

cobas[®]



Rx Only

cobas[®] **EGFR Mutation Test v2**

In-vitro-Diagnostikum



cobas[®] **EGFR Mutation Test v2**

24 Tests P/N: 07248563190

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

Informationen zur Probenvorbereitung für Plasmaproben sind dem **cobas**[®] cfDNA Sample Preparation Kit (M/N 07247737190) zu entnehmen.

INHALTSVERZEICHNIS

Verwendungszweck	6
Zusammenfassung und Erklärung des Tests	7
Hintergrund	7
Testprinzipien	9
Probenvorbereitung	9
PCR-Amplifikation	9
ABSCHNITT A: GEWEBEPROBEN	11
Materialien und Reagenzien	11
Mittelieferte Materialien und Reagenzien	11
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	12
Zusätzlich benötigtes Material	13
Zusätzlich benötigte Geräte und Software	13
Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung	13
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	13
Gute Laborpraxis	14
Kontamination	14
Handhabung	14
Entsorgung	15
Verschüttetes Material und Reinigung	15
Entnahme, Transport und Lagerung von Proben	15
Probenentnahme	15
Transport, Lagerung und Haltbarkeit von Proben	15
Lagerung und Haltbarkeit verarbeiteter Proben	16
Testverfahren	17
Durchführung des Tests	17
Gebrauchsanweisung	17
Umfang eines Laufs	17
Kontrolle des gesamten Prozesses	17
DNA-Isolierung	18
Makrodissektion	18
DNA-Quantifizierung	18
Amplifikation und Detektion	19
Einrichtung des Instruments	19
Einrichtung der Testanforderung	19
Berechnung der Verdünnung der DNA-Probenstammlösung	20
Probenverdünnung	21

Vorbereitung der Reaktion	21
Starten der PCR	23
Ergebnisse	23
Interpretation der Ergebnisse	23
Testwiederholung für Proben mit ungültigem Ergebnis	23
Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse	24
Mutationskontrolle	24
Negativkontrolle.....	24
Verfahrenseinschränkungen.....	24
Nichtklinische Leistungsmerkmale.....	25
Analytische Sensitivität – Leerwertgrenze	25
Nachweisgrenze bei FFPE-Gewebeprobemischungen	25
Mindest-Tumorgehalt	27
Kreuzreaktivität mit anderen Mutationen in Exon 18, 19, 20 und 21	28
Proben aus der EURTAC-Studie	28
Proben aus der AURA2-Studie	28
Spezifität – Mikroorganismen und EGFR-Homologe	28
Mikroorganismen der Lunge.....	28
EGFR-homologe Plasmide.....	28
Störeinflüsse	29
Nekrotisches Gewebe.....	29
Wiederholbarkeit.....	29
Reproduzierbarkeit beim Umgang mit Proben	29
Klinische Leistungsmerkmale	30
Klinische Studie 1 zur Reproduzierbarkeit	30
Klinische Studie 2 zur Reproduzierbarkeit	31
Korrelation mit der Referenzmethode unter Verwendung von Phase-III-Proben aus der EURTAC-Studie	32
Korrelation mit der Referenzmethode unter Verwendung von Proben aus der Phase-II-Studie AURA2	35
Klinische Ergebnisse	36
EURTAC.....	36
AURA2.....	37
FLAURA	38

ABSCHNITT B: PLASMAPROBEN	42
Probenvorbereitung.....	42
Materialien und Reagenzien	42
Mittelieferte Materialien und Reagenzien.....	42
Lagerung und Handhabung der Reagenzien.....	43
Zusätzlich benötigtes Material.....	44
Zusätzlich benötigte Geräte und Software.....	44
Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung.....	44
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen.....	44
Gute Laborpraxis.....	45
Kontamination.....	45
Handhabung	45
Entsorgung.....	46
Verschüttetes Material und Reinigung.....	46
Entnahme, Transport und Lagerung von Proben	46
Entnahme und Handhabung von Proben	46
Transport, Lagerung und Haltbarkeit von Proben.....	47
Lagerung und Haltbarkeit verarbeiteter Proben.....	47
Testverfahren.....	48
Durchführung des Tests.....	48
Gebrauchsanweisung.....	48
Umfang eines Laufs.....	48
Kontrolle des gesamten Prozesses.....	48
DNA-Isolierung.....	48
Amplifikation und Detektion	49
Einrichtung des Instruments	49
Einrichtung der Testanforderung	49
Vorbereitung der Reaktion	50
Starten der PCR	51
Ergebnisse	52
Interpretation der Ergebnisse	52
Semiquantitativer Index (SQI)	52
Testwiederholung für Proben mit ungültigem Ergebnis.....	53
Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse	53
Mutationskontrolle	53
Negativkontrolle.....	53
Verfahrenseinschränkungen.....	53

Nichtklinische Leistungsmerkmale	55
Analytische Leistung.....	55
Analytische Sensitivität – Leerwertgrenze.....	55
Nachweisgrenze mit Zelllinien-DNA.....	55
Kreuzreaktivität mit anderen Mutationen in Exon 18, 19, 20 und 21.....	56
Proben aus der AURA-Erweiterungsstudie und der AURA2-Studie.....	56
Spezifität – Mikroorganismen.....	56
Störeinflüsse.....	56
Linearität.....	57
Wiederholbarkeit.....	60
Klinische Leistungsmerkmale	61
Klinische Reproduzierbarkeit bei K2-EDTA-Plasma.....	61
Klinische Reproduzierbarkeit bei Roche-cfDNA-Plasma.....	62
Nachweisgrenze bei NSCLC-Plasmaproben.....	63
Korrelation von Roche-cfDNA- und K2-EDTA-Plasma.....	64
Korrelation mit der Referenzmethode unter Verwendung von Phase-III-Plasmaproben aus der ASPIRATION-Kohorte.....	65
Korrelation zwischen Plasma- und Gewebeproben im cobas EGFR-Test zum Nachweis von Exon-19- Deletionen und L858R-Mutationen unter Verwendung von Proben aus der Phase-III-Studie ENSURE.....	66
Korrelation mit der Referenzmethode unter Verwendung von Proben aus der Phase-II-Studie AURA2.....	67
Korrelation zwischen Plasma- und Gewebeproben beim Nachweis von T790M unter Verwendung von Proben aus der Phase-II-Studie AURA2.....	69
Klinische Ergebnisse.....	70
ENSURE.....	70
AURA2.....	71
FLAURA.....	72
Ergebnis-Flags	76
Bedeutung der Ergebnis-Flags.....	76
Weitere Informationen	78
Symbole.....	78
Technischer Support.....	79
Hersteller.....	79
Marken und Patente.....	79
Copyright.....	79
Literatur.....	80
Dokumentversion.....	82

Verwendungszweck

Der **cobas**® EGFR Mutation Test v2 ist ein Echtzeit-PCR-Test zum qualitativen Nachweis definierter Mutationen des EGFR-Gens (Gen des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors) bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC). Der Nachweis definierter EGFR-Mutationen erfolgt anhand von DNA, die aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem (FFPE) Tumorgewebe isoliert wurde, oder von frei zirkulierender Tumor-DNA (cfDNA) aus Plasma, das aus mit EDTA antikoaguliertem peripherem Vollblut gewonnen wurde.

Der Test ist als Begleitdiagnostik vorgesehen, um NSCLC-Patienten auszuwählen, die zur Therapie mit EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren (einschließlich der in Tabelle 1 aufgeführten gezielten Therapien) gemäß Zulassung infrage kommen:

Tabelle 1

Therapeutikum	FFPE-Gewebe	Plasma
TARCEVA® (Erlotinib)	Exon-19-Deletionen und L858R	Exon-19-Deletionen und L858R
TAGRISSO® (Osimertinib)	Exon-19-Deletionen, L858R und T790M	Exon-19-Deletionen, L858R und T790M
IRESSA® (Gefitinib)	Exon-19-Deletionen und L858R	Exon-19-Deletionen und L858R

Das Testen von Plasmaproben ist bei Patienten angemessen, bei denen keine Tumorbiopsie durchgeführt werden kann. Patienten, die in diesem Test unter Verwendung von Plasmaproben negativ auf diese Mutationen getestet wurden, sollten einer routinemäßigen Biopsie und einem Test auf EGFR-Mutationen mit FFPE-Gewebeprobenmaterial unterzogen werden, sofern verfügbar.

Bei den folgenden EGFR-Mutationen, die ebenfalls vom **cobas**® EGFR Mutation Test v2 erkannt werden, ist keine Arzneimittelsicherheit und -wirksamkeit belegt:

Tabelle 2

Therapeutikum	FFPE-Gewebe	Plasma
TARCEVA® (Erlotinib)	G719X, Exon-20-Insertionen, T790M, S768I und L861Q	G719X, Exon-20-Insertionen, T790M, S768I und L861Q
TAGRISSO® (Osimertinib)	G719X, Exon-20-Insertionen, S768I und L861Q	G719X, Exon-20-Insertionen, S768I und L861Q
IRESSA® (Gefitinib)	G719X, Exon-20-Insertionen, T790M, S768I und L861Q	G719X, Exon-20-Insertionen, T790M, S768I und L861Q

Der **cobas**® EGFR Mutation Test v2 für Plasmaproben beinhaltet eine semiquantitative Messung der Mutationen in den Exons 18, 19, 20 und 21 des EGFR-Gens. Diese Messung, deren Ergebnis als semiquantitativer Index (SQI) angegeben wird, korreliert mit der Menge der mutierten Ziel-cfDNA in Plasma und ermöglicht es, die Änderungen der mutierten Ziel-cfDNA-Last im Laufe der Zeit zu bestimmen.

Bei der manuellen Probenvorbereitung werden FFPE-Gewebeproben mit dem **cobas**® DNA Sample Preparation Kit und Plasmaproben mit dem **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit aufbereitet. Die automatisierte Amplifikation und Detektion findet auf dem **cobas z 480** Analyzer statt.

Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Hintergrund

Aktivierende Mutationen in dem Gen, das den EGFR kodiert, treten hauptsächlich bei NSCLC auf. Sie führen zu einer konstitutiven Aktivierung der Kinaseaktivität des EGFR-Proteins und fördern so den onkogenen Prozess.¹ Die Prävalenz dieser Mutationen bei unselektierten Fällen von NSCLC beträgt ungefähr 10 %–30 %.^{2,3} Diese Mutationen treten jedoch häufiger – wenn auch nicht ausschließlich – bei wenig oder gar nicht rauchenden weiblichen Patienten asiatischer Herkunft mit einer Adenokarzinom-Histologie auf.⁴

Zu den häufigsten EGFR-Mutationen bei NSCLC gehören eine Reihe von Deletionen in Exon 19 und die Substitutionsmutation L858R in Exon 21. Diese Mutationen stellen gemeinsam etwa 85 % der EGFR-Mutationen bei NSCLC dar.⁵ Beim **cobas**® EGFR Mutation Test v2 (**cobas** EGFR-Test) handelt es sich um einen Echtzeit-PCR-Test, der für die Detektion von G719X-Substitutionsmutationen in Exon 18, Deletionsmutationen in Exon 19, den Substitutionsmutationen T790M und S768I in Exon 20, Insertionsmutationen in Exon 20, und den Substitutionsmutationen L858R und L861Q in Exon 21 vorgesehen ist.

Der **cobas** EGFR-Test dient als Begleitdiagnostik für das Therapeutikum TARCEVA® (Erlotinib), dessen Wirkstoff die Kinaseaktivität des EGFR reversibel hemmt, so dass die Autophosphorylierung der Tyrosinreste des Rezeptors unterbunden und dadurch die weitere Signalübertragung, die Zellüberleben und -proliferation fördert, gehemmt wird. Die Rezeptor-Bindungsaffinität von TARCEVA® bei Exon-19-Deletion oder Exon-21-L858R-Substitution des EGFR-Gens ist höher als beim Wildtyp-Rezeptor.⁶ In klinischen Studien wurde nachgewiesen, dass Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC und Deletionsmutationen in Exon 19 oder L858R-Substitutionsmutationen in Exon 21, die mit TARCEVA® als Erstlinientherapie behandelt wurden, wahrscheinlich im Vergleich zu den mit Chemotherapie behandelten Patienten klinisch profitieren.^{3,7}

Der **cobas** EGFR-Test dient als Begleitdiagnostik für TAGRISSO® (Osimertinib), das sowohl die TKI-sensibilisierenden Mutationen als auch die T790M-Resistenzmutationen des EGFR-Gens bei fortgeschrittenem NSCLC irreversibel hemmt. TAGRISSO® hemmt die Kinaseaktivität des EGFR, wodurch wiederum eine Kaskade nachgelagerter intrazellulärer Signalübertragungen gehemmt wird, die Zellproliferation und -überleben sowie Angiogenese fördern.⁸ In klinischen Studien wurde gezeigt, dass Patienten mit fortgeschrittenem nicht-squamösem NSCLC und einer für TKI-sensibilisierenden EGFR-Mutation, bei denen es nach Behandlung mit einem EGFR-TKI der ersten Generation zu einer Progression gekommen war und bei denen eine T790M-Resistenzmutation in Exon 20 aufgetreten war, wahrscheinlich von einer Behandlung mit TAGRISSO® klinisch profitieren.⁹ In einer klinischen Phase-III-Studie konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC (mit Deletionsmutation in Exon 19 oder L858R-Substitutionsmutation in Exon 21), die mit TAGRISSO® als Erstlinientherapie behandelt wurden, einen größeren klinischen Nutzen haben als Patienten, die einen EGFR-TKI der ersten Generation (Gefitinib oder Erlotinib) erhielten.¹⁰

Der **cobas** EGFR-Test dient als Begleitdiagnostik für das Therapeutikum IRESSA® (Gefitinib), dessen Wirkstoff die Kinaseaktivität des EGFR reversibel hemmt, so dass die Autophosphorylierung der Tyrosinreste des Rezeptors unterbunden und dadurch die weitere Signalübertragung, die Zellüberleben und -proliferation fördert, gehemmt wird. In klinischen Studien wurde nachgewiesen, dass Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC und Deletionsmutationen in Exon 19 oder L858R-Substitutionsmutationen in Exon 21, die mit IRESSA® als Erstlinientherapie behandelt wurden, wahrscheinlich im Vergleich zu den mit Chemotherapie behandelten Patienten klinisch profitieren.^{11, 12, 13}

Die mit dem **cobas** EGFR-Test nachweisbaren EGFR-Mutationen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3 Der cobas EGFR-Test dient zum Nachweis der folgenden Mutationen:

Exon	EGFR-Mutationsgruppe	EGFR-Nukleinsäuresequenz	HGVS*-Proteinomenklatur	HGVS*-Nukleotidnomenklatur	COSMIC-ID ¹⁴
Exon 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
Exon 19	Ex19Del	2240_2251del12	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsSer)	LRG_304t1:c.2240_2251delTTAAGAGAAGCAA	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_2254delTTAAGAGAAGCAACAT	6254
		2239_2256del18	LRG_304p1:p.(Leu747_Ser752del)	LRG_304t1:c.2239_2256delTTAAGAGAAGCAACA TCT	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_2254delTTAAGAGAAGCAACAT	12369
		2240_2257del18	LRG_304p1:p.(Leu747_Pro753delinsSer)	LRG_304t1:c.2240_2257delTTAAGAGAAGCAACATCTC	12370
		2239_2248TTAAGAGAAG>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_2276delATCTCCGAAAGCCAA CAAGGAAAT	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_2254delTTAAGAGAAGCAACAT	23571		
2233_2247del15	LRG_304p1:p.(Lys745_Glu749del)	LRG_304t1:c.2233_2247delAAGGAATTAAGAGAA	26038		
Exon 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	
Exon 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 – Human Genome Variation Society

Testprinzipien

Der **cobas** EGFR-Test umfasst zwei Hauptprozesse: (1) manuelle Probenvorbereitung zur Gewinnung der genomischen DNA aus FFPE-Gewebe oder Plasma und (2) PCR-Amplifikation und Detektion der Ziel-DNA unter Verwendung von komplementären Primer-Paaren und Oligonukleotidsonden, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Der **cobas** EGFR-Test dient zum Nachweis der folgenden Mutationen:

- Exon 18: G719X (G719A, G719C und G719S)
- Exon 19: Deletionen und komplexe Mutationen (definiert als Kombination von Deletion und Insertion)
- Exon 20: S768I, T790M und Insertionen
- Exon 21: L858R und L861Q

Der Mutationsnachweis wird mittels PCR-Analyse mit dem **cobas z 480** Analyzer durchgeführt. Zur Bestätigung der Gültigkeit des Laufs werden mit jedem Lauf eine Mutationskontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt.

Probenvorbereitung

Das **cobas**® DNA Sample Preparation Kit und das **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit dienen zur manuellen Probenvorbereitung von FFPE-Gewebe bzw. Plasma, bei denen die Nukleinsäuren an Glasfasern gebunden werden. Die Freisetzung der Nukleinsäuren erfolgt mit Hilfe einer Protease und einem chaotropen Lyse-/Bindepuffer, die die freigesetzte DNA zudem vor DNasen schützen. Anschließend wird der Lysemischung Isopropanol zugegeben, die dann durch eine Säule mit Glasfaser-Filtereinsatz zentrifugiert wird. Die DNA wird beim Zentrifugieren an die Oberfläche des Glasfaserfilters gebunden. Außerdem werden durch das Zentrifugieren ungebundene Substanzen wie Salze, Proteine und andere Zellverunreinigungen entfernt. Die adsorbierten Nukleinsäuren werden dann mit einer wässrigen Lösung gewaschen und eluiert. Die Ziel-DNA wird anschließend unter Verwendung der Amplifikations- und Detektionsreagenzien des **cobas** EGFR-Testkits mit dem **cobas z 480** Analyzer amplifiziert und detektiert.

PCR-Amplifikation

Wahl der Zielsequenz

Der **cobas** EGFR-Test verwendet Primer, die für jede der Zielmutationen auf spezifischen Basenpaarsequenzen beruhen. Für die Exon-19-Deletionsmutationen dienen Sequenzen mit 125 bis 141 Basenpaaren als Ziel; für die Substitutionsmutation L858R in Exon 21 dienen Sequenzen mit 138 Basenpaaren als Ziel; für die Substitutionsmutation T790M in Exon 20 dient eine Sequenz mit 118 Basenpaaren als Ziel; für die Substitutionsmutation G719X in Exon 18 dienen Sequenzen mit 104 bis 106 Basenpaaren als Ziel; für die Substitutionsmutation S768I in Exon 20 dient eine Sequenz mit 133 Basenpaaren als Ziel; für die Exon-20-Insertionsmutationen dienen Sequenzen mit 125 bis 143 Basenpaaren als Ziel und für die Substitutionsmutation L861Q in Exon 21 dient eine Sequenz mit 129 Basenpaaren als Ziel. Die Amplifikation erfolgt nur in der von den Primern begrenzten Region des EGFR-Gens; es wird nicht das gesamte EGFR-Gen amplifiziert.

Amplifikation der Zielsequenz

Für die Amplifikation der Zielsequenz wird DNA-Polymerase eines Abkömmlings der *Thermus*-Spezies Z05-AS1 verwendet. Das PCR-Gemisch wird zuerst erwärmt, um die DNA zu denaturieren und die Primer-Zielsequenzen freizulegen. Beim Abkühlen des Gemischs lagern sich die Upstream- und Downstream-Primer an die Ziel-DNA-Sequenzen an. Die Z05-DNA-Polymerase verlängert in der Gegenwart zweiwertiger Metallkationen und eines Überschusses an dNTP die angelagerten Primer, wodurch ein zweiter DNA-Strang synthetisiert wird. Mit Abschluss dieses ersten PCR-Zyklus liegt nun eine doppelsträngige DNA-Kopie vor, die die Basenpaar-Zielregionen des EGFR-Gens enthält. Dieser Prozess wird für eine Reihe von Zyklen wiederholt, wobei jeder Zyklus die Menge an Ziel-DNA in Form von Amplifikaten effektiv verdoppelt.

Automatisierte Echtzeit-Mutationsdetektion

Der **cobas** EGFR-Test basiert auf Echtzeit-PCR-Technologie. Jede für eine Zielsequenz spezifische Oligonukleotidsonde wird in der Reaktion mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der als Reporter dient, und mit einem Quencher-Molekül, das die Fluoreszenzemission des Reporter-Farbstoffes in einer intakten Sonde absorbiert. Während jedes Amplifikationszyklus wird die Sonde, die zur einsträngigen DNA-Sequenz im Amplifikat komplementär ist, gebunden und anschließend durch die 5'-3'-Nukleaseaktivität der DNA-Polymerase Z05-AS1 abgespalten. Nachdem der Reporterfarbstoff durch diese Nukleaseaktivität vom Quencher abgespalten wurde, kann Fluoreszenzlicht einer charakteristischen Wellenlänge gemessen werden, wenn der Reporterfarbstoff durch das entsprechende Lichtspektrum angeregt wird. Die Zielmutationen des Tests werden mit vier verschiedenen Reporterfarbstoffen markiert. Die Amplifikation der sieben EGFR-Zielsequenzen wird durch die Messung der Fluoreszenz an den vier charakteristischen Wellenlängen in dedizierten optischen Kanälen unabhängig voneinander in drei Reaktionen nachgewiesen.

Selektive Amplifikation

Die selektive Amplifikation der Ziel-Nukleinsäure aus der Probe wird beim **cobas** EGFR-Test durch die Verwendung des Enzyms AmpErase (Uracil-N-Glykosylase) und von Desoxyuridintriphosphat (dUTP) erreicht.¹⁵ Das Enzym AmpErase erkennt desoxyuridinhaltige – nicht aber desoxythymidinhaltige – DNA-Stränge und katalysiert deren Zerstörung. Desoxyuridin ist in natürlich vorkommender DNA nicht enthalten, jedoch in den Amplifikaten immer vorhanden, da dUTP anstelle von Desoxythymidintriphosphat als eines der Nukleotid-Triphosphate im Master-Mix verwendet wird. Deshalb enthalten nur die Amplifikate Desoxyuridin. Vor der Amplifikation der Ziel-DNA werden kontaminierende Amplifikate durch das Desoxyuridin anfällig für die Zerstörung durch das Enzym AmpErase. Das im Master-Mix enthaltene Enzym AmpErase katalysiert die Spaltung desoxyuridinhaltiger DNA an den Desoxyuridin-Resten durch Öffnen der Desoxyribosekette an der C1-Position. Während der Erwärmung im ersten thermozyklischen Schritt bei alkalischem pH-Wert tritt ein Bruch des DNA-Strangs des Amplifikats an der Desoxyuridin-Position auf, so dass die DNA nicht weiter amplifiziert werden kann. Das Enzym AmpErase ist bei Temperaturen über 55 °C, d. h. während aller thermozyklischen Schritte, inaktiv und zerstört deshalb keine Zielamplifikate. Es konnte gezeigt werden, dass der **cobas** EGFR-Test desoxyuridinhaltiges mutiertes EGFR-Amplifikat inaktiviert.

BEI VERWENDUNG VON GEWEBEPROBEN GELTEN DIE ANWEISUNGEN IN ABSCHNITT A.

BEI VERWENDUNG VON PLASMAPROBEN GELTEN DIE ANWEISUNGEN IN ABSCHNITT B.

ABSCHNITT A: GEWEBEPROBEN

Informationen zur Isolierung von DNA aus Gewebeproben sind dem **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) zu entnehmen.

Materialien und Reagenzien

Mitgelieferte Materialien und Reagenzien

Kit/Kassetten	Komponenten und Reagenzienbestandteile	Menge je Test	Sicherheitssymbole und -hinweise
cobas® EGFR Mutation Test v2 24 Tests (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-1 (EGFR Master-Mix 1) (M/N 06471366001) Tris-Puffer Kaliumchlorid Glycerin EDTA Tween 20 3,13 % Dimethylsulfoxid 0,09 % Natriumazid < 0,10 % dNTPs < 0,01 % Z05-AS1-DNA-Polymerase (mikrobiell) < 0,01 % AmpErase-Enzym (Uracil-N-Glykosylase) (mikrobiell) < 0,01 % Aptamer < 0,01 % Upstream- und Downstream-EGFR-Primer < 0,01 % fluoreszenzmarkierte EGFR-Sonden	2 x 0,48 ml	k. A.
	EGFR MMX-2 (EGFR Master-Mix 2) (M/N 06471382001) Tris-Puffer Kaliumchlorid Glycerin EDTA Tween 20 3,13 % Dimethylsulfoxid 0,09 % Natriumazid < 0,10 % dNTPs < 0,01 % Z05-AS1-DNA-Polymerase (mikrobiell) < 0,01 % AmpErase-Enzym (Uracil-N-Glykosylase) (mikrobiell) < 0,01 % Aptamer < 0,01 % Upstream- und Downstream-EGFR-Primer < 0,01 % fluoreszenzmarkierte EGFR-Sonden	2 x 0,48 ml	k. A.

Kit/Kassetten	Komponenten und Reagenzienbestandteile	Menge je Test	Sicherheitssymbole und -hinweise
cobas® EGFR Mutation Test v2 24 Tests (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-3 v2 (EGFR Master-Mix 3) (M/N 07248610001) Tris-Puffer Kaliumchlorid Glycerin EDTA Tween 20 3,13 % Dimethylsulfoxid 0,09 % Natriumazid < 0,10 % dNTPs < 0,01 % Z05-AS1-DNA-Polymerase (mikrobiell) < 0,01 % AmpErase-Enzym (Uracil-N-Glykosylase) (mikrobiell) < 0,01 % Aptamer < 0,01 % Upstream- und Downstream-EGFR-Primer < 0,01 % fluoreszenzmarkierte EGFR-Sonden	2 x 0,48 ml	k. A.
	MGAC (Magnesiumacetat) (M/N 05854326001) Magnesiumacetat 0,09 % Natriumazid	6 x 0,2 ml	k. A.
	EGFR MC (EGFR-Mutationskontrolle) (M/N 06471455001) Tris-Puffer EDTA Poly-rA-RNA (synthetisch) 0,05 % Natriumazid < 0,1 % Plasmid-DNA mit EGFR-Sequenzen (Exon 18, 19, 20 und 21, mikrobiell) < 0,1 % EGFR-Wildtyp-DNA (Zellkultur)	6 x 0,1 ml	k. A.
	DNA SD (DNA-Probenverdünnungslösung) (M/N 05854474001) Tris-HCl-Puffer 0,09 % Natriumazid	2 x 3,5 ml	k. A.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Reagenz	Lagertemperatur	Lagerdauer
cobas® EGFR Mutation Test v2*	2 °C bis 8 °C	Geöffnet für 4 Anwendungen über 90 Tage bzw. maximal bis zum Verfallsdatum haltbar.

* **EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2** und Gebrauchs-MMX (hergestellt durch Zugabe von **MGAC** zu **EGFR MMX-1** oder **EGFR MMX-2** oder **EGFR MMX-3 v2**) sind über längere Zeiträume lichtgeschützt aufzubewahren. Der Gebrauchs-MMX muss bei 2 °C bis 8 °C im Dunkeln aufbewahrt werden. Die vorbereiteten Proben und Kontrollen müssen innerhalb von 1 Stunde nach der Zubereitung des Gebrauchs-MMX zugegeben werden. Mit der Amplifikation muss innerhalb von 1 Stunde nach der Zugabe der bearbeiteten Proben und Kontrollen zum Gebrauchs-MMX begonnen werden.

Zusätzlich benötigtes Material

Materialien	M/N
cobas® DNA Sample Preparation Kit	Roche 05985536190
Bleiche	Beliebiger Hersteller
70%iges Ethanol	Beliebiger Hersteller
Mikrotiterplatte für das cobas® 4800 System und Versiegelungsfolie	Roche 05232724001
Versiegelungsfolienwerkzeug für das cobas® 4800 System (bei der Installation des cobas® 4800 Systems bereitgestellt)	Roche 04900383001
Verstellbare Pipetten* (Kapazität von 5–1000 µl)	Beliebiger Hersteller
DNase-freie Aerosolfilter- oder Kolbenhub-Spitzen	Beliebiger Hersteller
Mikrozentrifugenröhrchen mit Einrastverschluss (1,5 ml, steril, RNase-/DNase-frei, PCR-Qualität)	Beliebiger Hersteller
Mikrozentrifugenröhrchen-Racks	Beliebiger Hersteller
Spektralphotometer zum Messen der DNA-Konzentration*	Beliebiger Hersteller
Vortexer*	Beliebiger Hersteller
Laborhandschuhe, puderfrei	Beliebiger Hersteller
Gefrierschrank mit einem Temperaturbereich von –25 °C bis –15 °C	Beliebiger Hersteller

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

Weitere Informationen zu diesen separat erhältlichen Materialien erhalten Sie von Ihrem zuständigen Roche-Mitarbeiter.

Zusätzlich benötigte Geräte und Software

Zusätzlich benötigte Geräte und Software
cobas z 480 Analyzer
Control Unit für das cobas® 4800 System mit Systemsoftware, Version 2.1 oder höher
EGFR Tissue P1 Analysis Package Software, Version 1.0 oder höher
Barcodeleser, ext. USB
Drucker

Weitere Informationen zu diesen separat erhältlichen Materialien erhalten Sie von Ihrem zuständigen Roche-Mitarbeiter.

Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Wie bei allen Testverfahren ist gute Laborpraxis eine unerlässliche Voraussetzung für die uneingeschränkte Leistung dieses Tests.

- Nur zur Verwendung als *in-vitro*-Diagnostikum bestimmt.
- Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheets, SDS) sind auf Anfrage bei der zuständigen Roche-Vertretung erhältlich.
- Dieser Test ist mit FFPE-NSCLC-Gewebeproben durchzuführen. Proben sind als potenziell infektiös und gemäß den Vorschriften für sicheres Arbeiten im Labor, wie in „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“¹⁶ und dem CLSI-Dokument M29-A4 beschrieben, zu behandeln.¹⁷
- Es wird empfohlen, sterile Einwegpipetten und DNase-freie Pipettenspitzen zu verwenden.

