

Bipacksedel
Prosigna® Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay
(Prosigna® prognostisk gensignaturanalys för bröstcancer)


Version 02, skapad 2023-07



1-10 analyser

Förvaringsförhållanden

 -20 °C Förvara vid -20 °C eller lägre	Prosigna Cartridges för prognostisk gensignaturanalys för bröstcancer
 -80 °C Förvara vid -80 °C eller lägre	Prosigna CodeSet för kassetter för prognostisk gensignaturanalys för bröstcancer
 +25 °C Förvara i rumstemperatur +15 °C	Prosigna Prep Pack för prognostisk gensignaturanalys för bröstcancer
 +8 °C Förvara vid +4 °C +2 °C	Prosigna Prep Plates för prognostisk gensignaturanalys för bröstcancer

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

1	AVSEDD ANVÄNDNING/SYFTE	1
2	SAMMANFATTNING AV ANALYSSYSTEMET	1
2.1	Principer för analysystemet nCounter	2
2.2	Principer för Prosigna-algoritmen för resultatberäkning	2
3	MEDFÖLJANDE REAGENSER OCH UTRUSTNING	2
3.1	Översikt över Prosigna-kit	2
3.2	Prosigna Kit Contents for a 1, 2, 3, 4, or 10 test Prosigna Kit	3
4	VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER	3
5	ALLMÄNNA ANALYSHÄNSEENDEN	3
5.1	Vävnadsbearbetning	3
5.2	Utföra Prosigna-analysen	4
6	INFORMATION OM UTBILDNING	4
7	AVFALLSHANTERING	4
8	FÖRVARING OCH HANTERING (REAGENSER)	4
9	INSTRUMENT SOM BEHÖVS FÖR PROSIGNA	4
10	REAGENSER OCH UTRUSTNING SOM BEHÖVS MEN INTE MEDFÖLJER	4
10.1	Material	4
10.2	Utrustning	4
10.3	Specifikationer för utrustning	4
11	PROVINSAMLING OCH BEARBETNING	5
11.1	Krav för vävnads exemplar och patologigranskning	5
11.2	PROVINSAMLING OCH BEARBETNING	5
11.3	Objektglasberedning	5
11.4	Bearbetning av objektglas	5
11.5	Isolering av RNA	6
11.6	Mäta koncentration och kvalitet på RNA	6
11.7	Analysprocedur	7
12	FELSÖKNING OCH ANALYSFEL	9
13	RESULTAT AV ANALYSEN	9
13.1	Intrinsiska subtyper	9
13.2	ROR-värde	10
13.3	Sannolikhet för fjärrmetastaser efter 10 år	10
13.4	Riskklassificering	10
13.5	Kvalitetskontroll	10
14	BEGRÄNSNINGAR I PROCEDURERNA	10
15	FÖRVÄNTADE VÄRDEN	11
15.1	ROR-intervall efter subtyp	11
15.2	ROR-värdesfrekvens efter körtelstatus	11
15.3	Fjärrmetastasfri överlevnad efter riskkategorisering	11

16	PRESTANDAEGENSKAPER	12
16.1	Analytisk precision och reproducerbarhet	12
16.2	Sensitivitet/RNA-inmatning	13
16.3	Interferensanalys	13
16.4	Klinisk prestanda	14
17	BIBLIOGRAFI	25
18	SYMBOLER OCH DEFINITIONER	26
19	KONTAKTINFORMATION	26

1 AVSEDD ANVÄNDNING/SYFTE

Prosigna® prognostisk gensignaturanalys för bröstcancer är en *in vitro*-diagnostisk analys som använder genuttrycksprofilen för celler i bröstcancervävnad för att analysera en patients risk för fjärrmetastaser. Analysen mäter genuttrycksprofilen med hjälp av RNA som extraherats från FFPE-vävnad (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded) från tumören i bröstet. Genuttrycksdata vägs tillsammans med kliniska variabler för att generera både en subtyp (luminal A, luminal B, HER2-berikad, eller basalliknande) och en värdeindikation av sannolikheten för fjärrmetastaser. Analysen görs på analysystemet nCounter® med hjälp av FFPE-vävnad från brösttumör som tidigare fått diagnosen invasiv bröstcancer.

Prosignas prognostiska gensignaturanalys för bröstcancer är indicerad hos kvinnliga bröstcancerpatienter som har genomgått antingen mastektomi eller bröstbevarande behandling i samband med lokoregional behandling i enlighet med standardvård, antingen som:

- En prognostisk indikator för fjärrmetastasfri överlevnad i 10 år hos kvinnor i klimakteriet med HR+-bröstcancer (hormonreceptorpositiv), bröstcancer som inte spridit sig till lymfkörtlarna eller en bröstcancer som befinner sig i Stadium I eller II som endast ska behandlas med adjuvant endokrin behandling som används i samband med andra klinikopatologiska faktorer.
- En prognostisk indikator för fjärrmetastasfri överlevnad i 10 år hos kvinnor i klimakteriet med HR+-bröstcancer (Hormone Receptor-Positive), bröstcancer som inte spridit sig till lymfkörtlarna (1-3 positiva körtlar eller 4 eller fler positiva körtlar) eller en bröstcancer som befinner sig i Stadium II eller IIIA som endast ska behandlas med adjuvant endokrin behandling som används i samband med andra klinikopatologiska faktorer.

2 SAMMANFATTNING AV ANALYSSYSTEMET

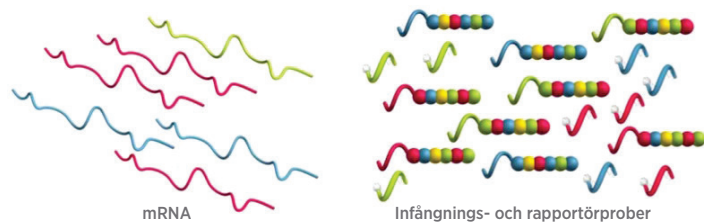
nCounter Analysystem ger direkta, multiplexade mätningar av genuttryck genom digitala avläsningar av det relativa överflödet av mRNA-transkriptioner med hjälp av följande steg: 1) hybridisering av RNA till fluorescerande rapportörprober och infångningsprober, 2) rening av target/prob-komplex med hjälp av nCounter analysplattor med de reagenser som behövs för posthybridiseringsprocessen och immobilisering till nCounter-kassetten på nCounter-analysstationen och 3) analys av nCounter-kassetten på nCounters digitala analysator för att ge ett testresultat¹. Både infångnings- och rapportörprober har unika DNA-probsekvenser för målhybridisering och rening. Infångnings- och rapportörproberna har kombinerats med de positiva och negativa kontrollerna för att bilda CodeSet. Prosigna mäter samtidigt uttrycksnivåerna för generna i PAM50-gensignaturen som används för att intrinsiska algoritmen för subtypklassificeringen², åtta hushållsgener som används för signalnormalisering, sex positiva kontroller och åtta negativa kontroller i en enda hybridiseringsreaktion med hjälp av nukleinsyraprober speciellt utformade för de generna. I Prosigna-kitet finns även ett referensprov som består av *in vitro*-transkriberade RNA-mål för var och en av de 58 generna. Referensprovet har testats med varje batch av patientens RNA-prover för att kvalificera körningen och normalisera signalen från varje gen.

Prosigna-analysen utförs på RNA som isolerats från FFPE-brösttumörvävnad. En patolog undersöker ett Hematoxylin och Eosin-färgat objektglas (Htx-E) och identifierar (och markerar) området med invasiv bröstcancer som lämpar sig för analysen. Patologen mäter också tumörens yta, vilket avgör antalet ofärgade objektglas som krävs för testet, och tumörens cellularitet för att säkerställa förekomsten av tillräcklig tumörvävnad för analysen. En utbildad tekniker makrodissekerar området på de ofärgade objektglasen som motsvarar det markerade tumörområdet på det Htx-E-färgade objektglasets och isolerar RNA från vävnaden. Isolerat RNA analyseras sedan på analysystemet nCounter för att ge analysresultat, t.ex. intrinsisk subtyp, återfallsrisk (ROR) och riskkategori.

2.1 Principer för analysystemet nCounter

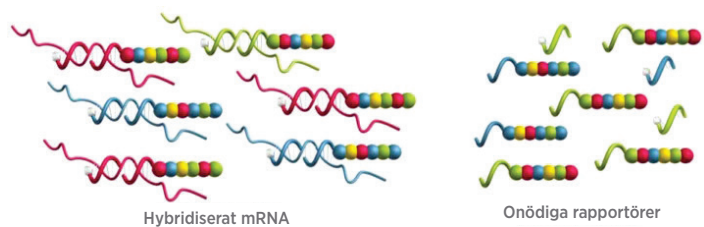
Analysystemet nCounter använder genspecifika probpar (Figur 1) som hybridiserar direkt till mRNA-provet i lösning och eliminerar enzymatiska reaktioner som kan påverka resultaten. I det första steget av analysen hybridiseras DNA-proberna direkt till ett 70-100-basparsområde av RNA-provet i lösning. Den fluorescerande rapportörproben består av en 35-50-basprobssekvens som kompletterar mRNA-målet och en unik DNA-sekvens som hybridiserar till sex RNA-segment märkta med en av fyra fluorescerande färger; röd (R), gul (Y), blå (B) eller grön (G). De fluorescerande segmenten skapar en sexlages/4-färgsfluorescerande "färgkod" som är unik för varje mål. En separat infångningsprob som består av en 35-50 basprobssekvens som kompletterar mRNA-målet och biotin, som används för immobilisering till ett streptavidin-belagt objektglas.

Figur 1: Hybridisera CodeSet till mRNA



Efter hybridisering sker alla provreningssteg automatiskt på nCounters analysstation. Först avlägsnas onödiga infångnings- och rapportörprober (Figur 2) med hjälp av successiva steg med infångning av magnetiska kulor följt av inbindning av prob-target-komplex till slumpmässiga platser på ytan av nCounter-Kassetten via en streptavidin-biotin-koppling (Figur 3). Till sist justeras och immobiliseras prob/target-komplex (Figur 4) i nCounter-kassetten.

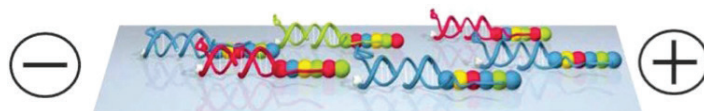
Figur 2: Avlägsna onödiga reportrar



Figur 3: Bind hybridiserade reportrar till ytan på kassetten



Figur 4: Justera och immobilisera hybridiserade reportrar



När provbearbetningen har slutförts placeras Kassetten i nCounters digitala analysator för datainsamling. Varje målmodul som är intressant identifieras av "färgkoden" som genererats av sex ordnade fluorescerande prickar på den associerade rapportörproben. Rapportörproberna på ytan av Kassetten räknas och tabuleras därefter för varje målmolekyl och bearbetas med samma algoritmen (Figur 5).

Figur 5: Datainsamling

Kod	Gen	Antal
	x	3
	y	1
	z	2

2.2 Principer för Prosigna-algoritmen för resultatberäkning

Analysen baseras på den rapporterade klassificeringsalgoritmen med 50 gener, ursprungligen kallad PAM50², och utförs på nCounter-analysystemet med hjälp av RNA som extraherats ur formalinfixerade, paraffinbäddade prover från brösttumörvävnad (FFPE). Algoritmen använder en uttrycksprofil med 50 gener för att dela in bröstcancer i en av fyra molekyllära klasser, eller intrinsiska subtyper: Luminal A, Luminal B, HER2-berikad eller basalliknande². De prototypiska genuttrycksprofilerna (t.ex. centroid) av de fyra intrinsiska subtyperna programmerades om på nCounter-analysystemet med hjälp av FFPE-brösttumörproverna som samlats in från flera kliniska platser i USA. När analysen gjorts på ett patientanalysprov jämför en beräkningsalgoritm baserad på Pearsons korrelation den normaliserade genuttrycksprofilen PAM50 för patientens analysprov med de prototypiska uttrycksprofilerna för de fyra för bröstcancer intrinsiska subtyperna. Patientens analyserade prov tilldelas den subtyp som har högst Pearson-korrelation.

Algoritmen rapporterar vidare ett ROR-värde på en 0-100-skala³ som är korrelerat med sannolikheten för fjärrmetastaser efter tio uppföljningsår hos postmenopausala kvinnor med hormonreceptorpositiv bröstcancer i tidigt stadium⁴. Rapporten ger även en riskkategori (låg, medelhög eller hög). ROR-värdet beräknas med hjälp av koefficienter från en Cox-modell som inkluderar Pearson-korrelationen för en 46-genssubtyp av de 50 generna för varje intrinsiska subtypscentroid, ett proliferationsvärde och bruttotumörstorlek. Analysvariablerna multipliceras med motsvarande koefficienterna från Cox-modellen för att generera värdet som sedan anpassas till en 0-100-skala baserad på koefficienter som genererats från programmeringsstet för FFPE-brösttumörprover. Dessutom baseras riskkategorier på tröskelvärden för ROR som fastställs i en klinisk valideringsstudie.

3 MEDFÖLJANDE REAGENSER OCH UTRUSTNING

3.1 Översikt över Prosigna-kit

Prosigna-kitet innehåller reagenser som räcker för att bearbeta 1, 2, 3, 4, eller 10 patientprover beroende på vilken produkt som beställts. Se nedan för beställningsinformation. Prosigna-kitet innehåller ett CodeSet, ett referensprov rör per en av tio analyser och förbrukningsartiklar som analyseras tillsammans för prestanda innan de släpps.

Katalognummer	Antal analyser i kitet	Referensprov rör inkluderade
PROSIGNA-001	1	2
PROSIGNA-002	2	2
PROSIGNA-003	3	2
PROSIGNA-004	4	2
PROSIGNA-010	10	2

Rekommenderas för användning i samband med Roche FFPET RNA-isoleringskitet (Roche-FFPET-025 eller Veracyte FFPE RNA-extraktionskit (550100). Båda RNA-extraktionskiten är endast tillgängliga genom Veracyte).

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
Prosigna Capture ProbeSet
Prosigna RNA Reference Sample
CodeSet Barcode Sticker
Test Configuration Code

*buffer, nucleic acids with fluorescent dyes
buffer, nucleic acids
buffer, nucleic acids
sticker sheet
card with sticker*

Prosigna Prep Plates

Prep Plates

*superparamagnetic beads, buffer, salts,
oligonucleotides, polystyrene beads containing
fluorescent dyes*

Prosigna Cartridges

nCounter Cartridge(s)

sample cartridge(s)

Prosigna Prep Pack

nCounter Hybridization Buffer
12-Well Notched Strip Tubes
12-Well Notched Strip Tube Lids
nCounter Prep Station Tips
nCounter Cartridge Adhesive Cover
nCounter Tip Sheaths

*buffer, salts
plastic strips
plastic lids
2 racks of 90 tips + 6 piercers nCounter
adhesive films
6-well tip holders*

4 VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

1. För *In Vitro*-diagnostik.
2. Denna analys är avsedd att användas av personer utbildade i avancerad molekylärbiologiska tekniker, baserade på lokala föreskrifter.
3. Blanda inte komponenter från olika kit i olika Prosigna-loter. Funktionalitet kan endast garanteras för Prosigna kitloter i befintligt skick, eftersom de godkänns på detta sätt under tillverkningen.
4. Eventuella restreagenser ska inte återanvändas i Prosigna-analysen.
5. Kassera reaktioner med nedsatta hybridiseringstider eller temperaturer.
6. Det är viktigt att upprätthålla integriteten i provkedjan (vävnad till RNA och RNA för analys) för att säkerställa att patientprovets ID associeras med rätt analysresultat.
7. Underlåtenhet att lagra reagenser enligt de villkor som anges på etiketten kan påverka analysens prestanda.
8. Använd alltid skyddshandskar vid hantering av reagenser och prover.
9. Undvik RNase-kontaminering som kan påverka kvaliteten på resultaten negativt.

10. Alla biologiska prover och allt biologiskt material ska hanteras som om det föreligger risk för överföring av smittsamma ämnen och ska kasseras med lämpliga försiktighetsåtgärder i enlighet med federala, statliga och lokala föreskrifter.
11. Pipettera aldrig med munnen.
12. Undvik att reagensen kommer i kontakt med ögon, hud och slemhinnor.
13. Använd bästa praxis för molekylära laboratorier för att förhindra korskontaminering mellan proverna eller med nukleinsyramål med hög koncentration (syntetiska eller PCR-förstärkta) som kan inverka negativt på resultatens kvalitet.
14. Mycket låga nivåer av natriumazid (<0,1 %) finns kvar efter processen i Prosigna analysplattor och nCounter-kassetter därför rekommenderas plast (ej metall) till avfallsbehållare som används för kassering. Även om det är ytterst osannolikt för Prosigna är natriumazidackumulering på metall känd för att skapa en explosionsrisk.
15. Ytterligare instrumentspecifik information om kassering finns i användarhandboken och servicehandböckerna för nCounters analysystem för analysstationen och den digitala analysatorn.
16. Information i säkerhetsdatabladet för rapportör-CodeSet, infångnings-ProbeSet, hybridiseringsbuffert och analysplattorna finns på www.prosigna.com.
17. Allt farligt material ska kasseras enligt institutionens riktlinjer för korrekt kassering av farligt material.
18. Oanvända CodeSet ska kasseras.
19. Om en kategorin för en patients tumörstorlek anges på fel sätt i mjukvaran kan ROR-värde och riskklassificering påverkas negativt (t.ex. skiftat ROR-värde och/eller felaktig klassificering).
20. Om en patients körtelstatus anges på fel sätt i mjukvaran kan patientens testresultat rapporteras felaktigt (t.ex. felaktig riskklassificering).
21. Använd inte RNA med låg kvalitet eller otillräcklig kvantitet eller tumörprover med otillräcklig tumöryta eller cellularitet i Prosigna-analysen. Prosigna-analysen kanske inte kan ge ett giltigt resultat. Istället rapporteras en analys som misslyckad.

5 ALLMÄNNA ANALYSHÄNSEENDEN

1. Analysen är avsedd för användning endast på formalinfixerade, paraffinbäddade prover (FFPE-prover) från bröstcancervävnad tagna vid kirurgisk resektion. Analysen är inte avsedd att göras på färsk eller fryst vävnad eller vävnad som inte är bröstcancervävnad.
2. Bruttostorleken på patientens primärtumör och körtelstatus krävs för att utföra analysen.
3. Använd sterila mikropipettspetsar för engångsbruk för att undvika mikrobiell och nukleas kontaminering av reagenser eller prover under bearbetningen.
4. Förvara de isolerade RNA-proverna på våt is när de inte används aktivt.
5. Kalibrerade termometrar krävs för värmeblock.
6. Använd inte kitets komponenter om de är skadade vid leverans.
7. Det rekommenderas att kliniska kontroller (t.ex. för riskkategori) utvecklas och utnyttjas av labb som kör Prosigna för att säkerställa noggrannheten i resultaten över tid som en del av standardrutinerna för laboratoriets kvalitetskontroll.

5.1 Vävnadsbearbetning

1. Underlåtenhet att ta bort omgivande icke-tumörvävnad/normal vävnad med hjälp av makrodissektion under vävnadsbearbetning kan leda till en underskattning då ett lägre ROR-värde rapporteras till läkaren.
2. Underlåtenhet att avlägsna humant genomiskt DNA under RNA-isolering kan leda till en högre felfrekvens på grund av lägre analysignal, eller en överskattning av risk på grund av att ett högre ROR-värde rapporteras till läkaren.
3. Alla ofärgade vävnadssnitt bör läggas på positivt laddade objektglas för att undvika att de lossnar under vävnadsbearbetning.
4. Om exemplar kräver flera objektglas ska dessa objektglas bearbetas tillsammans.
5. Vävnadssnitt som placerats på objektglas kan försämrats om de förvaras längre än 9 månader i en uttorkad miljö.
6. Byt ut 3 % av glycerollösningen varje vecka, eller om lösningen blir grumlig, för att undvika kontaminering.

- Byt ut innehållet i den första D-Limonentvätten efter bearbetning av fyra objektglas, och etanolen (EtOH) och innehållet i den andra D-Limonenfärgskålen efter bearbetning av åtta objektglas för att undvika försämring av vävnadskvaliteten.
- Var försiktig när du markerar tumörområdet på det ofärgade objektglaset och avlägsnar icke-tumörvävnad för att säkerställa att tumörvävnaden inte störs.
- Hantera skarpa föremål med försiktighet vid makrodissektion.
- Använd ett nytt rakblad för varje vävnadsprov som bearbetas.
- 10 % natriumdodekylsulfat (SDS) fälls ut frekvent i rumstemperatur och bör värmas till 37 °C tills utfällningen har löst sig.*
- Nya loter/partier av RNA-isoleringskit bör testas mot isoleringskitets specifikationer för att kvalificera nya kitloter för patientanalys (se avsnitt 11.5 för detaljer)

*10 % SDS krävs men tillhandahålls inte för Roche FFPE RNA-isoleringskit

5.2 Utföra Prosigna-analysen

- Säkerställ att patientens kategoriska primära bruttotumörstorlek anges rätt i mjuvkan.
- Säkerställ att patientens kategoriska körtelstatus anges rätt i mjuvkan.
- Kontrollera att värmeblocket med uppvärmt lock som krävs för hybridisering uppfyller specifikationerna och kalibreras regelbundet.
- Använd endast de förbrukningsartiklar som följde med Prosigna-kitet. De är speciellt utvecklade för att fungera med nCounters analysstation nCounters digitala analysator.
- Om hybridiseringsbufferten har förvarats i kalla temperaturer och en utfällning observeras, värm upp rören vid 37 °C tills salterna har lösts.
- Vortexblanda inte analyskomponenter för hårt då det kan skada reagenserna. Blandning bör utföras med hjälp av en pipett.
- Centrifugera inte rapportör-CodeSet snabbare än 3 000 x g i mer än 10 sekunder. Använd inte alternativet "pulsera" för att centrifugera. Om du gör det kan CodeSet falla ut.
- Håll hybridiseringsreaktioner i 65 °C tills de är redo att överföras till analysstationen. Om värmeblocket ställs in för att rampa ner till 4 °C eller om prover placeras på is i slutet av hybridiseringen kan korshybridisering inträffa vilket kan försämrans analysresultaten.
- Underlåtenhet att placera PCR-rören i 65 °C inom 15 minuter från det att ProbeSet för infångning tillsätts kan leda till korshybridisering vilket kan försämrans analysresultaten.
- Underlåtenhet att initiera analysstationens bearbetning inom 15 minuter från det att proverna avlägsnats från 65 °C kan leda till korshybridisering vilket kan försämrans analysresultaten.
- Kontrollera att PCR-rörens lock är ordentligt förslutna före hybridisering i värmeblocket för att undvika kondensering vilket kan försämrans analysresultaten.

6 INFORMATION OM UTBILDNING

Denna analys är avsedd att användas av personer utbildade i avancerade molekylärbiologiska tekniker, baserade på lokala föreskrifter. Kontakta Veracyte för information om utbildning som är specifik för att köra Prosigna-Analysen.

7 AVFALLSHANTERING

Se användarhandboken för nCounters analysystem när det gäller avfallshantering som är specifik för reagenser och instrument som används vid IVD-applikationer.

Se det valda RNA-extraktionskitets bruksanvisning beträffande avfallshantering och information som är specifik för RNA-extraktionsreagenserna.

8 FÖRVARING OCH HANTERING (REAGENSER)

Utgångsdatum för alla analyskitskomponenter finns på streckkodsetiketten som medföljer CodSet-förpackningen och på den yttre förpackningens etikett för alla Prosigna-komponenter.

