшихся в у участников клинического исследования EURTAC, анализировался только один уровень частоты — приблизительно 5 %. Смеси ДНК-образцов анализировали на базе 3 различных исследовательских центров задействованных в исследовании.

** Для этой мутации при стандартном содержании ДНК (50 нг на одну реакционную лунку) предел обнаружения тест-системы **cobas** EGFR выше, чем при содержании мутации 10%.

Данное исследование показало, что при внесении стандартного количества ДНК (50 нг на одну реакционную лунку) тест-система **cobas** EGFR способна обнаруживать мутации в экзонах 18, 19, 20 и 21 гена EGFR с частотой мутации не ниже 5 %.

Минимальное содержание опухолевых тканей

Чтобы определить минимальное содержание опухолевых тканей, необходимое для обнаружения мутаций гена EGFR в образцах тканей НМРЛ было проанализировано в общей сложности 66 независимых образцов с различными мутациями гена EGFR (35 образцов с делециями в экзоне 19 и 31 образец с мутацией L858R в экзоне 21) с различным содержанием опухолевых тканей в диапазоне от 25 % до 99 %. Ни в одном из исследованных образцов не присутствовали одновременно и делеция в экзоне 19, и мутация L858R в экзоне 21. Каждый образец был проанализирован как в отсутствие (неразведенный), так и после макроскопического иссечения. Фактические значения коэффициента контрастности тканей для неразведенных срезов и срезов после макроскопического иссечения анализировали методом регрессии Деминга и путем построения графика по методу Бланда — Альтмана (сравнение разностей со средними величинами). Результаты свидетельствуют об отсутствии необходимости макроскопического иссечения для образцов с содержанием опухолевых тканей более 25 %.

Чтобы определить, может ли макродиссекция образцов НМРЛ с низким содержанием опухолевых тканей повысить показатели обнаружения мутаций с помощью тест-системы **cobas** EGFR, было проведено исследование 10 дополнительных образцов тканей НМРЛ с геном EGFR дикого типа (содержание опухолевых тканей от 1 % до 90 %) и 10 образцов тканей с мутантным геном EGFR (содержание опухолевых тканей от 8 % до 95 %). Каждый образец был проанализирован как в отсутствие (неразведенный), так и после макроскопического иссечения. Для всех образцов после макроскопического иссечения результаты соответствовали полученным результатам образцов, для которых макродиссекция не проводилась. Кроме того, при исследовании 20 образцов с геном мутированного и дикого типа были получены прогнозируемые результаты.

В клиническом исследовании III фазы EURTAC с целью сравнения двух схем химиотерапии (на основе эрлотиниба и цисплатина) фиксированные в формалине и залитые в парафин образцы ткани (FFPET), полученные у пациентов с НМРЛ, с содержанием опухолевых тканей менее 10 % были подвергнуты макродиссекции, после чего проанализированы на наличие мутаций гена EGFR. Подгруппу прошедших скрининг образцов из клинического исследования EURTAC проанализировали на наличие мутаций гена EGFR двумя способами: с использованием тест-системы **cobas** EGFR и методом секвенирования нового поколения. Табл. 7 и Табл. 8 включали образцы НМРЛ с валидными парными результатами обнаружения мутаций в экзоне 19 гена EGFR или мутации L858R, полученными с использованием тест-системы **cobas** EGFR и с методом секвенирования нового поколения. Секвенирование нового поколения использовалось в качестве метода контроля. Результаты этих исследований показали, что макродиссекция фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани (FFPET), полученных у пациентов с НМРЛ, с содержанием опухолевых тканей менее 10 % обеспечивало сопоставимую точность результатов с исследованием аналогичных образцов тканей, макродиссекция которых не проводилась.

В совокупности результаты описанных выше исследований показывают, что для работы с фиксированными в формалине и залитыми в парафин образцами ткани (FFPET), полученных у пациентов с НМРЛ, с содержанием опухолевых тканей менее 10 % следует в обязательном порядке проводить макродиссекцию образца прежде, чем выполнять анализы с помощью тест-системы **cobas** EGFR.

Табл. 7 Эффективность тест-системы cobas EGFR при анализе фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани (FFPET), полученных у пациентов с НМРЛ, с содержанием опухолевых тканей ≤ 10 % (после макроскопического иссечения)

Показатели согласованности	Процент согласованности (N)	95 % ДИ
Процент согласованности положительных результатов (ПСП)	97,2 % (35/36)	85,8 %, 99,5 %
Процент согласованности отрицательных результатов (ПСН)	94,5 % (52/55)	85,1 %, 98,1 %
Общий процент согласованности (ОПС)	95,6 % (87/91)	89,2 %, 98,3 %

Табл. 8 Эффективность тест-системы cobas EGFR при анализе фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани (FFPET), полученных у пациентов с НМРЛ, с содержанием опухолевых тканей > 10 % (в отсутствие макроскопического иссечения)

Показатели согласованности	Процент согласованности (N)	95 % ДИ
Процент согласованности положительных результатов (ПСП)	93,0 % (107/115)	86,9 %, 96,4 %
Процент согласованности отрицательных результатов (ПСН)	98,5 % (199/202)	95,7 %, 99,5 %
Общий процент согласованности (ОПС)	96,5 % (306/317)	93,9 %, 98,1 %

Перекрестная реактивность с другими мутациями в экзонах 18, 19, 20 и 21

Образцы из клинического исследования EURTAC

Тест-система **cobas** EGFR выдала результат «Mutation Detected» (Мутация обнаружена) для нижеуказанных мутаций гена EGFR, присутствующих в образцах из клинического исследования EURTAC (Табл. 9). Аналитическая эффективность тест-системы **cobas** EGFR при выявлении данных мутаций не оценивалась.

Табл. 9 Мутации, выявленные в выборке участников клинического исследования EURTAC, которые могут быть источником перекрестной реактивности тест-системы cobas EGFR

Экзон	Последовательность мутации	Изменение АК	Идентификатор COSMIC ¹⁴
19	2236_2252>AT	E746_T751>I	26680
	2239_2253>CAA	L747_T751>Q	51527
	2234_2251>AAT	K745_T751>K	Не выявлено
	2236_2244del9	E746_R748>E	Не выявлено
	2236_2263>GAAGCAT	E746_A755>E	Не выявлено
	2237_2251>AAC	E746_751T>E	Не выявлено

Образцы из клинического исследования AURA2

Тест-система **cobas** EGFR выдала результат «Mutation Detected» (Мутация обнаружена) для нижеуказанной мутации гена EGFR, присутствующих в образцах из клинического исследования AURA2 (Табл. 10). Аналитическая эффективность тест-системы **cobas** EGFR при выявлении данной мутации не оценивалась.

Табл. 10 Мутации, выявленные в клиническом исследовании AURA2, которые могут быть источником перекрестной реактивности тест-системы cobas EGFR

Экзон	Последовательность мутации	Изменение АК	Идентификатор COSMIC ¹⁴
21	2572_2573CT>AG	L858R	13553

Специфичность: микроорганизмы и гомологичные EGFR последовательности

Специфичность тест-системы **cobas** EGFR оценивали путем изучения влияния на результаты анализов присутствия микроорганизмов, способных вызывать заболевания легких, и плазмид, которые содержат гомологичные EGFR последовательности ДНК, то есть плазмид, в составе которых присутствуют последовательности каждого из участков HER2, HER3 и HER4. Эти участки по составу аналогичны последовательностям в экзонах 18, 19, 20 и 21 гена EGFR, амплификация которых осуществляется при проведении исследований с использованием тест-системы **cobas** EGFR.

Микроорганизмы, способные вызывать заболевания легких

При добавлении *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* в количестве 4×10^5 колониеобразующих единиц к образцам, содержащим последовательности гена EGFR дикого и мутантного типа, на этапе лизиса тканей эти микроорганизмы не выступали источниками перекрестной реактивности и не оказывали интерферирующего влияния на результаты исследований с использованием тест-системы **cobas** EGFR.

Плазмиды с содержанием гомологичных EGFR последовательностей

Исследования показали, что структурно схожие с последовательностью гена белка эпидермального рецептора тирозинкиназы последовательности (EGFR/HER1, HER2, HER3 и HER4) не проявляют перекрестной реактивности с тест-системой **cobas** EGFR. Для проверки наличия или отсутствия перекрестной реактивности подозреваемую последовательность добавляли к экстракту ДНК исходного образца в количестве, эквивалентном 50 нг ДНК на одну ПЦР, до начала процедур амплификации/детекции. В исследование также был включен контроль без содержания плазмидной ДНК. Результаты свидетельствуют, что обнаруженные мутации во всех проанализированных 15 фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани (FFPET) соответствовали ожидаемому типу мутации в каждом случае. Для проверки соответствия выполняли секвенирование генетического материала образцов. Наличие или отсутствие в образцах добавленного гена HER плазмидной ДНК не влияло на результаты исследования. Кроме того, было проведено исследование возможности перекрестной реактивности тест-системы при наличии мутации L747S в EGFR экзоне 19. Результаты свидетельствуют, что тест-система **cobas** EGFR проявляет перекрестную реактивность при наличии мутации L747S в EGFR экзоне 19.

Интерферирующее влияние

Было установлено, что триглицериды (37 ммоль/л, рекомендованная CLSI высокая концентрация ²¹) и гемоглобин (2 мг/мл, рекомендованная CLSI высокая концентрация ²¹) не оказывали интерферирующего влияния на тест-систему **cobas** EGFR при внесении потенциально интерферирующих веществ на этапе лизиса образца в рамках процедуры пробоподготовки.

Для препаратов из списка, приведенного ниже, было показано отсутствие влияния на эффективность тест-системы **cobas** EGFR при добавлении этих препаратов на этапе лизиса в ходе процедуры пробоподготовки. Исследовано было влияние следующих препаратов: альбутерол (Вентолин), ипратропий (Атровент), флутиказон (Флоназа), цефтазидим (Фортаз), имипенем-циластатин (Примаксин), пиперациллин-тазобактам, Циластин (циластатин натрий), бетадин и лидокаин.

Некротизированные ткани

Исследования показали, что на результаты тест-системы **cobas** EGFR не влияло содержание в фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани (FFPET), полученных у пациентов с НМРЛ, некротизированных тканей в количестве до 60 % для образцов с мутантным геном EGFR и до 85 % для образцов с геном EGFR дикого типа.

Воспроизводимость

Воспроизводимость результатов тест-системы **cobas** EGFR была оценена с использованием шести фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани (FFPET) в числе которых были два образца с геном EGFR дикого типа и четыре образца с геном EGFR мутантного типа, по одну каждого типа: делеция в экзоне 19, двойная мутация S768I и G719X, двойная мутация T790M и L858R, и вставка в экзоне 20. Эти образцы были проанализированы в двух повторах двумя операторами с использованием двух различных лотов наборов реагентов и двух анализаторов **cobas**® z 480 на протяжении четырех дней. Суммарно каждый образец был проанализирован в 32 повторах. Тест-система **cobas** EGFR характеризуется частотой правильных результатов на уровне 96,9 % (186/192).

Воспроизводимость результатов тест-системы **cobas** EGFR также оценивалась еще в одном исследовании с анализом четырех фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани (FFPET), в числе которых были один образец гена EGFR дикого типа и три образца гена EGFR мутантного типа (по одному образцу для каждой мутации) — мутаций L861Q и G719X и вставки в экзоне 20. Эти образцы были проанализированы в двух повторах двумя операторами с использованием двух различных лотов наборов реагентов и двух анализаторов **cobas**® z 480 на протяжении нескольких дней. При анализе объединенных данных по всем повторам анализов образцов, операторам, лотам наборов реагентов и анализаторам тест-система **cobas** EGFR характеризовалась точностью определения на уровне 99,2 % (127/128 анализов).

Воспроизводимость на этапе обработки образцов

Для оценки воспроизводимости набора для пробоподготовки **cobas**® DNA Sample Preparation Kit были использованы срезы из трех блоков фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани (FFPET), один из которых содержал мутацию делеции в экзоне 19, второй — мутацию L858R, а третий — исходный немутантный тип. Каждый из образцов был проанализирован в двух повторах на базе каждой лаборатории в каждый из дней. Срезы каждого отдельно взятого образца были рандомизированы и проходили анализ на протяжении шести дней на базе трех лабораторий. в каждой лаборатории анализы проводил один оператор на одном анализаторе **cobas**® z 480, используя три серии набора для пробоподготовки **cobas**® DNA Sample Preparation Kit и один лот тест-системы **cobas** EGFR. В каждый из дней каждый оператор проводил выделение и анализ ДНК из двух срезов фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани (FFPET), полученных у пациентов с НМРЛ, используя для анализа тест-систему **cobas** EGFR. Для всех образцов за все шесть дней исследования были получены верные и валидные результаты. Анализ данных, полученных для всех образцов и операторов, показал, что тест-система **cobas** EGFR характеризуется частотой правильных результатов на уровне 100 % (108/108).

Оценка клинических показателей

Воспроизводимость в клинических условиях — исследование 1

Для оценки воспроизводимости результатов, полученных с использованием тест-системы cobas EGFR, было проведено внешнее исследование, в котором сравнивались результаты, полученные в 3 внешних лабораториях (по 2 оператора в каждой лаборатории) с задействованием 3 лотов реагентов на протяжении 5 непоследовательных дней. В качестве образцов для проведения исследования использовали панель с 13 образцами ДНК, экстрагированной из фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани (FFPET), полученных у пациентов с НМРЛ с геном EGFR дикого типа и различными вариациями гена мутантного типа. В состав этой панели входили мутация L858R в экзоне 21 и пять различных делеций в экзоне 19. Из 92 постановок для 90 (97,8 %) постановок были получены валидные результаты. Суммарно в рамках 90 валидных постановок было проведено 2340 тестов на 13 образцах панели. Результаты всех этих тестов также были валидными. При анализе 180 валидных тестов образцов панели с геномом дикого типа ни в одном из случаев не был получен результат «Mutation Detected» (Мутация обнаружена), что дает в конечном итоге 100 % согласованность для данного показателя. Для 10 из 12 образцов панели согласованность составляла 100 %. Для образца панели EX19_2240_2257del18 — при содержании мутации 5 % показатель согласованности составлял 62,8 % (результат «No Mutation Detected» [Ни одной мутации не обнаружено] был получен для 67 из 180 тестов). Для образца панели EX19_2240_2257del18 — при содержании мутации 10 % показатель согласованности составлял 99,4 % (результат «No Mutation Detected» [Ни одной мутации не обнаружено] был получен для 1 из 180 тестов). Совокупные результаты согласованности для тест-системы приведены в Табл. 11. Для всех образцов панели мутаций коэффициент вариации (КВ) составлял < 6 %. Для каждого отдельно взятого образца панели КВ составлял < 3,5 %. Общий КВ для внешнего контроля составлял < 1,3 %. КВ% между различными лотами составлял < 0,5 %, а в пределах лота — < 1,2 %.

Табл. 11 Расчетные показатели общей согласованности для образцов панели в испытании воспроизводимости 1 тест-системы cobas EGFR

Образец панели	Количество валидных тестов	Согласованность (N)	% согласованности (95 % ДИ) ^a
Исходный немутантный тип	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2235_2249del15 — содержание мутации 5 %	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2235_2249del15 — содержание мутации ≤ 10 %	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2236_2250del15 — содержание мутации 5 %	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2236_2250del15 — содержание мутации ≤ 10 %	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2239_2248>C — содержание мутации 5 %	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2239_2248>C — содержание мутации ≤ 10 %	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2254del15 — содержание мутации 5 %	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2254del15 — содержание мутации ≤ 10 %	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX19_2240_2257del18 — содержание мутации 5 %	180	113	62,8 (55,3, 69,9) *
EX19_2240_2257del18 — содержание мутации ≤ 10 %	180	179	99,4 (96,9, 100,0) *
EX21_2573T>G=L858R — содержание мутации 5 %	180	180	100 (98,0, 100,0)
EX21_2573T>G=L858R — содержание мутации ≤ 10 %	180	180	100 (98,0, 100,0)

Примечание. Результаты считали удовлетворительными по согласованности, если для образца панели, содержащего мутантный ген, были получены валидные результаты «Mutation Detected» (Мутация обнаружена), или если для образца с геном дикого типа были получены валидные результаты «No Mutation Detected» (Ни одной мутации не обнаружено).

^a 95 % ДИ = 95 % доверительный интервал при точном биномиальном распределении.

* Для этой мутации при стандартном количестве ДНК (50 нг на одну реакционную лунку) аналитическая чувствительность тест-системы cobas EGFR выше, чем при содержании мутации 10 %.

Воспроизводимость в клинических условиях — исследование 2

Для оценки воспроизводимости результатов, полученных с использованием тест-системы cobas EGFR, было проведено внешнее исследование, в котором сравнивались результаты, полученные в 3 лабораториях (в 2 внешних и 1 внутренней лаборатории, по 2 оператора в каждой лаборатории) с задействованием 3 лотов реагентов на протяжении 5 непоследовательных дней. Для проведения исследования использовали панель с 11 образцами ДНК, экстрагированной из фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани (FFPET), полученных у пациентов с НМРЛ с геном EGFR дикого типа и различными вариациями гена мутантного типа. В состав этой панели входили мутация G719X в экзоне 18, мутация T790M в экзоне 20, мутация S768I в экзоне 20, вставка в экзоне 20 и мутация L861Q в экзоне 21. Из 91 постановок для 90 (98,9 %) постановок были получены валидные результаты. Суммарно в рамках 90 повторных валидных постановок было проведено 1980 тестов на 11 образцах панели. Результаты всех этих тестов также были валидными. При анализе 180 валидных тестов образцов панели с геномом дикого типа ни в одном из случаев не был получен результат «Mutation Detected» (Мутация обнаружена), что дает в конечном итоге 100 % согласованность для данного показателя. Уровень согласованности для всех образцов панели, содержащих мутантный ген, составляла 100 %, за исключением LoD образца панели для вставки в экзоне 20. Совокупные результаты согласованности для тест-системы приведены в Табл. 12. Для всех образцов панели мутаций коэффициент вариации (КВ) составлял < 9,2 %. Общий КВ для внешнего контроля составлял ≤ 1,3 %. КВ% между различными лотами составлял ≤ 0,6 %, а в пределах лота — ≤ 1,1 %.

Табл. 12 Расчетные показатели общей согласованности для образцов панели в испытании воспроизводимости 2 тест-системы cobas EGFR

Образец панели	Количество валидных тестов	Согласованность (N)	% согласованности (95 % ДИ) *
Исходный немутантный тип	180	180	100 (98,0, 100,0)
Мутация G719X в экзоне 18 — LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Мутация T790M в экзоне 20 — LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Мутация S768I в экзоне 20 — LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Вставка в экзоне 20 — LoD	180	166	92,2 (87,3, 95,7)
Мутация L861Q в экзоне 21 — LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Мутация G719X в экзоне 18 — 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Мутация T790M в экзоне 20 — 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Мутация S768I в экзоне 20 — 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Вставка в экзоне 20 — 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Мутация L861Q в экзоне 21 — 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)

Примечание. Результаты считали удовлетворительными по согласованности, если для образца панели, содержащего мутантный ген, были получены валидные результаты обнаружения целевой мутации, или если для образца с геном дикого типа был получен валидный результат NMD.

* 95 % ДИ = 95 % доверительный интервал при точном биномиальном распределении.

ДИ = доверительный интервал; LoD = предел обнаружения;

NMD = «No Mutation Detected» (Ни одной мутации не обнаружено).

Корреляция результатов с методом контроля при использовании образцов, полученных в исследовании III фазы EURTAC

Клиническую эффективность тест-системы **cobas** EGFR оценивали путем сравнения с двумя эталонными методами, а именно двукратным двунаправленным секвенированием по Сэнгеру и количественным секвенированием нового поколения. В исследовании были использованы 487 фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани, полученных у пациентов с распространенным НМРЛ, которые прошли скрининг для участия в исследовании III фазы EURTAC с целью сравнения терапии препаратом ТАРЦЕВА® (эрлотиниб) с химиотерапией на основе цисплатина.^{6, 22} Клинические и демографические характеристики выборки пациентов, образцы которых были доступны для проведения этого ретроспективного исследования, были сопоставимы с характеристиками других пациентов (557), подходящих для участия в исследовании по другим критериям, образцы которых не были доступны для повторного тестирования.

Суммарно скрининг для участия в исследовании EURTAC прошли 1276 пациентов; для скрининга было применено сочетание специально разработанных лабораторных исследований, которые совокупно обозначены термином «тесты клинического исследования» (ТКИ). После исключения пациентов, не соответствующих критериям участия в исследовании, а также пациентов, у которых отсутствовали результаты ТКИ, потенциально подходящими для участия в данном исследовании оставались 1044 пациента. Среди этих 1044 подходящих пациентов у 225 были получены образцы, по результатам ТКИ положительные по критерию наличия мутаций, у 792 пациентов, по результатам ТКИ, в образцах содержался ген дикого типа, и у 27 пациентов результаты ТКИ были неоднозначными. У 487 из этих 1044 потенциально подходящих к участию пациентов имелись образцы, доступные для повторного анализа с применением тест-системы **cobas** EGFR.

Все 487 образцов были проанализированы в слепом режиме как с применением тест-системы **cobas** EGFR, так и путем секвенирования по Сэнгеру. Из общего числа проанализированных образцов для 406 образцов были получены валидные результаты как с применением тест-системы **cobas** EGFR, так и путем секвенирования по Сэнгеру; для 38 образцов были получены невалидные результаты и с применением тест-системы **cobas** EGFR, и путем секвенирования по Сэнгеру, для других 38 образцов были получены невалидные результаты только путем секвенирования по Сэнгеру и еще для 5 образцов были получены невалидные результаты только при анализе с использованием тест-системы **cobas** EGFR. Из 487 образцов, доступных для повторного анализа с использованием тест-системы **cobas** EGFR, для 444 образцов были получены валидные результаты теста с использованием тест-системы **cobas** EGFR; эти образцы были также повторно проанализированы методом секвенирования нового поколения. Секвенирование нового поколения 36 образцов показало невалидные результаты. Таким образом, для 408 образцов были получены валидные результаты и с применением тест-системы **cobas** EGFR, и методом секвенирования нового поколения. Аналитическую точность тест-системы **cobas** EGFR в сравнении с каждым из эталонных методов оценивали путем сравнения процентов согласованности положительных результатов (ПСП), процентов согласованности отрицательных результатов (ПСН) и общих процентов согласованности (ОПС), а также соответствующих 95 % ДИ, для делеций в экзоне 19 и мутации L858R как в совокупности, так и по отдельности для каждой мутации.

В выборке участников исследования EURTAC с использованием тест-системы **cobas** EGFR были обнаружены мутации в экзоне 19 и в экзоне 21 гена EGFR, перечисленные в Табл. 13. Аналитическая чувствительность тест-системы была продемонстрирована для мутаций, перечисленных в таблице Табл. 6, обнаруженных у участников исследования EURTAC.

