

**Bijsluiter**

**Prosigna® Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay**  
(Prosigna® -prognosestest van gensignatuur bij borstkanker)



Versie 01, gemaakt in juli 2023



1-10 tests

**Opslagcondities**

 -20 °C Opslaan bij -20 °C of lager	Prosigna-Cartridges voor prognosestest van gensignatuur bij borstkanker
 -80 °C Opslaan bij -80 °C of lager	Prosigna-CodeSet voor prognosestest van gensignatuur bij borstkanker
 +25 °C Opslaan bij kamertemperatuur	Prosigna-Prep Pack voor prognosestest van gensignatuur bij borstkanker
 +8 °C Opslaan bij +4 °C	Prosigna-Prep Plates voor prognosestest van gensignatuur bij borstkanker

**INHOUDSOPGAVE**

<b>1</b>	<b>BEOOGD GEBRUIK/DOELEINDE</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OVERZICHT VAN HET TESTSYSTEEM</b> .....	<b>1</b>
2.1	Principes van het nCounter-teststelsel.....	2
2.2	Principes van het Prosigna-algoritme voor capaciteitsberekening.....	2
<b>3</b>	<b>GELEVERDE REAGENTIA EN APPARATUUR</b> .....	<b>2</b>
3.1	Overzicht Prosigna-kit.....	2
3.2	Inhoud van Prosigna-kit voor een Prosigna-kit met 1, 2, 3, 4, of 10 testen.....	3
<b>4</b>	<b>WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMAATREGELEN</b> .....	<b>3</b>
<b>5</b>	<b>ALGEMENE OVERWEGINGEN TEST</b> .....	<b>3</b>
5.1	Weefselverwerking.....	3
5.2	De Prosigna-test uitvoeren.....	4
<b>6</b>	<b>TRAININGSINFORMATIE</b> .....	<b>4</b>
<b>7</b>	<b>AFVALVERWERKING</b> .....	<b>4</b>
<b>8</b>	<b>OPSLAG EN HANTERING (REAGENTIA)</b> .....	<b>4</b>
<b>9</b>	<b>INSTRUMENTEN VEREIST VOOR PROSIGNA</b> .....	<b>4</b>
<b>10</b>	<b>REAGENTIA EN APPARATUUR VEREIST MAAR NIET GELEVERD</b> .....	<b>4</b>
10.1	Materialen.....	4
10.2	Apparatuur.....	4
10.3	Apparatuurspecificaties.....	4
<b>11</b>	<b>MONSTERAFNAME EN -VERWERKING</b> .....	<b>5</b>
11.1	Overzicht van vereisten voor weefselmonsters en pathologie.....	5
11.2	Monsterafname en -opslag.....	5
11.3	Vorbereiding van objectglaasjes.....	5
11.4	Verwerking van objectglaasjes.....	5
11.5	Isolatie van RNA.....	6
11.6	De RNA-concentratie en -kwaliteit meten.....	6
11.7	Testprocedure.....	7
	Run afbreken.....	9
<b>12</b>	<b>PROBLEEMPLOSSEN EN TESTSTORINGEN</b> .....	<b>9</b>
<b>13</b>	<b>RESULTATEN VAN DE TEST</b> .....	<b>9</b>
13.1	Intrinsieke subtypes.....	9
13.2	ROR-score.....	10
13.3	Mogelijke terugkeer op een andere locatie binnen 10 jaar.....	10
13.4	Risicoclassificatie.....	10
13.5	Kwaliteitscontrole.....	10
<b>14</b>	<b>BEPERKINGEN VAN DE PROCEDURES</b> .....	<b>10</b>
<b>15</b>	<b>VERWACHTTE WAARDEN</b> .....	<b>11</b>
15.1	ROR-bereik volgens subtype.....	11
15.2	Frequentie van ROR-score volgens nodale status.....	11
15.3	Overleving zonder terugkeer op andere locatie per risicocategorisatie.....	11

<b>16</b>	<b>PRESTATIE-EIGENSCHAPPEN</b> .....	<b>12</b>
16.1	Analytische precisie en reproduceerbaarheid.....	12
16.2	Gevoeligheid/RNA-input.....	13
16.3	Interferentietest.....	13
16.4	Klinische prestatie.....	14
<b>17</b>	<b>BIBLIOGRAFIE</b> .....	<b>25</b>
<b>18</b>	<b>SYMBOLLEN EN DEFINITIES</b> .....	<b>26</b>
<b>19</b>	<b>CONTACTINFORMATIE</b> .....	<b>26</b>

**1 BEOOGD GEBRUIK/DOELEINDE**

De Prosigna®-prognosestest van gensignatuur bij borstkanker is een diagnostische *in vitro*-test waarbij het profiel van genexpressie van cellen wordt gebruikt die in borstkankerweefsel worden gevonden, om het risico van terugkeer op een andere locatie bij patiënten te beoordelen. Tijdens de test wordt het genexpressieprofiel gemeten met behulp van RNA dat uit met formaline gefixeerd, in paraffine ingebed (FFPE) borstkankerweefsel is gehaald. De gegevens van genexpressie worden samen met klinische variabelen afgewogen om zowel een subtype (luminaal type A, lumaal type B, HER2-verrijkt of basaalachtig), als een score te genereren die kenmerkend is voor de waarschijnlijkheid op terugkeer van de ziekte op een andere locatie. De test wordt met behulp van FFPE- borsttumoreweefsel, dat eerder als invasieve borstcarcinoom is gediagnosticeerd, op het nCounter®-teststelsel uitgevoerd.

De Prosigna-prognosestest van gensignatuur bij borstkanker wordt aangewezen bij vrouwelijke borstkankerpatiënten die of mastectomie hebben ondergaan of borstbehoudende therapie samen met locoregionale behandeling die overeenkomt met standaardzorg, als één van het volgende:

- Een prognostische indicator voor overleving, vrij van terugkeer op een andere locatie, gedurende 10 jaar bij vrouwen na de menopauze met hormoonreceptor-positieve (HR+), lymfeklier-negatieve borstkanker Fase I of II die alleen met endocriene nevenbehandeling moeten worden behandeld, wanneer samen met andere klinisch-pathologische factoren gebruikt.
- Een prognostische indicator voor overleving, vrij van terugkeer op een andere locatie, na 10 jaar bij vrouwen na de menopauze met hormoonreceptor-positieve (HR+), lymfeklier-positieve (1-3 positieve klieren of 4 of meer positieve klieren), borstkanker Fase II of IIIA die alleen met endocriene nevenbehandeling moeten worden behandeld, wanneer samen met andere klinisch-pathologische factoren gebruikt.

**2 OVERZICHT VAN HET TESTSYSTEEM**

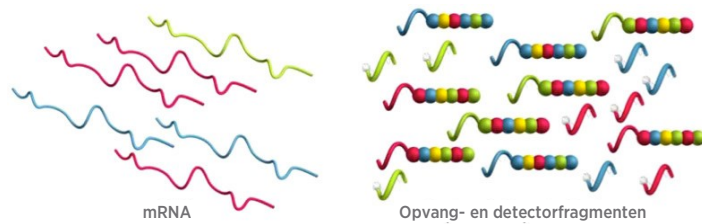
Het nCounter-teststelsel levert directe, multiplexe metingen van genexpressie via digitale uitlezingen van de relatieve abundantie van mRNA- afschriften, met behulp van de volgende stappen: 1) hybridisatie van de RNA naar fluorescente detectorfragmenten en opvangfragmenten, 2) purificatie van de doel/fragment-complexen met behulp van nCounter-voorbereidingsplaten die reagentia bevatten die nodig zijn voor verwerking na de hybridisatie en voor immobilisatie op de nCounter-patroon op het nCounter-voorbereidingsstation, en 3) test van de nCounter-patroon en de digitale nCounter-analysator om een testresultaat te leveren! Zowel de opvangfragmenten als de detectorfragmenten bevatten unieke DNA-fragmentsequenties voor hybridisatie en purificatie van het doel. De opvangfragmenten en detectorfragmenten worden met de positieve en negatieve controle-elementen gecombineerd om de CodeSet te vormen. Prosigna meet tegelijkertijd de expressieniveaus van 50 genen die worden gebruikt voor het intrinsieke subtype-classificatiealgoritme<sup>2</sup>, 8 huishoudgenen die worden gebruikt voor signaalnormalisatie, 6 positieve controle-elementen en 8 negatieve controle-elementen in een enkele hybridisatiereactie met behulp van nucleïnezuurfragmenten die specifiek voor deze genen zijn ontworpen. In de Prosigna-kit is ook een referentiemonster opgenomen, bestaande uit *in vitro* getranscribeerde RNA-doelen voor elk van 58 genen. Het referentiemonster wordt getest met elke batch van RNA-monsters van de patiënt getest om van elke gen de serie te kwalificeren en het signaal te normaliseren.

De Prosigna-test wordt op RNA uitgevoerd dat uit FFPE-borsttumoreweefsel is geïsoleerd. Een patholoog onderzoekt een met hematoxyline en eosine (H&E) gekleurd objectglaasje en identificeert (en markeert) het gebied met de invasieve borstcarcinoom dat geschikt is voor de test. De patholoog meet ook het tumoroppervlak, dat het aantal ongekleurde objectglaasjes bepaalt die voor de test nodig zijn, evenals de celdichtheid van de tumor om te verzekeren dat er voldoende tumorweefsel aanwezig is voor de test. Een getrainde technoloog voert een macrodissectie uit van het gebied op de ongekleurde objectglaasjes, dat overeenkomt met het gemarkeerde tumorgebied op het met H&E gekleurde objectglaasje en isoleert RNA uit het weefsel. Het geïsoleerde RNA wordt vervolgens op het nCounter-teststelsel getest om testresultaten te geven, inclusief het intrinsieke subtype, risico van terugkeer (ROR, Risk of Recurrence)- score en risicocategorie.

## 2.1 Principes van het nCounter-teststelsysteem

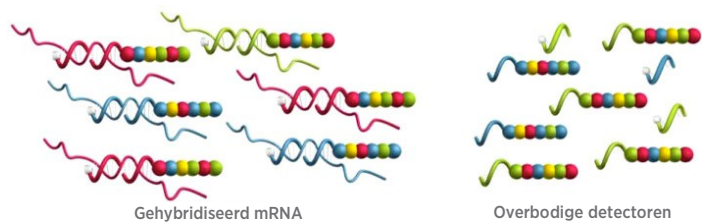
Het nCounter-teststelsysteem gebruikt genspecifieke fragmentparen (afbeelding 1) die rechtstreeks naar het mRNA-monster in de oplossing hybridiseren, waarbij enzymatische reacties geëlimineerd worden die tot afwijkingen in de resultaten zouden kunnen leiden. In de eerste stap van de test worden de DNA-fragmenten rechtstreeks naar een gebied van 70-100 basisparen van het RNA-monster in de oplossing gehybridiseerd. Het fluorescente detectorfragment bestaat uit een sequentie van 35-50 basisfragmenten die complementair is aan het mRNA-doel en een unieke DNA-ketensequentie die naar zes RNA-segmenten hybridiseert die met één van de vier fluorescente kleurstoffen zijn gelabeld; rood (R), geel (Y), blauw (B) of groen (G). De fluorescente segmenten vormen een fluorescente 'kleurcode' van zes posities/4 kleuren die voor elk doel uniek is. Een afzonderlijk opvangfragment bestaat uit een fragmentsequentie van 35-50 nucleobasen die complementair is aan het mRNA-doel en biotine, dat voor immobilisatie wordt gebruikt op een objectglaasje dat met streptavidine is gecoat.

Afbeelding 1: CodeSet hybridiseren naar mRNA



Na hybridisatie worden alle stappen voor purificatie van het monster op het nCounter-voorbereidingsstation geautomatiseerd. Eerst worden overmatige opvang- en detectorfragmenten verwijderd (afbeelding 2) met behulp van opvolgende vastleggende stappen met magnetische beads, gevolgd door het binden van de fragment/doel-complexen aan willekeurige locaties op het oppervlak van het nCounter-Patroon via een binding van streptavidine-biotine (afbeelding 3). Tenslotte worden fragment/doel-complexen uitgelijnd en in het nCounter-patroon geïmmobiliseerd (afbeelding 4).

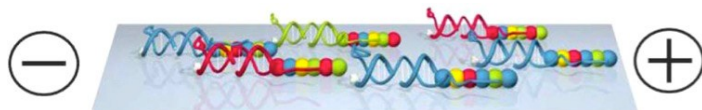
Afbeelding 2: Overmatige detectoren verwijderen



Afbeelding 3: Gehybridiseerde detectoren binden aan het oppervlak van patroon



Afbeelding 4: Gehybridiseerde detectoren uitlijnen en immobiliseren



Nadat de verwerking van het monster is voltooid, wordt het Patroon voor gegevensverzameling in de digitale nCounter-analysator geplaatst. Elk doelmolecuul van belang wordt geïdentificeerd door de "kleurcode". Deze wordt gegenereerd door zes gerangschikte fluorescente vlekken die op het bijbehorende detectorfragment aanwezig zijn. De detectorfragmenten op het oppervlak van het Patroon worden vervolgens geteld en voor elk doelmolecuul in een tabel opgenomen en met het algoritme verwerkt (afbeelding 5).

Afbeelding 5: Gegevensverzameling

Code	Gen	Telling
	x	3
	y	1
	z	2

## 2.2 Principes van het Prosigna-algoritme voor capaciteitsberekening

De test is gebaseerd op het opgegeven algoritme voor 50-genclassificatie, oorspronkelijk PAM50<sup>2</sup> genoemd en wordt op het nCounter-teststelsysteem uitgevoerd met behulp van RNA dat uit monsters is verkregen van met formaline gefixeerd, in paraffine ingebed (FFPE) borstkankerweefsel. Het algoritme gebruikt een 50-genexpressieprofiel om borstkanker toe te wijzen aan één van de vier moleculaire klassen of intrinsieke subtypen: lumaal type A, lumaal type B, HER2- verrijkt of basaalachtig<sup>2</sup>. De prototypische genexpressieprofielen (bijv. centroïde) van de vier intrinsieke subtypen werden met behulp van FFPE-borstkankermonsters van meerdere klinische locaties in Noord-Amerika verzameld en op het nCounter-teststelsysteem getraind. Na uitvoering van de test op een testmonster van een patiënt, vergelijkt een bewerkingsalgoritme op basis van een Pearson-correlatie het genormaliseerde 50-genexpressieprofiel van het testmonster van de patiënt met de prototypische expressieprofielen van de vier intrinsieke subtypen borstkanker. Het testmonster van de patiënt wordt aan het subtype met de hoogste Pearson-correlatie toegewezen.

Verder meldt het algoritme een risico van terugkeer (ROR)-score op een schaal van 0-100<sup>3</sup>, die gecorreleerd is met de mogelijkheid van terugkeer op een andere locatie gedurende 10 jaar bij vrouwen na de menopauze met hormoonreceptor-positieve borstkanker in een vroeg stadium<sup>4</sup>. Ook biedt het rapport een risicocategorie (laag, gemiddeld of hoog). De ROR-score wordt met behulp van coëfficiënten berekend van een Cox-model. Deze bevat de Pearson-correlatie van een 46-gensubset van de 50 genen ten opzichte van elk intrinsiek subtype centroïde, een proliferatiescore en algemene grootte van de tumor. De testvariabelen worden met de overeenkomende coëfficiënten van het Cox-model vermenigvuldigd om de score te genereren. Deze wordt dan op een schaal van 0-100 afgestemd die gebaseerd is op coëfficiënten die uit de trainingset van FFPE-borsttumormonsters zijn gegenereerd. Risicocategorieën worden ook gemeld op basis van cut-off-waarden voor ROR die in een klinisch validatieonderzoek zijn vastgesteld.

## 3 GELEVERDE REAGENTIA EN APPARATUUR

### 3.1 Overzicht Prosigna-kit

De Prosigna-kit bevat reagentia die voldoende zijn om, afhankelijk van het bestelde product, 1, 2, 3, 4, of 10 patiëntmonsters te verwerken. Zie hieronder voor bestelinformatie. De Prosigna-kit bevat een CodeSet, voor elke set van één tot tien tests één buis met referentiemonster en verbruikscomponenten die samen, voor de vrijgave, op prestatie zijn getest.

Catalogusnummer	Aantal tests in kit	Referentie monsterbuisjes opgenomen
PROSIGNA-001	1	2
PROSIGNA-002	2	2
PROSIGNA-003	3	2
PROSIGNA-004	4	2
PROSIGNA-010	10	2

Aanbevolen voor gebruik samen met de Roche FFPET RNA-isolatiekit (Roche-FFPET-025) of de FFPE RNA-extractiekit (550100). Beide RNA-extractiekits zijn alleen via Veracety beschikbaar.

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

Number of Tests	1	2	3	4	10
<b>Prosigna CodeSet Box</b>					
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
<b>Prosigna Prep Plate Box</b>					
Prep Plates	1	1	1	1	2
<b>Prosigna Cartridge Box</b>					
nCounter Cartridges	1	1	1	1	1
<b>Prosigna Prep Pack Box</b>					
nCounter Prep Station Tips	1	1	1	1	1
nCounter Cartridge Adhesive Cover	2	2	2	2	2
nCounter Tip Sheaths	2	2	2	2	2
nCounter Hybridization Buffer	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL	1 x 580 µL
12-Well Notched Strip Tubes	4	4	4	4	4
12-Well Notched Strip Tube Lids	4	4	4	4	4

### Contents Description

#### Prosigna CodeSet

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

#### Prosigna Prep Plates

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

#### Prosigna Cartridges

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

#### Prosigna Prep Pack

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

## 4 WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMAATREGELEN

- Voor *in vitro* diagnostisch gebruik.
- Het is de bedoeling dat deze test door operators wordt uitgevoerd die zijn getraind in zeer complexe moleculaire biogietechieken, op basis van lokale voorschriften.
- Meng geen componenten van kits binnen de Prosigna-partijen. De functionaliteit kan alleen voor Prosigna-kitpartijen worden verzekerd zoals deze worden geleverd, gezien zij op deze manier tijdens de vervaardiging zijn gekwalificeerd.
- Tijdens de Prosigna-test mogen geen restanten van reagentia opnieuw worden gebruikt.
- Reacties met gecompriëerde hybridisatietijden of temperaturen wegwerpen.
- Het is belangrijk dat de integriteit van de bewakingsketen van het monster te behouden (weefsel naar RNA en RNA naar test) om te verzekeren dat het monster-id van de patiënt overeenkomt met het juiste testresultaat.
- Nalating reagentia onder de op het label aangegeven condities op te slaan, kan een negatieve invloed hebben op de prestatie van de test.
- Draag tijdens het hanteren van reagentia en monsters altijd handschoenen.
- Voorkom RNase-besmetting, dat de kwaliteit van de resultaten negatief kan beïnvloeden.
- Alle biologische monsters en materialen moeten worden behandeld alsof er een potentieel bestaat voor het overdragen van infectiekiemen en deze moeten met de juiste voorzorgsmaatregelen worden weggevoerd, overeenkomstig de federale, nationale en lokale voorschriften.

- Alle biologische monsters en materialen moeten worden behandeld alsof er een potentieel bestaat voor het overdragen van infectiekiemen en deze moeten met de juiste voorzorgsmaatregelen worden weggevoerd, overeenkomstig de federale, nationale en lokale voorschriften.
- Pipetteer nooit via de mond.
- Voorkom dat reagentia in contact komen met ogen, huid en slijmvliezen.
- Hanteer de beste praktijken voor moleculaire laboratoria om kruisbesmetting te voorkomen tussen testmonsters, of met doelen met hoge concentratie nucleïnezuur (synthetisch of door PCR verhoogd), hetgeen de kwaliteit van de resultaten negatief kunnen beïnvloeden.
- Zeer lage niveaus van natriumazide (<0,1%) bevinden zich na de verwerking binnen de Prosigna-voorbereidingsplaten en nCounter-patronen. Daarom wordt het aangeraden om voor verwijdering kunststoffen (geen metalen) afvalbakken te gebruiken. Hoewel het uiterst onwaarschijnlijk is voor Prosigna, is het bekend dat opeenhoping van natriumazide op metaal een explosiegevaar kan vormen.
- Aanvullende instrumentenspecifieke informatie betreffende wegwerpen kan in de gebruikershandleiding en servicehandleiding van het nCounter-teststelsel worden gevonden voor het voorbereidingsstation en de digitale analyzer.
- Op [www.prosigna.com](http://www.prosigna.com) kan veiligheidsinformatie van het Material Safety Data Sheet worden gevonden voor Detector-CodeSet, opvangfragmentset, hybridisatiebuffer en voorbereidingsplaten.
- Alle gevaarlijke materialen moeten volgens de richtlijnen van uw instituut voor gevaarlijk afval worden weggevoerd.
- Ongebruikte CodeSets moet worden weggevoerd.
- Als de categorie voor de tumorgrootte van de patiënt onjuist in de software is ingevoerd, kunnen de ROR-score en risicoclassificatie negatief worden beïnvloed (bijv. verschoven ROR-score en/of foutieve classificatie).
- Als de nodale status van een patiënt onjuist in de software is ingevoerd, kunnen de testresultaten van de patiënt mogelijk onjuist worden gemeld (bijv. onjuiste risicoclassificatie).
- Gebruik in de Prosigna-test geen RNA van onvoldoende kwaliteit of hoeveelheid of tumormonsters met onvoldoende oppervlak of celdichtheid van de tumor. De Prosigna-test kan mogelijk geen geldig resultaat geven en meldt in plaats daarvan dat de test is mislukt.

## 5 ALGEMENE OVERWEGINGEN TEST

- De test is alleen bedoeld voor gebruik op met formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde (FFPE)-monsters van borstkankerweefsel van een chirurgische resectie; het is niet bedoeld voor gebruik op vers, bevroren of niet-borstkankerweefsel.
- Om de test uit te voeren zijn de algemene grootte van een primaire tumor van een patiënt en de nodale status vereist.
- Gebruik steriele, wegwerpmicropipetpunten om tijdens de verwerking microbiële en nuclease besmetting van reagentia of monsters te voorkomen.
- Houd de geïsoleerde RNA-monsters op nat ijs wanneer deze niet actief worden gebruikt.
- Voor warmteblokken zijn gekalibreerde thermometers vereist.
- Gebruik geen kitcomponenten in geval deze beschadigd aankomen.
- Het wordt aangeraden dat door laboratoria die met Prosigna werken, klinische controles (bijv. voor risicocategorie) worden ontwikkeld en uitgevoerd om met de tijd, als deel van standaardprocedures voor kwaliteitscontroles bij laboratoria nauwkeurigheid van resultaten te verzekeren.

### 5.1 Weefselverwerking

- Nalaten om tijdens verwerking van weefsel omringend niet-tumor-/normaal weefsel te verwijderen via macrodissectie, kan in een onderschat risico resulteren wegens een lagere ROR-score die aan de arts wordt doorgegeven.
- Nalaten om tijdens RNA-isolatie op juiste wijze DNA van het menselijk genoom te verwijderen, kan in een hoger percentage mislukkingen resulteren door een lager testsignaal, of een overgevaardeerd risico wegens een hogere ROR-score die aan de arts wordt doorgegeven.
- Alle ongekleurde weefselsecties moeten op positief geladen microscoopglasjes worden geplaatst om te voorkomen dat zij tijdens de weefselverwerking loslaten.
- Voor monsters die meerdere objectglasjes vereisen, moeten alle objectglasjes samen worden verwerkt.
- Weefselsecties die op objectglasjes zijn geplaatst, kunnen degraderen wanneer zij langer dan 9 maanden in een droge omgeving worden opgeslagen.
- Vervang elke week de werkoplossing van 3% glycerol, of als de oplossing troebel wordt, om besmetting te voorkomen.
- Wissel de inhoud van de eerste D-limoneen-spoeling na verwerking van 4 setjes objectglasjes, en de ethanol (EtOH) en inhoud van het tweede D-limoneen-kleurbad na verwerking van 8 setjes objectglasjes. Op deze manier voorkomt u dat de kwaliteit van het weefsel afneemt.
- Wees voorzichtig tijdens het omlijnen van het tumorgebied op het ongekleurde objectglasje en bij het verwijderen van niet-tumorweefsel om te verzekeren dat het tumorweefsel niet wordt verstoord.

9. Wees voorzichtig met scherpe componenten tijdens de macrodissectie.
10. Gebruik voor elk verwerkt weefselmonster een nieuw scheerblad.
11. 10% SDS slaat regelmatig neer op kamertemperatuur en moet worden opgewarmd tot 37 °C totdat de neerslag is opgelost.\*
12. Om de nieuwe kitpartijen voor testen op patiënten te kwalificeren, moeten nieuwe partijen/batches van RNA-isolatiekits ten opzichte van de specificaties voor isolatiekits worden getest (zie paragraaf 11.5 voor details).

\*10% SDS vereist maar niet geleverd voor de Roche FFPE RNA-isolatiekit

## 5.2 De Prosigna-test uitvoeren

1. Zorg dat de primaire, categorische algemene tumorgrootte van de patiënt juist in de software wordt ingevoerd.
2. Zorg dat de categorische nodale status van de patiënt juist in de software wordt ingevoerd.
3. Controleer dat het verwarmingsblok met het verwarmde deksel dat voor hybridisatie is vereist, aan de specificaties voldoet en regelmatig wordt gekalibreerd.
4. Gebruik alleen verbruiksartikelen die met de Prosigna-kit zijn geleverd. Zij zijn specifiek ontworpen om met het nCounter-voorbereidingsstation en de digitale nCounter-analysator te werken.
5. Als hybridisatiebuffer bij koude temperaturen is opgeslagen en er wordt neerslag waargenomen, dan moeten de buisjes tot 37 °C worden opgewarmd totdat de zouten zijn opgelost.
6. De testcomponenten mogen niet te krachtig worden gedraaid om ze te mengen. Dit kan namelijk de reagentia beschadigen. Gebruik een pipet om te mengen.
7. De detector CodeSet mag niet langer dan 10 seconden en sneller dan 3000 × g worden gecentrifugeerd. De optie "impuls" bij centrifugeren niet gebruiken. Hierdoor kan de CodeSet neerslaan.
8. Houd hybridisatiereacties op 65 °C totdat zij klaar zijn naar het voorbereidingsstation te worden overgebracht. Het verwarmingsblok tot 4 °C te laten dalen of de monsters aan het einde van hybridisatie op ijs te zetten, kan in kruishybridisatie resulteren, wat de testresultaten kan aantasten.
9. Nalaten om de strookbuisjes op 65 °C te plaatsen binnen 15 minuten na het toevoegen van de opvangfragmentset, kan in kruishybridisatie resulteren, wat de testresultaten kan aantasten.
10. Nalaten om verwerking van het voorbereidingsstation te starten binnen 15 minuten nadat de monsters van 65 °C zijn verwijderd, kan in kruishybridisatie resulteren, wat de testresultaten kan aantasten.
11. Zorg dat de dopjes van de strookbuisjes stevig worden afgesloten voordat de hybridisatie in het verwarmingsblok plaatsvindt. Dit voorkomt verdamping, wat de testresultaten kan aantasten.

