

Pakkausseloste
**Prosigna[®] Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay
(Rintasyöpää ennustavan geeniallekirjoituksen Prosigna[®]-
analyysi)**


Versio 02, luotu 09/2023



1-10 testiä

Säilytysolosuhteet

	-20 °C Säilytettävä -20 °C:ssa tai alimmassa lämpötilassa	Rintasyöpää ennustavan geeniallekirjoituksen Prosigna Cartridges -analyysikasetit
	-80 °C Säilytettävä -80 °C:ssa tai alimmassa lämpötilassa	Rintasyöpää ennustavan geeniallekirjoituksen Prosigna-analyysin CodeSet-koodisarja
	+25 °C Säilytetään huoneenlämmössä	Rintasyöpää ennustavan geeniallekirjoituksen Prosigna Prep Pack -analyysin valmistelupakkaus
	+8 °C Säilytettävä +4 °C:ssa	Rintasyöpää ennustavan geeniallekirjoituksen Prosigna Prep Plates -analyysin valmistelulevyt

SISÄLLYSLUETTELO

1	KÄYTTÖTARKOITUS	1
2	TESTIJÄRJESTELMÄN YHTEENVETO	1
2.1	nCounter-analyysijärjestelmän toimintaperiaate	2
2.2	Tulosten laskennassa käytetyn Prosigna-algoritmin toimintaperiaate	2
3	TOIMITETUT REAGENSIT JA LAITTEISTOT	2
3.1	Prosigna-pakkauksen yhteenveto	2
3.2	Prosigna-pakkauksen sisältö: 1, 2, 3, 4 tai 10 testin Prosigna-pakkaus	3
4	VAROITUKSET JA VAROTOIMET	3
5	YLEISIÄ TIETOJA ANALYYSISTÄ	3
5.1	Kudoksen käsittely	3
5.2	Prosigna-analyysin suorittaminen	4
6	KOULUTUSTIEDOT	4
7	JÄTTEIDEN KÄSITTELY	4
8	SÄILYTYS JA KÄSITTELY (REAGENSIT)	4
9	PROSIGNA-ANALYYSISSÄ TARVITTAVAT INSTRUMENTIT	4
10	TARVITTAVAT REAGENSIT JA LAITTEISTOT, JOITA EI TOIMITETA VALMIIKSI	4
10.1	Materiaalit	4
10.2	Laitteistot	4
10.3	Laitteistojen ohjeavot	4
11	NÄYTTEIDEN KERUU JA KÄSITTELY	5
11.1	Kudosnäytteitä koskevat vaatimukset ja patologin arviointi	5
11.2	Näytteiden keruu ja säilytys	5
11.3	Objektilasien valmistelu	5
11.4	Objektilasien käsittely	5
11.5	RNA:n eristys	6
11.7	Analyysimenetelmä	6
12	VIANMÄÄRITYS JA TESTIN EPÄONNISTUMINEN	9
13	ANALYYSIN TULOKSET	9
13.1	Luontaiset alatyypit	9
13.2	ROR-tulos	9
13.3	10 vuoden kuluessa tapahtuvan etäisen uusiutumisen todennäköisyys	9
13.4	Riskiluokitus	9
13.5	Laadunvalvonta	9
14	MENETELMIEN RAJOITTEET	10
15	ODOTETUT ARVOT	10
15.1	ROR-alue alatyypin mukaan	10
15.2	ROR-tulosten esiintymistiheys imusolmukkeiden tilan mukaan	10
15.3	Eloönjäänti ilman sairauden etäistä uusiutumista riskiluokan mukaan	11

16	SUORITUSKYKYTIEDOT	11
16.1	Analyysitarkkuus ja analyysin toistettavuus	11
16.2	Herkkyys ja RNA-syöttö	12
16.3	Häiriötestaus	13
16.4	Kliininen suorituskyky	13
17	VIITEJULKAISUT	25
18	MERKIT JA MÄÄRITELMÄT	25
19	YHTEYSTIEDOT	26

1 KÄYTTÖTARKOITUS

Rintasyöpää ennustavan geeniallekirjoituksen Prosigna[®]-analyysi on *in vitro* -diagnostiikka-analyysi, joka käyttää rintasyöpäkudoksen solujen geeni-ilmentämisprofiilia potilaan etäisen uusiutumisen arviointiin. Analyysissä mitataan geeni-ilmentämisprofiili käyttämällä RNA:ta, joka on saatu formaliiniin fiksoidusta ja parafiiniin upotetusta (FFPE) -rintakasvainkudoksesta. Geeni-ilmentämistiedot painotetaan kliinisten muuttujien kanssa niin, että saadaan luotua sekä alatyypin (Luminal A, Luminal B, runsaasti HER2:ta sisältävä tai basaalinen) sekä tulos, joka ilmaisee sairauden etäisen uusiutumisen todennäköisyyden. Analyysi suoritetaan NanoString nCounter[®]-analyysijärjestelmällä käyttämällä FFPE-rintakasvainkudosta, josta on aiemmin diagnosoitu invasiivinen rintasyöpä.

Rintasyöpää ennustavan geeniallekirjoituksen Prosigna[®]-analyysin käyttöaiheena ovat naispuoliset rintasyöpäpotilaat, joille on suoritettu joko rinnanpoisto tai annettu rintaa suojaavaa hoitoa yhdessä kehon paikallisen alueen hoidon kanssa tavanomaisen hoitokäytännön mukaisesti, joko:

- ennustavana indikaattorina, joka osoittaa eloonjäännin ilman etäistä uusiutumista 10 vuoden kuluttua vaihevuodet läpikäyneillä naisilla, joiden hormonireseptoripositiivista (HR-positiivinen), imusolmukenegatiivista vaiheen I tai II rintasyöpää on hoidettu pelkästään adjuvantilla endokriinisellä hoidolla, kun sitä käytetään yhdessä muiden kliinis-patologisten tekijöiden kanssa
- ennustavana indikaattorina, joka osoittaa eloonjäännin ilman etäistä uusiutumista 10 vuoden kuluttua vaihevuodet läpikäyneillä naisilla, joiden hormonireseptoripositiivista (HR+), imusolmukepositiivista (1-3 positiivista solmuketta tai vähintään 4 positiivista solmuketta) vaiheen II tai IIIA rintasyöpää on hoidettu pelkästään adjuvantilla endokriinisellä hoidolla, kun sitä käytetään yhdessä muiden kliinis-patologisten tekijöiden kanssa.

2 TESTIJÄRJESTELMÄN YHTEENVETO

nCounter-analyysijärjestelmä tekee suoraan limittäisiä mittauksia geenien ilmentymisestä ilmoittamalla digitaalisesti mRNA-transkriptien suhteellisen määrän seuraavien menetelmävaiheiden avulla: 1) RNA:n hybridisointifluoresoiviksi reporterikoettimiksi sieppauskoettimiksi, 2) kohde-koetin kompleksien puhdistus nCounter-valmistelulevyillä, jotka sisältävät jälkihybridisointikäsittelyssä ja nCounter-valmisteluaseman nCounter-kasettiin immobilisoinnissa tarvittavia reagensseja, sekä 3) nCounter-kasetin analysointi nCounter-digitaaliansaattorilla, jotta saadaan testin tulos¹. Sekä sieppaus- että reporterikoettimet sisältävät ainutlaatuisia DNA-koetinsekvenssejä kohteeseen hybridisointia ja puhdistusta varten. Sieppaus- ja reporterikoettimet muodostavat yhdessä positiivisten ja negatiivisten verrokkien kanssa CodeSet-koodisarjan. Prosigna mittaa samanaikaisesti 50 luontaisen alatyypin luokittelualgoritmin² käyttämän geenin, 8 signaalin normalisoinnissa käytetyn ylläpitogeenin (engl. housekeeping gene), 6 positiivisen verrokin ja 8 negatiivisen verrokin ilmentymistasot yhdellä hybridisointireaktiolla käyttämällä nimenomaan näille geeneille suunniteltuja nukleinihappokoettimia. Lisäksi Prosigna-pakkaukseen sisältyy vertailunäyte, joka koostuu *in vitro* transkriboiduista RNA-kohteista kullekin 58 geenistä. Vertailunäyte testataan jokaisen potilaan RNA-näyte-erän kanssa ajon kelpoisuuden arvioimiseksi ja kunkin geenin signaalin normalisoiduksi.

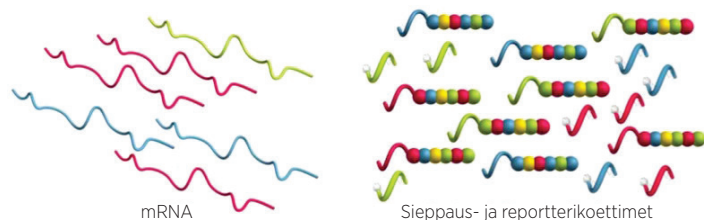
Prosigna-analyysi suoritetaan FFPE-rintakasvainkudoksesta eristetyille RNA:lle. Patologi tutkii hematoksyliinillä ja eosiinilla (H&E) värjätyn objektilasin ja tunnistaa (ja merkitsee) testiin soveltuvan invasiivisen rintasyövän alueen. Patologi mittaa myös kasvaimen pinta-alan, joka määrittää testissä tarvittavien värjäämättömien objektilasien määrän, sekä kasvainsolujen osuuden, jotta testiä varten on riittävästi kasvainkudosta. Koulutettu laborantti suorittaa makrodissektion värjäämättömien objektilasien alueelle, joka vastaa H&E-värjätyn objektilasiin merkittyä kasvainaluetta, ja eristää RNA:n kudoksesta.

Tämän jälkeen eristetty RNA testataan nCounter-analysijärjestelmällä, jolla saadaan testin tulokset, mukaan lukien luontainen alatyypin, uusiutumisen riski (engl. Risk of Recurrence, ROR) -tulos ja riskiluokka.

2.1 nCounter-analysijärjestelmän toimintaperiaate

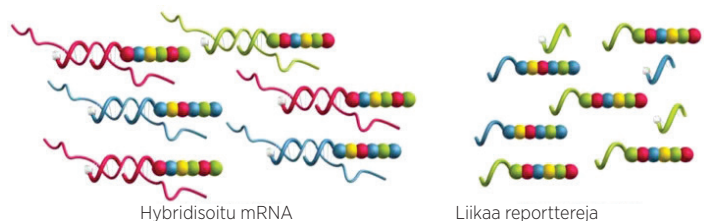
nCounter-analysijärjestelmä käyttää geenispesifisiä koetinpareja (kuva 1), jotka hybridisoituvat suoraan liuoksessa olevaan mRNA-näytteeseen, mikä estää entsymaattiset reaktiot, jotka saattaisivat aiheuttaa poikkeamia tuloksissa. Analyysin ensimmäisessä vaiheessa DNA-koetimet hybridisoidaan suoraan liuoksessa olevan RNA-näytteen 70–100 emäsparin alueeseen. Fluoresoiva reportterikoetin koostuu 35–50 emäksen koetinsekvenssistä, joka on komplementaarinen mRNA-kohteen kanssa, sekä yksilöllisestä DNA-runkosekvenssistä, joka hybridisoituu kuuteen RNA-segmenttiin, jotka on merkitty jollain neljästä fluoresoivasta väriaineesta: punainen (R), keltainen (Y), sininen (B) tai vihreä (G). Fluoresoivat segmentit saavat aikaan kuusipaikkaisen ja nelivärisen fluoresoiva värikoodin, joka on yksilöllinen kullekin kohteelle. Erillinen sieppauskoetin koostuu 35–50 emäksen koetinsekvenssistä, joka on komplementaarinen mRNA-kohteen kanssa, sekä biotiinista, jota käytetään immobilisointiin streptavidiinilla pinnoitetulle objektilasille.

Kuva 1: CodeSet-sarjan hybridisointi mRNA:han.



Hybridisoinnin jälkeen kaikki nCounter-valmisteluaseman näytteen puhdistusvaiheet tapahtuvat automaattisesti. Ensin ylimääräiset sieppaus- ja reportterikoetimet poistetaan (kuva 2) peräkkäisillä magneettihelmien avulla tehtävillä sieppausvaiheilla, mitä seuraa koetin-kohdekompleksien sitoutuminen satunnaisiin kohtiin nCounter-Kasetin pinnalle streptavidini-biotiinisidoksen kautta (kuva 3). Lopuksi koetin-kohdekompleksit kohdistetaan ja immobilisoidaan (kuva 4) nCounter-Kasetissa.

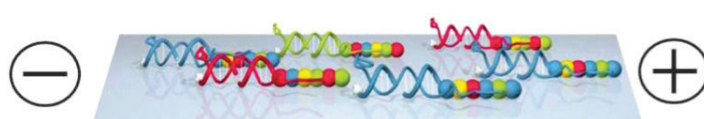
Kuva 2: Ylimääräisten reportterien poisto.



Kuva 3: Hybridisoituneiden reportterien sitominen kasetin pinnalle.



Kuva 4: Hybridisoituneiden reportterien immobilisointi ja kohdistus.



Näytteiden käsittelyn suorittamisen jälkeen kasetti viedään nCounter-digitaalialanalyzeriin tietojen keruuta varten. Jokaisen tutkittavan kohdemolekyylin yksilö "värikoodi", joka koostuu kuudesta järjestäytyneestä fluoresoivasta pisteestä siihen liittyvässä reportterikoettimessa. Tämän jälkeen lasketaan Kasetin pinnan reportterikoettimien määrä, joka taulukoidaan kullekin kohdemolekyylille ja käsitellään algoritmilla (kuva 5).

Kuva 5: Tietojen keruu.

Koodi	Geeni	Määrä
●●●●●●	x	3
●●●●●●	y	1
●●●●●●	z	2

2.2 Tulosten laskennassa käytetyn Prosigna-algoritmin toimintaperiaate

Testi perustuu ilmoitettuun 50 geenin luokittelualgoritmiin, jonka nimi oli alun perin PAM50² ja joka suoritetaan nCounter-analysijärjestelmällä käyttämällä formaliiniin fiksoidusta parafiiniin upotetuista rintakasvainkudosnäytteistä saatua RNA:ta. Algoritmi käyttää 50 geenin ilmentämisprofiilia rintasyövän määrittämiseen johonkin neljästä molekyyliluokasta tai luontaisesta alatyypistä: Luminal A, Luminal B, runsaasti HER2:ta sisältävä tai basaalinen². Neljän luontaisen alatyypin prototyyppiset geeni-ilmentämisprofiilit (esim. sentroidi) opetettiin nCounter-analysijärjestelmälle uudelleen käyttämällä FFPE-rintakasvainnäytteitä, jotka oli kerätty useilta kliinisiltä tutkimuspaikoilta Pohjois-Amerikasta. Kun analyysi oli suoritettu potilaan testinäytteelle, Pearsonin korrelaatioon perustuva laskenta-algoritmi vertaa potilaan testinäytteen normalisoitua 50-geenin ilmentämisprofiilia neljän rintasyövän luontaisen alatyypin prototyyppisiin ilmentämisprofiileihin. Potilaan testinäytteelle määritetään alatyypin, jonka Pearsonin korrelaatio on suurin.

Algoritmi vertaa edelleen toistumisriski (Risk of Recurrence, ROR) -tulosta 0–100-asteikolla³; tämä tulos korreloi etäisen uusiutumisen todennäköisyyden kanssa 10 vuoden kuluttua vaihdevuodet läpikäyneillä naisilla, joilla on hormonireseptoriposiitiivinen, varhaisen vaiheen rintasyöpä⁴. Raportti määrittelee myös riskiluokan (pieni, keskitaso tai suuri). ROR-tulos lasketaan käyttämällä kertoimia Coxin mallista, joka sisältää näiden 50 geenin 46 geenin alajoukon Pearson-korrelaation jokaisen luontaisen alatyypin sentroidiin, proliferaatiotulokseen ja kasvaimen bruttokokoon. Testimuuttujat kerrotaan vastaavilla kertoimilla Coxin mallista, jotta saadaan tulos, joka oikaistaan asteikolle 0–100 FFPE-rintakasvainnäytteiden opetussarjasta saatujen kertoimien perusteella. Riskiluokat ilmoitetaan myös kliinisessä validointitutkimuksessa määritettyjen ROR-raja-arvojen perusteella.

3 TOIMITETUT REAGENSIT JA LAITTEISTOT

3.1 Prosigna-pakkauksen yhteenveto

Prosigna-pakkaus sisältää reagenssit, jotka tarvitaan tilatun tuotteen mukaan 1, 2, 3, 4, tai 10 potilasnäytteen käsittelyyn. Katso tilaustiedot alla. Prosigna-pakkaus sisältää CodeSet-koodisarjan, yhden vertailunäyteputken jokaiselle yhden-kymmenen testin sarjalle sekä kulutustarvikkeet, joille suoritetaan yhdessä toimivuudesta ennen niiden myyntiin päästämistä.

Tuotenumero	Testien määrä pakkauksessa	Sisältyvien vertailunäytteiden numerot
PROSIGNA-001	1	2
PROSIGNA-002	2	2
PROSIGNA-003	3	2
PROSIGNA-004	4	2
PROSIGNA-010	10	2

Suosittelaa käytettävän yhdessä Veracyte FFPE RNA -uuttopakauksen (550100) kanssa. Tämän RNA-uuttopakauksen saa vain Veracyten kautta.

3.2 Prosigna-pakkauksen sisältö: 1, 2, 3, 4 tai 10 testin Prosigna-pakkaus

Testien määrä	1	2	3	4	10
Prosigna CodeSet -laatikko					
Prosigna Reporter CodeSet	1 x 65 µl	1 x 65 µl	1 x 65 µl	1 x 65 µl	1 x 65 µl
Prosigna Capture ProbeSet	1 x 70 µl	1 x 70 µl	1 x 70 µl	1 x 70 µl	1 x 70 µl
Prosigna RNA -vertailunäyte	1 x 30 µl	1 x 30 µl	1 x 30 µl	1 x 30 µl	1 x 30 µl
CodeSet-viivakooditarra	1	1	1	1	1
Testin kokoonpanokoodi	1	1	1	1	1
Prosigna Prep Plate valmistelulevyjen laatikko					
Prep Plates valmistelulevyt	1	1	1	1	2
Prosigna Cartridge -kasettilaatikko					
nCounter Cartridges -kasetit	1	1	1	1	1
Prosigna Prep Pack valmistelupakkauksen laatikko					
nCounter valmisteluaseman kärjet	1	1	1	1	1
nCounter Cartridge kasetin liimapeite	2	2	2	2	2
nCounter kärkien suojukset	2	2	2	2	2
nCounter-hybridisointipuskuri	1 x 580 µl	1 x 580 µl	1 x 580 µl	1 x 580 µl	1 x 580 µl
12-kuoppaiset lovetut putkiliuskat	4	4	4	4	4
12-kuoppaisten lovetuttujen putkiliuskojen kannet	4	4	4	4	4

Sisällön kuvaus

Prosigna CodeSet

Prosigna Reporter CodeSet

Prosigna Capture ProbeSet
Prosigna RNA -vertailunäyte
CodeSet-viivakooditarra
Testin kokoonpanokoodi

*puskuri, nukleiinihapot, joissa on fluoresoivia väriaineita
puskuri, nukleiinihapot
puskuri, nukleiinihapot
tarra-arkki
kortti ja tarra*

Prosigna Prep Plates -valmistelulevyt

Prep Plates -valmistelulevyt

*superparamagneettiset helmet,
puskuri, suolat, oligonukleotidit,
polystyreenihelmet, joissa on fluoresoivia väriaineita*

Prosigna Cartridges -kasetit

nCounter Cartridge(s) -kasetit

näytekasetit

Prosigna Prep Pack -valmistelupakkaus

nCounter-hybridisointipuskuri
12-kuoppaiset lovetut putkiliuskat
12-kuoppaisten lovetuttujen putkiliuskojen kannet
nCounter valmisteluaseman kärjet

*puskuri, suolat
muoviliuskat
muovikannet
2 telineä, joissa on 90 kärkeä +
6 lävistyslaitteen nCounter
liimakalvot
6-kuoppaiset kärkien pitimet*

nCounter Cartridge kasetin liimapeite

nCounter-kärkien suojukset

4 VAROITUKSET JA VAROTOIMET

1. Diagnostiseen *in vitro* -käyttöön.
2. Tämä analyysi on tarkoitettu sellaisten käyttäjien käyttöön, jotka ovat saaneet koulutusta erittäin monimutkaisista molekyylibiologisista tekniikoista paikallisten määräysten mukaisesti.
3. Eri Prosigna-erien pakkausten ainesosia ei saa sekoittaa keskenään. Prosigna-pakkauserien voidaan taata toimivan vain sellaisinaan, sillä niiden toimivuus on varmistettu tässä muodossa valmistuksen aikana.
4. Mitään yli jääneitä reagensseja ei saa käyttää uudelleen Prosigna-analyyseissä.
5. Hävitä kaikki reaktiot, joiden hybridisointiajat tai -lämpötilat saattavat olla vialliset.
6. On tärkeää pitää näytteen säilytysketju eheänä (kudoksesta RNA:han ja RNA:sta analyysiin), jotta potilasnäytteen tunnus liittyy oikeaan testitulokseen.
7. Jos reagensseja ei säilytetä etiketissä mainituissa olosuhteissa, analyysin suorituskyky voi kärsiä tästä.
8. Käytä aina käsieneitä reagensseja ja näytteitä käsitellessäsi.
9. Vältä RNA:naasin kontaminoitumista, sillä se voi heikentää tulosten laatua.
10. Kaikkia biologisia näytteitä ja materiaaleja on käsiteltävä siten kuin ne voisivat sisältää tarttumavaarallisia aineita, ja ne on hävitettävä asianmukaisin varotoimin liittovaltio- ja osavaltiotason sekä paikallisten määräysten mukaisesti.

11. Älä koskaan pipetoi suun avulla.
12. Vältä reagenssin kosketusta silmiin, ihoon tai limakalvoihin.
13. Käytä molekyylibiologian parhaita käytäntöjä, jottei testinäytteen tai suuren pitoisuuden nukleiinihappokohteiden (synteettisten tai PCR-monistettujen) välillä tapahdu ristikontaminaatiota, joka voi heikentää tulosten laatua.
14. Prosigna-valmistelulevyissä ja nCounter-kaseteissa on erittäin pienenä pitoisuutena natriumatsidia (alle 0,1 %), ja siksi niiden hävityksessä suositellaan käytettävän muovisia (ei metallisia) jätteastioita. Vaikka Prosignan tapauksessa natriumatsidin kertyminen metallin pinnalle on erittäin epätodennäköistä, sen tiedetään aiheuttavan räjähdysvaaran.
15. Lisää instrumenttikohtaisista hävitysohjeista on nCounter-analyyysijärjestelmän käyttöoppaassa ja valmisteluaseman ja digitaalisanalysaattorin huolto-oppaassa.
16. Reportterin CodeSet-sarjan, sieppauskoetinten ProbeSet-sarjan, hybridisointipuskurin ja valmistelulevyjen käyttöturvallisuustiedotteet ovat luettavissa verkkosivustossa www.prosigna.com.
17. Kaikki vaaralliset materiaalit on hävitettävä laitoksen omien vaarallisten jätteiden käsittelyä koskevien ohjeiden mukaisesti.
18. Kaikki käyttämättömät CodeSet-sarjat on hävitettävä.
19. Jos potilaan kasvainkoon luokitus kirjataan väärin ohjelmistoon, se voi heikentää ROR-tulosta ja riskiluokitusta (esim. muuttaa ROR-tulosta ja/tai aiheuttaa väärän luokituksen).
20. Jos potilaan imusolmuketila kirjataan väärin ohjelmistoon, potilaan testitulokset voidaan ilmoittaa virheellisesti (esim. väärä riskiluokitus).
21. Älä käytä Prosigna-analyyseissä riittämättömän laatuista tai liian vähäistä määrää RNA:ta tai kasvainnäytteitä, joiden kasvaimen pinta-ala tai kasvainsolujen osuus on riittämätön. Prosigna-analyysi ei välttämättä pysty antamaan kelvollista tulosta, vaan ilmoittaa sen sijaan analyysivirheestä.

5 YLEISIÄ TIETOJA ANALYYSISTÄ

1. Analyysi on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan kirurgisesti pois leikatuille formaliniin fiksoiduille, parafiiniin upotetuille rintasyöpäkudoksenäytteille; sitä ei ole tarkoitettu käytettäväksi tuoreille tai jäädytetyille näytteille tai muille kuin rintasyöpäkudoksille.
2. Potilaan primaarikasvaimen bruttokoko ja imusolmukkeiden tila ovat pakollisia tietoja analyysin suorittamisen kannalta.
3. Käytä steriilejä kertakäyttöisiä mikropipettikärkiä, jotteivät reagenssit tai näytteet kontaminoitu mikrobeista ja nukleasista käsittelyn aikana.
4. Säilytä eristettyjä RNA-näytteitä määrässä jäässä, kun niitä ei käsitellä aktiivisesti.
5. Lämpöblokkeja varten tarvitaan kalibroidut lämpömittarit.
6. Älä käytä pakkauksen ainesosia, jos ne ovat vahingoittuneet toimituksen aikana.
7. On suositeltavaa, että Prosigna-analyysejä käyttävät laboratoriot kehittävät ja käyttävät klinisiä verrokkeja (esim. riskiluokan suhteen) osana tavanomaisia laboratorion laadunvalvontatoimia, jotta tulokset säilyvät pitkäaikaisesti tarkkoina.

5.1 Kudoksen käsittely

1. Jos ympäröivää ei-kasvain- tai normaalia kudosta ei poisteta kunnolla makrodissektiolla kudoksen käsittelyn aikana, riski voidaan aliarvioida, koska lääkärille ilmoitetaan alhaisempi ROR-tulos.
2. Jos ihmisen genomien DNA:ta ei poisteta kunnolla RNA:n eristyksen aikana, epäonnistumisriski voi olla suurempi heikomman analyysisignaalin vuoksi tai riski voidaan yliarvioida, koska lääkärille ilmoitetaan suurempi ROR-tulos.
3. Kaikki värjäämättömät kudosteikkheet on kiinnitettävä positiivisesti varatuille mikroskoopin objektilaseille, jotteivät ne pääse irtoamaan kudoksen käsittelyn aikana.
4. Jos kyseessä on useita objektilaseja tarvitseva näyte, objektilasit voidaan käsitellä yhdessä.
5. Objektilasille kiinnitetyt kudosteikkheet voivat mennä pilalle, jos niitä säilytetään yli 9 kuukauden ajan kuivatussa ympäristössä.
6. Vaihda 3-prosenttinen glyserolin käyttöliuos kerran viikossa tai jos liuos muuttuu sameaksi. Näin toimimalla vältetään kontaminaation mahdollisuus.
7. Vaihda ensimmäisen D-limoneenipesun sisältö 4 objektilasisarjan käsittelyn jälkeen ja etanolin (EtOH)- ja toisen D-limoneenivärjäysmaljan sisältö 8 objektilasin käsittelyn jälkeen, jottei kudoksen laatu vaarannu.
8. Toimi varoen, kun rajaat kasvainaluetta värjäämättömästä objektilasista ja poistat ei-kasvainkudosta, jotta et koske kasvainkudosta.
9. Käsittele teräviä välineitä varoen makrodissektion aikana.

- Käytä uutta partaterää jokaiselle käsiteltävälle kudosnäytteelle.
- RNA-eristyspakkausten uudet erät/annokset on testattava eristyspakkausten ohjearvojen mukaisesti uusien pakkauserien kelpuuttamiseksi testauksessa käytettäväksi (katso lisätietoja kohdasta 11.5).

