

衛部醫器輸字第 031987 號

說明書-試劑



LBL-10667 第 02 版



1-10 測試

儲存條件

	-20 °C Store at -20° C or below	Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay- Cartridges (測定卡匣)
	-80 °C Store at -80° C or below	Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay- CodeSet (條碼組)
	+25 °C Store at room temperature	Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay- Prep Pack (製備包)
	+8 °C Store at +4° C	Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay- Prep Plates (製備盤)

目錄

1	效能	1
2	測試系統概要	1
2.1	nCounter Dx 分析系統的原理	2
2.2	Prosigna 演算法用於輸出計算的原理	2
3	所供試劑和設備	3
3.1	Prosigna 試劑組概述	3
4	警告和注意事項	3
5	一般測定注意事項	4
5.1	組織處理	4
5.2	實施 Prosigna 測定	4
6	訓練資訊	5
7	廢棄物處理	5
8	儲存和處理 (試劑)	5
9	PROSIGNA 所需儀器	5
10	必要但未提供的試劑和設備	5
10.1	材料	5
10.2	設備	5
10.3	設備規格	5
11	樣本採集和處理	6
11.1	組織樣本要求和病理學審核	6
11.2	樣本採集和儲存	6
11.3	載玻片製備	6
11.4	載玻片處理	6
11.5	RNA 的分離	7
11.6	測量 RNA 濃度和品質	8
11.7	測定程序	8

12	故障排除和測試故障	11
13	測定結果	12
13.1	內在亞型	12
13.2	ROR 分數	12
13.3	10 年遠端復發的可能性	12
13.4	風險分類	12
13.5	品質控制	12
14	本程序的限制	13
15	預期數值	13
15.1	按亞型分類的 ROR 範圍	13
15.2	按淋巴結狀態分類的 ROR 分數頻率	13
15.3	按風險分類區分的無遠端復發存活率(Distant Recurrence-Free Survival, DRFS)	14
16	性能特徵	14
16.1	分析精密度和重現性	14
16.2	靈敏度/ RNA 輸入	16
16.3	干擾測試	16
16.4	臨床表現	17
17	參考文獻	31
18	符號和定義	31
19	聯繫方式	32

1 效能

本產品需搭配 NanoString nCounter Dx 分析系統，檢測經福馬林固定/石蠟包埋 (FFPE) 的侵襲性乳腺腫瘤組織之細胞基因表現，來評估患者的遠端復發風險。

本產品會結合基因表現資料及臨床變因進行評估，以建立亞型 (管狀 A 型、管狀 B 型、HER2 擴增型或類基底型) 及指示疾病遠端復發可能性的分數。

本產品適用於曾接受過乳房切除術或乳房保留手術，並接受標準護理程序進行局部治療的女性乳癌患者，可做為下列用途：

- 對於激素受體陽性 (HR +)、淋巴結陰性、將僅採用輔助內分泌治療的 I 期或 II 期乳癌的停經後女性，當與其他臨床病理因素結合時可用作十年無遠端復發存活預後指標。
- 對於激素受體陽性 (HR +)、淋巴結陽性 (1-3 個陽性淋巴結)、將僅採用輔助內分泌治療的 II 期或 IIIA 期乳癌的停經後女性，當與其他臨床病理因素結合時可用作十年無遠端復發存活預後指標。

2 測試系統概要

NanoString nCounter Dx 分析系統採用如下步驟，通過 mRNA 轉錄體相對含量的數位讀數，提供直接、多重目標檢測的測量值：

- 1) RNA 與螢光報告探針和捕獲探針的雜合；
- 2) 利用 nCounter Prep Plates (製備盤) 進行標靶/探針複合物的純化，製備盤上的試劑可供後雜合處理 (post-hybridization processing) 及固定到

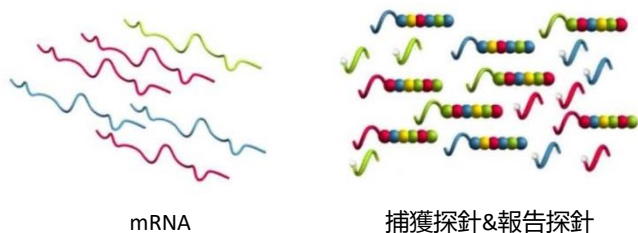
nCounter Prep Station (製備工作站) 的 nCounter Cartridge (測試卡匣); 和 3) 在 nCounter Digital Analyzer (數位分析儀) 上對 nCounter 測試卡匣進行分析, 以提供測試結果¹。捕獲探針和報告探針都含有標靶雜合和純化所需的專屬 DNA 探針序列。捕獲探針和報告探針與陽性和陰性控制組結合, 形成條碼組。本產品利用特別設計的核酸探針, 可在單次雜合反應中, 同時測量 50 個用於亞型分類演算法的基因²、8 個用來標準化基因表現亮的管家基因、6 個陽性控制組及 8 個陰性控制組。Prosigna 試劑組中還包含一個參考樣本, 其中包括 58 個基因的體外轉錄的 RNA 標靶; 每次運行時, 參考樣本皆會跟著患者 RNA 樣本一起進行測試, 以確定測試品質協助並標準化。

Prosigna 測定使用在從 FFPE 乳癌組織分離的 RNA 上。由病理學家檢查經蘇木精和曙紅 (H&E) 染色的載玻片, 標識 (和標記) 適合測試的侵襲性乳癌區域。病理學家也會測量腫瘤表面積, 從而確定測試所需的未染色載玻片數量, 以及確保有足夠腫瘤組織可用於測試的腫瘤細胞密度。經訓練技術人員對 H&E 染色載玻片上的標記腫瘤區域對應的未染色載玻片區域進行宏觀解剖 (macrodissection), 從組織中分離出 RNA。在 NanoString nCounter Dx 分析系統上測試分離的 RNA, 以提供測試結果, 包括內在亞型、復發風險 (ROR) 分數和風險分類。

2.1 nCounter Dx 分析系統的原理

nCounter Dx 分析系統使用的特定基因探針對於溶液中時, 可與 mRNA 樣本直接雜合 (圖 1); nCounter Dx 分析系統並未採用可能會導致結果偏差的酵素反應技術。在測定第一步中, DNA 探針與溶液中 RNA 樣本的 70-100 鹼基對區域雜合。這類螢光報告探針包含兩段 DNA 序列基因, 第一段為長度約 35-50 鹼基且可與 mRNA 標靶互補的探針序列, 第二段為可與 6 段 RNA 片段雜合的特殊 DNA 序列, 且這 6 段 RNA 片段皆被紅色 (R), 黃色 (Y), 藍色 (B) 或綠色 (G) 螢光之一標記。上述螢光片段可創造出一個六位元/四色螢光的“顏色代碼”, 每種“顏色代碼”接對應到特定標靶。另一方面, 捕獲探針則包含一段長度約 35-50 鹼基且可與 mRNA 標靶互補的探針序列; 同時捕獲探針也包含生物素, 以協助捕獲探針固定到鏈酶親和素 (streptavidin) 包覆的載玻片上。

圖 1: CodeSet (代碼集)與 mRNA 雜合



雜合後, nCounter Prep Station (製備工作站) 會自動實施所有樣本純化步驟。首先, 實施連續磁珠捕獲步驟移除多餘捕獲探針和報告探針 (圖 2), 隨後通過鏈酶親和素-生物素鏈接, 將探針-標靶複合物結合至 nCounter Cartridge (測定卡匣) 表面的隨機

位置上 (圖 3)。最後, 對齊探針/標靶複合物, 並將其固定在 nCounter Cartridge (測定卡匣) 中 (圖 4)。

圖 2: 移除多餘報告探針

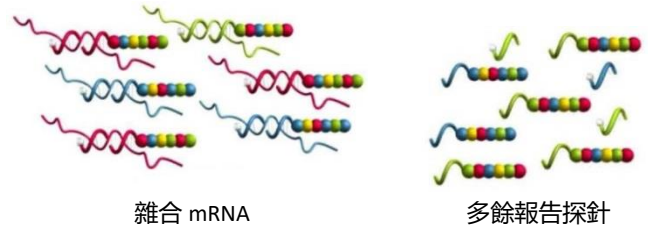
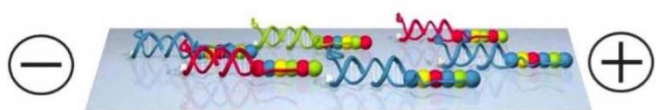


圖 3: 將雜合報告探針與 Cartridge (測定卡匣) 表面結合



圖 4: 對齊並固定雜合報告探針



樣本處理完成後, 將 nCounter Cartridge (測定卡匣) 置於 nCounter Digital Analyzer (數位分析儀) 中進行資料收集。透過偵測前述六位元螢光斑點的顏色與排列順序, 可得知其“顏色代碼”並辨識出相關聯的標靶分子。隨後計算測定卡匣表面上的報告探針, 並對各個標靶分子進行製表, 並採用演算法對其進行處理 (圖 5)。

圖 5: 資料收集

代碼	基因	計數
	X	3
	Y	1
	Z	2

2.2 Prosigna 演算法用於輸出計算的原理

本產品是根據原本命名為 PAM50² 的已發佈 50 基因分類演算法進行測試, 採用從福馬林固定, 石蠟包埋 (FFPE) 的乳腺腫瘤組織樣本中萃取的 RNA, 在 nCounter Dx 分析系統上進行測試。該演算法分析 50 項基因表現, 將乳癌分配到四個分子分類 (或稱內在亞型) 中的一項: Luminal A (管狀 A 型)、Luminal B (管狀 B 型)、HER2-enriched (HER2 擴增型) 或 Basal-like (類基底型)²。本產品利用從北美多個臨床地點收集的 FFPE 乳腺腫瘤樣本, 在 nCounter 分析系統上建立四種內在亞型的典型基因表現資料 (例如: 內部標準品)。當患者檢體進行檢測後, 患者檢體的 50

項基因表現會透過皮爾森積差相關分析衍生的演算法，與四個乳癌內在亞型的典型基因表現模式進行比較。患者檢體將會分類至高皮氏相關係數最高的內在亞型。

該演算法進一步採用 0-100 級距³，報告復發風險 (ROR) 的分數；該復發風險分數與激素受體陽性，患有早期乳癌的停經後女性十年遠端復發可能性相關⁴。該報告還提供了風險類別 (低、中或高)。前述 ROR 分數採用 Cox 模型計算；其中 Cox 模型分析 50 項基因中的 46 項與各內在亞型內部標準品的皮氏相關係數、細胞增殖分數和整體腫瘤大小等因素。將測試變因乘以 Cox 模式的相應係數，以獲得相關分數，並根據先前 FFPE 乳腺腫瘤樣本建立的係數，調整為 0-100 量表中對應的分數。藉由先前臨床驗證研究中建立的 ROR 閾值，本產品能根據 ROR 分數報告患者的風險類別。

3 所供試劑和設備

3.1 Prosigna 試劑組概述

Prosigna 套組包含足以處理 1、2、3、4 或 10 個患者樣本的試劑。關於訂購的資訊，請參見下文。Prosigna 套組包含一個 CodeSet (代碼集)，一個用於 1 至 10 項測試用 Reference Sample (參考樣本) 管，以及耗材等，在出貨前已對其性能進行測試。

型號	套組中的測試數量	所含參考樣本管
PROSIGNA-001	1	2
PROSIGNA-002	2	2
PROSIGNA-003	3	2
PROSIGNA-004	4	2
PROSIGNA-010	10	2

推薦與 Roche FFPET RNA 分離試劑組 (Roche FFPET RNA IsolationKit；型號：Roche-FFPET-025；僅能透過 NanoString Technologies 取得)配合使用

3.2 用於 1、2、3、4 或 10 測試 Prosigna 套組內容物

測試次數	1	2	3	4	10
Prosigna CodeSet Box (代碼集盒)					
Prosigna 報告代碼集	1x 65 µL	1x 65 µL	1x 65 µL	1x 65 µL	1x 65 µL
Prosigna 捕獲探針	1x 70 µL	1x 70 µL	1x 70 µL	1x 70 µL	1x 70 µL
Prosigna RNA 參考樣本	1x 30 µL	1x 30 µL	1x 30 µL	1x 30 µL	1x 30 µL
代碼集條碼貼紙	1	1	1	1	1
測試配置代碼	1	1	1	1	1
Prosigna Prep Plate Box (製備盤盒)					
製備盤	1	1	1	1	2
Prosigna Cartridge Box (測定卡匣盒)					
nCounter 測定卡匣	1	1	1	1	1
Prosigna Prep Pack Box (製備包盒)					
nCounter 製備工作站吸管尖	1	1	1	1	1
nCounter 測定卡匣膠粘性蓋	2	2	2	2	2
nCounter 吸管尖護套	2	2	2	2	2
nCounter 雜合緩衝液	1x 580 µL	1x 580 µL	1x 580 µL	1x 580 µL	1x 580 µL
12 口凹槽連排管	4	4	4	4	4
12 口凹槽連排管蓋	4	4	4	4	4

內容物說明

Prosigna CodeSet (代碼集)

Prosigna 報告代碼集	緩衝液、螢光染料的核酸
Prosigna 捕獲探針試劑	緩衝液、核酸
Prosigna RNA 參考樣本	緩衝液、核酸
代碼集條碼貼紙	貼紙
測試配置代碼	卡片與貼紙

Prosigna Prep Plates (製備盤)

製備盤	超順磁珠、緩衝液、鹽、寡核苷酸、含有螢光染料的聚苯乙烯珠
-----	------------------------------

Prosigna Cartridge (測定卡匣)

nCounter 測定卡匣	樣本測定卡匣
---------------	--------

Prosigna Prep Pack (製備包)

nCounter 雜合緩衝液	緩衝液、鹽
12 口凹槽連排管	塑膠條
12 口凹槽連排管蓋	塑膠蓋
nCounter 製備工作站吸管尖	90 個吸管尖的試驗架 2 個 + 6 個鑽孔器 nCounter
nCounter 測定卡匣膠粘性蓋	膠膜
nCounter 吸管尖護套	6 口吸管尖夾

4 警告和注意事項

- 僅限體外診斷使用。
- 本測定應根據當地的法規，由受過高度複雜的分子生物學技術訓練的操作人員進行操作。
- 請勿混用不同 Prosigna 套組批次中的試劑。在製造時已對同一套組批次進行性能測試，唯有使用同批次試劑和按使用方法操作方能保證產品性能。
- 任何殘餘試劑皆不得重複用於 Prosigna 測定。
- 一旦試驗反應中的雜合次數或雜合溫度超出規定值，皆應捨棄試驗結果。
- 試劑離開儲存條件及開封後必須立即使用。
- 開封後未立即使用的殘餘試劑必須丟棄，不可保留使用。
- 務必全面監視樣本檢體轉移過程 (從組織樣本至 RNA 樣本，及從 RNA 樣本至進行測定)，以確保患者樣本 ID 與正確的測試結果相關聯。
- 如未能按照標籤上規定的條件保存試劑，可能會導致對測定效果產生不利影響。
- 處理試劑和樣本時，請務必佩戴手套。
- 應避免 RNase 污染，因為可能會對結果品質產生負面影響。
- 所有生物樣本和材料皆應視作可能存在傳播傳染因子的方式來處置，並應遵守聯邦、州或地區法規，採取適當預防措施對其進行處理。
- 切勿用口吸。
- 避免試劑與眼睛、皮膚和黏膜接觸。
- 使用最嚴謹的分子實驗室操作程序，避免測試樣本之間的交叉污染或與高濃度核酸標靶 (如合成或 PCR 擴增過的核酸標靶) 的交叉污染，否則可能會對結果品質產生不利影響。

質產生負面影響。

16. Prosigna Prep Plates (製備盤) 和 nCounter Cartridge (測定卡匣) 在處理後, 會含有極少量的疊氮化鈉 (<0.1%), 因此, 建議使用塑膠 (非金屬) 的廢棄物容器進行處理。雖然對本產品而言可能性極低, 但仍應牢記, 疊氮化鈉在金屬上的累積會產生爆炸性危害。
17. 有關其他儀器特定處置資訊, 請參閱 nCounter Dx 分析系統用戶手冊、製備工作站和數位分析儀的維修手冊。
18. 有關報告條碼組、捕獲探針、雜合緩衝液、製備盤等的物質安全資料表資訊, 請參考 www.prosigna.com。
19. 所有危害材料均應根據貴機構的危險廢棄物處理指南進行處理。
20. 任何未使用的條碼組, 均應棄用。
21. 如在軟體中輸入的患者腫瘤大小類別不正確, 可能會導致 ROR 分數和風險分類受到不利影響(例如: 偏移 ROR 分數和/或錯誤分類)。
22. 如在軟體中輸入的患者淋巴腺狀態不正確, 可能會導致患者測試結果報告不正確(例如: 風險分類不正確)。
23. 請勿在本產品中使用品質不佳或數量不足的 RNA 樣本, 或使用腫瘤表面積或細胞密度不足的腫瘤樣本。本產品可能無法給出有效的結果, 反而造成檢測失敗。

5 一般測定注意事項

1. 本試驗僅適用於手術切除術中的福馬林固定, 石蠟包埋 (FFPE) 乳癌組織樣本; 不適用於新鮮, 冷凍或非乳癌組織。
2. 應確保患者的原發性腫瘤總體大小和淋巴腺狀態適合進行本測定。
3. 使用無菌拋棄式微量移液管吸管尖, 避免處理過程中試劑或樣本受微生物和核酸酶污染。
4. 分離的 RNA 樣本沒有進行操作時, 應放置在濕冰上保存。
5. 加熱器必須配合校正後的溫度計使用。
6. 如試劑套組在交付時已受損, 請勿使用。
7. 建議使用本產品的實驗室臨床應自行建立臨床品管物質庫 (例如: 供風險分類用的品管物質), 並將其作為實驗室的標準品管程序, 使經過一段時間後的結果仍能保持精準。

5.1 組織處理

1. 如在組織處理過程中, 宏觀解剖未能妥善去除周圍的非腫瘤/正常組織, 可能會導致醫生取得的報告中 ROR 分數較低, 造成低估風險。
2. 如在 RNA 分離過程中, 未能妥善移除人類基因組 DNA, 可能會導致測定信號偏低, 造成較高的失敗率, 或導致醫生取得的報告中 ROR 分數偏高, 造成風險高估。
3. 應將所有未染色組織切片裝載在帶正電荷的載玻片上, 避免在組織處理過程中脫落。

4. 樣本需要多個載玻片時, 應同時處理所有載玻片。
5. 裝載在載玻片上的組織切片如在乾燥環境中儲存超過 9 個月, 可能會導致降解。
6. 應每週或在溶液變濁時更換 3% 甘油工作液, 以避免污染。
7. 在處理 4 個載玻片組後, 應更換第一組右旋檸檬烯 (D-Limonene) 洗滌液; 在處理 8 個載玻片組後, 應更換乙醇 (EtOH) 和第二組右旋檸檬烯 (D-Limonene) 染色盤內容物, 以避免負面影響組織的品質。
8. 在勾畫未染色載玻片上腫瘤區域, 以及排除非腫瘤組織時, 應小心謹慎, 確保腫瘤組織不受干擾。
9. 在宏觀解剖過程中應小心謹慎處理尖銳部分。
10. 對於每個處理的組織樣本, 皆應使用全新剃刀刀片。
11. 10% SDS 在室溫下經常會沉澱, 應在 37°C 下加熱至沉澱溶解。
12. 使用新批次的 RNA 分離試劑組時, 應先進行測試, 確保新批次試劑組符合 RNA 分離試劑組規格 (詳見 11.5 節) 並可用於患者測試。

5.2 實施 Prosigna 測定

1. 應確保在軟體中正確輸入了患者的原發性腫瘤大小分類。
2. 應確保在軟體中正確輸入了患者的分類淋巴腺狀態。
3. 應驗證雜合所需, 且配置加熱蓋的加熱器達到規定, 且定期校準。
4. 應僅使用 Prosigna 套組中隨附的耗材。該等耗材是專為 nCounter Prep Station (製備工作站) 和 nCounter Digital Analyzer (數位分析儀) 所設計。
5. 如將雜合緩衝液冷藏保存, 但觀察到有沉澱物時, 應在 37°C 溫度條件下加熱試管, 直至鹽分溶解。
6. 混合時請勿劇烈晃動檢測組組件, 因為劇烈晃動可能會損壞試劑。應採用移液管進行混合。
7. 離心代碼集時, 離心速度不得超過 3,000 x g 且離心時間不得超過 10 秒。請勿使用“瞬間離心 (Pulse)”選項進行離心分離, 否則可能會導致代碼集沉澱。
8. 應確保雜合反應保持在 65°C 溫度條件下, 直至可轉移至製備工作站。靜置加熱器至溫度下降到 4°C, 或在雜合結束時將樣本置於冰上, 可能會導致交叉雜合, 最終影響測定結果。
9. 如在添加捕獲探針組的 15 分鐘內, 未能將連排管置於 65°C 溫度條件下, 可能會導致交叉雜合, 最終可能會影響測定結果。
10. 如在樣本離開 65°C 溫度條件後, 未能於 15 分鐘內啟動製備工作站的處理, 可能會導致交叉雜合, 最終可能會影響測定結果。
11. 確保在加熱器中雜合之前, 將連排管帽牢固密封, 以避免蒸發, 否則最終可能會影響測定結果。

