

## VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

**REF** 790-4794

06679072001

**IVD**  50

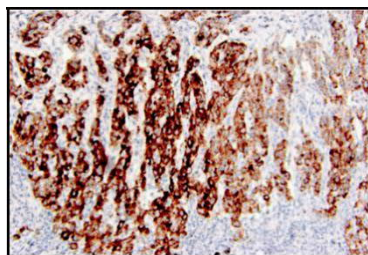


**Рисунок 1. Экспрессия метода окрашивания с использованием антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) на немелкоклеточной легочной карциноме.**

ZYKADIA® (ceritinib) или ALECENSA® (alectinib).

### ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Первичное кроличье моноклональное антитело VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody предназначено для лабораторного применения с целью обнаружения белка киназы анапластической лимфомы (ALK) в фиксированной формалином и залитой в парафин ткани non-small cell lung carcinoma (NSCLC), окрашенной при помощи аппарата BenchMark IHC/ISH. Это антитело облегчает выявление пациентов, подходящих для лечения препаратами XALKORI® (crizotinib),

настоящее время ALK считается ключевым онкогенным фактором, провоцирующим развитие немелкоклеточной карциномы легких. И хотя его главным партнером для слияния является EML4, были выявлены и другие гены-партнеры для слияния.<sup>10,11</sup> Частота перестроек гена ALK составляет 2–7 %, что в пересчете дает около 6000 ALK-положительных пациентов в год в США и 40 000 пациентов в год по всему миру.<sup>3, 4, 7</sup> Небольшие образцы ткани можно свободно использовать при проведении обычного иммуногистохимического анализа (IHC), благодаря чему патоморфолог может эффективно использовать данную методику в сочетании с антителами, выявляющими антигены, специфичные для интерпретации карциномы, при диагностике и установлении прогноза заболевания. Одним из важных маркеров немелкоклеточной карциномы легких является ALK. В образцах аденокарциномы легких наблюдалось абсолютное большинство перестроек гена ALK в сравнении с гистологическими образцами плоскоклеточной или мелкоклеточной карциномы.<sup>3–8</sup> Имеются данные о том, что перестройки гена ALK имеют тенденцию коррелировать с NSCLC у пациентов, которые никогда не курили или являются малокурящими, хотя это может и не являться статистически значимым сопутствующим фактором.<sup>3, 4, 7, 9</sup> Важно отметить, что перестройки гена ALK редко совпадают с мутациями EGFR, HER2 или KRAS, говоря о том, что ALK-положительность представляет собой особый подтип заболевания.<sup>9</sup> XALKORI® — это селективный АТФ-конкурентный низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназ ALK, ROS1 и c-Met/HGFR (рецептора фактора роста гепатоцитов) и их онкогенных вариантов (например, химерных белков ALK или ROS1, или мутантных вариантов c-Met/HGFR). Препарат XALKORI® продемонстрировал зависимость от концентрации подавление фосфорилирования ALK и c-Met в ходе клеточных методов исследования с использованием линий опухолевых клеток. Он также проявлял противоопухолевую активность у мышей с пересаженными опухолями, экспрессирующими химерные белки EML4-, или NPM-ALK, или Met.<sup>12, 13, 14</sup> ZYKADIA® — это ингибитор киназы. Мишенями для ингибирующей активности

Интерпретацию результатов должен выполнять квалифицированный патоморфолог с учетом результатов гистологического исследования и необходимых клинических данных после сравнения с соответствующими контролями.

Данные антитела предназначены для диагностики in vitro (IVD).

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

Белок киназы анапластической лимфомы (ALK) относится к суперсемейству инсулиновых рецепторов тирозинкиназного типа.<sup>1</sup> ALK представляет собой мембранный гликопротеин I типа, который обычно экспрессируется в нервной системе.<sup>2</sup> Ген ALK находится на хромосоме 2p23 и состоит из 2 крупных интронов и 26 экзонов.<sup>1</sup> Молекулярный патогенез ALK начинается с хромосомных перестроек, в ходе которых 3'-кодирующие последовательности внутриклеточного домена ALK попарно сопоставляются с 5'-промоторными элементами и кодирующими последовательностями других генов. 5'-промоторные элементы и кодирующие последовательности стимулируют избыточную экспрессию и лиганднезависимую олигомеризацию химерных белков, что является распространенным свойством протеин-тирозинкиназных новообразований химерного типа у людей.