Табл. 13 Мутации, обнаруженные с использованием тест-системы cobas EGFR в выборке участников исследования EURTAC

Экзон	Последовательность мутации	Изменение АК	Идентификатор COSMIC ¹⁴
19	2235_2249del15	E746_A750delELREA	6223
	2236_2250del15	E746_A750delELREA	6225
	2239_2256del18	L747_S752delLREATS	6255
	2240_2257del18	L747_P753>S	12370
	2239_2248 TTAAGAGAAG >C	L747_A750>P	12382
	2239_2251>C	L747_T751>P	12383
	2237_2255>T	E746_S752>V	12384
	2237_2253>TTGCT	E746_T751>VA	12416
	2237_2257>TCT	E746_P753>VS	18427
	2238_2252del15	L747_T751delLREAT	23571
	2236_2252>AT	E746_T751>I	26680
	2239_2253>CAA	L747_T751>Q	51527
	2234_2251>AAT	K745_T751>K	Не выявлено
	2236_2244del9	E746_R748>E	Не выявлено
	2236_2263>GAAGCAT	E746_A755>E	Не выявлено
2237_2251>AAC	E746_751T>E	Не выявлено	
2239_2257>GT	L747_P753>V	Не выявлено	
21	2573 T>G	L858R	6224

Суммарно в данный анализ согласованности было включено 406 образцов с валидными результатами, полученными с использованием тест-системы **cobas** EGFR и путем секвенирования по методу Сэнгера. ПСП между результатами, полученными при анализе с использованием тест-системы **cobas** EGFR и путем секвенирования по Сэнгеру, составлял 96,6 % (95 % ДИ: 91,5–98,7 %), а ПСН составлял 88,3 % (95 % ДИ: 84,1–91,5 %) при обнаружении делеции в экзоне 19 и мутации L858R в совокупности, как показано в Табл. 14. Значение ОПС составляло 90,6 %, при этом нижний предел 95 % ДИ был выше 87 %. Значения ПСП, ПСН и ОПС для обнаружения делеций в экзоне 19 были > 92 %. Для сравнения, значения ПСП, ПСН и ОПС для обнаружения мутации L858R составляли > 95 %.

Табл. 14 Сравнение эффективности обнаружения делеций в EGFR экзоне 19 и мутации L858R с использованием тест-системы cobas EGFR и путем секвенирования по Сэнгеру

Мутация	Показатели согласованности	Процент согласованности (N)	95 % ДИ
Делеция в экзоне 19	Процент согласованности положительных результатов (ПСП)	97,3 % (71/73)	90,5 %, 99,2 %
	Процент согласованности отрицательных результатов (ПСН)	92,5 % (308/333)	89,2 %, 94,9 %
	Общий процент согласованности (ОПС)	93,3 % (379/406)	90,5 %, 95,4 %
L858R	Процент согласованности положительных результатов (ПСП)	95,3 % (41/43)	84,5 %, 98,7 %
	Процент согласованности отрицательных результатов (ПСН)	97,5 % (354/363)	95,4 %, 98,7 %
	Общий процент согласованности (ОПС)	97,3 % (395/406)	95,2 %, 98,5 %

Мутация	Показатели согласованности	Процент согласованности (N)	95 % ДИ
В совокупности	Процент согласованности положительных результатов (ПСП)	96,6 % (112/116)	91,5 %, 98,7 %
	Процент согласованности отрицательных результатов (ПСН)	88,3 % (256/290)	84,1 %, 91,5 %
	Общий процент согласованности (ОПС)	90,6 % (368/406)	87,4 %, 93,1 %

Суммарно в данный анализ согласованности было включено 408 образцов с валидными результатами, полученными с использованием тест-системы **cobas** EGFR и методом секвенирования нового поколения. Для сравнения, ПСП и ПСН при выявлении делеций в экзоне 19 и точечной мутации L858R с использованием тест-системы **cobas** EGFR и методом секвенирования нового поколения составляли 94,0 % (95 % ДИ: 89,1–96,8 %) и 97,7 % (95 % ДИ: 95,0–98,9 %) соответственно, как показано в Табл. 15. Значение ОПС равнялось 96,3 %, при этом нижний предел 95 % ДИ составлял 94,0 %. Значения ПСП, ПСН и ОПС для выявления делеций в экзоне 19 были > 95 %, и все нижние пределы ДИ составляли > 90 %. Значения ПСП, ПСН и ОПС для обнаружения мутации L858R также были > 95 %, все нижние пределы 95 % ДИ были ≥ 95 %, за исключением нижнего предела ДИ для ПСП (90 %), что объясняется небольшим количеством выявленных случаев наличия мутации L858R.

Табл. 15 Сравнение эффективности обнаружения делеций в EGFR экзоне 19 и мутации замены L858R с использованием тест-системы cobas EGFR и методом секвенирования нового поколения

Мутация	Показатели согласованности	Процент согласованности (N)	95 % ДИ
Делеция в экзоне 19	Процент согласованности положительных результатов (ПСП)	95,9 % (94/98)	90,0 %, 98,4 %
	Процент согласованности отрицательных результатов (ПСН)	99,7 % (309/310)	98,2 %, 99,9 %
	Общий процент согласованности (ОПС)	98,8 % (403/408)	97,2 %, 99,5 %
L858R	Процент согласованности положительных результатов (ПСП)	90,6 % (48/53)	79,7 %, 95,9 %
	Процент согласованности отрицательных результатов (ПСН)	98,6 % (350/355)	96,7 %, 99,4 %
	Общий процент согласованности (ОПС)	97,5 % (398/408)	95,5 %, 98,7 %
В совокупности	Процент согласованности положительных результатов (ПСП)	94,0 % (142/151)	89,1 %, 96,8 %
	Процент согласованности отрицательных результатов (ПСН)	97,7 % (251/257)	95,0 %, 98,9 %
	Общий процент согласованности (ОПС)	96,3 % (393/408)	94,0 %, 97,8 %

Корреляция результатов с эталонным методом при использовании образцов, полученных в исследовании II фазы AURA2

Клиническую эффективность тест-системы **cobas** EGFR оценивали путем сравнения результатов с результатами валидированной методики секвенирования нового поколения. Для оценки использовали 383 фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов ткани, полученных у пациентов с распространенным НМРЛ, которые с использованием тест-системы **cobas** EGFR прошли скрининг для участия в исследовании II фазы AURA2 для изучения препарата TAGRISSO® (осимертиниб).

Скрининг для участия в исследовании AURA2 с использованием тест-системы **cobas** EGFR прошли 472 пациента. После исключения пациентов, не соответствующих критериям участия в исследовании, подходящими для участия в данном исследовании оставались 383 пациента.

Все 383 образца были проанализированы в слепом режиме как с применением тест-системы **cobas** EGFR, так и валидированным методом секвенирования нового поколения. Из этого числа для 368 образцов валидные результаты были получены и с использованием тест-системы **cobas** EGFR, и методом секвенирования нового поколения. Число невалидных результатов, полученных одновременно при исследовании обоими методами (с использованием тест-системы **cobas** EGFR и методом секвенирования нового поколения), составило 2, невалидных только при исследовании методом секвенирования нового поколения — 2, и невалидных только при исследовании с использованием тест-системы **cobas** EGFR — 11. Аналитическую точность тест-системы **cobas** EGFR при обнаружении мутации T790M в сравнении с эталонным методом (секвенирование нового поколения) оценивали путем расчета процента согласованности положительных результатов (ПСП), процента согласованности отрицательных результатов (ПОН) и общего процента согласованности (ОПС), а также 95 % ДИ для этих параметров при обнаружении мутации T790M.

В выборке участников исследования AURA2 с использованием тест-системы **cobas** EGFR были обнаружены мутации гена EGFR, перечисленные в Табл. 16. Аналитическая чувствительность тест-системы была продемонстрирована для мутаций, перечисленных в таблице Табл. 6, обнаруженных у участников исследования AURA2.

Табл. 16 Мутации, обнаруженные с использованием тест-системы cobas EGFR в выборке участников исследования AURA2

Экзон	Последовательность мутации	Изменение АК	Идентификатор COSMIC ¹⁴
18	2156G>C	G719A	6239
	2155G>A	G719S	6252
	2155G>T	G719C	6253
19	2239_2247delTTAAGAGAA	L747_E749delLRE	6218
	2235_2249del15	E746_A750delELREA	6223
	2236_2250del15	E746_A750delELREA	6225
	2239_2256del18	L747_S752delLREATS	6255
	2240_2254del15	L747_T751delLREAT	12369
	2240_2257del18	L747_P753>S	12370
	2239_2248 TTAAGAGAAG>C	L747_A750>P	12382
	2239_2251>C	L747_T751>P	12383
	2237_2255>T	E746_S752>V	12384
	2237_2251del15	E746_T751>A	12678
	2235_2248>AATTC	E746_A750>IP	13550
	2235_2252>AAT	E746_T751>I	13551
	2253_2276del24	S752_I759delSPKANKEI	13556
2237_2257>TCT	E746_P753>VS	18427	
20	2369C>T	T790M	6240
	2303G>T	S768I	6241
21	2573T>G	L858R	6224
	2573_2574TG>GT	L858R	12429
	2582T>A	L861Q	6213

Суммарно в данный анализ согласованности было включено 368 образцов с валидными результатами, полученными с использованием тест-системы **cobas** EGFR и методом секвенирования нового поколения. ПСП между результатами, полученными при анализе с использованием тест-системы **cobas** EGFR, и результатами секвенирования нового поколения, составлял 88,3 % (95 % ДИ: 83,8–91,7 %), ПСН составлял 97,3 % (95 % ДИ: 92,4–99,1 %), а ОПС составлял 91,0 % (95 % ДИ: 87,7–93,5 %) при обнаружении мутации Т790М, как приведено в Табл. 17. Для тридцати образцов были получены положительные результаты при секвенировании нового поколения, и в то же время отрицательные результаты при анализе с использованием тест-системы **cobas** EGFR: для 10/30 образцов процент содержания наличия мутации Т790М, обнаруженной путем секвенирования нового поколения, был ниже предела обнаружения тест-системы **cobas** EGFR (< 2 % мутации). В 20/30 образцов умеренно увеличенное значение *St* указывало на невысокую пригодность для амплификации ДНК-матрицы.

Табл. 17 Сравнение эффективности обнаружения мутации Т790М в гене EGFR с использованием тест-системы cobas EGFR и методом секвенирования нового поколения

Показатели согласованности	Процент согласованности (N)	95 % ДИ
Процент согласованности положительных результатов (ПСП)	88,3 % (226/256)	83,8 %, 91,7 %
Процент согласованности отрицательных результатов (ПСН)	97,3 % (109/112)	92,4 %, 99,1 %
Общий процент согласованности (ОПС)	91,0 % (335/368)	87,7 %, 93,5 %

Данные о клинических результатах

Исследование EURTAC

Исследование EURTAC²² представляло собой открытое, многоцентровое, рандомизированное исследование III фазы с целью сравнения препарата ТАРЦЕВА® (эрлотиниб) со стандартной двухкомпонентной схемой платиносодержащей химиотерапии. Сравнимые схемы лечения применялись в качестве терапии первой линии у ранее не получавших лечение пациентов с распространенным НМРЛ, в клетках которого по результатам теста клинического исследования (ТКИ) обнаружены делеции в экзоне 19 либо замены в экзоне 21 (L858R) гена EGFR. Исследование проводилось при спонсорской поддержке Испанской группы исследований рака легкого (Spanish Lung Cancer Group, SLCG). Суммарно в исследование было включено 174 пациента. Результаты исследования показали, что у пациентов, получавших лечение препаратом ТАРЦЕВА®, имело место статистически значимое повышение показателя выживаемости без прогрессирования (ВБП): медиана ВБП составляла 10,4 месяца по сравнению с 5,1 месяца у пациентов, получавших стандартную химиотерапию. Отношение рисков при этом составляло 0,34 ($p < 0,0001$, 95 % ДИ [0,23; 0,49]). Частота ответа пациентов на лечение препаратом ТАРЦЕВА® была выше, чем частота ответа в группе лечения стандартной химиотерапией (65,1 % против 16,1 %). Существенного различия между группами лечения по показателю общей выживаемости (ОВ) не было обнаружено, при этом 76 % пациентов из группы лечения стандартной химиотерапией были переведены на лечение препаратом ТАРЦЕВА®.

Из общего количества пациентов, включенных в исследование EURTAC (174 пациента), у 134 пациентов (что составляет 77 % от подгруппы исследования и включает 69 пациентов в группе терапии препаратом ТАРЦЕВА® и 65 пациентов из группы стандартной химиотерапии) имелись доступные для повторного тестирования образцы, которые были ретроспективно проанализированы с использованием помощью тест-системы **cobas** EGFR. Из 134 образцов, повторно проанализированных с помощью тест-системы **cobas** EGFR, в 116 случаях (у 59 пациентов из группы лечения препаратом ТАРЦЕВА® и 57 пациентов из группы химиотерапии) по результатам анализов, проведенных с использованием тест-системы **cobas** EGFR, был получен результат «Mutation Detected» (Мутация обнаружена). Анализ этой подгруппы из 116 случаев обнаружения мутаций показал, что у пациентов, получавших лечение препаратом ТАРЦЕВА®, имело место достоверное увеличение ВБП (медиана ВБП составляла 10,4 месяца по сравнению с 5,4 месяца) и снижение вероятности прогрессирования заболевания или смерти (ОР = 0,34, 95 % ДИ [0,21; 0,54], $p < 0,0001$) по сравнению с пациентами из группы стандартной химиотерапии (Рис. 3). Частота ответа в группе лечения препаратом ТАРЦЕВА® была выше по

сравнению с группой лечения стандартной химиотерапией (59,3 % по сравнению с 14,0 %). Между двумя группами лечения не было выявлено достоверной разницы по показателю ОБ. Выявленное улучшение клинических показателей в подгруппе пациентов, проходивших обследование с использованием тест-системы cobas EGFR, было сопоставимо с результатами в полной выборке участников исследования (Табл. 18).

Был проведен дополнительный анализ эффективности с учетом пациентов, показавших положительный результат при исследовании с использованием тест-системы cobas EGFR, но отрицательный или невалидный результат по результатам ТКИ. При наихудшем варианте (приняв, что соотношение рисков равно 1 у пациентов с положительным результатом исследования с использованием на тест-системы cobas EGFR и отрицательным результатом ТКИ), анализ данных показал, что ОР составляет 0,42 (95 % ДИ [0,26; 0,57]).

Рис. 3 Кривые выживаемости без прогрессирования заболевания (ВБП), построенные по методу Каплана — Мейера, в каждой группе лечения у пациентов с мутацией, выявленной с использованием тест-системы cobas EGFR (по оценке исследователя)

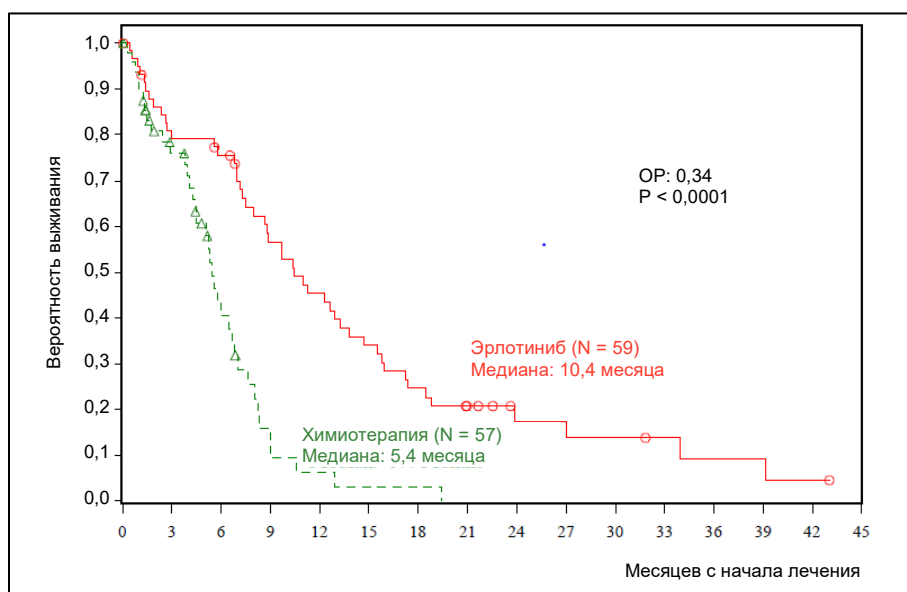


Табл. 18 Клиническая польза у пациентов, обследованных с использованием тест-системы cobas EGFR, сравнима с таковой в популяции исследования EURTAC

Параметр	Популяция с положительным результатом исследования с использованием тест-системы cobas EGFR n = 116		Исследование EURTAC n = 173 *	
	Химиотерапия n = 57	Эрлотиниб n = 59	Химиотерапия n = 87	Эрлотиниб n = 86
ВБП				
Медиана (месяцы)	5,4	10,4	5,1	10,4
Отношение рисков	0,34		0,34	
Отношение рисков, 95 % ДИ	[0,21; 0,54]		[0,23; 0,49]	
Значение p (логарифмический ранговый критерий)	< 0,0001		< 0,0001	

* Один пациент отозвал согласие после завершения исследования EURTAC, в результате численность пациентов в базе данных составила n = 173.

Исследование AURA2

Исследование AURA2²³ являлось многоцентровым открытым несравнительным исследованием II фазы с целью оценки безопасности и эффективности препарата TAGRISSO® (осимертиниб) в качестве терапии второй или третьей и последующих линий терапии у пациентов с распространенным НМРЛ, у которых наблюдалось прогрессирование заболевания после предшествующего лечения одобренным ингибитором тирозинкиназы (ИТК) EGFR. К участию допускались пациенты с НМРЛ с мутацией T790M, выявленной с использованием тест-системы cobas EGFR. Основным анализируемым показателем эффективности являлась частота объективного ответа (ЧОО) по критериям RECIST 1.1 по данным централизованной независимой оценки в «слепом» режиме (BICR) в популяции, подходящей для проведения анализа ответа. ЧОО определяли как количество (в %) пациентов, у которых по меньшей мере на 1 визите зарегистрирован полный ответ (ПО) или частичный ответ (ЧО), подтвержденный по меньшей мере через 4 недели (то есть наилучший объективный ответ [НОО] в виде ПО или ЧО).

Из 472 пациентов, прошедших скрининг для участия в исследовании AURA2, 383 пациента были признаны подходящими для обследования с использованием тест-системы cobas EGFR. Из этих подходящих пациентов 233 пациента с наличием мутации T790M были привлечены к участию в исследованию AURA2, и 210 пациентов были включены и получали лечение препаратом TAGRISSO® (полная выборка пациентов для анализа [FAS]).

В Табл. 19, приведенной ниже, представлены данные анализа ЧОО по BICR и по оценке исследователя в исследовании AURA2. Из 210 пациентов, получивших по меньшей мере одну дозу препарата TAGRISSO® (FAS), у 128 пациентов был подтвержден ответ по BICR, при этом ЧОО составила 61,0 % (95 % ДИ: 54,0–67,6 %) у 135 пациентов имел место ответ по оценке исследователя, а ЧОО составила 64,3 % (95 % ДИ: 57,4–70,8 %).

Все 383 пациента, подходящие для участия в исследовании AURA2, прошли повторное исследование с использованием тест-системы cobas EGFR. Из 233 пациентов с наличием мутации T790M, привлеченных к участию в исследовании AURA2, у 225 пациентов наличие мутации T790M было выявлено с использованием тест-системы cobas EGFR, и 204 из них относились к FAS.

Из 204 пациентов, получивших препарат TAGRISSO® (FAS), у 127 пациентов был подтвержден ответ по BICR, при этом ЧОО составила 62,3 % (95 % ДИ: 55,2–68,9 %). у 133 пациентов имел место ответ по оценке исследователя, а ЧОО составила 65,2 % (95 % ДИ: 58,2–71,7 %).

Табл. 19 Клиническая польза у пациентов с наличием мутации T790M, обследованных с использованием тест-системы cobas EGFR в исследовании AURA2

		Исследование AURA2			Тест-система cobas EGFR (IVD) Пациенты с мутацией T790M		
Выборка пациентов для анализа	Кем оценивался ответ	N	Число пациентов с подтвержденным ответом	ЧОО (95 % ДИ)	N	Число пациентов с подтвержденным ответом	ЧОО (95 % ДИ)
Полная выборка пациентов для анализа (FAS)	Централизованная независимая оценка в «слепом» режиме	210	128	61,0 % (54,0 %, 67,6 %)	204	127	62,3 % (55,2 %, 68,9 %)
	Исследователь		135	64,3 % (57,4 %, 70,8 %)		133	65,2 % (58,2 %, 71,7 %)

Исследование FLAURA

I. Исследование III фазы с применением препарата TAGRISSO® в качестве терапии первой линии

Исследование FLAURA¹⁰ являлось двойным слепым, рандомизированным клиническим исследованием III фазы с целью оценки эффективности и безопасности препарата TAGRISSO® в сравнении со стандартным лечением (СЛ: применение ИТК EGFR [гефитиниба или эрлотиниба]) в рамках терапии первой линии у пациентов с местнораспространенным или метастатическим НМРЛ, которые ранее не получали системное лечение в связи с распространенным заболеванием и у которых по данным местной или централизованной оценки в клетках опухоли подтверждено наличие сенсibiliзирующих мутаций гена EGFR (делеции в экзоне 19 или замены L858R), то есть установлено наличие мутированного гена EGFR. Основной конечной точкой исследования FLAURA была выживаемость без прогрессирования (ВБП) по оценке исследователя в полной выборке пациентов для анализа (FAS — все рандомизированные пациенты из разных стран).

В исследовании было рандомизировано в общей сложности 994 пациента, из которых у 809 пациентов образцы опухолевой ткани были централизованно исследованы с использованием тест-системы cobas EGFR — проспективно (во время скрининга) или ретроспективно. Из 556 рандомизированных пациентов (289 пациентов были рандомизированы на основании результатов централизованного исследования тканей с использованием тест-системы cobas и 267 пациентов — на основании результатов исследования на местном уровне); из них у 500 пациентов при централизованном исследовании с использованием тест-системы cobas было установлено наличие мутированного гена EGFR. Из 267 пациентов, рандомизированных на основании исследования на местном уровне, у 211 пациентов при централизованном исследовании с использованием тест-системы cobas было подтверждено наличие мутированного гена EGFR, у 41 пациента исследование с использованием тест-системы cobas не проводилось ввиду отсутствия или недостаточного объема образца, у 9 пациентов исследование с использованием тест-системы cobas показало невалидный результат и у 6 пациентов при исследовании с использованием тест-системы cobas был получен результат «No Mutation Detected» (Ни одной мутации не обнаружено).

