

REF 7900001
16 – testkit



**Circulating Tumor Cell Kit
(epitelrelaterade)**

IVD



AVSEDD ANVÄNDNING

För *in vitro*-diagnostisk användning.

CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell Kit avses användas för räkning av CTC av epitelursprung (CD45-, EpCAM+ och cytokeratiner av typen 8, 18+ och/eller 19+) i helblod.

Förekomsten av CTC i periferblodet, vilket detekteras av CELLSEARCH® CTC-kit, associeras med minskad överlevnadsgrad utan sjukdomsprogression, samt minskad överlevnadsgrad rent allmänt i patienter som behandlats mot metastatisk bröstcancer, metastatisk kolorektal cancer och prostatacancer*. Testet används som hjälp vid övervakning av patienter med metastatisk bröstcancer, kolorektal cancer och prostatacancer. Serietest för att hitta CTC används i samband med andra kliniska metoder vid övervakning av metastatisk bröstcancer, kolorektal cancer och prostatacancer. Utvärdering av CTC när som helst under sjukdomens förlopp medger utvärdering av patientprognos och förutspår överlevnadsgrad utan sjukdomsprogression, samt allmän överlevnadsgrad.

**Patienter med metastatisk prostatacancer i denna studie definierades enligt att de haft två efterföljande öknings av serummarkör-PSA-värdet som överstiger en referensnivå, trots standardhormonhantering. Patienterna beskrivs vanligen enligt att de haft androgenoberoende, hormonresistent eller kastreringsresistent prostatacancer.*

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Cancermetastas uppstår när celler släpps från en primär eller metastatisk tumör, kommer in i blodomloppet och börjar växa på avlägsna ställen i kroppen. Carcinom kommer ifrån epitelceller som normalt inte förekommer i blodomloppet.¹ CELLTRACKS® AUTOPREP®-system avses standardisera och automatisera provprepareringsprotokoll för användning tillsammans med CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell Kit (CELLSEARCH® CTC Kit). Analys och räkning av CTC utförs med CELLTRACKS ANALYZER II®, ett halvautomatiskt fluorescensmikroskop. Analysen räknar endast celler som uttrycker epitelcelladhesionsmolekylen (EpCAM) och cytokeratinerna (CK) 8, 18 och/eller 19.

PRINCIPER FÖR PROCEDUREN

CELLSEARCH® CTC-kit innehåller ferrovätskebaserad fångstreagens och immunfluorescerande reagenser. Ferrovätskereagensen består av partiklar med en magnetkärna omgiven av ett polymerskikt belagt med antikroppar som riktar in sig på EpCAM-antigenet för att fånga CTC. Efter immunmagnetisk fångst och berikning tillsätts fluorescerande reagenser för identifiering och räkning av CTC. Fluorescerande reagenser omfattar följande: anti-CK-fykoerytrin (PE) som är typiskt för intracellproteinet cytokeratin (typiskt för epitelceller), DAPI, vilket färgar cellkärnan och anti-CD45-allofukocyanin (APC) som är typiskt för leukocyter.

Reagens-/provblandningen dispenseras av CELLTRACKS® AUTOPREP® System till en kassett som förs in i en MAGNEST-kassetthållare. Det starka magnetfältet i MAGNEST-kassetthållare attraherar de magnetiskt märkta epitelcellerna till kassetts yta. CELLTRACKS ANALYZER II® skannar automatiskt hela kassetts yta, fångar bilder och visar händelse för användaren där CK-PE- och DAPI-fluorescens förekommer på samma ställe. Bilder visas för användaren i galleriformat för slutklassificering. En händelse klassificeras som tumörcell när de morfologiska dragen överensstämmer med en tumörcells. Fenotypen EpCAM+, CK+, DAPI+ och CD45- visas.

MATERIAL SOM MEDFÖLJER

- Bruksanvisning
- **3,0 mL anti-EpCAM ferrovätska:** Innehåller en suspension på 0,022% magnetiska partiklar som konjugerats till en monoklonal antikropp från en mus, som är specifik för cellytmarkören EpCAM som förekommer på epitelceller i en buffert som innehåller 0,03% bovint serumalbumin (BSA) och 0,05% ProClin® 300 konserveringsmedel (brunt lock)
- **3,0 mL färgningsreagens:** Innehåller 0,0006% monoklonala antikroppar från en mus som är specifika för cytokeratiner som konjugerats till fykoerytrin (PE); 0,0012% anti-CD45 monoklonal antikropp från en mus, som konjugerats till allofukocyanin (APC) i buffert som innehåller 0,5% BSA och 0,1% natriumazid (vitt lock)
- **3,0 mL färg med nukleinsyra:** Innehåller 0,005% 4', 6-diamidin-2-fenylindol, dihydroklorid (DAPI) och 0,05% ProClin® 300 (blått lock)
- **3,0 mL reagens för fångstförbättring:** Innehåller 0,02% egen reagens för kontrollerad ferrovätskeaggregation, 0,5% BSA och 0,1% natriumazid i buffert (ofärgat lock)
- **3,0 mL genomträngningsreagens:** Innehåller 0,011% egen genomträngningsreagens och 0,1% natriumazid i buffert (grönt lock)
- **3,0 mL cellfixeringsmedel:** Innehåller 25% egna beståndsmedel i fixeringsmedel, 0,1% BSA och 0,1% natriumazid i buffert (rött lock)
- **2 x 110 mL flaska spädningsbuffert:** Innehåller buffert med 0,1% natriumazid
- **16 CELLSEARCH® Conical Centrifuge Tubes (15 mL) och lock till konformiga rör**
- **16 kassetter och kassettpluggar**

MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE MEDFÖLJER

- CellSave Preservative Tube (katalognr 7900005)
- CELLTRACKS® AUTOPREP®-system (katalognr 9541)
- CELLTRACKS ANALYZER II® (katalognr 9555)

- CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell Control Kit (katalognr 7900003)
- CELLTRACKS® AUTOPREP® Circulating Tumor Cell Control Kit (katalognr 7901003)
- Centrifug med rotor med vågrät utsvängningshållare som kan klara 800 × g
- Ställningar för provrör
- Kalibrerade mikropipetter och spetsar
- Vortexmixer

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

1. För *in vitro*-diagnostisk användning.
2. Läs hela bruksanvisningen innan prov testas.
3. Försiktighet: Samla endast in blod i ett CellSave Preservative Tube. CTC:er är omtåliga. De måste konserveras för korrekt analys.
4. Försiktighet: All personal måste följa allmängiltiga försiktighetskrav och använda laboratoriesäkerhetsutrustning (dvs. skyddsglasögon, laboratorierock och handskar).
5. Försiktighet: Mikrobiell kontaminering av reagenser kan ge fel resultat och bör undvikas.
6. Försiktighet: Vissa reagenser innehåller natriumazid som konserveringsmedel. Sök omedelbart läkare vid förtäring. Hålls utom räckhåll för barn. Får inte komma i beröring med mat eller dryck. Bär lämplig skyddsklädsel. Kontakt med syror skapar mycket giftig gas. Azidföreningar måste spolas med stora mängder vatten vid kasseringen för att undvika att fällningar sätter sig i bly- eller kopparrör där explosion kan inträffa.
7. **Varning:** Samtliga biologiska prov, kassetter och övriga material som kommer i beröring med proven anses biologiskt farliga. Hantera materialet som om risk för infektiösoverföring föreligger. Behandla och kassera avfall enligt gällande bestämmelser. Pipettera aldrig med munnen.
8. **Varning:** Vissa reagenser innehåller ProClin® 300 som konserveringsmedel.
9. Användare måste utbildas för att utföra testproceduren.

Följande är uttalanden om risker och försiktighetsåtgärder:

H317 kan orsaka en allergisk hudreaktion.

Profylax:

P261 Undvik att inandas damm/rök/gas/dimma/ångor/sprej.

P272 Nedstänkta arbetskläder får inte avlägsnas från arbetsplatsen.

P280 Bär skyddshandskar.

Svar:

P333 + P313 Vid hudirritation eller utslag: uppsök läkare.

P362 + P364 Ta av förorenade kläder och tvätta dem före återanvändning.

Avfallshantering:

P501 Bortskaffa innehållet/behållaren till en godkänd avfallsanläggning.

För mer information, se säkerhetsdatabladet på www.cellsearchctc.com

FÖRVARING OCH HANTERING AV REAGENS

- Reagenser finns färdiga att använda. Lagra öppnade vid 2 till 8 °C.
- Efter öppnandet får inte reagenser i reagensförpackningen lagras längre än 30 dagar mellan 2 och 8 °C. Vid lagring **måste** öppna reagensbehållare försees med sina unika färgkodade lock, med de färger som anges på etiketterna på reagensbrickan som hjälp. Detta är för att säkerställa att korskontaminering av reagenser inte sker.
- OBS! Efter öppnande får flaskan med spädningsbuffert, som inte ingår i reagensförpackningen, lagras vid rumstemperatur i högst 30 dagar.
- Skydda reagenser mot värme som överstiger 35 °C. Får inte frysas.
- Låt reagenser anta rumstemperatur (mellan 15 och 30 °C) före användning.
- Inspektera visuellt reagensförpackningen gällande rätt placering av reagenserna. Bekräfta att alla reagenser finns på rätt plats genom att matcha färgen på locket med färgerna på etiketten. Se fotot för rätt placering. Använd inte reagensförpackningen om reagenser befinns sitta fel eller om dubletter av flaskor finns. Använd inte reagensförpackningen och meddela teknisk support för att beställa nya produkter.
- Skydda reagenser mot exponering för solljus.
- Vid riktig lagring håller sig reagenserna stabila tills utgångsdatumet på reagensbehållaren eller kitlådan. Använd inte utgångna reagenser.
- Kitkomponenterna är tillverkade och testade som huvudparti. Blanda **inte** reagenser från olika kit för att hitta matchande reagenser.



TESTPROCEDUR

Insamling och preparering av prov

Insamling av helblod i CellSave Preservative-rör

1. Ta de första proven innan behandlingsskuren inleds. Efterföljande prov tas efter behandlingsskuren påbörjats, vanligen med 3 eller 4 veckors mellanrum, för att följa CTC-nivåerna under behandlingen. Om patienten behandlas med doxorubicin krävs minst 7 dagar efter administrering av en dos doxorubicin innan blodprov tas.
2. Samla in helblod aseptiskt genom venpunktur eller genom venport, endast i CellSave Preservative-rör.
3. Fyll röret tills blodflödet slutar för att tillse att proportionen blodprov och antikoagulant och konserveringsmedel blir rätt. Blanda omedelbart genom att varsamt vända röret upp och ned åtta gånger. Uppochnedvändningen av röret förebygger proppbildning. Om blandningen är otillräcklig eller fördröjs kan resultatet bli felaktiga testresultat.
4. Blodprov lagras eller transporteras i CellSave Preservative-rör. Se bruksanvisningarna för CellSave Preservative-röret gällande processer, lagring och hantering. Sätt inte prov i kylskåp.

FÖRSIKTIGHET: Inspektera visuellt varje prov för att se om proppbildning förekommer före behandling i CELLTRACKS® AUTOPREP®-systemet. Prov med proppbildning kasseras.

Behandling med CELLTRACKS® AUTOPREP®-system

1. Blanda blodet i ett CellSave Preservative-rör genom att vända det upp och ned för hand fem gånger. Ta sedan bort gummiproppen.
2. Använd en ny pipett och överför 7,5 mL blod från CellSave Preservative-röret till ett 15 mL konformat CELLSEARCH®-rör med motsvarande etikett, som medföljer CELLSEARCH® CTC-kitet.
3. Använd en ny pipett och tillsätt 6,5 mL spädningsbuffert.
4. Sätt på locket på det konformiga CELLSEARCH®-röret och blanda manuellt genom att vända upp och ned på röret fem gånger.
5. Centrifugera provet vid 800 x g i totalt 10 minuter med bromsen fränkopplad med användning av en centrifug med utsvängningshållare. Den 10 minuter långa centrifugeringstiden inkluderar inte tiden som krävs för att uppnå 800 x g. Ställ in centrifugbromsen på Off (Av) om centrifugen har en variabel reglerbar bromsfunktion, ställ in bromsen på den lägsta bromsinställningen. Centrifugera vid rumstemperatur med användning av en centrifug som kan köras vid rumstemperatur. Inspektera varje provrör visuellt för separation av plasma och röda blodkroppar efter provcentrifugeringen.
6. Bearbeta på CELLTRACKS® AUTOPREP®-systemet inom 1 timme efter ovanstående provpreparering. Fullständiga anvisningar finns i användarhandboken för CELLTRACKS® AUTOPREP®-systemet.

Analys med CELLTRACKS ANALYZER II®

CELLTRACKS AUTOPREP®-systemet dispenserar det behandlade provet till en kassett redo för analys med hjälp av CELLTRACKS ANALYZER II®. Den fyllda kassetten i MAGNEST-kassetthållaren måste inkuberas mörkt i minst 20 minuter och analyseras inom 24 timmar. Se användarhandboken för CELLTRACKS ANALYZER II®, där det finns anvisningar om provanalys och datagranskning.

KVALITETSKONTROLL

CELLSEARCH® CTC-kontrollkit (katalognr 7900003) kontrollerar systemprestandan i stort, inklusive instrument, reagenser och användarens teknik. CELLSEARCH® CTC-kontroll måste köras varje dag under patienttestningen eller vid användning av nytt parti för CELLSEARCH® CTC-kit. Se användarhandboken för CELLSEARCH®-kontrollkit gällande förväntade värden.

TOLKNING AV RESULTAT

Resultat rapporteras i form av antalet CTC/7,5 mL blod.

Metastatisk bröstcancer (MBC)

Ett CTC-antal på 5 eller mer per 7,5 mL blod när som helst under sjukdomens gång associeras med en dålig prognos och förutsäger en kortare överlevnadssperiod utan sjukdomsprogression och förutsäger en kortare överlevnadssperiod rent allmänt.

Metastatisk kolorektal cancer (MCRC)

Ett CTC-antal på 3 eller mer per 7,5 mL blod när som helst under sjukdomens gång associeras med en dålig prognos och förutsäger en kortare överlevnadssperiod utan sjukdomsprogression och förutsäger kortare överlevnadssperiod rent allmänt.

Metastatisk prostatacancer (MPC)

Ett CTC-antal på 5 eller mer per 7,5 mL blod när som helst under sjukdomens gång associeras med en dålig prognos och förutsäger en kortare överlevnadssperiod utan sjukdomsprogression och förutsäger en kortare överlevnadssperiod rent allmänt.

Försiktighetsåtgärd

Överföring från ett CTC-antalsprov med **5000 eller fler** CTC-enheter per 7,5 mL blod kan påverka prover som därefter bearbetas med CELLTRACKS® AUTOPREP®-system, inklusive den påföljande satsen. Om celler överförs till efterföljande prover kan CTC-antalet för dessa prover vara felaktigt högre än patientens faktiska CTC-antal.

Ytterligare information finns i användarhandboken för CELLTRACKS® AUTOPREP®.

BEGRÄNSNINGAR

- Försiktighet: Enligt federal lag i USA får denna enhet endast säljas av eller på order av läkare.
- CELLSEARCH®-resultat måste användas i samband med all klinisk information som hämtas från diagnostiska test (dvs. bildtagning och laborietest), fysisk undersökning och fullständig medicinsk anamnes i enlighet med lämpliga patienthanteringsprocedurer.
- Denna *prognostiska* studie visar inte att *ett* nuvarande behandlingssätt är mer eller mindre effektivt än någon annan behandling, eller ingen behandling.
- Resultat eller bildtagningsresultat med CELLSEARCH® motsvarar inte varandra vid utvärdering av övergången mellan patienter med och utan sjukdomsprogression.
- Om patienten behandlas med doxorubicin krävs minst 7 dagar efter administrering av en behandlingsdos doxorubicin innan blodprov tas. Resultat av ett CELLSEARCH®-test måste tolkas försiktigt om prov tagits inom 7 dagar efter administrering av doxorubicinbehandling.
- CTC som inte uttrycker EpCAM detekteras inte av CELLSEARCH®-test.
- CTC som uttrycker EpCAM men inte cytokeratinerna 8, 18 och 19 detekteras inte av CELLSEARCH®-testet.
- Störande ämnen:
SK-BR-3-celler som tillsattes i blodprov exponerades för potentiellt störande ämnen och jämfördes med obehandlade kontrollämnena. Giftiga halter (5 gånger behandlingsindexet) med följande cancerläkemedel, icke receptbelagda läkemedel och andra exogena ämnen testades: cyklofosamid, Mitomycin C®, Procrit®, biotin, 5-fluorouracil, metotrexat, tamoxifencitrat, paklitaxel, Arimidex®, acetaminofen, acetylsalicylsyra, koffein, dextrometorfan, Aredia®, human antimusantikropp (HAMA) typ 1, HAMA typ 2, Herceptin® och ibuprofen. Inga betydande skillnader i SK-BR-3-cellantal detekterades, vilket tyder på att dessa ämnen inte stör funktionen i CELLSEARCH® CTC-kit.

Prov som tillsattes giftiga halter doxorubicin resulterade i avvikande färgning av leukocyter som cykokeratin och CD45 dubbelpositiva celler, på grund av att doxorubicin är en fluorescerande förening som inkorporeras i kärnfärsedda celler. Om det syns är färgningsmönstret för samtliga celler som är CD45-positiva och cytokeratinpositiva uppenbart och lätt identifierbart av användaren som en känd störfärgande profil. Om blodprov tas efter den rekommenderade 7-dagars inkörningsperioden, efter doxorubicininfundering, är det osannolikt att denna störning märks under klinisk användning, på grund av kontrollerade behandlingsnivåer och snabb läkemedelseliminering.

Potentiell störning från lipemi studerades genom tillsats av Intralipid i prov med en koncentration på 2,6%, vilket motsvarar mer än 1000 mg/dL triglycerid. Prov upplöstes för att simulera total hemolys. Bilirubin vid 7,4 mg/dL, HAMA 1/HAMA 2 och hematokrit från 18-60% studerades. Lipemi, hemolys, ikterus och ett brett spektrum hematokritvärden stör inte CELLSEARCH®-testet. HAMA 1 och HAMA 2 stör inte heller, vilket tyder på att individer som får mus-Ig genom parenterala vägar kan testas framgångsrikt med CELLSEARCH®-test.

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Friska frivilliga, icke elakartad bröstsjukdom

Enpunkts CTC-analyser utfördes på kontrollgrupper med 145 friska frivilliga, 101 kvinnor med icke elakartad bröstsjukdom och 99 kvinnor med andra icke elakartade sjukdomar. Epitelceller förväntas inte vara närvarande i periferblodet i friska individer. Av totalt 345 prov från friska frivilliga och kvinnor med icke elaktartad sjukdom hade endast en individ mer än 5 CTC/7,5 mL. Resultatet visas i **Tabell 1**.

Tabell 1. Kontrollpatienter

Kategori	Antal	Medelantal CTC	SD	Antal patienter med ≥5 CTC	Min.*	Max.*
Frisk	145	0,1	0,2	0	0	1
Icke elakartad bröstsjukdom	101	0,2	1,2	1	0	12
Andra icke elakartade sjukdomar	99	0,1	0,4	0	0	3

* NCCLS-riktlinjer C28-A2³

Friska frivilliga, icke elakartad kolorektal sjukdom

Blod samlades in från friska män och kvinnor som var 35 år eller äldre. De friska frivilliga registrerades på tre olika institutioner i USA. För studiens skull togs två rör blod från varje patient och både utvärderades utifrån CTC-halter. Totalt 150 utvärderbara patienter hade en eller två 7,5 mL alikvoter blod som behandlats gällande CTC. Inte alla utvärderbara patienter hade CTC-resultat att tillgå från båda rören. Medelantalet CTC var 0,0 för båda grupper patienter, med standardavvikelser på mellan 0,1 och 0,2. Av totalt 284 prov från friska frivilliga (män och kvinnor) hade noll antal patienter mer än 3 CTC/7,5 mL. Resultatet visas i **Tabell 2**.

Tabell 2. Resultatet gällande CELLSEARCH® CTC-analys i kontrollpatienter

Friska kontroller	Alla kontroller			Endast män			Endast kvinnor		
	Rör 1	Rör 2	Totalt	Rör 1	Rör 2	Totalt	Rör 1	Rör 2	Totalt
Antal	149	135	284	68	64	132	81	71	152
CTC-intervall	0 – 1	0 – 1	0 – 1	0 – 1	0 – 1	0 – 1	0 – 1	0 – 1	0 – 1
Medelantal CTC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CTC SD	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
N (%) ≥1 CTC	2 (1%)	4 (3%)	6 (2%)	1 (1%)	1 (2%)	2 (2%)	1 (1%)	3 (4%)	4 (3%)
N (%) ≥2 CTC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

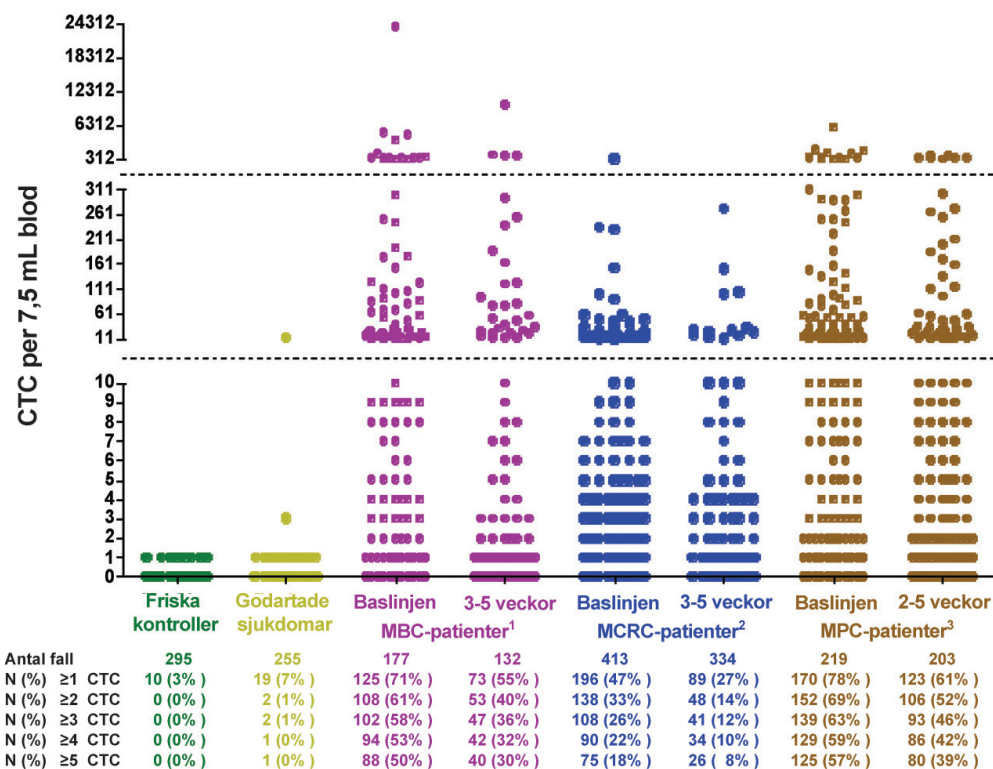
Cirka 30 mL blod (för att öka sannolikheten av att celler detekteras) samlades in i fyra olika CellSave-celler (minst 7,5 mL per rör) från patienter som undergår kolonoskopi eller operation gällande godartad sjukdom. Upp till fyra 7,5 mL blodprov utvärderades för varje patient före proceduren. Resultatet visas nedan i **Tabell 3**. Inte alla utvärderbara patienter hade CTC-resultat att tillgå från alla fyra rören. Ingen av patienterna med godartad kolorektal sjukdom hade mer än en CTC per 7,5 mL blod.

Tabell 3. Resultat av CELLSEARCH® CTC-analys i patienter med godartad kolorektal sjukdom

Godartad sjukdom	Blod som togs före procedur				
	Rör 1	Rör 2	Rör 3	Rör 4	Totalt
Antal	55	55	53	47	210
Intervall	0 – 1	0 – 1	0 – 1	0 – 1	0 – 1
Medelantal	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0
SD	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2
% ≥1 CTC	3 (5%)	1 (2%)	2 (4%)	4 (9%)	10 (5%)
% ≥2 CTC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Figur 1 visar frekvensen CTC hos friska och sjuka med godartad sjukdom (kontroller) och hos patienter med MBC, MCRC MPC, innan behandling inleds och cirka en månad efter inledandet av behandling.

Figur 1. Frekvensen CTC i kontroller (patienter utan cancer) och patienter med metastatisk bröstcancer¹ (MBC), metastatisk kolorektal cancer² (MCRC) eller metastatisk prostatacancer³ (MPC) innan inledandet av ett nytt behandlingssätt (baslinje) och ~2-5 veckor efter inledandet av behandling.



¹MBC – information gällande referenspopulation – Tabell 1 i klinisk IFU.

²MCRC – information gällande referenspopulation – Tabell 12 i klinisk IFU.

³MPC – information gällande referenspopulation – Tabell 22 i klinisk IFU.

PRESTANDAEGENSKAPER

Återvinning

Blodprover från en enda frisk givare sammanslogs och fem av sex 7,5 mL alikvoter tillsattes 1300, 325, 81, 20 och 5 odlade bröstcancer celler (SK-BR-3). Det sjätte blodröret innehöll blod utan tillsats och fungerade som nollpunkt. Dessa prover bearbetades i CELLTRACKS® AUTOPREP®-systemet med CELLSEARCH® CTC-kit och CTC-antalet fastställdes med CELLTRACKS ANALYZER II®. Experimentet upprepades med ytterligare fyra givare. De observerade cellantalen plottades mot resultatet av det förväntade cellantalet. Resultatet sammanfattas i **Tabell 4**.

Tabell 4. Beräkning av procentuell detektering.

Förväntat antal tumörer	Genomsnittligt observerat antal tumörceller	Intervall för procentuell återhämtning
1300	1215	91 till 95%
325	308	82 till 101%
81	85	80 till 136%
20	22	95 till 140%
5	7	120 till 200%

Linjär regressionsanalys utfördes för att fastställa passningen för den totala eller minsta kvadraten för jämförelsen av de observerade och förväntade cellantalen genom alla data. Regressionsformeln för dessa 30 prov var $Y=0,93x + 3,87$ med en $R^2=0,999$ ($R=0,999$). Resultatet av denna studie säger att genomsnittet för återhämtningen, som härlemts från regressionsanalysen, är ca 93% inom det testade CTC-intervall.

Med hänsyn till den linjära responsen avseende antalet tumörceller skulle man förvänta sig att lutningen på den observerade jämfört med den förväntade plotten skulle vara 1,0. Lutningen är emellertid 0,93. Detta beror på att CELLTRACKS® AUTOPREP®-systemet med CELLSEARCH® CTC-kit involverar infångning och fluorescensmärkning av celler efter att de detekterats och räknats med CELLTRACKS ANALYZER II®. Förlusten av celler skulle därför kunna förklaras med något av följande: 1) återhämtning av endast 93% av tumörcellerna som tillsatts i 7,5 mL blod med CELLTRACKS® AUTOPREP®-systemet, 2) detektion av endast 93% av tumörcellerna som är närvarande i provkammaren med CELLTRACKS ANALYZER II® eller 3) en kombination av båda dessa felkällor.

Linjäritet och rapporterbart intervall

Ett annat sätt att undersöka tidigare data är att analysera dem som en spädningsserie för att utvärdera testlinjäritet. Vi tog bort kopplingsvariabeln återhämtning i procent genom att använda det observerade värdet i initialprovet i spädningsserien (dvs. första röret) delat med spädningsfaktorerna, för att fastställa de förväntade värdena för spädningsserien för varje patientprov. Regression av hela detta antal observerade tumörceller jämfört med antalet förväntade tumörceller gav en lutning på 1,007, en skärningspunkt på 3,0 och ett $R^2=0,990$ ($R=0,995$). När procentandelen återhämtning (cellförlust) faktorerats ut ur CTC-värdena för varje ursprungligt prov visade denna dataanalys att detektionen av CTC var linjär över det rapporterbara intervallet på mellan 0 och 1238 tumörceller.

Detektionsgränser

En CTC per 7,5 mL kan detekteras av CELLTRACKS ANALYZER II®, vilket resulterar i en detektionsgräns på 1 CTC i en kassett. Linjär regression visar att i genomsnitt 93% av CTC som är närvarande i ett 7,5 mL blodprov återhämtas med användning av CELLTRACKS® AUTOPREP®-systemet (se avsnittet **Återhämtning**). Förlusten av ca 7% av CTC i provet är inte tillräcklig för att reducera detektionsgränsen på 1 CTC.