Gute Laborpraxis

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- In den Arbeitsbereichen des Labors nicht essen, trinken oder rauchen.
- Nach dem Umgang mit Proben und Testreagenzien gründlich die Hände waschen.
- Beim Umgang mit Reagenzien Schutzbrille, Laborkittel und Laborhandschuhe tragen. Haut, Augen und Schleimhäute vor Kontakt mit diesen Materialien schützen. Bei Kontakt sofort mit reichlich Wasser abspülen. Unbehandelt können Verätzungen entstehen. Verschüttete Flüssigkeiten vor dem Aufwischen zunächst mit Wasser verdünnen.
- Alle Arbeitsflächen im Labor gründlich mit einer frisch hergestellten Lösung aus 0,5%igem Natriumhypochlorit in destilliertem oder entionisiertem Wasser reinigen und desinfizieren (Haushaltsbleiche im Verhältnis 1:10 verdünnen). Anschließend die Arbeitsflächen mit 70%igem Ethanol abwischen.

Hinweis: *Handelsübliche flüssige Haushaltsbleiche enthält in der Regel Natriumhypochlorit in einer Konzentration von 5,25 %. Durch Verdünnung im Verhältnis 1:10 erhält man eine 0,5%ige Natriumhypochloritlösung.*

Kontamination

- Um Kontaminationen zu vermeiden, müssen Handschuhe getragen und zwischen der Handhabung von Proben und **cobas** EGFR-Testreagenzien gewechselt werden. Darauf achten, dass die Handschuhe beim Umgang mit Proben nicht kontaminiert werden.
- Handschuhe regelmäßig wechseln, um das Kontaminationsrisiko zu senken.
- Die Handschuhe müssen vor dem Verlassen von DNA-Isolierungsbereichen gewechselt werden oder wenn ein Verdacht auf Kontakt mit Lösungen oder einer Probe besteht.
- Kontamination der Reagenzien und Proben durch Mikroorganismen und Ribonuklease vermeiden.
- Der Arbeitsbereich für Amplifikation und Detektion ist vor der Herstellung des Gebrauchs-MMX gründlich zu reinigen. Die Geräte und Materialien sollten den verschiedenen Aktivitäten fest zugewiesen werden; sie dürfen dann nicht mehr für andere Aktivitäten verwendet oder in einen anderen Bereich gebracht werden. So dürfen für die DNA-Isolierung verwendete Pipetten und Verbrauchsmaterialien zum Beispiel nicht für die Vorbereitung von Reagenzien für die Amplifikation und Detektion verwendet werden.
- Die Arbeitsabläufe im Labor sind so zu gestalten, dass sie nur in eine Richtung verlaufen, d. h. ein Arbeitsgang wird abgeschlossen, bevor der nächste gestartet wird. So sollte beispielsweise die DNA-Isolierung abgeschlossen sein, bevor Amplifikation und Detektion gestartet werden. Darüber hinaus ist die DNA-Isolierung in einem Bereich durchzuführen, der von Amplifikation und Detektion räumlich getrennt ist. Um eine Kontamination des gebrauchsfertigen Master-Mix mit DNA-Proben zu vermeiden, ist der zur Amplifikation und Detektion verwendete Arbeitsbereich vor der Vorbereitung des Master-Mix gründlich zu reinigen.

Handhabung

- Kits nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Reagenzien aus verschiedenen Kits oder Chargen nicht vermischen.
- Einwegkomponenten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle Einwegkomponenten sind für den einmaligen Gebrauch vorgesehen. Nicht wiederverwenden.
- Alle Geräte müssen gemäß den Anweisungen des Herstellers gewartet werden.

Entsorgung

- MGAC, EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2, EGFR MC und DNA SD enthalten Natriumazid. Natriumazid kann bei der Reaktion mit Blei- und Kupferleitungen hochexplosive Metallazide bilden. Beim Ausgießen natriumazidhaltiger Lösungen in Laborwaschbecken mit reichlich kaltem Wasser nachspülen, um Azidansammlung zu vermeiden.
- Nicht verbrauchte Reagenzien und Abfall gemäß den einschlägigen regionalen und überregionalen Vorschriften entsorgen.

Verschüttetes Material und Reinigung

- Wenn im cobas® 4800 instrument Flüssigkeit verschüttet wird, die Reinigungsanweisungen im Benutzerhandbuch und/oder in der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems befolgen.
- Zum Reinigen des cobas z 480 Analyzers keine Natriumhypochloritlösung (Bleiche) verwenden. Den cobas z 480 Analyzer gemäß den Anweisungen im Benutzerhandbuch und/oder in der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems reinigen.
- Weitere Warnhinweise, Vorsichtsmaßnahmen und Verfahren zur Verringerung der Kontaminationsgefahr für den cobas z 480 Analyzer sind dem Benutzerhandbuch und/oder der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems zu entnehmen.

Entnahme, Transport und Lagerung von Proben

Hinweis: Alle Proben müssen wie potenzielle Überträger von Infektionserregern behandelt werden.

Probenentnahme

NSCLC-FFPE-Gewebeproben wurden für die Verwendung mit dem cobas EGFR-Test validiert.

Transport, Lagerung und Haltbarkeit von Proben

NSCLC-FFPE-Gewebeproben können bei 15 °C bis 30 °C transportiert werden. Beim Transport von FFPE-Gewebeproben sind die geltenden Vorschriften für den Transport von Krankheitserregern zu beachten.¹⁸

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

FFPE-Gewebeproben sind wie folgt haltbar:

Art der FFPE-Gewebeprobe	FFPE-Gewebeprobenblock	5-µm-FFPE-Gewebeschnitt
Lagertemperatur für FFPE-Gewebeproben	15 °C bis 30 °C	15 °C bis 30 °C
Lagerdauer	Max. 12 Monate	Max. 60 Tage

Lagerung und Haltbarkeit verarbeiteter Proben

Verarbeitete Proben (extrahierte DNA) sind wie folgt haltbar:

Lagertemperatur für extrahierte DNA	-15 °C bis -25 °C	2 °C bis 8 °C	15 °C bis 30 °C
Lagerdauer	Max. 3 Einfrier-Auftau-Zyklen in einem Zeitraum von 60 Tagen	Max. 14 Tage	Max. 1 Tag

Extrahierte DNA sollte innerhalb des empfohlenen Lagerzeitraumes bzw. spätestens vor Erreichen des Verfallsdatums des cobas® DNA Sample Preparation Kits, mit dem die DNA extrahiert wurde, verwendet werden.

Testverfahren

Durchführung des Tests

Abbildung 1 Arbeitsablauf des cobas EGFR-Tests mit dem cobas® DNA Sample Preparation Kit

1	System einschalten.
2	Wartung des Instruments durchführen.
3	Proben und Reagenzien aus der Lagerung nehmen.
4	Proben entparaffinieren.
5	DNA-Isolierung durchführen.
6	DNA eluieren.
7	Arbeitsliste erstellen und Plattenanordnung drucken.
8	Amplifikationsreagenzien vorbereiten.
9	Amplifikationsreagenzien auf die Mikrotiterplatte geben.
10	Probe auf die Mikrotiterplatte geben.
11	Mikrotiterplatte versiegeln.
12	Mikrotiterplatte in den cobas z 480 Analyzer laden.
13	Lauf starten.
14	Ergebnisse überprüfen.
15	Mit LIS: Ergebnisse an LIS übertragen.
16	Analyzer leeren.

Gebrauchsanweisung

Hinweis: Es dürfen nur NSCLC-FFPE-Gewebeschnitte mit einer Stärke von 5 µm und mindestens 10 % Tumorgehalt des Gewebeareals für den **cobas** EGFR-Test verwendet werden. Alle Proben, deren Tumorgehalt weniger als 10 % des Gewebeareals beträgt, müssen nach der Entparaffinierung einer Makrodissektion unterzogen werden.

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

Umfang eines Laufs

Ein einzelner Lauf kann pro Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten 1 bis 30 Proben (zuzüglich Kontrollen) umfassen. Bei der Analyse von mehr als 24 Proben werden mehrere **cobas** EGFR-Testkits benötigt.

Der **cobas** EGFR-Test enthält ausreichend Reagenzien für 8 Läufe mit je 3 Proben (zuzüglich Kontrollen) für ein Maximum von 24 Proben pro Kit.

Kontrolle des gesamten Prozesses

Für diesen Test wird eine Negativkontrolle für den gesamten Prozess benötigt. Für jeden Lauf eine Negativkontrolle zu den Proben mitführen, beginnend mit der **DNA-Isolierung**.

DNA-Isolierung

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

Makrodissektion

Wenn der Tumorgehalt der Probe weniger als 10 % des Gewebeareals beträgt, muss die Probe im Rahmen der Probenvorbereitung einer Makrodissektion unterzogen werden.

DNA-Quantifizierung

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

Hinweis: Die DNA-Stammlösung gemäß den Angaben im Abschnitt **Transport, Lagerung und Haltbarkeit von Proben** aufbewahren.

1. Jede DNA-Stammlösung 5 Sekunden lang vortexen.
2. Die DNA mit einem Spektralphotometer gemäß den Anweisungen des Herstellers quantifizieren. **DNA EB** aus dem **cobas**® DNA Sample Preparation Kit als Blank für das Gerät verwenden. Es wird ein Mittelwert aus zwei konsistenten Messwerten benötigt. Die beiden Messungen dürfen nicht um mehr als ± 10 % voneinander abweichen, wenn die DNA-Konzentrationen bei $\geq 20,0$ ng/ μ l liegen. Bei DNA-Konzentrationen $< 20,0$ ng/ μ l dürfen die beiden Messungen nicht um mehr als ± 2 ng/ μ l voneinander abweichen. Wenn die beiden Messungen bei gemessenen DNA-Konzentrationen $\geq 20,0$ ng/ μ l um mehr als ± 10 % oder bei gemessenen DNA-Konzentrationen $< 20,0$ ng/ μ l um mehr als ± 2 ng/ μ l voneinander abweichen, müssen 2 zusätzliche Messungen durchgeführt werden, bis die Anforderungen erfüllt werden. In diesem Fall muss der Mittelwert aus diesen beiden neuen Messungen berechnet werden.

Hinweis: Die DNA-Stammlösung von der verarbeiteten Negativkontrolle (**NEG**) muss nicht gemessen werden.

3. Die Konzentration der DNA-Stammlösung von den Proben muss ≥ 2 ng/ μ l betragen, damit der **cobas** EGFR-Test durchgeführt werden kann. Pro Probe werden drei Amplifikations-/Detektions-Zyklen mit jeweils 25 μ l einer 2-ng/ μ l-Verdünnung der DNA-Stammlösung (insgesamt 50 ng DNA) durchgeführt.

Hinweis: Jede DNA-Stammlösung muss eine Konzentration von mindestens 2 ng/ μ l aufweisen, damit der **cobas** EGFR-Test durchgeführt werden kann. Wenn die Konzentration einer DNA-Stammlösung < 2 ng/ μ l beträgt, die Entparaffinierung, DNA-Isolierung und DNA-Quantifizierung für diese Probe unter Verwendung von zwei 5- μ m-FFPE-Gewebeschnitten wiederholen. Bei aufgezogenen Proben die Gewebe von beiden Gewebeschnitten nach der Entparaffinierung zusammen in ein Röhrchen geben, das Gewebe in **TLB + PK** aus dem **cobas** DNA Sample Preparation Kit eintauchen und anschließend die DNA-Isolierung und -Quantifizierung durchführen. Bei nicht aufgezogenen Proben die Gewebe von beiden Gewebeschnitten zusammen in ein Röhrchen geben und die Entparaffinierung, DNA-Isolierung und -Quantifizierung durchführen. Wenn die Konzentration der DNA-Stammlösung weiterhin < 2 ng/ μ l ist, einen anderen FFPE-Gewebeprobenschnitt vom Klinikauftraggeber anfordern.

Amplifikation und Detektion

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

Einrichtung des Instruments

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

Einrichtung der Testanforderung

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

Eine Plattenübersicht mit den Positionen aller Proben und Kontrollen des Laufs erstellen. In einem Lauf, der nur aus Gewebeproben besteht, wird die Mutationskontrolle in die Positionen **A01** bis **A03** auf der Platte geladen. Die Negativkontrolle wird in die Positionen **B01** bis **B03** auf der Platte geladen. Die verdünnten Proben werden dann von **C01** bis **C03** bis **H10** bis **H12** in Gruppen von 3 Spalten zugegeben (siehe Abbildung 2).

Der **cobas** EGFR-Test kann im gemischten Testmodus (z. B. EGFR-Gewebe mit EGFR-Plasma) durchgeführt werden. Die Kontrollpositionen hängen von den ausgewählten Tests und der Probenanzahl ab. Weitere Informationen zur Einrichtung eines gemischten Testlaufs finden Sie im Benutzerhandbuch und/oder in der Benutzerunterstützung des **cobas® 4800** Systems.

Abbildung 2 Anordnung der Platte für den cobas EGFR-Test

Reihe / Spalte	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

Legende: MC = Mutationskontrolle; NEG = Negativkontrolle; S Nr. = Proben-ID; MMX Nr. = Master-Mix-Reagenz 1, 2 oder 3 v2

Hinweis: Jede Probe muss auf drei zusammenhängende Spalten in einer Reihe aufgeteilt werden, um ein Ergebnis zu erhalten.

Hinweis: Gebrauchs-Master-Mix 1 muss in die Spalten 01, 04, 07 und 10 der Platte geladen werden. Gebrauchs-Master-Mix 2 muss in die Spalten 02, 05, 08 und 11 der Platte geladen werden. Gebrauchs-Master-Mix 3 v2 muss in die Spalten 03, 06, 09 und 12 der Platte geladen werden.

Hinweis: Es können bis zu 30 Proben auf eine einzelne Platte geladen werden. Wenn zur Verarbeitung aller Proben auf der Platte mehrere Reagenzkits benötigt werden, müssen diese alle aus der gleichen Charge stammen.

Berechnung der Verdünnung der DNA-Probenstammlösung

Berechnung der Verdünnung der DNA-Stammlösung für Konzentrationen von 2 ng/µl bis 36 ng/µl

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

Hinweis: Für jede Probe werden drei Amplifikations-/Detektions-Zyklen durchgeführt, für die ein Volumen von insgesamt 75 µl (jeweils 25 µl für jede der drei Reaktionen) einer 2-ng/µl-Verdünnung der DNA-Stammlösung (insgesamt 150 ng DNA) benötigt wird.

1. Für jede Probe das Volumen (µl) der benötigten DNA-Stammlösung berechnen:

$$\mu\text{l der DNA-Stammlösung} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div \text{Konzentration der DNA-Stammlösung [ng}/\mu\text{l}]$$

2. Für jede Probe das Volumen (µl) der benötigten **DNA SD** berechnen:

$$\mu\text{l DNA SD} = 90 \mu\text{l} - \mu\text{l DNA-Stammlösung}$$

Beispiel:

$$\text{Konzentration der DNA-Stammlösung} = 6,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

1. $\mu\text{l DNA-Stammlösung} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 6,5 \text{ ng}/\mu\text{l} = 27,7 \mu\text{l}$

2. $\mu\text{l DNA SD} = (90 \mu\text{l} - 27,7 \mu\text{l}) = 62,3 \mu\text{l}$

Berechnung der Verdünnung der DNA-Stammlösung für Konzentrationen > 36 ng/µl

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

Hinweis: Für jede Probe werden drei Amplifikations-/Detektions-Zyklen durchgeführt, für die ein Volumen von insgesamt 75 µl (jeweils 25 µl für jede der drei Reaktionen) einer 2-ng/µl-Verdünnung der DNA-Stammlösung (insgesamt 150 ng DNA) benötigt wird.

1. Für Konzentrationen der DNA-Stammlösung von > 36 ng/µl die Menge der **DNA SD**, die zur Herstellung von mindestens 90 µl der verdünnten DNA-Stammlösung benötigt wird, anhand der folgenden Formel berechnen. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass für jede Probe mindestens 5 µl der DNA-Stammlösung verwendet werden.
2. Für jede Probe das Volumen (µl) von **DNA SD** berechnen, das zum Verdünnen von 5 µl DNA-Stammlösung auf 2 ng/µl benötigt wird:

$$\text{Benötigtes DNA SD-Volumen in } \mu\text{l} = [(5 \mu\text{l DNA-Stammlösung} \times \text{Konzentration der DNA-Stammlösung in ng}/\mu\text{l}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l}$$

Beispiel:

$$\text{Konzentration der DNA-Stammlösung} = 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

1. Benötigtes **DNA SD**-Volumen in µl = $[(5 \mu\text{l} \times 100 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l} = 245 \mu\text{l}$

2. 5 µl der DNA-Stammlösung mit dem berechneten Volumen von **DNA SD** verdünnen.

Probenverdünnung

1. Die erforderliche Anzahl von 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen mit Einrastverschluss für die DNA-Verdünnungen mit den jeweiligen Probenbezeichnungen beschriften.
2. Mit einer Pipette mit Aerosol-undurchlässiger Spitze das berechnete Volumen von **DNA SD** in die beschrifteten Röhrchen pipettieren. 45 µl **DNA SD** in ein mit **NEG** beschriftetes Mikrozentrifugenröhrchen mit Einrastverschluss pipettieren.
3. Jede DNA-Stammlösung und die Negativkontrolle 5 bis 10 Sekunden lang vortexen.
4. Das berechnete Volumen jeder DNA-Probenstammlösung mit einer Pipette mit Aerosol-undurchlässiger Pipettenspitze (für jeden Pipettierschritt eine neue Spitze verwenden) vorsichtig in die jeweiligen Röhrchen mit **DNA SD** pipettieren. 45 µl Negativkontrolle (extrahiertes Eluat) in das **NEG**-Röhrchen pipettieren.
5. Die Röhrchen verschließen und jeweils 5 bis 10 Sekunden lang vortexen.
6. Die Handschuhe wechseln.

Vorbereitung der Reaktion

Herstellung der Gebrauchs-Master-Mixe (MMX-1, MMX-2 und MMX-3 v2)

Hinweis: *EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 und Gebrauchs-MMX sind lichtempfindlich und müssen über längere Zeiträume lichtgeschützt aufbewahrt werden.*

Hinweis: *Aufgrund der Viskosität der EGFR MMX-Reagenzien und des Gebrauchs-MMX langsam pipettieren, um sicherzustellen, dass das gesamte Gemisch von der Spitze dispensiert wird.*

Hinweis: *EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 und EGFR MMX-3 v2 können einen hellblauen bzw. violetten Farbton aufweisen. Die Leistung der Reagenzien wird dadurch nicht beeinträchtigt.*

In separaten 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen mit Einrastverschluss drei Gebrauchs-MMX herstellen: einen mit **EGFR MMX-1**, einen mit **EGFR MMX-2** und einen mit **EGFR MMX-3 v2**.

1. Das für jeden Gebrauchs-MMX benötigte Volumen von **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2** bzw. **EGFR MMX-3 v2** anhand der folgenden Formel berechnen:

$$\text{Benötigtes Volumen von EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 oder EGFR MMX-3 v2} = (\text{Anzahl der Proben} + 2 \text{ Kontrollen} + 1) \times 20 \mu\text{l}$$

2. Das für jeden Gebrauchs-MMX benötigte Volumen von **MGAC** anhand der folgenden Formel berechnen:

$$\text{Benötigtes Volumen von MGAC} = (\text{Anzahl der Proben} + 2 \text{ Kontrollen} + 1) \times 5 \mu\text{l}$$

Mit Hilfe von Tabelle 4 kann auf der Grundlage der Probenanzahl in einem Lauf das Volumen jedes Reagenzes bestimmt werden, das zur Herstellung des Gebrauchs-MMX benötigt wird.

Tabelle 4 Volumina der benötigten Reagenzien zur Herstellung von Gebrauchs-MMX-1, Gebrauchs-MMX-2 und Gebrauchs-MMX-3 v2

		Anz. Proben*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMX	20 µl	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260
MGAC	5 µl	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Gesamtvol. pro Gebrauchs-MMX (µl)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Die Volumina für die Anzahl der Proben basieren auf der Summe der Proben + 2 Kontrollen + 1

3. Die benötigte Anzahl von Fläschchen mit **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** und **MGAC** aus der Lagerung bei 2 °C bis 8 °C entnehmen. Jedes Reagenz vor dem Gebrauch 5 Sekunden lang vortexen und die Flüssigkeit unten im Röhrchen sammeln. Ein steriles Mikrozentrifugenröhrchen für Gebrauchs-MMX-1, Gebrauchs-MMX-2 und Gebrauchs-MMX-3 v2 kennzeichnen.
4. Das berechnete Volumen von **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2** bzw. **EGFR MMX-3 v2** in die jeweiligen Gebrauchs-MMX-Röhrchen geben.
5. Das berechnete Volumen von **MGAC** in die Gebrauchs-MMX-Röhrchen geben.
6. Die Röhrchen 3 bis 5 Sekunden lang vortexen, um die erforderliche Homogenität zu gewährleisten.

Hinweis: *Proben und Kontrollen müssen innerhalb von 1 Stunde nach der Herstellung der Gebrauchs-MMX auf die Mikrotiterplatte gegeben werden.*

Hinweis: *Es dürfen nur die Mikrotiterplatte und Versiegelungsfolie für das cobas® 4800 System verwendet werden.*

Vorbereitung der Platte

1. Jeweils 25 µl Gebrauchs-MMX in jede Reaktionskavität der Mikrotiterplatte geben, die für den Lauf benötigt wird. Die Pipettenspitze darf die Platte außerhalb der Kavität nicht berühren.
 - Gebrauchs-MMX-1 (mit **EGFR MMX-1**) nach Bedarf in die Kavitäten der Mikrotiterplatte in den Spalten 01, 04, 07 und 10 geben.
 - Gebrauchs-MMX-2 (mit **EGFR MMX-2**) nach Bedarf in die Kavitäten der Mikrotiterplatte in den Spalten 02, 05, 08 und 11 geben.
 - Gebrauchs-MMX-3 v2 (mit **EGFR MMX-3 v2**) nach Bedarf in die Kavitäten der Mikrotiterplatte in den Spalten 03, 06, 09 und 12 geben.
2. 25 µl **EGFR MC** in die Kavitäten **A01**, **A02** und **A03** der Mikrotiterplatte geben; durch mindestens zweimaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen.
3. Mit einer neuen Pipettenspitze 25 µl **NEG** in die Kavitäten **B01**, **B02** und **B03** der Mikrotiterplatte pipettieren; durch mindestens zweimaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen.

Hinweis: *Bei jedem Lauf muss **EGFR MC** in den Kavitäten **A01**, **A02** und **A03** sowie **NEG** in den Kavitäten **B01**, **B02** und **B03** mitgeführt werden, anderenfalls wird der Lauf vom cobas z 480 Analyzer für ungültig erklärt.*

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

4. Mit neuen Pipettenspitzen für jede verdünnte Proben-DNA 25 µl der ersten Proben-DNA in die Kavitäten **C01**, **C02** und **C03** der Mikrotiterplatte geben, dabei für die Zugabe der Proben-DNA in jede Kavität eine neue Spitze verwenden; die Flüssigkeit in jeder Kavität durch mindestens zweimaliges Auf- und Abpipettieren mischen. Dieses Verfahren für die DNA jeder Probe wiederholen und gemäß der Vorlage in Abbildung 2 alle DNA-Proben auf die Mikrotiterplatte geben. Die gesamte Flüssigkeit muss sich unten in den Kavitäten sammeln.
5. Die Mikrotiterplatte mit Versiegelungsfolie (im Lieferumfang der Platten enthalten) abdecken. Das Versiegelungsfolienwerkzeug verwenden, damit die Versiegelungsfolie fest auf der Mikrotiterplatte haftet.
6. Vor Beginn der PCR sicherstellen, dass sich die gesamte Flüssigkeit unten in den Kavitäten angesammelt hat.

Hinweis: *Amplifikation und Detektion müssen innerhalb von 1 Stunde nach Zugabe der ersten Proben-DNA-Verdünnung zum Gebrauchs-MMX gestartet werden.*

Starten der PCR

Ausführliche Anweisungen zum EGFR-Arbeitsablauf sind dem Benutzerhandbuch und/oder der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems zu entnehmen. Wenn das Popup-Fenster „Select Test“ angezeigt wird, „EGFR Tissue P1“ auswählen und auf „OK“ klicken.

Ergebnisse

Interpretation der Ergebnisse

Hinweis: Die gesamte Lauf- und Probenvalidierung wird von der cobas® 4800 software durchgeführt.

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

Bei einem gültigen Lauf werden die Probenergebnisse wie in Tabelle 5 dargestellt interpretiert.

Tabelle 5 Interpretation der cobas EGFR-Testergebnisse

Testergebnis	Mutationsergebnis	Interpretation
Mutation Detected	Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (Es können mehrere Mutationen vorhanden sein.)	Mutation in spezifischer EGFR-Zielregion detektiert
No Mutation Detected (NMD)*	k. A.	Mutation in den EGFR-Zielregionen nicht detektiert
Ungültig	k. A.	Probenergebnis ist ungültig. Proben mit einem ungültigen Ergebnis gemäß den Anweisungen unter Testwiederholung für Proben mit ungültigem Ergebnis neu testen.
Failed	k. A.	Lauf ist infolge eines Hardware- oder Software-Fehlers fehlgeschlagen. Den technischen Kundendienst der zuständigen Roche-Vertretung kontaktieren.

* Das Vorliegen einer Mutation in den EGFR-Zielregionen kann bei dem Ergebnis „No Mutation Detected“ nicht ausgeschlossen werden, da die Ergebnisse von prozentualen Mutationssequenzen, einer angemessenen Probenintegrität, der Abwesenheit von Inhibitoren und einer für die Detektion ausreichenden Menge an DNA abhängen.

Die Ergebnis-Flags werden auf der Registerkarte „Results“ (Bildschirm) angezeigt bzw. in der Spalte „Flags“ (Bericht) angegeben. Detaillierte Informationen sind dem Abschnitt **Ergebnis-Flags** zu entnehmen.

Testwiederholung für Proben mit ungültigem Ergebnis

1. Die Verdünnung der ungültigen DNA-Probenstammlösungen erneut vornehmen. Dabei mit den Anweisungen unter „Berechnung der Verdünnung der DNA-Probenstammlösung“ und „Probenverdünnung“ im Abschnitt **Amplifikation und Detektion** beginnen.

- Nach der Verdünnung der DNA-Stammlösung auf 2 ng/µl gemäß den Anweisungen unter „Probenverdünnung“ mit den Anweisungen unter „Herstellung der Gebrauchs-Master-Mixe“ (MMX-1, MMX-2 und MMX-3 v2) und dem übrigen Amplifikations- und Detektionsverfahren fortfahren.

Hinweis: Wenn die Probe auch nach der Testwiederholung weiterhin ungültig ist oder in Schritt 1 von **Testwiederholung für Proben mit ungültigem Ergebnis** nicht genügend DNA-Stammlösung zur Herstellung einer anderen Verdünnung vorhanden war, muss das gesamte Testverfahren für diese Probe ab der Entparaffinierung und DNA-Isolierung unter Verwendung eines neuen 5-µm-FFPE-Tumor-Gewebeschnitts wiederholt werden.

Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse

In jedem Lauf mit bis zu 30 Proben wird ein Satz aus **cobas** EGFR-Test-Mutationskontrolle (**EGFR MC**, Kavitäten **A01**, **A02** und **A03**) und Negativkontrolle (**NEG**, Kavitäten **B01**, **B02** und **B03**) für Gebrauchs-MMX-1, Gebrauchs-MMX-2 und Gebrauchs-MMX-3 v2 mitgeführt. Ein Lauf ist gültig, wenn **EGFR MC** und **NEG** gültig sind. Wenn eine **EGFR MC** oder **NEG** ungültig ist, ist der gesamte Lauf ungültig und muss wiederholt werden. Eine frische Verdünnung der zuvor isolierten DNA-Probenstammlösung ansetzen, um für die Amplifikation und Detektion eine neue Mikrotiterplatte mit Kontrollen vorzubereiten.

Mutationskontrolle

Das Ergebnis der **EGFR MC** muss gültig sein („Valid“). Wenn die Ergebnisse der **EGFR MC** durchweg ungültig sind, den technischen Kundendienst der zuständigen Roche-Vertretung verständigen.

Negativkontrolle

Das Ergebnis der **NEG** muss gültig sein („Valid“). Wenn die Ergebnisse für **NEG** durchweg ungültig sind, den technischen Kundendienst der zuständigen Roche-Vertretung verständigen.

Verfahrenseinschränkungen

- Nur das angegebene Probenmaterial testen. Der **cobas** EGFR-Test wurde für die Verwendung mit NSCLC-FFPE-Tumor-Gewebeproben validiert.
- Der **cobas** EGFR-Test wurde nur mit dem **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (Roche P/N 05985536190) validiert.
- Die Detektion einer Mutation hängt von der Anzahl der in der Probe enthaltenen Kopien ab und kann durch die Probenintegrität, die Menge der isolierten DNA und das Vorliegen von Störsubstanzen beeinflusst werden.
- Zuverlässige Ergebnisse sind nur bei Anwendung sachgemäßer Verfahren für Fixierung, Transport, Lagerung und Bearbeitung der Proben gewährleistet. Die Vorgehensweisen in der Gebrauchsanweisung des **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190), dieser Gebrauchsanweisung sowie im Benutzerhandbuch und/oder in der Benutzerunterstützung des **cobas**® 4800 Systems sind zu befolgen.
- Die Auswirkungen anderer potenzieller Variablen, wie z. B. Variablen der Probenfixierung, wurden nicht evaluiert.
- Die Zugabe des Enzyms AmpErase zum Master-Mix des **cobas** EGFR-Tests ermöglicht eine selektive Amplifikation der Ziel-DNA; es ist jedoch gute Laborpraxis sowie die genaue Einhaltung der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren erforderlich, um eine Kontamination von Reagenzien zu vermeiden.
- Dieses Produkt darf nur von Personal verwendet werden, das in der PCR-Technik und der Verwendung des **cobas**® 4800 Systems geschult ist.
- Für die Verwendung mit diesem Produkt wurde ausschließlich der **cobas z** 480 Analyzer validiert. Es darf kein anderer Thermocycler mit optischer Echtzeit-Detektion mit diesem Produkt verwendet werden.

