

Package Insert (Pakningsvedlegg)

Prosigna® Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay (prognostisk gensignaturanalyse for brystkreft)



Version 01, opprettet 2022-05



1 - 10 tests

Lagringsbetingelser

 -20 °C Oppbevar i -20 °C eller lavere	Cartridges for Prosigna prognostisk gensignaturanalyse for brystkreft
 -80 °C Oppbevar i -80 °C eller lavere	CodeSet for Prosigna prognostisk gensignaturanalyse for brystkreft
 +25 °C Lagres ved romtemperatur	PrepPack for Prosigna prognostisk gensignaturanalyse for brystkreft
 +2 °C Oppbevar i -80 °C	PrepPlates for Prosigna prognostisk gensignaturanalyse for brystkreft

INNHOUDSFORTEGNELSE

1	TILTENKT BRUK/FORMÅL	1
2	SAMMENDRAG AV TESTSYSTEMET	1
2.1	Prinsipper for nCounter Dx analysesystem	2
2.2	Prosigna-algoritmens prinsipper for utgangsberegning	2
3	REAGENSER OG UTSTYR SOM LEVERES	2
3.1	Oversikt over Prosigna-settet	2
3.2	Prosigna Kit innhold for et 1, 2, 3, 4, eller 10 testers Prosigna Kit	3
4	ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER	3
5	GENERELLE ANALYSEFAKTORER	3
5.1	Bearbeiding av vev	3
5.2	Utføre Prosigna-analysen	4
6	INFORMASJON OM OPPLÆRING	4
7	AVFALLSHÅNDTERING	4
8	LAGRING OG HÅNDTERING (REAGENSER)	4
9	INSTRUMENTER SOM KREVES FOR PROSIGNA	4
10	REAGENSER OG UTSTYR SOM KREVES MEN SOM IKKE LEVERES	4
10.1	Materialer	4
10.2	Utstyr	4
10.3	Spesifikasjoner av utstyr	4
11	INNSAMLING OG BEARBEIDING AV PRØVER	5
11.1	Krav til vevsprøver og patologisk undersøkelse	5
11.2	Innsamling og lagring av prøver	5
11.3	Preparering av objektglass	5
11.4	Bearbeiding av objektglass	5
11.5	Isolering av RNA	6
11.6	Mål RNA konsentrasjon og kvalitet	6
11.7	Analyseprosedyre	7
12	FEILSØK OG TESTFEIL	9
13	ANALYSERESULTATER	9
13.1	Iboende subtyper	9
13.2	ROR score	10
13.3	Sannsynlighet for 10 års fjernmetastaser	10
13.4	Risikoklassifisering	10
13.5	Kvalitetskontroll	10
14	PROSEDYRENS BEGRENSNINGER	10
15	FORVENTEDE VERDIER	11
15.1	ROR-område etter Subtype	11
15.2	ROR score hyppighet etter nodalstatus	11
15.3	Fjernmetastase-fri overlevelse iht. risikokategorisering	11

16	YTELSESEGENSKAPER	12
16.1	Analytisk nøyaktighet og reproduserbarhet	12
16.2	Sensitivitet/RNA-input	13
16.3	Interferenstesting	13
16.4	Klinisk utførelse	14
17	BIBLIOGRAFI	25
18	SYMBOLER OG DEFINISJONER	26
19	KONTAKTINFORMASJON	26

1 TILTENKT BRUK/FORMÅL

Prosigna® prognostisk gensignaturanalyse for brystkreft er en *in vitro* (prøverør) diagnostisk analyse som bruker genets uttrykksprofil i celler som er funnet i brystkreftvev for å evaluere en pasients risiko for fjernmetastaser. Analysen måler genets uttrykksprofil ved hjelp av RNA (ribonukleinsyre) som er ekstrahert fra formalinfiksert parafininnlagt (FFPE) brystsvulstvev. Genets uttrykksdata avveies sammen med kliniske variabler for å generere både en subtype (luminal A, luminal B, HER2-beriket, eller basalcellelike) og en score som indikerer sannsynligheten for fjernmetastaser. Analysen utføres med NanoString nCounter® Dx Analysis System ved hjelp av FFPE brystsvulstvev som tidligere er diagnostisert som invasivt brystkarsinom.

Prosigna prognostisk gensignaturanalyse for brystkreft anbefales for kvinnelige brystkreftpasienter som har gjennomgått enten mastektomi eller brystbevarende bearbeiding i forbindelse med lokoregional behandling i samsvar med standarden på omsorgen, enten som:

- En prognoseindikator for fjernmetastasefri overlevelse i 10 år hos postmenopausale kvinner med hormonreseptor positiv (HR +), lymfeknute negative, Trinn I eller II brystkreft som skal behandles med adjuvant endokrin bearbeiding alene, når brukt sammen med andre klinisk-patologiske faktorer.
- En prognoseindikator for fjernmetastasefri overlevelse i 10 år hos postmenopausale kvinner med hormonreseptor positiv (HR +), lymfeknute positiv (1 - 3 positive noder, eller 4 eller flere positive noder), Trinn II eller IIIA brystkreft som skal behandles med adjuvant endokrin bearbeiding alene, når brukt sammen med andre klinisk-patologiske faktorer.

2 SAMMENDRAG AV TESTSYSTEMET

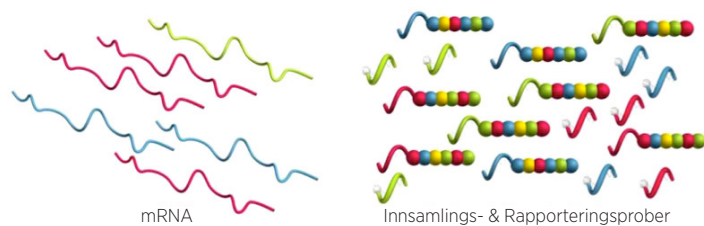
NanoString nCounter Dx analysesystem gir direkte multiplekse målinger av genuttrykk gjennom digital avlesning av den relative overfloden av mRNA-kopier ved hjelp av følgende fremgangsmåte: 1) Hybridisering av RNA til fluorescerende Reporter- og Fange- prøber, 2) Rensing av mål-/probekompleksene ved hjelp av nCounter Prep Plates, som inneholder reagenser som er nødvendige for bearbeiding etter hybridisering og immobilisering over på nCounter-patronen på nCounter Prep Station, og 3) Analyse av nCounter-patronen på nCounter Digital Analyzer for å gi et testresultat. Både Capture- og Reporter-probene inneholder unike DNA probesekvenser for målhybridisering og rensing. Capture- og Reporter-probene er kombinert med de positive og negative kontrollene for å danne kodesettet CodeSet. Prosigna måler samtidig uttrykksnivået i 50 gener som benyttes for den iboende subtypens klassifiseringsalgoritme², 8 housekeeping-gener som brukes for signalnormalisering, 6 positive kontroller og 8 negative kontroller i en enkelt hybridiseringsreaksjon, ved hjelp av nukleinsyreprober som er spesielt utviklet for disse genene. Også inkludert i Prosigna-settet er en referanseprøve som består av *in vitro* kopierte RNA-mål for hvert av de 58 genene. referanseprøven testes med hver gruppe av pasientens RNA-prøver for å kvalifisere kjøringen og normalisere signalet fra hvert gen.

Prosigna-analysen utføres på RNA som er isolert fra FFPE brystsvulstvev. En patolog undersøker et objektglass som er farget med hematoxylin og eosin (H&E) og identifiserer (og markerer) området med invasiv brystkreft som er egnet for testen. Patologen måler også svulstens overflateareal, hvilket bestemmer antall ufargede objektglass som er nødvendige for testen, og svulstens cellularitet for påse nærvær av tilstrekkelig svulstvev for testen. En trent teknolog makrodissekerer det området på de ufargede objektglassene som korresponderer med det markerte svulstområdet på det H&E-fargede objektglasset og isolerer RNA fra vevet. Isolert RNA blir deretter testet på NanoString nCounter Dx analysesystem for å gi testresultater, inkludert den iboende subtypen, Risk of Recurrence (ROR) (risiko for tilbakefall) score og risikokategori.

2.1 Prinsipper for nCounter Dx analysesystem

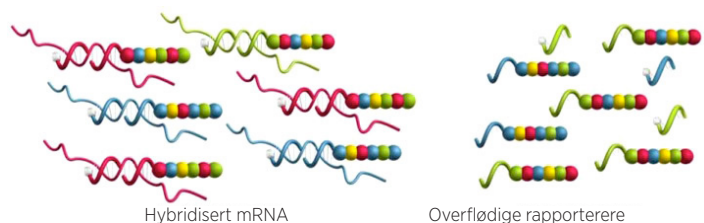
nCounter Dx analysesystem bruker genspesifikke probepar (Figur 1) som hybridiserer direkte til mRNA-prøven i oppløsning og eliminerer enzymatiske reaksjoner som kan introdusere skjevhet i resultatene. I det første trinnet av analysen hybridiseres DNA-probene direkte til en 70 - 100 basisparregion av RNA-prøven i oppløsningen. Den fluorescerende Reporter-proben består av en 35 - 50 basisprobesequens som er komplementær til mRNA-målet og en unik rygggrads DNA-sekvens som hybridiserer til seks RNA-segmenter som er merket med ett av fire fluorescerende fargestoffer; rødt (R), gult (G), blått (B), eller grønt (G). De fluorescerende segmentene skaper en seks-posisjons/4-farget fluorescerende "fargekode" som er unik for hvert mål. En separat Capture Probe (innfangningsprobe) består av en 35 - 50 basisprobesequens som er komplementær til mRNA-målet og biotin, som brukes for immobilisering på et streptavidin-belagt objektglass.

Figur 1: Hybridiser CodeSet til mRNA

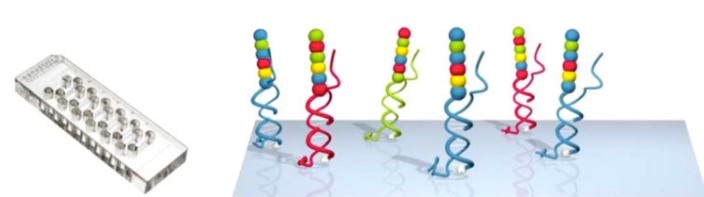


Etter hybridisering blir alle prøverensingsstegene automatisert på nCounter Prep Station. Først blir overflødig Capture- og Reporter-prober fjernet (Figur 2) ved hjelp av suksessive magnetiske kulefangsttrinn, etterfulgt av binding av probemålkompleksene til tilfeldige steder på overflaten av nCounter-Patronen via en streptavidin-biotin-binding (Figur 3). Til slutt blir probe-/målkomplekser justert og immobilisert (Figur 4) i nCounter-patronen.

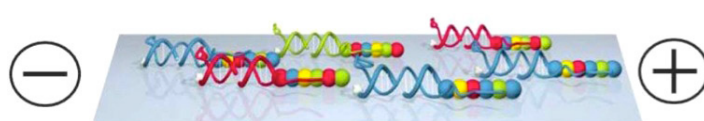
Figur 2: Fjern overflødig Reporter



Figur 3: Bind hybridiserte reportere til patronens overflate



Figur 4: Juster og immobiliser hybridiserte Reportere



Etter at prøvebearbeidingen er fullført plasseres Patronen i nCounter Digital Analyzer for datainnsamling. Hver mål molekyl av interesse identifiseres av den "color code" (fargekoden) som er generert av seks bestilte fluorescerende flekker som finnes på den tilhørende Reporter-proben. Reporter-probene på overflaten av Patronen blir deretter talt og tabulert for hvert mål molekylet og behandlet med algoritmen (Figur 5).

Figur 5: Datainnsamling

Kode	Gen	Antall
	x	3
	y	1
	z	2

2.2 Prosigna-algoritmens prinsipper for utgangsberegning

Testen er basert på den rapporterte 50-gen klassifikatoralgoritmen som opprinnelig het PAM50² og utføres på nCounter Dx analysesystem ved hjelp av RNA som er ekstrahert fra formalinfiksert, parafininnebygd (FFPE) brystsvulst vevsprøver. Algoritmen bruker en 50-geners uttrykksprofil for å tildele brystkreft til en av fire molekylære klasser eller iboende subtyper: Luminal A, Luminal B, HER2-beriket, eller Basalcellelike². De prototypiske genuttrykksprofilene (f.eks. tyngdepunkt) av de fire iboende subtypene ble omskolert på nCounter analysesystem ved hjelp av FFPE brystsvulstprøver som ble samlet inn fra flere kliniske sentre i Nord-Amerika. Etter å ha utført analysen på en pasientprøve, sammenligner en beregningsalgoritme, som er basert på Pearson's korrelasjon, den normaliserte 50-geners uttrykksprofilen av pasientens testprøve med de prototypiske uttrykksprofilene av de fire brystkreft iboende subtypene. Pasientens testprøve tilordnes subtypen med den høyeste Pearson's korrelasjon.

Algoritmen rapporterer videre en Risk Of Recurrence (ROR) (risiko for tilbakefall) score på en skala³ fra 0 - 100, som er korrelert med sannsynligheten for fjernmetastaser etter ti år for postmenopausale kvinner med hormonreseptor-positivt tidlig stadium av brystkreft⁴. Rapporten omfatter også en risikokategori (lav, middels, eller høy). ROR score beregnes ved hjelp av koeffisienter fra en Cox-modell, som omfatter Pearson korrelasjon av en 46-genet undergruppe av de 50 genene til hver iboende subtype tyngdepunkt, en sprednings- score og brutto svulststørrelse. Testvariablene multipliseres med de tilsvarende koeffisientene fra Cox-modellen for å generere en score, som deretter justeres til en skala fra 0 - 100 basert på koeffisienter som er generert fra prøvesettet av FFPE brystsvulstprøver. Risikokategoriene rapporteres også basert på grenser for ROR som bestemmes i en klinisk valideringsstudie.

3 REAGENSER OG UTSTYR SOM LEVERES

3.1 Oversikt over Prosigna-settet

Prosigna-settet inneholder tilstrekkelig med reagensmidler til å bearbeide 1, 2, 3, 4, eller 10 pasientprøver, avhengig av det bestilte produktet. Se nedenfor for bestillingsinformasjon. Prosigna-settet inneholder et CodeSet, ett referanseprøveprøve for hvert sett å 10 tester, og forbruksvarer som er ytelsetestet sammen før utgivelse.

Katalognummer	Antall tester i et Sett	Referanse prøverør inkludert
PROSIGNA-001	1	2
PROSIGNA-002	2	2
PROSIGNA-003	3	2
PROSIGNA-004	4	2
PROSIGNA-010	10	2

Anbefalt for bruk sammen med Roche FFPET RNA Isolation Kit (Roche-FFPET-025 kun tilgjengelig via NanoString Technologies)

3.2 Prosigna Kit Contents for a 1, 2, 3, 4, or 10 test Prosigna Kit

Number of Tests	1	2	3	4	10
Prosigna CodeSet Box					
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 Reference Sample	1 x 30 µL	1 x 30 µL	1 x 30 µL	1 x 30 µL	1 x 30 µL
CodeSet Barcode Sticker	1	1	1	1	1
Test Configuration Code	1	1	1	1	1
Prosigna Prep Plate Box					
Prep Plates	1	1	1	1	2
Prosigna Cartridge Box					
nCounter Cartridges	1	1	1	1	1
Prosigna Prep Pack Box					
nCounter Prep Station Tips	1	1	1	1	1
nCounter Cartridge Adhesive Cover	2	2	2	2	2
nCounter Tip Sheaths	2	2	2	2	2
nCounter Hybridization Buffer	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL
12-Well Notched Strip Tubes	4	4	4	4	4
12-Well Notched Strip Tube Lids	4	4	4	4	4

Contents Description

Prosigna CodeSet

Prosigna Reporter CodeSet	<i>buffer, nucleic acids with fluorescent dyes</i>
Prosigna Capture ProbeSet	<i>buffer, nucleic acids</i>
Prosigna RNA Reference Sample	<i>buffer, nucleic acids</i>
CodeSet Barcode Sticker	<i>sticker sheet</i>
Test Configuration Code	<i>card with sticker</i>

Prosigna Prep Plates

Prep Plates	<i>superparamagnetic beads, buffer, salts, oligonucleotides, polystyrene beads containing fluorescent dyes</i>
-------------	--

Prosigna Cartridges

nCounter Cartridge(s)	<i>sample cartridge(s)</i>
-----------------------	----------------------------

Prosigna Prep Pack

nCounter Hybridization Buffer	<i>buffer, salts</i>
12-Well Notched Strip Tubes	<i>plastic strips</i>
12-Well Notched Strip Tube Lids	<i>plastic lids</i>
nCounter Prep Station Tips	<i>2 racks of 90 tips + 6 piercers</i>
nCounter Cartridge Adhesive Cover	<i>nCounter</i>
nCounter Tip Sheaths	<i>adhesive films</i>
	<i>6-well tip holders</i>

4 ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

- For *In Vitro* diagnostisk bruk.
- Denne analysen er beregnet for å bli utført av operatører som er utdannet i svært komplekse molekylbiologiske teknikker, basert på lokale bestemmelser.
- Ikke bland komponenter fra forskjellige Prosigna-serier. Funksjonalitet kan kun garanteres for Prosigna-settserier som levert, siden de er kvalifisert på denne måten under framstillingen.
- Resterende reagenser bør ikke brukes på nytt i Prosigna-analysen.
- Ignorer alle reaksjoner med kompromitterte hybridiseringstider eller -temperaturer.
- Det er viktig å opprettholde integriteten av prøvens CoC (vev til RNA og RNA til analyse) for å påse at pasientprøvens ID er forbundet med korrekt testresultat.
- Unnlatelse av å lagre reagenser under de forholdene som er angitt på etiketten, kan påvirke analyseresultatet.
- Bruk alltid hansker ved håndtering av reagenser og prøver.
- Unngå RNase-forurensning, som kan påvirke testresultatene negativt.

- Alle biologiske prøver og materialer må behandles som om det foreligger en mulighet for smitteoverføring og bør avhendes med tilbørlig varsomhet og i overensstemmelse med nasjonale og lokale forskrifter.
- Pipetter aldri med munnen.
- Unngå at reagenser kommer i kontakt med øyne, hud og slimhinner.
- Bruk molekylærlaboratoriers beste praksis for å hindre krysskontaminering mellom testprøver, eller med nukleinsyremål med høy konsentrasjon (syntetisk eller PCR-forsterket), som kan påvirke testresultatenes kvalitet negativt.
- Prosigna Prep Plates og nCounter-patronene inneholder svært små mengder av natriumazid (< 0,1 %) i etterbearbeidingen, og det anbefales derfor at avfallsbeholdere for plast (ikke metall) benyttes ved deponeringen. Selv om det er ekstremt usannsynlig for Prosigna, er akkumulering av natriumazid på metall kjent for å skape en eksplosjonsfare.
- Ytterligere informasjon om deponering av instrumentet finnes i nCounter Analysis System Bruksanvisning og Service-manual for Prep Station og Digital Analyzer.
- Material Safety Data Sheet-informasjon for Reporter CodeSet, Capture ProbeSet, Hybridization Buffer og Prep Plates finnes på www.prosigna.com.
- Alle farlige materialer bør avfallsdeponeres i henhold til din institusjons retningslinjer for deponering av farlige stoffer.
- Alle ubrukte CodeSet bør kastes.
- Hvis en pasients svulststørrelseskategori legges inn feil i programvaren, kan ROR score og risikoklassifisering bli påvirket negativt (f.eks. forskjøvet ROR score og/eller feil klassifisering).
- Hvis en pasients nodalstatus legges inn feil i programvaren, kan pasientens testresultater bli rapportert feil (f.eks. feil risikoklassifisering).
- Ikke bruk RNA av utilstrekkelig kvalitet eller kvantitet, eller svulstprøver med utilstrekkelig svulstoverflateareal eller cellularitet, i Prosigna-analysen. Prosigna-analysen vil da muligens ikke være stand til å gi et gyldig resultat, og vil i stedet rapportere analysefeil.

5 GENERELLE ANALYSEFAKTORER

- Analysen er beregnet for bruk kun på formalinfiksert, parafin innebygd (FFPE) brystkreft vevsprøver fra kirurgisk reseksjon, og er ikke ment for bruk på friskt, frosset, eller ikke-brystkreft vev.
- Bruttostørrelsen av en pasients primærsvulst og nodalstatus er nødvendig for å utføre analysen.
- Bruk sterile engangs mikropipettespisser for å unngå mikrobiell og nuklease-kontaminering av reagenser eller prøver under bearbeidingen.
- Oppbevar de isolerte RNA-prøvene på våt is når de ikke blir aktivt manipulert.
- Kalibrerte termometre er nødvendige for varmeblokker.
- Ikke bruk settkomponenter hvis de er skadet ved ankomst.
- Det anbefales at kliniske kontroller (f.eks. for risikokategori) utvikles og benyttes av laboratorier som kjører Prosigna, for å sikre nøyaktigheten av resultatene over tid som en del av standard laboratorie kvalitetskontrollprosedyrer.

5.1 Bearbeiding av vev

- Unnlatelse av å fjerne omkringliggende ikke-svulst/normalt vev ved hjelp av makrodissekering under bearbeidingen av vevet, kan føre til en undervurdering av risiko på grunn av at en lavere ROR score rapporteres til legen.
- Unnlatelse av å fjerne humant genomt DNA under isolering av RNA, kan føre til en høyere feilhyppighet grunnet et lavere analyse-signal, eller en overestimert risiko fordi en høyere ROR score rapporteres til legen.
- Alle ufargede vevseksjoner bør monteres på positivt ladde mikroskop objektglass for å unngå at de løser under bearbeidingen.
- For prøver som krever flere objektglass, må alle objektglassene behandles samlet.
- Vevseksjoner som er lagt på objektglass kan nedbrytes hvis de lagres i mer enn 9 måneder i et tørt miljø.
- Skift 3 % glyserol arbeidsløsning hver uke, eller hvis oppløsningen blir grumset, for å unngå forurensning.

- Skift det første D-Limonen vaskeinnhold etter bearbeiding av 4 sett med objektglass, og etanol (EtOH) og andre D-Limonen flekkoppvask- innhold etter bearbeiding av 8 sett med objektglass for å unngå at det går ut over vevets kvalitet.
- Vær forsiktig når du skisserer svulstområdet på det ufargede objektglasset og fjerner ikke-svulstvev for å sikre at svulstvevet ikke forstyrres.
- Håndter skarpe redskaper varsomt under makrodissekering.
- Bruk et nytt barberblad for hver vevsprøve som behandles.
- 10 % SDS utfelles ofte ved romtemperatur og må varmes ved 37 °C inntil utfellingene er oppløst.
- Nye serier/grupper av RNA isolasjonssett bør testes mot isolasjonssettets spesifikasjoner for å kvalifisere de nye seriene for pasienttesting (se avsnitt 11.5 for detaljer).

5.2 Utføre Prosigna-analysen

- Sjekk at pasientens kategoriske primære brutto svulststørrelse er riktig lagt inn i programvaren.
- Sjekk at pasientens kategoriske nodalstatus er riktig lagt inn i programvaren.
- Kontroller at varmeblokken med oppvarmet lokk, som kreves for hybridisering, oppfyller spesifikasjonene og er rutinemessig kalibrert.
- Bruk kun de forbruksvarene som kom med Prosigna-settet. De er designet spesielt for å arbeide med nCounter Prep Station og nCounter Digital Analyzer.
- Hvis hybridiseringsbuffer var lagret ved lave temperaturer, og et presipitat blir observert, må rørene varmes ved 37 °C til saltene er oppløst.
- Ikke sentrifuger analysekomponenter kraftig for å blande, da det kan skade reagensene. Bør blandes med en pipette.
- Ikke sentrifuger Reporter CodeSet med en høyere hastighet enn 3000 x g i mer enn 10 sekunder. Ikke bruk "puls"-alternativet for sentrifugere. Gjør man det, kan utløse CodeSet bunnfall.
- Oppretthold hybridiseringsreaksjoner ved 65 °C til de er klare for å bli overført til Prep Station. Innstilling av varmeblokken for å rampe ned til 4 °C, eller å plassere prøvene på is etter hybridiseringen, kan føre til kryss-hybridisering, som kan kompromittere analyseresultatene.
- Unnlatelse av å plassere strimmelrør ved 65 °C innen 15 minutter etter å ha tilføyd Capture ProbeSet, kan resultere i kryss- hybridisering, hvilket kan kompromittere analyseresultatene.
- Unnlatelse av å initiere bearbeiding av Prep Station i løpet av 15 minutter etter å ha fjernet prøvene fra 65 °C, kan føre til kryss-hybridisering, hvilket kan kompromittere analyseresultatene.
- Påse at strimmelrørets lokk er godt forseglet før hybridisering i varmeblokken for å forhindre fordamping, hvilket kan kompromittere analyseresultatene.