В 2007 году в линиях клеток немелкоклеточной карциномы легких и в архивных клинических образцах была выявлена инверсия внутри 2p-хромосомы, приводящая к образованию химерного генного продукта, содержащего фрагменты гена белка, ассоциированного с микротрубочками иглокожих, тип 4 (EML4), и гена ALK.<sup>3</sup>

В последующих сериях опубликованных исследований было указано, что инверсия EML4-ALK приводит к появлению по меньшей мере 9 вариантов каталитически активных химерных белков киназы, каждый из которых содержит один и тот же участок С-концевого домена ALK.<sup>4–8</sup> Как и в случае слияний с участием гена ALK, которые впервые были выявлены в анапластической крупноклеточной лимфоме (ALCL), химерный белок EML4-ALK, как было показано, обладает трансформирующей активностью. С этим согласуются и сообщения о том, что экспрессия EML4-ALK в клетках альвеолярного эпителия легких трансгенных мышей являлась сильным онкогенным фактором.<sup>9</sup>

### КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

NSCLC является наиболее распространенным видом рака легких. Существуют три распространенных типа NSCLC, а именно: аденокарцинома, карцинома плоского эпителия и крупноклеточная карцинома.

препарата ZYKADIA®, как показали биохимические или клеточные эксперименты с использованием клинически значимых концентраций, являются ALK, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R), рецептор инсулина (InsR) и ROS1. Из них максимальную активность препарат ZYKADIA® проявляет против ALK. Препарат ZYKADIA® ингибировал аутофосфорилирование ALK, опосредованное ALK фосфорилирование следующего в цепочке сигнального белка STAT3 и рост ALK-зависимых раковых клеток в экспериментах in vitro и in vivo. Препарат ZYKADIA® ингибировал in vitro пролиферацию клеточных линий, экспрессирующих химерные белки EML4-ALK и NPM-ALK и продемонстрировал дозозависимое подавление роста трансплантированных EML4-ALK-положительных тканей HMPЛ у мышей и крыс.<sup>15</sup> Клиническая значимость перестройки гена ALK была продемонстрирована в рандомизированных, контролируемых активным препаратом клинических исследованиях препарата XALKORI®, проведенных компанией Pfizer, и препарата ZYKADIA®, проведенных компанией Novartis.<sup>14,15</sup> Препарат ALECENSA® — это высокоселективный и мощный ингибитор тирозинкиназы ALK и RET, подавляющий активность внутриклеточных сигнальных путей, участвующих в пролиферации и выживании опухолевых клеток, и, таким образом, способствующий гибели раковых клеток и угнетающий рост и пролиферацию клеток опухоли.<sup>16</sup> Согласно результатам доклинических исследований, препарат ALECENSA® не является субстратом эффлюксных переносчиков (PGP или BCRP), встроенных в гематоэнцефалический барьер, и поэтому может распределяться и удерживаться в центральной нервной системе. Препарат ALECENSA® вызывал регрессию опухоли в доклинических моделях с опухолевыми ксенотрансплантатами у мышей, включая противоопухолевую активность в головном мозге, и увеличивал выживаемость животных в моделях внутричерепных опухолей.<sup>17</sup> Препарат ALECENSA® хорошо переносился и демонстрировал контролируемый профиль безопасности.<sup>18–20</sup> Компания Ventana продемонстрировала согласованность результатов метода с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) с результатами, получаемыми при использовании набора Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (ALK FISH), при определении статуса экспрессии ALK у пациентов с немелкоклеточной карциномой легких. При оценке результатов окрашивания с использованием ALK FISH могут возникнуть технические затруднения. Внутрихромосомные перестройки могут способствовать тонкому дроблению сигнала, что приводит к потенциальным ложноотрицательным результатам.<sup>21</sup> В недавних исследованиях было показано, что метод ИГХ чувствителен и специфичен для определения статуса по ALK и является подходящей альтернативой методике ALK FISH.<sup>10,11, 21–23</sup> Компания Ventana разработала антитело VENTANA anti-ALK (D5F3) и связанный с ним алгоритм оценки для описания статуса образцов NSCLC по ALK.