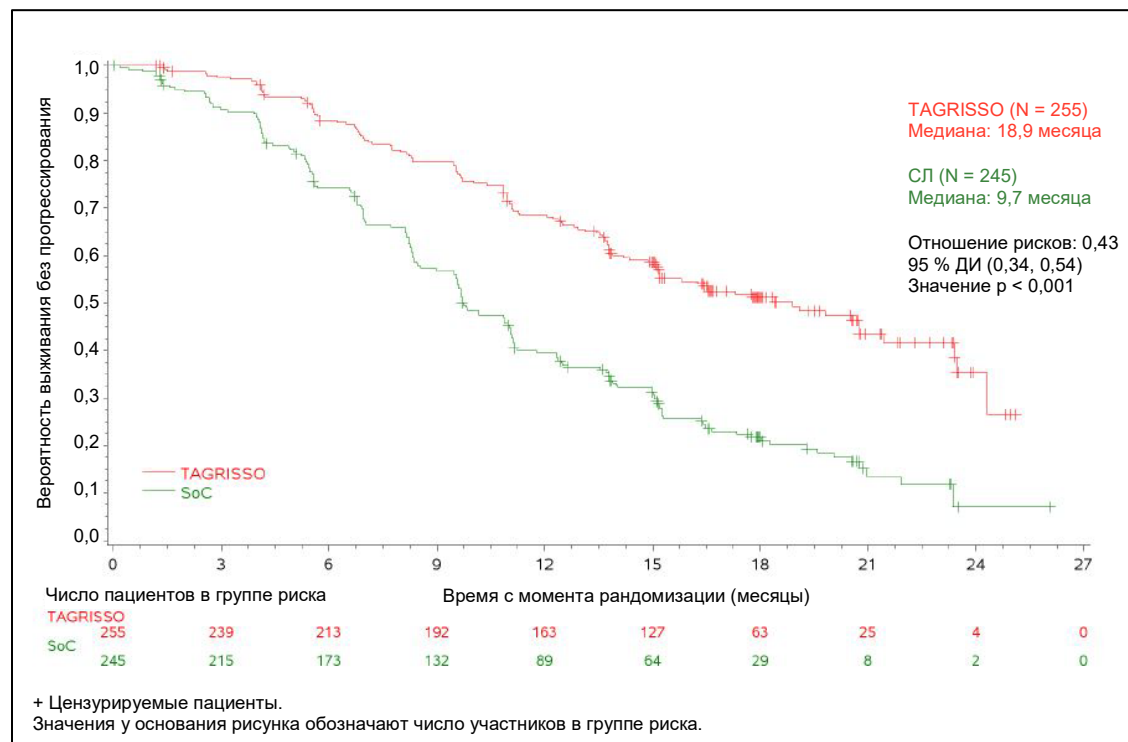
В Табл. 20, приведенной ниже, показано ОР для ВБП по оценке исследователя в полной выборке пациентов для анализа и в основной популяции оценки устройства (у пациентов с централизованно установленным наличием мутированного гена EGFR при исследовании тканей с использованием тест-системы cobas). ОР для ВБП по оценке исследователя в полной выборке пациентов для анализа (N = 556) с использованием стратифицированного логрангового критерия составляло 0,46 (95 % ДИ: 0,37, 0,57). Такой же показатель был получен при использовании нескорректированной модели пропорциональных рисков Кокса. ОР для ВБП по оценке исследователя в основной популяции оценки устройства (N = 500), рассчитанное с использованием нескорректированной модели пропорциональных рисков Кокса, составляло 0,43 (95 % ДИ: 0,34, 0,54). Клиническая эффективность в основной популяции оценки устройства соответствовала таковой в полной выборке пациентов для анализа. Кривая ВБП по оценке исследователя, построенная по методу Каплана — Мейера, в основной популяции оценки устройства показана на Рис. 4.

Табл. 20 Выживаемость без прогрессирования по оценке исследователя в полной выборке пациентов для анализа и в основной популяции оценки устройства в исследовании FLAURA (положительный результат исследования с использованием тест-системы cobas EGFR)

	Полная выборка пациентов для анализа в исследовании FLAURA N = 556		Популяция участников исследования FLAURA с положительным результатом исследования с использованием тест-системы cobas EGFR (основная популяция оценки устройства) N = 500	
	Осимертиниб (N = 279)	Гефитиниб или эрлотиниб (N = 277)	Осимертиниб (N = 255)	Гефитиниб или эрлотиниб (N = 245)
ВБП				
Число событий (%)	136 (49)	206 (74)	124 (49)	188 (77)
Медиана ВБП в месяцах (95 % ДИ)	18,9 (15,2, 21,4)	10,2 (9,6, 11,1)	18,9 (15,2, 21,4)	9,7 (9,5, 11,0)
Отношение рисков (95 % ДИ) ^a	0,46 (0,37, 0,57)		0,43 (0,34, 0,54)	
2-стороннее значение p ^a	< 0,0001		< 0,001	

^a Нескорректированная модель пропорциональных рисков Кокса

Рис. 4 Кривые выживаемости без прогрессирования заболевания (ВБП), построенные по методу Каплана — Мейера, в каждой группе лечения у пациентов с мутацией, выявленной с использованием тест-системы cobas EGFR (по оценке исследователя) в исследовании FLAURA



II. Анализ данных при применении препарата IRESSA® в качестве стандартного лечения

Отдельный анализ был проведен у пациентов с общей экспрессией EGFR (tEGFR+), получавших лечение препаратом IRESSA® (гефитиниб) в группе контроля исследования FLAURA. Из 178 пациентов, получавших лечение препаратом IRESSA®, у 174 пациентов был достигнут ответ по оценке исследователя (ЧОО = 67,8 % [118/174, 95 % ДИ: 60,6 %, 74,3 %, POP0 в Табл. 21]).

Из 79 пациентов, получавших лечение препаратом IRESSA® и рандомизированных на основании централизованного исследования тканей с использованием тест-системы cobas (основная популяция оценки эффективности), у 57 пациентов был достигнут объективный ответ с ЧОО, равной 72,2 % (95 % ДИ: 61,4 %, 80,8 %, POP1 в Табл. 21).

Эффективность лечения препаратом IRESSA® на основании исследования тканей с использованием тест-системы cobas сохранялась в других популяциях пациентов, при этом ЧОО составляла от 64,2 % (POP2, пациенты, включенные в исследование по результатам тестирования на местном уровне, с установленным статусом tEGFR+ по результатам исследования с использованием тест-системы cobas) до 68,5 % (POP3, все пациенты со статусом tEGFR+ по результатам исследования с использованием тест-системы cobas) (Табл. 21 и Рис. 5). Эти результаты согласуются с результатами первоначального регистрационного исследования (IFUM) у пациентов, отобранных для лечения препаратом IRESSA®.¹³

Табл. 21 ЧОО в разных популяциях пациентов по результатам исследования с использованием тест-системы cobas EGFR

Объективный ответ	Рандомизированные пациенты в группе СЛ, получавшие препарат IRESSA®				
	Пациенты, рандомизированные по результатам централизованного исследования (cobas tEGFR+)	Пациенты, рандомизированные по результатам исследования на местном уровне (местный tEGFR+)			Всего
		cobas tEGFR+	cobas tEGFR-	cobas tEGFR невалидны/неизвестны	
Число пациентов	79	70	2	23	174
Ответ	57	45	1	15	118
Отсутствие ответа	22	25	1	8	56
ЧОО (% , 95 % ДИ)	POP1 = 72,2 % (57/79: 61,4 %, 80,8 %)	POP4 = 64,3 % (45/70: 52,6 %, 74,5 %)	-	POP5 = 65,2 % (15/23: 44,9 %, 81,2 %)	POP0 = 67,8 % (118/174: 60,6 %, 74,3 %)
	-	POP2 = 64,2 % (61/95: 54,2 %, 73,1 %)			-
	POP3 = 68,5 % (102/149: 60,6 %, 75,4 %)		-	-	-

Примечание. Пациенты с отсутствием сведений об объективном ответе были исключены.

Примечание: tEGFR = тканевой EGFR, ДИ = доверительный интервал.

POP = популяция (подгруппа)

POP1: ЧОО у пациентов, рандомизированных по результатам исследования тканей с использованием тест-системы cobas (основная популяция оценки эффективности для исследования тканей с использованием тест-системы cobas).

POP2: ЧОО у пациентов, рандомизированных по результатам исследования тканей на местном уровне.

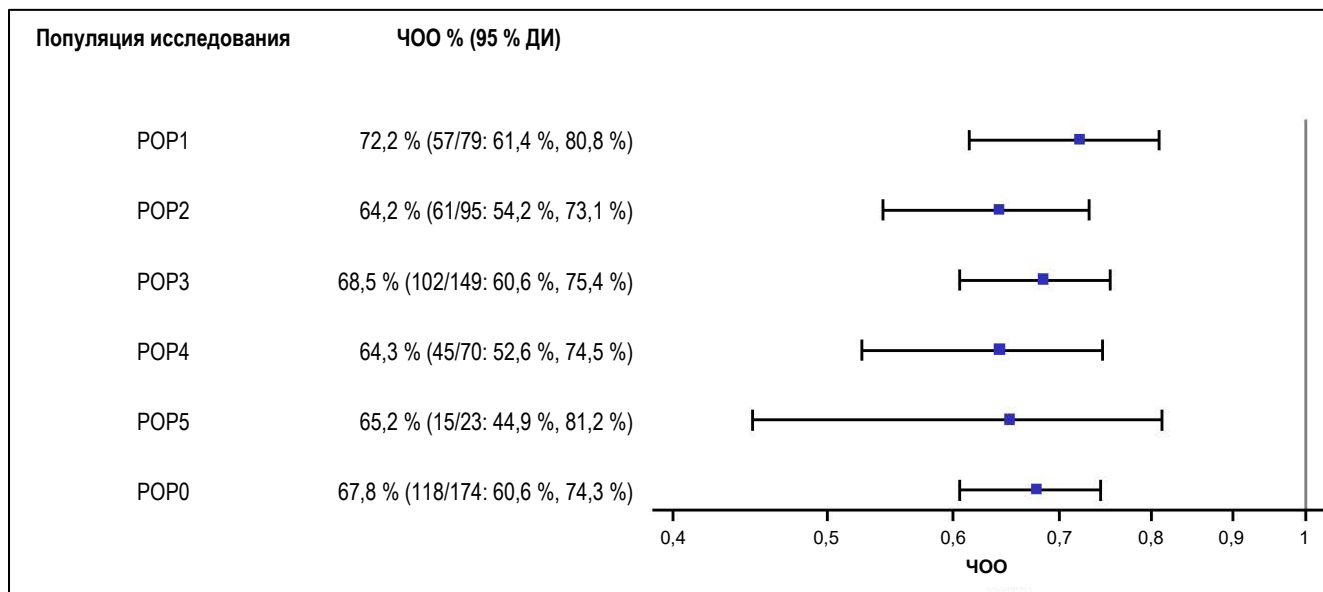
POP3: ЧОО у пациентов с положительным результатом исследования тканей с использованием тест-системы cobas.

POP4: ЧОО у пациентов, рандомизированных по результатам исследования тканей на местном уровне, подтвержденным при исследовании тканей с использованием тест-системы cobas.

POP5: ЧОО у пациентов, рандомизированных по результатам исследования тканей на местном уровне, у которых исследование тканей с использованием тест-системы cobas показало невалидный результат или не проводилось.

POP0: ЧОО у всех пациентов, получавших лечение препаратом IRESSA®.

Рис. 5 Кривые типа «форест-плот» для ЧОО на основании результатов исследования тканей с использованием тест-системы cobas EGFR в различных популяциях



POP = популяция (подгруппа)

POP1: ЧОО у пациентов, рандомизированных по результатам исследования тканей с использованием тест-системы **cobas** (основная популяция оценки эффективности для исследования тканей с использованием тест-системы **cobas**).

POP2: ЧОО у пациентов, рандомизированных по результатам исследования тканей на местном уровне.

POP3: ЧОО у пациентов с положительным результатом исследования тканей с использованием тест-системы **cobas**.

POP4: ЧОО у пациентов, рандомизированных по результатам исследования тканей на местном уровне, подтвержденным при исследовании тканей с использованием тест-системы **cobas**.

POP5: ЧОО у пациентов, рандомизированных по результатам исследования тканей на местном уровне, у которых исследование тканей с использованием тест-системы **cobas** показало невалидный результат или не проводилось.

POP0: ЧОО у всех пациентов, получавших лечение препаратом IRESSA®.

РАЗДЕЛ Б: ПРИНЦИП РАБОТЫ С ОБРАЗЦАМИ ПЛАЗМЫ

Пробоподготовка

Выделение ДНК из образцов плазмы крови описано в инструкции к набору **cobas®** cfDNA Sample Preparation Kit (M/N 07247737190).

Реагенты и материалы

Реагенты и материалы в комплекте

Набор/кассеты	Реагенты и их состав	Количество в наборе	Маркировка безопасности и предупреждения
Тест-система cobas® EGFR Mutation Test v2 Kit 24 теста (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-1 (мастермикс EGFR Master Mix 1) (M/N: 06471366001) Tris буфер Хлорид калия Глицерин ЭДТА Tween 20 3,13 % диметилсульфоксид 0,09 % азид натрия < 0,10 % dNTP < 0,01 % ДНК-полимераза Z05-AS1 (бактериальная) < 0,01 % фермент AmpErase (урацил-N-гликозилаза) (бактериальный) < 0,01 % аптамер < 0,01 % прямой и обратный праймеры гена EGFR < 0,01 % меченные флуоресцентным красителем зонды гена EGFR	2 × 0,48 мл	Нет
	EGFR MMX-2 (мастермикс EGFR Master Mix 2) (M/N: 06471382001) Tris буфер Хлорид калия Глицерин ЭДТА Tween 20 3,13 % диметилсульфоксид 0,09 % азид натрия < 0,10 % dNTP < 0,01 % ДНК-полимераза Z05-AS1 (бактериальная) < 0,01 % фермент AmpErase (урацил-N-гликозилаза) (бактериальный) < 0,01 % аптамер < 0,01 % прямой и обратный праймеры гена EGFR < 0,01 % меченные флуоресцентным красителем зонды гена EGFR	2 × 0,48 мл	Нет

Набор/кассеты	Реагенты и их состав	Количество в наборе	Маркировка безопасности и предупреждения
Тест-система cobas® EGFR Mutation Test v2 Kit 24 теста (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-3 v2 (мастермикс EGFR Master Mix 3) (M/N: 07248601001) Tris буфер Хлорид калия Глицерин ЭДТА Tween 20 3,13 % диметилсульфоксид 0,09 % азид натрия < 0,10 % dNTP < 0,01 % ДНК-полимераза Z05-AS1 (бактериальная) < 0,01 % фермент AmpErase (урацил-N-гликозилаза) (бактериальный) < 0,01 % аптамер < 0,01 % прямой и обратный праймеры гена EGFR < 0,01 % меченные флуоресцентным красителем зонды гена EGFR	2 × 0,48 мл	Нет
	MGAC (ацетат магния) (M/N: 05854326001) Ацетат магния 0,09 % азид натрия	6 × 0,2 мл	Нет
	EGFR MC (мутантный контроль гена EGFR) (M/N: 06471455001) Tris буфер ЭДТА Поли-гА-РНК (синтетическая) 0,05 % азид натрия < 0,1 % плазмидная ДНК, содержащая последовательности экзонов 18, 19, 20 и 21 гена EGFR (бактериальная) < 0,1 % ДНК гена EGFR дикого типа (культура клеток)	6 × 0,1 мл	Нет
	DNA SD (дилуэнт для образцов ДНК) (M/N: 05854474001) Tris-HCl буфер 0,09 % азид натрия	2 × 3,5 мл	Нет

Хранение реагентов и работа с ними

Реагент	Температура хранения	Длительность хранения
Тест-система cobas® EGFR Mutation Test v2 *	2–8 °C	После вскрытия эта тест-система стабильна для 4 применений на протяжении 90 дней или до истечения указанного срока годности, если он наступит раньше.

* Реагенты **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** и рабочий MMX (готовится путем добавления **MGAC** к **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2** или **EGFR MMX-3 v2**) необходимо хранить в темном месте и предохранять от длительного воздействия света. Рабочий MMX необходимо хранить в темноте при температуре 2–8 °C. Подготовленные образцы и контроли необходимо внести в рабочий MMX в течение 1 часа с момента его приготовления. Амплификация должна начаться в течение 1 часа с момента добавления подготовленных образцов и контролей в рабочий MMX.

Необходимые дополнительные материалы

Материалы	P/N
Набор для пробоподготовки cobas® cfDNA Sample Preparation Kit	Roche M/N 07247737190
Гипохлорит натрия	Любой поставщик
70 % этанол	Любой поставщик
Стерильные одноразовые серологические пипетки объемом 5 и 25 мл	Любой поставщик
Микропланшет (AD-планшет) системы cobas® 4800 и заклеивающая пленка	Roche 05232724001
Аппликатор для заклеивающей пленки системы cobas® 4800 (входит в комплект системы cobas® 4800)	Roche 04900383001
Дозаторы с регулируемым объемом * (для пипетирования реагентов объемом от 5 до 1000 мкл)	Любой поставщик
Свободные от ДНКаз наконечники для пипеток с аэрозольным барьером или прямым вытеснением	Любой поставщик
Настольная микроцентрифуга * (способная обеспечить 20 000 g)	Eppendorf 5430 или 5430R или эквивалентная
Морозильник, способный обеспечить хранение при температуре от –25 °С до –15 °С	Любой поставщик
Микроцентрифужные пробирки с плотно закрывающимися крышками (1,5 мл, свободные от РНКаз/ДНКаз, подходящие для ПЦР)	Любой поставщик
Штативы для пробирок с коническим дном и центрифужных пробирок	Любой поставщик
Вортекс *	Любой поставщик
Одноразовые перчатки без присыпки	Любой поставщик

* Все оборудование должно эксплуатироваться в соответствии с инструкциями производителя.

За дополнительной информацией о приобретаемых отдельно материалах обратитесь в местное представительство компании Roche.

Необходимое оборудование и программное обеспечение, не включенное в поставку

Необходимое оборудование и программное обеспечение, не включенное в поставку
Анализатор cobas® z 480
Управляющий компьютер системы cobas® 4800 с программным обеспечением версии 2.2 или более поздней версии
Программа EGFR Plasma P1 Analysis Package Software, версия 1.0 или более поздняя версия*
Сканер штрихкодов внешний с подключением через USB-порт
Принтер

* Актуальная версия программного обеспечения указана во вкладыше к набору с описанием тест-системы cobas® EGFR Mutation Test v2 (M/N: 07335873001).

За дополнительной информацией о приобретаемых отдельно материалах обратитесь в местное представительство компании Roche.

Меры предосторожности и правила работы

Меры предосторожности

Как и при выполнении любых тестов, соблюдение правил надлежащей лабораторной практики является условием качественного выполнения данного теста.

- Только для диагностики *in vitro*.
- Паспорта безопасности материалов (SDS) доступны по запросу в вашем региональном представительстве компании Roche.
- Данная тест-система предназначена для работы с образцами плазмы крови, полученными от пациентов с НМРЛ. Образцы нужно рассматривать как потенциально инфекционные и соблюдать при работе с ними правила лабораторной безопасности, приведенные в документах Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories¹⁶ и CLSI Document M29-A4.¹⁷
- Рекомендуется использовать стерильные одноразовые пипетки и свободные от ДНКаз наконечники.

Надлежащая лабораторная практика

- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте и не курите в рабочих лабораторных помещениях.
- Тщательно мойте руки после работы с образцами и реагентами набора.
- Работайте с любыми реагентами в средствах для защиты глаз, лабораторном халате и одноразовых перчатках. Избегайте попадания данных материалов в глаза, на кожу или слизистые оболочки. При попадании немедленно промойте большим количеством воды. В противном случае могут возникнуть ожоги. При разлинии реагентов залейте их водой, затем вытрите насухо.
- Тщательно очищайте и дезинфицируйте все рабочие поверхности свежеприготовленным 0,5%-м раствором гипохлорита натрия в дистиллированной или деионизированной воде (разведите бытовую хлорку в соотношении 1:10), затем протирайте их 70%-м этанолом.

Примечание. Коммерческий жидкий бытовой отбеливатель обычно содержит гипохлорит натрия в концентрации 5,25 %. Разведение 1:10 бытового хлорсодержащего моющего средства дает 0,5 % раствор гипохлорита натрия.

Контаминация

- Во избежание контаминации необходимо работать в одноразовых перчатках и менять их при переходе от работы с образцами к работе с реагентами тест-системы **cobas** EGFR. Не допускайте контаминации перчаток при работе с образцами.
- Необходимо часто менять перчатки, чтобы снизить риск контаминации.
- Также обязательно следует сменить перчатки перед выходом из зоны проведения работ по выделению ДНК или при подозреваемом загрязнении растворами реагентов или образцом.
- Не допускайте микробную и рибонуклеазную контаминацию реагентов.
- Перед приготовлением ММХ необходимо тщательно очистить зону амплификации и детекции. Для каждого этапа процедуры должны быть специально выделены запасы реактивов и отдельное оборудование, которые не будут применяться для других процедур или перемещаться из одной зоны в другую. Например, дозаторы и расходные материалы, использующиеся для выделения ДНК, нельзя использовать для приготовления реагентов для амплификации и детекции.

- Крайне желательно организовать рабочий процесс в лаборатории таким образом, чтобы все процедуры выполнялись в одном направлении и каждый следующий этап начинался только после завершения предыдущего. Например, выделение ДНК необходимо завершить до начала амплификации и детекции. Выделение ДНК должно осуществляться в зонах, отгороженных от зон амплификации и детекции. Во избежание контаминации рабочей смеси Мастермикс образцами ДНК необходимо тщательно очистить рабочую зону амплификации и детекции до начала приготовления смеси Мастермикс.

Целостность

- Не используйте набор по истечении срока годности.
- Не смешивайте реагенты из разных наборов или лотов.
- Не используйте одноразовые материалы с истекшим сроком годности.
- Все одноразовые материалы предназначены для однократного использования. Не используйте их повторно.
- Все оборудование должно эксплуатироваться в соответствии с инструкциями производителя.

Утилизация

- Реагенты **DNA EB, MGAC, EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2, EGFR MC** и **DNA SD** содержат азид натрия. Азид натрия может вступать в реакцию со свинцом и медью, которые содержатся в трубах канализации, что приводит к образованию взрывоопасных азидов. При сливе отходов, содержащих азид натрия, в лабораторную раковину смывайте их большим количеством холодной воды, чтобы предотвратить накопление азидов.
- Утилизируйте неиспользованные реагенты и отходы в соответствии с государственными, федеральными и региональными правилами.

Разлив жидкости и очистка

- Если разлив произошел в приборе **cobas® 4800**, выполните очистку в соответствии с инструкцией, приведенной в руководстве пользователя системы **cobas® 4800** или справочнике для поддержки пользователя системы **cobas® 4800**.
- Не используйте раствор гипохлорита натрия (хлорсодержащего моющего средства) для очистки анализатора **cobas® z 480**. Выполняйте очистку анализатора **cobas® z 480** в соответствии с инструкцией, приведенной в руководстве пользователя системы **cobas® 4800** или справочнике для поддержки пользователя системы **cobas® 4800**.
- Дополнительные предупреждения и сведения о мерах предосторожности и процедурах по снижению риска контаминации при работе с анализатором **cobas® z 480** приведены в руководстве пользователя системы **cobas® 4800** или справочнике для поддержки пользователя системы **cobas® 4800**.

Сбор, транспортировка и хранение образцов

Примечание. Работайте со всеми образцами как с потенциально инфекционными материалами.

Сбор и обработка образцов

Пробирка для взятия образцов Roche Cell-Free DNA Collection Tube

Для использования с тест-системой **cobas** EGFR валидированы образцы плазмы крови, полученные из цельной крови и собранные в пробирки Roche Cell-Free DNA Collection Tubes (пробирки Roche cfDNA).

Отделение плазмы от крови, собранной в пробирку Roche cfDNA, должно быть осуществлено в течение 7 дней после взятия образца. Образцы крови, собранные в пробирку Roche cfDNA, стабильны при хранении и транспортировке в течение 7 дней при температуре 15–25 °С с кратковременными колебаниями в пределах 15–30 °С в течение не более 16 часов. После отделения плазмы храните ее как описано ниже в разделе «**Транспортировка, хранение и обеспечение стабильности образцов**».

Примечание. В плазме, отделенной от крови, собранной в пробирку Roche cfDNA, наблюдался гемолиз. Однако было показано, что концентрации гемоглобина $\leq 2,0$ г/л не оказывают влияния на результаты исследования с использованием тест-системы **cobas** EGFR.

Пробирка для взятия образцов K2 ЭДТА Collection Tube

Для использования с тест-системой **cobas** EGFR валидированы образцы плазмы крови, полученные из цельной крови и собранные в пробирки K2 ЭДТА.