6 INFORMASJON OM OPPLÆRING

Denne analysen er beregnet for å bli utført av profesjonelle operatører som er opplært i svært komplekse molekylbiologiske teknikker, basert på lokale bestemmelser. Kontakt Veracyte for informasjon om spesialopplæring i å utføre Prosigna-analysen.

7 AVFALLSHÅNDTERING

Se nCounter Analysesystem bruksanvisning om avfallshåndtering og detaljer spesielt om de reagensene og instrumentene som brukes i IVD-applikasjoner.

8 LAGRING OG HÅNDTERING (REAGENSER)

Utløpsdatoen for alle analysesettkomponentene er listet på barcode- etiketten som ligger i CodeSet-boksen, så vel som på etiketten på den utvendige emballasjen for alle Prosigna-komponenter.

- Prosigna CodeSet-boks komponenter (Prosigna Reporter CodeSet, Prosigna Capture ProbeSet og Prosigna RNA Reference Sample) må oppbevares i -80 °C eller lavere.
- nCounter-patronene må lagres ved eller under -20 °C.
- nCounter Prep Plates må lagres ved 4 °C (2-8 °C).
- nCounter Prep Pack komponenter må lagres ved romtemperatur 15 °C - 25 °C.

9 INSTRUMENTER SOM KREVES FOR PROSIGNA

- nCounter Dx Analysis System (Katalognummer NCT-SYST-DX) (inkluderer begge instrumentene nedenfor)
 - nCounter Prep Station 5s (Katalognummer NCT-PREP-STATION-FLEX)
 - nCounter Digital Analyzer 5s (Katalognummer NCT-DIGITAL-ANALYZER-FLEX)

Se nCounter Analysis System IVD bruksanvisning for ytterligere informasjon.

10 REAGENSER OG UTSTYR SOM KREVES MEN SOM IKKE LEVERES

10.1 Materialer

- FFPE RNA Isolasjonssett (se Avsnitt 11.5 for krav til isolasjonssett hvis det ikke brukes Roche FFPET RNA isolasjonssett som er kjøpt gjennom NanoString Technologies)
- Hematoxylin og Eosin (H&E)
- Positivt ladede objektglass for mikroskop
- D-Limonene klaringsmiddel (histologisk grad)
- 100 % Etanol (Absolute), ACS grad eller liknende (ikke under 99,5 %)
- Glyserol, molekylærbiologisk klasse
- Nuklease-fritt vann, molekylærbiologisk grad
- 10 % SDS, molekylærbiologisk grad
- Barberblader (eller engangsskalpeller)
- Engangs Microtome-blader
- 0,5 ml skruelukk 1,5 og 1,7 ml ikke-klebende RNase-frie mikrosentrifugerør
- RNase-frie Micropipette-tips med aerosolbarriere

10.2 Utstyr

- Microtome
- Vannbad (40 °C)
- Objektglassvarmer (45 °C)
- Mikroskop objektglass tørkestativ
- Mikropipetter; 2 µL, 20 µL, 200 µL og 1000 µL
- Mini-sentrifuge med en 0,2 ml strimmelrørrotor og standard 1,5/2,0 ml mikrosentrifuge rørrotor
- Standard bordmodell mikrosentrifuge med en rotor med fast vinkel somt passer 1,5 ml sentrifugerør
- Rektangulære glass fargeskåler med deksel (ca. innvendige dimensjoner på 3,6 x 2,8 x 2,4 (91 x 71 x 60 mm); 3 påkrevet
- Objektglass stativ (holder opptil 10 3" x 1" (75 x 25 mm) objektglass)
- Tørr varmeblokk, stasjonær
- Benkmodell Vortexer for mikrosentrifugerør
- Målesylinder (foreslått str.: 100 - 250 ml)
- Dissekeringsnål eller dekkglasstang (vinklet, ikke-sagtakket)
- Kalibrerte termometere (dekker området 55 °C til 80 °C)
- Mikro-volum UV/Vis spektrofotometer (se spesifikasjoner nedenfor)
- Varmeblokk med oppvarmet lokk (se spesifikasjon nedenfor)
- Sentrifuge med plate mikropate adapter (se spesifikasjon nedenfor)
- Coplin-krukke

10.3 Spesifikasjoner av utstyr

Tabell 1: Full spektrum Mikro-volum UV/Vis spektrofotometer for Nukleinsyre- kvantifisering

Design-egenskap	Spesifikasjoner
Prøvens volumområde	1 - 2 µl
Banelengde	1 mm
Bølgelengdeområde	260 - 280 nm
Bølgelengde nøyaktighet eller feil	± 1 nm
Spektral oppløsning eller båndbredde	Mindre eller lik 4 nm
Absorberingspresisjon eller tilfeldig fotometrisk feil	0,003 (1 mm bane)
Deteksjonsgrense	5 ng/µL RNA
Maksimum konsentrasjon	≥ 1000 ng/µL RNA

Tabell 2: Mikro-volum fotodiode U-Vis spektrofotometer for Nukleinsyre- kvantifisering

Design-egenskap	Spesifikasjoner
Prøvens volumområde	1 - 2 µl
Banelengde	0,5 mm
Bølgelengdeområde	260 og 280 nm
Spektral oppløsning	Mindre enn eller lik 8 nm
Absorberingsnøyaktighet	3 % (ved 1,05 Abs ved 260 nm)
Deteksjonsgrense	4 ng/µL RNA
Maksimum konsentrasjon	≥ 1000 ng/µL RNA

Tabell 3: Varmeblokk med varmelokk for Analyse hybridisering

Design-egenskap	Spesifikasjoner
Varmeblokk-design	- Må passe til vanlig profil, 12 x 0,2 ml plasserte strimmelrør som leveres som en del av nCounter Prep Pack. - Heat Blocks designet for Lav Profil (LP) og Høy Profil (HP) rør er ikke kompatible (også referert til som "rapid" (raske) blokker for termosyking) - Heat Blocks designet for andre typer rør (f.eks. 0,1 ml rør, 1,5 ml rør) er ikke kompatible - Må være programmerbare til å holde en temperatur på 65 °C - Må holde temperaturen på 65 °C ±1 °C
Design på oppvarmet lokk	- Faste lokk, eller lokk med justerbar høyde, er godkjent - Lokk må være programmerbare til 70 °C

Tabell 4: Sentrifuge med mikroplatebærer for å spinne nCounter Prep Plates

Design-egenskap	Spesifikasjoner
Sentrifugeringshastighet	Minimum 2000 × g
Rotorer	4 x 750 ml svingende bøtterotorer med mikroplatebærere (eller liknende) for å få plass til SBS-format 96-brønners mikroplater
Moduser	Akselerasjons-/Retardasjonsmoduser

11 INNSAMLING OG BEARBEIDING AV PRØVER

11.1 Krav til vevsprøver og patologisk undersøkelse

- Prosigna brystkreft prognostisk gensignaturanalyse bør utføres på en formalinfiksert, parafininnebygd (FFPE) hormon-reseptor positiv brystsvulstvevsprøve som videre spesifiseres av en patolog som en av følgende typer invasivt brystkarsinom:
 - Invasivt dukalt karsinom
 - Invasivt lobulært karsinom
 - Invasivt karsinom med duktale og lobulære egenskaper ("blandet type karsinom")
 - Ingen spesiell type (NST), eller ikke spesifisert (NOS)
- En patolog bør velge FFPE svulstblokk med størst område av levedyktig invasivt brystkarsinom.
- Testen krever ufargede vevsprøver på objektglass for bearbeiding og et tilsvarende H&E-farget objektglass fra FFPE svulstblokk.
- Det anbefales at vevsprøver for analysering skjæres i nærheten av den vevsprøven som er skåret for H&E-farging for å påse at det svulstområdet som er identifisert på det H&E-fargede objektglasset representerer svulstområdet på de ufargede objektglassene.
- En patolog må sirkle inn området med levedyktig invasivt brystkarsinom på H&E-objektglasset, bortsett fra omkringliggende ikke-svulst vev.
- En patolog eller faglært laborant må anslå svulstens cellularitet og overflateområde innenfor det innsirklede området på det H&E-fargede objektglasset.
 - Svulstens cellularitetsprosent på det H&E-fargede objektglasset må være ≥ 10 %.
 - Svulstens innsirklede overflateområde på det H&E-fargede objektglasset må være ≥ 4 mm².

*Merk at svulstcellularitet-rposentandel referer til prosentandel av levedyktige svulstceller innen det innringede svulstområdet.
- En totalt svulstoverflate på over 100 mm² anbefales brukt som input for testen. Følgende tabell viser antall objektglass som anbefales basert på den målte svulstoverflaten på det H&E-fargede objektglasset.

- Hvis vevsevalueringprosessen viser at svulstblokken har utilstrekkelig svulstoverflate eller svulstcellularitet, kan en annen blokk fra samme svulst undersøkes. Hvis det ikke finnes noen FFPE-blokker med tilstrekkelig svulstvev, bør ikke Prosigna-analysen utføres. Vær oppmerksom på at for svulstblokker med under 20 mm² overflate er det mer sannsynlig at RNA input-kravene ikke vil være oppfylt.

Tabell 5: Anbefalte krav til objektglass basert på svulstens overflate

Målt svulstoverflate på H&E-fargede objektglass (mm²)	Antall ufargede objektglass
4 - 19	6
20 - 99	3
≥ 100	1

11.2 Innsamling og lagring av prøver

- Følgende kan utføres i henhold til laboratoriets standard driftsprosedyrer; vevsinnsamling og formalinfiksering, FFPE svulst blokkhåndtering og lagring og frakt av objektglass med FFPE-vev.
- FFPE vevsseksjoner på objektglass må lagres i henhold til laboratoriets standard driftsprosedyrer. Hvis de lagres i en lengre periode (> 30 dager), må objektglassene lagres i et uttørket miljø og behandles innen 9 måneder for å sikre testresultatenes kvalitet.

11.3 Preparering av objektglass

- Bruk en mikrotom og skjær en 4 - 5 µm tykk del for H&E-farging.
- Bruk en mikrotom og skjær 10 µm tykke deler for bruk i Prosigna-analysen.
- La delene flyte i et vannbad på 40 °C.
- Legg delene på positivt ladede objektglass for mikroskop.
- La objektglassene lufttørke.
- Bak objektglassene over natten på 45 °C.

11.4 Bearbeiding av objektglass

- Preparer en 3 % glyseroloppløsning ved å blande 1,5 ml glyserol med 48,5 ml molekylær grad, nukleasefritt vann – skaler om nødvendig. Hell løsningen på en Coplin-krukke for bearbeiding av objektglass.
- Hell ca. 200–250 ml D-Limonene klaringsmiddel i to fargeskåler og påse at objektglassene i stativet er helt senket ned.
- Hell ca. 200 - 250 ml ren etanol (EtOH) i en tredje fargeskål.
- Sett de ufargede vevsdelene på objektglassene i et stativ.
- Sett stativet i den første D-Limonene-fargeskålen og rist stativet forsiktig frem og tilbake i 10–15 sekunder. La stativet være i den andre D-Limonene-fargeskålen i totalt 1-2 minutter.
- Flytt stativet objektglassholderen fra den første D-Limonene fargeskålen til den andre D-Limonene-skålen. Beveg objektglassholderen forsiktig frem og tilbake i 10–15 sekunder. La stativet være i den andre D-Limonene-fargeskålen i totalt 2 minutter. Påse at all parafin er fjernet; hvis ikke, la stativet være i den andre D-Limonene-fargeskålen i ca. 1 minutt til.
- Flytt stativet fra den andre D-Limonene-fargeskålen til EtOH-vasken. Beveg stativet forsiktig frem og tilbake i 10–15 sekunder og ta den ut etter 2 minutter.
- La objektglassene lufttørke i 5 - 10 minutter, eller til de er helt tørre og vevet ser hvitt ut (dette kan ta lengre tid, avhengig av vevets størrelse).
- Lag en ring rundt svulstområdet på baksiden av de ufargede objektglassene ved å samkjøre dem med tilsvarende H&E-fargede objektglass og transponer det innringede området.
- Arbeid med ett objektglass av gangen og rehydrer vevet på det innringede ufargede objektglasset ved å dyppe objektglasset i den 3 % glyseroloppløsningen.
- Fjern all overflødig glyserol fra objektglasset med en lab-serviett.
- Når flere objektglass behandles, kan objektglassene tørke på et tørkestativ mens de andre objektglassene rehydreres.
- Skrap bort alt ikke-svulstvev rundt det innringede svulstområdet med et barberblad eller en skalpell og kast det.
- Samle makro-dissekert svulstvev på kanten av et barberblad mens du holder i den ene enden av objektglasset og hvil den andre enden på en fast overflate i en 45 graders vinkel. Vevet skal "krølle" lett opp på barberbladet ettersom det samles.

- Gjenta forrige trinn for hvert objektglass fra samme prøve.
Merk: Flere ufargede objektglass fra en enkelt FFPE-prøve kan samles på samme barberblad.
- Skyv vevsdelene fra den samme prøven inn i et merket 1,5 ml mikrosentrifugerør.
- Rengjør dissekeringsnålen eller tangen ved å dyppe dem i D-Limonen i et par sekunder og la dem tørke mellom vevsprøver.

11.5 Isolering av RNA

NanoString anbefaler å bruke Roche FFPE RNA Isolation Kit, som er godkjent spesielt for bruk med Prosigna.

Andre RNA isoleringssett kan brukes for å preparere prøver for Prosigna hvis de gir RNA fra objektglassmonterte FFPE brystsvulst vevsdelene som møter følgende spesifikasjoner:

Tabell 6: Spesifikasjon av RNA Isoleringssett

Metrisk	Test eller måling	Spesifikasjon
RNA-konsentrasjon	Optisk tetthet på 260 nm	$\geq 12,5$ ng/ μ l
RNA totalt volum (μ l)	Totalt utvasket volum	≥ 12 μ l
RNA-renhet	Forholdet mellom optisk tetthet på 260 nm og optisk tetthet på 280 nm (OD 260/280 nm)	1,7-2,3
DNA-kontaminasjon	Genomisk DNA-innhold i utvasket RNA-prøve	≤ 1 ng/ μ l
RNA-integritet	Størrelsesfordeling av de isolerte RNA-fragmentene	≥ 90 % av de isolerte RNA-fragmentene må være > 100 nukleotider i lengde

RNA isolasjonsprosedyre:

Isoler RNA fra det makrodissekerte svulstvevet i henhold til produsentens instruksjoner hvis du bruker et annet sett enn Roche FFPE RNA Isolation Kit.

Følgende instruksjoner gjelder Roche FFPE RNA Isolation Kit som er anbefalt for bruk med Prosigna. Se Roche FFPE RNA Isolation Kit pakningsvedlegg for informasjon om innholdet og instruksjoner om lagring, sikkerhet og håndtering.

Preparering av arbeidsoppløsninger

- Preparer arbeidsoppløsninger før du begynner med vevsutvasking og RNA-isolering:

Preparering av arbeidsoppløsninger	
Reagens	Prosedyre
Wash Buffer I (vaskebuffer I) (WB1)*	Tilføy 15 ml 100 % etanol, oppbevar preparert WB1 i +15 til +25 °C
Wash Buffer II (vaskebuffer II) (WB2)*	Tilføy 80 ml 100 % etanol, oppbevar preparert WB2 i +15 til +25 °C
Proteinase K (PK)	Oppløs lyofilisert/frysetørket Proteinase K i 4,5 ml Reagent Preparation Buffer (RPB). Preparer 600 μ l alikvoter, merk og oppbevar alikvoter i -15 til -25 °C.
DNase I (DNase I)*	Oppløs lyofilisert/frysetørket DNase I i 740 μ l Reagent Preparation Buffer (RPB). Preparer 50 μ l alikvoter, merk og oppbevar alikvoter i -15 til -25 °C.

Merk: Elementer som er merket med en stjerne (*) er ikke påkrevet før etter at vevet er utvasket.

Vevsutvasking

- Tin et tilstrekkelig antall Proteinase K (PK) alikvoter. Etter at de er tint, oppbevar alikvoter på is til de skal brukes.
Merk: En 600 μ l PK alikvot inneholder nok Proteinase K for 4 RNA-oppløsninger.
- Føy 100 μ l med Tissue Lysis Buffer, 16 μ l med 10 % SDS og 120 μ l Proteinase K arbeidsoppløsning til prøverørene med vev.
- Vorteks prøverørene med vev i flere sekunder og spinn ned kort.
- Inkuber i 55 °C over natten (12 - 23 timer).

RNA-isolering

- Inspiser prøverørene visuelt for å fastslå om vevet er helt oppløst. En fullstendig oppløsning vil være klar og ha lite til ikke noe vev i oppløsningen.
 - Hvis oppløsningen er ferdig, gå videre til neste trinn.
 - Hvis oppløsningen ikke er ferdig, føy til 20 μ l Proteinase K og inkuber i en time til.
- Spinn kort alle prøvene (< 30 sekunder i en minisentrifuge).
- Inkuber prøvene ved 80 °C i 15 minutter.
- Preparer eller tin opp et tilstrekkelig antall DNase-alikvoter. Etter at de er tint, oppbevar alikvoter på is til de skal brukes.
Merk: En 50 μ l DNase-alikvot inneholder nok DNase for 4 RNA-isolasjoner.
- Fortynn DNase i DNase Incubation Buffer (DIB). Påkrevet mengde N (antall av) RNA isolasjons er: (N+1) x 90 μ l DNase inkuberingsbuffer + (N+1) x 10 μ l DNase. Oppbevar den fortynnte DNase-oppløsningen på is til den skal brukes.
- Føy 325 μ l Paraffin Binding Buffer (PBB) og 325 μ l ren etanol til hver prøve og bland ved hjelp av pipettering.
- Spinn kort (< 30 sekunder i en minisentrifuge).
- Plasser et High Pure Filter Tube (filtrerrør) på et High Pure Collection-rør.
- Pipetter prøven i øvre beholder av filtrerrøret og unngå alt restvev.
- Sentrifuger i 30 sekunder på 6000 x g.
- Plasser High Pure Filter Tube på et nytt High Pure Collection-rør (kast tidligere samling rør som inneholder gjennomstrømning).
- Sentrifuger i 2 minutter på 16 000 x g for å tørke filterduken helt.
- Plasser High Pure Filter Tube på ny High Pure Collection Tube (kast tidligere samling rør som inneholder gjennomstrømning).
- Føy 100 μ l DNase utvannet oppløsning på High Pure Filter Tube filterteppe og inkuber i 15 minutter i +15 til +25 °C.
- Føy 500 μ l Wash Buffer I arbeidsoppløsning (WB1) til High Pure filterteppe, sentrifuger i 20 - 30 sekunder på 6000 x g, kast gjennomstrømning.
- Føy 500 μ l Wash Buffer II arbeidsoppløsning (WB2) til High Pure filterteppe, sentrifuger i 20 - 30 sekunder på 6000 x g, kast gjennomstrømning.
- Føy 500 μ l Wash Buffer II arbeidsoppløsning (WB2) til High Pure filterteppe, sentrifuger i 20 - 30 sekunder på 6000 x g, kast gjennomstrømning.
- Sentrifuger i 2 minutter på 16 000 x g for å tørke filterduken helt.
- Sett High Pure Filter Tube i et merket RNase-fri 1,5 eller 1,7 ml mikrosentrifugerør.
- Føy 30 μ l Elution Buffer (EB) til midten av High Pure filterduken.
- Inkuber i 1 minutt ved +15 til +25 °C.
- Sentrifuger i 1 minutt på 6000 x g for å vaske ut RNA fra kolonnen. Fjern og kast High Pure filtrerrøret.
- Sentrifuger det utvaskede RNA i mikrosentrifugerøret i 2 minutter på maksimum hastighet.
- Overfør supernatanten til et 0,5 ml rør med skrukork uten å forstyrre noen glassfibre som kan være vasket av filterduken i bunnen av det opprinnelige røret.
- Mål konsentrasjonen av isolert RNA i løpet av samme arbeidsdag (lagre i +2 til +8 °C) eller frys i -70 °C inntil bruk.

11.6 Mål RNA konsentrasjon og kvalitet

- Mål optisk tetthet (OD) på 260 og 280 nm på 2 μ l av det isolerte RNA ved hjelp av et spektrofotometer som møter de definerte spesifikasjonene som er indikert i 10.3 Spesifikasjon av utstyr. Unngå pipettering av det 2 μ l volumet fra bunnen av kilderøret i tilfelle det er glassfiber igjen, noe som vil forstyrre det optiske tetthetsresultatet.
- Følg instruksjonene fra produsenten av spektrofotometeret for måling av RNA.
- Hvis noen prøve ikke oppfyller minimum RNA renhets- eller konsentrasjonsmålinger (Tabell 6), sentrifuger prøverøret i 1 minutt på maksimal hastighet ($> 10 000$ x g), legg røret på is og gjenta målingen. Hvis prøven fortsatt ikke består renhets- eller konsentrasjons- målingen, er ikke RNA-prøven egnet for analyse med Prosigna Analyseprosedyre. Det må ikke brukes RNA av utilstrekkelig kvalitet eller kvantitet i Prosigna-analysen.

- RNA-ekstraksjonen kan gjentas hvis spesifikasjonene for minimum konsentrasjon eller renhet ikke er oppfylt (Tabell 6). Brukere kan velge å isolere ekstra objektglass fra samme FFPE-blokk, eller velge en separat blokk fra samme pasient.
- Hvis RNA-konsentrasjonen overskrider 250 ng/μl, må den fortynnes med molekylær grad RNase- og DNase-fritt vann til en ønsket konsentrasjon på 200 ng/μl før gjennomføring av den nedstrøms hybridiseringsanalysen. Bruk det registrerte forholdsresultatet OD 260/280 fra den ufortynnede prøven for å avgjøre om den fortynnede prøven tilfredsstiller minimum RNA-renhet på 1,7.
- Frys RNA ved -70 °C eller lavere hvis Prosigna-analysen ikke kan fullføres i løpet av den samme arbeidsdagen.

11.7 Analyseprosedyre

Denne analyseprosedyren beskrives de skrittene som er nødvendige for å utføre Prosigna-analysen ved hjelp av Nanostring nCounter Dx Analysis System. Disse skrittene kan oppsummeres i følgende kategorier på to påfølgende dager:

Dag 1

- Installer Run Set Identification (RSID)-protokoll på nettapplikasjon
- Installer RNA hybridisering med Prosigna CodeSet (30 minutters installasjon, 15 - 21 timers hybridisering)

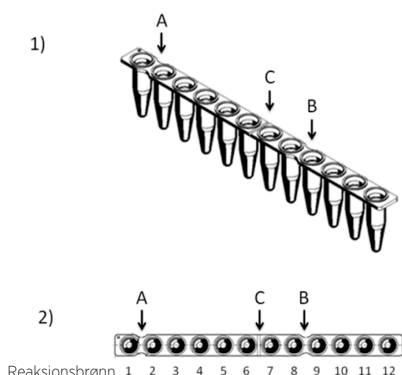
Dag 2

- Installering og kjøring av Prep Station (20 minutter installering, 2 - 3 timer per kjøring, avhengig av antall prøver som kjøres)
- Installering og skanning av Patronen på Digital Analyzer (5 min. for oppsett, 2,5 - 4,5 time for hver Patron, avhengig av antall prøver som kjøres)
- Hente opp rapport (30 minutter)

Valg av pasientprøve og Batch Set Up (gruppeinstallasjon)

- Velg de pasientprøvene som skal brukes for testkjøringen. Opptil 10 prøver kan inkluderes i en enkelt gruppe
 - Hver prøve i gruppen vil bli tildelt en unik posisjon i et strimmelrør med 12 posisjoner som brukes for hybridisering og er registrert som en del av installasjonens Run Set ID på instrumentet (Run Set ID utført med en nettgrensesnittprogramvare). Merk at posisjon 1 og 2 er reservert for referanse- prøven, og posisjonene 3 - 12 er for RNA-prøver fra svulst.
 - Bildet nedenfor viser strimmelrøret fra siden 1) og ovenfra 2). Strimmelrørene er plassert asymmetrisk mellom reaksjonsbrønn 1 og 2 (A) og mellom 8 og 9 (B) for å opprettholde orden i prøvene under prosedyren. Strimmelrørene har også hakk mellom reaksjonsbrønnene 6 og 7 (C) for å lette skjæring av strimmelrøret hvis det er nødvendig for å imøtekomme standard sentrifugeadaptere.