5.2 Prosigna-analyysin suorittaminen

- Varmista, että potilaan kategorinen primaarikasvaimen bruttokoko kirjataan oikein ohjelmistoon.
- Varmista, että potilaan kategorinen imusolmukkeiden tila kirjataan oikein ohjelmistoon.
- Varmista, että hybridisoinnissa tarvittava lämpöblokki, jossa on lämmitetty kansi, täyttää ohjearvot ja että se kalibroidaan säännöllisesti.
- Käytä vain Prosigna-pakkauksen mukana toimitettuja kulutustarvikkeita. Ne on suunniteltu toimimaan erityisesti nCounter-valmisteluaseman ja nCounter-digitaaliansaattorin kanssa.
- Jos hybridisointipuskuria on säilytetty kylmissä lämpötiloissa ja siinä havaitaan olevan sakkaa, lämmitä putkia 37 °C:ssa, kunnes suolat ovat liuenneet.
- Älä sekoita analyysin ainesosia pyörresekoittimella voimakkaasti seokseen, sillä muutoin reagenssit voivat vaurioitua. Sekoitus on tehtävä pipettiä käyttämällä.
- Älä sentrifugoi reportterin CodeSeta yli 3 000 g:n kiihtyvyydellä yli 10 sekunnin ajan. Älä käytä sentrifugoinnissa sykkytyssekoitustoimintoa. Muutoin CodeSet saattaa sakkautua.
- Säilytä hybridisointireaktioseoksia 65 °C:ssa, kunnes ne ovat valmiita siirrettäväksi valmisteluasemaan. Jos lämpöblokki asetetaan jäähtymään asteittain 4 °C:seen tai jos näytteet laitetaan jäihin hybridisaation loppuksi, seurauksena voi olla ristihybridisointi, joka voi heikentää analyysin tuloksia.
- Jos putkiliuskoja ei laiteta 65 °C:n lämpötilaan 15 minuutin kuluessa sieppauskoetinten ProbeSet-sarjan lisäämisestä, seurauksena voi olla ristihybridisointi, joka voi heikentää analyysin tuloksia.
- Jos valmisteluaseman käsittelyä ei aloiteta 15 minuutin kuluessa näytteiden poistamisesta 65 °C:n lämpötilasta, seurauksena voi olla ristihybridisointi, joka voi heikentää analyysin tuloksia.
- Varmista, että putkiliuskojen korkit sulkeutuvat tiiviisti ennen hybridisointia lämpöblokkissa, jotteivät ne pääse haihtumaan, mikä voisi vääristää analyysin tuloksia.

6 KOULUTUSTIEDOT

Tämä analyysi on tarkoitettu sellaisten ammattikäyttäjien käyttöön, jotka ovat saaneet koulutusta erittäin monimutkaisista molekyylibiologisista tekniikoista paikallisten määräysten mukaisesti. Jos haluat tietoja Prosigna-analyysin suorittamista koskevasta koulutuksesta, ota yhteys Veracyteen.

7 JÄTTEIDEN KÄSITTELY

Katso nCounter-analyyysijärjestelmän käyttöoppaasta IVD-sovelluksissa käytettävien reagenssien ja instrumenttien jätteenkäsittelyohjeet.

Katso valitun RNA-uuttopakkausten käyttöohjeista tietoa jätteiden käsittelystä sekä erityisesti RNA-uuttoreagensseja koskevat tiedot.

8 SÄILYTYS JA KÄSITTELY (REAGENSsit)

Kaikkien analyysipakkauksen osien viimeinen käyttöpäivä näkyy viivakooditarrassa, joka toimitetaan CodeSet-laatikon mukana sekä kaikkien Prosigna-osien ulkopakkauksen merkinnöissä.

- Prosigna CodeSet -laatikon sisältämät osat (Prosigna-reportterin CodeSet, Prosigna-sieppauskoetinten ProbeSet-sarja ja Prosigna-RNA-vertailunäyte) on säilytettävä enintään -80 °C:n lämpötilassa.
- nCounter Cartidges -kasetit on säilytettävä -20 °C:ssa tai kylmemmässä.
- nCounter Prep plates -valmistelulevyt on säilytettävä 4 °C (2-8 °C):ssa.
- nCounter Prep pack -valmistelupakkauksen osat on säilytettävä huoneenlämmössä 15–25 °C:ssa.

9 PROSIGNA-ANALYYSISSÄ TARVITTAVAT INSTRUMENTIT

- nCounter-analyyysijärjestelmä (tuotenumero NCT-SYST-DX) (sisältää kummatkin alla olevat instrumentit)
 - nCounter-valmisteluasema 5s (tuotenumero NCT-PREP-STATION-FLEX)
 - nCounter-digitaaliansaattori 5s (tuotenumero NCT-DIGITAL-ANALYZER-FLEX).

Katso lisätietoja nCounter-analyyysijärjestelmän käyttöoppaasta.

10 TARVITTAVAT REAGENSsit JA LAITTEISTOT, JOITA EI TOIMITETA VALMIIKSI

10.1 Materiaalit

- FFPE-RNA-eristyspakkaus (katso kohdasta 11.5 eristyspakkausten vaatimukset, jos et käytä Veracyten kautta ostettua Veracyte FFPE RNA -uuttopakkausta)
- hematoksyliini ja eosiini (H&E)
- positiivisesti varatut lasiset mikroskoopin objektilasit
- D-limoneenipuhdistusaine (histologisen laadun aine)
- 100-prosenttinen (absoluuttinen) etanoli, ACS- tai vastaavaa laatua (ei alle 99,5-prosenttista)
- glyseroli, molekyylibiologista laatua
- nukleasiton vesi, molekyylibiologista laatua*
- 100-prosenttinen isopropanoli*
- Kartiomainen putki 50 ml
- partaterät (tai kertakäyttöskalpellit)
- kertakäyttöiset mikrotomit
- 1,5 tai 1,7 ml:n tarttumattomat RNAasia sisältämättömät mikrosentrifugiputket
- RNAasia sisältämättömät mikropipettikärjet, joissa on aerosolisulku.

* Materiaalit, jotka tarvitaan RNA-uuttoon mutta joita ei ole toimitettu, kun käytetään Veracyte FFPE RNA -uuttopakkausta.

10.2 Laitteistot

- mikrotomi
- vesihaude (40 °C)
- objektilasin lämmitin (45 °C)
- mikroskoopin objektilasien kuivatusteline
- mikropipetit; 2 µl, 20 µl, 200 µl ja 1000 µl
- pienoissentrifugi, jossa on 0,2 ml:n putkiliuskaroottori ja tavallinen 1,5/2,0 ml:n mikrosentrifugiputkikroottori
- tavallinen pöytämikrosentrifugi, jossa on kiinteäkulmainen roottori ja johon sopivat 1,5 ml:n sentrifugiputket
- suorakulmaiset lasiset, kannelliset värjäysmaljat (sisämitat noin 91 × 71 × 60 mm); tarvittava määrä 3 kpl
- objektilasiteline (telineeseen mahtuu enintään kymmenen 75 × 25 mm:n lasista objektilasia)
- kuiva lämpöblokki, ei-siirrettävä*
- pöytäpyörresekoitin mikrosentrifugiputkia varten
- asteikollinen pullo (suositeltu koko: 100–250 ml)
- dissektioneula tai peitelasipihdit (taitettu, ei-sahalaitainen)
- kalibroidut lämpömittarit (pystyvät mittaamaan lämpötila-alueelta 55–80 °C)
- mikrotilavuuden UV/Vis-spektrofotometri (katso ohjearvot jäljempää)
- lämpöblokki, jossa on lämmitetty kansi (katso ohjearvot jäljempää)
- sentrifugi, jossa mikrolevysovitin (katso ohjearvot jäljempää)
- Coplin-malja.

* Väline, joka tarvitaan RNA-uuttoon Veracyte FFPE RNA -uuttopakkausten kanssa.

10.3 Laitteistojen ohjearvot

Taulukko 1: Täyden spektrin mikrotilavuuden UV/Vis-spektrofotometri nukleinihappojen kvantifiointia varten.

Ominaisuus	Ohjearvot
Näytteen tilavuusalue	1–2 µl
Valopolun pituus	1 mm
Aallonpituusalue	260–280 nm
Aallonpituuden tarkkuus tai virhe	± 1 nm
Spektritarvuuus tai kaistanleveys	Enintään 4 nm
Absorbanssin tarkkuus tai satunnainen fotometrin virhe	0,003 (1 mm:n valopolku)
Havaitsemiskynnys	5 ng/µl RNA:ta
Enimmäispitoisuus	≥ 1 000 ng/µl RNA:ta

Taulukko 2: Mikrotilavuuden UV/Vis-fotodiodispektrofotometri nukleinihappojen kvantifiointia varten.

Ominaisuus	Ohjearvot
Näytteen tilavuusalue	1–2 µl
Valopolun pituus	0,5 mm
Aallonpituusalue	260 ja 280 nm
Spektritarvuuus	Enintään 8 nm
Absorbanssin tarkkuus	3 % (absorbanssilla 1,05 Abs aallonpituudella 260 nm)
Havaitsemiskynnys	4 ng/µl RNA:ta
Enimmäispitoisuus	≥ 1 000 ng/µl RNA:ta

Taulukko 3: Lämmitetyllä kannella varustettu lämpöblokki analyysin hybridisointia varten.

Ominaisuus	Ohjearvot
Lämpöblokin rakenne	- Sisään on mahdolltava tavallisen profiilin 12 × 0,2 ml:n lovetut putkiluskat, jotka toimitetaan osana nCounter-valmistelupakkausta. - Matalan profiilin (LP) ja korkean profiilin (HP) putkille suunnitellut lämpöblokit eivät ole yhteensopivia (niihin viitataan "nopeina" blokkeina lämpösyklickäsittelyssä). - Muuntotyypisille putkille (esim. 0,1 ml:n ja 1,5 ml:n putkille) suunnitellut lämpöblokit eivät ole yhteensopivia. - Lämpöblokkien on oltava ohjelmoitavissa pitämään lämpötila 65 °C:ssa. - Niiden on pidettävä lämpötila ± 1 °C:n sisällä 65 °C:sta.
Lämmitetyn kannen rakenne	- Hyväksyttäviä kansiä ovat kiinteät tai korkeussäädettävät kannet. - Kansi on voitava ohjelmoida 70 °C:seen.

Taulukko 4: Mikrolevyalustalla varustettu sentrifugi nCounter-valmistelulevyjen linkoamista varten.

Ominaisuus	Ohjearvot
Sentrifugointinopeus	Vähintään 2 000 g
Roottorit	4 × 750 ml:n kääntöröypustinroottorit, joissa on mikrolevyalustat (tai vastaavat), joihin sopivat SBS-muodon 96-kuoppaiset mikrolevyt.
Toimintatilat	Kiihdytys- ja hidastustilat

11 NÄYTTEIDEN KERUU JA KÄSITTELY

11.1 Kudosnäytteitä koskevat vaatimukset ja patologin arviointi

- Rintasyöpää ennustavan geeniallekirjoituksen Prosigna-analyysi on suoritettava formaliiniin fiksoiduille, parafiiniin upotetuille hormonireseptoriposiitiivisille rintakasvaimukudosnäytteille, jotka patologi määrittää lisäksi kuuluvan johonkin seuraavista invasiivisen rintasyövän tyypeistä:
 - invasiivinen duktaalinen rintasyöpä
 - invasiivinen lobulaarinen rintasyöpä
 - invasiivinen rintasyöpä, jolla on sekä duktaalisia että lobulaarisia piirteitä ("sekatyypin rintasyöpä")
 - ei-erityistyyppinen (NST) tai muutoin määrittelemätön (NOS) rintasyöpä.
- Patologin on valittava tätä testiä varten se FFPE-kasvainpala, jossa on eniten elinkelpoista invasiivista rintasyöpää.
- Testiä varten tarvitaan värjäämättömälle objektilasille kiinnitettyjä kudosleikkeitä käsittelyä varten ja vastaava H&E-värjätty objektilasi FFPE-kasvainpalasta.
- On suositeltavaa, että analyysin käsittelyyn käytettävät kudosleikkeet leikataan H&E-värjäystä varten leikattujen kudosleikkeiden vierestä, jotta H&E-värjättyä objektilasilta havaittu kasvainalue edustaa värjäämättömien objektilasien kasvainaluetta.
- Patologin on ympyröitävä elinkelpoisten invasiivisen rintasyövän kohdat H&E-objektilasilta, pois lukien ympäröivä ei-kasvainkudos.
- Patologin tai koulutetun laborantin on arvioitava kasvainsolujen osuus ja kasvaimen pinta-ala H&E-värjätyn objektilasin ympyröidyltä alueelta.
 - Kasvainsolujen prosenttiosuuden H&E-värjättyllä objektilasilla on oltava vähintään 10 %.
 - Ympyröidyn kasvaimen pinta-alan H&E-värjättyllä objektilasilla on oltava vähintään 4 mm².

*Huomaa, että kasvainmäärän prosenttiarvo viittaa elinkykyisten kasvainsolujen prosenttiarvoon ympyröidyllä kasvainalueella.
- Testin aloittamista varten suositeltava kasvaimen kokonaispinta-ala on yli 100 mm². Seuraavassa taulukossa esitetään suositeltu objektilasien määrä, joka perustuu H&E-värjättyä objektilasilta mitattuun kasvainpinta-alaan.
- Jos kudoksen arvioinnissa käy ilmi, että kasvainpalan kasvainpinta-ala tai kasvainsolujen osuus on liian pieni, voidaan arvioida saman kasvaimen eri pala. Jos ei ole FFPE-paloja, jotka sisältävät riittävästi kasvainkudosta, Prosigna-analyysiä ei tule suorittaa. Huomaa, että jos kasvaimen pinta-ala alittaa 20 mm², on todennäköisempää, että RNA:n syöttövaatimukset eivät täyty.

Taulukko 5: Suositellut objektilasia koskevat vaatimukset perustuen kasvaimen pinta-alaan.

H&E-värjättyä objektilasilta mitattu kasvainpinta-ala (mm ²)	Värjäämättömien objektilasien määrä
4-19	6
20-99	3
≥ 100	1

11.2 Näytteiden keruu ja säilytys

- Seuraavat toimenpiteet voidaan tehdä laboratorion omien vakiotoimintatapojen mukaisesti: kudoksen keruu ja formalinifiksointi, FFPE-kasvainpalan käsittely ja säilytys ja objektilasille kiinnitetyn FFPE-kudoksen toimitus.
- Objektilasille kiinnitetyt FFPE-kudosleikkeet on säilytettävä laboratorion omien vakiotoimintatapojen mukaisesti. Jos objektilaseja säilytetään pitkään (yli 30 vuorokautta), niitä on säilytettävä kuivatetussa ympäristössä, ja ne on käsiteltävä 9 kuukauden kuluessa, jotta testitulokset pysyvät laadukkaina.

11.3 Objektilasien valmistelu

- Leikkaa mikrotomilla 4–5 µm:n paksuinen leike H&E-värjäystä varten.
- Leikkaa mikrotomilla 10 µm:n paksuinen leike Prosigna-analyysiä varten.
- Anna leikkeiden kellua vesihauteessa 40 °C:ssa.
- Kiinnitä leikkeet positiivisesti varatuille lasisille mikroskoopin objektilaseille.
- Anna objektilasien kuivua vapaasti.
- Lämmitä objektilaseja yön ajan 45 °C:ssa.

11.4 Objektilasien käsittely

- Valmista 3-prosenttinen glyserolin käyttöliuos sekoittamalla 1,5 ml glyserolikantaliuosta 48,5 ml:aan molekyylibiologisen laadun nukleasaition vettä; punnitse tarvittaessa. Kaada liuos Coplin-maljaan objektilasien käsittelyä varten.
 - Kaada 200–250 ml D-limoneenipuhdistusainetta kahteen värjäysmaljaan varmistaen, että objektilasitelineen objektilasit uppoavat liukseen kokonaan.
 - Kaada noin 200–250 ml absoluuttista etanolia (EtOH) kolmanteen värjäysmaljaan.
 - Aseta värjäämätön objektilasille kiinnitetty kudosleike (-leikkeet) objektilasitelineeseen.
 - Aseta objektilasiteline ensimmäiseen D-limoneenivärjäysmaljaan ja sekoita sitä varovasti edestakaisin 10–15 sekunnin ajan. Jätä teline ensimmäiseen D-limoneenivärjäysmaljaan yhteensä 2 minuutin ajaksi.
 - Ota objektilasiteline pois ensimmäisestä D-limoneenivärjäysmaljasta ja laita se toiseen D-limoneenivärjäysmaljaan. Sekoita objektilasitelinettä varovasti edestakaisin 10–15 sekunnin ajan. Jätä objektilasiteline toiseen D-limoneenivärjäysmaljaan yhteensä 2 minuutin ajaksi. Varmista, että kaikki parafiini on poistettu ja jos näin ei ole, jätä teline toiseen D-limoneenivärjäysmaljaan vielä 1 minuutiksi.
 - Ota objektilasiteline pois toisesta D-limoneenivärjäysmaljasta ja vie se EtOH-pesuun. Sekoita objektilasitelinettä varovasti edestakaisin 10–15 sekunnin ajan ja ota se pois 2 minuutin kuluttua.
 - Anna objektilasien kuivua avoimena 5–10 minuutin ajan tai kunnes ne ovat kuivuneet täysin, jolloin kudos näyttää valkoiselta (tähän voi kulua pidempään kudoksen koon mukaan).
 - Rajaa kasvaimen alue värjäämättömän objektilasi(e)n takapinnalta asettamalla se kohdakkain vastaavan H&E-värjätyn objektilasin kanssa ja siirtämällä rajattua aluetta.
 - Käytä yhtä objektilasia kerrallaan ja suorita kasvaimen rehydraatio rajausmerkitylle värjäämättömälle objektilasille kastamalla objektilasi 3-prosenttiseen glyseroliliuokseen.
 - Poista ylimääräinen glyseroli objektilasista laboratoriopyyhkeellä.
 - Kun käsittelyssä on useita objektilaseja, objektilasien voi antaa kuivua kuivaustelineellä muiden objektilasien rehydraation aikana.
 - Kaavi pois kaikki rajattua kasvainaluetta ympäröivä muu kuin kasvainkudos partaterällä tai skalpellilla ja heitä se pois.
 - Pidä kiinni objektilasin toisesta päästä ja laske toinen pää kiinteän pinnan varaan 45 asteen kulmaan ja kerää makrodissektoitu kasvainkudos partaterän reunalla. Kudoksen pitäisi "kiertyä" helposti partaterälle keräämisen aikana.
 - Toista edellinen vaihe jokaiselle saman näytteen objektilasille.
- Huomaa:** yhden FFPE-näytteen useat värjäämättömät objektilasit voi kerätä samalle partaterälle.
- Liu'uta varovasti saman näytteen kudosleikkeet merkittyyn 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen.
 - Jos käytät dissektioneulaa tai pihtejä, upota ne D-limoneeniin muutamaksi sekunniksi ja kuivaa ne kudonäytteiden välissä.

11.5 RNA:n eristys

Veracyste suosittelee Veracyste FFPE RNA -uuttopakauksen käyttöä, sillä se on validoitu nimenomaan Prosignan kanssa käytettäväksi.

Prosigna-näytteiden valmisteluun voidaan käyttää muita RNA-eristyspakkauskia, jos niillä saadaan objektilasille kiinnitetyistä FFPE-rintakasvainkudosleikkeistä RNA:ta, joka vastaa seuraavia ohjearvoja:

Taulukko 6: RNA-eristyspakauksen ohjearvot.

Mittari	Testi tai mittaus	Vaatus
RNA-pitoisuus	Optinen tiheys 260 nm:llä	$\geq 12,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$
RNA:n kokonaistilavuus (μl)	Eluoitu kokonaistilavuus	$\geq 12 \mu\text{l}$
RNA:n puhtaus	260 nm:n optisen tiheyden suhde verrattuna optiseen tiheyteen 280 nm:llä (OD 260/280 nm)	1,7-2,3
DNA:n kontaminaatio	Eluoidun RNA-näytteen genomin DNA:n pitoisuus	$\leq 1 \text{ ng}/\mu\text{l}$
RNA:n eheys	Eristettyjen RNA-fragmenttien kokojakauma	$\geq 90 \%$ eristetyistä RNA-fragmenteista on oltava yli 100 nukleotidin pituisia.

Huomio: Jos Prosigna-analyysin kanssa käytetään vaihtoehtoista eristysmenetelmää, laboratorion on validoitava kyseinen työnkulku täysin ennen sen käyttämistä rutiinissa.

RNA:n eristysmenetelmä:

- Jos käytetään Veracyste FFPE RNA -uuttopakkausta, noudata Veracyten antamia käyttöohjeita.
- Jos käytetään vaihtoehtoista uuttomenetelmää, noudata validoitua protokollaa tai valmistajan ilmoittamaa protokollaa.

Jokainen Veracyten valmistama RNA-uuttopakkaus on hyväksytty tuottamaan RNA-näytteitä, jotka täyttävät ennalta määritellyt spesifikaatiot koskien diagnostisia geeniekspressiomäärittäyksiä. Katso valitun RNA-uuttopakauksen menetelmän kuvauksesta / käyttöohjeista asianmukaiset säilytys-, turva- ja käsittelyohjeet.

11.6 Mittaa RNA:n pitoisuus ja laatu

1. Mittaa eristetyn RNA:n pitoisuus saman työpäivän kuluessa (säilytä sitä $+2...+8 \text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa) tai jäädytä se -70°C :seen tai alempaan lämpötilaan odottamaan käyttöä.
2. Mittaa optinen tiheys (OD) 260 ja 280 nm:n aallonpituudella 2 μl :sta eristettyä RNA:ta käyttämällä kohdassa 10.3 – Laitteistojen ohjearvot määritettyjä ohjearvoja vastaavaa spektrofotometriä. Vältä 2 μl :n pipetoimista lähdeputken pohjalta, jos siinä on lasikuituja, sillä ne häiritsevät optisen tiheyden lukemista.
3. Noudata RNA:n mittauksessa spektrofotometrin valmistajan ohjeita.
4. Jos jokin näytteistä ei täytä RNA:n vähimmäispuhtauden vaatimusta tai pitoisuusarvovaatimuksia (taulukko 6), sentrifugoi näyteputkea 1 minuutin ajan enimmäisnopeudella (yli 10 000 g), laita putki jäihin ja toista mittausprosessi. Jos näyte ei täytä edelleenkaan joko puhtaus- tai pitoisuusvaatimusta, RNA-näyte ei sovellu analysoitavaksi Prosigna-analyysimenetelmällä. Älä käytä Prosigna-analyysissä riittämättömän laatuista tai liian vähäistä määrää RNA:ta.
5. RNA:n eristäminen voi toistaa, jos vähimmäispitoisuuden tai -puhtauden vaatimus ei täyty (taulukko 6). Käyttäjät voivat eristää muut objektilasit samasta FFPE-palasta tai valita erillisen palan samalta potilaalta.
6. Jos RNA-pitoisuus ylittää 250 ng/ μl , RNA on laimennettava molekyylibiologisen laadun RNAasia ja DNAasia sisältämättömällä vedellä tavoitepitoisuuteen 200 ng/ μl ennen jatkovaiheen, hybridointianalyysin, suorittamista. Käytä tallennettua OD 260/280 -suhteen tulosta laimentamattomasta näytteestä sen määrittämiseen, täyttääkö laimennettu näyte RNA:n vähimmäispuhtausarvon 1,7.
7. Jäädytä RNA $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa tai alemmassa lämpötilassa, jos Prosigna-analyysiä ei voi suorittaa saman työpäivän aikana.

11.7 Analyysimenetelmä

Tämä analyysimenetelmä kuvaa toimenpiteet, jotka on käytävä läpi Prosigna-analyysin suorittamiseksi nCounter-analyysijärjestelmällä. Nämä vaiheet voidaan tiivistää seuraaviin luokkiin kahtena peräkkäisenä päivänä:

1. päivä

- Määritä ajosarjan tunniste (Run Set Identification, RSID) -tallenne verkkosovelluksella.
- Valmistele RNA-hybridisointi Prosigna CodeSet -sarjalla (30 minuutin valmistelu, 15–21 tunnin hybridisointi)

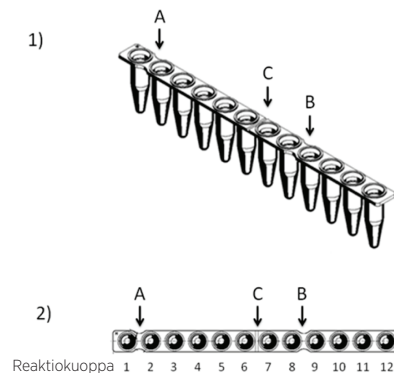
2. päivä

- Valmistele valmisteluasema ja suorita ajo (20 minuutin valmistelu, 2–3 tuntia ajoa kohti näytteiden ajomäärän mukaan).
- Valmistele kasetti ja lue se digitaaliansalyysiaattorissa (5 minuutin valmistelu, 2,5–4,5 tuntia ajoa kullekin Kasetille näytteiden ajomäärän mukaan).
- Hae raportti (30 minuuttia).

Potilasnäytteen valinta ja erän valmistelu

1. Määritä potilasnäytteet, jotka ovat osa testiajoa. Yhteen erään voi sisällyttää enintään 10 näytettä.
 - a. Jokaiselle erän näytteelle määritetään yksilöllinen paikka 12-kuoppaisessa hybridisointiin käytettävässä putkiliuskassa, ja tämä paikka rekisteröidään osana ajosarjan tunnusta instrumenttiin (ajosarjan tunnuksen määrittäminen tehdään verkkosovellusohjelmiston kautta). Huomaa, että paikat 1 ja 2 on varattu vertailunäytteelle ja paikat 3–12 ovat kasvaimen RNA-näytteille.
 - b. Alla olevassa kuvassa näkyvät putkiliuskan sivunäkymä (1) ja ylänäkö (2). Putkiliuskat on lovettu epäsymmetrisesti reaktiokuoppien 1 ja 2 väliin (A) ja 8 ja 9 väliin (B) näytteiden pitämiseksi järjestyksessä käsittelyn aikana. Putkiliuskoihin on myös tehty lovimerkintä reaktiokuoppien 6 ja 7 väliin (C), jotta putkiliuskan voi leikata tarvittaessa helpommin tavallisia sentrifugisovittimia varten.

Kuva 6: Kuva lovetuista putkiliuskoista.



2. Laske RNA:n ja veden (tarvittaessa) määrä, joka on lisättävä hybridisointireaktioon jokaiselle erään kuuluvalla näytteelle.
 - a. Suositeltu RNA:n syöttömäärä on 250 ng analyysiä varten. Hyväksyttävä RNA:n syöttömäärä hybridisointia varten on 125–500 ng.
 - b. Laske RNA-näytteen määrä (mikrolitroina), joka on lisättävä hybridisointireaktioon, jakamalla haluttu näytteen syöttömäärä (esim. 250 ng) mitatulla pitoisuudella.
 - c. Jos laskettu näytteen pitoisuus on 12,5 ng/ μl - 25 ng/ μl , lisää enimmäistilavuus 10 μl .
 - d. Jos näytettä varten tarvitaan alle 10 μl , laske se veden määrä, joka tarvitaan 10 μl :n kokonaisnäytetilavuuden saavuttamiseen.

Esimerkki: Näytteelle, jonka mitattu RNA-pitoisuus on 85 ng/ μl , 2,9 μl näytettä tarvitaan 250 ng:n kokonaisuuden saamiseen ja 7,1 μl vettä tarvitaan tilavuuden saamiseksi 10 μl :aan ennen jäljellä olevien reagenssien lisäämistä. Yhtälönä: $250 \text{ ng} \div 85 \text{ ng}/\mu\text{l} = 2,9 \mu\text{l}$

Näytteen rekisteröinti ja käsittely

Käyttäjät muodostaa jokaiselle näyte-erälle yksilöllisen ajosarjan tunnuksen, joka liittyy näytetunnuksien putkiliuskojen paikkoihin (paikat 3–12) käyttämällä nCounter-analyysijärjestelmän verkkosovellusta. Käyttäjät voi tarkistaa käyttöoppaasta nCounter-analyysijärjestelmän verkkosovelluksen käyttöohjeet.