6 訓練資訊

本試驗應由受過高度複雜分子生物學技術訓練的專業操作人員，依照當地法規實施。如需瞭解實施 Prosigna 試驗的訓練資訊，請聯繫製造廠。

7 廢棄物處理

有關體外診斷應用中所用試劑和儀器特定的廢棄物處理詳細資訊，請參閱 nCounter Dx 分析系統用戶手冊。

8 儲存和處理（試劑）

所有測定試劑套組組件的保存期限皆列在代碼集盒中隨附之條碼標籤，以及 Prosigna 組件的外盒標籤上。

- 應在-80°C 或以下溫度儲存 Prosigna 代碼集盒的組件 (Prosigna 報告代碼集、Prosigna 捕獲探針組、和 Prosigna RNA 參考樣本)。
- 應在-20°C 或以下溫度儲存 nCounter 測定卡匣。
- 應在 4°C (2-8°C) 溫度儲存 nCounter 製備盤。
- 應在室溫 15°C-25°C 溫度儲存 nCounter 製備包組件。

9 PROSIGNA 所需儀器

- nCounter Dx 分析系統 (型號: NCT-SYST-DX) 包括如下兩台儀器
 - nCounter 製備工作站 5s (型號: NCT-PREP-STATION-FLEX)
 - nCounter 數位分析儀 5s (型號: NCT-DIGITAL-ANALYZER-FLEX)

請參閱 nCounter Dx 分析系統用戶手冊了解進一步詳情。

10 必要但未提供的試劑和設備

10.1 材料

- FFPE RNA 分離試劑組 (如未使用購自 NanoString Technologies 的 Roche FFPE RNA 分離試劑組，請參閱 11.5 節分離試劑組規格要求)
- 蘇木精和曙紅 (H&E)
- 帶正電荷的載玻片
- 右旋檸檬烯 (D-Limonene) 清除劑 (組織學等級)
- 100%乙醇 (無水)，ACS 等級或等同等級 (不低於 99.5%)
- 甘油，分子生物學等級
- 無核酸酶 (Nuclease) 水，分子生物學等級
- 10% SDS，分子生物學等級
- 剃刀刀片 (或拋棄式手術刀)
- 拋棄式切片機刀片
- 0.5mL 螺旋蓋和 1.5 或 1.7mL 不黏無 RNase 微量離心管
- 有氣溶膠屏障的無 RNase 微量移液管吸管尖

10.2 設備

- 顯微鏡用薄片切片機
- 水浴槽 (40°C)
- 載玻片加熱器 (45°C)
- 載玻片乾燥架
- 微量移液管 2μL, 20μL, 200μL 和 1000μL
- 配置 0.2 mL 連排管轉子和標準 1.5 / 2.0 mL 微量離心管轉子的微型離心機
- 配置適合 1.5 mL 離心管的固定角度轉子的標準臺式微型離心機
- 帶外蓋的矩形玻璃染色盤 (內部尺寸約為 3.6 x 2.8 x 2.4", 或 91 x 71 x 60 mm)，所需數量為 3
- 載玻片架(最多可容納 10 個大小為 3" x 1" (75 x 25 mm) 玻璃載玻片)
- 乾加熱器，靜置
- 微量離心管的臺式渦流器
- 量筒 (建議尺寸: 100-250 mL)
- 解剖針或蓋片鉗 (成角，非鋸齒)
- 校正過的溫度計 (能偵測 55°C 至 80°C 的範圍)
- 微量紫外光/可見光分光光度計 (見下文規格)
- 配置加熱蓋的加熱器 (見下文規格)
- 配置板式微板适配器的離心機 (見下文規格)
- 玻片染色缸

10.3 設備規格

表 1: 用於核酸定量的全光譜微量的紫外光/可見光分光光度計

設計特點	規格
樣本體積範圍	1-2 μL
路徑長度	1 mm
波長範圍	260-280 nm
波長精度或誤差	± 1 nm
光譜解析度或頻寬	小於或等於 4 nm
吸光度精度或隨機光度誤差	0.003 (1 mm路徑)
檢測極限	5 ng/μL RNA
最大濃度	≥ 1000 ng/μL RNA

表 2: 用於核酸定量的微量光電二極管紫外光/可見光分光光度計

設計特點	規格
樣本體積範圍	1-2 μL
路徑長度	0.5 mm
波長範圍	260和280 nm
光譜解析度	小於或等於 8 nm
吸光度精度	3% (260 nm下1.05 Abs)
檢測極限	4 ng/μL RNA
最大濃度	≥ 1000 ng/μL RNA

表 3: 測定雜合用的加熱器 (附加熱蓋)

設計特點	規格
加熱器設計	- 應適用於nCounter製備包內附的常規尺寸、12 x 0.2 mL鏈結連排管 ✧ 不相容於設計給Low Profile (LP) 連排管和High Profile (HP) 連排管使用的加熱器

	(也稱熱循環“快速”加熱器) ✧ 不相容於設計給其他類型管 (例如, 0.1 mL管, 1.5 mL管) 的加熱器 · 應可設定溫度維持在65°C ✧ 具備將溫度保持在65°C ±1°C內的能力
加熱蓋設計	· 接受高度固定或可調節的加熱蓋 · 加熱蓋應可設定溫度在70°C

表 4：配置離心 nCounter 製備盤的微孔板載物台離心機

設計特點	規格
離心速度	最低2000 x g
轉子	配置微孔板載物台 (或等同裝置) 的4 x 750 mL搖擺式轉子, 用於容納SBS格式的96孔微孔板
模式	加速/減速模式

11 樣本採集和處理

11.1 組織樣本要求和病理學審核

- 應採用經病理學家進一步指定, 確認為如下侵襲性乳癌類型的福馬林固定, 石蠟包埋 (FFPE) 激素受體陽性乳腺腫瘤組織樣本, 來實施 Prosigna 乳癌預後基因印記測定。
 - 侵襲性乳管癌
 - 侵襲性小葉癌
 - 具乳管和小葉特徵的侵襲性癌 (“混合型癌”)
 - 非特殊類型 (NST) 或非其他指定類型 (NOS)
- 病理學家應選擇具有最大面積可行侵襲性有乳癌的 FFPE 腫塊進行測試。
- 本測試需要載有處理組織切片的未染色載玻片, 以及 FFPE 腫塊中相應的 H&E 染色載玻片。
- 建議測定處理的組織切片與用於 H&E 染色的組織切片相鄰, 以確保 H&E 染色載玻片上識別的腫瘤區域, 可代表未染色載玻片上的腫瘤區域。
- 病理學家應在 H&E 載玻片周圍畫出一圈活侵襲性乳癌區域, 不包括周圍的非腫瘤組織。
- 病理學家或受過訓練的實驗室技術人員應估計 H&E 染色載玻片的圓圈區域內的腫瘤細胞密度和腫瘤表面積。
 - H&E 染色載玻片上的腫瘤細胞密度百分比必須 $\geq 10\%$
 - H&E 染色載玻片上的圓形腫瘤表面積必須 $\geq 4 \text{ mm}^2$

*注意, 腫瘤細胞密度百分比是指畫圈腫瘤區域內活腫瘤細胞的百分比
- 於測定時, 建議腫瘤總表面積超過 100 mm^2 。下表為根據 H&E 染色載玻片上實測腫瘤表面積所建議的載玻片數量。
- 如組織審核過程顯示腫塊的腫瘤面積不足或細胞密度不足, 則需要評估同一腫瘤的不同腫瘤塊。若沒有足夠腫瘤組織的 FFPE 塊, 則不應實施 Prosigna 測定。請注意, 如腫瘤表面積小於 20 mm^2 , 可能無法取得測定所需的 RNA 總量。

表 5：基於腫瘤表面積的推薦切片要求

H&E染色載玻片上的實測腫瘤表面積(mm ²)	未染色載玻片數量
4-19	6
20-99	3
≥ 100	1

11.2 樣本採集和儲存

- 以下操作應根據實驗室的標準操作程序執行: 組織收集和福馬林固定, FFPE 腫瘤塊的處理和儲存, 以及載玻片裝載的 FFPE 組織的運輸。
- 應根據實驗室標準操作程序存放載玻片裝載的 FFPE 組織切片。如存放時間較長 (> 30 天), 應將載玻片儲存在乾燥環境中, 並在 9 個月內進行處理, 以確保測試結果的品質。

11.3 載玻片製備

- 使用薄片切片機, 切割 4-5 μm 厚的切片, 供 H&E 染色使用。
- 使用薄片切片機, 切割 10 μm 厚的切片, 供 Prosigna 測定使用。
- 將切片置於 40°C 溫度條件下進行水浴處理。
- 應將切片裝載在帶正電荷的玻璃載玻片上。
- 讓載玻片風乾。
- 在 45°C 溫度條件下烘烤載玻片一夜。

11.4 載玻片處理

- 通過混合 1.5 mL 甘油原液與 48.5 mL 分子級不含核酸酶水 (可按情況調整比例), 製備 3%甘油工作液。將溶液導入玻片染色缸, 用於處理載玻片。
- 將大約 200-250 mL 右旋檸檬烯清除劑倒入兩組染色盤中, 確保載玻片架中的載玻片能夠完全浸入。
- 將大約 200-250 mL 無水乙醇 (EtOH) 倒入第三組染色盤中。
- 將未染色載玻片裝載組織切片放在載玻片架上。
- 將載玻片架放置在第一組右旋檸檬烯染色盤中, 反復輕輕攪拌載玻片架 10-15 秒。將載玻片架置於第一組右旋檸檬烯染色盤中, 持續 2 分鐘。
- 將第一組右旋檸檬烯染色盤中的載玻片架移入第二組右旋檸檬烯染色盤中。反復輕輕攪拌載玻片架 10-15 秒。將載玻片架置於第二組右旋檸檬烯染色盤中, 持續 2 分鐘。確保已去除所有石蠟; 否則, 應將載玻片架置於第二組右旋檸檬烯染色盤中, 持續超過 1 分鐘左右。
- 應將第二組右旋檸檬烯染色盤的載玻片架移入 EtOH 盤中。反復輕輕攪拌載玻片架 10-15 秒, 兩分鐘後移除。
- 讓載玻片風乾 5-10 分鐘或直至其完全乾燥, 組織轉白為止 (根據組織的尺寸, 可能需要時間更長)。
- 將未染色載玻片與相應的 H&E 染色載玻片對準, 並將

- 其運至勾畫區，在未染色載玻片背面勾畫出腫瘤區。
- 一次處理一個載玻片，將載玻片浸入 3% 甘油溶液中，再水化勾畫未染色載玻片上的組織。
 - 去除載有實驗室組織的載玻片上的任何多餘甘油。
 - 處理多個載玻片時，用戶可在再水化其他載玻片的同時，在乾燥架上乾燥載玻片。
 - 用剃刀或手術刀除去勾畫腫瘤區域周圍的任何非腫瘤組織，並丟棄。
 - 握住載玻片的一端，將另一端以 45 度角放置在固體表面上，收集剃刀刀片邊緣上的宏觀解剖腫瘤組織。收集時，組織應很容易卷在剃刀上。
 - 對相同樣本的每個載玻片，重複上述步驟。注意：可在相同剃刀刀片上收集單個 FFPE 樣本的多個未染色載玻片。
 - 將相同樣本的組織載玻片輕輕轉入有標記的 1.5 mL 微型離心機管。
 - 使用後，將右旋檸檬烯浸泡幾分鐘，然後在組織樣本間乾燥，以此清潔解剖針或鑷子。

11.5 RNA 的分離

NanoString 建議使用 Roche FFPE RNA 分離試劑組，該試劑組經驗證可用於 Prosigna。

如使用其他 RNA 分離試劑組，應先確認可從載玻片裝載 FFPE 乳腺癌腫瘤組織切片產生達到如下規格的 RNA 後，再開始製備本產品上機樣本：

表 6: RNA 分離試劑組規格

項目	測試或測量	規格
RNA 濃度	260 nm 的光密度	≥ 12.5 ng/μL
RNA 總體積(μL)	萃出物	≥ 12 μL
RNA 純度	260 nm 的光密度與 280 nm 的光密度 (OD 260/280 nm) 比例	1.7- 2.3
DNA 污染	洗滌後 RNA 樣本的基因組 DNA 含量	≤ 1 ng/μL
RNA 完整性	分離 RNA 片段的大小分佈	≥ 90% RNA 片段分離長度應 > 100 個核苷酸

RNA 分離程序：

如使用非 Roche FFPE RNA 分離試劑組，應根據製造廠說明，從宏觀解剖腫瘤組織中分離 RNA。

以下說明與建議與本產品推薦配合使用的 Roche FFPE RNA 分離試劑組相關。有關內容物資訊、儲存、安全和處理說明，請參閱 Roche FFPE RNA 分離試劑組說明書。

工作液製備

- 應在處理組織吸收和 RNA 分離前準備工作液：

工作液製備	
試劑	程序
洗滌緩衝液 I	加入 15 mL 的 100% 乙醇，在 +15°C 至

(Wash Buffer 1, WB1)*	+25°C 溫度條件下儲存製備的 WB1。
洗滌緩衝液 II (Wash Buffer 2, WB2)*	加入 80 mL 100% 乙醇，在 +15°C 至 +25°C 溫度條件下儲存製備的 WB2。
蛋白酶 K (Proteinase K, PK)	在 4.5 mL 試劑製備緩衝液 (Reagent Preparation Buffer, RPB) 中溶解冷凍乾燥的蛋白酶 K。 製備 600 μL 等分試樣，標記等分試樣，並將其儲存在 -15 至 -25°C 溫度條件下。
DNase I (DNase I)*	在 740 μL 試劑製備緩衝液 (Reagent Preparation Buffer, RPB) 中溶解冷凍乾燥 DNase I。 製備 50 μL 等分試樣，標記等分試樣，並將其儲存在 -15 至 -25°C 溫度條件下。

注意：在組織處理後不需要標記星號 (*) 的項目。

組織消化

- 解凍足夠數量的蛋白酶 K (PK) 等分試樣。解凍後，應在冰上儲存等分試樣，直至準備使用該試樣。
注意：一個 600 μL 的 PK 等分試樣含有足夠 4 個組織消化的蛋白酶 K。
- 在有組織的試樣管中，添加 100 μL 組織裂解緩衝液 (Tissue Lysis Buffer, TLB)、16 μL 的 10% SDS 和 120 μL 的蛋白酶 K 工作液。
- 振盪有組織的試樣管幾分鐘，隨後離心。
- 在 55°C 溫度條件下隔夜培育 (12 小時 - 23 小時)。

RNA 分離

- 目測檢查試樣管，確定組織是否已完全消化。如完全消化，溶液呈透明色，溶液中幾乎沒有，甚至完全沒有組織。
a. 如完全消化，請繼續下一步。
b. 如未能完全消化，加入 20 μL 額外蛋白酶 K，並再培養一小時。
- 離心所有樣本 (在微型離心機中處理 30 秒)。
- 將樣本置於 80°C 溫度條件下培育 15 分鐘。
- 製備或解凍足夠數量的 DNase 等分試樣。解凍後，將等分試樣儲存在冰上，直至準備使用該試樣。
注意：一份 50 μL DNase 等分試樣含有足夠 4 次 RNA 分離用的 DNase。
- 應在 DNase 培育緩衝液 (DNase Incubation Buffer, DIB) 中稀釋 DNase。RNA 分離所需量 N 為 (N+1) x 90 μL DNase 培育緩衝液 + (N+1) x 10 μL DNase。應將稀釋的 DNase 溶液儲存在冰上，直至準備使用該溶液。
- 在每份樣本中添加 325 μL 石蠟結合緩衝液 (Paraffin Binding Buffer, PBB) 和 325 μL 無水乙醇，並通過移液管混合。
- 短暫地離心所有樣本 (在微型離心機中處理 30 秒)。
- 將高純濾管置於高純收集管上。
- 將樣本移入過濾管的上部貯存器，避免殘留組織。

10. 在 6,000 x g 速率下離心 30 秒。
11. 將高純濾管置於全新高純收集管上 (棄用含有已用溶液的前一個收集管)。
12. 在 16,000 x g 速率下離心 2 分鐘，直至完全脫乾過濾層。
13. 將高純濾管置於全新高純收集管上 (棄用含有已用溶液的前一個收集管)。
14. 將 100 µL 稀釋 DNase 溶液添加到高純濾管過濾層，在 +15 至 +25°C 溫度條件下培育 15 分鐘。
15. 將 500 µL 洗滌緩衝液 I 工作液 (WB1) 添加到高純濾管過濾層，在 6,000 x g 速率下離心 20-30 秒，棄用已用溶液。
16. 將 500 µL 洗滌緩衝液 II 工作液 (WB2) 添加到高純濾管過濾層，在 6,000 x g 速率下離心 20-30 秒，棄用已用溶液。
17. 將 500 µL 洗滌緩衝液 II 工作液 (WB2) 添加到高純濾管過濾層，在 6,000 x g 速率下離心 20-30 秒，棄用已用溶液。
18. 在 16,000 x g 速率下離心 2 分鐘，直至完全脫乾過濾層。
19. 將高純濾管放入有標籤的，無 RNase 1.5 或 1.7 mL 微離心管中。
20. 將 30 µL 洗滌緩衝液 (Elution Buffer, EB) 添加到高純過濾層的中心位置。
21. 在 +15 至 +25°C 溫度條件下培育 1 分鐘。
22. 在 6,000 x g 速率下離心 1 分鐘，從柱中洗滌 RNA。棄用高純過濾管。
23. 在最大速度條件下，將洗滌 RNA 在微型離心管中離心 2 分鐘。
24. 將上清液轉移到 0.5 mL 的螺帽管中，不應破壞原管底部過濾層上可能脫落的任何玻璃纖維。
25. 在同一工作日內測量分離 RNA 的濃度 (儲存在 +2 至 +8°C 的溫度條件下)，在 -70°C 或以下溫度條件下進行冷凍，直至需要其使用。

11.6 測量 RNA 濃度和品質

1. 使用達到 10.3 設備規格中規定規格的分光光度計，在 260 和 280 nm 下測量 2 µL 分離 RNA 的光密度 (OD)。如有任何殘留玻璃纖維，應避免吸取源管底部 2 µL 溶液，否則可能會干擾光密度讀數。
2. 應按照分光光度計的製造廠說明，來測量 RNA。
3. 如任何樣本未能達到最小 RNA 純度或濃度指標 (表 6) 要求，應在最大速度條件下 (> 10,000 x g) 對試樣管離心 1 分鐘，並將管置於冰上，並重複測量過程。如樣本仍未能達到純度或濃度指標，則該 RNA 樣本不適合用於本產品的分析。請勿在本產品的測定中使用品質或數量未達標的 RNA。
4. 如未能達到最小濃度或最小純度規格要求，可重複

RNA 萃取 (表 6)。用戶可選擇將額外載玻片與相同 FFPE 塊分離，或從相同患者處萃取單獨組織塊。

5. 如 RNA 濃度超過 250 ng/µL，在進行後續雜合測定前，應在分子級 RNase-和 DNase-free 水中將其稀釋至 200 ng/µL 的目標濃度。應使用從稀釋樣本處所得已記錄 OD 260/280 比例結果，確定稀釋樣本是否滿足 1.7 節中規定的最小 RNA 純度。
6. 如無法在同一工作日內無法完成 Prosigna 測定，應在 -70°C 或以下溫度下冷凍 RNA。

11.7 測定程序

本測定程序說明採用 NanoString nCounter Dx 分析系統實施 Prosigna 測定的必要步驟。相應步驟可總結為兩日實施的如下類別步驟：

第一天

- 在網頁版應用程式上設置測試集標識 (Setup Run Set Identification, SRSID) 記錄
- 實施 Prosigna 代碼集與 RNA 雜合設置 (30 分鐘設置 15-21 小時雜合)

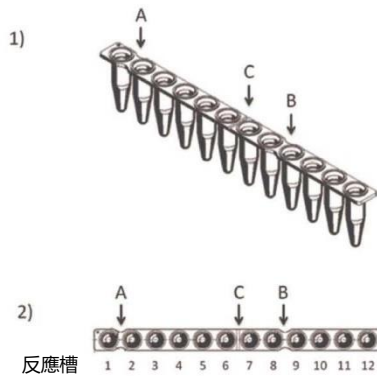
第二天

- 製備工作站的運行和設置 (20 分鐘設置，每次運行 2-3 小時，具體取決於樣本運行的數量)
- 數位分析儀上測定卡匣的設置和掃描 (5 分鐘設置，每個測定 2.5-4.5 小時，具體取決於樣本運行的數量)
- 檢索報告 (30 分鐘)