## 6 TRAININGSINFORMATIE

Het is de bedoeling dat deze test door professionele operators wordt uitgevoerd die zijn getraind in zeer complexe moleculaire biologie technieken, op basis van lokale regelgeving. Neem contact op met Veracyte voor trainingsinformatie die specifiek is voor het uitvoeren van de Prosigna-test.

## 7 AFVALVERWERKING

Zie de gebruikershandleiding van het nCounter-teststelsel voor details betreffende afvalverwerking die specifiek zijn voor de reagentia en instrumenten die in IVD-toepassingen worden gebruikt.

Zie de gebruiksaanwijzing van de gekozen RNA-extractiekit voor afvalverwerking en details specifiek voor RNA-extractiereagentia.

## 8 OPSLAG EN HANTERING(REAGENTIA)

Voor alle componenten van de testkit wordt de vervaldatum op het streepjescodelabel aangegeven die met de CodeSet-doos wordt meegeleverd, evenals op het label van de buitenste doos voor alle Prosigna-componenten.

- De componenten van de Prosigna CodeSet-doos (Prosigna detector CodeSet, Prosigna-opvangfragmentset en Prosigna RNA-referentiemonster) moeten op -80 °C of lager worden opgeslagen.
- De nCounter-patronen moeten op of onder -20 °C worden opgeslagen.
- De nCounter-voorbereidingsplaten moeten op 4 °C (2-8 °C) worden opgeslagen.
- De componenten van het nCounter-voorbereidingspakket moeten op kamertemperatuur (15-25 °C) worden opgeslagen.

## 9 INSTRUMENTEN VEREIST VOOR PROSIGNA

- nCounter-teststelsel (catalogusnummer NCT-SYST-DX) (inclusief beide instrumenten hieronder)
  - o nCounter-voorbereidingsstation 5s (catalogusnummer NCT-PREP-STATION-FLEX)
  - o Digitale nCounter-analysator 5s (catalogusnummer NCT-DIGITAL-ANALYZER-FLEX)

Raadpleeg de gebruikershandleiding van het nCounter-teststelsel voor aanvullende informatie.

## 10 REAGENTIA EN APPARATUUR VEREIST MAAR NIET GELEVERD

### 10.1 Materialen

1. FFPE RNA-isolatiekit (zie Paragraaf 11.5 voor vereisten van een isolatiekit als de Roche FFPE RNA-isolatiekit of de Veracyte FFPE RNA-extractiekit die via Veracyte kan worden gekocht niet worden gebruikt)
2. Hematoxyline en eosine (H&E)
3. Positief geladen glazen microscoopglasjes
4. D-limoneen oplosmiddel (histologiekwaliteit)
5. 100% ethanol (absoluut), ACS-kwaliteit of gelijksoortig (niet minder dan 99,5%)
6. Glycerol, moleculaire biologiekwaliteit
7. Nuclease-vrij water, moleculaire biologiekwaliteit<sup>1</sup>
8. 10% SDS, moleculaire biologiekwaliteit<sup>1</sup>
9. 100% isopropanol<sup>2</sup>
10. Conische buis 50 ml<sup>2</sup>
11. Scheermesjes (of wegwerpbaar chirurgische mesjes)
12. Wegwerpbaar microtoommesjes
13. 0,5 ml schroefdop<sup>1</sup> en 1,5 of 1,7 ml nonstick RNase-vrije microcentrifugebuisjes
14. RNase-vrije micropipetpunten met aerosolbarrière

<sup>1</sup>Materialen vereist maar niet geleverd voor RNA-extractie met de Roche FFPE RNA-isolatiekit.

<sup>2</sup>Materialen vereist maar niet geleverd voor RNA-extractie met de Veracyte FFPE RNA-extractiekit en ook vermeld in de gebruiksaanwijzing van de Veracyte-kit.

### 10.2 Apparatuur

1. Microtoom
2. Waterbad (40 °C)
3. Verwarmer objectglasje (45 °C)
4. Droogrek voor microscoopglasjes
5. Micropipetten; 2 µL, 20 µL, 200 µL en 1000 µL
6. Mini-centrifuge met een rotor voor strookbuisjes van 0,2 ml en standaardrotor voor microcentrifugebuisjes van 1,5/2,0 ml.
7. Standaard tafelmicrocentrifuge met rotor met vaste hoek die geschikt is voor centrifugebuisjes van 1,5 ml
8. Rechthoekige glazen kleurbakjes met deksels (binnendiameter ongeveer 91 × 71 × 60 mm (3,6 × 2,8 × 2,4")); hoeveelheid van 3 vereist
9. Objectglasjesrek (voor tien glazen objectglasjes van 75 × 25 mm (3" × 1"))
10. Droog verwarmingsblok, stationair\*
11. Tafelvortex voor microcentrifugebuisjes
12. Maatcilinder (voorgestelde grootte: 100-250 ml)
13. Prepareernaald of klemhaken voor glazen deksel (gehoekt, ongekarteld)
14. Gekalibreerde thermometers (die het bereik van 55 °C tot en met 80 °C dekken)
15. Micro-volume UV/Vis spectrofotometer (zie specificaties hieronder)
16. Verwarmingsblok met verwarmd deksel (zie specificaties hieronder)
17. Centrifuge met plaat-microplaat adapter (zie specificaties hieronder)
18. Kleurflesje

\*Apparatuur vereist voor RNA-extractie met Roche FFPE RNA-isolatiekit en Veracyte FFPE RNA-extractiekit

### 10.3 Apparatuurspecificaties

Tabel 1: Uitgebreide Micro-volume UV/Vis-spectrofotometer voor kwantificering van nucleïnezuur

Ontwerpeigenschap	Specificaties
Volumebereik monster	1-2 µl
Padlengte	1 mm
Golflengtebereik	260-280 nm
Nauwkeurigheid golflengte of fout	± 1 nm
Spectrale resolutie of bandbreedte	Minder dan of gelijk aan 4 nm
Nauwkeurigheid absorptie of willekeurige fotometrische fout	0,003 (1 mm pad)
Detectielimiet	5 ng/µl RNA
Maximale concentratie	≥ 1000 ng/µl RNA

Tabel 2: Micro-volume fotodiode UV/Vis-spectrofotometer voor kwantificering van nucleïnezuur

Ontwerpeigenschap	Specificaties
Volumebereik monster	1-2 µl
Padlengte	0,5 mm
Golflengtebereik	260 en 280 nm
Spectrale resolutie	Minder dan of gelijk aan 8 nm
Nauwkeurigheid absorptie	3% (bij 1,05 Abs bij 260 nm)
Detectielimiet	4 ng/µl RNA
Maximale concentratie	≥ 1000 ng/µl RNA



**Tabel 3: Verwarmingsblok met verwarmd deksel voor testhybridisatie**

Ontwerpeigenschap	Specificaties
Ontwerp verwarmingsblok	<ul style="list-style-type: none"> <li>Moet bij gewoon profiel passen, 12 × 0,2 ml gevormde strookbuisjes die als onderdeel van het nCounter-voorbereidingspakket worden geleverd. <ul style="list-style-type: none"> <li>Verwarmingsblokken die voor buisjes van Laag profiel (LP) en Hoog profiel (HP) zijn ontworpen, zijn niet compatibel (ook wel "snelle" blokken voor thermocycling genoemd)</li> <li>Verwarmingsblokken die ontworpen zijn voor andere typen buisjes (bijv. buisjes van 0,1 ml, buisjes van 1,5 ml) zijn niet compatibel</li> </ul> </li> <li>Moeten programmeerbaar zijn om een temperatuur van 65 °C te doorstaan</li> <li>Moeten temperatuur vasthouden tussen ±1 °C van 65 °C</li> </ul>
Ontwerp met verwarmd deksel	<ul style="list-style-type: none"> <li>Deksels met vaste of afstelbare hoogte zijn acceptabel</li> <li>Deksels moeten programmeerbaar zijn tot 70 °C</li> </ul>

**Tabel 4: Centrifuge met microplaatdrager om nCounter-voorbereidingsplaten te roteren**

Ontwerpeigenschap	Specificaties
Centrifugeringsnelheid	Minimaal 2000 × g
Rotors	Uitzwaairotor van 4 × 750 ml met microplaatdragers (of gelijksoortig) om microplaten met 96 putjes van SBS-formaat te accommoderen
Modi	Modi voor versnelling/vertraging

## 11 MONSTERAFNAME EN-VERWERKING

### 11.1 Overzicht van vereisten voor weefselmonsters en pathologie

- De Prosigna-prognosetest van gensignatuur bij borstkanker moet op een met formaline gefixeerd, in paraffine ingebed (FFPE) hormoonreceptor-positieve worden uitgevoerd, dat verder als één van de volgende typen invasieve borstcarcinoom is aangegeven door de patholoog:
  - invasief ductaal carcinoom
  - invasief lobulair carcinoom
  - Invasief carcinoom met ductale en lobulaire eigenschappen ("carcinoom van gemengd type")
  - Geen speciaal type (No special type, NST) of niet anders aangegeven (not otherwise specified, NOS)
- Een patholoog moet voor deze test het FFPE-tumorblok selecteren dat het grootste gebied aan levensvatbare, invasieve borstcarcinoom heeft.
- De test vereist voor verwerking ongekleurde weefselsecties die op objectglaasjes zijn geplaatst, evenals een overeenkomend H&E-gekleurd objectglaasje van het FFPE-tumorblok.
- Het wordt aangeraden dat voor de testverwerking weefselsecties worden gesneden die aan de weefselsectie grenzen die voor H&E-kleuring zijn gesneden om te verzekeren dat het tumorgebied dat op het H&E-gekleurde objectglaasje typerend is voor het tumorgebied op de ongekleurde objectglaasjes.
- Een patholoog moet het gebied van de levensvatbare, invasieve borstcarcinoom op het H&E-objectglaasje omcirkelen, waarbij het omliggende weefsel zonder tumor wordt uitgesloten.
- Een patholoog of getrainde laborant moet de celdichtheid en het oppervlaktegebied van de tumor binnen het omcirkelde gebied van het H&E-gekleurde objectglaasje beoordelen.
  - Het celdichtheidspercentage van de tumor op het H&E-gekleurde objectglaasje moet ≥ 10% zijn
  - Het omcirkelde oppervlaktegebied van de tumor op het H&E-gekleurde objectglaasje moet ≥ 4 mm<sup>2</sup> zijn.

\*Het celdichtheidspercentage van de tumor verwijst naar het percentage levensvatbare tumorcellen binnen het omcirkelde tumorgebied.
- Als input voor de test wordt een totaal oppervlaktegebied van de tumor dat groter is dan 100 mm<sup>2</sup> aanbevolen. De volgende tabel geeft het aantal objectglaasjes aan dat op basis van het gemeten oppervlaktegebied van de tumor op het H&E-gekleurd objectglaasje wordt aanbevolen.
- Als het beoordelingsproces van het weefsel toont dat het tumorblok onvoldoende tumorgebied bevat of onvoldoende tumorceldichtheid heeft, moet van dezelfde tumor een ander blok worden beoordeeld. Als er geen FFPE-blokken zijn die voldoende tumorweefsel bevatten, dan dient de Prosigna-test niet worden uitgevoerd. Let op dat voor tumoren met een oppervlaktegebied van minder dan 20 mm<sup>2</sup> de kans groot is dat er niet aan de RNA-input vereisten wordt voldaan.

**Tabel 5: Aanbevolen vereisten van objectglaasje op basis van oppervlaktegebied van tumor**

Gemeten oppervlaktegebied van tumor op H&E-gekleurd objectglaasje (mm <sup>2</sup> )	Aantal ongekleurde objectglaasjes
4-19	6
20-99	3
≥ 100	1

### 11.2 Monsterafname en -opslag

- Het volgende kan volgens de standaard bedrijfsprocedures van het laboratorium worden uitgevoerd: weefselafname en formalinefixatie, hanteren en opslag van FFPE-tumorblok en verzending van op objectglaasje aangebracht FFPE-weefsel.
- Op objectglaasje aangebrachte FFPE-weefselsecties moeten volgens de standaard bedrijfsprocedures van het laboratorium worden opgeslagen. Als opslag voor langere tijdsperiodes (>30 dagen) nodig is, moeten de objectglaasjes in een droge omgeving worden opgeslagen en binnen 9 maanden worden verwerkt om de kwaliteit van de testresultaten te kunnen verzekeren.

### 11.3 Voorbereiding van objectglaasjes

- Snij met behulp van een microtoom een sectie van 4-5 µm dik voor H&E kleuring.
- Snij met behulp van een microtoom secties van 10 µm dik voor gebruik in de Prosigna-test.
- Laat de secties in een waterbad drijven op 40 °C.
- Plaats de secties op positief geladen glazen microscoopglaasjes.
- Laat de objectglaasjes in de lucht drogen.
- Sinter de objectglaasjes een nacht lang op 45 °C.

### 11.4 Verwerking van objectglaasjes

- Bereid een werkoplossing van 3% glycerol voor door 1,5 ml glycerolvoorraad voor met 48,5 ml nuclease-vrij water van moleculaire kwaliteit te mengen; weeg af zoals passend is. Giet de oplossing in een kleurflasje om objectglaasjes te verwerken.
  - Giet ongeveer 200–250 ml D-limonee oplosmiddel in twee kleurbakjes en zorg dat de objectglaasjes in de objectglaasjeshouder volledig ondergedompeld zijn.
  - Giet in een derde kleurbakje ongeveer 200–250 ml absolute ethanol (EtOH).
  - Plaats de ongekleurde weefselsectie(s) op objectglaasjes in een objectglaasjeshouder.
  - Plaats de objectglaasjeshouder in het eerste D-limonee kleurbakje en beweeg de objectglaasjeshouder 10 tot 15 seconden heen en weer. Laat de houder in totaal 2 minuten in het eerste D-limonee kleurbakje zitten.
  - Verplaats de objectglaasjeshouder van het eerste D-limonee kleurbakje naar het tweede D-limonee-bakje. Beweeg de objectglaasjeshouder 10 tot 15 seconden voorzichtig heen en weer. Laat de objectglaasjeshouder in totaal 2 minuten in het tweede D-limonee kleurbakje zitten. Zorg dat alle paraffine is verwijderd. Laat de houder anders nog 1 minuut langer in het tweede D-limonee kleurbakje zitten.
  - Verplaats de objectglaasjeshouder van het tweede D-limonee kleurbakje naar het EtOH-bakje. Beweeg de objectglaasjeshouder voorzichtig 10 tot 15 seconden heen en weer en verwijder hem na 2 minuten.
  - Laat de objectglaasjes 5 - 10 minuten in de lucht drogen, of totdat zij geheel droog zijn en het weefsel wit uitziend (afhankelijk van de grootte van het weefsel kan dit langer duren).
  - Omcirkel het tumorgebied op de achterzijde van de ongekleurde objectglaasjes door het met het overeenkomende H&E-gekleurde objectglaasje uit te lijnen en het omcirkelde gebied over te brengen.
  - Terwijl aan één objectglaasje per keer wordt gewerkt, moet het weefsel op het omcirkelde ongekleurde objectglaasje worden gehydrateerd door het objectglaasje in de oplossing van 3% glycerol te dompelen.
  - Verwijder enige overmatige glycerol van het objectglaasje met een laboratoriumtissue.
  - Tijdens het verwerken van meerdere objectglaasjes, kan de gebruiker de objectglaasjes in droogrek laten drogen terwijl andere objectglaasjes opnieuw worden gehydrateerd.
  - Schraap enig niet-tumorweefsel rondom het omcirkelde tumorgebied weg met een scheermes of chirurgisch mesje en werp het weg.
  - Terwijl één uiteinde van het objectglaasje wordt vast gehouden en het andere uiteinde op een vast oppervlak in een hoek van 45 graden wordt gehouden, moet het macro-ontlede tumorweefsel op de hoek van een scheermes worden verzameld. Het weefsel moet gemakkelijk op het scheermes "krullen" terwijl het wordt verzameld.
  - Herhaal de voorgaande stap voor elk objectglaasje van hetzelfde monster.
- Opmerking:** Meerdere ongekleurde objectglaasjes van een enkel FFPE-monster kunnen op hetzelfde scheermesje worden verzameld.

- Schuif de weefselsecties van hetzelfde monster voorzichtig in een gelabeld microcentrifugebuisje van 1,5 ml.
- Reinig de dissectienaald of pincet als ze zijn gebruikt door ze enkele seconden in D-limonee te dompelen en ze tussen weefselmonsters te drogen.

## 11.5 Isolatie van RNA

**Veracyte raadt aan de Roche FFPE RNA-isolatiekit of de Veracyte FFPE RNA-extractiekit te gebruiken. Deze zijn specifiek voor gebruik met Prosigna gevalideerd.**

Andere RNA-isolatiekits kunnen worden gebruikt om monsters voor Prosigna voor te bereiden als zij van op objectglasjes aangebrachte FFPE-weefselsecties van borstkanker opleveren die aan de volgende specificaties voldoen:

**Tabel 6: Specificaties RNA-isolatiekit**

Metrisch	Test of meting	Specificatie
RNA-concentratie	Optische dichtheid bij 260 nm	$\geq 12,5$ ng/ $\mu$ l
Totaal volume RNA ( $\mu$ l)	Totaal geëluëerd volume	$\geq 12$ $\mu$ l
Zuiverheid van RNA	Verhouding van optische dichtheid bij 260 nm t.o.v. optische dichtheid bij 280 nm (OD 260/280 nm)	1,7-2,3
DNA-besmetting	Genomisch DNA-inhoud van geëluëerd RNA-monster	$\leq 1$ ng/ $\mu$ l
Integriteit van RNA	Grootteverdeling van de geïsoleerde RNA-fragmenten	$\geq 90\%$ van de geïsoleerde RNA-fragmenten moeten $>100$ nucleotiden lang zijn

**Waarschuwing:** Als er een alternatieve isolatieprocedure wordt gebruikt in combinatie met de Prosigna-test moet deze workflow volledig worden gevalideerd door het laboratorium voordat deze in de praktijk wordt gebruikt.

### RNA-isolatieprocedure:

- Als de Roche FFPE RNA-isolatiekit wordt gebruikt, volg dan de specifieke instructies voor isolatie van RNA zoals hieronder beschreven.
- Als de Veracyte FFPE RNA-extractiekit wordt gebruikt, volg dan de gebruiksaanwijzing zoals door Veracyte geleverd en ga verder naar deel 11.6.
- Als er een alternatieve extractiemethode wordt gebruikt, volg dan het gevalideerde protocol of het protocol dat door de fabrikant is verstrekt, en ga vervolgens door naar deel 11.6.

**Elke RNA-extractiekitpartij geproduceerd door Roche of Veracyte is gekwalificeerd voor de productie van RNA-monsters die voldoen aan de vooraf gedefinieerde specificaties voor diagnostische genexpressietests. Raadpleeg het informatieblad/de gebruiksaanwijzing van de gekozen RNA-extractiekitmethode voor de juiste opslag-, veiligheids- en gebruiksinstructies.**

### Vorbereiding van werkoplossingen voor Roche FFPE RNA-isolatiekit

- De voorbereiding van werkoplossingen moet plaatsvinden voordat men doorgaat met weefselontbinding en RNA-isolatie:

Vorbereiding van werkoplossingen	
Reagens	Procedure
Wasbuffer I (WB1)*	Voeg 15 ml 100% ethanol toe, sla voorbereide WB1 op bij +15 tot +25 °C
Wasbuffer II (WB2)*	Voeg 80 ml 100% ethanol toe, sla voorbereide WBII op bij +15 tot +25 °C
Proteïnase K (PK)	Los de gevriesdroogde proteïnase K op in 4,5 ml reagentpreparatiebuffer (RPB). Bereid fracties van 600 $\mu$ l voor, label ze en sla ze op bij -15 tot -25 °C
DNase I (DNase I)*	Los de gevriesdroogde DNase I op in 740 $\mu$ l reagentpreparatiebuffer (RPB). Bereid fracties van 50 $\mu$ l voor, label ze en sla ze op bij -15 tot -25 °C

**Opmerking:** Items met een asterisk (\*) zijn pas vereist als het weefsel is ontbonden.

### Weefselontbinding voor Roche FFPE RNA-isolatiekit

- Laat een voldoende aantal fracties proteïnase K (PK) ontdooien. Sla, wanneer ontdooid, de fracties op in ijs totdat zij klaar zijn voor gebruik.  
**Opmerking:** Eén fractie van 600  $\mu$ l PK bevat genoeg proteïnase K voor 4 weefselontbindingen.
- Voeg aan monsterbuisjes met weefsel 100  $\mu$ l weefsellysisbuffer (TLB) toe, 16  $\mu$ l 10% SDS en 120  $\mu$ l proteïnase K werkoplossing.
- Centrifugeer de monsterbuisjes met weefsel enkele seconden en laat de inhoud kort centrifugeren.
- Incubeer de hele nacht bij 55 °C (12 uur – 23 uur).

### RNA-isolatie voor Roche FFPE RNA-isolatiekit

- Inspecteer visueel de monsterbuisjes om vast te stellen of het weefsel geheel is ontbonden. Een volledige ontbinding komt helder voor en heeft weinig tot geen weefsel in de oplossing.
  - Ga door naar de volgende stap als de ontbinding is voltooid.
  - Als de ontbinding niet is voltooid, voegt u 20  $\mu$ l extra proteïnase K toe en incubeer u het nog een extra uur.
- Laat de inhoud van alle monsters kort (< 30 seconden in een minicentrifuge) centrifugeren.
- Incubeer de monsters 15 minuten bij 80 °C.
- Laat voldoende DNase-fracties ontdooien en prepareer ze. Sla, wanneer ontdooid, de fracties op in ijs totdat zij klaar zijn voor gebruik.  
**Opmerking:** Eén DNase-fractie van 50  $\mu$ l bevat genoeg DNase voor 4 RNA-isolaties.
- Verdun de DNase in DNase-incubatiebuffer (DIB). De vereiste hoeveelheid voor N (aantal) RNA-isolaties is:  $(N+1) \times 90$   $\mu$ l DNase-incubatiebuffer +  $(N+1) \times 10$   $\mu$ l DNase. Sla de verdunde DNase-oplossing op in ijs totdat het klaar is voor gebruik.
- Voeg 325  $\mu$ l paraffine bindingsbuffer (PBB) en 325  $\mu$ l absolute ethanol toe aan elk monster en meng door te pipetteren.
- Laat kort centrifugeren (< 30 seconden in een minicentrifuge).
- Plaats een High Pure filterbuis op een High Pure afnamebuis.
- Pipetteer het monster in het bovenste reservoir van de filterbuis en vermijd enig restweefsel.
- Centrifugeer 30 seconden op  $6.000 \times g$ .
- Plaats de High Pure filterbuis op een nieuwe High Pure afnamebuis (verwijder de vorige afnamebuis met de doorstroming).
- Centrifugeer 2 minuten op  $16.000 \times g$  om het filterdoek volledig te drogen.
- Plaats de High Pure filterbuis op de nieuwe High Pure afnamebuis (verwijder de vorige afnamebuis met de doorstroming).
- Voeg 100  $\mu$ l verdunde DNase toe op de filterdoek van de High Pure filterbuis en incubeer 15 minuten bij +15 tot +25 °C.
- Voeg 500  $\mu$ l wasbuffer I-werkoplossing (WB1) toe aan het High Pure filterdoek, centrifugeer 20-30 seconden op  $6.000 \times g$ , verwijder de doorstroming.
- Voeg 500  $\mu$ l wasbuffer II-werkoplossing (WB2) toe aan het High Pure filterdoek, centrifugeer 20-30 seconden op  $6.000 \times g$ , verwijder de doorstroming.
- Voeg 500  $\mu$ l wasbuffer II-werkoplossing (WB2) toe aan het High Pure filterdoek, centrifugeer 20-30 seconden op  $6.000 \times g$ , verwijder de doorstroming.
- Centrifugeer 2 minuten op  $16.000 \times g$  om het filterdoek volledig te drogen.
- Plaats de High Pure filterbuis in een gelabelde RNase-vrije microcentrifugebuis van 1,5 of 1,7 ml.
- Voeg 30  $\mu$ l elutiebuffer (EB) toe aan het midden van de High Pure filterdoek.
- Incubeer 1 minuut bij +15 tot +25 °C.
- Centrifugeer 1 minuut op  $6000 \times g$  om RNA uit de kolom te elueren. Verwijder de High Pure filterbuis en gooi hem weg.
- Centrifugeer het geëluëerde RNA 2 minuten op maximaal vermogen in de microcentrifuge.
- Breng het supernatant over in een buisje van 0,5 ml met schroefdop, zonder glasvezels te verstoren die mogelijk op de bodem van de originele buis van de filterdoek zijn gespoeld.

## 11.6 De RNA-concentratie en -kwaliteit meten

- Meet de concentratie van het geïsoleerde RNA op dezelfde werkdag (opslaan bij +2 tot +8 °C) of vries het tot het gebruik in op -70 °C.
- Meet de optische dichtheid (OD) op 260 en 280 nm van 2  $\mu$ l geïsoleerde RNA door een spectrofotometer te gebruiken die aan de gedefinieerde specificaties voldoet die in 10.3 Apparatuurspecificaties worden gedefinieerd. Vermijd het pipetteren van de 2  $\mu$ l van de bodem van de bronbuis voor het geval dat er glasvezels achterblijven, die de meting van de optische dichtheid kunnen verstoren.
- Volg de instructies van de fabrikant van de spectrofotometer om RNA te meten.
- Als een willekeurig monster niet aan de minimale zuiverheid van RNA of concentratiemetrie (tabel 6) voldoet, centrifugeert u het monsterbuisje gedurende 1 minuut op maximale snelheid ( $> 10.000 \times g$ ). Plaats het buisje op ijs en herhaal het meetproces. Als het monster nog steeds niet voldoet aan de zuiverheids- of concentratiemetrie, dan is het RNA-monster niet geschikt voor test onder de Prosigna-testprocedure. Gebruik geen RNA van slechte kwaliteit of onvoldoende hoeveelheid in de Prosigna-test.
- Als niet aan de minimale concentratie- of minimale zuiverheidspecificaties (tabel 6) wordt voldaan, kan de RNA-extractie worden herhaald. Gebruikers kunnen ervoor kiezen om aanvullende objectglasjes van hetzelfde FFPE-blok te isoleren van dezelfde patiënt een afzonderlijk blok kiezen.