9. Bevor Benutzer von einer Methode zu einer anderen wechseln, sollten sie aufgrund der inhärenten Unterschiede zwischen den Verfahren in ihrem Labor Korrelationsstudien durchführen, um die Unterschiede der Techniken aufzuzeigen.
10. Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren kann zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen.
11. Mutationen in den Regionen der genomischen DNA des EGFR-Gens, die durch die Primer oder Sonden des **cobas** EGFR-Tests abgedeckt sind, treten zwar selten auf, können jedoch dazu führen, dass eine Mutation in den Exons 18, 19, 20 und 21 nicht nachgewiesen wird (Ergebnis „No Mutation Detected“).
12. Der **cobas** EGFR-Test zeigt eine Kreuzreaktivität (Ergebnis „Mutation Detected“) mit der Mutation L747S in Exon 19, einer seltenen erworbenen Mutation, die zu einer Resistenz gegenüber der Behandlung mit TKI führen kann.¹⁹
13. Der **cobas** EGFR-Test wurde für die Verwendung mit einer DNA-Menge von 50 ng pro Kavität validiert. Von DNA-Mengen unter 50 ng pro Kavität wird abgeraten.
14. Beim **cobas** EGFR-Test handelt es sich um einen qualitativen Test. Er dient nicht zur quantitativen Bestimmung des Mutationsgrades.
15. Enthalten NSCLC-FFPE-Gewebeproben zersetzte DNA, so kann dies die Detektionsleistung des Tests in Bezug auf EGFR-Mutationen beeinträchtigen.
16. Proben, für die das Ergebnis „No Mutation Detected“ erzielt wird, können EGFR-Mutationen enthalten, die mit dem Test nicht nachgewiesen werden.
17. Der **cobas** EGFR-Test ist zum Nachweis von EGFR-Mutationen in NSCLC-Patienten mit Substitutionsmutationen (G719X) in Exon 18, Deletionsmutationen in Exon 19, Insertionsmutationen und Substitutionsmutationen (T790M, S768I) in Exon 20 sowie Substitutionsmutationen (L858R, L861Q) in Exon 21 vorgesehen. Andere EGFR-Mutationen werden von dem Test nicht erkannt.

Nichtklinische Leistungsmerkmale

Hinweis: Die folgenden Studienbeschreibungen umfassen Daten, die mit v1 und v2 des **cobas** EGFR-Tests erfasst wurden.

Der prozentuale Tumorgehalt wurde bei den nachfolgend beschriebenen nicht-klinischen Studien durch pathologische Untersuchungen bestimmt. Die Proben wurden mittels bidirektionaler Sanger-Sequenzierung und Hochdurchsatz-Sequenzierung (NGS, Next Generation Sequencing) für die Tests ausgewählt. Der Mutationsgrad der NSCLC-FFPE-Gewebeproben wurde mittels NGS bestimmt.

Analytische Sensitivität – Leerwertgrenze

Es wurden Proben ohne Template und NSCLC-FFPE-Gewebeproben vom EGFR-Wildtyp evaluiert, um die Leistung des **cobas** EGFR-Tests in der Abwesenheit von Template zu bewerten und sicherzustellen, dass eine Leerprobe kein analytisches Signal erzeugt, das eine niedrige Mutationskonzentration anzeigen könnte. Die gemäß der Richtlinie CLSI EP17-A2²⁰ bestimmte Leerwertgrenze beträgt bei allen Mutationen 0.

Nachweisgrenze bei FFPE-Gewebeprobenmischungen

Es wurden DNA-Extrakte von drei FFPE-Gewebeproben mit Deletionsmutationen in Exon 19, vier FFPE-Gewebeproben mit der Mutation L858R, zwei FFPE-Gewebeproben mit den beiden Mutationen L858R und T790M, zwei FFPE-Gewebeproben mit der Mutation G719A, einer FFPE-Gewebeprobe mit den beiden Mutationen T790M und G719A, einer FFPE-Gewebeprobe mit den beiden Mutationen G719C und S768I, einer FFPE-Gewebeprobe mit den beiden Mutationen S768I und G719S, drei FFPE-Gewebeproben mit einer Insertionsmutation in Exon 20 und drei FFPE-Gewebeproben mit der Mutation L861Q mit den Extrakten von FFPE-Gewebeproben des EGFR-Wildtyps vermischt, um Probenmischungen mit den Mutationsgraden 10, 5,0, 2,5 und 1,25 % zu erhalten. Der Mutationsgrad wurde dabei mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung (NGS) bestimmt, einer Methode, die für die Detektion von EGFR-Mutationen in den Exons 18, 19, 20

und 21 validiert war. Von jeder Probenmischung wurden Reihenverdünnungen hergestellt; anschließend wurden acht Replikate jeder Panelprobe mit drei verschiedenen **cobas** EGFR-Testkit-Chargen getestet (n = 24/Panelprobe). Die Nachweisgrenze jeder Probe wurde anhand der geringsten DNA-Menge bestimmt, mit der eine „Mutation Detected“-Rate für EGFR von mindestens 95 % für die Zielmutation erhalten wurde (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6 Nachweisgrenze des cobas EGFR-Tests für FFPE-Gewebeprobenmischungen

EGFR-Exon	EGFR-Mutationsgruppe	EGFR-Nukleinsäuresequenz	Mutationsgrad der Panelprobe zum Erreichen einer „Mutation Detected“-Ergebnisrate von ≥ 95 % mit einer DNA-Menge von 50 ng pro Kavität (N = 24 Replikate)	COSMIC-ID 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	Exon-19-Deletion	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	Nicht gefunden		
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
	Exon-20-Insertion	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

* Für diese nicht-prädominanten Deletionen in Exon 19 in der EURTAC-Kohorte wurde nur eine einzelne Zielkonzentration mit einem Mutationsgrad von etwa 5 % getestet. Die Proben-DNA-Mischungen wurden in 3 Studienzentren getestet.

** Die Nachweisgrenze des **cobas** EGFR-Tests für diese Mutation liegt bei einer Standardmenge von 50 ng pro Kavität über dem Mutationsgrad von 10 %.

Diese Untersuchung zeigt, dass EGFR-Mutationen in den Exons 18, 19, 20 und 21 mit einem Mutationsgrad von mindestens 5 % unter Verwendung einer Standardkonzentration von 50 ng pro Kavität mit dem **cobas** EGFR-Test nachgewiesen werden können.

Mindest-Tumorgehalt

Insgesamt wurden 66 unabhängige EGFR-Mutationsproben (35 Deletionsmutationen in Exon 19 und 31 L858R-Mutationen in Exon 21) mit einem Tumorgehalt zwischen 25 % und 99 % getestet, um den Tumorgehalt zu bestimmen, der für den Nachweis der EGFR-Mutation in NSCLC-Proben mindestens erforderlich ist. In keiner dieser untersuchten Proben lag sowohl eine Exon-19-Deletion als auch eine L858R-Mutation in Exon 21 vor. Jede Probe wurde sowohl ohne Makrodissektion (unverdünnt) als auch nach einer Makrodissektion getestet. Die ermittelten CtR-Werte für die Objektträger vor und nach der Makrodissektion wurden mittels Deming-Regressionsanalyse und Bland-Altman-Diagramm (Differenzen gegen Mittelwert) analysiert. Den Ergebnissen zufolge sollten Proben mit einem Tumorgehalt von mehr als 25 % ohne Makrodissektion verwendet werden.

Es wurden 10 weitere NSCLC-Proben des EGFR-Wildtyps (Tumorgehalt 1–90 %) und 10 EGFR-Mutationsproben (Tumorgehalt 8–95 %) getestet, um zu bestimmen, ob die Nachweisbarkeit von NSCLC-Gewebeproben mit niedrigem Tumorgehalt mit dem **cobas** EGFR-Test durch eine Makrodissektion verbessert werden kann. Jede Probe wurde sowohl ohne Makrodissektion (unverdünnt) als auch nach einer Makrodissektion getestet. Alle Ergebnisse für die Proben mit und ohne Makrodissektion stimmten überein und es wurden für alle 20 Proben die erwarteten Ergebnisse (Mutation oder Wildtyp) erhalten.

In der Phase-III-Studie EURTAC zur Untersuchung von Erlotinib im Vergleich zu einer Cisplatin-basierten Chemotherapie wurden NSCLC-FFPE-Gewebeproben mit einem Tumorgehalt von weniger als 10 % vor der EGFR-Mutationsanalyse einer Makrodissektion unterzogen. Bei einem Teil der im Rahmen der EURTAC-Studie untersuchten Proben wurde der EGFR-Mutationsstatus sowohl mit Hilfe des **cobas**® EGFR-Tests als auch mit Hochdurchsatz-Sequenzierung (NGS) bewertet. In Tabelle 7 und Tabelle 8 sind die NSCLC-Proben mit gültigen gepaarten Ergebnissen für EGFR-Mutationen in Exon 19 oder L858R-Mutationen aufgeführt, die sowohl mit dem **cobas**® EGFR-Test als auch mit Hochdurchsatz-Sequenzierung analysiert wurden. Die Ergebnisse belegen mit Hochdurchsatz-Sequenzierung als Referenzmethode, dass eine Makrodissektion der NSCLC-FFPE-Gewebeschnitte mit einem Tumorgehalt von weniger als 10 % eine vergleichbare analytische Genauigkeit ergab wie NSCLC-FFPE-Gewebeschnitte ohne Makrodissektion.

Die beiden Studien belegen, dass NSCLC-FFPE-Gewebeschnitte mit einem Tumorgehalt von weniger als 10 % vor der Durchführung der Analyse mit dem **cobas** EGFR-Test einer Makrodissektion unterzogen werden müssen.

Tabelle 7 Leistung des cobas EGFR-Tests für NSCLC-FFPE-Gewebeproben mit einem Tumorgehalt ≤ 10 % (mit Makrodissektion)

Übereinstimmung	Prozentuale Übereinstimmung (N)	95-%-KI
Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA)	97,2 % (35/36)	85,8 %, 99,5 %
Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA)	94,5 % (52/55)	85,1 %, 98,1 %
Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA)	95,6 % (87/91)	89,2 %, 98,3 %

Tabelle 8 Leistung des cobas EGFR-Tests für NSCLC-FFPE-Gewebeproben mit einem Tumorgehalt > 10 % (ohne Makrodissektion)

Übereinstimmung	Prozentuale Übereinstimmung (N)	95-%-KI
Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA)	93,0 % (107/115)	86,9 %, 96,4 %
Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA)	98,5 % (199/202)	95,7 %, 99,5 %
Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA)	96,5 % (306/317)	93,9 %, 98,1 %

Kreuzreaktivität mit anderen Mutationen in Exon 18, 19, 20 und 21

Proben aus der EURTAC-Studie

Bei den folgenden EGFR-Mutationen, die in Proben aus der klinischen Studie EURTAC beobachtet wurden, lieferte der **cobas** EGFR-Test das Ergebnis „Mutation Detected“ (Mutation erkannt) (Tabelle 9). Die analytische Leistung des **cobas** EGFR-Tests bei der Detektion dieser Mutationen wurde nicht untersucht.

Tabelle 9 In der EURTAC-Kohorte beobachtete Mutationen, für die Kreuzreaktivität mit dem **cobas** EGFR-Test ermittelt wurde

Exon	Mutationssequenz	Änderung der Aminosäuresequenz	COSMIC-ID ¹⁴
19	2236_2252>AT	E746_T751>I	26680
	2239_2253>CAA	L747_T751>Q	51527
	2234_2251>AAT	K745_T751>K	Nicht gefunden
	2236_2244del9	E746_R748>E	Nicht gefunden
	2236_2263>GAAGCAT	E746_A755>E	Nicht gefunden
	2237_2251>AAC	E746_751T>E	Nicht gefunden

Proben aus der AURA2-Studie

Bei der folgenden EGFR-Mutation, die in Proben aus der klinischen Studie AURA2 beobachtet wurde, lieferte der **cobas** EGFR-Test das Ergebnis „Mutation Detected“ (Mutation erkannt) (Tabelle 10). Die analytische Leistung des **cobas** EGFR-Tests bei der Detektion dieser Mutation wurde nicht untersucht.

Tabelle 10 In der AURA2-Studie beobachtete Mutationen, für die Kreuzreaktivität mit dem **cobas** EGFR-Test ermittelt wurde

Exon	Mutationssequenz	Änderung der Aminosäuresequenz	COSMIC-ID ¹⁴
21	2572_2573CT>AG	L858R	13553

Spezifität – Mikroorganismen und EGFR-Homologe

Die Spezifität des **cobas** EGFR-Tests wurde anhand von Mikroorganismen der Lunge und EGFR-homologen Plasmiden bewertet. Zu den letzteren gehören Plasmide, die jeweils Sequenzen der genetischen Regionen HER2, HER3 und HER4 enthalten, analog zu den mit dem **cobas** EGFR-Test amplifizierten Sequenzen in den EGFR-Exons 18, 19, 20 und 21.

Mikroorganismen der Lunge

Streptococcus pneumoniae und *Haemophilus influenzae* zeigten beim **cobas** EGFR-Test keine Kreuzreaktivität und führten zu keiner Störung der Detektion, als sie während der Gewebelyse mit 4×10^5 CFU den Proben mit den Wildtyp- und mutierten EGFR-Sequenzen zugegeben wurden.

EGFR-homologe Plasmide

Strukturell verwandte epidermale Rezeptor-Tyrosinkinase-Proteine (EGFR/HER1, HER2, HER3 und HER4) zeigten keine Kreuzreaktivität mit dem **cobas** EGFR-Test, als die potenziell kreuzreaktive Sequenz mit einer genomischen Kopienzahl, die einer PCR-Menge von 50 ng entspricht, vor der Amplifikation/Detektion der isolierten DNA-Stammlösung zugegeben wurde. Es wurde eine Kontrollbedingung ohne Plasmid-DNA eingeschlossen. Die nachgewiesenen Mutationen für alle 15 getesteten FFPE-Gewebeproben stimmten mit den gemäß Sequenzierung bestimmten Mutationen überein, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit der HER-Plasmid-DNA. Die EGFR-Mutation L747S in Exon 19 wurde ebenfalls auf Kreuzreaktivität getestet. Der **cobas** EGFR-Test zeigte Kreuzreaktivität mit der EGFR-Mutation L747S in Exon 19.

Störeinflüsse

Triglyceride (37 mM, empfohlene hohe Konzentration nach CLSI²¹) und Hämoglobin (2 mg/ml, empfohlene hohe Konzentration nach CLSI²¹) führten bei einer Zugabe der potenziellen Störsubstanz während des Lyseschritts der Probenvorbereitung nicht zu einer Störung des **cobas** EGFR-Tests.

Albuterol (Ventolin), Ipratropium (Atrovent), Fluticason (Flonase), Ceftazidim (Fortaz), Imipenem-Cilastin (Primaxin), Piperacillin-Tazobactam, Cilastin (Cilastatin-Natrium), Betadine und Lidocain zeigten keine Störung des **cobas** EGFR-Tests, als sie bei der Probenvorbereitung im Lyseschritt zugegeben wurden.

Nekrotisches Gewebe

NSCLC-FFPE-Gewebeproben mit einem Gehalt von nekrotischem Gewebe von bis zu 60 % für EGFR-Mutationen und von bis zu 85 % bei Wildtyp-Proben führten bei der Bestimmung des Mutationsstatus mit dem **cobas** EGFR-Test zu keiner Störung.

Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit des **cobas** EGFR-Tests wurde anhand von sechs FFPE-Gewebeproben evaluiert: zwei EGFR-Wildtyp-Proben sowie vier Proben mit EGFR-Mutationen, davon eine mit Deletion in Exon 19, eine mit S768I und G719X, eine mit T790M und L858R und eine mit Insertionsmutationen in Exon 20. Diese Proben wurden über vier Tage mit zwei verschiedenen Reagenzchargen, zwei **cobas z 480** Analyzern und von zwei Anwendern in Doppelbestimmungen getestet. Pro Probe wurden insgesamt 32 Replikate getestet. Die Testgenauigkeit des **cobas** EGFR-Tests betrug dabei 96,9 % (186/192).

In einer zweiten Studie wurde auch die Wiederholbarkeit des **cobas** EGFR-Tests anhand von vier FFPE-Gewebeproben evaluiert (einer EGFR-Wildtyp-Probe sowie drei mutierten EGFR-FFPE-Gewebeproben, davon eine mit L861Q, eine mit G719X und eine mit Insertionsmutationen in Exon 20). Die Proben wurden über mehrere Tage mit zwei verschiedenen Reagenzchargen, zwei **cobas z 480** Analyzern und von zwei Anwendern in Doppelbestimmungen getestet. Die Testgenauigkeit des **cobas** EGFR-Tests betrug über alle Replikate, Anwender, Reagenzchargen und Geräte insgesamt 99,2 % (127/128).

Reproduzierbarkeit beim Umgang mit Proben

Die Reproduzierbarkeit des **cobas**® DNA Sample Preparation Kits wurde anhand von Gewebeschnitten aus drei FFPE-Gewebeprobenblocks untersucht: ein Gewebeschnitt mit Exon-19-Deletion, einer mit L858R-Mutation und ein Wildtyp. Jede Probe wurde in jedem Testzentrum jeden Tag in Doppelbestimmung getestet. Die Gewebeschnitte für eine Probe wurden jeweils randomisiert und über einen Zeitraum von sechs Tagen an drei Testzentren von einem Anwender pro Zentrum mit einem **cobas z 480** Analyzer pro Zentrum, drei Chargen des **cobas**® DNA Sample Preparation Kits und einer Charge des **cobas** EGFR-Tests getestet. An jedem Testtag wurde von jedem Anwender die DNA aus zwei NSCLC-FFPE-Gewebeschnitten pro Probe isoliert und mit dem **cobas** EGFR-Test getestet. Für alle Proben wurden an allen sechs Testtagen gültige und korrekte Ergebnisse erzielt. Die Testgenauigkeit des **cobas** EGFR-Tests betrug zusammen für alle Proben und Benutzer 100 % (108/108).

Klinische Leistungsmerkmale

Klinische Studie 1 zur Reproduzierbarkeit

Es wurde eine externe Studie zur Reproduzierbarkeit des **cobas** EGFR-Tests durchgeführt. Dazu wurde ein aus 13 Proben bestehendes DNA-Proben-Panel aus FFPE-Gewebeschnitten vom NSCLC-Wildtyp (WT) und vom mutierten Typ (MT) an 3 externen Testzentren (2 Anwender pro Zentrum) mit 3 Reagenzchargen an 5 nicht aufeinander folgenden Tagen getestet. Die L858R-Mutation in Exon 21 und fünf verschiedene Exon-19-Deletionen waren in dem Panel enthalten. 90 der 92 Läufe (97,8 %) waren gültig. Mit den 13 Panelproben wurden in 90 gültigen Läufen insgesamt 2.340 Tests durchgeführt; alle Testergebnisse waren gültig. In 180 gültigen Tests der WT-Panelproben wurden keine Mutationen erkannt, was einer Übereinstimmung von 100 % entspricht. Für 10 der 12 MT-Panelproben betrug die Übereinstimmung 100 %. Für die Panelprobe EX19_2240_2257del18 (5 % Mutation) betrug die Übereinstimmung 62,8 % (67 der 180 Testergebnisse lauteten „No Mutation Detected“). Für die Panelprobe EX19_2240_2257del18 (10 % Mutation) betrug die Übereinstimmung 99,4 % (1 der 180 Testergebnisse lautete „No Mutation Detected“). Die Ergebnisse der Gesamtübereinstimmung sind in Tabelle 11 dargestellt. Der Variationskoeffizient (VK) lag bei allen Mutationspanelproben bei < 6 %. Innerhalb jeder Panelprobe lag der VK bei < 3,5 %. Der Gesamt-VK für die externe Kontrolle lag bei < 1,3 %. Der VK zwischen den Chargen lag bei < 0,5 % und der VK innerhalb einer Charge bei < 1,2 %.

Tabelle 11 Werte der Gesamtübereinstimmung pro Panelprobe in der Studie 1 zur Reproduzierbarkeit des cobas EGFR-Tests

Panelprobe	Anzahl gültiger Tests	Übereinstimmung (N)	Übereinstimmung in % (95 % KI) ^a
Wildtyp	180	180	100 (98,0; 100,0)
EX19_2235_2249del15 – 5 % Mutation	180	180	100 (98,0; 100,0)
EX19_2235_2249del15 – ≤ 10 % Mutation	180	180	100 (98,0; 100,0)
EX19_2236_2250del15 – 5 % Mutation	180	180	100 (98,0; 100,0)
EX19_2236_2250del15 – ≤ 10 % Mutation	180	180	100 (98,0; 100,0)
EX19_2239_2248>C – 5 % Mutation	180	180	100 (98,0; 100,0)
EX19_2239_2248>C – ≤ 10 % Mutation	180	180	100 (98,0; 100,0)
EX19_2240_2254del15 – 5 % Mutation	180	180	100 (98,0; 100,0)
EX19_2240_2254del15 – ≤ 10 % Mutation	180	180	100 (98,0; 100,0)
EX19_2240_2257del18 – 5 % Mutation	180	113	62,8 (55,3; 69,9)*
EX19_2240_2257del18 – ≤ 10 % Mutation	180	179	99,4 (96,9; 100,0)*
EX21_2573T>G=L858R – 5 % Mutation	180	180	100 (98,0; 100,0)
EX21_2573T>G=L858R – ≤ 10 % Mutation	180	180	100 (98,0; 100,0)

Hinweis: Die Ergebnisse stimmten überein, wenn eine MT-Panelprobe ein gültiges „Mutation Detected“-Ergebnis erzielte oder wenn eine Wildtyp-Panelprobe ein gültiges „No Mutation Detected“-Ergebnis erzielte.

^a 95%-KI = exaktes binomisches Konfidenzintervall von 95 %.

* Die analytische Sensitivität des **cobas** EGFR-Tests zum Nachweis dieser Mutation liegt bei einer Standardmenge von 50 ng pro Kavität über dem Mutationsgrad von 10 %.

Klinische Studie 2 zur Reproduzierbarkeit

Es wurde eine externe Studie zur Reproduzierbarkeit des cobas EGFR-Tests durchgeführt. Dazu wurde ein aus 11 Proben bestehendes DNA-Probenpanel aus FFPE-Gewebeschnitten vom NSCLC-WT und von mutierten Tumorproben an 3 Testzentren (2 extern und 1 intern, 2 Anwender pro Zentrum) mit 3 Reagenzchargen an 5 nicht aufeinander folgenden Tagen getestet. Das Panel umfasste die Exon-18-Mutation G719X, die Exon-20-Mutation T790M, die Exon-20-Mutation S768I, die Exon-20-Insertionsmutation und die Exon-21-Mutation L861Q. 90 der 91 Läufe (98,9 %) waren gültig. Mit den in Doppelbestimmung getesteten 11 Panelproben wurden in 90 gültigen Läufen insgesamt 1.980 Tests durchgeführt; alle Testergebnisse waren gültig. In 180 gültigen Tests der WT-Panelproben wurden keine Mutationen erkannt, was einer Übereinstimmung von 100 % entspricht. Bei allen Mutationspanelproben mit Ausnahme der LoD-Probe mit Exon-20-Insertion betrug die Übereinstimmung 100 %. Die Ergebnisse der Gesamtübereinstimmung sind in Tabelle 12 dargestellt. Der VK lag bei allen Mutationspanelproben bei < 9,2 %. Der Gesamt-VK für die externe Kontrolle lag bei ≤ 1,3 %. Der VK zwischen den Chargen lag bei ≤ 0,6 % und der VK innerhalb einer Charge bei ≤ 1,1 %.

Tabelle 12 Werte der Gesamtübereinstimmung pro Panelprobe in der Studie 2 zur Reproduzierbarkeit des cobas EGFR-Tests

Panelprobe	Anzahl gültiger Tests	Übereinstimmung (N)	Übereinstimmung in % (95-%-KI)*
Wildtyp	180	180	100 (98,0; 100,0)
Exon 18 G719X – LoD	180	180	100 (98,0; 100,0)
Exon 20 T790M – LoD	180	180	100 (98,0; 100,0)
Exon 20 S768I – LoD	180	180	100 (98,0; 100,0)
Exon 20 Insertion – LoD	180	166	92,2 (87,3; 95,7)
Exon 21 L861Q – LoD	180	180	100 (98,0; 100,0)
Exon 18 G719X – 2 × LoD	180	180	100 (98,0; 100,0)
Exon 20 T790M – 2 × LoD	180	180	100 (98,0; 100,0)
Exon 20 S768I – 2 × LoD	180	180	100 (98,0; 100,0)
Exon 20 Insertion – 2 × LoD	180	180	100 (98,0; 100,0)
Exon 21 L861Q – 2 × LoD	180	180	100 (98,0; 100,0)

Hinweis: Die Ergebnisse stimmten überein, wenn die Panelprobe eines mutierten Typs ein gültiges „Mutation Detected“-Ergebnis für die Zielmutation erzielte oder wenn eine Wildtyp-Panelprobe ein gültiges „NMD“-Ergebnis erzielte.

* 95-%-KI = exaktes binomisches 95-%-Konfidenzintervall.

KI = Konfidenzintervall; LoD = Nachweisgrenze; NMD = keine Mutation erkannt (No Mutation Detected)

Korrelation mit der Referenzmethode unter Verwendung von Phase-III-Proben aus der EURTAC-Studie

Die klinische Leistung des **cobas** EGFR-Tests wurde durch den Vergleich mit zwei Referenzmethoden bewertet: 2fache bidirektionale Sanger-Sequenzierung und quantitative Hochdurchsatz-Sequenzierung (NGS). Dazu wurden 487 formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Lungentumorproben von Patienten mit NSCLC im fortgeschrittenen Stadium verwendet, die das Screening der Phase-III-Studie EURTAC (TARCEVA® (Erlotinib) im Vergleich zur Cisplatin-basierten Chemotherapie) durchlaufen hatten.^{6, 22} Die klinischen und demografischen Merkmale der Patienten, deren Proben für diesen retrospektiven Test zur Verfügung standen, waren mit denen anderweitig geeigneter Patienten (557) vergleichbar, deren Proben nicht für ein erneutes Testen zur Verfügung standen.

Es wurden insgesamt 1.276 Patienten im Rahmen der EURTAC-Studie untersucht, wobei eine Kombination mehrerer im Labor entwickelter Tests zum Einsatz kam, die zusammen als Clinical Trial Assay (CTA) bezeichnet werden. Nach Ausschluss nicht geeigneter Patienten und von Patienten ohne CTA-Ergebnisse wurden 1044 Patienten potenziell in diese Studie übernommen. Von den 1.044 geeigneten Patienten wurden für die Proben von 225 Patienten mit dem CTA ein positives Mutationsergebnis erzielt, die Proben von 792 Patienten waren laut CTA WT-Proben, und für die Proben von 27 Patienten ergab der CTA keine eindeutigen Ergebnisse. Von den 1.044 potenziell geeigneten Patienten standen 487 Proben für eine erneute Analyse mit dem **cobas** EGFR-Test zur Verfügung.

Alle 487 Proben wurden in einem verblindeten Design sowohl mit dem **cobas** EGFR-Test als auch mittels Sanger-Sequenzierung getestet. Davon ergaben 406 Proben gültige Ergebnisse im **cobas** EGFR-Test und in der Sanger-Sequenzierung, 38 Ergebnisse waren im **cobas** EGFR-Test und in der Sanger-Sequenzierung ungültig, 38 Ergebnisse waren nur in der Sanger-Sequenzierung ungültig und 5 Ergebnisse waren nur im **cobas** EGFR-Test ungültig. Von den 487 Proben, die für eine erneute Analyse mit dem **cobas** EGFR-Test zur Verfügung standen, wurde für 444 Proben ein gültiges Ergebnis mit dem **cobas** EGFR-Test erzielt; diese wurden auch mittels NGS getestet. Davon waren 36 Ergebnisse in der NGS ungültig; es gab 408 Ergebnisse, die sowohl im **cobas** EGFR-Test als auch in der NGS gültig waren. Die analytische Genauigkeit des **cobas** EGFR-Tests im Vergleich zu den einzelnen Referenzmethoden wurde durch die Ermittlung der prozentualen positiven Übereinstimmung, der prozentualen negativen Übereinstimmung und der prozentualen Gesamtübereinstimmung sowie den jeweiligen 95-%-Konfidenzintervallen für Exon-19-Deletionen und L858R-Mutationen in Kombination und einzeln evaluiert.

In der EURTAC-Kohorte wurden mit dem **cobas** EGFR-Test die in Tabelle 13 aufgeführten Deletionen in Exon 19 und Exon 21 des EGFR-Gens nachgewiesen. Für die in Tabelle 6 aufgeführten Mutationen unter den in der EURTAC-Kohorte nachgewiesenen Mutationen wurde die analytische Sensitivität belegt.

Tabelle 13 Mit dem cobas EGFR-Test nachgewiesene Mutationen in der EURTAC-Kohorte

Exon	Mutationssequenz	Änderung der Aminosäuresequenz	COSMIC-ID 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	Nicht gefunden
	2236_2244del9	E746_R748>E	Nicht gefunden
	2236_2263>GAAGCAT	E746_A755>E	Nicht gefunden
	2237_2251>AAC	E746_751T>E	Nicht gefunden
	2239_2257>GT	L747_P753>V	Nicht gefunden
21	2573 T>G	L858R	6224

Es wurden insgesamt 406 Proben mit gültigen Ergebnissen für den **cobas** EGFR-Test und die Sanger-Sequenzierung in die Übereinstimmungsanalyse einbezogen. Beim gleichzeitigen Nachweis von Exon-19-Deletionen und L858R-Mutationen (siehe Tabelle 14) lag die positive Übereinstimmung zwischen dem **cobas** EGFR-Test und der Sanger-Sequenzierung bei 96,6 % (95%-KI: 91,5 % bis 98,7 %) und die negative Übereinstimmung bei 88,3 % (95%-KI: 84,1 % bis 91,5 %). Die Gesamtübereinstimmung betrug 90,6 %, wobei die untere Grenze des 95%-KI über 87 % lag. Positive, negative und Gesamtübereinstimmung beim Nachweis der Exon-19-Deletionen lagen bei > 92 %. Positive, negative und Gesamtübereinstimmung beim Nachweis der L858R-Mutationen lagen bei > 95 %.