- Komponenter i Prosigna CodeSet-förpackningen (Prosigna rapportör-CodeSet, Prosigna infångnings-ProbeSet och Prosigna RNA-referensprov) måste förvaras i -80 °C eller lägre.
- nCounter-kassetterna måste förvaras i eller under -20 °C.
- nCounter-analysplattorna måste förvaras i 4 °C (2-8 °C).
- nCounter-analyspacken måste förvaras i rumstemperatur, 15 °C – 25 °C.

9 INSTRUMENT SOM BEHÖVS FÖR PROSIGNA

- nCounter Analysystem (Katalognummer NCT-SYST-DX) (innehåller båda instrumenten nedan)
 - nCounter Analysstation 5s (Katalognummer NCT-PREP-STATION-FLEX)
 - nCounter Digital analysator 5s (Katalognummer NCT-DIGITAL-ANALYZER-FLEX)

Se användarhandboken för nCounter Analysystem för ytterligare information.

10 REAGENSER OCH UTRUSTNING SOM BEHÖVS MEN INTE MEDFÖLJER

10.1 Material

- FFPE RNA-isoleringskit (se avsnitt 11.5 för krav på isoleringskit om Roche FFPE RNA-isoleringskit eller Veracyte FFPE RNA-extraktionskit som har köpts genom Veracyte inte används)
- Hematoxylin och Eosin (H&E)
- Positivt laddade objektglas
- D-Limonen klarmedel (histologikvalitet)
- 100 % Etanol (Absolut), ACS-kvalitet eller motsvarande (inte mindre än 99,5 %)
- Glycerol, molekylärbiologikvalitet
- Nukleasfritt vatten, molekylärbiologikvalitet^{1,2}
- 10 % natriumdodekylsulfat (SDS), molekylärbiologikvalitet¹
- 100% isopropanol²
- Konisk rör på 50 ml²
- Rakblad (eller engångsskalpeller)
- Mikrotomblad för engångsbruk
- 0,5 mL skruvkork¹ och 1,5 eller 1,7 mL RNase-fria mikrocentrifugeringsrör (nonstick)
- RNase-fria mikropipettspetsar med aerosolbarriär

¹ Material som krävs men inte tillhandahålls för RNA-extraktion med Roche FFPE RNA-isoleringskit.

² Material som krävs men inte tillhandahålls för RNA-extraktion med Veracyte FFPE RNA-extraktionskit och även listat i bruksanvisningen för Veracyte-kitet.

10.2 Utrustning

- Mikrotom
- Vattenbad (40 °C)
- Objektglasvärmare (45 °C)
- Torkställ för objektglas
- Mikropipetter; 2 µL, 20 µL, 200 µL och 1 000 µL
- Minicentrifug med en 0,2 mL PCR-rörsrotor och 1,5/2,0 mL standardrörsrotor för mikrocentrifug
- Standard mikrocentrifug i bänkmodell med en fixerad rotor som passar 1,5 mL centrifugrör
- Rektangulära glasskålar för färgning med överdrag (ungefärliga inermått: 91 x 71 x 60 mm); 3 st behövs
- Objektglasställ (plats för upp till tio 75 x 25 mm objektglas)
- Torr värmeblock, stationär modell*
- Vortexblandare, bänkmodell, för mikrocentrifugrör
- Graderad cylinder (föreslagen storlek: 100-250 mL)
- Dissekeringsnål eller pincett (vinklad, icke-räfflad)
- Kalibrerade termometrar (täckar intervallet 55 °C- 80 °C)
- UV/Vis-spektrofotometer för mikrovolum (se specifikationer nedan)
- Värmeblock med uppvärmt lock (se specifikationer nedan)
- Centrifug med platta adapter för mikroplatta (se specifikationer nedan)
- Coplin-burk

*Utrustning som krävs för RNA-extraktion med Roche FFPE RNA-isoleringskit och Veracyte FFPE RNA-extraktionskit

10.3 Specifikationer för utrustning

Tabell 1: Fullspektrum mikrovolum UV/Vis-spektrofotometer för nukleinsyrakvantifiering

Utförandefunktion	Specifikationer
Provvolymsintervall	1-2 µL
Banlängd	1 mm
Våglängdsintervall	260-280 nm
Våglängdsnoggrannhet eller fel	± 1 nm
Spektral upplösning eller bandbredd	Mindre eller lika med 4 nm
Absorbansprecision eller slumpmässigt fotometri fel	0,003 (1 mm bana)
Detekteringsgräns	5 ng/µL RNA
Maximal koncentration	≥ 1 000 ng/µL RNA

Tabell 2: Mikrovolymfotodiod UV-Vis-spektrofotometer för nukleinsyrakvantifiering

Utförandefunktion	Specifikationer
Provvolymsintervall	1-2 µL
Banlängd	0,5 mm
Våglängdsintervall	260 och 280 nm
Spektral upplösning	Mindre eller lika med 8 nm
Absorbansnoggrannhet	3 % (vid 1,05 Abs vid 260 nm)
Detekteringsgräns	4 ng/µL RNA
Maximal koncentration	≥ 1 000 ng/µL RNA

Tabell 3: Värmeblock med uppvärmt lock för analyshybridisering

Utförandefunktion	Specifikationer
Värmeblockets utförande	- Måste passa vanlig profil, 12 x 0,2 mL anpassade PCR-rör som medföljer i nCounters analyspack. - Värmeblock utformade för rör med låg profil (LP) och hög profil (HP) är inte kompatibla (även kallade "snabba" block för termocyklings) - Värmeblock utformade för andra typer av rör (t.ex. 0,1 mL-rör, 1,5 mL-rör) är inte kompatibla - Måste programmeras för att hålla en temperatur om 65 °C - Måste hålla en temperatur som ligger inom ±1 °C av 65 °C
Utförande med uppvärmt lock	- Fixerade lock eller lock med justerbar höjd är tillåtna - Locket måste kunna programmeras till 70 °C

Tabell 4: Centrifug med bärare för mikroplatta för centrifugering av nCounter-analysplattor

Utförandefunktion	Specifikationer
Centrifughastighet	Minst 2 000 x g
Rotorer	4 x 750 mL rotorer med svängande bägare och mikrobärare (eller motsvarande) för att passa 96-brunnsmikroplattor i SBS-format
Lägen	Lägen för acceleration/deceleration

11 PROVINSAMLING OCH BEARBETNING

11.1 Krav för vävnadsexemplar och patologigranskning

- Prosigna prognostisk gensignaturalys för bröstcancer bör utföras på ett formalinfixerat, paraffinbäddat (FFPE) brösttumörvävnadsexemplar med positiv hormonreceptor som närmare specificerats av en patolog som en av följande typer av invasiv bröstcancer:
 - Invasiv duktal cancer
 - Invasiv lobulär cancer
 - Invasiv cancer med ductala och lobulära egenskaper ("blandad cancertyp")
 - Ingen särskild typ (NST) eller på annat sätt specificerad (NOS)
- En patolog bör välja det FFPE-tumörblock som har den största ytan med livskraftig invasiv bröstcancer för denna analys.
- Analysen kräver ofärgade vävnadssnitt på ett objektglas för bearbetning och ett motsvarande H&E-färgat objektglas från FFPE-tumörblocket.
- Det rekommenderas att vävnadssnitt för analysbearbetning tas på samma gång som vävnadssnitt för H&E-färgning för att säkerställa att tumörområdet som identifieras på det H&E-färgade objektglaset är representativt för tumörområdet på de ofärgade objektglasen.
- En patolog måste ringa in området med livskraftig invasiv bröstcancer på det H&E-färgade objektglaset, och utesluta omgivande icke-tumörvävnad.
- En patolog eller utbildad laboratorietekniker måste uppskatta tumörens cellularitet och tumörens yta i det inringade området på det H&E-färgade objektglaset.
 - Tumörens cellularitet på det H&E-färgade objektglaset måste vara ≥ 10 %
 - Den inringade tumörytan på det H&E-färgade objektglaset måste vara ≥ 4 mm²

*Observera att tumörcellprocent hänvisar till procentantalet viabla tumörceller inom det inringade tumörområdet.

- En total tumöryta som är större än 100 mm² rekommenderas att användas för analysen. Följande tabell illustrerar antalet objektglas som rekommenderas baserat på den uppmätta tumörytan på det H&E-färgade objektglaset.
- Om vävnadsgranskningen visar att tumörblocket har otillräckligt tumörområde eller otillräcklig tumörcellularitet måste ett annat block från samma tumör bedömas. Om det inte finns några FFPE-block som innehåller tillräckligt med tumörvävnad ska Prosigna-analysen inte köras. Observera att för tumörer med mindre än 20 mm² yta är det mer troligt att RNA-inmatningskraven inte uppfylls.

Tabell 5: Rekommenderade krav för objektglas baserade på tumörens yta

Tumörens uppmätta yta på H&E-färgat objektglas (mm ²)	Antal ofärgade objektglas
4-19	6
20-99	3
≥ 100	1

11.2 PROVINSAMLING OCH BEARBETNING

- Följande kan utföras i enlighet med laboratoriets standardrutiner: vävnadsinsamling och formalinfixering, hantering och förvaring av FFPE-tumörblock samt leverans av objektglasmonterad FFPE-vävnad.
- Objektglasmonterade FFPE-vävnadsskivor måste förvaras i enlighet med laboratoriets standardrutiner. Om objektglasen förvaras under längre tidsperioder (> 30 dagar) måste de förvaras i en uttorkad miljö och bearbetas inom 9 månader för att säkerställa kvaliteten på testresultaten.

11.3 Objektglasberedning

- Använd en mikrotom och skär en 4-5 µm tjock skiva för H&E-färgning.
- Använd en mikrotom och skär 10 µm tjocka skivor för användning i Prosigna-analysen.
- Låt skivorna ligga i ett vattenbad som håller 40 °C.
- Lägg skivorna på positivt laddade objektglas.
- Låt objektglasen lufttorka.
- Baka objektglasen över natten i 45 °C.

11.4 Bearbetning av objektglas

- Tillred en 3-procentig glycerollösning genom att blanda 1,5 mL glycerolbuljong med 48,5 mL molekyllägradigt, nukleasfritt vatten; använd lämplig skala. Håll lösningen i en Coplin-burk för objektglasbearbetning.
- Håll ca 200-250 mL klarmedel med d-Limonen i två färgningsskålar och säkerställ att objektglasen i stället sänks ned helt.
- Håll ca. 200-250 mL ren etanol (EtOH) i en tredje färgningsskål.
- Placera de ofärgade objektglasen med vävnadsskivan/-skivorna i ett objektglasställ.
- Placera objektglasstället i den första färgningsskålen för d-Limonen och skaka försiktigt objektglasstället fram och tillbaka i 10-15 sekunder. Lämna stället i den första skålen för d-Limonen i totalt 2 minuter.
- Flytta objektglasstället från den första färgningsskålen för d-Limonen till den andra skålen för d-Limonen. Skaka försiktigt objektglasstället i 10-15 sekunder. Lämna objektglasstället i den andra färgningsskålen för d-Limonen i totalt 2 minuter. Säkerställ att allt paraffin har avlägsnats; lämna annars stället i den andra färgningsskålen för d-Limonen i ytterligare ca 1 minut.
- Flytta objektglasstället från den andra färgningsskålen för d-Limonen till EtOH-tvätten. Skaka försiktigt objektglasstället i 10-15 sekunder och avlägsna efter 2 minuter.
- Låt objektglasen lufttorka i 5-10 minuter eller tills de är helt torra och vävnaden är vit (detta kan ta längre tid beroende på vävnadens storlek).
- Märk ut tumörens område på baksidan av det ofärgade objektglaset/-gasen genom att lägga det över det motsvarande H&E-färgade objektglaset och flytta över det område som märkts ut.
- Arbeta med ett objektglas åt gången, återfukta vävnaden på det märkta, ofärgade objektglaset genom att doppa glaset i den 3-procentiga glycerollösningen.
- Torka av eventuellt överskott av glycerol från objektglaset med en laborietrasa.
- När flera objektglas bearbetas kan användaren låta objektglasen torka på ett torkställ medan andra objektglas återfuktas.

13. Skrapa bort eventuell icke-tumörvävnad som om ger det utmärkta tumörområdet med ett rakblad eller en skalpell och kasta.
14. Håll i den ena änden av objektglas och vila den andra änden på en plan yta med 45 graders lutning och för på den makrodissekerade tumörvävnaden på kanten av ett rakblad. Vävnaden ska utan problem "rulla" på rakbladet när den tas.
15. Upprepa föregående steg för varje objektglas från samma exemplar. **Obs!** Flera ofärgade objektglas från ett enda FFPE-exemplar kan samlas in på samma rakblad.
16. Skjut försiktigt in vävnadsskivorna från samma exemplar i ett märkt 1,5 mL mikrocentrifugeringsrör.
17. Rengör dissekeringsnålen eller pincetten om sådana används genom att doppa dem i d-Limonen i ett några sekunder och låta dem torka mellan vävnadsprover.

11.5 Isolering av RNA

Veracyte rekommenderar Roche FFPET RNA-isoleringskitet eller Veracyte FFPE RNA-extraktionskitet som har validerats särskilt för användning med Prosigna.

Andra RNA-isoleringskit kan användas för att preparera prover för Prosigna om RNA tas från objektglasmonterade FFPE-brösttumörvävnadsskivor som uppfyller följande specifikationer:

Tabell 6: Specifikationer för RNA-isoleringskit

Metrik	Analys eller mätning	Specifikation
RNA-koncentration	Optisk densitet vid 260 nm	$\geq 12,5$ ng/ μ L
RNA total volym (μ L)	Total eluerad volym	≥ 12 μ L
RNA-renhet	Förhållande mellan optisk densitet vid 260 nm och optisk densitet vid 280 nm (OD 260/280 nm)	1,7-2,3
DNA-kontamination	Genomiskt DNA-innehåll för eluerat RNA-prov	≤ 1 ng/ μ L
RNA-integritet	Storleksfördelning av isolerade RNA-fragment	≥ 90 % av isolerade RNA-fragment måste vara >100 nukleotider i längd

Varning: Om ett alternativt isoleringsförfarande används i kombination med Prosigna-analysen måste detta specifika arbetsflöde valideras helt av laboratoriet innan det implementeras som rutin.

RNA-isoleringsprocedur:

- Om Roche FFPET RNA-isoleringskit används ska du följa de specifika instruktionerna för isolering av RNA såsom de beskrivs nedan.
- Om Veracyte FFPE RNA-extraktionskit används ska du följa bruksanvisningen som tillhandahålls av Veracyte och sedan fortsätta till avsnitt 11.6.
- Om en alternativ extraktionsmetod används ska du följa det validerade protokollet eller protokollet från tillverkaren och sedan fortsätta till avsnitt 11.6.

Alla satser med RNA-extraktionskit som har tillverkats av Roche eller Veracyte är kvalificerade att producera RNA-prover som uppfyller fördefinierade specifikationer för diagnostiska analyser av genuttryck. Hänvisa till det valda RNA-extraktionskitets metodikblad/bruksanvisning för lämpliga instruktioner beträffande förvaring, säkerhet och hantering.

Beredning av arbetslösningar för Roche FFPET RNA-isoleringskit

1. Bered arbetslösningar innan du går vidare med vävnadsnedbrytning och RNA-isolering:

Beredning av arbetslösningar	
Reagens	Procedur
Tvättbuffert I (WB1)*	Tillsätt 15 mL 100 % etanol, förvara preparerad WB1 vid +15 till +25 °C.
Tvättbuffert II (WB2)*	Tillsätt 80 mL 100 % etanol, förvara preparerad WB2 vid +15 till +25 °C.
Proteinas K (PK)	Lös lyofiliserat proteinas K i 4,5 mL reagens förberedelsebuffert (RPB). Bered 600 μ L alikvoter, märk och förvara alikvoter i -15 till -25 °C.
DNas I (DNas I)*	Lös lyofiliserat DNas I i 740 μ L reagens förberedelsebuffert (RPB). Bered 50 μ L alikvoter, märk och förvara alikvoter i -15 till -25 °C.

Obs! Poster markerade med en asterisk (*) behövs inte förrän när vävnaden har brutits ned.

Vävnadsnedbrytning för Roche FFPET RNA-isoleringskit

1. Tina tillräckligt många Proteinase K-alikvoter (PK). När de har tinat ska alikvoterna förvaras på is tills de är redo att användas. **Obs!** En 600 μ L PK-alikvot innehåller tillräckligt med Proteinase K för 4 vävnadsnedbrytningar.
2. Tillsätt 100 μ L buffert för vävnadssönderdelning (TLB), 16 μ L 10 % SDS och 120 μ L Proteinase K arbetslösning till provrör med vävnad.

3. Mixa provrören på vortex med vävnad i några sekunder och centrifugera en kort stund.
4. Inkubera i 55 °C under natten (12-23 timmar).

RNA-isolering för Roche FFPET RNA-isoleringskit

1. Inspektera provrören visuellt för att fastställa om vävnaden har brutits ned helt. En total nedbrytning är klar och har ingen eller mycket lite vävnad i lösningen.
 - a. Gå vidare till nästa steg när nedbrytningen är färdig.
 - b. Om nedbrytningen inte är färdig, tillsätt ytterligare 20 μ L Proteinase K och inkubera i ytterligare en timma.
2. Centrifugera alla prover en kort stund (< 30 sekunder i en minicentrifug).
3. Inkubera vid 80 °C i 15 minuter.
4. Förbered eller tina tillräckligt många DNas-alikvoter. När de har tinat ska alikvoterna förvaras på is tills de är redo att användas. **Obs!** En 50 μ L DNas-alikvot innehåller tillräckligt med DNas för 4 RNA-isoleringar.
5. Späd ut DNas-enzymet i DNas-inkuberingsbufferten (DIB). Den mängd som behövs för N (antal) RNA-isoleringar är: $(N+1) \times 90$ μ L DNas inkuberingsbuffert + $(N+1) \times 10$ μ L DNas. Förvara utspädd DNas-lösning på is tills den ska användas.
6. Tillsätt 325 μ L paraffinbindningsbuffert (PBB) och 325 μ L ren etanol till varje prov och blanda med hjälp av pipettering.
7. Centrifugera en kort stund (< 30 sekunder i en minicentrifug).
8. Placera ett HP-filtrerrör (High Pure-filtrerrör) på ett High Pure uppsamlingsrör.
9. Pipettera provet till den övre behållaren på filtrerröret och undvik eventuell restvävnad.
10. Centrifugera i 30 sekunder i 6 000 x g.
11. Sätt filtrerröret i ett nytt uppsamlingsrör (kassera det gamla uppsamlingsröret med genomflödet).
12. Tillsätt 500 μ L tvättbuffert I-arbetslösning (WB1) till High Pure filtrerväv, centrifugera i 20-30 sekunder i 6 000 x g, kassera genomflödet.
13. Sätt filtrerröret i ett nytt uppsamlingsrör (kassera det gamla uppsamlingsröret med genomflödet).
14. Tillsätt 100 μ L DNas-arbetslösning till HP-filtrerrörets filtrerväv och inkubera i 15 minuter i +15 till +25 °C.
15. Tillsätt 500 μ L tvättbuffert I-arbetslösning (WB1) till High Pure filtrerväv, centrifugera i 20-30 sekunder i 6 000 x g, kassera genomflödet.
16. Tillsätt 500 μ L tvättbuffert II-arbetslösning (WB2) till High Pure filtrerväv, centrifugera i 20-30 sekunder i 6 000 x g, kassera genomflödet.
17. Tillsätt 500 μ L tvättbuffert II-arbetslösning (WB2) till High Pure filtrerväv, centrifugera i 20-30 sekunder i 6 000 x g, kassera genomflödet.
18. Centrifugera i 2 minuter i 16 000 x g för att helt torka filtrets väv.
19. Sätt filtrerröret i ett märkt RNas-fritt 1,5 eller 1,7 mL mikrocentrifugeringsrör.
20. Tillsätt 30 μ L elueringsbuffert (EB) till mitten av High Pure-filtrerväven.
21. Inkubera i 1 minut vid +15 till +25 °C.
22. Centrifugera i 1 minut i 6 000 x g för att eluera RNA från kolumnen. Ta bort och kassera High Pure-filtrerröret.
23. Centrifugera den eluerade RNA i mikrocentrifugröret i 2 minuter vid högsta hastighet.
24. Överför supernatanten till ett 0,5 mL rör med skruvkork utan att störa några glasfibrer som kan ha tvättats bort av filtrerväven på botten av det ursprungliga röret.

11.6 Mäta koncentration och kvalitet på RNA

1. Mät koncentrationen i den isolerade RNA under samma arbetsdag (förvara i +2 till +8 °C) eller frys i -70 °C eller lägre tills det ska användas.
2. Mät den optiska densiteten (OD) vid 260 och 280 nm för 2 μ L av det isolerade RNA med hjälp av en spektrofotometer som uppfyller definierade specifikationer som anges 10.3 Specifikationer för utrustning. Undvik pipettering av de 2 μ L som finns på botten av det ursprungliga röret om spår av glasfiber finns kvar som kan störa avläsningen av den optiska densiteten.
3. Följ instruktionerna från spektrofotometerens tillverkare för mätning av RNA.
4. Om det finns prover som inte uppfyller lägsta RNA-renhet eller koncentrationsmetrik (Tabell 6), centrifugera provröret i 1 minut i maximal hastighet (> 10 000 x g), sätt röret på is och upprepa mätprocessen. Om provet fortfarande inte uppfyller varken renhets-

eller koncentrationsmetriken är RNA-provet inte lämpligt för analys i Prosigna-Analysproceduren. Använd inte RNA av otillräcklig kvalitet eller kvantitet i Prosigna-analysen.

- RNA-extraktion kan upprepas om specifikationer för lägsta koncentration eller lägsta renhet inte uppfylls (Tabell 6). Användare kan välja att isolera ytterligare objektglas från samma FFPE-block eller välja att separera block från samma patient.
- Om RNA-koncentrationen överskrider 250 ng/μL måste den spädas ut med RNas- och DNas-fritt vatten av molekylärkvalitet till en målkoncentration som är 200 ng/μL innan hybridiseringsanalys nedströms utförs. Använd det registrerade kvotresultatet för OD 260/280 från det utspädda provet för att fastställa om det utspädda provet uppfyller lägsta RNA-renhet på 1.7.
- Frys RNA i -70°C eller lägre om Prosigna-analysen inte kan slutföras samma arbetsdag.

11.7 Analysprocedur

Denna analysprocedur beskriver de steg som är nödvändiga för att utföra Prosigna-analysen med hjälp av nCounter Analyssystem. Dessa steg kan sammanfattas i följande kategorier över två efter varandra följande dagar:

Dag ett

- Inställning av RSID-register (Run Set Identification) i webbapplikationen
- Inställning av RNA-hybridisering med Prosigna CodeSet (30 minuters inställning, 15-21 timmar hybridisering)

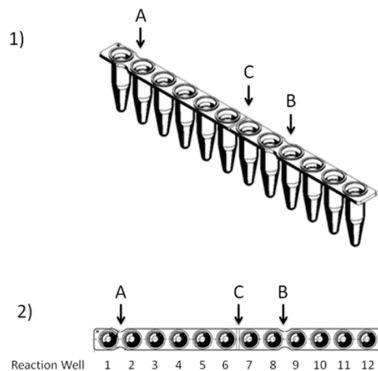
Dag två

- Inställning och körning av analysstation (20 minuters inställning, 2-3 timmar per körning, beroende på hur många prover som körs)
- Inställning och skanning av Kassett på den digitala analysatorn (5 minuters inställning, 2,5-4,5 timmar för varje Kassett, beroende på hur många prover som körs)
- Hämta rapport (30 minuter)

Patientprovsurval och batchinställning

- Bestäm vilka patientprover som ska ingå i analyskörningen. Upp till 10 prover kan ingå i en enda batch
 - Varje prov i batchen kommer att tilldelas en unik plats i en brunnsremsa med 12 PCR-rör som används för hybridisering, som är registrerad som en del av körningssetets ID på instrumentet (Körningssetets ID utförs i programvara på webben). Observera att plats 1 och 2 är reserverade för referensprovet och plats 3-12 är för RNA-prover från tumören.
 - Bilden nedan visar PCR-röret från sidan 1) och ovanifrån 2). PCR-rören är asymmetriskt kodade mellan reaktionsbrunnarna 1 och 2 (A) och 8 och 9 (B) för att upprätthålla provordningen under bearbetning. Det finns även skåror mellan rören vid reaktionsbrunnarna 6 och 7 (C) för att göra det lättare att skära av remsan om det behövs för att rören ska passa i vanliga centrifugadaptrar.