1. Jos RNA jäädytettiin ennen käyttöä, toimi seuraavasti ennen kuin jatkat:
 - a. Sulata kokonaan RNA-näytteet ja säilö ne jäihin.
 - b. Sentrifugoi sulatettua näyteputkea 1 minuutin ajan enimmäisnopeudella (yli 10 000 g) ja aseta se takaisin jäihin.
 2. Valitse sopiva Prosigna-testipaukkauksen koko testattavien potilasnäytteiden määrän mukaan (1, 2, 3, 4 tai 10). Ota sulamaan kunkin seuraavan CodeSet-sarjan reagenssin putki -80 °C:isesta pakastimesta. Säilytä reagensseja jäissä, jos et jatka heti seuraavia vaiheita.
 - a. Prosigna Reporter-reportterin CodeSet (vihreä tarra korkissa)
 - b. Prosigna Capture-sieppauskoetinten ProbeSet-sarja (harmaa tarra korkissa)
 - c. Prosigna Reference Sample -vertailunäyte (ei tarraa korkissa).
 3. Poista CodeSet-erän viivakooditarra ja testin kokoonpanokoodi CodeSet-pakkauksesta.
 4. Kirjautu IVD nCounter-analyysijärjestelmän verkkosovellukseen verkkoselainta käyttämällä ja valitse analyysityypiksi Prosigna, jotta pääset aloittamaan digitaalisten rekisteröintilomakkeiden määrittämisen.
 5. Valitse pääsivulta "Create New Run Set" (Luo uusi ajosarja).
 6. Ensimmäinen Prosigna-ajon määrittämiseksi täytettävä kenttä on Run Set ID (Ajosarjan tunnus). Syötä yksilöllinen tunnistus Run Set ID (Ajosarjan tunnus) -kenttään näyte-erän yksilöimiseksi.
 7. Lue tai syötä manuaalisesti testin kokoonpanokoodi verkkosovellukseen. Kun se on luettu tai syötetty, sen voi heittää roskin.
 8. Lue tai syötä manuaalisesti CodeSet-sarjan numero verkkosovellukseen.
 9. Syötä seuraavaksi yksilöllinen näytetunnus näytteelle, joka on kolmannessa paikassa/kuopassa putkiliuskassa, vastaavaan näytetunnuskenttään.
 - a. Syötä potilaan RNA-näytteiden tunnuksien viivakoodilukijan avulla tai syötä näytetunnukset manuaalisesti näppäimistön avulla.
 - b. Kun olet syöttänyt jokaisen näytetunnuksen, selaa vaadittuihin täytettäviin avattaviin kenttiin (kasvaimen bruttokoko ja imusolmukkeiden tila) ja täytä ne näytteelle ennen seuraavaan näytteen tietojen kirjaamista.
 - i. Käytä potilaan patologisen arvion aikana määritettyä positiivisten imusolmukkeiden määrää sopivan imusolmukeluokituksen valitsemiseen testiä varten (nolla, 1–3, > 4).
 - ii. Käytä mitattua kasvaimen bruttokokoa tai potilaan patologisen arvion aikana määritettyä sairauden vaihetta sopivan kasvaimen bruttokoon valitsemiseen testiä varten (< 2 cm tai > 2 cm).
 - c. Kaikki kommentit voi kirjoittaa valinnaiseen Memo (Muistio) -kenttään jokaiselle näytteelle.
- Huomaa:** Jos jotain putkiliuskan kuopista/paikoista ei tarvita, jätä loput kentät tyhjiksi. Jos tarvitset lisäkenttiä lisänäytteitä varten, käytä eri testikokoonpanoa, joka sallii enemmän näytteitä.
10. Kun olet saanut näytteen kirjauksen valmiiksi, määritä ketkä käyttäjät saavat seuraavat tiedot:
 - a. valmisteluaseman ja digitaalisanalysointilaitteiden ajoa koskevat tilapäivitykset
 - b. ilmoitus siitä, että loppuraportti on saatavissa.
11. Tallenna valmiiksi saatu ajosarja.
 - a. Ajosarjan laskentataulukon voi tulostaa, ja sitä voi käyttää näytteiden jäljittämiseen ja vahvistamiseen.

Hybridisointireaktion suorittaminen

Huomaa: seuraavissa vaiheissa oletetaan, että käytössä on kymmenen (10) potilasnäytettä ja kaksi (2) vertailunäytettä.

Huomaa: Älä sentrifugoi reportterin CodeSet-sarjaa yli 3 000 g:n kiihtyvyydellä tai yli 10 sekunnin ajan äläkä käytä sentrifugin pulssitoimintoa. Muutoin sentrifugi saavuttaa enimmäisnopeutensa ja voi liingota CodeSetin pois liuksesta.

1. Ohjelmoi lämpöblokki käyttämällä 30 µl:n tilavuutta, laskettua blokin ja kannen lämpötilaa ja "forever" (ikuinen) -aika-asetusta (tai vastaavaa pitoajan asetusta). Aseta lämpöblokin lämpötila 65 °C:seen ja aseta lämmitetyn kannen lämpötila 70 °C:seen.

Huomaa: seuraavissa vaiheissa on äärimmäisen tärkeää säilyttää järjestys, jossa näytteet lisätään putkiliuskaan, ja varmistaa, että niiden järjestys vastaa ajosarjan tunnusten järjestystä.

2. Merkitse toimitettu lovettu 12-kuoppainen putkiliuska niin, että paikat 1–6 erottuvat paikoista 7–12 (ks. putkiliuskan kuva).
3. Leikkaa tarvittaessa putkiliuska kahtia niin, että se sopii yhteen pienoissentrifugin putkiliuskan sovitimen kanssa.
4. Pipetoi 10 µl vertailunäytettä lovetun putkiliuskan paikkoihin 1 ja 2.
5. Pipetoi kullekin näytteelle laskettu tarvittava vesimäärä lovetun putkiliuskan vastaaviin paikkoihin.
6. Pipetoi kullekin näytteelle laskettu tarvittava RNA-määrä lovetun putkiliuskan vastaaviin paikkoihin käyttämällä jokaiselle näytteelle uutta pipetinkärkeä.
7. Kun potilasnäyte on lisätty putkiliuskaan, on suositeltavaa laittaa näyteputki näyteputkitelineeseen säilyttäen järjestys, jossa näytteet lisättiin putkiliuskaan. Näin varmistetaan, että näytteet lisättiin tarkoitettussa järjestyksessä, kun kaikki näytteet lisätään putkiliuskaan.
8. Kun kaikki näytteet on lisätty putkiliuskaan, varmista, että näytteiden järjestys pysyi samana putkiliuskassa (ajosarjan laskentataulukkoa voi käyttää näytteiden järjestyksen varmistamiseen).
 - a. Muokkaa tarvittaessa Run Set ID (Ajosarjan tunnus) -tietoa verkkosovellusohjelmistolla niin, että näytejärjestys vastaa lopullista kokoonpanoa (katso nCounter-analyysijärjestelmän käyttöoppaasta olemassa olevan ajosarjan tunnuksen muokkaamisohjeet).
9. Kun näytteiden järjestys on tarkistettu, aseta yksittäiset RNA-näyteputket takaisin jäihin.
10. Luo pääseos, joka sisältää 130 µl hybridisointipuskuria ja 65 µl reportterin CodeSet-sarjaa.

Huomaa: jos reportterin CodeSet säilöttiin jäihin, anna sen tasapainottua huoneenlämpöön 1 minuutin ajan ennen hybridisointipuskurin lisäämistä.
11. Sekoita pipetoimalla ja linkoa pääseosta hetken.

Huomaa: älä lisää sieppauskoetinten ProbeSet-sarjaa pääseokseen äläkä säilytä valmista pääseosta jäissä.
12. Pipetoi 15 µl pääseosta jokaiseen 12 kuopasta. Käytä uutta pipetinkärkeä jokaiselle kuopalle.

Huomaa: next (seuraavan) vaiheen suorittamisen jälkeen putkiliuska on laitettava lämpöblokkiin 65 °C:seen 15 minuutin kuluessa.
13. Lisää 5 µl sieppauskoetinten ProbeSet-sarjaa jokaiseen kuoppaan käyttämällä jokaiselle kuopalle uutta pipetinkärkeä.
14. Sulje putkiliuskan kuopat korkeilla ja sekoita reagensseja kääntämällä putkiliuskaa useita kertoja ja napauttamalla sitä sormella, jotta sekoitus tapahtuu täysin.
15. Linkoa putkiliuskassa olevia näytteitä hetken ajan Picofuge- tai pienoissentrifugissa (alle 3000 g:n kiihtyvyydellä).

Huomaa: käytä sellaista Picofuge-sentrifugia, johon mahtuu 12-kuoppainen putkiliuska, tai tarvittaessa sellaista pienoissentrifugia, johon mahtuvat leikatut putkiliuskat.
16. Aseta putkiliuska(t) 65 °C:seen lämpöblokkiin, jossa on kuumennettu kansi. Inkuboi hybridisointiseoksia 65 °C:ssa 15–21 tunnin ajan. Hybridisointiseokset on jätettävä 65 °C:seen odottamaan käsittelyä valmisteluasemalla.

Huomaa: Hävitä käyttämättömät CodeSetit.

Näytteiden käsittely nCounter-valmisteluasemalla

1. Etsi digitaalisanalysointilaitteeseen liittyvä valmisteluasema.
2. Ota nCounter-kasetti pois -20 °C:ssa säilytyksestä ja anna sen tasapainottua huoneenlämpöön 10–15 minuuttia foliopussissa.

Huomaa: varmista, että yhdessä käytetyt komponentit ovat samasta pakkauserästä.
3. Kun kasetti on lämmennyt huoneenlämpöön, ota se pois foliopussista ja laita sen jälkeen kasetti valmisteluaseman kansilevyille.
4. Ota nCounter-valmistelulevyt pois 4 °C:ssa säilytyksestä ja anna niiden tasapainottua huoneenlämpöön 10–15 minuutin ajan.

Huomaa: 1, 2, 3 tai 4 testin Prosigna-pakkauksella suoritettaviin ajoihin tarvitaan vain yksi valmistelulevy.
5. Sentrifugoi valmistelulevyjä 2 000 g:n kiihtyvyydellä 2 minuutin ajan ja kerää nesteet kuoppien pohjalta ennen valmistelulevyjen asettamista valmisteluaseman kansilevyille.

14. Kun saat sähköposti-ilmoituksen, ota valmiiksi saatu kasetti pois ja hävitä se laitoksesi ohjeiden mukaisesti.
- Huomaa:** Raportit luodaan sekä onnistuneesti suoritetuille ajoille että ajoille, joissa on tietojen laadunvalvontaan (QC) liittyviä virheitä. Raportteja ei luoda, jos havaitaan jokin virhe, joka ei liity tietojen laadunvalvontaan. Pyydä Veracyten asiakaspalvelulta apua tällaisessa tilanteessa.
15. Avaa ilmoitussähköpostiin liitettyä linkkiä napsauttamalla verkkosovellus ja lataa kaikki käsiteltävään RSID-tunnukseen liittyvät testiraportit.
16. Seuraavat virheet: noudata testiraportissa annettua suositusta yksittäisen näytteen tai järjestelmävirheen tapauksessa.
- Huomaa:** yksittäisten näytteiden epäonnistumista ei pidetä järjestelmävirheenä.

12 VIANMÄÄRITYS JA TESTIN EPÄONNISTUMINEN

Taulukko 7: Testin toistamista edellyttävät virhekoodit.

Virhekoodi	Virheen kuvaus	Suosittelut toimenpite
5	Lukemisen epäonnistuminen	Aja näyte uudelleen käyttämällä 250 ng RNA:ta.
7	Suuri signaali	Määritä näytteen tiedot uudelleen ja aja näyte uudelleen käyttämällä 125 ng RNA:ta.
6	Heikko signaali	Määritä näytteen tiedot uudelleen ja aja näyte uudelleen käyttämällä 500 ng RNA:ta.
30	Heikko signaali	Määritä näytteen tiedot uudelleen ja aja näyte uudelleen käyttämällä 500 ng RNA:ta.
31	Heikko RNA-signaali	Määritä näytteen tiedot uudelleen ja aja näyte uudelleen käyttämällä 500 ng RNA:ta.

Analyysin toistamisen syyt:

1. Analyysiraportissa yksilöidään epäonnistuneet näytteet eikä ilmoiteta mitään analyysituloksia. Analyysitulokset ilmoitetaan, jos näytteet hyväksytään.
2. Analyysiraportissa yksilöidään virheen tyyppi ja suositellut toimet, mikäli analyysi epäonnistuu. Epäonnistuneiden näytteiden RNA-pitoisuus voidaan mitata uudelleen ja näytteet voidaan ajaa uudelleen (osana uutta erää/RSID-tunnusta) epäonnistumisen tyyppin ja analyysituloksen saamista varten jäljelle jääneen RNA-aineksen määrän mukaan.

13 ANALYYSIN TULOKSET

Prosigna-analyysi sisältää useita laadunvalvontamittareita, joita sovelletaan jokaiseen näytteeseen analyysin aikana. Nämä mittarit arvioivat analyysin toimintaa ja määrittävät, ovatko tulokset odotettujen arvojen rajoissa. Kun näiden laadunvalvontamittarien analyysi on onnistunut, Prosigna-analyysi antaa seuraavat tulokset:

Taulukko 8: Prosigna-analyysin tulokset ja antamat tiedot.

Tulos	Antoarvot
Rintasyöpänäytteen luontainen alatyypin	Luminal A Luminal B Runsaasti HER2:ta sisältävä Basaalinen
10 vuoden kuluessa tapahtuvan etäisen uusiutumisen todennäköisyyden yksittäinen arvio	0-100 %
Risk of Recurrence (uusiutumisen riski, ROR) -tulos	Kokonaislukuarvo asteikolla 0-100
Riskiluokka	Pieni, keskitaso, suuri

13.1 Luontaiset alatyypit

Rintasyöpäkasvaimen luontaisen alatyypin on osoitettu liittyvän varhaisen vaiheen rintasyövän ennusteeseen. Potilaat, joilla on Luminal A -tyypin kasvain, saavat keskimäärin huomattavasti parempia tuloksia kuin potilaat, joilla on Luminal B- tai runsaasti HER2:ta sisältävän tai basaalisien tyyppien kasvaimia²⁵.

Luontainen alatyypin tunnistetaan vertaamalla 50 geenin geenilmentämisprofiilia tuntemattomasta näytteestä neljän luontaisen alatyypin odotettuihin ilmentämisprofiileihin. Tuntemattomalle näytteelle määritetään profiiliinsa parhaiten vastaava alatyypin.

Rintasyövän yleisimmät alatyypit ovat luminaaliset alatyypit Luminal A (LumA) ja Luminal B (LumB). Aikaisemmat tutkimukset viittaavat siihen, että rintasyövästä noin 30-40 % on Luminal A -tyyppiä ja noin 20 % Luminal B -tyyppiä⁵. Yli 90 prosentilla hormonireseptoripositiivisista potilaista on kuitenkin luminaalisia kasvaimia. Näiden alatyypin geenilmentämisprofiili muistuttaa rintakudoksen luminaalista epiteelikomponenttia⁵. Näille kasvaimille on tunnusomaista runsas estrogeenireseptorin (ER), progesteronireseptorin

(PR) ja ER:n aktivointiin liittyvien geenien, kuten LIV1:n, GATA3:n ja sykliini D1:n, ilmentyminen sekä luminaalisten sytokeratiinien 8 ja 18 ilmentyminen. Luminal A -tyypin rintasyövästä ilmentävät vähemmän solukierroon aktivointiin liittyviä geenejä verrattuna Luminal B -rintasyöpiin, joten niiden ennuste on parempi.

Aikaisemmat tutkimukset viittaavat siihen, että runsaasti HER2:ta sisältävä alatyypin (HER2-E) käsittää noin 20 % rintasyövästä⁵. Runsaasti HER2:ta sisältävät kasvaimet ovat kuitenkin yleensä ER-negatiivisia, joten vain 5 prosentilla testatuista ER-positiivisista potilaista havaittiin olevan runsaasti HER2:ta sisältävä rintasyöpä. ER-tilasta huolimatta runsaasti HER2:ta sisältävät kasvaimet HER2-positiivisia valtaosassa tapauksista, ja ne ilmentävät runsaasti ERBB2-ryvystä, mukaan lukien ERBB2 ja GRB7. Solukierroon aktivointiin liittyvät geenit ilmentyvät myös runsaasti.

Julkaistut tiedot viittaavat siihen, että basaalin alatyypin käsittää noin 20 % rintasyövästä⁵. Basaaliset kasvaimet ovat kuitenkin yleensä ER-negatiivisia, joten vain 1 prosentilla testatuista hormonireseptoripositiivisista potilaista on basaalin rintasyöpä. Basaalin alatyypin on lähes aina kliinisesti HER2-negatiivinen ja ilmentää erilaisia "basaalisia" biomarkkereita, mukaan lukien basaaliset epiteelin sytokeratiinit (CK) ja epidermin kasvutekijäreseptori (EGFR). Solukierroon aktivointiin liittyvät geenit ilmentyvät tässä alatyypissä runsaasti.

13.2 ROR-tulos

ROR-tulos on kokonaislukuarvo asteikolla 0-100, ja se liittyy yksittäisen potilaan etäisen uusiutumisen todennäköisyyteen 10 vuoden kuluessa määritetylle aiotulle käyttöpopulaatiolle. ROR-tulos lasketaan vertaamalla 46 geenin geenilmentämisprofiilia tuntemattomasta näytteestä neljän luontaisen alatyypin odotettuihin ilmentämisprofiileihin, kuten edellä on kuvattu, jotta saadaaan laskettua neljä erilaista korrelaatioarvoa. Seuraavaksi nämä korrelaatioarvot yhdistetään proliferaatiotulokseen ja kasvaimen bruttokokoon ROR-tuloksen laskemista varten.

13.3 10 vuoden kuluessa tapahtuvan etäisen uusiutumisen todennäköisyys

Kahden vaihdevuoden läpikäyneiden, hormonireseptoripositiivisista varhaisen vaiheen rintasyöpää sairastavien naisten kohortin ROR-tuloksia verrattiin eloonjääntiin ilman etäistä uusiutumista leikkauksen ja viiden vuoden endokriiniliitännäishoidon jälkeen sekä sen jälkeisen viiden vuoden tarkkailujakson jälkeen (katso lisätietoja kohdasta 16.4 – Kliininen suorituskyky). Näistä kahdesta tutkimuksesta saatiin malli, joka liittyy ROR-tuloksen etäisen uusiutumisen todennäköisyyteen tässä testatussa potilaspopulaatiossa 95 %:n luottamusväillä.

13.4 Riskiluokitus

Riskiluokitus tehdään myös, jotta ROR-tulos voidaan tulkita käyttämällä kliiniseen tulokseen liittyviä raja-arvoja testatuilla potilaspopulaatioilla.

Taulukko 9: Riskiluokitus ROR-alueen ja imusolmukkeiden tilan mukaan.

Imusolmukkeiden tila	ROR-alue	Riskiluokitus
Imusolmukenegatiiviset	0-40	Pieni
	41-60	Keskitaso
	61-100	Suuri
Imusolmukepositiiviset (1-3 solmuketta)	0-15	Pieni
	16-40	Keskitaso
	41-100	Suuri
Imusolmukepositiiviset (≥ 4 solmuketta)	0-100	Suuri

13.5 Laadunvalvonta

Jokainen Prosigna-analyysikomponenttien erä testataan käyttämällä ennalta määritettyjä ohjearvoja. Kaikki pakkaustason tuotteet on erämerkitty, ja jokaiseen erään sisältyvät kriittiset komponentit testataan yhdessä ja myydään yhdessä Prosigna-pakkauserän kanssa.

Prosigna-analyysipakkaus sisältää sarjan sisäisiä verrokkeja, joilla arvioidaan jokaisen ajosarjan laatu kokonaisuudessaan sekä kunkin näytteen laatu yksitellen. Nämä verrokot luetaan jäljempänä.

Erän verrokisarja: *In vitro* transkriboitu RNA-vertailunäyte

Syntetinen RNA-vertailunäyte sisällytetään verrokiksi Prosigna-analyysipakkaukseen. vertailunäyte koostuu *in-vitro* transkriboiduista RNA-kohteista 50 algoritmi- ja 8 ylläpitogeenistä. vertailunäyte käsitellään toistuvasti jokaisessa Prosigna-analyysijaksossa yhdessä enintään 10 tuntemattoman rintakasvaimen RNA-näytteen kanssa 12 reaktiokuopan putkiliuskassa. vertailunäytteen signaali analysoidaan ennalta määritettyihin kynnysarvoihin vertaamalla ajon laadun varmentamista varten.

Kunkin rintakasvaimen RNA-näytteen 50 algoritmigeenin signaali normalisoidaan vertailunäytteen vastaaviin geeneihin.

Positiivinen verrokkisarja: *In vitro* transkriboidut RNA-kohteet ja vastaavat sieppaus- ja reportterikoettimet

Synteettisiä RNA-kohteita käytetään positiivisina verrokkeina (Positive Control, PC) Prosigna-analysissä. PC-kohdesekvenssit saadaan External RNA Control Consortium (ERCC) -DNA-sekvenssikirjastosta⁶. RNA-kohteet transkriboidaan *in vitro* DNA-plasmideista. Analyysipakkaukseen sisältyy kuusi RNA-kohdetta nelinkertaisena titraussarjana (loppupitoisuus 128-0,125 fM hybridisointireaktiossa) yhdessä vastaavien sieppaus- ja reportterikoettimien kanssa. PC:t lisätään jokaiseen rintakasvaimen RNA-näytteeseen ja vertailunäytteeseen, jotka testataan Prosigna-analysillä. Näyte hylätään jatkoanalysistä, jos PC:n signaalinvoimakkuudet eivät täytä ennalta määritettyjä kynnysarvoja.

Negatiivinen verrokkisarja: eksogeeniset koettimet ilman kohteita

Negatiiviset verrokkikohdesekvenssit saadaan ERCC-DNA-sekvenssikirjastosta⁶. Näiden kohdesekvenssien havaitsemiseen suunnitellut koettimet sisältyvät osaksi analyysipakkausta ilman vastaavaa kohdesekvenssiä. Negatiiviset verrokkit (Negative Control, NC) lisätään laadunvalvontakeinona jokaiseen rintakasvaimen RNA-näytteeseen ja vertailunäytteeseen, jotka testataan Prosigna-analysillä. Näyte hylätään jatkoanalysistä, jos NC:n signaalinvoimakkuudet eivät täytä ennalta määritettyjä kynnysarvoja.

RNA:n eheyden verrokkisarja: ylläpitogeenit

Prosigna-pakkaukseen sisältyvät sieppaus- ja reportterikoettimet, jotka on suunniteltu havaitsemaan 8 ylläpitogeeniä ja 50 algoritmigeeniä. 8 ylläpitogeenin ilmentymistasot suositellaan laadun määrittämiseksi RNA:lle, joka on saatu FFPE-kudosnäytteestä ja jota käytetään Prosigna-analysin lähtöannoksena. Näyte hylätään jatkoanalysistä, jos ylläpitogeenien ilmentymistasot laskevat ennalta määritettyjen kynnysarvojen alapuolelle.

Ylläpitogeeniä käytetään myös normalisoimaan kaikki ehjän RNA:n määrien erot näytteessä ennen vertailunäytteen normalisointia.

14 MENETELMIEN RAJOITTEET

1. Prosigna-analyysi on optimoitu rintasyöpäkasvaimen luontaisen alatyypin sekä potilaan 10 vuoden kuluessa tapahtuvan etäisen uusiutumisen riskin tunnistamiseksi ROR-tuloksena ja riskiluokkana käyttämällä puhdistettua RNA:ta, joka on saatu formaliiniin fiksoidusta parafiniiniin upotetusta ihmisen rintakudoksesta. Muuntotyypisiä näytteitä tai fiksaatiiveja ei ole testattua, eikä niitä saa käyttää.
2. Prosigna-analyysi validoitiin käyttämällä vain tässä pakkausselosteessa esitettyjä menetelmiä. Näiden menetelmien muokaus voi muuttaa testin toimintakykyä.
3. Prosigna-analysin suorituskykyominaisuudet on määritetty vaihevuodet läpikäyneille naisille, joilla on hormonireseptoripositiivinen varhaisen vaiheen rintasyöpä, jota on hoidettu viiden vuoden ajan adjuvantilla endokriinisellä hoidolla. Suorituskykyä ei ole määritetty muiden hoito-ohjelmien kanssa tai muilla potilaspopulaatioilla.
4. Jos Analyysiin lisätään RNA:ta, jonka laatu tai määrä ei ole riittävä, Prosigna-analyysi ei välttämättä pysty antamaan kelvollista tulosta, vaan ilmoittaa sen sijaan analyysivirheestä.
5. Prosigna-analysin tulosten (luontainen alatyyppi, ROR-tulos, riskiluokka) tulkintaa on arvioitava muiden kliinisten patologisten tekijöiden, potilaan sairauskertomuksen ja muiden laboratoriotestien tulosten suhteen.
6. Prosigna-analysin suorituskyky on määritetty RNA:lla, joka vastaa ohjearvoja, jotka on määritetty edellä olevalla menetelmällä. Suorituskykyä ei ole määritetty eristetyllä RNA:lla, joka ei vastaa näitä ohjearvoja.
7. Tunnetut Prosigna-analysistä häiritsevät aineet sisältävät genomien DNA:ta ja ei-kasvainkudosta (esim. normaalia kudosta). Katso yleiset analyysiä koskevat seikat ennen menetelmän aloittamista. Patologin on tunnistettava selvästi elinkelpoisen invasiivisen syövän alue ennen menetelmän suorittamista. Lisäksi jokaista RNA-näytettä on käsiteltävä DNA:lla. Ennen potilaan testinäytteiden käyttämistä jokainen uusi DNA-erä on testattava ja hyväksyttävä annettujen ohjeiden mukaisesti käytettäessä jotain muuta eristysarjaa kuin Veracyte FFPE RNA -uuttopakkaus.

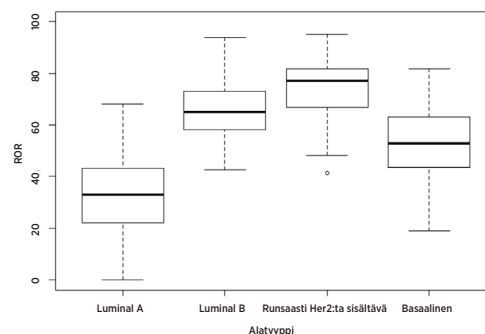
15 ODOTETUT ARVOT

Prosigna-analyysi antaa ROR-tuloksen (0–100), luontaisen alatyypin (Luminal A, Luminal B, runsaasti HER2:ta sisältävä tai basaalinen) ja riskiluokan (pieni, keskitaso tai suuri) kullekin kasvainnäytteelle. Kahden alla kuvatus klinisen validointitutkimuksen perusteella vaihevuodet läpikäyneillä naisilla, joilla oli HR-positiivinen varhaisen vaiheen rintasyöpä, jota oli hoidettu anastrolosolilla tai tamoksifeenilla ATAC- ja ABCSG-8-tutkimuksissa, esitetään odotetut ROR-tulosten alue ja esiintymistiheys (kuva 10), ROR:n jatkuva suhde etäisen uusiutumisen todennäköisyyteen imusolmukkeiden tilan mukaan (kuva 11) sekä ROR-tulosten jakauma luontaisen alatyypin mukaan (kuva 9). Näiden kliinisten validointitutkimusten perusteella kuvassa 12 (imusolmukenegatiiviset potilaat) esitetään eloonjäänti ilman etäistä uusiutumista 10 vuoden kuluessa riskiluokan mukaan ja kuvassa 13 vastaava imusolmukepositiivisille (1–3 solmuketta) potilaille.

15.1 ROR-alue alatyypin mukaan

Kuvassa 9 näkyy ROR-tulosten laatikkokuvaaja luontaisen alatyypin mukaan.

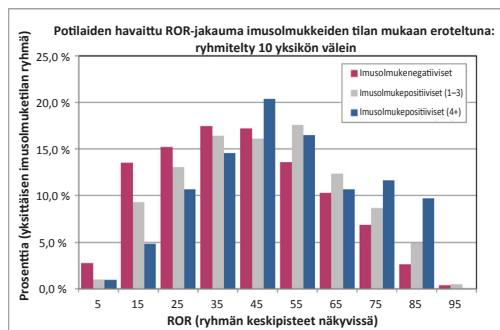
Kuva 9: ROR-tulosten laatikkokuvaaja luontaisen alatyypin mukaan.



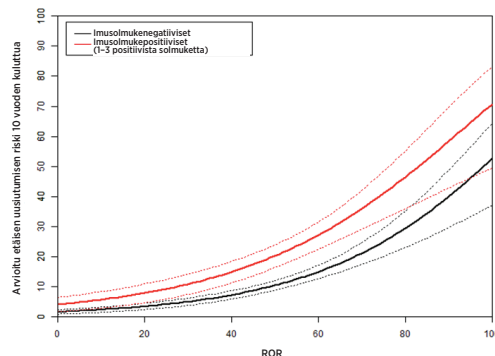
15.2 ROR-tulosten esiintymistiheys imusolmukkeiden tilan mukaan

Kuvan 10 kaavio luotiin käyttämällä yksittäistä Coxin mallia, joka sisälsi ROR-tuloksen ja kategoriset muuttujat kolmen imusolmuketartuntaisen ryhmän erottamista varten.