Reproducerbarhet:

a. Systemreproducerbarhet med CELLSEARCH® CTC-kontroll

Tre olika CELLSEARCH® CTC-kontrollprov preparerades och behandlades varje dag i mer än 30 dagar enligt den långvariga metoden i NCCLS-riktlinjen EP5-A2. Varje provflaska för engångsbruk innehåller en låg och en hög koncentration celler från en fast cellinje som förfärgats med två olika fluorkromer. Sammanfattningsstatistik för höga och låga kontrollcellkoncentrationer visas nedan.

Tabell 5. Sammanfattning över precisionsanalyser

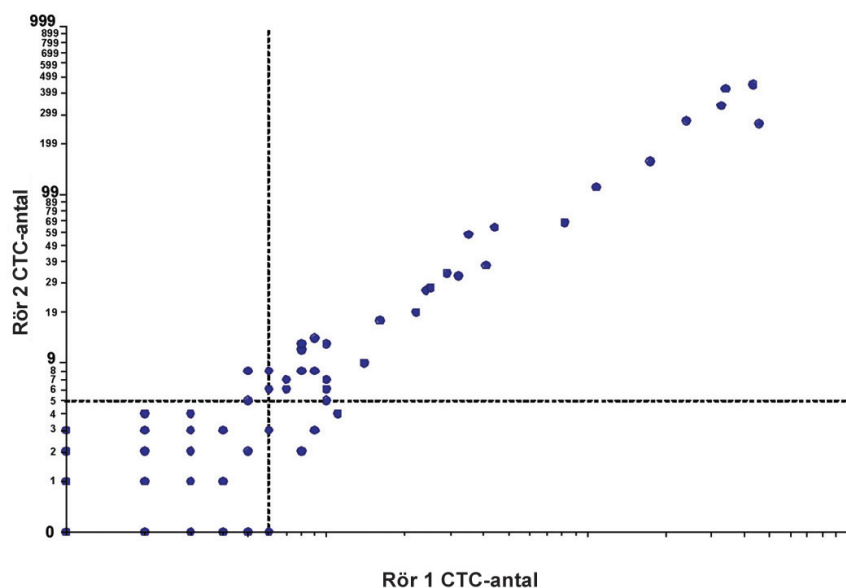
	Låg	Hög
Antal	99	99
Medelantal celler	48	969
Total standardavvikelse för noggrannhet (S_T)% CV	18%	5%

b. Systemreproducerbarhet med patientprov

Metastatisk bröstcancer (MBC)

Totalt 163 blodprovsdubletter samlades in från 47 patienter med metastatisk bröstcancer under den kliniska studiens gång. Proven behandlades på olika ställen för att fastställa reproducerbarheten för CTC-mätningar. Regressionsekvationen för jämförelse av dessa 163 provdubletter var $Y=0,98x + 0,67$, $R^2=0,99$. **Figur 2** visar punktdiagram för dubletter med CTC-resultat i blod från MBC-patienter på en logaritmisk skala, med en tröskel på 5 CTC, vilket visas av de streckade linjerna.

Figur 2. Reproducerbarhet av CTC-antal i dubletter med MBC-prov (n=163) med ett genomsnitt på <5 eller ≥5 CTC per 7,5 mL blod.

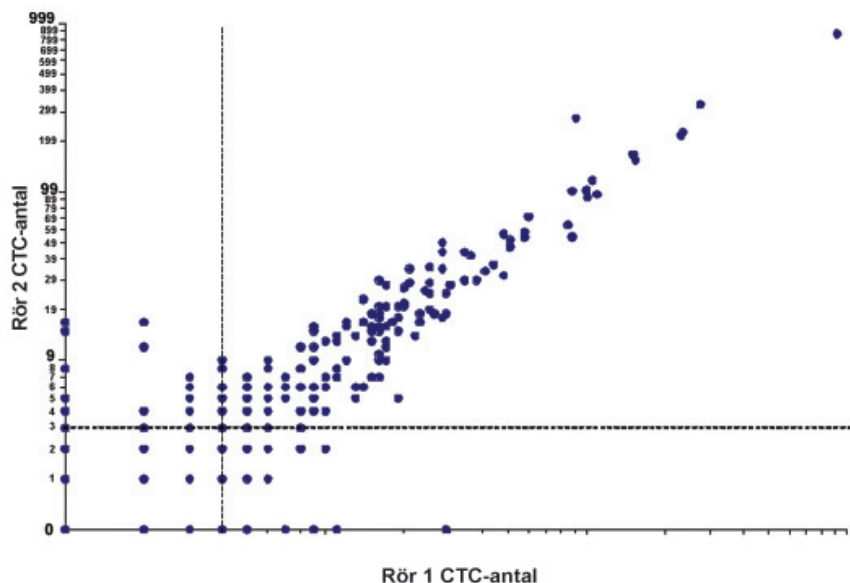


Figur 2 OBS! Det kan finnas mer än en punkt lagd ovanpå en annan. Det fanns till exempel på denna plott 50 förekomster (31%) där båda rören innehöll 0 CTC, 18 förekomster (11%) där rör 1 innehöll 0 CTC och rör 2 innehöll 1 CTC. Vidare var där 18 förekomster (11%) där rör 1 innehöll 1 CTC och rör 2 innehöll 0 CTC.

Metastatisk kolorektal cancer (MCRC)

Totalt 1627 blodprovsdubletter samlades in från 430 MCRC-patienter under den kliniska studiens gång. Proven behandlades på olika ställen för att fastställa reproducerbarheten för CTC-mätningar. Regressionsekvationen för jämförelse av dessa 1627 provdubletter var $Y=0,98x + 0,18$, $R^2=0,96$. **Figur 3** visar punktdiagram för dubletter med CTC-resultat i blod från MCRC-patienter som kartlagts på en logaritmisk skala, med en tröskel på 3 CTC, vilket visas av de streckade linjerna.

Figur 3. Reproducerbarhet av CTC-antal i dubletter med MCRC-prov (n=1627) med ett genomsnitt på <3 eller ≥3 CTC per 7,5 mL blod.



Figur 3 OBS! Det kan finnas mer än en punkt lagd ovanpå en annan. Det fanns till exempel på denna plott 975 förekomster (60%) där båda rören innehöll 0 CTC, 116 förekomster (7%) där rör 1 innehöll 0 CTC och rör 2 innehöll 1 CTC. Vidare var där 109 förekomster (7%) där rör 1 innehöll 1 CTC och rör 2 innehöll 0 CTC.

Variationen mellan olika provrör i CTC-antal mellan blodprov från patienter med metastatisk bröstcancer och kolorektal cancer visas i **Figur 2 och 3**. Fördelningen av sällsynta händelser (till exempel tumörceller) i en viss volym är godtycklig och oberoende av cell- eller sjukdomstyp. Detta karaktäriseras bäst av Poisson-fördelningen, en matematisk metod som används i modelleringssystem där sannolikheten att en händelse inträffar är mycket låg men antalet möjligheter att en sådan händelse inträffar är stor⁵. För rör med mycket få prostatiska CTC är det rimligt att vänta sig variation i resultat som liknar det som visas i **Figur 2 och 3**. Eftersom två tidigare studier av MBC- och MCRC-patienter visade nästan identiska resultat utfördes inte någon jämförelse mellan rör gällande antalet CTC i blodprov från patienter med metastatisk prostatacancer under CELLSEARCH® klinisk prövning med CTC-prostata. Dock visade resultaten av en oberoende studie med CELLSEARCH®-teknik som utfördes på Memorial Sloan-Kettering Cancer Center inga systematiska variationer i CTC-antal över intervallet 0 och 1192 CTC per rör för patienter med metastatisk prostatacancer⁴.

BIBLIOGRAFI

1. Cancer Biology, 3rd edition, Ray Ruddon 1995
2. NCCLS Approved Guideline EP5-A, "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices".
3. NCCLS Approved Guideline C28-A2, "How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory".
4. Shaffer DR, Leversha MA, Danila DC, Lin O, Gonzalez-Espinoza R, Gu B, Anand A, Smith K, Maslak, P, Doyle GV, Terstappen LWMM, Lilja H, Heller G, Fleisher M and Scher HI. "Circulating Tumor Cell Analysis in Patients with Progressive Castration-Resistant Prostate Cancer", Clinical Cancer Research, Vol 13 No.7: 2023-2029, (2007).
5. Tibbe A.G.J, Miller C.M and Terstappen LWMM "Statistical Considerations for Enumeration of Circulating Tumor Cells", Cytometry Part A 71a:154-162 (2007).

REF 7900001
16 – testkit



**Circulating Tumor Cell Kit
(epitelrelaterade)**

RESULTAT AV KLINISK PRÖVNING

Innehåll

1 Patienter med metastatisk bröstcancer (MBC)	5
1.1 CTC-frekvenser	5
1.2 Analys av MBC-patienter gällande överlevnadsgrad utan sjukdomsprogression (PFS)	6
1.2.1 PFS med CTC-resultat (baslinjen)	6
1.2.2 PFS med CTC-resultat (uppföljning)	6
1.2.3 Minskning eller ökning av CTC förutspår förbättrad eller försämrade PFS	7
1.3 Analys av överlevnadsgraden (OS) i stort gällande MBC-patienter	8
1.3.1 OS-analys med CTC-resultat (baslinjen)	8
1.3.2 OS med CTC-resultat (uppföljning)	8
1.3.3 Minskning eller ökning av CTC förutspår förbättrad eller försämrade OS	9
1.3.4 Univariat Cox-regressionsanalys av MBC-patienter	10
1.3.5 Multivariat Cox-regressionsanalys av MBC-patienter	11
1.4 Användning av CTC för att övervaka klinisk status på metastatisk bröstcancer	12
1.4.1 Relation mellan överlevnadsgrad, CTC och sjukdomsutvärdering genom bildtagning	12
1.4.2 CTC	12
1.4.3 Bildtagning	12
1.4.4 Relation mellan överlevnadsgrad och bildtagning och CTC	13
1.4.5 Överensstämmelse mellan CTC och radiologisk övervakning	15
1.4.6 CTC som komplement till bildtagning	17
1.5 Variabilitet för CTC och radiologiska utvärderingar	17
1.5.1 CTC	17
1.5.2 Bildtagning	17
2 Patienter med metastatisk kolorektal cancer (MCRC)	18
2.1 CTC-frekvenser	19
2.2 Analys av MCRC-patienter gällande överlevnadsgrad utan sjukdomsprogression (PFS)	20
2.2.1 PFS med CTC-resultat (baslinjen)	20
2.2.2 PFS med CTC-resultat (uppföljning)	20
2.2.3 Minskning eller ökning av CTC förutspår förbättrad eller försämrade PFS	21
2.3 Analys av överlevnadsgraden (OS) i stort gällande MCRC-patienter	22
2.3.1 OS-analys med CTC-resultat (baslinjen)	22
2.3.2 OS med CTC-resultat (uppföljning)	23
2.3.3 Minskning eller ökning av CTC förutspår förbättrad eller försämrade OS	23
2.3.4 Univariat Cox-regressionsanalys av MCRC-patienter	24
2.3.5 Multivariat Cox-regressionsanalys av MCRC-patienter	25
2.4 Användning av CTC för att övervaka klinisk status på metastatisk kolorektal cancer	26
2.4.1 Relation mellan överlevnadsgrad, CTC och sjukdomsutvärdering genom bildtagning	26
2.4.2 CTC	27
2.4.3 Bildtagning	27
2.4.4 Relation mellan överlevnadsgrad och bildtagning och CTC	27
2.4.5 Överensstämmelser mellan CTC och radiologisk övervakning av MCRC-patienter	29
2.4.6 CTC som komplement till bildtagning	31
3 Patienter med metastatisk prostatacancer (MPC)	31
3.1 CTC-frekvenser	32
3.2 Analys av MPC-patienter gällande överlevnadsgrad utan sjukdomsprogression (PFS)	33
3.2.1 PFS med CTC-resultat (baslinjen)	33
3.2.2 PFS med CTC-resultat (uppföljning)	34
3.2.3 Minskning eller ökning av CTC förutspår förbättrad eller försämrade PFS	34

3.3	Analys av överlevnadsgraden (OS) i stort gällande MPC-patienter	35
3.3.1	OS-analys med CTC-resultat (baslinjen)	35
3.3.2	OS med CTC-resultat (uppföljning)	36
3.3.3	Minskning eller ökning av CTC förutspår förbättrad eller försämrade OS	37
3.3.4	Univariat Cox-regressionsanalys av MPC-patienter	38
3.3.5	Multivariat Cox-regressionsanalys av MPC-patienter	39
3.4	Användning av CTC för att övervaka klinisk status på patienter med metastatisk prostatacancer	41
3.4.1	Relation mellan överlevnadsgrad, CTC och sjukdomsutvärdering genom PSA	41
3.4.2	Överensstämmelser mellan CTC- och PSA-ändringar hos MPC-patienter	42
3.4.3	CTC-halter och PSA-minskning i kombination för att göra prognoser för MPC-patienter	44
Lista över tabeller		
Tabell 1:	Statistik för MBC-patienter	5
Tabell 2:	PFS för MBC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid olika tidpunkter	7
Tabell 3:	OS för MBC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid olika tidpunkter	9
Tabell 4:	Univariat Cox-regressionsanalys av MBC-patienter	10
Tabell 5:	Multivariat Cox-regressionsanalys gällande överlevnadsgraden utan sjukdomsprogression hos MBC-patienter	11
Tabell 6:	Multivariat Cox-regressionsanalys gällande OS hos MBC-patienter	12
Tabell 7:	OS för MBC-patienter med CTC-utvärdering cirka en månad efter behandlingen påbörjas och inom en månad efter den radiologiska utvärderingen	14
Tabell 8:	MBC-patientvis jämförelse av CTC och bildtagning	16
Tabell 9:	MBC-observationsvis jämförelse av CTC och bildtagning	16
Tabell 10:	MBC-patientvis jämförelse av CTC och bildtagning	16
Tabell 11:	Variabilitet av radiologiska utvärderingar och CTC-utvärderingar av MBC-patienter	18
Tabell 12:	Statistik för MCRC-patienter	19
Tabell 13:	Undantag från analyser av överlevnadsgrad utan sjukdomsprogression och i stort, gällande MCRC-patienter	19
Tabell 14:	PFS för MCRC-patienter med <3 eller ≥3 CTC vid olika tidpunkter	21
Tabell 15:	OS för MCRC-patienter med <3 eller ≥3 CTC vid olika tidpunkter	23
Tabell 16:	Univariat Cox-regressionsanalys av MCRC-patienter	25
Tabell 17:	Multivariat Cox-regressionsanalys av MCRC-patienter	26
Tabell 18:	OS för MCRC-patienter med CTC-utvärdering cirka en månad efter behandlingen påbörjas och inom en månad efter den radiologiska utvärderingen	28
Tabell 19:	MCRC-patientvis jämförelse av CTC och bildtagning	30
Tabell 20:	MCRC-observationsvis jämförelse av CTC och bildtagning	30
Tabell 21:	MCRC-patientvis jämförelse av CTC och bildtagning	30
Tabell 22:	Statistik för MPC-patienter	32
Tabell 23:	MPC-patienter som utesluts ur PFS- och OS-analyser	33
Tabell 24:	PFS för MPC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid olika tidpunkter	34
Tabell 25:	OS för MPC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid olika tidpunkter	37
Tabell 26:	Univariat Cox-regressionsanalys av MPC-patienter	39
Tabell 27:	Multivariat Cox-regressionsanalys av MPC-patienter	40
Tabell 28:	OS för MPC-patienter 6-8 veckor efter inledningen av behandlingen	42
Tabell 29:	MPC-patientvis jämförelse av CTC och 30% PSA-minskning efter 2-5 veckor	43
Tabell 30:	MPC-patientvis jämförelse av CTC och 30% PSA-minskning efter 13-20 veckor	43
Tabell 31:	MPC-observationsvis jämförelse av CTC och 30% PSA-minskning	43

Lista över figurer

Figur 1: PFS för MBC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid baslinjen (N=177).	6
Figur 2: PFS för MBC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid olika tidpunkter under uppföljning.	7
Figur 3: En minskning av CTC till under 5 efter inledningen av behandlingen förutspår längre PFS för MBC-patienter.	8
Figur 4: OS för MBC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid baslinjen (N=177).	8
Figur 5: OS för MBC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid olika tidpunkter under uppföljning.	9
Figur 6: En minskning av CTC under 5 efter inledningen av behandlingen förutspår längre OS, medan en ökning av CTC till 5 eller högre förutspår kortare OS för MBC-patienter.	10
Figur 7: Korrelation mellan radiologisk och CTC-utvärdering med OS: OS för MBC-patienter med NPD eller PD vid studien gällande första uppföljningen med bildtagning (N=138)	14
Figur 8: Korrelation mellan radiologisk och CTC-utvärdering med OS: OS för MBC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid första uppföljningen efter inledningen av behandlingen (N=138).	15
Figur 9: Korrelation mellan radiologisk och CTC-utvärdering med OS: OS för MBC-patienter med <5 eller ≥5 CTC inom ± 1 månad efter första studien gällande uppföljning med bildtagning (N=134).	15
Figur 10: OS för MBC-patienter i grupperna 1, 2, 3 och 4 med användning av den första uppföljningen med CTC-utvärdering efter inledningen av behandling (n=138) och den sjukdomsstatus som fastställdes vid den första uppföljande bildtagningsstudien.	17
Figur 11: PFS för MCRC-patienter med <3 eller ≥3 CTC vid baslinjen (N=413).	20
Figur 12: PFS för MCRC-patienter med <3 eller ≥3 CTC vid olika tidpunkter under uppföljning.	21
Figur 13: En minskning av CTC under 3 efter inledningen av behandlingen förutspår längre PFS för MCRC-patienter.	22
Figur 14: OS för MCRC-patienter med <3 eller ≥3 CTC vid baslinjen (N=413).	22
Figur 15: OS för MCRC-patienter med <3 eller ≥3 CTC vid olika tidpunkter under uppföljning.	23
Figur 16: En minskning av CTC under 3 efter inledningen av behandlingen förutspår längre OS, medan en ökning av CTC till 3 eller högre förutspår kortare OS för MCRC-patienter.	24
Figur 17: Korrelation mellan radiologisk och CTC-utvärdering med OS: OS för MCRC-patienter med NPD eller PD vid den första uppföljande bildtagningsstudien (N=402).	28
Figur 18: Korrelation mellan radiologisk och CTC-utvärdering med OS: OS för MCRC-patienter med <3 eller ≥3 CTC vid första uppföljningen efter inledningen av behandlingen (N=320).	29
Figur 19: Korrelation mellan radiologisk och CTC-utvärdering med OS: OS för MCRC-patienter med <3 eller ≥3 CTC inom ± 1 månad efter den första uppföljande bildtagningsstudien (N=364).	29
Figur 20: OS för MCRC-patienter i grupperna 1, 2, 3 och 4 CTC 3-5 veckor efter inledningen av behandling (n=320) och den sjukdomsstatus som fastställdes vid den första uppföljande bildtagningsstudien.	31
Figur 21: PFS för MPC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid baslinjen (N=219).	33
Figur 22: PFS för MPC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid olika tidpunkter under uppföljning.	34
Figur 23: En minskning av CTC under 5 efter inledningen av behandlingen förutspår längre PFS hos MPC-patienter.	35
Figur 24: OS för MPC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid baslinjen (N=219).	36
Figur 25: OS för MPC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid olika tidpunkter under uppföljningen.	36
Figur 26: En minskning av CTC under 5 efter inledningen av behandlingen förutspår längre OS, medan en ökning av CTC till 5 eller högre förutspår kortare OS hos MPC-patienter.	37
Figur 27: OS för MPC-patienter 2-5 veckor efter inledningen av behandlingen.	41
Figur 28: OS för MPC-patienter 6-8 veckor efter inledningen av behandlingen.	41
Figur 29: OS för MPC-patienter 9-12 veckor efter inledningen av behandlingen.	41
Figur 30: OS för MPC-patienter 13-20 veckor efter inledningen av behandlingen.	42
Figur 31: CTC-nivåer och PSA-ändringar i kombination för att förutspå OS 2-5 veckor (panel A), 6-8 veckor (panel B), 9-12 veckor (panel C) och 13-20 veckor (panel D) efter inledningen av behandlingen.	44

1 Patienter med metastatisk bröstcancer (MBC)

En multicenter, prospektiv klinisk prövning utfördes för att fastställa om antalet CTC förutspår sjukdomsprogression och överlevnadsgrad. Patienter med metastatisk bröstcancer med mätbar (N=177) sjukdom som påbörjade nytt behandlingssätt registrerades. Kliniska data analyserades utifrån avsikten att behandla. Patientstatistik visas i **Tabell 1**.

Tabell 1: Statistik för MBC-patienter

Kategori		N=177 patienter
Ålder vid baslinjen	Medelvärde ± standardavvikelse medianvärde	58±13 58
	Beskrivning av kategorier	Antal patienter (% av totalantalet)
Stadium	1	26 (15%)
	2	92 (52%)
	3	26 (15%)
	4	20 (11%)
	Okänt	13 (7%)
Ras	Vit	153 (86%)
	svart	14 (8%)
	spansktalande	7 (4%)
	okänd	3 (2%)
Baslinjens ECOG-poäng	0	82 (46%)
	1	72 (41%)
	2	18 (10%)
	Okänd	5 (3%)
Sjukdomsställe	Inre organ	152 (86%)
	Skelett	153 (86%)
ER/PR	+	121 (68%)
	-	54 (31%)
	Okänd	2 (1%)
HER2	0	91 (51%)
	1+	12 (7%)
	2+	18 (10%)
	3+	27 (15%)
	Okänd	29 (17%)
Behandlingssätt	Första sättet	82 (46%)
	Andra sättet	26 (15%)
	≥Tredje sättet	67 (38%)
	Okänt	2 (1%)
Behandlingstyp	Kemo (Ch)	74 (42%)
	endokrin (En)	45 (25%)
	målinriktat (M)	9 (5%)
	K/En	10 (6%)
	K/M	23 (13%)
	En/M	7 (4%)
	K/En/M	2 (1%)
	Diverse	2 (1%)
	Okänt	5 (3%)

Baslinjen för CTC-antal fastställdes innan inledningen av ett nytt behandlingssätt. Uppföljning med CTC-antal fastställdes efter inledningen av behandlingen med 3-4 veckors intervall. För baslinjeanalyser mättes PFS från tidpunkten då blod togs på baslinjen till diagnosen för sjukdomsprogression med hjälp av CT-skanning och/eller kliniska tecken och symtom. OS mättes från tidpunkten då blod togs på baslinjen till tidpunkten då döden inträdde. För uppföljningsanalyserna mättes PFS från tidpunkten för uppföljningen med blodprovstagning till diagnosen för sjukdomsprogression eller döden. OS mättes från tidpunkten för uppföljningen för blodprovstagning till tidpunkten då döden inträdde.

1.1 CTC-frekvenser

CTC-resultat från uppföljningen med blodtagning efter 3-5 veckor, 6-8 veckor, 9-12 veckor och 13-20 veckor efter inledningen av behandlingen klassificerades som fördelaktig (<5 CTC) eller ofördelaktig (≥5 CTC). Om mer än ett CTC-resultat hämtades inom bestämda tidpunkter för uppföljning användes CTC-resultatet från det blodprov som avvek mest från baslinjens blodprov.

Av det totala MBC-patientantalet på 177 gick 23 inte att utvärdera vid första uppföljningen. Av dessa 23 patienter avled tio patienter innan uppföljning med blodprov kunde utföras, nio patienter upplevde sjukdomsprogression innan uppföljning med blodprov och fyra deltog inte i uppföljningen. Det är anmärkningsvärt att alla tio patienter som avled hade ≥5 upp till extremt höga CTC-antal vid baslinjen (CTC-antal 9, 11, 15, 24, 111, 126, 301, 1143, 4648 och 23.618). Av de 154 patienterna som kunde delta i uppföljningen hade 132, 99, 129 och 85 patienter blodprov tagna 3-5, 6-8, 9-14 och 15-20 veckor efter inledningen av behandlingen.

Tabell 3 sammanfattar totalantalet och procentandelen patienter med ofördelaktiga CTC-antal i den kliniska prövningen för OS som avviker från antalen och procentandelarna gällande patienter med PFS som visas i **Tabell 2**. Skillnaden i antalet patienter vid varje tidpunkt *mellan* de två tabellerna beror på sjukdomsprogressionen hos vissa patienter före blodprovstagningen. Skillnaden i antalet patienter *inom* tabellerna beror på antalet patienter med blodprov och utvärderbara CTC-resultat vid varje tidpunkt.

1.2 Analys av MBC-patienter PFS

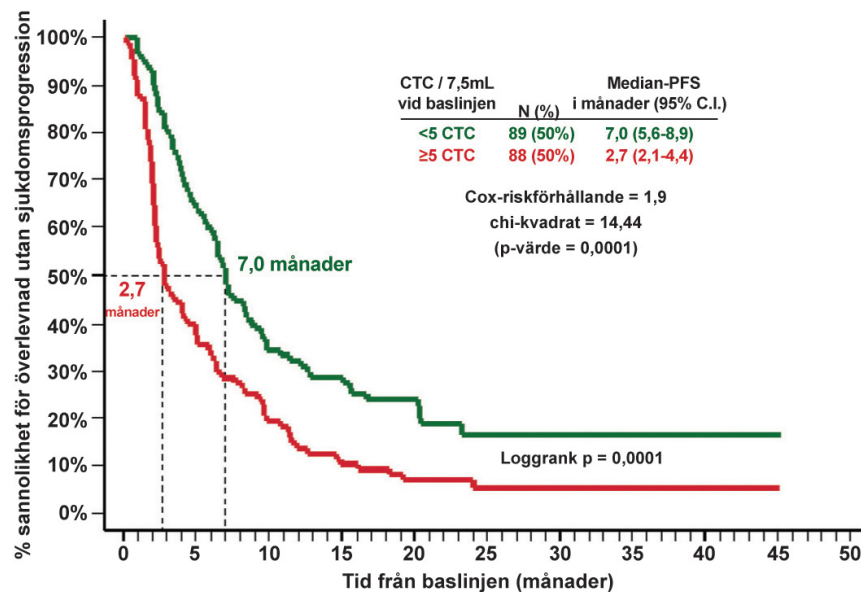
1.2.1 PFS med CTC-resultat (baslinjen)

Samtliga 177 MBC-patienter fick utfört CTC-test på baslinjen. För Kaplan-Meier-analys segmenterades patienterna i två grupper efter CTC-antalet vid baslinjen:

- Den fördelaktiga gruppen (N=89), som visas i **grönt**, bestod av patienter med <5 CTC.
- Den ofördelaktiga gruppen (N=88), som visas i **rött**, bestod av patienter med ≥5 CTC.

Median-PFS var betydligt längre i den fördelaktiga gruppen jämfört med den ofördelaktiga gruppen (7,0 jämfört med 2,7 månader). Resultatet sammanfattas i **Figur 1**.

Figur 1: PFS för MBC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid baslinjen (N=177)

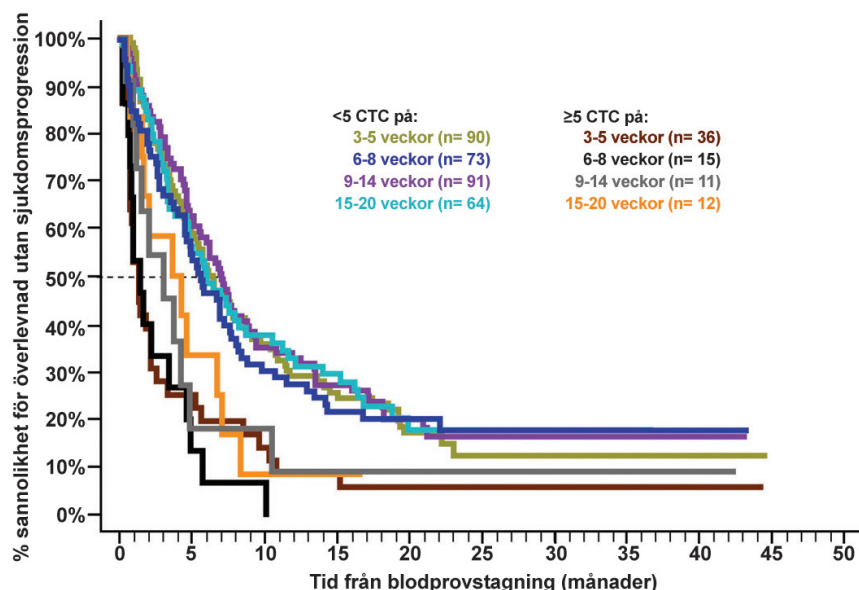


1.2.2 PFS med CTC-resultat (uppföljning)

För Kaplan-Meier-analys segmenterades MBC-patienter i två grupper efter CTC-antalet vid var och en av de olika blodprovstagningarna för uppföljning. Båda patientgrupper vid var och en av de olika blodprovstagningstiderna för uppföljning efter inledningen av behandling för PFS visas i **Figur 2**. PFS-tider beräknades från tidpunkten för varje blodprovstagning. Patienter som uppvisade tecken på sjukdomsprogression före en viss blodprovstagning uteslöts ur analysen för den blodprovstagningen och samtliga följande blodprovstagningar för uppföljning. **Figur 2** visar förmågan för CTC hos patienter med <5 och ≥5 CTC 3-5 veckor, 6-8 veckor, 9-14 veckor och 15-20 veckor efter inledningen av behandlingen att förutspå tiden fram till klinisk sjukdomsprogression hos 177 patienter med metastatisk bröstcancer.