Figure 6: Bild av kodade PCR-rör



- Beräkna mängden RNA och vatten (vid behov) som ska tillsättas till hybridiseringsreaktionen för varje prov i batchen.
 - Rekommenderad RNA-inmatning är 250 ng för analysen. Godtagbart intervall för RNA-inmatning för hybridisering är 125 – 500 ng.

- Beräkna volymen (i mikroliter) RNA-prov som ska tillsättas i hybridiseringsreaktionen genom att dividera den önskade provinmatningen (t.ex. 250 ng) med den uppmätta koncentrationen.
- Om den beräknade koncentrationen av provet ligger mellan 12,5 ng/μL och 25 ng/μL, tillsätt högst 10 μL.
- För prover som kräver mindre än 10 μL, beräkna volymen vatten som krävs för att generera 10 μL provvolym totalt.

Exempel: För ett prov med en uppmätt RNA-koncentration på 85 ng/μL behövs 2,9 μL prov för en total massa på 250 ng och 7,1 μL vatten krävs för att få volymen 10 μL innan resterande reagenser tillsätts. Dvs.: $250 \text{ ng} \div 85 \text{ ng}/\mu\text{L} = 2,9 \mu\text{L}$

Registrering och bearbetning av prov

Användaren kommer att bygga ett unikt körningsset-ID för varje batch med prover och associerar varje prov-ID med plats på rörremsan (plats 3-12) med hjälp av webbapplikationen nCounter Analysis System Services. Användaren kan hämta ytterligare instruktioner i användarhandboken för hur man använder webbapplikationen nCounter Analysis System Services.

- Om RNA varit fryst före användning, utför följande steg innan du går vidare:
 - Tina RNA-prov helt och förvara på is.
 - Centrifugera det tinade provröret i en minut i maxhastighet ($> 10\,000 \times g$) och sätt tillbaka på is.
- Välj lämplig storlek på Prosigna-test baserat på antal patientprover som ska analyseras (1, 2, 3, 4 eller 10). Ta fram en tub av varje av följande CodeSet-kitreagenser från frysen som håller -80 °C och tina. Förvara reagenserna på is om du inte ska gå vidare med efterföljande steg omedelbart.
 - Prosigna rapportör-CodeSet (grön etikett på locket)
 - Prosigna infångnings-ProbeSet (grå etikett på locket)
 - Prosigna referensprov (ingen etikett på locket)
- Avlägsna streckkodsetiketten för CodeSet-loten och en konfigurationskod för analys från CodeSet-förpackningen.
- Använd en webbläsare och logga in på IVD nCounter Analyssystemets webbapplikation för att börja ställa in de digitala registreringsformulären.
- Välj "Create New Run Set" (Skapa nytt körningsset) på huvudsidan.
- Det första obligatoriska fältet när en Prosigna-körning ska definieras är "Run Set ID" (ID för körningsset). Skriv in ett unikt ID i fältet för att identifiera batchen med prover.
- Skanna eller skriv manuellt in konfigurationskoden för analys i webbapplikationen. När den har skannats eller skrivits in kan den kastas.
- Skanna eller skriv manuellt in CodeSet-kitnumret i webbapplikationen.
- Skriv sedan in ett unikt prov-ID för det prov som ska vara på den tredje platsen/brunnen på rörremsan i fältet för prov-ID.
 - Skriv in patientens RNA-prov-ID med hjälp av en streckkodsläsare eller manuellt genom att ange prov-ID med hjälp av ett tangentbord.
 - När du har angett ett prov-ID i varje, gå vidare för att fylla i obligatoriska nedrullningsalternativ (bruttotumörstorlek och körtelstatus) för provet innan nästa prov skrivs in.
 - Använd antalet positiva körtlar som fastställs under patientens patologiska bedömning för att välja lämplig körtelkategori för analysen (noll, 1-3, ≥ 4).
 - Använd den uppmätta bruttotumörstorleken eller det stadium som fastställdes under patientens patologiska bedömning för att välja lämplig kategori för bruttotumörstorlek för analysen ($\leq 2 \text{ cm}$ eller $> 2 \text{ cm}$).
 - Kommentarer kan skrivas in i det frivilliga Memo-fältet för varje prov.
- Obs!** Om några brunnar/platser inte behövs lämnar du resterande fält tomma. Om ytterligare fält behövs för fler prover använder du en annan analyskonfiguration som passar fler prover.
- När alla prover skrivits in, ange vilka användare som får följande:
 - Statusuppdateringar för körningar på analysstationen och den digitala analysatorn.
 - Meddelande om att slutrapporten finns tillgänglig.
- Spara det slutförda körningssetet.
 - Arbetsbladet för körningssetet kan skrivas ut och användas för att spåra och verifiera prover.

Procedur för hybridiseringsreaktion

Obs! Följande steg antar tio (10) patientprover och två (2) referensprover.

Obs! Centrifugera inte rapportör-CodeSet snabbare än $3\,000 \times g$ eller i mer än 10 sekunder och "puls" inte. Om du gör det kommer centrifugen upp i maxhastighet vilket kan centrifugera ett CodeSet ut ur lösningen.

1. Programmera värmeblocket med hjälp av $30\ \mu\text{L}$ volym, beräknad block- och locktemperatur och "evig" tidsinställning (eller motsvarande inställning för tillhållartid). Ställ in temperaturen på värmeblocket till $65\ ^\circ\text{C}$ och ställ in det uppvärmda locket på $70\ ^\circ\text{C}$.

Obs! För följande steg är det viktigt att upprätthålla ordningen med vilken proverna läggs till rörremsan för att säkerställa att de överensstämmer med ordningen på körningssetets ID.

2. Märk den kodade 12-brunnsremsan som medföljer för att urskilja platserna 1-6 från platserna 7-12 (se bild på provrörsremsan).
3. Dela brunnsremsan på mitten om det behövs så den passar i en minicentrifug med en PCR-rörsadapter.
4. Pipettera $10\ \mu\text{L}$ referensprov på plats 1 och 2 på den kodade rörremsan.
5. Pipettera den beräknade volymen vatten som krävs för varje prov i respektive platsen på den kodade rörremsan.
6. Pipettera den beräknade volymen RNA som krävs för varje prov i lämplig plats på den kodade rörremsan med hjälp av en ny pipettspets för varje prov.
7. När patientprovet har lagts till på rörremsan bör provröret placeras i ett provrörsställ för att upprätthålla den ordning i vilken provet sattes på remsan. Detta för att säkerställa att proverna lades till i den avsedda ordningen efter att alla proverna har lagts till på rörremsan.
8. När alla prover har lagts till på rörremsan, kontrollera att provordningen behålls på remsan (arbetsbladet för körningssetet kan användas för att kontrollera provordningen).

- a. Om det behövs, redigera körningssetets ID med hjälp av webbapplikationens programvara för att spegla samma ordning som den slutliga layouten (se användarhandboken för nCounter Analyssystem för instruktioner angående redigering av ett befintligt ID för körningsset).

9. När provordningen har verifierats, sätt tillbaka de enskilda RNA-provrören på is.
10. Skapa en mastermix som innehåller $130\ \mu\text{L}$ hybridiseringsbuffert och $65\ \mu\text{L}$ rapportörens CodeSet.

Obs! Om rapportörens CodeSet förvarades på is, låt det jämnas ut sig till rumstemperatur i en minut innan du tillsätter hybridiseringsbufferten.

11. Blanda genom att pipettera och centrifugera mastermixen en kort stund.

Obs! Tillsätt inte infångnings-ProbeSetet till mastermixen OCH förvara inte den färdiga mastermixen på is.

12. Pipettera $15\ \mu\text{L}$ mastermix till var och en av de 12 brunnarna. Använd en ny pipett till varje brunn.

Obs! När **nästa** steg slutförts måste rörremsan placeras i värmeblocket i $65\ ^\circ\text{C}$ inom 15 minuter.

13. Tillsätt $5\ \mu\text{L}$ infångnings-ProbeSet i varje brunn med hjälp av en ny pipettspets för varje brunn.

14. Försegla brunnarna och blanda reagenserna genom att invertera rörremsan flera gånger och knäppa på den för att säkerställa att vätskorna blandats helt.

15. Centrifugera proverna en kort stund i PCR-röret i en pikofug eller minicentrifug (vid $< 3\,000 \times g$).

Obs! Använd en pikofug med plats för 12 PCR-rör, eller, om det behövs, en minicentrifug med plats för skurna brunnsremsor.

16. Placera PCR-rören i ett $65\ ^\circ\text{C}$ varmt värmeblock med uppvärmt lock. Inkubera hybridiseringsanalyserna i $65\ ^\circ\text{C}$ i 15-21 timmar. Hybridiseringar ska hålla $65\ ^\circ\text{C}$ tills de är redo att bearbetas på analysstationen.

Obs! Kassera alla oanvända CodeSet.

Bearbeta prover på nCounters analysstation

1. Hitta den analysstation som tillhör den digitala analysatorn.
2. Ta ut nCounter-Kassetter ur förvaringen i $-20\ ^\circ\text{C}$ och låt dem nå rumstemperatur i 10-15 minuter i foliepåsen.

Obs! Se till att komponenter från samma kit används tillsammans.

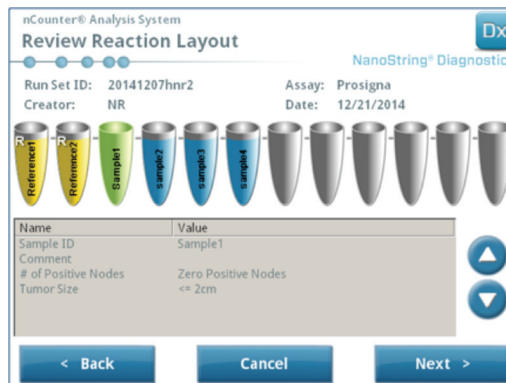
3. Ta ut Kassetten ur foliepåsen när den har nått rumstemperatur och sätt den i analysstationens däck.

4. Ta fram nCounter-analysplattorna från förvaringsstället ($4\ ^\circ\text{C}$) och låt dem anpassa sig till rumstemperatur i 10-15 minuter.

Obs! Endast en analysplatta krävs för körningar som utförs med hjälp av ett Prosigna-kit för 1, 2, 3 eller 4 analyser.

5. Centrifugera analysplattorna i $2\,000 \times g$ i 2 minuter för att samla vätskorna på botten av brunnarna innan analysplattorna laddas på analysstationen.
6. Förbered analysstationen med förbrukningsartiklar för nCounter-analyspack medan kassetterna och analysplattorna når rumstemperatur.
7. Använd nCounter-analysstationens pekskärm och tryck på "Diagnostics" (Diagnostik) för din analys.
8. Under skärmen "Main Menu" (Huvudmeny) trycker du på "Process Samples" (Bearbeta prover) på pekskärmen.
9. Bläddra i listan med ID för körningsset (RSID) som visas på skärmen för att bekräfta RSID för de prover som håller på att bearbetas.
10. Välj RSID genom att peka på skärmen och välja "Next" (Nästa) på skärmen.
11. Bekräfta på pekskärmen att korrekt RSID valdes genom att titta på varje rör på skärmen och kontrollera att provinformation stämmer.
 - a. Arbetsbladet för körningssetet kan användas här för att spåra och verifiera prover.
 - b. Om fel RSID valdes, tryck på "Back" (Bakåt) och välj rätt RSID.
 - c. Om RSID var rätt men det finns provinmatningsfel, tryck på "Back" (Bakåt) och gå till en dator och redigera RSID via webbapplikationen.

Figur 7: Skärmen "Process a Run" (Bearbeta en körning) på analysstationen



12. På följande flera skärmar kommer du att uppmanas att skanna de begärda streckkoderna för reagenserna i de öppna fälten eller bekräfta däckplaceringen av de nödvändiga förbrukningsartiklarna. Tryck på "Next" (Nästa) på skärmen när du har slutfört varje uppgift för att gå vidare till nästa skärm.

Obs! Endast en analysplatta och ett tomt rör med värmeremsa krävs för körningar som görs med Prosigna-kitet för 1, 2, 3 eller 4 analyser. För körningar med 1, 2, 3 eller 4 analyser laddas analysplattan och tomma rör med värmeremsa i sina respektive frontpositioner (närmast användaren) på analysstationens däck.

13. Ta ur proverna ur värmeblocket.

Obs! Initiera analysstationen för körning inom 15 minuter efter det att du tagit ur proverna ur värmeblocket.

14. Placera PCR-rören i en pikofug eller minicentrifug och centrifugera en kort stund (vid $< 3\,000 \times g$).

15. Ta försiktigt bort rörförseglingarna från rörremsorna.

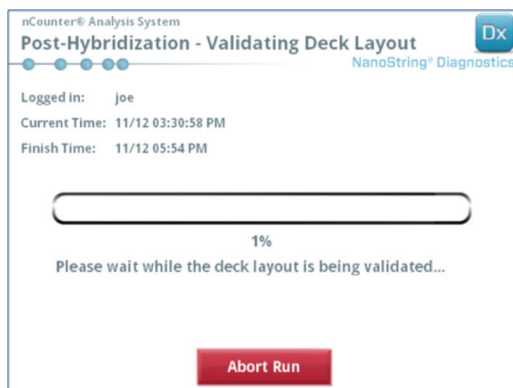
16. Skärorna på remsan och hjälplinerna på analysstationen ska stämma överens vad gäller ordning och riktning för proverna.

17. Placera PCR-rören med brunnarna i ordning 1-12 från vänster till höger på nCounter-analysstationens däck. Vid en körning med en sats med 1, 2, 3 eller 4 analyser behöver endast den första halvan av remsan (brunn 1-6) placeras på vänster sida av provrörshållaren på däcket, om tillämpligt. Observera att det är viktigt att använda endast brunn 1-6; den andra halvan av remsan (brunn 7-12) passar inte i den vänstra halvan av hållaren på grund av skåran på röret.

18. Kontrollera att PCR-rören är korrekt placerade på analysstationen och stäng metallocket.

19. Om locket inte går att stänga ordentligt uppmanas du att stänga det under valideringen av ordningen på däck.
20. Tryck på "Next" (Nästa) på pekskärmen.
21. Stäng instrumentets lucka när du uppmanas göra det och tryck på "Next" för att starta valideringen av däckutförande.
22. Om ett fel inträffar följer du anvisningarna som gäller för det specifika felet för att fortsätta med valideringen.

Figur 8: Efterhybridisering Validering av däckutförande Analysstationsvalidering



23. När däckutförandet har validerats trycker du på "Start Processing" (Påbörja bearbetning) på pekskärmen.
Obs! Om det uppstår problem när analysstationen ska startas sätter du tillbaka hybridiserade prover i värmeblocket, men ska inte överskrida maxtiden på 21 timmar.
24. Följ skärmanvisningarna på analysstationen när körningen är klar.
25. När analysstationen har slutfört körningen tar du försiktigt ut kassetten ur analysstationen och förseglar brunnarna på kassetten med det medföljande överdragslocket.
Obs! Låt inte kassetten stå utan överdrag på analysstationen över natten.
26. Om du inte kommer att skanna proverna samma dag, förvara dem i 4 °C i en opak kartong i upp till en vecka.

Skanna kassetten på nCounters digitala analysator

1. Lokalisera den digitala analysator som är kopplad till analysstationen som bearbetade proverna. Sätt i Kassetten i nCounters digitala analysator för skanning.
 - a. Öppna luckan till den digitala analysatorn.
 - b. Placera Kassetten som ska läggas till i ett tomt fack.
 - c. Stäng luckan och följ anvisningarna på pekskärmen.
2. Den digitala analysatorns pekskrmsgränssnitt har flera olika bilder så att du snabbt kan identifiera positionernas status:
 - a. Tom plats: Detta fack är tomt och redo att laddas med en ny kasset.
 - b. Slutför blå kasset: Skanning slutförd.

TA INTE UR FÖLJANDE KASSETTER:

 - a. Vit kasset: Det här facket innehåller en kasset som är registrerad men inte skannad.
 - b. Partiell blå kasset: Det här facket innehåller en kasset som håller på att skannas
3. Kassetter som har skannats klart kan tas bort från den digitala analysatorn.
4. Om detta är den första Kassetten som laddas i den digitala analysatorn, klicka på "Diagnostics" (Diagnostik) för att logga in. Om den digitala analysatorn redan skannar kassetter, gå vidare till steg 9 nedan.
5. Sätt försiktigt Kassetten i ett ledigt fack (se guide för platsstatus ovan) på den digitala analysatorn. Facket och Kassetten är anpassade efter varandra för att säkerställa att Kassetten sätts i på rätt håll. Streckkoden kommer att vara vänd uppåt.
6. Sänk ned överdraget över luckan och tryck på Kassetten genom öppningen i luckans lock för att säkerställa att Kassetten är korrekt placerad.
7. Klicka på "Start Counting" (Börja räkna) och vänta på att skannern startar skanningsprocessen. Du kommer att höra små rytmiska klickljud när den digitala analysatorn börjar skanna Kassetten.
8. Bekräfta att en blå stapel syns vid Kassetten plats på skärmen (inom fem minuter efter att skanningen har startat) som indikerar att skanningen har startat.

9. Om du vill lägga till en kasset till en digital analysator som redan skannar kassetter väljer du "Pause" (Pausa) på skärmen "Counting Cartridges" (Räknar kassetter) och väntar på att analysatorn pausar den aktuella skanningen.
10. Öppna luckan till den digitala analysatorn.
11. Placera Kassetten som ska läggas till i ett tomt fack (se guide för positionsstatus ovan).
12. Stäng luckan och tryck på "Resume" (Återuppta).
13. När skanningen har slutförts skickar programvaran rapporten till de e-postadresser som angetts tidigare.
14. När e-postmeddelandet har tagits emot, ta bort Kassetten som är klar och kasta enligt gällande bestämmelser.
Obs! Rapporter genereras för de körningar som slutförts samt för körningar med fel som är associerade med datakvalitetskontroll. Rapporter genereras inte i händelse av ett fel som inte är associerat med datakvalitetskontroll. Kontakta Veracytes kundtjänst för att få hjälp om detta inträffar.
15. Använd länken som bifogas i e-postmeddelandet för att öppna webbapplikationen och hämta alla analysrapporter som associeras det RSID som håller på att bearbetas.
16. Följande fel: Följ rekommendationerna i analysrapporten för fel i enskilda prover eller systemfel.
Obs! Fel i enskilda prover anses inte vara systemfel.

12 FELSÖKNING OCH ANALYSFEL

Tabell 7: Felkoder för upprepning av analys

Felkod	Felbeskrivning	Rekommenderad åtgärd
5	Skanningsfel	Kör om provet med 250 ng RNA
7	Hög signal	Specificera om provet och kör om analysen med 125 ng RNA
6	Låg signal	Specificera om provet och kör om analysen med 500 ng RNA
30	Låg signal	Specificera om provet och kör om analysen med 500 ng RNA
31	Låg RNA-signal	Specificera om provet och kör om analysen med 500 ng RNA

Orsaker för att upprepa analysen:

1. Analysrapporten identifierar misslyckade prover och inga analysresultat rapporteras. Analysresultaten rapporteras för prov som godkänns.
2. Analysrapporten identifierar typen av fel och rekommenderad åtgärd i händelse av ett analysfel. RNA-koncentrationen hos misslyckade prover kan mätas om och proverna kan köras om (som delar i en ny batch/RSID) beroende på typen av fel och mängden RNA-massa som finns kvar för att få ett analysresultat.

13 RESULTAT AV ANALYSEN

Prosigna-analysen består av en serie kvalitetskontrollmätningar som automatiskt tillämpas på varje prov under analysen. Dessa mätningar bedömer analysens prestanda för att fastställa om resultaten kommer att hamna inom förväntade värden. Vid en lyckad analys av dessa kvalitetskontrollmätningar ger Prosigna-analysen följande resultat:

Tabell 8: Resultat för Prosigna-analysen

Resultat	Resultatvärden
Intrinsisk subtyp för bröstcancerexemplaret	Luminal A Luminal B HER2-berikad Basalliknande
Individuell beräkning av sannolikheten för fjärmetastaser inom 10 år	0-100 %
ROR-värde (Risk för återfall)	Heltal på en skala 0-100
Riskkategori	Låg, Medelhög, Hög

13.1 Intrinsiska subtyper

Den intrinsiska subtypen av en bröstcancertumör har visat sig vara relaterad till prognos i bröstcancer i tidigt stadium. I genomsnitt har patienter med en Luminal A-tumör betydligt bättre resultat än patienter med tumörer av typen Luminal B, HER2-berikad eller Basal-liknande^{2,5}.

Den intrinsiska subtypen identifieras genom att genuttrycksprofilen för 50 gener jämförs i ett okänt prov med de förväntade uttrycksprofilerna för de fyra intrinsiska subtyperna. Den subtyp som har en profil som är mest lik tilldelas det okända provet.

De vanligaste subtyperna för bröstcancer är de luminala subtyperna, Luminal A (LumA) och Luminal B (LumB). Tidigare studier visar att Luminal A utgör 30-40 % och Luminal B ca. 20 % av bröstcancertumörer⁵. Men mer än 90 % av hormonreceptorpositiva patienter har luminala tumörer. Genuttrycksmönstret för dessa subtyper liknar den luminala epitelkomponenten i bröstvävnaden⁵. Dessa tumörer karakteriseras av ett högt uttryck av östrogenreceptorer (ER), progesteronreceptorer (PR) och gener som associeras med ER-aktivering, t.ex. LIV1, GATA3 och cyclin D1, samt uttryck för de luminala cytokeratinerna 8 och 18. Luminal A-bröstcancer uppvisar lägre uttryck av gener associerade med cellcykelaktivering vid jämförelse med Luminal B-bröstcancer vilket resulterar i bättre prognoser.

Tidigare studier visar att subtypen HER2-berikad (HER2-E) utgör ca. 20 % av bröstcancertyperna⁵. Men HER2-berikade tumörer är generellt sett ER-negativa, så endast 5 % av den testade ER-positiva patientpopulationen visade sig ha HER2-berikad bröstcancer. Oavsett ER-status är HER2-berikade tumörer HER2-positiva i de flesta fallen, med högt uttryck av ERBB2-klustret, inklusive ERBB2 och GRB7. Det finns även högt uttryck för gener associerade med cellcykelaktivering.

Tidigare studier visar att subtypen Basallik utgör ca. 20 % av bröstcancertyperna⁵. Basalliknande tumörer är dock generellt sett ER-negativa så endast 1 % av hormonreceptorpositiva patienter har basalliknande bröstcancer. Den basalliknande subtypen är nästan alltid kliniskt HER2-negativ och uttrycker en rad "basala" biomarkörer, bl.a. de basal epitelens cytokeratiner (CK) och EGFR (epidermal tillväxtfaktorreceptor). Det finns högt uttryck för gener som associeras med cellcykelaktivering.