Kuva 10: ROR-tulosten ja imusolmukkeiden tilan mukaisten ryhmien kaavio.



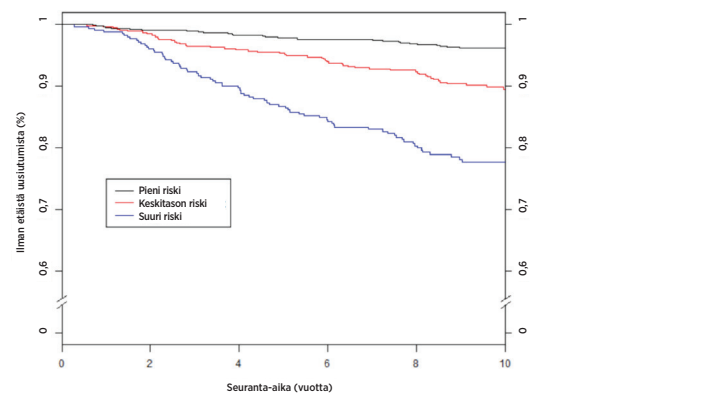
Kuva 11: Kymmenen vuoden ennustettu riski imusolmukkeiden tilan mukaisen ryhmän perusteella.



15.3 Eloönjäänti ilman sairauden etäistä uusiutumista riskiluokan mukaan

Seuraavat tiedot on saatu TransATAC- ja ABCSG-8-tutkimusten yhdistetystä analyysistä. Jotta potilaat voitiin määrittää riskiryhmiin, ROR-tuloksia verrattiin ennalta määritettyihin riskin kynnyksarvoihin imusolmukenegatiivisille tai imusolmukepositiivisille potilaille. Kuviissa 12 ja 13 näkyy eloonjäänti ilman sairauden etäistä uusiutumista (Distant Recurrence-Free Survival, DRFS) 10 vuoden kuluttua kullekin riskiluokkaryhmälle imusolmukkeiden tilan mukaan.

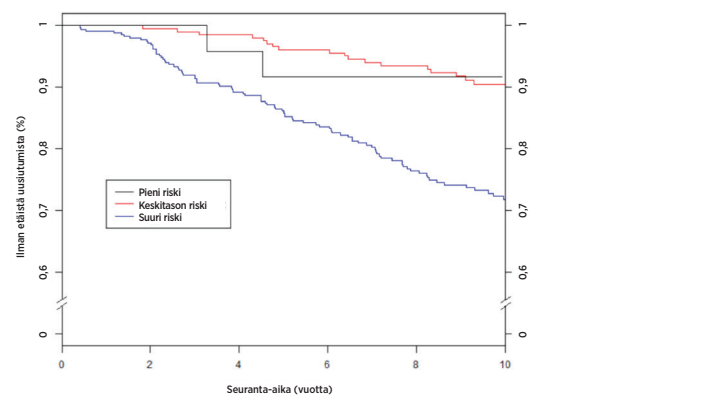
Kuva 12: DRFS riskiryhmän mukaan imusolmukenegatiivisille potilaille.



Kuvan 12 tietojen yhteenveto: DRFS riskiryhmän mukaan imusolmukenegatiivisille potilaille.

Riskiryhmä	Potilaiden lukumäärä (%)	Tapahtumien määrä 10 vuoteen saakka	Arvioitu etäiseltä uusiutumiselta välttyneiden prosenttiosuus 10 vuoden kuluttua [95 %-n luottamusväli]
Pieni	875 (49 %)	31	96,2 % [94,7–97,3 %]
Keskitaso	551 (31 %)	53	89,2 % [86,1–91,7 %]
Suuri	360 (20 %)	73	77,7 % [72,8–81,9 %]
Yhteensä	1 786 (100 %)	157	

Kuva 13: DRFS riskiryhmän mukaan imusolmukepositiivisille (1–3 solmuketta) potilaille



Kuvan 13 tietojen yhteenveto: DRFS riskiryhmän mukaan imusolmukepositiivisille (1–3 solmuketta) potilaille

Riskiryhmä	Potilaiden lukumäärä (%)	Tapahtumien määrä 10 vuoteen saakka	Arvioitu etäiseltä uusiutumiselta välttyneiden prosenttiosuus 10 vuoden kuluttua [95 %-n luottamusväli]
Pieni	24 (4 %)	2	91,7 % [70,6–97,8 %]
Keskitaso	211 (36 %)	18	90,4 % [85,2–93,9 %]
Suuri	355 (60 %)	87	71,8 % [66,3–76,6 %]
Yhteensä	590 (100 %)	107	

Taulukko 10: DRFS-osuudet 10 vuoden ajalta potilaille, joilla on vähintään 4 positiivista imusolmuketta.

Riskiryhmä	Potilaiden määrä	Tapahtumien määrä 10 vuoteen saakka	Arvioitu etäiseltä uusiutumiselta välttyneiden prosenttiosuus 10 vuoden kuluttua [95 %-n luottamusväli]
Suuri	103	39	57,4 % [46,3–67,0 %]

16 SUORITUSKYKYTIEDOT

16.1 Analyysitarkkuus ja analyysin toistettavuus

Prosigna-analyysin kokonaistarkkuuden ja toistettavuuden arvioimista varten suoritettiin kaksi tutkimusta, joiden tulokset yhdistettiin. Ensimmäinen suoritettu tutkimus oli nCounter-analysijärjestelmän tarkkuustutkimus, jossa käytettiin talteen otettua rintakasvaimen RNA:ta, ja toinen tutkimus oli toistettavuustutkimus, joka aloitettiin FFPE-rintakasvaimen kudoksesta ja joka sisälsi analyysiä edeltäviä tekijöitä.

RNA-tarkkuus

16.1.1 Tutkimusasetelma

nCounter-analysijärjestelmälle suoritettiin Prosigna-analyysiä käyttämällä kolmen tutkimuspaikan sokkoutettu ja satunnaistettu vertailututkimus, jolla arvioitiin analyttinen tarkkuus. Arkistoiduista FFPE-näytteistä luotiin viisi yhdistettyä rintakasvaimen RNA-näytettä kullakin tutkimuspaikalla testaamista varten. Näytepaneeli edusti rutiininomaisen testauksen aikana havaittuja prototyyppisiä geeni-ilmentämisprofiliileja ja kutakin riskiluokkaryhmää.

Jokainen tutkimuspaikka suoritti 18 kelpuutettua ajoa (kukin käyttäjä 9 ajoa, jokainen ajo koostui 10 testistä) niin, että kukin käyttäjä suoritti ensin tutustumisajon (taulukko 11). Jokainen näyte testattiin toistetusti jokaisessa ajossa nimellisellä 250 ng:n RNA-syöttötasolla analyysiä varten. Jokainen käyttäjä suoritti yhden ajon määrättyä päivänä pitkien ajomenetelmien hyväksytyn standardin mukaisesti⁷. Tutkimuksen kokonaistulos, tutustuminen mukaan lukien, oli yli 4 viikkoa jokaisessa tutkimuspaikassa.

Taulukko 11: RNA-tarkkuustutkimuksen yhteenveto.

Tutkimuksen muuttuja	Määrät
Rintakasvaimen RNA-näytteiden määrä	5
Näytteiden rinnakkaiskappaleiden määrä ajoa kohti (samalla kasetilla)	2
Ajojen määrä tutkimuspaikkaa kohti	18
Ajojen määrä päivää kohti	1
Käyttäjien määrä tutkimuspaikkaa kohti	2
Reagenssierien määrä tutkimuspaikkaa kohti	3
Tutkimuspaikkojen määrä	3
Tutkimuspaikkaa kohti testattujen näytteiden määrä (pois lukien tutustuminen) =	180
Näytteiden kokonaismäärä =	540

16.1.2 Varianssikomponenttien analyysi

Taulukossa 12 esitetään varianssikomponenttien analyysin tulos kaikille testaussarjan jäsenille. Arvioidun vaihtelun alapuolella on kokonaisvaihtelun prosenttiarvo (sulkeissa).

Taulukko 12: Varianssikomponentit testisarjan jäsenen mukaan (yhdistetty RNA-näyte).

Testisarjan jäsen riskin ja alatyypin mukaan	Keskimäär. ROR	Varianssikomponentti					Kokonaisvaihtelu	Keskihajonta yhteensä
		Erä	Tutkimuspaikka	Käyttäjä	Ajo	Ajon sisällä		
Pieni Luminal A	31,4	0,010 (2 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,134 (30 %)	0,296 (67 %)	0,44 (100 %)	0,66
Keskitaso Luminal B	55	0,105 (18 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,046 (8 %)	0,426 (74 %)	0,576 (100 %)	0,76
Keskitaso Basaalinen	55,4	0,059 (20 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,046 (15 %)	0,194 (65 %)	0,299 (100 %)	0,55
Suuri Luminal B	64,8	0,119 (21 %)	0,014 (2 %)	0,000 (0 %)	0,064 (11 %)	0,380 (66 %)	0,576 (100 %)	0,76
Suuri Runsaasti HER2:ta sisältävät	76,2	0,165 (37 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,277 (63 %)	0,442 (100 %)	0,66

Kokonaiskeskihajonta oli alle 1 ROR-yksikkö asteikolla 0–100 kaikkien viiden testisarjan jäsenen osalta. Kaikilla testisarjan jäsenillä suurin osa vaihtelusta aiheutui ajon sisäisestä vaihtelusta (toistettavuus). Tutkimuspaikkojen välistä vaihtelua tai käyttäjien välistä vaihtelua ei esiintynyt lähes ollenkaan. Todennäköisyysuhteen testaus tutkimuspaikan merkitsevyydelle testisarjan jäsenen mukaan osoitti, että tutkimuspaikan erot olivat tilastollisesti merkitseviä (p > 0,05). Jokaisen erän osalta keskimääräiset ROR-tulokset ovat alle 1 ROR-yksikön päässä kunkin testisarjan jäsenen osalta, mikä aiheuttaa keskimäärin noin 20 % kokonaisvaihtelusta.

16.1.3 Alatyypin hyväksynnän ja riskiluokan vastaavuus

Kaikkien testisarjan jäsenten osalta alatyypin tulos ja testisarjan jäsenen luontaisen alatyypin välillä oli 100-prosenttinen vastaavuus. Kaikilla näytteillä mitatun ja odotetun riskiryhmän välillä oli 100-prosenttinen vastaavuus.

Kudoksen toistettavuus

16.1.4 Tutkimusasetelma

nCounter-analyyisijärjestelmälle suoritettiin Prosigna-analyyysiä käyttämällä kolmen tutkimuspaikan sokkoutettu ja satunnaistettu vertailututkimus testaamalla toistettuja rintakasvainkudosnäytteitä, jotka oli otettu samasta FFPE-palasta. Osana tutkimusta testattiin 43 kpl:n sarja äskettäin rekisteröityjä FFPE-rintakasvainnäytteitä, jotka oli saatu hormonireseptoripositiivisilta rintasyöpäpotilailta, joilla oli vahvistettu olevan invasiivinen duktaalinen ja/tai lobulaarinen rintasyöpä. Kaikki kudoksenäytteet toimitettiin sopivaan testauspaikkaan käsittelyä varten. Kolme erillistä patologia arvioivat itsenäisesti nämä 43 näytettä. Jokaisen patologin arvioiman kudoksenäytteen osalta yksi käyttäjä suoritti kussakin tutkimuspaikassa testiajon, jossa tehtiin kudoksen makrodissektio, RNA-näytteenotto ja testaus Prosigna-analyyysillä käyttämällä määritettyä analyyisimenetelmää. Kunkin kudoksenäytteen eristetty RNA testattiin kaksi kertaa erillisissä analyyisijajoissa. Tämän tutkimuksen suorittamisessa käytettiin kolmea RNA-eristysarjan erää (yksi tutkimuspaikkaa kohti) ja yhtä analyyisisarjan reagenssien erää. RNA-näytteen ottamisessa käytettiin yhtä objektilasia, kun mitattu kasvaimen pinta-ala oli vähintään 100 mm², ja kolmea objektilasia, kun mitattu kasvaimen pinta-ala oli enintään 100 mm². Vaadittu kasvaimen vähimmäispinta-ala oli 4 mm².

16.1.5 Testin yhteenveto

Neljänkymmenenkolmen (43) kussakin kolmesta tutkimuspaikasta arvioidun kudoksenäytteen hyväksyntäosuus esitetään taulukossa 13.

Taulukko 13: Lämpäisyosuus kullakin tutkimuspaikalla.

Tutkimuspaikka	Tuloksen antaneiden prosenttiosuus	Lämpäisheet/yhteensä
1	95 %	41/43
2	93 %	40/43
3	100 %	43/43

Neljäkymmentä näytettä tuotti tuloksia kaikissa tutkimuspaikoissa (yhden näytteen RNA:n eristys yhdessä tutkimuspaikassa edellytti toistoa), 1 näyte tuotti tuloksen 2 tutkimuspaikassa ja 2 näytettä yhdessä tutkimuspaikassa. Sata prosenttia (100 %) kudoksen arvioinnin läpäisevistä ja RNA-eristuksen ohjearvoja vastaavista näytteistä tuotti hyväksytyjä tuloksia Prosigna-analyyysissä. Mitattu kasvaimen pinta-ala neljälle viidestä RNA-eristuksen epäonnistumisesta oli enintään 15 mm², mikä vastaa alle 50 mm²:n kudoksen kokonaispinta-alan syöttömäärää testiä varten.

Yhteensä 43 näytettä sisälsi sekä imusolmukenegatiivisilta ja imusolmukepositiivisilta potilailta. Yhteensä 43 näytteen lasketut testitulokset edustavat laajaa ROR-tulosten aluetta (94 yksikköä), kaikkia neljä luontaista alatyyppeä sekä kaikkia riskiluokkia, kun imusolmukenegatiivisia tai imusolmukepositiivisia raja-arvoja käytettiin kaikille näytteille. Kaksi näytettä, joille saatiin tulos yhdessä tutkimuspaikassa, suljettiin pois kaikista myöhemmistä tilastollisista analyyseistä, sillä tutkimuspaikkojen väliseen vertailuun ei ole saatavissa tietoja.

16.1.6 Varianssikomponenttien analyysi

Riskiluokkien välillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä ($\alpha = 0,05$) eroja käytettäessä ei-parametristä Kruskal-Wallisin testiä, joten varianssikomponenttimalli sovitettiin samanaikaisesti kaikille riskiluokille.

Taulukossa 14 esitetään varianssikomponenttien analyyisin tulokset kaikkia 41 kudoksenäytettä käyttämällä.

Taulukko 14: Varianssikomponentit (kudoksen toistettavuustutkimus).

Varianssikomponentit				Keskihajonta yhteensä
Tutkimuspaikka	Palassa	Jäännös	Yhteensä	
0,10	7,72	0,51	8,34	2,89

Tutkimuspaikkakomponentti mittaa systemaattista tutkimuspaikkojen välistä vaihtelua, "Within Block" ("palassa") -komponentti mittaa satunnaisvaihtelua, joka eroaa kudoksenäytteen arvioinnin/käsittelyn seurauksena tai FFPE-palan sisäistä vaihtelua, ja jäännösvaihtelu määrittää yhdistetyn ajojen välisen vaihtelun ja ajon sisäisen vaihtelun

Prosigna-analyyysissä. Tutkimuspaikkakomponentti on hyvin pieni suhteessa satunnaisvaihteluun palan sisällä, mikä viittaa siihen, että tutkimuspaikkojen väliset erot olivat keskimäärin mitättömiä (alle 1 % kokonaisvaihtelusta). Jäännösvaihtelu oli yhdenmukainen vastaavan RNA-tarkkuustutkimuksessa (jossa oli vähemmän näytteitä, mutta enemmän toistomittauksia) mitatun vaihtelun kanssa (varianssi 0,51 verrattuna keskimääräiseen yhteen paikkaan Prosigna-reagenssierän varianssin, 0,39, rajoissa RNA-tarkkuustutkimuksen tapauksessa).

Taulukossa 15 on kokonaisvaihtelun yhteenveto, joka on laadittu käyttämällä kudosten käsittelyn vaihtelun summaa (paikka- ja palan sisäiset komponentit tämän tutkimuksen taulukosta 14) sekä RNA:n käsittelyn kokonaisvaihtelua RNA-tarkkuustutkimuksesta (keskiarvotettu taulukon 12 viiden tutkimusmuuttujan kesken). Kudoksen käsittelyyn liittyvät analyyysiä edeltävät tekijät ovat testin vaihtelun ensisijainen lähde (94 % kokonaisvaihtelusta). Kokonaiskeskihajonta, joka sisältää kaikki vaihtelun lähteet, on 2,9, mikä viittaa siihen, että Prosigna-analyyysi mittaa luotettavasti kahden ROR-arvon välisen eron, 6,75, 95 %-luottamusväleillä.

Taulukko 15: Kokonaisvaihtelu (kudoksen ja RNA:n käsittely).

Kudoksen käsittelyn vaihtelu	RNA:n käsittelyn vaihtelu	Kokonaisvaihtelu	Keskihajonta yhteensä
7,82	0,47	8,29	2,9

16.1.7 Riskiluokan ja alatyypin luokitusten välinen vastaavuus

Paikkojen välinen vastaavuus potilasalaryhmän ja riskiluokan (pieni/keskitaso/suuri riski) mukaan esitetään taulukossa 16, jossa vastaavia imusolmukenegatiivisten ja imusolmukepositiivisten luokkien riskiraja-arvoja käytettiin kaikille näytteille. Täsmällisen tyyppin 95 %-luottamusvälit esitetään hakasulkeissa ja näytteiden määrä sekä tulokset kummallakin paikalla sulkeissa. Keskimääräinen vastaavuus esitetään viimeisessä sarakkeessa. Vastaavuus laskettiin kahdessa vaiheessa jokaista vertailua varten. Ensinnä laskettiin jokaiselle kudoksenäytteelle neljän mahdollisen yhtäpitävän tulosparin (kaksi tutkimuspaikassa 1* ja kaksi tutkimuspaikassa 2) osuus. Toisessa vaiheessa näille osuuksille laadittiin keskiarvot kaikilta tuloksenäytteiltä, joille saatiin tulokset kummaltakin tutkimuspaikalta määritetyssä vertailussa.

Taulukko 16: Alatyypin ja riskiluokan vastaavuuden yhteenveto imusolmukkeiden tilan mukaan.

Vertailutyyppi	Parittainen vastaavuus			Keskimääräinen vastaavuus
	Paikka 1 vs. paikka 2 (n = 40)	Paikka 1 vs. paikka 3 (n = 41)	Paikka 2 vs. paikka 3 (n = 40)	
Alatyyppi	96,3 % [86,4–99,5 %]	98,8 % [91,0–100 %]	95 % [83,1–99,3 %]	97 %
Riskiluokka	87,5 % [73,2–95,8 %]	92,7 % [80,1–98,4 %]	90 % [76,4–97,2 %]	90 %
Imusolmukenegatiiviset				
Riskiluokka	88,8 % [75,9–96,0 %]	92,7 % [80,1–98,4 %]	91,3 % [79,2–97,4 %]	91 %
Imusolmukepositiiviset				

Kussakin vertailussa (alatyyppi ja imusolmukenegatiiviset ja imusolmukepositiiviset riskiluokat) keskimääräinen paikkojen välinen vastaavuus oli vähintään 90 %. Missään näytteissä riskiluokkaa ei muuttanut pieniriskisestä suuririskiseen (tai päinvastoin) tutkimuspaikkojen välillä tai sisällä. Ainoastaan kaksi näytettä (41:stä) ei antanut täsmälleen sama alatyypiluokitusta kaikkien kuuden toiston kesken:

1. Toisella näytteellä oli kaksi Luminal A -tulosta yhdellä tutkimuspaikalla ja kaksi Luminal B -tulosta kummallakin kahdesta muusta tutkimuspaikasta.
2. Toisella näytteellä oli kaksi Luminal A -tulosta yhdellä tutkimuspaikalla, kaksi runsaasti HER2:ta sisältävän tyyppin tulosta toisella tutkimuspaikalla ja sekä Luminal A- että runsaasti HER2:ta sisältävän tyyppin tulos kolmannella tutkimuspaikalla.

16.2 Herkkyys ja RNA-syöttö

RNA:n syöttötutkimuksen kuvaus

Tutkimuksessa testattiin 13 rintakasvaimen RNA-näytettä kolmella RNA:n syöttötasolla analyyisin ohjearvojen rajoissa (500, 250 ja 125 ng) ja kahdella ylimääräisellä RNA:n syöttötasolla ohjearvojen ulkopuolella (625, 62,5 ng). Jokaisen pakkauserän (yhteensä 2 erää) jokainen näyte testattiin yhdessä testiajossa toistamalla mittaukset kahteen kertaan kullakin tasolla ohjearvojen rajoissa ja tekemällä yhden mittauksen kullakin tasolla ohjearvojen ulkopuolella. Kuhunkin testiajoon sisällytettiin toistetut sokkomittaukset (ilman kohdetta). Yksittäinen näyte testattiin vain yhdellä erällä.

RNA:n syöttötutkimuksen tulokset

Kaikki mitatut sokkonäytteet (n = 46) olivat selvästi kynnysarvon alapuolella signaalin osalta ja aiheuttivat hylätyn testituloksen (0 %:n hyväksyntäosuus). Kaikki analyysin ohjearvojen sisällä olevat kasvaimen RNA:n mittaukset (n = 138) tuottivat hyväksytyin testituloksen (100 %:n hyväksyntäosuus). Sata prosenttia (100 %) näytteistä, joiden syöttö ylitti ohjearvon (625 ng), antoi läpäisevän testituloksen. Kahdeksankymmentäkolme prosenttia (83 %) ohjearvon (62,5 ng) alittavalla syöttötasolla testatuista näytteistä (10/12) tuotti erässä 1 testituloksen, joka vastasi 100-prosenttisesti erää 2.

13 näytteen keskimääräinen ROR-tulos käsitti laajan alueen (20–82). Riskiryhmäluokka (pieni/keskitaso/suuri) oli 100-prosenttisesti yhtäpitävä kaikilla RNA:n syöttötasoilla 13 testatun näytteen osalta. Taulukkoon 17 on koottu ROR-tuloksen vaihtelu RNA-syötön funktiona. Keskimääristä ROR-tulosten eroa RNA:n syöttötasojen välillä, näiden erojen keskihajontaa sekä 90 %:n luottamusväliä käytettiin sen arvioimiseen, vastasivatko eri RNA-syöttötasoilta saadut ROR-tulokset 250 ng:n kohdetasoa käyttämällä luotuja tuloksia. Jotta hyväksyntäehto täyttyi, luottamusväli oli sisällyttävä kokonaan arvolla (–3,3 ROR). Analyysin määrittelyalueen ääripäissä olevilla kahdella tasolla (125 ja 500 ng RNA:ta), ROR-tulokset vastasivat kohdesyöttöpitoisuuden 250 ng tuloksia kummallakin kahdesta testatusta pakkauksen erästä. Kummallakin tasolla analyysin määritettyjen pitoisuuksien ulkopuolella ROR-tulokset vastasivat toista eristä, mutteivät toista.

Taulukko 17: ROR-tulosten erojen yhteenveto. Lukumäärä vastaa analyysiin sisällytettujen näytteiden määrää.

Pakkauserä	Massa (ng)	Määrä	Keskimääräinen ROR-ero	Eron keskihajonta	Alempi luottamusraja	Ylempi luottamusraja
20535	62,5–250	10	1,90	2,62	0,54	3,26
	125–250	12	0,75	1,23	0,16	1,34
	500–250	12	0,04	0,78	–0,33	0,41
	625–250	12	–0,13	0,86	–0,53	0,28
20536	62,5–250	11	–0,36	3,96	–2,33	1,60
	125–250	11	–0,50	3,07	–2,02	1,02
	500–250	11	–0,82	3,25	–2,43	0,79
	625–250	11	–1,09	4,24	–3,19	1,01

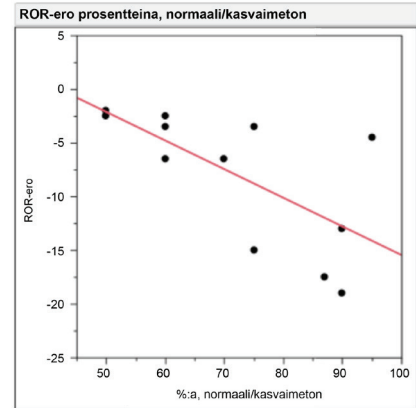
16.3 Häiriötestaus

Viereinen normaali/ei-kasvainkudos

Viereistä normaalia/ei-kasvainkudosta on yleisesti FFPE-rintakasvainpaloissa, ja tällaisen kudoksen voi tunnistaa patologin arvioinnissa muusta invasiivisesta rintasyövästä erillisenä alueena. Edellä kuvattu Prosigna-analysimenetelmä määrittää viereisen normaalin kudoksen poistamisen makrodissektiolla. Normaalin kudoksen testitulosten vääristämisvaikutuksen arviointia varten yhteensä 13 FFPE-rintakasvainpalaa, jotka sisälsivät patologisesti vahvistetun kudokseen levinneen duktaalisen rintasyövän, ja noin 50–95 % ympäröivästä normaalista/ei-kasvainkudoksesta testattiin suorittamalla makrodissektio ympäruskudokselle ja ilman makrodissektiota, ja ROR-tulosten ero (ROR-ero) määritettiin.

Makrodissektoidun kasvainnäytteen keskimääräinen ROR oli lähes 8 ROR-yksikköä suurempi kuin silloin, kun normaalia/ei-kasvainkudosta ei poistettu. Kuvassa 14 havainnollistetaan, että kun normaalin kudoksen määrä lisääntyy (enintään 95 prosenttia ei poisteta makrodissektiolla), samalla kasvaa sen riski, että ilmoitettu ROR-tulos on aliarvio tai poikkeaa alaspäin (enintään –19 ROR-yksikköä) potilaan uusiutumisen riskin pistemääräarviosta.

Kuva 14: Normaalin/ei-kasvainkudoksen vaikutus ROR-eroon.



Nekroottisen, hemorragisen ja DCIS-kudoksen aiheuttama häiriö

Nekroottisen/hemorragisen/DCIS:n aiheuttaman testitulosten vääristymisvaikutuksen arviointia varten yhteensä 11 FFPE-rintakasvainpalaa (3 DCIS-tapausta, 5 nekroottista ja 3 hemorragista), jotka sisälsivät patologisesti vahvistetun invasiivisen rintasyövän, ja noin 10–30 % häiriön aiheuttavasta kudoksesta testattiin suorittamalla makrodissektio häiriön aiheuttavalle kudokselle ja ilman makrodissektiota, ja ROR-tulosten ero (ROR-ero) määritettiin. Testatuilla tasoilla menetelmään sisältyneen veren/verenvuodon, DCIS:n ja nekroottisen kudoksen vaikutus ilmoitettuun ROR-tulokseen oli mitätön (alle 6 ROR-yksikköä). Riskiluokan määrittämisessä oli 100-prosenttinen vastaavuus yhdentoista nekroottisen, hemorragisen ja DCIS-näytteen osalta makrodissektion kanssa ja ilman sitä.

Ihmisen genom DNA

Prosigna-analysimenetelmä sisältää ihmisen genom DNA:n (gDNA) poiston DNaseI-digeroinnilla. gDNA:n aiheuttaman testitulosten vääristämisriskin arviointia varten yhteensä kymmenen (10) FFPE-rintakasvainpalaa, jotka sisälsivät patologisesti vahvistetun kudokseen levinneen duktaalisen rintasyövän, testattiin sekä poistamalla ihmisen genom DNA että poistamatta sitä jättäen DNAasi-vaiheen pois menetelmästä. Testattujen näytteiden keskimääräinen ROR-tulos oli 4–5 yksikköä pienempi pienen ja keskitason riskin ryhmissä, kun gDNA poistettiin DNAasi I:llä (katso taulukko 18). Kun näytteitä, joita ei käsitelty DNAasilla, käsiteltiin sen jälkeen DNAasi I:llä (jälkikäsitellyt), ROR-tulokset vastasivat arvoja, jotka havaittiin alun perin tutkimusmenetelmään kuuluvassa DNAasi -käsitelyssä. Riskinä on, että ilmoitettu ROR-tulos on yliarvio tai poikkeaa ylöspäin (enintään 7 ROR-yksikköä) potilaan uusiutumisen riskin pistemääräarviosta gDNA:n läsnä ollessa. Lisäksi DNAasi I -käsitelystä pois jääneiden näytteiden laskettu signaali oli merkitsevästi (p < 0,05) pienempi kuin niillä, jotka oli käsitelty DNAasi I:llä. Tämä johtui häiriöstä absorbanssilukemassa, jolla kvantifioitiin RNA:n määrä ennen Prosigna-analysissä testaamista.