Figur 6: Bilde av plasserte strimmelrør



- Beregn mengden av RNA og vann (om nødvendig) som skal tilføres hybridiseringsreaksjonen for hver prøve i gruppen.
 - Anbefalt RNA-tilførsel er 250 ng for analysen. Akseptabel RNA-tilførselsområde for hybridisering er 125 - 500 ng.
 - Beregn volumet (i mikroliter) av RNA-prøven som skal tilføres hybridiseringsreaksjonen ved å dele ønsket tilførselsmengde (f.eks. 250 ng) av den målte konsentrasjonen.
 - Hvis den beregnede konsentrasjonen av prøven er mellom 12,5 ng/μl og 25 ng/μl, tilføres maksimum volum på 10 μl.

- For prøver som krever mindre enn 10 μl, beregn volumet av vann som kreves for å generere 10 μl totalt prøvolum.

Eksempel: For en prøve med målt RNA-konsentrasjon på 85 ng/μl, er 2,9 μl prøve nødvendig for en total masse på 250 ng, og 7,1 μl vann er nødvendig for å bringe volumet til 10 μl før de gjenværende reagensene tilføres. I ligning: $250 \text{ ng} \div 85 \text{ ng}/\mu\text{l} = 2,9 \mu\text{l}$

Registrering og bearbeiding av prøver

Brukeren vil bygge en unik Run Set ID for hver gruppe av prøvene og assosiere prøvenes ID-er med strimmelrørenes plassering (posisjon 3 - 12) ved hjelp av nCounter Dx Analysis System Services nettgrensesnitt. Brukeren finner instruksjoner i Bruksanvisningen om hvordan man bruker nCounter Dx Analysis System Services nettgrensesnitt.

- Hvis RNA var frosset før bruk, utfør følgende trinn før du fortsetter:
 - Tin RNA-prøvene helt og oppbevar dem på is.
 - Sentrifuger det tinte prøverøret i 1 minutt på maksimum hastighet (> 10 000 x g) og sett det tilbake på is.
 - Velg riktig Prosigna testsetstørrelse basert på antall pasientprøver som skal testes (1, 2, 3, 4 eller 10). Ta ett rør av hver av følgende CodeSet-reagenser fra den -80 °C fryseren for å tine. Oppbevar reagensene på is hvis du ikke umiddelbart skal gå videre med følgende trinn
 - Prosigna Reporter CodeSet (grønn etikett på lokket)
 - Prosigna Capture ProbeSet (grå etikett på lokket)
 - Prosigna Reference Sample (ingen etikett på lokket)
 - Fjern etiketten med CodeSet-seriens strekkode og en testkonfigurasjonskode fra CodeSet-boks.
 - Ved hjelp av en nettleser, logg inn i IVD nCounter Dx Analysis System nettapplikasjon og velg Prosigna som den analysetype for å begynne å sette opp de digitale registreringsskjemaene.
 - Gå til Hovedsiden og velg "Create New Run Set" (Opprette nytt Run Set).
 - Den første obligatorisk feltet i defineringen av en Prosigna- kjøring er Run Set ID. Oppgi en unik identifikator i Run Set ID-feltet for å identifisere gruppen med prøver.
 - Skann eller tast inn manuelt Test Configuration Code (test konfigurasjonskoden) i nettapplikasjonen. Når den er skannet eller tastet inn kan den kasseres.
 - Skann eller tast inn manuelt CodeSet Kit Number (CodeSet serienummer) i nettapplikasjonen.
 - Legg deretter den unike prøve-ID-en for den prøven som skal ligge i den tredje posisjonen/brønnen på strimmelrøret i det tilsvarende prøv-ID-feltet.
 - Oppgi pasient RNA-prøve-ID-er ved hjelp av en strekkodeleser, eller manuelt ved å legge inn prøve-ID-er ved hjelp av et tastatur.
 - Etter å ha lagt inn hver prøve-ID, klikk på tab-tasten for å fylle ut de nødvendige rullegardinfeltene (brutto svulststørrelse og nodelstatus) for prøven før neste prøve legges inn.
 - Bruk antallet positive noder som er etablert under pasientens patologisk evaluering for å velge riktig nodalkategori for testen (null, 1 - 3, ≥ 4).
 - Bruk den målte bruttostørrelsen på svulsten, eller det stadiet som ble fastslått under pasientens patologisk evaluering, for å velge riktig brutto svulststørrelseskategori for testen (≤ 2 cm eller > 2 cm).
 - Eventuelle kommentarer kan legges inn i valgfritt Memo-felt for hver prøve.
- Merk:** Hvis noen strimmelrørbrønner/posisjoner ikke er nødvendige, la de resterende feltene stå tomme. Hvis det er nødvendig med flere felter for flere prøver, bruk en annen testkonfigurasjon som rommer flere prøver.
- Etter å ha lagt inn alle prøvene, spesifiser hvilke brukere som mottar følgende:
 - Statusoppdateringer for kjøring med Prep Station og Digital Analyzer.
 - Melding om at den endelige rapporten er tilgjengelig.
 - Lagre det fullførte Run Set.
 - Run Set arbeidsark kan skrives ut og brukes for sporing av prøver og verifikasjons.

Hybridiserings reaksjonsprosedyre

Merk: Følgende trinn antar ti (10) pasientprøver og to (2) referanseprøver.

Merk: Ikke sentrifuger Reporter CodeSet met en høyere hastighet enn $3000 \times g$ eller i mer enn 10 sekunder og ikke "pulser" det for å spinne. Gjør man det, vil det få sentrifugen til å nå maksimum hastighet, hvilket kan utløse CodeSet bunnfall.

1. Programmer varmeblokken med 30 µl volum, beregnet blokk- og lokktemperatur og "for evig" tidsinnstilling (eller liknende holdetidsinnstilling). Still temperaturen på varmeblokken til 65 °C og sett det varmede lokket til 70 °C.

Merk: For følgende trinn er det avgjørende å opprettholde den rekkefølgen prøvene er lagt til strimmelrøret, slik at de har samme rekkefølge på Run Set ID.

2. Merk det plasserte 12-brønners strimmelrøret for å skille posisjonene 1 - 6 fra posisjonene 7 - 12 (se bilde av strimmelrør ovenfor).
3. Om nødvendig, kutt det 12-brønners strimmelrøret i to slik det vil passe inn i en mini-sentrifuge med en strimmelrøradapter.
4. Pipetter 10 µl av referanseprøven inn i posisjonene 1 og 2 av det plasserte strimmelrøret.
5. Pipetter det beregnede volumet med vann som er påkrevet for hver prøve i de respektive posisjonene i det plasserte strimmelrøret.
6. Pipetter det beregnede volumet med RNA som er påkrevet for hver prøve i den riktige posisjonen i det plasserte strimmelrøret med en ny pipettespiss for hver prøve.
7. Når pasientprøven er lagt til strimmelrøret, anbefales det å plassere prøverøret i et prøverørstativ i den samme rekkefølgen som da prøven ble lagt til strimmelrøret. Dette for å verifisere at prøvene ble føyd til i tilsiktet rekkefølge etter at alle prøvene er lagt inn i strimmelrøret.
8. Når alle prøvene er lagt til strimmelrøret, må du kontrollere at prøvenes rekkefølge ble opprettholdt i strimmelrøret (Run Set regneark kan brukes for å verifisere prøvenes rekkefølge).

- a. Om nødvendig, rediger Run Set ID ved hjelp av Web Application-programmet for å reflektere prøvenes orden i den endelige utformingen (se nCounter Dx Analysis System IVD User Manual for instruksjoner om hvordan du redigerer en eksisterende Run Set ID).

9. Etter at prøvenes rekkefølge er bekreftet, plasseres de enkelte RNA prøverørerne tilbake på is.
10. Lag en Master Mix som inneholder 130 µl av hybridiseringsbufferen og 65 µl av Reporter CodeSet.

Merk: Hvis Reporter CodeSet ble lagret på is, la den ekvilibrere til romtemperatur i 1 minutt før tilsetning hybridiseringsbuffer.

11. Bland prøven ved pipettering og spinn Master Mix kort.

Merk: Ikke legg Capture ProbeSet til Master Mix OG ikke lagre fullført Master Mix på is.

12. Pipetter 15 µl Master Mix i hver av de 12 brønnene. Bruk en ny pipettespiss for hver brønn.

Merk: Etter at neste trinn er fullført, må strimmelrøret plasseres i varmeblokken ved 65 °C innen 15 minutter.

13. Tilsett 5 µl Capture ProbeSet til hver brønn, ved hjelp av en ny pipettespiss for hver brønn.

14. Sett lokk på strimmelrørbrønnene og bland reagensene ved å snu strimmelrøret flere ganger og knipse med en finger for å sikre fullstendig blanding.

15. Sentrifuger prøvene i strimmelrøret kort i en picofuge eller minisentrifuge (ved $< 3000 \times g$).

Merk: Bruk en picofuge som rommer et 12-brønners strimmelrør, eller om nødvendig en minisentrifuge som korte strimmelrør.

16. Plasser strimmelrøret i en 65 °C varmeblokk med et varmet lokk. Inkuber hybridiseringsanalysen ved 65 °C i 15 - 21 timer. Hybridiseringer bør bli stående i 65 °C til de er klar for bearbeiding på Prep Station.

Merk: Kasser alle ubrukte CodeSet.

Bearbeide prøver på nCounter Prep Station

1. Finn den Prep Station som er tilknyttet Digital Analyzer.
2. Fjern nCounter-Patronen fra -20 °C lagring og la den ekvilibrere til romtemperatur i 10 - 15 minutter i folieposen.

Merk: Påse at komponenter fra samme sett brukes sammen.

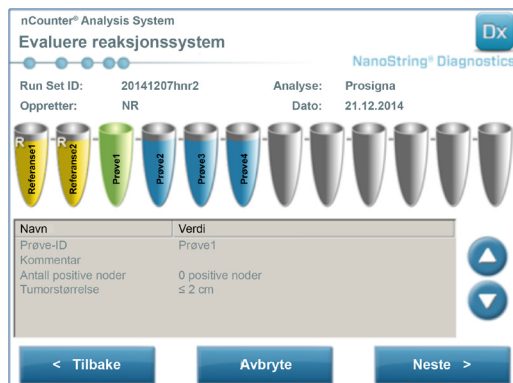
3. Når Patronen har nådd romtemperatur, ta den ut av folieposen før du legger Patronen på Prep Station-dekket.

4. Fjern nCounter Prep Plate(r) fra 4 °C lagring og la den ekvilibrere til romtemperatur i 10 - 15 minutter.

Merk: Kun en Prep Plate er påkrevet for kjøring med 1, 2, 3, eller 4 testers Prosigna-sett.

5. Sentrifuger Prep Plates på $2000 \times g$ i 2 minutter for å samle væsker i bunnen av brønnene før lasting av Prep Plates på Prep Station-dekket.
6. Mens patronene og prep-platen(e) kommer på romtemperatur, forbered Prep Station med nCounter Prep Pack forbruksvarer.
7. Bruk nCounter Prep Station berøringsskjermgrensesnitt og velg "Diagnostics"-knappen for din analyse.
8. Under "Main Menu"-skjermen velger du "Process Samples" på berøringsskjermen.
9. Søk i listen over tilgjengelige Run Set ID-er (RSID) som vises på skjermen for å bekrefte RSID for de prøvene som er under bearbeiding.
10. Velg RSID ved å berøre skjermen og velg "Next" på berøringsskjermgrensesnittet.
11. Sjekk på berøringsskjermen at riktig RSID ble valgt ved å se på hvert rør på skjermen og kryssreferer prøvens informasjon.
 - a. Run Set Worksheet er et arbeidsark som kan brukes her for prøve sporbarhet og verifisering.
 - b. Hvis feil RSID ble valgt, berør "Back"-knappen og velg riktig RSID.
 - c. Hvis RSID var riktig, men det finnes prøveregistreringsfeil, berør "Back"-knappen og gå til en datamaskin arbeidsstasjon og rediger RSID via nettapplikasjonen.

Figur 7: Bearbeid en Run-skjerm på Prep Station



12. I følgende skjermer vil du bli bedt om å skanne de forespurte Reagens Barcode-ID-ene i de åpne feltene eller bekrefte dekkplasseringen av de nødvendige forbruksvarene. Etter å ha utført hver oppgave, velg "Next" på berøringsskjermen for å gå videre til neste spørsmål.

Merk: Bare én Prep Plate og ett tomt varmeapparatets strimmelrør er nødvendig for kjøring utført ved hjelp av et 1, 2, 3, eller 4-testers Prosigna-sett. For kjøring med 1, 2, 3, eller 4-testers sett, last Prep Plate og tøm varmeapparatets strimmelrør i sine respektive frontposisjoner (nærmest brukeren) på Prep Station dekk.

13. Fjerne prøver fra varmeblokken.

Merk: Start Prep Station-kjøringen innen 15 minutter etter at prøvene er fjernet fra varmeblokken.

14. Plasser strimmelrørerne i en picofuge eller minisentrifuge og spinn kort (ved $< 3000 \times g$).

15. Fjern lokkene forsiktig fra strimmelrørerne.

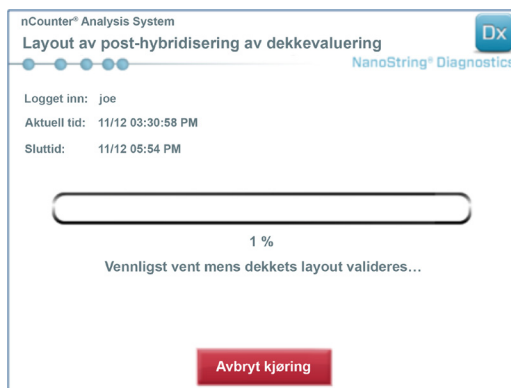
16. Hakkene på strimmelrøret og guidene på Prep Station bør opprettholde riktig rekkefølge og retning for prøvene.

17. Plasser strimmelrørerne med brønnene i rekkefølgen 1 - 12 fra venstre mot høyre på nCounter Prep Station dekket. Hvis du utfører en kjøring med et 1, 2, 3, or 4-testers sett, må kun den første halvdelen av strimmelrøret (brønnene 1-6) plasseres i den venstre siden av prøverørholderen på dekket. Vær oppmerksom på at det er viktig å bruke kun brønnene 1 - 6, og den andre halvdelen av strimmelrøret (brønnene 7 - 12) vil ikke passe inn i den venstre halvdelen av holderen på grunn av hakket i rørets design.

18. Sjekk at strimmelrørerne sitter fast på Prep Station og lukk metalldekslet.

19. Hvis lokket ikke er lukket ordentlig, vil du bli bedt om å lukke den under validering av dekkets layout.
20. Velg "Next" på berøringsskjermens grensesnitt.
21. Lukk instrumentdøra etter oppfordring og velg "Next" for å starte dekk layout validering.
22. Hvis det oppstår en feil, må du følge instruksjonene forbundet med spesifikke feil å fortsette med dekk-layout validering.

Figur 8: Validering av post-hybridisering av dekk-layout på Prep Station



23. Etter at dekk-layout er blitt validert, velg "Start Processing" (start bearbeiding) på berøringsskjermen.
Merk: Merk: Hvis du støter på problemer når du starter Prep Station, sender du dine hybridiserte prøver tilbake varmeblokken, men ikke overstig den maksimale tiden på 21 timer.
24. Følg påminnelsene på Prep Station når kjøringen er ferdig.
25. Når Prep Station har fullført kjøringen, fjern patronen forsiktig fra Prep Station og forsegle brønnene på patronen med det medfølgende patronbrønn selvklebende deksel.
Merk: Ikke la patronen forbli uforseglet på Prep Station over natten.
26. Hvis du ikke skal skanne prøvene samme dag, bør du oppbevare patronen i 4 °C i en ugjennomsiktig boks i opptil 1 uke.

Skannepatron på nCounter Digital Analyzer

1. Finn Digital Analyzer som er knyttet til den Prep Station som behandlet prøvene. Last Patronen på nCounter Digital Analyzer for skanning.
 - a. Åpne døren til Digital Analyzer.
 - b. Sett den Patronen som skal føyes til i en tom åpning.
 - c. Lukk døren og se berøringsskjermens display.
2. Digital Analyzer berøringsskjerm har flere forskjellige grafikker for rask identifisering av posisjonsstatus:
 - a. Tom posisjon: Dette sporet er tomt og klar til å bli lastet med en ny patron.
 - b. Fullført Blå patron: Fullført skanning.**IKKE FJERN FØLGENDE PATRONER:**
 - a. Hvit patron: Denne åpningen inneholder en patron som er registrert men ikke skannet.
 - b. Delvis Blå patron: Denne åpningen inneholder en patron som er under skanning
3. Patroner som er ferdig skannet kan fjernes fra Digital Analyzer.
4. Hvis dette er den første Patronen som er lastet på Digital Analyzer, klikk på "Diagnostics"-knappen, velg så "Main Menu" for å logge inn på Digital Analyzer. Hvis Digital Analyzer allerede skanner patroner, gå videre til trinn 9 nedenfor.
5. Plasser Patronen forsiktig i en ledig åpning (se veiledning om posisjonsstatus ovenfor) på Digital Analyzer. Åpningen og Patronen er plassert for å bidra til å sikre riktig retning. Barcoden vil vende opp.
6. Senk dekselet og trykk på Patronen gjennom åpningen i sporet lokket for å sikre at Patronen sitter ordentlig.
7. Berør "Start Counting"-knappen og vent til skanneren begynner skanneprosessen. Du vil høre en serie av små rytmiske klikkelyder ettersom Digital Analyzer begynner å skanne Patronen.
8. Bekreft at en blå linje vises i Patronens posisjon på skjermen (innen fem minutter etter at skanningen har startet) som indikerer at skanningen har startet.

9. For å legge til en patron til en Digital Analyzer som allerede skanner patroner, berør "Pause" på "Counting Cartridges"-skjermen og vent til Digital Analyzer stopper skanningen.
10. Åpne døra til Digital Analyzer.
11. Plasser den Patronen som skal settes i en tom åpning (se posisjonell statusveileder over).
12. Steng døra og berør "Resume".
13. Når skanningen er fullført vil programvaren sende rapporten til de tidligere spesifiserte brukeres e-postadresser.
14. Ved mottak av e-postvarsling må du fjerne den ferdige Patronen og kaste den i henhold til institusjonens retningslinjer.
Merk: Rapporter vil bli generert for fullført kjøring samt kjøring med feil knyttet til data Quality Control (QC) (kvalitetskontroll). Rapporter vil ikke bli generert i tilfelle av feil som ikke er knyttet til data QC. Kontakt NanoString kundeservice for hjelp hvis dette skjer.
15. Bruk linken festet til den e-posten, åpne nettapplikasjonen og last ned alle testrapportene som er knyttet til den RSID som er under bearbeiding.
16. Følgende feil: Følg den anbefalingen som er skissert i testrapporten for individuell prøve- eller systemfeil.
Merk: Individuelle prøvefeil er ikke ansett som systemfeil.

12 FEILSØK OG TESTFEIL

Tabell 7: Feilkoder for test gjentar seg

Feilkode	Beskrivelse av feil	Anbefalt tiltak
5	Skannefeil	Kjør på nytt prøve med 250 ng av RNA
7	Høyt signal	Spesifiser prøven om igjen og kjør testen på nytt med 125 ng av RNA
6	Lavt signal	Spesifiser prøven om igjen og kjør testen på nytt med 500 ng av RNA
30	Lavt signal	Spesifiser prøven om igjen og kjør testen på nytt med 500 ng av RNA
31	Lavt RNA-signal	Spesifiser prøven om igjen og kjør testen på nytt med 500 ng av RNA

Grunner til å gjenta analysen:

1. Analyserapporten vil identifisere feil ved prøver og ingen analyseresultater vil bli rapportert. Analyseresultatene vil bli rapportert hvis prøven(e) består.
2. Analyserapporten vil identifisere typen feil og anbefalt tiltak i tilfelle av en analysefeil. RNA-konsentrasjonen i sviktende prøver kan måles på nytt og prøvene kan kjøres på nytt (som en del av en ny gruppe/RSID) avhengig av hvilken type svikt og mengden av RNA-masse som er igjen for å oppnå et analyseresultat.

13 ANALYSERESULTATER

Prosigna-analysen omfatter en serie av kvalitetskontrollberegninger som brukes automatisk for hver prøve under analysen. Disse beregningene evaluere resultatene av analysen for å fastslå om resultatene faller innenfor de forventede verdiene. Etter vellykket analyse av disse kvalitetskontrollberegningene gir Prosigna-analysen følgende resultater:

Tabell 8: Resultater og utmating av Prosigna-analysen

Resultat	Utmatingsverdier
Den iboende subtypen av brystkreftprøven	Luminal A Luminal B HER2-beriket Basalcellelik
Individuell vurdering av sannsynligheten for fjernmetastaser innen 10 år	0 - 100 %
Risiko for tilbakefall (ROR) score	Heltallsverdi på en skala fra 0 -100
Risikokategori	Lav, middels, høy

13.1 Iboende subtyper

Den iboende subtypen av en brystkreftsvulst har vist seg å være relatert til prognose i Tidlig stadium av brystkreft. I gjennomsnitt har pasienter med en Luminal A svulst har betydelig bedre resultater enn pasienter med Luminal B, HER2-beriket, eller Basalcellelike svulster^{2,5}.

Den iboende subtypen identifiseres ved å sammenlikne genuttryksprofilen av 50 gener i en ukjent prøve med de forventede uttryksprofilene for de fire iboende subtypene. Subtypen med den mest lignende profilen er tildelt den ukjente prøven.

De vanligste undergruppene av brystkreft er de luminal subtypene, Luminal A (LumA) og Luminal B (LumB). Tidligere studier tyder på at Luminal A utgjør ca. 30 % til 40 %, og Luminal B ca. 20 % av alle brystkrefttilfeller⁵. Men flere enn 90 % av hormon-reseptor-positive pasienter har luminal svulster. Genuuttrykksmønsteret for disse subtypene ligner den luminal epitelkomponenten av brystvevet³. Disse svulstene karakteriseres ved høy ekspresjon av østrogenreseptor (ER), progesteronreseptoren (PR) og gener assosiert med ER-aktivering, så som LIV1, GATA3 og syklin D1, så vel som uttrykk av luminal cytotokeratinene 8 og 18. Luminal A brystkreft viser lavere ekspresjon av gener assosiert med cellesyklus aktivering sammenlignet med Luminal B brystkreft som fører til en bedre prognose.

Tidligere studier tyder på at HER2-beriket subtype (HER2-E) utgjør ca. 20 av brystkrefttilfellene⁵. HER2-berikede svulster er imidlertid vanligvis ER-negative, slik at bare 5 % av de testede ER-positive pasientene ble funnet å ha HER2-beriket brystkreft. Uavhengig av ER-status, HER2-berikede svulster er HER2-positive i de fleste tilfeller med høyt uttrykk for ERBB2-cluster, inkludert ERBB2 og GRB7. Gener forbundet med cellesyklusaktivering er også sterkt uttrykt.

Publiserte data tyder på at den Basalcellelike subtypen utgjør anslagsvis 20 % av brystkrefttilfellene⁵. Basalcellelike svulster er imidlertid generelt ER-negative, slik at bare 1 % av hormon-reseptor-positive pasienter har Basalcellelik brystkreft. Den Basalcellelike subtypen er nesten alltid klinisk HER2-negativ og uttrykker en rekke med "basale" biomarkører, inkludert de basale epiteliale cytotokeratinene (CK) og epidermal vekstfaktorreseptor (EGFR). Gener forbundet med cellesyklusaktivering er også sterkt uttrykt.