13.2 ROR-värde

ROR-värdet anges som ett heltal på en skala mellan 0 och 100 och är relaterat till en enskild patients sannolikhet för fjärrmetastaser inom tio uppföljningsår för populationen med den definierade populationen för avsedd användning. ROR-värdet beräknas genom att jämföra uttrycksprofilen för 46 gener i ett okänt prov med de förväntade profilerna för de fyra intrinsiska subtyper, såsom beskrivits ovan, för att beräkna fyra olika korrelationsvärden. Dessa korrelationsvärden kombineras sedan med ett proliferationsvärde och bruttotumörstorleken för att beräkna ROR-värdet.

13.3 Sannolikhet för fjärrmetastaser efter 10 år

ROR-värdet för två kohorter av postmenopausala kvinnor med hormonreceptorpositiv bröstcancer i tidigt stadium jämfördes med fjärrmetastasfri överlevnad efter kirurgi och behandling med fem års adjuvant endokrin behandling följt av fem års observation (se kliniska prestanda avsnitt 16.4 för detaljer). Dessa två studier resulterade i en modell som jämför ROR-värdet med sannolikheten för fjärrmetastaser i den testade patientpopulationen som inkluderar ett 95 % konfidensintervall.

13.4 Riskklassificering

Riskklassificering ges också för att tillåta tolkning av ROR-värdet genom att använda tröskelvärden relaterade till kliniska resultat i testade patientpopulationer.

Tabell 9: Riskklassificering efter ROR-värde och körtelstatus

Körtelstatus	ROR-intervall	Riskklassificering
Lymfkörtelnegativ	0-40	Låg
	41-60	Medelhög
	61-100	Hög
Lymfkörtelpositiv (1-3 körtlar)	0-15	Låg
	16-40	Medelhög
	41-100	Hög
Lymfkörtelpositiv (≥ 4 körtlar)	0-100	Hög

13.5 Kvalitetskontroll

Varje lot av Prosigna-analysens komponenter testas med hjälp av förutbestämda specifikationer. Alla poster på sats-nivå spåras med hjälp av lotnummer och de kritiska komponenterna i varje sats testas tillsammans och släpps som en Prosigna-satslot.

I Prosigna-Analysens sats finns en serie interna kontroller som används för att bedöma kvaliteten på varje körningsset som en helhet och på varje prov individuellt. Kontrollerna finns uppräknade nedan.

Kontrollset för parti: Referensprov för *In vitro*-transkriberat RNA

Ett syntetiskt RNA-referensprov ingår som en kontroll i Prosigna-Analyskitet. Referensprovet består av *in-vitro*-transkriberade RNA-mål från PAM50-

gensignaturen och åtta hushållsgener. Referensprovet bearbetas två gånger i varje Prosigna-Analys som körs tillsammans med ett set med upp till 10 ökända RNA-prover från brösttumörer på en rema med 12 reaktionsrör. Signalen från referensprovet analyseras mot fördefinierade tröskelvärden för att kvalificera körningen.

Signalen från var och en av generna i PAM50 för RNA-provet från brösttumören normaliseras till motsvarande gener för referensprovet.

Set för positiv kontroll: *in vitro*-transkriberat mål-RNA och motsvarande infångnings- och rapportörprober

Syntetiska RNA-mål används som positiva kontroller (PC) för Prosigna-analysen. PC-målsekvenser erhålls från det externa RNA-kontrollkonsortiets (ERCC) DNA-sekvensbibliotek⁶. RNA-målen är *in-vitro*-transkriberade från DNA-plasmider. Sex RNA-mål ingår i analyskitet i en fyrfaldig titreringsserie (128-0,125 fM slutlig koncentration i hybridiseringsreaktionen) tillsammans med motsvarande infångnings- och rapportörprober. De positiva kontrollerna läggs till varje brösttumörs RNA-prov och referensprov som analyseras med Prosigna. Ett prov diskvalificeras från vidare analys om signalintensiteterna från de positiva kontrollerna inte uppfyller fördefinierade tröskelvärden.

Negativt kontrollset: exogena prober utan mål

Negativa kontrollmålsekvenser erhålls från ERCC:s DNA-sekvensbibliotek⁶. De prober som är utvecklade för att detektera dessa målsekvenser ingår som en del av analyskitet utan motsvarande målsekvens. De negativa kontrollerna (NC) läggs till varje brösttumörs RNA-prov och referensprov som analyseras med Prosigna som en kvalitetskontroll. Provet diskvalificeras från vidare analys om signalintensiteterna från de negativa kontrollerna inte uppfyller fördefinierade tröskelvärden.

Kontrollset för RNA-integritet: Hushållsgener

Infångnings- och rapportörprober utformade för att detektera åtta hushållsgener och 50 gener i PAM50-gensignaturen ingår i Prosigna-kitet. Uttrycksnivåerna för de åtta hushållsgenerna analyseras för att bestämma kvaliteten på RNA extraherat från FFPE-vävnadsprovet och insatt i Prosigna-analysen. Provet diskvalificeras från vidare analys om uttrycksnivåerna för hushållsgenerna hamnar under fördefinierade tröskelvärden.

Hushållsgenerna används även för att normalisera för eventuella skillnader i intakt RNA-mängd i ett prov innan normalisering av referensprovet.

14 BEGRÄNSNINGAR I PROCEDURERNA

1. Prosigna-analysen har optimerats för att identifiera den intrinsiska subtypen av en bröstcancertumör och patientens risk för fjärrmetastaser efter tio år som ett ROR-värde och riskkategori, med hjälp av renat RNA extraherat från formalinfixerad, paraffinbäddad mänsklig bröstvävnad. Andra typer av exemplar eller fixativ har inte analyserats och ska inte användas.
2. Prestandan för Prosigna-analysen validerades endast med hjälp av de procedurer som medföljer i denna bipacksedel. Ändringar i dessa procedurer kan ändra analysens prestanda.
3. Prestandaegenskaper för Prosigna-analysen har fastställts för postmenopausala kvinnor med hormonreceptorpositiv bröstcancer i tidigt stadium som erhållit fem års adjuvant endokrin behandling. Prestanda med andra behandlingsprogram eller i andra patientgrupper har inte fastställts.
4. Om RNA av otillräcklig kvalitet eller kvantitet läggs till i analysen kan Prosigna-analysen kanske inte ge ett giltigt resultat och rapporterar istället en misslyckad analys.
5. Tolkningen av Prosigna-analysresultat (intrinsisk subtyp, ROR-värde, riskkategori) ska utvärderas inom ramen för andra kliniskopatologiska faktorer, patientens sjukdomshistoria och andra laboratorieresultat.
6. Utförandet av Prosigna-analysen har fastställts med RNA som uppfyller specifikationerna som definieras i förhållande till ovanstående procedur. Utförande med isolerad RNA som inte uppfyller dessa specifikationer har inte fastställts.
7. Kända ämnen som stör Prosigna-analysen är bl.a. genomiskt DNA och icke-tumörvävnad (t.ex. normal vävnad). Se generella analysöversväganden innan proceduren startas. Området med livskraftig invasiv cancer måste tydligt identifieras av en patolog innan du kör proceduren. Dessutom måste varje RNA-prov behandlas med DNase. Innan du fortsätter med patientanalysprover bör varje ny DNase-lot analyseras och kvalificeras per den medföljande specifikationen vid användning av ett annat isoleringskit än isoleringskitet Roche FFPET RNA.

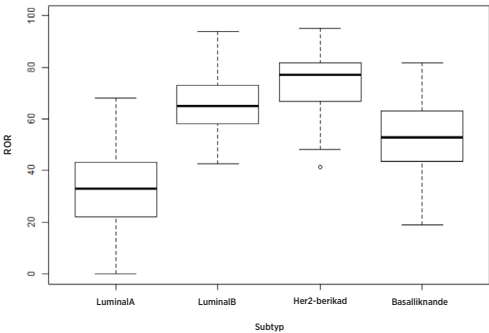
15 FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Prosigna-analysen ger ett ROR-värdet (0-100), en intrinsisk subtyp (Luminal A, Luminal B, HER2-berikad eller Basalliknande) och riskkategorisering (Låg, Medelhög eller Hög) för varje tumörprov. Utifrån de två kliniska valideringsstudier som beskrivs nedan visas intervallet och frekvensen av ROR-värden (Figur 10), den kontinuerliga relationen mellan ROR och sannolikheten för fjärrmetastaser efter körtelstatus (Figur 11) och distribution av ROR-värde efter intrinsisk subtyp (Figur 9) som förväntas för postmenopausala kvinnor med HR+, bröstcancer i tidigt stadium som behandlas med anastrozol eller tamoxifen i ATAC- och ABCSG-8-studier. Baserat på dessa kliniska valideringsstudier visas fjärrmetastasfri överlevnad efter 10 uppföljningsår efter riskkategorisering i Figur 12 (lymfkörtelnegativa patienter) och Figur 13 (lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar) patienter).

15.1 ROR-intervall efter subtyp

Figur 9 visar ett lådagram av ROR-värde efter intrinsisk subtyp.

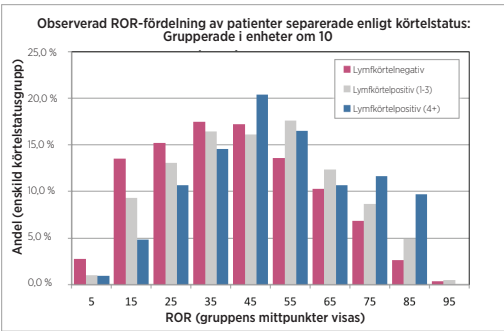
Figur 9: Lådagram av ROR-värde efter intrinsisk subtyp



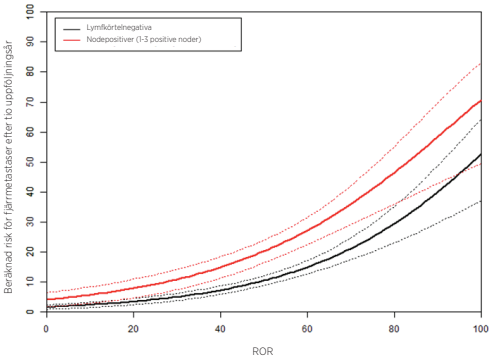
15.2 ROR-värdesfrekvens efter körtelstatus

Histogrammet i Figur 10 genererades med hjälp av en enda Cox-modell som innehöll ROR-värde och kategoriska variabler för att särskilja de tre körtelinvolveringsgrupperna.

Figur 10: Histogram för ROR-värde och körtelstatusgrupper



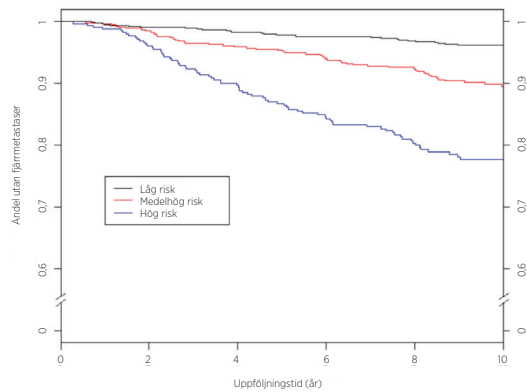
Figur 11: Tio års förutsagd risk bedömd inom körtelstatusgrupp



15.3 Fjärrmetastasfri överlevnad efter riskkategorisering

Följande data kommer från den kombinerade analysen av TransATAC- och ABCSG-8-studierna. För att dela in patienter i riskgrupper jämfördes ROR-värden med fördefinierade risktrösklar för lymfkörtelnegativa eller lymfkörtelpositiva patienter. Figurerna 12 och 13 visar fjärrmetastasfri överlevnad efter tio uppföljningsår för varje riskkategorigrupp efter körtelstatus.

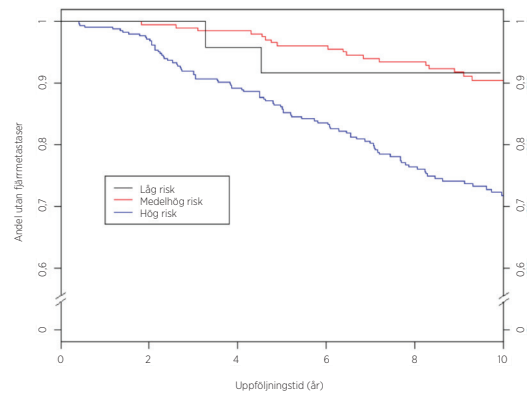
Figur 12: DRFS efter riskgrupp för lymfkörtelnegativa patienter



Sammanfattning av data för figur 12: DRFS efter riskgrupp för lymfkörtelnegativa patienter

Riskgrupp	Antal patienter (%)	Antal händelser under 10 år	Uppskattad andel utan fjärrmetastaser efter 10 år [95 % CI]
Låg	875 (49 %)	31	96,2 % [94,7 % - 97,3 %]
Medelhög	551 (31 %)	53	89,2 % [86,1 % - 91,7 %]
Hög	360 (20 %)	73	77,7 % [72,8 % - 81,9 %]
Totalt	1 786 (100 %)	157	

Figur 13: DRFS efter riskgrupp för lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar) patienter



Sammanfattning av data för figur 13: DRFS efter riskgrupp för lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar) patienter

Riskgrupp	Antal patienter (%)	Antal händelser under 10 år	Uppskattad andel utan fjärrmetastaser efter 10 år [95 % CI]
Låg	24 (4 %)	2	91,7 % [70,6 % - 97,8 %]
Medelhög	211 (36 %)	18	90,4 % [85,2 % - 93,9 %]
Hög	355 (60 %)	87	71,8 % [66,3 % - 76,6 %]
Totalt	590 (100 %)	107	

Tabell 10: DRFS-grad efter tio år för patienter med fyra eller fler positiva körtlar

Riskgrupp	Antal patienter	Antal händelser under 10 år	Uppskattad andel utan fjärrmetastaser efter 10 år [95 % CI]
Hög	103	39	57,4 % [46,3 % - 67,0 %]

16 PRESTANDAEGENSKAPER

16.1 Analytisk precision och reproducerbarhet

För att uppskatta övergripande precision och reproducerbarhet för Prosigna genomfördes två studier vars resultat kombinerades. Den första studien som genomfördes var en precisionsstudie på nCounter Analyssystem som började med extraherad brösttumör-RNA, och den andra studien var en reproducerbarhetsstudie som använde sig av FFPE-brösttumörvävnad och där preanalytiska faktorer inkluderades.

RNA-precision

16.1.1 Studiens utförande

En blind och randomiserad komparativ studie på tre platser genomfördes med Prosigna-analysen på NCounter Analyssystem för att bedöma analytisk precision. Fem poolade RNA-prover från brösttumörer genererades från arkiverade FFPE-exemplar för analys på varje plats. Provpanelen representerade prototypiska genuttrycksprofiler som påträffas under rutinanalys och varje riskklassificeringsgrupp.

Varje plats genomförde 18 giltiga körningar (9 körningar av varje användare där varje körning bestod av 10 analyser) efter en inlärningskörning av varje användare (Tabell 11). Varje prov analyserades två gånger under varje körning med en nominal RNA-inmatningsnivå om 250 ng för analysen. Varje användare slutförde en körning på en given dag i enlighet med generellt godkänd standard för långa körningsmetoder⁷. Den totala perioden för studien, inklusive förtrogenhet, täckte mer än fyra veckor på varje plats.

Tabell 11: Översikt över RNA-precisionsstudie

Variabler för studien	Nummer
Antal RNA-prover från brösttumör	5
Antal provreplikat per körning (samma kassett)	2
Antal körningar/plats	18
Antal körningar/dag	1
Antal användare/plats	2
Antal reagensloter/plats	3
Antal platser	3
Totalt antal prover analyserade per plats (ej inlärnin	180
Totalt antal prover =	540

16.1.2 Varianskomponentanalys

Tabell 12 visar resultatet av varianskomponentanalysen för varje panelmedlem. Under den beräknade variansen finns andel total varians (inom parentes).

Tabell 12: Varianskomponenter efter panelmedlem (poolat RNA-prov)

Panelmedlem efter risk, subtyp	Medel-ROR	Varianskomponent						Total varians	Total SD
		Lot	Plats	Användare	Körning	Inom-körning			
Låg Luminal A	31,4	0,010 (2 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,134 (30 %)	0,296 (67 %)	0,44 (100 %)	0,66	
Medelhög Luminal B	55	0,105 (18 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,046 (8 %)	0,426 (74 %)	0,576 (100 %)	0,76	
Medelhög basallik	55,4	0,059 (20 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,046 (15 %)	0,194 (65 %)	0,299 (100 %)	0,55	
Hög Luminal B	64,8	0,119 (21 %)	0,014 (2 %)	0,000 (0 %)	0,064 (11 %)	0,380 (66 %)	0,576 (100 %)	0,76	
Hög HER2-berikad	76,2	0,165 (37 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,000 (0 %)	0,277 (63 %)	0,442 (100 %)	0,66	

För samtliga fem panelmedlemmar var total SD mindre än 1 ROR-enhet på en skala mellan 0 och 100. För samtliga panelmedlemmar kom majoriteten av variansen från inom-körningen-variens (reproducerbarhet). Det fanns praktiskt taget ingen varians för plats-till-plats eller användare-till-användare. En sannolikhetstest för signifikansen av plats per panelmedlem visade att platsskillnaderna var statistiskt signifikanta (p> 0,05). För varje lot är medelvärden för ROR mindre än 1 ROR-enhet förutom för varje panelmedlem som bidrar med ca. 20 % i genomsnitt till den totala variansen.

16.1.3 Konkordans mellan subtypssvar och riskklassificering

Alla panelmedlemmar hade 100 % konkordans mellan subtypsresultatet och den intrinsiska subtypen för panelmedlemmen. Alla prover hade 100 % överensstämmelse mellan den uppmätta och förväntade riskgruppen.

Vävnadsreproducerbarhet

16.1.4 Studiens utförande

En blind och randomiserad komparativ studie på tre platser med replikat av brösttumörsvävnadsexemplar som tagits från samma FFPE-block analyserades på nCounter Analyssystem med hjälp av Prosigna-analys. Ett set om 43 nyligen insatta FFPE-brösttumörsexemplar från hormonreceptorpositiva cancerpatienter med bekräftad invasiv duktal och/eller lobulär cancer analyserades som en del i studien. Alla vävnadsexemplar levererades till lämplig analysplats för bearbetning. De 43 exemplaren granskades oberoende av tre separata patologer. För varje patologgranskat vävnadsprov gjordes en testkörning bestående av vävnadsmakrodissektion, RNA-extraktion och test med Prosigna-analysen av en enda användare på varje plats med hjälp av den definierade analysproceduren. Isolerad RNA från varje vävnadsprov analyserades två gånger i separata analyskörningar. Tre loter av RNA-isoleringskitet (en per plats) och en enskild lot analyskitreagenser används vid genomförandet av denna studie. Ett enskilt objektglas sattes i RNA-extraktion när tumörytan mätte ≥ 100 mm² och 3 objektglas sattes i när tumörytan mätte < 100 mm² med ett krav på en minsta tumöryta på 4 mm².

16.1.5 Analyssammanfattning

Svarsfrekvensen för de fyrtiotre (43) vävnadsexemplar som bedömdes vid var och en av de tre platser som visas i Tabell 13.

Tabell 13: Svarsfrekvens på varje plats

Plats	Andel som gav resultat	Godkända/Totalt
1	95 %	41/43
2	93 %	40/43
3	100 %	43/43

Fyrtio exemplar gav resultat på alla platser (RNA-isolering av ett prov på en plats krävde upprepning), ett exemplar gav resultat på två platser, och två exemplar gav resultat på en enda plats. Hundra procent (100 %) av exemplar som klarade vävnadsgranskning och RNA-isoleringsspecifikationer gav godkända resultat från Prosigna-analysen. Den uppmätta tumörytan för 4/5 misslyckade RNA-isoleringar var ≤ 15 mm² vilket motsvarar mindre än 50 mm² total vävnad per yta som används i analysen.

De 43 exemplaren innehöll såväl lymfkörtelnegativa som lymfkörtelpositiva patienter. Beräknade analysresultat från de 43 exemplaren representerar ett brett intervall (94 enheter) av ROR-värden, alla fyra intrinsiska subtyper och alla riskkategorier när lymfkörtelnegativa eller lymfkörtelpositiva tröskelvärden tillämpades på alla exemplar. De två proverna med resultat på en enda plats exkluderades från alla efterföljande statistiska analyser då det inte fanns några tillgängliga data för jämförelse mellan platserna.

16.1.6 Varianskomponentanalys

Det fanns inga statistiskt signifikanta (α = 0,05) skillnader mellan riskkategorier som använder en icke-parametrisk Kruskal-Wallis-analys så att varianskomponentmodellen passar i alla riskkategorier samtidigt.

Tabell 14 visar resultaten av varianskomponentanalysen med alla 41 vävnadsexemplar.

Tabell 14: Varianskomponenter (Vävnadsreproducerbarhetsstudie)

Varianskomponenter				Total SD
Plats	Inom blocket	Rest	Totalt	
0,10	7,72	0,51	8,34	2,89

Platskomponenten mäter systematisk platsspecifik variation, "Inom Block"-komponenten mäter slumpmässig variation som skiljer sig som en funktion av granskning/bearbetning av vävnadsexemplar eller inom FFPE-blocksvariation, och den återstående variationen mäter kombinerad körning-till-körning-variabilitet och variabilitet under varje körning i Prosigna-analysen. Platskomponenten är mycket liten i förhållande till den slumpmässiga variabiliteten inom blocket vilket indikerar att skillnaderna i genomsnitt mellan platserna var försumbara (<1 % av den totala variansen). Restvariationen överensstämde med motsvarande variabilitet uppmätt i RNA-precisionsstudien som hade färre prover men fler upprepade mätningar (0,51 varians jämfört med en genomsnittlig enskild plats inom Prosigna reagenslotvariens om 0,39 för RNA-precisionsstudien).

Tabell 15 sammanfattar den totala variabiliteten genom att använda summan av vävnadsbearbetningsvariabiliteten (plats och inom blockkomponenter från Tabell 14 från den här studien) såväl som den totala RNA-bearbetningsvariabiliteten från RNA-precisionsstudien (utslaget på de fem analyserade panelmedlemmarna i Tabell 12). Föranalytiska faktorer associerade med vävnadsbearbetning är den primära variationskällan för analysen (94 % total varians). Total SD inklusive alla variationskällor är lika med 2,9, vilket indikerar att Prosigna-Analysen är ett pålitligt mått för skillnaden mellan två ROR-värden på 6,75 med 95 % säkerhet.

Tabell 15: Total variabilitet (Vävnads- och RNA-bearbetning)

Variabilitet för vävnadsbearbetning	Variabilitet för RNA-bearbetning	Total variabilitet	Total SD
7,82	0,47	8,29	2,9

16.1.7 Konkordans mellan riskkategori och subtypsklassificering

Plats-till-plats-konkordans per patientsubtyp och riskklassificering (låg/medelhög/hög risk) visas i Tabell 16, där respektive tröskelvärde för lymfkörtelnegativa och lymfkörtelpositiva klassificeringar tillämpades på alla exemplar. Exaktmetodens 95 % konfidensintervall visas inom hakparenteser och antalet prover med resultat på båda platserna visas inom parentes. I den sista kolumnen visas den genomsnittliga konkordansen. För varje jämförelse beräknades konkordansen i två steg. Först beräknades för varje vävnadsprov proportionen av de fyra möjliga resultatparen (två på plats 1 * två på plats 2) som överensstämde. I det andra steget togs ett genomsnitt för dessa proportioner för alla vävnadsprover som genererade resultat på båda platserna i den givna jämförelsen.