Taulukko 18: DNAasi-käsittelyn vaikutus ROR-tulokseen kasvainnäytteistä.

ROR Luokka	Testatut FFPE-näytteet	ROR-ero DNAasi I:n kanssa - ilman DNAasi I:tä			ROR-ero DNAasi I:n kanssa - ilman DNAasi I:tä (jälkikäsitellyt)		
		Keskiarvo	Min.	Maks.	Keskiarvo	Min.	Maks.
Pieni	3	–4,0	–6,0	–1,0	0,7	–1,0	3,0
Keskitaso	2	–4,5	–7,0	–2,0	1,0	0,0	2,0
Suuri	5	0,4	–1,0	2,0	0,4	–1,0	1,0

16.4 Kliininen suorituskyky

Rintasyöpää ennustavan geeniallekirjoituksen Prosigna-analyysi validoitiin kahdella kliinisellä validointitutkimuksella. Kummankin tutkimuksen ensisijainen tavoite oli validoida julkaistut havainnot siitä, että uusiutumisen riskin tulos (Risk of Recurrence, ROR) antaa lisää ennustetietoja liittyen eloonjääntiin ilman sairauden etäistä uusiutumista 10 vuoden kuluessa tavanomaisiin kliinisiin muuttujiin nähden ja niiden lisäksi. Lisäksi kummankin tutkimuksen toissijainen tavoite oli vahvistaa aiemmat havainnot siitä, että Luminal A- ja Luminal B -potilailla on tilastollisesti merkitsevästi erilainen eloonjäänti ilman sairauden etäistä uusiutumista 10 vuoden kuluttua. Koska näiden kahden tutkimuksen sisällytys ehdot ja tulokset olivat samanlaisia, molemmat tietokannat yhdistettiin, ja ne analysoitiin taannehtivasti määritetyllä analyysisuunnitelmalla, jonka tavoitteet olivat samat kuin yksittäisillä tutkimuksilla.

Yhdistetty analyysi: Riskikuvaajien luominen käyttämällä Prosigna-analyysin yhdistettyjä tuloksia TransATAC- ja ABCSG-8-tutkimuksista.

Alla on hoidon ja kliinisten ominaisuuksien yhdistetyn analyysin yhteenveto. Yksittäiset tutkimusasetelmat ja analyysitiedot ovat tutkimuksia 1 ja 2 käsittelevissä kohdissa.

Analyyysi

Taulukko 19: Hoidon ja kliinisten ominaisuuksien yhteenveto tutkimusten 1 ja 2 yhdistetyssä analyysissä.

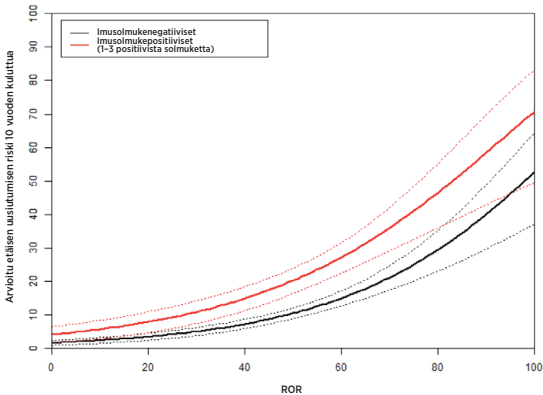
Ominaisuus	Arvo	Imusolmukenegatiiviset (n = 1 786)		1-3 positiivista solmuketta (n = 590)		≥ 4 positiivista solmuketta (n = 103)	
		Trans ATAC (n = 739)	ABCSG8 (n = 1 047)	Trans ATAC (n = 208)	ABCSG8 (n = 382)	Trans ATAC (n = 54)	ABCSG8 (n = 49)
Hoito	Jokin anastrotsoli	377 (51,0 %)	528 (50,4 %)	102 (49,0 %)	184 (48,2 %)	31 (57,4 %)	25 (51,0 %)
	Vain tamoksifeeni	362 (49,0 %)	519 (49,6 %)	106 (51,0 %)	198 (51,8 %)	23 (42,6 %)	24 (49,0 %)
Laatu	G1	169 (22,9 %)	210 (20,1 %)	39 (18,8 %)	54 (14,1 %)	3 (5,6 %)	7 (14,3 %)
	G2/GX	438 (59,3 %)	837 (79,9 %)	122 (58,7 %)	328 (85,9 %)	37 (68,5 %)	42 (85,7 %)
	G3	132 (17,9 %)	0 (0 %)	47 (22,6 %)	0 (0 %)	14 (25,9 %)	0 (0 %)
Kasvaimen koko	≤ 1 cm	122 (16,5 %)	219 (20,9 %)	13 (6,2 %)	37 (9,7 %)	3 (5,6 %)	2 (4,1 %)
	1–2 cm	420 (56,8 %)	568 (54,3 %)	83 (39,9 %)	193 (50,5 %)	15 (27,8 %)	18 (36,7 %)
	2–3 cm	157 (21,2 %)	213 (20,3 %)	77 (37,0 %)	122 (31,9 %)	18 (33,3 %)	23 (46,9 %)
	< 3 cm	40 (5,4 %)	47 (4,5 %)	35 (16,8 %)	30 (7,9 %)	18 (33,3 %)	6 (12,2 %)
HER2-tila	Negatiivinen	649 (87,8 %)	984 (94,0 %)	186 (89,4 %)	367 (96,1 %)	47 (87,0 %)	46 (93,9 %)
	Positiivinen	90 (12,2 %)	63 (6,0 %)	22 (10,6 %)	15 (3,9 %)	7 (13,0 %)	3 (6,1 %)
Uusiutumiset	Etäiset	79 (10,7 %)	91 (8,7 %)	50 (24,0 %)	64 (16,8 %)	31 (57,4 %)	10 (20,4 %)
	Mikä tahansa	117 (15,8 %)	121 (11,6 %)	59 (28,4 %)	73 (19,1 %)	34 (63,0 %)	10 (20,4 %)
NanoStringin luontainen alatyyppe	Luminal A	529 (71,6 %)	725 (69,2 %)	127 (61,1 %)	248 (64,9 %)	31 (57,4 %)	31 (63,3 %)
	Luminal B	176 (23,8 %)	284 (27,1 %)	68 (32,7 %)	118 (30,9 %)	20 (37 %)	16 (32,7 %)
	Basaalinen	7 (0,9 %)	6 (0,6 %)	2 (1,0 %)	2 (0,5 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
	Runsaasti HER2:ta sisältävä	27 (3,7 %)	32 (3,1 %)	11 (5,3 %)	14 (3,7 %)	3 (5,6 %)	2 (4,1 %)

Kummassakin tutkimuksessa oli hoitoaara, jossa annettiin 5 vuotta tamoksifeeniä. TransATAC-tutkimuksessa toinen tutkimushaara koostui viiden vuoden anastrotsolihoitosta, kun taas ABCSG-8-tutkimuksen toisessa haarassa annettiin 2 vuotta tamoksifeeniä ja sen jälkeen 3 vuotta anastrotsolia. Kun etäinen uusiutuminen (Distant Recurrence (DR)) mallinnettiin kaikkien kliinisten ja hoitomuuttujien funktiona, hoito ei parantanut merkittävästi ($p = 0,66$) DR-ennustetta. Näiden tutkimusten muut pääerot olivat se, että TransATAC-tutkimukseen sisällytettiin potilaat, joilla oli asteen 3 kasvaimet, ja että kokonaisuusiutuminen oli suurempi TransATAC-tutkimuksessa kuin ABCSG-8-tutkimuksessa.

Tulokset

Kuvassa 15 näkyy DR:n 10 vuoden riski ROR-tuloksen funktiona 95 %:n luottamusväleillä perustuen erillisiin Coxin suhteellisten vaarojen malleihin kullekin imusolmukenegatiivisistä ja -positiivista (1–3 positiivista solmuketta) potilasryhmistä.

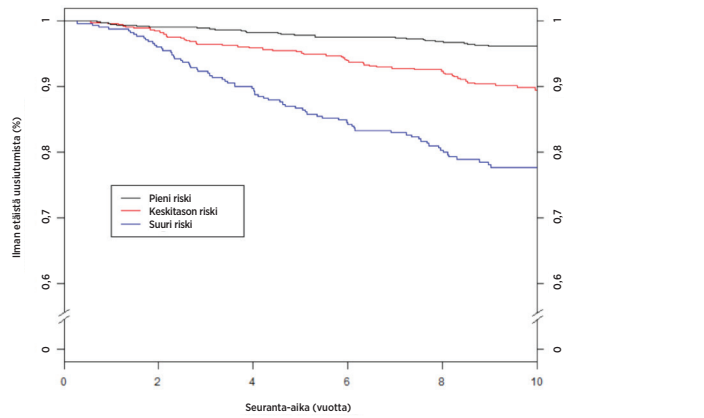
Kuva 15: Kymmenen vuoden arvioitu DR-riski imusolmukkeiden tilan mukaan 95 %:n luottamusväleillä.



Kuvassa 16 esitetään Kaplan-Meier- ja esiintymistiheyden kuvaajat riskiryhmän mukaan imusolmukenegatiivisille potilaille, ja kuvassa 17 esitetään samat

kuvaajat imusolmukepositiivisille (1–3 solmuketta) potilaille. Kummassakin kuvassa esitetään näytekokoja, tapahtumien määrää ja etäiseltä uusiutumiselta 10 vuoden kuluttua välttyneiden arvioitua prosenttiosuutta koskevat tiedot riskiryhmän mukaan. Imusolmukepositiivisten potilaiden ryhmässä oli vain muutamia potilaita, jotka kuuluivat ennalta määritettyihin pienen riskin ryhmiin ja jotka aiheuttivat luottamusvälin Kaplan-Meierin kuvaajaan ja siten erittäin laajan arvion 10 vuoden DRFS:stä.

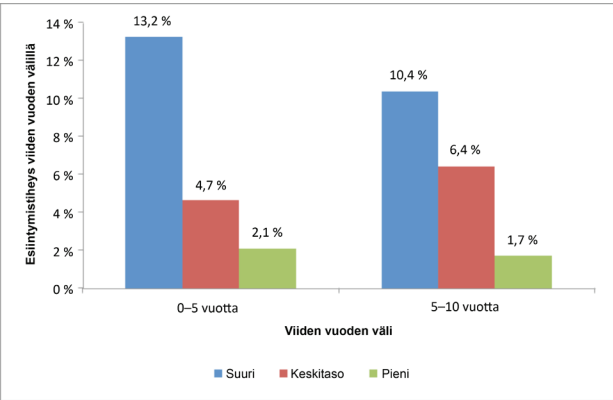
Kuva 16A: DRFS riskiryhmän mukaan imusolmukenegatiivisille potilaille.



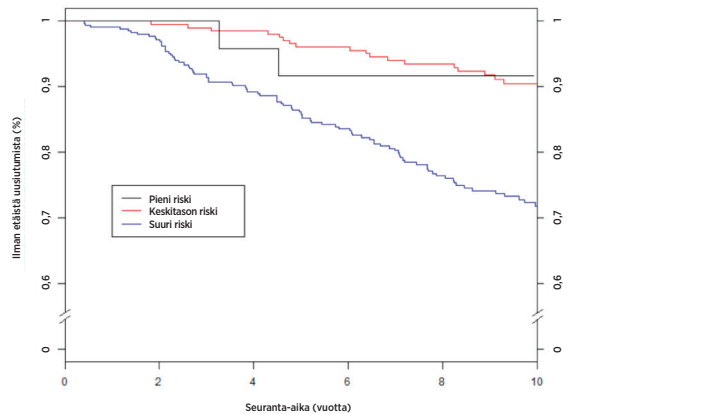
Kuvan 16A tietojen yhteenveto: DRFS riskiryhmän mukaan imusolmukenegatiivisille potilaille.

Riskiryhmä	Potilaiden lukumäärä (%)	Tapahtumien määrä 10 vuoteen saakka	Arvioitu etäiseltä uusiutumiselta välttyneiden prosenttiosuus 10 vuoden kuluttua [95 %:n luottamusväli]
Pieni	875 (49 %)	31	96,2 % [94,7–97,3 %]
Keskitaso	551 (31 %)	53	89,2 % [86,1–91,7 %]
Suuri	360 (20 %)	73	77,7 % [72,8–81,9 %]
Yhteensä	1 786 (100 %)	157	

Kuva 16B: Esiintymistiheys riskiryhmän mukaan imusolmukenegatiivisille potilaille viiden vuoden välein.



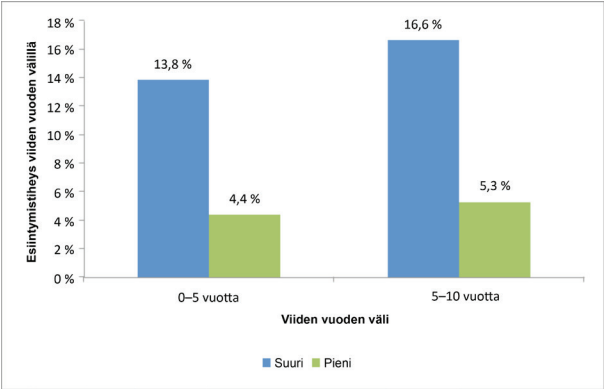
Kuva 17A: DRFS riskiryhmän mukaan imusolmukepositiivisille potilaille, joilla on 1–3 positiivista solmuketta.



Kuvan 17A tietojen yhteenveto: DRFS riskiryhmän mukaan imusolmukepositiivisille potilaille, joilla on 1–3 positiivista solmuketta.

Riskiryhmä	Potilaiden lukumäärä (%)	Tapahtumien määrä 10 vuoteen saakka	Arvioitu etäiseltä uusiutumiselta välttyneiden prosenttiosuus 10 vuoden kuluttua [95 %-n luottamusväli]
Pieni	24 (4 %)	2	91,7 % [70,6–97,8 %]
Keskitaso	211 (36 %)	18	90,4 % [85,2–93,9 %]
Suuri	355 (60 %)	87	71,8 % [66,3–76,6 %]
Yhteensä	590 (100 %)	107	

Kuva 17B: Esiintymistiheys riskiryhmän mukaan imusolmukepositiivisille (1–3 solmuketta) potilaille viiden vuoden välein.



Kuvassa 17B, koska pienen riskin imusolmukepositiivisten ryhmässä oli vain 24 potilasta, joilla oli 2 tapahtumaa, nämä potilaat on yhdistetty keskitason riskin potilaiden kanssa myöhäisen uusiutumisen analyysiä varten.

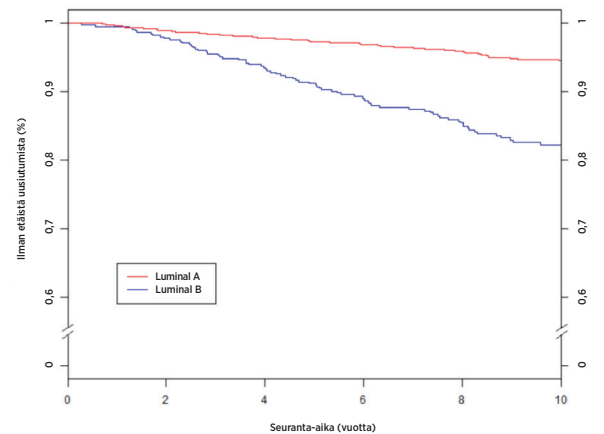
Kaikki yhdistetyn tietokannan 103 potilasta, joilla on vähintään neljä positiivista solmuketta, luokitellaan suuririskiseksi. Taulukossa 20 esitetään kymmenen vuoden DRFS-osuudet näille potilaille.

Taulukko 20: DRFS-osuudet 10 vuoden ajalta potilaille, joilla on vähintään 4 positiivista imusolmuketta.

Riskiryhmä	Potilaiden määrä	Tapahtumien määrä 10 vuoteen saakka	Arvioitu etäiseltä uusiutumiselta välttyneiden prosenttiosuus 10 vuoden kuluttua [95 %-n luottamusväli]
Suuri	103	39	57,4 % [46,3–67,0 %]

Suurin osa yhdistettyjen tutkimusten tutkittavista (96 %) oli joko Luminal A- tai Luminal B -tyyppiä. Kuvassa 18 näkyy DRFS-arvojen vertailu luminaalisen alatyypin mukaan imusolmukenegeetiivisille potilaille.

Kuva 18: Kaplan-Meierin kuvaajat DRFS:lle luontaisen alatyypin mukaan imusolmukenegeetiivisille potilaille.

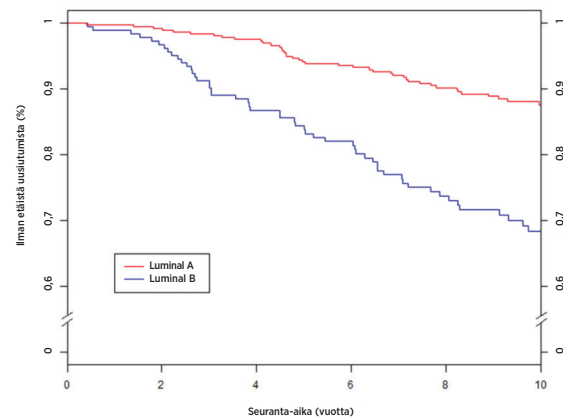


Kuvan 18 tietojen yhteenveto: Kaplan-Meierin kuvaajat DRFS:lle luontaisen alatyypin mukaan imusolmukenegeetiivisille potilaille.

Riskiryhmä	Potilaiden määrä	Tapahtumien määrä 10 vuoteen saakka	Arvioitu etäiseltä uusiutumiselta välttyneiden prosenttiosuus 10 vuoden kuluttua [95 %-n luottamusväli]
Luminal A	1254	62	94,6 [93,1–95,8]
Luminal B	460	75	81,9 [77,7–85,3]
Yhteensä	1 714	137	

Kuvassa 19 näkyy sama vertailu imusolmukepositiivisille potilaille, joilla on 1–3 positiivista solmuketta. Kummassakin ryhmässä DRFS-arvojen välillä oli huomattavia eroja Luminal A- ja Luminal B -potilaiden välillä.

Kuva 19: Kaplan-Meierin kuvaajat DRFS:lle luontaisen alatyypin mukaan imusolmukepositiivisille, joilla on 1–3 positiivista solmuketta.



Kuvan 19 tietojen yhteenveto: Kaplan-Meierin kuvaajat DRFS:lle luontaisen alatyypin mukaan imusolmukepositiivisille, joilla on 1–3 positiivista solmuketta.

Riskiryhmä	Potilaiden määrä	Tapahtumien määrä 10 vuoteen saakka	Arvioitu etäiseltä uusiutumiselta välttyneiden prosenttiosuus 10 vuoden kuluttua [95 %-n luottamusväli]
Luminal A	375	41	87,6 [83,5–90,8]
Luminal B	186	52	68,3 [60,4–75,0]
Yhteensä	561	93	

Yhdistetyssä tietokannassa oli vain 98 luminaalisen alatyypin potilasta, joilla oli vähintään neljä positiivista solmuketta. Taulukossa 21 näkyvät kymmenen vuoden DRFS-osuudet näille potilaille, joilla on myös paljon suurempi riski kuin jos heillä on Luminal B -alatyypin.

Taulukko 21: DRFS-osuudet 10 vuoden ajalta potilaille, joilla on vähintään 4 positiivista imusolmuketta, luminaalisen alatyypin mukaan.

Riskiryhmä	Potilaiden määrä	Tapahtumien määrä 10 vuoteen saakka	Arvioitu etäiseltä uusiutumiselta välttyneiden prosenttiosuus 10 vuoden kuluttua [95 %-n luottamusväli]
Luminal A	62	17	68,3 [53,6–79,3]
Luminal B	36	20	38,0 [21,4–54,5]
Yhteensä	98	37	

Myöhäisen uusiutumisen analyysi

Aiemmin kuvatuissa yhdistetyissä analyysitiedoissa, tapahtumien esiintymismäärät kussakin ryhmässä eivät ole muuttumattomia 10 vuoden aikavälillä, kuten kuvista 16B ja 17B nähdään. Jotta etäisen uusiutumisen myöhäisen uusiutumisen ajanjaksona voitiin ymmärtää paremmin, sellaisten potilaiden alaryhmälle suoritettiin taannehtiva post-hoc-analyysi edellä kuvattujen yhdistettyjen tietojen suhteen, joilla ei esiintynyt etäistä uusiutumista viiden vuoden kuluessa (yhteensä 2 163 potilasta⁹). Näistä 1 065 oli imusolmukenegeetiivisia potilaita ja 488 imusolmukepositiivisia potilaita (1–3 positiivista imusolmuketta). Kummankin imusolmukeryhmän osalta x-akselin alla olevat arvot viiden vuoden jälkeen kuvissa 20 ja 21 osoittavat riskiryhmän mukaisen potilasmäärän viiden vuoden kuluttua eli niiden potilaiden määrän, jotka kelpaavat myöhäisen uusiutumisen analyysiin.

Taulukossa 22 on yhteenveto hoidosta ja kliinisistä ominaisuuksista myöhäisen uusiutumisen analyysin imusolmukenegeetiivisille sekä imusolmukepositiivisille (1–3 solmuketta) potilaille.

Taulukko 22: Hoidon ja kliinisten ominaisuuksien yhteenveto etäisen uusiutumisen analyysiä varten.

Ominaisuus	Arvo	Imusolmukenegatiiviset (n = 1 605)		Imusolmukepositiiviset (1-3 solmuketta) (n = 488)	
		ABCSG8 (n = 944)	TransATAC (n = 661)	ABCSG8 (n = 311)	TransATAC (n = 177)
Hoito	Jokin anastrotsoli	480	346	153	89
	Vain tamoksifeeni	464	315	158	88
Laatu	Hyvä	192	158	46	36
	Keskitaso	752	394	265	105
	Heikko	0	109	0	36
Kasvaimen koko	≤ 1 cm	204	116	35	11
	1-2 cm	526	376	165	74
	2-3 cm	183	139	90	64
	> 3 cm	31	30	21	28
HER2-tila	Negatiivinen	888	590	300	157
	Positiivinen	56	71	11	20
Uusiutumiset	Etäiset	41	40	28	29
	Mikä tahansa	71	78	37	37
NanoStringin luontainen alatyypit	Luminal A	674	488	218	112
	Luminal B	245	150	87	54
	Basaalinen	4	5	0	1
	Runsaasti HER2:ta sisältävä	21	18	6	10

Ensisijaisena tavoitteena oli pystyä arvioimaan ROR-tuloksen kyky toimia merkityksellisenä lisäennustetietona DRFS:ää varten tavanomaisiin kliinisiin muuttujiin (CTS) nähden ja niiden lisäksi vuosien 5 ja 10 välillä. Pelkästä CTS:stä koostuvaa nollamalla verrattiin vaihtoehtoiseen malliin, joka koostuu CTS:stä ja ROR:sta; vertailussa käytettiin todennäköisyssuhde (LR) -testiä. ROR lisäsi tilastollisesti merkitseviä tietoja viiden vuoden jälkeisen DRFS:n osalta tavanomaisiin kliinisiin muuttujiin nähden ja niiden lisäksi kaikkien potilaiden osalta (p < 0,0001) sekä imusolmukenegatiivisten (p < 0,0001) ja imusolmukepositiivisten (1-3 imusolmuketta) potilaiden (p < 0,0001) osalta.

Taulukossa 23 on yhteenveto vaarasuhteista 10 pisteen muutokselle yhden muuttujan analyysin sekä monen muuttujan analyysin perusteella (jos huomioitiin sekä ROR-tulos että CTS). ROR-tuloksen vaarasuhteet ovat kaikissa tapauksissa tilastollisesti arvosta 1 eroavia CTS-oikaisun jälkeenkin. C-indeksit esitetään myös taulukossa 22. Kummankin ryhmän osalta C-indeksi oli huomattavan erilainen kuin arvo ilman tietoja, joka oli 0,5.

Taulukko 23: Myöhäisen uusiutumisen testauksen yhteenveto.

Positiivisten imusolmukkeiden määrä	N	Vaarasuhde: 10 pisteen ROR-tuloksen muutos		C-indeksi 95 %:n luottamusvälein		
		Yhden muuttujan analyysi	Monen muuttujan analyysi	C-indeksi	Alempi	Ylempi
0	1 605	1,38 [1,23-1,54]	1,29 [1,15-1,46]	70,1 %	64,7 %	75,5 %
1-3	488	1,43 [1,25-1,63]	1,34 [1,16-1,53]	71,1 %	64,0 %	78,3 %

Suurin osa kahden tutkimuksen potilaista oli HER2-negatiivisia. Taulukossa 24 esitetään HER2-tilan jakauma imusolmukenegatiivisille sekä imusolmukepositiivisille (1-3 solmuketta) naisille. Kummankin ryhmän osalta yli 90 % tutkimukseen osallistuneista naisista oli HER2-negatiivisia.

Taulukko 24: HER2-tilan jakauma positiivisten imusolmukkeiden määrän mukaan.

Potilaiden alaryhmä	HER2-tila		Yhteensä
	Negatiivinen	Positiivinen	
Imusolmukenegatiiviset potilaat	1 478 (92,1 %)	127 (7,9 %)	1 605
Imusolmukepositiiviset potilaat, joilla on 1-3 positiivista solmuketta	457 (93,6 %)	31 (6,4 %)	488

Taulukossa 25 vertaillaan monen muuttujan mallia, joka on sovitettu kaikille tietyn imusolmukeryhmän potilaille, sekä mallia, joka on sovitettu kaikille ryhmään kuuluville HER2-negatiivisille potilaille. Mitään tilastollisesti merkitseviä eroja ei ole.

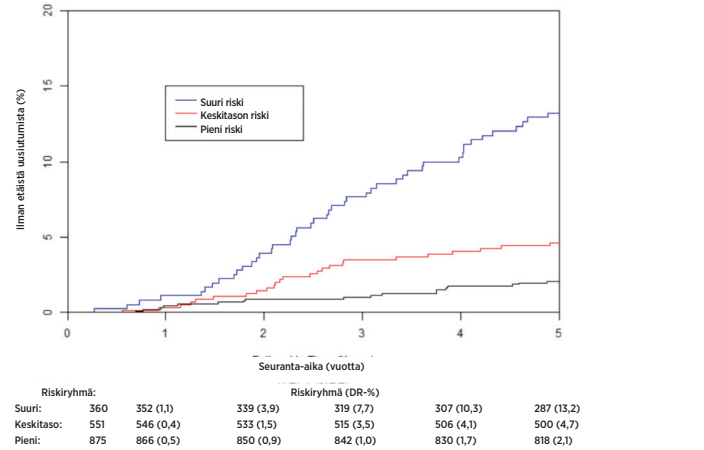
Taulukko 25: Monen muuttujan vaarasuhteet 10 pisteen ROR-tuloksen muutokselle: kaikki alaryhmän potilaat verrattuna alaryhmän HER2-negatiivisiin potilaisiin.

Positiivisten imusolmukkeiden määrä	Kaikki potilaat [95 %:n luottamusväli]	HER2-negatiiviset potilaat [95 %:n luottamusväli]
Imusolmukenegatiiviset potilaat	1,29 [1,15-1,46]	1,35 [1,19-1,54]
Imusolmukepositiiviset potilaat, joilla on 1-3 positiivista solmuketta	1,34 [1,16-1,53]	1,29 [1,11-1,50]

Vertailuariskiryhmien kesken kuvataan tarkemmin kuvissa 20 ja 21, joissa esitetään varhaisen ja myöhäisen etäisen uusiutumisen esiintymistiheyden kuvaajat, jotka on laadittu riskiryhmäkohtaisesti vastaavasti imusolmukenegatiivisille ja imusolmukepositiivisille (1-3 solmuketta) potilaille. Esiintymistiheyden kuvaajat kattavat varhaisen uusiutumisen jakson (ensimmäiset 5 vuotta) ja myöhäisen uusiutumisen jakson (5-10 vuotta diagnoosin jälkeen). Kummassakin kuvassa heti x-akselin alapuolella ovat riskiryhmään kuuluvien naisten määrä sekä kumulatiivinen esiintymisosuus. Kuvien alla olevissa yhteenvetotaulukoissa esitetään kumulatiivisen etäisen uusiutumisen osuuden luottamusväli 5 tai 10 vuoden jälkeen niille naisille, joilla ei esiintynyt etäistä uusiutumista 5 vuoden hoidon päättymisen jälkeen. Kuvassa 21 esitettyjen imusolmukepositiivisten (1-3 solmuketta) potilaiden osalta pienen ja keskitason riskin ryhmät on yhdistetty, sillä pienen riskin ryhmän potilaita oli hyvin vähän.