6. Als de RNA-concentratie 250 ng/μl overschrijdt, moet het met RNase- en Dnase-vrij water van moleculaire kwaliteit worden verdund tot een doelconcentratie van 200 ng/μl voordat de hybridisatie-test in een later stadium wordt uitgevoerd. Gebruik het opgenomen resultaat van de OD 260/280-verhouding van het onverdunde monster om vast te stellen of het verdunde monster aan de minimale RNA-zuiverheid van 1,7 voldoet.
7. Vries het RNA in op -70 °C of lager als de Prosigna-test niet op dezelfde werkdag kan worden voltooid.

- d. Voor monsters die minder dan 10 μl vereisen, berekent u het volume water dat wordt vereist om een totaal monstervolume van 10 μl te genereren.

**Voorbeeld:** Voor een monster met een gemeten RNA-concentratie van 85 ng/μl, is er 2,9 μl monster nodig voor een totale massa van 250 ng en is er 7,1 μl water nodig om vóór het toevoegen van resterende reagentia het volume op 10 μl te brengen. In een vergelijking:  $250 \text{ ng} \div 85 \text{ ng}/\mu\text{l} = 2,9 \mu\text{l}$

## 11.7 Testprocedure

Deze testprocedure beschrijft de stappen die nodig zijn om met behulp van het nCounter-teststelsel de Prosigna-test uit te voeren. Deze stappen kunnen op twee opeenvolgende dagen in de volgende categorieën worden samengevat:

### Dag één

- Instelling Run Set-Identificatie (RSID, uitvoeren setidentificatie)-rapport op webtoepassing
- Instelling van RNA-hybridisatie met Prosigna CodeSet (30 minuten instelling, 15-21 uur hybridisatie)

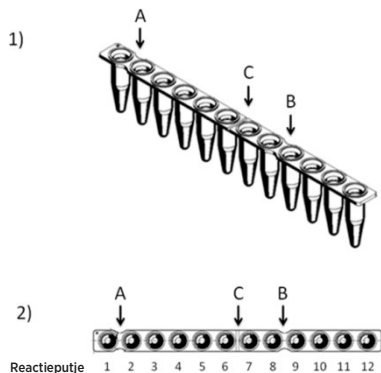
### Dag twee

- Instelling en werking van voorbereidingsstation (20 minuten instelling, 2-3 uur per verwerking, afhankelijk van het aantal monsters dat wordt verwerkt)
- Instelling en scannen van Patroon op de digitale analysator (5 minuten voor instelling, 2,5-4,5 uur voor elk Patroon, afhankelijk van het aantal monsters dat wordt verwerkt)
- Rapport ophalen (30 minuten)

### Selectie van patiëntmonster en instelling batch

1. Bepaal welke patiëntmonsters deel zullen uitmaken van de proefuitvoering. In een enkele batch kunnen tot 10 monsters worden opgenomen.
  - a. Elk monster in de batch krijgt een unieke positie toegewezen binnen een strook met 12 buisjes die voor hybridisatie wordt gebruikt. Deze wordt als onderdeel van de Run Set ID op het instrument geregistreerd (Run Set ID uitgevoerd via de software van de webapplicatie). Let op dat posities 1 en 2 voor het referentiemonster worden gereserveerd en posities 3-12 voor RNA-tumormonsters.
  - b. De afbeelding hieronder toont zijaanzicht 1) en bovenaanzicht 2) van de strookbuisjes. De strookbuisjes zijn asymmetrisch gevormd tussen reactieputjes 1 en 2 (A) en 8 en 9 (B) om tijdens de verwerking de monstervolgorde te helpen behouden. De strookbuisjes zijn ook tussen reactieputjes 6 en 7 (C) ingekeept om de strookbuisjes te kunnen snijden als het nodig is om standaard centrifugeadaptors te plaatsen.

Afbeelding 6: Afbeelding van gevormde strookbuisjes



2. Bereken de hoeveelheid RNA en water (wanneer vereist) die voor elk monster in de batch aan de hybridisatiereactie moet worden toegevoegd.
  - a. De aanbevolen RNA-input is 250 ng voor de test. Het aanvaardbare RNA-inputbereik voor hybridisatie is 125-500 ng.
  - b. Bereken het volume (in microliters) van het RNA-monster om aan de hybridisatiereactie toe te voegen. Hiervoor wordt de gewenste monsterinput (bijv. 250 ng) door de gemeten concentratie gedeeld.
  - c. Als de berekende concentratie van het monster tussen 12,5 ng/μl en 25 ng/μl is, voegt u het maximale volume toe van 10 μl.

### Registratie en verwerking van monster

De gebruiker bouwt met behulp van de webapplicatie van de nCounter-teststelselservices voor elke batch monsters een unieke Run Set ID aan die de monster-id's koppelt aan de positie in de strookbuisjes (posities 3-12). De gebruiker kan de gebruikershandleiding raadplegen voor instructies over het gebruik van de webapplicatie van de nCounter-teststelselservices.

1. Als de RNA voor het gebruik ingevroren was, moeten de volgende stappen worden uitgevoerd voordat u doorgaat:
    - a. Ontdooi RNA-monsters volledig en sla ze op in ijs.
    - b. Centrifugeer het ontdoode monsterbuisje 1 minuut op maximale snelheid ( $> 10.000 \times g$ ) en plaats het terug in het ijs.
  2. Kies de juiste grootte van de Prosigna-testkit op basis van het aantal patiëntmonsters dat getest wordt (1, 2, 3, 4 of 10). Haal een buisje van elk van de volgende reagentia van de CodeSet-kit uit de vriezer van -80 °C om ze te ontdooien. Sla de reagentia in ijs op als u niet binnen onmiddellijk met de volgende stappen doorgaat.
    - a. CodeSet Prosigna-detector (groene sticker op dop)
    - b. Prosigna-opvangfragmentset (grijze sticker op dop)
    - c. Prosigna-referentiemonster (geen sticker op dop)
  3. Verwijder de streepjescodesticker van de CodeSet en een testconfiguratiecode van de CodeSet-doos.
  4. Log via een webbrowser in bij de webapplicatie van het IVD nCounter-teststelsel en selecteer Prosigna als het analysetype om te beginnen met het opstellen van de digitale registratieformulieren.
  5. Selecteer 'Create New Run Set' (Nieuwe uitvoeringsset aanmaken) op de hoofdpagina.
  6. Het eerste vereiste veld bij het definiëren van een Prosigna-run is de Run Set ID. Voer een uniek identificatienummer in het veld Run Set ID in om de monsterbatch te identificeren.
  7. Scan de testconfiguratiecode in de webapplicatie in of voer deze handmatig in. Als de code is gescand of ingevoerd kunt u deze weggooien.
  8. Scan het CodeSet-kitnummer in de webapplicatie in of voer deze handmatig in.
  9. Voer vervolgens in het overeenkomende veld Sample-ID het unieke monster-id in voor het monster dat zich in de derde positie/put van de buisjesstrook bevindt.
    - a. Voer de RNA-monster-id's van de patiënt in met behulp van een streepjescodescanner of handmatig door met een toetsenbord de monster-id's in te voeren.
    - b. Voor het invoeren van het volgende monster, gaat u na invoer van elk monster-id, naar de volgende vereiste vervolkeuzevelden (algemene tumorgrootte en klierstatus) voor het monster.
      - i. Gebruik het aantal positieve klieren die tijdens de pathologische beoordeling zijn aangegeven om de passende nodale categorie voor de test te selecteren (nul, 1-3,  $\geq 4$ ).
      - ii. Gebruik de gemeten algemene tumorgrootte of fase die tijdens de pathologische beoordeling van de patiënt is vastgesteld om de passende categorie voor algemene tumorgrootte voor de test te selecteren ( $\leq 2 \text{ cm}$  of  $> 2 \text{ cm}$ ).
    - c. Voor elk monster kunnen in het optionele veld Memo opmerkingen worden ingevoerd.
- Opmerking:** Als bepaalde putjes/posities van de buisjesstrook niet nodig zijn, laat dan de resterende velden leeg. Als er extra velden vereist zijn voor meer monsters, gebruikt u een andere testconfiguratie die ruimte biedt aan meer monsters.
10. Na een monster volledig te hebben ingevoerd, geeft u aan welke gebruikers het volgende ontvangen:
    - a. Statusupdates voor activiteiten van het voorbereidingsstation en de digitale analysator.
    - b. De melding dat het eindrapport beschikbaar is.
  11. Sla de voltooid uitvoeringsset op.
    - a. Het Run Set-werkblad kan worden afgedrukt en worden gebruikt voor traceerbaarheid van het monster en verificatiedoelinden.

## Procedure hybridisatie-reactie

**Opmerking:** Voor de volgende stappen zijn tien (10) patiëntmonsters en twee (2) referentiemonsters vereist.

**Opmerking:** Centrifugeer de detector CodeSet niet sneller dan  $3000 \times g$  of langer dan 10 seconden en gebruik de optie 'puls' niet om te centrifugeren. Als u dit wel doet, bereikt de centrifuge de maximumsnelheid waardoor de CodeSet uit de oplossing gecentrifugeerd kan worden.

1. Programmeer het verwarmingsblok met behulp van een volume van 30  $\mu$ l, berekende temperatuur van blok en deksel en tijdstelling 'forever' (voorgoed) (of gelijke instelling voor wachttijd). Stel de temperatuur van het verwarmingsblok in op 65 °C en stel die van het verwarmde deksel in op 70 °C.

**Opmerking:** Voor de volgende stappen is het van cruciaal belang dat de volgorde wordt behouden waarin de monsters aan de buisjesstrook worden toegevoegd. Zorg ervoor dat zij overeenkomen met de volgorde van de Run Set-ID.

2. Label de gegeven gevormde strook van 12 buisjes om posities 1-6 te onderscheiden van posities 7-12 (zie afbeelding van buisjesstrook).
3. Snijd, indien nodig, de buisjesstrook doormidden zodat deze met een buisjesstrookadapter in een minicentrifuge past.
4. Pipetteer 10  $\mu$ l referentiemonster in posities 1 en 2 van de gevormde buisjesstrook.
5. Pipetteer het berekende volume water dat voor elk monster is vereist in de respectievelijke posities in de gevormde buisjesstrook.
6. Pipetteer het berekende volume RNA dat voor elk monster is vereist in de respectievelijke posities in de gevormde buisjesstrook. Gebruik voor elk monster een nieuw pipet.
7. Zodra het patiëntmonster aan de buisjesstrook is toegevoegd, wordt het aangeraden om het monsterbuisje in een monsterbuisjesrek te plaatsen, waarbij de volgorde wordt aangehouden waarin het monster aan de buisjesstrook was toegevoegd. Dit is ter verificatie dat monsters in de bedoelde volgorde zijn toegevoegd nadat alle monsters aan de buisjesstrook zijn toegevoegd.
8. Zodra alle monsters aan de buisjesstrook zijn toegevoegd, moet worden gecontroleerd of de volgorde van het monster in de buisjesstrook is aangehouden (voor het verifiëren van de volgorde van het monster kan het Run Set-werkblad worden gebruikt).
  - a. Bewerk, indien nodig, de Run Set ID met behulp van de software voor webtoepassing om in de eindopmaak de volgorde van de monsters te reflecteren (raadpleeg de gebruikershandleiding voor het nCounter-teststelsel voor instructies over het bewerken van een bestaande Run Set ID).
9. Plaats, na het verifiëren van de volgorde van het monster, de individuele buisjes met RNA-monster terug op ijs.
10. Maak een mastermix die 130  $\mu$ l hybridisatiebuffer en 65  $\mu$ l detector-CodeSet bevat.

**Opmerking:** Als de detector CodeSet op ijs is opgeslagen, moet het voor het toevoegen van de hybridisatiebuffer 1 minuut tijd krijgen om op kamertemperatuur te komen.

11. Meng door te pipetteren en centrifugeer de mastermix kort.

**Opmerking:** Voeg de opvangfragmentset niet toe aan de mastermix EN sla de voltooide mastermix niet op in ijs.
12. Pipetteer in elk van de 12 putjes 15  $\mu$ l van de mastermix. Gebruik voor elk putje een nieuw pipetpuntje.

**Opmerking:** Na voltooiing van de volgende stap moet de buisjesstrook binnen 15 minuten in het verwarmingsblok op 65 °C worden geplaatst.
13. Voeg 5  $\mu$ l opvangfragmentset toe aan ieder putje en gebruik een nieuw pipetpuntje voor ieder putje.
14. Dek de putjes van de buisjesstrook af en meng de reagentia door de buisjesstrook enkele keren om te draaien en met een vinger er tegen te tikken om volledig mengen te verzekeren.
15. Centrifugeer de monsters kort in de buisjesstrook in een picofuge of minicentrifuge (bij  $< 3000 \times g$ ).

**Opmerking:** Gebruik een picofuge die geschikt is voor eenbuisjesstrook met 12 putjes, of indien nodig, een minicentrifuge die geschikt is voor gesneden buisjesstroken.
16. Plaats de buisjesstrook/buisjesstroken in een verwarmingsblok met verwarmd deksel van 65 °C. Incubeer de hybridisatietests 15 tot 21 uur op 65 °C. De hybridisaties moeten op 65 °C worden gehouden totdat zij klaar zijn om op het voorbereidingsstation te worden verwerkt.

**Opmerking:** Gooi ongebruikte CodeSet weg.

## Monsters verwerken op het nCounter-voorbereidingsstation

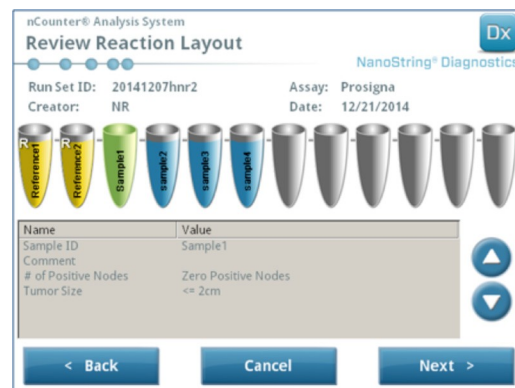
1. Zoek het voorbereidingsstation dat aan de digitale analysator is gekoppeld.
2. Verwijder het nCounter-Patroon uit de opslag bij -20 °C en laat hem 10 tot 15 minuten in de foliezak op kamertemperatuur komen.

**Opmerking:** Zorg ervoor dat componenten van dezelfde kitpartij samen gebruikt worden.
3. Als de Patroon kamertemperatuur heeft bereikt, verwijdert u het uit de foliezak voordat u het Patroon op de tafel van het voorbereidingsstation laadt.

4. Verwijder nCounter-voorbereidingsplaat of -platen uit de opslag bij 4 °C en laat ze 10 tot 15 minuten op kamertemperatuur komen.

**Opmerking:** er is slechts één voorbereidingsplaat nodig voor runs die worden uitgevoerd met een Prosigna-kit voor 1, 2, 3 of 4 tests.
5. Centrifugeer de voorbereidingsplaten 2 minuten op  $2000 \times g$  om vloeistoffen op de bodem van de putjes te verzamelen voordat de voorbereidingsplaten op de tafel van het voorbereidingsstation worden geladen.
6. Terwijl de patronen en plaat of platen op kamertemperatuur komen, bereidt u het voorbereidingsstation voor met de gebruiksartikelen van het nCounter-voorbereidingspakket.
7. Selecteer met behulp van het nCounter-voorbereidingsstation de toets 'Diagnostics' (Diagnostiek) voor uw analyse.
8. Selecteer onder het scherm Main Menu (Hoofdmenu) in de aanraakscherm-interface de toets "Process Samples" (Monsters verwerken).
9. Blader door de lijst beschikbare Run Set IDs (RSID) die op het scherm worden weergegeven om de RSID te bevestigen voor de monsters die momenteel worden verwerkt.
10. Selecteer het RSID door het scherm aan te raken en op de aanraakscherm-interface "Next" (Volgende) te selecteren.
11. Verifieer in de aanraakscherm-interface of het juiste RSID is geselecteerd door op het scherm naar elk buisje te kijken en een kruisverwijzing te maken met de monsterinformatie.
  - a. Het Run Set-werkblad kan hier worden gebruikt voor traceerbaarheid van het monster en verificatie.
  - b. Als het onjuiste RSID is geselecteerd, raakt u de toets "Back" (Terug) aan en selecteert u het juiste RSID.
  - c. Als het RSID juist was, maar er zijn fouten bij de monsterinvoer, raakt u de toets 'Back' (Terug) aan en gaat u naar een computerwerkstation en bewerkt u het RSID via de webapplicatie.

Afbeelding 7: Een run-scherm op voorbereidingsstation verwerken



12. In de volgende diverse schermen wordt u gevraagd de vereiste streepjescode-id's van de reagentia in de open velden te scannen of de plaatsing op de tafel van de vereiste verbruiksartikelen te bevestigen. Na elke taak te hebben uitgevoerd, selecteert u in de aanraakscherm-interface "Next" (Volgende) en gaat u door naar de volgende prompt.

**Opmerking:** Voor runs die met een Prosigna-kit van 1, 2, 3 of 4 tests worden uitgevoerd, is maar één voorbereidingsplaat en één lege verwarmingsbuisjesstrook vereist. Laad voor runs met 1, 2, 3 of 4 tests de voorbereidingsplaat en lege verwarmingsbuisjesstrook in hun respectievelijke voorste posities (het dichtst bij de gebruiker) op de tafel van het voorbereidingsstation.
13. Verwijder monsters uit het verwarmingsblok.

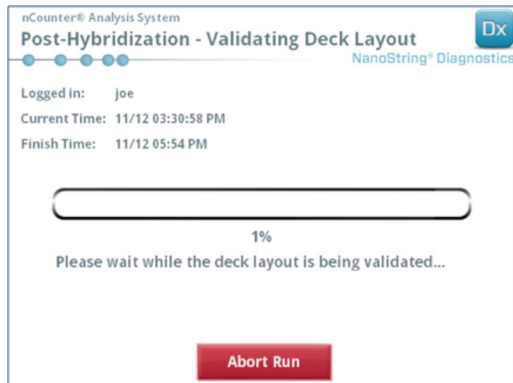
**Opmerking:** Start de run van het voorbereidingsstation binnen 15 minuten na de monsters uit het verwarmingsblok te hebben verwijderd.
14. Plaats de buisjesstrook/buisjesstroken in een picofuge of minicentrifuge en centrifugeer kort (bij  $< 3000 \times g$ ).
15. Haal voorzichtig de doppen van de buisjes van de buisjesstrook/buisjesstroken.
16. De inkepingen op de buisjesstrook en de geleiders op het voorbereidingsstation moeten de juiste volgorde en richting voor de monsters behouden.
17. Plaats de buisjesstrook/buisjesstroken met de putjes in de volgorde van 1 tot 12, van links naar rechts op de tafel van het nCounter-voorbereidingsstation. Wanneer een 1-, 2-, 3-, of 4-testkit wordt gebruikt, moet alleen de eerste helft van de buisjesstrook (putjes 1-6) in de linkerkant van de monsterbuisjeshouder op de tafel worden geplaatst, indien van toepassing. De tweede helft van de buisjesstrook (7-12) past niet in de linkerhelft van de houder door het ingekeepte ontwerp van het buisje.
18. Controleer of de buisjesstroken stevig op het voorbereidingsstation zijn geplaatst en sluit het metalen deksel.



19. Als het deksel niet goed kan worden gesloten, wordt u tijdens de validatie van de tafelopmaak gevraagd het te sluiten.
20. Selecteer 'Next' (Volgende) op het touchscreen.
21. Sluit de instrumentdeur als u hiervoor wordt gevraagd en selecteer "Next" (Volgende) om de validatie van de tafelopmaak te starten.
22. Als een fout optreedt, volgt u de richtlijnen die met de specifieke fout zijn verwant om met de validatie van de tafelopmaak door te gaan.

9. Om een Patroon toe te voegen aan een digitale analysator die al patronen aan het scannen is, drukt u op 'Pause' (Onderbreken) op het scherm 'Counting Cartridges' (Patronen tellen) en wacht u tot de digitale analysator de huidige scan onderbreekt.
10. Open het deurtje naar de digitale analysator.
11. Plaats het Patroon dat moet worden toegevoegd in een lege sleuf (zie de richtlijnen voor positionele status hierboven).
12. Sluit het deurtje en druk op 'Resume' (Hervatten).
13. Als de scan is voltooid, stuurt de software het rapport naar de eerder aangegeven e-mailadressen van de gebruiker.
14. Verwijder bij ontvangst van het e-mailbericht, het voltooide Patroon en werp het volgens de richtlijnen van uw instituut weg.  
**Opmerking:** Rapporten worden gegenereerd voor succesvol voltooide runs, evenals voor runs met fouten die verwant zijn met kwaliteitscontrolegegevens (QC). Rapporten worden niet gegenereerd als er een fout is opgetreden die niet met kwaliteitscontrolegegevens is verwant. Neem contact op met Veracyte-klantenservice voor hulp als dit gebeurt.
15. Open met behulp van de koppeling die aan de e-mail is bevestigd, de webapplicatie en download alle testrapporten die zijn verwant met het RSID dat nu wordt verwerkt.
16. Na het optreden van fouten: volg de aanbevelingen die in het testrapport worden aangegeven voor individuele monster- of systeemfout.  
**Opmerking:** fouten bij individuele monsters worden niet als systeemfouten beschouwd.

Abbeelding 8: Validatie tafelopmaak voorbereidingsstation na hybridisatie.



23. Nadat de tafelopmaak is gevalideerd, selecteert u "Start processing" (Verwerking starten) in de aanraakscherm-interface.  
**Opmerking:** Als u met het starten van het voorbereidingsstation problemen ondervindt, gaat u terug naar de gehybridiseerde monsters op het verwarmingsblok, maar overschrijd niet de maximale tijd van 21 uur.
24. Volg de prompts op het voorbereidingsstation zodra de run is voltooid.
25. Zodra het voorbereidingsstation de run heeft voltooid, verwijderd u voorzichtig het patroon van het voorbereidingsstation en dicht u de putjes van het patroon af met de meegeleverde adhesieve afdekking voor de putjes van het patroon.  
**Opmerking:** laat het patroon 's nachts niet onafgedicht op het voorbereidingsstation achter.
26. Als u niet van plan bent de monsters dezelfde dag nog te scannen, slaat u het patroon maximaal 1 week op in een ondoorzichtige doos bij 4 ° C.

#### Patroon scannen op de digitale nCounter-Analysator

1. Zoek de digitale analysator die met het voorbereidingsstation is gekoppeld die de monsters heeft verwerkt. Laad het Patroon op de digitale nCounter-digitalysator voor het scannen.
  - a. Open de deur naar de digitale analysator.
  - b. Plaats het Patroon dat moet worden toegevoegd in een lege sleuf.
  - c. Sluit de deur en raadpleeg het display op het aanraakscherm.
2. De interface met aanraakscherm van de digitale analysator heeft verschillende afbeeldingen om te helpen snel de positionele status te identificeren:
  - a. Lege locatie: deze sleuf is leeg en klaar om met een nieuw Patroon te worden geladen.
  - b. Volledig blauw patroon: voltooide scan.

#### DE VOLGENDE PATRONEN NIET VERWIJDEREN:

- a. Wit patroon: deze sleuf bevat een patroon dat is geregistreerd maar niet is gescand.
  - b. Gedeeltelijk blauw patroon: deze sleuf bevat een patroon dat momenteel gescand wordt.
3. Patronen waarbij het scannen is voltooid, kunnen uit de digitale analysator worden verwijderd.
  4. Als dit het eerste Patroon is dat op de digitale analysator is geladen, klikt u op de toets 'Diagnostics' (Diagnostiek) en selecteert u vervolgens 'Main Menu' (Hoofdmenu) om u aan te melden bij de digitale analysator. Als de digitale analysator klaar is met het scannen van Patronen, gaat u verder naar stap 9 hieronder.
  5. Plaats het Patroon voorzichtig in een lege sleuf (zie de richtlijnen voor de positionele status hierboven) op de digitale analysator. De sleuf en het patroon zijn gevormd om juiste plaatsing te verzekeren. De streepjescode is opwaarts gericht.
  6. Sluit het sleufklepje en druk op het patroon door de opening in het sleufdeksel om ervoor te zorgen dat het patroon correct is geplaatst.
  7. Druk op de toets 'Start counting' (Telling starten) en wacht tot de scanner met het scanproces start. U hoort een reeks kleine ritmische klikgeluiden terwijl de digitale analysator begint met het scannen van het Patroon.
  8. Bevestig dat op het scherm in de positie van het Patroon een blauwe balk verschijnt (binnen vijf minuten na het starten van de scan). Deze geeft aan dat de scan is gestart.

## 12 PROBLEEMOPlossen EN TESTSTORINGEN

Tabel 7: Foutcodes voor Testherhaling

Foutcode	Beschrijving storing	Aanbevolen actie
5	Scanstoring	Voer het monster opnieuw uit met 250 ng RNA
7	Hoog signaal	Specificeer monster opnieuw, voer test opnieuw uit met 125 ng RNA
6	Laag signaal	Specificeer monster opnieuw, voer test opnieuw uit met 500 ng RNA
30	Laag signaal	Specificeer monster opnieuw, voer test opnieuw uit met 500 ng RNA
31	Laag RNA-siginaal	Specificeer monster opnieuw, voer test opnieuw uit met 500 ng RNA

#### Redenen om de test te herhalen:

1. Het testrapport identificeert defecte monsters en er worden geen testresultaten gegeven. De testresultaten worden in geval van geslaagde monsters gemeld.
2. Het testrapport identificeert het soort falen en biedt een aanbevolen actie in geval van een mislukte test. De RNA-concentratie van falende monsters kan opnieuw worden gemeten en de monsters kunnen opnieuw worden uitgevoerd (als deel van een nieuwe batch/RSID). Dit is afhankelijk van het type falen en de hoeveelheid RNA-massa die overblijft om een testresultaat te verkrijgen.