Tabell 16: Sammanfattning av konkordans för subtyp och riskkategori efter körtelstatus

Jämförelsetyp	Parvis konkordans			Genomsnittlig konkordans
	Plats 1 vs. Plats 2 (n = 40)	Plats 1 vs. Plats 3 (n = 41)	Plats 2 vs. Plats 3 (n = 40)	
Subtyp	96,3 % [86,4 % - 99,5 %]	98,8 % [91,0 % - 100 %]	95 % [83,1 % - 99,3 %]	97 %
Riskkategori	87,5 % [73,2 % - 95,8 %]	92,7 % [80,1 % - 98,4 %]	90 % [76,4 % - 97,2 %]	90 %
Riskkategori	88,8 % [75,9 % - 96,0 %]	92,7 % [80,1 % - 98,4 %]	91,3 % [79,2 % - 97,4 %]	91 %

För varje jämförelse (subtyp och lymfkörtelnegativa och lymfkörtelpositiva riskkategorier), var den genomsnittliga konkordansen mellan platserna minst 90 %. Det fanns inga prover vars riskkategori ändrades från låg risk till hög risk (eller vice versa) mellan eller inom platserna. Det fanns endast två exemplar (av 41) som inte gav identiska subtyper för alla 6 replikaten:

1. Ett exemplar hade dubbla Luminal A-resultat på en plats och dubbla Luminal B-resultat på var och en av de andra två platserna.
2. Ett exemplar hade dubbla Luminal A-resultat på en plats, dubbla HER2-berikade resultat på en annan plats och en var av Luminal A och HER2-berikad på en tredje plats.

16.2 Sensitivitet/RNA-inmatning

Beskrivning av RNA-inmatningsstudie

Studien analyserade 13 RNA-prover från brösttumörer på tre RNA-inmatningsnivåer inom analysens specifikationer (500, 250 och 125 ng) och ytterligare två RNA-inmatningsnivåer utanför specifikationerna (625, 62,5 ng). Varje prov analyserades med varje kitlot (2 loter totalt) i en enda analyskörning som innehöll dubbla mätningar för varje nivå i specifikationen och en enskild mätning för varje nivå utanför specifikationen. Dubbla tomma (dvs. inget mål) mätningar inkluderades i varje analyskörning. Ett enskilt prov analyserades med en enskild lot.

Resultat av RNA-inmatningsstudie

Alla uppmätta tomma prover (n = 46) hamnade under tröskelvärdet för signal och gav ett icke-godkänt analysresultat (0 % svarsfrekvens). Alla RNA-mätningar för tumörer inom analysens specifikationer (n = 138) gav godkänt resultat (100 % svarsfrekvens). Hundra procent (100 %) av exemplaren med inmatning över specifikationen (625 ng) gav ett godkänt analysresultat. Åttiotre procent (83 %) av exemplaren (10/12) som analyserades vid inmatning som underskred specifikationen (62,5 ng) gav ett testresultat i lot 1 med 100 % i lot 2.

Genomsnittsvärdet för ROR för de 13 proverna täckte ett brett intervall (20–82). Riskgruppsklassificeringen (låg/medelhög/hög) visade 100 % konkordans för alla RNA-inmatningsnivåerna för de 13 analyserade proverna. Tabell 17 sammanfattar variationen i ROR-värde som en funktion av RNA-inmatning. Det genomsnittliga ROR-värdesskillnaden mellan RNA-inmatningsnivåer, SD för skillnaderna och det 90-procentiga konfidensintervallet användes för att utvärdera om ROR-värden som genereras från olika RNA-inmatningsnivåer motsvarade de som genereras med hjälp av målnivån 250 ng. För att uppfylla acceptanskriteriet måste konfidensintervallet vara helt inneslutet (-3,3 ROR). Vid de två nivåerna i extremlägena för analys-specifikationens intervall (125 och 500 ng RNA), var ROR-värdena likvärdiga med de för målingångskoncentrationen om 250 ng för var och en av de två kitloter som analyserades. För varje nivå utanför analys-specifikationen var ROR-värdena likvärdiga för en av loterna men inte för den andra.

Tabell 17: Sammanfattning av ROR-värdesskillnader Antal motsvarar antal prover som ingår i analysen.

Kitlot	Massa (ng)	Antal	Medelskillnad ROR	SD-skillnad	Nedre konfidensgräns	Övre konfidensgräns
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

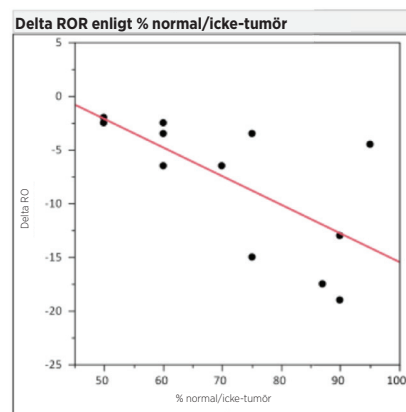
16.3 Interferensanalys

Angränsande normal vävnad/icke-tumörvävnad

Angränsande normal vävnad/icke-tumörvävnad i bröstet är vanligt förekommande i FFPE-brösttumörblock och syns vid patologisk granskning som ett tydligt område som skiljer sig från området med invasiv bröstcancer. Prosigna-Analysproceduren ovan beskriver avlägsnande av angränsande normal vävnad med makrodissektion. För att bedöma risken för normal vävnadskontamination i testresultaten analyserades totalt 13 FFPE-brösttumörblock som innehöll patologiskt-bekräftad infiltrerande duktal cancer och ca 50-95 % omgivande normal vävnad/ icke-tumörvävnad med och utan makrodissektion av den omgivande vävnaden och skillnaden i ROR-värde (delta ROR) fastställdes.

I snitt var ROR för det makrodissekerade tumörprovet nästan 8 ROR-enheter över det som observerats när normal vävnad/icke-tumörvävnad inte hade avlägsnats. Figur 14 visar att när mängden normal vävnad ökar (upp till 95 % avlägsnades inte med macrodissektion) finns det en ökande risk för att det rapporterade ROR-värdet får en underskattad eller negativt partisk (upp till -19 ROR-enheter) punktskattning av en patients risk för återfall.

Figur 14: Normal vävnads/icke-tumörvävnads påverkan på skillnaden i ROR-värde



Interferens för nekrotisk vävnad, hemorragisk vävnad och DCIS-vävnad

För att bedöma risken för nekrotisk/hemorragisk/DCIS-kontamination i testresultaten analyserades totalt 11 FFPE-brösttumörblock (3 DCIS, 5 nekrotiska, 3 hemorragiska) som innehöll patologiskt-bekräftad invasiv bröstcancer och ca. 10-30 % av interferenten testades med och utan makrodissektion av interferenten och skillnaden i ROR-värde (delta ROR) fastställdes. Vid de nivåer som analyserades hade effekten av blod/hemorragisk, DCIS och nekrotisk vävnad som ingick i proceduren försumbar påverkan på det rapporterade ROR-värdet, (< 6 ROR-enheter). Det fanns 100 % konkordans mellan riskkategoritilldelningen mellan de elva nekrotiska, hemorragiska och DCIS-proverna med och utan makrodissektion.

Humant genomiskt DNA

Prosigna-Analysproceduren innebär att humant genomiskt DNA (gDNA) avlägsnas genom nedbrytning med DNas. För att bedöma risken för gDNA-kontamination i testresultaten analyserades tio (10) FFPE brösttumörblock med patologiskt-bekräftad infiltrerande duktal cancer +/- avlägsnande av humant genomiskt DNA genom att utelämna DNas-steget i proceduren. I de prover som analyserades var i genomsnitt ROR-värdet 4 till 5 enheter lägre i riskgrupperna Låg och Medelhög när gDNA avlägsnas med DNas I (se Tabell 18). När proverna som inte DNas-behandlades därefter behandlades med DNas I (efterbehandling) matchade ROR-värdena de ROR-värden som ursprungligen observerades med regelmässig DNas-behandling. Det finns en risk för att det rapporterade ROR-värdet får en överskattat eller positivt partisk (upp till 7 ROR-enheter) punktbedömning av en patients risk för återfall i närvaro av gDNA. Dessutom var den beräknade signalen för prover utan DNas I-behandling signifikant (p <0,05) lägre än de som behandlades med DNas I på grund av störningar i absorptionsavläsningen som används för att kvantifiera mängden RNA före analys med Prosigna.

Tabell 18: Påverkan för behandling med DNase på ROR i tumörprover

ROR Kategori	Analyserade FFPE-exemplar	ROR-skilnad med DNas I - utan DNas I			ROR-skilnad med DNas I - utan DNas I (efter behandling)		
		Medel	Min	Max	Medel	Min	Max
Låg	3	-4,0	-6,0	-1,0	0,7	-1,0	3,0
Medelhög	2	-4,5	-7,0	-2,0	1,0	0,0	2,0
Hög	5	0,4	-1,0	2,0	0,4	-1,0	1,0

16.4 Klinisk prestanda

Två kliniska valideringsstudier utfördes för att validera Prosigna prognostisk gensignaturanalys för bröstcancer. Det primära syftet för båda studierna var att validera publicerade iakttagelser att ROR-värdet (risken för återfall) ger ytterligare prognostisk information för fjärrmetastastfri överlevnad efter 10 år utöver vanliga kliniska variabler. Dessutom var ett sekundärt syfte för båda studier att validera tidigare iakttagelser att Luminal A- och Luminal B-patienter har statistiskt sett signifikant olika fjärrmetastastfri överlevnad efter 10 uppföljningsår. Eftersom ingångskriterierna och resultaten från dessa två studier var liknande slogs de två databaserna ihop och analyseras med en prospektivt definierad analysplan med samma syfte som de enskilda studierna.

Kombinerad analys: Generera riskkurvor med hjälp av kombinerade resultat av Prosigna-analysen från TransATAC och ABCSG-8

En sammanfattning av behandling och kliniska egenskaper från den kombinerade analysen kan ses nedan. För information om utförande och analys av en enskild studie, se följande avsnitt för studie 1 respektive studie 2.

Analys

Tabell 19: Sammanfattning av behandling och kliniska egenskaper i en kombinerad analys av studie 1 och 2

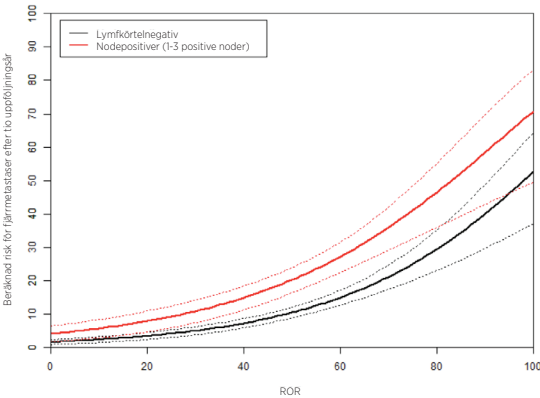
Egenskap	Värde	Lymfkörtelnegativ (n = 1 786)		1-3 positiva körtlar (n = 590)		≥ 4 positiva körtlar (n = 103)	
		Trans ATAC (n = 739)	ABCSG8 (n = 1 047)	Trans ATAC (n = 208)	ABCSG8 (n = 382)	Trans ATAC (n = 54)	ABCSG8 (n = 49)
Behandling	Viss anastrozol	377 (51,0 %)	528 (50,4 %)	102 (49,0 %)	184 (48,2 %)	31 (57,4 %)	25 (51,0 %)
	Endast Tamoxifen	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 %)
Tumörstorlek	≤ 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 %)
Metastaser	Fjärran	79 (10,7 %)	91 (8,7 %)	50 (24,0 %)	64 (16,8 %)	31 (57,4 %)	10 (20,4 %)
	Alla	117 (15,8 %)	121 (11,6 %)	59 (28,4 %)	73 (19,1 %)	34 (63,0 %)	10 (20,4 %)
NanoString Intrinsisk subtyp	Luminal A	529 (71,6 %)	725 (69,2 %)	127 (61,1 %)	248 (64,9 %)	31 (57,4 %)	31 (63,3 %)
	Luminal B	176 (23,8 %)	284 (27,1 %)	68 (32,7 %)	118 (30,9 %)	20 (37 %)	16 (32,7 %)
	Basalliknande	7 (0,9 %)	6 (0,6 %)	2 (1,0 %)	2 (0,5 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
	HER2-berikad	27 (3,7 %)	32 (3,1 %)	11 (5,3 %)	14 (3,7 %)	3 (5,6 %)	2 (4,1 %)

Båda studier hade en behandlingsarm bestående av 5 år med Tamoxifen. I TransATAC bestod den andra studiearmen av 5 års behandling med anastrozol, medan i ABCSG-8-studien bestod den andra armen av 2 års behandling med tamoxifen följt av 3-års behandling med anastrozol. När DR modellerades som en funktion av alla kliniska variabler och behandlingsvariabler bidrog behandlingen inte signifikant (p = 0,66) som en prediktor av DR. De andra stora skillnaderna mellan dessa försök var det faktum att TransATAC-försöket inkluderade patienter med Grad 3-tumörer och att den övergripande återfallsgraden var högre i TransATAC-studien än i ABCSG-8-studien.

Resultat

Figur 15 visar den tioåriga risken för DR som en funktion av ROR-värdet med 95 % konfidensband baserade på separata Cox-proportionella riskmodeller för var och en de lymfkörtelnegativa och lymfkörtelpositiva (1-3 positiva körtlar) patientgrupper.

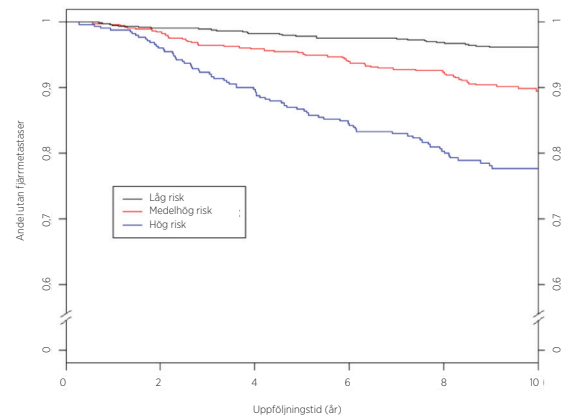
Figur 15: Tioårig uppskattad DR-risk efter körtelstatus med 95 % konfidensintervall



Figur 16 visar Kaplan-Meier-kurvor och incidens efter riskgrupp för lymfkörtelnegativa patienter och Figur 17 visar samma kurvor för lymfkörtelpositiva patienter med 1-3 positiva körtlar. I varje figur ges information om provstorlek, antal händelser och uppskattad andel utan fjärrmetastaser efter

10 uppföljningsår för varje riskgrupp. I den lymfkörtelpositiva patientgruppen fanns mycket få patienter i fördefinierade grupper med låg risk vilket gjorde konfidensintervallet på Kaplan-Meier-kurvan, och därmed beräkningen av 10-årig DRFS, mycket bred.

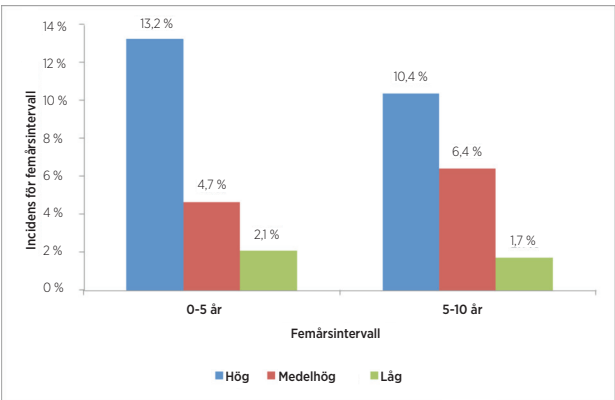
Figur 16A: DRFS efter riskgrupp för lymfkörtelnegativa patienter



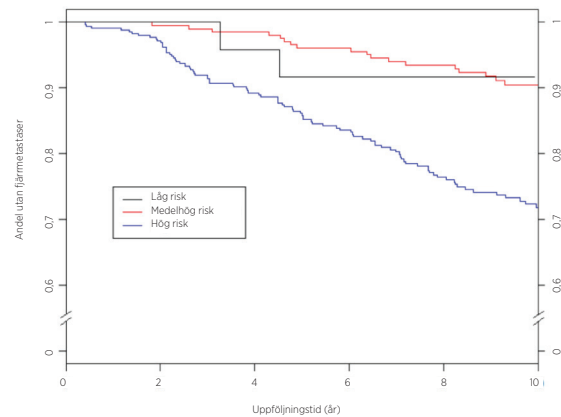
Sammanfattning av data för figur 16A: DRFS efter riskgrupp för lymfkörtelnegativa patienter

Riskgrupp	Antal patienter (%)	Antal händelser under 10 år	Uppskattad andel utan fjärrmetastaser efter 10 år [95 % CI]
Låg	875 (49 %)	31	96,2 % [94,7 % - 97,3 %]
Medelhög	551 (31 %)	53	89,2 % [86,1 % - 91,7 %]
Hög	360 (20 %)	73	77,7 % [72,8 % - 81,9 %]
Totalt	1 786 (100 %)	157	

Figur 16B: Incidens efter riskgrupp för körtelnegativa patienter i femårsintervall



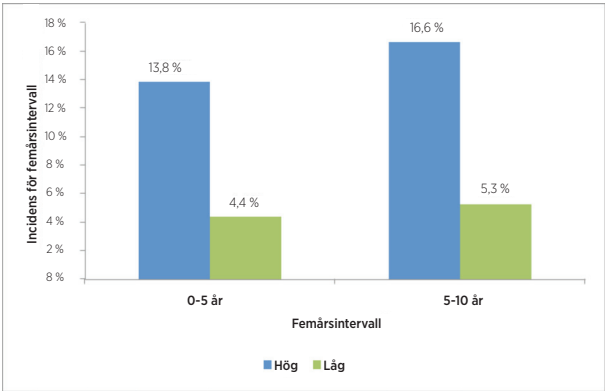
Figur 17A: DRFS efter riskgrupp för lymfkörtelpositiva patienter med 1 till 3 positiva körtlar



Sammanfattning av data för figur 17A: DRFS efter riskgrupp för lymfkörtelpositiva patienter med 1 till 3 positiva körtlar

Riskgrupp	Antal patienter (%)	Antal händelser under 10 år	Uppskattad andel utan fjärrmetastaser efter 10 år [95 % CI]
Låg	24 (4 %)	2	91,7 % [70,6 % - 97,8 %]
Medelhög	211 (36 %)	18	90,4 % [85,2 % - 93,9 %]
Hög	355 (60 %)	87	71,8 % [66,3 % - 76,6 %]
Totalt	590 (100 %)	107	

Figur 17B: Incidens efter riskgrupp för körtelpositiva (1-3 körtlar) patienter i femårsintervall



I figur 17B, då det endast fanns 24 patienter med 2 händelser i den körtelpositiva gruppen med låg risk, har dessa patienter slagits ihop med patienter med medelhög risk för analys av sent återfall.

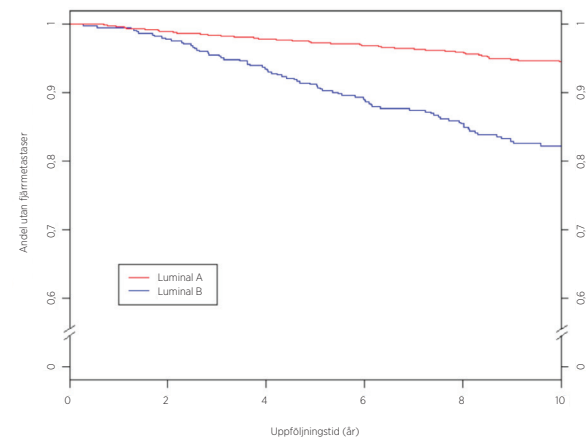
Alla 103 patienter i den kombinerade databasen med fyra eller fler positiva körtlar klassificeras som högrisk. Tabell 20 visar tioåriga DRFS-värden för dessa patienter.

Tabell 20: DRFS-grad efter tio år för patienter med fyra eller fler positiva körtlar

Riskgrupp	Antal patienter	Antal händelser under 10 år	Uppskattad andel utan fjärrmetastaser efter 10 år [95 % CI]
Hög	103	39	57,4 % [46,3 % - 67,0 %]

Majoriteten av ämnena i de kombinerade studierna (96 %) var antingen Luminal A eller Luminal B. Figur 18 visar en jämförelse av DRFS efter luminal subtyp för lymfkörtelnegativa patienter.

Figur 18: Kaplan-Meier-kurvor för DRFS efter intrinsisk subtyp för lymfkörtelnegativa patienter

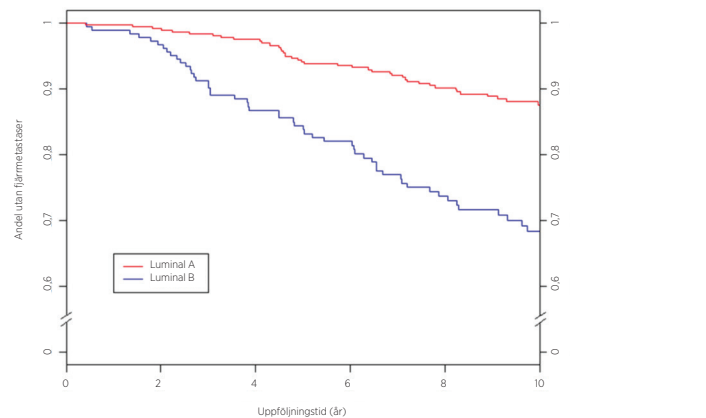


Sammanfattning av data för figur 18: Kaplan-Meier-kurvor för DRFS efter intrinsisk subtyp för lymfkörtelnegativa patienter

Riskgrupp	Antal patienter	Antal händelser under 10 år	Uppskattad andel utan fjärrmetastaser efter 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	1 714	137	

Figur 19 visar samma jämförelse för lymfkörtelnegativa patienter med 1-3 positiva körtlar. För båda grupperna fanns betydande skillnader mellan DRFS för Luminal A- och Luminal B-patienter.

Figur 19: Kaplan-Meier-kurvor för DRFS efter intrinsisk subtyp för lymfkörtelpositiva patienter med 1-3 positiva körtlar



Sammanfattning av data för figur 19: Kaplan-Meier-kurvor för DRFS efter intrinsisk subtyp för lymfkörtelpositiva patienter med 1-3 positiva körtlar

Riskgrupp	Antal patienter	Antal händelser under 10 år	Uppskattad andel utan fjärrmetastaser efter 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 fanns endast 98 patienter av Luminal subtyp i den kombinerade databasen med fyra eller fler positiva körtlar. Tabell 21 visar de tioåriga DRFS-värdena för dessa patienter som även visar en betydligt högre risk när Luminal B-subtypen förekommer.

Tabell 21: DRFS-grad efter tio år för patienter med fyra eller fler positiva körtlar per luminal subtyp

Riskgrupp	Antal patienter	Antal händelser under 10 år	Uppskattad andel utan fjärrmetastaser efter 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	

Analys av sent återfall

I den tidigare beskrivna kombinerade analysdatabasen är händelsegraderna inom varje riskgrupp inte konstanta över tioårsintervall vilket kan ses i figurerna 16B och 17B. För att ytterligare förstå DR i den sena återfallsperioden har en post-hoc retrospektiv analys av de kombinerade data som beskrivs ovan genomförts för den undergrupp av patienter som var fria från fjärrmetastaser i fem år (totalt 2 163 patienter⁶). Av dessa var 1 605 körtelnegativa patienter och 488 körtelpositiva patienter (1-3 positiva körtlar). För varje körtelgrupp visar värdena på x-axeln vid år 5 i figurerna 20 och 21 antalet patienter efter riskgrupp vid 5 år, dvs. lämpade för analys av sent återfall.