Интерпретация результатов применения метода с использованием антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) для оценки образцов ткани должна проводиться с использованием рекомендуемого алгоритма оценивания. Гистологическая подготовка образцов дает преимущество в виде сохраненной морфологии тканей, что помогает интерпретировать наличие положительной по ALK реакции в образце. Интерпретацию всех гистологических анализов должен проводить патоморфолог, а результаты этой интерпретации должны дополняться данными морфологических исследований и соответствующими контролями, а также должны использоваться в комплексе с другими клиническими и лабораторными данными. Сохранность таргетных антигенов зависит от времени фиксации, типа фиксатора и срока хранения срезов микропрепаратов, поэтому следует уделять особое внимание обеспечению совместимости подготовки образцов, прежде чем приступать к их окрашиванию (см. Руководство по интерпретации результатов исследования с использованием VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody для немелкоклеточной карциномы легких (NSCLC), № по каталогу: 1011879, и раздел «Особые ограничения» ниже).

## ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody представляет собой кроличье моноклональное первичное антитело, которое связывается с ALK в залитых в парафин тканевых срезах. Специфическое антитело можно визуализировать с использованием диагностического набора OptiView DAB IHC Detection Kit (№ по каталогу: 760-700/06396500001), после чего используется набор для амплификации OptiView Amplification Kit (№ по каталогу: 760-099/06396518001 (50 тестов) или 860-099/06718663001 (250 тестов)). Дополнительная информация представлена в листках-вкладышах к наборам OptiView DAB IHC Detection Kit и OptiView Amplification Kit.

## РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

Содержащий антитело реагент VENTANA anti-ALK (D5F3) включает в себя рекомбинантное кроличье моноклональное антитело и содержит достаточное количество реагента для окрашивания 50 образцов. Один флакон-дозатор антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) объемом 5 мл содержит приблизительно 70 мкг кроличьего моноклонального антитела (D5F3). Антитело разведено в 0,08 М фосфатно-солевом буфере (PBS) с 3 % белка-носителя и 0,05 % консерванта ProClin 300. Общая концентрация белка в реагенте составляет примерно 10 мг/мл. Концентрация специфических антител составляет приблизительно 14 мкг/мл.

## НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ МАТЕРИАЛЫ

1. Человеческий аппендикс или ALK-положительные и ALK-отрицательные образцы немелкоклеточной карциномы легкого для использования в качестве контрольной ткани
2. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (№ по каталогу: 790-4795/06683380001)
3. Предметные стекла для микроскопа (с положительным зарядом)
4. Сушилка, способная поддерживать температуру 60 °C ± 5 °C.
5. Эtiquетки со штрих-кодом
6. Ксилол (гистологической степени очистки)
7. Этанол или спиртосодержащий реагент (гистологической степени очистки)
  - 100 %-й раствор: неразбавленный этанол или спиртосодержащий реагент.
  - 95 %-й раствор: смешать 95 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 5 частями деионизированной воды.
  - 80 %-й раствор: смешать 80 частей этанола или спиртосодержащего реагента с 20 частями деионизированной воды.
8. Деионизированная или дистиллированная вода
9. OptiView DAB IHC Detection Kit (№ по каталогу: 760-700/06396500001)
10. OptiView Amplification Kit (№ по каталогу: № 760-099 / 06396518001 (на 50 тестов) или 860-099 / 06718663001 (на 250 тестов))
11. EZ Prep Concentrate (10X) (№ по каталогу: 950-102/05279771001)
12. Reaction Buffer Concentrate (10X) (№ по каталогу: 950-300/05353955001)
13. LCS (Predilute) (№ по каталогу: 650-010/05264839001)
14. ULTRA LCS (Predilute) (№ по каталогу: 650-210/05424534001)
15. Cell Conditioning 1 (CC1) (№ по каталогу: 950-124/05279801001)

16. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (№ по каталогу: 950-224/05424569001)
17. Hematoxylin II (№ по каталогу: 790-2208/05277965001)
18. Bluing Reagent (№ по каталогу: 760-2037/05266769001)
19. Перманентная заключающая среда (PermOUNT Fisher, № по каталогу: SP15-500; или эквивалентная)
20. Покровное стекло (достаточное для помещения образцов ткани под стекло, такое как VWR; № по каталогу: 48393-060)
21. Автоматическое устройство для заклеивания препаратов покровными стеклами (такое как Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper)
22. Световой микроскоп
23. Гигроскопические салфетки

В комплект поставки не входят окрашивающие реагенты, такие как наборы для обнаружения VENTANA и вспомогательные компоненты, включая микропрепараты ткани для отрицательного и положительного контроля.