患者樣本選擇和批設置

1. 確定屬測試運行一部分的患者樣本。單批中最多含 10 個樣本。
 - a. 應將單批中各樣本分配給雜合用 12 槽連排管中的專有位置，即登記為一起上運行設置 ID 的一部分 (通過網頁申請軟體實施運行設置 ID)。應注意：位置 1 和 2 保留給參考樣本，位置 3 至 12 保留用於腫瘤 RNA 樣本。
 - b. 下圖顯示了連排管的側視圖 1) 和頂視圖 2)。連排管在反應槽 1 和 2 (A) 和 8 和 9 (B) 之間有不對稱的度量鍵，以便在處理過程中有助於保持樣本順序。連排管在反應槽 6 和 7 (C) 反應槽 7 之間有凹槽，以便在必要時能方便切割，適應標準離心適配器。

圖 6：鏈結連排管圖示



2. 計算單批中個樣本雜合反應需要添加的 RNA 和水用量 (如有所需)。
 - a. 推薦的測定用 RNA 上機量為 250 ng。可接受的雜合 RNA 上機量範圍是 125-500 ng。
 - b. 將所需樣本輸入 (例如: 250 ng) 除以實測濃度, 計算添加到雜合反應的 RNA 樣本量 (單位: 微升)。
 - c. 如計算樣本濃度在 12.5 ng/μL 和 25 ng/μL 之間, 可添加的最大量是 10 μL。
 - d. 如所需樣本量小於 10 μL, 應計算可獲得 10 μL 總樣本量的水量。

示例: 對於實測 RNA 濃度為 85 ng/μL 的樣本, 如需獲得 250 ng 總量, 需要 2.9 μL 的樣本, 在添加剩餘試劑之前, 需要 7.1 μL 水可獲得 10 μL 總體積。方程式: $250 \text{ ng} \div 85 \text{ ng}/\mu\text{L} = 2.9 \mu\text{L}$

樣本註冊和處理

用戶應為每批樣本建立一個專用測試集 ID, 採用 nCounter Dx 分析系統服務網頁版應用程式, 將每個樣本 ID 與連排管位置相互關聯 (位置 3-12)。有關 nCounter Dx 分析系統服務網頁版應用程式詳情, 請參閱用戶手冊。

1. 如 RNA 在使用前為冷凍狀態, 請在使用前實施如下步驟:
 - a. 於冰上解凍 RNA 樣本, 並將其置於冰上存放。
 - b. 採用最大速度對解凍試樣管進行離心處理 ($> 10,000 \times g$) 1 分鐘, 隨後仍將其置於冰上存放。
2. 根據測試患者樣本數量, 選擇適當的 Prosigna 測試檢體數目 (1, 2, 3, 4 或 10)。將含如下每種條碼組試劑的試管從 -80°C 冰箱中取出解凍。如不立即實施後續步驟, 應將試劑置於冰上存放。
 - a. Prosigna 報告條碼組 (蓋上貼有綠色貼紙)
 - b. Prosigna 捕獲探針組 (蓋上貼有灰色貼紙)
 - c. Prosigna 參考樣本 (蓋上無貼紙)
3. 從條碼組試劑組盒中取出條碼組批次條碼貼紙和測試配置代碼。
4. 使用網頁瀏覽器, 登錄體外診斷 nCounter Dx 分析系統網頁版應用程式, 選擇 Prosigna 作為檢測類型, 開始設計數位註冊表。
5. 在主頁面上, 選擇“建立新測試集”。
6. 定義 Prosigna 運行的第一個必填欄位是測試集 ID。在

測試集 ID 欄位輸入專屬標識符, 以標識樣本批次。

7. 在網頁版應用程式中掃描或手動輸入測試配置代碼。一旦掃描或輸入完畢, 即可捨棄。
8. 在網頁版應用程式中掃描或手動輸入代碼集工具號碼。
9. 接下來, 在相應樣本 ID 欄位中輸入位於連排管第三個位置/槽中的樣本專屬樣本 ID。
 - a. 採用條碼掃描器, 或採用鍵盤手動輸入樣本 ID, 輸入患者 RNA 樣本 ID。
 - b. 在輸入樣本 ID 後, 在操作下一個樣本前, 應填寫樣本的所有必要下拉式欄位 (大體腫瘤尺寸和淋巴結狀態)。
 - i. 使用患者病理學評估過程中確定的陽性淋巴結數量, 選擇合適的測試用腫瘤類別 (0、1-3)
 - ii. 使用患者病理學評估過程中確定的實測腫瘤大小和階段, 選擇合適的測試用腫瘤大小類別 ($\leq 2 \text{ cm}$ 或 $> 2 \text{ cm}$)
 - c. 在各樣本的可選備註欄中, 可輸入相應的評論。
- 注意:** 如不需要任何連排管槽/位置, 應將剩餘欄位留白。如因為樣本數量過多, 需要更多欄位時, 應使用適合更多樣本的不同測試配置。
10. 完成樣本輸入後, 應指定要接收以下內容的用戶:
 - a. 製備工作站和數位分析儀運行的狀態更新。
 - b. 最終報告可用的通知
11. 保存完成的測試集
 - a. 可列印測試集工作表, 並將其用於樣本追蹤和驗證。

雜合反應程序

注意: 以下步驟中皆假設為有十 (10) 個患者樣本和兩 (2) 個參考樣本。

注意: 請確保報告代碼集離心速度不會超過 $3,000 \times g$, 且離心時間不會超過 10 秒, 請勿使之“暫停”離心。否則可能會導致離心達到最大速度, 使條碼組離心脫離溶液。

1. 使用 30 μL 體積, 計算所得加熱器和加熱蓋溫度, 以及“永久”時間設置 (或相當的保持時間設置) 對加熱器進行編程。將加熱器的溫度設定為 65°C, 將加熱蓋的溫度設定為 70°C。
- 注意:** 對於以下步驟, 請務必保持樣本添加到連排管的順序, 確保其與測試集 ID 上的順序匹配。
2. 標記所提供的鏈結 12 槽連排管, 以將 1-6 位置與 7-12 位置區分 (見連排管圖)。
3. 如有必要, 將連排管切半, 使之能通過連排管適配器裝入微型離心機中。
4. 將 10 μL 參考樣本移液至鏈結連排管的 1 號和 2 號位置。
5. 將各樣本計算所需含量移液至鏈結連排管的相應位置。

6. 採用各樣本的全新移液頭，將各樣本計算所需的 RNA 量移至鏈結連排管的相應位置。
7. 一旦將患者樣本添加到連排管中，建議將試樣管放置在試樣管架中，以確保樣本添加到連排管的順序。通過該種方式，在所有樣本添加到連排管後，可以驗證樣本是否按預期順序添加。
8. 一旦所有樣本已添加到連排管，應確認樣本按照連排管中維持的樣本順序排列（可使用測試集工作表驗證樣本順序）。
 - a. 必要時，可使用網頁版應用軟體編輯測試集 ID，以體現最終佈局中的樣本順序（有關編輯現有測試集 ID 說明，請參閱 nCounter Dx 分析系統用戶手冊）。
9. 對樣本順序進行驗證後，應將各個 RNA 試樣管放回冰上。
10. 應建立含有 130 μ L 雜合緩衝液和 65 μ L 報告條碼組的反應混合物。

注意：如將報告條碼組儲存在冰上，應在添加雜合緩衝液之前將之放置在室溫條件下 1 分鐘。
11. 通過移液方式進行混合，並離心反應混合物。

注意：請勿將捕獲探針組添加到反應混合物中，並請勿將完成的反應混合物儲存在冰上。
12. 將 15 μ L 反應混合物移液到槽中，共計移至 12 個槽中。每個槽均應採用全新移液頭。

注意：在完成下一步之前，應將連排管置於 65°C 溫度的加熱器上保持 15 分鐘。
13. 在每個槽中添加 5 μ L 捕獲探針組，每個槽均應使用全新移液頭。
14. 蓋上連排管槽，並反復倒轉連排管數次，用手指輕輕敲擊，以此混合試劑，確保完全混合。
15. 在 PicoFuge 或迷你離心機中，短暫地離心連排管中的樣本 (<3000 x g)。

注意：使用可放置 12 槽連排管的 picofuge，或必要時，使用可容納切割後連排管的微型離心機。
16. 應將連排管置於附加熱蓋的 65°C 加熱器上，應在 65°C 溫度條件下培育雜合測定 15-21 小時。應在 65°C 溫度條件下進行雜合，直至準備用於製備工作站處理。

注意：棄用任何未使用的條碼組。

在 nCounter 製備工作站上處理樣本

1. 裝置數位分析儀與樣本製備工作站。
2. 將 nCounter 測定卡匣從 -20°C 儲存環境中取出，在鋁箔袋中放置在室溫中 10-15 分鐘。

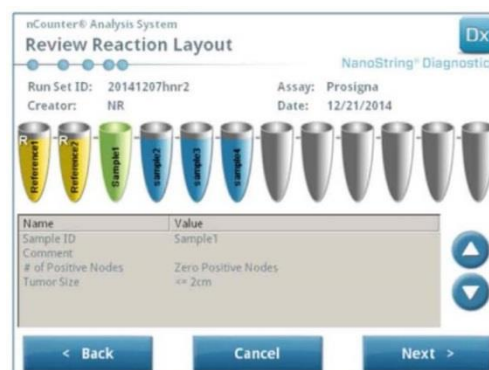
注意：應確保採用的組件來自同一批試劑組。
3. 當測定達到室溫後，應在將測定卡匣裝載到製備工作站板上，將其從鋁箔袋中取出。
4. 將 nCounter 製備盤從 4°C 儲存環境中取出，並放置在室溫中 10-15 分鐘。

注意：使用 1、2、3 或 4 個檢體數目的 Prosigna 套組

時，僅需要一個製備盤。

5. 在 2000 x g 條件下對製備盤離心處理 2 分鐘，在將製備盤載入到製備工作站板之前，收集槽底的液體。
6. 在測定卡匣和製備盤接近室溫時，用 nCounter 製備包耗材對製備工作站進行製備。
7. 使用 nCounter 製備工作站觸控螢幕介面，選擇測定用“診斷”按鈕。
8. 在主選單畫面下，選擇觸控螢幕介面上的“處理樣本”按鈕。
9. 瀏覽畫面上所示可用測試集 ID (RSID) 列表，確認當前正在處理樣本的 RSID。
10. 通過觸控螢幕，選擇 RSID，然後在觸控螢幕介面上選擇“下一步”。
11. 在觸控螢幕介面驗證中，通過查看畫面上各管，並交叉引用樣本資訊方式，選擇相應的 RSID。
 - a. 測試集工作表可用於樣本可追溯和驗證。
 - b. 如選擇了錯誤的 RSID，請點選“返回”按鈕並選擇正確的 RSID。
 - c. 如 RSID 正確但存在樣本條目錯誤，請點選“返回”按鈕並轉至計算工作站，通過網頁版應用程式編輯 RSID。

圖 7：在製備工作站處理運行畫面



12. 在如下數個畫面中，系統會提示用戶掃描開放欄位中的所需試劑條碼 ID，確認所致耗材的板放置。執行每個任務後，在觸控螢幕介面上選擇“下一步”，以移至下一個提示。

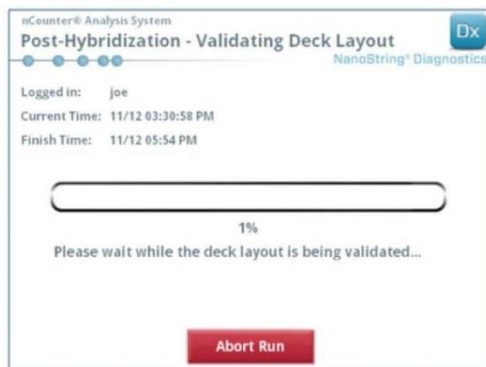
注意：使用 1、2、3 或 4 個檢體數目的 Prosigna 套組實施運行時，僅需使用一個製備盤，一個控制的加熱器的連排管，對於 1、2、3 或 4 個檢體數目運行，應將製備盤和空置加熱器連排管載入到製備工作站板上相應前端位置（最靠近用戶）。
13. 從加熱器中移出樣本。

注意：在從加熱器中移出樣本的 15 分鐘內，啟動製備工作站運行。
14. 應將連排管置於 picofuge 或微型離心機上，並進行離心 (<3000 x g)。
15. 應將管蓋從連排管中移除。
16. 連排管上的缺口和製備工作站上的間隙，應保持正確

的樣本順序和方向。

17. 按照 1 到 12 的順序將連排管由左至右置於 nCounter 製備工作站板中。如使用 1、2、3 或 4 個檢體數目實施運行時，僅需將連排管 (1-6 槽) 的前半部分置於夾板試樣管座的左側。請注意：務必僅使用 1-6 槽；因為管道的凹槽設計，連排管的後半部分 (7-12 槽) 無法放置進試樣管座的左側。
18. 應確認連排管牢固置於製備工作站上，並關閉金屬蓋。
19. 如加熱蓋關閉不當，系統會在驗證平台配置的過程中提示用戶關閉。
20. 在觸控螢幕介面上選擇“下一步”。
21. 出現提示時關閉儀器門，選擇“下一步”啟動平台配置驗證。
22. 如發生錯誤，應按照相應錯誤的指示執行，繼續平台配置驗證。

圖 8：雜合後平台配置驗證製備工作站



23. 驗證平台配置後，在觸控螢幕介面上選擇“開始處理”。
注意：如在啟動製備工作站過程中遇到問題，應將雜合樣本退回加熱器，但最長不應超過 21 個小時。
24. 一旦運行完成，請遵守製備工作站上的提示進行操作。
25. 一旦製備工作站完成運行，請小心將測定卡匣從製備工作站上移出，採用隨附的測定卡匣黏性蓋將之密封。
注意：請勿讓尚未密封的測定卡匣放在製備工作站中超過一晚。
26. 如不打算在一日掃描樣本，應將測定存放不透光工具箱中，於 4°C 溫度條件下存放，可保持最長一周時間。

在 nCounter 數位分析儀上掃描測定卡匣

1. 確定與用於處理樣本的製備工作站相連的數位分析儀。將測定卡匣載入 nCounter 數位分析儀上進行掃描。
 - a. 打開數位分析儀的門。
 - b. 將待添加的測定卡匣放置到空槽中。
 - c. 關門，按照觸控螢幕上的說明操作。
2. 數位分析儀觸控螢幕介面有幾種不同的圖形，有助於快速識別位置狀態：
 - a. 空位置：此插槽為空，準備載入新測定卡匣。
 - b. 完全藍色的測定卡匣：已完成掃描。**請勿移除如下測定卡匣：**

- c. 白色測定卡匣：此插槽中含有已註冊但未掃描的測定卡匣。
 - d. 局部藍色的測定卡匣：此插槽含有正在掃描中的測定卡匣。
3. 已完成掃描的測定卡匣，即可從數位分析儀中移除。
 4. 如果是數位分析儀上載入的第一個測定卡匣，請點選“診斷”按鈕，隨後選擇“主選單”登錄數位分析儀。如數位分析儀已準備掃描測定卡匣，請轉至下文的步驟 9。
 5. 謹慎地將測定卡匣置於數位分析儀上的空槽位中（見上文位置狀態指南）。插槽和測定卡匣上有嵌位，以確保方向正確。條碼面朝上。
 6. 放下插槽蓋，通過插槽加熱蓋上的開口按下測定卡匣，以確保測定卡匣位置放置正確。
 7. 點選“開始計時”按鈕，等待掃描器開始掃描過程。當數位分析儀開始掃描測定卡匣時，會聽到一陣的有節奏的小小喀達聲。
 8. 確認畫面上的測定卡匣位置出現藍色條（啟動掃描的五分鐘內），顯示掃描已啟動。
 9. 要將測定卡匣加至已在掃描測定卡匣的數位分析儀中，應點選“測定卡匣計時”畫面上的“暫停”，並等待數位分析儀暫停當前掃描。
 10. 打開數位分析儀的門。
 11. 將要加入的測定卡匣放置到空槽中。
 12. 關門，並點選“恢復”。
 13. 掃描完成後，軟體會將報告發送到預先指定的用戶電子郵件信箱。
 14. 收到電子郵件通知後，取出已完成的測定卡匣，並根據貴機構的守則丟棄。
注意：成功完成的測定以及有與資料品質控制(QC)相關錯誤的測定皆會產生報告。如出現與資料 QC 無關的錯誤，則不會產生報告。如出現該錯誤，請聯繫 NanoString 客戶服務部門尋求協助。
 15. 使用電子郵件中隨附的連結，打開網頁版應用程式，下載與當前處理的 RSID 有關的所有測試報告。
 16. 錯誤出現後，應按照各個樣本或系統錯誤報告中所列建議進行操作。
- 注意：**個別樣本故障不視為系統錯誤。

12 故障排除和測試故障

表 7：測試重複的錯誤代碼

錯誤代碼	故障描述	推薦措施
5	掃描失敗	採用 250 ng RNA 樣本重新運行測試
7	高信號	重新指定樣本，採用 125 ng RNA 樣本重新運行測試
6	低信號	重新指定樣本，採用 500 ng RNA 樣本重新運行測試
30	低信號	重新指定樣本，採用 500 ng RNA 樣本重新運行測試
31	低 RNA 信號	重新指定樣本，採用 500 ng RNA 樣本重新運行測試

重複測定的原因：

1. 測定報告將會找出失敗的樣本，不會報告測定結果。如為合格樣本，就會報告測定結果。
2. 如測定失敗，測定報告將會找出失敗原因，並建議應採取的行動。可能會重新測試失敗樣本的 RNA，並根據失敗類型以及保留的 RNA 質量，重新運行樣本 (作為全新批次/RSID 一部分)，以獲得測定結果。

13 測定結果

Prosigna 測定包含一系列在分析過程中自動應用於各樣本的品質控制指標。指標可評估測定性能，以確定結果是否在預期結果範圍內。成功分析品質控制指標，Prosigna 測定會提供如下結果：

表 8：Prosigna 測定的結果和輸出

結果	輸出數值
乳癌樣本內在亞型	管狀 A 型 管狀 B 型 HER2 擴增型 類基底型
10 年內遠端復發可能性的個別估計	0-100%
復發風險(ROR)分數	0-100 的整數值
風險類別	低、中、高

13.1 內在亞型

已有研究顯示，乳癌腫瘤的內在亞型與早期乳癌預後相關。平均而言，管狀 A 型腫瘤患者的療效比管狀 B 型、HER2 擴增型、或類基底型患者的療效好^{2, 5}。

藉由將未知樣本中 50 個基因的基因表現與四個內在亞型的預期表現模式進行比較，以確定內在亞型。未知樣本將被歸類為表現模式最相似的亞型。

最常見的乳癌亞型是管狀亞型、管狀 A 型 (LumA) 和管狀 B 型 (LumB)。先前研究表明，管狀 A 型占乳癌總數的 30% 至 40%，管狀 B 型占乳癌總數的 20%⁵。但是，90% 以上的激素受體陽性患者是管狀腫瘤。這些亞型的基因表現模式類似於乳腺組織的管狀上皮部分⁵。這些腫瘤具有較高的雌激素受體 (ER)、黃體素受體 (PR) 和與 ER 活化相關的基因如 LIV1, GATA3 和 D1 週期蛋白，以及管狀細胞角蛋白 8 和 18 的表現。與管狀 B 型乳癌相比，管狀 A 型乳癌顯示與細胞週期活化相關較低的基因表現，因此預後較佳。

先前研究表明，HER2 擴增型亞型 (HER2-E) 占乳癌總數的 20% 左右⁵。但是，HER2 擴增型腫瘤一般是 ER-陰性，因此在受測的測試 ER-陽性患者中，只有 5% 的患者發現患有 HER2 擴增型乳癌。不論 ER-狀態如何，在大多數 ERBB2 細胞團高表達病例中，HER2 擴增型腫瘤顯示 HER2-陽性，包括 ERBB2 和 GRB7。與細胞週期活化相關的基因也有高表現。

已發表的資料表明，類基底型亞型占乳癌總數的 20% 左右⁵。但是，類基底型腫瘤一般是 ER-陰性，因此僅 1% 激素受體陽性患者患有類基底型乳癌。類基底型亞型在臨床上大部分顯示 HER2-陰性，表現為一套“基底”生物標記，包括基底上皮細胞角蛋白 (CK) 和表皮生長因子受體 (EGFR)。與細胞週期活化相關的基因高度表達。

13.2 ROR 分數

ROR 分數是 0-100 之間的整數值，與效能定義族群的個別患者十年內遠端復發可能性相關。ROR 分數是將未知樣本中 46 項基因的表現模式，與上述四種內在亞型的預期表現模式進行對比，以計算四種不同相關係數。將相關係數與細胞增殖分數和整體腫瘤大小等，計算 ROR 分數。