Tabelle 14 Vergleich zwischen dem cobas EGFR-Test und Sanger-Sequenzierung zum Nachweis von EGFR-Deletionen in Exon 19 und L858R-Mutationen

Mutation	Übereinstimmung	Prozentuale Übereinstimmung (N)	95%-KI
Exon-19-Deletion	Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA)	97,3 % (71/73)	90,5 %, 99,2 %
	Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA)	92,5 % (308/333)	89,2 %, 94,9 %
	Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA)	93,3 % (379/406)	90,5 %, 95,4 %
L858R	Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA)	95,3 % (41/43)	84,5 %, 98,7 %
	Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA)	97,5 % (354/363)	95,4 %, 98,7 %
	Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA)	97,3 % (395/406)	95,2 %, 98,5 %
Gleichzeitig	Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA)	96,6 % (112/116)	91,5 %, 98,7 %
	Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA)	88,3 % (256/290)	84,1 %, 91,5 %
	Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA)	90,6 % (368/406)	87,4 %, 93,1 %

Es wurden insgesamt 408 Proben mit gültigen Ergebnissen im **cobas** EGFR-Test und in der NGS in die Übereinstimmungsanalyse einbezogen. Beim gleichzeitigen Nachweis von Exon-19-Deletionen und L858R-Punktmutationen (siehe Tabelle 15) lag die positive Übereinstimmung zwischen dem **cobas** EGFR-Test und NGS bei 94,0 % (95-%-KI: 89,1 % bis 96,8 %) und die negative Übereinstimmung bei 97,7 % (95-%-KI: 95,0 % bis 98,9 %). Die Gesamtübereinstimmung betrug 96,3 %, wobei die untere Grenze des 95-%-KI bei 94,0 % lag. Positive, negative und Gesamtübereinstimmung beim Nachweis der Exon-19-Deletionen betragen > 95 %, wobei alle unteren Grenzen der 95-%-KI bei > 90 % lagen. Positive, negative und Gesamtübereinstimmung beim Nachweis der L858R-Mutation betragen ebenfalls > 95 %, wobei alle unteren Grenzen der 95-%-KI bei ≥ 95 % lagen, mit Ausnahme der positiven Übereinstimmung (90 %) aufgrund der geringen Menge der nachgewiesenen L858R-Mutationen.

Tabelle 15 Vergleich zwischen dem cobas EGFR-Test und NGS zum Nachweis von Exon-19-Deletionen und L858R-Mutationen im EGFR-Gen

Mutation	Übereinstimmung	Prozentuale Übereinstimmung (N)	95-%-KI
Exon-19-Deletion	Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA)	95,9 % (94/98)	90,0 %, 98,4 %
	Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA)	99,7 % (309/310)	98,2 %, 99,9 %
	Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA)	98,8 % (403/408)	97,2 %, 99,5 %
L858R	Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA)	90,6 % (48/53)	79,7 %, 95,9 %
	Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA)	98,6 % (350/355)	96,7 %, 99,4 %
	Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA)	97,5 % (398/408)	95,5 %, 98,7 %
Gleichzeitig	Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA)	94,0 % (142/151)	89,1 %, 96,8 %
	Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA)	97,7 % (251/257)	95,0 %, 98,9 %
	Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA)	96,3 % (393/408)	94,0 %, 97,8 %

Korrelation mit der Referenzmethode unter Verwendung von Proben aus der Phase-II-Studie AURA2

Die klinische Leistung des **cobas** EGFR-Tests wurde durch Vergleich mit einem validierten Hochdurchsatz-Sequenzierungssystem (NGS-System) ermittelt. Dazu wurden 383 formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Lungentumorproben von Patienten mit NSCLC im fortgeschrittenen Stadium verwendet, die das Screening mit dem **cobas** EGFR-Test in der Phase-II-Studie AURA2 zu TAGRISSO® (Osimertinib) durchlaufen hatten.

Insgesamt durchliefen 472 Patienten das Screening mit dem **cobas** EGFR-Test für die AURA2-Studie. Nach Ausschluss nicht geeigneter Patienten wurden 383 Patienten in diese Studie übernommen.

Alle 383 Proben wurden in einem verblindeten Design sowohl mit dem **cobas** EGFR-Test als auch mittels eines validierten NGS-Verfahrens getestet. Davon waren 368 Ergebnisse sowohl im **cobas** EGFR-Test als auch in der NGS gültig. Insgesamt 2 Ergebnisse waren sowohl im **cobas** EGFR-Test als auch in der NGS ungültig, 2 Ergebnisse waren nur in der NGS ungültig und 11 Ergebnisse waren nur im **cobas** EGFR-Test ungültig. Die analytische Genauigkeit des **cobas** EGFR-Tests im Vergleich zur Referenzmethode NGS zum Nachweis der T790M-Mutation wurde durch die Ermittlung der prozentualen positiven Übereinstimmung, der prozentualen negativen Übereinstimmung und der prozentualen Gesamtübereinstimmung sowie den jeweiligen 95-%-Konfidenzintervallen für die T790M-Mutation evaluiert.

In der AURA2-Studie wurden mit dem **cobas** EGFR-Test die in Tabelle 16 aufgeführten Mutationen des EGFR-Gens nachgewiesen. Für die in Tabelle 6 aufgeführten Mutationen unter den in der AURA2-Studie nachgewiesenen Mutationen wurde die analytische Sensitivität belegt.

Tabelle 16 Mit dem cobas EGFR-Test nachgewiesene Mutationen in der AURA2-Kohorte

Exon	Mutationssequenz	Änderung der Aminosäuresequenz	COSMIC-ID 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

Es wurden insgesamt 368 Proben mit gültigen Ergebnissen im **cobas** EGFR-Test und in der NGS in die Übereinstimmungsanalyse einbezogen. Beim Nachweis der T790M-Mutation (siehe Tabelle 17) betrug die positive Übereinstimmung zwischen dem **cobas** EGFR-Test und der NGS 88,3 % (95-%-KI: 83,8 % bis 91,7 %), die negative Übereinstimmung 97,3 % (95-%-KI: 92,4 % bis 99,1 %) und die Gesamtübereinstimmung 91,0 % (95-%-KI: 87,7 % bis 93,5 %). 30 Proben waren in der NGS positiv, jedoch im **cobas** EGFR-Test negativ: Bei 10 von 30 Proben lag der in der NGS bestimmte T790M-Mutationsanteil unter der Nachweisgrenze (< 2 % Mutationen) des **cobas** EGFR-Tests. Bei 20 von 30 Proben deutete ein leicht verzögerter IC-Ct-Wert auf eine schlechte Amplifizierbarkeit des DNA-Template hin.

Tabelle 17 Vergleich zwischen dem cobas EGFR-Test und NGS zum Nachweis der T790M-Mutation im EGFR-Gen

Übereinstimmung	Prozentuale Übereinstimmung (N)	95-%-KI
Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA)	88,3 % (226/256)	83,8 %, 91,7 %
Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA)	97,3 % (109/112)	92,4 %, 99,1 %
Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA)	91,0 % (335/368)	87,7 %, 93,5 %

Klinische Ergebnisse

EURTAC

Bei der EURTAC-Studie²² handelte es sich um eine multizentrische, unverblindete, randomisierte Studie der Phase III zur Beurteilung von TARCEVA® (Erlotinib) gegenüber der gängigen platinbasierten Kombinationschemotherapie als Erstlinientherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC, die sich noch keiner Chemotherapie unterzogen hatten und deren Tumore laut Analyse mit einem Clinical Trial Assay (CTA) Exon-19-Deletionen oder Exon-21-Substitutionen (L858R-Mutationen) im EGFR-Gen aufwiesen. Sponsor der Studie war die Spanish Lung Cancer Group (SLCG). Insgesamt nahmen 174 Patienten an der Studie teil. Die Studienergebnisse belegten, dass die progressionsfreie Überlebenszeit von Patienten, die TARCEVA® erhielten, im Vergleich zu Patienten, die mit einer Chemotherapie behandelt wurden, statistisch signifikant höher war (medianes progressionsfreies Überleben: 10,4 Monate gegenüber 5,1 Monaten); das Hazard Ratio betrug 0,34 ($p < 0,0001$, 95-%-KI [0,23; 0,49]). Die Ansprechrate der Patienten im TARCEVA®-Studienarm war größer als die Ansprechrate der Chemotherapie-Patienten (65,1 % gegenüber 16,1 %). Hinsichtlich des Gesamtüberlebens gab es in beiden Studienarmen keine signifikanten Unterschiede, da 76 % der Chemotherapie-Patienten zur Behandlung mit TARCEVA® wechselten.

Von den 174 Teilnehmern der EURTAC-Studie, standen 134 Patienten (77 % der Studienpopulation, darunter 69 Patienten aus dem Studienarm mit TARCEVA® und 65 Patienten aus dem Chemotherapie-Studienarm) für weitere Tests zur Verfügung und wurden retrospektiv mit dem **cobas** EGFR-Test getestet. Von den 134 mit dem **cobas** EGFR-Test erneut analysierten Fällen wurde bei 116 (59 Patienten aus dem TARCEVA®-Studienarm und 57 Patienten aus dem Chemotherapie-Studienarm) mit dem **cobas** EGFR-Test das Ergebnis „Mutation Detected“ erzielt. Die Analyse dieser 116 Fälle ergab für die mit TARCEVA® behandelten Patienten eine signifikant höhere progressionsfreie Überlebenszeit (medianes progressionsfreies Überleben: 10,4 gegenüber 5,4 Monaten) und eine geringere Wahrscheinlichkeit von Progression oder Tod (Hazard Ratio = 0,34, 95-%-KI [0,21; 0,54], $p < 0,0001$) gegenüber den Chemotherapie-Patienten (Abbildung 3). Die Ansprechrate war im TARCEVA®-Studienarm höher als im Chemotherapie-Studienarm (59,3 % gegenüber 14,0 %). Zwischen den beiden Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Gesamtüberlebens festgestellt. Der in dieser Teilgruppe von Patienten (Analyse mit dem **cobas** EGFR-Test) beobachtete klinische Nutzen war vergleichbar mit dem der gesamten Studienpopulation (Tabelle 18).

Eine zusätzliche Wirksamkeitsanalyse wurde durchgeführt, um Patienten zu berücksichtigen, deren Ergebnisse im **cobas** EGFR-Test positiv, aber im CTA negativ oder ungültig waren. Im „Worst-Case“-Szenario (unter Annahme eines Hazard Ratio von 1 für Patienten, deren Ergebnisse im **cobas** EGFR-Test positiv und im CTA negativ waren) ergaben die Daten ein Hazard Ratio von 0,42 (95-%-KI [0,26; 0,57]).

Abbildung 3 Kaplan-Meier-Diagramm für das progressionsfreie Überleben nach Behandlungsart für Patienten, bei denen mit dem cobas EGFR-Test eine Mutation nachgewiesen wurde (Beurteilung durch Prüfarzt)

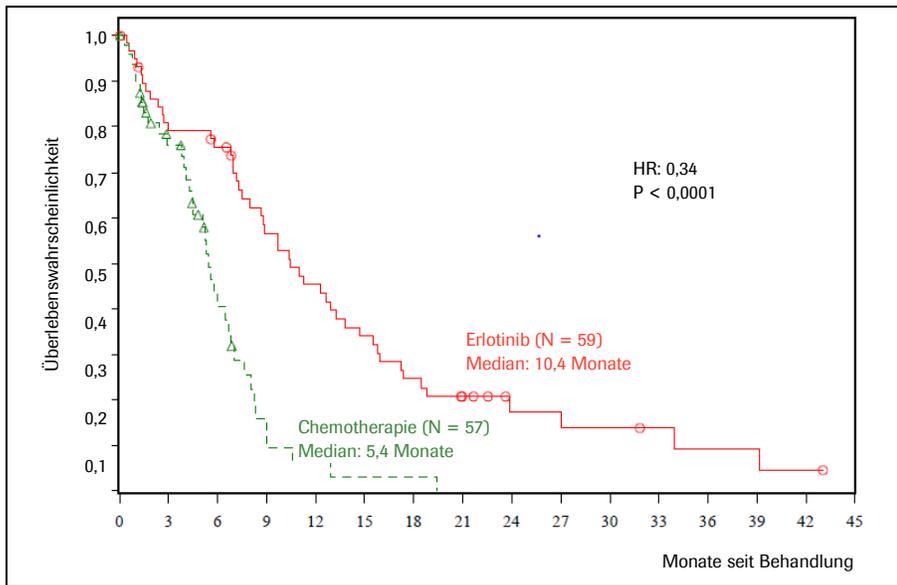


Tabelle 18 Klinischer Nutzen für mit dem cobas EGFR-Test getestete Patienten ist vergleichbar mit dem in der EURTAC-Population beobachteten Nutzen

Parameter	Population mit positivem cobas EGFR-Test n = 116		EURTAC n = 173*	
	Chemotherapie n = 57	Erlotinib n = 59	Chemotherapie n = 87	Erlotinib n = 86
Progressionsfreies Überleben				
Median (Monate)	5,4	10,4	5,1	10,4
Hazard Ratio	0,34		0,34	
Hazard Ratio 95%-KI	[0,21; 0,54]		[0,23; 0,49]	
p-Wert (Log-Rank-Test)	< 0,0001		< 0,0001	

* Ein Patient widerrief nach Abschluss der EURTAC-Studie sein Einverständnis, weshalb sich ein Datensatz von n = 173 ergab.

AURA2

Bei AURA2²³ handelte es sich um eine multizentrische, einarmige, unverblindete Phase-II-Studie zur Beurteilung der Sicherheit und Wirksamkeit von TAGRISSO® (Osimertinib) als Zweitlinien-, Drittlinien- oder weitere Therapie bei Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC, bei denen es nach einer vorangegangenen Therapie mit einem zugelassenen EGFR-TKI zur Progression gekommen war. Bei allen Patienten musste ein NSCLC mit mittels cobas EGFR-Test nachgewiesener T790M-Mutation vorliegen. Das primäre Wirksamkeitskriterium war die objektive Ansprechrate (ORR) nach RECIST 1.1, beurteilt mittels verblindeter, unabhängiger, zentraler Begutachtung (BICR) des „Evaluable for Response“-Auswertungskollektivs. Die ORR war definiert als Anzahl (%) der Patienten mit mindestens 1 Visite und kompletter Remission (CR) oder partieller Remission (PR), die mindestens 4 Wochen später bestätigt wurde (d. h. bestes objektives Ansprechen [BOR] von CR oder PR).

Von den 472 Patienten, die das Screening für die AURA2-Studie durchliefen, waren 383 für den Test mit dem **cobas** EGFR-Test geeignet. Davon wurden 233 T790M-positive Patienten in die AURA2-Studie rekrutiert, wovon 210 aufgenommen wurden und TAGRISSO® erhielten (Full Analysis Set [FAS]).

In Tabelle 19 sind die ORR in AURA2 aufgeschlüsselt nach BICR und Prüfarzt-Beurteilung dargestellt. Von den 210 Patienten, die mindestens eine Dosis TAGRISSO® erhielten (FAS), wurden 128 in der BICR als Responder bestätigt, entsprechend einer ORR von 61,0 % (95%-KI: 54,0 % bis 67,6 %), und 135 in der Prüfarzt-Beurteilung, entsprechend einer ORR von 64,3 % (95%-KI: 57,4 % bis 70,8 %).

Alle 383 für die AURA2-Studie geeigneten Patienten wurden erneut mit dem **cobas** EGFR-Test getestet. Von den 233 T790M-positiven Patienten, die in die AURA2-Studie rekrutiert wurden, waren 225 im **cobas** EGFR-Test T790M-positiv und wurden 204 in das FAS eingeschlossen.

Von den 204 Patienten, die TAGRISSO® erhielten (FAS), wurden 127 in der BICR als Responder bestätigt, entsprechend einer ORR von 62,3 % (95%-KI: 55,2 % bis 68,9 %), und 133 in der Prüfarzt-Beurteilung, entsprechend einer ORR von 65,2 % (95%-KI: 58,2 % bis 71,7 %).

Tabelle 19 Klinischer Nutzen für mit dem cobas EGFR-Test getestete T790M-positive Patienten in der AURA2-Studie

Auswertungs-kollektiv	Beurteilt durch	AURA2			cobas EGFR-Test (IVD) T790M-positiv		
		N	Anzahl der bestätigten Responder	ORR (95%-KI)	N	Anzahl der bestätigten Responder	ORR (95%-KI)
Full Analysis Set (FAS)	Verblindete, unabhängige, zentrale Begutachtung (BICR)	210	128	61,0 % (54,0 %, 67,6 %)	204	127	62,3 % (55,2 %, 68,9 %)
	Prüfarzt		135	64,3 % (57,4 %, 70,8 %)		133	65,2 % (58,2 %, 71,7 %)

FLAURA

I. Phase-III-Studie zur TAGRISSO®-Erstlinientherapie

Bei der FLAURA-Studie¹⁰ handelte es sich um eine doppelblinde, randomisierte klinische Phase-III-Studie zur Beurteilung der Wirksamkeit und Sicherheit von TAGRISSO® im Vergleich zur Standardtherapie mit EGFR-TKI (entweder Gefitinib oder Erlotinib) als Erstlinientherapie bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem NSCLC, die zuvor keine systemische Therapie für fortgeschrittene Erkrankungen erhalten haben und in deren Tumoren EGFR-sensibilisierende Mutationen, Ex19del-Mutationen oder L858R-Substitutionsmutationen lokal oder zentral bestätigt wurden (gemeinschaftlich als EGFRm-positiv bezeichnet). Der primäre Endpunkt der FLAURA-Studie war das durch den Prüfarzt beurteilte progressionsfreie Überleben (PFS) bei Patienten im Full Analysis Set (FAS: alle global randomisierten Patienten).

Es wurden insgesamt 994 Patienten in der Studie für die Randomisierung voruntersucht, von denen bei 809 Patienten entweder prospektiv bei der Voruntersuchung oder retrospektiv Tumorgewebeproben mit dem **cobas** EGFR-Test zentral getestet wurden. Von den 556 randomisierten Patienten (289 randomisiert auf der Grundlage des zentralen **cobas**-Gebetests und 267 randomisiert auf der Grundlage eines lokalen Tests) wurde bei 500 Patienten ein zentrales positives **cobas** EGFRm-Testergebnis bestätigt. Von den 267 Patienten, die auf der Grundlage eines lokalen Tests randomisiert wurden, wurde bei 211 Patienten ein zentrales positives **cobas** EGFRm-Testergebnis bestätigt. Für 41 Patienten lag kein **cobas**-Testergebnis vor, da keine Probe bzw. nur eine unzureichende Probe vorhanden war. Für 9 Patienten wurde ein ungültiges **cobas**-Testergebnis und für 6 Patienten das **cobas**-Testergebnis „No Mutation Detected“ erhalten.

Tabelle 20 unten enthält die Hazard Ratio (HR) für das durch den Prüfarzt beurteilte progressionsfreie Überleben (PFS) für das Full Analysis Set und die primäre Testpopulation (Patienten mit einem zentralen positiven **cobas** EGFRm-

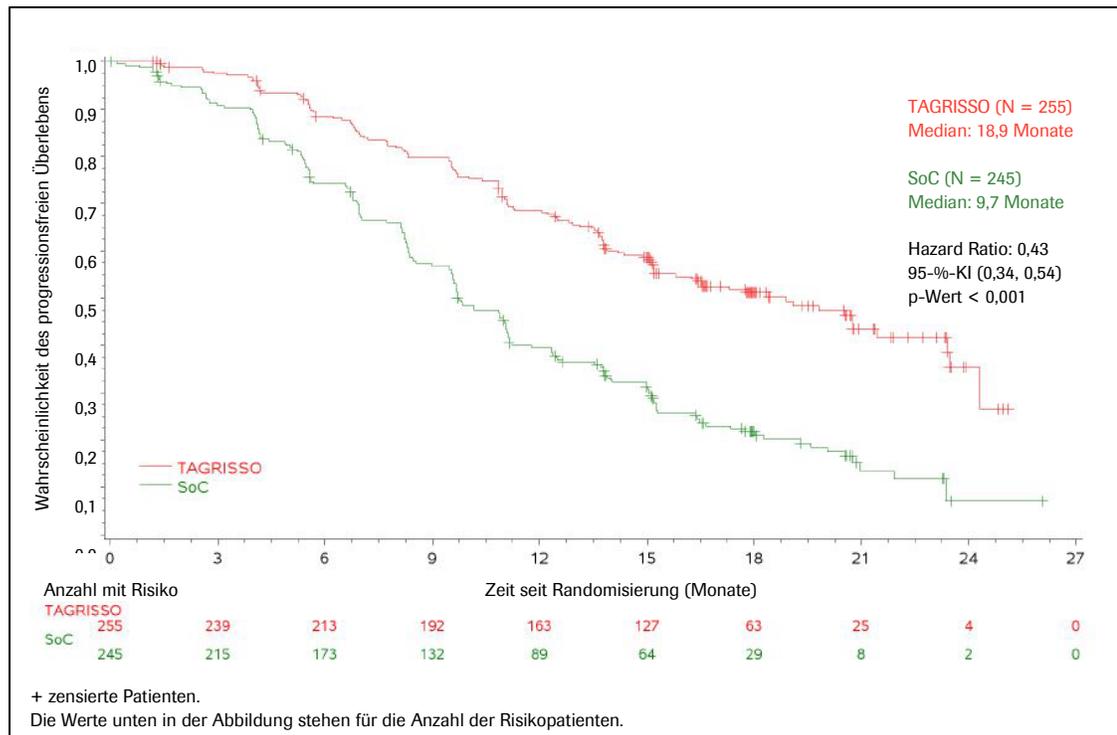
Ergebnis für die Gewebeprobe). Die HR für das durch den Prüfarzt beurteilte progressionsfreie Überleben für das Full Analysis Set (N = 556), die auf einem stratifizierten Log-Rang-Test beruhte, betrug 0,46 (95-%-KI: 0,37, 0,57). Dieselbe Punktschätzung wurde mit einem nicht angepassten Cox-Modell (proportional hazards model) erhalten. Die HR für das durch den Prüfarzt beurteilte progressionsfreie Überleben für die primäre Testpopulation (N = 500), die mit Hilfe eines nicht angepassten Cox-Modells berechnet wurde, betrug 0,43 (95-%-KI: 0,34, 0,54). Die in der primären Testpopulation beobachtete klinische Wirksamkeit stimmte mit der im Full Analysis Set überein. Die Kaplan-Meier-Kurve für das durch den Prüfarzt beurteilte progressionsfreie Überleben in der primären Testpopulation ist in Abbildung 4 dargestellt.

Tabelle 20 Durch den Prüfarzt beurteiltes progressionsfreies Überleben für das Full Analysis Set in FLAURA und für die Population des Primärprodukts (positiver cobas EGFR-Test)

	Full Analysis Set in FLAURA N = 556		Population mit positivem cobas EGFR-Test in FLAURA (primäre Testpopulation) N = 500	
	Osimertinib (N = 279)	Gefitinib oder Erlotinib (N = 277)	Osimertinib (N = 255)	Gefitinib oder Erlotinib (N = 245)
Progressionsfreies Überleben				
Anzahl der Ereignisse (%)	136 (49)	206 (74)	124 (49)	188 (77)
Medianes PFS in Monaten (95-%-KI)	18,9 (15,2, 21,4)	10,2 (9,6, 11,1)	18,9 (15,2, 21,4)	9,7 (9,5, 11,0)
Hazard Ratio (95-%-KI) ^a	0,46 (0,37, 0,57)		0,43 (0,34, 0,54)	
Zweiseitiger p-Wert ^a	< 0,0001		< 0,001	

^a Nicht angepasstes Cox-Modell

Abbildung 4 Kaplan-Meier-Diagramm für das progressionsfreie Überleben nach Behandlungsart für Patienten, bei denen in FLAURA mit dem cobas EGFR-Test eine Mutation nachgewiesen wurde (Beurteilung durch den Prüfarzt)



II. Analyse der IRESSA®-Standardtherapie

Es wurde eine separate Analyse bei tEGFR-positiven Patienten durchgeführt, die im Kontrollarm der FLAURA-Studie mit IRESSA® (Gefitinib) behandelt wurden. Von den insgesamt 178 mit IRESSA® behandelten Patienten zeigten 174 ein vom Prüfarzt beurteiltes objektives Ansprechen [ORR = 67,8 % (118/174, 95%-KI: 60,6 %, 74,3 %, POP0 in Tabelle 21)].

Von den 79 Patienten, die mit IRESSA® behandelt und für einen zentralen cobas-Gewebetest randomisiert wurden (primäre Wirksamkeitspopulation), sprachen 57 objektiv an (ORR = 72,2 %, 95%-KI: 61,4 %, 80,8 %, POP1 in Tabelle 21).

Der auf der Grundlage des cobas-Gewebetests gemessene Behandlungseffekt von IRESSA® zeigte sich auch für andere Patientenpopulationen mit objektiven Ansprechraten von 64,2 % (POP2, lokaler Test und cobas tEGFR-positiv Patienten) bis 68,5 % (POP3, alle cobas tEGFR-positiven Patienten) (Tabelle 21 und Abbildung 5). Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten überein, die in der ursprünglichen Zulassungsstudie (IFUM) für Patienten erhalten wurden, die für die IRESSA®-Behandlung ausgewählt wurden.¹³

Tabelle 21 ORR-Ergebnisse für unterschiedliche Patientenpopulationen auf der Grundlage des cobas EGFR-Tests an Gewebe

Objektives Ansprechen	Randomisierte mit IRESSA® behandelte Patienten im Standardtherapiearm				Gesamt
	Zentral randomisiert (cobas tEGFR+)	Lokal randomisiert (lokal tEGFR+)			
		cobas tEGFR+	cobas tEGFR-	cobas tEGFR Ungültig/Unbekannt	
Anzahl Patienten	79	70	2	23	174
Responder	57	45	1	15	118
Non-Responder	22	25	1	8	56
ORR (% , 95%-KI)	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 %)		-	-	-

Hinweis: Patienten, die objektiv nicht ansprachen, wurden ausgeschlossen.

Hinweis: tEGFR = EGFR in Gewebe; KI = (Score) Konfidenzintervall.

POP = Population (Untergruppe)

POP1: ORR für Patienten, die für den cobas-Gewebetest randomisiert wurden (primäre Wirksamkeitspopulation für den cobas-Gewebetest).

POP2: ORR für Patienten, die für einen lokalen Gewebetest randomisiert wurden

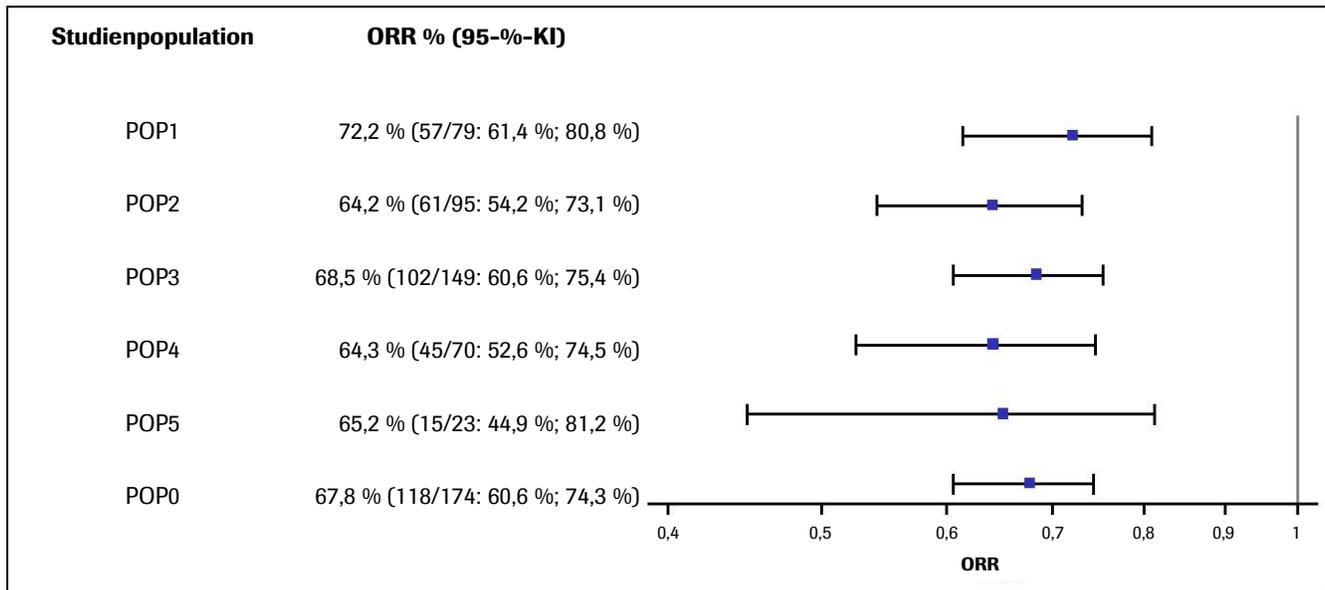
POP3: ORR für Patienten mit einem positiven cobas-Gewebetest

POP4: ORR für Patienten, die für einen lokalen Gewebetest randomisiert und mit dem cobas-Gewebetest bestätigt wurden.

POP5: ORR für Patienten, die für einen lokalen Gewebetest randomisiert wurden und bei denen ein ungültiger cobas-Gewebetest vorliegt bzw. dieser Test nicht durchgeführt wurde.

POP0: ORR für alle Patienten, die mit IRESSA® behandelt wurden.

Abbildung 5 Forest-Plots der objektiven Ansprechraten auf der Grundlage des cobas EGFR-Tests an Gewebe für unterschiedliche Populationen



POP = Population (Untergruppe)

POP1: ORR für Patienten, die für den **cobas**-Gewebetest randomisiert wurden (primäre Wirksamkeitspopulation für den **cobas**-Gewebetest).

POP2: ORR für Patienten, die für einen lokalen Gewebetest randomisiert wurden

POP3: ORR für Patienten mit einem positiven **cobas**-Gewebetest

POP4: ORR für Patienten, die für einen lokalen Gewebetest randomisiert und mit dem **cobas**-Gewebetest bestätigt wurden.

POP5: ORR für Patienten, die für einen lokalen Gewebetest randomisiert wurden und bei denen ein ungültiger **cobas**-Gewebetest vorliegt bzw. dieser Test nicht durchgeführt wurde.

POP0: ORR für alle Patienten, die mit IRESSA® behandelt wurden.

ABSCHNITT B: PLASMAPROBEN

Probenvorbereitung

Informationen zur Isolierung von DNA aus Plasmaproben sind dem **cobas®** cfDNA Sample Preparation Kit (M/N 07247737190) zu entnehmen.