Продукты, перечисленные в листке-вкладыше, могут быть недоступны в некоторых странах. Проконсультируйтесь с местным представителем службы поддержки.

## ХРАНЕНИЕ

После получения препарата и пока он не используется, его следует хранить при температуре 2–8 °C. Не замораживать.

Для обеспечения надлежащей сохранности реагента и стабильности антител после каждого использования необходимо надевать на место крышку флакона-дозатора и сразу ставить его в холодильник в вертикальном положении.

На каждом флаконе-дозаторе с раствором антител указан срок годности. При соблюдении условий хранения реагент остается стабильным до даты, указанной на этикетке. Не использовать реагент после истечения срока годности.

## ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

При использовании наборов для обнаружения VENTANA и инструментов BenchMark IHC/ISH данное первичное антитело можно использовать со стандартно обработанными, фиксированными формалином и залитыми в парафин тканями. Основываясь на данных из модели ксенотрансплантата, полученной при помощи клеточной линии NCI-H2228 NSCLC человека, положительной по ALK, компания Ventana рекомендует выполнять фиксацию тканей в 10 % нейтральном забуференном формалине (NBF) в течение не менее 6 часов.<sup>24</sup> Время фиксации менее 6 часов значительно снижает интенсивность окрашивания, вызываемого ALK. Фиксатор цинк-формалин также допустимо использовать в течение времени фиксации не менее 6 часов. Используемое количество фиксатора должно составлять от 15 до 20 объемов ткани. За 24 часа фиксатор проникает в плотную ткань не более чем на 2–3 мм, а в пористую ткань — не более чем на 5 мм. Фиксирование следует проводить при комнатной температуре (15–25 °C).<sup>25</sup> Для таких фиксаторов, как спиртовой раствор формалина и уксусной кислоты (AFA), PREFER, B5 и других фиксаторов на основе кислоты и (или) спирта) было показано, что обработанные ими образцы (при всех испытанных значениях времени фиксации от 1 до 72 часов) теряют интенсивность окрашивания, вызываемого ALK. Использование их в данном методе не рекомендуется. В исследованиях с задержкой времени фиксации также была показана потеря интенсивности окрашивания на ALK, когда образцы ксенотрансплантатов не фиксировали в пределах 6 часов с момента их иссечения. Дополнительное обсуждение темы влияния подготовки образца на интенсивность окрашивания, вызываемого ALK, представлено в Руководстве по интерпретации результатов исследования VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody для немелкоклеточной карциномы легких (NSCLC), № по каталогу: 1011879.

Необходимо получить срезы толщиной приблизительно 4 мкм и нанести их на положительно заряженные предметные стекла. Микропрепараты следует немедленно окрасить, так как антигенность срезов ткани со временем может уменьшаться и ухудшаться в течение 3 месяцев после их получения путем приготовления срезов из парафинового блока (см. Руководство по интерпретации результатов исследования с использованием антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody для немелкоклеточной карциномы легких (NSCLC), № по каталогу 1011879, и раздел «Рабочие характеристики» ниже).

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики in vitro (IVD).
2. Только для профессионального использования.

- Обращаем ваше внимание на то, что обладающие положительным электрическим зарядом предметные стекла могут быть подвержены неблагоприятным воздействиям со стороны окружающей среды, вследствие чего окрашивание любыми иммуногистохимическими методами приведет к неудовлетворительным результатам, например вследствие недостаточного количества первичного антитела или контрастного красителя в тканях. Для лучшего понимания того, каким образом неблагоприятные факторы окружающей среды могут воздействовать на положительно заряженные предметные стекла для ИГХ, обратитесь к техническому документу N4629\_0313B «Воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды на различные типы предметных стекол для гистологических анализов».
- В данном реагенте в качестве консерванта используется раствор ProClin 300. Он относится к раздражающим средствам и при контакте с кожей может стать причиной сенсибилизации. При работе с реагентом соблюдайте меры предосторожности. Избегайте попадания реагентов в глаза, на кожу и слизистые оболочки. Используйте защитную одежду и перчатки.
- Материалы человеческого или животного происхождения следует считать биологически опасными материалами и утилизировать, соблюдая все необходимые меры предосторожности.
- Избегайте контакта реагентов с глазами и слизистыми оболочками. При попадании реагентов на чувствительные участки промойте пораженные участки достаточным количеством воды.
- Не допускайте микробного загрязнения реагентов, поскольку это может привести к получению неверных результатов.
- Проконсультируйтесь с местными и/или государственными органами в отношении рекомендованного способа утилизации.
- Дополнительная информация о безопасности содержится в паспорте безопасности продукта и руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте [www.ventana.com](http://www.ventana.com).

## ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Антитело VENTANA anti-ALK (D5F3) разработано для использования с приборами BenchMark IHC/ISH в комбинации с Rabbit Monoclonal Negative Control Ig, OptiView DAB IHC Detection Kit, OptiView Amplification Kit и вспомогательными реагентами. Рекомендованные протоколы окрашивания для каждого из приборов приведены в Таблицах 1, 2 и 3.

Данное антитело оптимизировано для инкубации в течение конкретных периодов времени, однако пользователю необходимо провести валидацию результатов, полученных с использованием данного реагента. Отклонение от протокола окрашивания, указанного в Таблицах 1, 2 или 3, может привести к получению ложноположительных или ложноотрицательных результатов. Для аппарата BenchMark ULTRA разработана процедура специфического окрашивания на ALK, U VENTANA ALK (D5F3). Перед тем как выбирать условия протокола из процедуры специфического окрашивания на ALK, на аппарате BenchMark ULTRA следует установить программное обеспечение VSS 12.3 с версией процедуры окрашивания OptiView v5 или более поздней. Параметры автоматизированных процедур можно отобразить на дисплее, распечатать и отредактировать в соответствии с процедурой, представленной в руководстве по эксплуатации аппарата. Подробная информация по процедурам иммуногистохимического окрашивания представлена в листке-вкладыше к набору для обнаружения VENTANA.

**Таблица 1.** Рекомендованный протокол окрашивания для исследования с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) и Rabbit Monoclonal Negative Control Ig с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit и OptiView Amplification Kit в аппарате BenchMark ULTRA.

| Процедура окрашивания: U VENTANA ALK(D5F3) |                                                                                                           |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Этап протокола                             | Ввод параметров                                                                                           |
| Антитела (первичные)                       | AT VENTANA ALK – 16 мин<br>(затем выберите США или Европа/другие страны)<br>или<br>отрицательный контроль |
| Контрастное окрашивание                    | Hematoxylin II, 4 минуты                                                                                  |
| Обработка после контрокрашивания           | Bluing, 4 минуты                                                                                          |

**Таблица 2.** Рекомендованный протокол окрашивания для исследования с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) и Rabbit Monoclonal Negative Control Ig с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit и OptiView Amplification Kit в аппарате BenchMark XT.

| Тип процедуры                                               | Метод                                                     |
|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Синхронизация процедуры ИHC                                 | Выбрано *                                                 |
| Депарафинирование                                           | Выбрано                                                   |
| Кондиционирование клеток (демаскировка антигена)            | Cell Conditioning 1, 92 минуты, 100 °C                    |
| Предварительная обработка реагентом ингибитором пероксидазы | Выбрано                                                   |
| Антитела (первичные)                                        | Ventana anti-ALK (D5F3) или Rabbit Mono Neg 16 мин, 37 °C |
| OptiView HQ Univ Linker                                     | 12 минут                                                  |
| OptiView HRP Multimer                                       | 12 минут                                                  |
| Амплификация OptiView                                       | Выбрано                                                   |
| OV AMP H2O2, OV Amplifier                                   | 8 минут                                                   |
| OV AMP Multimer                                             | 8 минут                                                   |
| Контрастное окрашивание                                     | Hematoxylin II, 4 минуты                                  |
| Обработка после контрокрашивания                            | Bluing, 4 минуты                                          |

\* Данный выбираемый пользователем этап применяется только в случае использования XT OptiView DAB версии 4. Он недоступен при использовании более ранних версий программного обеспечения.