13.2 ROR score

ROR score er et heltall på en 0 - 100 skala som er relatert til en individuell pasients sannsynlighet for fjernmetastaser innen 10 år for det definerte bruksområdet i befolkningen. ROR score er beregnet ved å sammenligne ekspresjonsprofilen til 46 gener i en ukjent prøve med de forventede profilene for de fire iboende subtyper, som beskrevet ovenfor, for å beregne fire forskjellige korrelasjonsverdier. Disse korrelasjonsverdiene blir så kombinert med en sprednings-score og brutto svulststørrelse for å beregne ROR score.

13.3 Sannsynlighet for 10 års fjernmetastaser

ROR score for to årskull av postmenopausale kvinner med hormonreseptor positiv tidlig brystkreft ble sammenlignet med fjernmetastasefrie overlevelse etter kirurgi og bearbeiding med fem års adjuvant endokrin bearbeiding etterfulgt av 5 år med observasjon (se Kliniske prestasjoner Seksjon 16.4 for detaljer). Disse to studiene resulterte i en modell som relaterte ROR score til sannsynligheten for fjernmetastaser i denne testede pasientgruppen inkludert en 95 % konfidensintervall.

13.4 Risikoklassifisering

Risikoklassifiseringen er også tilveiebrakt for å tillate tolkning av ROR scoren ved hjelp begrensninger relatert til klinisk resultat i testede pasientpopulasjoner.

Tabell 9: Risikoklassifisering av ROR-område og nodalstatus

Nodalstatus	ROR-område	Risikoklassifisering
Node-negativ	0 - 40	Lav
	41 - 60	Middels
	61 - 100	Høy
Node-positiv (1 - 3 noder)	0 - 15	Lav
	16 - 40	Middels
	41 - 100	Høy
Node-positiv (≥ 4 noder)	0 - 100	Høy

13.5 Kvalitetskontroll

Hvert parti av Prosigna-analysens komponenter er testet ved hjelp av forhåndsbestemte spesifikasjoner. Alle sett-nivå elementer er parti-sporet, og de viktige komponentene som finnes i hvert sett er testet sammen og utgitt som et Prosigna partiset.

Prosigna Analysesett inneholder en rekke interne kontroller som brukes for å vurdere kvaliteten på hver kjøring som en helhet og hver prøve individuelt. Diss kontrollene er listet nedenfor.

Gruppekontrollsett: *In vitro* avskrevet RNA referanseprøve

En syntetisk RNA referanseprøve inngår som en kontroll i NanoString Prosigna Analysesett. referanseprøven består av *in-vitro* transkriberte RNA-mål fra 50-algoritmen og 8 housekeeping-gener. referanseprøven er behandlet i to eksemplarer i hver Prosigna analysekjøring sammen med et sett på opptil

10 ukjente brystsvulst RNA-prøver i et 12 reaksjoners strimmelrør. Signalet fra referanseprøven er analysert mot forhåndsdefinerte terskler for å kvalifisere kjøringen.

Signalet fra hver av de 50 algoritmegenerene av brystsvulst RNA- prøven er normalisert til de tilsvarende genene fra referanseprøven.

Positivt kontrollsett: *in vitro* utskrevde RNA-mål og korresponderende Capture og Reporter-prober

Syntetiske RNA-mål brukes som positive kontroller (PC-er) for Prosigna-analysen. PC målsekvensene er hentet fra External RNA Control Consortium (ERCC) DNA sequence library⁶. RNA-målene er avskrevet *in-vitro* fra DNA plasmider. Seks RNA-mål er inkludert i analysesettet i en 4-foldig titrasjonsserie (128 – 0,125 fM endelig konsentrasjon i hybridiseringsreaksjonen) sammen med de korresponderende Capture- og Reporter-probene. PC-ene er lagt til hver brystsvulst RNA-prøve og referanseprøve som er testet med Prosigna-analysen. En prøve vil bli diskvalifisert fra videre analyse hvis signalintensiteten fra PC-ene ikke oppfyller forhåndsdefinerte terskler.

Negativt kontrollsett: Eksogene prober uten mål

Negative kontrollmålsekvenser er avledet fra ERCC DNA sequence library⁶. De probene som er designet for å oppdage disse målsekvensene er inkludert som en del av analysesettet uten den tilsvarende målsekvensen. De negative kontrollene (NC-ene) blir tilsatt hver brystsvulst RNA- prøve og referanseprøve testet med Prosigna-analyse som en kvalitetskontrollforanstaltning. Prøven vil bli diskvalifisert fra videre analyse hvis signalintensiteten fra NC-ene ikke oppfyller forhåndsdefinerte terskler.

RNA Integrity Control Set (RNA integritetskontrollsett): Housekeeping-gener

Capture- og Reporter-prober, som er designet for å oppdage 8 housekeeping-gener, og 50 algoritmegener er inkludert som en del av Prosigna-settet. De 8 housekeeping-genes uttrykksnivåer blir analysert for å bestemme kvaliteten av RNA ekstrahert fra FFPE vevsprøven og skrives inn i Prosigna-analysen. Prøven vil bli diskvalifisert fra videre analyser hvis housekeeping- genes uttrykksnivåer synker under forhåndsdefinerte terskler.

Housekeeping-genene brukes også til å normalisere for eventuelle forskjeller i intakt RNA-mengde i en prøve forut for referanseprøve normalisering.

14 PROSEDYRENS BEGRENSNINGER

1. Prosigna-analysen er blitt optimalisert for å identifisere den iboende subtypen av en brystkreftsvulst og pasientens 10-års risiko for at det oppstår fjernmetastaser som en ROR score og risikokategori, ved hjelp av renset RNA ekstrahert fra formalinfixert, parafininnebygd menneskelig brystvev. Andre typer prøver eller fiksativer har ikke blitt testet og bør ikke brukes.
2. Prosigna-analysens ytelse ble validert ved hjelp av de prosedyrene som kun finnes i dette pakningsvedlegget. Endringer av disse prosedyrene kan påvirke resultatene av testen.
3. Prosigna-analysens ytelseskarakteristikk er gastsått for postmenopausale kvinner med hormonreseptor-positiv tidlig stadie av brystkreft behandlet med 5 års adjuvant endokrin bearbeiding. Ytelse med andre bearbeidingsregimer eller i andre pasientpopulasjoner er ikke bevist.
4. Hvis RNA av utilstrekkelig kvalitet eller kvantitet tilsettes analysen, kan Prosigna-analysen være ute av stand til å gi et gyldig resultat og i stedet rapportere en analysefeil.
5. Tolkningen av Prosigna analyseresultater (iboende subtype, ROR score, risikokategori) bør vurderes i sammenheng med andre klinisk-patologiske faktorer, pasientens sykehistorie og alle andre laboratorietestresultater.
6. Prosigna-analysens ytelse er blitt fastslått med RNA som tilfredsstillende de kravene som er definert med hensyn til fremgangsmåten ovenfor. Ytelsen er ikke fastslått med isolert RNA som ikke oppfyller disse spesifikasjonene.
7. Kjente forstyrrende stoffer av Prosigna-analysen omfatter genomisk DNA og ikke-svulst vev (f.eks. normalt vev). Vennligst se generelle analysehensyn før du starter prosedyren. Arealet av levedyktig invasivt karsinom må være klart identifisert av en patolog før prosedyren kjøres. I tillegg må hvert RNA-prøve behandles med DNase. Før du fortsetter med pasientens testprøver, bør hvert nytt parti DNase testes og kvalifiseres per medfølgende spesifikasjon når du bruker et annet isoleringssett enn Roche FFPET RNA isoleringssett.

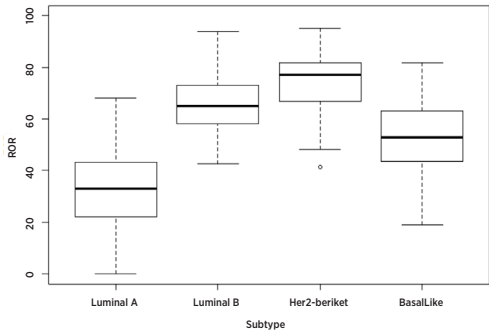
15 FORVENTEDE VERDIER

Prosigna-analysen rapporterer en ROR score (0 - 100), en iboende subtype (Luminal A, Luminal B, HER2-beriket eller Basalcellelik) og risikokategorisering (lav, middels, eller høy) for hver svulstprøve. Basert på de to kliniske valideringsstudiene som er beskrevet nedenfor av post-menopausale kvinner med HR+ tidlig stadium av brystkreft, som ble behandlet med anastrozol eller tamoxifen i ATAC- og ABCSG-8-studiene, viser området og hyppigheten av ROR score (Figur 10), det kontinuerlige forholdet mellom ROR og sannsynligheten for fjernmetastaser iht. nodalstatus (Figur 11), og distribuering av ROR scores iht. iboende subtype (Figur 9) som forventet. Basert på disse kliniske valideringsstudiene, vises fjernmetastasefri overlevelse i over 10 år iht. risikokategorisering nedenfor i Figur 12 (Node negative pasienter) og Figur 13 (Node positive pasienter; 1 - 3 noder).

15.1 ROR-område etter Subtype

Figur 9 viser et rutediagram av ROR score etter iboende subtype.

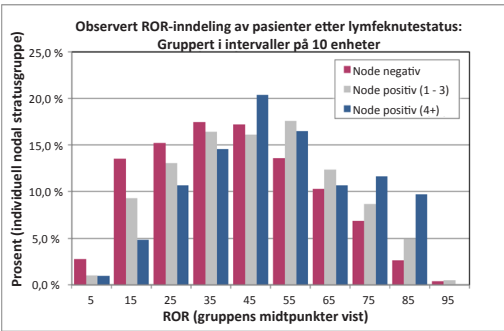
Figur 9: Rutediagram over ROR score etter iboende subtype



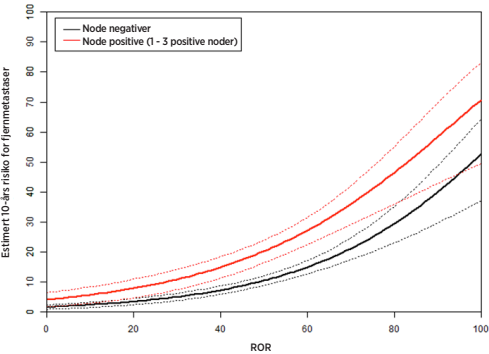
15.2 ROR score hyppighet etter nodalstatus

Histogrammet i figur 10 ble generert ved hjelp av en enkelt Cox-modell som inkluderte ROR score og kategoriske variabler for å atskille de tre gruppene hvor noder er involvert.

Figur 10: Histogram av ROR score og nodale statusgrupper



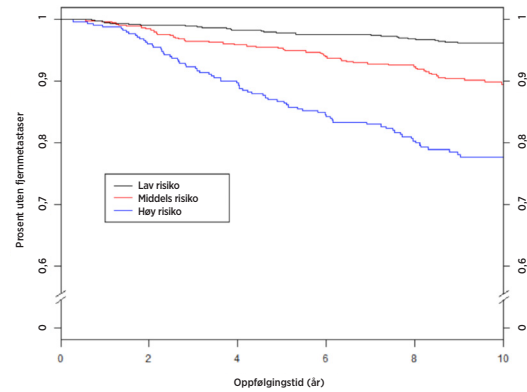
Figur 11: Ti års forutsett risiko estimert i nodalstatusgruppe



15.3 Fjernmetastase-fri overlevelse iht. risikokategorisering

Følgende data stammer fra den kombinerte analysen av TransATAC- og ABCSG-8-studiene. For å dele pasienter inn i risikogrupper, ble ROR score sammenlignet med forhåndsdefinerte risikoterskler for node negative eller node positive pasienter. Figurene 12 og 13 viser den 10 års fjernmetastasefri overlevelsen for hver risikokategorigruppe etter nodalstatus.

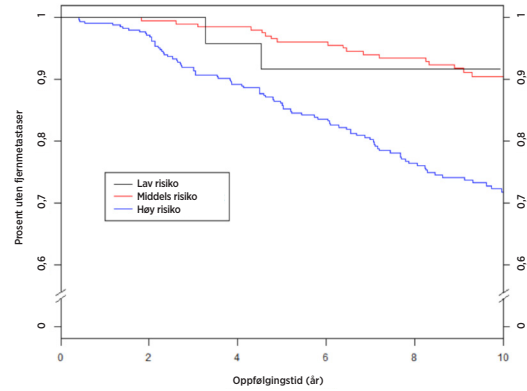
Figur 12: DRFS (fjernmetastasefri overlevelse) iht. risikogruppe for node negative pasienter



Sammendrag av data for Figur 12: DRFS (fjernmetastasefri overlevelse) iht. risikogruppe for node negative pasienter

Risikogruppe	Antall pasienter (%)	Antall hendelser gjennom 10 år	Estimert prosent uten fjernmetastaser etter 10 år [95 % CI]
Lav	875 (49 %)	31	96,2 % [94,7 % - 97,3 %]
Middels	551 (31 %)	53	89,2 % [86,1 % - 91,7 %]
Høy	360 (20 %)	73	77,7 % [72,8 % - 81,9 %]
Totalt	1786 (100 %)	157	

Figur 13: DRFS iht. Risikogruppe for node positive (1 - 3 noder) pasienter



Sammendrag av data for Figur 13: DRFS iht. Risikogruppe for node positive (1 - 3 noder) pasienter

Risikogruppe	Antall pasienter (%)	Antall hendelser gjennom 10 år	Estimert prosent uten fjernmetastaser etter 10 år [95 % CI]
Lav	24 (4 %)	2	91,7 % [70,6 % - 97,8 %]
Middels	211 (36 %)	18	90,4 % [85,2 % - 93,9 %]
Høy	355 (60 %)	87	71,8 % [66,3 % - 76,6 %]
Totalt	590 (100 %)	107	

Tabell 10: Ti års DRFS-rater for pasienter med 4 eller flere positive noder

Risikogruppe	Antall pasienter	Antall hendelser gjennom 10 år	Estimert prosent uten fjern- metastaser etter 10 år [95 % CI]
Høy	103	39	57,4 % [46,3 % - 67,0 %]

16 YTELSESEGENSKAPER

16.1 Analytisk nøyaktighet og reproduserbarhet

For å anslå total nøyaktighet og reproduserbarhet av Prosigna ble to studier utført og resultatene kombinert. Den første studien som ble utført var en nøyaktighetsstudie på nCounter Dx Analysis System som startet med ekstrahert brystsvulst RNA, og den andre studien var en reproduserbarhetsstudie som startet fra FFPE brystsvulstvev som inkluderte pre-analytiske faktorer.

RNA-nøyaktighet

16.1.1 Studiens design

En tre områders blindtest og randomisert komparativstudie ble utført med Prosigna-analysen på nCounter Dx Analysis System for å vurdere analytisk nøyaktighet. Fem sammenslåtte brystsvulst RNA-prøver ble samlet fra arkiverte FFPE-prøver for testing på hvert område. Prøvepanelet representerte prototypiske gennuttryksprofiler som var oppstått under rutinemessig testing samt hver risikoklassifiseringsgruppe.

Hvert område fullførte 18 gyldige kjøring (9 kjøring av hver operatør, hver kjøring bestående av 10 tester) etter en tilvennings- kjøring av hver operatør (Tabell 11). Hver prøve ble testet i duplikat under hver kjøring med det nominelle RNA inngangsnivået på 250 ng for analysen. Hver operatør fullførte en kjøring på en gitt dag per den generelt aksepterte standarden for lange kjøringsmetoder. Den totale studieperioden inkludert tilvenning tok mer enn 4 uker på hvert område.

Tabell 11: Oversikt over RNA nøyaktighetsstudien

Studievariabel	Antall
# brystkreft RNA-prøver	5
# prøvegentagelser per kjøring (samme patron)	2
# kjøring(er)/område	18
# kjøring(er)/dag	1
# operatører/område	2
# reagensserier/område	3
# områder	3
<i>Totalt # prøver testet per område (unntatt tilvenning) =</i>	<i>180</i>
<i>Totalt # prøver =</i>	<i>540</i>

16.1.2 Variance Components Analysis (varianskomponentanalyse)

Tabell 12 viser resultatet av varianskomponentanalysen for hvert panelmedlem. Under den estimerte variansen er prosentdelen av total varians (i parentes).

Tabell 12: Varianskomponenter etter panelmedlem (gruppert RNA-prøve)

Panelmedlem etter Risiko, Subtype	Gjennomsnitt ROR	Varianskomponent					Total varians	Total SD
		Serie	Område	Operatør	Kjøring	Kjøring til kjøring		
Lav Luminal A	31,4	0,010 (2 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,134 (30 %)	0,296 (67 %)	0,44 (100 %)	0,66
Gjennomsnittlig Luminal B	55	0,105 (18 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,046 (8 %)	0,426 (74 %)	0,576 (100 %)	0,76
Gjennomsnittlig Basalcellelik	55,4	0,059 (20 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,046 (15 %)	0,194 (65 %)	0,299 (100 %)	0,55
Høy Luminal B	64,8	0,119 (21 %)	0,014 (2 %)	0,000 (0 %)	0,064 (11 %)	0,380 (66 %)	0,576 (100 %)	0,76
Høy HER2-beriket	76,2	0,165 (37 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,277 (63 %)	0,442 (100 %)	0,66

For alle fem panelmedlemmene var total SD mindre enn 1 ROR- enhet på en skala fra 0 - 100. For alle panelmedlemmene kom de fleste variablene fra variasjoner fra kjøring til kjøring (repeterbarhet). Det var nesten ikke noen variasjoner fra område til område, eller fra operatør til operatør. En sannsynlighets forholdstest for betydningen av området utført av panelmedlem viste at områdeforskjellene var statistisk ubetydelige (p > 0,05). For hvert parti er gjennomsnitts ROR score mindre enn 1 ROR-enhet fra hverandre for hvert panelmedlem og bidrar ca. 20 % i gjennomsnitt til samlet varians.

16.1.3 Samsvar mellom subtype anrops- og risikoklassifisering

For alle panelmedlemmene var det 100 % samsvar mellom subtype resultatet og den iboende subtypen for hvert panelmedlem. For alle prøver var det 100 % samsvar mellom den målte og den forventede risikogruppen.

Vevets reproduserbarhet

16.1.4 Studiens design

En tre-områders blind- og randomisert komparativ studie ble testet ved hjelp av replikerte vevsprøver fra brystsvulster fra samme FFPE-blokk på nCounter Dx Analysis System med Prosigna- analysen. Et sett med 43 nylig høstede FFPE brystvevsprøver fra pasienter med hormonreseptor positiv brystkreft med bekreftet invasiv ductalt og/ eller lobulært karsinom ble testet som en del av studiet. Alle vevsprøvene ble sendt til det aktuelle teststedet for videre bearbeiding. De 43 prøvene ble undersøkt uavhengig av tre forskjellige patologer. For hver patolog-undersøkt vevsprøve ble det utført en testkjøring bestående av makrodissekering av vev, RNA-ekstraksjon og testing med Prosigna-analysen av en enkelt operatør på hvert sted ved hjelp av den definerte analyseprosedyren. Det isolerte RNA fra hver av vevsprøvene ble testet to ganger i separate analysekjøringer. Tre serier av RNA isoleringssettet (ett per område) og en enkelt serie av analysesettreagenser ble benyttet i utførelsen av denne studien. Et enkelt objektglass ble lagt inn for RNA-ekstraksjon for svulst med overflate på ≥ 100 mm², og 3 objektglass ble lagt inn når svultens overflate målte < 100 mm², med en minimum påkrevet svulstoverflate på 4 mm².

16.1.5 Sammendrag av testen

Anropsfrekvensen for de 43 vevsprøvene som ble evaluert på hvert av de tre områdene vises i Tabell 13.

Tabell 13: Anropshyppighet for hvert område

Område	Resultatprosent	Bestått/Totalt
1	95 %	41/43
2	93 %	40/43
3	100 %	43/43

Førti prøver ga resultater på alle områder (RNA isolering av én prøve på ett område er nødvendig å gjenta), 1 prøve gitt resultater på to områder, og 2 prøver ga resultater på ett enkelt område. Hundre prosent (100 %) av prøver som gikk igjennom vevs- undersøkelse og RNA isolasjonsspesifikasjoner fikk bestått av Prosigna-analysen. Den målte svulstoverflaten for 4/5 RNA isolasjonsfeil var ≤ 15 mm², hvilket tilsvarer mindre enn 50 mm² totalt vevsareal brukt i testen.

De 43 prøvene omfattet både node negative og node positive pasienter. De beregnede testresultatene fra de 43 prøvene representerer stort område (94 enheter) av ROR score, alle 4 iboende subtyper, og alle risikokategorier ved bruk av node negative eller node positive begrensninger for alle prøvene. De to prøvene med resultater på ett enkelt område ble ekskludert fra alle påfølgende statistiske analyser siden det ikke var tilgjengelige data for å sammenligne på tvers av områder.

16.1.6 Variance Components Analysis (varianskomponentanalyse)

Det var ingen statistisk signifikante (α = 0,05) forskjeller på tvers av risikokategorier ved bruk av en ikke-parametrisk Kruskal-Wallis-test, så varianskomponentmodellen ble tilpasset over alle risikokategorier samtidig.

Tabell 14 viser resultatene av varianskomponentanalysene med alle 41 vevsprøvene.

Tabell 14: Varianskomponenter (studie av vevets reproduserbarhet)

Varianskomponenter				Total SD
Område	Innenfor blokk	Rest	Totalt	
0,10	7,72	0,51	8,34	2,89

Områdekomponenten måler systematisk områdespesifikk variasjon, "Innenfor blokk"-komponent måler tilfeldig variasjon som er forskjellig som en funksjon av vevsprøveevaluering/-bearbeiding, eller variasjon innenfor FFPE-blokken, og restvariasjonen måler den kombinerte variasjonen fra kjøring til kjøring og variasjoner i inne-kjøring i Prosigna-analysen. Områdekomponenten er veldig liten i forhold til den tilfeldige variabiliteten inne i blokk, hvilket indikerer at forskjellene i gjennomsnitt mellom områdene var neglisjerbare (< 1 % av total varians). Restvariasjonen var i overensstemmelse med den tilsvarende variasjonen målt i RNA presisjonsstudien som hadde færre prøver, men flere gjentatte målinger (0,51 forskjell sammenlignet med et gjennomsnittlig enkelt område innenfor en Prosigna reagensparti variasjon på 0,39 for RNA presisjonsstudien).

Tabell 15 oppsummerer den totale variabilitet ved hjelp av summen av vevsbearbeidingsvariasjonen (område og innenfor blokk komponenter fra Tabell 14 fra denne studien), så vel som den totale RNA bearbeidingsvariabiliteten fra RNA presisjonsstudien (gjennomsnitt for de fem testede panelmedlemmene i Tabell 12). Pre-analytiske faktorer i forbindelse med vevsbearbeiding er den primære kilden for variasjon for testen (94 % av total varians). Den totale SD, inkludert alle kilder for variasjon, er lik 2,9, hvilket indikerer at Prosigna-analysen er et pålitelig mål på forskjellen mellom to ROR-verdier på 6,75 med 95 % sikkerhet.

Tabell 15: Total variabilitet (Vevs- og RNA-bearbeiding)

Variabilitet i vevsbearbeiding	Variabilitet i vevsbearbeiding	Total variabilitet	Total SD
7,82	0,47	8,29	2,9

16.1.7 Samsvar mellom risikokategori- og subtype-klassifikasjoner

Område-til-område-samsvaret etter pasient subtype og risikoklassifisering (lav/middels/høy risiko) vises i Tabell 16, hvor de respektive risikobegrensninger for node negative og node positive klassifiseringer ble brukt på alle prøver. De eksakt-type 95 % konfidensintervallene vises i parentes og antall prøver med resultater på begge områdene er vist i parentes. Gjennomsnittlig samsvar vises i siste kolonne. For hver sammenligning ble samsvaret beregnet i to trinn. Først, for hver vevsprøve av de fire mulige resultat-parene (to i område 1 * to i område 2) ble proporsjonen som stemte beregnet. I andre trinn ble gjennomsnittet av disse proporsjonene målt på tvers av alle de vevsprøvene som genererte resultater i begge områdene i den gitte sammenligningen.