## 13 RESULTATEN VAN DE TEST

De Prosigna-test omvat een aantal meetgegevens voor kwaliteitscontrole die tijdens de test automatisch op elk monster worden toegepast. Deze metriekeken evalueren de prestatie van de test om vast te stellen of de resultaten binnen de verwachte waarden vallen. Bij een succesvolle test van de metriekeken van deze kwaliteitscontrole, geeft de Prosigna-test de volgende resultaten:

Tabel 8: Resultaten en opbrengst van de Prosigna-test

Resultaat	Opbrengstwaarden
Het intrinsieke subtype van het borstkankermonster	Luminaal A Luminaal B HER2-verrijkt Basaalachtig
Individuele schatting van de mogelijkheid van terugkeer op een andere locatie binnen 10 jaar	0-100%
Risico van terugkeer (ROR)-score	Gehele waarde op een schaal van 0-100
Risicocategorie	Laag, gemiddeld, hoog

### 13.1 Intrinsieke subtypes

Het intrinsieke subtype van een borstkankertumor heeft aangetoond verwant te zijn aan de prognose in borstkanker in vroeg stadium. Gemiddeld hebben patiënten met een luminaal A-tumor aanzienlijk betere resultaten dan patiënten met luminaal-B-tumoren, HER2-verrijkt of basaalachtig<sup>25</sup>.

Het intrinsieke subtype wordt geïdentificeerd door het genexpressieprofiel van 50 genen in een onbekend monster te vergelijken met de verwachte expressieprofielen voor de vier intrinsieke subtypes. Het subtype met het meest gelijkende profiel wordt aan het onbekende monster toegewezen.

De meest algemene subtypes van borstkanker zijn de lumbinale subtypes, lumbinaal A (LumA) en lumbinaal B (LumB). Voorgaande onderzoeken suggereren dat lumbinaal A ongeveer 30% - 40% omvat en lumbinaal B ongeveer 20% van de borstkankers<sup>5</sup>. Meer dan 90% van de patiënten die positief zijn voor hormoonreceptoren, hebben lumbinale tumoren. Van deze subtypes komt het patroon van genexpressie overeen met het lumbinale, epitheliale component van het borstweefsel<sup>5</sup>. Deze tumoren worden gekenmerkt door een hoge expressie van estrogeenreceptor (ER), progesteronreceptor (PR) en genen verwant met ER-activering, zoals LIV1, GATA3 en cycline D1, evenals de expressie van lumbinale cytokeratinen 8 en 18. Lumbinaal A -borstkankers tonen lagere expressie van genen die met activering van de celcyclus zijn verwant wanneer zij worden vergeleken met lumbinaal B-kankersoorten. Dit resulteert in een betere prognose.

Voorgaande onderzoeken suggereren dat het HER2-verrijkte subtype (HER2-E) ongeveer 20% van de borstkankers omvat<sup>5</sup>. HER2-verrijkte tumoren zijn over het algemeen echter ER-negatief, dus maar 5% van het geteste patiëntenbestand die ER-positief zijn getest, blijken HER2-verrijkte borstkanker te hebben. Ongeacht de ER-status zijn HER2-verrijkte tumoren in de meeste gevallen met hoge expressie van het ERBB2-cluster, inclusief ERBB2 en GRB7, HER2-positief. Genen die met activering van de celcyclus zijn verwant, zijn ook uitermate expressief.

Gepubliceerde gegevens suggereren dat het basaalachtige subtype ongeveer 20% van de borstkankers omvat<sup>5</sup>. Basaalachtige tumoren zijn echter meestal ER-negatief en dus heeft maar 1% van de hormoonreceptor-positieve patiënten basaalachtige borstkanker. Het basaalachtige subtype is meestal altijd klinisch HER2-negatief en toont een reeks "basale" biomarkers, inclusief de basale epitheliale cytokeratinen (CK) en epidermale groeifactorreceptor (EGFR). Genen die met activering van de celcyclus zijn verwant, zijn uitermate expressief.

### 13.2 ROR-score

De ROR-score is een geheel getal op een schaal van 0-100 die verwant is aan de mogelijke terugkeer op een andere locatie binnen 10 jaar bij individuele patiënten van de populatie van het gedefinieerde beoogde gebruik. De ROR-score wordt berekend door het expressieprofiel van 46 genen in een onbekend monster te vergelijken met de verwachte profielen voor de vier intrinsieke subtypes, zoals hierboven wordt beschreven om vier verschillende correlatiewaarden te berekenen. Deze correlatiewaarden worden dan met een proliferatiescore en de algemene tumorgrootte gecombineerd om de ROR-score te berekenen.

### 13.3 Mogelijke terugkeer op een andere locatie binnen 10 jaar

Voor 2 cohorten van postmenopauzale vrouwen met hormoonreceptor-positieve borstkanker in vroeg stadium werden de ROR-scores vergeleken met overleving zonder terugkeer op andere locatie na een operatie en behandeling met 5 jaar endocriene nevenbehandeling, gevolgd met 5 jaar observatie (zie paragraaf 16.4 Klinische prestaties voor details). Deze twee onderzoeken resulteerden in een model die de ROR-score aan de mogelijke terugkeer op een andere locatie bij deze geteste patiëntengroep koppelt, inclusief een betrouwbaarheidsinterval van 95%.

### 13.4 Risicoclassificatie

Risicoclassificatie wordt ook gegeven om interpretatie van de ROR-score toe te staan door cutoff-waarden te gebruiken die aan de klinische resultaten in geteste patiëntgroepen zijn verwant.

**Tabel 9: Risicoclassificatie per ROR-bereik en nodale status**

Nodale status	ROR-bereik	Risicoclassificatie
Klier-negatief	0-40	Laag
	41-60	Gemiddeld
	61-100	Hoog
Klier-positief (1-3 klieren)	0-15	Laag
	16-40	Gemiddeld
	41-100	Hoog
Klier-positief (≥ 4 klieren)	0-100	Hoog

### 13.5 Kwaliteitscontrole

Elke partij van de Prosigna-testcomponenten wordt met vooraf vastgestelde specificaties getest. Alle artikelen op pakketniveau worden volgens partij getraceerd en de belangrijke componenten in elk pakket worden samen getest en vrijgegeven als een Prosigna-pakketpartij.

De Prosigna-testkit bevat een reeks interne controle-elementen die worden gebruikt om van elke set als een geheel en elk monster individueel de kwaliteit te beoordelen. De controle-elementen worden hieronder in de lijst genoemd:

#### Batch-controle: *in vitro* getranscribeerd RNA-referentiemonster

In de Prosigna-testkit is een synthetisch RNA-referentiemonster als een controle-element opgenomen. Het referentiemonster bestaat uit *in-vitro* getranscribeerde RNA-doelen van de 50 algoritme- en 8 huishoudgenen. In elke Prosigna-test wordt het referentiemonster in tweevoud verwerkt, samen met

een set van tot 10 onbekende RNA-borsttumormonsters en in een strook van 12 reageerbuisjes. Het signaal van het referentiemonster wordt ten opzichte van vooraf gedefinieerde drempels getest om de run te kwalificeren.

Het signaal van elk van de 50 algoritmegeenen van het RNA-borsttumormonster wordt genormaliseerd ten opzichte van de overeenkomende genen van het referentiemonster.

#### Positieve controle: *in vitro* getranscribeerde RNA-doelen en overeenkomende detector- en opvangfragmenten

Voor de Prosigna-test worden synthetische RNA-doelen als positieve controle-elementen (PC's) gebruikt. De PC-doelsequenties stammen af van de externe RNA-controleconsortium (ERCC) DNA-sequentiebibliotheek<sup>6</sup>. De RNA-doelen zijn *in vitro* getranscribeerd van DNA-plasmiden. In de testkit zijn zes RNA-doelen opgenomen in een 4-voudige titratieserie (128 - 0,125 fM eindconcentratie in de hybridisatiereactie), samen met de overeenkomende detector- en opvangfragmenten. De PC's zijn aan elk RNA -borsttumormonster en referentiemonster toegevoegd die met de Prosigna-test zijn getest. Als de signaalintensiteiten van de PC's niet overeenkomen met de vooraf gedefinieerde drempels dan wordt een monster voor verdere analyse gediskwalificeerd.

#### Negatieve controle: exogene fragmenten zonder doelen

Negatieve doelsequenties voor controle stammen af van de ERCC DNA-sequentiebibliotheek<sup>6</sup>. Als deel van de testkit zijn de fragmenten opgenomen die zijn ontworpen om deze doelsequenties te detecteren, zonder de overeenkomende doelsequentie. De negatieve controle-elementen (NC's) zijn als een maatregel voor kwaliteitscontrole aan elk RNA -borsttumormonster en referentiemonster toegevoegd die met de Prosigna-test zijn getest. Als de signaalintensiteiten van de NC's niet overeenkomen met de vooraf gedefinieerde drempels dan wordt een monster voor verdere analyse gediskwalificeerd.

#### Controle voor RNA-integriteit: huishoudgenen

Als deel van de Prosigna-kit zijn detector- en opvangfragmenten opgenomen die zijn ontworpen om 8 huishoudgenen en 50 algoritmegeenen te detecteren. De expressieniveaus van de 8 huishoudgenen worden getest om de kwaliteit van RNA vast te stellen dat van het FFPE-weefselmonster is geëxtraheerd en ingevoerd in de Prosigna-test. Als de expressieniveaus van de huishoudgenen onder de vooraf gedefinieerde drempels vallen dan wordt het monster voor verdere analyse gediskwalificeerd.

De huishoudgenen worden ook gebruikt om verschillen in de ongeschonden RNA-hoeveelheid in een monster te normaliseren vóór de normalisatie van het referentiemonster.

## 14 BEPERKINGEN VAN DE PROCEDURES

1. De Prosigna-test is geoptimaliseerd om het intrinsieke subtype van een borstkankertumor en het 10-jaar risico van terugkeer op een andere locatie als een ROR-score en risicocategorie te identificeren. Hierbij wordt gezuiverde RNA gebruikt dat uit met formale gefixeerd, in paraffine ingebed menselijk borstweefsel is geëxtraheerd. Andere typesmonsters of fixeermiddelen zijn niet getest en moeten niet worden gebruikt.
2. De prestatie van de Prosigna-test werd met behulp van de procedures gevalideerd die alleen in deze bijsluiters worden genoemd. Wijzigingen aan deze procedures kunnen de prestatie van de test wijzigen.
3. Prestatie-eigenschappen van de Prosigna-test zijn opgesteld voor postmenopauzale vrouwen met hormoonreceptor-positieve borstkanker in een vroeg stadium die gedurende 5 jaar met endocriene nevenbehandeling werden behandeld. Prestatie met andere behandelingsregimes of in andere patiëntgroepen is niet vastgesteld.
4. Als RNA van onvoldoende kwaliteit of hoeveelheid aan de test wordt toegevoegd, dan is de Prosigna-test mogelijk niet in staat om een geldig resultaat te geven en meldt het in plaats daarvan een mislukte test.
5. De interpretatie van de Prosigna-testresultaten (intrinsiek subtype, ROR-score, risicocategorie) moet binnen de context worden geëvalueerd van andere klinicopathologische factoren, de medische geschiedenis van de patiënt en resultaten van enige andere laboratoriumtests.
6. De prestatie van de Prosigna-test is vastgesteld met RNA dat aan de specificaties voldoet die in referentie met de hierboven gegeven procedure zijn gedefinieerd. Prestatie met geïsoleerd RNA dat niet aan deze specificaties voldoet is niet vastgesteld.
7. Bekende substanties die de Prosigna-test verstoren, omvatten genoom DNA en niet-tumorweefsel (bijv. normaal weefsel). Raadpleeg de algemene overwegingen van de test voordat u de procedure start. Voordat de procedure wordt uitgevoerd, moet het gebied van levensvatbare invasieve carcinoom duidelijk worden geïdentificeerd door een patholoog. Aanvullend moet elk RNA-monster met DNase worden behandeld. Voordat men doorgaat met de testmonsters van de patiënt moet elke nieuwe partij DNase volgens de gegeven specificaties worden getest en gekwalificeerd als een andere isolatiekit wordt gebruikt dan de Roche FFPE RNA-isolatiekit.

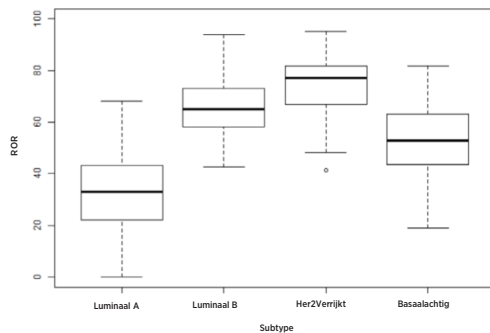
## 15 VERWACHTE WAARDEN

De Prosigna-test geeft voor elk tumormonster een ROR-score (0-100), een intrinsiek subtype (luminaal A, luminaal B, HER2-verrijkt of basaalachtig) en risicocategorisatie (laag, gemiddeld, hoog). Op basis van de twee klinische validatieonderzoeken die hieronder worden beschreven wordt bij postmenopauzale vrouwen met HR+ borstkanker in vroeg stadium, behandeld met anastrozol of tamoxifen tijdens de ATAC- en ABCSG-8-onderzoeken, het bereik en frequentie van ROR-scores (afbeelding 10), de doorlopende relatie van ROR naar mogelijke terugkeer op een andere locatie door de nodale status (afbeelding 11) en verdeling van ROR-scores per intrinsiek subtype (afbeelding 9) getoond die worden verwacht. Op basis van deze klinische validatieonderzoeken wordt in afbeelding 12 (klier-negatieve patiënten) en afbeelding 13 (klier-positieve (1-3 klieren) patiënten) de overleving zonder terugkeer op andere locatie gedurende 10 jaar per risicocategorisatie weergegeven.

### 15.1 ROR-bereik volgens subtype

Afbeelding 9 toont een boxplot van de ROR-score per intrinsiek subtype.

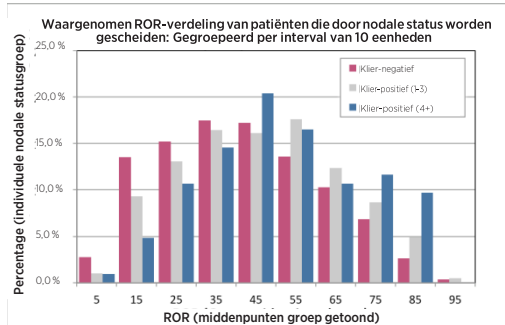
Afbeelding 9: Boxplot van ROR-score per intrinsiek subtype



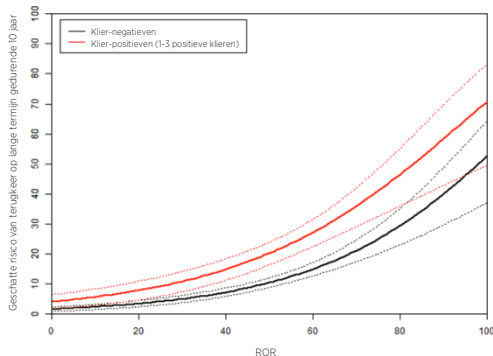
### 15.2 Frequentie van ROR-score volgens nodale status

Het histogram in afbeelding 10 werd met een enkelvoudig Cox-model gegenereerd dat een ROR-score en categorische variabelen omvatte om de drie nodale betrokken groepen te onderscheiden.

Afbeelding 10: Histogram van ROR-score en nodale statusgroepen



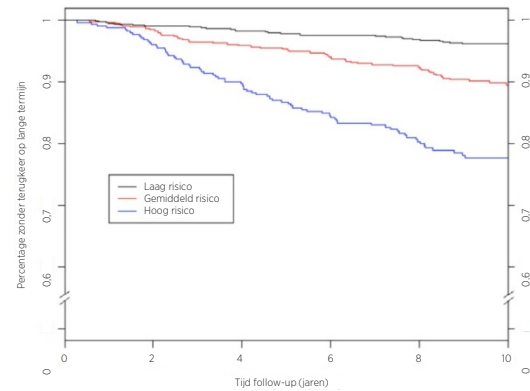
Afbeelding 11: Tien jarig voorspelde risicoschatting binnen nodale statusgroep



## 15.3 Overleving zonder terugkeer op andere locatie per risicocategorisatie

De volgende gegevens zijn afkomstig van de gecombineerde test van de TransATAC- en ABCSG-8-onderzoeken. Om patiënten aan risicogroepen toe te wijzen, werden ROR-scores met vooraf gedefinieerde risicodrempels vergeleken voor klier-negatieve of klier-positieve patiënten. Afbeeldingen 12 en 13 tonen voor elke risicocategoriegroep de 10-jarige overleving zonder terugkeer op andere locatie (DRFS) volgens nodale status.

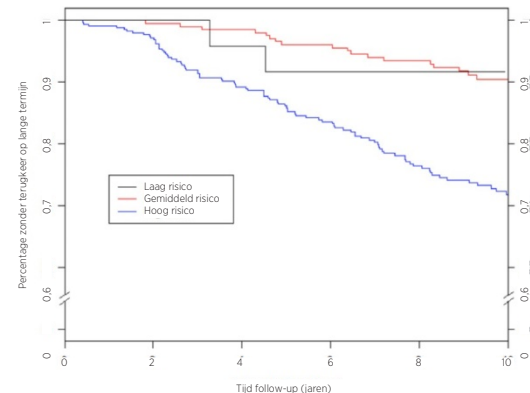
Afbeelding 12: DRFS per risicogroep voor klier-negatieve patiënten



Overzicht van gegevens voor afbeelding 12: DRFS per risicogroep voor klier-negatieve patiënten

Risicogroep	Aantal patiënten (%)	Aantal gebeurtenissen gedurende 10 jaar	Geschatte percentage zonder terugkeer op een andere locatie gedurende 10 jaar [95% CI]
Laag	875 (49%)	31	96,2% [94,7% - 97,3%]
Gemiddeld	551 (31%)	53	89,2% [86,1% - 91,7%]
Hoog	360 (20%)	73	77,7% [72,8% - 81,9%]
Totaal	1,786 (100%)	157	

Afbeelding 13: DRFS per risicogroep voor klier-positieve (1-3 klieren) patiënten



Overzicht van gegevens voor afbeelding 13: DRFS per risicogroep voor klier-positieve (1-3 klieren) patiënten

Risicogroep	Aantal patiënten (%)	Aantal gebeurtenissen gedurende 10 jaar	Geschatte percentage zonder terugkeer op een andere locatie gedurende 10 jaar [95% CI]
Laag	24 (4%)	2	91,7% [70,6% - 97,8%]
Gemiddeld	211 (36%)	18	90,4% [85,2% - 93,9%]
Hoog	355 (60%)	87	71,8% [66,3% - 76,6%]
Totaal	590 (100%)	107	

Tabel 10: Tienjarige DRFS-cijfers voor patiënten met 4 of meer positieve klieren

Risicogroep	Aantal patiënten	Aantal gebeurtenissen gedurende 10 jaar	Geschatte percentage zonder terugkeer op een andere locatie gedurende 10 jaar [95% CI]
Hoog	103	39	57,4% [46,3% - 67,0%]

## 16 PRESTATIE-EIGENSCHAPPEN

### 16.1 Analytische precisie en reproduceerbaarheid

Om algemene precisie en reproduceerbaarheid van Prosigna te schatten, werden twee onderzoeken uitgevoerd en werden de resultaten hiervan gecombineerd. Het eerste onderzoek dat werd uitgevoerd, was een precisieonderzoek op het nCounter-teststelsel dat werd gestart met geëxtraheerd borsttumor-RNA. Het tweede onderzoek was een reproduceerbaarheidsonderzoek dat met FFPE-borsttumorweefsel werd gestart en dat pre-analytische factoren omvatte.

#### RNA-precisie

##### 16.1.1 Onderzoeksopzet

Met de Prosigna-test op het nCounter-teststelsel werd op drie locaties een blind en gerandomiseerd vergelijkend onderzoek uitgevoerd om de analytische precisie te beoordelen. Om op elke locatie een test uit te voeren, werden van gearhiveerde FFPE-monsters vijf samengestelde RNA-monsters van borsttumor gegenereerd. Het monsterpaneel vertegenwoordigde prototypische genexpressieprofielen die te zien zijn tijdens routinetesten en elke risicoclassificatiegroep.

Elke locatie voltooide 18 geldige runs (9 runs per operator, elke run bestaand uit 10 tests), na door een kennismakingsuitvoering door elke operator (tabel 11). Elke monster werd tijdens elke run tweevoudig getest op het nominale RNA-inputniveau van 250 ng voor de test. Elke operator voltooide op een bepaalde dag één run volgens de algemeen aanvaarde standaard voor lange uitvoeringsmethoden<sup>7</sup>. De totale onderzoeksperiode, inclusief kennismaking, duurde op elke locatie meer dan 4 weken.

Tabel 11: Overzicht van RNA-precisieonderzoek

Onderzoeksvaariabele	Aantal
# RNA-borsttumormonsters	5
# monsterreplica's per run (hetzelfde patroon)	2
# runs/locatie	18
# runs/dag	1
# operators/locatie	2
# reagenspartij/locatie	3
# locaties	3
<i>Totaal # monsters getest per locatie (exclusief kennismaking) =</i>	<i>180</i>
<i>Totaal # monsters =</i>	<i>540</i>

##### 16.1.2 Variantietest componenten

Tabel 12 toont de output van de variantietest van componenten voor elk paneelid. Onder de geschatte variantie is het percentage van totale variantie weergegeven (tussen haakjes).

Tabel 12: Variantiecomponenten volgens paneelid (samengesteld RNA-monster)

Panellid per risico, subtype	Gemiddelde ROR	Variantiecomponent					Totaal variantie	Totale SD
		Partij	Locatie	Operator	Run	Binnen de run		
Luminaal A laag	31,4	0,010 (2%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,134 (30%)	0,296 (67%)	0,44 (100%)	0,66
Luminaal B gemiddeld	55	0,105 (18%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,046 (8%)	0,426 (74%)	0,576 (100%)	0,76
Basaalachtig gemiddeld	55,4	0,059 (20%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,046 (15%)	0,194 (65%)	0,299 (100%)	0,55
Luminaal B hoog	64,8	0,119 (21%)	0,014 (2%)	0,000 (0%)	0,064 (11%)	0,380 (66%)	0,576 (100%)	0,76
HER2-verrijkt Hoog	76,2	0,165 (37%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,000 (0%)	0,277 (63%)	0,442 (100%)	0,66

Voor alle vijf panelleden was de totale SD minder dan 1 ROR-eenheid op een schaal van 0-100. Voor alle panelleden kwam het grootste gedeelte van de omvang van de variantie van variantie binnen de run (herhaalbaarheid). Er was bijna geen variantie van locatie tot locatie of van operator tot operator. Een test van aannemelijkheidsverhouding voor significantie van een locatie per paneelid toonde aan dat de locatieverschillen statistisch gezien niet-significant waren ( $p > 0,05$ ). Voor elke partij waren de gemiddelde ROR-scores minder dan 1 ROR-eenheid van elkaar verwijderd voor elk paneelid, hetgeen gemiddeld ongeveer 20% bijdroeg aan de algemene variantie.

##### 16.1.3 Overeenstemming van subtype-toewijzing en risicoclassificatie

Voor alle panelleden was er een overeenkomst van 100% tussen het subtype-resultaat en het intrinsieke subtype van het paneelid. Voor alle monsters was er een overeenkomst van 100% tussen de gemeten en verwachte risicogroep.

## Reproduceerbaarheid van weefsel

### 16.1.4 Onderzoeksopzet

Een blind en gerandomiseerd vergelijkend onderzoek op drie locaties waarbij monsterreplica van borsttumorweefsel wordt gebruikt van hetzelfde FFPE-blok. Deze werden met de Prosigna-test op het nCounter-teststelsel getest. Als onderdeel van het onderzoek werd een set van 43 recent verzamelde FFPE-borsttumormonsters van hormoonreceptor positieve borstkankerpatiënten met bevestigde invasief ductaal en/of lobulair carcinoom getest. Alle weefselmonsters werden voor verwerking naar de betreffende testlocatie verzonden. De 43 monsters werden onafhankelijk door drie afzonderlijke pathologen beoordeeld. Voor elk pathologisch beoordeeld weefselmonster werd op elke locatie door een enkele operator met gebruik van de gedefinieerde testprocedure een test uitgevoerd die uit macrodissectie van het weefsel, RNA-extractie en tests met de Prosigna-test bestond. Van elk weefselmonster werd het geïsoleerde RNA twee keer in afzonderlijke test-runs getest. Tijdens de uitvoering van dit onderzoek werden drie partijen van de RNA-isolatiekit (één per locatie) en een enkele partij reagentia van de testkit gebruikt. Er werd een enkel objectglasje ingevoerd voor RNA-extractie terwijl het oppervlaktegebied van de tumor  $\geq 100 \text{ mm}^2$  werd gemeten en er werden 3 objectglasjes ingevoerd toen het tumoroppervlak van  $< 100 \text{ mm}^2$  werd gemeten, waarbij een minimaal oppervlaktegebied van de tumor van  $4 \text{ mm}^2$  werd vereist.

### 16.1.5 Testoverzicht

De succesgevallen van de drieënveertig (43) weefselmonsters die op elk van de drie locaties werden beoordeeld, wordt in tabel 13 weergegeven.

Tabel 13: Succesgevallen op elke locatie

Locatie	Resultaat leverend percentage	Geslaagd/totaal
1	95%	41/43
2	93%	40/43
3	100%	43/43

Veertig monsters behaalden resultaten op alle locaties (op één locatie vereiste de RNA-isolatie van één monster een herhaling), 1 monster behaalde resultaten op 2 locaties en 2 monsters behaalden resultaten op één enkele locatie. Honderd procent (100%) van de monsters slaagden voor de weefselbeoordeling en de specificaties van de RNA-isolatie behaalde slagende resultaten voor de Prosigna-test. Het gemeten oppervlaktegebied van de tumor voor 4/5 mislukte RNA-isolaties was  $\leq 15 \text{ mm}^2$ , wat gelijk is aan minder dan  $50 \text{ mm}^2$  totaal weefselgebied per gebiedsinput in de test.

De 43 monsters omvatten zowel klier-negatieve als klier-positieve patiënten. De berekende testresultaten van de 43 monsters vertegenwoordigen een breed bereik (94 eenheden) van ROR-scores, alle 4 intrinsieke subtypes en alle risicocategorieën wanneer op alle monsters de klier-negatieve of klier-positieve cutoff-waarden worden toegepast. De twee monsters met resultaten op een enkele locatie werden uitgesloten van alle opvolgende statistische tests omdat er geen beschikbare gegevens waren om binnen de locaties te vergelijken.

### 16.1.6 Variantietest componenten

Er waren statistisch geen significante ( $\alpha = 0,05$ ) verschillen binnen de risicocategorieën die een niet-parametrische Kruskal-Wallis-test gebruikten. Hierdoor was het variantiemodel van de componenten gelijktijdig binnen alle risicocategorieën geschikt.

Tabel 14 toont de resultaten van de variantie-test van componenten waarbij alle 41 weefselmonsters worden gebruikt.