Цельная кровь, собранная в пробирки K2 ЭДТА, может храниться до 8 часов при температуре ≤ 30 °С. После отделения плазмы храните ее как описано ниже в разделе «**Транспортировка, хранение и обеспечение стабильности образцов**».

Транспортировка, хранение и обеспечение стабильности образцов

Транспортировку образцов плазмы крови необходимо производить в соответствии с федеральными, государственными и прочими правилами транспортировки этиологических агентов.¹⁸

Образцы плазмы крови сохраняют стабильность при следующих условиях:

Температура хранения образцов плазмы крови	≤ -70 °С	-15...-25 °С	2–8 °С	15–30 °С
Время хранения образцов плазмы крови, собранных в пробирки Roche cfDNA	До 30 дней	До 30 дней	До 7 дней	До 1 дня
Время хранения образцов плазмы крови с ЭДТА, собранных в пробирки K2	До 12 месяцев	До 12 месяцев	До 3 дней	До 1 дня

Срок хранения и стабильность обработанных образцов

Обработанный образец (выделенная сцДНК) плазмы крови, собранной в пробирки Roche cfDNA или пробирки K2 ЭДТА, стабилен в следующих условиях:

Температура хранения с выделенной сцДНК	-15...-25 °С	2-8 °С	15-30 °С
Длительность хранения	До 2 циклов замораживания-оттаивания на протяжении 60 дней	До 21 дней	До 7 дней

Выделенную сцДНК необходимо использовать в течение рекомендованного срока хранения или до истечения срока годности набора **cobas®** cfDNA Sample Preparation Kit, который был использован для выделения ДНК, если этот срок наступит раньше.

Перед использованием хранившихся исходных образцов ДНК перемешайте на вортексе и центрифугируйте пробирку для элюирования, содержащую исходный образец.

Процедура тестирования

Постановка теста

Рис. 6 Рабочий процесс использования тест-системы cobas EGFR совместно с набором cobas® cfDNA Sample Preparation Kit

1	Запуск системы
2	Обслуживание прибора
3	Извлечение образцов и реагентов из хранения
4	Подготовка образцов для связывания с колонкой
5	Выделение ДНК
6	Элюирование ДНК
7	Создание рабочего задания и распечатка схемы планшета
8	Подготовка реагентов для амплификации
9	Загрузка реагентов для амплификации в лунки AD-планшета
10	Загрузка образца в лунки AD-планшета
11	Запечатывание AD-планшета
12	Загрузка AD-планшета в анализатор cobas® z 480
13	Запуск постановки
14	Просмотр результатов
15	С использованием ЛИС: отправка результатов в ЛИС
16	Разгрузка анализатора

Инструкция по работе с набором

Примечание. Для использования с тест-системой **cobas EGFR** валидированы только образцы плазмы, отделенной от крови, собранные в пробирки Roche cfDNA или в пробирки K2 ЭДТА.

Примечание. Подробные инструкции по работе с анализатором **cobas® z 480** приведены в руководстве пользователя для анализатора **cobas® z 480**.

Объем постановки

Одна постановка может включать от 1 до 30 образцов (а также контроли) на 96-луночный AD-планшет. При постановке более чем 24 образца понадобится использовать несколько наборов тест-системы **cobas EGFR**.

Набор тест-системы **cobas EGFR** содержит достаточно реагентов для проведения 8 постановок по 3 образца (плюс контроли). Таким образом, одной тест-системы будет достаточно для анализа 24 образцов.

Контроль всей процедуры

При проведении этого исследования обязателен отрицательный контроль процедуры. Начиная с этапа выделения ДНК, в каждую постановку вместе с образцами в обязательном порядке включается отрицательный контроль.

Выделение ДНК

ДНК выделяется из образцов плазмы крови с использованием набора для пробоподготовки **cobas® cfDNA Sample Preparation Kit** (M/N 07247737190).

Аmplификация и детекция

Примечание. Во избежание контаминации рабочего ММХ образцами ДНК процедуры амплификации и детекции следует проводить в зоне, отделенной от зоны выделения ДНК. Перед приготовлением ММХ необходимо тщательно очистить зону амплификации и детекции. Для обеспечения достаточной очистки все поверхности, включая штативы и дозаторы, необходимо тщательно протереть 0,5 % раствором гипохлорита натрия, а затем 70 % раствором этанола. Коммерческий жидкий бытовой отбеливатель обычно содержит гипохлорит натрия в концентрации 5,25 %. Разведение 1:10 бытового хлорсодержащего моющего средства дает 0,5 % раствор гипохлорита натрия.

Подготовка оборудования

Подробные инструкции по подготовке к работе с анализатором cobas® z 480 приведены в руководстве пользователя системы cobas® 4800 или справочнике для поддержки пользователя системы cobas® 4800.

Подготовка к проведению исследования

Подробные инструкции по подготовке этапов рабочего процесса исследования на наличие мутаций гена EGFR приведены в руководстве пользователя системы cobas® 4800 или справочнике для поддержки пользователя системы cobas® 4800.

Подготовьте схему планшета с указанием расположения всех образцов и контролей для текущей постановки. В постановке, в которой анализируются только образцы плазмы крови, мутантный контроль вносят в лунки планшета A01–A03. Отрицательный контроль вносят в лунки планшета B01–B03. Затем вносят образцы в 3 колонках, начиная с лунок C01–C03 и заканчивая лунками H10–H12, как показано на Рис. 7.

Тест-система cobas EGFR может использоваться в смешанном режиме (то есть позволяет проводить исследование на наличие мутаций гена EGFR одновременно в образцах тканей и плазмы крови). В зависимости от выбранных вариантов исследования и количества образцов расположение контролей может различаться. Подробные инструкции по подготовке к проведению исследования в смешанном режиме приведены в руководстве пользователя системы cobas® 4800 или тест-системы cobas® EGFR Mutation Test v2 или в справочнике для поддержки пользователя системы cobas® 4800.

Рис. 7 Схема планшета для тест-системы cobas EGFR

Ряд/колонка	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	MC MMX 1	MC MMX 2	MC MMX 3 v2	S7 MMX 1	S7 MMX 2	S7 MMX 3 v2	S15 MMX 1	S15 MMX 2	S15 MMX 3 v2	S23 MMX 1	S23 MMX 2	S23 MMX 3 v2
B	NEG MMX 1	NEG MMX 2	NEG MMX 3 v2	S8 MMX 1	S8 MMX 2	S8 MMX 3 v2	S16 MMX 1	S16 MMX 2	S16 MMX 3 v2	S24 MMX 1	S24 MMX 2	S24 MMX 3 v2
C	S1 MMX 1	S1 MMX 2	S1 MMX 3 v2	S9 MMX 1	S9 MMX 2	S9 MMX 3 v2	S17 MMX 1	S17 MMX 2	S17 MMX 3 v2	S25 MMX 1	S25 MMX 2	S25 MMX 3 v2
D	S2 MMX 1	S2 MMX 2	S2 MMX 3 v2	S10 MMX 1	S10 MMX 2	S10 MMX 3 v2	S18 MMX 1	S18 MMX 2	S18 MMX 3 v2	S26 MMX 1	S26 MMX 2	S26 MMX 3 v2
E	S3 MMX 1	S3 MMX 2	S3 MMX 3 v2	S11 MMX 1	S11 MMX 2	S11 MMX 3 v2	S19 MMX 1	S19 MMX 2	S19 MMX 3 v2	S27 MMX 1	S27 MMX 2	S27 MMX 3 v2
F	S4 MMX 1	S4 MMX 2	S4 MMX 3 v2	S12 MMX 1	S12 MMX 2	S12 MMX 3 v2	S20 MMX 1	S20 MMX 2	S20 MMX 3 v2	S28 MMX 1	S28 MMX 2	S28 MMX 3 v2
G	S5 MMX 1	S5 MMX 2	S5 MMX 3 v2	S13 MMX 1	S13 MMX 2	S13 MMX 3 v2	S21 MMX 1	S21 MMX 2	S21 MMX 3 v2	S29 MMX 1	S29 MMX 2	S29 MMX 3 v2
H	S6 MMX 1	S6 MMX 2	S6 MMX 3 v2	S14 MMX 1	S14 MMX 2	S14 MMX 3 v2	S22 MMX 1	S22 MMX 2	S22 MMX 3 v2	S30 MMX 1	S30 MMX 2	S30 MMX 3 v2

Условные обозначения: MC = мутантный контроль, NEG = отрицательный контроль; S# = идентификатор образца, MMX # соответствует номеру мастермикс реагента Master Mix: 1, 2 или 3 v2.

Примечание. Для того чтобы получить валидные результаты, каждый образец необходимо внести в три последовательных столбца в один ряд.

Примечание. Рабочий мастермикс Master Mix 1 вносится в лунки планшета 01, 04, 07 и 10. Рабочий мастермикс Master Mix 2 вносится в лунки планшета 02, 05, 08 и 11. Рабочий мастермикс Master Mix 3 v2 вносится в лунки планшета 03, 06, 09 и 12.

Примечание. В лунки одного планшета может быть внесено не более 30 образцов. Если для внесения всех образцов в один планшет требуется использовать реагенты из нескольких наборов, все эти наборы должны быть из одного лота.

Подготовка реакции

Подготовка рабочих мастермиксов (MMX-1, MMX-2 и MMX-3 v2)

Примечание. Растворы **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** и рабочий **MMX** чувствительны к свету и необходимо защищать их от длительного воздействия света.

Примечание. В связи с высокой вязкостью реагентов **EGFR MMX** и рабочего **MMX** эти растворы необходимо типетировать медленно, чтобы обеспечить полный выход смеси из наконечника.

Примечание. Реагенты **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2** и **EGFR MMX-3 v2** могут иметь бледно-голубую или сиреневатую окраску. Это не влияет на рабочие характеристики реагента.

Примечание. В отдельных микроцентрифужных пробирках объемом 1,5 мл приготовьте три партии рабочего **MMX**, одну — с добавлением **EGFR MMX-1**, другую — с добавлением **EGFR MMX-2**, и третью — с добавлением **EGFR MMX-3 v2**.

1. Рассчитайте объемы реагентов **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2** или **EGFR MMX-3 v2**, необходимые для каждого рабочего **MMX** по следующей формуле:
Необходимый объем **EGFR MMX-1** или **EGFR MMX-2** или **EGFR MMX-3 v2** = (количество образцов + 2 контроля + 1) × 20 мкл
2. Рассчитайте необходимый объем реагента **MGAC** для каждой партии рабочего **MMX** по следующей формуле:
Необходимый объем реагента **MGAC** = (количество образцов + 2 контроля + 1) × 5 мкл

Для определения объема каждого реагента, необходимого для приготовления рабочего **MMX** исходя из количества образцов, включенных в постановку, руководствуйтесь Табл. 22.

Табл. 22 Объемы реагентов, необходимые для приготовления рабочих **MMX-1**, **MMX-2** и **MMX-3 v2**

		Количество образцов *									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMX	20 мкл	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260
MGAC	5 мкл	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Общий объем каждого рабочего MMX (мкл)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Значение параметра «количество образцов» определяется как количество анализируемых образцов + 2 контроля + 1.

3. Достаньте необходимое количество пробирок реагентов **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** и **MGAC** из холодильника с температурой камеры от 2 °С до 8 °С. Перемешайте каждый реагент на вортексе в течение 5 секунд и осадите капли со стенок пробирки на дно, прежде чем приступить к работе с реагентом. Промаркируйте стерильные микроцентрифужные пробирки для рабочих **MMX-1**, **MMX-2** и **MMX-3 v2**.
4. Внесите рассчитанные объемы реагентов **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2** или **EGFR MMX-3 v2** в соответствующие пробирки для рабочих **MMX**.
5. Внесите рассчитанный объем реагента **MGAC** в пробирки с рабочими **MMX**.
6. Перемешайте содержимое пробирок на вортексте в течение 3–5 секунд для получения достаточно однородной смеси.

Примечание. Образцы и контроли необходимо внести в лунки AD-планшета в течение 1 часа после приготовления рабочих ММХ.

Примечание. Используйте только AD-планшеты и заклеивающую пленку для системы cobas® 4800.

Подготовка планшета

Примечание. При использовании хранившихся исходных образцов ДНК следуйте указаниям в разделе «Транспортировка, хранение и обеспечение стабильности образцов».

1. Пипетируйте 25 мкл рабочего ММХ в каждую реакционную лунку AD-планшета, которая задействована в постановке. Не касайтесь наконечниками дозатора поверхности планшета за пределами лунки.
 - Внесите рабочий ММХ-1 (содержащий **EGFR ММХ-1**) в лунки колонок 01, 04, 07 и 10 AD-планшета (по мере необходимости).
 - Внесите рабочий ММХ-2 (содержащий **EGFR ММХ-2**) в лунки колонок 02, 05, 08 и 11 AD-планшета (по мере необходимости).
 - Внесите рабочий ММХ-3 v2 (содержащий **EGFR ММХ-3 v2**) в лунки колонок 03, 06, 09 и 12 AD-планшета (по мере необходимости).
2. Пипетируйте по 25 мкл реагента **EGFR MC** в лунки **A01**, **A02** и **A03** AD-планшета, перемешайте содержимое лунок с помощью дозатора: наберите содержимое лунки в наконечник и вылейте обратно в лунку не менее двух раз.
3. Поменяв наконечник дозатора, пипетируйте по 25 мкл отрицательного контроля **NEG** в лунки **B01**, **B02** и **B03** AD-планшета, перемешайте содержимое лунок с помощью дозатора: наберите содержимое лунки в наконечник и вылейте обратно в лунку не менее двух раз.

Примечание. При каждой постановке обязательным является внесение реагента **EGFR MC** в лунки **A01**, **A02** и **A03**, а также отрицательного контроля **NEG** в лунки **B01**, **B02** и **B03**. В противном случае анализатор cobas® z 480 расценит эту постановку как невалидную.

Примечание. Во избежание перекрестной контаминации образцов, а также внешней контаминации реакционных пробирок для ПЦР, меняйте перчатки каждый раз, когда в этом возникает необходимость.

4. Пипетируйте по 25 мкл первого образца ДНК в лунки **C01**, **C02** и **C03** AD-планшета, используя новый наконечник для дозатора при наборе каждой новой дозы раствора образца ДНК и внесении образца ДНК в каждую новую лунку. Перемешайте содержимое лунок с помощью дозатора: наберите содержимое лунки в наконечник и вылейте обратно в лунку не менее двух раз. Повторите эту процедуру для ДНК каждого образца, соблюдая схему, приведенную на Рис. 7, до тех пор, пока все образцы ДНК не будут внесены в лунки AD-планшета. Убедитесь, что вся жидкость находится на дне лунок.

Примечание. Перед использованием хранившихся исходных образцов ДНК перемешайте на вортексе и центрифугируйте пробирку для элюирования, содержащую исходный образец.

5. Покройте AD-планшет заклеивающей пленкой (входит в комплект поставки вместе с планшетами). Для того чтобы надежно приклеить заклеивающую пленку к AD-планшету, воспользуйтесь аппликатором.
6. Прежде чем запустить ПЦР, убедитесь, что вся жидкость находится на дне лунок.

Примечание. Амплификация и детекция должны начаться не позднее чем через 1 час после внесения первого разведенного образца ДНК в рабочий ММХ.

Запуск ПЦР

Подробные инструкции по этапам рабочего процесса исследования на наличие мутаций гена EGFR приведены в руководстве пользователя системы cobas® 4800 или справочнике для поддержки пользователя системы cobas® 4800. При появлении всплывающего окна «Select test» (Выберите исследование), выберите вариант «EGFR Plasma P1» и нажмите кнопку «ОК».

Результаты

Интерпретация результатов

Примечание. Валидность всех постановок и образцов проверяется программой **cobas® 4800**.

Примечание. Валидная постановка исследования может содержать как валидные, так и невалидные результаты исследования образцов.

В Табл. 23 приведена интерпретация результатов исследования образцов в случае валидной постановки.

Табл. 23 Интерпретация результатов исследования с использованием тест-системы **cobas EGFR**

Результат исследования	Результат определения мутации	Полуколичественный показатель (SQI)	Интерпретация
Mutation Detected	Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (Может присутствовать несколько мутаций.)	Ex19Del: SQI S768I: SQI L858R: SQI T790M: SQI L861Q: SQI G719X: SQI Ex20Ins: SQI (Может присутствовать несколько мутаций.)	Обнаружена мутация в специфическом мишеневом участке-гена EGFR.
No Mutation Detected (NMD) *	Нет	Нет	Мутации в мишеневых участках гена EGFR не обнаружены.
Invalid	Нет	Нет	Результат исследования образца невалидный. При получении невалидных результатов повторите исследование соответствующих образцов, соблюдая инструкции, приведенные в разделе « Повторное исследование образцов после получения невалидных результатов » ниже.
Failed	Нет	Нет	Невалидная постановка по причине сбоя оборудования или программного обеспечения. Обратитесь в местное представительство компании Roche за технической поддержкой.

* Результат «No Mutation Detected» (Ни одной мутации не обнаружено) не исключает наличия мутаций в мишеневых участках гена EGFR, поскольку результат исследования зависит от концентрации мутантных последовательностей, достаточной целостности образца, отсутствия ингибиторов и достаточного количества искомой ДНК.

Сигнальные сообщения для результатов могут появляться на вкладке «Result» (Результаты) на экране либо в колонке «Flags» (Сигнальные сообщения) в отчете. Подробные сведения приведены в разделе «**Сигнальные сообщения для результатов**».

Полуколичественный показатель (SQI)

SQI является полуколичественной мерой количества мутантной сцДНК в образце, который может использоваться для оценки различий мутационной нагрузки с течением времени. Увеличение значения SQI указывает на увеличение содержания соответствующей целевой мутации в пределах индивидуального образца как источника, тогда как уменьшение значения SQI указывает на уменьшение содержания соответствующей целевой мутации в пределах индивидуального образца как источника. Типичные величины SQI для каждого класса мутаций гена EGFR, выявляемых данной тест-системой, показаны в виде линейной аппроксимации результатов на Рис. 8 – Рис. 14.

Повторный анализ образцов, результаты которых признаны невалидными

1. Если постановка невалидна, объема выделенной ДНК для каждого образца будет недостаточно для повторения процедур амплификации и детекции. Повторите всю процедуру со всеми образцами, начав с выделения ДНК.
2. Если постановка валидна, но невалиден образец, объема выделенной ДНК для каждого образца будет недостаточно для повторения процедур амплификации и детекции. Повторите всю процедуру для невалидного образца, начав с выделения ДНК.

Контроль качества и валидности результатов

Каждая постановка, предполагающая анализ до 30 образцов, должна включать мутантный контроль для тест-системы **cobas EGFR (EGFR MC)** [лунки **A01, A02 и A03**] и отрицательный контроль (**NEG**) [лунки **B01, B02 и B03**] для рабочих мастермиксов ММХ-1, ММХ-2 и ММХ-3 v2. Результат постановки считается валидным, если результаты для контролей **EGFR MC** и **NEG** признаны валидными. Если для любого из контролей (**EGFR MC** или **NEG**) получен невалидный результат, вся постановка признается невалидной и анализ проводится повторно.

Мутантный контроль

Результат анализа для мутантного контроля **EGFR MC** должен быть «Valid» (Валидный). Если результат для мутантного контроля **EGFR MC** стабильно невалиден, обратитесь в местное представительство компании Roche за технической поддержкой.

Отрицательный контроль

Результат анализа для отрицательного контроля **NEG** должен быть «Valid» (Валидный). Если результат для отрицательного контроля **NEG** стабильно невалиден, обратитесь в местное представительство компании Roche за технической поддержкой.

Ограничения процедуры

1. Тест проводится только для указанных типов образцов. Тест-система **cobas EGFR** была валидирована только для исследования образцов плазмы, отделенной от крови, собранных в пробирки Roche cfDNA или в пробирки K2 ЭДТА.
2. Функциональные характеристики тест-системы **cobas EGFR** были валидированы при ее использовании вместе с набором для пробоподготовки **cobas® cfDNA Sample Preparation Kit**.
3. Эффективность обнаружения мутаций не зависит от количества копий в образце, но на нее могут влиять качество образца, количество выделенной ДНК и наличие интерферирующих веществ.
4. Достоверность результатов теста зависит от соблюдения правил транспортировки, хранения и обработки образцов. Соблюдайте процедуры, описанные в данной инструкции по работе с тест-системой, а также в руководстве пользователя системы **cobas® 4800** или справочнике для поддержки пользователя системы **cobas® 4800**.

5. Пипетирование со дна пробирки для элюирования может разрушить осадок и неблагоприятно повлиять на результаты теста.
6. Добавление фермента AmpErase в рабочие мастермиксы Master Mix тест-системы **cobas** EGFR позволяет выполнять избирательную амплификацию ДНК-мишени. В то же время для предотвращения контаминации реагентов требуется соблюдать стандарты надлежащей лабораторной практики, а также в точности следовать процедурам, описанным в данном руководстве по работе с тест-системой.
7. К работе с данным продуктом допускается только персонал, обученный проведению ПЦР и работе с системой **cobas**® 4800.
8. Данная тест-система валидирована для использования только с анализатором **cobas**® z 480. Другие термочиклеры с оптической детекцией в режиме реального времени не могут применяться с данной тест-системой.
9. Вследствие естественных различий между технологиями пользователю рекомендуется, прежде чем заменить одну технологию на другую, провести корреляционные испытания для двух методов, чтобы оценить возможные различия между технологиями.
10. Наличие ингибиторов ПЦР может обусловить получение ложноотрицательных или невалидных результатов.
11. В редких случаях мутации в пределах геномных участков ДНК гена EGFR, с которыми взаимодействуют используемые в тест-системе **cobas** EGFR праймеры или зонды, могут приводить к невозможности выявления мутаций в экзонах 18, 19, 20 и 21 (получению результата «No Mutation Detected» [Ни одной мутации не обнаружено]).
12. Тест-система **cobas** EGFR может проявлять перекрестную реактивность (с получением результата «Mutation Detected» [Мутация обнаружена]) при наличии мутации замены L747S в экзоне 19 — это редкая приобретенная мутация, связанная с резистентностью к лечению препаратами из группы ингибиторов тирозинкиназы (ИТК).¹⁹
13. Образцы, тестировавшиеся при высоких концентрациях ($> 10^5$ копий/мл), могут давать ложные результаты.
14. Тест-система **cobas** EGFR валидирована для использования с 25 мл исходного раствора ДНК на одну реакционную лунку. Внесение исходного раствора ДНК в меньшем объеме, чем 25 мл на одну реакционную лунку, не рекомендуется.
15. Описанной выше методике необходимо следовать для обнаружения ≥ 100 копий мутантной ДНК на мл плазмы, отделенной от крови, собранной в пробирку Roche cfDNA или в пробирку K2 ЭДТА для выявления мутаций гена EGFR в Табл. 3.
16. Образцы, для которых по итогам анализа был получен результат «No Mutation Detected» (Ни одной мутации не обнаружено), могут содержать мутации EGFR, которые не определяются данной тест-системой.
17. Следует обратить внимание на то, что при результате «No Mutation Detected» (Ни одной мутации не обнаружено) для плазмы следует провести проверочный тест или подтвердить его в исследовании тканей.
18. Количества плазмы из цельной крови, собранной в пробирку Roche cfDNA, достаточно только для одного тестирования.
19. Плазму пациента из крови, взятой не в то же самое время, не следует объединять с другой плазмой.
20. Эксплуатационные характеристики тест-системы **cobas** EGFR не были установлены для свернувшихся образцов, собранных в пробирку Roche cfDNA. Свернувшиеся образцы следует отложить и взять новый образец у пациента.
21. В плазме, отделенной от крови, собранной в пробирку Roche cfDNA, наблюдался гемолиз. Концентрации гемоглобина $> 2,0$ г/л, могут оказать интерферирующее влияние на результаты, полученные на тест-системе **cobas** EGFR.