- Den fördelaktiga gruppen, som visas i **olivgrönt, blått, lila** och **cyan**, bestod av patienter med <5 CTC.
- Den ofördelaktiga gruppen, som visas i **brunt, svart, grått** och **orange**, bestod av patienter med ≥5 CTC.

Figur 2: PFS för MBC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid olika tidpunkter under uppföljning (N=177)



Tabell 2 sammanfattar resultaten för PFS-analysen med användning av CTC-nivåer och en tröskel på ≥5 CTC/7,5 mL vid var och en av tidpunkterna för blodprovstagning.

Tabell 2: PFS för MBC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid olika tidpunkter

1	2	3	4	5	6
Provtagningstid Efter Tx-initiering	Antal	≥5 CTC	Median-PFS i månader (95% CI)		Logrank p-värde
			<5 CTC	≥5 CTC	
Baslinjen	117	88 (50%)	7,0 (5,6-8,9)	2,7 (2,1-4,4)	0,0001
3-5 veckor	126	36 (29%)	6,1 (4,7-8,6)	1,3 (0,7-2,1)	<0,0001
6-8 veckor	88	15 (17%)	5,6 (4,5-7,6)	1,4 (0,6-3,4)	0,0001
9-14 veckor	102	11 (11%)	7,0 (5,1-8,8)	3,0 (0,9-4,8)	0,0251
15-20 veckor	76	12 (16%)	5,9 (3,8-8,7)	3,6 (0,7-7,0)	0,0610

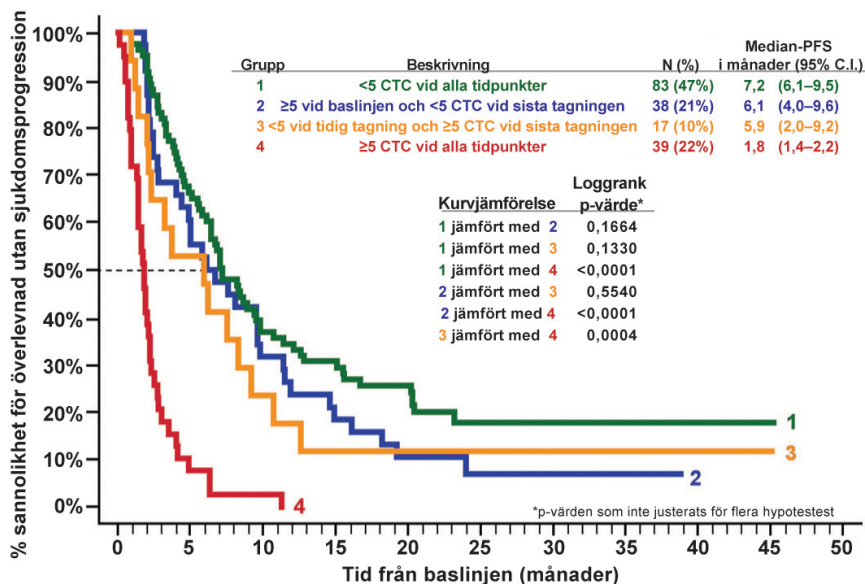
Enligt **Figur 2** och **Tabell 2** hade patienter med förhöjd CTC (≥5 CTC/7,5 mL helblod) vid samtliga tidpunkter mycket högre sannolikhet för snabb sjukdomsprogression än patienter med <5 CTC. **Tabell 2** kolumn 4 visar median-PFS-tider för patienter med <5 CTC mellan 5,6 och 7,0 månader. Tiderna var betydligt längre än median-PFS-tiderna för patienter med ≥5 CTC, vilka låg på mellan 1,3 och 3,6 månader (kolumn 5).

1.2.3 Minskning eller ökning av CTC förutspår förbättrad eller försämrad PFS

Förflutna PFS-tider beräknades utifrån baslinjens blodprov. För Kaplan-Meier-analys (**Figur 3**) segmenterades MBC-patienter i fyra grupper utifrån deras CTC-antal vid baslinjen, 3-5 veckor, 6-8 veckor, 9-14 veckor och 15-20 veckor efter inledningen av behandlingen:

- Grupp 1 (**grön** kurva), 83 (47%) patienter med <5 CTC vid alla blodprovstagningstidpunkter. Fem (6%) av dessa patienter hade endast en blodprovstagning på baslinjen, medan två (2%) hade en blodprovstagning mellan första och sista blodprovstagning med ≥5 CTC.
- Grupp 2 (**blå** kurva), 38 (21%) patienter med ≥5 CTC före inledningen av behandlingen, med minskning till <5 CTC vid tidpunkten för sista blodprovstagningen.
- Grupp 3 (**orange** kurva), 17 (10%) patienter med <5 CTC vid en tidig blodtagning (baslinjen, 3-5 veckor och/eller 6-8 veckor) men som ökat till ≥5 CTC vid tidpunkten för sista blodprovstagningen.
- Grupp 4 (**röd** kurva), 39 (22%) patienter med ≥5 CTC vid alla tidpunkter för blodprovstagning. Tio (26%) av dessa patienter hade endast en blodprovstagning på baslinjen.

Figur 3: En minskning av CTC till under 5 efter inledningen av behandlingen förutspår längre PFS för MBC-patienter



Figur 3 visar att MBC-patienter med ≥5 CTC vid alla tidpunkter (**Grupp 4**) hade kortast median-PFS, vilken avvek betydligt jämfört med median-PFS för **Grupp 3**, **Grupp 2** och **Grupp 1**. Skillnaderna mellan kurvorna för de andra grupperna i denna figur var obetydliga.

1.3 Analys av överlevnadsgraden (OS) i stort gällande MBC-patienter

1.3.1 OS-analys med CTC-resultat (baslinjen)

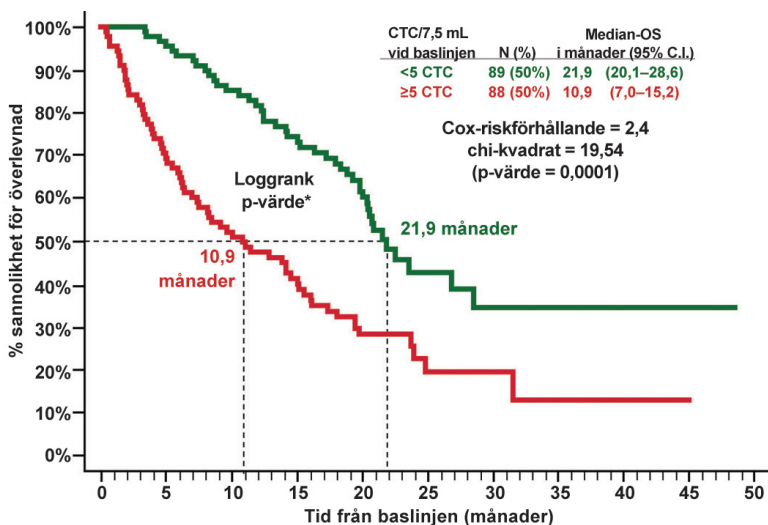
Dödsfall inträffade hos 109 (62%) av de 177 MBC-patienterna, med en medeluppföljningstid för de 68 (38%) patienter som fortfarande var i livet på 22,7±9,4 månader (median=21,1, intervall=4,4 – 48,6). Vid tidpunkten för analyserna hade 44 (49%) av 89 patienter från den fördelaktiga gruppen (<5 CTC vid baslinjen) jämfört med 65 (74%) av 88 från den ofördelaktiga gruppen (≥5 CTC vid baslinjen) avlidit.

För Kaplan-Meier-analysen segmenterades patienter i två grupper efter deras CTC-antal vid baslinjen:

- Den fördelaktiga gruppen (N=89), som visas i **grönt**, bestod av patienter med <5 CTC.
- Den ofördelaktiga gruppen (N=88), som visas i **rött**, bestod av patienter med ≥5 CTC.

Median-OS var betydligt längre i den fördelaktiga gruppen än i den ofördelaktiga gruppen (21,9 respektive 10,9 månader). Resultatet sammanfattas i **Figur 4**.

Figur 4: OS för MBC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid baslinjen (N=177).



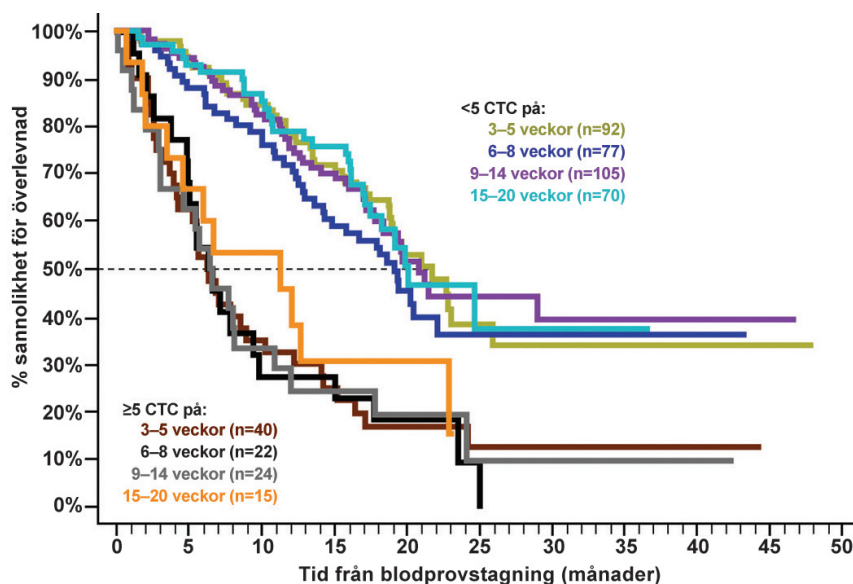
1.3.2 OS med CTC-resultat (uppföljning)

Kaplan-Meier-analyserna av båda MBC-patientgrupperna vid var och en av de olika tidpunkterna för blodprovstagning för uppföljning efter inledning av behandlingen visas i **Figur 5**. Figuren visar förmågan hos CTC hos MBC-patienter med <5 och ≥5 CTC 3-5 veckor, 6-8 veckor, 9-14 veckor och 15-20 veckor efter inledningen av behandlingen att

förutspå tiden fram till dödsfall hos 177 patienter med metastatisk bröstcancer. OS-tider beräknades från tiden för varje blodprovstagning.

- Den fördelaktiga gruppen, som visas i **olivgrönt, blått, lila** och **cyan**, bestod av patienter med <5 CTC.
- Den ofördelaktiga gruppen, som visas i **brunt, svart, grått** och **orange**, bestod av patienter med ≥5 CTC.

Figur 5: OS för MBC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid olika tidpunkter under uppföljning.



Tabell 3 sammanfattar resultaten för OS-analysen med CTC-nivåer och en tröskel på ≥5 CTC/7,5 mL vid var och en av tidpunkterna för blodprovstagning.

Tabell 3: OS för MBC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid olika tidpunkter

1 Provtagningstid Efter Tx-initiering	2 Antal	3 ≥5 CTC	4 Median-OS i månader (95% CI)		6 Logg-rank p-värde
			<5 CTC	≥5 CTC	
Baslinjen	177	88 (50%)	21,9 (20,1-28,6)	10,9 (7,0-15,2)	<0,0001
3-5 veckor	132	40 (30%)	21,7 (18,8-25,9)	6,2 (4,1- 8,9)	<0,0001
6-8 veckor	99	22 (22%)	19,1 (14,2-22,1)	6,3 (4,8- 9,8)	0,0001
9-14 veckor	129	24 (19%)	20,8 (17,8-24,5)	6,4 (3,0-10,9)	<0,0001
15-20 veckor	85	15 (18%)	20,1 (17,1-23,5)	11,3 (2,0-22,9)	0,0021

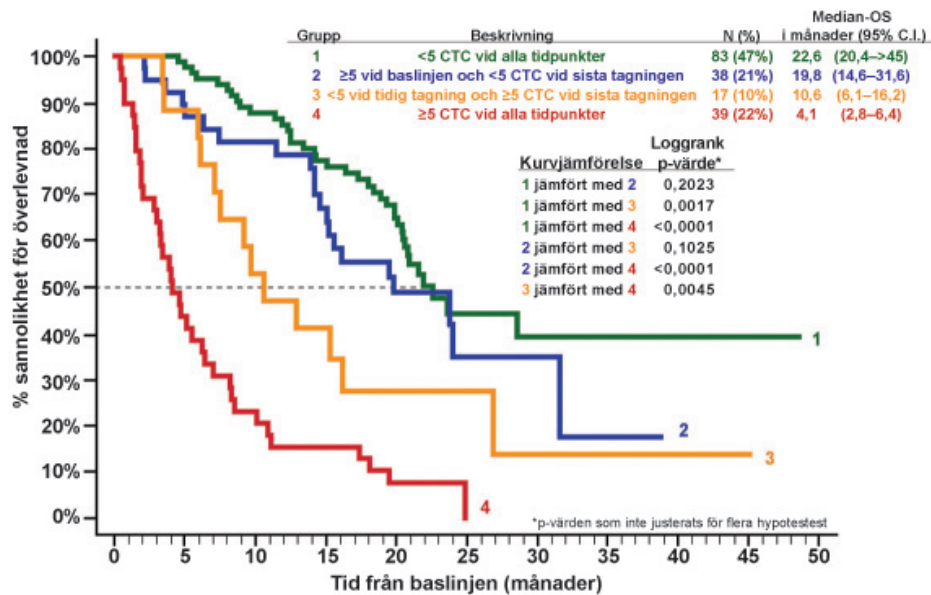
1.3.3 Minskning eller ökning av CTC förutspår förbättrad eller försämrad OS

Förflutna OS-tider beräknades utifrån baslinjens blodprov. För Kaplan-Meier-analys (**Figur 6**) segmenterades MBC-patienter i fyra grupper utifrån deras CTC-antal vid baslinjen, 3-5 veckor, 6-8 veckor, 9-14 veckor och 15-20 veckor efter inledningen av behandlingen:

- Grupp 1 (**grön** kurva), 83 (47%) patienter med <5 CTC vid alla blodprovstidpunkter. Fem (6%) av dessa patienter hade endast en blodprovstagning på baslinjen, medan två (2%) hade en blodprovstagning mellan första och sista blodprovstagningen med ≥5 CTC.
- Grupp 2 (**blå** kurva), 38 (21%) patienter med ≥5 CTC innan inledningen av behandlingen, med minskning till <5 CTC vid tidpunkten för sista blodprovstagningen.
- Grupp 3 (**orange** kurva), 17 (10%) patienter med <5 CTC vid en tidig blodprovstagning (baslinjen, 3-5 veckor och/eller 6-8 veckor) men som ökat till ≥5 CTC vid tidpunkten för sista blodprovstagningen.
- Grupp 4 (**röd** kurva), 39 (22%) patienter med ≥5 CTC vid alla blodtagningstidpunkter. Tio (26%) av dessa patienter hade endast en blodprovstagning på baslinjen.

Figur 6 visar att MBC-patienter som överstiger tröskeln på 5 CTC när som helst efter inledningen av behandlingen hade mycket större sannolikhet för kortare överlevnadsperiod i stort. Patienter med ≥5 CTC vid alla tidpunkter (**Grupp 4**) hade kortast median-OS, vilken avvek betydligt jämfört med median-OS för **Grupp 3**, **Grupp 2**, och **Grupp 1**. Skillnaden i medianöverlevnaden mellan **Grupp 3** och **Grupp 1** var också betydande. Även om median-OS för **Grupp 3** var kortare jämfört med **Grupp 2** var skillnaden inte statistiskt signifikant. **Figur 6** visar även att patienter med ≥5 CTC vid baslinjen men som så småningom minskar till <5 CTC efter inledningen av behandlingen har ungefär samma risk för dödsfall som de patienter som aldrig överskridit tröskeln 5 CTC.

Figur 6: En minskning av CTC under 5 efter inledningen av behandlingen förutspår längre OS, medan en ökning av CTC till 5 eller högre förutspår kortare OS för MBC-patienter.



Enligt vad som visas i **Figur 6** och **Tabell 3** i kolumn 4 och 5 hade MBC-patienter med ≥ 5 CTC vid alla tidpunkter större sannolikhet att avlida tidigare än de med < 5 CTC. Median-OS-tiderna för patienter med < 5 CTC låg på mellan 19,1 och 21,9 månader. Tiderna var betydligt längre än median-OS-tiderna för patienter med ≥ 5 CTC, vilka låg på mellan 6,2 och 11,3 månader.

1.3.4 Univariat Cox-regressionsanalys av MBC-patienter

Följande parametrar analyserades med univariat Cox-regressionsanalys för att utvärdera sambandet med PFS och OS: patientålder (kontinuerlig), sjukdomsstadium vid diagnos (1-4), tid till metastas (kontinuerlig), ECOG-status före inledning av ett nytt behandlingssätt (0-2), ER/PR-status (+/-), HER2/neu-status (0-3+), behandlingssätt (≥ 2 :a eller första), behandlingstyp (endast kemobehandling eller hormonbehandling/kombination), baslinjens CTC-antal (≥ 5 eller < 5 CTC/7,5 mL) och CTC-antal vid uppföljning 3-5 veckor, 6-8 veckor, 9-14 veckor och 15-20 veckor efter inledningen av behandling (≥ 5 eller < 5 CTC/7,5 mL). **Tabell 4** visar resultatet av denna analys och presenterar Cox-riskförhållandet (HR) och associerat p-värde (Wald-test av Z-statistik) samt antalet patienter i varje utvärdering.

Tabell 4: Univariat Cox-regressionsanalys av MBC-patienter

Parameter	Kategorier		Antal MBC-patienter	PFS-risk från baslinjen		OS-risk från baslinjen	
	Positiv	Negativ		HR	p-värde	HR	p-värde
Ålder vid baslinjens blodprovstagning	Ålder i år		175	0,99	0,173	0,99	0,375
Stadium vid primär diagnos	4 jämfört med 3 jämfört med 2 jämfört med 1		164	0,97	0,723	1,00	0,969
ER/PR	Positiv	Negativ	175	0,84	0,327	0,53	0,002
Her-2/neu	3+ jämfört med 2+ jämfört med 1+ jämfört 0		148	0,91	0,207	0,93	0,422
Baslinjens ECOG-status	2 jämfört med 1 jämfört med 0		172	1,14	0,307	1,64	0,001
Tid till metastas	Tid i år		175	0,97	0,048	0,95	0,018
Behandlingssätt	≥Andra	Första	175	1,55	0,007	1,91	0,001
Behandlingstyp	Endast kemo	H / C och/eller I	172	1,97	<0,001	2,22	<0,001
Baslinjens CTC-antal	≥5	<5	177	1,85	<0,001	2,36	<0,001
3-5 veckor CTC-antal	≥5	<5	132	2,52	<0,001	3,30	<0,001
6-8 veckor CTC-antal	≥5	<5	99	3,57	<0,001	2,87	<0,001
9-14 veckor CTC-antal	≥5	<5	129	2,89	<0,001	3,64	<0,001
15-20 veckor CTC-antal	≥5	<5	85	1,86	0,041	2,85	0,004

H/C/och/eller I – Hormon- eller immunbehandling endast eller en kombination av hormon- och/eller kemobehandling och/eller immunbehandling

1.3.5 Multivariat Cox-regressionsanalys av MBC-patienter

Multivariata Cox-regressionsanalyser utfördes av MBC-patienter för att utvärdera den oberoende förmågan för CTC-antalet att göra prognoser genom att justera för påverkan från kända viktiga kliniska faktorer som är statistiskt signifikanta för univariata analyser. CTC befanns vara starka prediktorer för PFS (**Tabell 5**) och OS (**Tabell 6**).

Tabell 5: Multivariat Cox-regressionsanalys gällande överlevnadsgraden utan sjukdomsprogression hos MBC-patienter

Variabel	Antal	Risikförhållande	p-värde
Baslinjens CTC (<5 jämfört med ≥5)	172	1,69	0,001
Tid till metastas (år)		0,98	0,154
Behandlingssätt (första jämfört med ≥andra)		1,52	0,013
Behandlingstyp (hormon/annat jämfört med endast kemo)		1,74	0,001
3-5 veckor uppföljning CTC (<5 jämfört med ≥5)	132	2,32	<0,001
Tid till metastas (år)		0,97	0,166
Behandlingssätt (första jämfört med ≥andra)		1,68	0,008
Behandlingstyp (hormon/annat jämfört med endast kemo)		1,50	0,060
6-8 veckor uppföljning CTC (<5 jämfört med ≥5)	99	2,92	<0,001
Tid till metastas (år)		0,93	0,023
Behandlingssätt (första jämfört med ≥andra)		1,36	0,175
Behandlingstyp (hormon/annat jämfört med endast kemo)		1,90	0,005
9-14 veckor uppföljning CTC (<5 jämfört med ≥5)	129	2,23	0,002
Tid till metastas (år)		0,97	0,170
Behandlingssätt (första jämfört med ≥andra)		1,48	0,061
Behandlingstyp (hormon/annat jämfört med endast kemo)		1,73	0,007
15-20 veckor uppföljning CTC (<5 jämfört med ≥5)	85	1,58	0,140
Tid till metastas (år)		0,96	0,064
Behandlingssätt (första jämfört med ≥andra)		1,80	0,018
Behandlingstyp (hormon/annat jämfört med endast kemo)		1,66	0,049

Tabell 6: Multivariat Cox-regressionsanalys gällande OS hos MBC-patienter

Variabel	Antal	Risikförhållande	p-värde
Baslinjens CTC (<5 jämfört med ≥5)	170	2,62	<0,001
ER/PR (negativ jämfört med positiv)		0,57	0,016
Baslinjens ECOG-status (2 jämfört med 1 jämfört med 0)		1,58	0,001
Tid till metastas (år)		0,97	0,078
Behandlingssätt (första jämfört med andra)		2,33	<0,001
Behandlingstyp (hormon/annat jämfört med endast kemo)		1,78	0,006
3-5 veckor uppföljning CTC (<5 jämfört med ≥5)	130	3,78	<0,001
ER/PR (negativ jämfört med positiv)		0,51	0,020
Baslinjens ECOG-status (2 jämfört med 1 jämfört med 0)		1,69	0,001
Tid till metastas (år)		0,96	0,142
Behandlingssätt (första jämfört med andra)		2,30	0,001
Behandlingstyp (hormon/annat jämfört med endast kemo)		1,72	0,026
6-8 veckor uppföljning CTC (<5 jämfört med ≥5)	99	2,88	0,001
ER/PR (negativ jämfört med positiv)		0,58	0,062
Baslinjens ECOG-status (2 jämfört med 1 jämfört med 0)		1,32	0,173
Tid till metastas (år)		0,94	0,135
Behandlingssätt (första jämfört med andra)		2,51	0,001
Behandlingstyp (hormon/annat jämfört med endast kemo)		2,33	0,003
9-14 veckor uppföljning CTC (<5 jämfört med ≥5)	129	4,14	<0,001
ER/PR (negativ jämfört med positiv)		0,39	0,002
Baslinjens ECOG-status (2 jämfört med 1 jämfört med 0)		1,57	0,016
Tid till metastas (år)		0,98	0,388
Behandlingssätt (första jämfört med andra)		2,21	0,003
Behandlingstyp (hormon/annat jämfört med endast kemo)		2,28	0,003
15-20 veckor uppföljning CTC (<5 jämfört med ≥5)	85	3,44	0,006
ER/PR (negativ jämfört med positiv)		0,38	0,024
Baslinjens ECOG-status (2 jämfört med 1 jämfört med 0)		1,33	0,321
Tid till metastas (år)		0,94	0,150
Behandlingssätt (första jämfört med andra)		3,43	0,001
Behandlingstyp (hormon/annat jämfört med endast kemo)		1,67	0,166

1.4 Användning av CTC för att övervaka klinisk status på metastatisk bröstcancer

1.4.1 Relation mellan överlevnadsgrad, CTC och sjukdomsutvärdering genom bildtagning

Radiologisk bildtagning är en av de primära metoderna för att fastställa sjukdomsstatus och respons på behandling av patienter med metastatisk bröstcancer. För att fastställa sambandet mellan klinisk status enligt bildtagning och CTC, mätt vid två tidpunkter, jämfördes resultat av bildtagning 1) med den verkliga kliniska slutpunkten för allmän överlevnadsgrad och 2) med varandra.

1.4.2 CTC

Tidigare data har visat att MBC-patienter med ≥5 CTC/7,5 mL blod vid efterföljande uppföljningsbesök efter inledningen av behandlingen hade större sannolikhet för sjukdomsprogression och försämrad OS jämfört med patienter med <5 CTC/7,5 mL blod. CTC-resultat som inhämtats vid första uppföljningen efter inledningen av behandlingen, samt även CTC-resultat som inhämtats inom ± en månad efter bildtagningsstudien klassificerades som <5 CTC och ≥5 CTC. Om mer än ett CTC-värde inhämtades inom ± en månad efter bildtagningsstudien användes det CTC-resultat som inhämtades närmast datumet för bildtagningsstudien.

1.4.3 Bildtagning

Samtliga bildtagningskliniker uppfyllde standarden Digital Imaging and Communications in Medicine (digital bildtagning och kommunikation inom medicin, DICOM). Med standardiserade digitala bilder klassificerade två

expertradiologer (läsare), som arbetade enskilt och blindat gällande klinisk information, varje sjukdomsutvärdering med uppföljning (totalt 231 bildtagningsstudier) från 138 patienter med mätbar sjukdom enligt följande: obestämbart (I), stabil sjukdom (S), delrespons (PR) eller sjukdomsprogression (PD), enligt Världshälsoorganisationens (WHO) bidimensionella kriterier. Mätbar sjukdom definierades som förekomsten av minst en lesion ≥ 2 cm som längsta mått. Läsarna identifierade upp till åtta lesioner per patient per tidpunkt genom att beskriva längsta dimensionen på lesionen och längsta vinkelräta dimension. Dessa två dimensioner multiplicerades och "korsprodukten" rapporterades. Summerade mätningar för korsprodukterna beräknades och procentuell ändring från tidigare tidpunkt bestämdes. Även om alla patienter hade en mätbar sjukdom inkluderades icke mätbara lesioner (som ändå kunde detekteras med radiologi) i bestämningen av patientstatus enligt beskrivning i WHO-riktlinjerna. Sjukdomsprogression definierades som en $>25\%$ ökning av summan av alla lesioner eller uppdykande av en ny mätbar eller icke mätbar lesion. Delrespons definierades som en minskning av summan av alla lesioner med $\geq 50\%$ och inga nya lesioner.

Radiologiska tolkningar från två expertradiologer klassificerades enligt följande:

- S och PR ansågs båda påvisa en sjukdom utan progression (NPD)
- PD ansågs påvisa sjukdomsprogression
- När en av radiologerna fastställde klassificeringen Obestämd (I) men en annan radiolog fastställde klassificeringen S, PR eller PD användes klassificeringen från den senare radiologen vid jämförelse med CTC (n=11)
- När båda radiologerna fastställde klassificeringen Obestämd (I) användes inte data vid jämförelsen med CTC (n=3)
- En tredje oberoende radiolog avgjorde tvister mellan två primära läsare gällande PD och NPD (n=27)
- När den tredje oberoende radiologen fastställde klassificeringen Obestämd (I) användes inte data vid jämförelsen med CTC (n=2)
- I seriella bildtagningsstudier användes inte radiologiska resultat där det gått mindre än en månad från föregående beräknade observation (n=1).