Tabell 22 ger en sammanfattning av behandlingen och kliniska egenskaper för körtelnegativa och körtelpositiva (1-3 körtlar) patienter i analysen av sent återfall.

Tabell 22: Sammanfattning av behandling och kliniska egenskaper för analys av sent återfall

Egenskap	Värde	Körtelnegativ (n = 1,605)		Körtelpositiv (1-3 körtlar) (n = 488)	
		ABCSG8 (n = 944)	ransATAC (n = 661)	ABCSG8 (n = 311)	TransATAC (n = 177)
Behandling	Viss anastrozol	480	346	153	89
	Endast Tamoxifen	464	315	158	88
Grad	God	192	158	46	36
	Mellan	752	394	265	105
	Dålig	0	109	0	36
Tumörstorlek	≤ 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
Metastaser	Fjärran	41	40	28	29
	Alla	71	78	37	37
NanoString Intrinsisk subtyp	Luminal A	674	488	218	112
	Luminal B	245	150	87	54
	Basalliknande	4	5	0	1
	HER2-berikad	21	18	6	10

Det primära syftet var att utvärdera om ROR-värdet bidrog till signifikant ytterligare prognostisk information för DRFS utöver vanliga kliniska variabler år 5 till 10. En nollmodell bestående av endast CTS jämfördes med en alternativ modell bestående av CTS och ROR med hjälp av ett sannolikhetskvottest (LR). ROR bidrog med statistiskt signifikant information för DRFS efter 5 år och utöver vanliga kliniska variabler för alla patienter (p < 0,0001) såväl som för körtelnegativa (p < 0,0001) och körtelpositiva (1-3 körtlar) patienter (p < 0,0001).

Tabell 23 visar en sammanfattning av de riskkvoter för en förändring på 10 poäng baserad på en univariat analys och på en multivariat analys som innehåller både ROR-värde och CTS. Riskkvoterna för ROR-värdet är alla signifikant olika från 1 även efter justering för CTS. C-index visas också i Tabell 22. För båda grupperna skilde sig C-indexet signifikant från det värde på 0,5 utan information.

Tabell 23: Sammanfattning av sent återfall-analys

Antal positiva körtlar	N	Riskkvot: 10 poängs förändring av ROR-värde		C-index med 95 % konfidensintervall		
		Univariat analys	Multivariat analys	C-index	Lägre	Övre
0	1 605	1,38 [1,23-1,54]	1,29 [1,15-1,46]	70,1 %	64,7 %	75,5 %
1-3	488	1,43 [1,25-1,63]	1,34 [1,16-1,53]	71,1 %	64,0 %	78,3 %

Majoriteten av patienterna i de två studierna var HER2-negativa. Tabell 24 visar fördelningen av HER2-status för de körtelnegativa och körtelpositiva (1-3 körtlar) kvinnorna. För båda grupperna var över 90 % av kvinnorna i studierna HER2-negativa.

Tabell 24: Fördelning av HER2-status efter antalet positiva körtlar

Patientundergrupp	HER2-status		Totalt
	Negativ	Positiv	
Körtelnegativa patienter	1 478 (92,1 %)	127 (7,9 %)	1 605
Körtelpositiva patienter med 1-3 positiva körtlar	457 (93,6 %)	31 (6,4 %)	488

Tabell 25 visar en jämförelse mellan den multivariata modellen anpassad till alla patienter i en given körtelgrupp och den modell som är anpassad till alla HER2-negativa patienter i gruppen. Det finns inga statistiskt signifikanta skillnader.

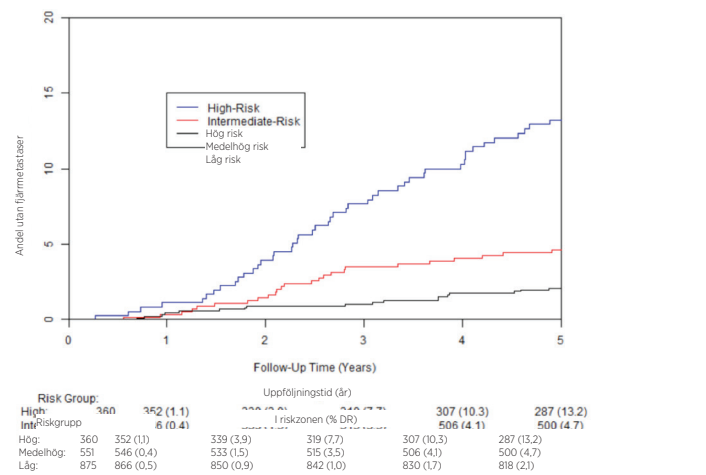
Tabell 25: Multivariata riskkvoter för en förändring om 10 poäng av ROR-värdet: Alla patienter i undergruppen jämfört med HER2-negativa patienter i undergruppen

Antal positiva körtlar	Alla patienter [95 % CI]	HER2-negativa patienter [95 % CI]
Körtelnegativa patienter	1,29 [1,15-1,46]	1,35 [1,19-1,54]
Körtelpositiva patienter med 1-3 positiva körtlar	1,34 [1,16-1,53]	1,29 [1,11-1,50]

Jämförelsen mellan riskgrupper undersöks ytterligare i Figur 20 och 21 vilka visar incidenskurvor för tidigt och sent återfall skapade efter riskgrupp hos körtelnegativa respektive körtelpositiva (1-3 körtlar) patienter. Incidenskurvorna täcker tidig återfallsperiod (under de första 5 åren) och sen återfallsperiod (mellan 5 och 10 år efter diagnos). Direkt under x-axeln visar varje figur antalet kvinnor i riskzonen och den samlade incidensen. Sammanfattningstabellerna under figurerna visar konfidensintervallen för den kumulativa metastasgraden vid 5 år eller 10 år för de kvinnor som var metastasfria efter 5 års behandling. För körtelpositiva (1-3 körtlar) patienter representerade i Figur 21 och grupperna med låg respektive medelhög risk har slagits ihop med hänsyn till det låga antalet patienter i lågriskgruppen.

Lågriskpopulationen har en låg sannolikhet för återfall mellan år 5 och 10 efter 5 års endokrin behandling, vilket framgår av de kumulativa incidenskurvorna och de tillhörande riskkvoterna för varje riskgrupp. I populationer med medelhög risk eller hög risk finns däremot en ständig risk för metastaser efter 5 års endokrin behandling. Skillnaden i resultat när det gäller körtelnegativa populationer med medelhög och hög risk etableras under de 5 första åren (Metastasgrad = 13,2 % [9,6 % - 16,7 %] för högriskpatienter och 4,7 % [2,9 % - 6,4 %] för patienter med medelhög risk) och finns kvar upp till 10 år, men återfallsgraderna för grupper med medelhög och hög risk efter 5 års endokrin behandling är väldigt lika.

Figur 20A: Incidenskurvor för metastaser efter riskgrupp från 0-5 år: Körtelnegativa patienter

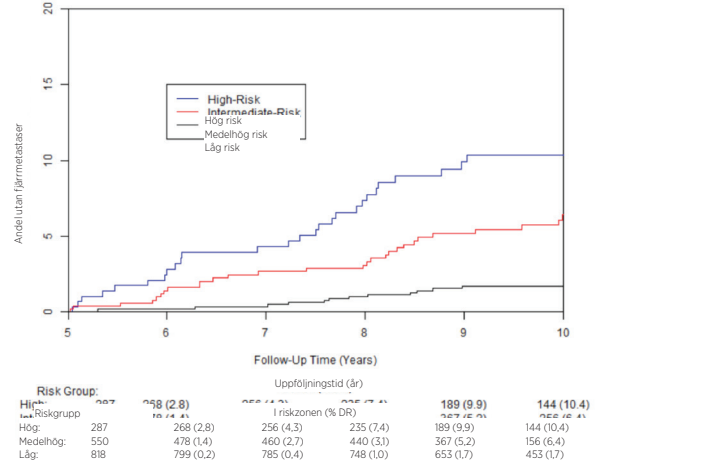


Sammanfattning av data för figur 20A: Incidenskurvor för metastaser efter riskgrupp från 0-5 år: Körtelnegativa patienter

Metastasgrad efter riskgrupp upp till 5 år efter slutförd behandling [95 % konfidensintervall]		
Hög	Medelhög	Låg
13,2 % [9,6 % - 16,7 %]	4,7 % [2,9 % - 6,4 %]	2,1 % [1,1 % - 3,1 %]

Figur 20B: Incidenskurvor för metastaser efter riskgrupp från 5-10 år: Körtelnegativa patienter

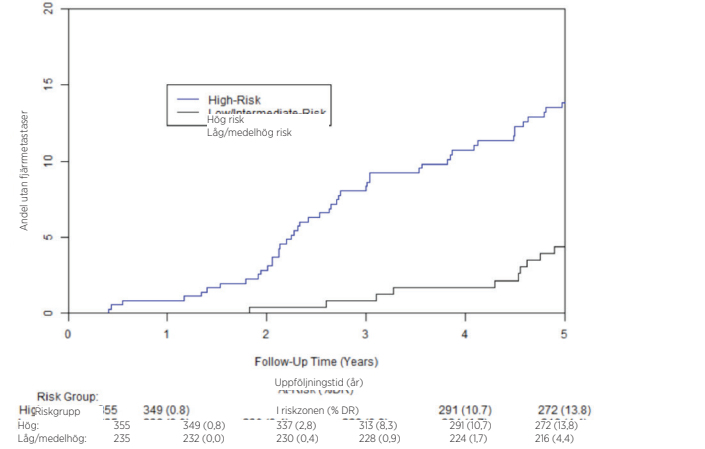
patienter



Sammanfattning av data för figur 20B: Incidenskurvor för metastaser efter riskgrupp från 5-10 år: Körtelnegativa patienter

Metastasgrad efter riskgrupp 5 år efter metastasfri slutförd behandling [95 % konfidensintervall]		
Hög	Medelhög	Låg
10,4 % [6,6 % - 14 %]	6,4 % [4,1 % - 8,7 %]	1,7 % [0,8 % - 2,6 %]

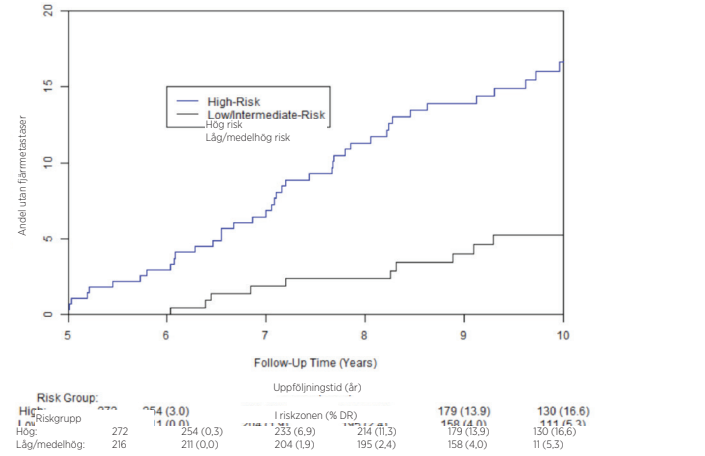
Figur 21A: Incidenskurvor för metastaser efter riskgrupp från 0-5 år: Lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar) patienter



Sammanfattning av data för figur 21A: Incidenskurvor för metastaser efter riskgrupp från 0-5 år: Lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar) patienter

Metastasgrad efter riskgrupp upp till 5 år efter slutförd behandling [95 % konfidensintervall]	
Hög	Låg/medelhög
13,8 % [10,1 % - 17,4 %]	4,4 % [1,7 % - 7,0 %]

Figur 21B: Incidenskurvor för metastaser efter riskgrupp från 5-10 år: Lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar) patienter



Sammanfattning av data för figur 21B: Incidenskurvor för metastaser efter riskgrupp från 5-10 år: Lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar) patienter

Metastasgrad efter riskgrupp 5 år efter metastasfri slutförd behandling [95 % konfidensintervall]	
Hög	Låg/medelhög
16,6 % [11,7 % - 21,3 %]	5,3 % [2,0 % - 8,4 %]

Slutsatser av kombinerad analys

ROR-värdet visade sig bidra med signifikant prognostisk information under den senare återfallsperioden mellan 5 och 10 år efter diagnos och utöver vanliga kliniska variabler i den kombinerade studien för patienter som var metastasfria under fem år. Genom att använda riskgrupper definierade vid baslinjen för varje körtelantal specifika kohorter kunde man visa att riskgrupperna klassificerade hela uppsättningen patienter i grupper med signifikant annorlunda risk för metastaser. Både de kontinuerliga och de ROR-värdesbaserade riskgruppsanalyserna visade liknande prognostisk information i olika undergrupper. Inga materiella skillnader syntes mellan resultaten som använde HER2-negativa patienter jämfört med alla patienter.

I var och en av TransATAC- och ABCSG-8-studierna hade ROR visat sig lägga betydande prognostisk information över och ovanpå de vanliga kliniska variablerna och behandlingsvariablerna både när de ingick som en kontinuerlig mätning och när de ingick som tre fördefinierade riskgrupper. De två studierna hade olika riskprofiler i det avseendet att händelsegraden var högre i TransATAC-studien än i ABCSG-8-studien: detta blir tydligt vid en jämförelse av DRFS (%) i kontrollarmarna för ATAC (90,8 %) och ABCSG8 (92,5 %) som rapporteras i litteraturen^{9, 10}. Denna analys kombinerade uppgifterna från de två studierna med lika stor betydelse för att generera riskprofiler som i större utsträckning ska kunna användas på andra patientpopulationer än resultaten från enskilda studier.

Studie 1: Förutsägelse av risken för fjärrmetastaser hos postmenopausala kvinnor med lymfkörtelnegativ eller lymfkörtelpositiv, hormonreceptorpositiv bröstcancer i tidigt stadium som behandlas med arimidex eller tamoxifen: en TransATAC-studie

Studiens utförande

Syftet med den kliniska valideringsstudien var att bekräfta att värdet på risken för återfall (ROR) ger ytterligare prognostisk information för fjärrmetastasfri överlevnad (DRFS) utöver standardkliniska variabler genom att använda alla tillgängliga patientprover. Denna studie använd RNA som isolerats från FFPE-brösttumörvävnad från ett subset av patienter som deltog i ATAC-studien¹¹. ATAC-försöket bestod av 9 366 patienter på tre försöksarmar (1:1:1) där patienter randomiserades för att erhålla fem års endokrin behandling med 1 mg anastrozol (dvs. arimidex) plus en tamoxifen-placebo, 20 mg tamoxifen plus anastrozol-placebo, eller en kombination av tamoxifen/arimidex. Kombinationsbehandlingsgruppen avbröts efter den initiala analysen då den inte visade någon effekt eller några tolerabilitetsfördelar jämfört med endast tamoxifen. En tio års medianuppföljning av ATAC-studiens monoterapibehandlingar rapporterades nyligen för att tillfredsställa FDA-krav på uppdaterad information om säkerhet och effektivitet⁹. Hormonreceptorpositiva patienter visade en klar förbättring när det gäller DFS (HR = 0,86), RFS (HR = 0,79) och (DRFS) (HR = 0,85) för de patienter som behandlats med anastrozol jämfört med tamoxifen i denna analys. Absoluta skillnader i fjärrmetastasfri överlevnad mellan anastrozol och tamoxifen ökade med tiden från 2,7 % efter fem år till 4,3 % efter tio år. TransATAC-projektet inleddes 2002 under TA/01-protokollet för att upprätta en vävnadsbank från arkiverade histopatologiska FFPE-block från ATAC-patienter retrospektiv¹¹.

Totalt 2 006 block erhöles från de 4 160 kvinnor med hormonreceptorpositiv bröstcancer som randomiserades till monoterapiarmarna i ATAC-studien. Av de FFPE-blocken samlades 1 372 in från patienter i Storbritannien och innehöll tillräckligt med invasiv tumör för analys med hjälp av Genomic Health® Oncotype Dx®-testet¹². Oncotype Dx Recurrence Score® (RS) fastställdes utifrån FFPE-bocken och resultaten av studien bekräftade RS kliniskt för att uppskatta fjärrmetastasfri överlevnad i HR+, postmenopausala bröstcancerpatienter som behandlats med anastrozol eller tamoxifen. Återstående RNA från Oncotype Dx-studien skickades till Royal Marsden Hospital i London där det lagrades i -70 °C. Totalt 1 017 patienter från Oncotype Dx-studien hade >500 ng RNA kvar och testades av NanoString som en del av NanoStrings kliniska valideringsstudie.

Denna studie använde de intrinsiska subtyper som genererades av analysen och evaluerade två versioner av ROR-värdet med hjälp av en fördefinierad sekventiell metod. De två olika ROR-värdena, där vart och ett ligger inom ett intervall mellan 0 och 100, beräknades genom att använda antingen alla 50 testgener i enlighet med tidigare publicering² eller ett subset med 46 gener. I varje fall beräknades koefficienten utifrån en Cox-modell som inkluderar Pearson-korrelationen till de 50 eller 46 gener som använts för att beräkna varje intrinsiska subtyp, ett proliferationsvärde och tumörstorlek. Alla analyser utfördes på data som bygger på en tioårig uppföljning.

Den primära slutpunkten var fjärrmetastasfri överlevnad (DRFS). Detta definieras som intervallet från diagnos till upptäckt av metastas eller dödsfall i bröstcancer. Den sekundära slutpunkten var återfallsfri överlevnad (RFS). Detta definieras som intervallet från diagnos till första återfallet (lokalt, regionalt eller fjärran) eller dödsfall i bröstcancer.

Med hjälp av alla tillgängliga patientprover anpassades multivariata Cox PH-modeller (proportional hazards) för att utvärdera det primära målet i sekventiella tester av ROR baserat på 50 och 46 gener. Modellen inkluderade standardkliniska kovariater (ålder, tumörgrad, tumörstorlek, körtelstatus, adjuvant behandling). En Cox-modell anpassas sedan och ett sannolikhetsskottest användes för att analysera om ROR bidrog med statistiskt signifikant ($\alpha = 0,05$) ytterligare prognostisk information utöver den som fanns i CTS-värdet (Clinical Treatment Score). CTS är en optimerad kombination av klinikopatologiska faktorer utvecklade av den kliniska forskaren som ett mått på standardpatologi¹². De primära analyserna upprepades för olika patientsubset (alla, lymfkörtelnegativa, lymfkörtelpositiva eller endast HER2-negativa) och slutpunkter (DRFS eller RFS).

För var och en av de lymfkörtelnegativa och lymfkörtelpositiva patienterna användes Cox-modeller (ej CTS) för att förutspå risken för DR efter tio år som en funktion av ROR. Baserat på dessa modellförutsägelser definierades tre riskgrupper som:

Låg risk:	< 10 % risk för DR efter tio år
Medelhög risk:	10-20 % risk för DR efter tio år
Hög risk:	> 20 % risk för DR efter tio år

Analys

Kaplan-Meier-kurvor ritades för varje riskgrupp. Sannolikhetsskotttester (används för att jämföra hur två statistiska modeller passa ihop) enligt beskrivning i den primära analysen genomfördes för Genomic Healths Oncotype Dx-analys (RS, Recurrence Score) och den huvudsakliga forskarens immunohistokemi-baserade analys (IHC4). Resultaten jämfördes med de som erhöles för ROR för att fastställa i vilken utsträckning varje värdesystem ger ytterligare prognostisk information utöver CTS. IHC4-resultaten diskuteras inte ytterligare då de är svåra att jämföra med den andra analyserna eftersom IHC4-analysen programmerades med hjälp av data från TransATAC-studien.

Tabell 26: Sammanfattning av demografi och kliniska egenskaper

Egenskap	Aktuell studie (n = 1 007)		Initial studie från vilken RNA erhöills (n = 1 231)	Monoterapiarmar i ATAC-studien ingår ej (n = 2,929)
	Antal patienter	Andel patienter		
Körtelstatus				
Negativ	701	70 %	71 %	68 %
Positiv	268	27 %	25 %	25 %
Okänd	38	4 %	4 %	7 %
Tumörstorlek				
≤ 1 cm	138	14 %	67 %	70 %
1-2 cm	523	52 %		
2-3 cm	253	25 %	33 %	30 %
>3 cm	93	9 %		
Tumörgrad				
God	213	21 %	27 %	25 %
Mellan	601	60 %	57 %	59 %
Dålig	193	19 %	16 %	17 %
Ålder				
Medel	64,4 år		64,3	66,1

Tabell 27: Ytterligare kliniska egenskaper

Egenskap	Antal patienter	Andel patienter
Subtyp		
Basalliknande	9	1 %
HER2-berikad	41	4 %
Luminal A	692	69 %
Luminal B	265	26 %
Behandling		
Anastrozol	513	51 %
Tamoxifen	494	49 %
Metastaser		
Alla	210	21 %
Fjärran	160	16 %
HER2-status		
Negativ	888	88 %
Positiv	119	12 %

Resultat

Primär analystestning visat att ROR-värdet ger ytterligare prognostisk information för sjukdomsfri överlevnad utöver vanliga kliniska variabler (CTS). Alla rapporterade ROR-data som följer baseras på 46 gener då detta är grunden för ROR enligt rapporter från Prosigna-analysen.

Tabell 28: Primär analystestning av ROR

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

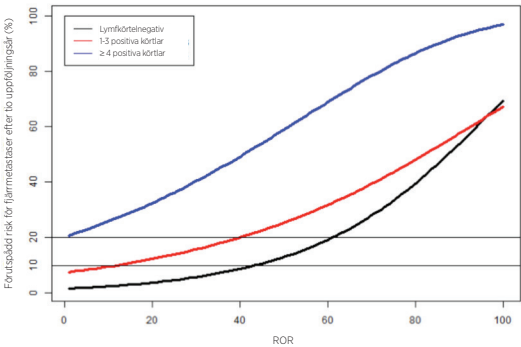
Sekundära analyser visade att ROR är signifikant relaterad till sjukdomsfri överlevnad och lägger till prognostisk information utöver CTS i flera kliniskt relevanta undergrupper.

Tabell 29: Upprepning av primär analystestning för fördefinierade undergrupper

Subjektgrupp	Slutpunkt	Antal patienter	Antal händelser	CTS+ROR vs. CTS	
				$\Delta LR \chi^2$	χ^2 p-värde
Alla	DRFS	1007	160	34,2	< 0,0001
	RFS	1007	210	31,2	< 0,0001
HER2-negativa	DRFS	888	131	28,9	< 0,0001
	RFS	888	179	26,9	< 0,0001
Lymfkörtelnegativa	DRFS	739	79	25,0	< 0,0001
	RFS	739	117	21,5	< 0,0001
Lymfkörtelpositiva	DRFS	268	81	9,3	0,0023
	RFS	268	93	10,6	0,0011
HER2-negativa körtelnegativa	DRFS	649	62	24,6	< 0,0001
	RFS	649	98	20,8	< 0,0001

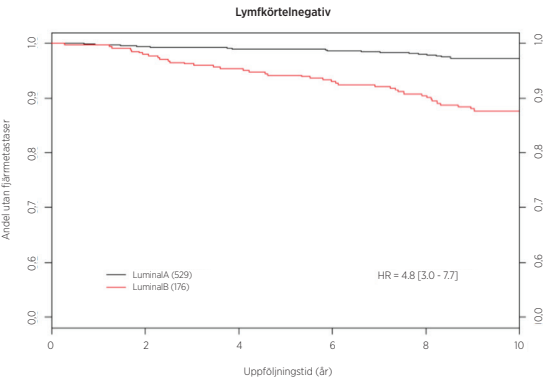
Primära och sekundära analyser visade att ROR var fortsatt relaterad till sjukdomsfri överlevnad (DRFS) i alla patienter och i alla undergrupper.