**Таблица 3.** Рекомендованный протокол окрашивания для исследования с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) и Rabbit Monoclonal Negative Control Ig с использованием OptiView DAB IHC Detection Kit и OptiView Amplification Kit в аппарате BenchMark GX.

| Тип процедуры                                               | Метод                                                     |
|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Депарафинирование                                           | Выбрано                                                   |
| Кондиционирование клеток (демаскировка антигена)            | Cell Conditioning 1, 92 минуты, 100 °C                    |
| Предварительная обработка реагентом ингибитором пероксидазы | Выбрано                                                   |
| Антитела (первичные)                                        | Ventana anti-ALK (D5F3) или Rabbit Mono Neg 16 мин, 37 °C |
| OptiView HQ Univ Linker                                     | 12 минут                                                  |
| OptiView HRP Multimer                                       | 12 минут                                                  |
| Амплификация OptiView                                       | Выбрано                                                   |
| OV AMP H2O2, OV Amplifier                                   | 8 минут                                                   |
| OV AMP Multimer                                             | 8 минут                                                   |
| Контрастное окрашивание                                     | Hematoxylin II, 4 минуты                                  |
| Обработка после контрокрашивания                            | Bluing, 4 минуты                                          |

В связи с различиями в фиксации и обработке ткани, а также в лабораторном оборудовании общего назначения и условиях окружающей среды может потребоваться увеличить или уменьшить время инкубации первичного антитела, кондиционирования клеток или предварительной обработки протеазой в зависимости от конкретных образцов, методов обнаружения, а также от предпочтений экспертов. Дополнительная информация о факторах, влияющих на фиксацию, содержится в источнике Immunohistochemistry Principles and Advances.<sup>26</sup>

## КОНТРОЛИ

### ПРОЦЕДУРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА Rabbit Monoclonal Negative Control Ig

Для облегчения интерпретации результатов необходимо использовать соответствующий микропрепарат для реагента для отрицательного контроля с каждым образцом. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (№ по каталогу: 790–4795/06683380001), антитело для отрицательного контроля реагента, специально подобрано для данного исследования и используется вместо первичного антитела для оценки неспецифического окрашивания. Протокол окрашивания реагента для отрицательного контроля должен соответствовать периоду инкубации с первичным антителом. Использование другого реагента для отрицательного контроля или неиспользование рекомендованного реагента отрицательного контроля может привести к получению неверных результатов.

### Контроли системного уровня

С образцами пациентов необходимо использовать контроли системного уровня. Это могут быть препараты человеческого аппендикса 26 или известные образцы ткани немелкоклеточной карциномы легких, как положительные, так и отрицательные по ALK. В качестве контрольной ткани следует использовать образцы, полученные в ходе вскрытия, биопсии или хирургических операций, подготовленные и зафиксированные как можно скорее по точно такой же процедуре, что используется для исследуемых образцов. С помощью такой ткани можно контролировать все этапы анализа, начиная от подготовки ткани и заканчивая окрашиванием. Использование среза ткани, зафиксированного или обработанного по процедуре, отличной от процедуры для исследуемого образца, позволяет контролировать качество всех реагентов и этапов анализа, за исключением фиксации и подготовки ткани.

### Аппендикс или контрольные образцы

#### положительных/отрицательных по ALK тканей NSCLC

При выполнении каждой процедуры окрашивания с антителом VENTANA anti-ALK (D5F3) нужно использовать ALK-положительные и ALK-отрицательные контрольные ткани. Образцы NSCLC с окрашиванием, которые показали клинически положительный результат по ALK, а также образцы с клинически отрицательным результатом по ALK пригодны для оптимального контроля качества, включая случаи незначительной деградации реагента или случаи, которые могут быть связаны с тем, что состояние аппаратов выходит за пределы их технических характеристик.

Ткани человеческого аппендикса содержат элементы с положительным и отрицательным окрашиванием по ALK, поэтому они подходят для использования в качестве контроля системного уровня. Положительно окрашиваемые компоненты ткани служат подтверждением того, что антитела нанесены и что аппарат работает надлежащим образом; образцы с отрицательным результатом окрашивания используются для выявления случаев незначительной деградации реагента или случаев, которые могут быть связаны с тем, что состояние аппаратов выходит за пределы их технических характеристик.

Варианты окрашивания ALK-положительных и отрицательных образцов NSCLC и компонентов ткани аппендикса описаны в Таблицах 4 и 5, а также в Руководстве по интерпретации результатов исследования VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody для немелкоклеточной карциномы легких (NSCLC), № по каталогу: 1011879.