Tabell 16: Sammendrag av samsvar mellom subtype og risikokategori iht. nodestatus

Sammenligningstype	Parvist samsvar			Middels samsvar
	Område 1 vs. Område 2 (n = 40)	Område 1 vs. Område 3 (n = 41)	Område 2 vs. Område 3 (n = 40)	
Subtype	96,3 % [86,4 % - 99,5 %]	98,8 % [91,0 % - 100 %]	95 % [83,1 % - 99,3 %]	97 %
Risikokategori Node-negativ	87,5 % [73,2 % - 95,8 %]	92,7 % [80,1 % - 98,4 %]	90 % [76,4 % - 97,2 %]	90 %
Risikokategori Node-positiv	88,8 % [75,9 % - 96,0 %]	92,7 % [80,1 % - 98,4 %]	91,3 % [79,2 % - 97,4 %]	91 %

For hver sammenligning (subtype og node negativ og node positiv risikokategorier), var middels samsvar mellom områdene minst 90 %. Der var ingen prøver hvor risikokategorien skiftet fra lav risiko til høy risiko (eller omvendt) mellom eller inne i områder. Det var bare to prøver (av 41) som ikke ga identiske subtyper på tvers av alle 6 gjentakelsene:

1. En prøve hadde to Luminal A-resultater på ett område og to Luminal B-resultater på hvert av de to andre områdene.
2. En prøve hadde duplikate Luminal A-resultater på ett område, duplikate HER2-berikede resultater på et annet område og ett hver av Luminal A- og HER2-beriket på det tredje området.

16.2 Sensitivitet/RNA-input

Beskrivelse av RNA input-studie

Studien testet 13 RNA-prøver fra brystsvulster over tre RNA input- nivåer innenfor analysespesifikasjonen (500, 250 og 125 ng) og to ekstra RNA input-nivåer utenfor spesifikasjonen (625, 62,5 ng). Hver prøve ble testet med hvert sett (2 sett totalt) i en enkel testkjøring som omfattet doble målinger på hvert nivå i spesifikasjonen og en enkelt måling for hvert nivå utenfor spesifikasjonen. Duplikat blank (dvs. ikke noe mål) målingene ble inkludert i hver kjøring. En enkelt prøve ble testet kun med en enkelt serie.

RNA Input studieresultater

Alle målte blanke prøver (n = 46) var godt under terskelen for signal og ga feil testresultat (0 % anropsfrekvens). Alle RNA svulstmålinger innenfor analysespesifikasjonen (n = 138) besto testen (100 % anropshyppighet). Hundre prosent (100 %) av prøvene med input over spesifikasjonen (625 ng) besto testen. Åttitre prosent (83 %) av prøvene (10/12) testet ved input under spesifikasjonen (62,5 ng) ga et testresultat i en rekke med 100 % i serie 2.

Den gjennomsnittlige ROR score for de 13 prøvene dekket et stort område (20 - 82). Risikogruppeklassifiseringen (lav/middels/høy) var 100 % i samsvar på

tvers av alle RNA input-nivåer for de 13 testede prøvene. Tabell 17 summerer variasjonen i ROR Score som en funksjon av RNA input. Gjennomsnittlig ROR score forskjell mellom RNA input nivåer, SD for forskjellene og 90 % konfidensintervall ble brukt for å vurdere om ROR score som var generert fra ulike RNA input nivåer var tilsvarende de som ble generert med målnivået på 250 ng. For å møte akseptkriteriet, måtte konfidensintervallet være helt inkludert i (-3,3 ROR). På de to nivåene ved ytterpunktene av spesifikasjonsområdet for analysen (125 og 500 ng RNA) var ROR scorene likeverdige med de på mål input konsentrasjonen på 250 ng for hver av de to testede seriene. For hvert nivå utenfor analysespesifikasjonen var ROR scores lik for én av seriene, men ikke for den andre.

Tabell 17: Sammendrag av ROR Score-forskjeller. Antallet er lik antall prøver som er inkludert i analysen.

Sett Serie	Masse (ng)	Antall	Gjennomsnittlig ROR-differanse	SD av differanse	Nedre tillitsgrense	Øvre tillitsgrense
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

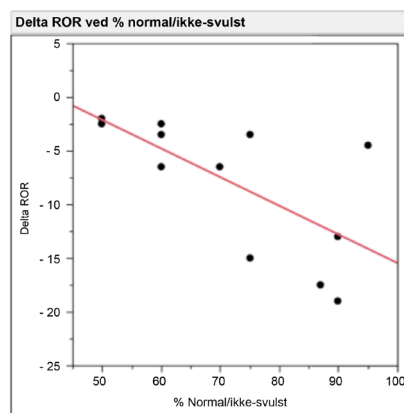
16.3 Interferenstesting

Tilstøtende normalt/ikke-svulst-vev

Tilstøtende normalt/ikke-svulst-brystvev er ofte til stede i FFPE brystsvulstblokker og kan identifiseres ved patologisk undersøkelse som et atskilt område fra området med invasiv brystkreft. Prosigna analyseprosedyren ovenfor spesifiserer fjerning av tilstøtende normalt vev med makrodissekering. For å vurdere risikoen for at normalt vev skal forurense test- resultatene, ble totalt 13 FFPE brystsvulstblokker som inneholdt patologisk bekreftet infiltrerende duktalt karsinom og ca. 50 - 95 % tilstøtende normalt/ikke-svulstvev testet med og uten makrodisse- kering av det tilstøtende vevet, og forskjellen i ROR score (delta ROR) ble fastslått.

I gjennomsnitt var ROR av den makrodissekerte svulstprøven nesten 8 ROR-enheter over det som ble observert når normalt/ ikke- svulstvev ikke ble fjernet. Figur 14 viser at ettersom mengden av normalt vev øker (opptil 95 % ikke fjernet ved makrodissekering), er det en økende risiko for at den rapporterte ROR scoren vil være en underestimert eller negativt forutinntatt (opptil -19 ROR-enheter) punktslag av en pasients risiko for tilbakefall.

Figur 14: Innflytelsen a normalt/ikke-svulstvev på Delta ROR



Nekrotisk, blødende og DCIS vevsinterferens

For å vurdere risikoen for nekrotisk/blødende/DCIS vevs- kontaminering av testresultatene, ble totalt 11 FFPE brystsvulst- blokker (3 DCIS, 5 nekrotiske, 3 blødende) som inneholdt patologisk bekreftet invasivt brystkarsinom og ca. 10 - 30 % av interferenten, testet med og uten makrodissekering av interferenten, og forskjellen i ROR score (delta ROR) ble fastslått. På de nivåene som ble testet, hadde effekten av blod/hemorragisk, DCIS og nekrotisk vev som var inkludert i prosedyren, ubetydelig virkning på den rapporterte ROR score (< 6 ROR-enheter). Det var 100 % samsvar i risikokategorioppdraget mellom elleve nekrotiske/blødende/DCIS-prøver med og uten makrodissekering.

Humant genomisk DNA

Prosigna Analyseprosedyre omfatter fjerning av humant genomt DNA (gDNA) ved utvasking med DNase. For å vurdere risikoen for gDNA forurensning av testresultatene, ble ti (10) FFPE brystsvulstblokker som inneholdt patologisk bekreftet infiltrerende duktalt karsinomtestet +/- fjerning av humant genomt DNA ved å utelate DNase-trinnet i prosedyren. I de prøvene som ble testet, var i gjennomsnitt ROR scoren 4 til 5 enheter lavere i de Lave og Middels risikogruppene når gDNA fjernes med DNase I (se Tabell 18). Når de prøvene som ikke ble DNase-behandlet deretter ble behandlet med DNase I (etterbehandling), passet ROR scorene de ROR-verdiene som var observert opprinnelig med DNase-behandling etter protokollen. Det er en risiko for at den rapporterte ROR score vil være en overestimert eller positivt forutinntatt (opptil 7 ROR-enheter) punkt estimering av en pasients risiko for tilbakefall i nærvær av gDNA. I tillegg var beregnet signal for prøver uten DNase I-behandling betydelig lavere (p < 0,05) enn de som ble behandlet med DNase I på grunn av forstyrrelser i absorpsjonsavlesning som brukes til å kvantifisere mengden av RNA før testing med Prosigna-analysen.

Tabell 18: Effekt av behandling med DNase på ROR i tumorprøver

ROR Kategori	FFPE-prøver testet	ROR forskjell m/ DNase I - uten DNase I			ROR forskjell m/ DNase I - m/ DNase I (etterbehandling)		
		Gjennomsnitt	Min.	Maks.	Gjennomsnitt	Min.	Maks.
Lav	3	-4,0	-6,0	-1,0	0,7	-1,0	3,0
Middels	2	-4,5	-7,0	-2,0	1,0	0,0	2,0
Høy	5	0,4	-1,0	2,0	0,4	-1,0	1,0

16.4 Klinisk utførelse

To kliniske valideringsstudier ble utført for å validere Prosigna brystkreft prognostisk gensignaturanalyse. Det primære målet for begge studiene var å validere publiserte observasjoner at risikoen for tilbakefall score (ROR) gir ekstra prognostisk informasjon for fjernmetastasefri overlevelse på 10 år utover standard kliniske variabler. Videre tok et sekundært mål fra begge studiene sikte på å validere tidligere observasjoner; at Luminal A- og Luminal B-pasienter iht. statistikken har forskjellig fjernmetastasefri overlevelse etter 10 år. Fordi utgangskriteriene og resultatene av disse to studiene var like, ble de to databasene kombinert og analysert med et prospektivt definert analyseplan som hadde de samme målene som de enkelte studiene.

Kombinert analyse: Generere risikokurver ved hjelp av kombinerte resultater av Prosigna-analysen fra TransATAC og ABCSG-8.

Et sammendrag av behandlings og kliniske karakteristika fra den kombinerte analysen finnes nedenfor. For individuelt studie-design og analyseinformasjon, se følgende avsnitt for Studie 1 og 2 henholdsvis.

Analyse

Tabell 19: Sammendrag av Behandling og kliniske karakteristikker i kombinert analyse av studie 1 og 2

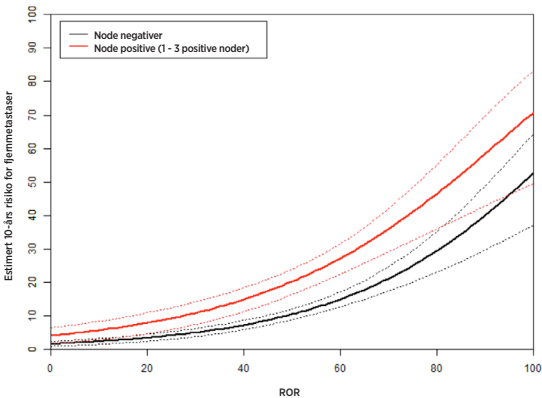
Karakteristikk	Verdi	Node-negativ (n = 1,786)		1 - 3 positive noder (n = 590)		≥ 4 positive noder (n = 103)	
		Trans ATAC (n = 739)	ABCSG8 (n = 1 047)	Trans ATAC (n = 208)	ABCSG8 (n = 382)	Trans ATAC (n = 54)	ABCSG8 (n = 49)
Behandling	Noe Anastrozol	377 (51,0 %)	528 (50,4 %)	102 (49,0 %)	184 (48,2 %)	31 (57,4 %)	25 (51,0 %)
	Kun Tamoksifen	362 (49,0 %)	519 (49,6 %)	106 (51,0 %)	198 (51,8 %)	23 (42,6 %)	24 (49,0 %)
Grad	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 %)
Tumorstørrelse	≤ 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 status	Negativ	649 (87,8 %)	984 (94,0 %)	186 (89,4 %)	367 (96,1 %)	47 (87,0 %)	46 (93,9 %)
	Positiv	90 (12,2 %)	63 (6,0 %)	22 (10,6 %)	15 (3,9 %)	7 (13,0 %)	3 (6,1 %)
Tilbakefall	Fjern	79 (10,7 %)	91 (8,7 %)	50 (24,0 %)	64 (16,8 %)	31 (57,4 %)	10 (20,4 %)
	Alle	117 (15,8 %)	121 (11,6 %)	59 (28,4 %)	73 (19,1 %)	34 (63,0 %)	10 (20,4 %)
NanoString iboende subtype	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 (37,0 %)	16 (32,7 %)
	Basalcellelik	7 (0,9 %)	6 (0,6 %)	2 (1,0 %)	2 (0,5 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
	HER2-beriket	27 (3,7 %)	32 (3,1 %)	11 (5,3 %)	14 (3,7 %)	3 (5,6 %)	2 (4,1 %)

Begge studiene hadde en behandling som besto av 5 år med Tamoksifen. I TransATAC besto den andre studiearmen av 5 år med Anastrozol, mens i ABCSG-8 besto den andre studiearm av 2 år med Tamoksifen etterfulgt av 3 år med Anastrozol. Da DR ble fremstilt som en funksjon av alle de kliniske og behandlingsvariablene, bidro ikke behandlingen særlig (p = 0,66) som en forutier for DR. Den andre hovedforskjellen mellom disse studiene var det faktum at TransATAC-studien inkluderte pasienter med Grad 3 svulster, og at den samlede tilbakefallshyppigheten var høyere i TransATAC- studien enn i ABCSG-8-studien.

Resultater

Figur 15 viser den 10-årige risikoen av DR som en funksjon av ROR score med 95 % konfidensbånd basert på separate Cox-proporsjonale faremodeller for hver av node negative og node positive (1 - 3 positive noder) pasientgrupper.

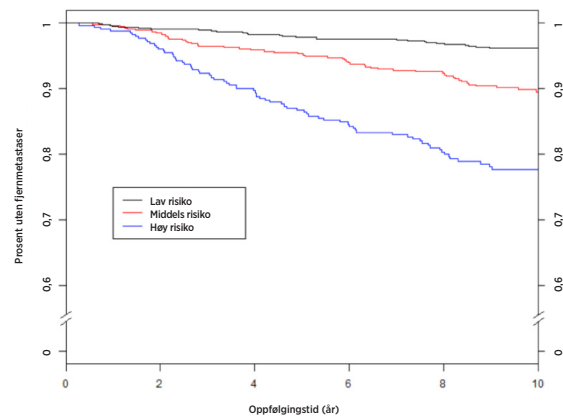
Figur 15: Ti års estimert DR-risiko ved nodelstatus med 95 % konfidens- intervaller



Figur 16 viser Kaplan-Meier og forekomstdiagrammer etter risikogruppe for node negative pasienter, og Figur 17 viser samme diagram for node positive pasienter med 1 - 3 positive noder. I hver figur er det oppgitt detaljer om prøvestørrelser, antall hendelser og anslått prosent uten fjernmetastaser på

10 år i henhold til risikogruppe. I den node positive pasientgruppen var det svært få pasienter i de forhåndsdefinerede lavrisikogrupperne, hvilket fører til at konfidens- intervallet på Kaplan-Meiers kurve, og dermed estimatet på 10-års DRFS, er svært bredt.

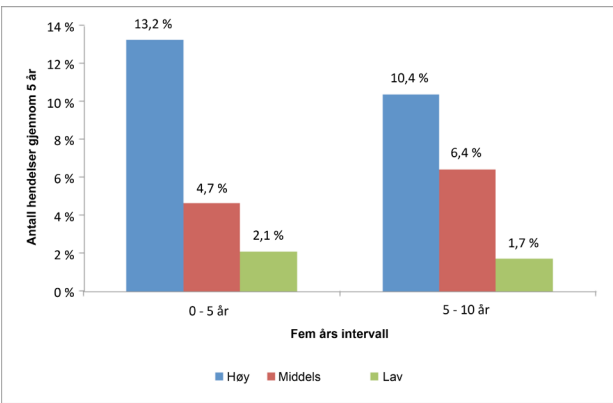
Figur 16A: DRFS (fjernmetastasefri overlevelse) iht. risikogruppe for node negative pasienter



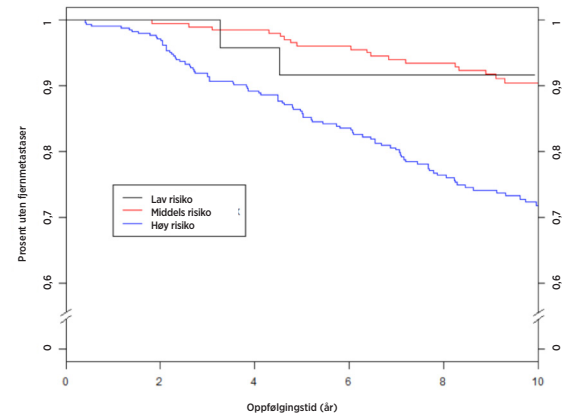
Sammendrag av data for Figur 16A: DRFS (fjernmetastasefri overlevelse) iht. risikogruppe for node negative pasienter

Risikogruppe	Antall pasienter (%)	Antall hendelser gjennom 10 år	Estimert prosent uten fjernmetastaser etter 10 år [95 % CI]
Lav	875 (49 %)	31	96,2 % [94,7 % - 97,3 %]
Middels	551 (31 %)	53	89,2 % [86,1 % - 91,7 %]
Høy	360 (20 %)	73	77,7 % [72,8 % - 81,9 %]
Totalt	1 786 (100 %)	157	

Figur 16B: Forekomst iht. Risikogruppe for Node negative pasienter i fem års Intervaller



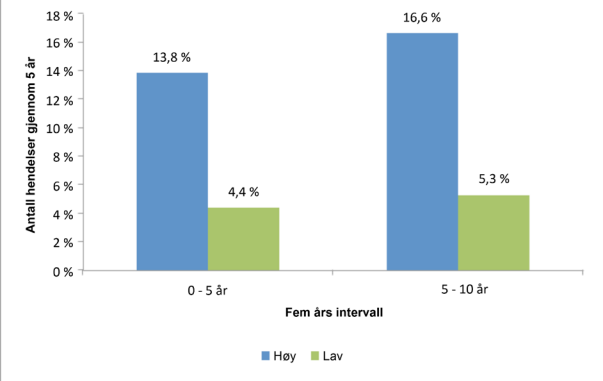
Figur 17A: DRFS etter risikogruppe for node positive pasienter med 1 til 3 positive noder



Sammendrag av data for Figur 17A: DRFS etter risikogruppe for node positive pasienter med 1 til 3 positive noder

Risikogruppe	Antall pasienter (%)	Antall hendelser gjennom 10 år	Estimert prosent uten fjernmetastaser etter 10 år [95 % CI]
Lav	24 (4 %)	2	91,7 % [70,6 % - 97,8 %]
Middels	211 (36 %)	18	90,4 % [85,2 % - 93,9 %]
Høy	355 (60 %)	87	71,8 % [66,3 % - 76,6 %]
Totalt	590 (100 %)	107	

Figur 17B: Forekomst iht. Risikogruppe for Node negative pasienter i fem års Intervaller



Siden det bare var 24 pasienter med 2 hendelser i lavrisiko- node positiv-gruppen, ble disse pasientene kombinert med de mellomliggende pasientene for sent tilbakefalls-analyse i Figur 17B.

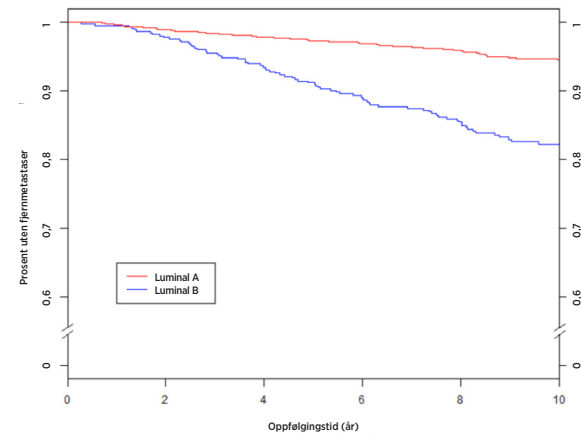
Alle 103 pasienter i den kombinerte databasen med 4 eller mer positive noder er klassifisert som høy risiko-pasienter. Tabell 20 viser DRFS-hyppigheten etter 10 år for disse pasientene.

Tabell 20: Ti års DRFS-rater for pasienter med 4 eller flere positive noder

Risikogruppe	Antall pasienter	Antall hendelser gjennom 10 år	Estimert prosent uten fjernmetastaser etter 10 år [95 % CI]
Høy	103	39	57,4 % [46,3 % - 67,0 %]

Flertallet av pasientene i den kombinerte studien (96 %) var enten Luminal A eller Luminal B. Figur 18 viser en sammenligning av DRFS iht. Luminal subtype for node negative pasienter.

Figur 18: Kaplan-Meier-kurver for DRFS ved lboende subtype for node negative pasienter

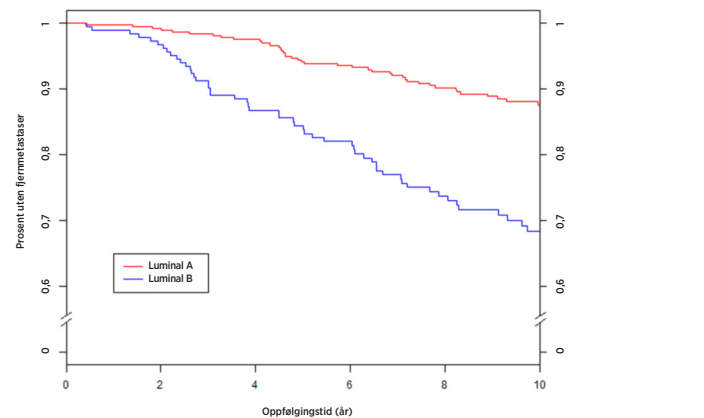


Sammendrag av data for Figur 18: Kaplan-Meier-kurver for DRFS ved Iboende subtype for node negative pasienter

Risikogruppe	Antall pasienter	Antall hendelser gjennom 10 år	Estimert prosent uten fjernmetastaser etter 10 år [95 % CI]
Luminal A	1254	62	94,6 [93,1 - 95,8]
Luminal B	460	75	81,9 [77,7 - 85,3]
Totalt	1714	137	

Figur 19 viser den samme sammenligningen for node positive pasienter med 1 - 3 positive noder. For begge grupper var det betydelige forskjeller mellom DRFS av Luminal A og Luminal B pasienter.

Figur 19: Kaplan-Meier-kurver for DRFS ved iboende subtype for node positive pasienter med 1 - 3 positive noder



Sammendrag av data for Figur 19: Kaplan-Meier-kurver for DRFS ved iboende subtype for node positive pasienter med 1 - 3 positive noder

Risikogruppe	Antall pasienter	Antall hendelser gjennom 10 år	Estimert prosent uten fjernmetastaser etter 10 år [95 % CI]
Luminal A	375	41	87,6 [83,5 - 90,8]
Luminal B	186	52	68,3 [60,4 - 75,0]
Totalt	561	93	

Det var kun 98 luminal subtype pasienter i den kombinerte databasen med 4 eller flere positive noder. Tabell 21 nedenfor viser DRFS-hyppigheten etter 10 år for disse pasientene, som også viser en mye høyere risiko når man har en Luminal B subtype.

Tabell 21: Ti års DRFS-hyppigheter for pasienter med 4 eller flere positive noder av Luminal subtype

Risikogruppe	Antall pasienter	Antall hendelser gjennom 10 år	Estimert prosent uten fjernmetastaser etter 10 år [95 % CI]
Luminal A	62	17	68,3 [53,6 - 79,3]
Luminal B	36	20	38,0 [21,4 - 54,5]
Totalt	98	37	

Sent tilbakefallsanalyse

I de tidligere beskrevne kombinerte analysedataene, er ikke hendelsesratene innen hver risikogruppe konstant over 10-års intervallet, som fremgår av Figur 16B og 17B. For ytterligere å forstå DR i slutten av tilbakefallsperioden, ble en post-hoc retrospektiv analyse av kombinerte data som er beskrevet ovenfor, gjennomført for undergruppen av pasienter som var fri for fjernmetastaser gjennom fem år (totalt 2163 pasienter⁸). Av disse var 1605 node negative pasienter og 488 var node positive pasienter (1 - 3 positive noder). For hver nodegruppe viser verdiene under x-aksen det 5. året i figur 20 og 21 antall pasienter iht. risikogruppe som er i fare etter fem år, dvs. kvalifisert for sent tilbakefallsanalysen.