Результаты неклинических испытаний теста

Аналитические характеристики

Приведенные ниже данные предназначены для демонстрации аналитических характеристик тест-системы cobas EGFR.

Аналитическая чувствительность (предел измерения холостой пробы)

Для оценки функциональных характеристик тест-системы cobas ДНК, а также для подтверждения того факта, что контрольный (пустой) образец не генерирует сигнал, который мог бы быть интерпретирован как присутствие мутантного гена в низкой концентрации, было проведено исследование тест-системы с собранными в пробирки K2 с образцами, плазмы крови с ЭДТА здоровых доноров с геном EGFR дикого типа. По результатам проведения анализа, предписанного рекомендациями CLSI EP17-A2²⁰, предел измерения холостой пробы равнялся нулю для всех видов мутаций.

Предел обнаружения с использованием ДНК клеточной линии

Образцы плазмы крови с ЭДТА, собранные в пробирки K2

ДНК клеточной линии с содержанием каждого из семи классов мутаций, определяемых данной тест-системой, были добавлены в пробирки K2 с образцами плазмы крови с ЭДТА здоровых доноров с геном EGFR дикого типа. Были приготовлены серии разведений, после чего были подготовлены 24 повторных постановки для каждого образца панели с использованием каждого из трех лотов наборов тест-системы cobas EGFR.

Для каждого из семи классов мутаций, определяемых данной тест-системой, был определен предел обнаружения в виде наименьшей концентрации ДНК, обеспечивающей результат «Mutation Detected» (Мутация обнаружена) для целевой мутации EGFR с частотой не ниже 95 %. Полученные результаты приведены в Табл. 24.

Табл. 24 Предел обнаружения для тест-системы cobas EGFR с применением образцов плазмы крови с ЭДТА, собранных в пробирки K2

Экзон гена EGFR	Группа мутаций гена EGFR	Последовательность нуклеиновых кислот гена EGFR	LoD для интактной * ДНК (копий/мл)	LoD для фрагментированной ** ДНК (копий/мл)	Идентификатор COSMIC ¹⁴
18	G719A	2156G>C	100	100	6239
19	Ex19Del	2235_2249del15	25	75	6223
20	T790M	2369C>T	25	100	6240
20	S768I	2303G>T	20	25	6241
20	Ex20Ins	2307_2308ins9GCCAGCGTG	80	25	12376
21	L858R	2573T>G	10	100	6224
21	L861Q	2582T>A	30	30	6213

Различия по фактическим значениям LoD (предела обнаружения) связаны с различием в фоновой ДНК.

* Интактная ДНК клеточной линии имела фоновую ДНК дикого типа с концентрацией примерно 10 000 копий/мл.

** ДНК клеточной линии, подвергнутая механической фрагментации до среднего размера 220 п.н., имела фоновую ДНК дикого типа с концентрацией примерно 100 000 копий/мл.

Образцы плазмы крови, собранные в пробирки Roche cfDNA

Для плазмы, отделенной от крови, собранной в пробирку Roche cfDNA, значения LoD были подтверждены путем добавления фрагментированной ДНК клеточной линии с содержанием каждого из семи классов мутаций, определяемых данной тест-системой, в пробирки Roche cfDNA с образцами плазмы крови здоровых доноров с геном EGFR дикого типа. Разведения были приготовлены с целью достижения концентраций, близких к LoD, указанных в Табл. 24, и было проанализировано 20 повторных постановок для каждого образца с использованием одного лота наборов тест-системы **cobas** EGFR. Фактическая частота выявления каждой мутации составляла 100 %.

Таким образом, тест-система **cobas** EGFR способна выявлять мутации в экзонах 18, 19, 20 и 21 гена EGFR при количестве ≤ 100 копий мутантной ДНК на мл плазмы крови с использованием стандартного внесения 25 мкл исходного образца ДНК в одну реакционную лунку с плазмой крови, собранной в пробирку K2 ЭДТА или в пробирку Roche cfDNA.

Перекрестная реактивность с другими мутациями в экзонах 18, 19, 20 и 21**Образцы, полученные в дополнительном клиническом исследовании AURA и в исследовании AURA2**

Тест-система **cobas** EGFR выдала результат «Mutation Detected» (Мутация обнаружена) для нижеуказанных мутаций гена EGFR, присутствующих в образцах из дополнительного клинического исследования AURA и в исследовании AURA2 (Табл. 25). Целью дополнительного исследования AURA являлось добавление образцов в выборку исследования AURA2 и повышение вероятности обнаружения редких мутаций в образцах плазмы крови. Аналитическая эффективность тест-системы **cobas** EGFR при выявлении данных мутаций не оценивалась.

Табл. 25 Мутации, выявленные в дополнительном исследовании AURA и в исследовании AURA2, которые могут быть источником перекрестной реактивности тест-системы cobas EGFR

Экзон	Последовательность мутации	Изменение АК	Идентификатор COSMIC ¹⁴
19	2236_2256>ATC	E746_S752>I	133190
	2237_2258>TATC	E746_P753>VS	Не выявлено
	2239_2256>CAG	L747_S752>Q	Не выявлено
	2239_2264>GCCAA	L747_A755>AN	85891
	2240_2264>CGAGAGA	L747_A755>SRD	Не выявлено

Специфичность — микроорганизмы

Специфичность тест-системы **cobas** EGFR оценивалась в исследовании с использованием *Staphylococcus epidermidis* в количестве 1×10^6 колониеобразующих единиц. Полученные результаты показали, что данный микроорганизм не проявляет перекрестного реагирования и не оказывают интерферирующего влияния на тест-систему **cobas** EGFR в случае добавления к образцам плазмы крови с ЭДТА в пробирках K2, полученной у здоровых доноров с последовательностями гена EGFR дикого и мутантного типа.

Интерферирующее влияниеОбразцы плазмы крови с ЭДТА, собранные в пробирки K2

Было установлено, что триглицериды (37 ммоль, рекомендованная CLSI высокая концентрация²¹), билирубин (0,2 г/л, неконъюгированный или конъюгированный, рекомендованная CLSI высокая концентрация²¹) и гемоглобин (1,5 г/л), не оказывают интерферирующего влияния на результаты исследования с использованием тест-системы **cobas** EGFR при добавлении потенциально интерферирующего вещества к образцам плазмы крови с ЭДТА в пробирках K2, полученной у здоровых доноров с последовательностями гена EGFR дикого и мутант-

ного типа. Как было показано, гемоглобин при концентрации 2,0 г/л в плазме крови не оказывает интерферирующего влияния на результаты исследования с использованием тест-системы **cobas** EGFR. Альбумин в концентрации ≥ 60 г/л (60 г/л, рекомендованная CLSI высокая концентрация ²¹) может оказывать интерферирующее влияние на результаты исследования с использованием тест-системы **cobas** EGFR.

Результаты исследования показывают, что ЭДТА, а также препараты Нейпоген и TARCEVA® не оказывают интерферирующего влияния на функциональные характеристики тест-системы **cobas** EGFR при добавлении потенциально интерферирующих веществ к образцам плазмы крови с ЭДТА в пробирках K2, полученной у здоровых доноров с последовательностями гена EGFR дикого и мутантного типа.

Образцы плазмы крови, собранные в пробирки Roche cfDNA

Было установлено, что триглицериды (37 ммоль, рекомендованная CLSI высокая концентрация ²¹), билирубин (0,2 г/л, неконъюгированный или конъюгированный, рекомендованная CLSI высокая концентрация ²¹), гемоглобин (2,0 г/л) и альбумин (60 г/л, рекомендованная CLSI высокая концентрация ²¹) не оказывают интерферирующего влияния на результаты исследования с использованием тест-системы **cobas** EGFR при добавлении потенциально интерферирующих веществ к образцам плазмы крови в пробирках Roche cfDNA, полученной у здоровых доноров с последовательностями гена EGFR дикого и мутантного типа.

Линейность

Образцы плазмы крови с ЭДТА, собранные в пробирки K2

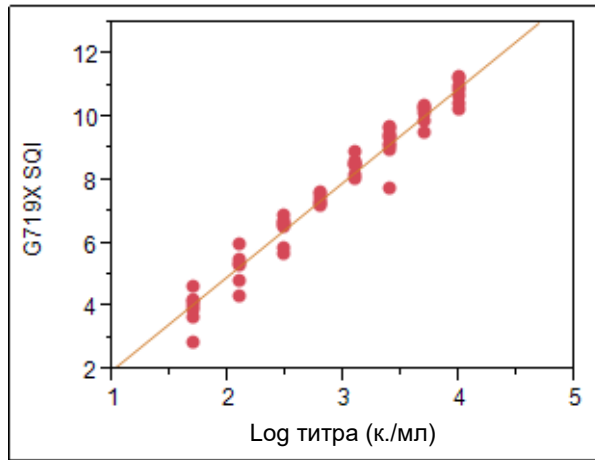
Исследование линейности тест-системы **cobas** EGFR проводилось на серии разведений по меньшей мере 8 образцов панели, охватывающих линейный диапазон для доминирующей мутации каждого класса мутаций гена EGFR, определяемых тест-системой. Образцы панели были приготовлены путем разведения образцов ДНК клеточных линий, каждый из которых содержал доминантные мутации, образцами плазмы крови с ЭДТА в пробирках K2, полученной у здоровых доноров с геном EGFR дикого типа. Исследования проводили в соответствии с рекомендациями CLSI Guideline EP-06A.²⁴ Было исследовано по десять повторов на образец панели для каждой из 2 лотов в концентрациях до $1,0E+04$ копий/мл (всего 20 повторов для каждого уровня). Для концентраций выше $1,0E+04$ копий/мл исследовалось по одному повтору для каждого лота.

Для исследования каждого класса мутаций с использованием тест-системы **cobas** EGFR линейный диапазон приведен в Табл. 26, а соответствующие кривые для одного лота показаны на Рис. 8 – Рис. 14.

Табл. 26 Линейный диапазон для тест-системы **cobas** EGFR с применением образцов плазмы крови с ЭДТА, собранных в пробирки K2

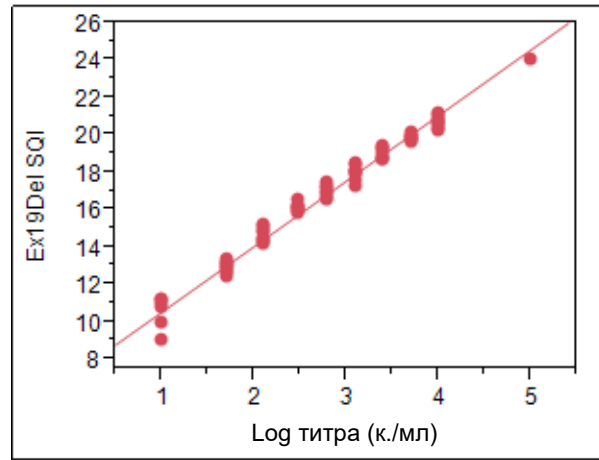
Экзон гена EGFR	Мутация гена EGFR	Последовательность нуклеиновых кислот мишени	Линейный диапазон (копий/мл)
18	G719A	2156G>C	50 – $1E+04$
19	Делеция в экзоне 19	2235_2249del15	10 – $1E+05$
20	S768I	2303G>T	10 – $1E+05$
20	T790M	2369C>T	50 – $1E+05$
20	Вставка в экзоне 20	2307_2308ins9GCCAGCGTG	10 – $1E+05$
21	L858R	2573T>G	10 – $1E+05$
21	L861Q	2582T>A	10 – $1E+05$

Рис. 8 Линейность для мутантной ДНК в образцах плазмы крови с ЭДТА, собранных в пробирки К2: ДНК клеточной линии с мутацией G719A



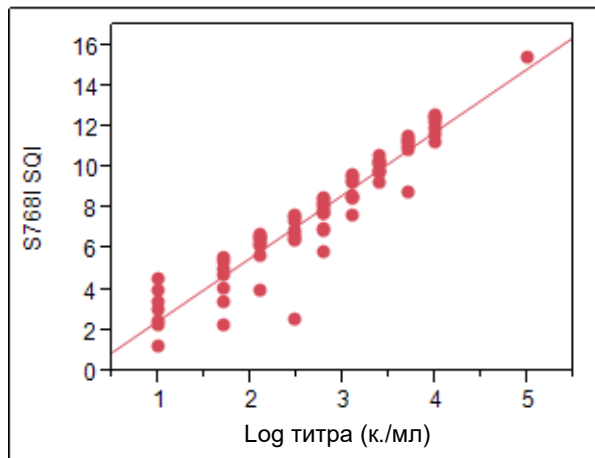
$SQI = -0,987 + 2,986 \times \log \text{ числа копий на мл}$
 $R^2 = 0,968$

Рис. 9 Линейность для мутантной ДНК в образцах плазмы крови с ЭДТА, собранных в пробирки К2: ДНК клеточной линии с делецией в экзоне 19



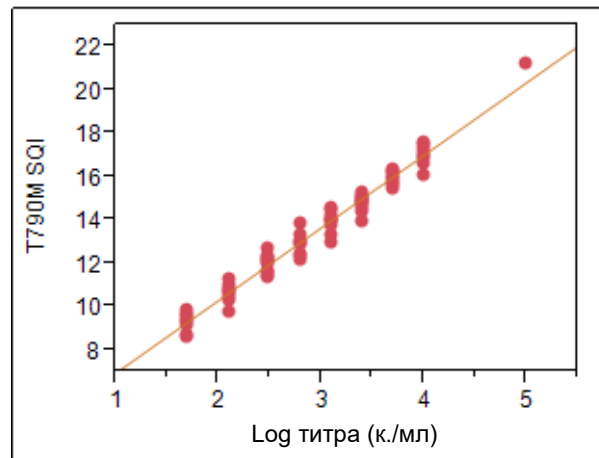
$SQI = 7,042 + 3,507 \times \log \text{ числа копий на мл}$
 $R^2 = 0,981$

Рис. 10 Линейность для мутантной ДНК в образцах плазмы крови с ЭДТА, собранных в пробирки К2: ДНК клеточной линии с мутацией S768I



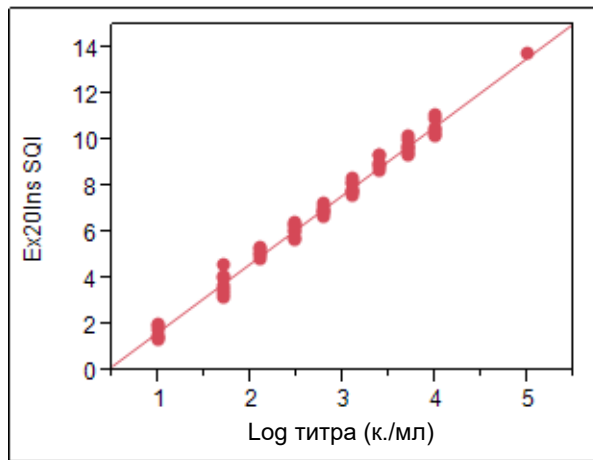
$SQI = -0,578 + 3,093 \times \log \text{ числа копий на мл}$
 $R^2 = 0,912$

Рис. 11 Линейность для мутантной ДНК в образцах плазмы крови с ЭДТА, собранных в пробирки К2: ДНК клеточной линии с мутацией T790M



$SQI = 3,593 + 3,352 \times \log \text{ числа копий на мл}$
 $R^2 = 0,973$

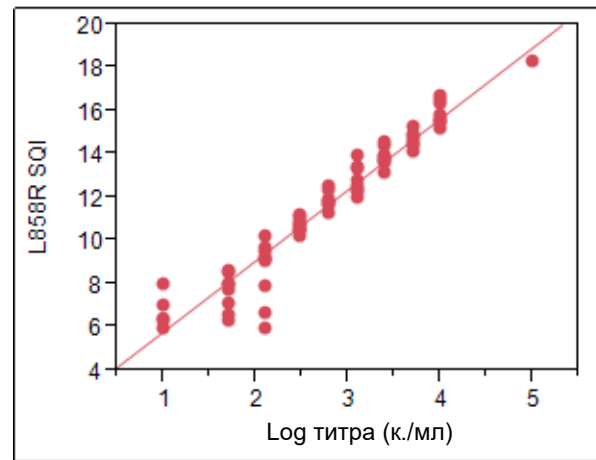
Рис. 12 Линейность для мутантной ДНК в образцах плазмы крови с ЭДТА, собранных в пробирки K2: ДНК клеточной линии со вставками в экзоне 20



$$\text{SQI} = -1,268 + 2,973 \times \log \text{ числа копий на мл}$$

$$R^2 = 0,990$$

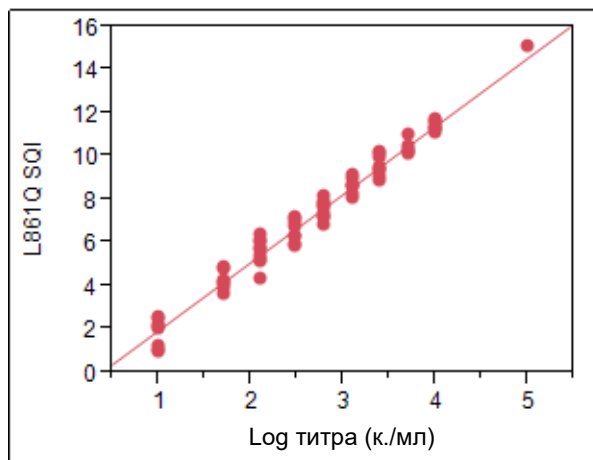
Рис. 13 Линейность для мутантной ДНК в образцах плазмы крови с ЭДТА, собранных в пробирки K2: ДНК клеточной линии с мутацией L858R



$$\text{SQI} = 2,543 + 3,283 \times \log \text{ числа копий на мл}$$

$$R^2 = 0,933$$

Рис. 14 Линейность для мутантной ДНК в образцах плазмы крови с ЭДТА, собранных в пробирки K2: ДНК клеточной линии с мутацией L861Q



$$\text{SQI} = -1,177 + 3,149 \times \log \text{ числа копий на мл}$$

$$R^2 = 0,980$$

Образцы плазмы крови, собранные в пробирки Roche cfDNA

Линейный диапазон в образцах плазмы крови, собранных в пробирки Roche cfDNA, был подтвержден на серии разведений по меньшей мере 6 образцов панели, охватывающих диапазон линейности, установленный для образцов плазмы крови с ЭДТА, собранных в пробирки K2 (Табл. 26). Образцы панели были приготовлены разведением образцов фрагментированной ДНК клеточной линии, каждый из которых содержал доминантные мутации, образцами плазмы в крови в пробирках Roche cfDNA, полученной у здоровых доноров с геном EGFR дикого типа. Исследования проводили в соответствии с рекомендациями CLSI Guideline EP06-A.²⁴ Было исследовано по четыре повтора на образец панели для каждого из 2 лотов в концентрациях до 1,0E+04 копий/мл (всего 8 повторов для каждого уровня). Для концентраций выше 1,0E+04 копий/мл исследовалось по 2 повтора для каждого лота (всего 4 повтора для каждого уровня).

Воспроизводимость

Воспроизводимость тест-системы **cobas** EGFR оценивалась на панели из двенадцати образцов, состоящей из образцов ДНК клеточной линии с мутациями гена EGFR, разведенных образцами плазмы крови с ЭДТА в пробирках K2, полученной у здоровых доноров. Образцы с доминантной мутацией каждого класса, определяемой тест-системой, смешивали и разводили с получением одиннадцати образцов и оценивали по 3 раза в с учетом LoD для каждой мутации (копий/мл), 1,0E+03 копий/мл и 5,0E+04 копий/мл. Кроме того, был исследован один образец с геном дикого типа. Каждый из двенадцати образцов тестировали в двух повторах двумя операторами, используя два разных лота реагентов, в течение 4 дней на двух анализаторах **cobas**® z 480 (N = 32 на один образец). Тест-система **cobas** EGFR характеризуется частотой правильных результатов на уровне 99,2 % (381/384).

В Табл. 27 приведены средние значения SQI и CO для SQI из исследования воспроизводимости. Все 32 повтора для образца с геном дикого типа показали результат «No Mutation Detected» (Ни одной мутации не обнаружено).

Табл. 27 Средние значения SQI и CO для SQI из исследования воспроизводимости

Экзон гена EGFR	Мутация гена EGFR	Последовательность нуклеиновых кислот мишени	Концентрация (копий/мл)	Среднее значение SQI	CO для SQI (n = 32)
18	G719A	2156G>C	3,00E+02	4,53	0,41
			1,00E+03	6,86	0,38
			5,00E+04	11,81	0,67
19	Ex19Del	2235_2249del15	7,50E+01	13,42	0,46
			1,00E+03	16,85	0,42
			5,00E+04	22,31	0,55
20	S768I	2303G>T	6,00E+01	5,99	0,45
			1,00E+03	8,49	0,43
			5,00E+04	14,13	0,43
20	T790M	2369C>T	7,50E+01	9,00	1,03
			1,00E+03	13,28	0,43
			5,00E+04	19,52	0,57
20	Ex20Ins	2307_2308ins9GCCAGCGTG	2,40E+02	4,92	0,43
			1,00E+03	6,77	0,40
			5,00E+04	12,61	0,60
21	L858R	2573T>G	1,20E+02	9,81	0,47
			1,00E+03	12,91	0,28
			5,00E+04	17,21	0,81
21	L861Q	2582T>A	4,50E+01	3,58	0,73
			1,00E+03	7,91	0,45
			5,00E+04	10,06	0,60
Ген EGFR исходного немутантного типа			0	NMD	NMD

NMD = Ни одной мутации не обнаружено

Оценка клинических показателей

Клиническая воспроизводимость при использовании образцов плазмы крови с ЭДТА в пробирках К2

Для оценки воспроизводимости результатов, полученных с использованием тест-системы **cobas** EGFR, было проведено исследование, в котором сравнивались результаты, полученные в 3 лабораториях (в 2 внешних и 1 внутренней лаборатории, по 2 оператора в каждой лаборатории) с задействованием 3 лотов реагентов на протяжении 3 непоследовательных дней. В качестве образцов для проведения исследования использовали панель с девятью образцами ДНК, экстрагированной из образцов ДНК клеточной линии, разведенных образцами плазмы крови пациентов с НМРЛ. В четырех полученных образцах были обнаружены мутации, включая одну мутацию G719X в экзоне 18, одну делецию в экзоне 19, две мутации T790M в экзоне 20, одну вставку в экзоне 20, одну мутацию L858R в экзоне 21 и одну мутацию L861Q в экзоне 21, как обобщено в Табл. 28. Каждый полученный образец был приготовлен на двух уровнях: приблизительно 100 копий/мл и 300 копий/мл. Эти полученные образцы были включены в панель из восьми отдельных образцов совместно с контролем (образец с геном дикого типа) с получением панели из девяти образцов.