1.4.4 Relation mellan överlevnadsgrad och bildtagning och CTC

Separata Kaplan-Meier-analyser utfördes för att jämföra OS hos MBC-patienter i grupperna fördelaktiga (<5 CTC) och ofördelaktiga (≥ 5 CTC) med CTC-resultatet vid två olika tidpunkter och den första uppföljande bildtagningsstudien. Med resultat från de första uppföljande bildtagningsstudierna som utfördes 10,1 $\pm$ 5,1 veckor (median=9,0 veckor) efter inledningen av behandling (dvs. baslinjens blodprovstagning), fastställdes genom bildtagning medianöverlevnaden för de 96 (70%) patienter som hade NPD till 23,8 månader (95% CI mellan 20,4 och 28,6) (**Figur 7, Tabell 7**). För de 42 (30%) patienter som genom bildtagning fastställdes ha PD var medianöverlevnaden 12,9 månader (95% CI mellan 7,1 och 19,3).

För CTC vid första blodprovstagningen, som utfördes 4,3 $\pm$ 2,5 veckor (median=4,0 veckor) efter inledningen av behandlingen, var medianöverlevnaden för 104 (75%) patienter med fördelaktiga CTC-resultat (<5 CTC) 21,9 månader (95% CI mellan 20,4 och 26,9) (**Figur 8, Tabell 7**). Trettiofyra (34) patienter (25%) med ofördelaktiga CTC-resultat (≥ 5 CTC) hade en medianöverlevnadsperiod på 8,3 månader (95% CI mellan 5,9 och 15,1).

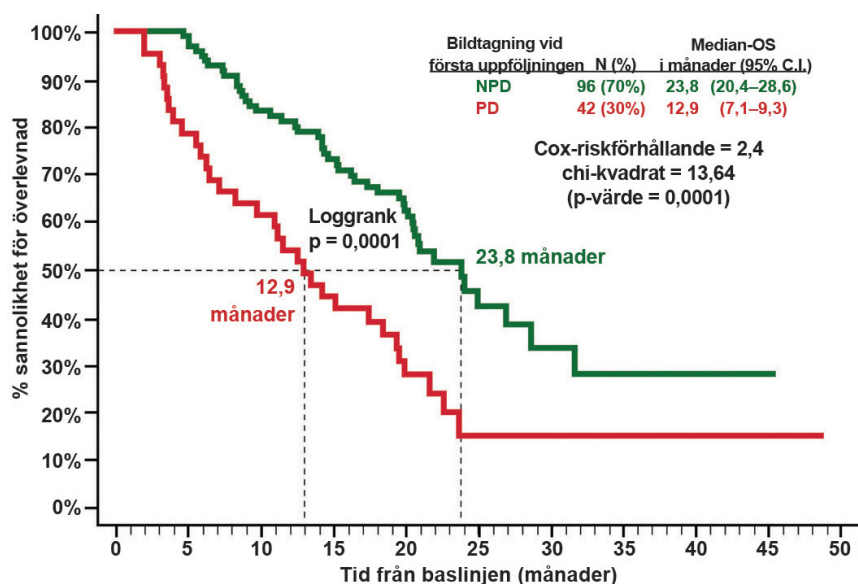
För att fastställa om CTC-utvärderingar som utförts närmare i tiden till bildtagningen resulterade i liknande överlevnadspotential jämfört med CTC-utvärderingar som utfördes cirka 4 veckor efter inledningen av behandlingen, analyserades endast de patienter med CTC-utvärderingar som utförts inom $\pm$ en månad efter första uppföljande bildtagningsstudien (9,9 $\pm$ 5,1 veckor, medianvärde=8,8 veckor, efter inledningen av behandling) (**Figur 9, Tabell 7**). Etthundratrettiofyra (134) av de 138 patienterna (97%) hade CTC-utvärderingar inom en månad efter första uppföljande bildtagningsstudien. Medianöverlevnadstiden för 105 (78%) patienter med fördelaktiga CTC-resultat var 21,9 månader (95% CI mellan 19,9 och 31,6). Medianöverlevnadstiden för 29 (22%) patienter med ofördelaktiga CTC-resultat var 8,5 månader (95% CI mellan 5,5 och 15,1). Dessa data visar att CTC-utvärderingar vid båda tidpunkter ger liknande resultat som bildtagning som utförts cirka 9 veckor efter inledningen av behandling (*Clin. Cancer Res.* Vol 12: 6403-6409, November 2006).

Tabell 7: OS för MBC-patienter med CTC-utvärdering cirka en månad efter behandlingen påbörjas och inom en månad efter den radiologiska utvärderingen

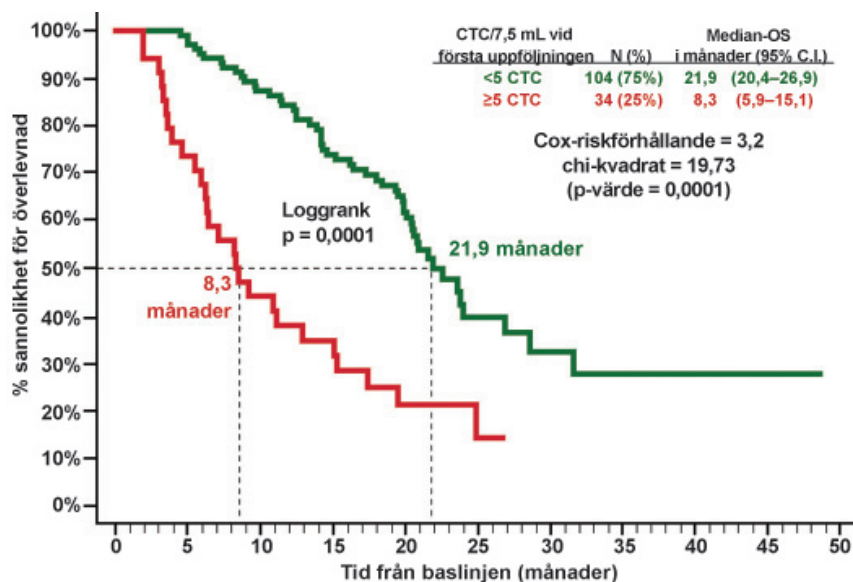
	Antal	Medianöverlevnadsperiod och (95% CI) månader
Bildtagning	138	
fördelaktig (NPD)	96 (70%)	23,8 (20,4 – 28,6)
ofördelaktig (PD)	42 (30%)	12,9 (7,1 – 19,3)
Första uppföljning CTC	138	
fördelaktig (<5)	104 (75%)	21,9 (20,4 – 26,9)
ofördelaktig (≥5)	34 (25%)	8,3 (5,9 – 15,1)
CTC (±1 bildtagningmånad)	134*	
fördelaktig (<5)	105 (78%)	21,9 (19,9 – 31,6)
ofördelaktig (≥5)	29 (22%)	8,5 (5,5 – 15,1)

*134/138 patienter hade CTC-utvärderingar som utfördes inom (±) 1 månad efter bildtagning.

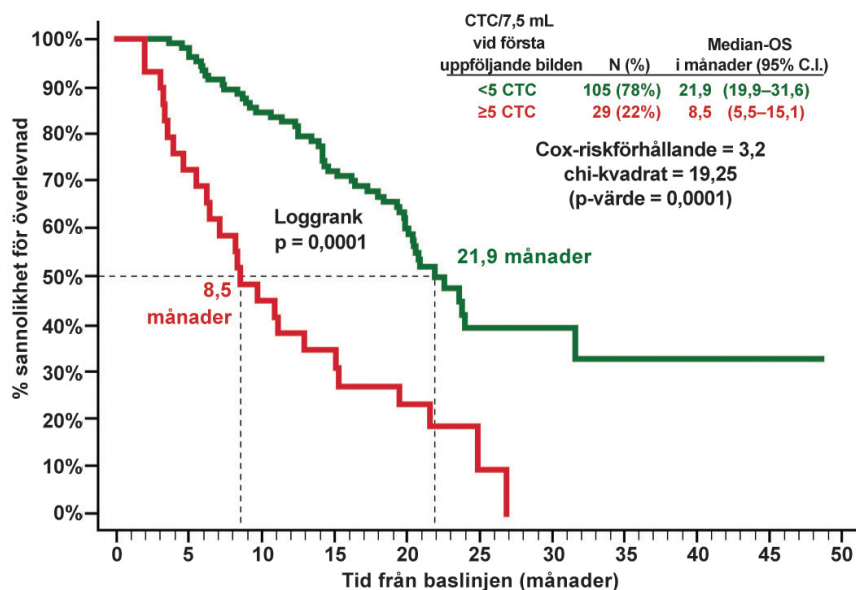
Figur 7: Korrelation mellan radiologisk och CTC-utvärdering med OS: OS för MBC-patienter med NPD eller PD vid studien gällande första uppföljande bildtagning (N=138)



Figur 8: Korrelation mellan radiologisk och CTC-utvärdering med OS: OS för MBC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid första uppföljningen efter inledningen av behandlingen (N=138).



Figur 9: Korrelation mellan radiologisk utvärdering och CTC-utvärdering med OS: OS för MBC-patienter med <5 eller ≥5 CTC inom ± 1 månad efter första studien gällande uppföljning med bildtagning (N=134)



1.4.5 Överensstämmelse mellan CTC och radiologisk övervakning

Som ovan anges utgör bildtagningsstudier en huvudkomponent i den nuvarande vårdstandarden vid bestämning av sjukdomsprogression och respons på behandling gällande metastatisk bröstcancer. För att vidare förbättra effektiviteten med CTC vid dessa kliniska utvärderingar (*Clin. Cancer Res.* Vol 12: 6403-6409, November 2006), sammanställdes två och två beräkningar av överensstämmande och inte överensstämmande observationer mellan CTC och radiologisk bildtagning, enligt tidigare beskrivna kriterier.

Med användning av endast den första uppföljande bildtagningsstudien jämfördes den radiologiska responsen med det CTC-resultat som inhämtades ± en månad efter denna bildtagningsstudie. Totalt 134 av de 138 MBC-patienterna (97%) hade CTC-resultat som uppfyllde detta kriterium. Resultatet av denna patientvisa jämförelse mellan CTC och bildtagning visas i **Tabell 8**.

Tabell 8: MBC-patientvis jämförelse av CTC och bildtagning

Respons vid första första uppföljande bildtagningsstudie	CTC inom ±1 bildtagningsmånad		Totalt
	<5 CTC / 7,5 mL	≥5 CTC / 7,5 mL	
Sjukdom utan progression	85	9	94
Sjukdomsprogression	20	20	40
Totalt	105	29	134

Mätvärde	Beräkning	Nedre 95% CI	Övre 95% CI
Positiv överensstämmelse %	50%	34%	66%
Negativ överensstämmelse %	90%	83%	96%
Positivt förutsäggande värde	69%	49%	85%
Negativt förutsäggande värde	81%	72%	88%
Överensstämmelse i stort	78%	70%	85%
Oddsförhållande	9,4	3,4	26,8

Med användning av samtliga uppföljande bildtagningsstudier som utfördes efter inledningen av behandlingen av de 138 MBC-patienterna som gav upphov till användbara radiologiska responsresultat (n=225) jämfördes sedan dessa resultat med CTC-resultat som inhämtades inom ± månad efter bildtagningsstudien. Totalt 219 av de 225 (97%) bildtagningsstudierna hade CTC-resultat som uppfyllde detta kriterium. Resultatet av denna observationsvisa jämförelse mellan CTC och bildtagning visas i **Tabell 9**.

Tabell 9: MBC-observationsvis jämförelse av CTC och bildtagning

Respons vid alla uppföljningsstudier med bildtagning	CTC inom ±1 bildtagningsmånad		Totalt
	<5 CTC / 7,5 mL	≥5 CTC / 7,5 mL	
Sjukdom utan progression	151	16	167
Sjukdomsprogression	30	22	52
Totalt	181	38	219

Mätvärde	Beräkning	Nedre 95% CI	Övre 95% CI
Positiv överensstämmelse %	42%	29%	57%
Negativ överensstämmelse %	90%	85%	94%
Positivt förutsäggande värde	58%	41%	74%
Negativt förutsäggande värde	83%	77%	89%
Överensstämmelse i stort	79%	73%	84%
Oddsförhållande	6,9	3,0	15,8

I serieobservationerna sammanföll endast en minoritet av övergångarna för bildtagningsresultaten mellan sjukdom utan progression och sjukdomsprogression med en motsvarande övergång med CTC-antal mellan <5 och ≥5 CTC / 7,5 mL.

Eftersom det prognostiska värdet för CTC-resultat vid en tidigare tidpunkt motsvarade CTC-resultatet vid tidpunkten för bildtagning (**Figur 8 och Figur 9**) skapades en patientvis jämförelse med resultatet från endast den första uppföljande bildtagningsstudien, som utfördes cirka 9 veckor efter inledningen av behandling, och det resultat som erhöles vid första uppföljningen, cirka 4 veckor efter inledningen av behandlingen. Alla 138 MBC-patienter hade CTC-resultat som uppfyllde detta kriterium. Resultatet av denna patientvisa jämförelse mellan CTC vid en tidigare tidpunkt och bildtagning visas i **Tabell 10**.

Tabell 10: MBC-patientvis jämförelse av CTC och bildtagning

Respons vid första uppföljningsstudie med bildtagning	CTC vid första uppföljning		Totalt
	<5 CTC / 7,5 mL	≥5 CTC / 7,5 mL	
Sjukdom utan progression	84	12	96
Sjukdomsprogression	20	22	42
Totalt	104	34	138

Mätvärde	Beräkning	Nedre 95% CI	Övre 95% CI
Positiv överensstämmelse %	52%	36%	68%
Negativ överensstämmelse %	88%	79%	93%
Positivt förutsäggande värde	65%	46%	80%
Negativt förutsäggande värde	81%	72%	88%
Överensstämmelse i stort	77%	69%	84%
Oddsförhållande	7,7	3,0	19,9

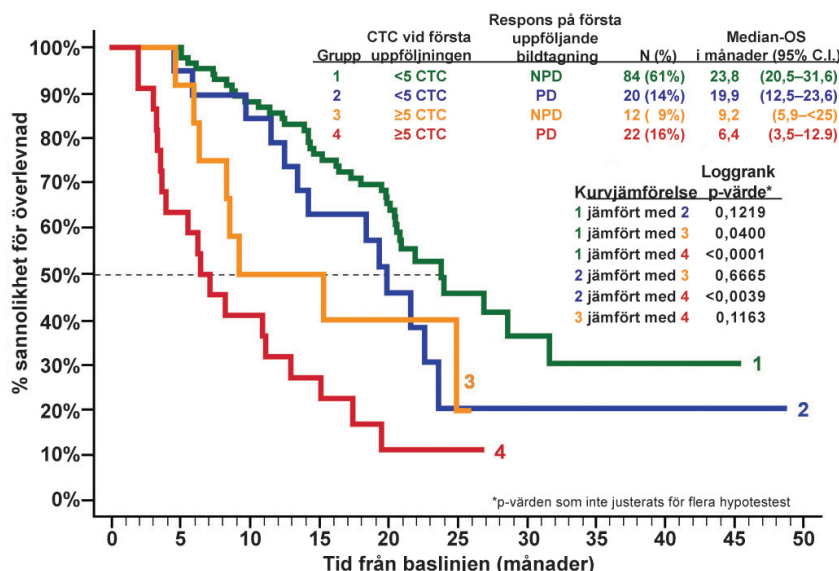
1.4.6 CTC som komplement till bildtagning

Överensstämmelsen mellan CTC och bildtagningen var tillfredsställande (cirka 78%), men det saknades överensstämmelse för cirka 22% av MBC-patienterna. Eftersom information från CTC-utvärderingar avses användas i samband med andra diagnostiska modaliteter för att fatta behandlingsbeslut, jämfördes CTC-utvärdering vid första uppföljningen (cirka 4 veckor efter inledningen av behandlingen) och bildtagning av följande grupper med OS för att fastställa vilka av de icke överensstämmande resultaten bättre påvisar prognosen för patienten (**Figur 10**):

- Grupp 1 (**grön** kurva), 84 (61%) patienter med <5 CTC vid första uppföljningen och NPD.
- Grupp 2 (**blå** kurva), 20 (14%) patienter med <5 CTC vid första uppföljningen och PD.
- Grupp 3 (**orange** kurva), 12 (9%) patienter med ≥5 CTC vid första uppföljningen och NPD.
- Grupp 4 (**röd** kurva), 22 (16%) patienter med ≥5 CTC vid första uppföljningen och PD.

I denna studie utgör CTC-resultatet en stor oberoende och förutsäggande faktor för överlevnadsperioden i stort. Studieresultaten tydde på att kombinationen av CTC och radiologiska utvärderingar ger den riktigaste utvärderingen gällande prognoser.

Figur 10: OS för MBC-patienter i grupperna 1, 2, 3 och 4 med användning av den första uppföljningen med CTC-utvärdering efter inledningen av behandling (n=138) och den sjukdomsstatus som fastställdes vid den första uppföljande bildtagningsstudien



1.5 Variabilitet för CTC och radiologiska utvärderingar

1.5.1 CTC

Variabilitet mellan läsare gällande CTC-antal vid första blodprovstagningen för uppföljning bestämdes genom att räkna antalet förekomster där användaren på testplatsen inte var i överensstämmelse med centrallaboratoriet vid klassificering av ett prov som ≥5 CTC jämfört med <5 CTC. I en delgrupp bestående av 71 patienter togs två rör med blod och behandlades, och klassificeringen ≥5 CTC jämfört med <5 CTC i vart och ett av de två rören, enligt vad som fastställts lokalt på plats samt av centrallaboratoriet jämfördes.

1.5.2 Bildtagning

Variabiliteten mellan läsare bestämdes genom jämförelse av de radiologiska tolkningarna av de två radiologerna, som klassificeras som NPD respektive PD. Variabilitet mellan läsare beräknades genom jämförelse av de radiologiska tolkningarna av de två radiologerna i en delgrupp patienter där varje radiolog bestämde responsen vid tre olika tillfällen, där varje tillfälle skiljdes åt med en vecka. Bildtagningsegment vid senare utvärderingar av dessa 138 MBC-patienter samt CTC-utvärderingar innan inledningen av behandling och vid senare uppföljningar studerades också.

Tabell 11: Variabilitet av radiologiska utvärderingar och CTC-utvärderingar av MBC-patienter

	n	Bristande överensstämmelse mellan NPD och PD vid radiologi	n	Bristande överensstämmelse för CTC/7,5 ml ≤5 jämfört med ≥5
<i>Mellan läsare</i>				
Första uppföljning	132	11,4%	138	0,7%
Alla uppföljningar	217	13,4%	695	1,0%
<i>Enskild läsare</i>				
Första uppföljning				
Läsare 1 (radiologi)	24	25,0%	—	—
Läsare 2 (radiologi)	22	9,1%	—	—
Alla uppföljningar				
Läsare 1 (radiologi)	30	20,0%	—	—
Läsare 2 (radiologi)	28	10,7%	—	—
<i>CTC rör till rör</i>				
Första uppföljning	—	—	71	5,6%
Alla uppföljningar	—	—	403	5,5%

Tabell 11 visar att variabiliteten mellan läsare för radiologiska beslut var betydligt högre i både den första uppföljande sjukdomsutvärderingen och i alla följande uppföljande sjukdomsutvärderingar jämfört med variabiliteten mellan läsare för CTC-antalen i samma grupper (Fishers $P < 0,001$).

När CTC och radiologisk utvärdering inte överensstämde gav CTC den mest noggranna bedömningen av prognosen.

2 Patienter med metastatisk kolorektal cancer (MCRC)

En prospektiv multicenter klinisk prövning utfördes för att fastställa om antalet CTC förutspår sjukdomsprogression och överlevnadsgrad. Patienter med metastatisk kolorektal cancer med mätbar ($N=430$) sjukdom som påbörjade ett nytt behandlingssätt registrerades. Kliniska data analyserades utifrån avsikten att behandla. Patientstatistik visas i **Tabell 12**.

Baslinjen för CTC-antal fastställdes före inledningen av ett nytt behandlingssätt. Uppföljning med CTC-antal fastställdes efter inledningen av behandlingen med 3-4 veckors intervall. För baslinjeanalyser mättes PFS från den tidpunkt då baslinjens blod togs till diagnos av sjukdomsprogression med hjälp av CT-skanning och/eller kliniska tecken och symtom. OS mättes från tidpunkten då baslinjens blod togs till tidpunkten då döden inträdde. För uppföljningsanalyserna mättes PFS från tidpunkten för uppföljande blodprovstagning tills diagnos av sjukdomsprogression eller döden. OS mättes från tidpunkten för uppföljande blodprovstagning tills tidpunkten då döden inträdde.

Tabell 12: Statistik för MCRC-patienter

Kategori		N=430 patienter
Ålder vid baslinjen (i år)	Medelvärde ± standardavvikelse (medianvärde)	63,0±12,6 (64)
Antal år till metastas	Medelvärde ± standardavvikelse (medianvärde)	0,9±1,4 (0,1)
	Beskrivning av kategorier	Antal patienter (% av totalantalet)
Kön	Kvinna Man	192 (45%) 238 (55%)
Ras	Vit svart annan okänd	305 (71%) 44 (10%) 12 (3%) 69 (16%)
Baslinjens ECOG-poäng	0 1 2 Okänd	196 (46%) 187 (43%) 31 (7%) 16 (4%)
Tumörtyp vid primär diagnos	Kolon Rektal Kolorektal Okänd	292 (68%) 71 (17%) 66 (15%) 1 (0%)
Stadium vid primär diagnos	1 2 3 4 Okänt	12 (3%) 45 (11%) 118 (27%) 232 (54%) 23 (5%)
Levermetastas	Nej Ja	117 (27%) 313 (73%)
Behandlingssätt	Första sättet Andra sättet Tredje sättet	309 (72%) 95 (22%) 26 (6%)
Behandlingstyp	Bevacizumab Irinotekan Oxaliplatin Okänd	243 (56%) 103 (24%) 253 (59%) 25 (6%)

2.1 CTC-frekvenser

Av totalantalet 430 MCRC-patienter fick 9 en blodprovstagning på baslinjen men inga uppföljande blodprovstagningar. Av dessa 9 patienter avled fyra innan blodprov för uppföljning kunde inhämtas, för två avslutades behandlingen på grund av behandlingsrelaterad toxicitet, en patient genomgick operation för att ta bort den mätbara sjukdomen, en patient vägrade fortsatt behandling och en patient vägrade vidare blodprovstagningar. Av de återstående patienterna fick 362, 342, 321 och 211 uppföljande blodprovstagningar 1-2 veckor, 3-5 veckor, 6-12 veckor och 13-20 veckor efter inledningen av behandling. Skillnaden i antalet patienter som kunde utvärderas för PFS och OS vid varje tidpunkt berodde på sjukdomsprogression hos vissa patienter före blodprovstagningen, medan skillnaden i antalet patienter vid varje tidpunkt berodde på antalet patienter med blodprovstagningar och utvärderbara CTC-resultat.

Tabell 13 visar antalet patienter vid varje tidpunkt som uteslöts från PFS, OS eller PFS- och OS-analyser och orsakerna till deras uteslutning.

Tabell 13: Undantag från analyser av överlevnadsgrad utan sjukdomsprogression och i stort, gällande MCRC-patienter

Val av tidpunkt för blodprovstagning	Orsaker till uteslutning av MCRC-patienter från analyser:						Totalt antal utvärderbara MCRC-patienter:	
	PFS och OS				Endast PFS	Endast OS	PFS	OS
	Blodprov som inte tagits	Blodprov som tagits 1-7 dagar efter administrering av behandling	Ingen uppföljning efter datum för blodprovstagning	Ikke utvärderbara CTC-resultat	Blodprov som tagits efter datum för sjukdomsprogression	Ingen uppföljning efter datum för blodprovstagning		
Baslinjen	1	11	0	5	0	0	413	413
1-2 veckor	68	0	0	5	1	0	356	357
3-5 veckor	88	0	1	8	4	0	329	333
6-12 veckor	109	0	4	7	26	0	284	310
13-20 veckor	219	0	9	8	14	1	180	193

CTC-resultatet från uppföljningen med blodprovstagning efter 1-2 veckor, 3-5 veckor, 6-12 veckor och 13-20 veckor efter inledningen av behandlingen klassificerades som fördelaktigt (<3 CTC) eller ofördelaktigt (≥3 CTC). Om mer än ett CTC-resultat hämtades inom bestämda tidpunkter för uppföljning användes CTC-resultatet från det blodprov som avvek mest från blodprovet på baslinjen.

Tabell 15 sammanfattar totalantalet MCRC-patienter samt procentandelen patienter med ofördelaktiga CTC-antal i den kliniska prövningen som avviker från antalen och procentandelarna för patienter med PFS som visas i **Tabell 14**.

2.2 Analys av MCRC-patienter gällande överlevnadsgrad utan sjukdomsprogression (PFS)

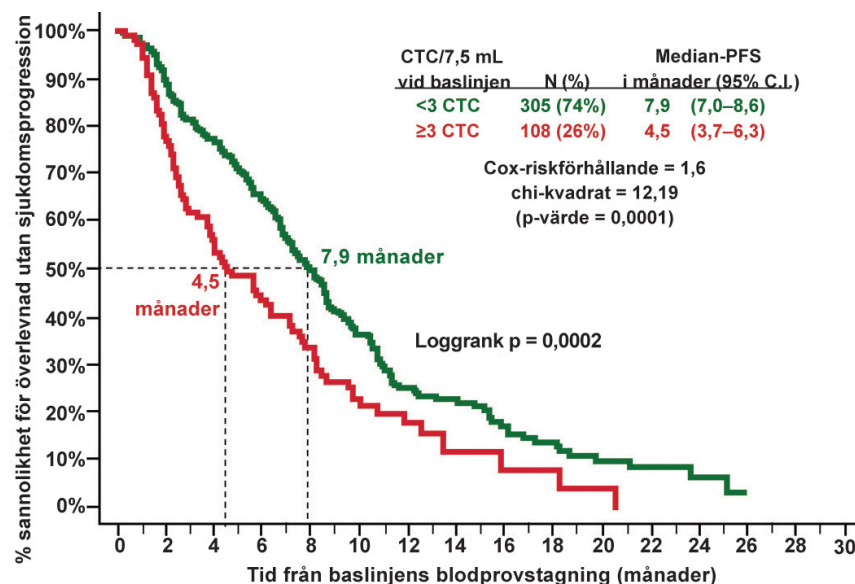
2.2.1 PFS med CTC-resultat (baslinjen)

Fyrahundratretton (413) av de 430 MCRC-patienter hade ett tillgängligt CTC-resultat från baslinjen. För Kaplan-Meier-analys segmenterades patienter i två grupper efter CTC-antalet vid baslinjen:

- Den fördelaktiga gruppen (N=305), som visas i **grönt**, bestod av patienter med <3 CTC.
- Den ofördelaktiga gruppen (N=108), som visas i **rött**, bestod av patienter med ≥3 CTC.

Median-PFS var betydligt längre i den fördelaktiga gruppen jämfört med den ofördelaktiga gruppen (7,9 jämfört med 4,5 månader). Resultaten visas i **Figur 11** och **Tabell 14**.

Figur 11: PFS för MCRC-patienter med <3 eller ≥3 CTC vid baslinjen (N=413).

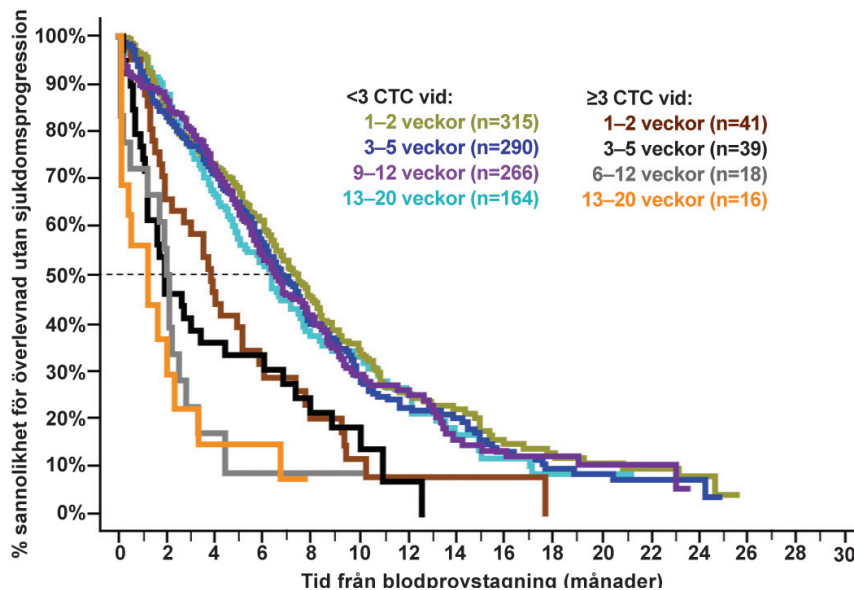


2.2.2 PFS med CTC-resultat (uppföljning)

För Kaplan-Meier-analys segmenterades MCRC-patienter i två grupper efter CTC-antalet vid var och en av de olika uppföljande blodprovstagningarna. Båda patientgrupper vid var och en av de olika blodprovstagningstiderna för uppföljning efter inledningen av behandling för PFS visas i **Figur 12**. PFS-tiderna beräknades från tidpunkten för varje blodprovstagning. Patienter som uppvisade tecken på sjukdomsprogression före en viss blodprovstagning uteslöts ur analysen för den blodprovstagningen och samtliga följande uppföljande blodprovstagningar. **Figur 12** visar förmågan för CTC att förutsäga PFS för MCRC-patienter med <3 och ≥3 CTC 1-2 veckor, 3-5 veckor, 6-12 veckor och 13-20 veckor efter inledningen av behandling.