Для фиксации и обработки подтвержденных положительных и подтвержденных отрицательных контрольных образцов тканей, используемых для мониторинга производительности анализа на ALK, нужно использовать те же алгоритмы, что и для образца пациента. В противном случае контрольные образцы тканей можно использовать только для мониторинга правильной работы тестовых реагентов. Контрольные образцы тканей нельзя использовать для облегчения диагностики по образцам пациента.

### Верификация анализа

Прежде чем использовать первичное антитело или систему окрашивания в диагностических целях, необходимо удостовериться в специфичности данного первичного антитела, окрасив серию тканей с известными иммуногистохимическими характеристиками. В серию должны входить ткани с положительным и отрицательным окрашиванием по ALK (более подробная информация содержится в разделе «Процедуры контроля качества», приведенном ранее в данном вкладыше, а также в «Рекомендациях по контролю качества» источников College of

American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist<sup>27</sup> или CLSI Approved Guideline<sup>28</sup>). Эти процедуры контроля качества необходимо повторять для каждой новой партии антител или при каждом изменении параметров анализа. Для верификации анализа можно использовать ткани немелкоклеточной карциномы легких с известной экспрессией ALK или образцы тканей человеческого аппендикса.

### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При проведении автоматизированной процедуры иммунного окрашивания VENTANA наблюдается выпадение коричневого осадка продукта реакции (DAB) в местах локализации антигена, обнаруженного антителом VENTANA anti-ALK (D5F3). Перед интерпретацией результатов квалифицированный патоморфолог, имеющий опыт проведения иммуногистохимических процедур, должен выполнить оценку контролей системного уровня, реагентов для отрицательного контроля и окрашенного продукта.

#### Положительные/отрицательные тканевые контроли на системном уровне

Следует провести исследование положительных и отрицательных окрашенных тканевых контролей, чтобы убедиться в соответствующем действии всех реагентов. Свидетельством положительного ответа является наличие должным образом окрашенного продукта реакции в цитоплазме клеток-мишеней ткани положительного контроля.

Если в тканях положительного или отрицательного контроля не наблюдается надлежащего окрашивания или наблюдается изменение клинической диагностической интерпретации, любые результаты по исследуемым образцам следует считать недостоверными.

Таблица 4. Критерии оценки контрольной ткани аппендикса.

Репрезентативные изображения приведены в Руководстве по интерпретации результатов исследования VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody для немелкоклеточной карциномы легких (NSCLC), № по каталогу: 1011879.

| Приемлемое                                                                                                                                                                                                                                                 | Недопустимый результат                                                                                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Наличие сильного гранулярного цитоплазматического окрашивания в ганглионарных клетках. (См. примечание.)                                                                                                                                                   | Отсутствие сильного гранулярного цитоплазматического окрашивания в ганглионарных клетках.                                               |
| Отсутствие сильного гранулярного цитоплазматического окрашивания в glandулярных эпителиальных клетках, мышечной и лимфоидной ткани (в лимфоидных скоплениях может обнаруживаться незначительное окрашивание лимфорециркулярных клеток или его отсутствие). | Избыточное неспецифическое фоновое окрашивание glandулярных эпителиальных клеток, мышечной или лимфоидной ткани, препятствующее оценке. |

Примечание. Нервная ткань в мышечных слоях аппендикса показала положительное окрашивание.

### Реагент для отрицательного контроля

Неспецифическое окрашивание (при наличии) будет иметь диффузный характер и может быть оценено с использованием микропрепарата реагента для отрицательного контроля, окрашенного реагентом Rabbit Monoclonal Negative Control Ig. Для интерпретации результатов окрашивания следует использовать интактные клетки, так как некротические и дегенеративные клетки часто окрашиваются неспецифично. Если наблюдается чрезмерное фоновое окрашивание, результаты для исследуемого образца считаются недостоверными. Примеры приемлемого уровня фонового окрашивания для данного метода анализа можно найти в руководстве VENTANA ALK Scoring Interpretation Guide for non-small cell lung carcinoma (Руководство по оценке окрашивания VENTANA ALK для немелкоклеточной легочной карциномы), № по каталогу: 1011879.