Materialien und Reagenzien

Mitgelieferte Materialien und Reagenzien

Kit/Kassetten	Komponenten und Reagenzienbestandteile	Menge je Test	Sicherheitssymbole und -hinweise
cobas® EGFR Mutation Test v2 Kit 24 Tests (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-1 (EGFR Master-Mix 1) (M/N: 06471366001) Tris-Puffer Kaliumchlorid Glycerin EDTA Tween 20 3,13 % Dimethylsulfoxid 0,09 % Natriumazid < 0,10 % dNTPs < 0,01 % Z05-AS1-DNA-Polymerase (mikrobiell) < 0,01 % AmpErase-Enzym (Uracil-N-Glykosylase) (mikrobiell) < 0,01 % Aptamer < 0,01 % Upstream- und Downstream-EGFR-Primer < 0,01 % fluoreszenzmarkierte EGFR-Sonden	2 x 0,48 ml	k. A.
	EGFR MMX-2 (EGFR Master-Mix 2) (M/N: 06471382001) Tris-Puffer Kaliumchlorid Glycerin EDTA Tween 20 3,13 % Dimethylsulfoxid 0,09 % Natriumazid < 0,10 % dNTPs < 0,01 % Z05-AS1-DNA-Polymerase (mikrobiell) < 0,01 % AmpErase-Enzym (Uracil-N-Glykosylase) (mikrobiell) < 0,01 % Aptamer < 0,01 % Upstream- und Downstream-EGFR-Primer < 0,01 % fluoreszenzmarkierte EGFR-Sonden	2 x 0,48 ml	k. A.

Kit/Kassetten	Komponenten und Reagenzienbestandteile	Menge je Test	Sicherheitssymbole und -hinweise
cobas® EGFR Mutation Test v2 Kit 24 Tests (M/N: 07248563190)	EGFR MMX-3 v2 (EGFR Master-Mix 3) (M/N: 07248601001) Tris-Puffer Kaliumchlorid Glycerin EDTA Tween 20 3,13 % Dimethylsulfoxid 0,09 % Natriumazid < 0,10 % dNTPs < 0,01 % Z05-AS1-DNA-Polymerase (mikrobiell) < 0,01 % AmpErase-Enzym (Uracil-N-Glykosylase) (mikrobiell) < 0,01 % Aptamer < 0,01 % Upstream- und Downstream-EGFR-Primer < 0,01 % fluoreszenzmarkierte EGFR-Sonden	2 x 0,48 ml	k. A.
	MGAC (Magnesiumacetat) (M/N: 05854326001) Magnesiumacetat 0,09 % Natriumazid	6 x 0,2 ml	k. A.
	EGFR MC (EGFR-Mutationskontrolle) (M/N: 06471455001) Tris-Puffer EDTA Poly-rA-RNA (synthetisch) 0,05 % Natriumazid < 0,1 % Plasmid-DNA mit EGFR-Sequenzen (Exon 18, 19, 20 und 21, mikrobiell) < 0,1 % EGFR-Wildtyp-DNA (Zellkultur)	6 x 0,1 ml	k. A.
	DNA SD (DNA-Probenverdünnungslösung) (M/N: 05854474001) Tris-HCl-Puffer 0,09 % Natriumazid	2 x 3,5 ml	k. A.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Reagenz	Lagertemperatur	Lagerdauer
cobas® EGFR Mutation Test v2*	2 °C bis 8 °C	Geöffnet für 4 Anwendungen über 90 Tage bzw. maximal bis zum Verfallsdatum haltbar.

* **EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2** und Gebrauchs-MMX (hergestellt durch Zugabe von **MGAC** zu **EGFR MMX-1** oder **EGFR MMX-2** oder **EGFR MMX-3 v2**) sind über längere Zeiträume lichtgeschützt aufzubewahren. Der Gebrauchs-MMX muss bei 2 °C bis 8 °C im Dunkeln aufbewahrt werden. Die vorbereiteten Proben und Kontrollen müssen innerhalb von 1 Stunde nach der Zubereitung des Gebrauchs-MMX zugegeben werden. Mit der Amplifikation muss innerhalb von 1 Stunde nach der Zugabe der bearbeiteten Proben und Kontrollen zum Gebrauchs-MMX begonnen werden.

Zusätzlich benötigtes Material

Materialien	P/N
cobas® cfDNA Sample Preparation Kit	Roche M/N 07247737190
Bleiche	Beliebiger Hersteller
70%iges Ethanol	Beliebiger Hersteller
Sterile, serologische Einwegpipetten, 5 und 25 ml	Beliebiger Hersteller
Mikrotiterplatte für das cobas® 4800 System und Versiegelungsfolie	Roche 05232724001
Versiegelungsfolienwerkzeug für das cobas® 4800 System (bei der Installation des cobas® 4800 Systems bereitgestellt)	Roche 04900383001
Verstellbare Pipetten* (Kapazität von 5–1000 µl)	Beliebiger Hersteller
DNase-freie Aerosolfilter- oder Kolbenhub-Pipettenspitzen	Beliebiger Hersteller
Tischmikrozentrifuge* (mit einer Zentrifugalkraft von 20.000 × g)	Eppendorf 5430 oder 5430R oder gleichwertiges Produkt
Gefrierschrank mit einem Temperaturbereich von -25 °C bis -15 °C	Beliebiger Hersteller
Mikrozentrifugenröhrchen mit Einrastverschluss (1,5 ml, RNase-/DNase-frei, PCR-Qualität)	Beliebiger Hersteller
Racks für konische und Mikrozentrifugenröhrchen	Beliebiger Hersteller
Vortexer*	Beliebiger Hersteller
Puderfreie Laborhandschuhe	Beliebiger Hersteller

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

Weitere Informationen zu diesen separat erhältlichen Materialien erhalten Sie von Ihrem zuständigen Roche-Mitarbeiter.

Zusätzlich benötigte Geräte und Software

Zusätzlich benötigte Geräte und Software
cobas z 480 Analyzer
Control Unit für das cobas® 4800 System mit Systemsoftware, Version 2.1 oder höher
EGFR Plasma P1 Analysis Package Software, Version 1.0 oder höher
Barcodeleser, ext. USB
Drucker

Weitere Informationen zu diesen separat erhältlichen Materialien erhalten Sie von Ihrem zuständigen Roche-Mitarbeiter.

Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Wie bei allen Testverfahren ist gute Laborpraxis eine unerlässliche Voraussetzung für die uneingeschränkte Leistung dieses Tests.

- Nur zur Verwendung als *in-vitro*-Diagnostikum bestimmt.
- Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheets, SDS) sind auf Anfrage bei der zuständigen Roche-Vertretung erhältlich.

- Dieser Test ist mit NSCLC-Plasmaproben durchzuführen. Proben sind als potenziell infektiös und gemäß den Vorschriften für sicheres Arbeiten im Labor, wie in „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“¹⁶ und dem CLSI-Dokument M29-A4 beschrieben, zu behandeln.¹⁷
- Es wird empfohlen, sterile Einwegpipetten und DNase-freie Pipettenspitzen zu verwenden.

Gute Laborpraxis

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- In den Arbeitsbereichen des Labors nicht essen, trinken oder rauchen.
- Nach dem Umgang mit Proben und Testreagenzien gründlich die Hände waschen.
- Beim Umgang mit Reagenzien Schutzbrille, Laborkittel und Laborhandschuhe tragen. Haut, Augen und Schleimhäute vor Kontakt mit diesen Materialien schützen. Bei Kontakt sofort mit reichlich Wasser abspülen. Unbehandelt können Verätzungen entstehen. Verschüttete Flüssigkeiten vor dem Aufwischen zunächst mit Wasser verdünnen.
- Alle Arbeitsflächen im Labor gründlich mit einer frisch hergestellten Lösung aus 0,5%igem Natriumhypochlorit in destilliertem oder entionisiertem Wasser reinigen und desinfizieren (Haushaltsbleiche im Verhältnis 1:10 verdünnen). Anschließend die Arbeitsflächen mit 70%igem Ethanol abwischen.

Hinweis: *Handelsübliche flüssige Haushaltsbleiche enthält in der Regel Natriumhypochlorit in einer Konzentration von 5,25 %. Durch Verdünnung im Verhältnis 1:10 erhält man eine 0,5%ige Natriumhypochloritlösung.*

Kontamination

- Um Kontaminationen zu vermeiden, müssen Handschuhe getragen und zwischen der Handhabung von Proben und cobas EGFR-Testreagenzien gewechselt werden. Darauf achten, dass die Handschuhe beim Umgang mit Proben nicht kontaminiert werden.
- Handschuhe regelmäßig wechseln, um das Kontaminationsrisiko zu senken.
- Die Handschuhe müssen vor dem Verlassen von DNA-Isolierungsbereichen gewechselt werden oder wenn ein Verdacht auf Kontakt mit Lösungen oder einer Probe besteht.
- Kontamination der Reagenzien und Proben durch Mikroorganismen und Ribonuklease vermeiden.
- Der Arbeitsbereich für Amplifikation und Detektion ist vor der Herstellung des Gebrauchs-MMX gründlich zu reinigen. Die Geräte und Materialien sollten den verschiedenen Aktivitäten fest zugewiesen werden; sie dürfen dann nicht mehr für andere Aktivitäten verwendet oder in einen anderen Bereich gebracht werden. So dürfen für die DNA-Isolierung verwendete Pipetten und Verbrauchsmaterialien zum Beispiel nicht für die Vorbereitung von Reagenzien für die Amplifikation und Detektion verwendet werden.
- Die Arbeitsabläufe im Labor sind so zu gestalten, dass sie nur in eine Richtung verlaufen, d. h. ein Arbeitsgang wird abgeschlossen, bevor der nächste gestartet wird. So sollte beispielsweise die DNA-Isolierung abgeschlossen sein, bevor Amplifikation und Detektion gestartet werden. Darüber hinaus ist die DNA-Isolierung in einem Bereich durchzuführen, der von Amplifikation und Detektion räumlich getrennt ist. Um eine Kontamination des gebrauchsfertigen Master-Mix mit DNA-Proben zu vermeiden, ist der zur Amplifikation und Detektion verwendete Arbeitsbereich vor der Vorbereitung des Master-Mix gründlich zu reinigen.

Handhabung

- Kits nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Reagenzien aus verschiedenen Kits oder Chargen nicht vermischen.
- Einwegkomponenten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle Einwegkomponenten sind für den einmaligen Gebrauch vorgesehen. Nicht wiederverwenden.
- Alle Geräte müssen gemäß den Anweisungen des Herstellers gewartet werden.

Entsorgung

- DNA EB, MGAC, EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2, EGFR MC und DNA SD enthalten Natriumazid. Natriumazid kann bei der Reaktion mit Blei- und Kupferleitungen hochexplosive Metallazide bilden. Beim Ausgießen natriumazidhaltiger Lösungen in Laborwaschbecken mit reichlich kaltem Wasser nachspülen, um Azidansammlung zu vermeiden.
- Nicht verbrauchte Reagenzien und Abfall gemäß den einschlägigen regionalen und überregionalen Vorschriften entsorgen.

Verschüttetes Material und Reinigung

- Wenn im cobas® 4800 instrument Flüssigkeit verschüttet wird, die Reinigungsanweisungen im Benutzerhandbuch und/oder in der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems befolgen.
- Zum Reinigen des cobas z 480 Analyzers keine Natriumhypochloritlösung (Bleiche) verwenden. Den cobas z 480 Analyzer gemäß den Anweisungen im Benutzerhandbuch und/oder in der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems reinigen.
- Weitere Warnhinweise, Vorsichtsmaßnahmen und Verfahren zur Verringerung der Kontaminationsgefahr für den cobas z 480 Analyzer sind dem Benutzerhandbuch und/oder der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems zu entnehmen.

Entnahme, Transport und Lagerung von Proben

Hinweis: Alle Proben müssen wie potenzielle Überträger von Infektionserregern behandelt werden.

Entnahme und Handhabung von Proben

Roche Cell-Free DNA Collection Tube

In Roche Cell-Free DNA Collection Tubes (Roche cfDNA-Röhrchen) gesammelte Plasmaproben aus Vollblut wurden für die Verwendung mit dem cobas EGFR-Test validiert.

Das Plasma ist innerhalb von 7 Tagen nach der Entnahme vom im Roche cfDNA-Röhrchen gesammelten Blut zu trennen. In Roche cfDNA-Röhrchen gesammelte Blutproben sind bei Lagerung und Transport zwischen 15 °C und 25 °C maximal 7 Tage lang haltbar, vorübergehende Abweichungen der Temperatur im Bereich von 15 °C bis 30 °C für bis zu 16 Stunden beeinflussen die Haltbarkeit nicht. Nach der Trennung des Plasmas sind die Proben gemäß den Anweisungen im unten stehenden Abschnitt **Transport, Lagerung und Haltbarkeit von Proben** zu lagern.

Hinweis: In Plasma, das von im Roche cfDNA-Röhrchen gesammelten Blut getrennt wurde, konnte eine Hämolyse beobachtet werden. Bei einer Hämoglobinkonzentration von $\leq 2,0$ g/l wurde jedoch kein Störeinfluss auf die Leistung des cobas EGFR-Tests festgestellt.

K2 EDTA Collection Tube

In K2-EDTA-Röhrchen gesammelte Plasmaproben aus Vollblut wurden für die Verwendung mit dem cobas EGFR-Test validiert.

K2-EDTA-Vollblut kann bis zu 8 Stunden bei ≤ 30 °C aufbewahrt werden. Nach der Trennung des Plasmas sind die Proben gemäß den Anweisungen im unten stehenden Abschnitt **Transport, Lagerung und Haltbarkeit von Proben** zu lagern.

Transport, Lagerung und Haltbarkeit von Proben

Beim Transport von Plasmaproben sind die geltenden Vorschriften für den Transport von Krankheitserregern zu beachten.¹⁸

Für Plasmaproben gelten folgende Lagerbedingungen:

Lagertemperatur für Plasmaproben	≤ -70 °C	-15 °C bis -25 °C	2 °C bis 8 °C	15 °C bis 30 °C
Lagerdauer für Plasma in Roche cfDNA-Röhrchen	Max. 30 Tage	Max. 30 Tage	Max. 7 Tage	Max. 1 Tag
Lagerdauer für Plasma in K2-EDTA-Röhrchen	Max. 12 Monate	Max. 12 Monate	Max. 3 Tage	Max. 1 Tag

Lagerung und Haltbarkeit verarbeiteter Proben

Für verarbeitete, aus dem Roche cfDNA-Röhrchen bzw. dem K2-EDTA-Röhrchen gewonnene Plasmaproben (extrahierte cfDNA) gelten folgende Lagerbedingungen:

Lagertemperatur für extrahierte cfDNA	-15 °C bis -25 °C	2 °C bis 8 °C	15 °C bis 30 °C
Lagerdauer	Max. 2 Einfrier-Auftau-Zyklen in einem Zeitraum von 60 Tagen	Max. 21 Tage	Max. 7 Tage

Extrahierte cfDNA sollte innerhalb des empfohlenen Lagerzeitraumes bzw. spätestens vor Erreichen des Verfallsdatums des cobas® cfDNA Sample Preparation Kits, mit dem die DNA extrahiert wurde, verwendet werden.

Vor der Verwendung extrahierter DNA-Stammlösung aus der Lagerung muss das Elutionsröhrchen mit der Stammlösung im Kurzzeitbetrieb des Vortexmischers (kurze Impulse) gemischt und zentrifugiert werden.

Testverfahren

Durchführung des Tests

Abbildung 6 Arbeitsablauf des cobas EGFR-Tests mit dem cobas® cfDNA Sample Preparation Kit

1	System einschalten.
2	Wartung des Instruments durchführen.
3	Proben und Reagenzien aus der Lagerung nehmen.
4	Proben für die Bindung an die Säule vorbereiten.
5	DNA-Isolierung durchführen.
6	DNA eluieren.
7	Arbeitsliste erstellen und Plattenanordnung drucken.
8	Amplifikationsreagenzien vorbereiten.
9	Amplifikationsreagenzien auf die Mikrotiterplatte geben.
10	Probe auf die Mikrotiterplatte geben.
11	Mikrotiterplatte versiegeln.
12	Mikrotiterplatte in den cobas z 480 Analyzer laden.
13	Lauf starten.
14	Ergebnisse überprüfen.
15	Mit LIS: Ergebnisse an LIS übertragen.
16	Analyzer leeren.

Gebrauchsanweisung

Hinweis: Es wurde lediglich Plasma für die Verwendung mit dem **cobas** EGFR-Test validiert, das von im Roche cfDNA-Röhrchen oder im K2-EDTA-Röhrchen gesammelten Blut getrennt wurde.

Hinweis: Ausführliche Anweisungen zum Betrieb des **cobas z 480** Analyzers sind dem Gerätehandbuch des **cobas z 480** Analyzers zu entnehmen.

Umfang eines Laufs

Ein einzelner Lauf kann pro Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten 1 bis 30 Proben (zuzüglich Kontrollen) umfassen. Bei der Analyse von mehr als 24 Proben werden mehrere **cobas** EGFR-Testkits benötigt.

Der **cobas** EGFR-Testkit enthält ausreichend Reagenzien für 8 Läufe mit je 3 Proben (zuzüglich Kontrollen) für ein Maximum von 24 Proben pro Kit.

Kontrolle des gesamten Prozesses

Für diesen Test wird eine Negativkontrolle für den gesamten Prozess benötigt. Für jeden Lauf eine Negativkontrolle zu den Proben mitführen, beginnend mit der DNA-Isolierung.

DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung aus Plasmaproben erfolgt mithilfe des **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (M/N 07247737190).

Amplifikation und Detektion

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

Einrichtung des Instruments

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

Einrichtung der Testanforderung

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

Eine Plattenübersicht mit den Positionen aller Proben und Kontrollen des Laufs erstellen. In einem Lauf, der nur aus Plasmaproben besteht, wird die Mutationskontrolle in die Positionen **A01** bis **A03** auf der Platte geladen. Die Negativkontrolle wird in die Positionen **B01** bis **B03** auf der Platte geladen. Die Proben werden dann von **C01** bis **C03** bis **H10** bis **H12** in Gruppen von 3 Spalten zugegeben (siehe Abbildung 7).

Der **cobas** EGFR-Test kann im gemischten Testmodus (z. B. EGFR-Gewebe mit EGFR-Plasma) durchgeführt werden. Die Kontrollpositionen hängen von den ausgewählten Tests und der Probenanzahl ab. Weitere Informationen zur Einrichtung eines gemischten Testlaufs finden Sie im Benutzerhandbuch für den **cobas® EGFR Mutation Test v2** sowie im Benutzerhandbuch und/oder in der Benutzerunterstützung des **cobas® 4800** Systems.

Abbildung 7 Anordnung der Platte für den cobas EGFR-Test

Reihe / Spalte	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

Legende: MC = Mutationskontrolle; NEG = Negativkontrolle; S Nr. = Proben-ID; MMX Nr. = Master-Mix-Reagenz 1, 2 oder 3 v2

- Hinweis:** Jede Probe muss auf drei zusammenhängende Spalten in einer Reihe aufgeteilt werden, um ein Ergebnis zu erhalten.
- Hinweis:** Gebrauchs-Master-Mix 1 muss in die Spalten 01, 04, 07 und 10 der Platte geladen werden. Gebrauchs-Master-Mix 2 muss in die Spalten 02, 05, 08 und 11 der Platte geladen werden. Gebrauchs-Master-Mix 3 v2 muss in die Spalten 03, 06, 09 und 12 der Platte geladen werden.
- Hinweis:** Es können bis zu 30 Proben auf eine einzelne Platte geladen werden. Wenn zur Verarbeitung aller Proben auf der Platte mehrere Reagenzkits benötigt werden, müssen diese alle aus der gleichen Charge stammen.

Vorbereitung der Reaktion

Herstellung des Gebrauchs-Master-Mix (MMX-1, MMX-2 und MMX-3 v2)

- Hinweis:** EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 und Gebrauchs-MMX sind lichtempfindlich und müssen über längere Zeiträume lichtgeschützt aufbewahrt werden.
- Hinweis:** Aufgrund der Viskosität der EGFR MMX-Reagenzien und des Gebrauchs-MMX langsam pipettieren, um sicherzustellen, dass das gesamte Gemisch von der Spitze dispensiert wird.
- Hinweis:** EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 und EGFR MMX-3 v2 können einen hellblauen bzw. violetten Farbton aufweisen. Die Leistung der Reagenzien wird dadurch nicht beeinträchtigt.
- Hinweis:** In separaten 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen drei Gebrauchs-MMX herstellen: einen mit EGFR MMX-1, einen mit EGFR MMX-2 und einen mit EGFR MMX-3 v2.

- Das für jeden Gebrauchs-MMX benötigte Volumen von EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 bzw. EGFR MMX-3 v2 anhand der folgenden Formel berechnen:

$$\text{Benötigtes Volumen von EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 oder EGFR MMX-3 v2} = (\text{Anzahl der Proben} + 2 \text{ Kontrollen} + 1) \times 20 \mu\text{l}$$

- Das für jeden Gebrauchs-MMX benötigte Volumen von MGAC anhand der folgenden Formel berechnen:

$$\text{Benötigtes Volumen von MGAC} = (\text{Anzahl der Proben} + 2 \text{ Kontrollen} + 1) \times 5 \mu\text{l}$$

Mit Hilfe von Tabelle 22 kann auf der Grundlage der Probenanzahl in einem Lauf das Volumen jedes Reagenzes bestimmt werden, das zur Herstellung des Gebrauchs-MMX benötigt wird.

Tabelle 22 Volumina der benötigten Reagenzien zur Herstellung von Gebrauchs-MMX-1, Gebrauchs-MMX-2 und Gebrauchs-MMX-3 v2

		Anz. Proben*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMX	20 µl	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260
MGAC	5 µl	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Gesamtvol. pro Gebrauchs-MMX (µl)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Die Volumina für die Anzahl der Proben basieren auf der Summe der Proben + 2 Kontrollen + 1

- Die benötigte Anzahl von Fläschchen mit EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 und MGAC aus der Lagerung bei 2 °C bis 8 °C entnehmen. Jedes Reagenz vor dem Gebrauch 5 Sekunden lang vortexen und die Flüssigkeit unten im Röhrchen sammeln. Ein steriles Mikrozentrifugenröhrchen für Gebrauchs-MMX-1, Gebrauchs-MMX-2 und Gebrauchs-MMX-3 v2 kennzeichnen.
- Das berechnete Volumen von EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 bzw. EGFR MMX-3 v2 in die jeweiligen Gebrauchs-MMX-Röhrchen geben.
- Das berechnete Volumen von MGAC in die Gebrauchs-MMX-Röhrchen geben.

6. Die Röhrchen 3 bis 5 Sekunden lang vortexen, um die erforderliche Homogenität zu gewährleisten.

Hinweis: Proben und Kontrollen müssen innerhalb von 1 Stunde nach der Herstellung der Gebrauchs-MMX auf die Mikrotiterplatte gegeben werden.

Hinweis: Es dürfen nur die Mikrotiterplatte und Versiegelungsfolie für das cobas® 4800 System verwendet werden.

Vorbereitung der Platte

Hinweis: Bei Verwendung von DNA-Stammlösung aus der Lagerung gemäß den Angaben im Abschnitt **Transport, Lagerung und Haltbarkeit von Proben** vorgehen.

1. Jeweils 25 µl Gebrauchs-MMX in jede Reaktionskavität der Mikrotiterplatte geben, die für den Lauf benötigt wird. Die Pipettenspitze darf die Platte außerhalb der Kavität nicht berühren.
 - Gebrauchs-MMX-1 (mit EGFR MMX-1) nach Bedarf in die Kavitäten der Mikrotiterplatte in den Spalten 01, 04, 07 und 10 geben.
 - Gebrauchs-MMX-2 (mit EGFR MMX-2) nach Bedarf in die Kavitäten der Mikrotiterplatte in den Spalten 02, 05, 08 und 11 geben.
 - Gebrauchs-MMX-3 v2 (mit EGFR MMX-3 v2) nach Bedarf in die Kavitäten der Mikrotiterplatte in den Spalten 03, 06, 09 und 12 geben.
2. 25 µl EGFR MC in die Kavitäten A01, A02 und A03 der Mikrotiterplatte geben; durch mindestens zweimaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen.
3. Mit einer neuen Pipettenspitze 25 µl NEG in die Kavitäten B01, B02 und B03 der Mikrotiterplatte pipettieren; durch mindestens zweimaliges Auf- und Abpipettieren gründlich mischen.

Hinweis: Bei jedem Lauf muss EGFR MC in den Kavitäten A01, A02 und A03 sowie NEG in den Kavitäten B01, B02 und B03 mitgeführt werden, anderenfalls wird der Lauf vom cobas z 480 Analyzer für ungültig erklärt.

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

4. Mit neuen Pipettenspitzen für jede Proben-DNA 25 µl der ersten Proben-DNA in die Kavitäten C01, C02 und C03 der Mikrotiterplatte geben, dabei für die Zugabe der Proben-DNA in jede Kavität eine neue Spitze verwenden; die Flüssigkeit in jeder Kavität durch mindestens zweimaliges Auf- und Abpipettieren mischen. Dieses Verfahren für die DNA jeder Probe wiederholen und gemäß der Vorlage in Abbildung 7 alle DNA-Proben auf die Mikrotiterplatte geben. Die gesamte Flüssigkeit muss sich unten in den Kavitäten sammeln.

Hinweis: Vor der Verwendung von DNA-Stammlösung aus der Lagerung muss das Elutionsröhrchen mit der Stammlösung im Kurzzeitbetrieb des Vortexmischers (kurze Impulse) gemischt und zentrifugiert werden.

5. Die Mikrotiterplatte mit Versiegelungsfolie (im Lieferumfang der Platten enthalten) abdecken. Das Versiegelungsfolienwerkzeug verwenden, damit die Versiegelungsfolie fest auf der Mikrotiterplatte haftet.
6. Vor Beginn der PCR sicherstellen, dass sich die gesamte Flüssigkeit unten in den Kavitäten angesammelt hat.

Hinweis: Amplifikation und Detektion müssen innerhalb von 1 Stunde nach Zugabe der ersten Proben-DNA-Verdünnung zum Gebrauchs-MMX gestartet werden.

Starten der PCR

Ausführliche Anweisungen zum EGFR-Arbeitsablauf sind dem Benutzerhandbuch und/oder der Benutzerunterstützung des cobas® 4800 Systems zu entnehmen. Wenn das Popup-Fenster „Select Test“ angezeigt wird, „EGFR Plasma P1“ auswählen und auf „OK“ klicken.

Ergebnisse

Interpretation der Ergebnisse

Hinweis: Die gesamte Lauf- und Probenvalidierung wird von der **cobas® 4800 software** durchgeführt.

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

Bei einem gültigen Lauf werden die Probenergebnisse wie in Tabelle 23 dargestellt interpretiert.

Tabelle 23 Interpretation der cobas EGFR-Testergebnisse

Testergebnis	Mutationsergebnis	Ergebnisse des semiquantitativen Index (SQI)	Interpretation
Mutation Detected	Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (Es können mehrere Mutationen vorhanden sein.)	Ex19Del: SQI S768I: SQI L858R: SQI T790M: SQI L861Q: SQI G719X: SQI Ex20Ins: SQI (Es können mehrere Mutationen vorhanden sein.)	Mutation in spezifischer EGFR-Zielregion detektiert
No Mutation Detected (NMD)*	k. A.	k. A.	Mutation in den EGFR-Zielregionen nicht detektiert
Ungültig	k. A.	k. A.	Probenergebnis ist ungültig. Proben mit einem ungültigen Ergebnis gemäß den Anweisungen unter Testwiederholung für Proben mit ungültigem Ergebnis neu testen.
Failed	k. A.	k. A.	Lauf ist infolge eines Hardware- oder Software-Fehlers fehlgeschlagen. Den technischen Kundendienst der zuständigen Roche-Vertretung kontaktieren.

* Das Vorliegen einer Mutation in den EGFR-Zielregionen kann bei dem Ergebnis „No Mutation Detected“ nicht ausgeschlossen werden, da die Ergebnisse von der Konzentration der Mutantensequenzen, einer angemessenen Probenintegrität, der Abwesenheit von Inhibitoren und einer für die Detektion ausreichenden Menge an DNA abhängen.

Die Ergebnis-Flags werden auf der Registerkarte „Results“ (Bildschirm) angezeigt bzw. in der Spalte „Flags“ (Bericht) angegeben. Detaillierte Informationen sind dem Abschnitt **Ergebnis-Flags** zu entnehmen.

Semiquantitativer Index (SQI)

Beim SQI handelt es sich um ein semiquantitatives Maß für die Menge an mutierter cfDNA in einer Probe. Er dient zum Messen von Unterschieden der Mutationslast über die Zeit. Ein Anstieg des SQI-Wertes zeigt eine zunehmende Menge der entsprechenden Zielmutation in einer bestimmten Probe an, eine Abnahme des SQI-Wertes zeigt eine abnehmende Menge der entsprechenden Zielmutation in einer bestimmten Probe an. Repräsentative SQI-Ergebnisse für jede EGFR-Mutationsklasse, die mit dem Test nachgewiesen wurde, sind in den Linearitätsergebnissen in Abbildung 8 bis Abbildung 14 dargestellt.

Testwiederholung für Proben mit ungültigem Ergebnis

1. Wenn der Lauf ungültig ist, reicht das für die entsprechende Probe extrahierte Volumen an DNA nicht aus, um Amplifikation und Detektion zu wiederholen. In diesem Fall muss das gesamte Testverfahren für alle Proben beginnend mit der DNA-Isolierung wiederholt werden.
2. Wenn der Lauf gültig, aber die Probe ungültig ist, reicht das für die entsprechende Probe extrahierte Volumen an DNA nicht aus, um Amplifikation und Detektion zu wiederholen. In diesem Fall muss das gesamte Testverfahren für die ungültige Probe beginnend mit der DNA-Isolierung wiederholt werden.

Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse

In jedem Lauf mit bis zu 30 Proben wird ein Satz aus **cobas** EGFR-Test-Mutationskontrolle (**EGFR MC**, Kavitäten **A01**, **A02** und **A03**) und Negativkontrolle (**NEG**, Kavitäten **B01**, **B02** und **B03**) für Gebrauchs-MMX-1, Gebrauchs-MMX-2 und Gebrauchs-MMX-3 v2 mitgeführt. Ein Lauf ist gültig, wenn **EGFR MC** und **NEG** gültig sind. Wenn eine **EGFR MC** oder **NEG** ungültig ist, ist der gesamte Lauf ungültig und muss wiederholt werden.

Mutationskontrolle

Das Ergebnis der **EGFR MC** muss gültig sein („Valid“). Wenn die Ergebnisse der **EGFR MC** durchweg ungültig sind, den technischen Kundendienst der zuständigen Roche-Vertretung verständigen.