- Den fördelaktiga gruppen, som visas i **olivgrönt, blått, lila** och **cyan**, bestod av patienter med <3 CTC.
- Den ofördelaktiga gruppen, som visas i **brunt, svart, grått** och **orange**, bestod av patienter med ≥3 CTC.

Figur 12: PFS för MCRC-patienter med <3 eller ≥3 CTC vid olika tidpunkter under uppföljning



Tabell 14 sammanfattar resultaten av PFS-analysen med användning av CTC-nivåer och en tröskel på ≥3 CTC/7,5 mL vid var och en av tidpunkterna för blodprovstagning.

Tabell 14: PFS för MCRC-patienter med <3 eller ≥3 CTC vid olika tidpunkter

1	2	3	4		5	6
Provtagningstid Efter Tx-initiering	Antal	≥3 CTC	Median-PFS i månader (95% CI)		Logg-rank p-värde	
			<3 CTC	≥3 CTC		
Baslinjen	413	108 (26%)	7,9 (7,0 – 8,6)	4,5 (3,7 – 6,3)	0,0002	
1-2 veckor	356	41 (12%)	7,3 (6,5 – 8,1)	3,8 (1,9 – 5,1)	<0,0001	
3-5 veckor	329	39 (12%)	6,8 (6,1 – 7,6)	1,9 (1,2 – 4,4)	<0,0001	
6-12 veckor	284	18 (6%)	6,5 (5,8 – 7,7)	2,0 (0,5 – 2,5)	<0,0001	
13-20 veckor	180	16 (9%)	6,3 (4,9 – 7,4)	1,2 (0,1 – 2,3)	<0,0001	

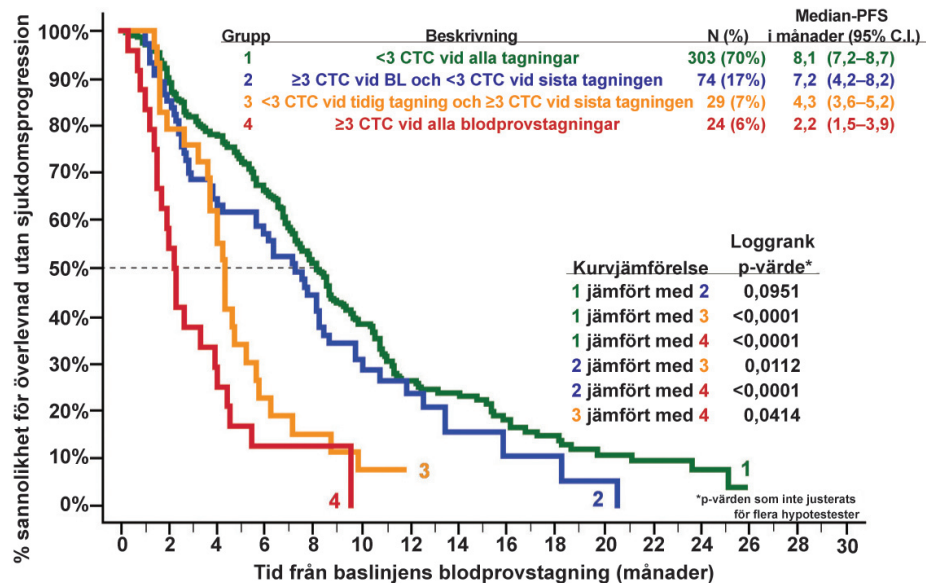
Som framgår av **Figur 12** och **Tabell 14** hade patienter med förhöjd CTC (≥3 CTC/7,5 mL helblod) vid samtliga tidpunkter mycket högre sannolikhet för snabb sjukdomsprogression än patienter med <3 CTC. **Tabell 14** kolumn 4 visar median-PFS-tider för patienter med <3 CTC mellan 6,3 och 7,9 månader. Dessa tider var betydligt längre än median-PFS-tiderna för patienter med ≥3 CTC, vilka låg på mellan 1,2 och 4,5 månader (kolumn 5).

2.2.3 Minskning eller ökning av CTC förutspår förbättrad eller försämrad PFS

Förflutna PFS-tider beräknades utifrån baslinjens blodprov. För Kaplan-Meier-analys (**Figur 13**) segmenterades MCRC-patienter i fyra grupper utifrån deras CTC-antal vid baslinjen, 1-2 veckor, 3-5 veckor, 6-12 veckor och 13-20 veckor efter inledningen av behandlingen:

- Grupp 1 (**grön** kurva), 303 (70%) patienter med <3 CTC vid alla tidpunkter. Sju (2%) av dessa patienter hade endast en blodprovstagning på baslinjen, medan åtta (3%) hade en blodprovstagning mellan första och sista blodprovstagningen med ≥3 CTC.
- Grupp 2 (**blå** kurva), 74 (17%) patienter med ≥3 CTC innan inledningen av behandlingen, men som hade minskat till <3 CTC vid tidpunkten för sista blodprovstagningen.
- Grupp 3 (**orange** kurva), 29 (7%) patienter med <3 CTC vid en tidig blodprovstagning (baslinjen, 1-2 veckor och/eller 3-5 veckor) men som ökat till ≥3 CTC vid tidpunkten för sista blodprovstagningen.
- Grupp 4 (**röd** kurva), 24 (6%) patienter med ≥3 CTC vid alla tidpunkter; Tre (13%) av dessa patienter hade endast en blodprovstagning på baslinjen, en (4%) hade endast en blodprovstagning efter 3-5 veckor och en (4%) hade en enda blodprovstagning mellan första och sista blodprovstagningen med resultatet <3 CTC.

Figur 13: En minskning av CTC under 3 efter inledningen av behandlingen förutspår längre PFS för MCRC-patienter



Figur 13 visar att MCRC-patienter med ≥ 3 CTC vid alla tidpunkter (Grupp 4) hade kortast median-PFS, vilken avvek betydligt jämfört med median-PFS för Grupp 3, Grupp 2 och Grupp 1. Skillnaden i median-PFS mellan de patienter som visade en CTC-minskning efter inledningen av behandlingen (Grupp 2) var betydligt större än för de patienter som visade en CTC-ökning (Grupp 3).

2.3 Analys av överlevnadsgraden (OS) i stort gällande MCRC-patienter

2.3.1 OS-analys med CTC-resultat (baslinjen)

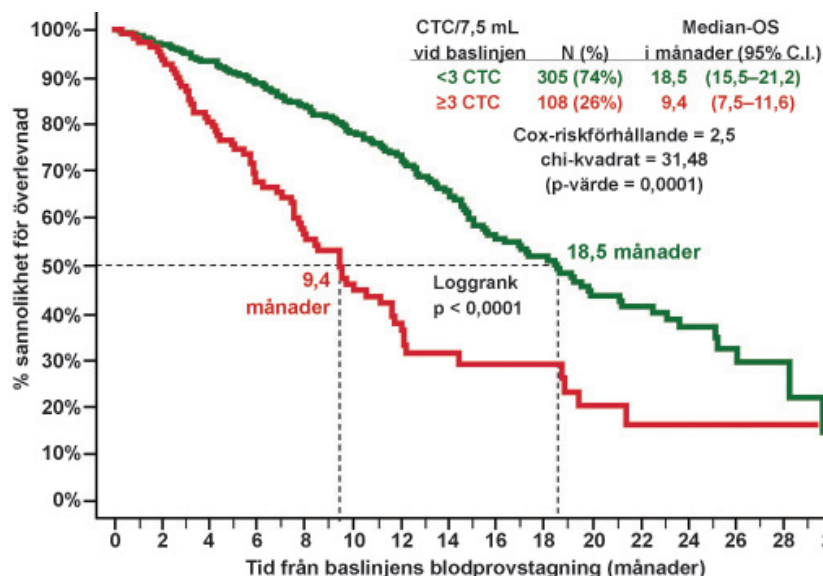
Dödsfall inträffade hos 202 (47%) av de 430 MCRC-patienterna, med en medelföljningstid för de 228 (53%) patienterna i livet på $12,6 \pm 6,5$ månader (median=11,0, intervall=0,8–30,0). Vid tidpunkten för analyserna hade 124 (41%) av 305 patienter från den fördelaktiga gruppen (<3 CTC vid baslinjen) jämfört med 68 (63%) av 108 från den ofördelaktiga gruppen (≥ 3 CTC vid baslinjen) avlidit.

För Kaplan-Meier-analysen segmenterades patienterna i två grupper efter deras CTC-antal vid baslinjen:

- Den fördelaktiga gruppen (N=305), som visas i **grönt**, bestod av patienter med <3 CTC.
- Den ofördelaktiga gruppen (N=108), som visas i **rött**, bestod av patienter med ≥ 3 CTC.

Median-OS var betydligt längre i den fördelaktiga gruppen jämfört med den ofördelaktiga gruppen (18,5 jämfört med 9,4 månader). Resultatet sammanfattas i Figur 14.

Figur 14: OS för MCRC-patienter med <3 eller ≥ 3 CTC vid baslinjen (N=413).

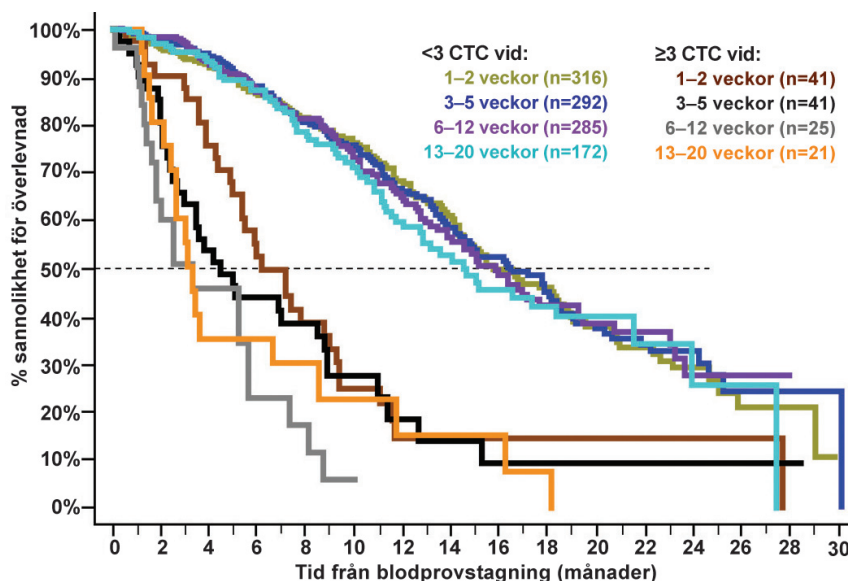


2.3.2 OS med CTC-resultat (uppföljning)

Kaplan-Meier-analyserna för båda MCRC-patientgrupper vid var och en av de olika tidpunkterna för blodprovstagning för uppföljning efter inledning av behandlingen visas i **Figur 15**. Figuren visar förmågan för CTC att förutspå tiden fram till dödsfall för MCRC-patienter med <3 och ≥3 CTC 1-2 veckor, 3-5 veckor, 6-12 veckor och 13-20 veckor efter inledningen av behandlingen för 421 patienter med metastatisk kolorektal cancer. OS-tiderna beräknades från tiden för varje blodprovstagning.

- Den fördelaktiga gruppen, som visas i **olivgrönt, blått, lila och cyan**, bestod av patienter med <3 CTC.
- Den ofördelaktiga gruppen, som visas i **brunt, svart, grått och orange**, bestod av patienter med ≥3 CTC.

Figur 15: OS för MCRC-patienter med <3 eller ≥3 CTC vid olika tidpunkter för uppföljning.



Tabell 15 sammanfattar resultaten för OS-analysen med användning av CTC-nivåer och ett tröskelvärde på ≥3 CTC/7,5 mL vid var och en av tidpunkterna för blodprovstagning.

Tabell 15: OS för MCRC-patienter med <3 eller ≥3 CTC vid olika tidpunkter

1	2	3	4	5	6
Provtagningstid Efter Tx-initiering	Antal	≥3 CTC	Median-OS i månader (95% CI)		Logg-rank p-värde
			<3 CTC	≥3 CTC	
Baslinjen	413	108 (26%)	18,5 (15,5 – 21,2)	9,4 (7,5 – 11,6)	<0,0001
1-2 veckor	357	41 (11%)	15,7 (14,3 – 18,4)	6,1 (4,9 – 8,9)	<0,0001
3-5 veckor	333	41 (12%)	16,4 (14,1 – 18,3)	4,4 (2,6 – 8,7)	<0,0001
6-12 veckor	310	25 (8%)	15,8 (13,8 – 19,2)	3,3 (1,8 – 5,6)	<0,0001
13-20 veckor	193	21 (11%)	14,6 (12,0 – 21,5)	3,3 (2,4 – 8,5)	<0,0001

Enligt vad som visas i **Figur 15** och **Tabell 15** i kolumn 4 och 5 hade MCRC-patienter med ≥3 CTC vid alla tidpunkter större sannolikhet att avlida tidigare än de med <3 CTC. Median-OS-tiderna för patienter med <3 CTC låg på mellan 14,6 och 18,5 månader. Dessa tider var betydligt längre än median-OS-tiderna för patienter med ≥3 CTC, vilka låg på mellan 3,3 och 9,4 månader.

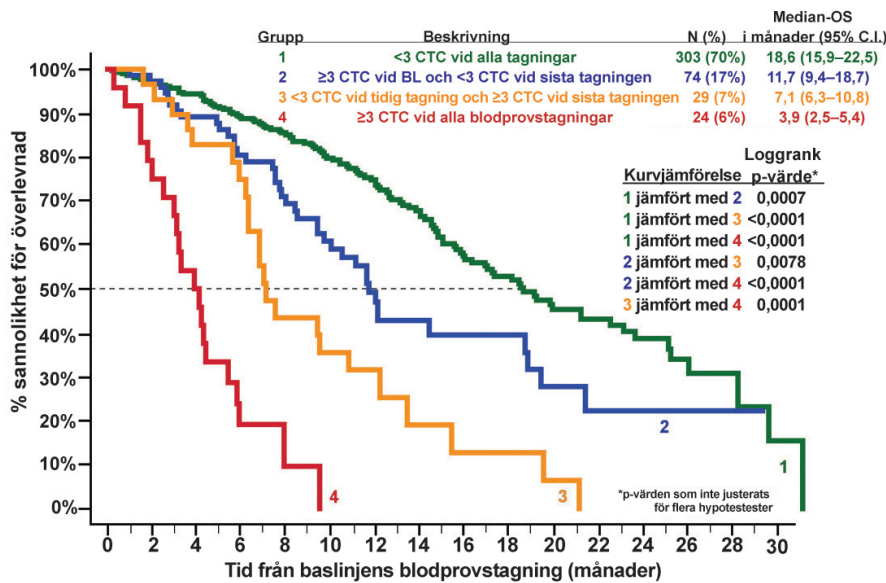
2.3.3 Minskning eller ökning av CTC förutspår förbättrad eller försämrad OS

Förflutna OS-tider beräknades utifrån baslinjens blodprov. För Kaplan-Meier-analys (**Figur 16**) segmenterades MCRC-patienter i fyra grupper utifrån deras CTC-antal vid baslinjen, 1-2 veckor, 3-5 veckor, 6-12 veckor och 13-20 veckor:

- Grupp 1 (**grön** kurva), 303 (70%) patienter med <3 CTC vid alla tidpunkter. Sju (2%) av dessa patienter fick endast en blodprovstagning på baslinjen, medan åtta (3%) hade en blodprovstagning mellan första och sista blodprovstagningen med ≥3 CTC.
- Grupp 2 (**blå** kurva), 74 (17%) patienter med ≥3 CTC före inledningen av behandlingen, men som hade minskat till <3 CTC vid tidpunkten för sista blodprovstagningen.
- Grupp 3 (**orange** kurva), 29 (7%) patienter med <3 CTC vid en tidig blodprovstagning (baslinjen, 1-2 veckor och/eller 3-5 veckor) men som ökat till ≥3 CTC vid tidpunkten för sista blodprovstagningen.

- Grupp 4 (röd kurva), 24 (6%) patienter med ≥ 3 CTC vid alla tidpunkter för blodprovstagningar. Tre (13%) av dessa patienter hade endast en blodprovstagning på baslinjen, en patient (4 %) hade endast en blodprovstagning efter 3-5 veckor och en patient (4%) hade en blodprovstagning mellan första och sista blodprovstagningen med resultatet <3 CTC.

Figur 16: En minskning av CTC under 3 efter inledningen av behandlingen förutspår längre OS, medan en ökning av CTC till 3 eller högre förutspår kortare OS för MCRC-patienter



Figur 16 visar att MCRC-patienter som överstiger tröskeln på 3 CTC när som helst efter inledningen av behandlingen hade mycket större sannolikhet för kortare överlevnadsperiod i stort. Patienter med ≥ 3 CTC vid alla tidpunkter (**Grupp 4**) hade kortast median-OS, vilket avvek betydligt jämfört med median-OS för **Grupp 3**, **Grupp 2** och **Grupp 1**. Patienter med 3 CTC vid alla tidpunkter (**Grupp 1**) hade längst median-OS, vilken avvek betydligt från median-OS för **Grupp 4**, **Grupp 3** och **Grupp 2**. **Figur 16** visar även att patienter som uppvisat en minskning av CTC (**Grupp 2**) hade en betydligt lägre risk för dödsfall jämfört med patienter med en ökning av CTC (**Grupp 3**).

2.3.4 Univariat Cox-regressionsanalys av MCRC-patienter

Följande parametrar analyserades med univariat Cox-regressionsanalys för att utvärdera sambandet med PFS och OS: kön, sjukdomsstadium vid diagnosen (1-4), tid till metastas (kontinuerlig), patientens ålder (≥ 65 eller <65), plats för primär sjukdom (kolorektal eller rektal eller kolon), ECOG-status före inledning av ett nytt behandlingssätt (0-2), behandlingssätt (första eller andra eller tredje), förekomst av levermetastas (ja eller nej), typ av behandling (bevacizumab, irinotecan och/eller oxaliplatin med eller inte), CTC-antal på baslinjen (≥ 3 eller <3 CTC/7,5 mL) och CTC-antal vid uppföljningen 1-2 veckor, 3-5 veckor, 6-12 veckor och 13-20 veckor efter inledningen av behandling (≥ 3 eller <3 CTC/7,5 mL). **Tabell 16** visar resultatet av denna analys och presenterar Cox-riskförhållandet (HR) och associerat p-värde (Wald-test av Z-statistik) samt antalet patienter i varje utvärdering.

Tabell 16: Univariat Cox-regressionsanalys av MCRC-patienter

Parameter	Kategorier		Antal MCRC-patienter	PFS-risk från baslinjen		OS-risk från baslinjen	
	Positiv	Negativ		Riskförhållande	p-värde	Riskförhållande	p-värde
Kön	Man (1)	Kvinna (0)	430	1,01	0,944	1,23	0,156
Stadium vid primär diagnos	4 jämfört med 3 jämfört med 2 jämfört med 1		407	0,98	0,734	1,09	0,330
Tid till metastas	Tid i år		428	1,00	0,901	0,92	0,121
Ålder vid blodprovstagning på baslinjen	≥65 år	<65 år	430	1,65	<0,001	1,82	<0,001
Plats för primär sjukdom	Kolorektal (2) jämfört med rektal (1) jämfört med kolon (0)		429	1,03	0,733	1,02	0,866
ECOG-status på baslinjen	2 jämfört med 1 jämfört med 0		414	1,32	0,002	1,65	<0,001
Behandlingssätt	3 jämfört med 2 jämfört med 1		430	2,04	<0,001	1,63	<0,001
Levermetastaser	Ja	Nej	430	0,86	0,225	1,23	0,198
Bevacizumab	Ja	Nej	405	0,54	<0,001	0,62	0,001
Irinotekan	Ja	Nej	405	1,51	0,001	1,39	0,029
Oxaliplatin	Ja	Nej	405	0,53	<0,001	0,69	0,008
CTC-antal på baslinjen	≥3	<3	413	1,59	<0,001	2,48	<0,001
CTC-antal efter 1-2 veckor	≥3	<3	357	2,02	<0,001	3,23	<0,001
CTC-antal efter 3-5 veckor	≥3	<3	334	2,19	<0,001	4,23	<0,001
CTC-antal efter 6-12 veckor	≥3	<3	314	4,59	<0,001	10,88	<0,001
CTC-antal efter 13-20 veckor	≥3	<3	203	5,07	<0,001	4,88	<0,001

2.3.5 Multivariat Cox-regressionsanalys av MCRC-patienter

Multivariata Cox-regressionsanalyser utfördes för att utvärdera den oberoende förutspående förmågan hos CTC-antalet genom att justera för påverkan från kända viktiga kliniska faktorer som är statistiskt signifikanta i univariata analyser. CTC befanns vara starka prediktorer av PFS och OS (**Tabell 17**).

Tabell 17: Multivariat Cox-regressionsanalys av MCRC-patienter

Variabel	Antal	PFS-risk från baslinjen		OS-risk från baslinjen	
		Risikförhållande	p-värde	Risikförhållande	p-värde
CTC på baslinjen (<3 jämfört med ≥3)	373	1,76	<0,001	2,46	<0,001
Ålder på baslinjen (<65 jämfört med ≥65)		1,47	0,002	1,84	<0,001
ECOG-status på baslinjen (0 jämfört med 1 jämfört med 2)		1,16	0,107	1,48	0,001
Behandlingssätt (första jämfört med andra jämfört med tredje)		1,59	<0,001	1,41	0,009
Bevacizumab (nej jämfört med ja)		0,65	0,001	0,68	0,021
Irinotekan (nej jämfört med ja)		0,76	0,156	1,25	0,363
Oxaliplatin (nej jämfört ja)		0,57	0,002	1,00	0,984
CTC efter 1-2 veckor (<3 jämfört med ≥3)	321	1,76	0,003	2,77	<0,001
Ålder på baslinjen (<65 jämfört med ≥65)		1,53	0,001	1,85	<0,001
ECOG-status på baslinjen (0 jämfört med 1 jämfört med 2)		1,26	0,025	1,54	0,001
Behandlingssätt (första jämfört med andra jämfört med tredje)		1,76	<0,001	1,62	0,001
Bevacizumab (nej jämfört med ja)		0,66	0,003	0,77	0,156
Irinotekan (nej jämfört med ja)		0,67	0,066	1,25	0,402
Oxaliplatin (nej jämfört ja)		0,53	0,002	0,97	0,904
CTC efter 3-5 veckor (<3 jämfört med ≥3)	302	2,35	<0,001	4,54	<0,001
Ålder på baslinjen (<65 jämfört med ≥65)		1,58	0,001	2,06	<0,001
ECOG-status på baslinjen (0 jämfört med 1 jämfört med 2)		1,16	0,149	1,33	0,032
Behandlingssätt (första jämfört med andra jämfört med tredje)		1,74	<0,001	1,65	0,001
Bevacizumab (nej jämfört med ja)		0,68	0,007	0,86	0,410
Irinotekan (nej jämfört med ja)		0,58	0,012	0,99	0,966
Oxaliplatin (nej jämfört ja)		0,47	<0,001	0,88	0,594
CTC efter 6-12 veckor (<3 jämfört med ≥3)	279	3,04	<0,001	9,43	<0,001
Ålder på baslinjen (<65 jämfört med ≥65)		1,43	0,013	1,73	0,005
ECOG-status på baslinjen (0 jämfört med 1 jämfört med 2)		1,30	0,027	1,53	0,004
Behandlingssätt (första jämfört med andra jämfört med tredje)		1,73	<0,001	1,20	0,282
Bevacizumab (nej jämfört med ja)		0,61	0,001	0,82	0,337
Irinotekan (nej jämfört med ja)		0,78	0,258	1,47	0,181
Oxaliplatin (nej jämfört ja)		0,62	0,020	1,35	0,278
CTC efter 13-20 veckor (<3 jämfört med ≥3)	186	4,50	<0,001	4,97	<0,001
Ålder på baslinjen (<65 jämfört med ≥65)		1,26	0,218	1,55	0,061
ECOG-status på baslinjen (0 jämfört med 1 jämfört med 2)		1,13	0,417	1,13	0,526
Behandlingssätt (första jämfört med andra jämfört med tredje)		1,68	0,004	1,12	0,628
Bevacizumab (nej jämfört med ja)		0,68	0,058	0,89	0,655
Irinotekan (nej jämfört med ja)		0,73	0,311	1,20	0,636
Oxaliplatin (nej jämfört ja)		0,65	0,135	1,31	0,477

2.4 Användning av CTC för att övervaka klinisk status på metastatisk kolorektal cancer

2.4.1 Relation mellan överlevnadsgrad, CTC och sjukdomsutvärdering genom bildtagning

Radiologisk bildtagning är en av de primära metoderna för att fastställa sjukdomsstatus och respons på behandling hos patienter med metastatisk kolorektal cancer. För att fastställa sambandet mellan klinisk status enligt bildtagning och CTC, mätt vid två tidpunkter, jämfördes resultaten av bildtagning 1) med den verkliga kliniska slutpunkten för allmän överlevnad och 2) med varandra.

2.4.2 CTC

Tidigare data har visat att patienter med metastatisk kolorektal cancer med ≥ 3 CTC/7,5 mL blod vid efterföljande uppföljningsbesök efter inledningen av behandlingen hade större sannolikhet för sjukdomsprogression och försämrad OS jämfört med patienter med < 3 CTC/7,5 mL blod. CTC-resultat som inhämtats 3-5 veckor efter inledningen av behandlingen, samt även CTC-resultat som inhämtats inom $\pm$ en månad efter bildtagningsstudien klassificerades som fördelaktiga (< 3 CTC) och ofördelaktiga (≥ 3 CTC). Om mer än ett CTC-värde inhämtades inom $\pm$ en månad efter bildtagningsstudien användes det CTC-resultat som inhämtades närmast datumet för bildtagningsstudien.

2.4.3 Bildtagning

Villkoret var att varje MCRC-patient hade mätbar sjukdom, dvs. minst en 2 cm lesion upp till och med maximalt 10 lesioner. Bildtagningsmetoden för varje patient bestämdes av den behandlande onkologen i överensstämmelse med aktuell vårdstandard. CT eller MRT av bröstet, buken och bäckenet utfördes på villkor att samtliga lesioner som sågs på baslinjen följdes med samma metod vid samtliga efterföljande bildtagningsstudier. Tolkning av bilderna utfördes av en certifierad radiolog på deltagande klinik med RECIST unidimensionella kriterier för att klassificera varje uppföljning med sjukdomsutvärdering som fullständig respons (CR), delrespons (PR), stabil sjukdom (SD) eller sjukdomsprogression (PD).

Bilder togs av varje patient vid minst två och upp till åtta tillfällen. Dessa studier omfattade en baslinjebild, bildtagning vid efterföljande intervall på 2-3 månader (6-12 veckor) och en slutlig bildtagningsstudie när patientens deltagande i prövningen avslutades. Kopior på samtliga patienters bildtagningsstudier vidarebefordrades till studiekoordinatören på varje klinik för arkivering med patientens kliniska data.

Av totalt 430 utvärderbara MCRC-patienter som registrerats i studien fick 28 (7%) ingen uppföljande bildtagningsstudie utförd, 18 (4%) avled innan en uppföljande bildtagningsstudie kunde utföras och 384 (89%) fick en eller flera uppföljande bildtagningsstudier utförda vilka utvärderades med RECIST-kriterier. Vid tiden för första uppföljningen av de 384 patienterna med en uppföljande bildtagningsstudie uppvisade 4 (1%) fullständig respons, 117 (31%) uppvisade delvis respons, 186 (48%) hade stabil sjukdom och 77 (20%) uppvisade sjukdomsprogression. I detta analys-sammanhang ansågs patienter som avled innan en uppföljande bildtagningsstudie kunde påbörjas ha sjukdomsprogression.