Tabell 22 gir en oppsummering av behandlingen og kliniske kjennetegn for node negative og node positive (1 - 3 noder) pasienter i sent tilbakefallsanalysen.

Tabell 22: Oppsummering av Behandling og kliniske kjennetegn for sent tilbakefallsanalysen

Karakteristikk	Verdi	Node Negativ (n = 1,605)		Node Positiv (1 - 3 noder) (n = 488)	
		ABCSG8 (n = 944)	ransATAC (n = 661)	ABCSG8 (n = 311)	TransATAC (n = 177)
Behandling	Noe Anastrozol	480	346	153	89
	Kun Tamoksifen	464	315	158	88
Grad	God	192	158	46	36
	Moderat	752	394	265	105
	Dårlig	0	109	0	36
Tumor Størrelse	≤ 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 Status	Negativ	888	590	300	157
	Positiv	56	71	11	20
Tilbakefall	Fjern	41	40	28	29
	Alle	71	78	37	37
NanoString Iboende subtype	Luminal A	674	488	218	112
	Luminal B	245	150	87	54
	Basalcellelik	4	5	0	1
	HER2-beriket	21	18	6	10

Det primære målet var å vurdere muligheten av ROR Score for å gi betydelig prognostisk tilleggsinformasjon for DRFS utover standard kliniske variabler i år 5 til 10. En nullmodell bestående av CTS alene ble sammenlignet med en alternativ modell bestående av CTS og ROR ved hjelp av en sannsynlighetsforholdstest (LR). ROR la til statistisk signifikant informasjon for post 5-års DRFS utover standard kliniske variabler for alle pasienter (p < 0,0001) samt for node negative (p < 0,0001) og node positive (1-3 noder) pasienter (p < 0,0001).

Tabell 23 viser en oppsummering av risikoforholdet for en 10 poengs endring basert på en univariabel og en flervariabel analyse som omfattet både ROR Score og CTS. Risikoforholdene for ROR Score er alle signifikant forskjellig fra 1, selv etter justering for CTS. C-indeks vises også i Tabell 22. For begge gruppene var C-indeksen betydelig forskjellig fra ingen-informasjons-verdien på 0,5.

Tabell 23: Sammendrag av tilbakefallstesting

Antall positive noder	N	Risikoforhold: 10 punkter ROR Score-endering		C-Index med 95 % Konfidensintervaller		
		Univariabel analyse	Flervariabel analyse	C-Index	Nedre	Øvre
0	1605	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 %

Majoriteten av pasientene i de to studiene var HER2-negative. Tabell 24 viser fordelingen av HER2-status for node negative og node positive (1-3 noder) kvinner. For begge gruppene var over 90 % av kvinnene i studiene HER2-negative.

Tabell 24: Distribusjon av HER2-status iht. antall positive noder

Pasient undersøkt	HER2-status		Totalt
	Negative	Positive	
Node negative pasienter	1478 (92,1 %)	127 (7,9 %)	1605
Node positive pasienter med 1 - 3 positive noder	457 (93,6 %)	31 (6,4 %)	488

Tabell 25 viser en sammenligning av den flervariabel modellen som er tilpasset alle pasienter i en gitt nodegruppe og den modellen som er tilpasset alle HER2-negative pasienter i gruppen. Det er ingen statistisk signifikante forskjeller.

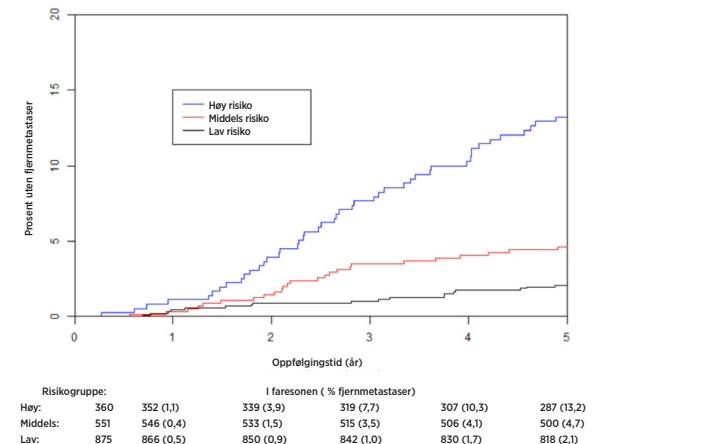
Tabell 25: Flervariable risikoforhold for 10 punkter ROR-Score endring: Alle pasienter i undergruppen hhv. HER2-negative pasienter i undergruppen

Antall positive noder	Alle pasientene [95 % CI]	HER2-negative pasienter [95 % CI]
Node negative pasienter	1,29 [1,15 - 1,46]	1,35 [1,19 - 1,54]
Node positive pasienter med 1 - 3 positive noder	1,34 [1,16 - 1,53]	1,29 [1,11 - 1,50]

Sammenligningen på tvers av risikogrupper er videre utforsket i Figur 20 og 21, som viser kurver over forekomster for tidlige og sene fjernmetastaser konstruert iht. risikogruppe i node negative og node positive (1 - 3 noder) pasienter henholdsvis. Forekomstkurvene dekker den tidlige tilbakefallsperioden (de første 5 årene) og den sene tilbakefallsperioden (mellom 5 og 10 år etter diagnose). Umiddelbart under x-aksen viser hver figur antallet kvinner med risiko og den kumulative forekomsten. Sammendragstabellene under figurene viser konfidensintervallene for den kumulative DR-hyppigheten etter 5 eller 10 år for de kvinnene som var DR-frie etter fem års behandling. For node positive (1 - 3 noder) pasienter representert i Figur 21, er den lave og middels risikogruppen kombinert p.g.a. få pasienter i lavrisikogruppen.

Lavrisikobefolkningen har en lav sannsynlighet for tilbakefall mellom år 5 og 10 etter 5 år med endokrin behandling, som demonstrert av de kumulative forekomstkurvene og tilhørende risikoforholdene for hver risikogruppe. I kontrast har middels og høyrisikobefolkninger en vedvarende risiko for sent fjern tilbakefall etter fem år med endokrin behandling. Forskjellen i resultat mellom Middels og Høy Risiko nodenegative befolkninger etableres de første 5 årene (DR rate = 13,2 % [9,6 % - 16,7 %] for Høy Risiko og 4,7 % [2,9 % - 6,4 %] for Middels risiko pasienter) og vedvarer inntil 10 år; tilbakefallsprosentene for middels og høy risikogrupper etter 5 år med endokrin behandling er imidlertid svært like.

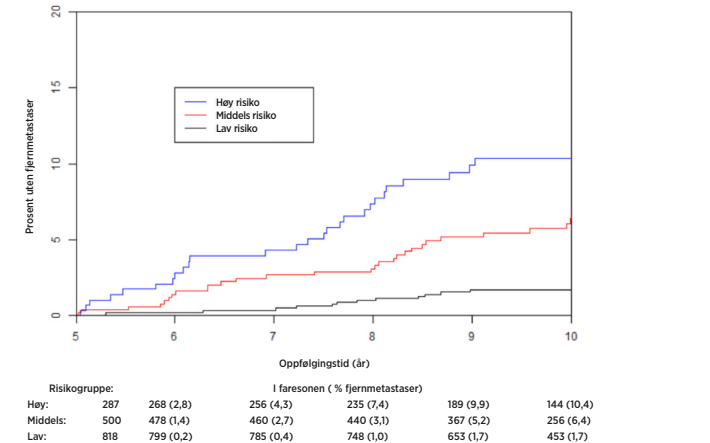
Figur 20A: Forekomstkurvene for fjernmetastaser iht. Risikogruppe fra 0 - 5 år: Node-negative pasienter



Sammenndrag av data for Figur 20A: Forekomstkurvene for fjernmetastaser iht. Risikogruppe fra 0 - 5 år: Node-negative pasienter

DR-rater iht. Risikogruppe opptil 5 års fullført behandling [95 % konfidensintervaller]		
Høy	Middels	Lav
13,2 % [9,6 % - 16,7 %]	4,7 % [2,9 % - 6,4 %]	2,1 % [1,1 % - 3,1 %]

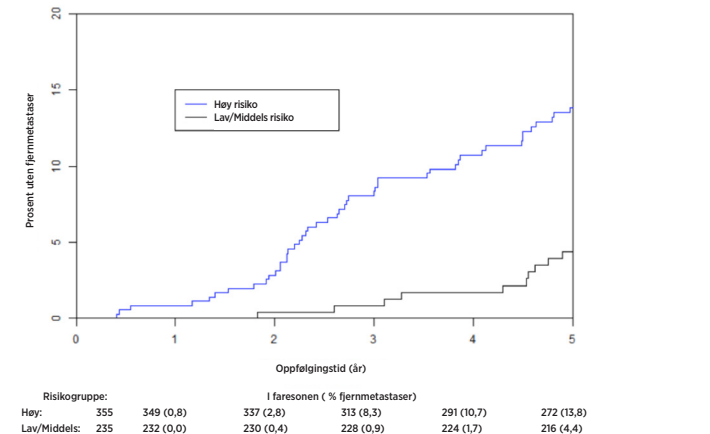
Figur 20B: Forekomstkurvene for fjernmetastaser iht. Risikogruppe fra 5 - 10 år: Node-negative pasienter



Sammenndrag av data for Figur 20B: Forekomstkurvene for fjernmetastaser iht. Risikogruppe fra 5 - 10 år: Node-negative pasienter

DR-rater iht. Risikogruppe 5 år etter DR-fri fullført behandling [95 % konfidensintervaller]		
Høy	Middels	Lav
10,4 % [6,6 % - 14 %]	6,4 % [4,1 % - 8,7 %]	1,7 % [0,8 % - 2,6 %]

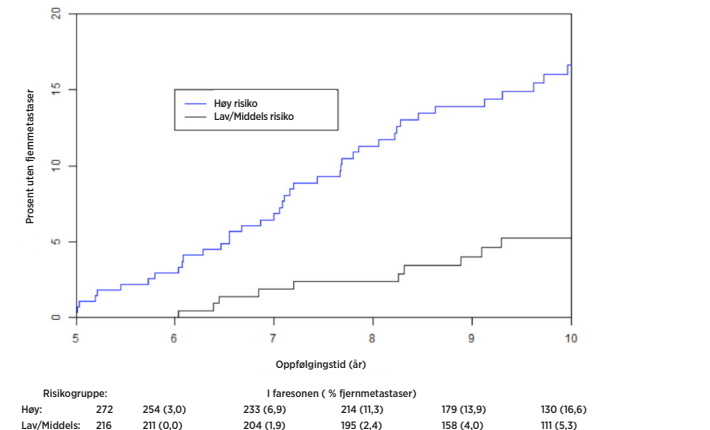
Figur 21A: Forekomstkurver for fjernmetastaser iht. Risikogruppe fra 0 - 5 år: Node positive (1 - 3 noder) pasienter



Sammenndrag av data for Figur 21A: Forekomstkurver for fjernmetastaser iht. Risikogruppe fra 0 - 5 år: Node positive (1 - 3 noder) pasienter

DR-rater iht. Risikogruppe opptil 5 års fullført behandling [95 % konfidensintervaller]	
Høy	Lav / Middels
13,8 % [10,1 % - 17,4 %]	4,4 % [1,7 % - 7,0 %]

Figur 21B: Forekomstkurvene for fjernmetastaser iht. Risikogruppe fra 5 - 10 år: Node positive (1 - 3 noder) pasienter



Sammendrag av data for Figur 21B: Forekomstskurvene for fjernmetastaser iht. Risikogruppe fra 5 - 10 år: Node positive (1 - 3 noder) pasienter

DR-rater iht. Risikogruppe 5 år etter DR-fri fullført behandling [95 % konfidensintervaller]	
Høy	Lav / Middels
16,6 % [11,7 % - 21,3 %]	5,3 % [2,0 % - 8,4 %]

Kombinerne analysekonklusjoner

ROR-score ble vist å tilføre betydelig prognostisk informasjon i slutten av tilbakefallsperioden mellom 5 og 10 år etter diagnose og over standard kliniske variabler i kombinert studie for pasienter som var fjernmetastasefrie gjennom fem år. Ved hjelp av risikogrupper som definert ved grunnlinjen for hver av node-tall spesifikke kohorter, viste risikogruppene seg å klassifisere hele settet av pasienter i grupper med betydelig forskjell i sen fjernmetastaserisiko. Både de kontinuerlige og de ROR Score-baserte risikogruppe- analysene viste lik prognostisk informasjon i ulike undergrupper. Ingen vesentlige forskjeller ble sett mellom resultatene som brukte HER2-negative pasienter sammenliknet med alle pasientene.

I hver av TransATAC- og ABCSG-8-studiene hadde ROR blitt vist å legge til signifikant prognostisk informasjon utover standard kliniske og behandlingsvariabler, både når det var inkludert som et kontinuerlig tiltak, og når den var inkludert ved hjelp av tre forhåndsdefinerte risikogrupper. De to studiene hadde ulike risikoprofiler i den forstand at eventhyppigheten var høyere i TransATAC-studien enn i ABCSG-8- studien; dette er klart når man sammenligner DRFS (%) i kontroll- gruppene til ATAC (90,8 %) og ABCSG8 (92,5 %) som er rapportert i litteraturen^{9,10}. Denne analysen kombinerte data fra de to studiene med like vektorer for å generere risiko-profiler som forventes å kunne generaliseres mer til andre pasientgrupper enn resultater fra de individuelle studiene.

Studie 1: Forutsigelse av risiko for fjernmetastaser hos postmenopausale kvinner med node negativ eller node positiv hormonreseptor positiv tidlig brystkreft som er behandlet med Arimidex eller Tamoksifen: en TransATAC-studie.

Studiens design

Den kliniske valideringsstudien ble designet for å validere at risikoen for tilbakefall (ROR score) gir ekstra prognostisk informasjon for Distant Recurrence-Free Survival (DRFS) - fjernmetastasefrie overlevelse) utover standard kliniske variabler som bruker alle tilgjengelige pasientprøver. Denne studien benyttet RNA som var isolert fra FFPE brystsvulstvev fra en undergruppe av pasientene som deltok i ATAC-prøven¹¹. ATAC-prøven inkluderte 9366 pasienter over tre studiearmene (1:1:1) der pasientene ble valgt tilfeldig til å motta 5 års endokrin behandling med 1 mg anastrozol (dvs. arimidex) pluss en tamoxifen placebo, 20 mg tamoxifen pluss anastrozol placebo, eller en kombinasjon av tamoksifen/ arimidex. Kombinasjons behandlingsgruppen ble utviklet etter den første analysen fordi det viste ingen effekt eller toleransefordeler sammenliknet med tamoxifen alene. En 10 års middels oppfølging av ATAC-prøven monoterapiarmene ble nylig rapportert for å tilfredsstille kravene fra FDA til oppdatert informasjon om sikkerhet og effekt⁹. For hormonreseptor positive pasienter, var det en betydelig forbedring i DFS (HR = 0,86), RFS (HR = 0,79) og DRFS (HR = 0,85) for de pasientene som ble behandlet med anastrozol sammenliknet med tamoxifen i denne analysen. Absolutte forskjeller i fjernmetastasefrie overlevelse mellom anastrozol og tamoksifen økte over tid fra 2,7 % etter 5 år til 4,3 % etter 10 år. TransATAC-prosjektet ble startet i 2002 under TA/01-protokollen for å etablere en vevbank fra arkivert histopatologi FFPE-blokker fra ATAC-pasienter i retrospekt¹¹.

Totalt 2006 blokker ble innhentet fra de 4160 kvinnene med hormonreseptor positiv brystkreft som ble valgt tilfeldig til monoterapigruppene av ATAC-prøven. Av de FFPE-blokkene ble 1372 samlet inn fra pasienter i Storbritannia og inneholdt tilstrekkelig invasivt svulstvev for analyse ved hjelp av Genomic Health® Oncotype Dx® test¹². Oncotype Dx Recurrence Score® (RS) ble fastslått basert på FFPE- blokkene og studieresultatene validerte RS klinisk for å anslå fjernmetastasefrie overlevelse i HR+ postmenopausale brystkreftpasienter som ble behandlet med anastrozol eller tamoxifen. Resten av RNA fra Oncotype Dx-studien ble sendt til Royal Marsden Hospital i London, hvor den ble oppbevart i -70 °C. Totalt 1017 pasienter fra Oncotype Dx-studien hadde > 500 ng av RNA igjen og ble testet med NanoString som en del av NanoString kliniske valideringsstudie.

Denne studien brukte de iboende subtype som var generert av analysen og evaluerte to versjoner av ROR score ved hjelp av en forhåndsdefinert sekvensiell tilnærming. De to forskjellige ROR score, som hver spenner fra 0 - 100, ble beregnet ved hjelp av enten alle 50 testgener, som kunngjort² tidligere, eller en 46-genet undergruppe. I hvert tilfelle ble koeffisientene beregnet fra en Cox-modell som omfatter Pearson korrelasjon til de 50 eller 46 genene som brukes for å beregne hver iboende subtype, en sprednings score og tumorstørrelse. Alle analysene ble utført på 10 år av oppfølgingsdata.

Det primære slutt punktet var fjernmetastasefrie overlevelse (DRFS). Dette ble definert som intervallet fra diagnose til fjernmetastaser eller død på grunn av brystkreft. Det sekundære slutt punktet var metastasefrie overlevelse (RFS). Dette ble definert som intervallet fra diagnose til første tilbakefall (lokale-, regionale-, eller fjernmetastaser) eller død på grunn av brystkreft.

Ved hjelp av alle tilgjengelige pasientprøver, ble flervariabel forholds- messige farer (PH) Cox-modeller montert for å evaluere det overordnede målet i sekvensielle tester av ROR basert på 50 og 46 gener. Modellen inkluderte standard kliniske kovariater (alder, tumorens grad, tumor størrelse, nodal status, adjuvant terapi). En Cox-modell ble deretter montert og en sannsynlighets forholdstest ble brukt til å teste om ROR la til statistisk signifikant ($\alpha = 0,05$) ekstra prognostisk informasjon utover det som inngår i Clinical Treatment Score (CTS) (klinisk behandlingsresultat). CTS er en optimalisert kombinasjon av klinisk-patologiske faktorer som er utviklet av den kliniske etterforskeren som et mål på standard patologi¹². De primære analysene ble gjentatt for ulike pasient undergrupper (alle, node negative, node positive, eller bare HER2-negative) og endepunkter (DRFS eller RFS).

For hver av de node negative og node positive pasientene ble Cox-modeller (unntatt CTS) brukt til å forutsi 10-årsrisikoen for DR som en funksjon av ROR. Basert på disse modellenes forutsigelser ble tre risikogrupper definert som:

Lav risiko:	< 10 % mulighet for DR innen 10 år
Middels risiko:	10 - 20 % mulighet for DR innen 10 år
Høy risiko:	> 20 % sjanse for DR innen 10 år

Analyse

Kaplan-Meier-diagrammer ble opprettet for hver risikogruppe. Sannsynlighetsforholdstester (brukt for å sammenligne to statistiske modeller), som beskrevet i den primære analysen, ble utført for Genomic Health's Oncotype Dx test (RS, Recurrence Score/ hyppighet av tilbakefall) og hovedetterforskerens immunhisto- kjemibaserte test (IHC4). Disse resultatene ble sammenliknet med de som ble oppnådd for ROR for å bestemme i hvilken grad hver scoringssystem gir ytterligere prognostisk informasjon utover CTS. IHC4-resultatene vil ikke bli diskutert videre siden det er vanskelig å sammenligne dem med de andre analysene fordi IHC4-testen ble innrettet ved hjelp av TransATAC studiedata.

Tabell 26: Sammendrag av demografi og kliniske karakteristika

Karakteristikk	Gjeldende studie (n = 1007)		Innledende studie fra hvilken RNA ble oppnådd (n = 1231)	Single Agent Arms av ATAC Ikke inkludert (n = 2929)
	# pasienter	% pasienter		
Nodalstatus				
Negativ	701	70 %	71 %	68 %
Positiv	268	27 %	25 %	25 %
Ukjent	38	4 %	4 %	7 %
Tumorstørrelse				
≤ 1 cm	138	14 %	67 %	70 %
1 - 2 cm	523	52 %		
2 - 3 cm	253	25 %	33 %	30 %
> 3 cm	93	9 %		
Tumorens grad				
God	213	21 %	27 %	25 %
Moderat	601	60 %	57 %	59 %
Dårlig	193	19 %	16 %	17 %
Alder				
Gjennomsnitt	64,4 år		64,3	66,1

Tabell 27: Flere kliniske karakteristikker

Karakteristikk	Antall pasienter	% av pasienter
Subtype		
Basalcellelik	9	1 %
HER2-beriket	41	4 %
Luminal A	692	69 %
Luminal B	265	26 %
Behandling		
Anastrozol	513	51 %
Tamoksifen	494	49 %
Tilbakefall		
Alle	210	21 %
Fjern	160	16 %
HER2 status		
Negativ	888	88 %
Positiv	119	12 %

Resultater

Den første analysetesting viste at ROR score gir ekstra prognostisk informasjon for fjernmetastasefri overlevelse utover standard kliniske variabler (CTS). Alle rapporterte ROR-data som følger er basert på 46 gener, siden dette er grunnlaget for ROR som rapportert av Prosigna-analysen.

Tabell 28: Første analysetesting av ROR

Nullmodell	Alternativ modell	$\Delta LR \chi^2$	χ^2 p-verdi
CTS	CTS + ROR	34,21	P < 0,0001

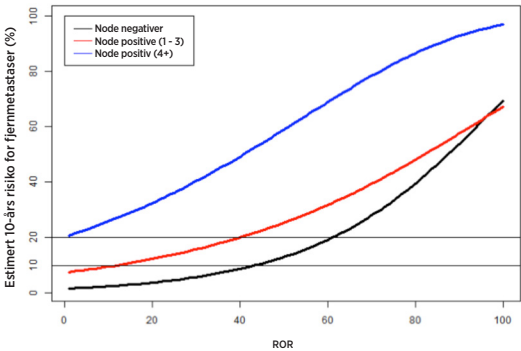
Sekundære analyser viste at ROR er vesentlig relatert til fjern- metastasefri overlevelse og legger til prognostisk informasjon utover CTS i flere klinisk relevante undergrupper.

Tabell 29: Gjentakelse av første analysetest for predefinerte undergrupper

Temagruppe	Sluttpunkt	# pasienter	# hendelser	CTS+ROR vs. CTS	
				$\Delta LR \chi^2$	χ^2 p-verdi
Alle	DRFS	1007	160	34,2	< 0,0001
	RFS	1007	210	31,2	< 0,0001
HER2-negativer	DRFS	888	131	28,9	< 0,0001
	RFS	888	179	26,9	< 0,0001
Node negative	DRFS	739	79	25,0	< 0,0001
	RFS	739	117	21,5	< 0,0001
Node positive	DRFS	268	81	9,3	0,0023
	RFS	268	93	10,6	0,0011
HER2-negativ node negativer	DRFS	649	62	24,6	< 0,0001
	RFS	649	98	20,8	< 0,0001

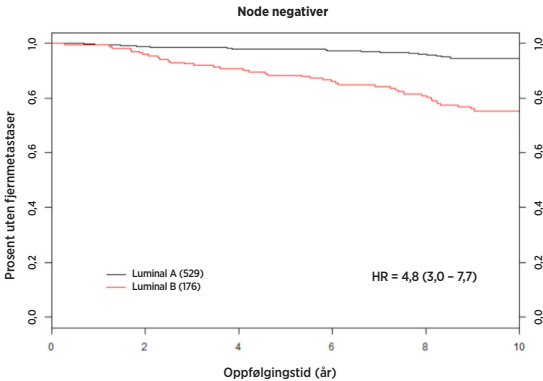
Primære og sekundære analyser viste at ROR ble kontinuerlig relatert til DRFS hos alle pasienter og i alle undergrupper.

Figur 22: Ti års spådd tilbakefallsrisiko beregnet ved analyse av ROR score innenfor Nodal Status Group (nodalstatusgruppe).