13.3 10 年遠端復發的可能性

將 2 組激素受體陽性早期乳癌的停經後女性的 ROR 分數，與接受手術且術後接受 5 年輔助內分泌治療隨後又接受 5 年觀察的無遠端復發患者的 ROR 分數進行對比 (相關詳情，請參閱臨床症狀章節 16.4)。通過兩項研究，獲得了將 ROR 分數與受測患者群中遠端復發可能性相互關聯的模式，包括 95% 信賴區間。

13.4 風險分類

透過採用與受測患者群的臨床效果相關的臨界值，亦可提供風險分類來解釋 ROR 分數。

表 9：按 ROR 範圍界定的風險分類和淋巴腺狀態

淋巴結狀況	ROR 範圍	風險分類
淋巴結-陰性	0-40	低
	41-60	中
	61-100	高
淋巴結陽性 (1-3 個淋巴結)	0-15	低
	16-40	中
	41-100	高
淋巴結陽性 (≥ 4 個淋巴結)	0-100	高

13.5 品質控制

採用預先確定的規格，測試各批次的 Prosigna 套組。所有套組均通過批次進行追蹤，另外各套組中所含的關鍵試劑均同時接受測試，並以 Prosigna 試劑套組出貨。

Prosigna 套組包括一系列用於評估各個測試集和運行及整體品質的內部對照。具體詳情，請參閱下文。

批次控制集：體外轉錄 RNA 參考樣本

一個合成 RNA 參考樣本是 NanoString Prosigna 套組中所附的對照組。參考樣本由 50 個演算法和 8 個管家基因的體外轉錄 RNA 標靶組成。在每個 Prosigna 測定運行中，雙份處理參考樣本，並對 12 個反應連排管中最多配置 10 個的未知乳腺淋巴結 RNA 樣本進行處理。根據預定義閾值分析參考樣本的信號，以確定運行是否合格。

乳腺淋巴結 RNA 樣本中的 50 個演算法基因的每個基因信號，均應根據參考樣本相應基因進行標準化處理。

陽性控制組：體外轉錄 RNA 標靶和相應的捕獲探針和報告探針
合成 RNA 標靶，用作 Prosigna 測定的陽性控制組 (Positive Control, PC)。這些 PC 目標序列是由外部 RNA 對照聯盟 (External RNA Control Consortium, ERCC) DNA 序列庫所衍生⁶。RNA 標靶通過 DNA 質體從體外轉錄。本產品中包含六種 RNA 標靶，皆以四倍濃度稀釋 (雜合反應中的最終濃度 128 - 0.125 fM)、以及相應的捕獲探針和報告探針。將 PC 添加到採用 Prosigna 測定的各乳腺淋巴結 RNA 樣本和參考樣本中。如 PC 的信號強度不符合預定義閾值，樣本將不再具有進一步分析的資格。

陰性控制組：無標靶的外源探針

陰性控制組目標序列是由 ERCC DNA 序列庫所衍生。本產品所附的探針沒有接續對應的目標序列，用於針測陰性控制組目標序列。在採用 Prosigna 試驗測試的各乳腺淋巴結 RNA 樣本和參考樣本中添加陰性控制組 (NC)，作為品質控制措施。如 NC 的信號強度不符合預設閾值，樣本將不再具有進一步分析的資格。

RNA 完整性對照集：管家基因

包含專門用於檢測 8 個管家基因和 50 個演算法基因的捕獲探針和報告探針，作為 Prosigna 試劑組的一部分。對 8 個管家基因的表現水準進行分析，確定 FFPE 組織樣本從萃取且輸入 Prosigna 測定的 RNA 品質。如管家基因表現水準低於預定義閾值，樣本將不再具有進一步分析的資格。

在參考樣本規範化之前，也可採用管家基因對樣本中完整 RNA 數中差異進行正常化處理。

14 本程序的限制

1. Prosigna 測定已經過優化，採用從福馬林固定、石蠟包埋 (FFPE) 人體乳房組織中萃取的純化 RNA，辨識乳癌淋巴結的內在亞型，以及患者 10 年遠端復發風險，作為 ROR 分數和風險分類。其他類型的樣本或固定劑尚未被驗證，不可用於檢測。
2. Prosigna 測定的性能僅在採用本說明書中提供的程序時經驗證有效，如更改程序，可能會影響測試的性能。
3. Prosigna 測定的性能特徵係針對接受五年輔助內分泌治療的激素受體陽性早期乳癌絕經後女性患者而建立，對其他治療方案或其他患者群的性能仍未建立。
4. 如將數量或品質不足的 RNA 添加到測定中，Prosigna 測定無法提供有效結果，相反地，會報告測定失敗。
5. Prosigna 的測定結果 (內部亞型、ROR 分數、風險分類等) 應配合其他臨床病理因素、患者病史和任何其他實驗室測試結果等來解釋。
6. Prosigna 測定的性能已經過符合上述程序參考之規格的 RNA 來確立。不符合規格的分離 RNA，尚未確定其性能。

7. 已知會干擾 Prosigna 測定的物質包括有基因組 DNA 和非淋巴結組織 (例如：正常組織)。請在啟動之前，參考一般測定注意事項。病理學家在運程序前，應明確確定可見侵襲性癌區域。另外，應採用 DNase 處理每個 RNA 樣本。如採用非 Roche FFPE RNA 分離試劑組的分離試劑時，在處理患者測試樣本前，根據所提供規格，測試並確認各新批次的 DNase。

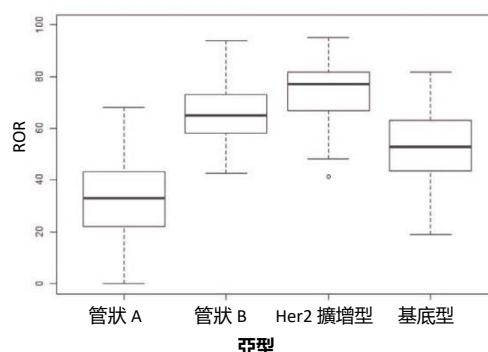
15 預期數值

Prosigna 測定會針對每個癌症樣本報告其 ROR 分數 (0-100)、內在亞型 (管狀 A 型、管狀 B 型、HER2 擴增型或類基底型) 和風險分類 (低、中或高) 等。根據下文所述兩個臨床驗證研究，顯示了 HR+ 的早期乳癌絕經後女性，在 ATAC 和 ABCSG-8 試驗中接受安美達錠 (Anastrozole) 或諾瓦得士錠 (Tamoxifen) 治療的 ROR 分數範圍和頻率 (圖 10)，以及 ROR 與淋巴結狀態遠端復發可能性的連續關係 (圖 11)，以及預期按內在亞型分類的 ROR 分數分佈 (圖 9)。根據該等臨床驗證研究，圖 12 (淋巴結-陰性患者) 和圖 13 (淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者) 代表按風險類別分類的 10 年無遠端復發存活率。

15.1 按亞型分類的 ROR 範圍

圖 9 顯示了按內在亞型分類的 ROR 分數的盒鬚圖

圖 9：按內在亞型分類的 ROR 分數的盒鬚圖



15.2 按淋巴結狀態分類的 ROR 分數頻率

圖 10 中的直方圖，採用單個 Cox 模式生成，包括 ROR 分數和分類變因，以區分三個淋巴結涉及分組。

圖 10：ROR 分數和淋巴結狀態組直方圖

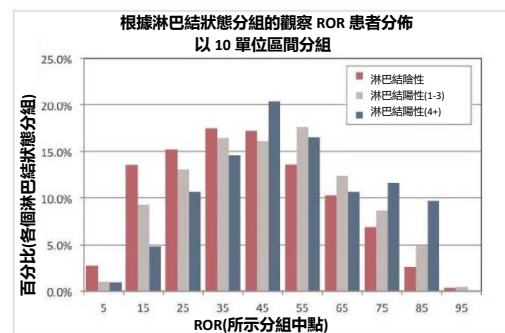
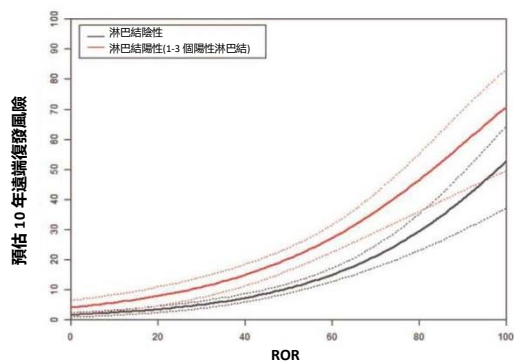


圖 11：於淋巴結狀態組中預估的 10 年預測風險



15.3 按風險分類區分的無遠端復發存活率 (Distant Recurrence-Free Survival, DRFS)

以下資料來自 TransATAC 和 ABCSG-8 試驗的綜合分析。為了將患者分配的風險組，將 ROR 分數與預先確定的淋巴結-陰性或淋巴結-陽性患者的閾值進行比較。圖 12 和 13 是按淋巴結狀態區分的各風險分類組的 10 年無遠端復發存活率。

圖 12: 按淋巴結-陰性患者的風險組區分的 Distant Recurrence-Free Survival (DRFS)

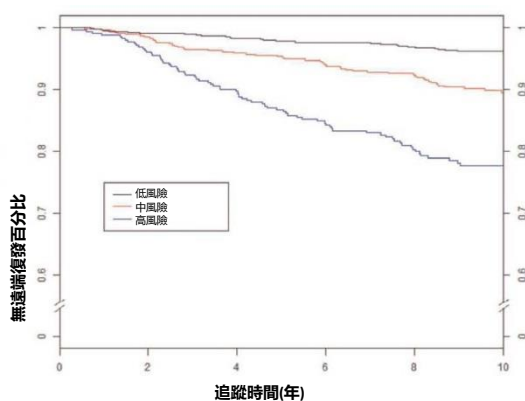


圖 12 資料總結：按淋巴結-陰性患者的風險組區分的 DRFS

風險組	患者人數 (%)	10年間事件數量	預估10年無遠端復發的百分比 [95%CI]
低	875 (49%)	31	96.2% [94.7% - 97.3%]
中	551 (31%)	53	89.2% [86.1% - 91.7%]
高	360 (20%)	73	77.7% [72.8% - 81.9%]
總計	1,786 (100%)	157	

圖 13: 按淋巴結-陽性(1-3 個淋巴結)患者的風險組區分的 DRFS

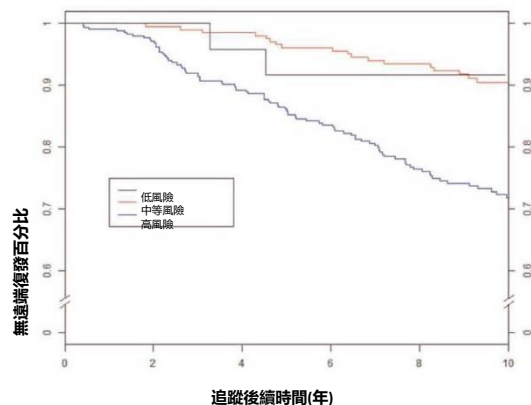


圖 13 資料總結：按淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者的風險組區分的 DRFS

風險組	患者人數 (%)	10年間事件數量	預估10年無遠端復發的百分比 [95%CI]
低	24 (4%)	2	91.7% [70.6% - 97.8%]
中	211 (36%)	18	90.4% [85.2% - 93.9%]
高	355 (60%)	87	71.8% [66.3% - 76.6%]
總計	590 (100%)	107	

表 10: 4 個或以上陽性-淋巴結患者 10 年 DRFS 率

風險組	患者人數	10年間事件數量	預估10年無遠端復發的百分比 [95%CI]
高	103	39	57.4% [46.3% - 67.0%]

16 性能特徵

16.1 分析精密度和重現性

為了預估 Prosigna 的整體精密度和再現性，需要實施兩項研究並將結果進行綜合考慮。實施的第一項研究是在 nCounter Dx 分析系統上實施的精密度研究，從萃取的乳腺淋巴結 RNA 開始；第二項研究是再現性研究，從包含預分析因子的乳腺淋巴結組織開始。

RNA 精密度

16.1.1 研究設計

在 nCounter Dx 分析系統上，採用 Prosigna 測定實施三中心的盲性隨機比較研究，以評估分析精密度。從取得的 FFPE 檢體中產生各中心測試用的五個合併乳腺癌淋巴結 RNA 樣本。樣本代表常規測試中遇到的原型表現模組，以及各個風險分類組。

首先每位操作人員應熟悉操作，每個中心均完成 18 輪有效操作（每位操作人員實施 9 次操作，每次操作包括 10 次測試）（表 11）。在每次操作過程中，採用 250 ng 測定的標準 RNA 上機量水準，二重複測試每個樣本。每位操作人員在指定日期，根據長時間操作方法的工人標準實施一次操作。每個中心的總研究時間（包括熟悉時間）超過

4 周。

表 11: RNA 精密度研究概述

研究變量	數量
乳腺淋巴結 RNA 樣本數量	5
每次操作的樣本重複數量(同一測定卡匣)	2
操作次數/中心	18
操作次數/天	1
操作人員人數/中心	2
試劑批次數量/中心	3
中心數量	3
各中心測試的樣本總數(不包括熟悉)=	180
總樣本數=	540

16.1.2 變異數成分分析

表 12 是各個樣板組成變異數成分分析的輸出。預測變異數下方是總變異數的百分比 (括號中)。

表 12: 按樣板組成區分的變異數成分(合併 RNA 樣本)

按風險亞型 分類的樣板 組成	平均 ROR	變異數成分					變異數 總計	總標 準差
		批次	中心	操作 人員	操作	操作過 程中		
低 管狀 A 型	31.4	0.010 (2%)	0.000 (0%)	0.000 (0%)	0.134 (30%)	0.296 (67%)	0.44 (100%)	0.66
中 管狀 B 型	55	0.105 (18%)	0.000 (0%)	0.000 (0%)	0.046 (8%)	0.426 (74%)	0.576 (100%)	0.76
中 類基底型	55.4	0.059 (20%)	0.000 (0%)	0.000 (0%)	0.046 (15%)	0.194 (65%)	0.299 (100%)	0.55
高 管狀 B 型	64.8	0.119 (21%)	0.014 (2%)	0.000 (0%)	0.064 (11%)	0.380 (66%)	0.576 (100%)	0.76
高 HER2 擴增型	76.2	0.165 (37%)	0.000 (0%)	0.000 (0%)	0.000 (0%)	0.277 (63%)	0.442 (100%)	0.66

對於所有五個樣板組成，在 0-100 量表中，總標準偏差低於 1 個 ROR 單位。對於所有樣板組成，大部分變異數均來自操作間變異數 (重複性)。幾乎沒有中心與中心間的變異數，或操作人員與操作人員間的變異數。透過樣板組成分類的中心概似比測試表明，中心差異在統計學上不顯著 ($p > 0.05$)。對於每個批次，除了導致整體變異數平均 20% 的差異的每個樣板組成外，平均 ROR 分數小於 1 個 ROR 單位。

16.1.3 亞型合格和風險分類的一致性

對於所有樣板組成，亞型結果和樣板組成內在亞型之間 100% 一致。對於所有樣本，實測風險組和預估風險組之間也 100% 一致。

組織再現性

16.1.4 研究設計

在採用 Prosigna 測定的 nCounter Dx 分析系統上，使用取自相同 FFPE 塊的複製乳癌組織樣本實施三個中心的盲性隨機比較研究。對確認侵襲性導管和/或小葉癌的激素受體陽性乳癌患者的 43 個最新 FFPE 乳腺淋巴結樣本進行測試，此項為研究的一部分。將所有組織樣本運至適當的測試中心進行處理。由三位獨立病理學家對 43 個樣本實

施獨立審核。對於每個病理學審核的組織樣本，會由每個中心的單一操作人員，使用既定測定程序，實施測試操作，具體包括組織宏觀解剖、RNA 萃取，以及採用 Prosigna 套組進行測試。在各個獨立測定操作中，對各個組織樣本的分離 RNA 測試兩次。在研究執行過程中，使用三批 RNA 分離試劑組 (每個中心一個批次) 和一個批次的測試套組。當實測淋巴結表面積 $\geq 100 \text{ mm}^2$ 時，針對 RNA 萃取需要一片載玻片；當實測淋巴結表面積 $< 100 \text{ mm}^2$ 時，則需要三片載玻片，其中最最小淋巴結表面積應為 4 mm^2 。

16.1.5 測試總結

三個中心評估的四十三 (43) 個組樣本準的合格率 (Call Rate)，如表 13 中所示。

表 13: 各中心的完成率(Call Rate)

中心	提供結果的百分比	合格/總計
1	95%	41/43
2	93%	40/43
3	100%	43/43

有 40 個樣本在所有中心都產生了結果 (每一個中心重複進行一個樣本的 RNA 分離)，有 1 個樣本在 2 個中心產生了結果，有 2 個樣本在 1 個中心產生了結果。通過組織審核和 RNA 分離規格的百分之百 (100%) 樣本，產生了 Prosigna 測定的合格結果。4/5 的 RNA 分離失敗的實測淋巴結表面積 $\leq 15 \text{ mm}^2$ ，相當於小於輸入測試中面積計算的 50 mm^2 總面積。

在 43 個樣本中，包括淋巴結-陰性患者和淋巴結-陽性患者。43 個樣本的計算測試結果代表較廣的 ROR 分數範圍 (94 個單位)，所有 4 個內在亞型，以及將淋巴結-陰性或淋巴結-陽性臨界值用於所有樣本時的所有風險範圍。在所有後續統計分析中，不應包含結果在單個中心的兩個樣本，因為沒有資料用於中心間對比。

16.1.6 變異數成分分析

在使用無母數 Kruskal-Wallis 測試的風險類別之間，沒有統計學意義 ($\alpha = 0.05$)，所以變異數成分模式同時適用於所有風險類別。

表 14 顯示了使用所有 41 個組織樣本的變異數成分分析的結果。

表 14: 變異數成分 (組織再現性研究)

變異數成分				總標準差
中心	腫塊內	殘餘	總計	
0.10	7.72	0.51	8.34	2.89

中心成分測量系統性中心特定變異；“腫塊內”成分測量因組織樣本審核/處理的隨機變異，或 FFPE 腫塊內變異；殘餘變異測量 Prosigna 試驗中綜合的操作與操作間變異和

操作內變異。與腫塊內隨機變異相比，中心成分的變異非常小，這表示中心間的平均差異可以忽略（< 總變異數的 1%）。殘餘變異與 RNA 精確度研究中實測的等效變異性相互一致，其中 RNA 精確度研究的樣本較少，而且更多是重複測量（與 RNA 精確度研究中平均每個中心的 Prosigna 試劑批號變異數為 0.39 相比，變異數為 0.51）。

表 15 總結了採用組織處理可變性（本研究表 14 的中心和塊內成分）的總變異數，以及 RNA 精確度研究的總 RNA 處理變異數（表 12 中五個樣板組成的平均值）。與組織處理相關的預分析因素是測試變化的根本原因（總變異數的 94%）。包括所有變異數來源的總標準差等於 2.9，表示 Prosigna 試驗在 95%信賴區間時兩個 ROR 值間 6.75 差值的可靠度。

表 15：總變異數（組織和 RNA 處理）

組織處理 變異數	RNA 處理 變異數	總變異數	總標準差
7.82	0.47	8.29	2.9

16.1.7 風險類別和亞型分類的一致性

表 16 中列出了按患者亞型和風險分類區分的中心對中心一致性（低/中/高風險），其中，在所有樣本上採用針對淋巴結-陰性和淋巴結-陽性分類的相應風險臨界值。關於精確類型 95%信賴區間，如表中所示，兩個中心間均有結果的樣本數量，採用小括弧表示。一致性平均值請見最後一列。每次比較皆採用兩個步驟計算一致性。首先，對各個組織樣本，計算確定的四個可能結果對的比例（在中心 1 的兩個結果 * 在中心 2 的兩個結果）。第二，計算生成指定對比中兩個中心結果的所有組織樣本的平均比例。

表 16：按淋巴結狀態區分的亞型和風險類別一致性摘要

對比類型	成對一致性			平均 一致 性
	中心1 vs. 中心2 (n=40)	中心1 vs. 中心3 (n=41)	中心2 vs. 中心3 (n=40)	
亞型	96.3% [86.4% - 99.5%]	98.8% [91.0% - 100%]	95% [83.1% - 99.3%]	97%
風險類別 淋巴結-陰性	87.5% [73.2% - 95.8%]	92.7% [80.1% - 98.4%]	90% [76.4% - 97.2%]	90%
風險類別 淋巴結-陽性	88.8% [75.9% - 96.0%]	92.7% [80.1% - 98.4%]	91.3% [79.2% - 97.4%]	91%

對於每次對比（亞型和淋巴結-陰性和淋巴結-陽性風險類別），中心間平均一致性至少是 90%。在兩個中心之間或中心內，不存在風險分類從低風險轉變為高風險（或反之亦然）的樣本。在所有 6 個副本中，僅兩個樣本（總數量為 41）沒有得出相同亞型：