För respons på behandling vid första uppföljande sjukdomsutvärdering definierades den fördelaktiga gruppen som den med stabil sjukdom (S), delrespons (PR) eller fullständig respons (CR) enligt RECIST-kriterierna (sjukdom utan progression, NPD) och den ofördelaktiga gruppen som den med sjukdomsprogression, eller där dödsfall inträffade (PD).

2.4.4 Relation mellan överlevnadsgrad och bildtagning och CTC

Separata Kaplan-Meier-analyser utfördes för att jämföra OS hos MCRC-patienter i de fördelaktiga (< 3 CTC) och ofördelaktiga (≥ 3 CTC) grupperna med användning av CTC-resultaten vid två olika tidpunkter och första uppföljande bildtagningsstudien. Med användning av resultatet från de första uppföljande bildtagningsstudierna som utfördes 9,1 $\pm$ 2,9 veckor (medianvärde=8,6 veckor) efter inledningen av behandling (dvs baslinjens blodprovstagning), fastställdes medianöverlevnadstiden för de 307 (76%) patienterna genom bildtagning som hade NPD till 19,1 månader (95% CI mellan 17,0 och 23,1) (**Figur 17, Tabell 18**). För de 95 (24%) patienter som genom bildtagning fastställdes ha PD var medianöverlevnadstiden 5,8 månader (95% CI mellan 4,4 och 7,7).

Totalt 320 MCRC-patienter hade bildtagningsstudier som utfördes före och efter inledningen av behandling, eller så avled de innan en uppföljande bildtagningsstudie hann utföras. CTC utvärderades 3-5 veckor efter inledningen av behandling (medeltal=3,8 $\pm$ 0,7 veckor från och med tiden för baslinjens blodprovstagning, medianvärde=4,0 veckor). Medianöverlevnadstiden för 282 (88%) patienter med fördelaktiga CTC-resultat (< 3 CTC) var 17,3 månader (95% CI=15,0 till 19,5 månader) (**Figur 18, Tabell 18**). 38 patienter (12%) med ofördelaktiga CTC-resultat (≥ 3 CTC) hade en medianöverlevnadstid på 5,4 månader (95% CI mellan 3,6 och 9,4 månader).

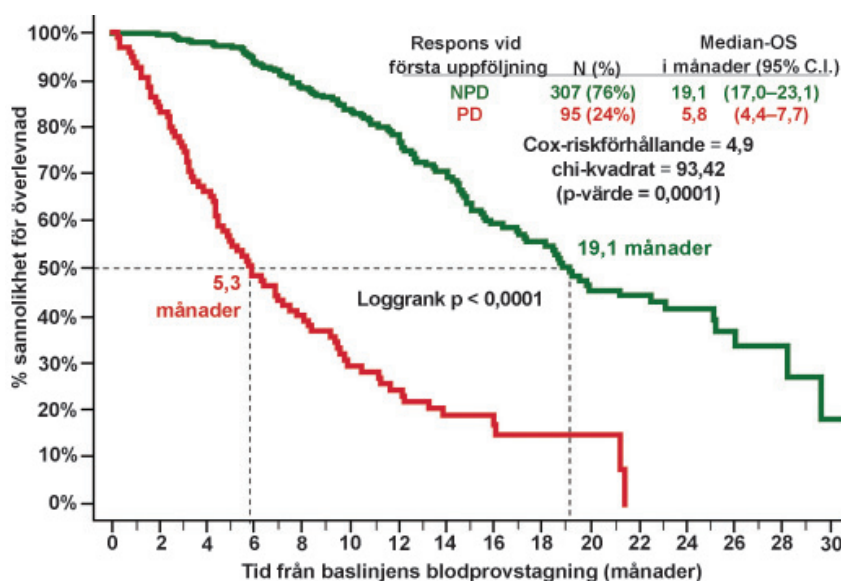
För att fastställa om CTC-utvärderingar som utförts närmare tiden för bildtagning resulterade i liknande överlevnadstider jämfört med CTC-utvärderingar som utförts cirka 4 veckor efter inledningen av behandling analyserades endast de patienter som fått CTC-utvärderingar inom $\pm$ en månad efter första uppföljande bildtagningsstudie (**Figur 19, Tabell 18**). Trehundrasextiofyra (364) av de 402 patienterna (91%) fick CTC-utvärderingar inom en månad efter första uppföljande bildtagningsstudie, vilka utfördes 9,0 $\pm$ 2,9 veckor (medianvärde=8,5 veckor) efter inledningen av behandlingen. Medianöverlevnadstiden för 335 (92%) patienter med fördelaktiga CTC-resultat var 17,2 månader (95% CI mellan 15,0 och 19,2). Medianöverlevnadstiden för 29 (8%) patienter med ofördelaktiga CTC-resultat var 5,4 månader (95% CI mellan 3,2 och 7,5 månader). Dessa data visade att CTC-utvärderingar vid båda tidpunkterna gav liknande resultat som bildtagning som utfördes cirka 9 veckor efter inledningen av behandling.

I denna studie tydde tillämpandet av multivariat Cox-regressionsanalys för att justera för bildtagning på att både CTC och bildtagning efter 6-12 veckor var för sig är förknippade med allmän överlevnad, men att CTC [justerat riskförhållande: 7,9 (4,6-13,6)] är en starkare prediktor än bildtagning [justerat riskförhållande: 3,1 (2,1-4,6)].

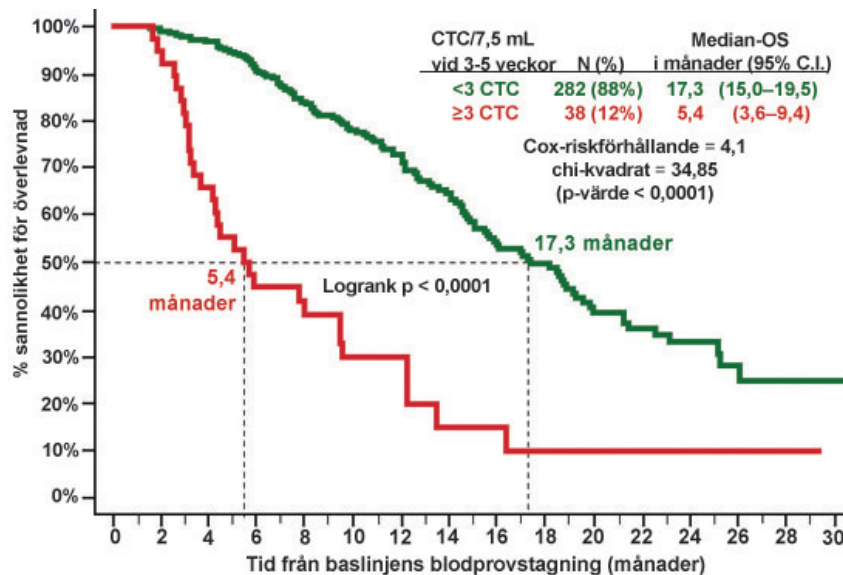
Tabell 18: OS för MCRC-patienter med CTC-utvärdering cirka en månad efter behandlingen påbörjas och inom en månad efter den radiologiska utvärderingen

	Antal	Medianöverlevnadsperiod och (95% CI) i månader
A. Bildtagning	402	
Fördelaktig (NPD)	307 (76%)	19,1 (17,0 – 23,1)
Ofördelaktig (PD)	95 (24%)	5,8 (4,4 – 7,7)
B. 3-5 veckor CTC	320	
Fördelaktig (<3 CTC)	282 (88%)	17,3 (15,0 – 19,5)
Ofördelaktig (≥3 CTC)	38 (12%)	5,4 (3,6 – 9,4)
C. CTC (±1 bildtagningsmånad)	364	
Fördelaktig (<3 CTC)	335 (92%)	17,2 (15,0 – 19,2)
Ofördelaktig (≥3 CTC)	29 (8%)	5,4 (3,2 – 7,5)

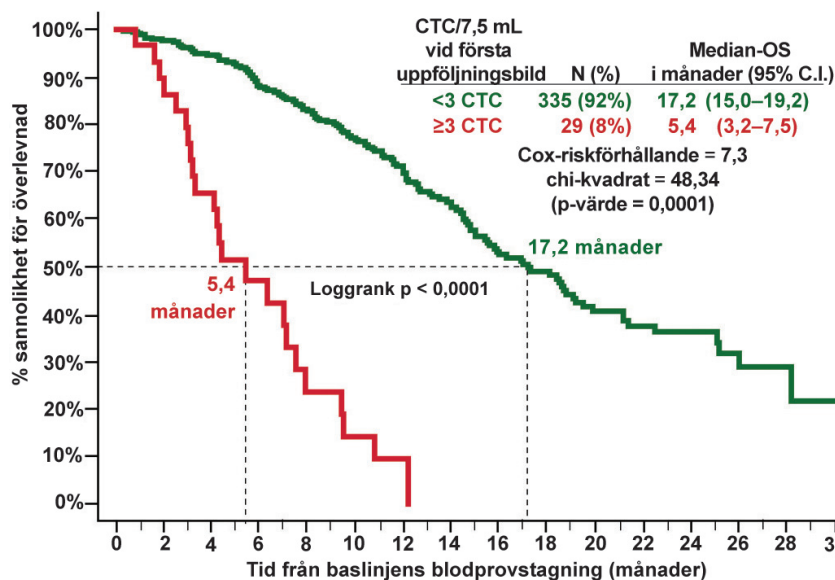
Figur 17: Korrelation mellan radiologisk och CTC-utvärdering med OS: OS för MCRC-patienter med **NPD** eller **PD** vid den första uppföljande bildtagningsstudien (N=402)



Figur 18: Korrelation mellan radiologisk och CTC-utvärdering med OS: OS för MCRC-patienter med <3 eller ≥3 CTC vid första uppföljningen efter inledningen av behandlingen (N=320)



Figur 19: Korrelation mellan radiologisk och CTC-utvärdering med OS: OS för MCRC-patienter med <3 eller ≥3 CTC inom ± 1 månad efter den första uppföljande bildtagningsstudien (N=364)



2.4.5 Överensstämmelser mellan CTC och radiologisk övervakning av MCRC-patienter

Som framgår ovan utgör bildtagningsstudier en huvudkomponent i den nuvarande vårdstandarden vid bestämning av sjukdomsprogression och respons på behandling av metastatisk kolorektal cancer. För att vidare stödja effektiviteten för CTC för att göra sådana kliniska utvärderingar skapades beräkningar, två åt gången, av överensstämmande och icke överensstämmande observationer mellan CTC och radiologisk bildtagning.

För respons på behandling definierades den fördelaktiga gruppen som den med stabil sjukdom (S), delrespons (PR) eller fullständig respons (CR) enligt RECIST-kriterierna (sjukdom utan progression, NPD) och den ofördelaktiga gruppen som den med sjukdomsprogression, eller där dödsfall inträffade (PD). Av de 18 patienter som avled före en uppföljande bildtagningsstudie hade 10 fått en uppföljande blodprovstagning inom 30 dagar före dödsfallet. De 10 patienterna klassificerades som de med sjukdomsprogression (PD) för dessa jämförelser.

CTC-resultatet som inhämtades inom ± en månad efter bildtagningsstudien klassificerades som fördelaktiga (<3 CTC) och ofördelaktiga (≥3 CTC). Om mer än ett CTC-värde inhämtades inom ± en månad efter bildtagningsstudien användes det CTC-resultat som inhämtades närmast datumet för bildtagningsstudien. Denna analys använde sig av alla utvärderbara blodprovstagningar från patienter för att matcha CTC mot bildtagningsstudierna, inte enbart de som valdes ut för angivna tidpunkter enligt beskrivning i 2.1 ovan.

Totalt 366 MCRC-patienter hade CTC-resultat inom en månad från bildtagningsstudien eller dödsfall. Resultatet av denna patientvisa jämförelse mellan CTC och bildtagning (eller dödsfall) visas i **Tabell 19**.

Tabell 19: MCRC-patientvis jämförelse av CTC och bildtagning

Respons vid första uppföljande bildtagningsstudie	CTC inom ±1 månad från bildtagningsstudie eller dödsfall		Totalt
	<3 CTC / 7,5 mL	≥3 CTC / 7,5 mL	
Sjukdom utan progression	272	13	285
Sjukdomsprogression	65	16	81
Totalt	337	29	366

Mätvärde	Beräkning	Nedre 95% CI	Övre 95% CI
Positiv överensstämmelse %	20%	12%	30%
Negativ överensstämmelse %	95%	92%	98%
Positivt förutsäggande värde	55%	36%	74%
Negativt förutsäggande värde	81%	76%	85%
Överensstämmelse i stort	79%	74%	83%
Oddsförhållande	5,2	2,4	11,2

Av 384 MCRC-patienter med en eller flera uppföljande bildtagningsstudier utfördes totalt 911 bildtagningsstudier som ledde till användbar radiologisk respons. Totalt 805 av 911 (88%) bildtagningsstudier hade CTC-resultat som inhämtades inom ± en månad efter bildtagningsstudien. Av de 18 patienterna som avled innan en uppföljande bildtagningsstudie hade 10 fått en uppföljande blodprovstagning inom 30 dagar från dödsfallet. Dessa 10 patienter klassificerades som de med sjukdomsprogression (PD) för dessa jämförelser. Resultatet av denna observationsvisa jämförelse mellan CTC och bildtagning (eller dödsfall) för 815 observationer visas i **Tabell 20**.

Tabell 20: MCRC-observationsvis jämförelse av CTC och bildtagning

Respons vid alla uppföljande bildtagningsstudier	CTC inom ±1 månad från bildtagningsstudie eller dödsfall		Totalt
	<3 CTC / 7,5 mL	≥3 CTC / 7,5 mL	
Sjukdom utan progression	597	33	630
Sjukdomsprogression	147	38	185
Totalt	744	71	815

Mätvärde	Beräkning	Nedre 95% CI	Övre 95% CI
Positiv överensstämmelse %	21%	15%	27%
Negativ överensstämmelse %	95%	93%	96%
Positivt förutsäggande värde	54%	41%	65%
Negativt förutsäggande värde	80%	77%	83%
Överensstämmelse i stort	78%	75%	81%
Oddsförhållande	4,7	2,8	7,7

I serieobservationerna sammanföll endast en minoritet av övergångarna för bildtagningsresultaten mellan sjukdomar med och utan progression med en motsvarande övergång mellan CTC-antal med <3 och ≥3 CTC/7,5 mL.

Eftersom det prognostiska värdet för CTC-resultat vid en tidigare tidpunkt var likvärdigt med CTC-resultatet vid tidpunkten för bildtagning (**Figur 18** och **Figur 19**) skapades en patientvis jämförelse med resultatet från endast den första uppföljande bildtagningsstudien, som utfördes cirka 9 veckor efter inledningen av behandling, och det CTC-resultat som inhämtades cirka 4 veckor efter inledningen av behandlingen. Totalt 320 (80%) av de 402 patienterna hade CTC-resultat 3-5 veckor efter inledningen av behandling. Resultatet av denna patientvisa jämförelse mellan CTC vid en tidigare tidpunkt och bildtagning (eller dödsfall) visas i **Tabell 21**.

Tabell 21: MCRC-patientvis jämförelse av CTC och bildtagning

Respons vid första uppföljande bildtagningsstudie	CTC 3-5 veckor efter inledning av behandling		Totalt
	<3 CTC / 7,5 mL	≥3 CTC / 7,5 mL	
Sjukdom utan progression	228	18	246
Sjukdomsprogression	54	20	74
Totalt	282	38	320

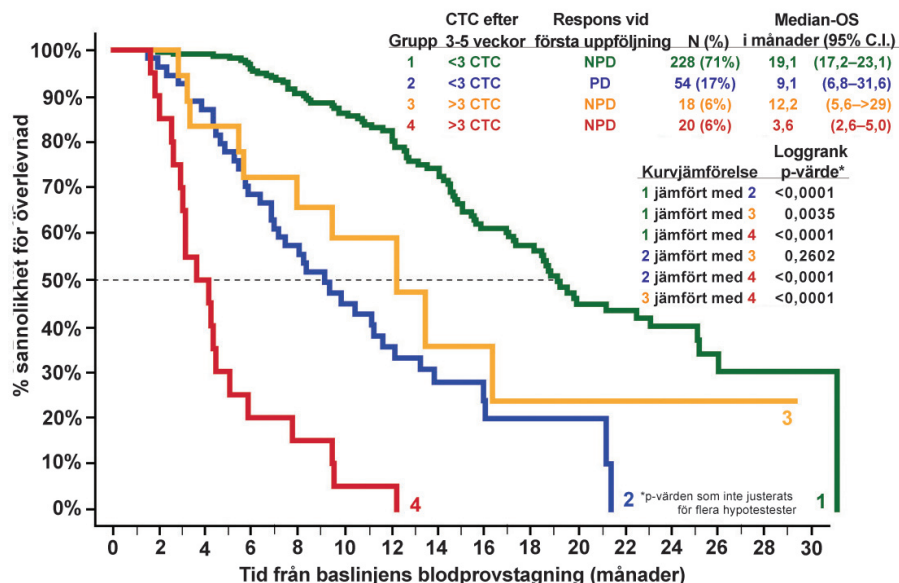
Mätvärde	Beräkning	Nedre 95% CI	Övre 95% CI
Positiv överensstämmelse %	27%	17%	39%
Negativ överensstämmelse %	93%	89%	96%
Positivt förutsäggande värde	53%	36%	69%
Negativt förutsäggande värde	81%	76%	85%
Överensstämmelse i stort	78%	73%	82%
Oddsförhållande	4,7	2,3	9,5

2.4.6 CTC som komplement till bildtagning

Överensstämmelsen i stort mellan CTC och bildtagningen var tillfredsställande (cirka 78%), men det saknades överensstämmelse hos cirka 22% av MCRC-patienterna. Eftersom information från CTC-utvärderingar avses användas i samband med andra diagnostiska modaliteter för att fatta behandlingsbeslut, jämfördes CTC-utvärdering vid första uppföljningen 3-5 veckor efter inledningen av behandlingen och bildtagning i följande grupper med OS för att fastställa vilka av de icke överensstämmande resultaten som bättre påvisar prognosen för patienten (Figur 20):

- Grupp 1 (grön kurva), 228 (71%) patienter med <3 CTC efter 3-5 veckor och NPD.
- Grupp 2 (blå kurva), 54 (17%) patienter med <3 CTC efter 3-5 veckor och PD.
- Grupp 3 (orange kurva), 18 (6%) patienter med ≥3 CTC efter 3-5 veckor och NPD.
- Grupp 4 (röd kurva), 20 (6%) patienter med ≥3 CTC efter 3-5 veckor och PD.

Figur 20: OS för MCRC-patienter i grupperna 1, 2, 3 och 4 med CTC 3-5 veckor efter inledningen av behandling (n=320) och sjukdomsstatus som fastställts vid första uppföljande bildtagningsstudie



I denna studie utgör CTC-resultatet en stor oberoende och förutsäggande faktor för allmän överlevnad. Studieresultaten tyder på att kombinationen CTC och radiologiska utvärderingar ger den mest korrekta utvärderingen av prognosen.

3 Patienter med metastatisk prostatacancer (MPC)

En prospektiv multicenter klinisk prövning utfördes för att fastställa om antalet CTC förutspår sjukdomsprogression och överlevnadsgrad. Patienter med metastatisk prostatacancer i denna studie definierades enligt att de haft två efterföljande öknings av serummarkören prostataspecifik antigen (PSA) över en viss en referensnivå, trots standardhormonbehandling. Patienterna beskrivs vanligen som att de haft androgenoberoende, hormonresistent eller kastreringsresistent prostatacancer. Totalt 231 patienter med metastatisk prostatacancer med påvisad PSA-utveckling trots standardhormonbehandling som påbörjade nytt kemobehandlingssätt eller ny kemobehandlingstyp registrerades. Kliniska data analyserades utifrån avsikten att behandla. Patientstatistik visas i **Tabell 22**.

Tabell 22: Statistik för MPC-patienter

Kategori	Medelvärde ± standardavvikelse (medianvärde)	Antal patienter
Ålder på baslinjen (i år)	70±9 (70)	231
Förbehandling:		
PSA (ng/mL)	547±1616 (144)	231
Hemoglobin (g/dL)	12,3±1,6 (12,4)	221
Alkalisk fosfatas (Alkfos) (IU/mL)	235±271 (144)	223
Laktatdehydrogenas (LDH) (IU/mL)	293±228 (224)	219
Albumin (g/dL)	3,9±2,6 (3,8)	214
	Beskrivning av kategorier	Antal patienter (% av totalantalet)
Ras	Vit	209 (90%)
	Svart	17 (7%)
	annan	5 (3%)
ECOG-poäng på baslinjen	0	101 (44%)
	1	100 (43%)
	2	21 (9%)
	Okänd	9 (4%)
Gleason-poäng	≥5	18 (8%)
	6	28 (12%)
	7	63 (27%)
	8	45 (20%)
	≥9	54 (23%)
	Okänd	23 (10%)
Stadium vid primär diagnos	1	14 (6%)
	2	30 (13%)
	3	58 (25%)
	4	19 (8%)
	Okänt	110 (48%)
Behandlingssätt	Första	154 (67%)
	Andra	38 (16%)
	≥Tredje	39 (17%)
Taxoter i nuvarande behandlingssätt?	Nej	67 (29%)
	Ja	162 (70%)
	Okänt	2 (1%)
Skelettmetastas	Negativ	20 (8%)
	Positiv	207 (90%)
	Okänd	4 (2%)
Mätbar sjukdom	Nej	142 (62%)
	Ja	88 (38%)
	Okänt	1 (0%)
Metastas i inre organ	Nej	141 (61%)
	Ja	89 (39%)
	Okänt	1 (0%)

CTC-antalet på baslinjen fastställdes före insättandet av en ny typ av kemoterapi. Följande schema valdes för utvärdering: baslinjen (före inledning av behandling), 2-5 veckor (14-41 dagar efter baslinjen), 6-8 veckor (42-62 dagar efter baslinjen), 9-12 veckor (63-90 dagar efter baslinjen) och 13-20 veckor (91-146 dagar efter baslinjen) efter inledningen av behandling. Om mer än en blodprovstagning hamnade inom de bestämda tidsramarna användes den blodprovstagning som låg längst ifrån baslinjens blodprovstagning som resultat för varje tidsram.

3.1 CTC-frekvenser

Samtliga 231 utvärderbara MPC-patienter fick en blodprovstagning på baslinjen. Tvåhundraåtugo (221) av dessa MPC-patienter fick en eller fler blodprovstagningar för uppföljning efter inledningen av behandling. Av de tio MPC-patienter med endast en baslinjens blodprovstagning avled tre innan blodprovstagning för uppföljning kunde göras, en patients sjukdom utvecklades och patienten fick läggas in på hospice, en patient fick avsluta kemobehandlingen på grund av höftbensbrott, en patient flyttades, tre patienter vägrade göra fler blodprovstagningar och en patient tog tillbaka samtycket till deltagande i studien. Totalt fanns 214, 171, 158 och 149 MPC-patienter med blodprovstagningar för uppföljning 2-5 veckor, 6-8 veckor, 9-12 veckor och 13-20 veckor efter inledningen av behandling.

Vid metastatisk prostatacancer fastställs sjukdomens progression huvudsakligen utifrån ändringar av PSA-värdet. I denna studie fastställdes sjukdomens progression på institutioner som använder sig av PSA-värde, bildtagning och/eller kliniska tecken och symtom. För analyser på baslinjen fastställdes PFS utifrån tiden för blodprovstagningen på baslinjen till fastställandet av sjukdomsprogression eller dödsfall, och OS fastställdes utifrån tiden för

blodprovstagningen på baslinjen till datumet för sista kontakt med patienten. För uppföljningsanalyserna mäts PFS från tidpunkten för uppföljningen med blodprovstagning till diagnosen sjukdomsprogression eller dödsfall. OS mäts från tidpunkten för blodprovstagning för uppföljning till datum för dödsfall, eller datum för sista kontakt med patienten. Patienter med sjukdomsprogression före datum för blodprovstagning för utvärdering uteslöts ur PFS-analyserna för den tidpunkten och samtliga efterföljande blodprovstagningar för uppföljning. Patienter utan vidare uppföljning av överlevnadsgrad efter datum för blodprovstagning för utvärdering uteslöts ur PFS- och OS-analyserna för den tidpunkten. **Tabell 23** visar antalet patienter vid varje tidpunkt som uteslöts ur PFS- eller PFS- och OS-analyser samt orsakerna till deras uteslutning.

Tabell 23: MPC-patienter som utesluts ur PFS- och OS-analyser

Tidpunkt för blodprovstagning	Icke utvärderbara MPC-patienter:					Totalt antal utvärderbara MPC-patienter	
	PFS och OS				Endast PFS		
	Blodprov inte tagits	Blodprov tagits 1-7 dagar efter administrering av behandling	Ingen uppföljning efter datum för blodprovstagning	Inga eller icke utvärderbara CTC-resultat	Blodprov tagits efter datum för sjukdomsprogression	PFS	OS
Baslinjen	0	6	0	6	0	219	219
2-5 veckor	17	0	0	11	4	199	203
6-8 veckor	60	0	0	8	22	141	163
9-12 veckor	73	1	0	8	15	134	149
13-20 veckor	82	0	1	5	27	116	143

CTC-resultaten från uppföljande blodprovstagning efter 2-5 veckor, 6-8 veckor, 9-12 veckor och 13-20 veckor efter inledningen av behandling klassificerades som fördelaktiga (<5 CTC) ofördelaktiga (≥5 CTC). Nivåerna av PSA, alkalisk fosfatas och LDH som sammanfattas i statistiktabellen och som användes i analyserna mäts alla på ett centrallaboratorium i serumprover som samlades in samtidigt som de blodprover som användes för CTC-utvärdering. Hemoglobin- och albuminnivåer som sammanfattades i tabellerna och användes i analyserna var värden som tillhandahölls av institutionerna och verifierades enligt patientens journal och som fastställdes inom ± 30 dagar efter baslinjens CTC-utvärdering.

3.2 Analys av MPC-patienter gällande överlevnadsgrad utan sjukdomsprogression (PFS)

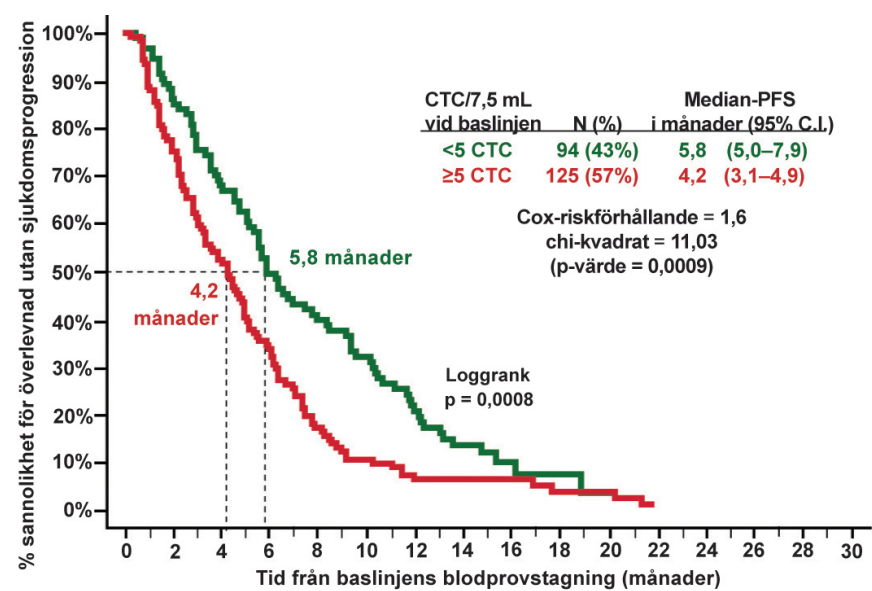
3.2.1 PFS med CTC-resultat (baslinjen)

Tvåhundra nittionio (219) av de 231 utvärderbara patienterna hade ett CTC-resultat från baslinjen tillgängligt. För Kaplan-Meier-analys segmenterades patienterna i två grupper efter CTC-antalet vid baslinjen:

- Den fördelaktiga gruppen (N=94), som visas i **grönt**, bestod av patienter med <5 CTC.
- Den ofördelaktiga gruppen (N=125), som visas i **rött**, bestod av patienter med ≥5 CTC.