Pienen riskin potilasryhmällä on alhainen uusiutumisen todennäköisyys vuosien 5 ja 10 välillä viiden vuoden endokriinihoidon jälkeen, kuten kumulatiivisen esiintymistiheyden kuvaajat ja kunkin riskiryhmän vastaavat vaarasuhteet osoittavat. Sitä vastoin keskitason ja suuren riskin potilailla on pysyvä etäisen uusiutumisen riski viiden vuoden endokriinihoidon jälkeen. Keskitason ja suuren riskien imusolmukenegatiivisten potilaiden tulosten ero määritetään ensimmäisten viiden vuoden ajalta (etäisen uusiutumisen osuus = 13,2 % [9,6-16,7 %] suuren riskin ryhmässä ja 4,7 % [2,9-6,4 %] keskitason riskin potilailla), ja sitä jatketaan 10 vuoteen saakka. Keskitason ja suuren riskin ryhmien esiintymisosuudet viiden vuoden endokriinihoidon jälkeen ovat kuitenkin hyvin samankaltaiset.

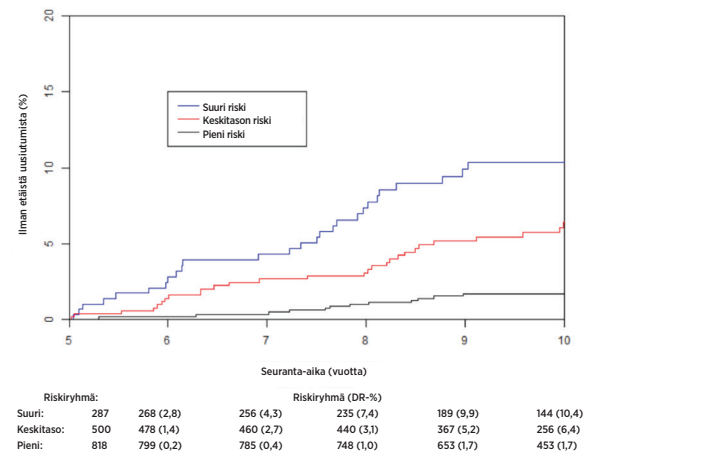
Kuva 20A: Etäisen uusiutumisen esiintymistiheyden kuvaajat riskiryhmäkohtaisesti 0-5 vuoden välillä: imusolmukenegatiiviset potilaat.



Kuvan 20A tietojen yhteenveto: Etäisen uusiutumisen esiintymistiheyden kuvaajat riskiryhmäkohtaisesti 0-5 vuoden välillä: imusolmukenegatiiviset potilaat.

Etäisen uusiutumisen osuudet riskiryhmäkohtaisesti viiden vuoden hoidon päättymiseen saakka [95 %:n luottamusväli]		
Suuri	Keskitaso	Pieni
13,2 % [9,6-16,7 %]	4,7 % [2,9-6,4 %]	2,1 % [1,1-3,1 %]

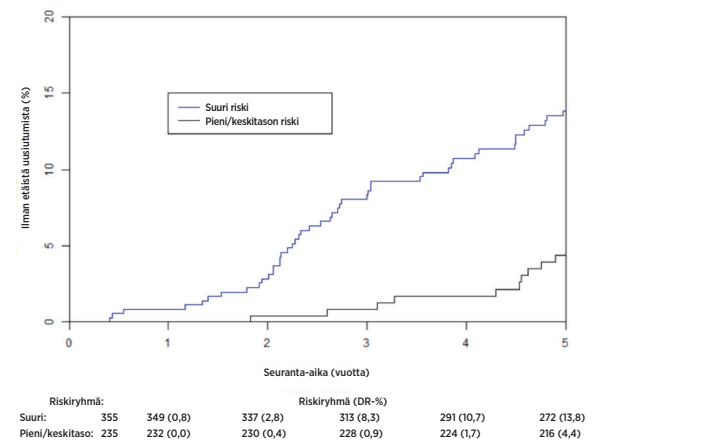
Kuva 20B: Etäisen uusiutumisen esiintymistiheyden kuvaajat riskiryhmäkohtaisesti 5-10 vuoden välillä: imusolmukenegatiiviset potilaat.



Kuvan 20B tietojen yhteenveto: Etäisen uusiutumisen esiintymistiheyden kuvaajat riskiryhmäkohtaisesti 5-10 vuoden välillä: imusolmukenegatiiviset potilaat.

Etäisen uusiutumisen osuudet viisi vuotta hoidon päättymisestä ilman etäistä uusiutumista [95 %:n luottamusväli]		
Suuri	Keskitaso	Pieni
10,4 % [6,6–14 %]	6,4 % [4,1–8,7 %]	1,7 % [0,8–2,6 %]

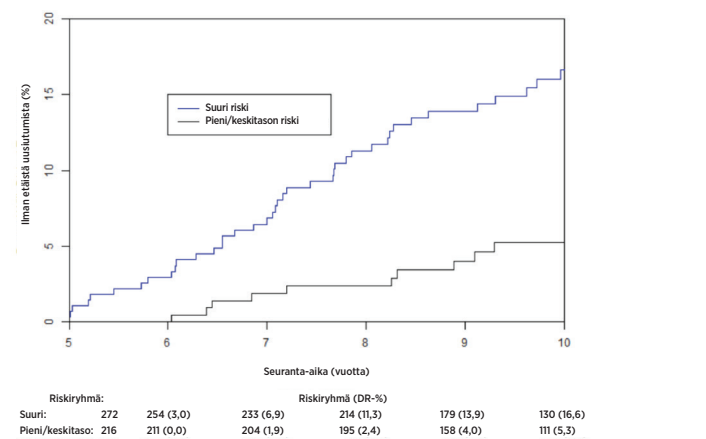
Kuva 21A: Etäisen uusiutumisen esiintymistiheyden kuvaajat riskiryhmäkohtaisesti 0-5 vuoden välillä: imusolmukepositiiviset (1-3 solmuketta) potilaat.



Kuvan 21A tietojen yhteenveto: Etäisen uusiutumisen esiintymistiheyden kuvaajat riskiryhmäkohtaisesti 0-5 vuoden välillä: imusolmukepositiiviset (1-3 solmuketta) potilaat.

Etäisen uusiutumisen osuudet riskiryhmäkohtaisesti viiden vuoden hoidon päättymiseen saakka [95 %:n luottamusväli]	
Suuri	Pieni/keskitaso
13,8 % [10,1–17,4 %]	4,4 % [1,7–7,0 %]

Kuva 21B: Etäisen uusiutumisen esiintymistiheyden kuvaajat riskiryhmäkohtaisesti 5-10 vuoden välillä: imusolmukepositiiviset (1-3 solmuketta) potilaat.



Kuvan 21B tietojen yhteenveto: Etäisen uusiutumisen esiintymistiheyden kuvaajat riskiryhmäkohtaisesti 5-10 vuoden välillä: imusolmukepositiiviset (1-3 solmuketta) potilaat.

Etäisen uusiutumisen osuudet viisi vuotta hoidon päättymisestä ilman etäistä uusiutumista [95 %:n luottamusväli]	
Suuri	Pieni/keskitaso
16,6 % [11,7–21,3 %]	5,3 % [2,0–8,4 %]

Yhdistetyn analyysin johtopäätökset

ROR-tuloksen osoitettiin antavan huomattavasti lisää ennustetietoja myöhäisen uusiutumisen ajanjaksona 5-10 vuotta diagnoosin jälkeen sekä tavanomaisiin kliinisiin muuttujiin nähden ja niiden lisäksi yhdistetyssä tutkimuksessa sellaisten potilaiden osalta, joilla ei esiintynyt etäistä uusiutumista viiden vuoden kuluessa. Kun käytettiin lähtötilanteessa kullekin imusolmukemäärän suhteen olevalle potilasryhmälle määritettyjä riskiryhmiä, näiden riskiryhmien osoitettiin luokittelevan kaikki potilaat ryhmiin, joilla oli huomattavan erilaiset myöhäisen etäisen uusiutumisen riskit. Sekä jatkuvilla että ROR-tuloksen perustuvilla riskiryhmäanalyyseillä osoitettiin olevan samankaltainen ennustevoima eri alaryhmien osalta. Mitään merkittäviä eroja ei havaittu tulosten välillä käytettäessä HER2-negatiivisia potilaita ja kaikkia potilaita.

Sekä TransATAC- että ABCSG-8-tutkimuksessa ROR:n oli osoitettu antavan merkittävästi lisää ennustetietoja tavallisiin kliinisiin ja hoitomuuttujiin nähden sekä jatkuvana mittarina käytettynä että kolmea ennalta määritettyä riskiryhmää käyttämällä sisällytettynä. Näiden kahden tutkimuksen riskiprofiilit olivat erilaiset siinä mielessä, että tapahtumien osuus oli paljon suurempi TransATAC-tutkimuksessa kuin ABCSG-8-tutkimuksessa: tämä käy ilmi vertaamalla DRFS:ää (%) kirjallisuudessa ilmoitetuissa ATAC-tutkimuksen (90,8 %) ja ABCSG8-tutkimuksen (92,5 %) verrokkihaaroissa^{9,10}. Tässä analyysissä yhdistettiin näiden kahden tutkimuksen tiedot yhtäläisiin painokertoimin, jotta saatiin riskiprofiilit, joiden odotetaan olevan yleistettävissä paremmin muihin potilaspopulaatioihin kuin yksittäisten tutkimusten tulokset.

Tutkimus 1: Etäisen uusiutumisen riskin ennustaminen vaihdevuodet läpikäyneillä naisilla, joilla on imusolmukenegatiivinen tai imusolmukepositiivinen, hormonireseptoriposiitivinen varhaisen vaiheen rintasyöpä, joita hoidettiin Arimidexillä tai tamoksifeenillä: TransATAC-tutkimus.

Tutkimusasetelma

Kliininen validointitutkimus suunniteltiin vahvistamaan se, että uusiutumiskisken tulos (Risk of Recurrence, ROR) antaa lisää ennustetietoja liittyen eloonjääntiin ilman sairauden etäistä uusiutumista (Distant Recurrence-Free Survival, DRFS) tavanomaisiin kliinisiin muuttujiin nähden ja niiden lisäksi käytettäessä kaikkia saatavissa olevia potilasnäytteitä. Tässä tutkimuksessa käytettiin RNA:ta, joka on eristetty FFPE-rintakasvainkudoksesta sellaisten potilaiden alaryhmistä, jotka osallistuivat ATAC-tutkimukseen¹¹. ATAC-tutkimukseen osallistui 9 366 potilasta kolmesta eri hoitohaarasta (1:1:1), joissa potilaat satunnaistettiin saamaan viiden vuoden ajan endokriinihoitoa 1 mg:lla anastrotsolia (eli Arimidexia) sekä tamoksifeenilumelääkettä, 20 mg tamoksifeenia sekä anastrotsolilumelääkettä tai tamoksifeenin ja Arimidexin yhdistelmää. Yhdistelmähoitoryhmän hoito lopetettiin alustavan analyysin jälkeen, sillä ei havaittu tehokkuus- tai siedettävyysetuja pelkkään tamoksifeeniin nähden. Äskettäin ATAC-tutkimuksen monoterapiahaarojen 10 vuoden mediaaniseurannan ilmoitettiin täyttävän FDA:n päivitettyä turvallisuus- ja tehokkuustietoja koskevat vaatimukset⁹. Hormonireseptoriposiitivisten potilaiden osalta DFS (HR = 0,86), RFS (HR = 0,79) ja DRFS (HR = 0,85) parantuivat huomattavasti tässä analyysissä anastrotsolia saaneilla potilailla verrattuna tamoksifeenia saaneisiin. Absoluuttiset erot eloonjäännissä ilman etäistä uusiutumista anastrotsolin ja tamoksifeenin välillä lisääntyivät ajan mittaan: se oli 2,7 % 5 viiden vuoden jälkeen ja 4,3 % 10 vuoden jälkeen. TransATAC-projekti aloitettiin vuonna 2002 TA/01-tutkimussuunnitelman mukaisesti tarkoituksena perustaa kudospankki taannehtivasti ATAC-potilaiden arkistoiduista histopatologisista FFPE-paloista¹¹.

4 160 hormonireseptoriposiitivista rintasyöpää sairastavalta naiselta saatiin yhteensä 2 006 kasvainpalaa, ja ne satunnaistettiin ATAC-tutkimuksen monoterapiahoitohaarihin. Näistä FFPE-paloista 1 372 kerättiin isobritannialaisilta potilailta, ja ne sisälsivät riittävästi invasiivista kasvainta Genomic Health® Oncotype Dx® -testillä tehtävää analyysiä varten¹². Oncotype Dx Recurrence Score® (RS) -uusiutumispistemäärä määritettiin FFPE-paloista, ja tutkimuksen tulokset vahvistivat kliinisesti RS:n käyttökelpoisuuden arvioitaessa eloonjääntiä ilman etäistä uusiutumista HR-positiivisilta, vaihdevuodet läpikäyneiltä rintasyöpäpotilailta, joita oli hoidettu anastrotsolilla tai tamoksifeenilla. Oncotype Dx -tutkimuksen jäljelle jäänyt RNA toimitettiin Royal Marsden -sairaalaan Lontoon, jonne se säilöttiin -70 °C:seen. Yhteensä 1 017 Oncotype Dx -tutkimuksen potilaalla oli jäljellä yli 500 ng RNA:ta, ja NanoString testasi heidän RNA:nsa osana NanoStringin kliinistä validointitutkimusta.

Tässä tutkimuksessa käytettiin luontaisia alatyyppejä, jotka oli luotu analyysillä, ja arvioitiin ROR-tuloksen kaksi versiota käyttämällä ennalta määritettyä peräkkäistä lähestymistapaa. Nämä kaksi erilaista ROR-tulosta, joista kummankin arvo oli 0–100, laskettiin käyttämällä joko kaikkia aiemmin julkaistuja 50 testigeeniä² tai 46 geeniin alaryhmää. Kummassakin tapauksessa kertoimet laskettiin Coxin mallista, joka sisälsi Pearson-korrelaation 50 tai 46 geeniin, joita käytettiin kunkin luontaisen alatyypin, proliferaatiotuloksen ja kasvaimen bruttokoon laskemiseen. Kaikki analyysit suoritettiin 10 vuoden seurantatiedoille.

Ensisijainen päätetapahtuma oli eloonjäänti ilman etäistä uusiutumista (Distant Recurrence-Free Survival, DRFS). Tämä määritettiin ajaksi, joka kului diagnoosista etäiseen uusiutumiseen tai rintasyövän aiheuttamaan kuolemaan. Toissijainen päätetapahtuma oli eloonjäänti ilman uusiutumista (Recurrence-Free Survival, RFS). Tämä määritettiin ajaksi, joka kului diagnoosista ensimmäiseen uusiutumiseen (paikalliseen, alueelliseen tai etäiseen) tai rintasyövän aiheuttamaan kuolemaan.

Coxin suhteellisten riskien (Proportional Hazards, PH) monimuuttujamallit sovitettiin, jotta voitiin arvioida ensisijainen tavoite peräkkäisillä ROR-testeillä 50 ja 46 geeniin perustuen. Tämä malli sisälsi tavanomaiset kliiniset kovariaatit (ikä, kasvaimen laatu, kasvaimen koko, imusolmukkeiden tila, liitännäishoito). Tämän jälkeen tehtiin Coxin mallin sovitus, ja todennäköisyysuhteen testillä testattiin, lisäksi ROR tilastollisesti merkitsevästi ($\alpha = 0,05$) ennustetietoja kliiniseen hoitotulokseen (Clinical Treatment Score, CTS) nähden ja sen lisäksi. CTS on kliinisen tutkijan kehittämien kliinis-patologisten tekijöiden optimoitu yhdistelmä, jota käytetään tavanomaisen patologian mittarina². Ensisijaiset analyysit toistettiin eri potilasalaryhmille (kaikki, imusolmukenegatiiviset, imusolmukepositiiviset tai vain HER2-negatiiviset) ja päätetapahtumille (DRFS tai RFS).

Kullekin imusolmukenegatiiviselle ja imusolmukepositiiviselle potilaalle käytettiin Coxin malleja (pois lukien CTS) 10 vuoden DR-riskin ennustamiseen ROR:n funktiona. Näiden mallien ennustusten perusteella kolmeksi riskiryhmäksi määritettiin seuraavat:

- Pieni riski:
- alle 10 %:n mahdollisuus etäiseen uusiutumiseen 10 vuoden kuluessa.
- Keskitaso riski:
- 10–20 %:n etäisen uusiutumisen riski 10 vuoden kuluessa.
- Suuri riski:
- yli 20 %:n mahdollisuus etäiseen uusiutumiseen 10 vuoden kuluessa.

Analyyysi

Kullekin riskiryhmälle laadittiin Kaplan-Meierin kuvaajat. Ensisijaisessa analyysissä kuvatut todennäköisyysuhteiden testit (käytetään kahden tilastollisen mallin sovituksen vertailuun) suoritettiin Genomic Healthin Oncotype Dx -testille (RS, Recurrence Score eli uusiutumispistemäärä) ja päätutkijan immunohistokemiallispohjaiselle testille (IHC4). Näitä tuloksia verrattiin ROR:lle saatuihin, jotta voitiin määrittää, missä määrin kukin pisteytysjärjestelmä antaa lisää ennustetietoja CTS:ään nähden ja sen lisäksi. IHC4-tuloksia ei käsitellä tässä tarkemmin, sillä niitä on vaikea vertailla muihin analyysihin siitä syystä, että IHC4-testimallia säädettiin käyttämällä TransATAC-tutkimuksen tietoja.

Taulukko 26: Potilastietojen ja kliinisten ominaisuuksien yhteenveto.

Ominaisuus	Nykyinen tutkimus (n = 1 007)		Alkuperäinen tutkimus, josta RNA saatiin (n = 1 231)	ATAC:n yhden lääkeaineen hoitoaarat, joita ei sisällytetty (n = 2 929)
	Potilaiden määrä	Potilaiden %-osuus		
Imusolmukkeiden tila				
Negatiivinen	701	70 %	71 %	68 %
Positiivinen	268	27 %	25 %	25 %
Tuntematon	38	4 %	4 %	7 %
Kasvaimen koko				
≤ 1 cm	138	14 %	67 %	70 %
1–2 cm	523	52 %		
2–3 cm	253	25 %	33 %	30 %
< 3 cm	93	9 %		
Kasvaimen laatu				
Hyvä	213	21 %	27 %	25 %
Keskitaso	601	60 %	57 %	59 %
Heikko	193	19 %	16 %	17 %
Ikä				
Keskiarvo	64,4 v.		64,3	66,1

Taulukko 27: Muut kliiniset ominaisuudet.

Ominaisuus	Potilaiden määrä	%:a potilaista
Alatyyppi		
Basaalinen	9	1 %
Runsaasti sisältävä HER2:ta	41	4 %
Luminal A	692	69 %
Luminal B	265	26 %
Hoito		
Anastrotsoli	513	51 %
Tamoksifeeni	494	49 %
Uusiutumiset		
Mikä tahansa	210	21 %
Etäiset	160	16 %
HER2-tila		
Negatiivinen	888	88 %
Positiivinen	119	12 %

Tulokset

Ensisijaisen analyysin testaus osoitti, että ROR-tulos antaa lisää ennustetietoja arvioitaessa eloonjääntiä ilman sairauden etäistä uusiutumista tavanomaisiin kliinisiin muuttujiin (CTS) nähden ja niiden lisäksi. Kaikki seuraavassa esitetyt ilmoitetut ROR-tiedot perustuvat 46 geeniin, sillä Prosigna-analyysin antamat ROR-tulokset perustuvat niihin.

Taulukko 28: ROR:n testaus ensisijaisella analyysillä.

Nollamalli	Vaihtoehtoinen malli	Δ LR χ^2	χ^2 :n p-arvo
CTS	CTS + ROR	34,21	p < 0,0001

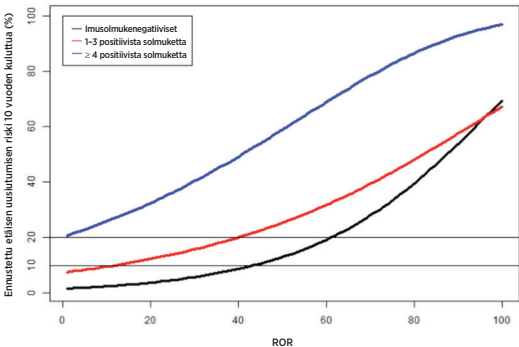
Toissijaiset analyysit osoittivat, että ROR liittyy merkitsevästi eloonjääntiin ilman etäistä uusiutumista ja antaa lisää ennustetietoja CTS:ään nähden useissa kliinisesti asiaankuuluviissa alaryhmissä.

Taulukko 29: Ensisijaisen analyysitestauksen toistaminen ennalta määritetyille alaryhmille.

Tutkittavien ryhmä	Päätetapahtuma	Potilaiden määrä	Tapahtumien määrä	CTS + ROR vs. CTS	
				Δ LR χ^2	χ^2 :n p-arvo
Kaikki	DRFS	1007	160	34,2	< 0,0001
	RFS	1007	210	31,2	< 0,0001
HER2-negatiiviset	DRFS	888	131	28,9	< 0,0001
	RFS	888	179	26,9	< 0,0001
Imusolmukenegatiiviset	DRFS	739	79	25,0	< 0,0001
	RFS	739	117	21,5	< 0,0001
Imusolmukepositiiviset	DRFS	268	81	9,3	0,0023
	RFS	268	93	10,6	0,0011
HER2-negatiiviset imusolmukenegatiiviset	DRFS	649	62	24,6	< 0,0001
	RFS	649	98	20,8	< 0,0001

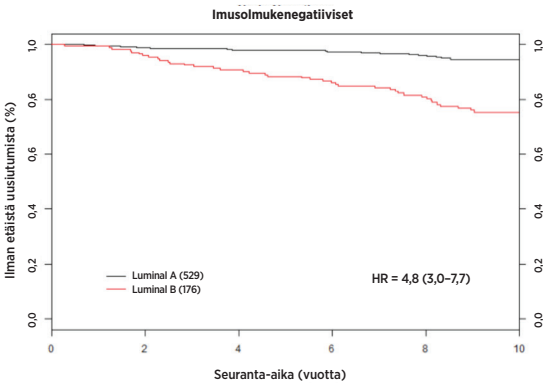
Ensisijainen ja toissijainen analyysi osoittivat, että ROR liittyy jatkuvasti DRFS:ään kaikilla potilailla ja kaikissa alaryhmissä.

Kuva 22: Ennustettu etäisen uusiutumisen riski 10 vuoden kuluttua arvioituna ROR-tuloksen analyysillä imusolmukkeiden tilan mukaisessa ryhmässä.

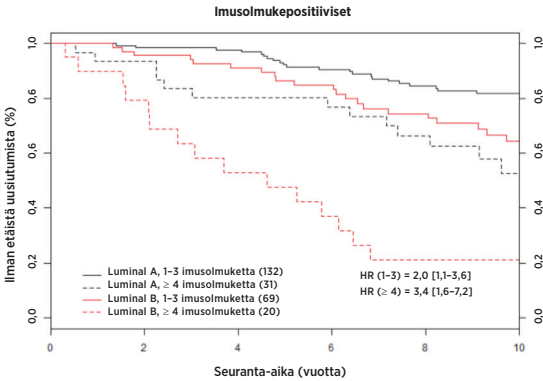


Toissijaiset analyysit osoittavat, että Luminal A- ja Luminal B -alatyyppien tulokset olivat tilastollisesti merkitsevästi erilaisia kussakin imusolmukkeiden tilan mukaan määritetyssä potilaiden alaryhmässä.

Kuva 23: Kaplan-Meierin kuvaajat DRFS:lle imusolmukenegatiivisille potilaille luontaisen alatyypin mukaan.

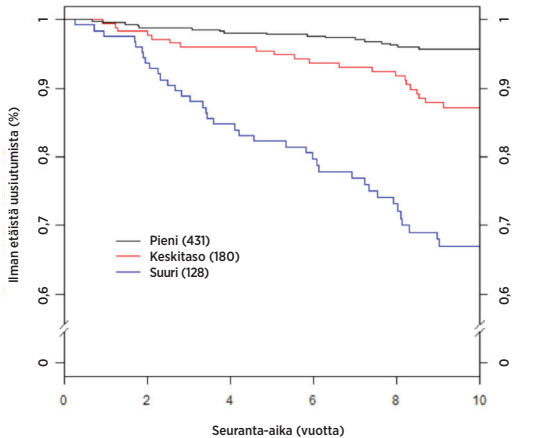


Kuva 24: Kaplan-Meierin kuvaajat DRFS:lle imusolmukepositiivisille potilaille luontaisen alatyypin mukaan.



Kuvissa 25 ja 26 osoitetaan, että kussakin imusolmukeluokassa pieniriskisiksi ennustettujen potilaiden absoluuttinen kliininen riski oli huomattavasti erilainen kuin korkeariskisiksi ennustettujen potilaiden absoluuttinen kliininen riski: pieniriskisiksi ennustettujen potilaiden havaittu 10 vuoden DR-osuus oli alle 10 %, kun taas suuririskisten tapauksessa havaittu 10 vuoden DR-osuus oli yli 30 %.

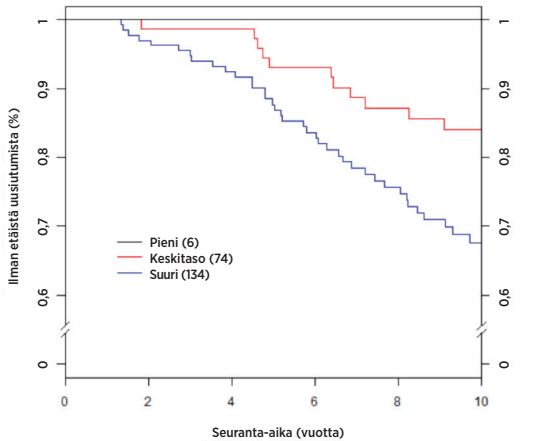
Kuva 25: DRFS riskiryhmän mukaan imusolmukenegatiivisille potilaille, pois lukien CTS.



Kuvan 25 tietojen yhteenveto: DRFS riskiryhmän mukaan imusolmukenegatiivisille potilaille, pois lukien CTS.

Riskiryhmä	Potilaiden lukumäärä (%)	Tapahtumien määrä	Arvioitu etäiseltä uusiutumiselta välttyneiden prosenttiosuus 10 vuoden kuluttua [95 %:n luottamusväli]
Pieni	431 (58 %)	17	96 % [94-98 %]
Keskitaso	180 (24 %)	22	86 % [81-92 %]
Suuri	128 (17 %)	38	67 % [59-76 %]
Yhteensä	739 (100 %)	77	

Kuva 26: DRFS riskiryhmän mukaan potilaille, joilla oli 1-3 positiivista solmuketta, ilman CTS:ää.



Kuvan 26 tietojen yhteenveto: DRFS riskiryhmän mukaan potilaille, joilla oli 1-3 positiivista solmuketta, ilman CTS:ää.