1. 一個樣本在一個中心出現重複的管狀 A 型結果，在其他兩個中心則出現重複的管狀 B 型結果。
2. 一個樣本在一個中心出現重複的管狀 A 型結果，在另一個中心出現重複的 HER2 擴增型結果，在第三個中心則出現一個管狀 A 型結果和一個 HER2 擴增型結

果。

16.2 靈敏度/ RNA 輸入

RNA 輸入研究說明

本研究測試了測定規格（500、250 和 125 ng）內三個 RNA 上機量的 13 個乳腺淋巴結 RNA 樣本，和兩個超過規格（625、62.5 ng）的額外 RNA 上機量的樣本。在單個測試操作中，每次採用一個批次的套組（總共兩個批次）對每個樣本進行測試，每次操作都包括各規格水準條件下的重複測量，以及規格水準外的單獨測量。每次測試操作均包括重複空白（即，無標靶）測量。僅採用單個批次測試單個樣本。

RNA 輸入研究結果

所有實測空白樣本（n=46）均低於信號閾值，並會產生失敗測試結果（0%合格率）。測定規格內的所有淋巴結 RNA 測量（n=138），均產生合格測試結果（100%合格率）。百分之百（100%）輸入高於規格（625 ng）的樣本，產生合格測試結果。低於樣本規格（62.5 ng）條件下，在批次 1 有百分之八十三（83%）的樣本（10/12）得出結果，而在批次 2 則為 100%產生結果。

13 個樣本的平均 ROR 分數，覆蓋範圍較廣（20-82）。對於 13 個受測樣本，在所有 RNA 輸入水準條件下，風險組分類（低/中/高）100%一致。表 17 總結了 ROR 分數作為 RNA 輸入函數時的變化。採用不同 RNA 輸入水準之間的平均 ROR 分數差，該差值的標準差以及 90%信賴區間，評估通過不同 RNA 輸入水準生成的 ROR 分數，是否與採用 250 ng 標靶水準生成的 ROR 分數等同。為了達到驗收準則，信賴區間必須完全在（-3, 3 ROR）內。在測定規格範圍（125 和 500 ng RNA）極端的兩個水準條件下，ROR 分數與兩個受測組批次中各組批次的 250 ng 標靶輸入濃度下的 ROR 分數等同。對於超出測定規格的各水準，對於其中一個批次，ROR 分數等同，但對另一個批次，ROR 分數不同。

表 17：ROR 分數差總結。計數等於分析中所含樣本量。

批次	含量(ng)	計數	平均ROR 差值	差值 標準差	信賴下限	信賴上限
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 干擾測試

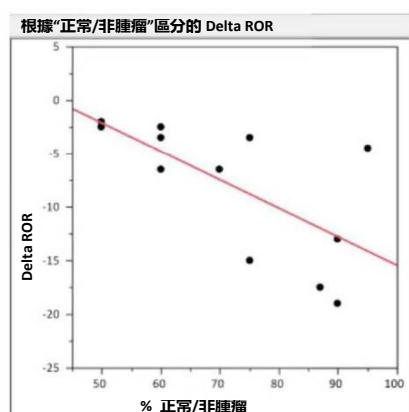
相鄰正常組織/非腫瘤組織

FFPE 乳腺腫塊中一般會有相鄰正常/非腫瘤乳腺組織。在病理學審核時，可將其辨識為與侵襲性乳癌區域不同的區域。上述 Prosigna 測定程序具體說明了通過宏觀解剖去除相鄰正常組織

為了評估正常組織污染影響測試結果的風險，共有 13 個 FFPE 乳癌腫塊的樣本，同時採用有/無周圍組織宏觀解剖 (macrodissection) 後進行評估，測定 ROR 分數 (delta ROR) 的差值，這些樣本含有病理確診的浸潤性乳腺管癌，且周圍正常/非腫瘤組織約占 50-95%。

平均而言，宏觀解剖腫瘤樣本的 ROR，比正常/非腫瘤組織未能移除時觀察到的 ROR 高 8 個 ROR 單位。圖 14 顯示，當正常組織數量增加時 (宏觀解剖未能移除的比例最高達 95%)，如下風險會增加：報告中 ROR 分數可能低估患者預期的復發風險，或出現負向偏差 (高達 -19 個 ROR 單位)。

圖 14：正常/非腫瘤組織對 Delta ROR 的影響



壞死性，出血性和 DCIS 組織干擾

為了評估壞死/出血/DCIS 污染影響測試結果的風險，共有 11 個 FFPE 乳癌腫塊 (3 個 DCIS、5 個壞死、3 個出血) 的樣本，同時採用有/無周圍組織宏觀解剖 (macrodissection) 後進行評估，測定 ROR 分數 (delta ROR) 的差值，這些樣本為經病理確診的侵襲性乳癌，並被偵測含有 10-30% 的干擾性組織。在受測水準條件下，檢測程序中血液/出血、DCIS 和壞死組織對於 ROR 評估的影響可忽略不計 (<6 ROR 單位)。有/無宏觀解剖的 11 例壞死、出血、和 DCIS 樣本之間的風險分類分配 100% 一致。

人類基因組 DNA

Prosigna 測定程序包括去除人類基因組 DNA (gDNA)。為了評估 gDNA 污染影響測試結果的風險，共選用十 (10) 個經病理確診為浸潤性乳腺管癌的 FFPE 癌腫塊樣本，透過省略 DNase 操作步

驟的方式，達到有/無去除人類基因組 DNA 的樣本測定。平均而言，在受測樣本中，當採用 DNase I 移除 gDNA 時，中低風險組中的 ROR 分數低了 4~5 單位 (見表 18)。當未採用 DNase 處理的樣本，在後續採用 DNase I 處理 (處理後)，ROR 分數與原先採用 DNase 處理方案所觀察到的 ROR 數值匹配。可能會導致出現如下風險：在 gDNA 存在時，報告中 ROR 分數高估患者預期的復發風險，或出現正向偏差 (高達 7 個 ROR 單位)。此外，無 DNase I 處理的樣本計算信號，比有 DNase I 處理的樣本計算信號明顯要低 ($p < 0.05$)，因為於 Prosigna 測定前用以測量 RNA 總量的吸光值讀數受到干擾。

表 18：採用 DNase 的處理對腫瘤樣本中 ROR 的影響

ROR 類別	受測 FFPE 樣本	ROR 差值 有 DNase I – 無 DNase I			ROR 差值 有 DNase I – 有 DNase I (處理後)		
		平均	最小	最大	平均	最小	最大
低	3	-4.0	-6.0	-1.0	0.7	-1.0	3.0
中	2	-4.5	-7.0	-2.0	1.0	0.0	2.0
高	5	0.4	-1.0	2.0	0.4	-1.0	1.0

16.4 臨床表現

執行了兩項臨床驗證研究，以驗證 Prosigna 乳癌預後基因印記測定。兩項研究的主要指標，在驗證已發表文獻的觀察結果，即復發風險分數 (ROR) 提供超出標準臨床變量的 10 年以上無遠端復發存活率等額外預後信息。此外，此兩項研究的次要指標，是為了驗證如下已觀察到的結論：管狀 A 型和管狀 B 型患者在 10 年無遠端復發存活率方面存在統計學上顯著差異。由於此兩項研究的納入條件和結果相似，將兩個資料庫相結合，並採用與各研究有相同指標的前瞻性定義分析方案進行分析。

綜合分析：使用 TransATAC 和 ABCSG-8 的 Prosigna 測定 綜合結果生成風險曲線

綜合分析的治療和臨床特徵總結如下表所示。關於個別研究設計和分析資訊，請分別參閱研究 1 和 2 的以下部分。

分析

表 19：研究 1 和研究 2 綜合分析中治療和臨床特徵總結

特徵	數值	淋巴結-陰性 (n=1,786)		1-3 陽性淋巴結 (n=590)		≥4 陽性淋巴結 (n=103)	
		Trans ATAC (n=739)	ABCSGB (n=1,047)	Trans ATAC (n=208)	ABCSGB (n=382)	Trans ATAC (n=54)	ABCSGB (n=49)
治療	部分安美達錠 (Anastrozole)	377 (51.0%)	528 (50.4%)	102 (49.0%)	184 (48.2%)	31 (57.4%)	25 (51.0%)
	僅諾瓦得士錠 (Tamoxifen)	362 (49.0%)	519 (49.6%)	106 (51.0%)	198 (51.8%)	23 (42.6%)	24 (49.0%)
等級	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%)
腫瘤尺寸	≤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狀態	陰性	649 (87.8%)	984 (94.0%)	186 (89.4%)	367 (96.1%)	47 (87.0%)	46 (93.9%)
	陽性	90 (12.2%)	63 (6.0%)	22 (10.6%)	15 (3.9%)	7 (13.0%)	3 (6.1%)
復發性	遠端	79 (10.7%)	91 (8.7%)	50 (24.0%)	64 (16.8%)	31 (57.4%)	10 (20.4%)
	任何	117 (15.8%)	121 (11.6%)	59 (28.4%)	73 (19.1%)	34 (63.0%)	10 (20.4%)
NanoString 內在亞型	管狀A型	529 (71.6%)	725 (69.2%)	127 (61.1%)	248 (64.9%)	31 (57.4%)	31 (63.3%)
	管狀B型	176 (23.8%)	284 (27.1%)	68 (32.7%)	118 (30.9%)	20 (37%)	16 (32.7%)
	類基底型	7 (0.9%)	6 (0.6%)	2 (1.0%)	2 (0.5%)	0 (0%)	0 (0%)
	HER2擴增型	27 (3.7%)	32 (3.1%)	11 (5.3%)	14 (3.7%)	3 (5.6%)	2 (4.1%)

兩項研究的治療組均包含 5 年諾瓦得士錠 (Tamoxifen)。在 TransATAC 中，另一治療組包含 5 年安美達錠 (Anastrozole)，而在 ABCSG-8 研究中，第二個治療組包含 2 年諾瓦得士錠 (Tamoxifen) 隨後 3 年安美達錠 (Anastrozole)。將遠端復發 (Distant Recurrence, DR) 被模擬用作所有臨床和治療變量的函數時，治療作為 DR 的預測因子沒有明顯作用 ($p=0.66$)。試驗間的另一項主要差值是如下實施：TransATAC 試驗包括 3 級腫瘤患者，且 TransATAC 研究中的整體復發率比 ABCSG-8 研究中的整體復發率高。

結果

圖 15 顯示了根據各淋巴結-陰性和各淋巴結-陽性 (1-3 陽性淋巴結) 的獨立 Cox 比例風險回歸模式 用作 95%信賴區間的 ROR 分數函數的 DR 的 10 年風險。

圖 15: 按 95%信賴區間的淋巴結狀態區分的十年預估 DR 風險

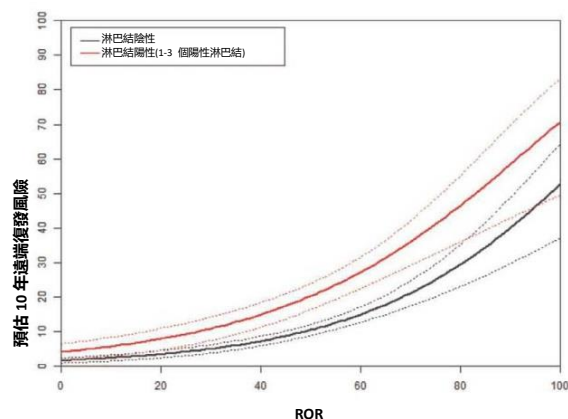


圖 16 是按淋巴結-陰性患者分區的 Kaplan-Meier 和發病率圖，圖 17 是有 1-3 個陽性淋巴結的淋巴結-陽性患者的發病率圖。在每幅圖中，按風險組提供樣本量、事件數量和 10 年無遠端復發預估百分比的詳細資訊。在淋巴結-陽性患者組中，僅有極少量導致 Kaplan-Meier 曲線上信賴區間的預定義低風險組中的患者，因此，10 年 DRFS 預估非常廣。

圖 16A: 按淋巴結-陰性患者風險組區分的 DRFS

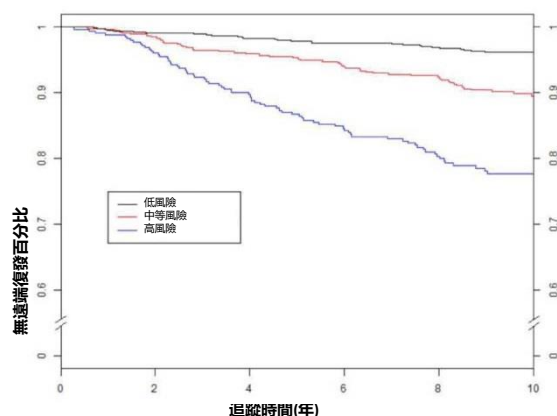


圖 16A 資料總結：按淋巴結-陰性患者風險組區分的 DRFS

風險組	患者人數(%)	10年間事件數量	預估10年無遠端復發的百分比 [95% CI]
低	875 (49%)	31	96.2% [94.7% - 97.3%]
中	551 (31%)	53	89.2% [86.1% - 91.7%]
高	360 (20%)	73	77.7% [72.8% - 81.9%]
總計	1,786 (100%)	157	

圖 16B: 按五年區間淋巴結-陰性患者風險組區分的發生率

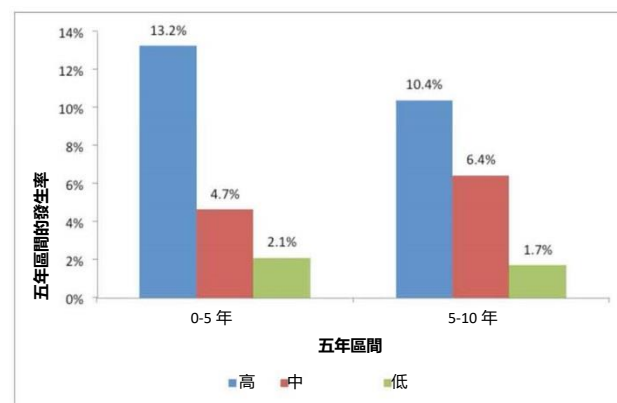


圖 17A: 按有 1-3 個陽性淋巴結的淋巴結-陽性患者風險組區分的 DRFS

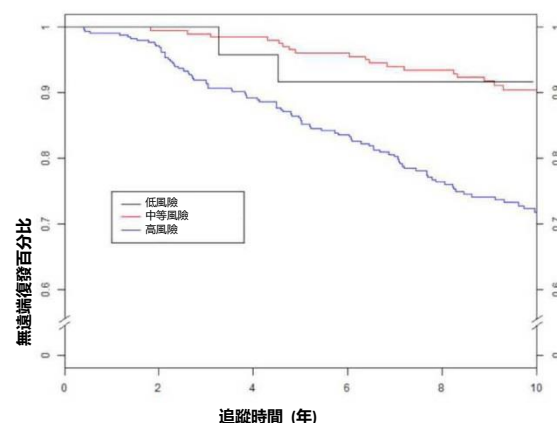
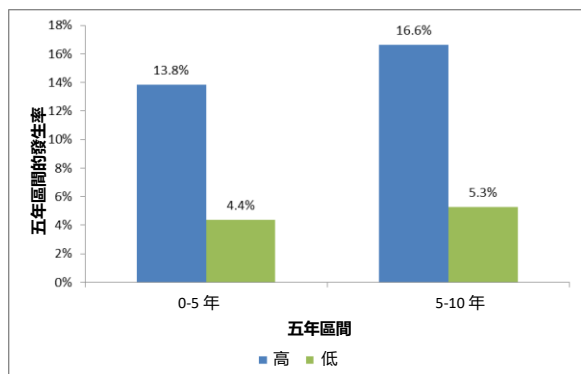


圖 17A 資料總結：按有 1-3 個陽性淋巴結的淋巴結-陽性患者風險組區分的 DRFS

風險組	患者人數(%)	10年間事件數量	預估10年無遠端復發的百分比 [95% CI]
低	24 (4%)	2	91.7% [70.6% - 97.8%]

中	211 (36%)	18	90.4% [85.2% - 93.9%]
高	355 (60%)	87	71.8% [66.3% - 76.6%]
總計	590 (100%)	107	

圖 17B: 按淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者在五年區間的風險組區分的發生率



在圖17B中，因低風險淋巴結-陽性分組中的24位患者中僅有2例事件，故這些患者被併入中風險患者進行晚期復發分析。

在有 4 個或以上陽性淋巴結的綜合資料庫中的所有 103 例患者，均歸類為高風險。表 20 顯示了這些患者的十年 DRFS 率。

表 20: 4 個或以上陽性淋巴結患者的 10 年 DRFS 率

風險組	患者人數	10年間事件數量	預估10年無遠端復發的百分比 [95% CI]
高	103	39	57.4% [46.3% - 67.0%]

綜合研究中的大部分受試者 (96%) 是管狀 A 型或管狀 B 型。圖 18 是按淋巴結-陰性患者管狀亞型區分的 DRFS 對比。

圖 18: 按淋巴結-陰性患者內在亞型區分的 DRFS 的 Kaplan - Meier 曲線

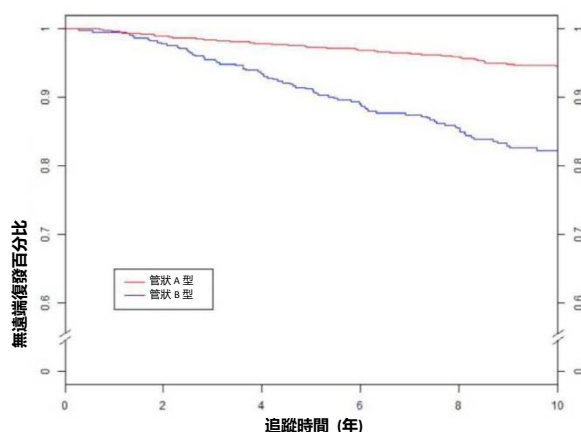


圖 18 資料總結: 按淋巴結-陰性患者內在亞型區分的 DRFS 的 Kaplan - Meier 曲線

風險組	患者人數	10年間事件數量	預估10年無遠端復發的百分比 [95% CI]
管狀A型	1254	62	94.6 [93.1 - 95.8]
管狀B型	460	75	81.9 [77.7 - 85.3]
總計	1,714	137	

圖 19 是針對有 1-3 個陽性淋巴結的淋巴結-陽性患者的相同對

比。在兩個分組中，管狀 A 型患者 DRFS 和管狀 B 型患者 DRFS 之間存在明顯差異。

圖 19: 按有 1-3 個陽性淋巴結的淋巴結-陽性患者內在亞型區分的 DRFS 的 Kaplan-Meier 曲線

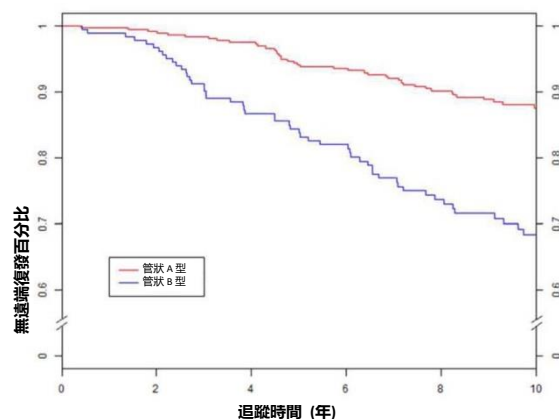


圖 19 資料總結: 按有 1-3 個陽性淋巴結的淋巴結-陽性患者內在亞型區分的 DRFS 的 Kaplan-Meier 曲線

風險組	患者人數	10年間事件數量	預估10年無遠端復發的百分比 [95% CI]
管狀A型	375	41	87.6 [83.5 - 90.8]
管狀B型	186	52	68.3 [60.4 - 75.0]
總計	561	93	

在 4 個或以上陽性淋巴結綜合資料庫中，僅有 98 例管狀亞型患者。表 21 是患有管狀 B 型的較高風險患者的 10 年 DRFS 率。

表 21: 按管狀亞型區分，有 4 個或以上陽性淋巴結患者的 10 年 DRFS 率

風險組	患者人數	10年間事件數量	預估10年無遠端復發的百分比 [95%CI]
管狀A型	62	17	68.3 [53.6 - 79.3]
管狀B型	36	20	38.0 [21.4 - 54.5]
總計	98	37	

晚期復發分析

在前述綜合分析資料中，各風險組中的事件發生率，在 10 年區間內並不相同，如圖 16B 和 17B 所示。為進一步理解晚期復發期間的 DR，因此對五年無遠端復發的患者，實施了前述綜合資料的回顧性分析 (總計 2,163 例患者)⁸。其中 1,605 例是淋巴結陰性患者，488 例是淋巴結-陽性患者 (1-3 個陽性淋巴結)。針對各個淋巴結組，圖 20 和圖 21 中五年時 x 軸以下數值，為按五年風險的風險組區分的患者人數，即：符合晚期復發分析資格的患者。