Figur 22: Tio års förutspädd risk för metastaser beräknad med hjälp av analys av ROR-värde inom gruppen för körtelstatus

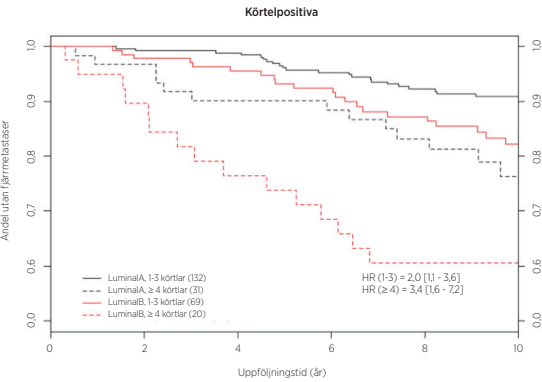


Sekundära analyser visade att subtyperna Luminal A och Luminal B hade statistiskt sett signifikant olika resultat inom varje undergrupp med patienter definierade efter körtelstatus.

Figur 23: Kaplan-Meier-kurvor för DRFS för lymfkörtelnegativa patienter efter intrinsisk subtyp

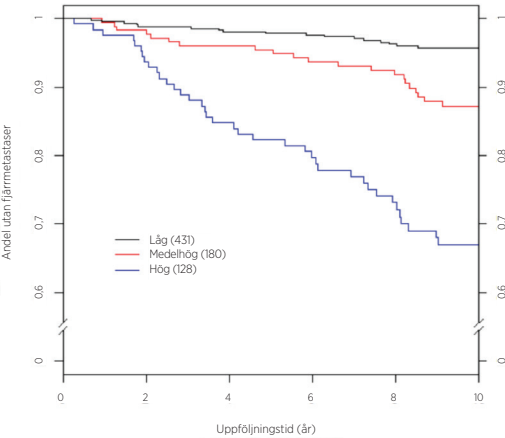


Figur 24: Kaplan-Meier-kurvor för DRFS för lymfkörtelpositiva patienter efter intrinsisk subtyp



Figurerna 25 och 26 visar att inom varje körtelkategori var det väsentlig skillnad mellan den absoluta kliniska risken för de patienter som spåddes bli låg risk och den absoluta kliniska risken för patienter som spåddes bli hög risk: de patienter som spåddes bli låg risk hade observerat återfallsvärden efter tio år på mindre än 10 %, medan patienterna som spåddes bli hög risk hade observerat återfallsvärden efter tio år på över 30 %.

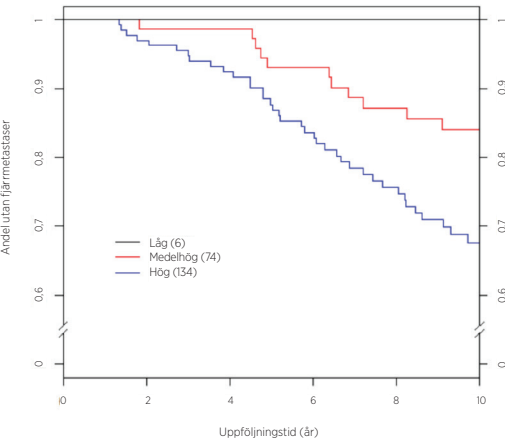
Figur 25: DRFS efter riskgrupp för lymfkörtelnegativa patienter, utom CTS



Sammanfattning av data för figur 25: DRFS efter riskgrupp för lymfkörtelnegativa patienter, utom CTS

Riskgrupp	Antal patienter (%)	Antal Händelser	Uppskattad andel utan fjärrmetastaser efter 10 år [95 % CI]
Låg	431 (58 %)	17	96 % [94 % - 98 %]
Medelhög	180 (24 %)	22	86 % [81 % - 92 %]
Hög	128 (17 %)	38	67 % [59 % - 76 %]
Totalt	739 (100 %)	77	

Figur 26: Sjukdomsfri överlevnad (DRFS) efter riskgrupp för patienter med 1-3 positiva körtlar utan CTS



Sammanfattning av data för figur 26: Sjukdomsfri överlevnad (DRFS) efter riskgrupp för patienter med 1-3 positiva körtlar utan CTS

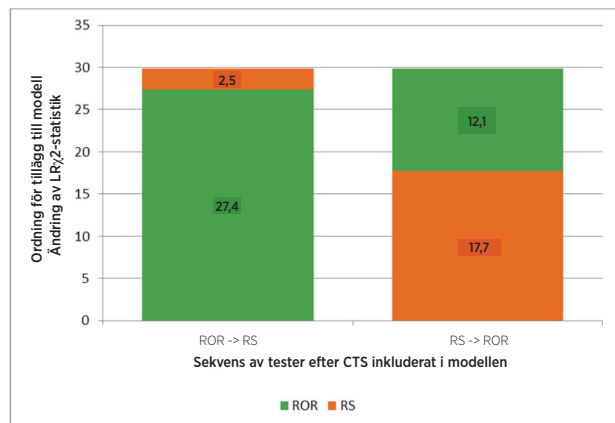
Riskgrupp	Antal patienter (%)	Antal Händelser	Uppskattad andel utan fjärrmetastaser efter 10 år [95 % CI]
Låg	6 (3 %)	0	100 % [ej tillämpligt]
Medelhög	74 (35 %)	11	84 % [76 % - 93 %]
Hög	134 (63 %)	38	68 % [59 % - 77 %]
Totalt	214 (100 %)	49	

ROR jämfört med RS

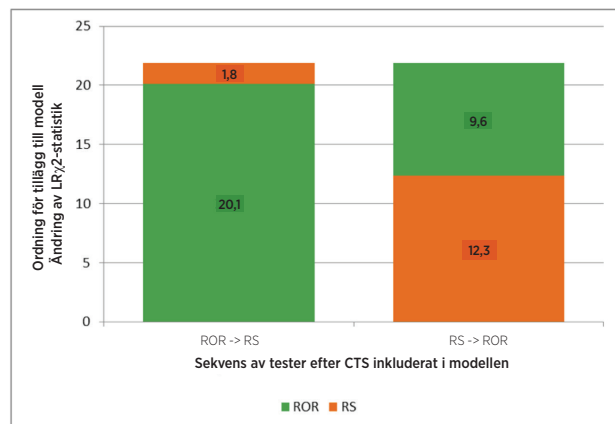
Av de 1 007 proverna med ROR-värden var Oncotype Dx-analysresultat tillgängliga för samtliga 1 007 prover men IHC-resultat var endast tillgängliga för 940 prover. För att kunna jämföra alla tre analyserna baseras resultat på de 940 proverna som hade analysresultat för samtliga tre metoder (IHC4 rapporteras dock inte här). Sannolikhetstvotest presenteras för att lägga till en enskild variabel, så för att tillagd information ska vara statistiskt signifikant ($\alpha = 0,05$) måste förändringen i 1 frihetsgrad χ^2 statistiskt sett vara större än 3,84. Figurerna nedan visar den information som lagts till när det prognostiska testet läggs till ett annat prognostiskt test plus CTS i följd. Vid varje tillägg mäts den tillagda informationen med förändringen i χ^2 .

ROR tillagt till RS utöver CTS: prognostisk information

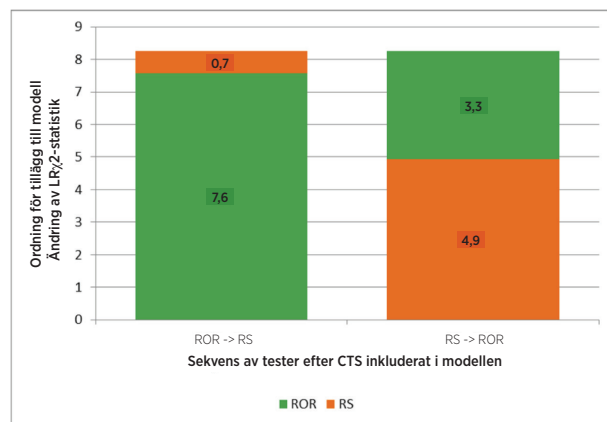
Figur 27: Prognostisk information för DRFS över CTS i alla patienter (n = 940)



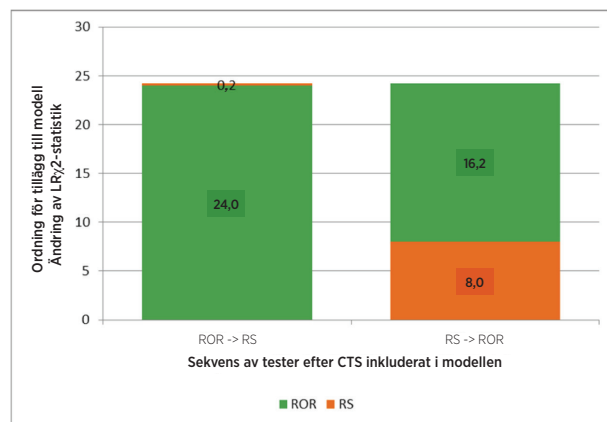
Figur 28: Prognostisk information för DRFS över CTS i lymfkörtelnegativa patienter (n = 683)



Figur 29: Prognostisk information för DRFS över CTS i lymfkörtelnegativa patienter (n = 257)



Figur 30: Prognostisk information för DRFS över CTS i lymfkörtelnegativa HER2-negativa patienter (n = 649)



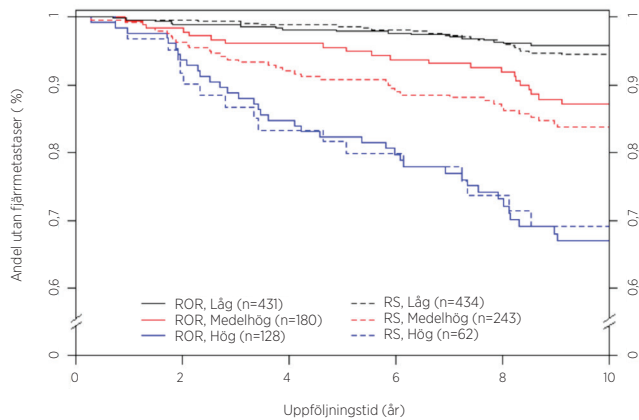
Figur 27 till och med 30 visar den information som lagts till förutom CTS när de två prognostiska analyserna har tillagts i följd. Vid varje tillägg mäts den tillagda informationen med förändringen i χ^2 -statistiken. Till exempel, när ROR var den första analysen som lades till efter att CTS inkluderats (alla patientdata) var förändringen i χ^2 -statistiken 27,4. Med CTS och ROR i modellen blev ändringen i χ^2 -statistiken 2,5 när RS lades till, vilket inte är signifikant (kritiskt värde för χ^2 -analys med 1 frihetsgrad är 3,84); dvs. när CTS och ROR båda finns i modellen adderar RS inte någon signifikant information. Men om RS var den första analysen som lades till fanns det fortfarande information i ROR som inte fanns med i kombinationen av CTS och RS. Båda analyserna visar prognostisk signifikans när de läggs till i CTS hos lymfkörtelnegativa patienter, men ingen av analyserna visar signifikans när de läggs till som andra analys, kanske på grund av att provstorleken är mindre. För lymfkörtelnegativa HER2-negativa patientsubset adderar RS inte någon prognostisk information till CTS + ROR. Å andra sidan lägger ROR till signifikant information till CTS + RS.

ROR vs. RS: resultat för riskgrupper

För att jämföra hur de två analyserna delade in patienter efter risk definierades riskgrupper utifrån varje analys uppskattning av risken för återfall efter tio år inom TransATAC-populationen. Riskvärdeströsklar för att definiera riskgrupperna valdes för varje analys och bygger på resultaten av vår TransATAC-studie för att definiera riskgrupper som innehåller patienter med samma risk. För att uppnå dessa jämförbara riskgrupper skiljde sig de brytpunkter som användes för Oncotype DX från de som användes av Genomic Health. För varje analys definierades lågriskgruppen prospektivt som patienter med mindre än 10 % beräknad risk för återfall. För varje analys definierades medelriskgruppen prospektivt som patienter med mellan 10 % och 20 % beräknad risk för återfall. För varje analys definierades högriskgruppen prospektivt som patienter med mindre än 20 % beräknad risk för återfall. Figuren nedan sammanfattar storlekar och resultat för de riskgrupper som definieras av varje test.

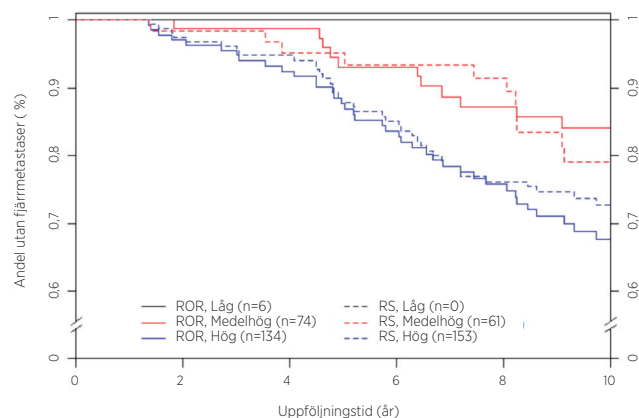
Figur 31 illustrerar resultatet att Prosigna tilldelade 26 % färre patienter till medelriskgruppen än Oncotype DX (180 patients vs. 243 patients). Dessutom tilldelade Prosigna fler patienter till högriskgruppen än vad Oncotype DX gjorde; men de lågriskgrupper och högriskgrupper som definierades av varje analys har liknande resultat vilket illustreras av de överlappande Kaplan-Meier-kurvorna. Denna iakttagelse ledde oberoende forskare i vår TransATAC-studie till slutsatsen att Prosigna tilldelade färre patienter till medelriskgruppen än vad Oncotype DX RS gjorde, med lika hög eller högre separation mellan låg- och högriskgrupper.

Figur 31: Prosignas ROR-värde identifierade betydligt fler högriskpatienter och färre medelriskpatienter än Oncotype DX RS-värde för lymfkörtelnegativa patienter.



När endast ROR användes i lymfkörtelnegativa patienter med 1-3 positiva körtlar spåddes sex patienter ha <10 % risk för fjärrmetastaser. Inget tillstötte för någon av dessa patienter under studiens gång. En av dessa observerades i 7,9 år och alla andra hade inga fjärrmetastaser på minst 9,9 uppföljningsår vilket indikerar att lymfkörtelpositiva patienter som förutspåddes vara lågriskpatienter verkligen var lågriskpatienter. Logranktester användes inte för jämförelse då det inte fanns någon lågriskgrupp för RS.

Figur 32: Jämförelse av riskgruppssklassificering för tio års sjukdomsfri överlevnad utan att använda CTS: Lymfkörtelpositiva patienter (1-3 körtlar) (ROR vs. RS)



Klinisk studie 1 Slutsatser

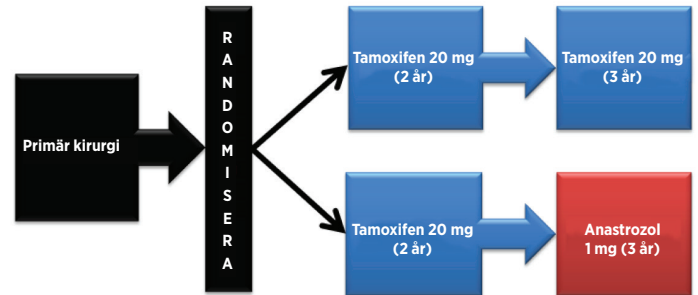
Den primära analysen visade att ROR bidrog med signifikant prognostisk information bortom vanliga kliniska kovariater (CTS) i alla patienter och i alla fördefinierade kliniskt relevanta undergrupper. ROR visade sig dela in patienter i tre riskgrupper med statistisk sett signifikanta skillnader i resultat i lymfkörtelnegativa patienter. De intrinsiska subtyperna Luminal A och Luminal B visade sig ha signifikant olika DRFS och RFS, oavsett körtelstatus. I jämförelse med den prognostiska indikatorn RS (21-gens Recurrence Score från Oncotype Dx), lade ROR till prognostisk information bortom RS i alla patienter och i kliniskt relevanta undergrupper. Vidare fördubblade ROR antalet patienter i den körtelnegativa gruppen som tilldelats högriskgruppen och minskade antalet patienter som tilldelats mellanriskgruppen kraftigt utan att minska resultatskillnaderna mellan låg- och högriskgrupperna vid jämförelse med RS.

Studie 2: Prognos för hormonreceptorpositiva, postmenopausala bröstcancerpatienter som endast får adjuvant systemisk endokrin behandling med Prosigna-analysen: en ABCSG-8-studie

Studiens utförande

Studiens kohort består av FFPE-vävnadsprover från brösttumör som samlats in retrospektivt och arkiverats i ABCSG-tumörbanken från patienter som varit registrerade mellan 1996 och 2004 i ABCSG-8-studien¹³. Totalt 3 901 postmenopausala kvinnor med HR+, bröstcancer i tidigt stadium randomiserades före två års adjuvant behandling med Tamoxifen följt av tre års behandling med Arimidex® (anastrozol) eller fem års adjuvant behandling med Tamoxifen. Behandlingsstrukturen för studien visas i Figur 33.

Figur 33: Schematik för ABCSG-8-studiens utförande



Valideringskohorten representerar fraktionen av den evaluerbara ABCSG-8-kohorten för vilka vävnadsexemplar kan samlas in från den retrospektivt arkiverade ABCSG-tumörbanken och för vilka informerat samtycke kan erhållas, eller avled. Patienter som uppfyller kriterierna för den ursprungliga studien var bara uteslutna antingen för att vävnaden var otillgänglig för Nanostrings analys som skulle utföras eller för att patienten inte kunde samtycka igen. Alla prover med ett tumörblock och patientsamtycke analyserades som en del av denna studien.

Denna studie använde de intrinsiska subtyper som genererades av analysen och evaluerade ROR-värdet med hjälp av en fördefinierad analysplan. ROR-värdet, som går från 0-100, beräknades med hjälp av ett 46-gensubset från de 50 testgener som tidigare publicerades². I varje fall beräknades ROR-koefficienten utifrån en Cox-modell som inkluderar Pearson-korrelationen till de 46 gener som använts för att beräkna varje intrinsiska subtyp, ett proliferationsvärde och tumörstorlek. Alla analyser utfördes på maximala uppföljningsdata.

Den primära slutpunkten var fjärrmetastastfri överlevnad (DRFS). Detta definieras som intervallet från diagnos till upptäckt av metastas eller dödsfall i bröstcancer. Den sekundära slutpunkten var återfallsfri överlevnad (RFS). Detta definieras som intervallet från diagnos till första återfallet (lokalt, regionalt eller avlägset) eller dödsfall i bröstcancer.

Med hjälp av alla tillgängliga patientprover anpassades multivariata Cox PH-modeller (proportional hazards) för att evaluera det primära målet i sekventiella tester av ROR. Modellen inkluderade standardkliniska kovariater (ålder, tumörgrad, bruttotumörstorlek, körtelstatus, adjuvant behandling). En Cox-modell anpassas sedan och ett sannolikhetsskottet användes för att analysera om ROR bidrog med statistiskt signifikant ($\alpha = 0,05$) ytterligare prognostisk information utöver den som fanns i CTS-värdet (Clinical Treatment Score). CTS är en optimerad kombination av klinikopatologiska faktorer utvecklad som ett mått på standardpatologi¹². De primära analyserna upprepades för olika patientsubset (alla, lymfkörtelnegativa, lymfkörtelpositiva eller endast HER2-negativa) och slutpunkter (DRFS eller RFS).

Analys

En sekventiell metod användes där det främsta vetenskapliga syftet var att visa att ROR tillför viktig prognostisk information utöver de vanliga kliniska variablerna. Det primära målet tillförde ytterligare ett krav för att visa att kategorisk riskklassificering i en av tre grupper (låg/medel/hög) tillför betydande prognostisk information utöver de vanliga kliniska variablerna. För att uppfylla detta krav måste båda av följande visas:

- Visa att det kontinuerliga ROR-värdet tillför prognostiskt värde utöver de vanliga kliniska variablerna
- Om nollhypotesen av ingen prognostisk information avvisas, visa att de ROR-baserade riskkategorierna tillför prognostiskt värde utöver de vanliga kliniska variablerna

Med hjälp av alla tillgängliga patientprover anpassades multivariata Cox PH-modeller (proportional hazards) för att evaluera det primära målet i sekventiella analyser av ROR följt av fördefinierade ROR-baserade riskkategorier. Modellerna innehåller följande kategoriska, kliniska standardkovariater (med möjliga värden):

- Ålder (≥ 65 eller < 65)
- Grad (G1 eller G2/GX)
- Bruttotumörstorlek (T1, T2/T3)
- Körtelstatus (N0, N+(1-3), N+(≥ 4))
- Adjuvant behandling (endast tamoxifen eller tamoxifen → anastrozol)

där N0 betecknar lymfkörtelnegativa patienter betecknar N+(1-3) lymfkörtelpositiva patienter med 1-3 positiva körtlar och N+(≥ 4) lymfkörtelpositiva patienter med fler än 4 positiva körtlar. T1 indikerar en tumör om är ≤ 2 cm i diameter, T2 indikerar en tumör som är större än 2 cm men högst 5 cm i diameter och T3 indikerar en tumör som är mer än 5 c i diameter. Det fanns endast 14 T3-exemplar i studien så dessa kombinerades med T2-exemplar. De väldifferentierade (G1) tumörerna jämfördes med kombinationen av moderat differentierade (G2) och GX-lobulära tumörer. GX lobulära tumörer behandlades som G2-tumörer i syfte av analys då G2-tumörer är den vanligaste graden i denna avsedda patientpopulation.

Dessa kovariater matas in i modellen i form av kliniskt behandlingsvärde (CTS). För att erhålla CTS, anpassades följande modell:

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

Där z representerar de kliniska variablerna och behandlingsvariablerna listade ovan och CTS definierades med hjälp av beräkningarna för γ som erhöles ovan, dvs.

$$CTS = \sum_j z_j \gamma_j$$

Det proportionella riskantagandet analyserades med hjälp av Schoenfeld-residualerna.

Patienter som ingick i valideringsstudien har liknande egenskaper som de i den ursprungliga ACBSG-8-studien.

Tabell 30: Sammanfattning av kliniska egenskaper

Egenskap	Värde	Ingår (n = 1 478)		Ingår ej (n = 2 236)		Totalt (n = 3 714)	
		Antal	%	Antal	%	Antal	%
Behandling	Endast Tamoxifen	741	50,1 %	1108	49,3 %	1 849	49,8 %
	Tamoxifen → Anastrozol	737	49,9 %	1128	50,2 %	1 865	50,2 %
ER-status	Negativ	14	0,9 %	32	1,4 %	46	1,2 %
	Positiv	1 464	99,1 %	2 199	98,3 %	3 663	98,6 %
	Okänd	0	0,0 %	5	0,2 %	5	0,1 %
Grad	G1	271	18,3 %	468	20,8 %	739	19,9 %
	G2	1 152	77,9 %	1 659	73,9 %	2 811	75,7 %
	GX	55	3,7 %	109	4,9 %	164	4,4 %
Körtelstatus	N0	1 047	70,8 %	1 723	76,7 %	2 770	74,6 %
	N+(1-3)	382	25,8 %	449	20,0 %	831	22,4 %
	N+(≥ 4)*	49	3,3 %	64	2,8 %	113	3,0 %
PgR-status	Negativ	260	17,6 %	424	18,9 %	684	18,4 %
	Positiv	1 218	82,4 %	1 805	80,4 %	3 023	81,4 %
	Okänd	0	0,0 %	7	0,3 %	7	0,2 %
Tumörstadium	T1	1 037	70,2 %	1 745	77,7 %	2 782	74,9 %
	T2	427	28,9 %	472	21,0 %	899	24,2 %
	T3	14	0,9 %	19	0,8 %	33	0,9 %
Ålder	Median	63		NA		64	
	Intervall	41-79				41- 80	

* En patient med > 9 positiva körtlar

Tabell 31: Ytterligare kliniska egenskaper

Egenskap	Värde	Antal patienter	Andel patienter
NanoString Intrinsisk subtyp	LuminalA	1 004	67,9 %
	LuminalB	418	28,3 %
	HER2-berikad	48	3,2 %
	Basalliknande	8	0,5 %
Metastaser	Fjärran	155	10,5 %
	Alla	194	13,1 %
HER2-status	Negativ	1 397	94,5 %
	Positiv	77	5,2 %
	Okänd	4	0,3 %

Resultat

Av de 1 620 vävnader som var tillgängliga för analys klarade 25 (1,5 %) inte den fördefinierade patologigenomgången för adekvat tumör, 73 av de 1 595 vävnadsproverna (4,6 %) med livskraftig invasiv vävnad klarade inte de fördefinierade specifikationerna i kvalitetskontrollen för extraherat RNA och 44 av de 1 522 RNA-proverna (2,9 %) klarade inte analysens specifikationer för kvalitetskontroll för Prosigna-resultat vilket gör att totalt 1 478 (91,2 %) var kvar och tillgängliga för analys.