Табл. 28 Комбинации мутаций в полученных образцах

Комбинация 1 из ДНК клеточной линии	Комбинация 2 из ДНК клеточной линии	Комбинация 3 из ДНК клеточной линии	Комбинация 4 из ДНК клеточной линии
Делеция в экзоне 19	L858R	S768I	L861Q
T790M	T790M	G719A	Вставка в экзоне 20

В общей сложности было проведено 37 постановок: в 36 постановках были получены валидные результаты и в одной постановке — невалидные результаты. Было протестировано в общей сложности 648 панелей (или 1224 образцов с мутациями), и для 646 панелей (или 1220 образцов мутаций) были получены валидные результаты. В 72 валидных тестах образца панели с геном дикого типа не было получено результата «Mutation Detected» (Мутация обнаружена), что указывало на 100 % согласованность. Согласованность для образцов панели с геном мутированного типа различалась: для восьми образцов согласованность составляла 100 %, для пяти — > 97 %, а для одного образца с мутацией G719X согласованность была более низкой и составляла около 90 %. Данные по общей согласованности для мутаций приведены в Табл. 29. Для всех образцов панели мутаций коэффициент вариации (КВ) составлял ≤ 12,8 %. Для внутреннего и мутантного контроля общий КВ составил ≤ 1,5 %. КВ % между различными лотами составлял ≤ 0,89 %, а в пределах лота — ≤ 1,47 %.

Табл. 29 Общая оценка согласованности для образцов панели мутаций в исследовании воспроизводимости

Образец панели мутаций	Количество валидных тестов	Согласованность N	% согласованности (95 % ДИ) ^a
Исходный немутантный тип — НП	72	72	100 (95,0, 100,0)
Мутация G719A в экзоне 18 — 100 копий/мл	72	65	90,3 (81,0, 96,0) ^b
Делеция в экзоне 19 (2235_2249del15) — 100 копий/мл	72	72	100 (95,0, 100,0)
Вставка в экзоне 20 (2307_2308ins9) — 100 копий/мл	72	72	100 (95,0, 100,0)
Мутация S768I в экзоне 20 — 100 копий/мл	72	72	100 (95,0, 100,0)
Мутация T790M в экзоне 20 — 100 копий/мл	143	139	97,2 (93,0, 99,2)
Мутация L858R в экзоне 21 — 100 копий/мл	71	70	98,6 (92,4, 100,0)
Мутация L861Q в экзоне 21 — 100 копий/мл	72	72	100 (95,0, 100,0)
Мутация G719A в экзоне 18 — 300 копий/мл	71	70	98,6 (92,4, 100,0)
Делеция в экзоне 19 (2235_2249del15) — 300 копий/мл	72	72	100 (95,0, 100,0)
Вставка в экзоне 20 (2307_2308ins9) — 300 копий/мл	72	72	100 (95,0, 100,0)
Мутация S768I в экзоне 20 — 300 копий/мл	71	71	100 (94,9, 100,0)
Мутация T790M в экзоне 20 — 300 копий/мл	144	142	98,6 (95,1, 99,8)
Мутация L858R в экзоне 21 — 300 копий/мл	72	71	98,6 (92,5, 100,0)
Мутация L861Q в экзоне 21 — 300 копий/мл	72	72	100 (95,0, 100,0)

^a 95 % ДИ = 95 % доверительный интервал при точном биномиальном распределении.

^b Более низкая согласованность для этого образца была в первую очередь связана с многочисленными неудачными попытками (в совокупности n = 6/24 повторов), в основном имевшим место в одном из трех центров.

Примечание. Результаты считали удовлетворительными по согласованности, если для образца панели, содержащего мутантный ген, были получены валидные результаты «Mutation Detected» (Мутация обнаружена), или если для образца с геном дикого типа были получены валидные результаты «No Mutation Detected» (Ни одной мутации не обнаружено).

Примечание. Образцы, используемые для этого исследования, содержали ДНК клеточной линии, подвергнутую механической фрагментации до среднего размера 220 п.н., и фоновую ДНК дикого типа с концентрацией примерно 12 000 копий/мл.

Клиническая воспроизводимость при использовании образцов плазмы крови в пробирках Roche cfDNA

Было проведено исследование с целью оценки воспроизводимости тест-системы **cobas** EGFR в 3 исследовательских центрах (в 2 внешних и 1 внутреннем, по 2 оператора в каждой лаборатории) на одном лоте реагентов и в течение 3 непоследовательных дней тестирования на трех панелях из девяти образцов, состоящих из ДНК клеточной линии, разведенной тремя разными пулами плазмы крови, полученной у здоровых доноров. Образцы каждого пула были собраны пробирки Roche cfDNA отдельного лота. Две из панелей образцов плазмы были исследованы в каждой лаборатории. В четырех полученных образцах были обнаружены мутации, включая одну мутацию G719X в экзоне 18, одну делецию в экзоне 19, одну мутацию T790M в экзоне 20, одну вставку в экзоне 20, одну мутацию L858R в экзоне 21 и одну мутацию L861Q в экзоне 21, как обобщено в Табл. 30. Каждый полученный образец был приготовлен на двух уровнях: приблизительно 100 копий/мл и 300 копий/мл. Эти полученные образцы были включены в панель из восьми отдельных образцов совместно с контролем (образец с геном дикого типа) с получением панели из девяти образцов.

Табл. 30 Комбинации мутаций в полученных образцах

Комбинация 1 из ДНК клеточной линии	Комбинация 2 из ДНК клеточной линии	Комбинация 3 из ДНК клеточной линии	Комбинация 4 из ДНК клеточной линии
Делеция в экзоне 19	S768I	T790M	L858R
Вставка в экзоне 20	G719A	L861Q	Нет

В общей сложности было проведено 36 постановок, и все они были валидными. Было протестировано в общей сложности 648 панелей, и для 646 панелей (или 1220 образцов мутаций) были получены валидные результаты. В 72 валидных тестах образца панели с геном дикого типа был получен один результат «Mutation Detected» (Мутация обнаружена), что указывало на 98,6 % согласованность. Согласованность для образцов панели с геном мутированного типа различалась: для тринадцати образцов согласованность составляла 100 % и для одного — > 98 %. Данные по общей согласованности для мутаций приведены в Табл. 31. Для всех образцов панели мутаций коэффициент вариации (КВ) составлял $\leq 13,7$ %. Для внутреннего и мутантного контроля общий КВ составил $\leq 1,3$ %.

Табл. 31 Общая оценка согласованности для образцов панели мутаций в исследовании воспроизводимости

Образец панели мутаций	Количество валидных тестов	Согласованность N	% согласованности (95 % ДИ) ^a
Исходный немутантный тип — НП	72	71	98,6 (92,5, 100,0)
Мутация G719A в экзоне 18 — 100 копий/мл	72	71	98,6 (92,5, 100,0)
Делеция в экзоне 19 (2235_2249del15) — 100 копий/мл	72	72	100 (95,0, 100,0)
Вставка в экзоне 20 (2307_2308ins9) — 100 копий/мл	72	72	100 (95,0, 100,0)
Мутация S768I в экзоне 20 — 100 копий/мл	72	72	100 (95,0, 100,0)
Мутация T790M в экзоне 20 — 100 копий/мл	72	72	100 (95,0, 100,0)
Мутация L858R в экзоне 21 — 100 копий/мл	72	72	100 (95,0, 100,0)
Мутация L861Q в экзоне 21 — 100 копий/мл	72	72	100 (95,0, 100,0)
Мутация G719A в экзоне 18 — 300 копий/мл	72	72	100 (95,0, 100,0)
Делеция в экзоне 19 (2235_2249del15) — 300 копий/мл	71	71	100 (94,9, 100,0)
Вставка в экзоне 20 (2307_2308ins9) — 300 копий/мл	71	71	100 (94,9, 100,0)
Мутация S768I в экзоне 20 — 300 копий/мл	72	72	100 (95,0, 100,0)
Мутация T790M в экзоне 20 — 300 копий/мл	71	71	100 (94,9, 100,0)
Мутация L858R в экзоне 21 — 300 копий/мл	72	72	100 (95,0, 100,0)
Мутация L861Q в экзоне 21 — 300 копий/мл	71	71	100 (94,9, 100,0)

^a 95 % ДИ = 95 % доверительный интервал при точном биномиальном распределении.

Примечание. Результаты считали удовлетворительными по согласованности, если для образца панели, содержащего мутантный ген, были получены валидные результаты «Mutation Detected» (Мутация обнаружена), или если для образца с геном дикого типа были получены валидные результаты «No Mutation Detected» (Ни одной мутации не обнаружено).

Предел обнаружения (LoD) для образцов плазмы пациентов с НМРЛ

Было проведено исследование с целью подтверждения значения LoD в образцах плазмы из крови в пробирках К2 ЭДТА, полученной у пациентов с НМРЛ, для трех делеций в экзоне 19, одной мутации L858R и одной мутации T790M, используя cobas EGFR в трех исследовательских центрах (два внешних и одном внутреннем, по два оператора в каждой лаборатории), на трех лотах реагентов и в течение двух непоследовательных дней тестирования на панели из 11 образцов плазмы от пациентов с НМРЛ (по пять мутаций в каждой с двумя уровнями: $1 \times \text{LoD}$ и $2 \times \text{LoD}$; плюс дикого типа). В общей сложности было проведено 12 постановок (2 повтора в каждой постановке) и все постановки были валидными. В общей сложности было проведено 264 теста на 11 образцах панели, из которых 262 (99,2 %) тестов были валидными. В 23 валидных тестах образца панели с геном дикого типа не было получено результата «Mutation Detected» (Мутация обнаружена), что указывало на 100 % согласованность. Процент согласованности для «Мутация T790M в экзоне 20 — $1 \times \text{LoD}$ » составил 95,8 %, и 100 % для всех других образцов мутантной панели. Результаты оценки согласованности по образцам панели приведены в Табл. 32. Для всех образцов панели мутаций коэффициент вариации (КВ) составлял < 7,0 %.

Табл. 32 Результаты оценки согласованности по образцам панели

Образец панели	Количество валидных тестов	Согласованность N	% согласованности (95 % ДИ) ^a
Исходный немутантный тип — НП	23	23	100 (85,2, 100,0)
Делеция 1 в экзоне 19 — $1 \times \text{LoD}$	24	24	100 (85,8, 100,0)
Делеция 1 в экзоне 19 — $2 \times \text{LoD}$	24	24	100 (85,8, 100,0)
Делеция 2 в экзоне 19 — $1 \times \text{LoD}$	23	23	100 (85,2, 100,0)
Делеция 2 в экзоне 19 — $2 \times \text{LoD}$	24	24	100 (85,8, 100,0)
Делеция 3 в экзоне 19 — $1 \times \text{LoD}$	24	24	100 (85,8, 100,0)
Делеция 3 в экзоне 19 — $2 \times \text{LoD}$	24	24	100 (85,8, 100,0)
Мутация T790M в экзоне 20 — $1 \times \text{LoD}$	24	23	95,8 (78,9, 99,9)
Мутация T790M в экзоне 20 — $2 \times \text{LoD}$	24	24	100 (85,8, 100,0)
Мутация L858R в экзоне 21 — $1 \times \text{LoD}$	24	24	100 (85,8, 100,0)
Мутация L858R в экзоне 21 — $2 \times \text{LoD}$	24	24	100 (85,8, 100,0)

^a 95 % ДИ = 95 % доверительный интервал при точном биномиальном распределении.

Примечание. Результаты считали удовлетворительными по согласованности, если для образца панели, содержащего мутантный ген, были получены валидные результаты «Mutation Detected» (Мутация обнаружена), или если для образца с геном дикого типа были получены валидные результаты «No Mutation Detected» (Ни одной мутации не обнаружено).

Примечание. Клинические образцы, использовавшиеся в этом исследовании, имели фоновую ДНК дикого типа с концентрацией примерно 24 000 копий/мл.

Корреляция результатов, полученных при использовании образцов плазмы крови с ЭДТА в пробирках Roche cfDNA и в пробирках K2

Функциональные характеристики тест-системы **cobas** EGFR с использованием образцов плазмы крови с ЭДТА в пробирках K2 и в пробирках Roche cfDNA сравнивали путем исследования панели образцов, которая включала парные пробы плазмы из крови, взятой у 34 пациентов с НМРЛ, имеющих ген EGFR дикого типа, 17 пациентов с НМРЛ с наличием мутаций гена EGFR и 20 здоровых доноров. Образцы, взятые у здоровых доноров, использовались для составления суррогатных образцов, состоящих из проб ДНК, подвергнутых механической фрагментации, содержащих доминантные мутации, определяемых тест-системой **cobas** EGFR, к которым добавляли цельную кровь из пробирок K2 ЭДТА и пробирок Roche cfDNA. Количество введенной в суррогатные образцы добавки для образцов ДНК, подвергнутых механической фрагментации, составляло приблизительно $1,5 \times \text{LoD}$ для каждой мутации, как определено для плазмы крови с ЭДТА в пробирках K2 (Табл. 24). Мутационный статус был подтвержден для каждого пациента с НМРЛ методом секвенирования нового поколения. Каждый образец тестировали на одном лоте реагентов для тест-системы **cobas** EGFR. Для всех образцов были получены валидные результаты, и результаты сравнения показаны в Табл. 33.

Табл. 33 Анализ согласованности результатов анализа с использованием образцов плазме крови с ЭДТА в пробирках K2 и в пробирках Roche cfDNA

		Пробирка K2 ЭДТА		Всего		
		MD	NMD			
Пробирка Roche Cell-Free DNA	MD	37	0	37	Согласованность положительных результатов (%): 95 % ДИ	
	NMD	0	34	34	Согласованность отрицательных результатов (%): 95 % ДИ	
	Всего	37	34	71	Общая согласованность результатов (%): 95 % ДИ	
					100 %	90,5–100 %
					100 %	89,7–100 %
					100 %	94,5–100 %

Условные обозначения: MD = Mutation Detected (Мутация обнаружена) и NMD = No Mutation Detected (Ни одной мутации не обнаружено)

Согласованность для парных образцов плазмы крови с ЭДТА из пробирок K2 и из пробирок Roche Cell-Free DNA составляла 100 %. Противоречивых результатов не наблюдалось.

В образцах плазмы крови, полученных в исследовании, с использованием тест-системы **cobas** EGFR были обнаружены мутации в экзонах 18, 19, 20 и 21 гена EGFR, приведенные в Табл. 34. Если не указано иное, мутации обнаруживались в образцах пациентов с НМРЛ.

Табл. 34 Мутации при оценке корреляции между образцами плазмы крови с ЭДТА в пробирках Roche cfDNA и в пробирках K2

Экзон	Последовательность мутации	Изменение АК	Идентификатор COSMIC ¹⁴
18	2156G>C*	G719A	6239
	2155G>A§	G719S	6252
19	2235_2249del15 ⁺	E746_A750delELREA	6223
	2236_2250del15§	E746_A750delELREA	6225
	2219_2236dup TTCCCGTCGCTATCAAGG§	K745_E746insVPVAIK	6963938
	2237_2248del12§	E746_E749delELRE	Не выявлено
	2237_2251del15§	E746_T751>A	12678
	2239_2240TT>CC§	L747P	24267
	2251A>C§	T751P	Не выявлено
20	2369C>T ⁺	T790M	6240
	2303G>T ⁺	S768I	6241
	2307_2308insGCCAGCGTG*	V769_D770insASV	12376
21	2573T>G ⁺	L858R	6224
	2582T>A*	L861Q	6213

* Только в суррогатном образце

⁺ Только в суррогатном образце и в образце пациентов с НМРЛ

§ Только в образце пациентов с НМРЛ

Корреляция результатов с методом контроля при использовании образцов плазмы крови, полученных в исследованиях III фазы (когорты ASPIRATION)

Аналитическую точность тест-системы **cobas** EGFR при обнаружении делеции в экзоне 19 и мутации L858R оценивали путем сравнения с валидированным методом секвенирования следующего поколения (NGS) с использованием образцов плазмы крови с ЭДТА в пробирках K2, полученных у пациентов с распространенным НМРЛ в одном или нескольких из следующих исследований (когорты ASPIRATION): клинические исследования G027821 (MetMab) и G027761 (MetLung) компании Genentech, а также клиническое исследование ML25637 (ASPIRATION) компании Roche.

В анализ согласованности в отношении мутаций делеции в экзоне 19 и мутации L858R гена EGFR было включено сто двадцать восемь образцов плазмы объемом 2 мл с валидными результатами для парных образцов, как для тест-системы **cobas** EGFR для образцов плазмы крови, так и для метода NGS для образцов плазмы крови. Методом NGS в общей сложности для 32 образцов был получен результат MD и для 95 образцов — результат NMD. ПСП между результатами, полученными при анализе с использованием тест-системы **cobas** EGFR для образцов плазмы крови, и результатами секвенирования нового поколения для образцов плазмы крови составлял 87,5 % (95 % ДИ: 71,9 %, 95,0 %); ПСН для тест-системы **cobas** EGFR и для метода NGS составил 96,8 % (95 % ДИ: 91,1 %, 98,9 %), как приведено в Табл. 35.

Табл. 35 Сравнение эффективности обнаружения делеций в экзоне 19 и мутации L858R в гене EGFR с использованием тест-системы cobas EGFR для образцов плазмы крови и методом секвенирования нового поколения

Показатели согласованности	Процент согласованности (N)	95 % ДИ
Процент согласованности положительных результатов (ПСП)	87,5 % (28/32)	71,9 %, 95,0 %
Процент согласованности отрицательных результатов (ПЧН)	96,8 % (92/95)	91,1 %, 98,9 %

Корреляция между образцами плазмы и ткани при использовании тест-системы cobas EGFR для обнаружения мутаций делеции в экзоне 19 и мутации L858R в гене EGFR при использовании образцов исследования III фазы ENSURE

Исследование ENSURE (YO25121) являлось многоцентровым, открытым, рандомизированным исследованием III фазы с целью оценки безопасности и эффективности препарата TARCEVA® (эрлотиниб) в сравнении с гемцитабином/цисплатином в качестве терапии первой линии у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) на IIIB/IV стадии с делецией в экзоне 19 или мутацией L858R в домене тирозинкиназы гена рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). В общей сложности 647 пациентов прошли скрининг, у 601 пациента были получены валидные результаты исследования тканей на наличие делеции в экзоне 19 и мутации L858R в гене EGFR с использованием тест-системы **cobas EGFR**; 217 пациентов были рандомизированы в данном исследовании.

Пятьсот семнадцать пациентов (86,0 %, 517 из 601) имели парные образцы плазмы с ЭДТА в пробирках K2 и образцы ткани, и 441 пациент имел объем образца плазмы крови $\geq 2,0$ мл, то есть объем образца, для которого валидирована тест-система **cobas EGFR** для образцов плазмы крови.

Корреляцию результатов исследования образцов плазмы крови и тканей с использованием тест-системы **cobas EGFR** при обнаружении делеции в экзоне 19 и мутации L858R в гене EGFR оценивали как в отдельности, так и в совокупности. В анализ согласованности в общей сложности был включен 431 парный образец с валидными результатами, полученными при использовании тест-системы **cobas EGFR** как для образцов тканей, так и для образцов плазмы крови. Процент согласованности положительных результатов (ПСП) между образцами плазмы крови и тканей составил 76,7 % (95 % ДИ: 70,5–81,9 %), процент согласованности отрицательных результатов (ПЧН) составил 98,2 % (95 % ДИ: 95,4–99,3 %) при обнаружении делеции в экзоне 19 и мутации L858R в гене EGFR в совокупности, как приведено в Табл. 36. ПСП, ПЧН и ОПС при обнаружении делеции в экзоне 19 и мутации L858R в отдельности также представлены в Табл. 36.

Табл. 36 Согласованность между результатами исследования образцов плазмы крови и тканей с использованием тест-системы cobas EGFR при обнаружении делеции в экзоне 19 и мутации L858R

Мутация	Показатели согласованности	Процент согласованности (N)	95 % ДИ
В совокупности	Процент согласованности положительных результатов (ПСП)	76,7 % (161/210)	70,5 %, 81,9 %
	Процент согласованности отрицательных результатов (ПСН)	98,2 % (217/221)	95,4 %, 99,3 %
	Общий процент согласованности (ОПС)	87,7 % (378/431)	84,2 %, 90,5 %
Делеция в экзоне 19	Процент согласованности положительных результатов (ПСП)	80,8 % (97/120)	72,9 %, 86,9 %
	Процент согласованности отрицательных результатов (ПСН)	98,7 % (307/311)	96,7 %, 99,5 %
	Общий процент согласованности (ОПС)	93,7 % (404/431)	91,0 %, 95,7 %
L858R	Процент согласованности положительных результатов (ПСП)	67,8 % (61/90)	57,6 %, 76,5 %
	Процент согласованности отрицательных результатов (ПСН)	99,1 % (338/341)	97,4 %, 99,7 %
	Общий процент согласованности (ОПС)	92,6 % (399/431)	89,7 %, 94,7 %

Примечание. ПСП и ПСН рассчитаны с использованием ткани в качестве контроля.

Положительное предиктивное значение (ППЗ) и отрицательное предиктивное значение (ОПЗ) для обнаружения делеции в экзоне 19 и мутации L858R в совокупности были также рассчитаны при помощи метода многократных генераций исходной выборки исходя из различной распространенности в тканях в разных популяциях (Табл. 37). Как и ожидалось, ППЗ возрастает, а ОПЗ уменьшается при увеличении распространенности мутации гена EGFR. Для европеоидной популяции пациентов, что предполагает распространенность мутации гена EGFR в тканях на уровне 10–15 %, диапазон значений ППЗ составляет 82,8–88,6 %, тогда как диапазон значений ОПЗ составляет 96,0–97,4 %. Диапазон значений ППЗ составляет 94,8–97,8 %, тогда как диапазон значений ОПЗ составляет 80,8–90,9 %, если оценивать их распространенность в азиатской популяции, приняв распространенность мутации гена EGFR в тканях, составляющую 30–50 %.

Табл. 37 Оценка предиктивных значений для тест-системы cobas EGFR для образцов тканей и тест-системы cobas EGFR для образцов плазмы крови (объем образцов плазмы крови — $\geq 2,0$ мл) в зависимости от различной распространенности мутаций гена EGFR в тканях

Предполагаемая распространенность мутаций гена EGFR в образцах тканей	Положительное предиктивное значение (ППЗ)	Отрицательное предиктивное значение (ОПЗ)
10 %	82,8 % (71,3 %, 93,7 %)	97,4 % (96,2 %, 98,7 %)
15 %	88,6 % (79,7 %, 96,9 %)	96,0 % (94,3 %, 97,6 %)
20 %	91,6 % (85,0 %, 97,8 %)	94,4 % (92,3 %, 96,3 %)
30 %	94,8 % (90,0 %, 98,6 %)	90,9 % (88,4 %, 93,4 %)
40 %	96,8 % (93,0 %, 99,4 %)	86,4 % (83,3 %, 89,4 %)
50 %	97,8 % (95,0 %, 100,0 %)	80,8 % (77,4 %, 84,8 %)

Примечание. Значения 95 % ДИ были рассчитаны методом многократных генераций исходной выборки.

Примечание. Результаты для 79 образцов, имеющих объем $< 2,0$ мл, считались невалидными в рамках данного анализа.

Примечание. ППЗ и ОПЗ рассчитаны с использованием образцов плазмы крови в качестве контроля.