表 22 是晚期復發分析中淋巴結-陰性和淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者的治療和臨床特徵總結。

表 22：晚期復發分析的治療和臨床特徵總結

特徵	數值	淋巴結-陰性 (n=1,605)		淋巴結-陽性 (1-3個淋巴結) (n=488)	
		ABCSG8 (n=944)	TransATAC (n=661)	ABCSG8 (n=311)	TransATAC (n=177)
治療	部分安美達錠 (Anastrozole)	480	346	153	89
	僅諾瓦得士錠 (Tamoxifen)	464	315	158	88
等級	良好	192	158	46	36
	中等	752	394	265	105
	差	0	109	0	36
腫瘤尺寸	≤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狀態	陰性	888	590	300	157
	陽性	56	71	11	20
復發	遠端	41	40	28	29
	任何	71	78	37	37
NanoString 內在亞型	管狀A型	674	488	218	112
	管狀B型	245	150	87	54
	類基底型	4	5	0	1
	HER2擴增型	21	18	6	10

主要指標是評估 ROR 分數是否能提供 5 至 10 年內超出標準臨床變量的 DRFS 等額外預後信息。採用概似比 (LR) 測試，將僅包含臨床治療指數 (Clinical Treatment Score, CTS) 的虛無模型，與包含 CTS 和 ROR 的對立模型進行對比。對於所有患者 (p<0.0001) 和淋巴結-陰性 (p<0.0001) 和淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 的患者 (p<0.0001)，ROR 添加了超出標準臨床變量的後五年 DRFS 等統計性重要資訊。

表 23 是基於單變量分析和包括 ROR 分數和 CTS 的多變量分析的 10 點變化的風險比總結。即使在調整 CTS 後，ROR 分數的風險比也與 1 有顯著性差異。表 22 中顯示了 C-指數。對於兩個分組，各自 C-指數與無資訊狀況的 0.5 也有顯著性差異。

表 23：晚期復發測試總結

陽性 淋巴結 數量	N	風險比：10點ROR分數變化		95%信賴區間的C-指數		
		單變量分析	多變量分析	C-指數	下限	上限
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%

兩項研究中的大部分患者均為 HER2-陰性。表 24 顯示了淋巴結-陰性和淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 女性的 HER2-狀態的分佈在這兩個分組中，研究中 90%以上的女性為 HER2-陰性。

表 24：按陽性淋巴結數量區分的 HER2-狀態的分佈

患者子集	HER2-狀態		總計
	陰性	陽性	
淋巴結-陰性患者	1,478 (92.1%)	127 (7.9%)	1,605
有1- 3個陽性淋巴結的淋巴結-陽性患者	457 (93.6%)	31 (6.4%)	488

表 25 顯示了指定淋巴結分組中所有患者的多變量模式，與各分組中所有 HER2-陰性患者的模式的對比。不存在統計學上顯著性差異。

表 25：10 點 ROR 分數變化的多變量風險比：分組中的所有患者與分組中的 HER2-陰性患者

陽性淋巴結數量	所有患者 [95% CI]	HER2-陰性患者 [95% CI]
淋巴結-陰性患者	1.29 [1.15-1.46]	1.35 [1.19-1.54]
有1- 3個陽性淋巴結的淋巴結-陽性患者	1.34 [1.16-1.53]	1.29 [1.11-1.50]

圖 20 和圖 21 中，進一步探討了各風險組的差異，分別顯示了按淋巴結-陰性和淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 的風險組區分的早期和晚期遠端復發的發生率曲線。發生率曲線涵蓋早期復發期 (前 5 年) 和晚期復發期 (診斷後 5 和 10 年)。每張圖中緊接在 X 軸下方呈現出有風險的女性數量和累積發病率。接續每張圖的是其總結表，顯示的數據為完成 5 年治療後無遠端復發的女性在 5 年或 10 年的累積遠端復發率(DR)的信賴區間。對於圖 21 呈現的淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者，因低風險組中患者人數甚少，因此將其與中風險組合併。

根據各風險組的累積發生率曲線和相關風險比，5 年的內分泌治療後，低風險患者群在 5 至 10 年間復發率可能性較低。相比之下，5 年的內分泌治療後，中和高風險患者群仍持續出現晚期遠端復發率風險。中高風險淋巴結-陰性組別的差異在於前 5 年的結果 (高風險組的 DR 率為 13.2% [9.6% - 16.7%]；中風險組的 DR 率為 4.7% [2.9% - 6.4%])，且一直持續至 10 年；但是，在 5 年的內分泌治療後，中高風險組的復發率非常相似。

圖 20A：按 0-5 年風險組區分的遠端復發發生率曲線：淋巴結-陰性患者

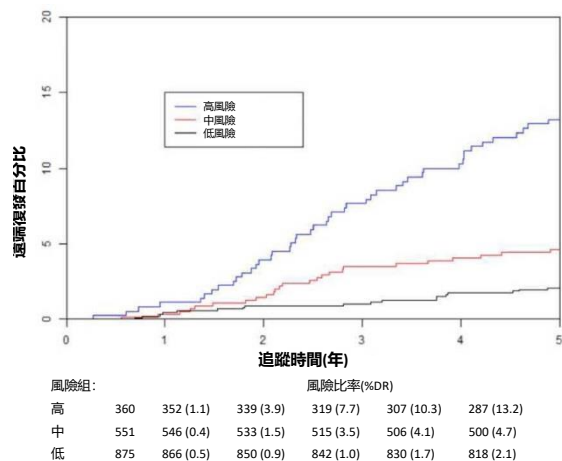


圖 20A 的資料總結：按 0-5 年風險組區分的遠端復發發生率曲線：淋巴結-陰性患者

按完成治療前五年間的風險組區分的DR率 [95%信賴區間]		
高	中	低
13.2% [9.6% - 16.7%]	4.7% [2.9% - 6.4%]	2.1% [1.1% - 3.1%]

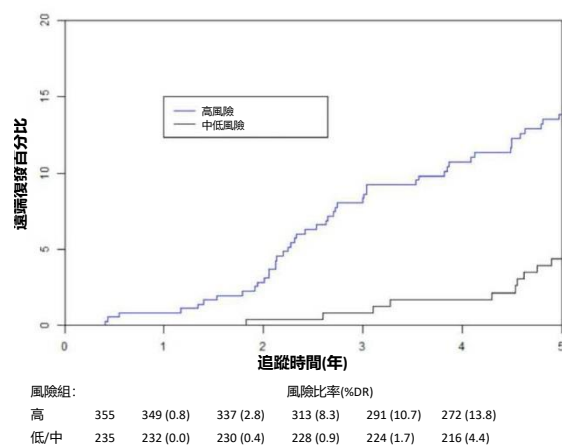


圖 21A 的資料總結：按 0-5 年風險組區分的遠端復發發生率曲線：淋巴結-陽性(1-3 個淋巴結)患者

按完成治療前五年間的風險組區分的DR率 [95%信賴區間]	
高	低/中
13.8% [10.1% - 17.4%]	4.4% [1.7% - 7.0%]

圖 21B：按 5-10 年風險組區分的遠端復發發生率曲線：淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者

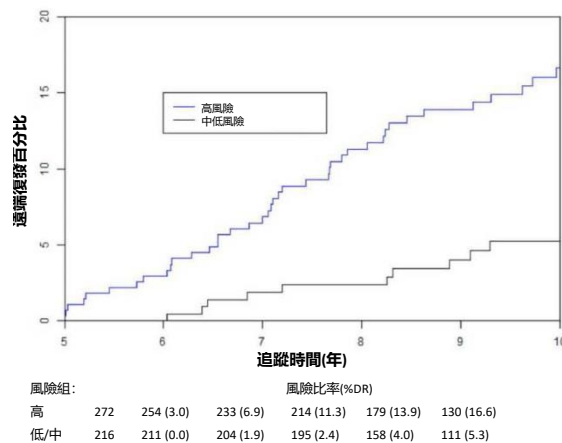


圖 21B 資料總結：按 5-10 年風險組區分的遠端復發發生率曲線：淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者

按完成治療且無遠端復發後五年的風險組區分的DR率 [95%賴區間]	
高	低/中
16.6% [11.7% - 21.3%]	5.3% [2.0% - 8.4%]

綜合分析結論

ROR 分數顯示可提供診斷後 5 年至 10 年間晚期復發，及綜合研究中五年間無遠端復發的患者其超出標準臨床變量的重要預後信息。利用各特定淋巴結數量族群在基準時定義的風險組別，可將所有患者分類至具顯著性差異的晚期復發風險組中。連續結果和以 ROR 分數為主的風險組分析結果顯示，不同子分組的預後信息相似。與所有患者相比，HER2-陰性患者的結果無明顯差異。

在各自的 TransATAC 和 ABCSG-8 研究中，當納為連續測量或採用已定義的風險組別納入時，ROR 分數已被證實，可在標準臨床和治療變量之外添加重要預後信息。兩項研究有不同風險狀

圖 20B：按 5-10 年風險組區分的遠端復發發生率曲線：淋巴結-陰性患者

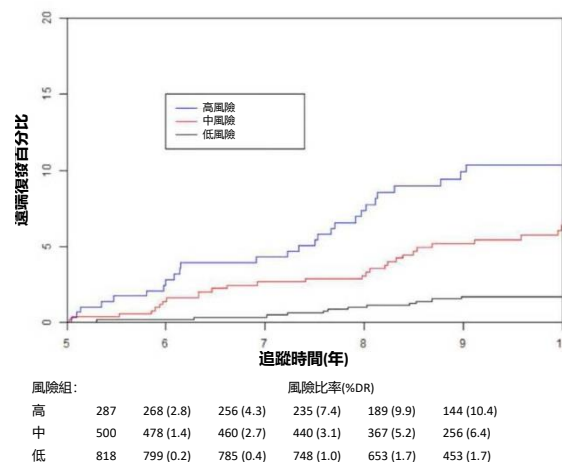


圖 20B 的資料總結：按 5-10 年風險組區分的遠端復發發生率曲線：淋巴結-陰性患者

按完成治療且無遠端復發後五年的風險組區分的DR率 [95%賴區間]		
高	中	低
10.4% [6.6% - 14%]	6.4% [4.1% - 8.7%]	1.7% [0.8% - 2.6%]

圖 21A：按 0-5 年風險組區分的遠端復發發生率曲線：淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者

況 意義上來說 TransATAC 研究中的事件發生率高於 ABCSG-8 研究中的事件發生率 比對文獻中 ATAC (90.8%) 與 ABCSG8 (92.5%) 各自對照組中的 DRFS (%) 後可明確^{9,10}。本分析以同等權重結合兩項研究的資料，預期產生相較於單獨研究更能通用其他患者群的風險狀況。

研究 1：淋巴結-陰性或淋巴結-陽性、激素受體陽性的停經後女性，以安美達錠 (Arimidex) 或諾瓦得士錠 (Tamoxifen) 進行早期乳癌治療的遠端復發風險預估：TransATAC 研究

研究設計

臨床驗證研究旨在驗證，採用所有可用患者樣本時，復發風險分數 (ROR) 可提供超出標準臨床變量的無遠端復發存活率 (DRFS) 等額外預後信息。本研究採用了自參與 ATAC 試驗的患者子集中 FFPE 乳腺癌組織所分離的 RNA¹¹。ATAC 試驗共計有 9,366 例患者，分為三個分組 (1:1:1)，隨機分配患者接受 5 年的 1 mg 安美達錠 (Anastrozole) (即 Arimidex) 內分泌治療 + 諾瓦得士錠 (Tamoxifen) 安慰劑、或接受 20 mg 諾瓦得士錠 (Tamoxifen) + 安美達錠 (Anastrozole) 安慰劑，或諾瓦得士錠 (Tamoxifen)/安美達錠 (Arimidex) 的組合治療。在初始分析後即終止組合治療的組別，因為初始分析顯示，與僅採用諾瓦得士錠 (Tamoxifen) 治療相比，組合治療並沒有療效或耐受性優勢。一份 ATAC 單一治療的 10 年中位追蹤報告，最近顯示符合美國 FDA 要求更新的安全性和有效性資訊⁹。對於激素受體陽性的患者，研究中，與接受諾瓦得士錠 (Tamoxifen) 治療的組別相比，接受安美達錠 (Anastrozole) 治療的組別在無疾病存活率 (Disease-Free Survival, DFS) (HR = 0.86)、無復發存活率 (Recurrence-Free Survival, RFS) (HR = 0.79)、及遠端無復發存活率 (Distant Recurrence-Free Survival, DRFS) (HR = 0.85) 均有顯著性改善。隨著時間發展，安美達錠 (Anastrozole) 與諾瓦得士錠 (Tamoxifen) 之間的無遠端復發存活率的絕對差值逐漸增加，從五年時為 2.7% 到 10 年時為 4.3%。TransATAC 研究是在 2002 年啟動，以 TA/01 試驗方案，回溯性地從 ATAC 患者所保存的組織病理學 FFPE 腫塊建立組織庫¹¹。

從隨機分配接受 ATAC 試驗單一治療組的激素受體陽性乳癌的 4,160 例女性中，共計獲得 2,006 個腫塊。在所得 FFPE 腫塊中，在英國患者中收集到了 1,372 個腫塊，腫塊中含有足夠可通過使用 Genomic Health Oncotype Dx 測試進行分析的侵襲性腫瘤¹²。根據 FFPE 腫塊可確定 Oncotype Dx 復發指數 (Recurrence Score, RS)，且研究結果驗證了臨床上用於預估接受安美達錠 (Anastrozole) 或諾瓦得士錠 (Tamoxifen) 治療的 HR+ 停經後乳癌患者的無遠端復發存活的 RS 指數。Oncotype Dx 研究所剩餘 RNA 運至倫敦的皇家馬斯登醫院 (Royal Marsden Hospital)，在該醫院中，剩餘 RNA 會保存在 -70°C 溫度條件下。Oncotype Dx 研究總計 1,017 例患者的剩餘 RNA 含量 > 500 ng，後續供原廠進行測試，作為原廠臨床驗證研究的一部分。

本研究使用試驗成生的內在亞型，且以預定義逐次方法評估兩種版本的 ROR 分數。兩種不同 ROR 分數，各自範圍在 0-100 間，使用已發佈 50 基因分類演算法²或 46 基因子集進行計算取得。在每一案例中，採用 Cox 模型計算，其中 Cox 模型分析 50 項基因或 46 項基因與各內在亞型的皮氏相關係數、細胞增殖分數和腫瘤大小等。所有分析結果皆以 10 年追蹤資料進行測定。

主要指標是遠端無復發存活 (Distant Recurrence-Free Survival, DRFS)。此定義為從診斷到因乳癌導致遠端復發或死亡的區間。次要指標是無復發存活 (Recurrence-Free Survival, RFS)。即，從診斷到因乳癌導致第一次復發 (局部 區域或遠端) 或死亡的區間。

使用所有可用患者樣本，以多變量 Cox 比例風險 (Proportional Hazards, PH) 模式，評估依 50 項和 46 項基因計算的 ROR 逐次試驗中的主要指標。該模式包括標準臨床共變量 (年齡、腫瘤等級、腫瘤尺寸、淋巴結狀態、輔助治療)。後續以 Cox 模式計算，並使用概似比測試，確認 ROR 是否添加了超出臨床治療指數 (Clinical Treatment Score, CTS) 之外統計性顯著 ($\alpha = 0.05$) 的額外預後信息。CTS 是由臨床研究者開發作為標準病理學量表的臨床病理因素最佳組合¹²。在不同患者亞集 (全部、淋巴結-陰性、淋巴結-陽性、或僅 HER2-陰性) 和評估指標 (DRFS 或 RFS) 間重複進行主要指標分析。

對於各個淋巴結-陰性和淋巴結-陽性患者，以 Cox 模式 (不包括 CTS) 預估 10 年 DR 風險，作為 ROR 分數。根據這些預估模式，三個風險組被定義為：

低風險:	10 年 DR 機率 <10%
中風險:	10 年 DR 機率 10-20%
高風險:	10 年 DR 機率 >20%

分析

每個風險組將個別生成 Kaplan-Meier 圖。對於 Genomic Health's Oncotype Dx 測試 (RS, Recurrence Score) 和主要研究人員的免疫組織化學測試 (IHC4)，根據主要指標分析所述，實施概似比測試 (用於對比兩者統計模式)。將這些結果與為 ROR 取得的結果相比較，確定各個統計系統可提供超出 CTS 的額外預後信息的程度。IHC4 的結果將不進一步討論，因為 IHC4 測試採用 TransATAC 研究資料進行整理，所以無法將其與其他測定進行對比。

表 26: 人口統計學和臨床特徵摘要

特徵	當前研究 (n=1,007)		獲得RNA的 初始研究 (n=1,231)	未包含ATAC的 單一藥劑組 (n=2,929)
	#患者人數	%患者比率		
淋巴結狀態				
陰性	701	70%	71%	68%
陽性	268	27%	25%	25%
未知	38	4%	4%	7%
腫瘤尺寸				
≤1 cm	138	14%	67%	70%
1-2 cm	523	52%		
2-3 cm	253	25%	33%	30%
>3 cm	93	9%		
腫瘤等級				
良好	213	21%	27%	25%
中等	601	60%	57%	59%
較差	193	19%	16%	17%
年齡				
平均值	64.4歲		64.3	66.1

表 27: 其他臨床特徵

特徵	患者人數	患者百分比
亞型		
類基底型	9	1%
HER2擴增型	41	4%
管狀A型	692	69%
管狀B型	265	26%
治療		
安美達錠 (Anastrozole)	513	51%
諾瓦得士錠 (Tamoxifen)	494	49%
復發		
任何	210	21%
遠端	160	16%
HER2狀態		
陰性	888	88%
陽性	119	12%

結果

主要分析測試表明，ROR 分數能提供超出標準臨床變量 (CTS) 的無遠端復發存活等額外預後信息。以下顯示的所有 ROR 資料，均以 46 項基因為主，因為這也是 Prosigna 測定 ROR 的基準。

表 28: ROR 的主要分析測試

虛無模型	對立模型	$\Delta LR\chi^2$	χ^2 p值
CTS	CTS + ROR	34.21	P < 0.0001

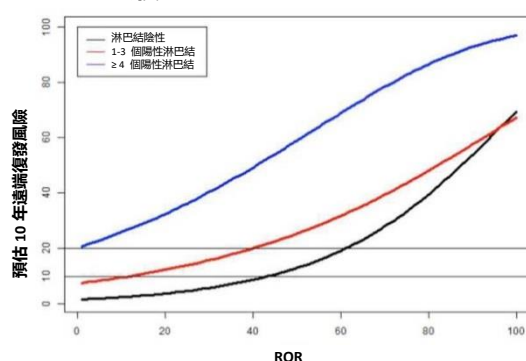
次要分析顯示，在多項臨床相關亞集中，ROR 與無遠端復發存活有顯著性相關，且可添加超出 CTS 的預後資訊。

表 29: 預定義子組主要分析測試的重複性

受試者分組	終點	患者 人數	事件數	CTS+ROR vs. CTS	
				$\Delta LR\chi^2$	χ^2 p數值
全部	DRFS	1007	160	34.2	< 0.0001
	RFS	1007	210	31.2	< 0.0001
HER2-陰性	DRFS	888	131	28.9	< 0.0001
	RFS	888	179	26.9	< 0.0001
淋巴結-陰性	DRFS	739	79	25.0	< 0.0001
	RFS	739	117	21.5	< 0.0001
淋巴結-陽性	DRFS	268	81	9.3	0.0023
	RFS	268	93	10.6	0.0011
HER2-陰性 淋巴結-陰性	DRFS	649	62	24.6	< 0.0001
	RFS	649	98	20.8	< 0.0001

主要和次要分析結果顯示，在所有患者和所有分組，ROR 與 DRFS 連續相關。

圖 22: 通過對淋巴結狀態分組中的 ROR 分數進行分析，預估 10 年預測遠端復發風險



次要分析顯示，在通過淋巴結狀態定義的患者亞集中，管狀 A 型和管狀 B 型的結果有統計上顯著性差異。

圖 23: 通過內在亞型區分，用於淋巴結-陰性患者的 DRFS 的 Kaplan-Meier 曲線

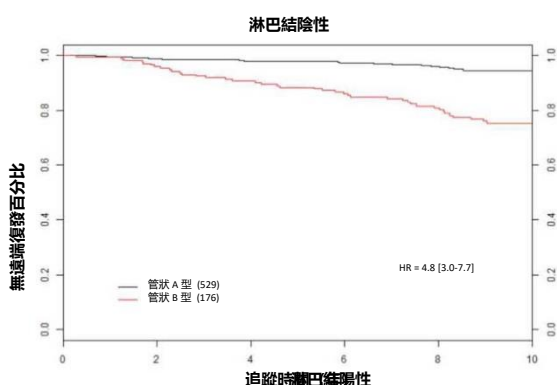


圖 24: 通過內在亞型區分, 用於淋巴結-陽性患者的 DRFS 的 Kaplan-Meier 曲線

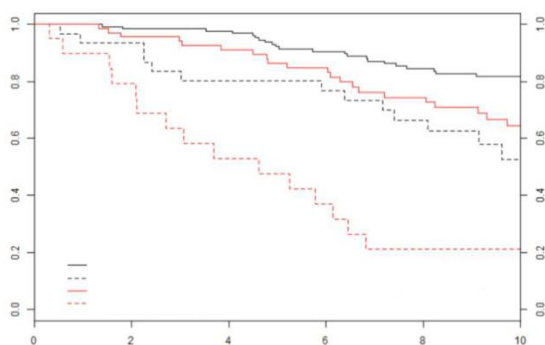


圖 25 和 26 顯示, 在每個淋巴結類別中, 預測為低風險患者的絕對臨床風險, 與預測為高風險患者的絕對臨床風險明顯不同: 預測為低風險患者所觀察到的 10 年 DR 比率低於 10%, 而預測為高風險患者所觀察到的 10 年 DR 比率大於 30%。