Negativkontrolle

Das Ergebnis der **NEG** muss gültig sein („Valid“). Wenn die Ergebnisse für **NEG** durchweg ungültig sind, den technischen Kundendienst der zuständigen Roche-Vertretung verständigen.

Verfahrenseinschränkungen

1. Nur die angegebenen Probenmaterialien testen. Der **cobas** EGFR-Test wurde für die Verwendung mit Plasmaproben validiert, die von im Roche cfDNA-Röhrchen oder im K2-EDTA-Röhrchen gesammelten Blut getrennt wurden.
2. Die Leistung des **cobas** EGFR-Tests wurde mit dem **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit validiert.
3. Die Detektion einer Mutation hängt von der Anzahl der in der Probe enthaltenen Kopien ab und kann durch die Probenintegrität, die Menge der isolierten DNA und das Vorliegen von Störsubstanzen beeinflusst werden.
4. Zuverlässige Ergebnisse sind nur bei Anwendung sachgemäßer Verfahren für Transport, Lagerung und Bearbeitung der Proben gewährleistet. Die in dieser Gebrauchsanweisung sowie im Benutzerhandbuch und/oder in der Benutzerunterstützung des **cobas**® 4800 Systems beschriebenen Vorgehensweisen sind zu befolgen.
5. Beim Pipettieren vom Boden des Elutionsröhrchens kann das Pellet beschädigt werden, was zu einer Beeinträchtigung der Testergebnisse führen kann.
6. Die Zugabe des Enzyms AmpErase zum Master-Mix des **cobas** EGFR-Tests ermöglicht eine selektive Amplifikation der Ziel-DNA; es ist jedoch gute Laborpraxis sowie die genaue Einhaltung der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren erforderlich, um eine Kontamination von Reagenzien zu vermeiden.
7. Dieses Produkt darf nur von Personal verwendet werden, das in der PCR-Technik und der Verwendung des **cobas**® 4800 Systems geschult ist.
8. Für die Verwendung mit diesem Produkt wurde ausschließlich der **cobas z 480** Analyzer validiert. Es darf kein anderer Thermocycler mit optischer Echtzeit-Detektion mit diesem Produkt verwendet werden.
9. Bevor Benutzer von einer Methode zu einer anderen wechseln, sollten sie aufgrund der inhärenten Unterschiede zwischen den Verfahren in ihrem Labor Korrelationsstudien durchführen, um die Unterschiede der Techniken aufzuzeigen.
10. Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren kann zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen.

11. Mutationen in den Regionen der genomischen DNA des EGFR-Gens, die durch die Primer oder Sonden des **cobas** EGFR-Tests abgedeckt sind, treten zwar selten auf, können jedoch dazu führen, dass eine Mutation in den Exons 18, 19, 20 und 21 nicht nachgewiesen wird (Ergebnis „No Mutation Detected“).
12. Der **cobas** EGFR-Test zeigt eine Kreuzreaktivität (Ergebnis „Mutation Detected“) mit der Mutation L747S in Exon 19, einer seltenen erworbenen Mutation, die zu einer Resistenz gegenüber der Behandlung mit TKI führen kann.¹⁹
13. Proben mit hohen Konzentrationen ($> 10^5$ Kopien/ml) können zu falschen Ergebnissen führen.
14. Der **cobas** EGFR-Test wurde für die Verwendung mit 25 µl DNA-Stammlösung pro Kavität validiert. Von Mengen unter 25 µl DNA-Stammlösung pro Kavität wird abgeraten.
15. Für die Detektion von ≥ 100 Kopien mutierter DNA pro ml Plasma, das von im Roche cfDNA-Röhrchen oder im K2-EDTA-Röhrchen gesammelten Blut getrennt wurde, muss für die in Tabelle 3 aufgeführten EGFR-Mutationen das oben beschriebene Verfahren befolgt werden.
16. Proben, für die das Ergebnis „No Mutation Detected“ erzielt wird, können EGFR-Mutationen enthalten, die mit dem Test nicht nachgewiesen werden.
17. Für Plasmaproben mit dem Ergebnis „No Mutation Detected“ ist ein Folgetest oder eine Bestätigung durch Gewebetests in Erwägung zu ziehen.
18. Plasma, das aus in Roche cfDNA-Röhrchen gesammelten Vollblut gewonnen wurde, kann lediglich einmal getestet werden.
19. Plasma aus Blutproben, die zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommen wurden, ist nicht zu vermischen.
20. Die Leistung des **cobas** EGFR-Tests für die Verwendung mit geronnenen, in Roche cfDNA-Röhrchen gesammelten Proben wurde noch nicht belegt. Geronnene Proben dürfen nicht verwendet werden und dem Patienten muss eine neue Probe entnommen werden.
21. In Plasma, das von im Roche cfDNA-Röhrchen gesammelten Blut getrennt wurde, konnte eine Hämolyse beobachtet werden. Bei einer Hämoglobinkonzentration von $> 2,0$ g/l könnte gegebenenfalls ein Störeinfluss auf die Leistung des **cobas** EGFR-Tests festgestellt werden.

Nichtklinische Leistungsmerkmale

Analytische Leistung

Die folgenden Daten sollen die analytische Leistung des **cobas** EGFR-Tests belegen.

Analytische Sensitivität – Leerwertgrenze

Es wurden K2-EDTA-Plasmaproben mit EGFR-Wildtyp von gesunden Spendern evaluiert, um die Leistung des **cobas** EGFR-Tests in der Abwesenheit von Template zu bewerten und sicherzustellen, dass eine Leerprobe kein analytisches Signal erzeugt, das eine niedrige Mutationskonzentration anzeigen könnte. Die gemäß der Richtlinie CLSI EP17-A2²⁰ bestimmte Leerwertgrenze beträgt bei allen Mutationen 0.

Nachweisgrenze mit Zelllinien-DNA

K2-EDTA-Plasma

K2-EDTA-Plasma gesunder Spender vom EGFR-Wildtyp wurde mit Zelllinien-DNA versetzt, die jeweils eine der sieben mit dem Test nachweisbaren Mutationsklassen enthielt. Es wurden Reihenverdünnungen hergestellt; anschließend wurden 24 Replikate jeder Panelprobe mit drei **cobas** EGFR-Testkit-Chargen getestet.

Für jede der sieben mit dem Test nachgewiesenen Mutationsklassen wurde die Nachweisgrenze als die niedrigste DNA-Konzentration bestimmt, bei der in mindestens 95 % der Fälle für die Zielmutation das EGFR-Ergebnis „Mutation Detected“ erhalten wird. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24 Nachweisgrenze (LoD) des cobas EGFR-Tests für K2-EDTA-Plasma

EGFR-Exon	EGFR-Mutationsgruppe	EGFR-Nukleinsäuresequenz	LoD intakte* DNA (Kopien/ml)	LoD gescherte** DNA (Kopien/ml)	COSMIC-ID 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

Die Unterschiede in der gemessenen Nachweisgrenze sind auf Unterschiede der Hintergrund-DNA zurückzuführen.

* Die intakte Zelllinien-DNA hatte einen Wildtyp-DNA-Hintergrund von ungefähr 10.000 Kopien/ml.

** Die Zelllinien-DNA, die mechanisch auf eine mittlere Größe von 220 bp geschert wurde, hatte einen Wildtyp-DNA-Hintergrund von ungefähr 100.000 Kopien/ml.

Roche-cfDNA-Plasma

Für Plasma, das von im Roche cfDNA-Röhrchen gesammelten Blut getrennt wurde, wurden die Nachweisgrenzen überprüft, indem Roche-cfDNA-Plasma gesunder Spender vom EGFR-Wildtyp mit gescherter Zelllinien-DNA versetzt wurde, die jeweils eine der sieben mit dem Test nachweisbaren Mutationsklassen enthielt. Zur Erzielung der in Tabelle 24 angegebenen Konzentrationen der Nachweisgrenze wurden Verdünnungen hergestellt und für jede Probe wurden 20 Replikate mit der **cobas** EGFR-Testkit-Charge getestet. Die Trefferquote für jede Mutation betrug 100 %.

Der **cobas** EGFR-Test ist ein Test zum Nachweis von EGFR-Mutationen in den Exons 18, 19, 20 und 21 mit ≤ 100 Kopien mutierter DNA pro ml Plasma (K2-EDTA-Plasma oder Roche-cfDNA-Plasma) unter Verwendung einer Standardaufgabe von 25 μ l DNA-Stammlösung pro Kavität.

Kreuzreaktivität mit anderen Mutationen in Exon 18, 19, 20 und 21

Proben aus der AURA-Erweiterungsstudie und der AURA2-Studie

Bei den folgenden EGFR-Mutationen, die in Proben aus der AURA-Erweiterungsstudie und der AURA2-Studie beobachtet wurden, lieferte der **cobas** EGFR-Test das Ergebnis „Mutation Detected“ (Mutation erkannt) (Tabelle 25). Die AURA-Erweiterungsstudie wurde genutzt, um die Proben aus der AURA2-Kohorte zu ergänzen und die Wahrscheinlichkeit eines Nachweises seltener Mutationen in Plasma zu erhöhen. Die analytische Leistung des **cobas** EGFR-Tests bei der Detektion dieser Mutationen wurde nicht untersucht.

Tabelle 25 In der AURA-Erweiterungsstudie und der AURA2-Studie beobachtete Mutationen, für die Kreuzreaktivität mit dem **cobas** EGFR-Test ermittelt wurde

Exon	Mutationssequenz	Änderung der Aminosäuresequenz	COSMIC-ID ¹⁴
19	2236_2256>ATC	E746_S752>I	133190
	2237_2258>TATC	E746_P753>VS	Nicht gefunden
	2239_2256>CAG	L747_S752>Q	Nicht gefunden
	2239_2264>GCCAA	L747_A755>AN	85891
	2240_2264>CGAGAGA	L747_A755>SRD	Nicht gefunden

Spezifität – Mikroorganismen

Zur Evaluation der Spezifität des **cobas** EGFR-Tests wurden K2-EDTA-Plasmaproben von gesunden Spendern mit Wildtyp- und mutierten EGFR-Sequenzen nach Zugabe von *Staphylococcus epidermidis* in einer Menge von 1×10^6 koloniebildenden Einheiten getestet; dabei wurde keine Kreuzreaktivität oder Interferenz mit dem **cobas** EGFR-Test festgestellt.

Störeinflüsse

K2-EDTA-Plasma

Bei separater Zugabe von Triglyzeriden (37 mM, empfohlene hohe Konzentration nach CLSI²¹), Bilirubin (0,2 g/l; unkonjugiert oder konjugiert, empfohlene hohe Konzentration nach CLSI²¹) und Hämoglobin (1,5 g/l) zu K2-EDTA-Plasmaproben mit Wildtyp- und mutierten EGFR-Sequenzen von gesunden Spendern wurde kein Störeinfluss auf den **cobas** EGFR-Test festgestellt. Bei einer Hämoglobinkonzentration von 2,0 g/l in Plasma wurde ein Störeinfluss auf den **cobas** EGFR-Test nachgewiesen. Bei einer Albuminkonzentration von ≥ 60 g/l (60 g/l: empfohlene hohe Konzentration nach CLSI²¹) kann es zu einem Störeinfluss auf den **cobas** EGFR-Test kommen.

Die Studienergebnisse zeigen, dass EDTA, Neupogen und TARCEVA®, die zu K2-EDTA-Plasmaproben mit Wildtyp- und mutierten EGFR-Sequenzen von gesunden Spendern gegeben wurden, keinen störenden Einfluss auf die Leistung des **cobas** EGFR-Tests hatten.

Roche-cfDNA-Plasma

Bei separater Zugabe von Triglyzeriden (37 mM, empfohlene hohe Konzentration nach CLSI²¹), Bilirubin (0,2 g/l, unkonjugiert oder konjugiert, empfohlene hohe Konzentration nach CLSI²¹), Hämoglobin (2,0 g/l) und Albumin (60 g/l, empfohlene hohe Konzentration nach CLSI²¹) zu Roche-cfDNA-Plasmaproben mit Wildtyp- und mutierten EGFR-Sequenzen von gesunden Spendern wurde kein Störeinfluss auf den **cobas** EGFR-Test festgestellt.

Linearität

K2-EDTA-Plasma

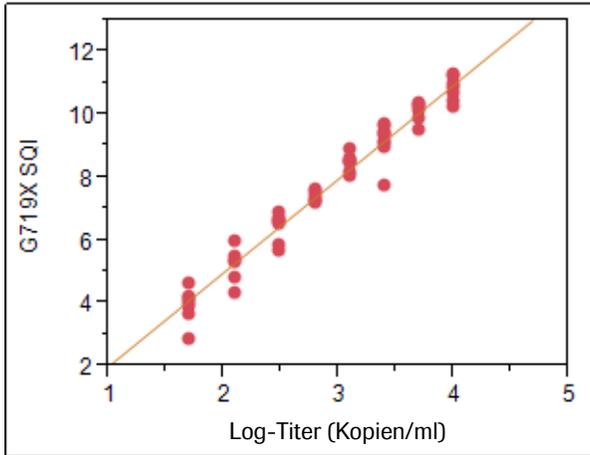
Zur Evaluation der Linearität des **cobas** EGFR-Tests wurde für jede mit dem Test nachweisbare EGFR-Mutationsklasse eine Verdünnungsreihe von mindestens 8 Panelproben untersucht, die den gesamten linearen Bereich der prädominanten Mutation abdeckte. Zur Herstellung der Panel-Proben wurde Zelllinien-DNA von jeder der prädominanten Mutationen in K2-EDTA-Plasma gesunder Spender vom EGFR-Wildtyp verdünnt. Die Evaluierung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP-06A durchgeführt.²⁴ Für jede der 2 Chargen wurden 10 Replikate pro Panelprobe für Konzentrationen bis zu 1,0E+04 Kopien/ml getestet (insgesamt 20 Replikate pro Konzentration). Über der Konzentration von 1,0E+04 Kopien/ml wurde ein Replikat pro Charge getestet.

Die linearen Bereiche für die verschiedenen Mutationsklassen des **cobas** EGFR-Tests sind in Tabelle 26 zusammengefasst und die zugehörigen Diagramme für eine Charge sind in Abbildung 8 bis Abbildung 14 dargestellt.

Tabelle 26 Linearer Bereich des cobas EGFR-Tests für K2-EDTA-Plasma

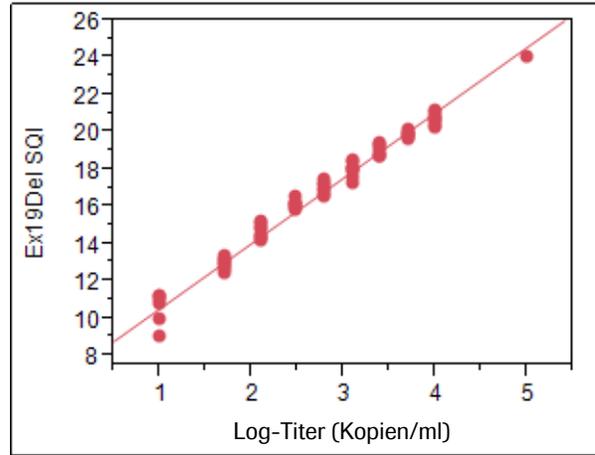
EGFR-Exon	EGFR-Mutation	Nukleinsäure-Zielsequenz	Linearer Bereich (Kopien/ml)
18	G719A	2156G>C	50 – 1E+04
19	Exon-19-Deletion	2235_2249del15	10 – 1E+05
20	S768I	2303G>T	10 – 1E+05
20	T790M	2369C>T	50 – 1E+05
20	Exon-20-Insertion	2307_2308ins9GCCAGCGTG	10 – 1E+05
21	L858R	2573T>G	10 – 1E+05
21	L861Q	2582T>A	10 – 1E+05

**Abbildung 8 Linearität für mutierte DNA in K2-EDTA-Plasma:
Zelllinien-DNA G719A**



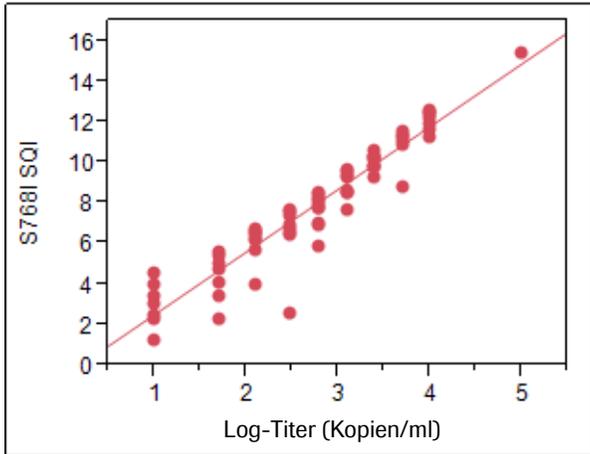
$SQI = -0,987 + 2,986 \times \log \text{Kopien/ml}$
 $R^2 = 0,968$

**Abbildung 9 Linearität für mutierte DNA in K2-EDTA-Plasma:
Zelllinien-DNA Ex19Del**



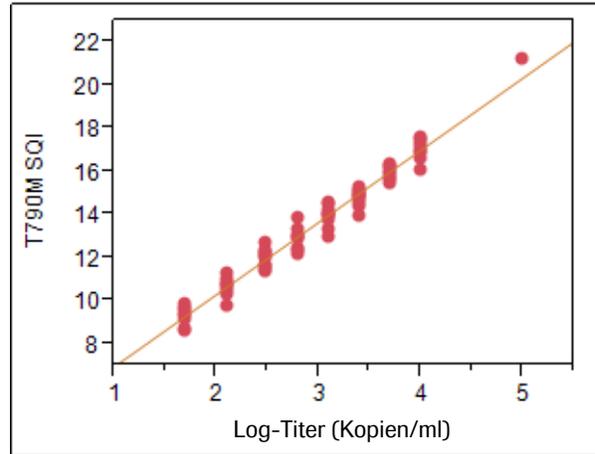
$SQI = 7,042 + 3,507 \times \log \text{Kopien/ml}$
 $R^2 = 0,981$

**Abbildung 10 Linearität für mutierte DNA in K2-EDTA-Plasma:
Zelllinien-DNA S768I**



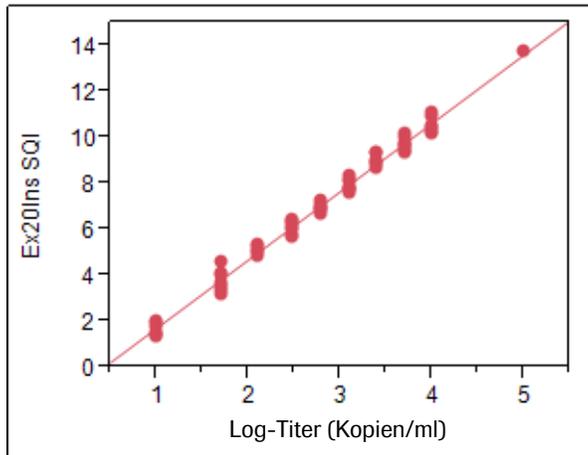
$SQI = -0,578 + 3,093 \times \log \text{Kopien/ml}$
 $R^2 = 0,912$

**Abbildung 11 Linearität für mutierte DNA in K2-EDTA-Plasma:
Zelllinien-DNA T790M**



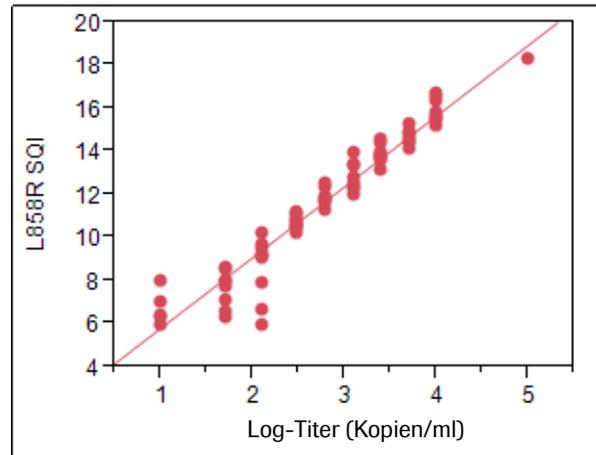
$SQI = 3,593 + 3,352 \times \log \text{Kopien/ml}$
 $R^2 = 0,973$

Abbildung 12 Linearität für mutierte DNA in K2-EDTA-Plasma:
Zelllinien-DNA Ex20Ins



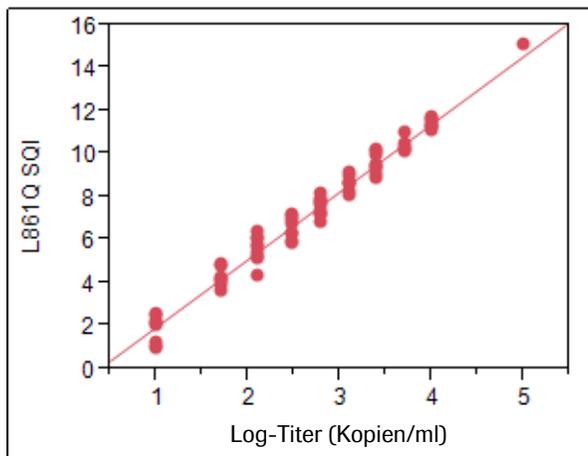
$SQI = -1,268 + 2,973 \times \log \text{Kopien/ml}$
 $R^2 = 0,990$

Abbildung 13 Linearität für mutierte DNA in K2-EDTA-Plasma:
Zelllinien-DNA L858R



$SQI = 2,543 + 3,283 \times \log \text{Kopien/ml}$
 $R^2 = 0,933$

Abbildung 14 Linearität für mutierte DNA in K2-EDTA-Plasma:
Zelllinien-DNA L861Q



$SQI = -1,177 + 3,149 \times \log \text{Kopien/ml}$
 $R^2 = 0,980$

Roche-cfDNA-Plasma

Der lineare Bereich für Roche-cfDNA-Plasma wurde anhand einer Verdünnungsreihe aus mindestens 6 Panelproben, die den gesamten, für K2-EDTA-Plasma bestimmten, linearen Bereich abdeckten, überprüft (Tabelle 26). Zur Herstellung der Panel-Proben wurde gescherte Zelllinien-DNA von jeder der prädominanten Mutationen in Roche-cfDNA-Plasma gesunder Spender vom EGFR-Wildtyp verdünnt. Die Evaluierung erfolgte gemäß CLSI-Richtlinie EP06-A.²⁴ Für jede der 2 Chargen wurden 4 Replikate pro Panelprobe für Konzentrationen bis zu 1,0E+04 Kopien/ml getestet (insgesamt 8 Replikate pro Konzentration). Über der Konzentration von 1,0E+04 Kopien/ml wurden zwei Replikate pro Charge getestet (insgesamt 4 Replikate pro Konzentration).

Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit des **cobas** EGFR-Tests wurde anhand von 12 Proben von mutierter EGFR-Zellenlinien-DNA evaluiert, die in K2-EDTA-Plasmaproben gesunder Spender verdünnt wurde. Die prädominante Mutation von jeder mit dem Test nachgewiesenen Klasse wurde weiter zu 11 Proben verdünnt und an der dreifachen Nachweisgrenze der jeweiligen Mutation (in Kopien/ml), bei 1,0E+03 Kopien/ml und bei 5,0E+04 Kopien/ml getestet. Darüber hinaus wurde eine Wildtyp-Probe getestet. Die 12 Proben wurden über 4 Tage mit zwei verschiedenen Reagenzchargen, zwei **cobas z 480** Analyzern und von zwei Anwendern jeweils in Doppelbestimmungen getestet (N = 32 je Probe). Die Testgenauigkeit des **cobas** EGFR-Tests betrug dabei 99,2 % (381/384).

Der Mittelwert und die Standardabweichung der im Rahmen der Untersuchung zur Wiederholbarkeit bestimmten SQI-Werte sind in Tabelle 27 zusammengefasst. Alle 32 Replikate der Wildtyp-Probe lieferten das erwartete Ergebnis „No Mutation Detected“.

Tabelle 27 Mittelwert und Standardabweichung der im Rahmen der Untersuchung zur Wiederholbarkeit bestimmten SQI-Werte

EGFR-Exon	EGFR-Mutation	Nukleinsäure-Zielsequenz	Konzentration (Kopien/ml)	Mittlerer SQI	SD 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
EGFR-Wildtyp			0	NMD	NMD

NMD: keine Mutation erkannt (No Mutation Detected)

Klinische Leistungsmerkmale

Klinische Reproduzierbarkeit bei K2-EDTA-Plasma

Es wurde eine Studie zur Reproduzierbarkeit des cobas EGFR-Tests durchgeführt. Dazu wurde ein Panel mit 9 künstlich hergestellten Proben von in NSCLC-Plasma verdünnter Zelllinien-DNA an 3 Testzentren (2 extern und 1 intern, 2 Anwender pro Zentrum) mit 3 Reagenzchargen an 3 nicht aufeinander folgenden Tagen getestet. In vier künstlich hergestellten Proben waren die folgenden Mutationen wie in Tabelle 28 dargestellt vertreten: eine G719X-Mutation in Exon 18, eine Exon-19-Deletionsmutation, zwei T790M-Mutationen in Exon 20, eine Exon-20-Insertionsmutation, eine L858R-Mutation in Exon 21 sowie eine L861Q-Mutation in Exon 21. Jede künstlich hergestellte Probe wurde in zwei Konzentrationen hergestellt: circa 100 Kopien/ml und 300 Kopien/ml. Diese künstlich hergestellten Proben wurden in acht separate Panelproben neben einer Wildtyp-Kontrolle überführt, um das 9 Proben umfassende Panel zu bilden.

Tabelle 28 Mutationskombinationen in den künstlich hergestellten Proben

Zelllinien-DNA-Kombination 1	Zelllinien-DNA-Kombination 2	Zelllinien-DNA-Kombination 3	Zelllinien-DNA-Kombination 4
Exon-19-Del.	L858R	S768I	L861Q
T790M	T790M	G719A	Exon20ins

Es wurden insgesamt 37 Läufe durchgeführt, von denen 36 gültig und einer ungültig waren. Es wurden insgesamt 648 Panels (d. h. 1224 Mutationen) getestet, von denen 646 (1220 Mutationen) gültige Ergebnisse lieferten. In 72 gültigen Tests der Wildtyp-Panelprobe wurden keine Mutationen erkannt, was einer Übereinstimmung von 100 % entspricht. Die Übereinstimmung ist je nach Mutation unterschiedlich: Bei acht Mutationen betrug die Übereinstimmung 100 %, bei fünf Mutationen betrug sie > 97 % und bei einer Mutation (G719X) war die Übereinstimmung mit einem Wert von circa 90 % geringer. Die Ergebnisse der Gesamtübereinstimmung nach Mutation sind in Tabelle 29 dargestellt. Der Variationskoeffizient (VK) lag bei allen Mutationspanelproben bei ≤ 12,8 %. Der Gesamt-VK für die interne Kontrolle und die Mutationskontrolle lag bei ≤ 1,5 %. Der VK zwischen den Chargen lag bei ≤ 0,89 % und der VK innerhalb einer Charge bei ≤ 1,47 %.

Tabelle 29 Werte der Gesamtübereinstimmung nach Mutationspanelprobe in der Studie zur Reproduzierbarkeit

Mutationspanelprobe	Anzahl gültiger Tests	Übereinstimmung N	Übereinstimmung in % (95 % KI) ^a
Wildtyp – Konzentration n. z.	72	72	100 (95,0; 100,0)
Exon 18, G719A – 100 Kopien/ml	72	65	90,3 (81,0, 96,0) ^b
Exon-19-Deletion (2235_2249del15) – 100 Kopien/ml	72	72	100 (95,0; 100,0)
Exon-20-Insertion (2307_2308ins9) – 100 Kopien/ml	72	72	100 (95,0; 100,0)
Exon 20, S768I – 100 Kopien/ml	72	72	100 (95,0; 100,0)
Exon 20, T790M – 100 Kopien/ml	143	139	97,2 (93,0; 99,2)
Exon 21, L858R – 100 Kopien/ml	71	70	98,6 (92,4; 100,0)
Exon 21, L861Q – 100 Kopien/ml	72	72	100 (95,0; 100,0)
Exon 18, G719A – 300 Kopien/ml	71	70	98,6 (92,4; 100,0)
Exon-19-Deletion (2235_2249del15) – 300 Kopien/ml	72	72	100 (95,0; 100,0)
Exon-20-Insertion (2307_2308ins9) – 300 Kopien/ml	72	72	100 (95,0; 100,0)
Exon 20, S768I – 300 Kopien/ml	71	71	100 (94,9; 100,0)
Exon 20, T790M – 300 Kopien/ml	144	142	98,6 (95,1; 99,8)
Exon 21, L858R – 300 Kopien/ml	72	71	98,6 (92,5; 100,0)
Exon 21, L861Q – 300 Kopien/ml	72	72	100 (95,0; 100,0)

^a 95-%-KI = exaktes binomisches Konfidenzintervall von 95 %.

^b Die geringere Übereinstimmung bei dieser Probe war in erster Linie auf mehrere fehlende Ergebnisse (n = 6/24 Replikate insgesamt) überwiegend in einem der drei Zentren zurückzuführen.

Hinweis: Die Ergebnisse stimmten überein, wenn die Panelprobe eines Mutationstyps ein gültiges „Mutation Detected“-Ergebnis erzielte oder wenn eine Wildtyp-Panelprobe ein gültiges „No Mutation Detected“-Ergebnis erzielte.

Hinweis: Die für diese Studie verwendeten Proben bestanden aus Zelllinien-DNA, die mechanisch auf eine mittlere Größe von 220 bp geschert wurde und hatten einen Wildtyp-DNA-Hintergrund von ungefähr 12.000 Kopien/ml.