Tabel 14: Variantiecomponenten (onderzoek voor reproduceerbaarheid van weefsel)

Locatie	Variantiecomponenten			Totaal	Totale SD
	Binnen blok	Restant	Totaal		
0,10	7,72	0,51	8,34	2,89	

De locatiecomponent meet systematisch de locatiespecifieke variatie, het component "Binnen blok" meet een willekeurige variatie die verschilt als functie van beoordeling/verwerking van weefselmonster of binnen een FFPE-blokvariantie en de restantvariantie meet de gecombineerde run tot run-variabiliteit en binnen-run-variabiliteit in de Prosigna-test. De locatiecomponent is heel klein ten opzichte van de willekeurige variabiliteit binnen het blok. Dit geeft aan dat de verschillen gemiddeld verwaarloosbaar zijn tussen de locaties ( $< 1\%$  totale variantie). De restantvariantie was consistent met de gelijkwaardige variabiliteit die in het RNA-precisieonderzoek werd gemeten. Deze had minder monsters maar meer replicatiemetingen (0,51 variantie vergeleken met een gemiddelde enkele locatie binnen de variantie van de Prosigna-reagenspartij van 0,39 voor het RNA-precisieonderzoek).



Tabel 15 vat de totale variabiliteit samen met behulp van de som van de weefselverwerkingsvariabiliteit (locatie en binnen-blokcomponenten van tabel 14 van dit onderzoek), evenals de totale RNA-verwerkingsvariabiliteit van het RNA-precisieonderzoek (gemiddeld genomen binnen de vijf geteste panelleden in tabel 12). De primaire variatiebron voor de test (94% van totale variantie) bestaat uit pre-analytische factoren die met weefselverwerking zijn verwant. De totale SD die alle variatiebronnen omvat, is gelijk aan 2,9. Dit geeft aan dat de Prosigna-test een betrouwbare meting van verschil is tussen twee ROR-waarden van 6,75, met een betrouwbaarheid van 95%.

Tabel 15: Totale variabiliteit (weefsel- en RNA-verwerking)

Weefselverwerkings-variabiliteit	RNA-verwerkings-variabiliteit	Totale variabiliteit	Totale SD
7,82	0,47	8,29	2,9

### 16.1.7 Overeenkomst van risicocategorie en subtype-classificaties

In tabel 16 wordt de locatie-tot-locatie-overeenkomst volgens subtype patiënt en risicoclassificatie (laag/gemiddeld/hoog) getoond. Hier worden op alle monsters de respectievelijke risico-cutoff-waarden voor de klier-negatieve en klier-positieve classificaties toegepast. De betrouwbaarheidsintervallen van 95% voor exacte types wordt tussen vierkante haakjes getoond en het aantal monsters met resultaten op beide locaties worden tussen haakjes getoond. De gemiddelde overeenkomst wordt in de laatste kolom getoond. Voor elke vergelijking werd de overeenkomst in twee stappen berekend. Eerst werd voor elk weefselmonster de proportie van de vier mogelijke resultaatparen (twee op locatie 1 \* twee op locatie 2) berekend die overeen kwamen. In de tweede stap werd van deze proporties binnen alle weefselmonsters het gemiddelde genomen, wat resultaten op beide locaties in de gegeven

Tabel 16: Overzicht overeenkomst subtype en risicocategorie per klierstatus

Vergelijkings-type	Paarsgewijze overeenkomst			Gemiddelde overeenkomst
	Locatie 1 vs. locatie 2 (n = 40)	Locatie 1 vs. locatie 3 (n = 41)	Locatie 2 vs. locatie 3 (n = 40)	
Subtype	96,3% [86,4%-99,5%]	98,8% [91,0% - 100%]	95% [83,1% - 99,3%]	97%
Risicocategorie	87,5% [73,2% - 95,8%]	92,7% [80,1% - 98,4%]	90% [76,4% - 97,2%]	90%
Risicocategorie klier-positief	88,8% [75,9% - 96,0%]	92,7% [80,1% - 98,4%]	91,3% [79,2% - 97,4%]	91%

Voor elke vergelijking (subtype en klier-negatieve en klier-positieve risicocategorieën) was de gemiddelde overeenkomst tussen de locaties ten minste 90%. Er waren geen monsters waarbij de risicocategorie van laag risico naar hoog risico (of omgekeerd) veranderde tussen of binnen de locaties. Er waren maar twee monsters (van de 41) die geen identieke subtypes gaven binnen alle 6 replica:

1. Eén monster had dubbele lumaal A-resultaten op één locatie en dubbele lumaal B-resultaten op elk van de twee andere locaties.
2. Eén monster had dubbele lumaal A-resultaten op één locatie, dubbele HER2-verrijkte resultaten op een andere locatie en één van elke lumaal A en HER2-verrijkte resultaten op de derde locatie.

## 16.2 Gevoeligheid/RNA-input

### Beschrijving RNA-inputonderzoek

Het onderzoek testte 13 RNA-borsttumormonsters in drie RNA-inputniveaus binnen testspecificatie (500, 250 en 125 ng) en twee aanvullende RNA-inputniveaus buiten de specificatie (625, 62,5 ng). Elk monster werd in een enkele testrun met elke kitpartij (2 partijen in totaal) getest. Deze run omvatte dubbele meting op elk niveau in de specificatie en een enkele meting voor elk niveau buiten de specificatie. In elke testuitvoering werden dubbele blanco (d.w.z. geen doel) metingen opgenomen. Een enkel monster werd met maar een enkele partij getest.

### Resultaten RNA-inputonderzoek

Alle gemeten blanco monsters (n = 46) waren ver onder de signaaldrempel en gaven een mislukt testresultaat (0% succesgevallen). Alle RNA-tumormetingen binnen testspecificatie (n = 138) gaven een geslaagd testresultaat (100% succesgevallen). Honderd procent (100%) van de monsters met input boven de specificatie (625 ng) gaven een geslaagd testresultaat. Drieëntachtig procent (83%) van de monsters (10/12) die op een input onder de specificatie (62,5 ng) werden getest, gaven een testresultaat in partij 1, en 100% in partij 2.

De gemiddelde ROR-score voor de 13 monsters besloeg een breed bereik (20-82). Binnen alle RNA-inputniveaus voor de 13 geteste monsters was de risicogroepclassificatie (laag/gemiddeld/hoog) 100% overeenkomstig. Tabel 17 vat de variatie in de ROR-score als een functie van de RNA-input samen. Het gemiddelde verschil van ROR-score tussen RNA-inputniveaus, de SD voor de verschillen en het

90% betrouwbaarheidsinterval werden gebruikt om te evalueren of de ROR-scores die van verschillende RNA-inputniveaus werden gegenereerd, gelijk waren aan degenen die met behulp van het doelniveau van 250 ng werden gegenereerd. Om aan het acceptatiecriterium te voldoen, moest het betrouwbaarheidsinterval volledig vallen tussen -3 en +3 ROR. Op de twee uiterste niveaus van het specificatiebereik van de test (125 en 500 ng RNA), waren de ROR-scores gelijk aan die bij de concentratie van de doelinput van 250 ng voor elk van de twee geteste kitpartijen. Voor elk niveau buiten de testspecificatie waren de ROR-scores gelijk voor één van de partijen, maar niet voor de andere partij.

Tabel 17: Overzicht verschillende ROR-scores Telling is gelijk aan aantal monsters die in test zijn opgenomen.

Pakketpartij	Massa (ng)	Telling	Gemiddelde ROR-verschil	SD van verschil	Lagere vertrouwens-limiet	Hogere vertrouwens-limiet
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
20536	625 - 250	12	-0,13	0,86	-0,53	0,28
	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

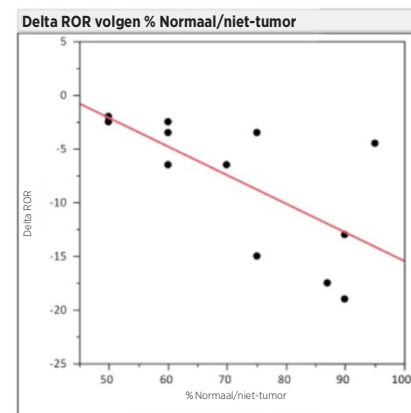
## 16.4 Interferentietest

### Aangrenzend normaal/niet-tumorweefsel

In FFPE-borsttumorblokken is over het algemeen naastliggend normaal/vergelijkend gegenereerd. niet-tumorborstweefsel aanwezig. Dit kan bij pathologische controle als een onderscheidend gebied worden geïdentificeerd van het gebied van het invasieve borstcarcinoom. De Prosigna-testprocedure hierboven geeft de verwijdering aan van naastliggend normaal weefsel door middel van macrodissectie. Om het risico van besmetting van normaal weefsel bij de testresultaten te beoordelen, werd een totaal van 13 FFPE-borsttumorblokken getest die pathologisch bevestigde infiltrerend ductaal carcinoom en ongeveer 50-95% omliggend normaal/niet-tumorweefsel bevatten getest, met en zonder macrodissectie van het omliggend weefsel en het verschil in de ROR-score (delta-ROR) werd vastgesteld.

Gemiddeld was de ROR van het macrogedissecteerde tumormonster bijna 8 ROR-eenheden hoger dan wat werd waargenomen wanneer het normale/niet-tumorweefsel niet werd verwijderd. Afbeelding 14 geeft aan dat als de hoeveelheid normaal weefsel toeneemt (tot 95% niet verwijderd door macrodissectie), er een toenemend risico bestaat dat de gemelde ROR-score een onderschatte of negatief beïnvloedde (tot -19 ROR-eenheden) puntschatting zal zijn van het terugkeerisico bij een patiënt.

Afbeelding 14: Impact van normaal/niet-tumorweefsel op delta ROR



### Interferentie van necrotisch, hemorrhagisch en DCIS (ductal carcinoma in situ)-weefsel

Om het risico van besmetting van necrotisch/hemorrhagisch/DCIS-weefsel bij de testresultaten te beoordelen, werd een totaal van 11 FFPE-borsttumorblokken (3 DCIS, 5 necrotisch, 3 hemorrhagisch) getest die pathologisch bevestigde invasief borstcarcinoom en ongeveer 10-30% van het interfererende weefsel bevatte getest, met en zonder macrodissectie van het interfererende weefsel en het verschil in de ROR-score (delta-ROR) werd vastgesteld. Op de geteste niveaus had het effect van bloed/hemorrhagisch, DCIS en necrotisch weefsel dat in de procedure werd opgenomen, een te negeren invloed op de gemelde ROR-score (< 6 ROR-eenheden). Er was in de toekenning van de risicocategorie een overeenkomst van 100% tussen de elf necrotische, hemorrhagische en DCIS-monsters met en zonder macrodissectie.

## Menselijk genomisch DNA

De Prosigna-Analyseprocedure bestaat onder andere uit verwijdering van menselijk genomisch DNA (gDNA) door ontbinding met DNase. Om het risico van gDNA-besmetting op de testresultaten te beoordelen, werden tien (10) borsttumorblokken getest die pathologisch bevestigde, infiltrerend ductaal carcinoom bevatten, getest met +/- verwijdering van menselijk genomisch DNA door binnen de procedure de DNase-stap over te slaan. In de geteste monsters was de ROR-score gemiddeld 4 tot 5 eenheden lager in de lage en gemiddelde risicogroepen als gDNA met DNase I was verwijderd (zie tabel 18). Als de monsters die niet met DNase waren behandeld, vervolgens met DNase I werden behandeld (nabehandeling), dan kwamen de ROR-scores overeen met de ROR-waarden die oorspronkelijk met volgens protocol uitgevoerde DNase-behandeling werd waargenomen. Er bestaat een risico dat de gemelde ROR-score een overschatte of positief beïnvloedde (tot 7 ROR-eenheden) puntschatting is van het terugkeerrisico bij patiënten als gDNA aanwezig is. Aanvullend was het berekende signaal voor monsters zonder DNase I-behandeling aanzienlijk lager ( $p < 0,05$ ) dan die met DNase I waren behandeld. Dit kwam door de interferentie binnen de absorptiemeting die werd gebruikt om de hoeveelheid RNA te bepalen voordat met de Prosigna-test werd getest.

Tabel 18: Impact van behandeling met DNase op ROR in tumormonsters

ROR Categorie	Geteste FFPE-monsters	ROR-verschil met DNase I - zonder DNase I			ROR-verschil met DNase I - met DNase I (nabehandeling)		
		Gemiddeld	Min	Max	Gemiddeld	Min	Max
Laag	3	-4,0	-6,0	-1,0	0,7	-1,0	3,0
Gemiddeld	2	-4,5	-7,0	-2,0	1,0	0,0	2,0
Hoog	5	0,4	-1,0	2,0	0,4	-1,0	1,0

## 16.4 Klinische prestatie

Er werden twee klinische validatieonderzoeken uitgevoerd om de Prosigna-test voor prognostische gesignatuur bij borstkanker te valideren. De primaire doelstelling van beide onderzoeken was het valideren van gepubliceerde waarnemingen dat de risico van terugkeer (ROR)-score aanvullende prognostische informatie biedt voor overleving zonder terugkeer op andere locatie gedurende 10 jaar over en boven standaard klinische variabelen. Ook een secundaire doelstelling van beide onderzoeken was gericht op het valideren van voorgaande waarnemingen dat lumaal A- en lumaal B-patiënten statistisch aanzienlijke verschillende overleving zonder terugkeer op andere locatie gedurende 10 jaar hebben. Omdat de invoercriteria en -resultaten van deze twee onderzoeken vergelijkbaar waren, werden de twee databases gecombineerd en met een prospectief gedefinieerd testplan getest, die dezelfde doelstellingen had als de twee individuele onderzoeken.

## Gecombineerde test: met gecombineerde resultaten van de Prosigna-test van TransATAC en ABCSG-8 risicocurven genereren.

Hieronder kan een overzicht van behandelings- en klinische eigenschappen van de gecombineerde test worden gevonden. Zie de volgende paragrafen voor respectievelijke onderzoeken 1 en 2 voor ontwerp- en test-informatie van de individuele onderzoeken.

## Test

Tabel 19: Overzicht van behandelings- en klinische eigenschappen in gecombineerde test van onderzoeken 1 en 2

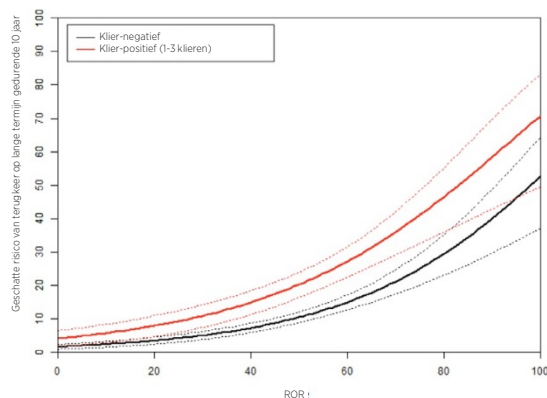
Eigenschap	Waarde	Klier-negatief (n = 1,786)		1-3 positieve klieren (n = 590)		≥ 4 positieve klieren (n = 103)	
		Trans ATAC (n = 739)	ABCSG8 (n = 1,047)	Trans ATAC (n = 208)	ABCSG8 (n = 382)	Trans ATAC (n = 54)	ABCSG8 (n = 49)
Behandeling	Een anastrozol	377 (51,0%)	528 (50,4%)	102 (49,0%)	184 (48,2%)	31 (57,4%)	25 (51,0%)
	Alleen Tamoxifen	362 (49,0%)	519 (49,6%)	106 (51,0%)	198 (51,8%)	23 (42,6%)	24 (49,0%)
Kwaliteit	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%)
Tumorgrootte	≤ 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	Negatief	649 (87,8%)	984 (94,0%)	186 (89,4%)	367 (96,1%)	47 (87,0%)	46 (93,9%)
	Positief	90 (12,2%)	63 (6,0%)	22 (10,6%)	15 (3,9%)	7 (13,0%)	3 (6,1%)
Terugkeringen	Andere locatie	79 (10,7%)	91 (8,7%)	50 (24,0%)	64 (16,8%)	31 (57,4%)	10 (20,4%)
	Enige	117 (15,8%)	121 (11,6%)	59 (28,4%)	73 (19,1%)	34 (63,0%)	10 (20,4%)
Intrinsiek subtype NanoString	Lumaal A	529 (71,6%)	725 (69,2%)	127 (61,1%)	248 (64,9%)	31 (57,4%)	31 (63,3%)
	Lumaal B	176 (23,8%)	284 (27,1%)	68 (32,7%)	118 (30,9%)	20 (37%)	16 (32,7%)
	Basaalachtig	7 (0,9%)	6 (0,6%)	2 (1,0%)	2 (0,5%)	0 (0%)	0 (0%)
	HER2-verrijkt	27 (3,7%)	32 (3,1%)	11 (5,3%)	14 (3,7%)	3 (5,6%)	2 (4,1%)

Beiden onderzoeken hadden een behandelingstak van 5 jaren met Tamoxifen. Bij TransATAC bestond de andere behandelingstak uit 5 jaren met Anastrozole, terwijl de tweede tak in het ABCSG-8-onderzoek uit 2 jaren met Tamoxifen bestond, gevolgd met 3 jaren met Anastrozole. Toen DR als een functie van alle klinische en behandelingsvariabelen werd gemodelleerd, droeg de behandeling niet aanzienlijk bij ( $p = 0,66$ ) als voorspeller van DR. De andere hoofdverschillen tussen deze onderzoeken was het feit dat het TransATAC-onderzoek patiënten omvatte met tumoren van Fase 3 en dat het algemene terugkeerratio hoger was in het TransATAC-onderzoek dan in het ABCSG-8-onderzoek.

## Resultaten

Afbeelding 15 toont het 10-jarige risico van DR als een functie van de ROR-score, met 95% vertrouwensbanden op basis van afzonderlijke Cox-proportionele gevarieerde modellen voor elk van de klier-negatieve en klier-positieve (1-3 positieve klieren) patiëntgroepen.

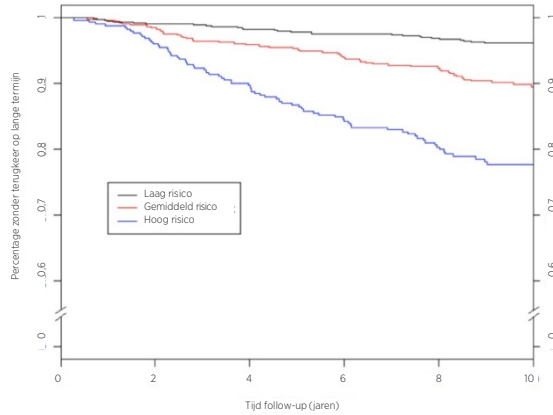
Afbeelding 15: Tienjarig geschatte DR-risico volgens klierstatus met 95% vertrouwensintervallen



Afbeelding 16 toont de Kaplan-Meier- en incidentieplots per risicogroep voor klier-negatieve patiënten en afbeelding 17 toont dezelfde plots voor klier-positieve patiënten met 1-3 positieve klieren. In elke afbeelding worden details van monstergrootten, aantal gebeurtenissen en geschatte percentage zonder terugkeer op een andere locatie gedurende 10 jaar volgens risicogroep gegeven. In de klier-positieve patiëntengroep waren maar een paar patiënten in de vooraf gedefinieerde lage-risicogroepen die in de Kaplan-Meier-curve het

betrouwbaarheidsinterval veroorzaakten en hierdoor de geschatte 10-jarige DRFS zeer breed maakte.

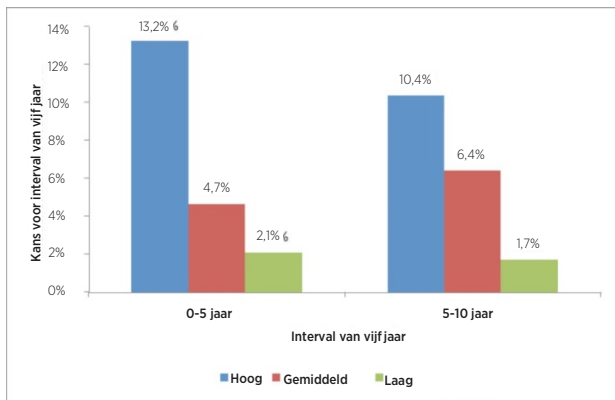
**Afbeelding 16A: DRFS per risicogroep voor klier-negatieve patiënten**



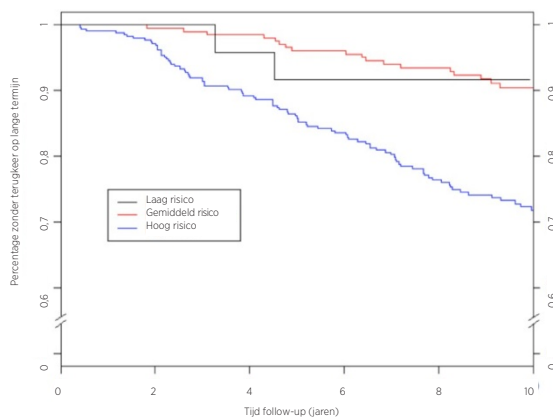
**Gegevensoverzicht voor afbeelding 16A: DRFS per risicogroep voor klier-negatieve patiënten**

Risicogroep	Aantal patiënten (%)	Aantal gebeurtenissen gedurende 10 jaar	Geschatte percentage zonder terugkeer op een andere locatie gedurende 10 jaar [95% CI]
Laag	875 (49%)	31	96,2% [94,7% - 97,3%]
Gemiddeld	551 (31%)	53	89,2% [86,1% - 91,7%]
Hoog	360 (20%)	73	77,7% [72,8% - 81,9%]
Totaal	1.786 (100%)	157	

**Afbeelding 16B: Incidentie op risicogroep voor klier-negatieve patiënten in intervallen van vijf jaar**



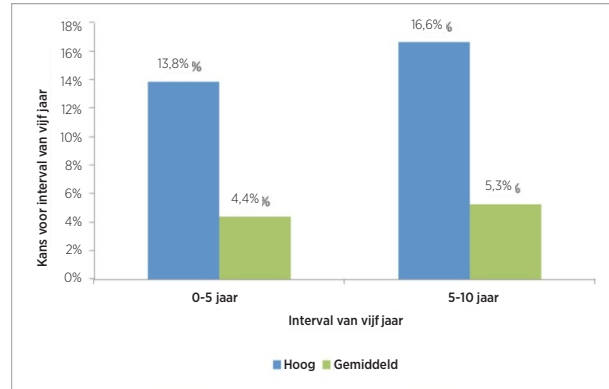
**Afbeelding 17A: DRFS per risicogroep voor klier-positieve patiënten met 1 tot 3 positieve klieren**



**Gegevensoverzicht voor afbeelding 17A: DRFS per risicogroep voor klier-positieve patiënten met 1 tot 3 positieve klieren**

Risicogroep	Aantal patiënten (%)	Aantal gebeurtenissen gedurende 10 jaar	Geschatte percentage zonder terugkeer op een andere locatie gedurende 10 jaar [95% CI]
Laag	24 (4%)	2	91,7% [70,6% - 97,8%]
Gemiddeld	211 (36%)	18	90,4% [85,2% - 93,9%]
Hoog	355 (60%)	87	71,8% [66,3% - 76,6%]
Totaal	590 (100%)	107	

**Figure 17B: Incidence by Risk Group for Node-Positive (1-3 nodes) Patients in Five Year Intervals**



In afbeelding 17B zijn deze patiënten samengevoegd met de gemiddelde patiënten voor de late terugkeeraanalyse, aangezien er maar 24 patiënten waren met 2 gebeurtenissen in de klier-positieve groep met een laag risico.

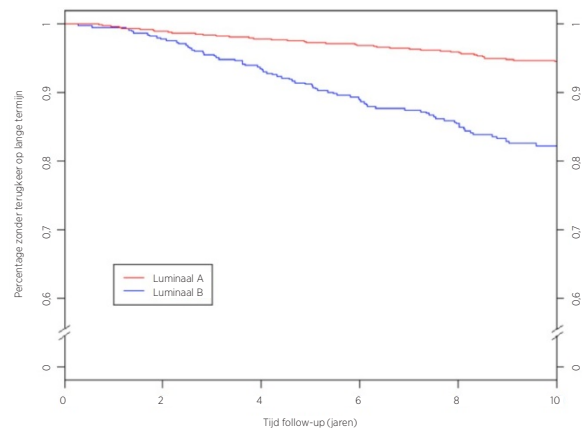
Alle 103 patiënten in de gecombineerde database met 4 of meer positieve klieren, worden als hoog risico geclassificeerd. Tabel 20 toont de tienjarige DRFS-cijfers voor deze patiënten.

**Tabel 20: Tienjarige DRFS-cijfers voor patiënten met 4 of meer positieve klieren**

Risicogroep	Aantal patiënten	Aantal gebeurtenissen gedurende 10 jaar	Geschatte percentage zonder terugkeer op een andere locatie gedurende 10 jaar [95% CI]
Hoog	103	39	57,4% [46,3% - 67,0%]

Het merendeel van de patiënten in de gecombineerde onderzoeken (96%) waren of lumaal A of lumaal B. Afbeelding 18 toont een vergelijking van DRFS volgens lumaal subtype voor klier-negatieve patiënten.

**Afbeelding 18: Kaplan-Meier-curven voor DRFS per intrinsiek subtype voor klier-negatieve patiënten**

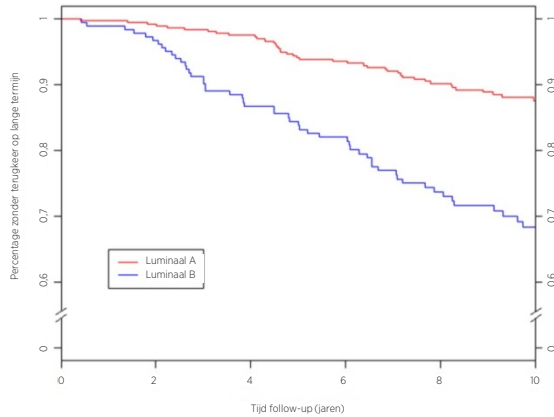


**Overzicht van gegevens voor afbeelding 18: Kaplan-Meier-curven voor DRFS per intrinsiek subtype voor klier-negatieve patiënten**

Risicogroep	Aantal patiënten	Aantal gebeurtenissen gedurende 10 jaar	Geschatte percentage zonder terugkeer op een andere locatie gedurende 10 jaar [95% CI]
Luminaal A	1254	62	94,6 [93,1 - 95,8]
Luminaal B	460	75	81,9 [77,7 - 85,3]
<i>Totaal</i>	<i>1.714</i>	<i>137</i>	

Afbeelding 19 toont dezelfde vergelijking voor klier-positieve patiënten met 1-3 positieve klieren. Voor beide groepen waren er aanzienlijke verschillen tussen de DRFS van luminaal A- en luminaal B-patiënten.