圖 25: 按無 CTS, 淋巴結-陰性患者風險組區分的 DRFS

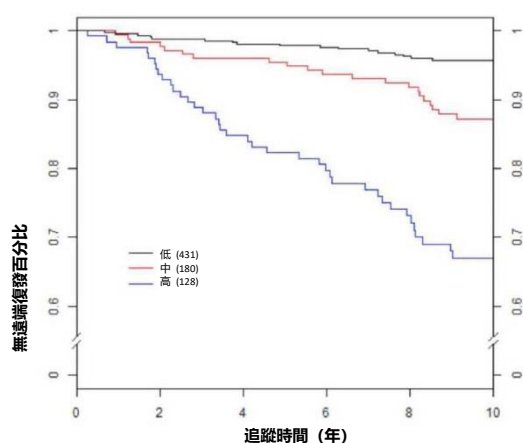


圖 25 資料總結: 按無 CTS, 淋巴結-陰性患者風險組區分的 DRFS

風險組	患者人數 (%)	事件數量	預估10年無遠端復發的百分比 [95% CI]
低	431(58%)	17	96% [94% - 98%]
中	180 (24%)	22	86% [81% - 92%]
高	128 (17%)	38	67% [59% - 76%]
總計	739 (100%)	77	

圖 26: 按無 CTS, 有 1-3 個陽性淋巴結的患者風險組區分的 DRFS

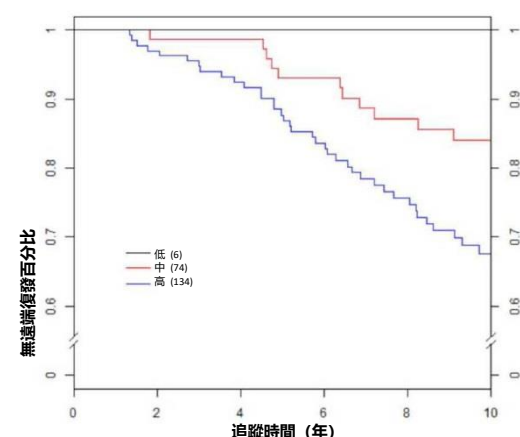


圖 26 資料總結: 按無 CTS, 有 1-3 個陽性淋巴結的患者風險組

區分的 DRFS

風險組	患者人數 (%)	事件數量	預估10年無遠端復發的百分比 [95% CI]
低	6 (3%)	0	100% [N/A]
中	74 (35%)	11	84% [76% - 93%]
高	134 (63%)	38	68% [59% - 77%]
總計	214 (100%)	49	

ROR 與 RS 的對比

在 1,007 個有 ROR 分數的樣本中, 所有 1,007 個樣本都有 Oncotype Dx 測試結果, 但是僅 940 個樣本有 IHC 結果。為了同時比對三項測試結果, 此部分的結果以含有三種測試結果的 940 個樣本為主 (但本文中未顯示 IHC4 結果)。概似比測試用於單一變量的增加, 因為使附加信息達到統計性意義 ($\alpha = 0.05$), 1 個自由度 χ^2 統計量的變化量必須大於 3.84。下圖顯示了在將預後測試結果附加到逐次試驗的另一個預後測試結果加上 CTS 資訊。每次添加時, 均應通過 χ^2 變化測量添加的資訊。

除了 CTS 外, ROR 附加入 RS: 預後資訊

圖 27: 所有患者超出 CTS 的 DRFS 預後資訊 (n = 940)

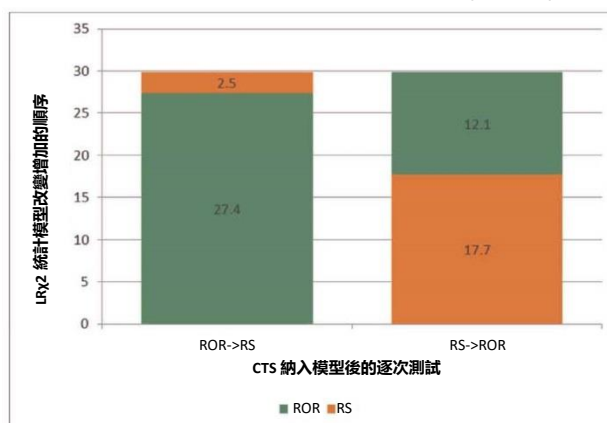


圖 28: 淋巴結-陰性患者超出 CTS 的 DRFS 預後資訊 (n = 683)

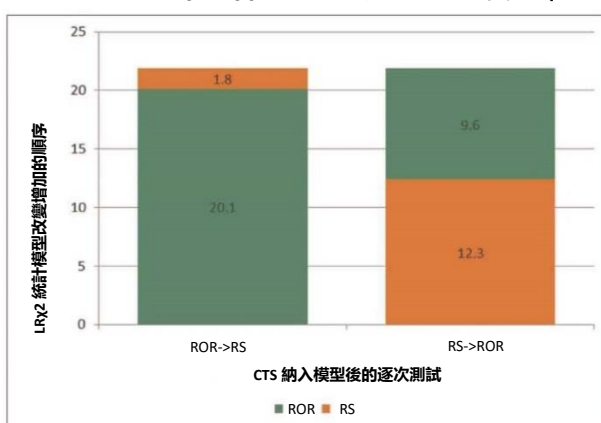


圖 29: 淋巴結-陽性患者超出 CTS 的 DRFS 預後資訊 (n = 257)

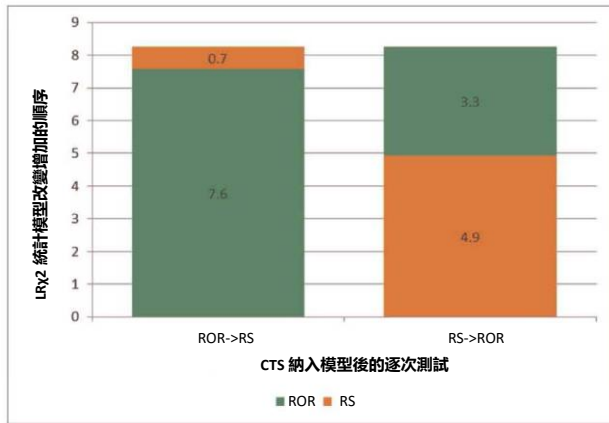


圖 30: 淋巴結-陰性, HER2-陰性患者超出 CTS 的 DRFS 預後資訊 (n = 649)

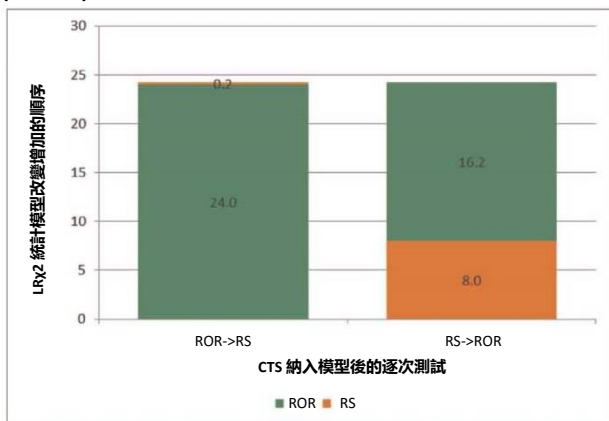


圖 27 至圖 30 顯示了兩項預後測試逐次添加時，超出 CTS 的資訊。每次添加時，應採用 χ^2 統計變化量測添加的資訊。例如，當在包含 CTS (所有患者資料) 後，首先添加的是 ROR 時， χ^2 統計變化量是 27.4。當模式中有 CTS 和 ROR 時，添加 RS 導致 χ^2 統計變化量為 2.5，此變化量沒有明顯意義 (1 個自由度的 χ^2 測試臨界值為 3.84)；即，一旦模式中同時有 CTS 和 ROR，RS 不會增加重要的資訊。但是，如首先添加的是 RS 時，ROR 中仍有未能顯示在 CTS 和 RS 中的資訊。在淋巴結-陽性患者中，兩項測試附加到 CTS 都有顯著性預後意義，但可能因樣本數較小，添加第二項測試時都未顯示差異性。對於淋巴結-陰性, HER2-陰性患者子集而言，RS 不會在 CTS + ROR 中添加顯著性預後資訊。另一方面，ROR 會在 CTS + RS 中添加顯著性預後資訊。

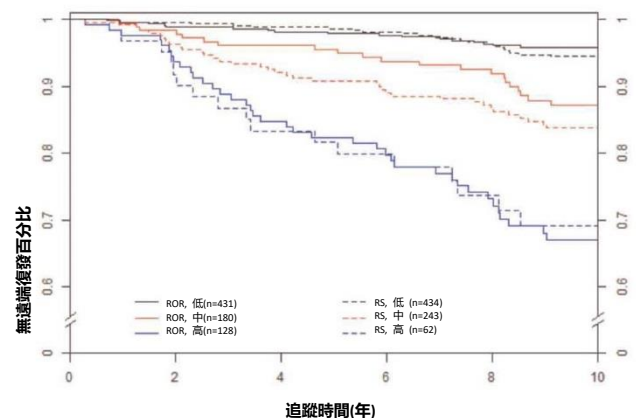
ROR vs. RS: 風險組結果

為了對比兩項測試如何依據風險鑑別患者組別，風險組別主要根據 TransATAC 患者群中各測試預估的 10 年遠端復發風險。為使風險組別中患者都為相同風險，根據 TransATAC 研究結果中定義的風險組別，選用相同風險情況定義風險分數閾值。為達成可對比的風險組，用於 Oncotype DX 的臨界點與 Genomic Health 使用的臨界點不同。對於各項測試，從前瞻性角度將低風險組定義為患者的預估復發風險比率低於 10%。對於各項測試，從前瞻性角度將中等風險組定義為患者的預估復發風險比率在 10%至 20%間。對於各項測試，從前瞻性角度將高風險組定義為患者的預估復發風險比率大於 20%。下圖顯示了各項測試定義的風險組大小和結果。

圖 31 描述 Prosigna 將分配到中等風險組中的患者數比 Oncotype DX 少 26% (180 例患者 vs. 243 例患者)。此外，Prosigna 比 OncoType Dx 分配更多患者到高風險組，但是，重疊 Kaplan-Meier 曲線可發現，各項測試低風險和高風險組別都有相似的結果。

這一觀察結果引導 TransATAC 研究得出如下結論：Prosigna 分配到中等風險組的患者數比 Oncotype DX 少，而對於低風險及高風險組有同等或更高的區別。

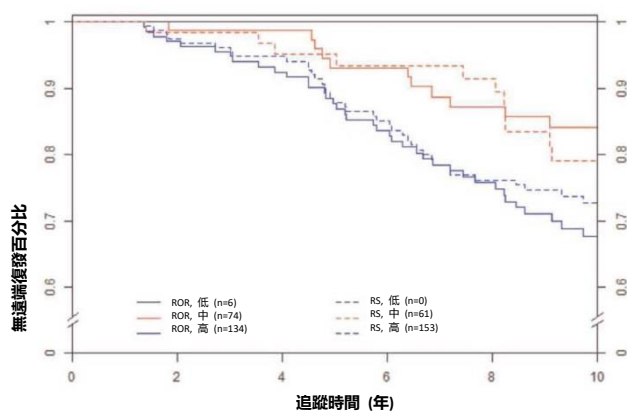
圖 31: 對淋巴結-陰性患者而言，Prosigna 的 ROR 分數比 Oncotype DX 的 RS 分數明顯辨別出更多的高風險患者，而中等風險患者較少。



在有 1-3 個陽性淋巴結的淋巴結-陽性患者中，僅使用 ROR 時，有 6 例患者被預估其遠端復發風險機率 < 10%。在研究過程中，這些患者都未發生任何事件。其中一例患者持續追蹤 7.9 年，

其他患者追蹤至少 9.9 年都沒有 DR，這表示預估為低風險的淋巴結-陽性患者，實際情況下其風險確實較低。未採用對數級測試進行對比，因為 RS 沒有低風險組。

圖 32：不使用 CTS，比對 10 年 DRFS 風險組分類—淋巴結-陽性患者 (1-3 個淋巴結) (ROR vs. RS)



臨床研究 1 結論

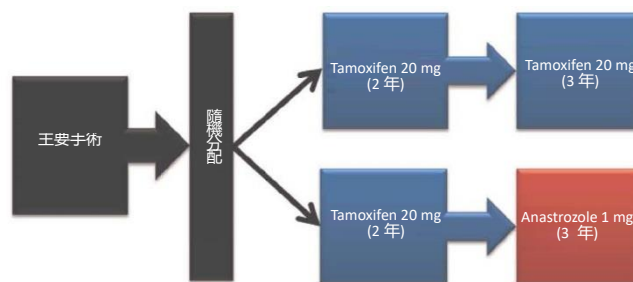
主要分析表明，在所有患者和預定義臨床相關子集中，標準臨床共變量 (CTS) 之外，ROR 可提供額外有意義預後資訊。ROR 將患者細分為 3 個風險組別，其中在淋巴結-陰性患者的結果具有統計學顯著性差異。管狀 A 型和管狀 B 型內在亞型顯示具有明顯不同的 DRFS 和 RFS，與淋巴結狀態無關。與預後指標 RS (Oncotype Dx 的 21 項-基因復發分數) 相比，在所有患者和預定義臨床相關子集中，ROR 提供 RS 以外的預後資訊。此外，在淋巴結-陰性分組中，ROR 將分配至高風險組的患者人數翻倍，大大減少了分配至中等風險組的患者人數，但與 RS 相比，沒有縮小高低風險組之間的差異。

研究 2：使用 NanoString Prosigna 測定，針對僅接受輔助系統內分泌治療的激素受體-陽性、停經後乳癌患者的預後：ABCSG-8 研究

研究設計

研究對象包括 1996 年至 2004 年間的 ABCSG-8 試驗中招募受試者的 ABCSG 腫瘤庫中取得，回顧性採集的 FFPE 乳腺腫瘤組織樣本¹³。在治療前，共計 3,901 例 HR+ 的早期乳癌停經後女性被隨機分配到至兩年的輔助性諾瓦得士錠 (Tamoxifen) 治療並接續三年的安美達錠 (Arimidex (Anastrozole)) 治療或五年的輔助性諾瓦得士錠 (Tamoxifen) 治療。試驗的治療示意圖如圖 33 所示。

圖 33：ABCSG-8 試驗研究設計示意圖



驗證對象代表達到如下可評估 ABCSG-8 條件：可從追溯性保存的 ABCSG 腫瘤庫中收集組織樣本，且已取得知情同意書，或患者已死亡。若原試驗受試者的組織無法用於 NanoString 測定或者無法獲得患者重新同意時，才會排除本試驗外。所有具腫瘤快的樣本且取得患者同意書的被作為本試驗測試的一部份。

本研究採用測定生成的內在亞型，採用預定義分析方法評估 ROR 分數。ROR 分數範圍為 0-100，使用已發佈 50 項基因中的 46 項基因子集計算取得²。ROR 係數採用 Cox 模型計算，其中 Cox 模型分析 46 項基因與各內在亞型的皮氏相關係數、細胞增殖分數、和整體腫瘤大小等。所有分析結果均以最大可追蹤資料進行測定。

主要指標是無遠端復發存活 (DRFS)。即從診斷到因乳癌導致遠端復發或死亡的區間。次要指標是無復發存活 (RFS)。即從診斷到因乳癌導致首次復發 (局部、區域或遠端) 或死亡的區間。

使用所有可用患者樣本，以多變量 Cox 比例風險 (Proportional Hazards, PH) 模式，評估 ROR 逐次試驗中的主要指標。該模式包括標準臨床共變量 (年齡、腫瘤等級、整體腫瘤尺寸、淋巴結狀態、輔助性治療)。後續以 Cox 模式計算，並使用概似比測試，確認 ROR 是否添加了超出臨床治療指數 (Clinical Treatment Score, CTS) 之外統計性顯著 ($\alpha = 0.05$) 的額外預後信息。CTS 是由臨床研究者開發作為標準病理學量表的臨床病理因素最佳組合。在不同患者亞集 (全部、淋巴結-陰性、淋巴結-陽性、或僅 HER2-陰性) 和評估指標 (DRFS 或 RFS) 間重複進行主要指標分析。

分析

採用逐次試驗方法，本研究的主要科學性指標是證明 ROR 添加了超出標準臨床變量的顯著性預後資訊。主要指標證明分成三種組別的風險等級 (低/中/高) 的附加條件，可提供標準臨床變量以外的顯著性預後信息。為了達到此條件，下列兩者均需被證明：

- 顯示連續 ROR 分數添加超出標準臨床變量的預後數值
- 如無預後資訊的虛無假設被拒絕，顯示基於 ROR 的風險類別添加超出標準臨床變量的預後數值

使用所有可用患者樣本，以多變量 Cox 比例風險 (Proportional Hazards, PH) 模式，評估預定義風險組別的 ROR 逐次試驗的主

要指標。該模式包括如下分類標準臨床共變量 (可能數值):

- 年齡 (≥65 或<65)
- 等級 (G1 或 G2/GX)
- 整體腫瘤大小 (T1, T2/T3)
- 淋巴結狀態 (N0, N+(1-3), N+(≥4))
- 輔助性治療 (僅諾瓦得士錠 (Tamoxifen), 或 Tamoxifen→安美達錠 (Anastrozole))

其中 N0 表示淋巴結-陰性患者, N+(1-3)表示有 1-3 個陽性淋巴結的淋巴結-陽性患者, N+(≥4)表示有 4 個或以上陽性淋巴結的淋巴結-陽性患者。T1 表示橫跨 ≤2 釐米的淋巴結, T2 表示橫跨大於 2 釐米但不超過 5 釐米的淋巴結, T3 表示橫跨超過 5 釐米的淋巴結。本研究中僅涉及 14 例 T3 樣本, 故將其併入 T2 樣本組合。將高分化型 (G1) 腫瘤與中等分化 (G2) 和 GX 小葉腫瘤組合進行比較。為了便於分析, 將 GX 小葉腫瘤被視為 G2 腫瘤, 因為 G2 腫瘤是本預期使用患者群體中最常見的等級。

採用臨床治療指數 (CTS) 形式, 將共變量輸入模式中。為取得 CTS, 運用下列方程式:

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

其中 z 代表上述臨床和治療變量, 採用上述所得 γ 預估值定義 CTS; 即: $CTS = \sum_j z_j \gamma_j$ 。此比例風險假設以 Schoenfeld 殘差檢定

驗證研究中的患者, 其特徵與原 ACBSG-8 研究中的患者特徵相似。

表 30: 臨床特徵總結

特徵	數值	包含 (n =1,478)		未包含 (n = 2,236)		總計 (n =3,714)	
		#	%	#	%	#	%
治療	僅諾瓦得士錠 (Tamoxifen)	741	50.1%	1108	49.3%	1,849	49.8%
	諾瓦得士錠 (Tamoxifen)→ 安美達錠 (Anastrozole)	737	49.9%	1128	50.2%	1,865	50.2%
ER 狀態	陰性	14	0.9%	32	1.4%	46	1.2%
	陽性	1,464	99.1%	2,199	98.3%	3,663	98.6%
	未知	0	0.0%	5	0.2%	5	0.1%
等級	G1	271	18.3%	468	20.8%	739	19.9%
	G2	1,152	77.9%	1659	73.9%	2,811	75.7%
	GX	55	3.7%	109	4.9%	164	4.4%
淋巴結狀 態	N0	1047	70.8%	1723	76.7%	2,770	74.6%
	N+(1-3)	382	25.8%	449	20.0%	831	22.4%
	N+(≥4)*	49	3.3%	64	2.8%	113	3.0%
PgR 狀態	陰性	260	17.6%	424	18.9%	684	18.4%
	陽性	1,218	82.4%	1,805	80.4%	3,023	81.4%
	未知	0	0.0%	7	0.3%	7	0.2%
腫瘤階段	T1	1,037	70.2%	1745	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%
年齡	平均	63		NA	64		
	範圍	41-79			41- 80		