Klinische Reproduzierbarkeit bei Roche-cfDNA-Plasma

Es wurde eine Studie zur Reproduzierbarkeit des cobas EGFR-Tests durchgeführt. Dazu wurden drei Panels mit 9 künstlich hergestellten Proben von in drei unterschiedlichen Plasma-Pools gesunder Spender verdünnter Zelllinien-DNA an 3 Testzentren (2 extern und 1 intern, 2 Anwender pro Zentrum) mit einer Reagenzcharge an 3 nicht aufeinander folgenden Tagen getestet. Die Proben in jedem Pool wurden unter Verwendung von drei verschiedenen Chargen von Roche cfDNA-Röhrchen entnommen. An jedem Testzentrum wurden zwei der Plasma-Panels getestet. In vier künstlich hergestellten Proben waren die folgenden Mutationen wie in Tabelle 30 dargestellt vertreten: eine G719X-Mutation in Exon 18, eine Exon-19-Deletionsmutation, eine T790M-Mutation in Exon 20, eine Exon-20-Insertionsmutation, eine L858R-Mutation in Exon 21 sowie eine L861Q-Mutation in Exon 21. Jede künstlich hergestellte Probe wurde in zwei Konzentrationen hergestellt: circa 100 Kopien/ml und 300 Kopien/ml. Diese künstlich hergestellten Proben wurden in acht separate Panelproben neben einer Wildtyp-Kontrolle überführt, um das 9 Proben umfassende Panel zu bilden.

Tabelle 30 Mutationskombinationen in den künstlich hergestellten Proben

Zelllinien-DNA-Kombination 1	Zelllinien-DNA-Kombination 2	Zelllinien-DNA-Kombination 3	Zelllinien-DNA-Kombination 4
Exon-19-Del.	S768I	T790M	L858R
Exon-20-Ins.	G719A	L861Q	k. A.

Insgesamt wurden 36 Läufe durchgeführt. Alle Läufe waren gültig. Es wurden insgesamt 648 Panels getestet, von denen 646 (1.220 Mutationen) gültige Ergebnisse lieferten. In 72 gültigen Tests der Wildtyp-Panelprobe wurde eine Mutation erkannt, was einer Übereinstimmung von 98,6 % entspricht. Die Übereinstimmung ist je nach Mutation unterschiedlich: Bei dreizehn betrug die Übereinstimmung 100 %, bei einer betrug sie > 98 %. Die Ergebnisse der Gesamtübereinstimmung nach Mutation sind in Tabelle 31 dargestellt. Der Variationskoeffizient (VK) lag bei allen Mutationspanelproben bei ≤ 13,7 %. Der Gesamt-VK für die interne Kontrolle und die Mutationskontrolle lag bei ≤ 1,3 %.

Tabelle 31 Werte der Gesamtübereinstimmung nach Mutationspanelprobe in der Studie zur Reproduzierbarkeit

Mutationspanelprobe	Anzahl gültiger Tests	Übereinstimmung N	Übereinstimmung in % (95 % KI) ^a
Wildtyp – Konzentration n. z.	72	71	98,6 (92,5; 100,0)
Exon 18, G719A – 100 Kopien/ml	72	71	98,6 (92,5; 100,0)
Exon-19-Deletion (2235_2249del15) – 100 Kopien/ml	72	72	100 (95,0; 100,0)
Exon-20-Insertion (2307_2308ins9) – 100 Kopien/ml	72	72	100 (95,0; 100,0)
Exon 20, S768I – 100 Kopien/ml	72	72	100 (95,0; 100,0)
Exon 20, T790M – 100 Kopien/ml	72	72	100 (95,0; 100,0)
Exon 21, L858R – 100 Kopien/ml	72	72	100 (95,0; 100,0)
Exon 21, L861Q – 100 Kopien/ml	72	72	100 (95,0; 100,0)
Exon 18, G719A – 300 Kopien/ml	72	72	100 (95,0; 100,0)
Exon-19-Deletion (2235_2249del15) – 300 Kopien/ml	71	71	100 (94,9; 100,0)
Exon-20-Insertion (2307_2308ins9) – 300 Kopien/ml	71	71	100 (94,9; 100,0)
Exon 20, S768I – 300 Kopien/ml	72	72	100 (95,0; 100,0)
Exon 20, T790M – 300 Kopien/ml	71	71	100 (94,9; 100,0)
Exon 21, L858R – 300 Kopien/ml	72	72	100 (95,0; 100,0)
Exon 21, L861Q – 300 Kopien/ml	71	71	100 (94,9; 100,0)

^a 95%-KI = exaktes binomisches Konfidenzintervall von 95 %.

Hinweis: Die Ergebnisse stimmten überein, wenn die Panelprobe eines Mutationstyps ein gültiges „Mutation Detected“-Ergebnis erzielte oder wenn eine Wildtyp-Panelprobe ein gültiges „No Mutation Detected“-Ergebnis erzielte.

Nachweisgrenze bei NSCLC-Plasmaproben

Zur Bestätigung der Nachweisgrenze (LoD) bei K2-EDTA-NSCLC-Plasmaproben für drei Exon-19-Deletionen, eine L858R-Mutation und eine T790M-Mutation wurde ein 11 Proben umfassendes Panel von NSCLC-Plasmaproben (fünf Mutationen in je zwei Konzentrationen: 1 × LoD und 2 × LoD sowie Wildtyp) mit dem cobas EGFR-Test an drei Zentren (zwei extern und eine intern, zwei Anwender pro Zentrum) mit drei Reagenzchargen an zwei nicht aufeinander folgenden Tagen getestet. Es wurden insgesamt 12 Läufe durchgeführt (zwei Replikate je Lauf), die alle gültig waren. Mit den 11 Panelproben wurden insgesamt 264 Tests durchgeführt, von denen 262 (99,2 %) gültig waren. In 23 gültigen Tests der Wildtyp-Panelprobe wurden keine Mutationen erkannt, was einer Übereinstimmung von 100 % entspricht. Die Übereinstimmung bei Exon 20 T790M bei 1 × LoD beträgt 95,8 % und bei allen anderen Mutationspanelproben 100 %. Die Übereinstimmung nach Panelprobe ist in Tabelle 32 aufgeführt. Der Variationskoeffizient (VK) lag bei allen Mutationspanelproben bei < 7,0 %.

Tabelle 32 Übereinstimmung nach Panelprobe

Panelprobe	Anzahl gültiger Tests	Übereinstimmung N	Übereinstimmung in % (95 % KI) ^a
Wildtyp – Konzentration n. z.	23	23	100 (85,2; 100,0)
Exon-19-Deletion 1 – 1 × LoD	24	24	100 (85,8; 100,0)
Exon-19-Deletion 1 – 2 × LoD	24	24	100 (85,8; 100,0)
Exon-19-Deletion 2 – 1 × LoD	23	23	100 (85,2; 100,0)
Exon-19-Deletion 2 – 2 × LoD	24	24	100 (85,8; 100,0)
Exon-19-Deletion 3 – 1 × LoD	24	24	100 (85,8; 100,0)
Exon-19-Deletion 3 – 2 × LoD	24	24	100 (85,8; 100,0)
Exon 20 T790M – 1 × LoD	24	23	95,8 (78,9; 99,9)
Exon 20 T790M – 2 × LoD	24	24	100 (85,8; 100,0)
Exon 21 L858R – 1 × LoD	24	24	100 (85,8; 100,0)
Exon 21 L858R – 2 × LoD	24	24	100 (85,8; 100,0)

^a 95-%-KI = exaktes binomisches Konfidenzintervall von 95 %.

Hinweis: Die Ergebnisse wurden als Übereinstimmung gewertet, wenn bei einem gültigen Test der Panelprobe eines Mutationstyps das Ergebnis „Mutation Detected“ erzielt wurde oder wenn bei einem gültigen Test einer Wildtyp-Panelprobe das Ergebnis „No Mutation Detected“ erzielt wurde.

Hinweis: Die in dieser Studie verwendeten klinischen Proben hatten einen Wildtyp-DNA-Hintergrund von ungefähr 24.000 Kopien/ml.

Korrelation von Roche-cfDNA- und K2-EDTA-Plasma

Die Leistung des **cobas** EGFR-Tests bei K2-EDTA-Plasma wurde mit der Leistung des Tests bei Roche-cfDNA-Plasma verglichen. Hierzu wurde ein Proben-Panel mit gepaarten Proben von 34 NSCLC-Patienten mit EGFR-Wildtyp, 17 EGFR-mutationspositive NSCLC-Patienten und 20 gesunden Spendern getestet. Die Proben der gesunden Spender dienten der Herstellung von Surrogatproben. Diese bestehen aus gescherter Zelllinien-DNA, die die vom **cobas** EGFR-Test nachweisbaren, prädominanten Mutationen enthält und in K2-EDTA-Röhrchen sowie Roche cfDNA-Röhrchen gesammeltem Vollblut zugesetzt wurde. Die Grenze der zugesetzten gescherter Zelllinien-DNA in den Surrogatproben lag etwa bei der 1,5fachen Nachweisgrenze für die jeweilige Mutation, die im K2-EDTA-Plasma bestimmt wurde (Tabelle 24). Der Mutationsstatus jedes NSCLC-Patienten wurde mittels NGS bestimmt. Jede Probe wurde mit einer Charge der **cobas** EGFR-Testreagenzien getestet. Alle Proben ergaben gültige Ergebnisse; die Ergebnisse des Vergleichs sind in Tabelle 33 zusammengefasst.

Tabelle 33 Übereinstimmungsanalyse zwischen K2-EDTA-Plasma und aus dem Roche cfDNA-Röhrchen gewonnenem Plasma

		K2-EDTA-Röhrchen		Gesamt
		MD	NMD	
Roche Cell-Free DNA-Röhrchen	MD	37	0	37
	NMD	0	34	34
	Gesamt	37	34	71

Positive Übereinstimmung (%): 95-%-KI	100 % 90,5 % – 100 %
Negative Übereinstimmung (%): 95-%-KI	100 % 89,7 % – 100 %
Gesamtübereinstimmung (%): 95-%-KI	100 % 94,5 % – 100 %

Legende: MD = Mutation erkannt (Mutation Detected); NMD = keine Mutation erkannt (No Mutation Detected)

Die Übereinstimmung zwischen gepaarten Proben für K2-EDTA-Plasma und aus dem Roche Cell-Free DNA-Sammelröhrchen gewonnenen Plasma war 100 %. Es wurden keine Ergebnisse beobachtet, die nicht übereinstimmten.

In Plasmaproben aus der Studie wurden mit dem **cobas** EGFR-Test die in Tabelle 34 aufgeführten Mutationen in den Exons 18, 19, 20 und 21 des EGFR-Gens nachgewiesen. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Mutationen in NSCLC-Proben beobachtet.

Tabelle 34 In Korrelation zu Roche-cfDNA-Plasma und K2-EDTA-Plasma beobachtete Mutationen

Exon	Mutationssequenz	Änderung der Aminosäuresequenz	COSMIC-ID 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	Nicht gefunden
	2237_2251del15 [§]	E746_T751>A	12678
	2239_2240TT>CC [§]	L747P	24267
	2251A>C [§]	T751P	Nicht gefunden
20	2369C>T ⁺	T790M	6240
	2303G>T ⁺	S768I	6241
	2307_2308insGCCAGCGTG*	V769_D770insASV	12376
21	2573T>G ⁺	L858R	6224
	2582T>A*	L861Q	6213

* Nur in Surrogatprobe beobachtet

+ In Surrogat- und NSCLC-Probe beobachtet

§ Nur in NSCLC-Probe beobachtet

Korrelation mit der Referenzmethode unter Verwendung von Phase-III-Plasmaproben aus der ASPIRATION-Kohorte

Die analytische Genauigkeit des **cobas** EGFR-Tests zum Nachweis von Exon-19-Deletionen und L858R-Mutationen wurde durch einen Vergleich mit einem validierten Hochdurchsatz-Sequenzierungssystem (NGS-System) unter Verwendung von K2-EDTA-Plasmaproben von Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC aus einer oder mehreren der folgenden klinischen Studien (ASPIRATION-Kohorte) beurteilt: G027821 (MetMab) und G027761 (MetLung) von Genentech, ML25637 (ASPIRATION) von Roche.

Es wurden 128 Plasmaproben mit einem Volumen von je 2 ml und gültigen gepaarten Ergebnissen sowohl im **cobas** EGFR-Test mit Plasma als auch einem NGS-Verfahren unter Verwendung von Plasmaproben in die Übereinstimmungsanalyse für den Nachweis von Exon-19-Deletionen und L858R-Mutationen im EGFR-Gen einbezogen. Insgesamt 32 Proben hatten im NGS-Verfahren ein „Mutation Detected“-Ergebnis, 95 ein „No Mutation Detected“-Ergebnis. Wie in Tabelle 35 dargestellt betrug die positive prozentuale Übereinstimmung zwischen dem **cobas** EGFR-Test mit Plasma und der NGS mit Plasma 87,5 % (95%-KI: 71,9 %, 95,0 %) und die negative prozentuale Übereinstimmung zwischen dem **cobas** EGFR-Test und der NGS 96,8 % (95%-KI: 91,1 %, 98,9 %).

Tabelle 35 Vergleich zwischen dem cobas EGFR-Test an Plasma und NGS zum Nachweis von Exon-19-Deletionen und L858R-Mutationen im EGFR-Gen

Übereinstimmung	Prozentuale Übereinstimmung (N)	95-%-KI
Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA)	87,5 % (28/32)	71,9 %, 95,0 %
Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA)	96,8 % (92/95)	91,1 %, 98,9 %

Korrelation zwischen Plasma- und Gewebeproben im cobas EGFR-Test zum Nachweis von Exon-19-Deletionen und L858R-Mutationen unter Verwendung von Proben aus der Phase-III-Studie ENSURE

Die ENSURE-Studie (YO25121) war eine multizentrische, randomisierte, unverblindete Phase-III-Studie zur Beurteilung der Wirksamkeit und Sicherheit von TARCEVA® (Erlotinib) im Vergleich zu Gemcitabin/Cisplatin als Erstlinientherapie bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) im Stadium IIIb/IV und Exon-19-Deletion oder L858R-Mutation in der Tyrosinkinase-Domäne des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) des Tumors. Insgesamt durchliefen 647 Patienten das Screening, davon hatten 601 im cobas EGFR-Test gültige Ergebnisse für Exon-19-Deletion und L858R-Mutation im EGFR und von diesen wurden 217 in der Studie randomisiert.

Für 517 Patienten (86,0 %, 517 von 601) lagen gematchte K2-EDTA-Plasma- und Gewebeproben vor und von 441 Patienten lag ein Plasmaprobenvolumen von $\geq 2,0$ ml vor, d. h. das Probenvolumen, für das der cobas EGFR-Test mit Plasma validiert wurde.

Die Korrelation von Plasma- und Gewebeproben im cobas EGFR-Test zum Nachweis von Exon-19-Deletionen und L858R-Mutationen wurde sowohl einzeln als auch in Kombination evaluiert. Es wurden insgesamt 431 Proben mit gültigen gepaarten Ergebnissen im cobas EGFR-Test sowohl für die Gewebe- als auch die Plasmaprobe in die Übereinstimmungsanalyse einbezogen. Beim gleichzeitigen Nachweis von Exon-19-Deletionen und L858R-Mutationen (siehe Tabelle 36) lag die positive Übereinstimmung zwischen Plasma- und Gewebeprobe bei 76,7 % (95-%-KI: 70,5 % bis 81,9 %) und die negative Übereinstimmung bei 98,2 % (95-%-KI: 95,4 % bis 99,3 %). Positive und negative Übereinstimmung sowie Gesamtübereinstimmung beim separaten Nachweis von Exon-19-Deletionen und L858R-Mutationen sind ebenfalls in Tabelle 36 dargestellt.

Tabelle 36 Übereinstimmung zwischen Plasma- und Gewebeproben im cobas EGFR-Test beim Nachweis von Exon-19-Deletionen und L858R-Mutationen

Mutation	Übereinstimmung	Prozentuale Übereinstimmung (N)	95-%-KI
Gleichzeitig	Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA)	76,7 % (161/210)	70,5 %, 81,9 %
	Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA)	98,2 % (217/221)	95,4 %, 99,3 %
	Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA)	87,7 % (378/431)	84,2 %, 90,5 %
Exon-19-Deletion	Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA)	80,8 % (97/120)	72,9 %, 86,9 %
	Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA)	98,7 % (307/311)	96,7 %, 99,5 %
	Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA)	93,7 % (404/431)	91,0 %, 95,7 %
L858R	Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA)	67,8 % (61/90)	57,6 %, 76,5 %
	Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA)	99,1 % (338/341)	97,4 %, 99,7 %
	Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA)	92,6 % (399/431)	89,7 %, 94,7 %

Hinweis: Bei der Berechnung der positiven und der negativen Übereinstimmung wurde Gewebe als Referenz herangezogen.

Der positive prädiktive Wert (PPV) und der negative prädiktive Wert (NPV) für den Nachweis von Exon-19-Deletionen und L858R-Mutationen in Kombination wurden ebenfalls anhand der Bootstrapping-Methode auf Basis der verschiedenen populationsbezogenen Prävalenzen in Gewebe berechnet (Tabelle 37). Wie erwartet steigt der PPV und sinkt der NPV mit zunehmender Prävalenz der EGFR-Mutationen. In einer weißen Patientenpopulation, für die eine Prävalenz der Gewebe-EGFR-Mutationen von 10–15 % angenommen wird, liegt der PPV zwischen 82,8 % und 88,6 % und der NPV zwischen 96,0 % und 97,4 %. Bei Annahme der Prävalenz von Gewebe-EGFR-Mutationen in der asiatischen Population, die auf 30–50 % geschätzt wird, liegt der PPV zwischen 94,8 % und 97,8 % und der NPV zwischen 80,8 % und 90,9 %.

Tabelle 37 Geschätzte prädiktive Werte des cobas EGFR-Tests an Gewebe und des cobas EGFR-Tests an Plasma (Patienten mit Plasmavolumina ≥ 2,0 ml), basierend auf verschiedenen Prävalenzen von Gewebe-EGFR-Mutationen

Angenommene Prävalenz von EGFR-Mutationen auf Basis von Gewebeproben	Positiver prädiktiver Wert (PPV)	Negativer prädiktiver Wert (NPV)
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 %)

Hinweis: Die 95-%-KI wurden aus der Bootstrapping-Methode berechnet.

Hinweis: Die Ergebnisse der 79 Proben mit einem Volumen von < 2,0 ml wurden in dieser Analyse als ungültig behandelt.

Hinweis: Bei der Berechnung von PPV und NPV wurde Plasma als Referenz herangezogen.

Korrelation mit der Referenzmethode unter Verwendung von Proben aus der Phase-II-Studie AURA2

Die klinische Leistung des cobas EGFR-Tests wurde durch Vergleich mit einem validierten Hochdurchsatz-Sequenzierungssystem (NGS-System) ermittelt. Dazu wurden K2-EDTA-Plasmaproben von Patienten mit NSCLC im fortgeschrittenen Stadium verwendet, die das Screening in der Phase-II-Studie AURA2 mit TAGRISSO® durchlaufen hatten.²³

Von 344 der 383 für die Studie geeigneten Patienten lagen Plasmaproben vor, die mit dem cobas EGFR-Test getestet wurden; 342 Ergebnisse waren gültig, 2 Ergebnisse waren ungültig. Von insgesamt 344 mit dem cobas EGFR-Test getesteten Plasmaproben wurden 322 (93,6 %) außerdem mit einem NGS-Verfahren getestet; bei 22 Proben reichte das Plasmavolumen nicht für einen NGS-Test aus.

Es wurde die analytische Genauigkeit des cobas EGFR-Tests im Vergleich zur Referenzmethode NGS beim Nachweis der T790M-Mutation in Plasmaproben evaluiert. Es wurden insgesamt 320 Proben mit gültigen gepaarten Ergebnissen sowohl im cobas EGFR-Test als auch in der NGS in die Übereinstimmungsanalyse einbezogen. Beim Nachweis von T790M-Mutationen (siehe Tabelle 38) lag die positive Übereinstimmung zwischen dem cobas EGFR-Test und der NGS bei 91,5 % (95-%-KI: 85,7 % bis 95,1 %) und die negative Übereinstimmung bei 91,1 % (95-%-KI: 86,0 % bis 94,4 %).

Tabelle 38 Vergleich zwischen dem cobas EGFR-Test an Plasma und NGS zum Nachweis der T790M-Mutation im EGFR-Gen

Übereinstimmung	Prozentuale Übereinstimmung (N)	95-%-KI
Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA)	91,5 % (129/141)	85,7 %, 95,1 %
Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA)	91,1 % (163/179)	86,0 %, 94,4 %

In K2-EDTA-Plasmaproben aus der AURA2-Studie wurden mit dem **cobas** EGFR-Test die in Tabelle 39 aufgeführten Mutationen in den Exons 18, 19, 20 und 21 des EGFR-Gens nachgewiesen.

Tabelle 39 Mit dem cobas EGFR-Test nachgewiesene Mutationen in der AURA2-Kohorte

Exon	Mutationssequenz	Änderung der Aminosäuresequenz	COSMIC-ID 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	Nicht gefunden
	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	Nicht gefunden
	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	Nicht gefunden
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

Korrelation zwischen Plasma- und Gewebeproben beim Nachweis von T790M unter Verwendung von Proben aus der Phase-II-Studie AURA2

Bei der klinischen Studie AURA2²³ handelte es sich um eine einarmige, unverblindete Phase-II-Studie zur Beurteilung der Sicherheit und Wirksamkeit von TAGRISSO® (Osimertinib) als Zweitlinien-, Drittlinien- oder weitere Therapie bei Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC, bei denen es nach einer vorangegangenen Therapie mit einem zugelassenen EGFR-TKI zur Progression gekommen war und die im **cobas** EGFR-Test positiv auf T790M-Mutation waren. Insgesamt durchliefen 472 Patienten das Screening. Von 383 Patienten wurde eine Gewebeprobe getestet, wovon 371 ein gültiges Ergebnis im **cobas** EGFR-Test auf EGFR-T790M hatten. Von diesen waren 233 Patienten T790M-positiv, und von diesen wurden wiederum 210 in der Studie randomisiert.

Von 344 der 383 für die Studie geeigneten Patienten lagen K2-EDTA-Plasmaproben vor. Es wurden insgesamt 334 Proben mit gültigen gepaarten Ergebnissen im **cobas** EGFR-Test sowohl für die Gewebe- als auch die Plasmaprobe in die Analyse einbezogen. Beim Nachweis der T790M-Mutation lag die positive Übereinstimmung zwischen Plasma- und Gewebeprobe bei 58,7 % (95%-KI: 52,2 %, 65,0 %) und die negative Übereinstimmung bei 80,2 % (95%-KI: 71,8 %, 86,5 %). Für den Nachweis der T790M-Mutation lag der positive prädiktive Wert (PPV) bei 85,6 % (95%-KI: 79,2 %, 90,3 %) und der negative prädiktive Wert (NPV) bei 49,2 % (95%-KI: 42,0 %, 56,4 %), wie in Tabelle 40 dargestellt.

Der in Tabelle 40 dargestellte PPV wurde durch die 22 Proben beeinflusst, die im **cobas** EGFR-Test an Gewebe T790M-negativ und im **cobas** EGFR-Test an Plasma T790M-positiv waren. 18 Proben wurden mit NGS an Plasma als T790M-positiv bestätigt, bei einer Probe reichte das Volumen nicht für einen NGS-Test aus. Nur 3 Proben wurden in der NGS als T790M-negativ bestimmt.

Tabelle 40 Übereinstimmung zwischen Plasma- und Gewebeproben im cobas EGFR-Test beim Nachweis von T790M-Mutationen

Mutation	Übereinstimmung	Prozentuale Übereinstimmung (N)	95%-KI
T790M	Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA)	58,7 % (131/223)	52,2 %, 65,0 %
	Negative prozentuale Übereinstimmung (NPA)	80,2 % (89/111)	71,8 %, 86,5 %
	Prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA)	65,9 % (220/334)	60,6 %, 70,8 %
	Positiver prädiktiver Wert (PPV)	85,6 % (131/153)	79,2 %, 90,3 %
	Negativer prädiktiver Wert (NPV)	49,2 % (89/181)	42,0 %, 56,4 %

Hinweis: Bei der Berechnung der positiven und der negativen Übereinstimmung wurde Gewebe als Referenz herangezogen.

Hinweis: Bei der Berechnung von PPV und NPV wurde Plasma als Referenz herangezogen.

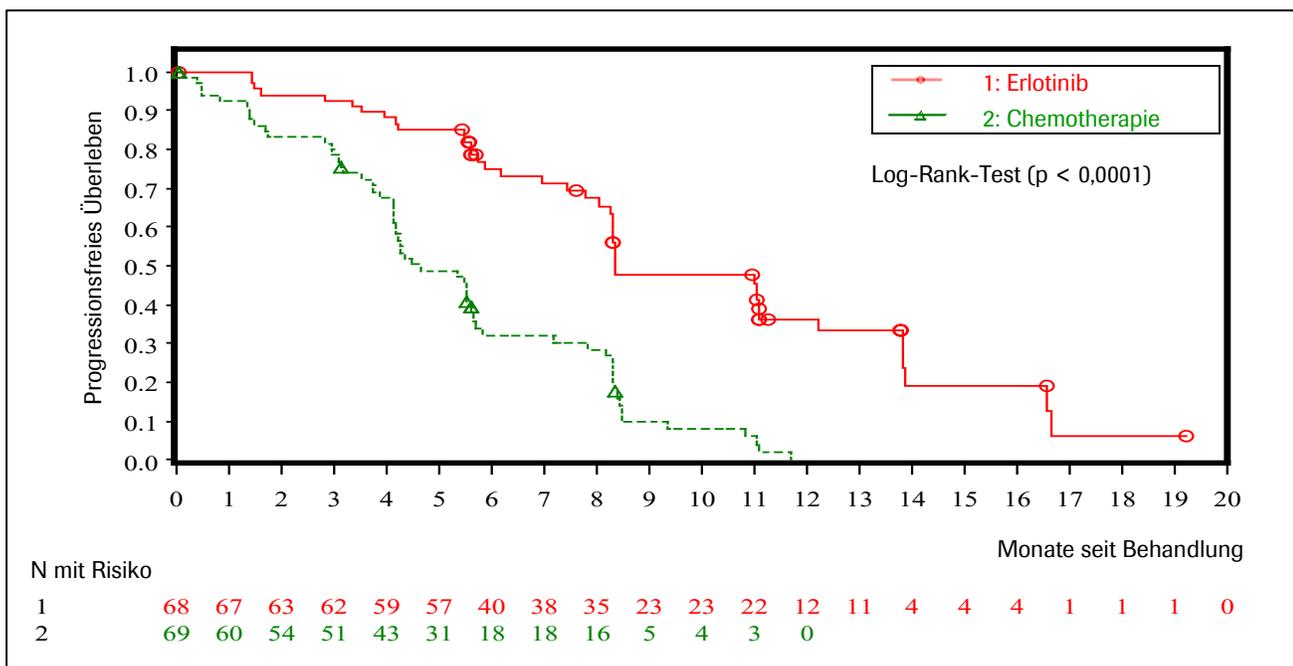
Die Übereinstimmung von Plasma- und Gewebeproben beim Nachweis der T790M-Resistenzmutation ist geringer als beim Nachweis von aktivierenden Mutationen. Die positive Übereinstimmung kann durch Gewebheterogenität beeinträchtigt werden: Im Gegensatz zu den aktivierenden Mutationen L858R und Exon-19-Deletionen kann T790M in nur einem geringen Anteil der Tumorzellen vorliegen, da es sich im Allgemeinen um eine erworbene Mutation handelt, so dass T790M-cfDNA möglicherweise nur in sehr niedriger Konzentration und unterhalb der Nachweisgrenze im Plasma vorhanden ist. Die negative Übereinstimmung kann ebenfalls durch Tumorerogenität beeinträchtigt werden: Da die T790M-Mutation unter Umständen nicht in allen Tumorzellen vorliegt, besteht die Möglichkeit, dass ein Tumor biopsiert wird, in dem keine T790M-Mutation vorkommt, während andere Tumorlokalisationen T790M-positiv sind.⁷

Klinische Ergebnisse

ENSURE

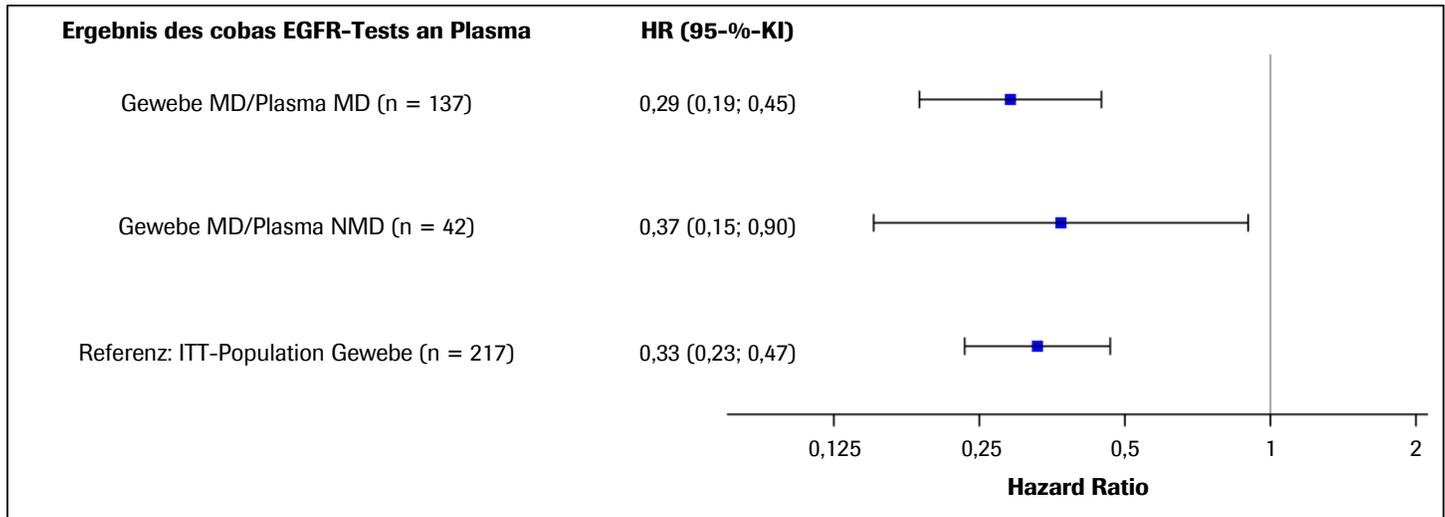
Unter den 217 Patienten, die in die ENSURE-Studie aufgenommen wurden (d. h. diejenigen, bei denen mit dem **cobas** EGFR-Test v1 eine Exon-19-Deletion oder eine L858R-Mutation in einer Gewebeprobe nachgewiesen wurde) lag von 214 (98,6 %) eine K2-EDTA-Plasmaprobe vor, und bei 180 Patienten betrug das Plasmaprobenvolumen 2,0 ml. Von den 180 Plasmaproben mit einem Volumen von 2 ml, die mit dem **cobas** EGFR-Test getestet wurden, erzielten 137 ein „Mutation Detected“-Ergebnis auf Exon-19-Deletion oder L858R-Mutation (68 Patienten im Erlotinib-Arm, 69 Patienten im Chemotherapie-Arm), 42 erzielten ein „No Mutation Detected“-Ergebnis (22 Patienten im TARCEVA®-Arm, 20 Patienten im Chemotherapie-Arm) und eine Probe generierte ein ungültiges Ergebnis. Die Kaplan-Meier-Kurven für das vom Prüfarzt beurteilte progressionsfreie Überleben der Patienten mit Exon-19-Deletion oder L858R-Mutation in der Plasmaprobe sind in Abbildung 15 dargestellt. Die Patienten im TARCEVA®-Arm hatten ein längeres progressionsfreies Überleben als die Patienten im Chemotherapie-Arm und die beiden Kurven verliefen während des gesamten Beobachtungszeitraums klar voneinander getrennt ($p < 0,001$), was einen erheblichen Vorteil der TARCEVA®-Therapie bei Patienten mit nachweisbarer EGFR-aktivierender Mutation im Plasma anzeigt.