Корреляция результатов с эталонным методом при использовании образцов, полученных в исследовании II фазы AURA2

Клиническую эффективность тест-системы **cobas** EGFR оценивали путем сравнения результатов с результатами валидированной методики секвенирования нового поколения. Для оценки использовали образцы плазмы крови с ЭДТА, собранные в пробирки К2, полученные у пациентов с распространенным НМРЛ, которые прошли скрининг для участия в исследовании II фазы AURA2 для изучения препарата TAGRISSO®.²³

Из 383 пациентов, подходящих для участия в исследовании, у 344 пациентов были получены образцы плазмы, которые были проанализированы с использованием тест-системы **cobas** EGFR. Было получено 342 валидных результата и два невалидных результата. Из 344 образцов плазмы, исследованных с использованием тест-системы **cobas** EGFR, 322 образца (93,6 %) были также исследованы методом секвенирования нового поколения, а 22 образца не имели достаточного объема оставшейся плазмы для исследования методом секвенирования нового поколения.

Оценивалась аналитическая точность тест-системы **cobas** EGFR в сравнении с эталонным методом секвенирования нового поколения при обнаружении мутации T790M в образцах плазмы крови. Суммарно в данный анализ согласованности было включено 320 образцов с парными валидными результатами, полученными с использованием тест-системы **cobas** EGFR и методом секвенирования нового поколения. Процент согласованности положительных результатов (ПСП) между результатами, полученными при анализе с использованием тест-системы **cobas** EGFR, и результатами секвенирования нового поколения, составлял 91,5 % (95 % ДИ: 85,7–95,1 %), процент согласованности отрицательных результатов (ПСН) составил 91,1 % (95 % ДИ: 86,0–94,4 %) при обнаружении мутации T790M, как приведено в Табл. 38.

Табл. 38 Сравнение эффективности обнаружения мутации T790M в гене EGFR с использованием тест-системы cobas EGFR для образцов плазмы крови и методом секвенирования нового поколения

Показатели согласованности	Процент согласованности (N)	95 % ДИ
Процент согласованности положительных результатов (ПСП)	91,5 % (129/141)	85,7 %, 95,1 %
Процент согласованности отрицательных результатов (ПСН)	91,1 % (163/179)	86,0 %, 94,4 %

В образцах плазмы крови с ЭДТА в пробирках К2, полученных в исследовании с использованием тест-системы **cobas** EGFR в исследовании AURA2, были обнаружены мутации в экзонах 18, 19, 20 и 21 гена EGFR, приведенные в Табл. 39.

Табл. 39 Мутации, обнаруженные с использованием тест-системы cobas EGFR в выборке участников исследования AURA2

Экзон	Последовательность мутации	Изменение АК	Идентификатор COSMIC ¹⁴
-------	----------------------------	--------------	------------------------------------

18	2156G>C	G719A	6239
	2155G>A	G719S	6252
	2155G>T	G719C	6253
19	2235_2249del15	E746_A750delELREA	6223
	2236_2250del15	E746_A750delELREA	6225
	2236_2256>ATC	E746_S752>I	133190
	2237_2251del15	E746_T751>A	12678
	2237_2255>T	E746_S752>V	12384
	2237_2258>TATC	E746_P753>VS	Не выявлено
	2238_2248>GC	L747_A750>P	12422
	2239_2247delTTAAGAGAA	L747_E749delLRE	6218
	2239_2248TTAAGAGAAG>C	L747_A750>P	12382
	2239_2251>C	L747_T751>P	12383
	2239_2256>CAG	L747_S752>Q	Не выявлено
	2239_2256del18	L747_S752delLREATS	6255
	2239_2258>CA	L747_P753>Q	12387
	2239_2264>GCCAA	L747_A755>AN	85891
	2240_2251del12	L747_T751>S	6210
	2240_2254del15	L747_T751delLREAT	12369
	2240_2257del18	L747_P753>S	12370
	2240_2264>CGAGAGA	L747_A755>SRD	Не выявлено
2253_2276del24	S752_I759delSPKANKEI	13556	
20	2369C>T	T790M	6240
	2303G>T	S768I	6241
21	2573T>G	L858R	6224
	2573_2574TG>GT	L858R	12429
	2582T>A	L861Q	6213

Корреляция между результатами исследования образцов плазмы крови и тканей при обнаружении мутации T790M с использованием образцов, полученных в исследовании II фазы AURA2

Клиническое исследование AURA2²³ являлось открытым несравнительным исследованием II фазы с целью оценки безопасности и эффективности препарата TAGRISSO® (осимертиниб) в качестве терапии второй или третьей и последующих линий терапии у пациентов с распространенным НМРЛ, у которых наблюдалось прогрессирование заболевания после предшествующего лечения одобренным ингибитором тирозинкиназы (ИТК) EGFR и у которых была выявлена мутация T790M при исследовании с использованием тест-системы cobas EGFR. В общей сложности 472 пациента прошли скрининг, и было проведено исследование образцов тканей 383 пациентов. У 371 пациента при исследовании на наличие мутации T790M с использованием тест-системы cobas EGFR были получены валидные EGFR результаты. Мутация T790M была выявлена у 233 пациентов, и 210 пациентов из них были рандомизированы в данном исследовании.

Из 383 пациентов, подходящих для участия в исследовании, у 344 пациентов были взяты образцы плазмы крови с ЭДТА в пробирки К2. В анализ в общей сложности были включены 334 парных образца с валидными результатами, полученными при использовании тест-системы **cobas** EGFR как для образцов тканей, так и для образцов плазмы крови. Процент согласованности положительных результатов (ПСП) между образцами плазмы крови и тканей составил 58,7 % (95 % ДИ: 52,2 %, 65,0 %), процент согласованности отрицательных результатов (ПСН) составил 80,2 % (95 % ДИ: 71,8 %, 86,5 %) при обнаружении мутации Т790М. Положительное предиктивное значение (ППЗ) составило 85,6 % (95 % ДИ: 79,2 %, 90,3 %), а отрицательное предиктивное значение (ОПЗ) составило 49,2 % (95 % ДИ: 42,0 %, 56,4 %) при обнаружении мутации Т790М, как показано в Табл. 40.

На значения ППЗ, приведенные в Табл. 40, повлияли 22 образца с отрицательным статусом по наличию мутации Т790М по результатам исследования с использованием тест-системы **cobas** EGFR для образцов тканей и с положительным статусом по наличию мутации Т790М по результатам исследования с использованием тест-системы **cobas** EGFR для образцов плазмы крови. Восемнадцать образцов были подтверждены как Т790М-положительные при исследовании образцов плазмы крови методом секвенирования нового поколения, и один образец не имел достаточного объема для исследования методом секвенирования нового поколения. Только три образца были определены как Т790М-отрицательные при исследовании методом секвенирования нового поколения.

Табл. 40 Согласованность между результатами исследования образцов плазмы крови и тканей с использованием тест-системы **cobas** EGFR при обнаружении мутации Т790М

Мутация	Показатели согласованности	Процент согласованности (N)	95 % ДИ
Т790М	Процент согласованности положительных результатов (ПСП)	58,7 % (131/223)	52,2 %, 65,0 %
	Процент согласованности отрицательных результатов (ПСН)	80,2 % (89/111)	71,8 %, 86,5 %
	Общий процент согласованности (ОПС)	65,9 % (220/334)	60,6 %, 70,8 %
	Положительное предиктивное значение (ППЗ)	85,6 % (131/153)	79,2 %, 90,3 %
	Отрицательное предиктивное значение (ОПЗ)	49,2 % (89/181)	42,0 %, 56,4 %

Примечание. ПСП и ПСН рассчитаны с использованием ткани в качестве контроля.

Примечание. ППЗ и ОПЗ рассчитаны с использованием образцов плазмы крови в качестве контроля.

Согласованность результатов между образцами плазмы и тканей при обнаружении мутации резистентности Т790М оказалась более низкой, чем в случае активирующих мутаций. На ПСП может повлиять гетерогенность ткани: в отличие от активирующих мутаций L858R и делеции в экзоне 19, Т790М может присутствовать в небольшой процентной доле опухолевых клеток, как это обычно наблюдается в случае приобретенной мутации; по этой причине Т790М в cfDNA может присутствовать лишь в очень низкой концентрации в плазме ниже предела обнаружения. На ПСН также может повлиять гетерогенность ткани: поскольку мутация Т790М может не присутствовать во всех опухолевых клетках, тканевой биоптат может быть взят из опухоли, в которой мутация Т790М не присутствует, тогда как другие участки опухоли могут быть Т790М-положительными.⁷

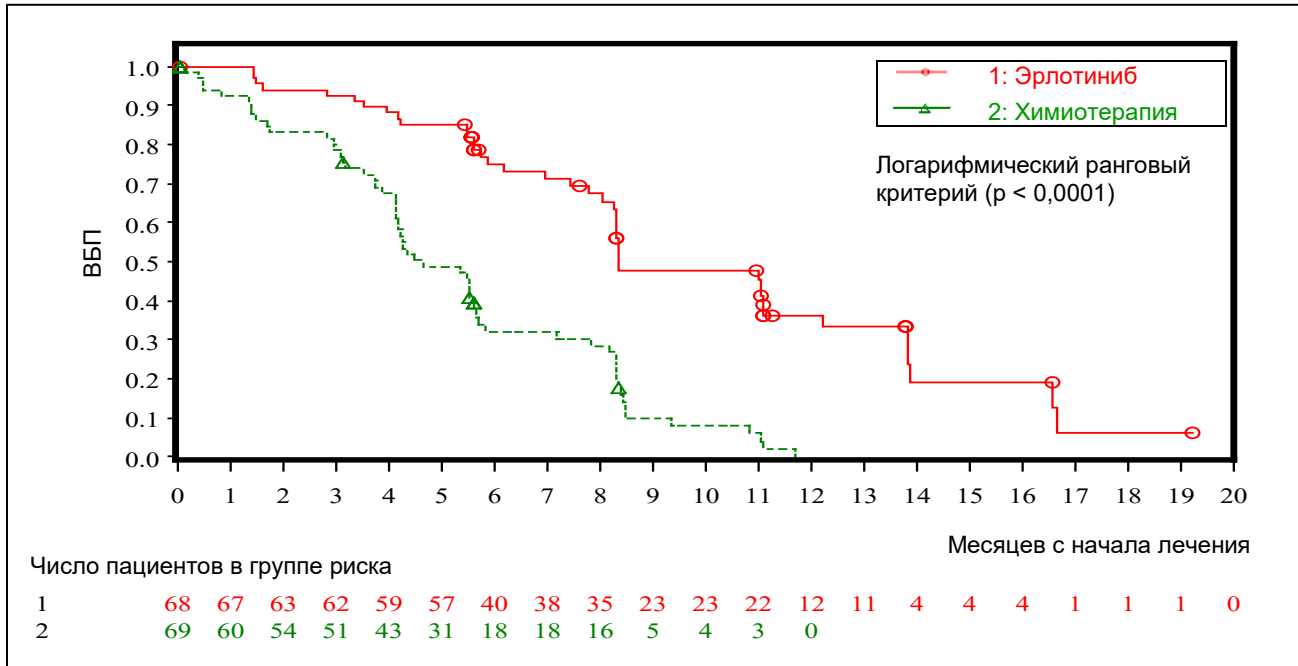
Данные о клинических результатах

Исследование ENSURE

В исследовании ENSURE из 217 пациентов, включенных в исследование (с наличием делеции в экзоне 19 или мутации L858R в образце ткани при исследовании с использованием тест-системы **cobas** EGFR v1), у 214 пациентов (98,6 %) были собраны образцы плазмы крови с ЭДТА в пробирки К2, и у 180 пациентов объем образцов плазмы крови составлял 2,0 мл. Из 180 образцов плазмы объемом 2 мл, исследованных с использованием тест-системы **cobas** EGFR, у 137 пациентов получен результат «Mutation Detected» (Мутация обнаружена) для делеции в экзоне 19 или мутации L858R (68 пациентов из группы эрлотиниба, 69 пациентов из группы химиотерапии), у 42 пациентов получен результат «No Mutation Detected» (Ни одной мутации не обнаружено) [22 пациента из группы препарата TARCEVA®, 20 пациентов из группы химиотерапии] и для одного образца был получен невалидный результат. Кривые ВБП по оценке исследователя, построенные по методу Каплана — Мейера, 07340761001-03RU

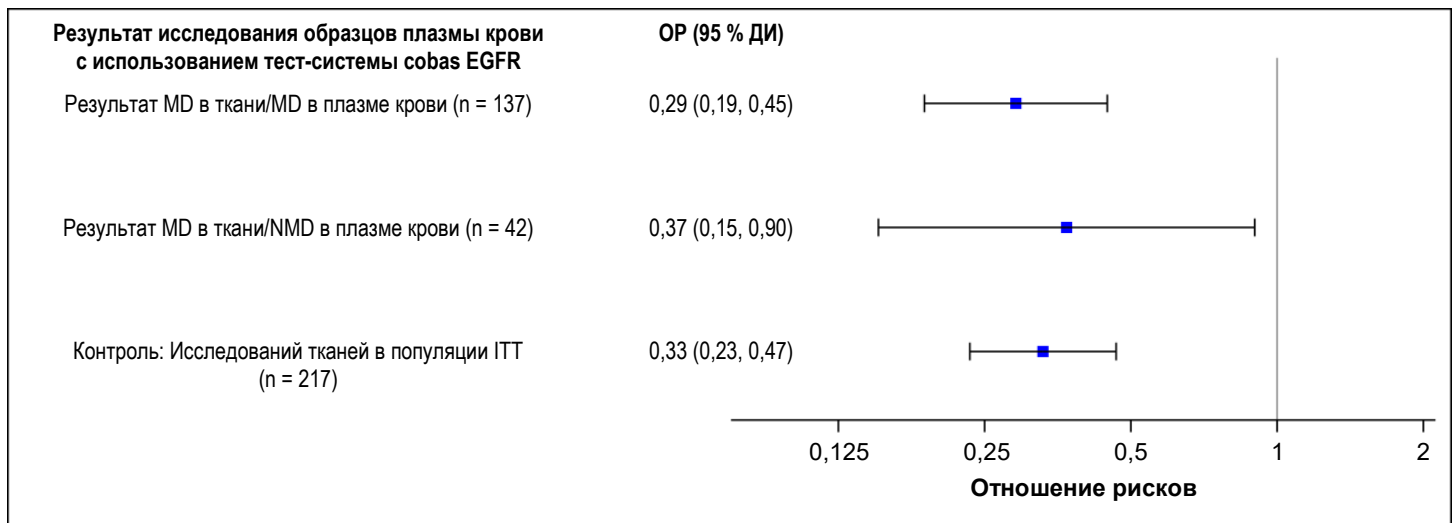
приведены на Рис. 15 для пациентов либо с делецией в экзоне 19, либо с мутацией L858R, обнаруженных в образце плазмы крови. Пациенты в группе препарата TARCEVA® имели более продолжительную ВБП по сравнению с пациентами группы химиотерапии, и обе кривые были заметно разделены на протяжении периода наблюдения (значение $p < 0,001$), что демонстрирует существенную пользу от терапии препаратом TARCEVA® у пациентов с поддающейся обнаружению в плазме крови активирующей мутацией гена EGFR.

Рис. 15 Кривые выживаемости без прогрессирования заболевания (ВБП), построенные по методу Каплана — Мейера, в каждой группе лечения у пациентов с мутацией, выявленной с использованием тест-системы cobas EGFR в образце плазмы крови и в образце тканей (при объеме образцов плазмы крови 2 мл)



Существенная польза от лечения в виде стойкого повышения ВБП наблюдалась у всех пациентов с наличием мутаций в гене EGFR в образцах тканей, у которых были получены образцы плазмы крови объемом 2,0 мл. Эта польза от лечения не зависела от положительного или отрицательного результата исследования образца плазмы крови на наличие мутаций и была сходной с пользой в виде повышения ВБП в общей популяции ИТТ (все рандомизированные пациенты) в исследовании ENSURE (OR = 0,33; 95 % ДИ: 0,23, 0,47) как показано на Рис. 16.

Рис. 16 Кривые типа «форест-плот» для ОР для ВБП по оценке исследователя (при объеме образцов плазмы крови 2 мл)



Примечание. MD = Mutation Detected (Мутация обнаружена) [делеция в экзоне 19 или мутация L858R];
NMD = No Mutation Detected (Ни одной мутации не обнаружено) [делеции в экзоне 19 и мутации L858R]

Исследование AURA2

Анализируемым показателем эффективности являлась частота объективного ответа (ЧОО) по критериям RECIST 1.1 по данным BICR в популяции, подходящей для проведения анализа ответа. ЧОО определяли как количество (в %) пациентов, совершивших по меньшей мере один визит, на котором зарегистрирован полный ответ (ПО) или частичный ответ (ЧО), подтвержденный по меньшей мере через четыре недели (то есть наилучший объективный ответ [НОО] в виде ПО или ЧО).

В популяции с подходящими для анализа данными (ERAS) исследования образцов тканей (T790M-положительные пациенты по результатам исследования тканей с использованием тест-системы **cobas** EGFR, получившие по меньшей мере одну дозу препарата TAGRISSO® и имевшие на исходном уровне измеримое заболевание согласно BICR) 111 пациентов были T790M-положительными по результатам исследования плазмы крови с ЭДТА в пробирках K2 с использованием тест-системы **cobas** EGFR (то есть с T790M-положительным результатом при исследовании как образцов тканей, так и образцов плазмы крови). ЧОО в этой подгруппе составила 64,9 % (72/111, 95 % ДИ: 52,1 %, 70,4 %), что очень близко к ЧОО 64,1 % при исследовании тканей в популяции ERAS.

В полной выборке пациентов для анализа (FAS) образцов ткани (T790M-положительные пациенты по результатам исследования тканей с использованием тест-системы **cobas** EGFR, получившие по меньшей мере одну дозу препарата TAGRISSO®) 117 пациентов были T790M-положительными по результатам исследования образцов плазмы крови с использованием тест-системы **cobas** EGFR. ЧОО у пациентов с T790M-положительным результатом как для ткани, так и для плазмы крови составила 61,5 % (72/117, 95 % ДИ: 55,2 %, 73,7 %), что также очень близко к ЧОО 61 % при исследовании тканей в популяции FAS. Результаты этих анализов представлены в Табл. 41. Включение в исследование AURA2 проводилось на основании положительных результатов исследования ткани. Данные о клинических исходах для пациентов (T790M-положительных по результатам для плазмы крови и T790M-отрицательных по результатам для ткани) в этом исследовании не приведены.

Табл. 41 Частота объективного ответа по результатам исследования плазмы крови у пациентов (T790M-положительных по результатам для ткани), включенных в исследование AURA2

Популяция (T790M-положительный статус по результатам исследования образца ткани)	Результаты исследования образца плазмы крови с использованием тест-системы cobas EGFR	N	Число пациентов с ответом на лечение (ЧОО) ^a n (%)	ЧОО (95 % ДИ)
Полная выборка пациентов для анализа образцов тканей (FAS для образцов тканей)	T790M+ (FAS для образцов плазмы крови)	117	72 (61,5 %)	(55,2 %, 73,7 %)
	T790M-	89	53 (59,6 %)	(51,3 %, 73,0 %)
	Всего (FAS для образцов тканей)	210	128 (61,0 %)	(57,0 %, 70,8 %)
Популяция с подходящими для анализа результатами исследования тканей (ERAS для образцов тканей)	T790M+ (ERAS для образцов плазмы крови)	111	72 (64,9 %)	(52,1 %, 70,4 %)
	T790M-	83	52 (62,7 %)	(48,6 %, 69,8 %)
	Всего (ERAS для образцов тканей)	198	127 (64,1 %)	(54,0 %, 67,6 %)

^a В число пациентов с ответом включены только пациенты с подтвержденным ответом.

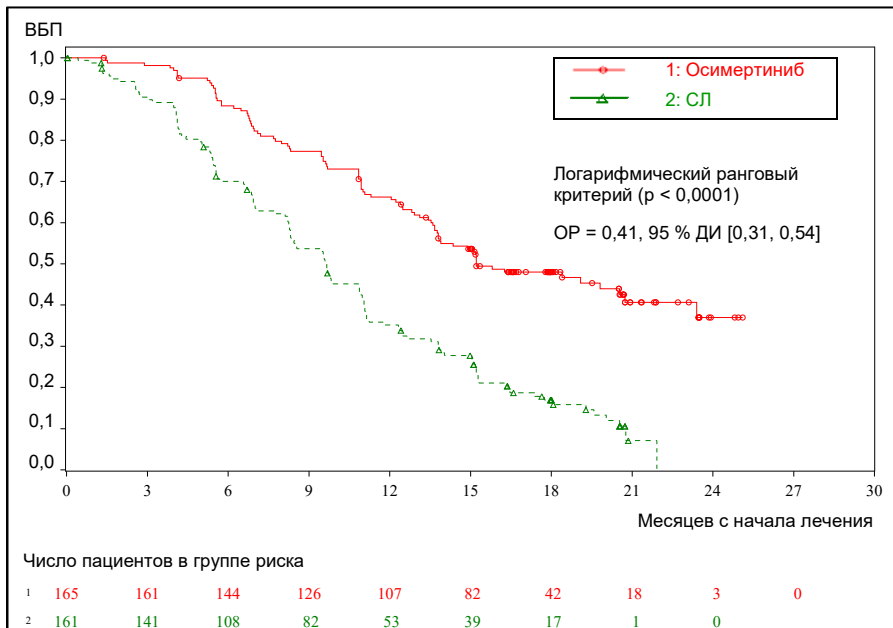
Исследование FLAURA

I. Исследование III фазы с применением препарата TAGRISSO® в качестве терапии первой линии

В общей сложности 994 пациента прошли скрининг для участия в исследовании FLAURA¹⁰. Из них 556 пациентов были рандомизированы в клиническое исследование и 438 пациентов не прошли скрининг. Из 556 пациентов, рандомизированных в исследовании FLAURA, 537 пациентов были подходящими для включения в анализ данных исследования. Из 537 подходящих для анализа в рамках исследования пациентов 276 пациентов были рандомизированы по результатам централизованного исследования тканей с использованием тест-системы cobas EGFR для тканей, из которых 254 пациента имели подходящие для тестирования образцы плазмы с ЭДТА в пробирках K2 со 190 положительными образцами плазмы крови при исследовании с использованием тест-системы cobas EGFR для плазмы крови (pEGFRm+); 261 пациент был рандомизирован по результатам исследования ткани на местном уровне, из которых 242 пациента имели подходящие для тестирования образцы плазмы с 169 положительными для тканей проводимыми образцами плазмы крови с использованием тест-системы cobas EGFR для плазмы крови (136 положительных по наличию мутаций гена EGFR в ткани по результатам исследования с использованием тест-системы cobas для тканей (tEGFRm+), 1 отрицательный результат по наличию мутаций гена EGFR в тканях по результатам исследования с использованием тест-системы cobas (tEGFRm-). Кроме того, у 32 пациентов получен невалидный результат исследования ткани с использованием тест-системы cobas или исследование с использованием тест-системы cobas для тканей не проводилось).