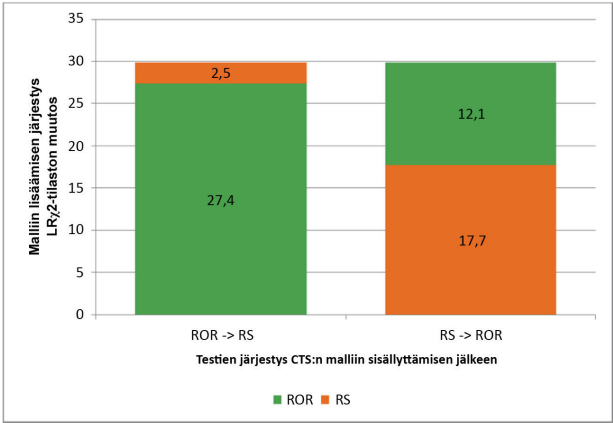
Riskiryhmä	Potilaiden lukumäärä (%)	Tapahtumien määrä	Arvioitu etäiseltä uusiutumiselta välttyneiden prosenttiosuus 10 vuoden kuluttua [95 %:n luottamusväli]
Pieni	6 (3 %)	0	100 % [ei mitään]
Keskitaso	74 (35 %)	11	84 % [76-93 %]
Suuri	134 (63 %)	38	68 % [59-77 %]
Yhteensä	214 (100 %)	49	

ROR:n vertailu RS:ään

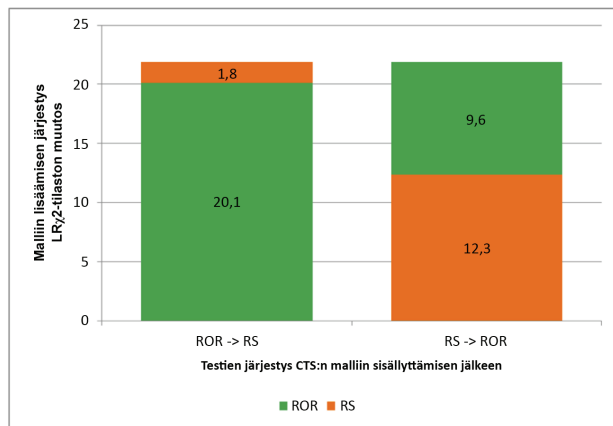
1 007 näytteestä, joille oli ROR-tulokset, Oncotype Dx -testitulokset olivat saatavilla kaikille 1 007 näytteelle, mutta IHC-tulokset olivat saatavissa vain 940 näytteelle. Jotta kaikkia kolmea testin voitiin vertailla, tämän osion tulokset perustuvat niihin 940 näytteeseen, joille oli kaikkien kolmen menetelmän testitulokset (IHC:ää ei kuitenkaan ilmoiteta tässä). Todennäköisyyssuhteen testit esitetään myös yhden muuttujan lisäystä varten, joten jotta lisätyt tiedot ovat tilastollisesti merkitseviä ($\alpha = 0,05$), 1 vapausasteen χ^2 tilastotietojen muutoksen on oltava yli 3,84. Alla olevissa kuvissa esitetään tiedot, jotka on lisätty, kun ennustetesti lisätään toiseen ennustetestiin sekä CTS:ään peräkkäin. Kunkin lisäyksen osalta lisätyt tiedot mitataan χ^2 -arvon muutoksella.

ROR lisätty RS:ään tavanomaisten kliinisten muuttujien lisäksi: ennustetiedot

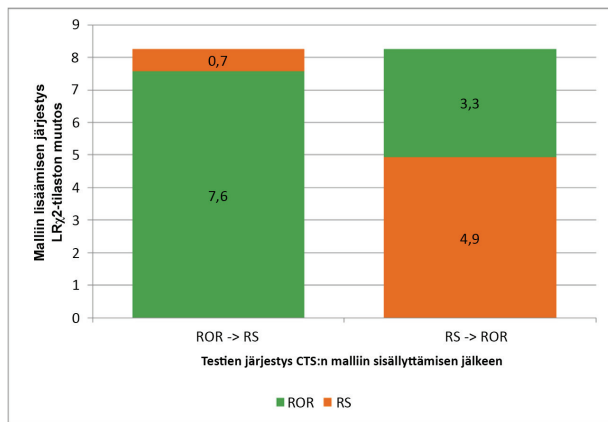
Kuva 27: Ennustetiedot DRFS:lle yli tavanomaisten kliinisten muuttujien kaikille potilaille (n = 940).



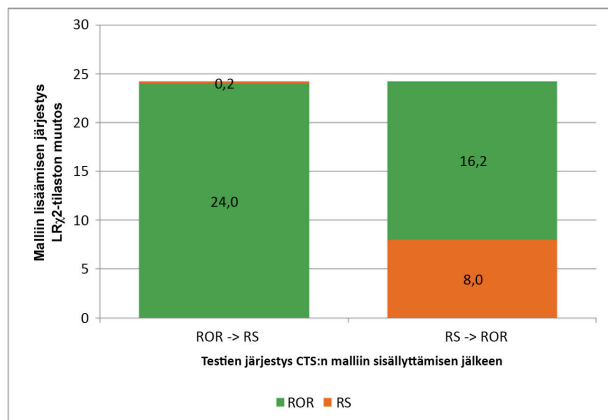
Kuva 28: Ennustetiedot DRFs:lle tavanomaisten kliinisten muuttujien imusolmukenegatiivisille potilaille (n = 683).



Kuva 29: Ennustetiedot DRFs:lle tavanomaisten kliinisten muuttujien imusolmukepositiivisille potilaille (n = 257).



Kuva 30: Ennustetiedot DRFs:lle tavanomaisten kliinisten muuttujien yli imusolmukenegatiivisille HER2-negatiivisille potilaille (n = 649).



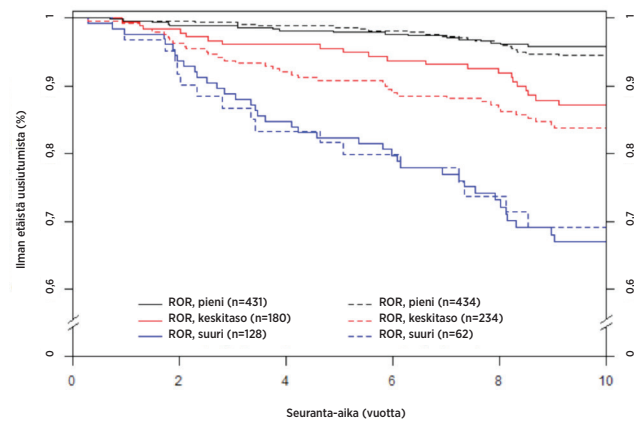
Kuvissa 27-30 esitetään tiedot, jotka ylittävät tavanomaisten kliinisten muuttujien antamat tiedot, kun nämä kaksi ennustetestiä lisätään peräkkäin. Kunkin lisäyksen osalta lisätyt tiedot mitataan χ^2 -tilastoarvon muutoksella. Kun ROR oli esim. ensimmäinen CTS:n sisällytyksen jälkeen lisätty testi (kaikki potilastiedot), χ^2 -tilastoarvon muutos oli 27,4. Kun mallissa ovat CTS ja ROR, RS:n lisääminen aiheutti χ^2 -tilasto-arvon muutoksen 2,5, joka ei ollut merkitsevä (kriittinen arvo χ^2 -testille yhdellä vapausasteella on 3,84); toisin sanoen, kun sekä CTS että ROR ovat mallissa, RS ei lisää merkittävästi tietoja. Jos RS oli kuitenkin ensimmäinen lisätty testi, ROR:ään sisältyi edelleen tietoja, joita ei sisällynyt CTS:n ja RS:n yhdistelmään. Molemmat testit ovat ennustuksellisesti merkitseviä, kun ne lisätään CTS:ään imusolmukepositiivisille potilaille, mutta kumpikaan testeistä ei ole merkitsevä toisena lisättyä testiä mahdollisesti pienen näytteenkoon vuoksi. Imusolmukenegatiivisten HER2-negatiivisten potilaiden alaryhmän osalta RS ei lisää merkitsevästi ennustetietoja CTS + ROR -yhdistelmään. Toisaalta ROR lisää merkitsevästi ennustetietoja CTS + RS -yhdistelmään.

ROR vs. RS: tulokset riskiryhmillä

Jotta voidaan verrata, miten nämä kaksi testiä erottelevat potilaat riskin mukaan, riskiryhmät määritettiin perustuen kummankin testin arvioon 10 vuoden kuluessa tapahtuvan etäisen uusiutumisen todennäköisyydestä TransATAC-populaatioissa. Riskitulokset kynnysarvot riskiryhmien määrittämistä varten valittiin kummallekin testille TransATAC-tutkimuksemme mukaan, jotta voitiin määrittää saman riskisiä potilaita sisältävät riskiryhmät. Näiden verrattavien riskiryhmien aikaansaamiseksi Oncotype DX -testille käytetyt raja-arvot olivat eri kuin Genomic Health -testissä. Kumpaakin testiä varten pienen riskin ryhmä määritettiin taannehtivasti ryhmäksi, jonka potilaiden arvioitu uusiutumiskirski oli alle 10 %. Kumpaakin testiä varten keskitason riskin ryhmä määritettiin taannehtivasti ryhmäksi, jonka potilaiden arvioitu uusiutumiskirski oli 10-20 %. Lisäksi kumpaakin testiä varten suuren riskin ryhmä määritettiin taannehtivasti ryhmäksi, jonka potilaiden arvioitu uusiutumiskirski oli yli 20 %. Alla olevaan kuvaan on koottu kummankin testin määrittämien riskiryhmien koot ja tulokset.

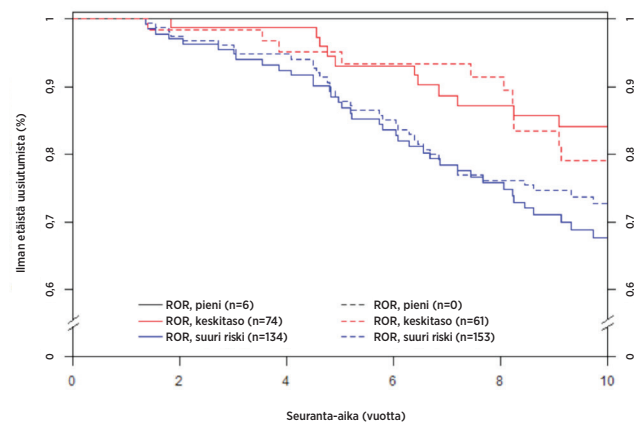
Kuvasta 31 käy ilmi, että Prosigna määrittä 26 % vähemmän potilaita keskitason riskin ryhmään kuin Oncotype Dx (180 potilasta verrattuna 243 potilaaseen). Lisäksi Prosigna määrittä useampia potilaita suuren riskin ryhmään kuin Oncotype DX; kummankin testin määrittämällä pienen riskin ja suuren riskin ryhmillä oli samankaltaiset tulokset, kuten päällekkäiset Kaplan-Meierin kuvaajat osoittavat. Tämä havainto sai TransATAC-tutkimuksemme itsenäiset tutkijat päättämään siihen johtopäätökseen, että Prosigna määrittä vähemmän potilaita keskitason riskin ryhmään kuin Oncotype DX:n RS-tulos, ja pienen ja suuren riskien ryhmien välillä oli yhtäläinen tai suurempi ero.

Kuva 31: Prosignan ROR-tulos tunnisti huomattavasti enemmän suuren riskin potilaita ja vähemmän keskitason riskin potilaita kuin Oncotype DX:n RS-tulos imusolmukenegatiivisten potilaiden osalta.



Kun pelkkää ROR-tulosta käytettiin imusolmukepositiivisille potilaille, joilla oli 1-3 positiivista solmuketta, kuudella potilaalla ennustettiin olevan alle 10 %:n etäisen uusiutumisen riski. Yhdelläkään näistä potilaista ei ollut mitään tapahtumia tutkimuksen kuluessa. Yhtä näistä potilaista tarkkailtiin 7,9 vuoden ajan, ja kaikkien muiden DR-tulos vähintään 9,9 vuoden seurannan aikana viittasi siihen, että pieniriskiseksi määritettyjen imusolmukepositiivisten potilaiden riski oli todellakin pieni. Logaritmisia järjestystestejä ei käytetty vertailuun, sillä RS:n tapauksessa ei ollut pienen riskin ryhmää.

Kuva 32: 10 vuoden DRFS:n riskiryhmäluokituksen vertailua käyttämällä CTS:ää: imusolmukepositiiviset potilaat (1-3 solmuketta) (ROR vs. RS).



Kliinisen tutkimuksen 1 johtopäätökset

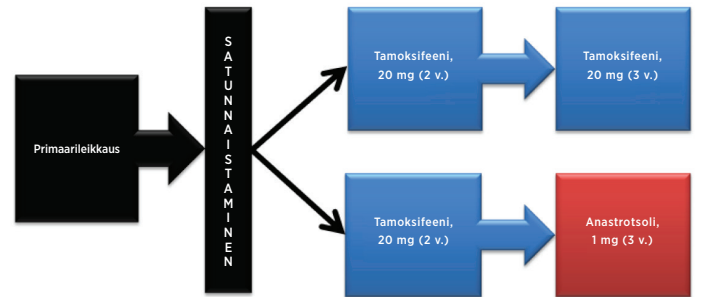
Ensisijainen analyysi osoitti, että ROR lisäsi huomattavasti ennustetietoja tavanomaisiin kliinisiin kovariaatteihin (CTS) nähdn ja niiden lisäksi kaikilla potilailla ja kaikissa ennalta määritetyissä kliinisesti asiaankuuluissa alaryhmissä. ROR:n osoitettiin jakavan potilaat kolmeen riskiryhmään, joilla on tilastollisesti merkitsevästi erilaiset tulokset imusolmukenegatiivisilla potilailla. Luminal A- ja Luminal B -luontaisalatyypeillä osoitettiin olevan merkitsevästi erilaiset DRFS- ja RFS-arvot imusolmukkeiden tilasta huolimatta. Verrattuna ennusteindikaattoriin RS (21 geenin uusiutumistulos Oncotype Dx -testistä) ROR antoi lisää ennustetietoja RS:ään nähdn kaikilla potilailla ja kliinisesti merkittävissä alaryhmissä. Lisäksi imusolmukenegatiivisessa ryhmässä ROR kaksinkertaisti suuren riskin ryhmään määritettyjen potilaiden määrän ja vähensi huomattavasti keskitason riskin ryhmään määritettyjen potilaiden määrää vähentämättä pienen ja suuren riskin ryhmien tulosten eroja RS:ään verrattuna.

Tutkimus 2: Ennuste hormonireseptoriposiitivisille, vaihdevuodet läpikäyneille rintasyöpäpotilaille, jotka saavat pelkkää adjuvanttista, systeemistä endokriinihoitoa käyttämällä Prosigna-analyysiä: ABCSG-8-tutkimus

Tutkimusasetelma

Tutkimuskohortti koostuu FFPE-rintakasvaimen kudосnäytteistä, jotka on kerätty taannehtivasti ja arkistoitu ABCSG-kasvainpankkiin vuosien 1996 ja 2004 välisenä aikana ABCSG-8-tutkimukseen osallistuneilta potilailta¹⁵. Yhteensä 3 901 vaihdevuodet läpikäyneeltä naiselta, joilla oli HR-positiivinen varhaisen vaiheen rintasyöpä, satunnaistettiin ennen hoitoa, jossa annetaan kaksi vuotta adjuvanttia Tamoksifeenihoitoa ja sen jälkeen kolme vuotta Arimidex® (anastrotsoli)- tai viisi vuotta adjuvanttia Tamoksifeenihoitoa. Tutkimuksen hoidon rakenne esitetään kuvassa 33.

Kuva 33: ABCSG-8-tutkimuksen tutkimusasetelman kaavio.



Validointikohortti edustaa sitä osuutta arvioitavasta ABCSG-8-kohortista, jolta voitiin kerätä kudосnäytteet taannehtivasti arkistoidusta ABCSG-kasvainpankista ja jolta saatiin suostumus tutkimukseen ja jotka olivat kuulleet. Alkuperäisen tutkimuksen kelpoisuusehdot täyttävät potilaat suljettiin pois ainoastaan joko siitä syystä, että kudosta ei voitu käyttää suoritettavassa NanoStringin analyysissä tai että potilaalta ei saatu uutta suostumusta. Tässä tutkimuksessa testattiin kaikki ne näytteet, joissa oli kasvainpala ja joille oli saatu potilaalta suostumus.

Tässä tutkimuksessa käytettiin luontaisia alatyypejä, jotka oli luotu analyysillä, ja arvioitiin ROR-tulos käyttämällä ennalta määritettyä analyysisuunnitelmaa. ROR-tulos, jonka arvo on 0-100, laskettiin käyttämällä 46 geenin alaryhmää aiemmin julkaistujen 50 testigeenin joukosta². ROR-kertoimet laskettiin Coxin mallista, joka sisältää Pearson-korrelaation 46 geenin alaryhmään, jota käytettiin kunkin luontaisen alatyyppin, proliferaatiotuloksen ja kasvaimen bruttokoon määrittämiseen. Kaikki analyysit suoritettiin mahdollisimman suurella määrällä seurantatietoja.

Ensisijainen päätetapahtuma oli eloonjäänti ilman etäistä uusiutumista (Distant Recurrence-Free Survival, DRFS). Tämä määritettiin ajaksi, joka kului diagnoosista etäiseen uusiutumiseen tai rintasyövän aiheuttamaan kuolemaan. Toissijainen päätetapahtuma oli eloonjäänti ilman uusiutumista (Recurrence-Free Survival, RFS). Tämä määritettiin ajaksi, joka kului diagnoosista ensimmäiseen uusiutumiseen (paikalliseen, alueelliseen tai etäiseen) tai rintasyövän aiheuttamaan kuolemaan.

Coxin suhteellisten riskien (Proportional Hazards, PH) monimuuttujamallit sovitettiin kaikkia käytettävissä olevia potilastietoja käyttämällä ensisijaisen tavoitteen arvioimiseksi peräkkäisillä ROR-testeillä. Tämä malli sisälsi tavanomaiset kliiniset kovariaatit (ikä, kasvaimen laatu, kasvaimen bruttokoko, imusolmukkeiden tila, liittänaishoito). Tämän jälkeen tehtiin Coxin mallin sovitus, ja todennäköisyysuhteen testillä testattiin, lisäikö ROR tilastollisesti merkitsevästi ($\alpha = 0,05$) ennustetietoja kliiniseen hoitotulokseen (Clinical Treatment Score, CTS) nähdn ja sen lisäksi. CTS on kliinis-patologisten tekijöiden optimoitu yhdistelmä, joka on kehitetty tavanomaisen patologian

mittariksi¹². Ensisijaiset analyysit toistettiin eri potilasalaryhmille (kaikki, imusolmukenegatiiviset, imusolmukepositiiviset tai vain HER2-negatiiviset) ja päätetapahtumille (DRFS tai RFS).

Analyyysi

Analyyssissä käytettiin peräkkäistä lähestymistapaa, jossa ensisijainen tutkimuksen tavoite oli osoittaa, että ROR lisää merkitsevästi ennustetietoja tavanomaisiin kliinisiin muuttujiin nähdn ja niiden lisäksi. Ensisijainen tavoite toi mukanaan lisävaatimuksen: sen osoittamisen, että kategorinen riskiluokitus johonkin kolmesta ryhmästä (pieni/keskitaso/suuri) lisää merkitsevästi ennustetietoja tavanomaisiin kliinisiin muuttujiin nähdn ja niiden lisäksi. Tämän vaatimuksen täyttämiseksi oli osoitettava kumpikin seuraavista:

- se, että jatkuva ROR-tulos antaa lisäarvoa ennusteille tavanomaisiin kliinisiin muuttujiin nähdn ja niiden lisäksi
- mikäli nollahypoteesi eli se, ettei ennustetietoja ole, hylätään, on osoitettava, että ROR-pohjaiset riskiluokat antavat lisäarvoa ennusteille tavanomaisiin kliinisiin muuttujiin nähdn ja niiden lisäksi.

Coxin suhteellisten riskien (Proportional Hazards, PH) monimuuttujamallit sovitettiin kaikkia käytettävissä olevia potilastietoja käyttämällä, jotta voitiin arvioida ensisijainen tavoite peräkkäisillä ROR-testeillä ja sen jälkeen ennalta määritetyillä ROR-pohjaisilla riskiluokilla. Mallit sisälsivät seuraavat kategoriset tavanomaiset kliiniset kovariaatit (ja mahdolliset arvot):

- ikä (≥ 65 tai < 65)
- laatu (G1 tai G2/GX)
- kasvaimen bruttokoko (T1, T2/T3)
- imusolmukkeiden tila (N0, N+(1-3), N+(≥ 4))
- liittänaishoito (pelkkä tamoksifeeni tai tamoksifeeni → anastrotsoli).

Tässä N0 tarkoittaa imusolmukenegatiivisia potilaita, N+(1-3) imusolmukepositiivisia potilaita, joilla on 1-3 positiivista imusolmuketta, ja N+(≥ 4) tarkoittaa imusolmukepositiivisia potilaita, joilla on vähintään neljä positiivista imusolmuketta. T1 tarkoittaa, että kasvaimen poikkimitta on enintään 2 cm, T2 tarkoittaa yli 2 cm:n ja alle 5 cm:n poikkimittaa, ja T3 tarkoittaa, että kasvain on yli 5 cm poikkimitaltaan. Tutkimuksessa oli ainoastaan 14 T3-näytettä, joten nämä yhdistettiin T2-näytteisiin. Hyvin erilaistuneita (G1) kasvaimia verrattiin kohtuullisesti erilaistuneiden (G2) ja GX-lobulaarikasvaimien yhdistelmään. GX-lobulaarikasvaimia pidettiin G2-kasvaimia analyysiä varten, sillä G2 on yleisin kasvaintyyppi tässä suunnitellussa käyttöpopulaatiossa.

Nämä kovariaatit kirjataan malliin Clinical Treatment Score (CTS) -tuloksen muodossa. CTS-tuloksen selvittämistä varten tehtiin seuraavan mallin sovitus:

$$\lambda(t) = \lambda_0(t) \exp \left(\sum_j z_j \gamma_j \right)$$

Tässä z_j edustavat edellä lueteltuja kliinisiä ja hoitomuuttujia ja CTS määritettiin käyttämällä edellä saatuja γ -arvioita; toisin sanoen $CTS = \sum_j z_j \gamma_j$.

Suhteellisten vaarojen oletus testattiin käyttämällä Schoenfeldin jäännösarvoja.

Validointitutkimukseen osallistuneilla potilailla olivat samankaltaiset ominaisuudet kuin alkuperäisen ACBSG-8-tutkimuksen osallistujilla.

Taulukko 30: Kliinisten ominaisuuksien yhteenveto.

Ominaisuus	Arvo	Sisälty (n = 1 478)		Ei sisälly (n = 2 236)		Yhteensä (n = 3 714)	
		Tapahtuma-	%	Tapahtuma-	%	Tapahtuma-	%
Hoito	Vain tamoksifeeni	741	50,1 %	1108	49,3 %	1 849	49,8 %
	Tamoksifeeni → anastrotsoli	737	49,9 %	1128	50,2 %	1 865	50,2 %
ER-tila	Negatiivinen	14	0,9 %	32	1,4 %	46	1,2 %
	Positiivinen	1 464	99,1 %	2 199	98,3 %	3 663	98,6 %
	Tuntematon	0	0,0 %	5	0,2 %	5	0,1 %
Laatu	G1	271	18,3 %	468	20,8 %	739	19,9 %
	G2	1 152	77,9 %	1 659	73,9 %	2 811	75,7 %
	GX	55	3,7 %	109	4,9 %	164	4,4 %
Imusolmuk- keiden tila	N0	1047	70,8 %	1723	76,7 %	2 770	74,6 %
	N+(1-3)	382	25,8 %	449	20,0 %	831	22,4 %
	N+(≥ 4)*	49	3,3 %	64	2,8 %	113	3,0 %
PgR-tila	Negatiivinen	260	17,6 %	424	18,9 %	684	18,4 %
	Positiivinen	1 218	82,4 %	1 805	80,4 %	3 023	81,4 %
	Tuntematon	0	0,0 %	7	0,3 %	7	0,2 %
Kasvaimen vaihe	T1	1 037	70,2 %	1 745	77,7 %	2 782	74,9 %
	T2	427	28,9 %	472	21,0 %	899	24,2 %
	T3	14	0,9 %	19	0,8 %	33	0,9 %
Ikä	Mediaani	63		-		64	
	Arvoväli	41-79				41-80	

* Sisältää yhden potilaan, jolla oli yli 9 positiivista imusolmuketta.

Taulukko 31: Muut kliiniset ominaisuudet.

Ominaisuus	Arvo	Potilaiden määrä	%:a potilaista
NanoStringin luontainen alatyyppe	Luminal A	1 004	67,9 %
	Luminal B	418	28,3 %
	Runsaasti HER2:ta sisältävä	48	3,2 %
	Basaalinen	8	0,5 %
Uusiutumiset	Etäiset	155	10,5 %
	Mikä tahansa	194	13,1 %
	Negatiivinen	1 397	94,5 %
HER2-tila	Positiivinen	77	5,2 %
	Tuntematon	4	0,3 %

Tulokset

1 620:sta testiä varten saatavasta kudoksesta 25 kappaletta (1,5 %) ei läpäissyt ennalta määritettyä patologin suorittamaa kasvaimen riittävyuden arviointia, 73 kappaletta 1 595 kudostäyttestä (4,6 %), joissa oli elinkelpoista invasiivista kudosta, ei vastannut ennalta määritettyjä laadunvalvonnan ohjetietoja talteen otetun RNA:n osalta, ja 44 kappaletta 1 522:sta RNA-näytteestä (2,9 %) ei vastannut laadunvalvonnan ohjearvoja Prosigna-analyysiä varten, joten analyysiä varten jäi jäljelle yhteensä 1 478 (91,2 %) näytettä.

Analyysiin käytettävistä 1 478 potilaasta 155:llä ilmeni etäinen uusiutuminen ja 194:llä ilmeni paikallinen tai etäinen uusiutuminen tai tapahtui rintasyövän aiheuttama kuolema. Tutkimuksen mediaaniseuranta kesti 10 vuotta.

Ensisijaisen analyysin testaus osoitti, että ROR-tulos antaa merkittävästi lisää ennustetietoja arvioitaessa eloonjääntiä ilman sairauden etäistä uusiutumista tavanomaisiin kliinisiin muuttujiin (CTS) nähden ja niiden lisäksi.

Taulukko 32: Ensisijaisen analyysin testauksen yhteenveto.

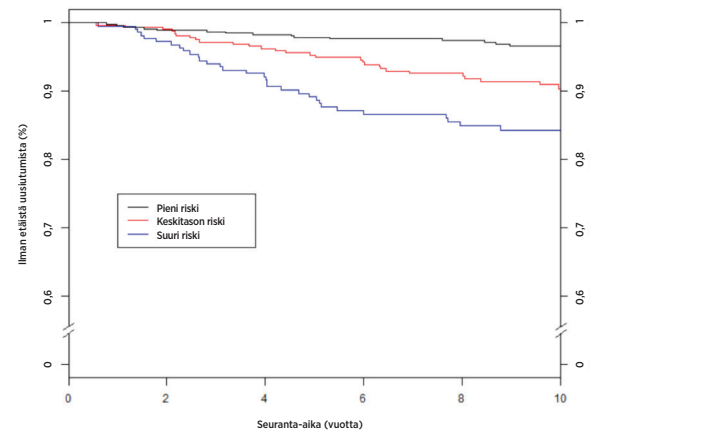
Nollamalli	Vaihtoehtoinen malli	$\Delta LR \chi^2$	χ^2 :n kriittinen arvo (vapausastetta)	χ^2 :n p-arvo
CTS	CTS + ROR	53,49	3,84 (df = 1)	p < 0,0001
CTS	CTS + riskiryhmä	34,12	5,99 (df = 2)	p < 0,0001

Toisijaiset analyysit osoittivat, että ROR liittyy merkittävästi eloonjääntiin ilman etäistä uusiutumista ja antaa lisää ennustetietoja CTS:ään nähden useissa kliinisesti asiaankuuluissa alaryhmissä.

Taulukko 33: Ensisijaisen analyysitestauksen toistaminen ennalta määritetyille alaryhmille.

Tutkittavien ryhmä	Potilaiden määrä	Tapahtumien määrä	CTS + ROR vs. CTS	CTS + riskiryhmä vs. CTS
			$\Delta LR \chi^2$ (kriit. arvo = 3,84)	$\Delta LR \chi^2$ (kriit. arvo = 5,99)
Kaikki	1 478	155	53,49	34,12
HER2-negatiivinen	1 397	145	47,50	29,94
NO	1 047	86	25,57	23,36
NO, HER2-negatiivinen	984	79	21,69	20,32
N+(1-3)	382	59	25,99	19,94
N+(1-3), HER2-negatiiviset	367	56	22,75	18,75

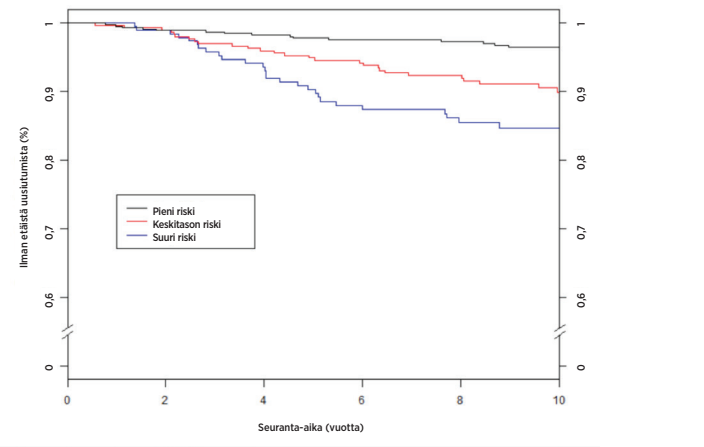
Kuva 34: DRFS riskiryhmän mukaan imusolmukenegatiivisille potilaille.