*包括一例有>9 個陽性淋巴結的患者

表 31: 其他臨床特徵

特徵	數值	患者人數	患者百分比
NanoString 內在亞型	管狀A型	1,004	67.9%
	管狀B型	418	28.3%
	HER2擴增型	48	3.2%
	類基底型	8	0.5%
復發	遠端	155	10.5%
	任何	194	13.1%
HER2狀態	陰性	1,397	94.5%
	陽性	77	5.2%
	未知	4	0.3%

結果

在 1,620 例測試用組織中, 25 個 (1.5%) 沒有通過預定義符合腫瘤特徵的病理學審核, 在 1,595 個存在侵襲性組織的組織樣本中, 有 73 個 (4.6%) 組織樣本沒有通過預定義的萃取 RNA QC 規格, 在 1,522 例 RNA 樣本中, 有 44 個 (2.9%) 樣本未能達到 Prosigna 測定所需的 QC 規格, 使得最後僅 1,478 例 (91.2%) 可用於分析。

在 1,478 例可供分析的患者中, 155 例患者出現了遠端復發, 194 例患者出現了因乳癌導致的局部或遠端復發或死亡。試驗的追蹤時間中位數為 10 年。

主要分析測試表明, ROR 分數可提供超出標準臨床變量 (CTS) 的無遠端復發存活等額外預後資訊。

表 32: 主要分析測試總結

虛無模型	對立模型	$\Delta LR \chi^2$	χ^2 臨界數值 (自由度)	χ^2 p-值
CTS	CTS + ROR	53.49	3.84 (df = 1)	p < 0.0001
CTS	CTS + 風險組	34.12	5.99 (df = 2)	p < 0.0001

次要分析表明, ROR 與無遠端復發存活顯著相關, 且在多個臨床相關亞集中添加超出 CTS 的預後資訊。

表 33: 預定義分組的主要分析測試的重複性

受試者 分組	患者 人數	事件 數	CTS + ROR vs. CTS	CTS + 風險組 vs. CTS
			$\Delta LR \chi^2$ (臨界數值= 3.84)	$\Delta LR \chi^2$ (臨界數值= 5.99)
全部	1,478	155	53.49	34.12
HER2-陰性	1,397	145	47.50	29.94
N0	1,047	86	25.57	23.36
N0, HER2-陰性	984	79	21.69	20.32
N+(1-3)	382	59	25.99	19.94
N+(1-3), HER2-陰性	367	56	22.75	18.75

總計	984 (100%)	69
----	------------	----

圖 36 顯示了按淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者各風險分組的 Kaplan-Meier 圖。圖 37 顯示了淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) HER2-陰性患者風險分組的 Kaplan-Meier 圖。有/無 HER2-陽性患者的結果相似。

圖 34：按淋巴結-陰性患者風險組區分的 DRFS

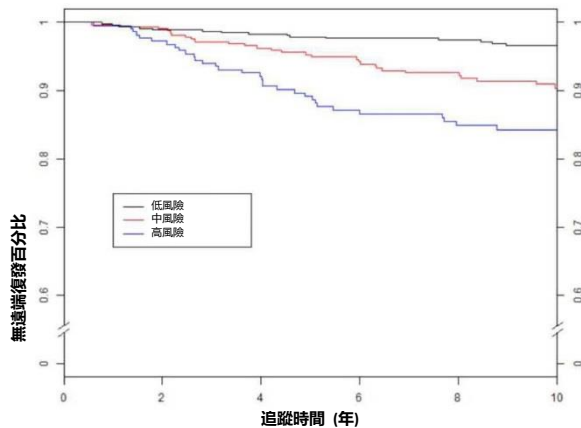


圖 34 資料總結：按淋巴結-陰性患者風險組區分的 DRFS

風險組	患者人數(%)	10年間事件數量	預估10年無遠端復發的百分比 [95% CI]
低	487 (47%)	15	96.6% [94.4% - 97.9%]
中	335 (32%)	28	90.4% [86.3% - 93.3%]
高	225 (21%)	32	84.3% [78.4% - 88.6%]
總計	1,047 (100%)	75	

圖 35：HER2-陰性、淋巴結-陰性患者風險組區分的 DRFS

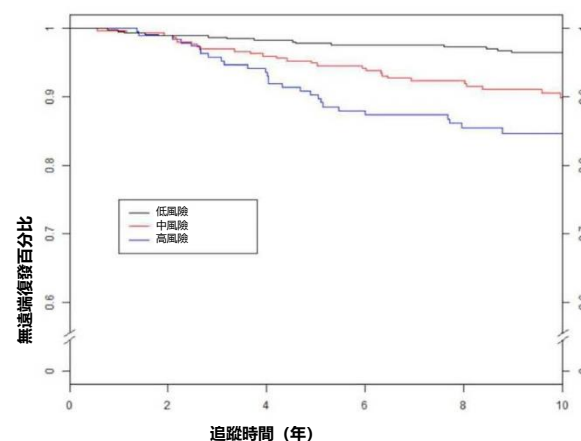


圖 35 資料總結：HER2-陰性、淋巴結-陰性患者風險組區分的 DRFS

風險組	患者人數(%)	10年間事件數量	預估10年無遠端復發的百分比 [95% CI]
低	474 (48%)	15	96.5% [94.3% - 97.9%]
中	311 (32%)	27	90% [85.6% - 93.1%]
高	199 (20%)	27	84.7% [78.4% - 89.3%]

圖 36：淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者風險組區分的 DRFS

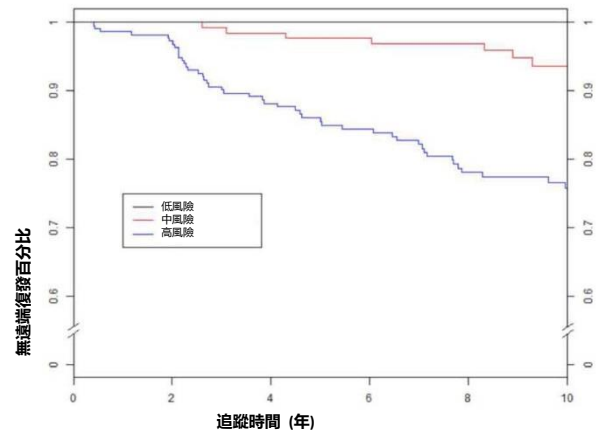


圖 36 資料總結：淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者風險組區分的 DRFS

風險組	患者人數(%)	10年間事件數量	預估10年無遠端復發的百分比 [95% CI]
低	15 (4%)	0	100% [78.2% - 100%]*
中	143 (37%)	7	93.6% [86.9% - 97%]
高	224 (59%)	46	75.8% [68.9% - 81.4%]
總計	382 (100%)	53	

*採用 Clopper-Pearson 方法預估信賴區間

圖 37：HER2-陰性、淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者風險組區分的 DRFS

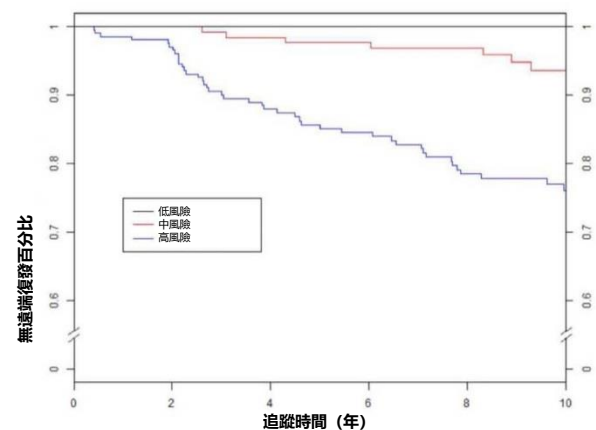


圖 37 資料總結：HER2-陰性、淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者風險組區分的 DRFS

風險組	患者人數(%)	10年間事件數量	預估10年無遠端復發
-----	---------	----------	------------

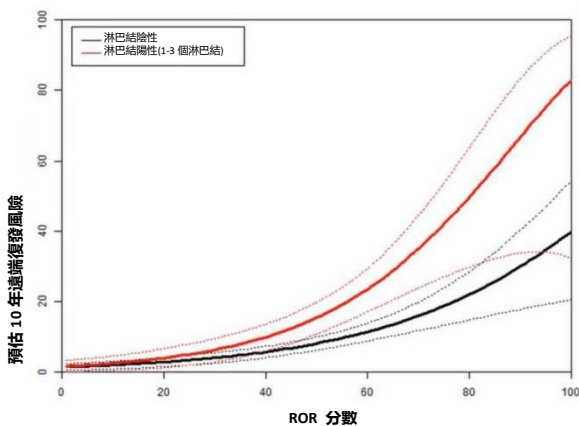
			發的百分比 [95% CI]
低	15 (4%)	0	100% [78.2% - 100%]*
中	142 (39%)	7	93.6% [86.8% - 96.9%]
高	210 (57%)	43	76.1% [69.0% - 81.8%]
總計	367 (100%)	50	

*採用 Clopper-Pearson 方法預估信賴區間

ROR 與風險預測的關係

圖 38 根據各淋巴結-陰性組和各淋巴結-陽性組的獨立 Cox 比例風險模式，顯示含 95%信賴區間的 10 年 DR 風險，作為的 ROR 分數。對於淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者，在擬合整個範圍時，比例風險假設被拒絕。此針對淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 的曲線利用 ROR 分數在 0-80 的淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者，以達到比例風險假設。

圖 38：按 95%信賴區間淋巴結類別區分的 10 年預估 DR 風險



在每個子組中，分配至低風險分類的患者絕對臨床風險，與分配至高風險分類的患者絕對臨床風險存在實質差異。

表 34 顯示以 10 為單位的 ROR 區分的淋巴結-陰性患者的分佈還顯示了 10 年 DR 風險。

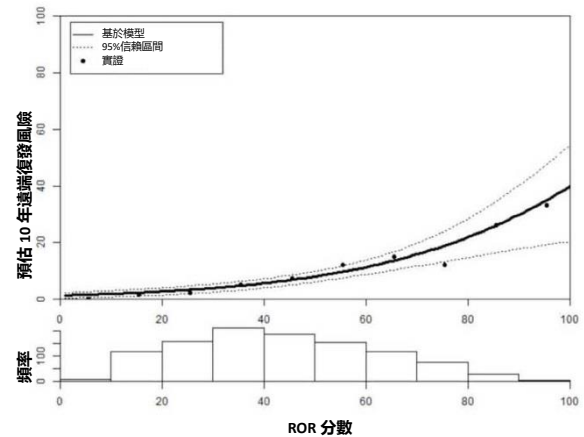
表 34：以 10 為單位的 ROR 區分的淋巴結-陰性患者的分佈

ROR範圍	患者人數	患者百分比	10年DR風險 (實證研究)
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%
總計	1,047	100%	

圖 39 顯示了淋巴結-陰性患者以模式預估的 10 年存活率曲線和以實證預估的 10 年存活率，以 10 為單位的 ROR 分數呈現，且

均包含以 10 為單位的 ROR 範圍內所有患者 (1-10, 11-20 等)。曲線下方的直方圖是按分組區分的頻率分配。

圖 39：比對淋巴結-陰性患者依模式預估和實證預估的 10 年 DR 風險，同時呈現 ROR 分數的分佈



對於淋巴結-陰性患者，整個範圍的比例風險模式預估與實證預估結果相似。表 35 顯示了以 10 為單位的 ROR 區分的淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者的分佈情況。還顯示了 10 年 DR 風險。

表 35：以 10 為單位的 ROR 範圍區分的淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者的分佈

ROR範圍	患者人數	患者百分比	10年DR風險 (實證研究)
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%
總計	382	100%	

圖 40 以淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 且 ROR 分數 ≤80 的患者，以模式預估的 10 年存活率曲線和以實證預估的 10 年存活率，以 10 為單位的 ROR 分數呈現，且均包含以 10 為單位的 ROR 範圍內所有患者 (1-10, 11-20 等)。曲線下方的直方圖是按分組區分的頻率分配。

圖 40：比對淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者依模式預估和實證預估的 10 年 DR 風險，同時呈現 ROR 分數的分佈

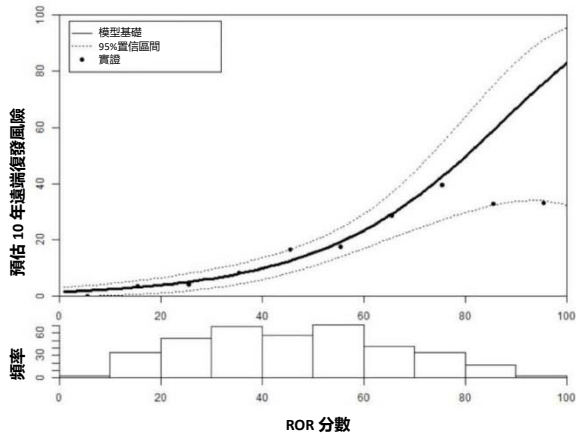


表 35 和圖 40 都顯示了導致比例風險假設失效的 ROR 範圍上限所觀察到的 10 年風險的扁平化。但應注意，對於淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者，80 以上的兩個群集樣本量均較小 (17 例患者在 81-90 之間，僅 3 例患者在 91-100 之間)。

管狀 A 型和管狀 B 型內在亞型的對比

研究中的大部分受試者 (96%) 屬管狀 A 型或管狀 B 型，這與預計情況相似，因為管狀 A 型或管狀 B 型是激素受體-陽性患者中的最常見的內在亞型¹²。

表 36 顯示了概似比測試的結果，用於顯示管狀 A 型/管狀 B 型分配提供超出 CTS 的 DRFS 等額外預後數值。該表同時比較了管狀 A 型與管狀 B 型患者的危險比。在三個測試組中，管狀 A 型患者的遠端復發風險明顯較低。

表 36：管狀亞型 DRFS 預後數值的概似率測試

子組	患者人數	事件數	$\Delta LR\chi^2$	χ^2 p-值	管狀A型：管狀B型的風險比 (95% CI)
All	1,422	135	24.42	< 0.0001	0.42 [0.30 - 0.59]
N0	1,009	74	9.68	0.0019	0.47 [0.30 - 0.75]
N+(1-3)	366	51	14.94	0.0001	0.33 [0.19 - 0.58]

圖 41 是按淋巴結-陰性患者管狀亞型區分的 DRFS 比對，圖 42 是淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者相同的比對。兩個分組中，管狀 A 型和管狀 B 型患者的 DRFS 之間存在顯著差異。

圖 41：按淋巴結-陰性患者內在亞型區分的 DRFS 的 Kaplan-Meier 曲線

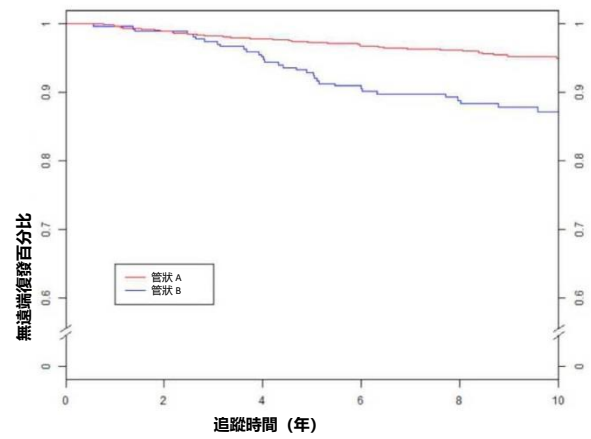


圖 41 資料總結：按淋巴結-陰性患者內在亞型區分的 DRFS 的 Kaplan-Meier 曲線

風險組	患者人數	10年間事件數量	預估10年無遠端復發的百分比 [95% CI]
管狀A型	725	32	95.1% [93.4% - 96.3%]
管狀B型	284	32	87.2% [83.2% - 90.3%]
總計	1,009	64	

圖 42：按淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者內在亞型區分的 DRFS 的 Kaplan-Meier 曲線

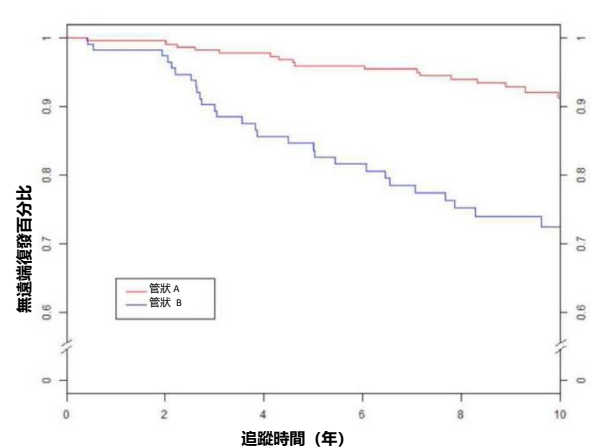


圖 42 資料總結：按淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者內在亞型區分的 DRFS 的 Kaplan-Meier 曲線

風險組	患者人數	10年間事件數量	預估10年無遠端復發的百分比 [95% CI]
管狀A型	248	17	91.3% [87.2% - 94.2%]
管狀B型	118	28	72.5% [64.2% - 79.1%]
總計	366	45	

表 37 顯示了按淋巴結-陰性和淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 分組管狀亞型區分的 10 年 RFS 率。

表 37：按淋巴結分組和管狀亞型區分的十年 RFS 率

淋巴結	管狀亞型	患者人	10年	10年無遠端復發的
-----	------	-----	-----	-----------

狀態		數(%)	事件數	預計百分比 [95% CI]
NO	管狀A型	725 (72)	44	93.0% [91.1% - 94.5%]
	管狀B型	284 (28)	44	82.2% [77.6% - 85.9%]
N+(1-3)	管狀A型	248 (68)	21	89.1% [84.7% - 92.4%]
	管狀B型	118 (32)	30	71.6% [62.2% - 77.4%]

對於各個淋巴結-陰性和淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者群，管狀 A 型和管狀 B 型患者間存在顯著差異。

臨床研究 2 結論

採用連續測量及採用預定義的三個風險分組時，ROR 證實可提供超出標準臨床和治療變量的顯著性預後資訊。如預期地，低風險組的 10 年 DRFS 遠高於 90%。高風險組的 10 年 DRFS 為 80%，比原本預期會明顯低於 80% 來得高。用於定義風險組的臨界值是以 TransATAC 測試對象為基準—其風險比當前測試的風險高，導致整體“高風險組”的風險低於預期。ROR (基於連續和風險組) 在不同子組中的顯示相似的預後資訊。在淋巴結-陰性和淋巴結-陽性 (1-3 個淋巴結) 患者群中，連續風險模式預估結果近似實證復發率。研究中大多數患者 (96%) 為兩個管狀亞型 (管狀 A 型或管狀 B 型) 之一。在所有淋巴結狀態組中，就 DRFS 而言，管狀 A 型/管狀 B 型區分附加了額外預後資訊。

綜合臨床研究概要

結果可適用兩組臨床驗證研究，歸因於樣本送至兩個臨床驗證研究中的不同實驗室，並在實驗室內進行分析。採用連續測量及採用預定義的三個風險分組時，ROR 證實可提供超出標準臨床和治療變量的顯著性預後資訊。此外，在事後分析中，ROR 添加了對所有患者在治療後五年 DRFS 的附加資訊。ROR (基於連續和風險組) 顯示，不同子組中的預後資訊相似。利用 RFS 可測定有限的分析結果。ROR 類別也可定義有不同 RFS 的三個風險組。對於此兩項研究，管狀 A 型的 DRFS 和管狀 B 型的 DRFS 之間存在顯著差異，與淋巴結狀態無關。

17 參考文獻

- 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.
- (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 符號和定義



-製造廠



-體外診斷醫療器材



-請參閱使用說明書



-批號



-序號



-足夠執行<n>次測試



-儲存溫度範圍



-儲存溫度範圍下限

	-儲存溫度範圍上限
	-保存期限
	-製造日期
Room Temp.	=室溫
HYB	=雜合

監管免責聲明

用於體外診斷用途。

©2012-2019 NanoString Technologies。版權所有。NanoString、NanoString Technologies、NanoString 的標誌、nCounter 以及 Prosigna 和 Prosigna 的標誌是 NanoString Technologies 在美國及/或其他國家的註冊商標。

19 聯繫方式

製造廠資訊

製造廠名稱：NanoString Technologies, Inc.

製造廠地址：530 Fairview Ave N, Seattle, WA, 98109 USA

製造廠電話：888-358-NANO (888-358-6266)

製造廠傳真：206-378-6288

全球聯繫方式

技術支援郵箱：dxsupport@nanosttring.com

產品資訊郵箱：info@prosigna.com

網站：www.prosigna.com

藥商資訊

藥商名稱：冷泉港生物科技股份有限公司

藥商地址：依所轄衛生局最新核定之藥商地址內容刊載