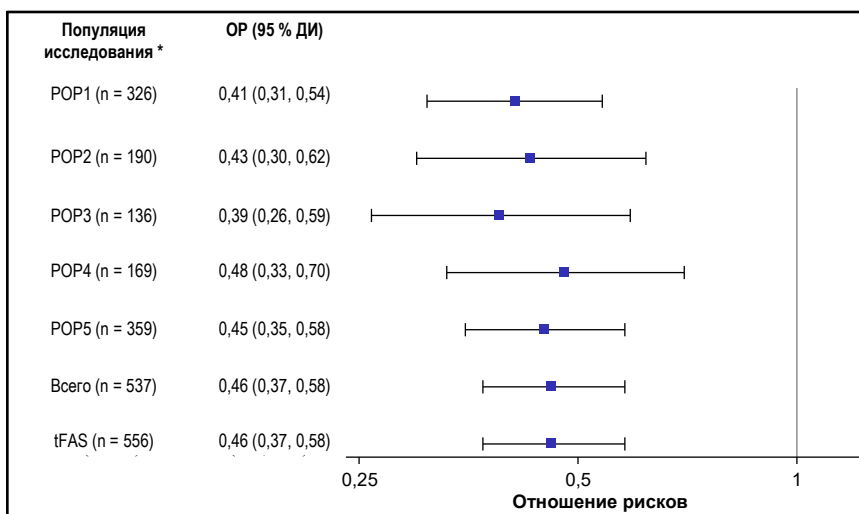
В основной выборке данных исследования плазмы крови (tEGFRm+ и pEGFRm+) с использованием тест-системы cobas EGFR (N = 326, 190 пациентов были рандомизированы по результатам централизованного исследования и 136 — на местном уровне), ОР составило 0,41 (95 % ДИ: 0,31, 0,54), а ОР у пациентов популяции FAS исследования FLAURA (tEGFRm+, N = 556) — 0,46 (95% ДИ: 0,37, 0,58). Таким образом, эффективность препарата в основной выборке данных исследования плазмы крови согласуется с таковой в популяции FAS исследования FLAURA. Кривые, построенные по методу Каплана — Мейера, в основной выборке данных исследования плазмы крови с наличием делеции в экзоне 19 или мутации L858R в образцах плазмы крови, приведены на Рис. 17.

Рис. 17 Кривые ВБП, построенные по методу Каплана — Мейера, в зависимости от лечения в популяции исследования FLAURA в основной выборке данных исследования плазмы крови (пациенты с результатами cobas tEGFRm+ и cobas pEGFRm+, n = 326)



Превосходство препарата TAGRISSO® по сравнению со стандартным лечением (СЛ) было согласующимся во всех подгруппах с положительными результатами исследования плазмы крови с использованием тест-системы **cobas** на наличие tEGFR при включении в клиническое исследование в рамках централизованного исследования и на местном уровне; значения ОР составляли от 0,39 до 0,48 и согласовались со значениями ОР, полученными в популяции FAS исследования FLAURA (ОР = 0,46) как показано на Рис. 18 ниже.

Рис. 18 Кривые типа «форест-плот» для ОР в подгруппах исследования FLAURA, определенных по результатам оценки в централизованном исследовании и на местном уровне с использованием тест-системы cobas EGFR



POP = популяция (подгруппа)

* POP1: все рандомизированные пациенты с положительными результатами исследования с использованием тест-системы **cobas** для тканей и тест-системы **cobas** для плазмы крови.

POP2: пациенты, рандомизированные по результатам исследования ткани с использованием тест-системы **cobas** и с положительными результатами исследования плазмы крови с использованием тест-системы **cobas**.

POP3: пациенты, рандомизированные по результатам проведенного на местном уровне исследования тканей и с положительным результатом исследования тканей и плазмы крови с использованием тест-системы **cobas**.

POP4: пациенты, рандомизированные по результатам проведенного на местном уровне исследования тканей и с положительными результатами исследования плазмы крови с использованием тест-системы **cobas**.

POP5: все рандомизированные пациенты с положительными результатами исследования плазмы крови с использованием тест-системы **cobas**.

Всего: все рандомизированные пациенты, исключая 19 пациентов из Китая.

tFAS: все рандомизированные пациенты (полная выборка пациентов для анализа в исследовании FLAURA).

II. Анализ данных при применении препарата IRESSA® в качестве стандартного лечения

Отдельный анализ был проведен в популяции пациентов из группы стандартного лечения (СЛ), получавших препарат IRESSA® (гефитиниб). Из всех получавших лечение препаратом IRESSA® пациентов, имевших объективный ответ по оценке исследователя в исследовании FLAURA, 105 пациентов имели положительный результат исследования плазмы крови с использованием тест-системы **cobas** для образцов в пробирках К2 ЭДТА. ЧОО у всех пациентов с положительными результатами в плазме крови с использованием тест-системы **cobas** составила 71,4 % (75/105, 95 % ДИ: 62,2 %, 79,2 %, POP4 в Табл. 42).

Из 105 пациентов, имевших положительные результаты исследования плазмы с использованием тест-системы **cobas**, 47 пациентов были рандомизированы в результате исследования тканей на тест-системе **cobas** (основная популяция оценки эффективности для тест-системы **cobas** для образцов плазмы крови) и 58 пациентов были рандомизированы в результате тестирования на местном уровне. В общей сложности 36 пациентов считались, по оценке исследователя, испытываемыми с ответной реакцией в популяции для оценки первичной эффективности по результатам исследования плазмы на тест-системе **cobas** (n = 47), что дало значение ЧОО 76,6 % (95 % ДИ: 62,8 %, 86,4 %, POP1 в Табл. 42).

ЧОО составила 62,2 % (28/45, 95 % ДИ: 47,6 %, 74,9 %) у рандомизированных на местном уровне пациентов, с положительными результатами исследования как ткани на тест-системе **cobas**, так и плазмы на тест-системе **cobas** (POP2 в Табл. 42). ЧОО составила 69,6 % (64/92, 95 % ДИ: 59,5 %, 78,0 %) у всех пациентов, получавших лечение препаратом IRESSA®, с положительными результатами исследования как ткани с использованием тест-системы **cobas**, так и плазмы крови с использованием тест-системы **cobas** (POP3 в Табл. 42). График типа «форест-плот» для ЧОО в этих различных популяциях пациентов показан на Рис. 19. Результаты указывают на то, что эффект лечения препаратом IRESSA®, на основании исследования плазмы крови с использованием тест-системы **cobas**, сохранялся в каждой популяции пациентов и находился в согласии с результатами, о которых сообщалось в первоначальном регистрационном исследовании (IFUM) у пациентов, отобранных для получения препарата IRESSA®.¹³

Табл. 42 ЧОО у участников исследования FLAURA, получавших лечение препаратом IRESSA® и имевших положительный результат исследования плазмы крови с использованием тест-системы cobas

Объективный ответ	Пациенты с положительным результатом в плазме крови (pEGFR+) в группе стандартного лечения, получавшие лечение препаратом IRESSA®				Всего
	Пациенты, со статусом pEGFR+, рандомизированные по результатам централизованного исследования (cobas tEGFR+)	Пациенты со статусом pEGFR+, рандомизированные по результатам исследования на местном уровне (местный tEGFR+)			
		cobas tEGFR+	cobas tEGFR-	cobas tEGFR Невалидный результат/ анализ не проводился	
Число пациентов	47	45	1	12	105
Ответ	36	28	1	10	75
Отсутствие ответа	11	17	0	2	30
ЧОО (%; 95 % ДИ)	POP1 = 76,6 % (36/47: 62,8 %, 86,4 %)	POP2 = 62,2 % (28/45: 47,6 %, 74,9 %)	-	-	POP4 = 71,4 % (75/105: 62,2 %, 79,2 %)
	POP3 = 69,6 % (64/92: 59,5 %, 78,0 %)		-	-	-

Примечание: tEGFR = тканевый EGFR; pEGFR = плазматический EGFR; ДИ = доверительный интервал.

POP = популяция (подгруппа)

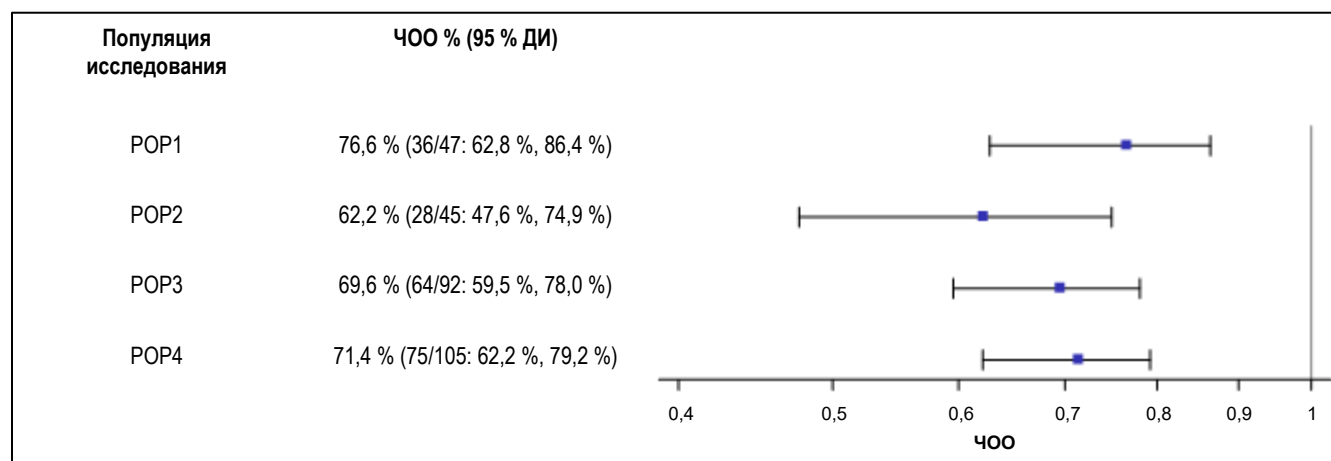
POP1: ЧОО у пациентов со статусом **cobas** pEGFR+, рандомизированных по результатам исследования тканей с использованием тест-системы **cobas** (основная популяция оценки эффективности для исследования плазмы крови с использованием тест-системы **cobas**).

POP2: ЧОО у пациентов с положительным результатом для образцов плазмы крови и тканей, полученных с использованием тест-системы **cobas**, рандомизированных на основании исследования на местном уровне.

POP3: ЧОО у всех пациентов с положительными результатами для образцов плазмы крови и тканей при исследовании с использованием тест-системы **cobas**.

POP4: ЧОО у всех пациентов с положительными результатами для образцов плазмы крови при исследовании с использованием тест-системы **cobas**.

Рис. 19 Кривые типа «форест-плот» для ЧОО на основании результатов исследования плазмы крови с использованием тест-системы cobas EGFR в различных популяциях



POP = популяция (подгруппа)

POP1: ЧОО у пациентов со статусом **cobas** pEGFR+, рандомизированных по результатам исследования тканей с использованием тест-системы **cobas** (основная популяция оценки эффективности для исследования плазмы крови с использованием тест-системы **cobas**).

POP2: ЧОО у пациентов с положительным результатом для образцов плазмы крови и тканей, полученных с использованием тест-системы **cobas**, рандомизированных на основании исследования на местном уровне.

POP3: ЧОО у всех пациентов с положительными результатами для образцов плазмы крови и тканей при исследовании с использованием тест-системы **cobas**.

POP4: ЧОО у всех пациентов с положительными результатами для образцов плазмы крови при исследовании с использованием тест-системы **cobas**.

Сигнальные сообщения для результатов

Объяснение сигнальных сообщений для результатов

Причина появления сигнального сообщения указана в коде этого сообщения, а значения кодов приведены в Табл. 43.

Табл. 43 Причины появления сигнальных сообщений

Код сигнального сообщения начинается с	Причина появления	Пример
M ^a	Совокупность причин или другие причины	M6
R	Интерпретация результата	R20
Z ^a	Анализатор	Z1

^a Подробные сведения приведены в руководстве пользователя системы cobas® 4800 или справочнике для поддержки пользователя системы cobas® 4800.

В Табл. 44 приведены все сигнальные сообщения для результатов системы, которые имеют отношение к пользователю системы.

Табл. 44 Перечень сигнальных сообщений, имеющих отношение к интерпретации результатов

Код сигнального сообщения	Критичность	Описание	Рекомендуемое действие
R797, R807, R817, R827, R837, R842, R847	Ошибка	Мишень не обнаружена	Повторите анализ образца. См. раздел «Процедура тестирования». Эти коды сигнальных сообщений указывают на получение отрицательного результата для образца (т.е. в одну или несколько лунок, возможно, не были внесены образцы).
R700, R718, R724, R736, R742, R748, R766, R712, R754, R760	Ошибка	Мутантный контроль не обнаружен	Повторите постановку. См. раздел «Процедура тестирования». Эти коды сигнальных сообщений указывают на ошибку определения порогового цикла, что возможно в случае атипичной картины флуоресценции или сильного фонового сигнала.
R701, R719, R725, R737, R743, R749, R767, R713, R755, R761	Ошибка	Мутантный контроль не обнаружен	Повторите постановку. См. раздел «Процедура тестирования». Эти коды сигнальных сообщений указывают, что для мутантного контроля был получен отрицательный результат. Возможно, в одну или несколько ячеек не была внесена ДНК мутантного контроля.
R702, R720, R726, R738, R744, R750, R768, R714, R756, R762	Ошибка	Мутантный контроль вне допустимого диапазона	Повторите постановку. См. раздел «Процедура тестирования». Эти коды сигнальных сообщений указывают, что наблюдаемое значение Ct мутантного контроля было выше установленного порогового значения (пороговый цикл слишком высокий). Возможные причины этого явления: 1. Неправильное приготовление рабочего мастермикса Master Mix 2. Ошибка пипетирования на этапе добавления рабочего мастермикса Master Mix в лунку микропланшета 3. Ошибка пипетирования на этапе добавления мутантного контроля в лунку микропланшета
R703, R721, R727, R739, R745, R751, R769, R715, R757, R763	Ошибка	Мутантный контроль вне допустимого диапазона	Повторите постановку. См. раздел «Процедура тестирования». Эти коды сигнальных сообщений указывают, что наблюдаемое значение Ct мутантного контроля было ниже установленного порогового значения (пороговый цикл слишком низкий). Эта ошибка может возникать в случае контаминации ДНК.
R772, R778, R780, R784, R786, R788, R794, R776, R790, R792	Ошибка	Отрицательный контроль не обнаружен	Повторите постановку. См. раздел «Процедура тестирования». Эти коды сигнальных сообщений указывают на ошибку определения порогового цикла, что возможно в случае атипичной картины флуоресценции или сильного фонового сигнала.












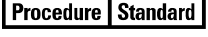








































Код сигнального сообщения	Критичность	Описание	Рекомендуемое действие
R773, R779, R781, R785, R787, R789, R795, R777, R791, R793	Ошибка	Отрицательный контроль вне допустимого диапазона	Повторите постановку. См. раздел «Процедура тестирования». Эти коды сигнальных сообщений указывают на получение положительного результата для отрицательного контроля (произошла контаминация).
R796, R816, R826, R836, R806, R841, R846	Ошибка	Мишень не обнаружена	Повторите анализ образца. См. раздел «Процедура тестирования». Эти коды сигнальных сообщений указывают на ошибку определения порогового цикла, что возможно в случае атипичной картины флуоресценции или сильного фонового сигнала.
R799, R819, R829, R839, R809, R844, R849	Ошибка	Результат выходит за пределы диапазона	Повторите анализ образца. См. раздел «Процедура тестирования». Эти коды сигнальных сообщений указывают на атипично низкое значение Ct, полученное для образца.
R800, R820, R830, R840, R810, R845, R850	Ошибка	Результат выходит за пределы диапазона	Повторите анализ образца. См. раздел «Процедура тестирования». Эти коды сигнальных сообщений указывают на атипичное взаимоотношение между значениями Ct для мутантного контроля и внутреннего контроля, полученными для исследуемого образца.
R811, R831, R851	Ошибка	Внутренний контроль не обнаружен	Повторите анализ образца. См. раздел «Процедура тестирования». Эти коды сигнальных сообщений указывают на ошибку определения порогового цикла, что возможно в случае атипичной картины флуоресценции или сильного фонового сигнала.
R812, R832, R852	Ошибка	Внутренний контроль не обнаружен	Повторите анализ образца. См. раздел «Процедура тестирования». Эти коды сигнальных сообщений указывают на ошибку валидности результата внутреннего контроля для исследуемого образца. Отсутствие валидного результата для внутреннего контроля может указывать на следующие обстоятельства: 1. Низкое качество геномной ДНК образца 2. Неправильная обработка образца 3. Наличие в образце ингибиторов ПЦР 4. Наличие редких мутаций в участках геномной ДНК, с которыми связываются праймеры и/или зонды внутреннего контроля 5. Возможно, в одну или несколько ячеек не была внесена ДНК образца 6. Другие факторы
R813, R834, R853	Ошибка	Внутренний контроль вне допустимого диапазона	Повторите анализ образца. См. раздел «Процедура тестирования». Эти коды сигнальных сообщений указывают на ошибку валидности результата внутреннего контроля для исследуемого образца. Отсутствие валидного результата для внутреннего контроля может указывать на следующие обстоятельства: 1. Низкое качество геномной ДНК образца 2. Неправильная обработка образца 3. Наличие в образце ингибиторов ПЦР 4. Наличие редких мутаций в участках геномной ДНК, с которыми связываются праймеры и/или зонды внутреннего контроля 5. Возможно, в одну или несколько ячеек не была внесена ДНК образца 6. Другие факторы
R814, R835, R854	Ошибка	Внутренний контроль вне допустимого диапазона	Повторите анализ образца. См. раздел «Процедура тестирования». Эти коды сигнальных сообщений указывают на атипично низкое значение Ct внутреннего контроля, полученное для исследуемого образца. Данная ошибка может возникать, если в реакционную смесь для ПЦР загружено избыточное количество концентрированной геномной ДНК.

Дополнительная информация

Условные обозначения

Приведенные ниже символы применяются для маркировки продукции для ПЦР-диагностики компании Roche.

Табл. 45 Символы, применяемые для маркировки продукции для ПЦР-диагностики компании Roche

 Age/DOB Возраст или дата рождения	 Устройство не для исследования по месту лечения	 QS IU/PCR МЕ КС на ПЦР-реакцию; при подсчете результатов значения представляйте в виде Международных единиц (МЕ) КС на ПЦР-реакцию.
 SW Вспомогательное программное обеспечение	 Устройство не предназначено для самостоятельного тестирования	 SN Серийный номер
 Assigned Range [copies/ml] Заданный диапазон (копий/мл)	 Дистрибьютер <i>(Примечание. Соответствующая страна/регион могут быть указаны под символом.)</i>	 Site Лаборатория
 Assigned Range [IU/ml] Заданный диапазон (МЕ/мл)	 Не использовать повторно	 Procedure Standard Стандартная процедура
 EC REP Авторизованный представитель в Европейском сообществе	 Женский	 STERILE EO Стерилизовано этиленоксидом
 BARCODE Список штрихкодов	 Только для испытаний IVD	 Хранить в темноте
 LOT Номер лота	 GTIN Глобальный номер товара	 Температурный диапазон
 Биологическая опасность	 Импортёр	 TDF Файл с описанием теста
 REF Номер по каталогу	 IVD Медицинское устройство для диагностики <i>in vitro</i>	 Этой стороной вверх
 CE CE маркировка соответствия требованиям ЕС — это изделие соответствует применимым требованиям для выдачи сертификата в ЕС на медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>	 LLR Нижний предел заданного диапазона	 Procedure UltraSensitive Сверхчувствительная процедура
 Collect Date Дата сбора	 Мужской	 UDI Уникальный идентификатор устройства
 Обратитесь к инструкции	 Производитель	 ULR Верхний предел заданного диапазона
 Рассчитано на <n> тестов	 CONTROL - Отрицательный контроль	 Urine Fill Line Линия заполнения мочой
 CONTENT Состав набора	 NON STERILE Нестерильно	 Rx Only Только для США. Федеральное законодательство ограничивает право продажи данного устройства терапевтом или по его рецепту.
 CONTROL Контроль	 Ф. И. О. пациента	 Использовать до
 Дата производства	 Номер пациента	
 Устройство для исследования по месту лечения	 Оторвите здесь	
 Устройство для самостоятельного тестирования	 CONTROL + Положительный контроль	
	 QS copies / PCR Копии количественного стандарта (КС) на ПЦР-реакцию; при подсчете результатов значения представляйте в виде копий КС на ПЦР-реакцию.	

Техническая поддержка

Для получения технической поддержки (помощи) обратитесь в местный филиал в вашем регионе:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Производитель

Табл. 46 Производитель

Произведено в США



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

Сделано в США

Товарные знаки и патенты

См. <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

Авторское право

© Roche Molecular Systems, Inc., 2023.

Литература

1. Sharma S. V., Bell D. W., Settleman J., Haber D. A. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(3):169-81.
2. Pao W., Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(11):760-774.
3. Zhou C., Wu Y. L., Chen G., Feng J., Liu X. Q., Wang C., et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2011;12(8):735-42.
4. Paz-Ares L., Soulieres D., Melezinek I., Moecks J., Keil L., Mok T., et al. Clinical outcomes in non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations: pooled analysis. *J Cell Mol Med*. 2010;14(1-2):51-69.
5. Cheng L., Alexander R. E., MacLennan G. T., Cummings O. W., Montironi R., Lopez-Beltran A., et al. Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Mod Pathol*. 2012;25(3):347-69.
6. TARCEVA® (erlotinib) Package Insert.
7. Wu Y. L., Lee J. S., Thongprasert S., Yu C. J., Zhang L., Ladrera G., et al. Intercalated combination of chemotherapy and erlotinib for patients with advanced stage non-small-cell lung cancer (FASTACT-2): a randomised, double-blind trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(8):777-86.
8. TAGRISSO® (osimertinib) Package Insert.
9. Janne P. A., Yang J. C., Kim D. W., Planchard D., Ohe Y., Ramalingam S. S., et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(18):1689-99.
10. Soria J-C, Vansteenkiste J, Reungwetwantana T, et al. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *NEJM* 2018; 378:113-125.
11. Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, Chen G, McGuinn WD, Jr, Morse D, et al. United States Food and Drug Administration Drug Approval summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets. *Clin Cancer Res* 2004;10(4):1212-1218.
12. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu S, Saijo, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361(10):947-957.
13. Douillard J-Y, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, McCormack R, Webster A, et al. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br. J Ca* 2014;110:55-62.
14. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC), 2011, v.51. <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>.
15. Longo M. C., Berninger M. S., Hartley J. L. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93(1):125-8.
16. Chosewood LC, Wilson DE. Biosafety and microbiological and biomedical laboratories-Fifth Edition. US Department of Health and Human Services Publication. (CDC). 2009:21-1112.
17. 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.
18. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 52nd Edition. 2011.
19. Costa D. B., Nguyen K. S., Cho B. C., Sequist L. V., Jackman D. M., Riely G. J., et al. Effects of erlotinib in EGFR mutated non-small cell lung cancers with resistance to gefitinib. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(21):7060-7.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline - Second Edition. CLSI Document EP17-A2: Wayne, PA; CLSI, Jun 2012.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Interference testing in clinical chemistry; Approved Guideline-Second Edition. CLSI Document EP07-A2 Appendix D:Wayne, PA; CLSI, 2005.
22. Rosell R., Carcereny E., Gervais R., Vergnenegre A., Massuti B., Felip E., et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(3):239-46.
23. Goss G., Tsai C. M., Shepherd F. A., Bazhenova L., Lee J. S., Chang G. C., et al. Osimertinib for pretreated EGFR Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2016;17(12):1643-52.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: A statistical approach; Approved Guideline. CLSI Document EP-06A: Wayne, PA; CLSI, Apr 2003.

Редакция документа

Сведения о редакции документа	
Doc Rev. 8.0 07/2023	<p>Обновлена версия программного обеспечения системы до 2.2 и добавлено примечание со ссылкой на вкладыш с информацией о продукте в разделе Необходимое оборудование и программное обеспечение, не включенное в поставку раздела А и раздела Б.</p> <p>Обновлено фирменное оформление cobas®.</p> <p>Обновлен раздел Товарные знаки и патенты, в том числе ссылка.</p> <p>В случае возникновения вопросов свяжитесь с местным представительством компании Roche.</p>