Kuvan 34 tietojen yhteenveto: DRFS riskiryhmän mukaan imusolmukenegatiivisille potilaille.

Riskiryhmä	Potilaiden lukumäärä (%)	Tapahtumien määrä 10 vuoteen saakka	Arvioitu etäiseltä uusiutumiselta välttyneiden prosenttiosuus 10 vuoden kuluttua [95 %:n luottamusväli]
Pieni	487 (47 %)	15	96,6 % [94,4–97,9 %]
Keskitaso	335 (32 %)	28	90,4 % [86,3–93,3 %]
Suuri	225 (21 %)	32	84,3 % [78,4–88,6 %]
Yhteensä	1 047 (100 %)	75	

Kuva 35: DRFS riskiryhmän mukaan HER2-negatiivisille imusolmukenegatiivisille potilaille.

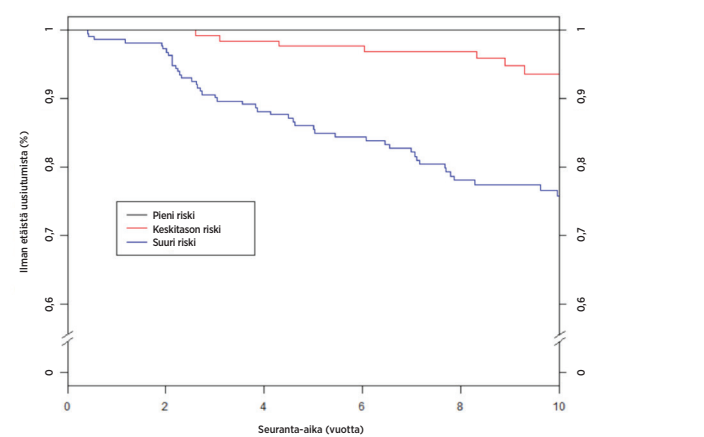


Kuvan 35 tietojen yhteenveto: DRFS riskiryhmän mukaan HER2-negatiivisille imusolmukenegatiivisille potilaille.

Riskiryhmä	Potilaiden lukumäärä (%)	Tapahtumien määrä 10 vuoteen saakka	Arvioitu etäiseltä uusiutumiselta välttyneiden prosenttiosuus 10 vuoden kuluttua [95 %:n luottamusväli]
Pieni	474 (48 %)	15	96,5 % [94,3–97,9 %]
Keskitaso	311 (32 %)	27	90 % [85,6–93,1 %]
Suuri	199 (20 %)	27	84,7 % [78,4–89,3 %]
Yhteensä	984 (100 %)	69	

Kuvassa 36 esitetään Kaplan-Meierin kuvaajat riskiryhmän mukaan imusolmukepositiivisille (1–3 solmuketta) potilaille, ja kuvassa 37 esitetään samat kuvaajat imusolmukepositiivisille (1–3 solmuketta) HER2-negatiivisille potilaille. Tulokset ovat samankaltaisia sekä HER2-positiivisten potilaiden kanssa että ilman heitä.

Kuva 36: DRFS riskiryhmän mukaan imusolmukepositiivisille (1–3 solmuketta) potilaille.

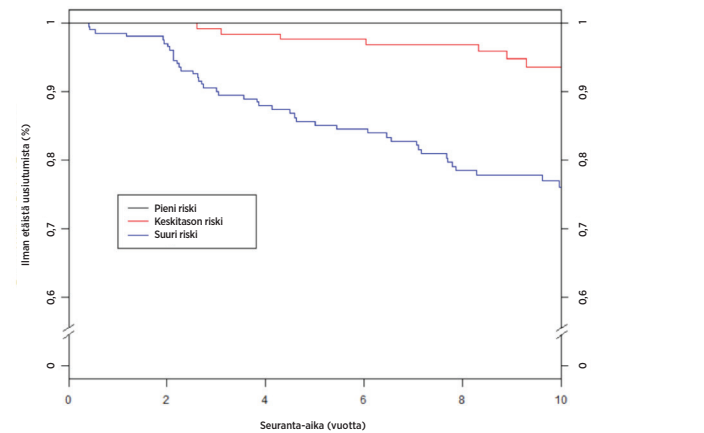


Kuvan 36 tietojen yhteenveto: DRFS riskiryhmän mukaan imusolmukepositiivisille (1-3 solmuketta) potilaille.

Riskiryhmä	Potilaiden lukumäärä (%)	Tapahtumien määrä 10 vuoteen saakka	Arvioitu etäiseltä uusiutumiselta välttyneiden prosenttiosuus 10 vuoden kuluttua [95 %:n luottamusväli]
Pieni	15 (4 %)	0	100 % [78,2-100 %]*
Keskitaso	143 (37 %)	7	93,6 % [86,9-97 %]
Suuri	224 (59 %)	46	75,8 % [68,9-81,4 %]
Yhteensä	382 (100 %)	53	

* Luottamusväli arvioitiin Clopper-Pearsonin menetelmällä.

Kuva 37: DRFS riskiryhmän mukaan HER2-negatiivisille imusolmukepositiivisille (1-3 solmuketta) potilaille.



Kuvan 37 tietojen yhteenveto: DRFS riskiryhmän mukaan HER2-negatiivisille imusolmukepositiivisille (1-3 solmuketta) potilaille

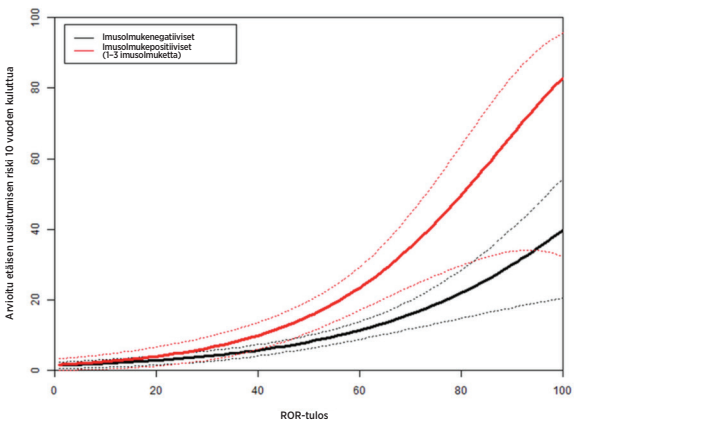
Riskiryhmä	Potilaiden lukumäärä (%)	Tapahtumien määrä 10 vuoteen saakka	Arvioitu etäiseltä uusiutumiselta välttyneiden prosenttiosuus 10 vuoden kuluttua [95 %:n luottamusväli]
Pieni	15 (4 %)	0	100 % [78,2-100 %]*
Keskitaso	142 (39 %)	7	93,6 % [86,8-96,9 %]
Suuri	210 (57 %)	43	76,1 % [69,0-81,8 %]
Yhteensä	367 (100 %)	50	

* Luottamusväli arvioitiin Clopper-Pearsonin menetelmällä.

ROR:n ja riskien ennustamisen välinen suhde

Kuvassa 38 näkyy DR:n 10 vuoden riski ROR-tuloksen funktiona 95 %:n luottamusväleillä perustuen erillisiin Coxin suhteellisten vaarojen malleihin kullekin imusolmukenegatiivisista ja -positiivista (1-3 imusolmuketta) potilasryhmistä. Imusolmukepositiivisten (1-3 imusolmuketta) potilaiden tapauksessa suhteellisten vaarojen oletusta rikottiin tekemällä sovitus koko alueelle. Tässä näkyvä imusolmukepositiivisten (1-3 imusolmuketta) potilaiden kuvaaja käyttää imusolmukepositiivisia (1-3 imusolmuketta) potilaita, joiden ROR-tulokset ovat 0-80, ja sen osalta suhteellisten vaarojen oletus täyttyi.

Kuva 38: Kymmenen vuoden arvioitu DR-riski imusolmukeluokituksen mukaan 95 %:n luottamusväleillä.



Jokaisessa alaryhmässä pienen riskin luokkaan määritettyjen potilaiden absoluuttinen kliininen riski erosi huomattavasti suuren riskin luokkaan määritettyjen potilaiden absoluuttisesta kliinisestä riskistä.

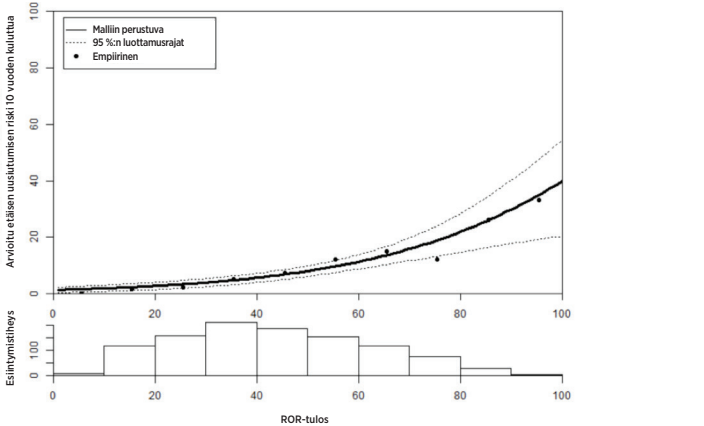
Taulukossa 34 näkyy imusolmukenegatiivisten potilaiden jakauma 10 ROR-yksikön portain. Lisäksi siinä näkyy 10 vuoden DR-riski.

Taulukko 34: Imusolmukenegatiivisten potilaiden jakauma 10 ROR-yksikön portain.

ROR-alue	Potilaiden määrä	Potilaiden prosenttiosuus	10 vuoden DR-riski (empiirinen)
1-10	7	0,7 %	0,0 %
11-20	116	11,1 %	1,8 %
21-30	155	14,8 %	2,5 %
31-40	209	20,0 %	5,1 %
41-50	183	17,5 %	7,5 %
51-60	152	14,5 %	12,1 %
61-70	116	11,1 %	15,0 %
71-80	77	7,4 %	12,3 %
81-90	28	2,7 %	26,1 %
91-100	4	0,4 %	33,3 %
Yhteensä	1 047	100 %	

Kuvassa 39 näkyy mallin perustuva kuvaaja imusolmukenegatiivisille potilaille yhdessä empiirisesti arvioitujen 10 vuoden ajan eloonjäämisosuuksien kanssa 10 eri arvovälille, kun kukin arvoväli koostuu kaikista 10 yksikön ROR-alueiden potilaista (1-10, 11-20 jne.). Kuvaajan alla on taulukko, jossa näkyy esiintymistiheysjakauma arvoväleittäin.

Kuva 39: Mallin perustuvien ja empiiristen 10 vuoden DR-riskin arvioiden vertailu imusolmukenegatiivisille potilaille; ROR-tulosten jakauma näkyy kuvaajan alla.



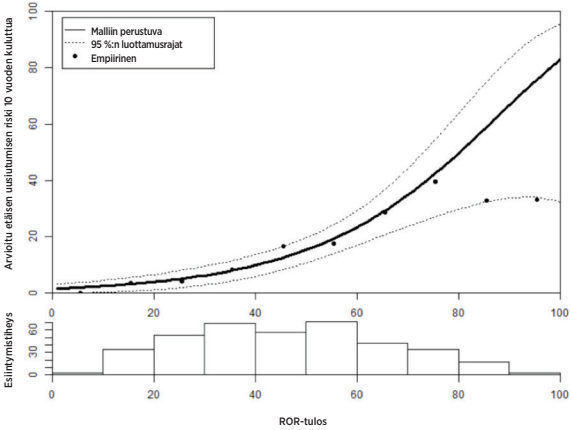
Imusolmukenegatiivisten potilaiden tapauksessa suhteellisten vaarojen malliin perustuvat arviot olivat samankaltaisia kuin empiiriset arviot koko alueelta. Taulukossa 35 näkyy imusolmukepositiivisten (1-3 solmuketta) potilaiden jakauma 10 ROR-yksikön portain. Lisäksi siinä näkyy 10 vuoden DR-riski.

Taulukko 35: Imusolmukepositiivisten (1-3 solmuketta) potilaiden jakauma 10 ROR-yksikön portain.

ROR-alue	Potilaiden määrä	Potilaiden prosenttiosuus	10 vuoden DR-riski (empiirinen)
1-10	3	0,8 %	0,0 %
11-20	34	8,9 %	3,6 %
21-30	53	13,9 %	4,1 %
31-40	68	17,8 %	8,5 %
41-50	57	14,9 %	16,7 %
51-60	71	18,6 %	17,8 %
61-70	42	11,0 %	28,9 %
71-80	34	8,9 %	39,5 %
81-90	17	4,5 %	33,0 %
91-100	3	0,8 %	33,3 %
Yhteensä	382	100 %	

Kuvassa 40 näkyy mallin perustuva kuvaaja (jossa käytetään imusolmukepositiivisia (1-3 solmuketta) potilaita, joiden ROR-tulokset ovat enintään 80) imusolmukepositiivisille (1-3 solmuketta) potilaille yhdessä empiirisesti arvioitujen 10 vuoden ajan eloonjäämisosuuksien kanssa 10 eri arvovälille, kun kukin arvoväli koostuu kaikista 10 yksikön ROR-alueiden potilaista (1-10, 11-20 jne.). Kuvaajan alla on taulukko, jossa näkyy esiintymistiheysjakauma arvoväleittäin.

Kuva 40: Mallin perustuvien ja empiiristen 10 vuoden DR-riskin arvioiden vertailu imusolmukepositiivisille (1-3 solmuketta) potilaille; ROR-tulosten jakauma näkyy kuvaajan alla.



Sekä taulukossa 35 että kuvassa 40 näkyy havaitun 10 vuoden riskin tasaantuminen ROR-alueen yläosassa, mikä aiheutti suhteellisten vaarojen oletusten epäonnistumisen. On kuitenkin huomattava, että kummankin arvon 80 ylittävän arvovälin näytekoot olivat pieniä imusolmukepositiivisten (1-3 imusolmuketta) potilaiden osalta (17 potilasta väliltä 81-90 ja vain 3 väliltä 91-100).

Luontaisten Luminal A- ja Luminal B -alatyypin vertailu

Suurin osa tutkimukseen osallistuvista tutkittavista (96 %) oli joko Luminal A- tai Luminal B -tyyppiä, mikä oli täysin odotettavaa, sillä nämä luontaiset alatyypit ovat vallitsevia hormonireseptoriposiitivisilla potilailla².

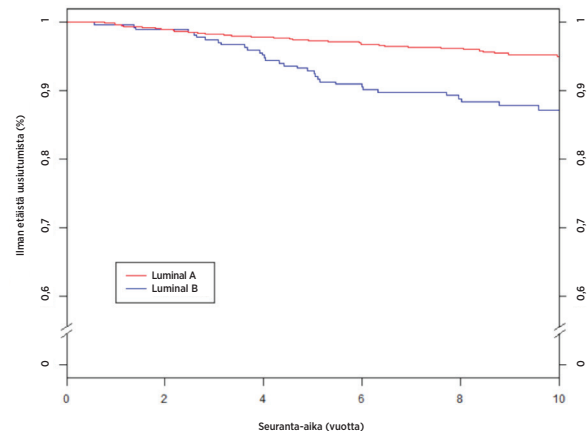
Taulukossa 36 esitetään todennäköisyysuhteiden testin tulokset, jotka osoittavat Luminal A:n ja Luminal B:n erittelyn antaman lisäennuste-arvon DRFS:lle CTS:ään nähden. Taulukossa esitetään myös Luminal A -potilaiden vaarasuhde verrattuna Luminal B -potilaisiin. Luminal A -potilailla oli merkitsevästi alempi etäisen uusiutumisen riski kaikissa kolmessa ryhmässä.

Taulukko 36: Todennäköisyysuhteiden testi luminaalisten alatyypin DRFS-ennusteelle antamasta lisäennustevoimasta.

Aliryhmä	Tapahtuma-määrä	Tapahtuma-määrä	$\Delta LR \chi^2$	$\chi^2:n$ p-arvo	LumA: LumB-vaarasuhde (95 %:n luottamusväli)
Kaikki	1 422	135	24,42	< 0,0001	0,42 [0,30-0,59]
N0	1 009	74	9,68	0,0019	0,47 [0,30-0,75]
N+(1-3)	366	51	14,94	0,0001	0,33 [0,19-0,58]

Kuvassa 41 esitetään DRFS-vertailu luminaalisen alatyypin mukaan imusolmuke-negatiivisille potilaille, ja kuvassa 42 esitetään sama vertailu imusolmuke-positiivisille (1-3 imusolmuketta) potilaille. Kummassakin ryhmässä DRFS-arvojen välillä oli huomattavia eroja Luminal A- ja Luminal B -potilaiden välillä.

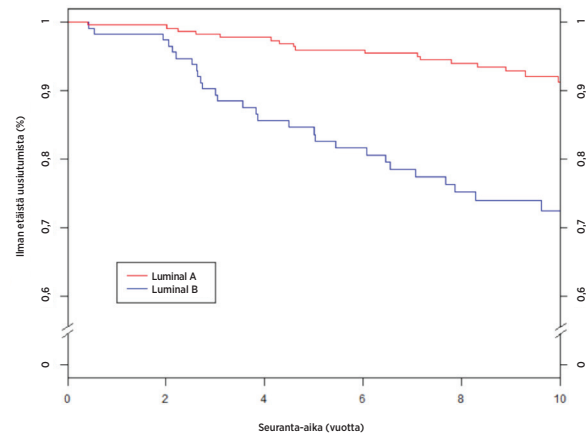
Kuva 41: Kaplan-Meierin kuvaajat DRFS:lle luontaisten alatyypin mukaan imusolmuke-negatiivisille potilaille.



Kuvan 41 tietojen yhteenveto: Kaplan-Meierin kuvaajat DRFS:lle luontaisten alatyypin mukaan imusolmuke-negatiivisille potilaille.

Riskiryhmä	Potilaiden määrä	Tapahtumien määrä 10 vuoteen saakka	Arvioitu etäiseltä uusiutumiselta välttyneiden prosenttiosuus 10 vuoden kuluttua [95 %:n luottamusväli]
Luminal A	725	32	95,1 % [93,4-96,3 %]
Luminal B	284	32	87,2 % [83,2-90,3 %]
Yhteensä	1 009	64	

Kuva 42: Kaplan-Meierin kuvaajat DRFS:lle luontaisten alatyypin mukaan imusolmuke-positiivisille (1-3 solmuketta) potilaille.



Kuvan 42 tietojen yhteenveto: Kaplan-Meierin kuvaajat DRFS:lle luontaisten alatyypin mukaan imusolmuke-positiivisille (1-3 solmuketta) potilaille.

Riskiryhmä	Potilaiden määrä	Tapahtumien määrä 10 vuoteen saakka	Arvioitu etäiseltä uusiutumiselta välttyneiden prosenttiosuus 10 vuoden kuluttua [95 %:n luottamusväli]
Luminal A	248	17	91,3 % [87,2-94,2 %]
Luminal B	118	28	72,5 % [64,2-79,1 %]
Yhteensä	366	45	

Taulukossa 37 on taulukoituna RFS-osuudet luminaalisen alatyypin mukaan 10 vuoden ajalta imusolmuke-negatiivisille ja imusolmuke-positiivisille (1-3 solmuketta) imusolmuke-ryhmillä.

Taulukko 37: Kymmenen vuoden RFS-osuudet imusolmuke-ryhmän ja luminaalisen alatyypin mukaan.

Imusolmukeiden tila	Luminal-alatyyppi	Potilaiden lukumäärä (%)	Tapahtumien määrä 10 vuoteen saakka	Arvioitu etäiseltä uusiutumiselta välttyneiden prosenttiosuus 10 vuoden kuluttua [95 %:n luottamusväli]
N0	Luminal A	725 (72)	44	93,0 % [91,1-94,5 %]
	Luminal B	284 (28)	44	82,2 % [77,6-85,9 %]
N+(1-3)	Luminal A	248 (68)	21	89,1 % [84,7-92,4 %]
	Luminal B	118 (32)	30	71,6 % [62,2-77,4 %]

Jokaisessa imusolmuke-negatiivisten ja imusolmuke-positiivisten (1-3 solmuketta) potilasryhmässä Luminal A- ja Luminal B -potilaiden ero oli merkittävä.

Kliinisen tutkimuksen 2 johtopäätökset

ROR:n osoitettiin antavan merkittävästi lisää ennustetietoja tavallisiin klinisiin ja hoitomuuttujiin nähden sekä jatkuvana mittarina käytettynä että kolmea ennalta määritettyä riskiryhmää käyttämällä sisällytettynä. Pienen riskin ryhmällä oli 10 vuoden DRFS selvästi yli 90 %, kuten ennakoitiin. Suuren riskin ryhmällä oli 10 vuoden DRFS 80 %, joka on enemmän kuin ennakoitiin; sen odotettiin olevan huomattavasti alle 80 %. Raja-arvot, joiden avulla määritettyyn riskiryhmät, perustuvat TransATAC-kohorttiin, joka on suurempiriskinen kuin nykyinen kohortti, mikä aiheuttaa kokonaisriskiltään ennakoitua alhaisemman riskin "suuren riskin ryhmän". ROR:n (jatkuva ja riskiryhmäpohjainen) ennustevoiman havaittiin olevan vastaavanlainen erilaisilla alaryhmillä. Jatkuva riskimalli vastaa tarkasti empiirisiä uusiutumisosuuksia sekä imusolmuke-negatiivisilla että imusolmuke-positiivisilla (1-3 solmuketta) potilasryhmillä. Useimmilla tutkimukseen osallistuneista potilaista (96 %) kasvaimet kuuluivat toiseen kahdesta luminaalisesta alatyypistä (Luminal A tai Luminal B). Kaikissa imusolmuke-tilan mukaan järjestellyissä ryhmissä Luminal A:n ja Luminal B:n välinen ero lisäsi DRFS:ään liittyen ennustevoimaa.

Yhdistettyjen kliinisten tutkimusten yhteenveto

Tulokset ovat yleistettävissä hajautettuun käyttöön, sillä näytteet lähetettiin kahdessa kliinisessä validointitutkimuksessa eri laboratorioille, joissa ne analysoitiin. ROR:n osoitettiin antavan merkittävästi lisää ennustetietoja 10 vuoden DRFS:n osalta tavallisiin kliinisiin ja hoitomuuttuihin nähden sekä jatkuvana mittarina käytettynä että kolmea ennalta määritettyä riskiryhmää käyttämällä sisällytettynä. Lisäksi post-hoc-analyysissä ROR antoi merkittävästi lisää ennustevoimaa viiden vuoden jälkeisen DRFS:n osalta kaikille potilaille tavallisiin kliinisiin ja hoitomuuttuihin nähden ja niiden lisäksi. ROR:n (jatkuva ja riskiryhmäpohjainen) ennustevoiman havaittiin olevan vastaavanlainen erilaisilla alaryhmillä. Rajallisia analyysejä suoritettiin myös RFS:ää käyttämällä. ROR-luokat pystyivät myös määrittämään kolme riskiryhmää, joilla oli eriävä RFS. Kummassakin tutkimuksessa DRFS-arvojen välillä oli huomattavia eroja Luminal A- ja Luminal B -alaryhmien välillä imusolmukkeiden tilasta huolimatta.

17 VIITEJULKAISUT

1. Geiss G, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs Nature Biotechnology 2008; 26: 317–25.
2. Parker JS, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. Journal of Clinical Oncology 2009, 27(8): 1160–1167.
3. Dowsett M, et al. ATAC:n ja LATTE Trialists Groupin puolesta. Comparison of PAM50 Risk of Recurrence Score With Oncotype DX and IHC4 for Predicting Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy. Journal of Clinical Oncology. J Clinical Oncology. 2013 Aug 1;31(22):2783–90.
4. Nielsen TO, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor positive breast cancer. Clinical Cancer Research 2010; 16: 5222–5232.
5. Harris JR, et al. (Carey L, Perou C) Diseases of the Breast 4th edition. 2009: 458–471.
6. Baker SC, et al. The External RNA Controls Consortium: a progress report. Nature Methods 2010; 2: 731–734.
7. Tholen DW, et al. CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline—Second Edition. Clinical Laboratory Standards Institute. Nide 24.
8. Sestak I, et al. Prediction of Late Distant Recurrence After 5 Years of Endocrine Treatment: A Combined Analysis of Patients From the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group 8 and Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination Randomized Trials Using the PAM50 Risk of Recurrence Score. Journal of Clinical Oncology 2014; Oct 20 ePub ahead of print JCO.2014.55.6894.
9. Cuzick J, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. Lancet Oncology 2010; 11(12): 1135–41.
10. Dubsy PC, et al. Tamoxifen and Anastrozole As a Sequencing Strategy: A Randomized Controlled Trial in Postmenopausal Patients With Endocrine-Responsive Early Breast Cancer From the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. Journal of Clinical Oncology 2012;30(7): 722–728.
11. Dowsett M, et al. Prediction of Risk of Distant Recurrence Using the 21-Gene Recurrence Score in Node-Negative and Node-Positive Postmenopausal Patients With Breast Cancer Treated With Anastrozole or Tamoxifen: A TransATAC Study. Journal of Clinical Oncology 2010; 28: 1829–1834.
12. Cuzick J, et al. Prognostic Value of a Combined Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, Ki-67, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Immunohistochemical Score and Comparison With the Genomic Health® Recurrence Score in Early Breast Cancer. Journal of Clinical Oncology 2011; 29: 4273–4278.

13. (a) Jakesz R, Jonat W, Gnant M, et al. Switching of postmenopausal women with endocrine responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: Combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. Lancet 2005; 366(9484): 455–462.
- (b) Jonat W, Gnant M, Boccard F, Kaufmann M, Rubagotti A, Zuna I, Greenwood M, Jakesz R: Effectiveness of switching from adjuvant tamoxifen to anastrozole in postmenopausal women with hormone-sensitive early-stage breast cancer: a meta-analysis. Lancet Oncology 2006; 7(12): 991–996.
- (c) Gnant M, Filipits R, Greil H, et al. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. Annals of Oncology 2014; 25(2):339–45.

18 MERKIT JA MÄÄRITELMÄT

 – Valmistaja

 – Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisön alueella

 – *In vitro* -diagnostiikkaan tarkoitettu lääkintälaitte

 – Katso käyttöohje

 – CE-merkintä

 – Eräkoodi/eränumero

 – Luettelo- tai viitenumero

 – Sisältää riittävästi <n> testiä varten

 – Säilytyksen lämpötilaväli

 – Säilytyksen lämpötilavälin alaraja

 – Säilytyksen lämpötilavälin yläraja

 – Viimeinen käyttöpäivämäärä

 – Tämä puoli ylöspäin

Room Temp. = huoneenlämpö

HYB = hybridisaatio

Lainmukainen vastuuvapauslauseke

Diagnostiseen *in vitro* -käyttöön.

© 2023 Veracyte, Inc. ja tytäryhtiöt. Kaikki oikeudet pidätetään. Veracyte, Veracyte-logo, Prosigna ja Prosigna-logo ovat Veracyte, Inc:n ja sen tytäryhtiöiden tavaramerkkejä. nCounter on NanoString Technologies, Inc:n tavaramerkki, jota käytetään luvanvaraisesti.

19 YHTEYSTIEDOT



Yhteystiedot – Yhdysvallat:
Veracyte, Inc.
6000 Shoreline Court
Suite 300
South San Francisco CA 94080
USA
Puh: +1-650-243-6335
www.veracyte.com



Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisön alueella:
Veracyte
Luminy Biotech Entreprises
163 Avenue de Luminy
13288 Marseille Cedex 9
FRANCE

Maailmanlaajuiset yhteystiedot:
Teknisen tuen sähköpostiosoite: DxSupport@Veracyte.com
Sähköpostiosoite, josta saa tuotetietoja: info@prosigna.com
Verkkosivusto: www.prosigna.com