Median-PFS var betydligt längre i den fördelaktiga gruppen jämfört med den ofördelaktiga gruppen (5,8 jämfört med 4,2 månader). Resultatet visas i **Figur 21** och **Tabell 24**.

Figur 21: PFS för MPC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid baslinjen (N=219).

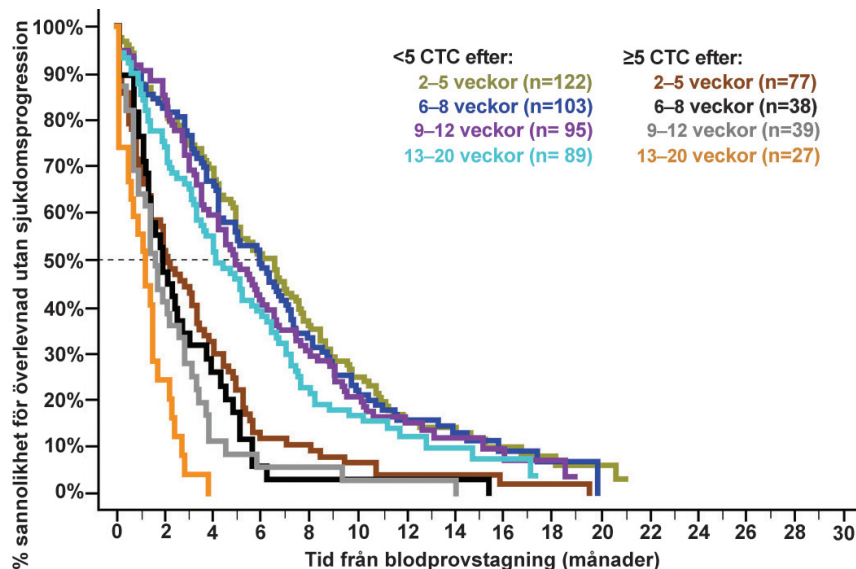


3.2.2 PFS med CTC-resultat (uppföljning)

För Kaplan-Meier-analys segmenterades MPC-patienter i två grupper efter CTC-antalet vid vart och ett av de olika blodprovstagningarna för uppföljning. Värdena för de båda patientgrupperna vid var och en av de olika blodprovstagningarna för uppföljning efter inledningen av behandling för PFS visas i **Figur 22**. Figuren visar förmågan för CTC hos MPC-patienter <5 och ≥5 CTC att förutsäga perioden till klinisk progression eller dödsfall efter 2-5 veckor (n=199), 6-8 veckor (n=141), 9-12 veckor (n=134) och 13-20 veckor (n=116) efter inledningen av behandling.

- Den fördelaktiga gruppen som visas i **olivgrönt, blått, lila och cyan** bestod av patienter med <5 CTC 2-5, 6-8, 9-12 och 13-20 veckor efter inledningen av behandling.
- Den ofördelaktiga gruppen som visas i **brunt, svart, grått och orange** bestod av patienter med ≥5 CTC 2-5, 6-8, 9-12 och 13-20 veckor efter inledningen av behandling.

Figur 22: PFS för MPC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid olika tidpunkter under uppföljning.



Tabell 24 sammanfattar resultaten av PFS-analysen med användning av CTC-nivåer och ett tröskelvärde på ≥5 CTC/7,5 mL vid var och en av tidpunkterna för blodprovstagning.

Tabell 24: PFS för MPC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid olika tidpunkter

1	2	3	4	5	6
Provtagningstid Efter Tx-initiering	Antal	≥5 CTC	Median-PFS i månader (95% CI)		Logg-rank p-värde
			<5 CTC	≥5 CTC	
Baslinjen	219	125 (57%)	5,8 (5,0 – 7,9)	4,2 (3,1 – 4,9)	0,0008
2-5 veckor	199	77 (39%)	6,5 (4,9 – 7,4)	2,1 (1,4 – 3,3)	<0,0001
6-8 veckor	141	38 (27%)	5,9 (4,2 – 7,0)	1,9 (1,3 – 2,7)	<0,0001
9-12 veckor	134	39 (24%)	4,9 (3,8 – 6,2)	1,6 (0,9 – 2,6)	<0,0001
13-20 veckor	116	27 (23%)	4,1 (3,3 – 5,8)	1,2 (0,5 – 1,5)	<0,0001

Som framgår av **Figur 22** och **Tabell 24** hade MPC-patienter med förhöjd CTC (≥5 CTC/7,5 mL helblod) vid samtliga tidpunkter mycket högre sannolikhet för snabb sjukdomsprogression än patienter med <5 CTC. **Tabell 24** kolumn 4 visar median-PFS-tider för patienter med <5 CTC på mellan 4,1 och 6,5 månader. Dessa tider var betydligt längre än median-PFS-tiderna för patienter med ≥5 CTC, vilka låg på mellan 1,2 och 4,2 månader (kolumn 5).

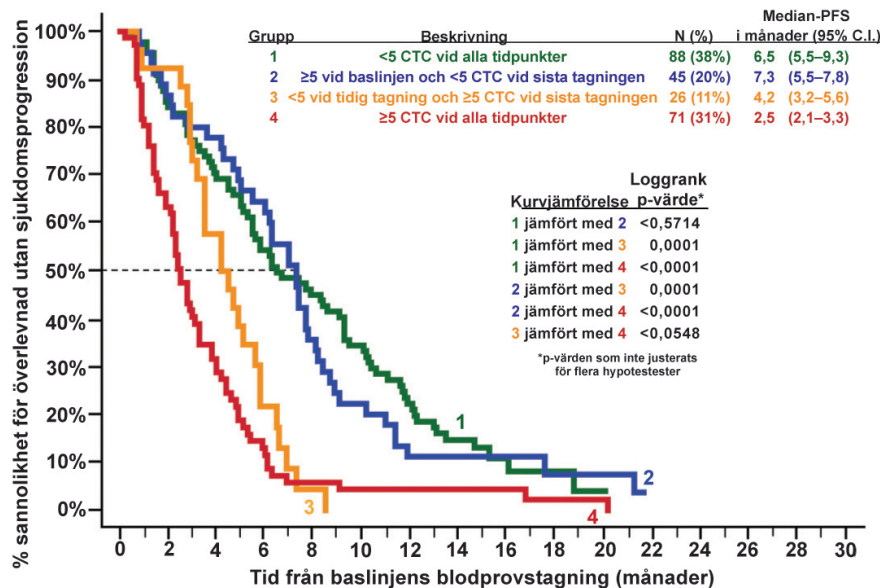
3.2.3 Minskning eller ökning av CTC förutspår förbättrad eller försämrad PFS

Förflutna PFS-tider beräknades utifrån baslinjens blodprov. För den Kaplan-Meier-analys som visas i **Figur 23** segmenterades MPC-patienter i fyra grupper utifrån deras CTC-antal vid baslinjen, 2-5 veckor, 6-8 veckor, 9-12 veckor och 13-20 veckor efter inledningen av behandling:

- Grupp 1 (**grön** kurva), 88 (38%) patienter med <5 CTC vid alla tidpunkter. Fem (6%) av dessa patienter hade endast fått en blodprovstagning på baslinjen, medan sju (8%) hade fått en blodprovstagning mellan första och sista blodprovstagningen med ≥5 CTC.

- Grupp 2 (**blå** kurva), 45 (20%) patienter med ≥ 5 CTC före inledningen av behandlingen, men som hade minskat till < 5 CTC vid tidpunkten för den sista blodprovstagningen.
- Grupp 3 (**orange** kurva), 26 (11%) patienter med < 5 CTC vid en tidig blodprovstagning (baslinjen, 2-5 veckor och/eller 6-8 veckor) men som ökat till ≥ 5 CTC vid tidpunkten för den sista blodprovstagningen.
- Grupp 4 (**röd** kurva), 71 (31%) patienter med ≥ 5 CTC vid alla tidpunkter för blodprovstagningar. Åtta (11%) av dessa patienter hade endast fått en blodprovstagning på baslinjen, medan två (3%) hade en blodprovstagning mellan första och sista blodprovstagningen med < 5 CTC.

Figur 23: En minskning av CTC under 5 efter inledningen av behandlingen förutspår längre PFS hos MPC-patienter.



Figur 23 visar att MPC-patienter med ≥ 5 CTC vid alla tidpunkter (**Grupp 4**) hade kortast median-PFS, vilken avvek betydligt från median-PFS för **Grupp 3**, **Grupp 2** och **Grupp 1**. Skillnaden i median-PFS mellan de patienter som visade en CTC-minskning efter inledningen av behandlingen (**Grupp 2**) var betydligt längre än för de patienter som visade en CTC-ökning (**Grupp 3**).

3.3 Analys av överlevnadsgraden (OS) i stort gällande MPC-patienter

3.3.1 OS-analys med CTC-resultat (baslinjen)

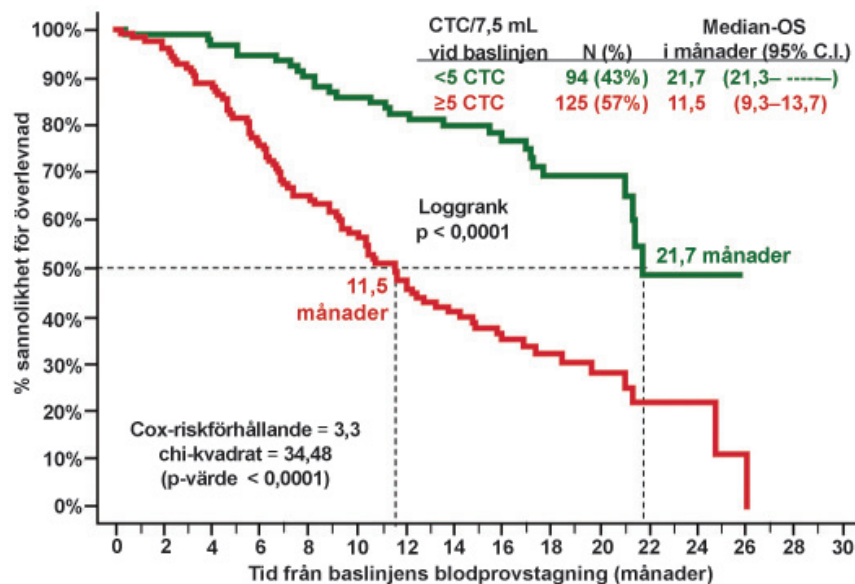
Dödsfall inträffade hos 119 (52%) av de 231 MPC-patienterna, med en medeluppföljningstid för de 112 (48%) patienter i livet på $16,1 \pm 4,9$ månader (median=16,5 månader, intervall=1,9 – 25,7 månader). Vid tidpunkten för analyserna hade 28 (30%) av 94 patienter från den fördelaktiga gruppen (< 5 CTC vid baslinjen) jämfört med 83 (66%) av 125 från den ofördelaktiga gruppen (≥ 5 CTC vid baslinjen) avlidit.

För Kaplan-Meier-analysen segmenterades 219 av de 231 utvärderbara patienterna som hade resultat från baslinjen i två grupper utifrån CTC-antal vid baslinjen:

- Den fördelaktiga gruppen (N=94), som visas i **grönt**, bestod av patienter med < 5 CTC.
- Den ofördelaktiga gruppen (N=125), som visas i **rött**, bestod av patienter med ≥ 5 CTC.

Median-OS var betydligt längre i den fördelaktiga gruppen än i den ofördelaktiga gruppen (21,7 respektive 11,5 månader). Resultatet sammanfattas i **Figur 24**.

Figur 24: OS för MPC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid baslinjen (N=219).

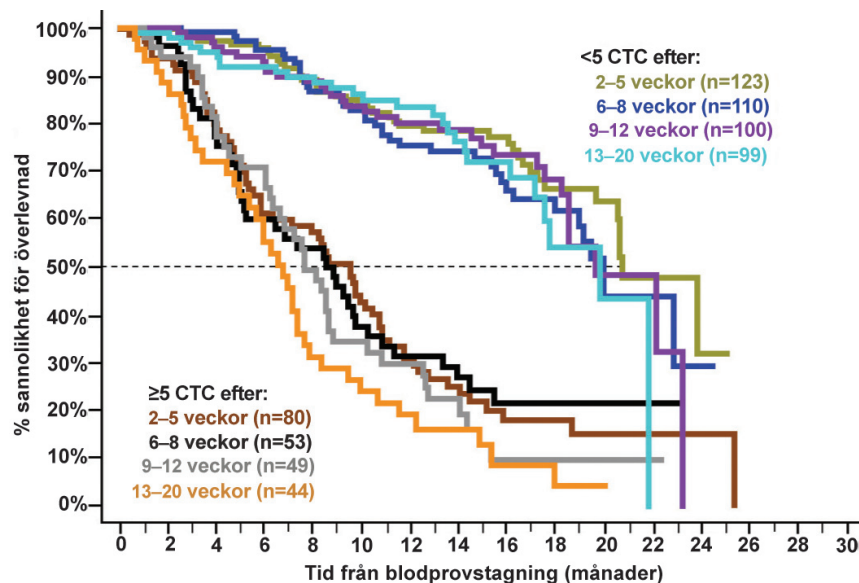


3.3.2 OS med CTC-resultat (uppföljning)

Kaplan-Meier-analyserna för båda MPC-patientgrupperna vid var och en av de olika blodprovstiderna för uppföljning efter inledningen av behandling visas i **Figur 25**. Figuren visar förmågan för CTC att beräkna perioden till dödsfall för MPC-patienter med <5 och ≥5 CTC 2-5 veckor (n=203), 6-8 veckor (n=163), 9-12 veckor (n=149) och 13-20 veckor (n=143) efter inledningen av behandling. OS-tiderna beräknades från tiden för varje blodprovstagnning.

- Den fördelaktiga gruppen, som visas i **olivgrönt, blått, lila** och **cyan**, bestod av patienter med <5 CTC.
- Den ofördelaktiga gruppen, som visas i **brunt, svart, grått** och **orange**, bestod av patienter med ≥5 CTC.

Figur 25: OS för MPC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid olika tidpunkter under uppföljningen.



Tabell 25 sammanfattar resultaten för OS-analysen med användning av CTC-nivåer och ett tröskelvärde på ≥5 CTC/7,5 mL vid var och en av tidpunkterna för blodprovstagnning.

Tabell 25: OS för MPC-patienter med <5 eller ≥5 CTC vid olika tidpunkter

1	2	3	4	5	6
Provtagningstid Efter Tx-initiering	Antal	≥5 CTC	Median-OS i månader (95% CI)		Logg-rank p-värde
			<5 CTC	≥5 CTC	
Baslinjen	219	125 (57%)	21,7 (21,3 – NR)	11,5 (9,3 – 13,7)	<0,0001
2-5 veckor	203	80 (39%)	20,7 (20,5 – NR)	9,5 (5,8 – 10,7)	<0,0001
6-8 veckor	163	53 (33%)	19,9 (17,9 – NR)	8,5 (5,0 – 10,2)	<0,0001
9-12 veckor	149	49 (33%)	19,6 (18,5 – NR)	7,6 (6,2 – 8,6)	<0,0001
13-20 veckor	143	44 (31%)	19,8 (17,1 – NR)	6,7 (4,9 – 7,6)	<0,0001

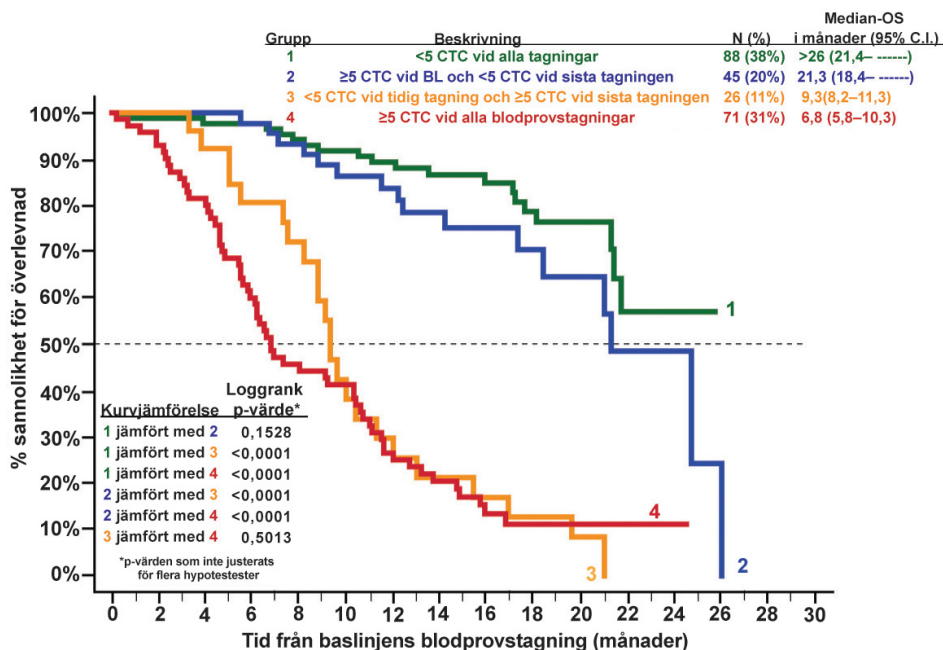
Enligt vad som visas i **Figur 25** och **Tabell 25** i kolumn 4 och 5 hade MPC-patienter med ≥5 CTC vid alla tidpunkter större sannolikhet att avlida tidigare än de med <5 CTC. Median-OS-tiderna för patienter med <5 CTC låg på mellan 19,6 och 21,7 månader. Dessa tider var betydligt längre än median-OS-tiderna för patienter med ≥5 CTC, vilka låg på mellan 6,7 och 11,5 månader.

3.3.3 Minskning eller ökning av CTC förutspår förbättrad eller försämrad OS

Förflutna OS-tider beräknades från baslinjens blodprov. För Kaplan-Meier-analys (**Figur 26**) segmenterades MBC-patienter i fyra grupper utifrån deras CTC-antal vid baslinjen, 2-5 veckor, 6-8 veckor, 9-12 veckor och 13-20 veckor efter inledningen av behandling:

- Grupp 1 (**grön** kurva), 88 (38%) patienter med <5 CTC vid alla blodtagningstidpunkter. Fem (6%) av dessa patienter hade endast fått en blodprovstagning på baslinjen, medan sju (8%) hade fått en blodprovstagning mellan första och sista blodprovstagningen med ≥5 CTC.
- Grupp 2 (**blå** kurva), 45 (20%) patienter med ≥5 CTC innan inledningen av behandlingen, men som hade minskat till <5 CTC vid tidpunkten för sista blodprovstagningen.
- Grupp 3 (**orange** kurva), 26 (11%) patienter med <5 CTC vid en tidig blodprovstagning men som ökat till ≥5 CTC vid tidpunkten för sista blodprovstagningen.
- Grupp 4 (**röd** kurva), 71 (31%) patienter med ≥5 CTC vid alla tidpunkter för blodprovstagningar. Åtta (11%) av dessa patienter hade endast fått en blodprovstagning på baslinjen, medan två (3%) hade fått en blodprovstagning mellan första och sista blodprovstagningen med <5 CTC.

Figur 26: En minskning av CTC under 5 efter inledningen av behandlingen förutspår längre OS, medan en ökning av CTC till 5 eller högre förutspår kortare OS hos MPC-patienter.



Figur 26 visar att patienter med ≥ 5 CTC när som helst efter inledningen av behandlingen hade mycket större sannolikhet att avlida tidigare. Patienter med ≥ 5 CTC vid alla tidpunkter (**Grupp 4**) hade kortast median-OS, vilken avvek betydligt från median-OS för **Grupp 2** och **Grupp 1** men inte **Grupp 3**. Patienter med < 5 CTC vid alla tidpunkter (**Grupp 1**) hade längst median-OS, vilken avvek betydligt från median-OS för **Grupp 4** och **Grupp 3**, men inte **Grupp 2**. **Figur 26** visar även att patienter som visar en minskning av CTC (**Grupp 2**) ökar överlevnadsgraden och hade en median-OS som liknade den för patienter med fördelaktiga CTC vid alla blodprovstagningar (**Grupp 1**). Figuren visar även att ofördelaktiga CTC-nivåer efter inledningen av behandling på ett betydande sätt minskade OS (**Grupp 3** och **Grupp 4**).

3.3.4 Univariat Cox-regressionsanalys av MPC-patienter

Univariat Cox-regressionsanalys för proportionell risk användes för att utvärdera associeringen av följande förbehandlingsparametrar med PFS och OS: sjukdomsstadium vid diagnos (1-4), patientålder (≥ 70 eller < 70 år), ECOG-status före inledningen av ett nytt behandlingssätt (0-2), Gleason-poäng (2-10), hemoglobinnivå inom ± 30 dagar efter blodprovstagningen på baslinjen (g/dL, kontinuerlig), albuminnivå inom ± 30 dagar efter blodprovstagningen på baslinjen (g/dL, kontinuerlig), testosteronnivå vid tiden för blodprovstagningen på baslinjen (ng/mL, kontinuerlig), LDH-nivå vid tiden för blodprovstagningen på baslinjen (IU/mL, kontinuerlig), alkalisk fosfatas vid tiden för blodprovstagningen på baslinjen (IU/mL, kontinuerlig), PSA-nivå vid tiden för blodprovstagningen på baslinjen (ng/mL, kontinuerlig), förbehandlings PSA-fördubblingstid (månader, kontinuerlig), förbehandlings PSA-hastighet (ng/mL/månad, kontinuerlig), behandlingssätt (första, andra, tredje, fjärde, femte och sjätte), behandlingstyp (taxotere medtaget eller inte), förekomst av mätbar sjukdom (ja eller nej), förekomst av skelettmetastas (ja eller nej), förekomst av visceral metastas (ja eller nej) samt CTC-nivån på baslinjen (≥ 5 CTC/7,5 mL eller < 5 CTC/7,5 mL) och CTC-antal vid uppföljning efters 2-5, 6-8, 9-12 och 13-20 veckor.

För dessa analyser beräknades förfluten tid för både PFS och OS utifrån tiden för baslinjens blodprovstagning. Cox-regressionsresultatet (dvs riskförhållandet och associerat 95% konfidensintervall, chikvadratvärdet och associerade p-värden) för förmågan hos parametrarna att oberoende förutsäga PFS och OS anges i **Tabell 26** samt även antalet patienter i varje utvärdering.

Tabell 26: Univariat Cox-regressionsanalys av MPC-patienter

Parameter	Kategorier		Antal MPC-patienter	PFS-risk från baslinjen		OS-risk från baslinjen	
	Positiv	Negativ		RisKFör-hållande	p-värde ²	RisKFör-hållande	p-värde ²
Stadium vid primär diagnos	4 jämfört med 3 jämfört med 2 jämfört med 1		121	0,88	0,206	0,83	0,174
Ålder vid blodprovstagning på baslinjen	≥70	<70	231	0,96	0,764	1,28	0,178
ECOG-status vid studieinföring	2 jämfört med 1 jämfört med 0		222	1,34	0,011	2,36	<0,001
Gleason-poäng	10-2		208	1,01	0,919	1,02	0,717
PSA:s fördubblingstid (månader) vid förbehandling	Kontinuerligt		230	0,97	0,542	0,97	0,664
PSA-hastighet (ng/mL/månad) vid förbehandling	Kontinuerligt		230	1,00	0,200	1,00	0,544
Hemoglobin på baslinjen (g/dL)	Kontinuerligt		221	0,87	0,002	0,71	<0,001
Albumin på baslinjen (g/dL)	Kontinuerligt		214	0,99	0,748	1,02	0,557
Testosteron på baslinjen (ng/mL) ¹	Kontinuerligt		223	1,07	0,900	2,71	0,060
LDH på baslinjen (IU/mL) ¹	Kontinuerligt		219	1,001	<0,001	1,002	<0,001
Alkalisk fosfatas på baslinjen (IU/mL) ¹	Kontinuerligt		223	1,00	0,158	1,0008	0,001
Behandlingssätt	Kontinuerligt (1 – 6)		231	1,23	0,003	1,28	0,003
Behandlingstyp (Taxoter: Ja/nej)	Ja	Nej	229	0,57	<0,001	0,59	0,006
Mätbar sjukdom?	Ja	Nej	230	1,00	0,993	1,28	0,181
Skelettmetastas?	Ja	Nej	227	1,02	0,933	2,22	0,057
Metastas i inre organ?	Ja	Nej	230	1,01	0,918	1,26	0,216
PSA på baslinjen (ng/mL) ¹	Kontinuerligt		231	1,00	0,746	1,00	0,907
PSA efter 2-5 veckor (ng/mL) ¹	Kontinuerligt		207	1,00	0,819	1,00	0,794
PSA efter 6-8 veckor (ng/mL) ¹	Kontinuerligt		167	1,00	0,426	1,00	0,654
PSA efter 9-12 veckor (ng/mL) ¹	Kontinuerligt		155	1,00	0,684	1,00	0,324
PSA efter 13-20 veckor (ng/mL) ¹	Kontinuerligt		143	1,00	0,639	1,00	0,205
PSA-minskning från BL efter 2-5 veckor (%) ¹	<30%	≥ 30%	207	1,56	0,006	1,24	0,318
PSA-minskning från BL efter 6-8 veckor (%) ¹	<30%	≥ 30%	167	2,21	<0,001	2,27	0,001
PSA-minskning från BL efter 9-12 veckor (%) ¹	<30%	≥ 30%	155	2,76	<0,001	2,30	<0,001
PSA-minskning från BL efter 13-20 veckor (%) ¹	<30%	≥ 30%	143	2,69	<0,001	3,19	<0,001
CTC-antal på baslinjen	≥5	<5	219	1,62	0,001	3,33	<0,001
CTC-antal efter 2-5 veckor	≥5	<5	203	2,34	<0,001	4,46	<0,001
CTC-antal efter 6-8 veckor	≥5	<5	163	3,29	<0,001	3,66	<0,001
CTC-antal efter 9-12 veckor	≥5	<5	149	3,23	<0,001	5,82	<0,001
CTC-antal efter 13-20 veckor	≥5	<5	144	4,82	<0,001	7,18	<0,001

¹ Bestämt utifrån serum som tagits på samma datum som blod som tagits för CTC

² p-värde utifrån Wald-test för Z-statistik

3.3.5 Multivariat Cox-regressionsanalys av MPC-patienter

Multivariata Cox-regressionsanalyser utfördes för att utvärdera den oberoende förutspående förmågan för CTC-antalet genom att justera för effekterna av kända viktiga kliniska faktorer som är statistiskt signifikanta i univariata analyser. CTC befanns vara den starkaste prediktorn vid de flesta tidpunkter för PFS och OS (Tabell 27).