**Afbeelding 19: Kaplan-Meier-curven voor DRFS volgens intrinsiek subtype voor klier-positieve patiënten met 1-3 positieve klieren.**



**Overzicht van gegevens voor afbeelding 19: Kaplan-Meier-curven voor DRFS volgens intrinsiek subtype voor klier-positieve patiënten met 1-3 positieve klieren.**

Risicogroep	Aantal patiënten	Aantal gebeurtenissen gedurende 10 jaar	Geschatte percentage zonder terugkeer op een andere locatie gedurende 10 jaar [95% CI]
Luminaal A	375	41	87,6 [83,5 - 90,8]
Luminaal B	186	52	68,3 [60,4 - 75,0]
<i>Totaal</i>	<i>561</i>	<i>93</i>	

In de gecombineerde database waren maar 98 patiënten met luminaal subtype met 4 of meer positieve klieren. Tabel 21 toont de DRFS-cijfers voor tien jaar voor deze patiënten die ook een veel hoger risico lopen als zij een luminaal B subtype hebben.

**Tabel 21: DRFS-cijfers voor tien jaar voor patiënten met 4 of meer positieve klieren volgens luminaal-subtype**

Risicogroep	Aantal patiënten	Aantal gebeurtenissen gedurende 10 jaar	Geschatte percentage zonder terugkeer op een andere locatie gedurende 10 jaar [95% CI]
Luminaal A	62	17	68,3 [53,6 - 79,3]
Luminaal B	36	20	38,0 [21,4 - 54,5]
<i>Totaal</i>	<i>98</i>	<i>37</i>	

**Late terugkeeranalyse**

In de hiervoor beschreven samengevoegde analysedata zijn de gebeurteniscijfers binnen iedere risicogroep niet constant tijdens het interval van 10 jaar, zoals in afbeelding 16B en 17B is af te lezen. Om DR in de late terugkeerfase beter te begrijpen, is er een retrospectieve post-hoc analyse van de hierboven beschreven samengevoegde data uitgevoerd voor de subgroep patiënten waarbij de afgelopen vijf jaar DR niet is teruggekeerd op een andere locatie (in totaal 2163 patiënten<sup>9</sup>). Hiervan waren 1605 klier-negatieve en 488 klier-positieve patiënten (1-3 positieve klieren). De waarden onder de x-as in het vijfde jaar in afbeelding 20 en 21 geven voor iedere kliergroep het aantal patiënten weer per risicogroep die risico loopt, oftewel die in aanmerking komen voor de late terugkeeranalyse.

Tabel 22 geeft een overzicht van de behandeling en klinische kenmerken van de klier-negatieve en klier-positieve (1-3 klieren) patiënten in de late terugkeeranalyse.

**Tabel 22: Overzicht van behandeling en klinische kenmerken voor late terugkeeranalyse**

Eigenschap	Waarde	Klier-negatief (n = 1.605)		Klier-positief (1-3 klieren) (n = 488)	
		ABCSG8 (n = 944)	TransATAC (n = 661)	ABCSG8 (n = 311)	TransATAC (n = 177)
Behandeling	Een anastrozol	480	346	153	89
	Alleen Tamoxifen	464	315	158	88
Kwaliteit	Goed	192	158	46	36
	Gemiddeld	752	394	265	105
	Slecht	0	109	0	36
Tumor-grootte	≤ 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	Negatief	888	590	300	157
	Positief	56	71	11	20
Terugkeringen	Andere locatie	41	40	28	29
	Enige	71	78	37	37
Intrinsiek subtype Nanostring	Luminaal A	674	488	218	112
	Luminaal B	245	150	87	54
	Basaalachtig	4	5	0	1
	HER2-verrijkt	21	18	6	10

Het voornaamste doel was de beoordeling van het vermogen van de ROR-score om significante extra prognostische informatie voor DRFS te bieden over en boven standaard klinische variabelen in jaar 5 tot 10. Een nulmodel van alleen CTS werd vergeleken met een alternatief model bestaande uit CTS en ROR met behulp van een test voor aannemelijkheidsverhouding. De ROR voegde statistisch significante informatie toe voor DRFS na vijf jaar over en boven standaard klinische variabelen voor alle patiënten ( $p < 0,0001$ ), alsmede voor klier-negatieve ( $p < 0,0001$ ) en klier-positieve (1-3 klieren) patiënten ( $p < 0,0001$ ).

Tabel 23 toont een overzicht van de gevarenverhoudingen voor een verandering met 10 punten op basis van een univariate en een multivariate analyse die beide de ROR-score en CTS bevatten. De gevarenverhoudingen voor de ROR-score verschillen allemaal significant van 1, zelfs na aanpassing voor CTS. In tabel 22 worden C-indexen weergegeven. De C-index verschilde voor beide groepen significant van de geen-informatiewaarde van 0,5.

**Tabel 23: Overzicht late terugkeertests**

Aantal positieve klieren	N	Gevarenverhouding: Wijziging van de ROR-score met 10 punten		C-index met 95% betrouwbaarheidsintervallen		
		Univariate analyse	Multivariate analyse	C-index	Onder	Boven
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%

Het merendeel van de patiënten in de twee onderzoeken was HER2-negatief. Tabel 24 toont de distributie van de HER2-status voor de klier-negatieve en klier-positieve (1-3 klieren) vrouwen. In beide onderzoeksgroepen was meer dan 90% van de vrouwen HER2-negatief.

**Tabel 24: Distributie van HER2-status per aantal positieve klieren**

Subgroep patiënten	HER2-status		Totaal
	Negatief	Positief	
Klier-negatieve patiënten	1.478 (92,1%)	127 (7,9%)	1.605
Klier-negatieve patiënten met 1-3 positieve klieren	457 (93,6%)	31 (6,4%)	488

Tabel 25 toont een vergelijking van het multivariate model aangepast op alle patiënten in een bepaalde kliergroep en het model aangepast op alle HER2-negatieve patiënten in de groep. Er zijn geen statistisch significante verschillen.



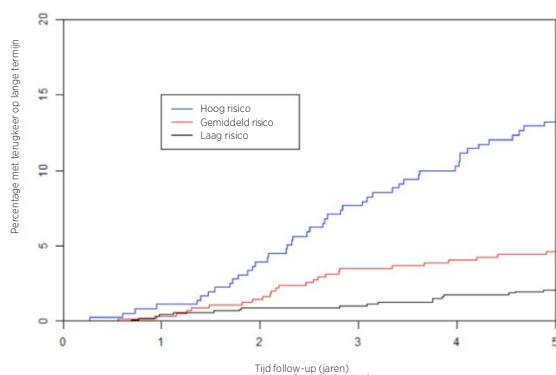
**Tabel 25: Multivariate gevarenverhoudingen voor een wijziging van de ROR-score met 10 punten: Alle patiënten binnen subgroep vs. HER2-negatieve patiënten binnensubgroep**

Aantal positieve klieren	Alle patiënten [95% CI]	HER2-negatieve patiënten [95% CI]
Klier-negatieve patiënten	1,29 [1,15-1,46]	1,35 [1,19-1,54]
Klier-negatieve patiënten met 1-3 positieve klieren	1,34 [1,16-1,53]	1,29 [1,11-1,50]

De vergelijking tussen risicogroepen wordt verder onderzocht in afbeelding 20 en 21. Hierin worden respectievelijk incidentiecurven getoond voor vroege en late terugkeer op andere locatie ingedeeld op risicogroep bij klier-negatieve en klier-positieve (1-3 klieren) patiënten. De incidentiecurven geven de vroege terugkeerperiode (in de eerste 5 jaar) en de late terugkeerperiode (tussen 5 en 10 jaar na de diagnose) weer. Onmiddellijk onder de x-as wordt in iedere afbeelding het aantal vrouwen dat risico loopt en de cumulatieve incidentie weergegeven. De overzichtstabellen onder de afbeeldingen tonen de betrouwbaarheidsintervallen voor de cumulatieve DR-cijfers bij 5 of 10 jaar voor de vrouwen die DR-vrij waren na de behandeling van 5 jaar. Voor de in afbeelding 21 weergegeven klier-positieve (1-3 klieren) patiënten zijn de lage en gemiddelde risicogroepen samengevoegd vanwege het geringe aantal patiënten in de groep met een laag risico.

De patiënten met een laag risico hebben een kleine kans op terugkeer tussen jaren 5 en 10 na 5 jaar hormoonbehandeling, zoals aangegeven door de cumulatieve incidentie en daarbij horende gevarenverhoudingen voor iedere risicogroep. De patiënten met een gemiddeld en hoog risico lopen daarentegen een constant risico op late terugkeer op een andere locatie na 5 jaar endocriene behandeling. De verschillende resultaten tussen de klier-negatieve patiënten met een gemiddeld en hoog risico onderling komt in de eerste 5 jaar tot uiting (DR-cijfer = 13,2% [9,6% - 16,7%] voor patiënten met een hoog risico en 4,7% [2,9% - 6,4%] voor patiënten met een gemiddeld risico) en verspreidt zich over 10 jaar. De terugkeerratio's voor de groepen met een gemiddeld en hoog risico na 5 jaar hormoonbehandeling zijn echter zeer vergelijkbaar.

**Afbeelding 20A: Incidentiecurven voor terugkeer op andere locatie bij risicogroep van 0-5 jaar: Klier-negatieve patiënten**

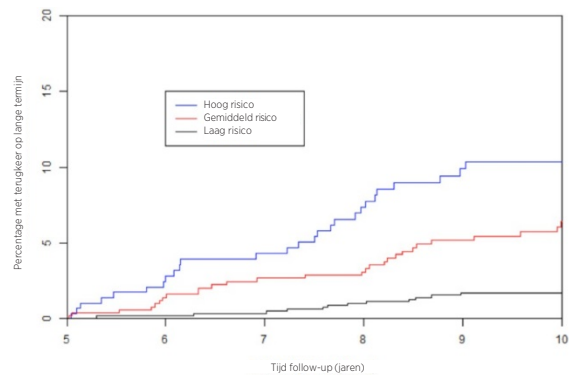


Risicogroep:	Loopt risico (%DR)					
Hoog:	360	352 (1,1)	339 (3,9)	319 (7,7)	307 (10,3)	287 (13,2)
Gemiddeld:	551	546 (0,4)	533 (1,5)	515 (3,5)	506 (4,1)	500 (4,7)
Laag:	875	866 (0,5)	850 (0,9)	842 (1,0)	830 (1,7)	818 (2,1)

**Gegevensoverzicht voor afbeelding 20A: Incidentiecurven voor terugkeer op andere locatie bij risicogroep van 0-5 jaar: Klier-negatieve patiënten**

DR-cijfers per risicogroep na tot vijf jaar behandeling [95% betrouwbaarheidsintervallen]		
Hoog	Gemiddeld	Laag
13,2% [9,6% - 16,7%]	4,7% [2,9% - 6,4%]	2,1% [1,1% - 3,1%]

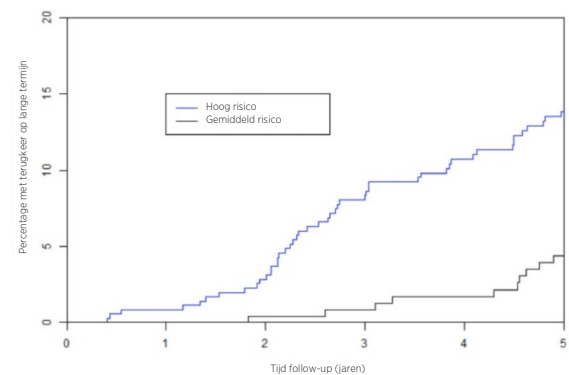
**Afbeelding 20B: Incidentiecurven voor terugkeer op andere locatie bij risicogroep van 5-10 jaar: Klier-negatieve patiënten**



Risicogroep:	Loopt risico (%DR)					
Hoog:	287	268 (2,8)	256 (4,3)	235 (7,4)	189 (9,9)	144 (10,4)
Gemiddeld:	500	478 (1,4)	460 (2,7)	440 (3,3)	367 (5,2)	156 (6,4)
Laag:	818	799 (0,2)	785 (0,4)	748 (1,0)	653 (1,7)	453 (1,7)

**Gegevensoverzicht voor afbeelding 20B: Incidentiecurven voor terugkeer op andere locatie bij risicogroep van 5-10 jaar: Klier-negatieve patiënten**

DR-cijfers per risicogroep vijf jaar na DR-vrije voltooiing van behandeling [95% betrouwbaarheidsintervallen]		
Hoog	Gemiddeld	Laag
10,4% [6,6% - 14%]	6,4% [4,1% - 8,7%]	1,7% [0,8% - 2,6%]

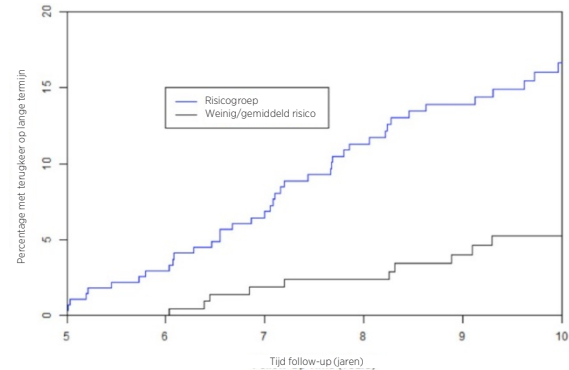


Risicogroep: Hoog:	Loopt risico (%DR)					
355	349 (0,8)	337 (2,8)	313 (8,3)	291 (10,7)	272 (13,8)	
Weinig/gemiddeld:	235	232 (0,0)	230 (0,4)	228 (0,9)	224 (1,7)	216 (4,4)

**Gegevensoverzicht voor afbeelding 21A: Incidentiecurven voor terugkeer op andere locatie bij risicogroep van 0-5 jaar: Klier-positieve (1-3 klieren) patiënten**

DR-cijfers per risicogroep na tot vijf jaar behandeling [95% betrouwbaarheidsintervallen]	
Hoog	Laag / Gemiddeld
13,8% [10,1% - 17,4%]	4,4% [1,7% - 7,0%]

**Afbeelding 21B: Incidentiecurven voor terugkeer op andere locatie bij risicogroep van 5-10 jaar: Klier-positieve (1-3 klieren) patiënten**



Risicogroep:	Loopt risico (%DR)					
Hoog:	272	254 (0,3)	233 (6,9)	214 (11,3)	179 (13,9)	130 (16,6)
Weinig/gemiddeld:	216	211 (0,0)	204 (1,9)	195 (2,4)	158 (4,0)	11 (5,3)

**Gegevensoverzicht voor afbeelding 21B: Incidentiecurven voor terugkeer op andere locatie bij risicogroep van 5-10 jaar: Klier-positieve (1-3 klieren) patiënten**

DR-cijfers per risicogroep vijf jaar na DR-vrije voltooiing van behandeling [95% betrouwbaarheidsintervallen]	
Hoog	Laag / Gemiddeld
16.6% [11.7% - 21.3%]	5.3% [2.0% - 8.4%]

**Conclusies samengevoegde analyse**

We hebben aangetoond dat de ROR-score significante prognostische informatie toont in de late terugkeerperiode tussen 5 en 10 jaar na de diagnose en boven standaard klinische variabelen in het samengevoegde onderzoek naar patiënten die vijf jaar lang terugkeervrij waren. Met behulp van risicoprofielen die op de basis zijn gedefinieerd voor iedere klier-aantal specifieke cohort, bleek dat de risicogroepen alle patiënten in groepen indeelden met significant verschillende late terugkeerrisico's op andere locatie. Zowel de analyses voor de risicogroep op basis van de ROR-score als de continue risicogroep lieten vergelijkbare informatie zien in verschillende subgroepen. Er waren geen significante verschillen tussen de resultaten van de HER2-negatieve patiënten vergeleken met alle patiënten.

In elk van de TransATAC- en ABCSG-8-onderzoeken heeft de ROR getoond aanzienlijk prognostische informatie over en boven de standaard klinische en behandelingsvariabelen toe te voegen als het als een doorlopende meting opgenomen wordt en wanneer het met gebruik van drie vooraf gedefinieerde risicogroepen wordt opgenomen. De twee onderzoeken hadden verschillende risicoprofielen in het opzicht dat de gebeurteniscijfers hoger waren in het TransATAC-onderzoek dan in het ABCSG-8-onderzoek; dit wordt duidelijk door het DRFS (&) te vergelijken in de controletakken van ATAC (90.8%) en ABCSG8(92.5%) die in de literatuur is vermeld<sup>9, 10</sup>. Deze test combineerde de gegevens van de twee onderzoeken met gelijk gewicht om risicoprofielen te genereren waarvan wordt verwacht dat deze voor andere patiëntgroepen beter te algemeneren zijn dan resultaten van de individuele onderzoeken.

**Onderzoek 1: Voorspelling van terugkeerrisico op een andere locatie bij postmenopauzale vrouwen met klier-negatieve of klier-positieve, hormoonreceptor-positieve borstkanker in een vroeg stadium die behandeld zijn met Arimidex of tamoxifen: een TransATAC-onderzoek.**

**Onderzoeksoepzet**

Het klinische validatieonderzoek werd opgezet om te valideren dat het risico van terugkeer-score (ROR) aanvullende prognostische informatie biedt voor overleving zonder terugkeer op andere locatie (DRFS) over en boven standaard klinische variabelen waarbij alle beschikbare patiëntmonsters werden gebruikt. Dit onderzoek gebruikte RNA dat geïsoleerd is uit FFPE-borsttumorweefsel van een subgroep patiënten die aan het ATAC-onderzoek deelnamen<sup>11</sup> Het ATAC-onderzoek omvatte 9366 patiënten binnen drie onderzoekstakken (1:1:1) waarbij patiënten willekeurig werden ingedeeld om gedurende 5 jaar een endocriene behandeling met 1 mg anastrozol (d.w.z. Arimidex) te ontvangen, plus een tamoxifen-placebo, 20 mg tamoxifen plus anastrozol-placebo of een combinatie van tamoxifen/Arimidex. De combinatie-behandelingsgroep werd na de eerste test stopgezet omdat het aantoonde geen doeltreffende of tolereerbare voordelen te hebben in vergelijking met alleen tamoxifen. Onlangs werd gemeld dat een 10 jarige follow-up tussendoor van de ATAC-onderzoekstakken voor monotherapie aan de FDA vereisten voldeed voor bijgewerkte veiligheids- en doeltreffendheidsinformatie<sup>9</sup> Voor hormoonreceptor-positieve patiënten was er een aanzienlijke verbetering in DFS (HR = 0,86), RFS (HR = 0,79) en DRFS (HR = 0,85) voor de patiënten die met anastrozol waren behandeld en wanneer in dit onderzoek met tamoxifen vergeleken. Met de tijd namen de absolute verschillen bij overleving zonder terugkeer op andere locatie tussen anastrozol en tamoxifen toe, van 2,7% bij 5 jaar tot 4,3% bij 10 jaar. Het TransATAC- project werd in 2002 onder het TA/01-protocol gestart om achteraf een weefselbank op te zetten van archiverende histopathologische FFPE-blokken van ATAC-patiënten<sup>11</sup>

In totaal werden 2.006 blokken verkregen van de 4.160 vrouwen met hormoonreceptor-positieve borstkanker die willekeurig waren in gedeeld in de ATAC-onderzoekstakken voor monotherapie. Van deze FFPE-blokken werden er 1372 verzameld van patiënten in het Verenigd Koninkrijk en bevatten voldoende invasieve tumor voor analyse met behulp van de Genomic Health® Oncotype Dx® test<sup>12</sup>. De Oncotype Dx Recurrence Score® (RS) van de FFPE-blokken werd vastgesteld en de onderzoeksresultaten valideerden op klinische wijze de RS om overleving zonder terugkeer op andere locatie te schatten bij postmenopauzale patiënten met HR+ borstkanker die met anastrozol of tamoxifen waren behandeld. Het resterende RNA van het Oncotype Dx-onderzoek werd naar het Royal Marsden-ziekenhuis in Londen verzonden. Daar werd het op -70 °C opgeslagen. In totaal 1017 patiënten van het Oncotype Dx-onderzoek hadden een RNA-restant van >500 ng en werden als onderdeel van het klinische NanoString-validatieonderzoek door NanoString getest.

Dit onderzoek gebruikte de intrinsieke subtypes die door de test werden gegenereerd en evalueerde twee versies van de ROR-score door een vooraf gedefinieerde opvolgende benadering te gebruiken. De twee verschillende ROR-scores, beide met een schaal van 0-100, werden met behulp van ofwel alle 50 testgenen berekend, zoals eerder werd gepubliceerd<sup>2</sup>, ofwel met behulp van een 46-genen-subset. In beide gevallen werden de coëfficiënten via een Cox-model berekend. Dit model omvatte de Pearson-correlatie ten opzichte van de 50 of 46 genen die werden gebruikt om elk intrinsiek subtype, een proliferatiescore en tumorgrootte te berekenen. Alle tests werden op gegevens van een 10-jarige follow-up uitgevoerd.

Het primaire eindpunt was overleving zonder terugkeer op andere locatie (DRFS). Dit werd gedefinieerd als het interval vanaf diagnose tot terugkeer op een andere locatie of overlijden wegens borstkanker. Het secundaire eindpunt was ziektevrije overleving (RFS). Dit werd gedefinieerd als het interval vanaf diagnose tot terugkeer (lokaal, regionaal of op een andere locatie) of overlijden wegens borstkanker.

Met gebruik van alle beschikbare patiëntmonsters werden meervoudig variabele proportionele gevaren (PH)-modellen van Cox toegepast om de primaire doelstelling te evalueren in opvolgende tests van ROR op basis van 50 en 46 genen. Het model omvatte de standaard klinische covariaten (leeftijd, type tumor, tumorgrootte, nodale status, nevenbehandeling). Daarna werd een Cox-model toegepast en er werd een test voor aannemelijkheidsverhouding gebruikt om te testen of ROR statistisch aanzienlijke ( $\alpha = 0,05$ ) aanvullende, prognostische informatie toevoegde over en boven die in de klinische behandelingscore (Clinical Treatment Score, CTS). CTS is een geoptimaliseerde combinatie van klinicopathologische factoren die door de klinische onderzoeken werden ontwikkeld als een meting van standaard pathologie<sup>2</sup>. De primaire tests werden voor verschillende subgroepen patiënten herhaald (allemaal, klier-negatief, klier-positief of alleen HER2-negatief) en eindpunten (DRFS of RFS).

Voor elke klier-negatieve en klier-positieve patiënt werden Cox-modellen (exclusief CTS) gebruikt om het 10-jarige risico van DR te voorspellen als functie van ROR. Op basis van deze modelvoorspellingen werden drie risicogroepen als volgt gedefinieerd:

- Laag risico: < 10% kans van DR in 10 jaar
- Gemiddeld risico: 10 - 20% kans van DR in 10 jaar
- Hoog risico: > 20% kans van DR in 10 jaar

**Test**

Voor elke risicogroep werden Kaplan-Meier-plots gegenereerd. Er werden tests voor aannemelijkheidsverhoudingen (gebruikt om twee statistische modellen te vergelijken) en zoals beschreven in de primaire test, uitgevoerd voor de Genomic Health's Oncotype Dx-test (RS, terugkeerscore) en de op belangrijkste immunohistochemie gebaseerde test (IHC4) van de onderzoeker. Deze resultaten werden vergeleken met de resultaten verkregen voor ROR om de mate vast te stellen waarin elk scoresysteem aanvullende prognostische informatie biedt over en boven de CTS. De IHC4-resultaten worden verder niet besproken omdat zij moeilijk kunnen worden vergeleken met de andere tests, omdat de IHC4-test met behulp van de TransATAC-onderzoeksgegevens werd getraind.

**Table 26: Overzicht van demografische en klinische eigenschappen**

Eigenschap	Huidig onderzoek (n = 1,007)		Startonderzoek van welke RNA werd verkregen (n = 1,231)	Onderzoekstakken van ATAC met behandeling met één preparaat niet opgenomen (n = 2,929)
	# patiënten	% patiënten		
<b>Nodale status</b>				
Negatief	701	70%	71%	68%
Positief	268	27%	25%	25%
Onbekend	38	4%	4%	7%
<b>Tumorgrootte</b>				
< 1 cm	138	14%	67%	70%
1-2 cm	523	52%		
2-3 cm	253	25%	33%	30%
> 3 cm	93	9%		
<b>Type tumor</b>				
Goed	213	21%	27%	25%
Gemiddeld	601	60%	57%	59%
Slecht	193	19%	16%	17%
<b>Leeftijd</b>				
Gemiddeld	64,4 jaar		64,3	66,1

**Table 27: Aanvullende klinische eigenschappen**

Eigenschap	Aantal patiënten	% van patiënten
<b>Subtype</b>		
Basaalachtig	9	1%
HER2-verrijkt	41	4%
Luminaal A	692	69%
Luminaal B	265	26%
<b>Behandeling</b>		
Anastrozol	513	51%
Tamoxifen	494	49%
<b>Terugkeringen</b>		
Enige	210	21%
Andere locatie	160	16%
<b>HER2-status</b>		
Negatief	888	88%
Positief	119	12%

## Resultaten

Primaire analyse van deze test toonde aan dat de ROR-score aanvullende prognostische informatie biedt voor ziektevrij herstel op een andere locatie over en boven standaard klinische variabelen (CTS). Alle gemelde ROR-gegevens die volgen, zijn gebaseerd op 46 genen, omdat dit de basis is voor ROR zoals door de Prosigna-Test is gemeld.

Tabel 28: Primaire analyse van test van ROR

Nullmodel	Alternatief model	$\Delta LR \chi^2$	$\chi^2$ p-waarde
CTS	CTS + ROR	34,21	P < 0,0001

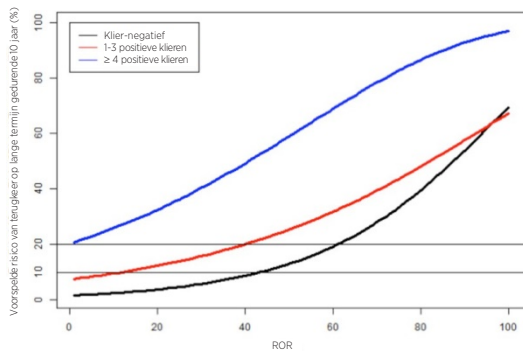
De secundaire tests toonden aan dat ROR aanzienlijk is verwant aan overleving zonder terugkeer op andere locatie en prognostische informatie na CTS toevoegt in meerdere klinisch-relevante subgroepen.