Abbildung 15 Kaplan-Meier-Diagramm für das progressionsfreie Überleben (PFS) nach Behandlungsart für Patienten, bei denen mit dem **cobas** EGFR-Test sowohl in Plasma als auch in Gewebe eine Mutation nachgewiesen wurde (Beurteilung durch Prüfarzt) (2-ml-Plasmaproben)



Bei allen Patienten mit EGFR-mutationspositiver Gewebeprobe und 2,0 ml Plasmavolumen wurde unabhängig davon, ob die Plasmaprobe mutationspositiv oder -negativ war, ein ähnlicher Vorteil beim progressionsfreien Überleben beobachtet. Dieser entsprach dem Vorteil beim progressionsfreien Überleben, der in der ITT-Population der ENSURE-Studie insgesamt beobachtet wurde (HR = 0,33; 95-%-KI: 0,23, 0,47), siehe Abbildung 16.

Abbildung 16 Forest Plot der HR für das progressionsfreie Überleben gemäß Beurteilung durch Prüfarzt (mit 2-ml-Plasmaproben)



Hinweis: MD = Mutation erkannt (Exon-19-Deletion oder L858R); NMD = Keine Mutation erkannt (weder Exon-19-Deletion noch L858R)

AURA2

Der primäre Wirksamkeitsendpunkt war die objektive Ansprechrate (ORR) nach RECIST 1.1 mittels verblindeter, unabhängiger, zentraler Begutachtung (BICR) des „Evaluable for Response“-Auswertungskollektivs. Die ORR war definiert als Anzahl (%) der Patienten mit mindestens 1 Visite und kompletter Remission (CR) oder partieller Remission (PR), die mindestens 4 Wochen später bestätigt wurde (d. h. bestes objektives Ansprechen [BOR] von CR oder PR).

Im Auswertungskollektiv mit auswertbarem Ansprechen (Evaluable Response Analysis Set, ERAS) für Gewebe (T790M-positive Patienten im cobas EGFR-Test an Gewebe, die mindestens eine Dosis TAGRISSO® erhielten und bei Studienbeginn laut BICR einen messbaren Tumorbefall aufwiesen) waren 111 Patienten im cobas EGFR-Test an K2-EDTA-Plasma T790M-positiv (d. h. sowohl Gewebe- als auch Plasmaprobe T790M-positiv). Die ORR bei dieser Untergruppe betrug 64,9 % (72/111, 95-%-KI: 52,1 %, 70,4 %) und lag damit sehr nahe an der im ERAS beobachteten ORR von 64,1 %.

Im Full Analysis Set (FAS) für Gewebe (T790M-positive Patienten im cobas EGFR-Test an Gewebe, die mindestens eine Dosis TAGRISSO® erhielten) waren 117 Patienten im cobas EGFR-Test an Plasma T790M-positiv. Die ORR der sowohl in der Gewebe- als auch in der Plasmaprobe T790M-positiven Patienten lag bei 61,5 % (72/117, 95-%-KI: 55,2 %, 73,7 %) und lag damit ebenfalls sehr nahe an der im Gewebe-FAS beobachteten ORR von 61 %. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 41 dargestellt. Da positive Gewebe-Testergebnisse ein Einschlusskriterium von AURA2 waren, liefert diese Studie keine Outcome-Daten zu Patienten, bei denen das Plasma T790M-positiv, aber das Gewebe T790M-negativ war.

Tabelle 41 Objektive Ansprechrates nach Plasmaergebnis unter den aufgenommenen Patienten (Gewebe T790M-positiv) der AURA2-Studie

Population (Gewebeprobe T790M-positiv)	Ergebnisse des cobas EGFR-Tests mit Plasmaprobe	N	Anzahl Patienten mit Remission (ORR) ^a n (%)	ORR (95%-KI)
Full Analysis Set Gewebe (Gewebe-FAS)	T790M-positiv (Plasma-FAS)	117	72 (61,5 %)	(55,2 %, 73,7 %)
	T790M-negativ	89	53 (59,6 %)	(51,3 %, 73,0 %)
	Gesamt (Gewebe-FAS)	210	128 (61,0 %)	(57,0 %, 70,8 %)
Evaluable Response Analysis Set Gewebe (Gewebe-ERAS)	T790M-positiv (Plasma-ERAS)	111	72 (64,9 %)	(52,1 %, 70,4 %)
	T790M-negativ	83	52 (62,7 %)	(48,6 %, 69,8 %)
	Gesamt (Gewebe-ERAS)	198	127 (64,1 %)	(54,0 %, 67,6 %)

^a Remission umfasst nur bestätigte Remissionen.

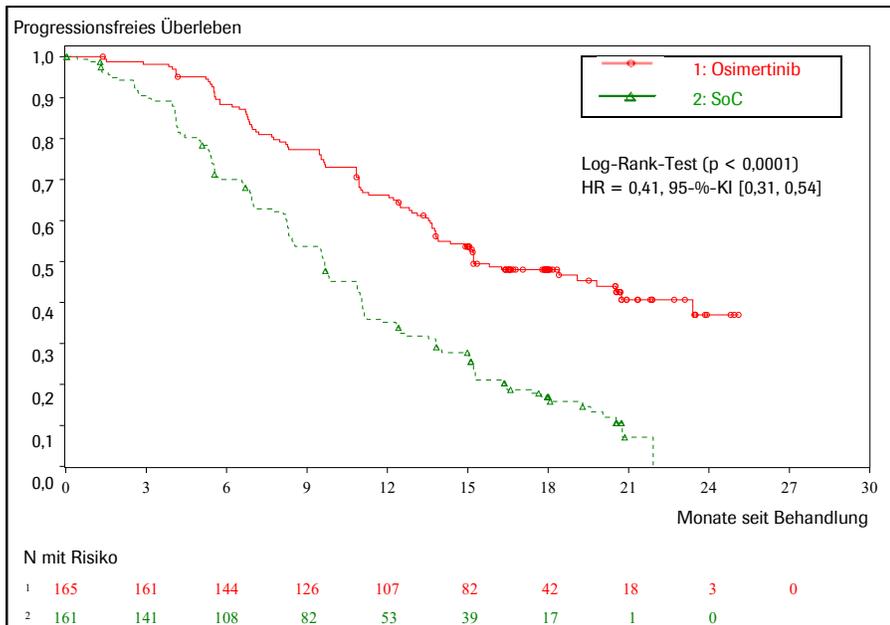
FLAURA

I. Phase-III-Studie zur TAGRISSO®-Erstlinientherapie

Von den insgesamt 994 Patienten, die im Rahmen der FLAURA-Studie¹⁰ voruntersucht wurden, wurden 556 Patienten in die Studie aufgenommen und randomisiert; 438 Patienten wurden nach der Voruntersuchung ausgeschlossen. Von den 556 randomisierten FLAURA-Patienten waren 537 für die Studienanalyse geeignet. Von den 537 für die Studie geeigneten Patienten wurden 276 für einen zentralen **cobas** EGFR-Gewebetest randomisiert. Für 254 dieser Patienten war eine K2-EDTA-Plasmaprobe zu Testzwecken vorhanden, von denen 190 mit dem **cobas** EGFR-Plasmatest positiv getestet wurden (pEGFRm+). Zudem wurden 261 Patienten für einen lokalen Gewebetest randomisiert, von denen für 242 eine Plasmaprobe zu Testzwecken vorhanden war; für 169 Patienten davon wurde mit dem **cobas** EGFR-Plasmatest ein positives Testergebnis erhalten (136 **cobas** EGFR-mutationspositive Gewebeprobe (tEGFRm+), 1 **cobas** EGFR-mutationsnegative Gewebeprobe (tEGFRm-) und 32 ungültig bzw. mit dem **cobas**-Gewebetest nicht getestet).

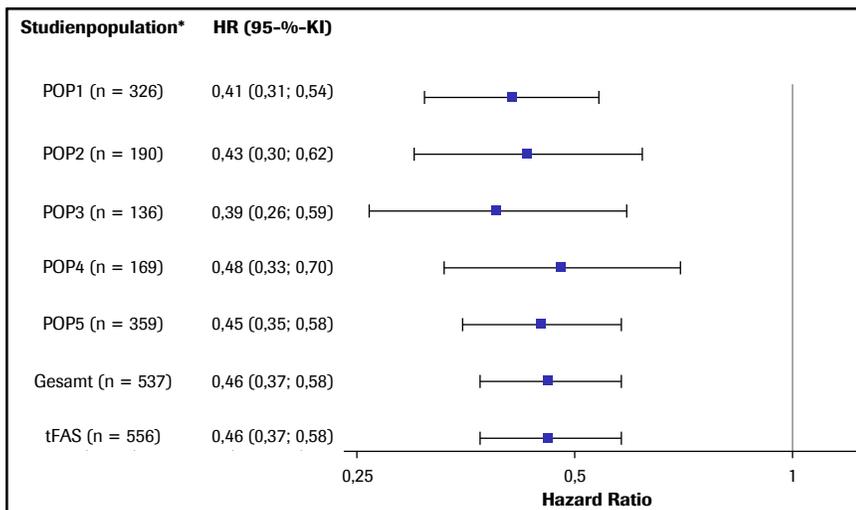
Für die primäre Plasmapopulation [tEGFRm+ und pEGFRm+ mittels **cobas** EGFR-Test (N = 326); 190 zentral und 136 lokal randomisiert] betrug die HR 0,41 (95%-KI: 0,31, 0,54). Die HR für das Full Analysis Set (FAS) in FLAURA (tEGFRm+, N = 556) betrug 0,46 (95%-KI: 0,37, 0,58). Die Wirksamkeit des Arzneimittels für die primäre Plasmapopulation stimmt somit mit der FAS-Population in FLAURA überein. Abbildung 17 zeigt das Kaplan-Meier-Diagramm für die primäre Plasmapopulation mit einer Deletion in Exon 19 oder einer L858R-Mutation in einer Plasmaprobe.

Abbildung 17 Kaplan-Meier-Diagramm für progressionsfreies Überleben nach Behandlung für die primäre Plasmapopulation in FLAURA (cobas tEGFRm+ und cobas pEGFRm+ Patienten, n = 326)



Die Überlegenheit von TAGRISSO® gegenüber der Standardtherapie war über alle plasmapositiven Untergruppen nach lokalem und zentralem **cobas** tEGFR-Rekrutierungsstatus einheitlich. Die HR-Werte lagen dabei im Bereich von 0,39 bis 0,48 und stimmten mit der HR überein, die für die FAS-Population in FLAURA erhalten wurde (HR = 0,46, siehe Abbildung 18 unten).

Abbildung 18 Forest-Plot für die HR-Werte der FLAURA-Untergruppen nach lokalem und zentralem cobas EGFR-Teststatus



POP = Population (Untergruppe)

*POP1: Alle randomisierten Patienten mit einem positiven **cobas**-Gebetest und **cobas**-Plasmatest.

POP2: Patienten, die für den **cobas**-Gebetest randomisiert wurden und auch mit dem **cobas**-Plasmatest positiv waren.

POP3: Patienten, die für einen lokalen Gebetest randomisiert wurden und auch mit dem **cobas**-Gewebe- und Plasmatest positiv waren.

POP4: Patienten, die für einen lokalen Gebetest randomisiert wurden und auch mit dem **cobas**-Plasmatest positiv waren.

POP5: Alle randomisierten Patienten mit einem positiven **cobas**-Plasmatest.

Insgesamt: Alle randomisierten Patienten mit Ausnahme von 19 Patienten aus China

tFAS: Alle randomisierten Patienten (Full Analysis Set in FLAURA).

II. Analyse der IRESSA®-Standardtherapie

Es wurde eine separate Analyse für die Patienten des Standardtherapiearms durchgeführt, die mit IRESSA® (Gefitinib) behandelt wurden. Von allen mit IRESSA® behandelten Patienten, die in FLAURA ein vom Prüfarzt beurteiltes objektives Ansprechen zeigten, waren die K2-EDTA-Proben von 105 Patienten mit dem cobas-Plasmatest positiv. Die objektive Ansprechrate (ORR) für alle cobas-plasmapositive Patienten betrug 71,4 % (75/105, 95-%-KI: 62,2 %, 79,2 %, POP4 in Tabelle 42).

Von den 105 Patienten mit positiven Ergebnissen im cobas-Plasmatest wurden 47 Patienten für den cobas-Gewebetest randomisiert (primäre Wirksamkeitspopulation für den cobas-Plasmatest); 58 Patienten wurden für einen lokalen Test randomisiert. In der primären Wirksamkeitspopulation für den cobas-Plasmatest (n = 47) wurden 36 Patienten bei Beurteilung durch den Prüfarzt als Responder eingestuft. Dies entspricht einer ORR von 76,6 % (95-%-KI: 62,8 %, 86,4 %, POP1 in Tabelle 42).

Bei den lokal randomisierten Patienten, bei denen sowohl der cobas-Gewebetest als auch der cobas-Plasmatest positiv war, betrug die ORR 62,2 % (28/45, 95-%-KI: 47,6 %, 74,9 %, POP2 in Tabelle 42). Bei allen mit IRESSA® behandelten Patienten, bei denen sowohl der cobas-Gewebetest als auch der cobas-Plasmatest positiv war, betrug die ORR 69,6 % (64/92, 95-%-KI: 59,5 %, 78,0 %, POP3 in Tabelle 42). Ein Forest-Plot der objektiven Ansprechraten für diese Patientenpopulationen ist in Abbildung 19 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass der auf der Grundlage des cobas-Plasmatests beurteilte Behandlungseffekt von IRESSA® in allen Subpopulationen zu beobachten war und mit den Ergebnissen übereinstimmte, die in der ursprünglichen Zulassungsstudie (IFUM) für Patienten angegeben wurden, die für die IRESSA®-Therapie ausgewählt wurden.¹³

Tabelle 42 Objektive Ansprechraten für cobas-plasmapositive Patienten, die in FLAURA mit IRESSA® behandelt wurden

Objektives Ansprechen	Plasmapositive (pEGFR+), mit IRESSA® behandelte Patienten im Standardtherapiearm				
	pEGFR+, zentral randomisiert (cobas tEGFR+)	pEGFR+, lokal randomisiert (lokal tEGFR+)			Gesamt
		cobas tEGFR+	cobas tEGFR-	cobas tEGFR Ungültig/ Nicht getestet	
Anzahl Patienten	47	45	1	12	105
Responder	36	28	1	10	75
Non-Responder	11	17	0	2	30
ORR (%; 95-%-KI)	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 %)		-	-	-

Hinweis: tEGFR = EGFR in Gewebe; pEGFR = EGFR in Plasma; KI = (Score) Konfidenzintervall.

POP = Population (Untergruppe)

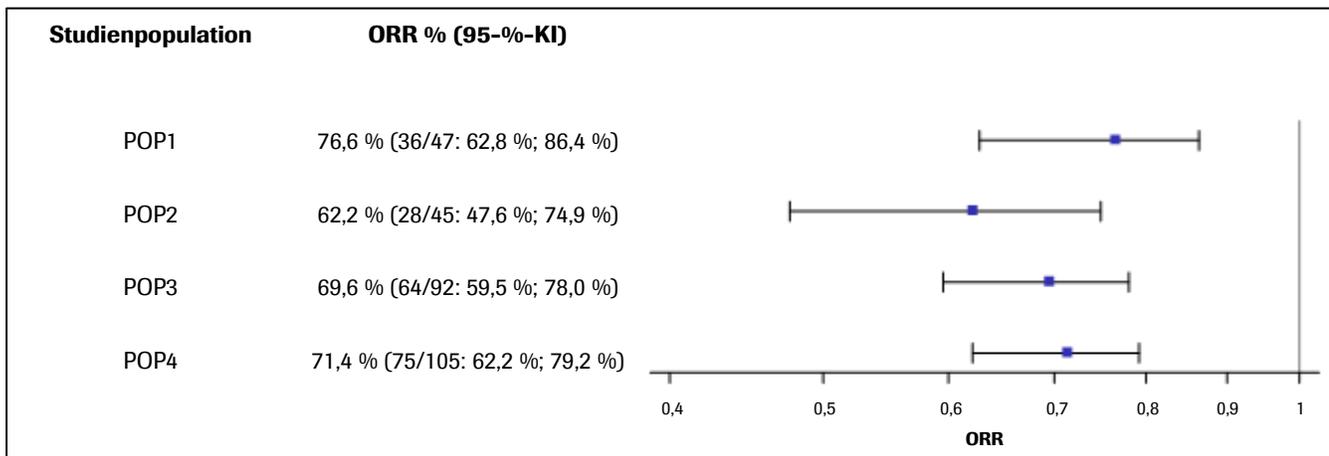
POP1: ORR für cobas-pEGFR-positive Patienten, die für den cobas-Gewebetest randomisiert wurden (primäre Wirksamkeitspopulation für den cobas-Plasmatest).

POP2: ORR für cobas-plasma- und gewebepositive Patienten, die für einen lokalen Gewebetest randomisiert wurden.

POP3: ORR für alle cobas-plasma- und gewebepositiven Patienten.

POP4: ORR für alle cobas-plasmapositive Patienten.

Abbildung 19 Forest-Plots der objektiven Ansprechraten auf der Grundlage des cobas EGFR-Tests in Plasma für unterschiedliche Populationen



POP = Population (Untergruppe)

POP1: ORR für **cobas**-pEGFR-positive Patienten, die für den **cobas**-Gewebetest randomisiert wurden (primäre Wirksamkeitspopulation für den **cobas**-Plasmatest).

POP2: ORR für **cobas**-plasma- und gewebepositive Patienten, die für einen lokalen Gewebetest randomisiert wurden.

POP3: ORR für alle **cobas**-plasma- und gewebepositiven Patienten.

POP4: ORR für alle **cobas**-plasma-positiven Patienten.

Ergebnis-Flags

Bedeutung der Ergebnis-Flags

Die Herkunft eines Flags wird im Flag-Code angegeben (siehe Tabelle 43).

Tabelle 43 Flag-Herkunft

Flag-Code beginnt mit	Flag-Herkunft	Beispiel
M ^a	Mehrere oder andere Gründe	M6
R	Ergebnisinterpretation	R20
Z ^a	Analyzer	Z1

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

Tabelle 44 enthält eine Zusammenfassung aller Ergebnis-Flags des Systems, die für den Benutzer relevant sind.

Tabelle 44 Liste der Flags für die Ergebnisinterpretation

Flag-Code	Kategorie	Beschreibung	Empfohlene Maßnahme
R797, R807, R817, R827, R837, R842, R847	Fehler	Es konnte keine Zielsequenz nachgewiesen werden.	Die Probe wiederholen. Siehe Abschnitt Testverfahren . Diese Flag-Codes geben an, dass für die Probe ein negatives Ergebnis ausgegeben wurde (d. h. die Probe wurde u. U. nicht in eine oder mehrere Kavitäten gegeben).
R700, R718, R724, R736, R742, R748, R766, R712, R754, R760	Fehler	Mutationskontrolle konnte nicht nachgewiesen werden.	Den Lauf wiederholen. Siehe Abschnitt Testverfahren . Diese Flag-Codes geben an, dass der Algorithmus zur Elbow-Bestimmung einen Fehler erkannt hat, der u. U. auf ein atypisches oder rauschbehaftetes Fluoreszenzmuster zurückzuführen ist.
R701, R719, R725, R737, R743, R749, R767, R713, R755, R761	Fehler	Mutationskontrolle konnte nicht nachgewiesen werden.	Den Lauf wiederholen. Siehe Abschnitt Testverfahren . Diese Flag-Codes geben an, dass für die Mutationskontrolle ein negatives Ergebnis ausgegeben wurde. In mindestens eine Kavität wurde u. U. keine Mutationskontroll-DNA gegeben.
R702, R720, R726, R738, R744, R750, R768, R714, R756, R762	Fehler	Die Mutationskontrolle liegt außerhalb des zulässigen Bereichs.	Den Lauf wiederholen. Siehe Abschnitt Testverfahren . Diese Flag-Codes geben an, dass ein für die Mutationskontrolle gemessener Ct-Wert über dem festgelegten Schwellenwert lag (d. h. Elbow-Wert zu hoch). Zu den möglichen Gründen gehören: 1. Falsche Herstellung des Gebrauchs-Master-Mix 2. Pipettierfehler bei der Zugabe von Gebrauchs-Master-Mix in eine Kavität der Mikrotiterplatte 3. Pipettierfehler bei der Zugabe von Mutationskontrolle in eine Kavität der Mikrotiterplatte
R703, R721, R727, R739, R745, R751, R769, R715, R757, R763	Fehler	Die Mutationskontrolle liegt außerhalb des zulässigen Bereichs.	Den Lauf wiederholen. Siehe Abschnitt Testverfahren . Diese Flag-Codes geben an, dass ein für die Mutationskontrolle gemessener Ct-Wert unter dem festgelegten Schwellenwert lag (d. h. Elbow-Wert zu niedrig). Dieser Fehler kann bei einer DNA-Kontamination auftreten.
R772, R778, R780, R784, R786, R788, R794, R776, R790, R792	Fehler	Die Negativkontrolle konnte nicht nachgewiesen werden.	Den Lauf wiederholen. Siehe Abschnitt Testverfahren . Diese Flag-Codes geben an, dass der Algorithmus zur Elbow-Bestimmung einen Fehler erkannt hat, der u. U. auf ein atypisches oder rauschbehaftetes Fluoreszenzmuster zurückzuführen ist.

Flag-Code	Kategorie	Beschreibung	Empfohlene Maßnahme
R773, R779, R781, R785, R787, R789, R795, R777, R791, R793	Fehler	Die Negativkontrolle liegt außerhalb des zulässigen Bereichs.	Den Lauf wiederholen. Siehe Abschnitt Testverfahren . Diese Flag-Codes geben an, dass für die Negativkontrolle ein positives Ergebnis angegeben wurde (d. h. es ist eine Kontamination aufgetreten).
R796, R816, R826, R836, R806, R841, R846	Fehler	Es konnte keine Zielsequenz nachgewiesen werden.	Die Probe wiederholen. Siehe Abschnitt Testverfahren . Diese Flag-Codes geben an, dass der Algorithmus zur Elbow-Bestimmung einen Fehler erkannt hat, der u. U. auf ein atypisches oder rauschbehaftetes Fluoreszenzmuster zurückzuführen ist.
R799, R819, R829, R839, R809, R844, R849	Fehler	Das Ergebnis liegt außerhalb des zulässigen Bereichs.	Die Probe wiederholen. Siehe Abschnitt Testverfahren . Diese Flag-Codes geben an, dass für die Probe ein ungewöhnlich niedriger Ct-Wert gemessen wurde.
R800, R820, R830, R840, R810, R845, R850	Fehler	Das Ergebnis liegt außerhalb des zulässigen Bereichs.	Die Probe wiederholen. Siehe Abschnitt Testverfahren . Diese Flag-Codes geben an, dass für die Probe ein auffälliges Verhältnis zwischen dem Ct-Wert für die Mutation und dem Ct-Wert für die interne Kontrolle festgestellt wurde.
R811, R831, R851	Fehler	Die interne Kontrolle konnte nicht nachgewiesen werden.	Die Probe wiederholen. Siehe Abschnitt Testverfahren . Diese Flag-Codes geben an, dass der Algorithmus zur Elbow-Bestimmung einen Fehler erkannt hat, der u. U. auf ein atypisches oder rauschbehaftetes Fluoreszenzmuster zurückzuführen ist.
R812, R832, R852	Fehler	Die interne Kontrolle konnte nicht nachgewiesen werden.	Die Probe wiederholen. Siehe Abschnitt Testverfahren . Diese Flag-Codes geben an, dass das Ergebnis der internen Kontrolle für die Probe ungültig war. Wenn kein gültiges Ergebnis für die interne Kontrolle vorliegt, kann dies folgende Ursachen haben: <ol style="list-style-type: none"> 1. Unzureichende Qualität der genomischen DNA aus der Probe 2. Unzureichende Probenverarbeitung 3. PCR-Inhibitoren in der Probe 4. Seltene Mutationen in den Regionen der genomischen DNA, die durch die Primer und/oder Sonden der internen Kontrolle abgedeckt sind 5. In mindestens eine Kavität wurde keine Proben-DNA gegeben 6. Andere Faktoren
R813, R834, R853	Fehler	Interne Kontrolle außerhalb des zulässigen Bereichs	Die Probe wiederholen. Siehe Abschnitt Testverfahren . Diese Flag-Codes geben an, dass das Ergebnis der internen Kontrolle für die Probe ungültig war. Wenn kein gültiges Ergebnis für die interne Kontrolle vorliegt, kann dies folgende Ursachen haben: <ol style="list-style-type: none"> 1. Unzureichende Qualität der genomischen DNA aus der Probe 2. Unzureichende Probenverarbeitung 3. PCR-Inhibitoren in der Probe 4. Seltene Mutationen in den Regionen der genomischen DNA, die durch die Primer und/oder Sonden der internen Kontrolle abgedeckt sind 5. In mindestens eine Kavität wurde keine Proben-DNA gegeben 6. Andere Faktoren
R814, R835, R854	Fehler	Interne Kontrolle außerhalb des zulässigen Bereichs	Die Probe wiederholen. Siehe Abschnitt Testverfahren . Diese Flag-Codes geben an, dass für die Probe ein ungewöhnlich niedriger Ct-Wert der internen Kontrolle gemessen wurde. Dieser Fehler kann auftreten, wenn das PCR-Gemisch zu viel konzentrierte genomische DNA enthält.

Weitere Informationen

Symbole

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

Tabelle 45 Symbole zur Kennzeichnung von Roche PCR-Diagnostikprodukten

 Alter oder Geburtsdatum	 Gerät nicht für eine patientennahe Testung geeignet	 Quantifizierungsstandard zur Berechnung der Ergebnisse, in Internationalen Einheiten pro PCR-Reaktion
 Zusatz-Software	 Gerät nicht für Selbsttests geeignet	 Seriennummer
 Sollbereich (Kopien/ml)	 Vertrieb (Hinweis: ggf. Angabe von Land/Region unter dem Symbol)	 Zentrum, Labor
 Sollbereich (IE/ml)	 Nicht wiederverwenden	 Standardverfahren
 Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft	 Frauen, weiblich	 Mit Ethylenoxid sterilisiert
 Barcode-Datenblatt	 Nur zur Beurteilung der IVD-Leistung	 Im Dunkeln lagern
 Chargenbezeichnung	 Globale Artikelnummer GTIN	 Temperaturbegrenzung
 Biogefährdung	 Import	 Datei mit Testdefinitionen
 Bestellnummer	 <i>In-vitro</i> -Diagnostikum	 Diese Seite oben
 CE-Kennzeichnung für Konformität; dieses Produkt entspricht den geltenden Vorschriften für die CE-Kennzeichnung für <i>In-vitro</i> -Diagnostika.	 Unterer Grenzwert des Sollbereichs	 Ultrasensitives Verfahren
 Entnahmedatum	 Männer, männlich	 Eindeutige Gerätekenung
 Gebrauchsanweisung beachten	 Hersteller	 Oberer Grenzwert des Sollbereichs
 Ausreichend für <n> Tests	 Negativkontrolle	 Fülllinie für Urin
 Inhalt der Packung	 Nicht steril	 Nur für die USA: In den USA darf dieser Test nach den gesetzlichen Vorschriften nur durch einen Arzt oder auf ärztliche Verschreibung abgegeben werden.
 Kontrolle	 Patientennamen	 Verwendbar bis
 Herstellungsdatum	 Patienten-ID	
 Gerät für eine patientennahe Testung	 Hier abziehen	
 Gerät für Selbsttests	 Positivkontrolle	
	 Quantifizierungsstandard zur Berechnung der Ergebnisse, in Kopien pro PCR-Reaktion	

Technischer Support

Für technischen Support wenden Sie sich bitte an Ihre Roche-Vertretung vor Ort:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Hersteller

Tabelle 46 Hersteller

Hergestellt in den USA



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

Hergestellt in den USA

Marken und Patente

COBAS, COBAS Z und AMPERASE sind Marken von Roche.

Alle anderen Produktnamen und Marken sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

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

Einige EGFR-Sequenzen in diesem Produkt sind durch ein oder mehrere Patente der Genzyme Corporation, des Dana-Farber Cancer Institutes sowie der General Hospital Corporation geschützt und wurden an Roche Molecular Systems, Inc. lizenziert. Lizenziert wurde unter US-Patent Nr. 7,964,349; weitere US-amerikanische und internationale Patente angemeldet.

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

Copyright

©2022 Roche Molecular Systems, Inc.

Literatur

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.

Dokumentversion

Dokumentversionsübersicht	
Doc Rev. 7.0 03/2022	<p>Unter Entnahme und Handhabung von Proben in Abschnitt B wurde die Anweisung zur Lagerung von Vollblutproben in Cell-Free DNA Collection Tubes aktualisiert.</p> <p>Die Herstellerangaben wurden aktualisiert.</p> <p>Der Abschnitt „Technischer Support“ wurde hinzugefügt.</p> <p>Die Symbolbezeichnungen auf der Symbolseite wurden im Zuge der Harmonisierung aktualisiert.</p> <p>Es wurde die Angabe hinzugefügt, wo das Produkt hergestellt wurde.</p> <p>Bei Fragen wenden Sie sich bitte an Ihre Roche-Vertretung vor Ort.</p>