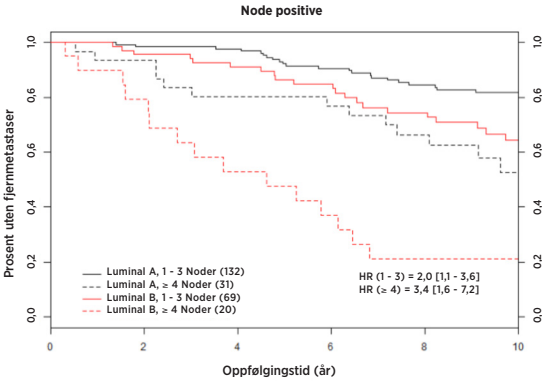


Sekundære analyser viste at Luminal A og Luminal B subtyper hadde statistisk sett betydelig forskjellige resultater i hver under- gruppe av pasienter som definert av nodalstatus.

Figur 23: Kaplan-Meier-kurver for DRFS for node negative pasienter etter iboende subtype

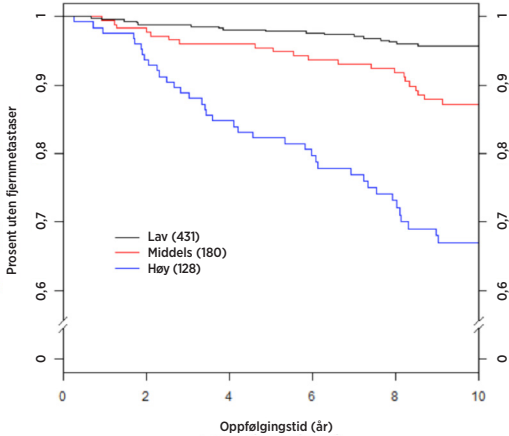


Figur 24: Kaplan-Meier-kurver for DRFS for node negative pasienter etter iboende subtype



Figur 25 og 26 viser at innenfor hver nodalkategori var den absolutte kliniske risikoen for de pasientene som ble forutsett å ha lav risiko vesentlig forskjellig fra den absolutte kliniske risikoen for de pasientene som ble forutsett å ha høy risiko; de pasientene som ble forutsett å være lav risiko hadde opplevd 10 års DR-hyppigheter på mindre enn 10 %, mens de pasientene som ble forutsett å være høy risiko hadde opplevd 10 års DR-hyppigheter på mer enn 30 %.

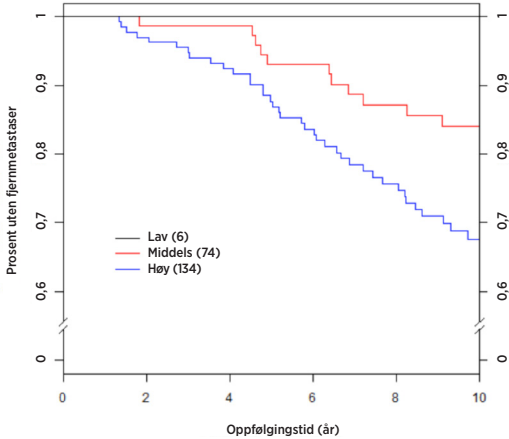
Figur 25: DRFS iht. risikogruppe for node negative pasienter unntatt CTS



Sammendrag av data for Figur 25: DRFS iht. risikogruppe for node negative pasienter unntatt CTS

Risikogruppe	Antall pasienter (%)	Antall Hendelser	Estimert prosent uten fjernmetastaser etter 10 år [95 % CI]
Lav	431 (58 %)	17	96 % [94 % - 98 %]
Middels	180 (24 %)	22	86 % [81 % - 92 %]
Høy	128 (17 %)	38	67 % [59 % - 76 %]
Totalt	739 (100 %)	77	

Figur 26: DRFS iht. risikogruppe for pasienter med 1 - 3 positive noder uten CTS



Sammendrag av data for Figur 26: DRFS iht. risikogruppe for pasienter med 1 - 3 positive noder uten CTS

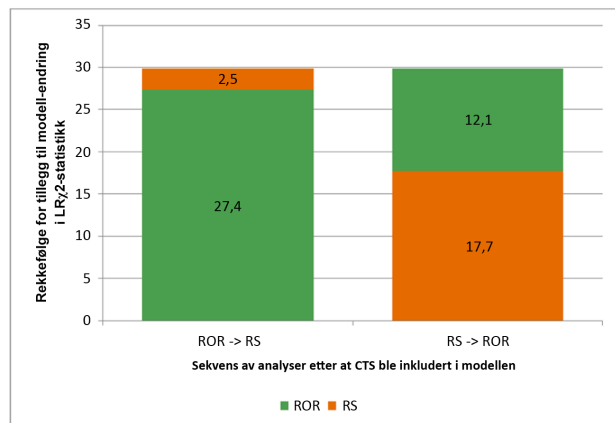
Risikogruppe	Antall pasienter (%)	Antall Hendelser	Estimert prosent uten fjernmetastaser etter 10 år [95 % CI]
Lav	6 (3 %)	0	100 % [N/A]
Middels	74 (35 %)	11	84 % [76 % - 93 %]
Høy	134 (63 %)	38	68 % [59 % - 77 %]
Totalt	214 (100 %)	49	

Sammenligning av ROR med RS

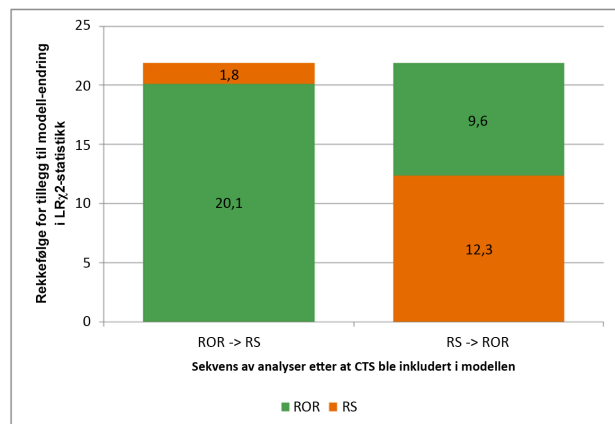
Av de 1007 prøvene med ROR score, var Oncotype Dx testresultater tilgjengelig for alle de 1007 prøvene, men IHC-resultater var bare tilgjengelig for 940 prøver. For å tillate sammenligning av alle tre testene, er resultatene i dette avsnittet basert på de 940 prøvene som hadde testresultater for alle tre metodene (men IHC4 rapporteres ikke her). Sannsynlighetsforholdstestene er presentert for tilføyingen av en enkel variabel, så for at tilleggsinformasjon skal være statistisk signifikant ($\alpha = 0,05$), må endringen i den 1-graders friheten χ^2 være større enn 3,84. Figurene nedenfor viser den informasjonen som er lagt til når den prognostiske testen legges til en annen prognostisk test pluss CTS i sekvens. Ved hvert tillegg måles tilleggsinformasjonen iht. endringen i χ^2 .

ROR lagt til RS i tillegg til CTS; prognostisk informasjon

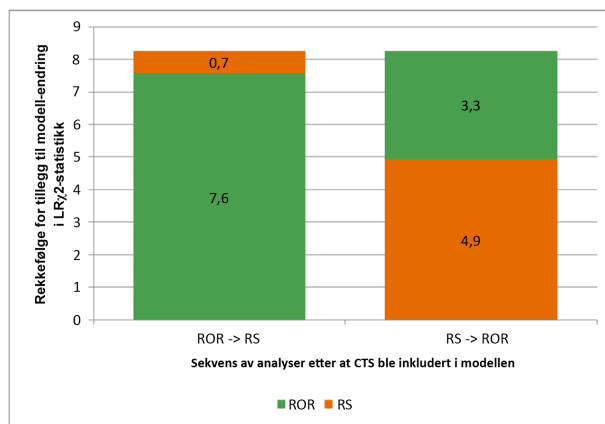
Figur 27: Prognostisk Informasjon for DRFS utover CTS i Alle pasienter (n = 940)



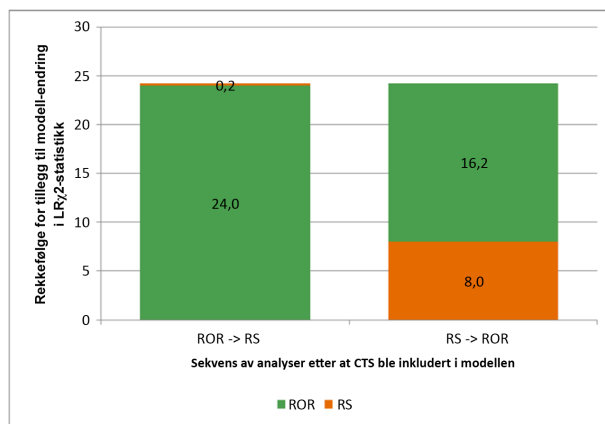
Figur 28: Prognostisk Informasjon for DRFS utover CTS i node negative pasienter (n = 683)



Figur 29: Prognostisk Informasjon for DRFS utover CTS i node positive pasienter (n = 257)



Figur 30: Prognostisk Informasjon for DRFS utover CTS i node negative HER2-negative pasienter (n = 649)



Figur 27 - 30 viser den informasjonen som er tilføyd utover CTS når de to prognostiske testene tilføyes i rekkefølge. Ved hvert tillegg måles tilleggsinformasjonen iht. endringen i χ^2 -statistikken. F.eks. da ROR var den første testen som ble tilføyd etter inkluderingen av CTS (alle pasientdata), var endringen i χ^2 -statistikken 27,4. Med CTS og ROR i modellen ga tilføying av RS en endring i χ^2 -statistikken på 2,5, hvilket ikke er signifikant (kritisk verdi for χ^2 -test med 1 grads frihet er 3,84); dvs. så snart både CTS og ROR er i modellen, tilfører ikke RS signifikant informasjon. Imidlertid, hvis RS var den første testen som ble tilføyd, var det fortsatt informasjonen i ROR som ikke ble inkludert i kombinasjonen av CTS og RS. Begge testene viser prognostisk signifikans når de legges til CTS i node positive pasienter, men ingen av testene viser betydning som en tilføyd test nummer to, muligens på grunn av den mindre prøvestørrelsen. For den node negative HER2-negative pasient undergruppen, tilfører ikke RS signifikant prognostisk informasjon til CTS + ROR. På den andre siden tilfører ROR signifikant prognostisk informasjon til CTS + RS.

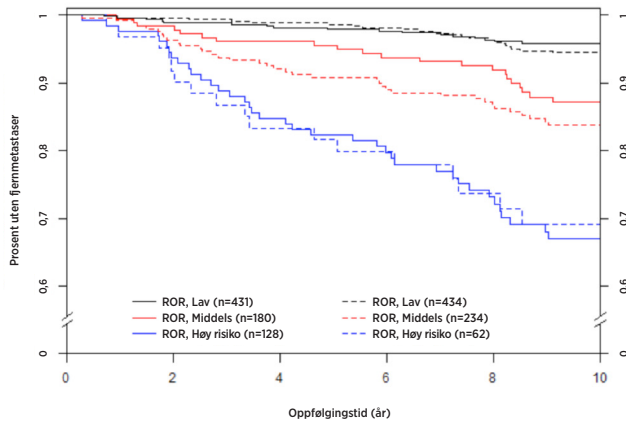
ROR versus RS: Resultat fra risikogrupper

For å sammenligne hvordan de to testene skilte pasienter i henhold til risiko, ble risikogrupper definert basert på hver tests estimat av risiko for fjernmetastaser etter 10 år innenfor TransATAC- befolkningen. Risikoscoreterskler for å definere risikogrupperne ble valgt for hver test basert på resultatene fra vår TransATAC-studie for å definere risikogrupper som inneholder pasienter med samme risiko. For å oppnå disse sammenlignbare risikogrupperne, var den poenggrensen som ble brukt for Oncotype DX ulik den som ble brukt av Genomic Health. For hver test ble lavrisikogruppen prospektivt definert som pasienter med under 10 % estimert risiko for tilbakefall. For hver test ble gruppen med middels risiko prospektivt definert som pasienter med mellom 10 % og 20 % beregnet risiko for tilbakefall. For hver test ble høyriskogruppen prospektivt definert som pasienter med over 20 % estimert risiko for tilbakefall. Figuren nedenfor oppsummerer størrelser og resultatene av de risikogrupperne som er definert av hver test.

Figur 31 illustrerer det resultatet at Prosigna tildelte 26 % færre pasienter til gruppen med middels risiko enn Oncotype DX gjorde (180 vs. 243 pasienter). I tillegg tildelte Prosigna flere pasienter til høyriskogruppen enn Oncotype DX gjorde, men lavrisiko og høyriskogruppene som ble definert av hver av testene har like resultater, som illustrert med de overlappende Kaplan-Meier-kurvener.

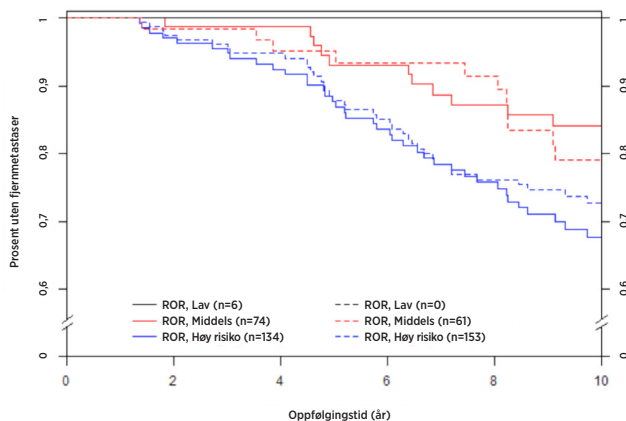
Denne observasjonen førte til at uavhengige etterforskere av vår TransATAC-studie konkluderte med at Prosigna tildelte færre pasienter til middels risikogruppen enn Oncotype DX RS, med tilsvarende eller høyere skille mellom lav- og høyriskogruppene.

Figur 31: Prosigna's ROR score identifiserte vesentlig flere høyriskopasienter og færre middels risikopasienter enn Oncotype DX's RS score for node negative pasienter.



Ved bruk av ROR alene i node positive pasienter med 1 - 3 positive noder, ble 6 pasienter forutsett å ha < 10 % risiko for fjernmetastaser. Ingen av disse pasientene hadde hendelser mens studien pågikk. En av disse pasientene ble observert i 7,9 år, og alle de andre hadde ingen DR i minst 9,9 år med oppfølging, hvilket indikerer at node positive pasienter som ble forutsett å være lav-risiko faktisk var lav-risiko. Logg-rank tester ble ikke brukt til sammenligning siden det ikke var noen lav-risikogruppe for RS.

Figur 32: Sammenligne 10-års DRFS risikogruppeklassifisering uten å bruke CTS: Node positive pasienter (1 - 3 noder) (ROR vs. RS)



Sammendrag av klinisk studie 1

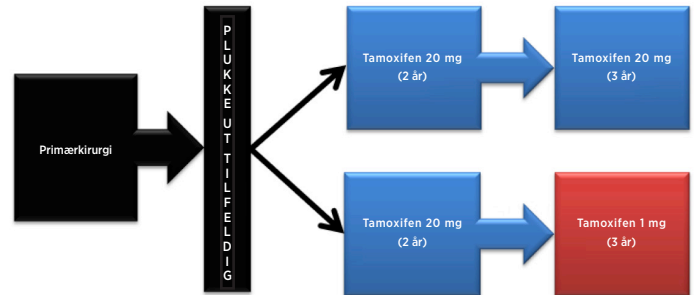
Den primære analysen viste at ROR tilføyde signifikant prognostisk informasjon utover det for vanlige kliniske kovariater (CTS) hos alle pasienter og i alle forhåndsdefinerte klinisk relevante undergrupper. ROR viste seg å underfordele pasientene i 3 risikogrunder som har statistisk signifikant forskjellige resultater i node negative pasienter. Luminal A og Luminal B iboende subtyper ble vist å ha signifikant forskjellige DRFS og RFS uavhengig av nodalstatus. I sammenligning med prognostisk indikator RS (21 geners tilbakefallsscore fra Oncotype Dx), la ROR til prognostisk informasjon utover RS hos alle pasienter og i klinisk relevante undergrupper. Videre doblet ROR i den node negative gruppen antall pasienter som var tildelt høyriskogruppen, og reduserte betydelig antallet pasienter som var tildelt den mellomliggende risikogruppe, uten å redusere forskjellene i resultater mellom de lave og høye risikogruppene når sammenlignet med RS.

Studie 2: Prognose for Hormonreseptor-positiv, Post-menopausal brystkreft-pasienter som fikk adjuvant systemisk endokrin behandling alene ved bruk av Nanostring Prosigna-analysen; en ABCSG-8 studie

Studiens design

Studiegruppen består av FFPE brystsvulst vevsprøver retrospektivt samlet inn og arkivert i ABCSG svulstbank fra pasienter som ble registrert i ABCSG-8-studien¹³ mellom 1996 og 2004. Totalt 3901 postmenopausale kvinner med HR+ tidlig stadium av brystkreft ble valgt tilfeldig før behandling til to års adjuvant Tamoxifen etterfulgt av tre år med Arimidex® (anastrozol) eller fem års adjuvant Tamoxifen. Testens behandlingsstruktur vises i Figur 33.

Figur 33: Skjema over ABCSG-8-testens studiedesign



Valideringsgruppen representerer den delen av den evaluerbare ABCSG-8-gruppen for hvilken vevsprøver kunne hentes fra den retrospektivt arkiverte ABCSG svulstbanken og fra hvem informert samtykke kunne innhentes, eller pasienten var død. Pasienter som oppfylte kriteriene for den opprinnelige testen ble kun ekskludert fordi vev ikke var tilgjengelig for å utføre NanoString's analyse, eller fordi pasientens samtykke ikke kunne innhentes. Alle tilgjengelige prøver med en svulstblokk og pasientens samtykke ble testet som en del av denne studien.

Denne undersøkelsen brukte de iboende subtypene som ble generert av analysen og evaluert ROR score ved hjelp av en forhåndsdefinert analyseplan. Den ROR score som spenner fra 0 - 100 ble beregnet ved hjelp av en 46-geners undergruppe av de 50 testgenene som var publisert² tidligere. Koeffisientene for ROR ble beregnet ut fra en Cox-modell som omfatter Pearson-korrelasjonen til de 46 genene som ble benyttet for å bestemme hver iboende subtype, en sprednings score og brutto tumorstørrelse. Alle analysene ble utført på maksimale oppfølgingsdata.

Det primære slutt punktet var fjernmetastasefri overlevelse (DRFS). Dette ble definert som intervallet fra diagnose til fjernmetastaser eller død på grunn av brystkreft. Det sekundære slutt punktet var metastasefri overlevelse (RFS). Dette ble definert som intervallet fra diagnose til første tilbakefall (lokale-, regionale-, eller fjernmetastaser) eller død på grunn av brystkreft.

Ved bruk av alle tilgjengelige pasientprøver ble flervariabel Cox Proportional Hazards (PH) (forholdsmessige farer) modeller montert for å evaluere det overordnede målet i sekvensielle tester av ROR. Modellen inkluderte standard kliniske kovariater (alder, tumorens grad, brutto tumorstørrelse, nodal status, adjuvant terapi). En Cox-modell ble deretter montert og en sannsynlighets forholdstest ble brukt til å teste om ROR la til statistisk signifikant ($\alpha = 0,05$) ekstra prognostisk informasjon utover det som inngår i Clinical Treatment Score (CTS) (klinisk behandlingsresultat). CTS er en optimalisert kombinasjon av klinisk-patologiske faktorer som er utviklet som et mål på standard patologi¹². De primære analysene ble gjentatt for ulike pasient undergrupper (alle, node negative, node positive, eller bare HER2-negative) og endepunkter (DRFS eller RFS).

Analyse

En sekvensiell tilnærming ble brukt der det primære vitenskapelige målet var å vise at ROR tilfører betydelig prognostisk informasjon utover de vanlige kliniske variablene. Hovedformålet la til et tilleggskrav i en av gruppene (lav/middels/høy) for å vise at kategorisk risikoklassifisering tilfører betydelig prognostisk informasjon utover de vanlige kliniske variablene. For å møte dette kravet, måtte begge de følgende demonstreres:

- Vis at den kontinuerlige ROR score tilfører prognostisk verdi utover de vanlige kliniske variablene
- Hvis nullhypotesen om ingen prognostisk informasjon blir avvist, vis at ROR-baserte risikokategorier tilfører prognostisk verdi utover de vanlige kliniske variablene

Ved hjelp av alle tilgjengelige pasientprøver ble flervariabel Cox forholdsmessige (PH)-modeller montert for å evaluere det overordnede formålet i sekvensielle tester av ROR etterfulgt av forhåndsdefinerte ROR-baserte risikokategorier. Modellene omfattet følgende kategoriske kliniske standardgrupper (med mulige verdier):

- Alder (≥ 65 eller < 65)
- Grad (G1 eller G2/GX)
- Brutto tumorstørrelse (T1, T2/T3)
- Nodal Status (N0, N+(1-3), N+(≥ 4))
- Adjuvansterapi (Tamoksifen alene, eller Tamoksifen → Anastrozol)

hvor N0 angir node negative pasienter, N+(1-3) angir node positiv pasient med 1 - 3 positive noder, og N+(≥ 4) angir node positive pasienter med mer 4 eller flere positive noder. T1 indikerer tumor med ≤ 2 cm tverrsnitt, T2 indikerer en tumor som er større enn 2 cm, men ikke mer enn 5 cm i tverrsnitt, og T3 indikerer en tumor som er mer enn 5 cm i tverrsnitt. Det var bare 14 T3-prøver i undersøkelsen, så disse ble kombinert med T2-prøvene. De brønndifferensierte (G1)-svulstene ble sammenlignet med en kombinasjon av moderat differensierte (G2) og GX lobulære svulster. GX lobulære tumorer ble behandlet som G2-tumorer med henblikk på analyse fordi G2-tumorer er den vanligste graden i populasjonen for denne tiltenkte bruken.

Disse variablene legges inn i modellen i form av en Clinical Treatment Score (CTS) - (en klinisk behandlings score). For å oppnå denne CTS ble følgende modell montert:

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

Der hvor z'er representerer de kliniske og behandlingsvariablene som er nevnt ovenfor, og CTS ble definert med estimatene av γ'er som ble oppnådd ovenfor; dvs.CTS = $\sum_j z_j \gamma_j$.

Den proporsjonale fareantakelsen ble testet ved hjelp av Schoenfeld residualer. Pasienter som inngikk i valideringsstudien hadde ens egenskaper som de i den opprinnelige ACBSG-8 studien.

Tabell 30: Sammendrag av kliniske karakteristika

Karakteristikk	Verdi	Inkludert (n = 1478)		Ikke inkludert (n = 2236)		Totalt (n = 3714)	
		#	%	#	%	#	%
Behandling	Kun Tamoksifen	741	50,1 %	1108	49,3 %	1849	49,8 %
	Tamoksifen → Anastrozol	737	49,9 %	1128	50,2 %	1865	50,2 %
ER-status	Negativ	14	0,9 %	32	1,4 %	46	1,2 %
	Positiv	1464	99,1 %	2199	98,3 %	3663	98,6 %
	Ukjent	0	0,0 %	5	0,2 %	5	0,1 %
Grad	G1	271	18,3 %	468	20,8 %	739	19,9 %
	G2	1152	77,9 %	1659	73,9 %	2811	75,7 %
	GX	55	3,7 %	109	4,9 %	164	4,4 %
Nodalstatus	N0	1047	70,8 %	1723	76,7 %	2770	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-status	Negativ	260	17,6 %	424	18,9 %	684	18,4 %
	Positiv	1218	82,4 %	1805	80,4 %	3023	81,4 %
	Ukjent	0	0,0 %	7	0,3 %	7	0,2 %
Tumor stadie	T1	1037	70,2 %	1745	77,7 %	2782	74,9 %
	T2	427	28,9 %	472	21,0 %	899	24,2 %
	T3	14	0,9 %	19	0,8 %	33	0,9 %
Alder	Middels	63		NA	64		
	Område	41 - 79			41 - 80		

* Omfatter en pasient med > 9 positive noder

Tabell 31: Flere kliniske karakteristikker

Karakteristikk	Verdi	Antall pasienter	% av pasienter
NanoString iboende subtype	Luminal A	1004	67,9 %
	Luminal B	418	28,3 %
	HER2-beriket	48	3,2 %
	BasallLike	8	0,5 %
Tilbakefall	Fjern	155	10,5 %
	Alle	194	13,1 %
HER2-status	Negativ	1397	94,5 %
	Positiv	77	5,2 %
	Ukjent	4	0,3 %

Resultater

Av de 1620 vevsprøvene som var tilgjengelig for testing, var det 25 (1,5 %) som ikke besto forhåndsdefinert patologisk evaluering for adekvat svulst, 73 av de 1595 vevsprøvene (4,6 %) med levedyktig invasivt vev besto ikke forhåndsdefinert QC-spesifikasjoner for ekstrahert RNA, og 44 av de 1522 RNA-prøvene (2,9 %) besto ikke analysens QC-spesifikasjoner for Prosigna-resultater, hvilket etterlot totalt 1478 (91,2 %) som var tilgjengelig for analyse.