Tabel 29: Herhalen van primaire analyse van test voor vooraf gedefinieerde subgroepen

Patiëntengroep	Eindpunt	# patiënten	# gebeurtenissen	CTS+ROR vs. CTS	
				$\Delta LR \chi^2$	$\chi^2$ p-waarde
Alles	DRFS	1007	160	34,2	< 0,0001
	RFS	1007	210	31,2	< 0,0001
HER2-negatief	DRFS	888	131	28,9	< 0,0001
	RFS	888	179	26,9	< 0,0001
Klier-negatieven	DRFS	739	79	25,0	< 0,0001
	RFS	739	117	21,5	< 0,0001
Klier-positieven	DRFS	268	81	9,3	0,0023
	RFS	268	93	10,6	0,0011
Klier-negatieven HER2-negatief	DRFS	649	62	24,6	< 0,0001
	RFS	649	98	20,8	< 0,0001

Primaire en secundaire tests toonden aan dat ROR bij alle patiënten en in alle subgroepen doorlopend was verwant aan DRFS.

Afbeelding 22: Tien jaar voorspelde terugkeer risico geschat volgens test van ROR-score binnen nodale statusgroep



Secundaire tests toonden aan dat de subtypes luminaal A en luminaal B statistisch gezien aanzienlijk andere resultaten hadden binnen elke subgroep van patiënten die volgens nodale status waren gedefinieerd.

Figure 23: Kaplan-Meier curves for DRFS for Node-Negative patients by Intrinsic Subtype

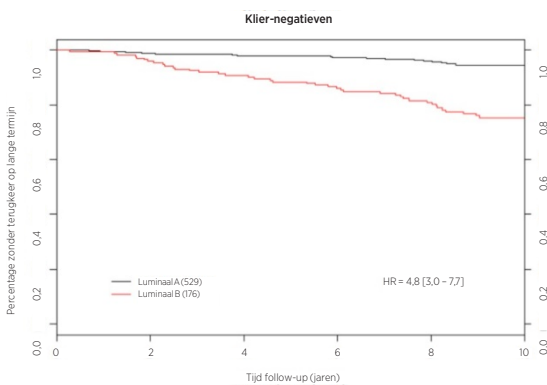
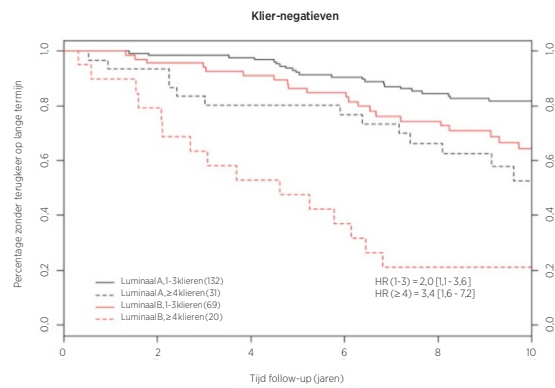
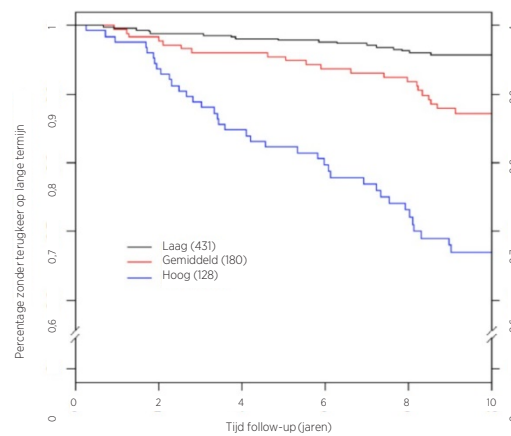


Figure 24: Kaplan-Meier curves for DRFS for Node-Positive patients by Intrinsic Subtype



Afbeeldingen 25 en 26 tonen aan dat binnen elke nodale categorie het absolute klinische risico van die patiënten die op laag risico waren voorspeld, aanzienlijk verschillend was van het absolute klinische risico van de patiënten die op hoog risico waren voorspeld: de patiënten die op laag risico werden voorspeld hadden waargenomen 10-jarige DR-cijfers van minder dan 10%, terwijl patiënten die op hoog risico waren voorspeld, waargenomen 10-jarige DR-cijfers van meer dan 30% hadden.

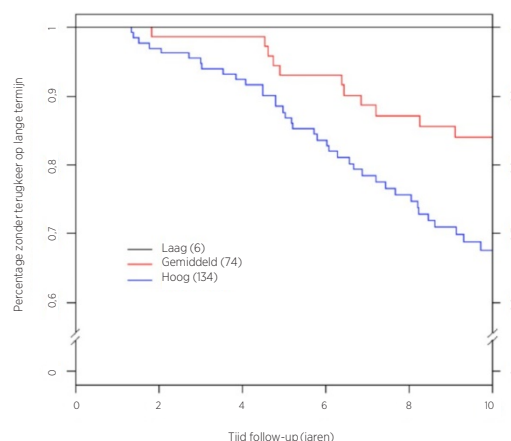
Afbeelding 25: DRFS per risicogroep voor klier-negatieve patiënten, exclusief CTS



Overzicht van gegevens voor afbeelding 25: DRFS per risicogroep voor klier-negatieve patiënten, exclusief CTS

Risicogroep	Aantal patiënten (%)	Aantal Gebeurtenissen	Geschatte percentage zonder terugkeer op een andere locatie gedurende 10 jaar [95% CI]
Laag	431 (58%)	17	96% [94% - 98%]
Gemiddeld	180 (24%)	22	86% [81% - 92%]
Hoog	128 (17%)	38	67% [59% - 76%]
Totaal	739 (100%)	77	

Afbeelding 26: DRFS per risicogroep voor patiënten met 1-3 positieve klieren, zonder CTS



**Overzicht van gegevens voor afbeelding 26: DRFS per risicogroep voor patiënten met 1-3 positieve klieren, zonder CTS**

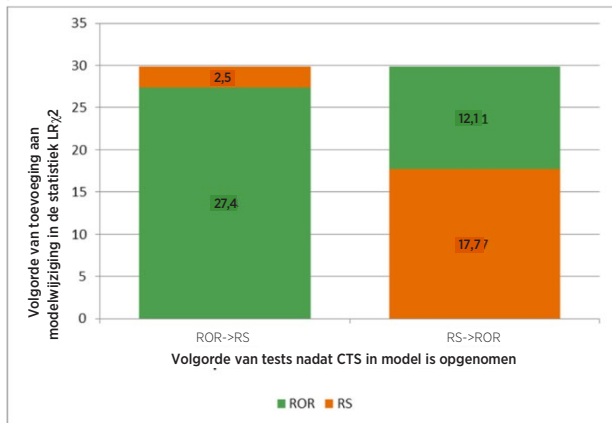
Risicogroep	Aantal patiënten (%)	Aantal Gebeurtenissen	Geschatte percentage zonder terugkeer op een andere locatie gedurende 10 jaar [95% CI]
Laag	6 (3%)	0	100% [n.v.t.]
Gemiddeld	74 (35%)	11	84% [76% - 93%]
Hoog	134 (63%)	38	68% [59% - 77%]
Totaal	214 (100%)	49	

**Vergelijking van ROR met RS**

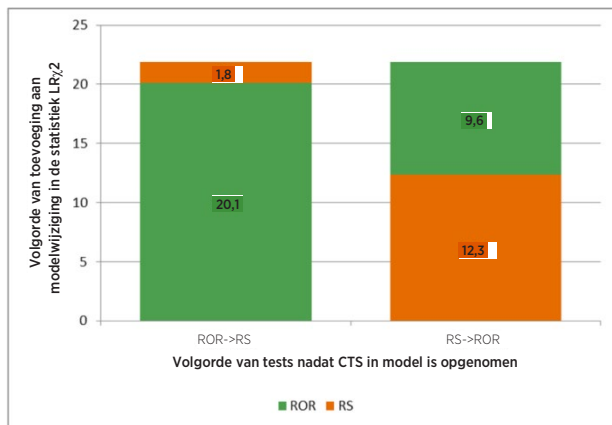
Van de 1.007 monsters met ROR-scores waren voor alle 1.007 monsters Oncotype Dx-testresultaten beschikbaar, maar voor IHC-resultaten waren maar 940 monsters beschikbaar. Om vergelijking van alle drie de tests mogelijk te maken, worden de resultaten in deze sectie gebaseerd op de 940 monsters die voor alle drie de methoden testresultaten hadden (IHC4 wordt hier echter niet gemeld). De tests voor aanneemelijkheidsverhoudingen worden gepresenteerd voor de toevoeging van een enkele variabele, dus opdat toegevoegde informatie statistisch significant is ( $\alpha = 0,05$ ), moet de verandering in de 1-e vrijheidsgraad  $\chi^2$ -statistiek groter zijn dan 3,84. De cijfers hieronder tonen de informatie die werd toegevoegd wanneer de prognostische test aan een andere prognostische test wordt toegevoegd, plus CTS na elkaar. Bij elke toevoeging wordt de toegevoegde informatie gemeten volgens de verandering in  $\chi^2$ .

**ROR toegevoegd aan RS met toevoeging van CTS: prognostische informatie**

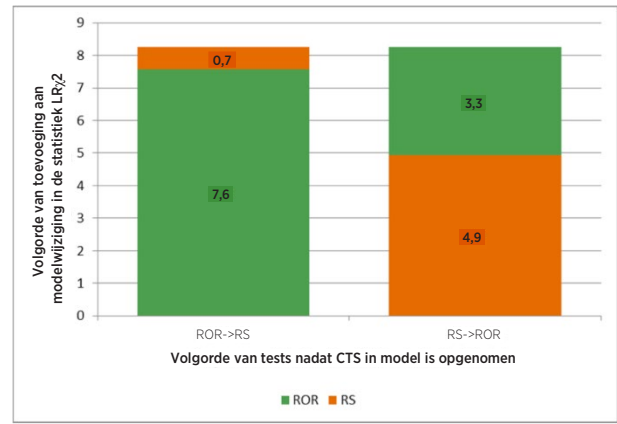
**Afbeelding 27: Prognostische informatie voor DRFS voorbij CTS in alle patiënten (n= 940)**



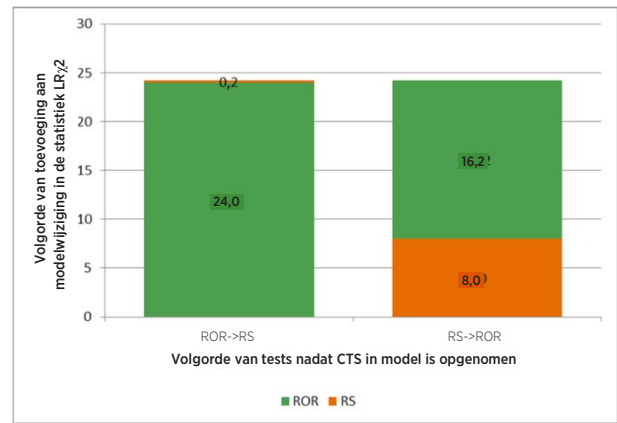
**Afbeelding 28: Prognostische informatie voor DRFS voorbij CTS in klier-negatieve patiënten (n= 683)**



**Afbeelding 29: Prognostische informatie voor DRFS voorbij CTS in klier-positieve patiënten (n= 257)**



**Afbeelding 30: Prognostische informatie voor DRFS voorbij CTS in klier-negatieve HER2-negatieve patiënten (n= 649)**



Afbeelding 27 t/m 30 tonen de informatie die boven de CTS werd toegevoegd wanneer de twee prognostische tests na elkaar worden toegevoegd. Bij elke toevoeging wordt de toegevoegde informatie gemeten volgens de verandering in de statistiek  $\chi^2$ . Als ROR bijvoorbeeld de eerste test was die na de inclusie van CTS (alle patiëntgegevens) werd toegevoegd, dan was de verandering in de  $\chi^2$ -statistiek 27,4. Met CTS en ROR in het model, bereikte de toevoeging van RS een verandering in de  $\chi^2$ -statistiek van 2,5, welke niet significant is (kritieke waarde voor  $\chi^2$ -test met 1 graad vrijheid is 3,84); d.w.z. zodra CTS en ROR allebei in het model zijn, dan voegt RS geen belangrijke informatie toe. Als RS echter de eerste test is die werd toegevoegd, dan was er nog informatie in de ROR die niet in combinatie van CTS en RS is opgenomen. Beide tests tonen prognostische significantie wanneer zij bij klier-positieve patiënten aan CTS worden toegevoegd, maar geen van de tests tonen significantie als een tweede toegevoegde test, mogelijk vanwege het kleinere monster. Voor de subgroep van klier-negatieve HER2-negatieve patiënten voegt RS geen belangrijke prognostische informatie toe aan de CTS + ROR. Van de andere kant voegt ROR belangrijke prognostische informatie toe aan CTS + RS.

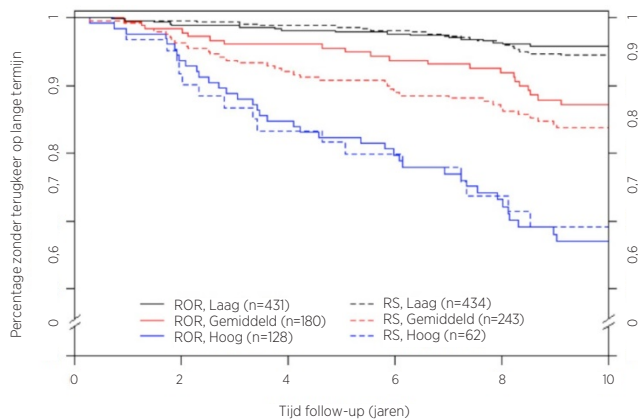
**ROR vs. RS: resultaat van risicogroepen**

Om te vergelijken hoe de twee tests patiënten onderverdelen op risico, werden binnen de TransATAC-populatie risicogroepen op basis van het geschatte risico op terugkeer op een andere locatie van 10 jaar gedefinieerd. Voor elke test werden drempels voor de risicoscore gekozen om de risicogroepen te definiëren op basis van de resultaten van ons TransATAC-onderzoek, om risicogroepen te definiëren die patiënten bevatten met hetzelfde risico. Om deze vergelijkbare risicogroepen te bereiken, waren de cutoffpunten die voor Oncotype DX werden gebruikt anders dan die door Genomic Health werden gebruikt. Voor elke test werd de groep met laag risico naar verwachting gedefinieerd als patiënten met een geschat risico van terugkeer van minder dan 10%. Voor elke test werd de groep met gemiddeld risico naar verwachting gedefinieerd als patiënten met een geschat risico van terugkeer tussen 10% en 20%. Voor elke test werd de groep met hoog risico naar verwachting gedefinieerd als patiënten met een geschat risico van terugkeer van meer dan 20%. De afbeelding hieronder vat de grootten en resultaten samen van de risicogroepen die door elke test werden gedefinieerd.

Afbeelding 31 illustreert het resultaat dat Prosigna 26% minder patiënten toewees aan de gemiddelde risicogroep dan Oncotype DX (180 patiënten vs. 243 patiënten). Daarnaast wees Prosigna meer patiënten toe aan de hoge risicogroep dan Oncotype DX. De lage en hoge risicogroepen die door elke test werden gedefinieerd, hadden echter gelijke resultaten zoals door de overlappende Kaplan-Meier-curven wordt weergegeven. Deze waarneming leidde ertoe dat de onafhankelijke onderzoekers van ons TransATAC-onderzoek tot de conclusie kwamen dat Prosigna minder patiënten aan de gemiddelde risicogroep toewees dan Oncotype DX RS, met gelijke of grotere scheiding tussen de lage en hoge risicogroepen.

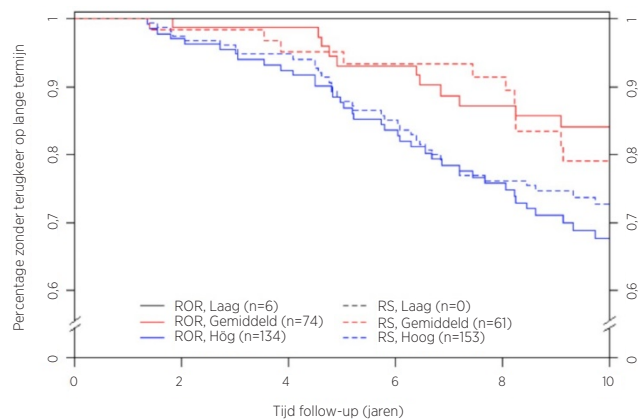


**Afbeelding 31:** De ROR-score van Prosigna identificeerde substantieel meer hoge risicopatiënten en minder gemiddelde risicopatiënten dan de RS-score van Oncotype DX voor klier-negatieve patiënten.



Wanneer bij klier-positieve patiënten met 1-3 positieve klieren alleen ROR wordt gebruikt, dan wordt bij 6 patiënten een risico van <10% op terugkeer op een andere locatie voorspeld. Geen van deze patiënten had terugkeergebeurtenissen gedurende het onderzoek. Eén van deze patiënten werd gedurende 7,9 jaar geobserveerd en alle anderen hadden gedurende ten minste 9,9 jaar follow-up geen DR, wat aangeeft dat de klier-positieve patiënten die als laag risico waren voorspeld, inderdaad laag risico waren. Omdat er voor RS geen lage risicogroepen waren, werden geen log-rangtesten gebruikt voor vergelijking.

**Afbeelding 32:** Vergelijking classificatie 10-jarige DRFS-risicogroep zonder gebruik van CTS: klier-positieve patiënten (1-3 klieren) (ROR vs. RS)



### Conclusies klinisch onderzoek 1

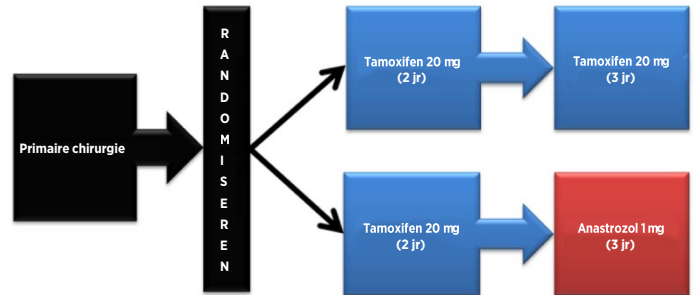
De primaire test toonde dat ROR bij alle patiënten en in alle vooraf gedefinieerde klinisch relevante subgroepen, belangrijke prognostische informatie toevoegde voorbij die van de standaard klinische covariaten (CTS). Met ROR werd getoond dat het patiënten in 3 risicogroepen onderverdeelde, die statistisch aanzienlijk verschillende resultaten hebben bij de klier-negatieve patiënten. De intrinsieke subtypes lumaal A en lumaal B toonden aan ongeacht de nodale status een aanzienlijk andere DRFS en RFS. Vergeleken met de prognostische indicator RS (terugkeerscore 21-gen van Oncotype Dx), voegde de ROR prognostische informatie toe boven RS bij alle patiënten en binnen klinisch relevante subgroepen. Verder verdubbelde ROR binnen de klier-negatieve groep het aantal patiënten dat bij de groep met een hoog risico hoorde, en verminderde het aantal patiënten dat bij de groep met een gemiddeld risico hoorde aanzienlijk, zonder dat er minder verschillende resultaten waren tussen de groepen met een laag en hoog risico vergeleken met RS.

### Onderzoek 2: Prognose voor hormoonreceptor-positieve postmenopauzale patiënten met borstkanker die alleen systemische endocriene nevenbehandeling ontvangen met gebruik van de Prosigna-test: een ABCSG-8- onderzoek

#### Onderzoeksoepzet

De cohort van het onderzoek bestaat uit monsters van FFPE-borsttumorweefsel die achteraf werden afgenomen en in de ABCSG-tumorbank werden gearchiveerd van patiënten die tussen 1996 en 2004 in het ABCSG-8-onderzoek werden ingeschreven<sup>13</sup>. Er werden totaal 3.901 postmenopauzale vrouwen met HR+ borstkanker in een vroeg stadium willekeurig ingedeeld voorafgaand aan de behandeling van twee jaar met adjuvante Tamoxifen, gevolgd door drie jaar Arimidex® (anastrozol) of vijf jaar adjuvante Tamoxifen. In afbeelding 33 wordt de behandelingsstructuur van het onderzoek getoond.

**Afbeelding 33:** Schema van de onderzoeksoepzet van het ABCSG-8-onderzoek



De cohort van de validatie vertegenwoordigt de fractie van de evalueerbare ABCSG-8-cohort waarvoor weefselmonsters konden worden afgenomen van de achteraf gearchiveerde ABCSG-tumorbank en waarvoor geïnformeerde toestemming kon worden verkregen, of de patiënt was overleden. Patiënten die voor het oorspronkelijke onderzoek aan de criteria voor geschiktheid voldoen werden alleen uitgesloten omdat voor de uitvoering van de test van NanoString geen weefsel beschikbaar was of omdat de patiënt niet opnieuw toestemming kon krijgen. Alle monsters met een tumorblok en beschikbare toestemming van de patiënt werden als onderdeel van dit onderzoek getest.

Dit onderzoek gebruikte de intrinsieke subtypes die door de test werden gegenereerd en evalueerde de ROR-score met een vooraf gedefinieerd testplan. De ROR-score, met een schaal van 0-100, werd berekend met behulp van een subgroep van 46-genen van de 50 testgenen die eerder waren gepubliceerd<sup>2</sup>. De coëfficiënten voor ROR werden met een Cox-model berekend. Dit model omvatte de Pearson-correlatie ten opzichte van 46 genen die werden gebruikt om elk intrinsiek subtype, een proliferatiescore en algemene tumorgroote te berekenen. Alle tests werden op gegevens van een maximale follow-up uitgevoerd.

Het primaire eindpunt was overleving zonder terugkeer op andere locatie (DRFS). Dit werd gedefinieerd als het interval vanaf diagnose tot terugkeer op een andere locatie of overlijden wegens borstkanker. Het secundaire eindpunt was ziektevrije overleving (RFS). Dit werd gedefinieerd als het interval vanaf diagnose tot de eerste terugkeer (lokaal, regionaal of op een andere locatie) of overlijden wegens borstkanker.

Met gebruik van beschikbare patiëntmonsters werden meervoudig variabele proportionele gevaren (PH)-modellen van Cox toegepast om de primaire doelstelling te evalueren in opvolgende tests van ROR. Het model omvatte de standaard klinische covariaten (leeftijd, type tumor, algemene tumorgroote, nodale status, nevenbehandeling). Daarna werd een Cox-model toegepast en er werd een test voor aannemelijkheidsverhouding gebruikt om te testen of ROR statistisch aanzienlijke ( $\alpha = 0,05$ ) aanvullende, prognostische informatie toevoegde over en boven die in de klinische behandelingscore (Clinical Treatment Score, CTS). CTS is een geoptimaliseerde combinatie van klinicopathologische factoren die als een meting van standaard pathologie werden ontwikkeld<sup>12</sup>. De primaire tests werden voor verschillende subgroepen van patiënten (allen, klier-negatief, klier-positief of alleen HER2-negatief) en eindpunten (DRFS of RFS) herhaald.

#### Test

Een opvolgende benadering werd gebruikt waarin het de primaire wetenschappelijke doelstelling was om aan te tonen dat ROR belangrijke prognostische informatie over en boven de standaard klinische variabelen toevoegde. De primaire doelstelling voegde een aanvullende vereiste toe om aan te tonen dat categorische risicoclassificatie in één van de drie groepen (laag/gemiddeld/hoog) belangrijke prognostische informatie over en boven de standaard klinische variabelen toevoegde. Om aan deze vereiste te voldoen, moesten beide volgende voorwaarden worden aangetoond:

- Aantonen aan dat de doorlopende ROR-score prognostische waarde over en boven de standaard klinische variabelen toevoegt
- Als de null-hypothese van geen prognostische informatie wordt afgewezen, moet worden aangetoond dat de op ROR-gebaseerde risicocategorieën prognostische waarde over en boven de standaard klinische variabelen toevoegen

Met gebruik van alle beschikbare patiëntmonsters werden meervoudig variabele proportionele gevaren (PH)-modellen van Cox toegepast om de primaire doelstelling te evalueren in opvolgende tests van ROR gevolgd door vooraf gedefinieerde op ROR gebaseerde risicocategorieën. De modellen omvatten de volgende categorische standaard, klinische covariaten (met mogelijke waarden):

- Leeftijd ( $\geq 65$  of  $< 65$ )
- Type (G1 of G2/GX)
- algemene tumorgrootte (T1, T2/T3)
- Nodale status (NO, N+(1-3), N+( $\geq 4$ ))
- Nevenbehandeling (alleen tamoxifen of tamoxifen  $\rightarrow$  anastrozol)

Waar NO klier-negatieve patiënten aangeeft, geeft N+(1-3) klier-positieve patiënten met 1 tot 3 positieve klieren aan en N+( $\geq 4$ ) geeft klier-positieve patiënten met meer dan 4 positieve klieren aan. T1 geeft tumor  $\leq 2$  cm dwarsdoorsnede aan, T2 geeft tumor groter dan 2 cm aan maar niet meer dan 5 cm dwarsdoorsnede en T3 geeft tumor van meer dan 5 cm dwarsdoorsnede aan. In het onderzoek waren er slechts 14 T3-monsters, dus deze werden met de T2-monsters gecombineerd. De goed gedifferentieerde (G1) tumoren werden vergeleken met de combinatie van gemiddeld gedifferentieerde (G2) en GX lobulaire tumoren. GX lobulaire tumoren werden voor het doel van de test als G2-tumoren behandeld omdat G2-tumoren het meest voorkomende type zijn in deze beoogde patiëntpopulatie.

Deze covariaten zijn in de vorm van een klinische behandelingscore (CTS) in het model ingevoerd. Om de CTS te verkrijgen, werd het volgende model toegepast:

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

waarbij de letters z de klinische en behandelingsvariabelen vertegenwoordigen die hierboven in de lijst worden gegeven, en de CTS werd met behulp van de schattingen van de hierboven verkregen  $\gamma$  gedefinieerd; d.w.z.,  $CTS = \sum_j z_j \gamma_j$ .

De proportionele gevarenaanname werd met behulp van de Schoenfeld-residuen getest.

Patiënten die in het validatieonderzoek werden opgenomen, hadden vergelijkbare eigenschappen met degenen in het oorspronkelijke ABCSG-8-onderzoek.