Av de 1 478 patienter som var tillgängliga för analys hade 155 fjärrmetastaser och 194 lokala metastaser eller fjärrmetastaser eller dödsfall i bröstcancer. Medianuppföljningen för studien var tio år.

Primär analys visade att ROR-värdet tillför betydande ytterligare prognostisk information för sjukdomsfri överlevnad utöver vanliga kliniska variabler (CTS).

Tabell 32: Sammanfattning av primär analys

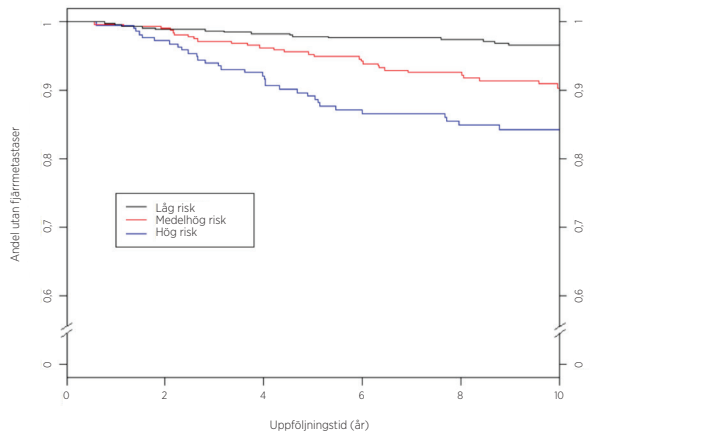
Nollmodell	Alternativ modell	ΔLR χ²	χ² Kritiskt värde(Grader av frihet)	χ²p-värde
CTS	CTS + ROR	53,49	3,84 (df = 1)	p < 0,0001
CTS	CTS + riskgrupp	34,12	5,99 (df = 2)	p < 0,0001

Sekundära analyser visade att ROR är signifikant relaterad till sjukdomsfri överlevnad och tillför prognostisk information utöver CTS i flera kliniskt relevanta undergrupper.

Tabell 33: Upprepning av primär analystestning för fördefinierade undergrupper

Subjektgrupp	Antal patienter	Antal händelser	CTS+ROR vs. CTS	CTS+Riskgrupp vs. CTS
			ΔLR χ² (Krit. värde= 3,84)	ΔLR χ² (Krit. värde= 5,99)
Alla	1 478	155	53,49	34,12
HER2-negativ	1 397	145	47,50	29,94
N0	1 047	86	25,57	23,36
N0, HER2-negativ	984	79	21,69	20,32
N+(1-3)	382	59	25,99	19,94
N+(1-3), HER2-negativ	367	56	22,75	18,75

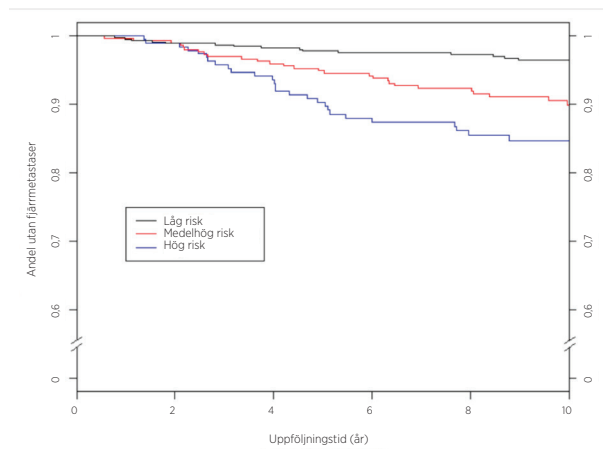
Figur 34: DRFS efter riskgrupp för lymfkörtelnegativa patienter



Sammanfattning av data för figur 34: DRFS efter riskgrupp för lymfkörtelnegativa patienter

Riskgrupp	Antal patienter (%)	Antal händelser under tio år	Uppskattad andel utan fjärrmetastaser efter 10 år [95 % CI]
Låg	487 (47 %)	15	96,6 % [94,4 % - 97,9 %]
Medelhög	335 (32 %)	28	90,4 % [86,3 % - 93,3 %]
Hög	225 (21 %)	32	84,3 % [78,4 % - 88,6 %]
Totalt	1 047 (100 %)	75	

Figur 35: DRFS efter riskgrupp för HER2-negativa, lymfkörtelnegativa patienter

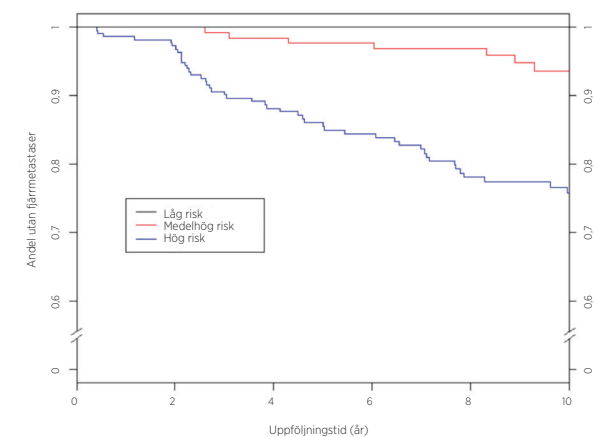


Sammanfattning av data för figur 35: DRFS efter riskgrupp för HER2-negativa, lymfkörtelnegativa patienter

Riskgrupp	Antal patienter (%)	Antal händelser under 10 år	Uppskattad andel utan fjärrmetastaser efter 10 år [95 % CI]
Låg	474 (48 %)	15	96,5 % [94,3 % - 97,9 %]
Medelhög	311 (32 %)	27	90 % [85,6 % - 93,1 %]
Hög	199 (20 %)	27	84,7 % [78,4 % - 89,3 %]
Totalt	984 (100 %)	69	

Figur 36 visar Kaplan-Meier-kurvor efter riskgrupp för lymfkörtelpositiva patienter (1-3 körtlar) och Figur 37 visar samma kurvor för körtelpositiva HER2-negativa patienter (1-3 körtlar). Resultaten med och utan de HER2-positiva patienterna är liknande.

Figur 36: DRFS efter riskgrupp för lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar) patienter

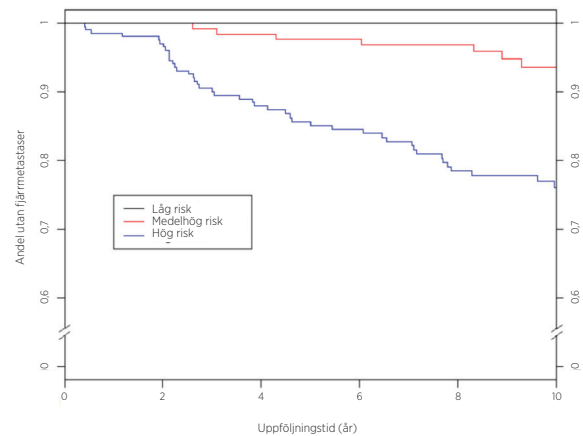


Sammanfattning av data för figur 36: DRFS efter riskgrupp för lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar) patienter

Riskgrupp	Antal patienter (%)	Antal händelser under tio år	Uppskattad andel utan fjärrmetastaser efter 10 år [95 % CI]
Låg	15 (4 %)	0	100 % [78,2 % - 100 %]
Medelhög	143 (37 %)	7	93,6 % [86,9 % - 97 %]
Hög	224 (59 %)	46	75,8 % [68,9 % - 81,4 %]
Totalt	382 (100 %)	53	

* Konfidensintervall uppskattat med hjälp av Clopper-Pearson-metoden

Figur 37: DRFS efter riskgrupp för HER2-negativa, lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar) patienter



Sammanfattning av data för Figur 37 DRFS efter riskgrupp för HER2-negativa lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar) patienter

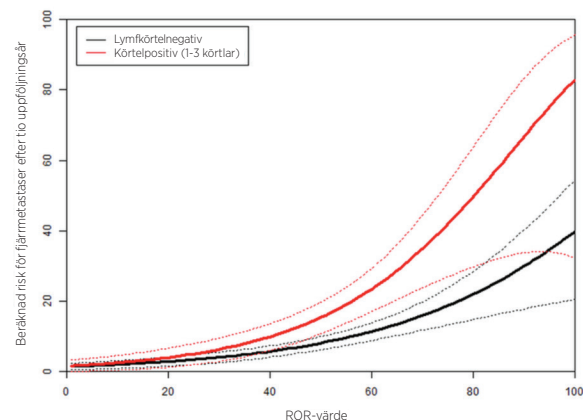
Riskgrupp	Antal patienter (%)	Antal händelser under tio år	Uppskattad andel utan fjärrmetastaser efter 10 år [95 % CI]
Låg	15 (4 %)	0	100 % [78,2 % - 100 %]
Medelhög	142 (39 %)	7	93,6 % [86,8 % - 96,9 %]
Hög	210 (57 %)	43	76,1 % [69,0 % - 81,8 %]
Totalt	367 (100 %)	50	

* Konfidensintervall uppskattat med hjälp av Clopper-Pearson-metoden.

Förhållande mellan ROR-värde och riskförutsägelse

Figur 38 visar den tioåriga risken för DR som en funktion av ROR-värdet med 95 % konfidensintervall baserade på separata Cox-proportionella riskmodeller för var och en de lymfkörtelnegativa och lymfkörtelpositiva (1-3 positiva körtlar) patientgrupperna. För körtelpositiva patienter (1-3 körtlar) uppfylldes inte det proportionerliga riskantagandet vid anpassning över hela intervallet. Kurvan som visas här för körtelpositiva patienter (1-3 körtlar) använder körtelpositiva patienter (1-3 körtlar) med ROR-värden i intervallet 0-80 för vilka det proportionerliga riskantagandet uppfylldes.

Figur 38: Tioårig uppskattad DR-risk efter körtelkategori med 95 % konfidensintervall



Inom varje undergrupp skilde sig den absoluta kliniska risken för patienter som tilldelats kategorin låg risk väsentligt från den absoluta kliniska risken för patienter som tilldelats kategorin hög risk.

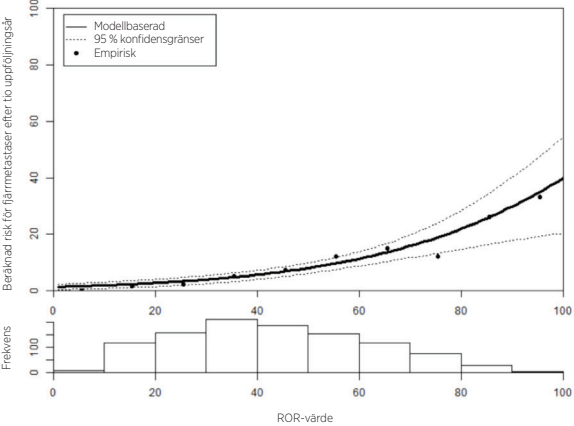
Tabell 34 visar fördelningen av lymfkörtelnegativa patienter i intervall om 10 ROR-enheter. Den tioåriga DR-risken visas också.

Tabell 34: Fördelning av lymfkörtelnegativa patienter i intervall om 10 ROR-enheter

ROR-intervall	Antal patienter	Andel patienter	DR-risk efter 10-år (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	1 047	100 %	

Figur 39 visar den modellbaserade kurvan för lymfkörtelnegativa patienter tillsammans med den empiriska beräkningen för överlevnad efter 10 år för de 10 enheterna där varje enhet består av alla patienter inom det intervall om 10 ROR-enheter (1-10, 11-20 etc.). Under kurvan finns ett histogram som visar frekvensfördelningen per tio enheter.

Figur 39: Jämförelse mellan modellbaserad och empiriska uppskattningar av DR-risk efter 10 år för lymfkörtelnegativa patienter med fördelning av ROR-värden visas nedan



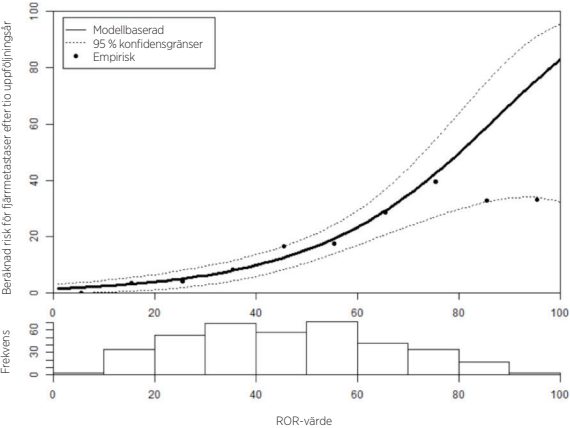
För körtelnegativa patienter liknade de modellbaserade beräkningarna av den oproportionerliga risken de empiriska beräkningarna över hela intervallet. Tabell 35 visar fördelningen av lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar) patienter i intervall om 10 ROR-enheter. Den tioåriga DR-risken visas också.

Tabell 35: Fördelningen av lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar) patienter i enheter om tio ROR-enheter.

ROR-intervall	Antal patienter	Andel patienter	DR-risk efter 10-år (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 visar den modellbaserade kurvan (med hjälp av lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar) patienter med ROR-värden ≤ 80) för lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar) patienter tillsammans med den empiriskt beräknade 10-årsöverlevnad för de 10 enheter där varje tioenhet innehåller alla patienter inom de 10 ROR-intervallen (1-10, 11-20 osv.). Under kurvan finns ett histogram som visar frekvensfördelningen per tio enheter.

Figur 40: Jämförelse mellan modellbaserad och empiriska uppskattningar av DR-risk efter tio år för lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar) patienter med fördelning av ROR-värden visas nedan



Både tabell 35 och figur 40 visar utplanandet av den observerade 10-årsrisken överst i ROR-intervallet som ledde till felet i det proportionella riskantagandet. Men man bör observera att provstorlekarna i de två kärlen över 80 var båda små för lymfkörtelpositiva patienter (1-3 körtlar) (17 patienter från 81-90 och endast tre från 91-100).

Jämförelse av de intrinsiska subtyperna Luminal A och Luminal B

Majoriteten av patienterna i studien (96 %) var antingen Luminal A eller Luminal B, vilket inte var oväntat eftersom dessa intrinsiska subtyper dominerar i hormonreceptorpositiva patienter¹².

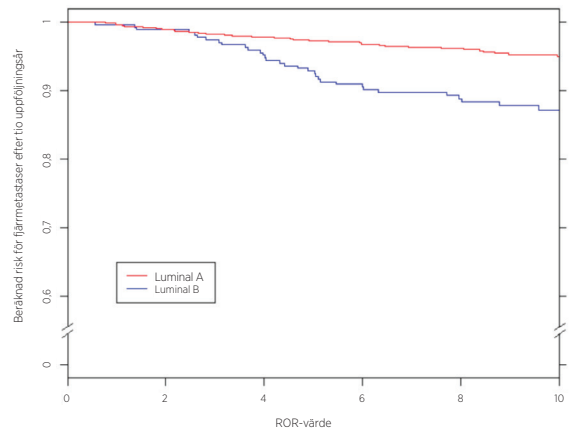
Tabell 36 visar resultaten av sannolikhetstestet för att visa det ytterligare prognostiska värdet för DRFS som den Luminala A/Luminal B-distinktionen tillför utöver CTS. Tabellen visar även riskkvoten där Luminal A-patienter jämförs med Luminal B-patienter. Det fanns en signifikant lägre risk för fjärrmetastaser för Luminal A-patienter i alla tre grupper.

Tabell 36. Sannolikhetstest för DRFS Prognostiskt värde för luminala subtyper

Undergrupp	Antal Patienter	Antal Händelser	ΔLR χ^2	χ^2 p-värde	Riskkvot för LumA : LumB (95 % CI)
Alla	1 422	135	24,42	< 0,0001	0,42 [0,30 - 0,59]
NO	1 009	74	9,68	0,0019	0,47 [0,30 - 0,75]
N+(1-3)	366	51	14,94	0,0001	0,33 [0,19 - 0,58]

Figur 41 visar en jämförelse av DRFS efter Luminal subtyp för lymfkörtelnegativa patienter, Figur 42 visar samma jämförelse för lymfkörtelnegativa patienter (1-3 körtlar). För båda grupperna fanns betydande skillnader mellan DRFS för Luminal A- och Luminal B-patienter.

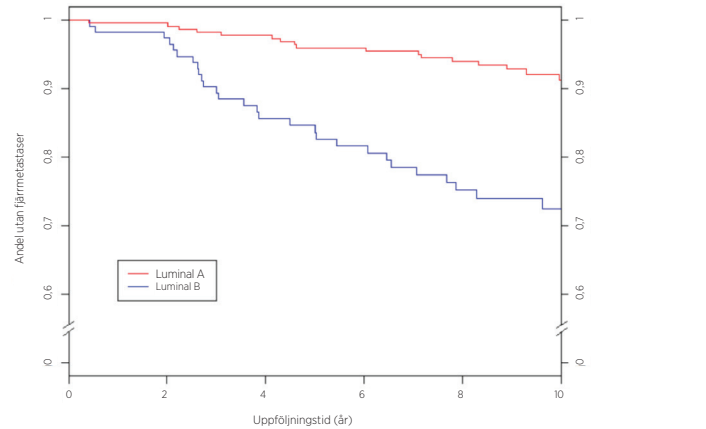
Figur 41: Kaplan-Meier-kurvor för DRFS efter intrinsisk subtyp för lymfkörtelnegativa patienter



Sammanfattning av data för figur 41: Kaplan-Meier-kurvor för DRFS efter intrinsisk subtyp för lymfkörtelnegativa patienter

Riskgrupp	Antal patienter	Antal händelser under tio år	Uppskattad andel utan fjärrmetastaser efter 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	1 009	64	

Figur 42: Kaplan-Meier-kurvor för DRFS efter intrinsisk subtyp för lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar) patienter



Sammanfattning av data för figur 42: Kaplan-Meier-kurvor för DRFS efter intrinsisk subtyp för lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar) patienter

Riskgrupp	Antal patienter	Antal händelser under 10 år	Uppskattad andel utan fjärrmetastaser efter 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 visar en tabell över RFS-värden efter 10 år efter luminal subtyp för lymfkörtelgrupperna lymfkörtelnegativa och lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar).

Tabell 37: RFS-värden tio uppföljningsår per lymfkörtelgrupp och luminal subtyp

Körtelstatus	Luminal subtyp	Antal patienter (%)	Antal händelser under 10 år	Uppskattad andel utan fjärrmetastaser efter 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 %]

För varje lymfkörtelnegativa och lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar) patientpopulationer var skillnaden mellan Luminal A-patienter och Luminal B-patienter signifikant.

Klinisk studie 2 Slutsatser

ROR visade sig tillföra signifikant prognostisk information utöver de vanliga kliniska variablerna och behandlingsvariablerna både när de ingick som ett kontinuerligt mått och när de ingick i tre fördefinierade riskgrupper. Lågriskgruppen hade tio års DRFS gott och väl över 90 % som förväntat. Högriskgruppen hade tio års DRFS på 80 % vilket var högre än förväntat – förväntad andel var betydligt lägre än 80 %. Tröskelvärden som användes för att definiera riskgrupper baserades på TransATAC-kohorten, vilket är högre risk än den aktuella kohorten vilket leder till en "högriskgrupp" med betydligt lägre risk än förväntat. ROR (kontinuerlig och riskgruppsbaserad) visade liknande prognostisk information i olika undergrupper. Den kontinuerliga riskmodellen är noga anpassad efter de empiriska värdena för återfall i både lymfkörtelnegativa och lymfkörtelpositiva (1-3 körtlar) patientpopulationer. De flesta patienter (96 %) i studien hade tumörer av en av två luminala undergrupper (Luminal A eller Luminal B). I alla körtelstatusgrupper tillförde Luminal A/Luminal B-distinktionen prognostisk information för DRFS.

Sammanfattning av kombinerade kliniska studier

Resultaten kan generaliseras för distribuerad användning då prover skickades till och analyserades i olika lab i de två kliniska valideringsstudierna. ROR visade sig tillföra signifikant prognostisk information för 10 års DRFS utöver de vanliga kliniska variablerna och behandlingsvariablerna både när de ingick som ett kontinuerligt mått och när de ingick i tre fördefinierade riskgrupper. Dessutom bidrog ROR, i en post-hoc-analys, signifikant information för DRFS efter 5 år utöver vanliga kliniska variabler för alla patienter. ROR (kontinuerlig och riskgruppsbaserad) visade liknande prognostisk information i olika undergrupper. Begränsade analyser utfördes även med hjälp av RFS. ROR-klasserna kunde även definiera tre riskgrupper med distinkt RFS. För båda studierna fanns signifikanta skillnader mellan DRFS för Luminal A-undergrupper och Luminal B-undergrupper, oberoende av körtelstatus.

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: A TransATAC Study. 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 OCH DEFINITIONER

 - Tillverkare

 - Auktoriserad EU-representant

 - *In vitro*-diagnostisk medicinsk apparat

 - Se användarhandboken

 - CE-märkning

 - Batchkod/Lotnummer

 - Katalog- eller referensnummer

 - Innehåller tillräckligt för <n> analyser

 - Temperaturintervall för förvaring

 - Lägre temperaturgräns för förvaring

 - Övre temperaturgräns för förvaring

 - Använd senast/Utgångsdatum

 - Denna sida upp

Room Temp. = Rumstemperatur

HYB = Hybridisering

Juridisk ansvarsfriskrivning

För *In Vitro*-diagnostik.

© 2023 Veracyte, Inc. och dess dotterbolag. Alla rättigheter förbehållna. Veracyte, Veracyte-logotypen, Prosigna och Prosigna-logotypen är varumärken som tillhör Veracyte, Inc. och dess dotterbolag. nCounter är ett varumärke som tillhör NanoString Technologies, Inc. och används under licens.

19 KONTAKTINFORMATION

 Kontaktinformation i USA:
Veracyte, Inc.
6000 Shoreline Court
Suite 300
South San Francisco CA 94080
USA
Telefon: +1-650-243-6335
www.veracyte.com



Auktoriserad EU-representant:
Veracyte
Luminy Biotech Entreprises
163 Avenue de Luminy
13288 Marseille Cedex 9
FRANCE

Global kontaktinformation:
E-postadress till teknisk support: DxSupport@Veracyte.com
E-postadress till produktinformation: info@prosigna.com
Webbplats: www.prosigna.com