Av de 1478 pasientene som var tilgjengelig for analyse, hadde 155 fjernmetastase tilbakefall, og 194 hadde lokale eller fjernmetastaser, eller var døde på grunn av brystkreft. Gjennomsnittlig oppfølging av testen var 10 år.

Den første analysetesten viste at ROR score gir signifikant prognostisk tilleggsm informasjon for fjernmetastasefri overlevelse utover standard kliniske variabler (CTS).

Tabell 32: Sammendrag av den første analysetesen

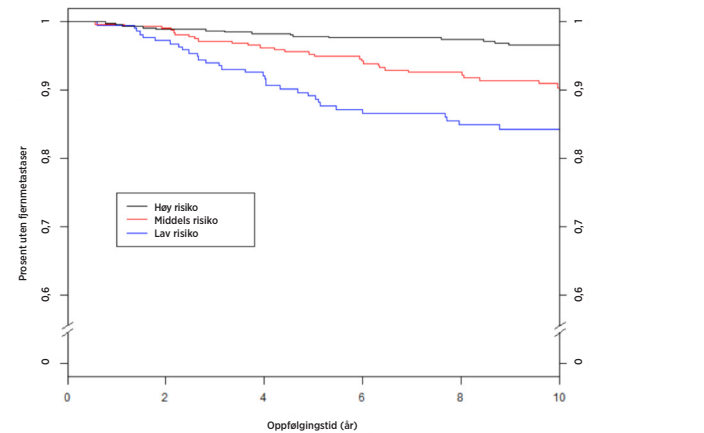
Nullmodell	Alternativ modell	ΔLR χ²	χ² Kritisk verdi (grader av frihet)	χ² p-verdi
CTS	CTS + ROR	53,49	3,84 (df = 1)	p < 0,0001
CTS	CTS + Risikogruppe	34,12	5,99 (df = 2)	p < 0,0001

Sekundære analyser viste at ROR er vesentlig relatert til fjern- metastasefri overlevelse og legger til prognostisk informasjon utover CTS i flere klinisk relevante undergrupper.

Tabell 33: Gjentakelse av første analysetest for predefinerte undergrupper

Temagruppe	# pasienter	# hendelser	CTS+ROR vs. CTS	CTS+Risikogruppe vs. CTS
			ΔLR χ² (Krit. Verdi= 3,84)	ΔLR χ² (Krit. Verdi= 5,99)
Alle	1478	155	53,49	34,12
HER2-negative	1397	145	47,50	29,94
N0	1047	86	25,57	23,36
N0, HER2-negative	984	79	21,69	20,32
N+(1-3)	382	59	25,99	19,94
N+(1-3), HER2-negative	367	56	22,75	18,75

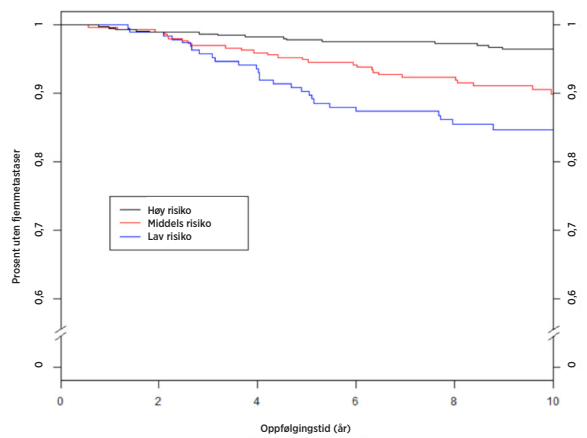
Figur 34: DRFS (fjernmetastasefri overlevelse) iht. risikogruppe for node negative pasienter



Sammendrag av data for Figur 34: DRFS (fjernmetastasefri overlevelse) iht. risikogruppe for node negative pasienter

Risikogruppe	Antall pasienter (%)	Antall Hendelser gjennom 10 år	Estimert prosent uten fjernmetastaser etter 10 år [95 % CI]
Lav	487 (47 %)	15	96,6 % [94,4 % - 97,9 %]
Middels	335 (32 %)	28	90,4 % [86,3 % - 93,3 %]
Høy	225 (21 %)	32	84,3 % [78,4 % - 88,6 %]
Totalt	1047 (100 %)	75	

Figur 35: DRFS iht. risikogruppe for HER2-negative node negative pasienter

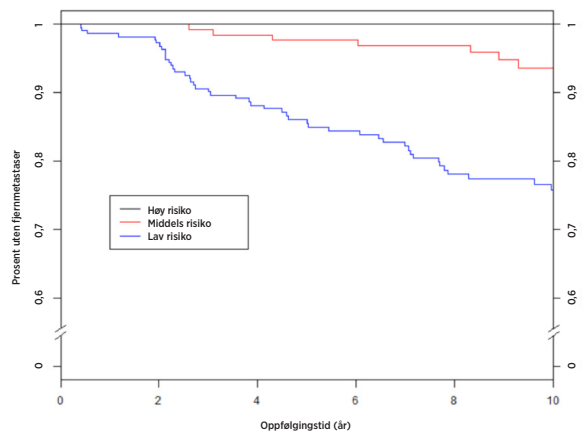


Sammendrag av data for Figur 35: DRFS iht. risikogruppe for HER2-negative node negative pasienter

Risikogruppe	Antall pasienter (%)	Antall hendelser gjennom 10 år	Estimert prosent uten fjernmetastaser etter 10 år [95 % CI]
Lav	474 (48 %)	15	96,5 % [94,3 % - 97,9 %]
Middels	311 (32 %)	27	90 % [85,6 % - 93,1 %]
Høy	199 (20 %)	27	84,7 % [78,4 % - 89,3 %]
Totalt	984 (100 %)	69	

Figur 36 viser Kaplan-Meier diagrammer etter risikogrupper for node positive (1 - 3 noder) pasienter og Figur 37 viser de samme diagrammene for N1 HER2-negative pasienter. Resultatene i utenfor de HER2-positive pasientene er like

Figur 36: DRFS iht. Risikogruppe for node positive (1 - 3 noder) pasienter

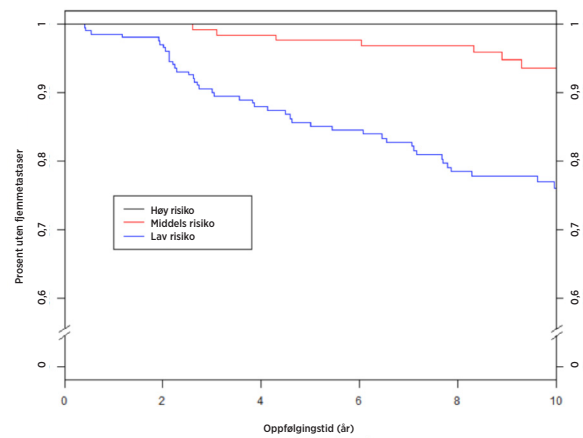


Sammendrag av data for Figur 36: DRFS iht. Risikogruppe for node positive (1 - 3 noder) pasienter

Risikogruppe	Antall pasienter (%)	Antall Hendelser gjennom 10 år	Estimert prosent uten fjernmetastaser etter 10 år [95 % CI]
Lav	15 (4 %)	0	100 % [78,2 % - 100 %]
Middels	143 (37 %)	7	93,6 % [86,9 % - 97 %]
Høy	224 (59 %)	46	75,8 % [68,9 % - 81,4 %]
Totalt	382 (100 %)	53	

* Konfidensintervall estimert ved hjelp av Clopper-Pearson-metoden

Figur 37: DRFS iht. Risikogruppe for HER2-negative node positive (1 - 3 noder) pasienter



Sammendrag av data for Figur 37 DRFS iht. risikogruppe for HER2-negative node positive (1 - 3 noder) pasienter

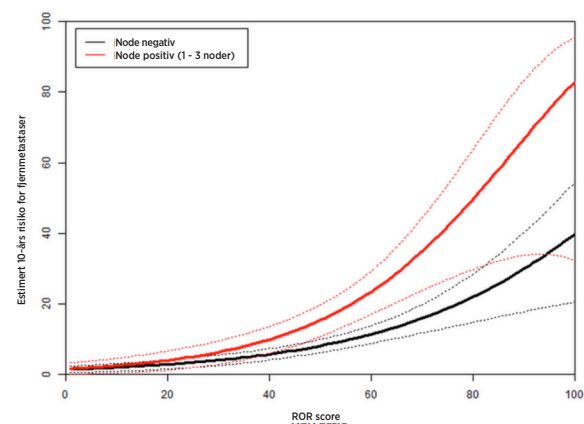
Risikogruppe	Antall pasienter (%)	Antall Hendelser gjennom 10 år	Estimert prosent uten fjernmetastaser etter 10 år [95 % CI]
Lav	15 (4 %)	0	100 % [78,2 % - 100 %]
Middels	142 (39 %)	7	93,6 % [86,8 % - 96,9 %]
Høy	210 (57 %)	43	76,1 % [69,0 % - 81,8 %]
Totalt	367 (100 %)	50	

* Konfidensintervall estimert ved hjelp av Clopper-Pearson-metoden

Forhold mellom ROR og risikoforutsigelse

Figur 38 viser den 10-årige risikoen av DR som en funksjon av ROR score med 95 % konfidensbånd basert på separate Cox-proporsjonale faremodeller for hver av node negative og node positive (1 - 3 positive noder) pasientgrupper. For de node positive (1 - 3 noder) pasientene ble det forholdsvis fareestimatet overtrådt da det ble anvendt på tvers av hele området. Den kurven som vises her for de node positive pasientene (1 - 3 noder) bruker node positive (1 - 3 noder) pasienter med ROR score i området 0 - 80, for hvem den forholdsvis fareantakelsen ble oppfylt.

Figur 38: Ti års Estimert DR Risiko etter Nodal Kategori med 95 % konfidensintervaller



Innenfor hver undergruppe var den absolutte kliniske risikoen for pasientene i lavrisikokategorien vesentlig forskjellig fra den absolutte kliniske risikoen for pasientene i høyriskokategorien.

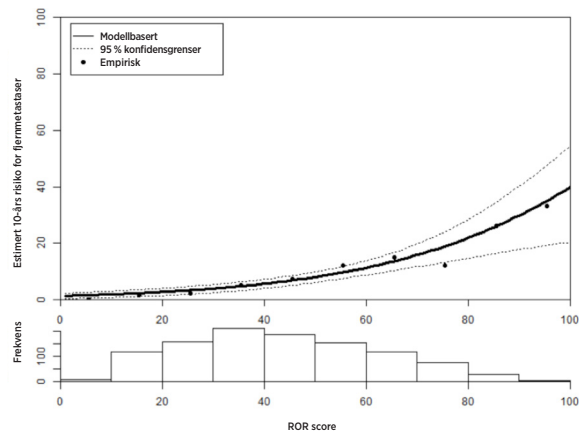
Tabell 34 viser fordelingen av node negative pasienter i 10-enheters ROR-grupper. Også vist er 10-års DR-risiko.

Tabell 34: Fordeling av node negative pasienter i 10-enheters ROR-område

ROR-område	Antall pasienter	Prosent av pasienter	10-års DR-risiko (Empirisk)
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 %
Totalt	1047	100 %	

Figur 39 viser den modellbaserte kurven for de node negative pasientene sammen med de empirisk estimerte 10-års overlevelsesshyppighet for de 10 gruppene hvor hver gruppe består av alle pasientene innenfor 10-enhets ROR-områder (1 - 10, 11 - 20 osv.). Under kurven er et histogram som viser hyppighetsfordelingen etter gruppe.

Figur 39: Sammenligning av Modellbaserte og Empiriske Estimer av Ti-års DR-risiko for node negative pasienter med Spredning av ROR scores er vist nedenfor.



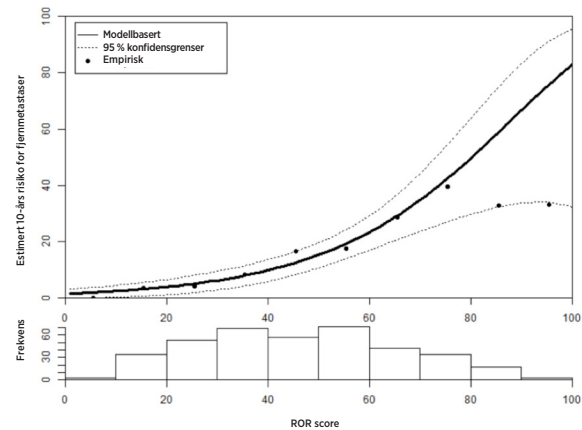
For de node negative pasientene var de proporsjonale farene modellbaserte estimer lik de empiriske estimatene over hele området. Tabell 35 viser fordelingen av node positive (1 - 3 noder) pasienter i 10-enheters ROR-grupper. Også vist er 10-års DR-risiko.

Tabell 35: Fordeling av node positive (1 - 3 noder) pasienter i 10-enheters ROR-område

ROR-område	Antall pasienter	Prosent av pasienter	10-års DR-risiko (Empirisk)
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 %
Totalt	382	100 %	

Figur 40 viser den modellbaserte kurven (ved hjelp av Node-positiv (1 - 3 noder) pasienter med ROR score ≤ 80) for de node positive (1 - 3 noder) pasientene sammen med de empirisk estimerte 10-års overlevelsesshyppighet for de 10 gruppene hvor hver gruppe består av alle pasientene i de 10 ROR-områdene (1 - 10, 11 - 20, osv.). Under kurven er et histogram som viser hyppighetsfordelingen etter gruppe.

Figur 40: Sammenligning av Modell-baserte og Empiriske Estimer av Ti-års DR-risiko for Node-positive (1 - 3) pasienter med Spredning av ROR score er vist nedenfor.



Både Tabell 35 og Figur 40 viser utflatingen av den observerte 10 års risikoen øverst på ROR-området som førte til svikt i den proporsjonale fareantagelsen. Det skal imidlertid bemerkes at prøvestørrelsene i de to gruppene over 80 var begge små for de node positive (1 - 3) pasientene (17 pasienter fra 81 - 90, og bare 3 fra 91 - 100).

Sammenligning av Luminal A og Luminal B iboende subtyper

Flertallet av pasientene i studien (96 %) var enten Luminal A eller Luminal B, hvilket ikke var uventet siden disse iboende subtypene dominerer i hormonreseptor positive pasienter¹².

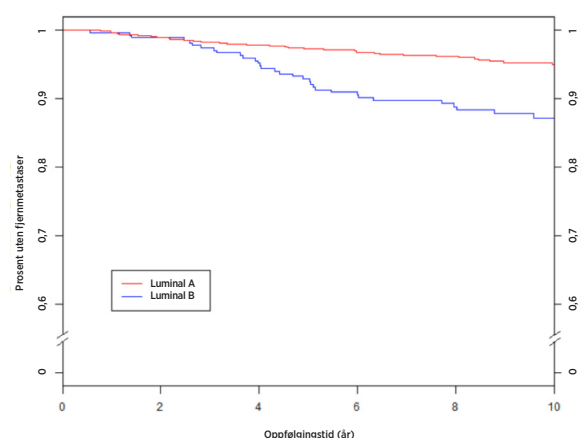
Tabell 36 viser resultatene av sannsynlighetsforholdstesten for å vise ytterligere prognostisk verdi for DRFS som Luminal A / Luminal B-forskjellen legger til utover CTS. Tabellen viser også risikoforholdet ved å sammenligne Luminal A med Luminal B pasienter. Det var en betydelig lavere risiko for fjernmetastaser for Luminal A pasienter i alle tre gruppene.

Tabell 36. Test av sannsynlighetsforhold for DRFS Prognostisk verdi for luminal subtyper

Subgruppe	# Pasienter	# Hendelser	$\Delta LR \chi^2$	χ^2 p-verdi	Risikoforhold for LumA : LumB (95 % CI)
Alle	1422	135	24,42	< 0,0001	0,42 [0,30 - 0,59]
NO	1009	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]

Figur 41 viser en sammenligning av DRFS etter Luminal subtype for node negative pasienter, Figur 42 viser den samme sammenligningen for node positive (1 - 3 noder) pasienter. For begge grupper var det betydelige forskjeller mellom DRFS av Luminal A og Luminal B pasienter.

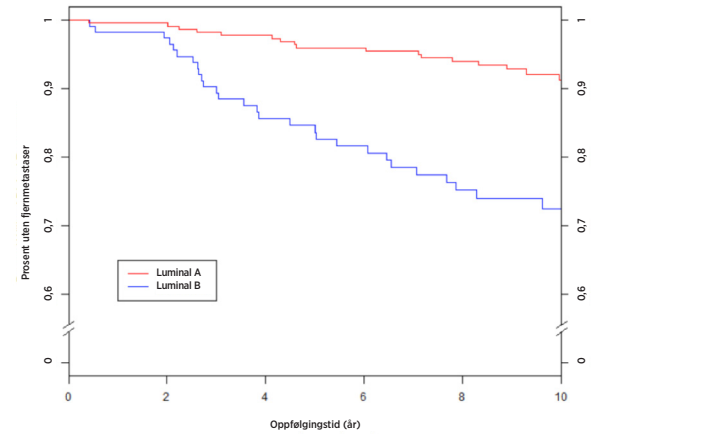
Figur 41: Kaplan-Meier-kurver for DRFS ved Iboende subtype for node negative pasienter



Sammendrag av data for Figur 41: Kaplan-Meier-kurver for DRFS ved Iboende subtype for node negative pasienter

Risikogruppe	Antall pasienter	Antall Hendelser gjennom 10 år	Estimert prosent uten fjernmetastaser etter 10 år [95 % CI]
Luminal A	725	32	95,1 % [93,4 % - 96,3 %]
Luminal B	284	32	87,2 % [83,2 % - 90,3 %]
Totalt	1009	64	

Figur 42: Kaplan-Meier-kurver for DRFS ved iboende subtype for node positive pasienter (1 - 3 noder)



Sammendrag av data for Figur 42: Kaplan-Meier-kurver for DRFS ved iboende subtype for node positive pasienter (1 - 3 noder)

Risikogruppe	Antall pasienter	Antall hendelser gjennom 10 år	Estimert prosent uten fjernmetastaser etter 10 år [95 % CI]
Luminal A	248	17	91,3 % [87,2 % - 94,2 %]
Luminal B	118	28	72,5 % [64,2 % - 79,1 %]
Totalt	366	45	

Tabell 37 viser en tabell over 10-års RFS-hyppighet etter luminal subtype for node negative og node positive (1 - 3 noder) nodale grupper.

Tabell 37: Ti års RFS-hyppighet etter Nodal-gruppe og Luminal subtype

Nodestatus	Luminal subtype	Antall pasienter (%)	Antall hendelser gjennom 10 år	Estimert prosent uten fjernmetastaser etter 10 år [95 % CI]
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 %]

For hver av de node negative og node positive (1 - 3 noder) pasientbefolkningene var forskjellen mellom Luminal A og Luminal B pasienter betydelig.

Sammendrag av klinisk studie 2

ROR ble demonstrert for å legge til betydelig prognostisk informasjon utover de vanlige kliniske og behandlingsvariablene, både når de ble inkludert som et kontinuerlig tiltak, og når de ble inkludert ved hjelp av tre forhåndsdefinerte risikogrupper. Lavrisikogruppen hadde 10 års DRFS, godt over 90 % som forventet. Høyriskogruppen hadde 10 års DRFS på 80 %, som var høyere enn forventet – hadde vært forventet å være anslagsvis lavere enn 80 %. De begrensningene som ble brukt for å definere risikogrupper var basert på TransATAC-gruppen, hvilket er en høyere risiko enn dagens gruppe og fører til en generelt lavere risiko "høyriskogruppe" enn det som var forventet. ROR (kontinuerlig og risikogruppebasert) viste tilsvarende prognostisk informasjon i ulike undergrupper. Den kontinuerlige risikomodellen var nært tilpasset de empiriske forekomstene av tilbakefall i både node negative og node positive (1 - 3 noder) pasientgrupper. De fleste av pasientene (96 %) i studien hadde svulster av én av to luminal undergrupper (Luminal A eller Luminal B). I alle nodale statusgrupper, la Luminal A/Luminal B-forskjellen til prognostisk informasjon om DRFS.

Sammendrag av kombinerte kliniske studier

Resultatene er generaliserbare for distribuert bruk siden prøver ble sendt til og analysert i forskjellige laboratorier i de to kliniske valideringsstudiene. ROR ble demonstrert for å legge til betydelig prognostisk informasjon i 10 år utover de vanlige kliniske og behandlingsvariablene, både når de ble inkludert som et kontinuerlig tiltak, og når de ble inkludert ved hjelp av tre forhåndsdefinerte risikogrupper. I tillegg, i en post-hoc analyse, la ROR til vesentlig informasjon for post 5-års DRFS utover standard kliniske variabler for alle pasienter. ROR (kontinuerlig og risikogruppebasert) viste tilsvarende prognostisk informasjon i ulike undergrupper. Begrensede analyser ble også utført med RFS. ROR-klassene var også i stand til å definere tre risikogrupper med uttalt RFS. For begge studiene var det signifikante forskjeller mellom DRFS av undergruppene Luminal A og Luminal B, uavhengig av nodalstatus.

17 BIBLIOGRAFI

- Geiss G, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs Nature Biotechnology 2008; 26: 317-25.
- Parker JS, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. Journal of Clinical Oncology 2009, 27(8): 1160-1167.
- Dowsett M. et al. on behalf of the ATAC and LATTE Trialists Group. 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.
- 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.
- Harris JR, et al. (Carey L, Perou C) Diseases of the Breast 4th edition. 2009: 458-471.
- Baker SC, et al. The External RNA Controls Consortium: a progress report. Nature Methods 2010; 2: 731-734.
- Tholen DW, et al. CLSI EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline—Second Edition. Clinical Laboratory Standards Institute. Volume 24.
- 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.
- 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.
- Dubsky 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.
- 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: En TransATAC-test. Journal of Clinical Oncology 2010; 28: 1829-1834.
- 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 SYMBOLER OG DEFINISJONER

 - Produsent

 - Autorisert representant i EU

 - *In vitro* diagnostisk medisinsk apparat

 - Se Brukerveiledningen

 - CE-merke

 - Seriekode / Parti nummer

 - Serienummer

 - Innholdet rekker for < n > tester

 - Temperaturområde lagringsbetingelser

 - Lavere temperaturgrense lagringsbetingelser

 - Øvre temperaturgrense for lagringsbetingelser

 - For bruk før / utløpsdato

 - Produksjonsdato

Romtemp. = Romtemperatur

HYB = Hybridisering

Lovmessig ansvarsfraskrivelse

For *in vitro* diagnostisk bruk.

© 2022 Veracyte, Inc. Alle rettigheter forbeholdt. Prosigna og Prosigna-logoen er registrerte varemerker for Veracyte, Inc. i USA og/eller andre land.

19 KONTAKTINFORMASJON

 US kontaktinformasjon:
Veracyte, Inc.
6000 Shoreline Court
Suite 300
South San Francisco CA 94080
USA
Tel.: +1-650-243-6335



Autorisert representant i EU:
Veracyte
Luminy Biotech Entreprises
163 Avenue de Luminy
13288 Marseille Cedex 9
FRANCE

Global kontaktinformasjon: Teknisk støtte e-mail: DxSupport@Veracyte.com
Produktinformasjon e-mail: info@prosigna.com Website: www.prosigna.com