**Tabel 30: Overzicht van klinische eigenschappen**

Eigenschap	Waarde	Opgenomen (n = 1,478)		Niet opgenomen (n = 2,236)		Totaal (n = 3,714)	
		#	%	#	%	#	%
Behandeling	Alleen Tamoxifen	741	50,1%	1108	49,3%	1849	49,8%
	Tamoxifen + anastrozol	737	49,9%	1128	50,2%	1865	50,2%
ER-status	Negatief	14	0,9%	32	1,4%	46	1,2%
	Positief	1.464	99,1%	2.199	98,3%	3.663	98,6%
	Onbekend	0	0,0%	5	0,2%	5	0,1%
Kwaliteit	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%
Nodale status	NO	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+( $\geq 4$ )*	49	3,3%	64	2,8%	113	3,0%
PgR-status	Negatief	260	17,6%	424	18,9%	684	18,4%
	Positief	1.218	82,4%	1.805	80,4%	3.023	81,4%
	Onbekend	0	0,0%	7	0,3%	7	0,2%
Tumorfase	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%
Leeftijd	Mediaan	63		N.v.t.		64	
	Bereik	41-79				41 - 80	

\* Omvat één patiënt met > 9 positieve klieren

**Tabel 31: Aanvullende klinische eigenschappen**

Eigenschap	Waarde	Aantal patiënten	% van patiënten
Intrinsiek subtype NanoString	Luminaal A	1.004	67,9%
	Luminaal B	418	28,3%
	HER2-verrijkt	48	3,2%
Terugkeringen	Basaalachtig	8	0,5%
	Andere locatie	155	10,5%
	Enige	194	13,1%
HER2-status	Negatief	1.397	94,5%
	Positief	77	5,2%
	Onbekend	4	0,3%

## Resultaten

Van de 1620 weefsels die voor testen beschikbaar waren, slaagden er 25 (1,5%) niet voor de vooraf gedefinieerde pathologische beoordeling voor bruikbare tumor, 73 van de 1595 weefselmonsters (4,6%) met levensvatbaar invasief weefsel slaagden niet voor de vooraf gedefinieerde kwaliteitspecificaties voor geëxtraheerd RNA en 44 van de 1522 RNA-monsters (2,9%) faalden voor de kwaliteitspecificaties van de test voor Prosigna-resultaten. Hierdoor bleef een totaal van 1478 (91,2%) beschikbaar voor de test.

Van de 1478 patiënten die voor de test beschikbaar waren, ondervonden er 155 terugkeer op een andere locatie en 194 hadden lokale terugkeer of terugkeer op een andere locatie of zij overleden aan borstkanker. De gemiddelde tijd van de follow-up voor het onderzoek was 10 jaar.

Primaire analyse van de test toonde aan dat de ROR-score aanzienlijke, aanvullende prognostische informatie biedt voor overleving zonder terugkeer op andere locatie over en boven klinische variabelen (CTS).

**Tabel 32: Overzicht van primaire analyse test**

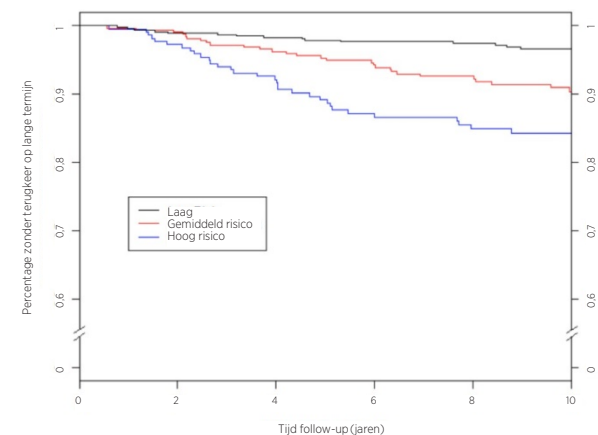
Nullmodel	Alternatief model	$\Delta LR \chi^2$	$\chi^2$ Kritieke waarde (vrijheidsgraden)	$\chi^2$ p-waarde
CTS	CTS + ROR	53,49	3,84 (df = 1)	p < 0,0001
CTS	CTS + risicogroep	34,12	5,99 (df = 2)	p < 0,0001

De secundaire testen toonden aan dat ROR aanzienlijk is verwant aan overleving zonder terugkeer op andere locatie en prognostische informatie na CTS toevoegt in meerdere klinisch-relevante subgroepen.

**Tabel 33: Herhalen van primaire analyse van test voor vooraf gedefinieerde subgroepen**

Patiëntengroep	# patiënten	# gebeurtenissen	CTS+ROR vs. CTS	CTS+risicogroep vs. CTS
			$\Delta LR \chi^2$ (Krit. waarde= 3,84)	$\Delta LR \chi^2$ (Krit. waarde= 5,99)
Alles	1.478	155	53,49	34,12
HER2-negatief	1.397	145	47,50	29,94
NO	1.047	86	25,57	23,36
NO, HER2-negatief	984	79	21,69	20,32
N+(1-3)	382	59	25,99	19,94
N+(1-3), HER2-negatief	367	56	22,75	18,75

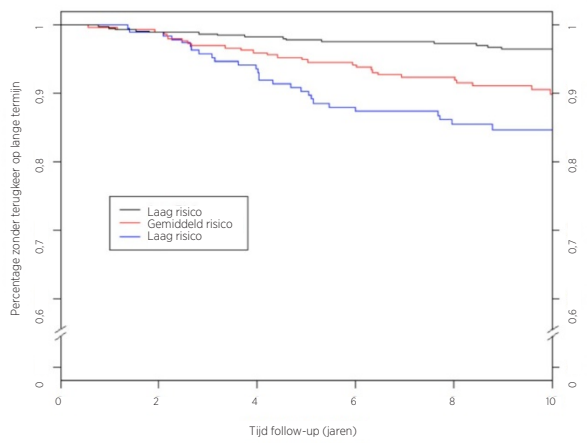
**Afbeelding 34: DRFS per risicogroep voor klier-negatieve patiënten**



**Overzicht van gegevens voor afbeelding 34: DRFS per risicogroep voor klier-negatieve patiënten**

Risicogroep	Aantal patiënten (%)	Aantal Gebeurtenissen gedurende 10 jaar	Geschatte percentage zonder terugkeer op een andere locatie gedurende 10 jaar [95% CI]
Laag	487 (47%)	15	96,6% [94,4% - 97,9%]
Gemiddeld	335 (32%)	28	90,4% [86,3% - 93,3%]
Hoog	225 (21%)	32	84,3% [78,4% - 88,6%]
Totaal	1.047 (100%)	75	

Afbeelding 35: DRFS per risicogroep voor HER2-negatieve, klier-negatieve patiënten

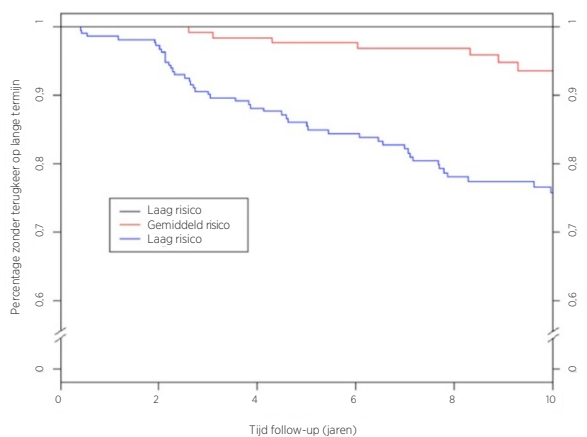


Overzicht van gegevens voor afbeelding 35: DRFS per risicogroep voor HER2-negatieve, klier-negatieve patiënten

Risicogroep	Aantal patiënten (%)	Aantal gebeurtenissen gedurende 10 jaar	Geschatte percentage zonder terugkeer op een andere locatie gedurende 10 jaar [95% CI]
Laag	474 (48%)	15	96,5% [94,3% - 97,9%]
Gemiddeld	311 (32%)	27	90% [85,6% - 93,1%]
Hoog	199 (20%)	27	84,7% [78,4% - 89,3%]
<b>Totaal</b>	<b>984 (100%)</b>	<b>69</b>	

Afbeelding 36 toont de Kaplan-Meier-plots per risicogroep voor klier-positieve (1-3 klieren) patiënten en afbeelding 37 toont dezelfde plot voor klier-positieve (1-3 klieren) HER2-negatieve patiënten. De resultaten met en zonder de HER2-positieve patiënten zijn vergelijkbaar.

Afbeelding 36: DRFS per risicogroep voor klier-positieve (1-3 klieren) patiënten

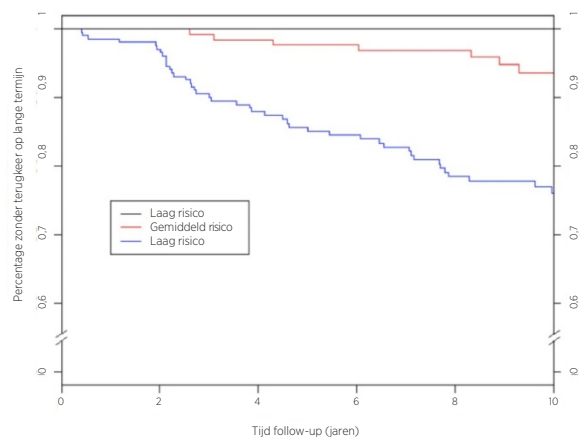


Overzicht van gegevens voor afbeelding 36: DRFS per risicogroep voor klier-positieve (1-3 klieren) patiënten

Risicogroep	Aantal patiënten (%)	Aantal Gebeurtenissen gedurende 10 jaar	Geschatte percentage zonder terugkeer op een andere locatie gedurende 10 jaar [95% CI]
Laag	15 (4%)	0	100% [78,2% - 100%]*
Gemiddeld	143 (37%)	7	93,6% [86,9% - 97%]
Hoog	224 (59%)	46	75,8% [68,9% - 81,4%]
<b>Totaal</b>	<b>382 (100%)</b>	<b>53</b>	

\* Betrouwbaarheidsinterval geschat met behulp van de Clopper-Pearson-methode

Afbeelding 37: DRFS per risicogroep voor HER2-negatieve, klier-positieve (1-3 klieren) patiënten



Overzicht van gegevens voor afbeelding 37 DRFS per risicogroep voor HER2-negatieve, klier-positieve (1-3 klieren) patiënten

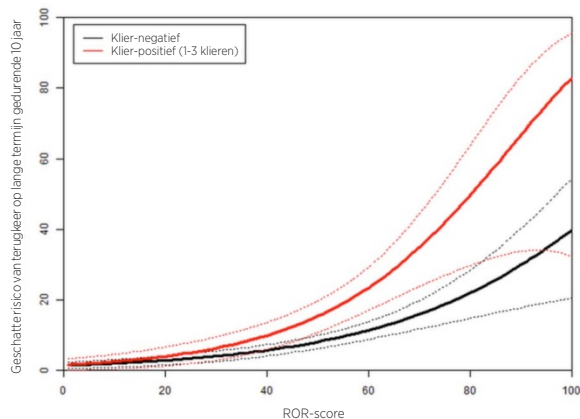
Risicogroep	Aantal patiënten (%)	Aantal Gebeurtenissen gedurende 10 jaar	Geschatte percentage zonder terugkeer op een andere locatie gedurende 10 jaar [95% CI]
Laag	15 (4%)	0	100% [78,2% - 100%]*
Gemiddeld	142 (39%)	7	93,6% [86,8% - 96,9%]
Hoog	210 (57%)	43	76,1% [69,0% - 81,8%]
<b>Totaal</b>	<b>367 (100%)</b>	<b>50</b>	

\* Betrouwbaarheidsinterval geschat met behulp van de Clopper-Pearson-methode.

#### Relatie tussen ROR en risicovoorspelling

Afbeelding 38 toont het 10-jarige risico van DR als een functie van de ROR-score, met 95% betrouwbaarheidsintervallen op basis van afzonderlijke Cox-proportionele gevearenmodellen voor elk van de klier-negatieve en klier-positieve (1-3 klieren) patiëntgroepen. Voor de klier-positieve (1-3 klieren) patiënten werd de proportionele gevearenveronderstelling overtreden tijdens toepassing binnen het gehele bereik. De curve die hier voor de klier-positieve (1-3 klieren) patiënten wordt getoond, gebruikt klier-positieve (1-3 klieren) patiënten met ROR-scores in het bereik van 0-80 waarvoor aan de proportionele gevearenveronderstelling werd voldaan.

Afbeelding 38: Tienjarig geschatte DR-risico per nodale categorie met 95% betrouwbaarheidsintervallen



Binnen elke subgroep was het absolute klinische risico van deze patiënten die aan de lage risicocategorie waren toegewezen, aanzienlijk verschillend van het absolute klinische risico van patiënten die aan de hoge risicocategorie waren toegewezen.

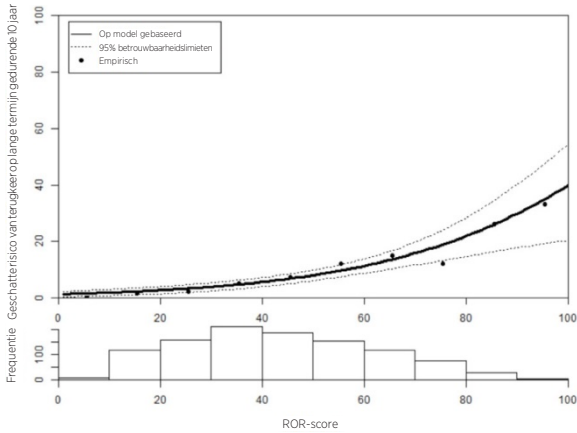
Tabel 34 toont de distributie van klier-negatieve patiënten volgens ROR-bereik van

Tabel 34: Distributie van klier-negatieve patiënten volgens ROR-bereik van 10 eenheden.

ROR-bereik	Aantal patiënten	Percentage van patiënten	10 -jarig DR-risico (empirisch)
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%
Totaal	1.047	100%	

Afbeelding 39 toont de op model gebaseerde curve voor de klier-negatieve patiënten samen met de empirisch geschatte 10-jarige overlevingskansen voor de 10 bereiken waarbij elk bereik alle patiënten bevat tussen het ROR-bereik van 10 eenheden (1-10, 11-20, enz.). Onder de curve bevindt zich een histogram die de regelmatige verdeling per bereik toont.

Afbeelding 39: Vergelijking van op model gebaseerde en empirische schattingen van het tienjarige DR-risico voor klier-negatieve patiënten met verdeling van ROR-scores wordt hieronder getoond.



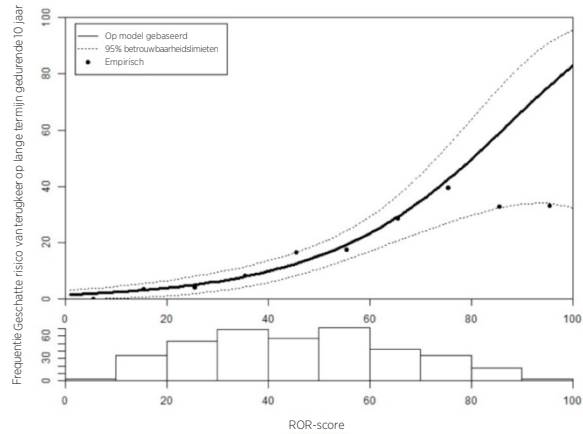
Voor de klier-negatieve patiënten waren de proportionele op model gebaseerde gevarenschattingen gelijk aan de empirische schattingen binnen het gehele bereik. Tabel 35 toont de distributie van klier-positieve (1-3 klieren) patiënten per ROR-bereik van 10 eenheden. Ook het 10-jarige DR-risico wordt getoond.

Tabel 35: Distributie van klier-positieve (1-3 klieren) patiënten volgens ROR-bereik van 10 eenheden.

ROR-bereik	Aantal patiënten	Percentage van patiënten	10 -jarig DR-risico (empirisch)
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%
Totaal	382	100%	

Afbeelding 40 toont de op model gebaseerde curve (met gebruik van klier-positieve (1-3 klieren) patiënten met ROR scores van  $\leq 80$ ) voor klier-positieve (1-3 klieren) patiënten samen met de empirisch geschatte 10-jarige overlevingskansen voor de 10 bereiken waarbij elk bereik alle patiënten bevat tussen de 10 ROR-bereiken (1-10, 11-20, enz.). Onder de curve bevindt zich een histogram die de regelmatige verdeling per bereik toont.

Afbeelding 40: Vergelijking van op model gebaseerde en empirische schattingen van het tienjarige DR-risico voor klier-positieve (1-3 klieren) patiënten met verdeling van ROR-scores wordt hieronder getoond.



Zowel tabel 35 als afbeelding 40 tonen het afvlakken van het waargenomen 10-jarige risico boven op het ROR-bereik dat tot het mislukken van de proportionele gevarenveronderstelling leidde. Het moet echter worden opgemerkt dat de monstergroottes in de twee bereiken boven 80 beiden klein waren voor de klier-positieve (1-3 klieren) patiënten (17 patiënten van 81-90 en maar 3 van 91-100).

### Vergelijking van intrinsieke subtypes lumaal A en lumaal B

Het merendeel van de patiënten in het onderzoek (96%) waren lumaal A of lumaal B, wat niet onverwachts was gezien deze intrinsieke subtypes in de meerderheid zijn bij hormoonreceptor-positieve patiënten<sup>12</sup>

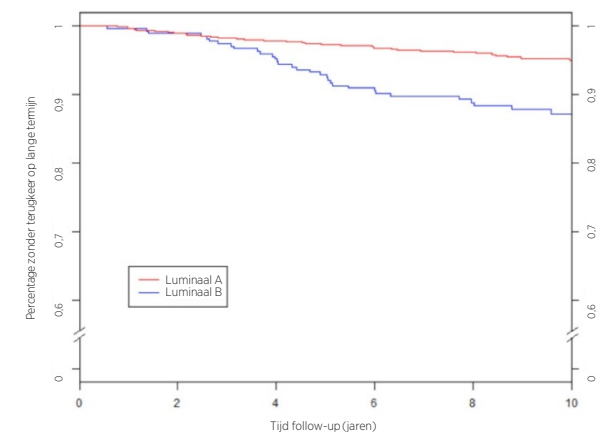
Tabel 36 toont de resultaten van de test voor aannemelijkheidsverhoudingen voor het tonen van de aanvullende prognostische waarde voor DRFS dat het verschil tussen lumaal A/lumaal B na de CTS toevoegt. De tabel toont ook de gevarenverhouding door lumaal A- met lumaal B-patiënten te vergelijken. Er was in alle drie de groepen een aanzienlijk lager risico van terugkeer op een andere locatie voor lumaal A-patiënten.

Tabel 36 Test voor aannemelijkheidsverhoudingen voor DRFS-prognostische waarde van lumaal subtypes

Subgroep	# Patiënten	# Gebeurtenissen	$\Delta LR \chi^2$	$\chi^2 p$ -waarde	Gevarenverhouding van lum A: Lum B (95% CI)
Alles	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]

Afbeelding 41 toont een vergelijking van DRFS volgens lumaal subtype voor klier-negatieve patiënten. Afbeelding 42 toont dezelfde vergelijking voor klier-positieve (1-3 klieren) patiënten. Voor beide groepen waren er aanzienlijke verschillen tussen de DRFS van lumaal A- en lumaal B-patiënten.

Afbeelding 41: Kaplan-Meier-curven voor DRFS per intrinsiek subtype voor klier-negatieve patiënten

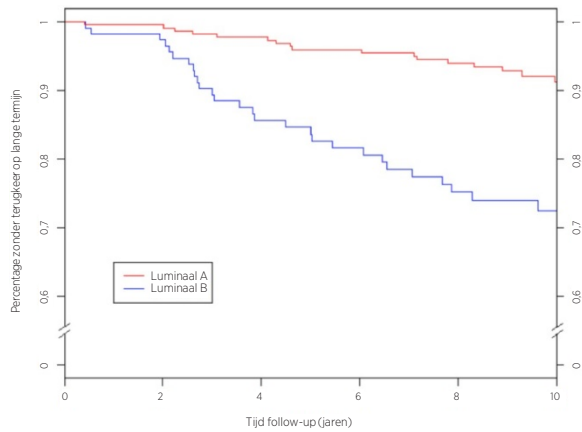




**Overzicht van gegevens voor afbeelding 41: Kaplan-Meier-curven voor DRFS per intrinsiek subtype voor klier-negatieve patiënten**

Risicogroep	Aantal patiënten	Aantal Gebeurtenissen gedurende 10 jaar	Geschatte percentage zonder terugkeer op een andere locatie gedurende 10 jaar [95% CI]
Luminaal A	725	32	95,1% [93,4% - 96,3%]
Luminaal B	284	32	87,2% [83,2% - 90,3%]
Totaal	1.009	64	

**Afbeelding 42: Kaplan-Meier-curven voor DRFS per intrinsiek subtype voor klier-positieve (1-3 klieren) patiënten**



**Overzicht van gegevens voor afbeelding 42: Kaplan-Meier-curven voor DRFS per intrinsiek subtype voor klier-positieve (1-3 klieren) patiënten**

Risicogroep	Aantal patiënten	Aantal gebeurtenissen gedurende 10 jaar	Geschatte percentage zonder terugkeer op een andere locatie gedurende 10 jaar [95% CI]
Luminaal A	248	17	91,3% [87,2% - 94,2%]
Luminaal B	118	28	72,5% [64,2% - 79,1%]
Totaal	366	45	

Tabel 37 toont een tabel van 10-jarige RFS-cijfers per luminaal subtype voor de klier-negatieve en klier-positieve (1-3 klieren) nodale groepen.

**Tabel 37: Tienjarige RFS-cijfers per nodale groep en luminaal subtype**

Klierstatus	Luminaal subtype	Aantal patiënten (%)	Aantal gebeurtenissen gedurende 10 jaar	Geschatte percentage zonder terugkeer op een andere locatie gedurende 10 jaar [95% CI]
NO	Luminaal A	725 (72)	44	93,0% [91,1% - 94,5%]
	Luminaal B	284 (28)	44	82,2% [77,6% - 85,9%]
N+(1-3)	Luminaal A	248 (68)	21	89,1% [84,7% - 92,4%]
	Luminaal B	118 (32)	30	71,6% [62,2% - 77,4%]

Voor elke groep klier-negatieve en klier-positieve (1-3 klieren) patiënten, was het verschil tussen luminaal A- en luminaal B-patiënten aanzienlijk.

**Conclusies klinisch onderzoek 2**

De ROR toonde aan een aanzienlijk prognostische informatie over en boven de standaard klinische en behandelingsvariabelen toe te voegen, zowel als het als een doorlopende meting opgenomen wordt en als het met behulp van drie vooraf gedefinieerde risicogroepen opgenomen wordt. De lage-risicogroep had, naar alle verwachtingen, 10-jarige DRFS ver boven 90%. De hoge-risicogroep had 10-jarige DRFS van 80%, wat hoger was dan werd verwacht - er werd verwacht dat het aanzienlijk lager zou zijn dan 80%. De cutoff-waarden die werden gebruikt om risicogroepen te definiëren, waren gebaseerd op de TransATAC-cohort. Deze is van hoger risico dan de huidige cohort, wat tot een algemeen lager risico leidt bij de 'hogerisicogroep' dan werd verwacht. De ROR (doorlopend en op risicogroep gebaseerd) toonde gelijke prognostische informatie in diverse subgroepen. Het doorlopende risicomodel sluit nauw aan op de empirische verhoudingen van terugkeer bij zowel klier-negatieve als klier-positieve (1-3 klieren) patiënten. De meeste patiënten (96%) in het onderzoek hadden tumoren van één van de twee lumenale subtypes (luminaal A of luminaal B). In alle nodale statusgroepen voegde het verschil tussen luminaal A/luminaal B prognostische informatie toe betreffende DRFS.

**Overzicht gecombineerde klinische onderzoeken**

Resultaten zijn generaliseerbaar voor verdeeld gebruik gezien monsters naar en in verschillende laboratoria werden verzonden en getest tijdens de twee klinische validatieonderzoeken. De ROR toonde aan een aanzienlijk prognostische informatie voor 10-jarige DRFS over en boven de standaard klinische en behandelingsvariabelen toe te voegen, zowel als het als een doorlopende meting opgenomen wordt en als het met behulp van drie vooraf gedefinieerde risicogroepen opgenomen wordt. Verder bleek uit een post-hoc analyse dat de ROR significante informatie toevoegde voor post 5-jarige DRFS over en boven standaard klinische variabelen voor alle patiënten. De ROR (doorlopend en op risicogroep gebaseerd) toonde gelijke prognostische informatie in diverse subgroepen. Beperkte testen werden ook met RFS uitgevoerd. De ROR-classes konden ook drie risicogroepen met onderscheidende RFS definiëren. Voor beide onderzoeken waren er, onafhankelijk van de nodale status, aanzienlijke verschillen tussen de DRFS van luminaal A- en luminaal B-subgroepen.

**17 BIBLIOGRAFIE**

- 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. in opdracht van de 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. Augustus 2013;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; 20 oktober digitaal gepubliceerd 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.

## 19 CONTACTINFORMATIE

 Contactinformatie in de VS:  
Veracyte, Inc.  
6000 Shoreline Court  
Suite 300  
South San Francisco CA 94080  
USA  
Telefoon: +1-650-243-6335  
www.veracyte.com

### EC REP

Bevoegde vertegenwoordiger in de EU:  
Veracyte  
Luminy Biotech Entreprises  
163 Avenue de Luminy  
13288 Marseille Cedex 9  
FRANCE

Globale contactinformatie:  
E-mail technische ondersteuning: DxSupport@Veracyte.com  
E-mail productinformatie: info@prosigna.com  
Website: www.prosigna.com

## 18 SYMBOLEN EN DEFINITIES

 - Fabrikant

**EC REP** - Bevoegde vertegenwoordiger binnen de Europese Gemeenschap

**IVD** - *In vitro* diagnostisch medisch instrument

 - Raadpleeg de gebruiksinstructies

**CE** - CE-markering

**LOT** - Batchcode/partijnummer

**REF** - Catalogus- of referentienummer


 - Bevat voldoende voor <n> tests

 - Temperatuurbereik opslagcondities

 - Onderlimiet voor temperatuur opslagcondities

 - Bovenlimiet van temperatuur opslagcondities

 - Voor gebruik tot/Vervaldatum

 - Deze zijde omhoog

**Room Temp. = Kamertemperatuur**

**HYB = Hybridisatie**

### Wettelijke disclaimer

Voor *in vitro* diagnostisch gebruik.

© 2023 Veracyte, Inc. en geaffilieerde ondernemingen. Alle rechten voorbehouden. Veracyte en het Veracyte-logo, Prosigna en het Prosigna-logo zijn geregistreerde handelsmerken van Veracyte, Inc. en haar geaffilieerde ondernemingen. nCounter is een handelsmerk van NanoString Technologies, Inc. en wordt gebruikt onder licentie.