Tabell 27: Multivariat Cox-regressionsanalys av MPC-patienter

Parameter	Antal patienter	PFS-risk från baslinjen		OS-risk från baslinjen	
		Risikförhållande	p-värde ²	Risikförhållande	p-värde ²
CTC på baslinjen (<5 jämfört med ≥5)	188	1,14	0,455	1,92	0,009
ECOG-status på baslinjen (0 jämfört med 1 jämfört med 2)		1,00	0,982	1,46	0,032
Hemoglobin på baslinjen (g/dL) ³		0,88	0,027	0,81	0,007
LDH på baslinjen (IU/mL) ^{1, 3}		1,0007	0,018	1,002	<0,001
Alkalisk fosfatas på baslinjen (IU/mL) ^{1, 3}		---	---	1,00	0,410
Behandlingssätt (första till och med sjätte)		1,14	0,145	1,07	0,547
Behandlingstyp (Taxoter: Ja/nej)		0,63	0,009	0,70	0,139
CTC efter 2-5 veckor (<5 jämfört med ≥5)	173	1,48	0,041	2,91	<0,001
PSA-minskning från baslinjen efter 2-5 veckor (≥30% jämfört med <30%) ¹		1,40	0,077	1,13	0,637
ECOG-status på baslinjen (0 jämfört med 1 jämfört med 2)		0,97	0,836	1,46	0,054
Hemoglobin på baslinjen (g/dL) ³		0,93	0,246	0,89	0,141
LDH på baslinjen (IU/mL) ^{1, 3}		1,002	0,002	1,003	<0,001
Alkalisk fosfatas på baslinjen (IU/mL) ^{1, 3}		---	---	1,00	0,622
Behandlingssätt (första till och med sjätte)		1,11	0,274	1,11	0,399
Behandlingstyp (Taxoter: Ja/nej)		0,75	0,133	0,80	0,397
CTC efter 6-8 veckor (<5 jämfört med ≥5)	139	2,14	<0,001	2,13	0,009
PSA-minskning från baslinjen efter 6-8 veckor (≥30% jämfört med <30%) ¹		1,88	0,002	2,38	0,007
ECOG-status på baslinjen (0 jämfört med 1 jämfört med 2)		1,04	0,810	1,52	0,088
Hemoglobin på baslinjen (g/dL) ³		0,97	0,695	0,79	0,013
LDH på baslinjen (IU/mL) ^{1, 3}		1,002	0,003	1,004	<0,001
Alkalisk fosfatas på baslinjen (IU/mL) ^{1, 3}		---	---	1,00	0,780
Behandlingssätt (första till och med sjätte)		1,37	0,001	1,35	0,035
Behandlingstyp (Taxoter: Ja/nej)		0,80	0,278	1,45	0,276
CTC efter 9-12 veckor (<5 jämfört med ≥5)	125	1,74	0,015	3,94	<0,001
PSA-minskning från baslinjen efter 9-12 veckor (≥30% jämfört med <30%) ¹		2,23	<0,001	1,46	0,221
ECOG-status på baslinjen (0 jämfört med 1 jämfört med 2)		1,21	0,307	1,89	0,004
Hemoglobin på baslinjen (g/dL) ³		0,93	0,322	0,97	0,758
LDH på baslinjen (IU/mL) ^{1, 3}		1,00	0,190	1,003	<0,001
Alkalisk fosfatas på baslinjen (IU/mL) ^{1, 3}		---	---	1,00	0,989
Behandlingssätt (första till och med sjätte)		1,25	0,052	1,11	0,499
Behandlingstyp (Taxoter: Ja/nej)		0,97	0,903	1,26	0,486
CTC efter 13-20 veckor (<5 jämfört med ≥5)	123	2,95	<0,001	3,75	0,001
PSA-minskning från baslinjen efter 13-20 veckor (≥30% jämfört med <30%) ¹		1,97	0,002	1,52	0,275
ECOG-status på baslinjen (0 jämfört med 1 jämfört med 2)		0,98	0,919	1,98	0,002
Hemoglobin på baslinjen (g/dL) ³		1,03	0,723	0,87	0,232
LDH på baslinjen (IU/mL) ^{1, 3}		1,00	0,380	1,003	<0,001
Alkalisk fosfatas på baslinjen (IU/mL) ^{1, 3}		---	---	1,00	0,078
Behandlingssätt (första till och med sjätte)		1,25	0,050	1,06	0,751
Behandlingstyp (Taxoter: Ja/nej)		1,04	0,882	0,90	0,770

¹ Bestämt utifrån serum som tagits på samma datum som blod som tagits för CTC

² p-värde utifrån Wald-test för Z-statistik

³ Utvärderad som kontinuerlig parameter

3.4 Användning av CTC för att övervaka klinisk status på patienter med metastatisk prostatacancer

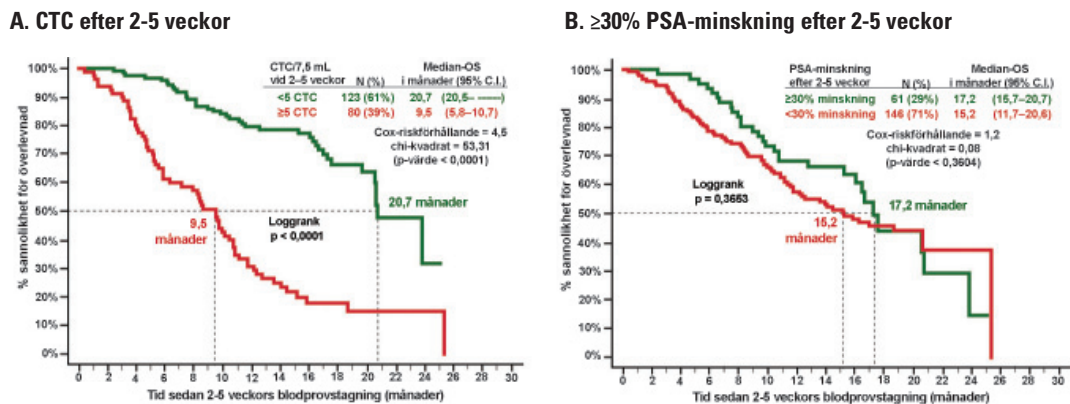
3.4.1 Relation mellan överlevnadsgrad, CTC-antal och sjukdomsutvärdering genom PSA

För närvarande är en minskning i PSA ett av huvudsätten att fastställa respons på behandling av MPC-patienter. För att fastställa klinisk status med PSA i förhållande till CTC mättes minskning av $\geq 30\%$ eller $\geq 50\%$ PSA och CTC efter 2-5 veckor, 6-8 veckor, 9-12 veckor och 13-20 veckor efter inledning av behandling och jämfört med OS.

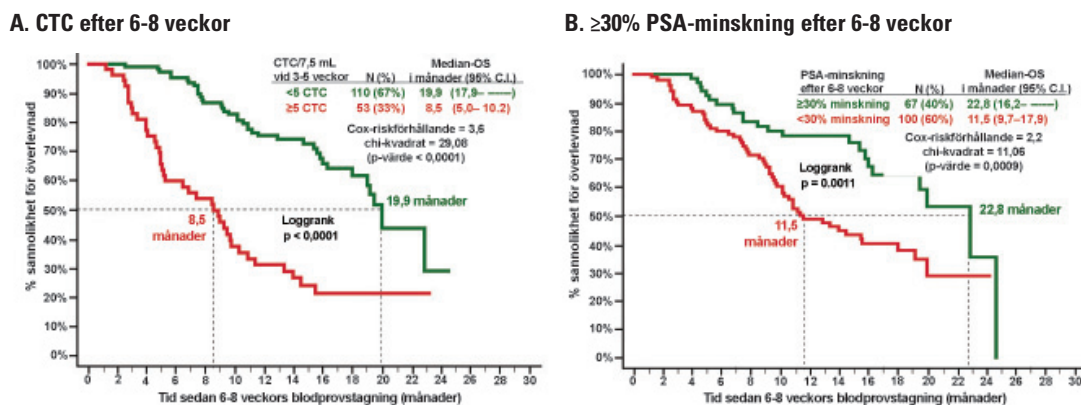
För Kaplan-Meier-analysen beräknades förlutna OS-tider utifrån tidpunkten för blodprovstagning. Patienter segmenterades i fördelaktiga grupper enligt en CTC på <5 vid tidpunkten för utvärdering och en $\geq 30\%$ minskning av PSA från baslinjen till tidpunkten för utvärdering. Patienter segmenterades i ofördelaktiga grupper enligt en CTC på ≥ 5 och $<30\%$ minskning i PSA från baslinjen till tidpunkten för utvärdering.

Figur 27 visar resultatet av analysen 2-5 veckor efter inledningen av behandling, **Figur 28** analysen 6-8 veckor efter inledningen av behandling, **Figur 29** analysen 9-12 veckor efter inledningen av behandling och **Figur 30** analysen 13-20 veckor efter inledningen av behandling.

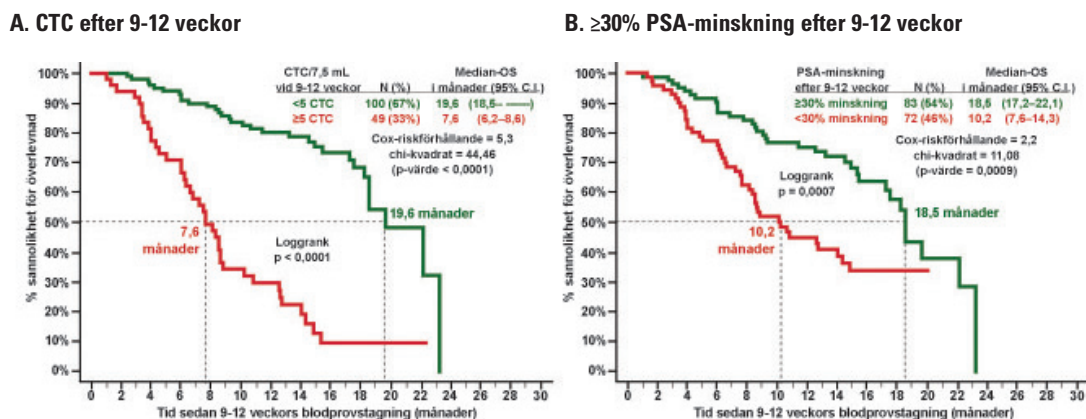
Figur 27: OS för MPC-patienter 2-5 veckor efter inledningen av behandlingen



Figur 28: OS för MPC-patienter 6-8 veckor efter inledningen av behandlingen

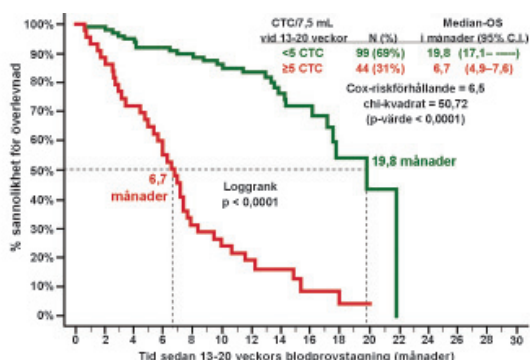


Figur 29: OS för MPC-patienter 9-12 veckor efter inledningen av behandlingen

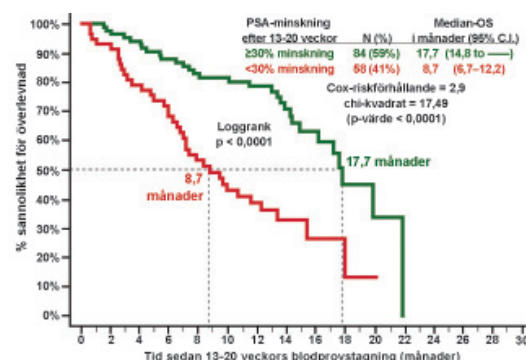


Figur 30: OS för MPC-patienter 13-20 veckor efter inledningen av behandlingen

A. CTC efter 13-20 veckor



B. ≥30% PSA-minskning efter 13-20 veckor



Tabell 28 visar en jämförelse mellan median-OS vid olika tidpunkter efter behandling med CTC, en 30% PSA-minskning och en 50% PSA-minskning.

Tabell 28: Jämförelse av median-OS mellan fördelaktiga och ofördelaktiga grupper gällande CTC och PSA-minskning.

Tidpunkt	CTC/7,5 mL						30% PSA-minskning från baslinjen						50% PSA-minskning från baslinjen					
	Antal	≥5 (%)	Median-OS		logrank p-värde	HR	Antal	<30 (%)	Median-OS		logrank p-värde	HR	Antal	<50 (%)	Median-OS		logrank p-värde	HR
			<5	≥5					≥30%	<30%					≥50%	<50%		
2-5 veckor	203	39%	20,7	9,5	<0,0001	4,5	207	71%	17,2	15,2	0,3653	1,2	207	83%	17,5	16,2	0,5599	1,2
6-8 veckor	163	33%	19,9	8,5	<0,0001	3,6	167	60%	22,8	11,5	0,0011	2,2	167	75%	22,8	14,4	0,0117	2,1
9-12 veckor	149	33%	19,6	7,6	<0,0001	5,3	155	46%	18,5	10,2	0,0007	2,2	155	59%	19,6	10,8	0,0006	2,3
13-20 veckor	143	31%	19,8	6,7	<0,0001	6,5	142	41%	17,7	8,7	<0,0001	2,9	142	46%	17,7	9,9	0,0001	2,6

Data i **Figur 27** till och med **Figur 30** och i **Tabell 28** visar en i hög grad signifikant skillnad i OS mellan patienter med ofördelaktig CTC och fördelaktig CTC vid alla tidpunkter som testas, medan PSA-utvärderingar inte var signifikanta förrän efter 6-8 veckor efter inledningen av behandling. Även om skillnaderna i median-OS mellan fördelaktiga (≥30% eller ≥50% PSA-minskning från baslinjen) och ofördelaktiga (<30% eller <50% PSA-minskning från baslinjen) PSA-minskningsgrupper var signifikanta föreföll separationen mellan fördelaktiga (<5 CTC) och ofördelaktiga (≥5 CTC) CTC-grupper vara större och var signifikanta vid alla tidpunkter efter inledningen av behandling.

3.4.2 Överensstämmelser mellan CTC- och PSA-ändringar hos MPC-patienter

För närvarande används vanligen en ≥30% eller ≥50% minskning av PSA för att utvärdera sjukdomsprogression hos patienter med metastatisk prostatacancer. För att bestämma förhållandet mellan CTC och ändringar av PSA sammanställdes beräkningar två och två gällande överensstämmande och icke överensstämmande observationer mellan CTC och PSA-ändringar för varje tidpunkt efter inledningen av behandling. Även om jämförelser av CTC och PSA-ändringar för båda storleksordningarna beräknades rapporteras endast data från CTC jämfört med ≥30% PSA-ändring. Beslutet bygger på en nyligen utkommen skrift (*J Nat Ca Inst.* 98 (8):p.516-521, 2006) som visar att en tremånaders 30% PSA-minskning påvisade ett starkare samband med minskning av risken för dödsfall än med en 50% minskning av PSA. Vidare påvisade inte en jämförelse mellan ett patientvist och ett observationsvist resultat från den 30% och 50% PSA-minskningen jämfört med CTC inte betydande skillnader i positiv överensstämmelse i %, negativ överensstämmelse i % och överensstämmelse i stort vid någon av de observerade tidpunkterna.

Totalt 197, 159, 146 och 138 patienter fick serumprov analyserade av centrallaboratoriet och hade utvärderbara CTC-resultat 2-5 veckor, 6-8 veckor, 9-12 veckor och 13-20 veckor efter inledningen av behandling. För att fastställa patientens respons på behandlingen beräknades den procentuella förändringen från baslinjevärdet för var och en av tidpunkterna efter inledningen av behandling. För PSA-ändringar vid varje tidpunkt definierades den fördelaktiga gruppen som patienter med en ≥30% minskning av PSA och den ofördelaktiga gruppen definierades som patienter med en <30% minskning av PSA. För CTC vid varje tidpunkt definierades den fördelaktiga gruppen som patienter med <5 CTC per 7,5 mL blod och den ofördelaktiga gruppen definierades som patienter med ≥5 CTC.

Eftersom resultaten för CTC jämfört med PSA för patientvisa jämförelser mellan CTC och en ≥30% PSA-minskning efter 2-5 veckor och 13-20 veckor efter inledningen av behandling visade den mest signifikanta bristande överensstämmelsen och överensstämmelsen, visas dessa data i **Tabell 29** och **Tabell 30**.

Tabell 29: MPC-patientvis jämförelse av CTC och 30% PSA-minskning efter 2-5 veckor

% minskning av PSA från baslinjen efter 2-5 veckor efter inledningen av behandling	CTC 2-5 veckor efter inledning av behandling		Totalt
	<5 CTC/7,5 mL	≥5 CTC/7,5 mL	
≥30% minskning i PSA	50	11	61
<30% minskning i PSA	69	67	136
Totalt	119	78	197

Mätvärde	Beräkning	Nedre 95% CI	Övre 95% CI
Positiv överensstämmelse %	49%	41%	58%
Negativ överensstämmelse %	82%	70%	91%
Positivt förutsäggande värde	86%	76%	93%
Negativt förutsäggande värde	42%	33%	51%
Överensstämmelse i stort	59%	52%	66%
Oddsförhållande	4,4	2,1	9,2

Tabell 30: MPC-patientvis jämförelse av CTC och 30% PSA-minskning efter 13-20 veckor

% minskning av PSA från baslinjen vid 13-20 veckor efter inledningen av behandling	CTC 13-20 veckor efter inledning av behandling		Totalt
	<5 CTC	≥5 CTC	
≥30% minskning i PSA	72	9	81
<30% minskning i PSA	23	34	57
Totalt	95	43	138

Mätvärde	Beräkning	Nedre 95% CI	Övre 95% CI
Positiv överensstämmelse %	60%	46%	72%
Negativ överensstämmelse %	89%	80%	95%
Positivt förutsäggande värde	79%	64%	90%
Negativt förutsäggande värde	76%	66%	84%
Överensstämmelse i stort	77%	69%	84%
Oddsförhållande	11,8	4,9	28,3

Resultatet av en observationsvis jämförelse av CTC och PSA-ändringar med en ≥30% minskningströskel efter 2-5 veckor, 6-8 veckor, 9-12 veckor och 13-20 veckor efter inledningen av behandling i kombination visas i **Tabell 31**.

Tabell 31: MPC-observationsvis jämförelse av CTC och 30% PSA-minskning

% minskning av PSA från baslinjen efter inledning av behandling	CTC efter inledning av behandling		Totalt
	<5 CTC	≥5 CTC	
≥30% minskning i PSA	243	41	284
<30% minskning i PSA	175	181	356
Totalt	418	222	640

Mätvärde	Beräkning	Nedre 95% CI	Övre 95% CI
Positiv överensstämmelse %	51%	46%	56%
Negativ överensstämmelse %	86%	81%	89%
Positivt förutsäggande värde	82%	76%	86%
Negativt förutsäggande värde	58%	53%	63%
Överensstämmelse i stort	66%	62%	70%
Oddsförhållande	6,1	4,1	9,1

Överensstämmelse i stort mellan CTC och PSA-ändringar vid de olika tidpunkterna efter inledningen av behandling varierade mellan 59% och 77% vid jämförelse med en ≥30% PSA-minskning och mellan 52% och 75% vid jämförelse med en ≥50% PSA-minskning, vilket visar att CTC och PSA-ändringar inte överensstämmer hos mellan ~25% och 40% av patienterna.

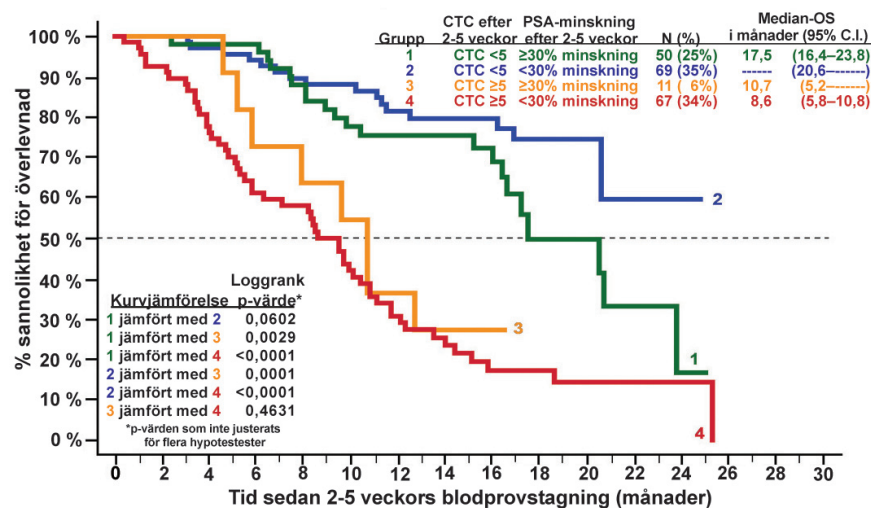
3.4.3 CTC-halter och PSA-minskning i kombination för att göra prognoser för MPC-patienter

För att fastställa vilket av de resultat som inte överensstämmer som bättre speglar patientens prognos, jämfördes CTC-utvärdering och ändringar av PSA 2-5 veckor, 6-8 veckor, 9-12 veckor och 13-20 veckor efter inledningen av behandling med OS. Förflutna OS-tider beräknades utifrån det blodprov som utvärderades. För Kaplan-Meier-analysen **Figur 31 (Panel A, B, C och D)** segmenterades patienter i fyra grupper utifrån CTC-antal och PSA-minskning efter 2-5 veckor, 6-8 veckor, 9-12 veckor och 13-20 veckor efter inledningen av behandling:

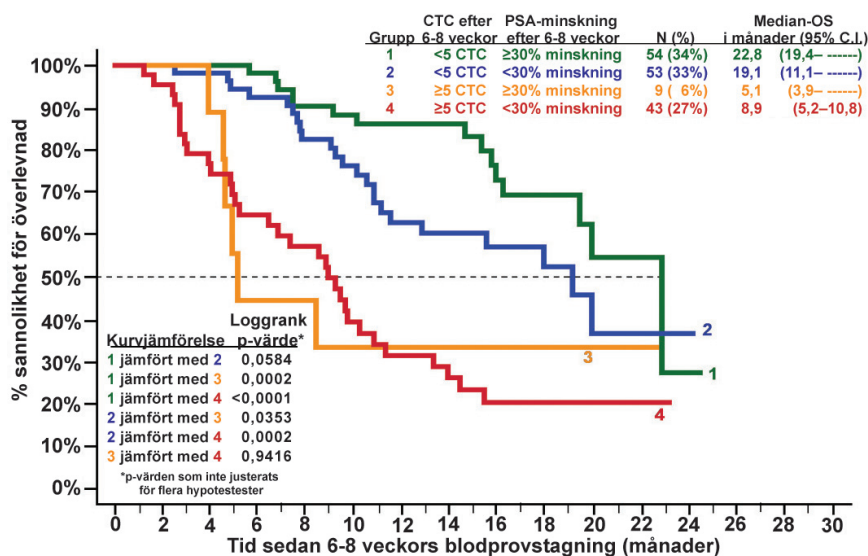
- Grupp 1 (**grön** kurva), patienter med <5 CTC vid tidpunkten för utvärdering och $\geq 30\%$ minskning av PSA från baslinjen till tiden för utvärdering.
- Grupp 2 (**blå** kurva), patienter med <5 CTC vid tiden för utvärdering och <30% minskning av PSA från baslinjen till tidpunkten för utvärdering.
- Grupp 3 (**orange** kurva), patienter med ≥ 5 CTC vid tidpunkten för utvärdering och $\geq 30\%$ minskning av PSA från baslinjen till tidpunkten för utvärdering.
- Grupp 4 (**röd** kurva), patienter med ≥ 5 CTC vid tiden för utvärdering och <30% minskning av PSA från baslinjen till tidpunkten för utvärdering.

Figur 31: CTC-nivåer och PSA-ändringar i kombination för att förutspå OS 2-5 veckor (panel A), 6-8 veckor (panel B), 9-12 veckor (panel C) och 13-20 veckor (panel D) efter inledningen av behandling

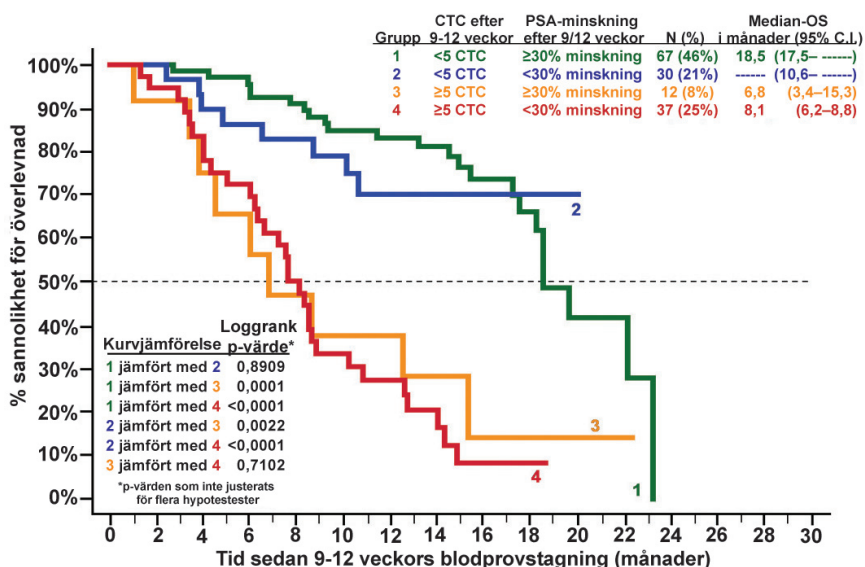
A. 2-5 veckor



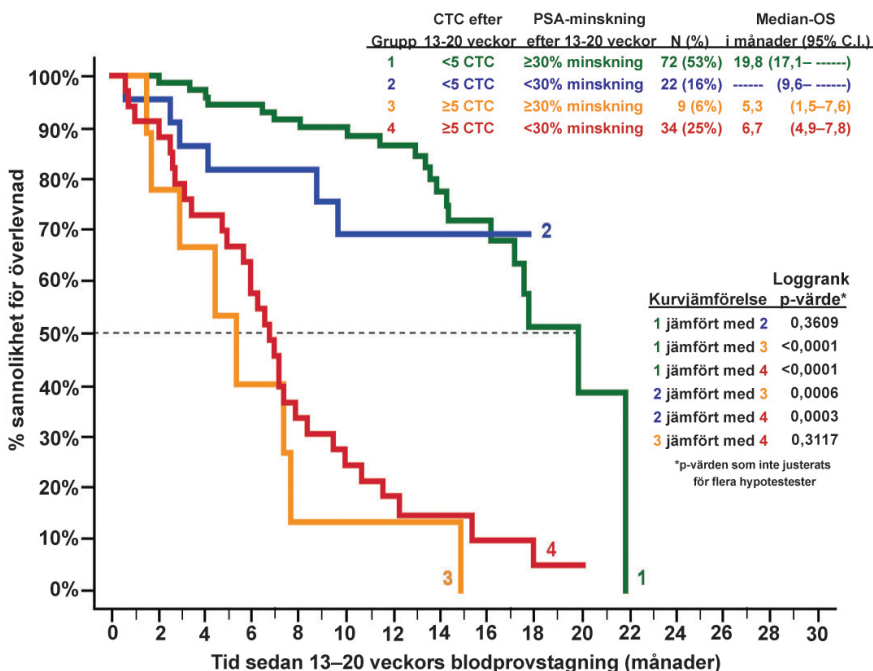
B. 6-8 veckor



C. 9-12 veckor



D. 13-20 veckor



Figur 31 visar att patienter med ≥ 5 CTC när som helst efter inledningen av behandlingen hade mycket större sannolikhet att avlida tidigare, oavsett förändringar av i PSA-nivåerna från baslinjen. Patienter med ≥ 5 CTC vid alla tidpunkter (**Grupp 3** och **Grupp 4**) hade kortast median-OS, vilken inte avvek på ett betydande sätt. Dock avvek median-OS för dessa två grupper betydligt jämfört med median-OS för patienterna med < 5 CTC vid alla tidpunkter (**Grupp 1** och **Grupp 2**). Dessa två grupper (**Grupp 1** och **Grupp 2**) hade längst median-OS, vilken inte avvek på ett betydande sätt. Det viktiga resultatet som visas i **Figur 31** är att även om en minskning av PSA vid vissa punkter efter inledningen av behandling kanske uppnår signifikans för prognos för överlevnad var fördelaktiga CTC vid alla tidpunkter mer korrekta än PSA-utvärderingen. Den praktiska innebörden är att CTC-analys kan användas för utvärdering av sannolikheten för överlevnad bland MPC-patienter. När CTC och PSA-ändring inte överensstämde gav CTC den mest noggranna utvärderingen av prognosen.



Menarini Silicon Biosystems Inc.
3401 Masons Mill Road, Suite 100
Huntingdon Valley, PA 19006
USA
documents.cellsearchctc.com
Tél. : 1-877-837-4339
00 8000 8374339

CELLSEARCH®, CELLTRACKS®, CELLTRACKS ANALYZER II® och AUTOPREP® är registrerade varumärken som tillhör Menarini Silicon Biosystems Inc. Denna teknologi, inklusive produkter och tillhörande komponenter, samt förfaringssätt och instrument som beskrivs häri, skyddas av amerikanska patent och motsvarande internationella patent samt andra sökta patent och omfattar ett eller flera av följande: Amerikanska patentnummer 6,136,182; 6,551,843; 6,623,982; 6,790,366; 7,011,794 och 7,332,288.

SYMBOLFÖRKLARINGAR

Följande symboler kan förekomma i denna bruksanvisning eller på tillhörande etiketter.



Används före
ÅÅÅÅ-MM-DD eller ÅÅÅÅ-MM



Satskod



Serienummer



Försiktighet! Läs medföljande dokument



Tillverkningsdatum



Tillverkare



Tillräckligt för < n > tester



Varning



Katalognummer



Auktoriserad representant i Europeiska
gemenskapen



Temperaturbegränsning



Biologiska risker



Läs bruksanvisningen



In vitro-diagnostisk medicinteknisk produkt

Menarini Silicon Biosystems SpA
Via Giuseppe Di Vittorio 21B/3
40013 Castel Maggiore (Bologna)
Italy



Menarini Silicon Biosystems Inc.
3401 Masons Mill Road, Suite 100
Huntingdon Valley, PA 19006
USA
documents.cellsearchctc.com
Telefon: 1-877-837-4339
00 8000 8374339 (EU)



MENARINI
silicon biosystems