### Ткань пациента

Ткань пациента должна оцениваться в соответствии с алгоритмом оценки VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay, представленного в Таблице 5. См. Руководство по оценке результатов исследования VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody для немелкоклеточного рака легких (HMP), № по каталогу: 1011879.

**Таблица 5.** Алгоритм оценки результатов исследования VENTANA anti-ALK (D5F3). Репрезентативные изображения приведены в Руководстве по оценке результатов исследования VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody для немелкоклеточной карциномы легких (NSCLC), № по каталогу: 1011879.

| Клиническая интерпретация | Описание окрашивания                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Положительно по ALK       | Наличие сильного гранулярного цитоплазматического окрашивания в клетках опухоли (любой процент положительных опухолевых клеток). Некоторые элементы окрашивания следует исключить, в том числе: <ul style="list-style-type: none"> <li>• легкую зернистость цитоплазмы в альвеолярных макрофагах;</li> <li>• клетки невральное происхождения (нервные и ганглионарные клетки);</li> <li>• окрашивание железистого эпителия;</li> <li>• отдельные лимфорегикулярные клетки внутри лимфоцитарных инфильтратов.</li> </ul> Некоторое фоновое окрашивание также может наблюдаться в пределах нормальной слизистой оболочки при немелкоклеточной карциноме легких (включая муцин) и в областях некроза опухоли. Эти случаи следует исключить из клинической оценки. |
| Отрицательно по ALK       | Отсутствие сильного гранулярного цитоплазматического окрашивания в клетках опухоли.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

#### ОБЩИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Иммуногистохимический анализ — это многоступенчатый диагностический процесс, который требует специальной подготовки при выборе надлежащих реагентов и тканей, фиксации, обработке и подготовке иммуногистохимического микропрепарата, а также интерпретации результатов окрашивания.
2. На результаты окрашивания ткани влияет обращение с тканью и обработка ее перед окрашиванием. Ненадлежащая фиксация, замораживание, оттаивание, промывка, просушка, нагрев, неправильное приготовление срезов или загрязнение другими тканями или жидкостями могут привести к появлению артефактов, захвату антитела или получению ложноотрицательных результатов. Противоречивые результаты могут быть следствием различий методов фиксации и заливки или внутренней неоднородности ткани.
3. Избыточное или неполное контрастное окрашивание может негативно повлиять на правильность интерпретации результатов.
4. Клиническая интерпретация положительного окрашивания либо его отсутствия должна проводиться с учетом истории болезни, морфологических данных и других гистопатологических критериев. Клиническая интерпретация окрашивания либо его отсутствия должна также дополняться морфологическими исследованиями, контролями системного уровня и результатами других диагностических тестов. Квалифицированный патоморфолог обязан знать характеристики используемых антител, реагентов и способов интерпретации окрашенного препарата. Окрашивание должно проводиться в сертифицированной и лицензированной лаборатории под контролем патоморфолога, который несет ответственность за просмотр окрашенных препаратов и обеспечение достоверности положительных и отрицательных контролей.
5. Антитела и реагенты компании Ventana Medical Systems, Inc. в комплекте поставки имеют оптимальную концентрацию для применения в соответствии с прилагаемой инструкцией. Любое отклонение от рекомендованных процедур проведения теста может привести к тому, что ожидаемые результаты будут недействительными. Необходимо использовать и документировать надлежащие контроли. Пользователи, которые отклоняются от рекомендованных процедур проведения теста, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.
6. Данный продукт не предназначен для использования в проточной цитометрии. Проверка его характеристик не проводилась.

7. При использовании реагентов с тканями, которые ранее не тестировались, могут возникать непредвиденные реакции. Возможность протекания непредвиденных реакций даже в исследованных группах тканей нельзя полностью исключить ввиду биологической вариабельности экспрессии антигенов в неоплазмах или других патологических тканях.<sup>29</sup>
8. Образцы тканей лиц, инфицированных вирусом гепатита В и содержащих поверхностный антиген (HBsAg) гепатита В, могут проявлять неспецифическое окрашивание пероксидазой хрена.<sup>30</sup>
9. Ложноположительные результаты могут возникать вследствие неиммунного связывания белков или продуктов реакции в субстрате. Их также может вызвать псевдопероксидазная активность (эритроциты), активность эндогенной пероксидазы (цитохром С) или влияние эндогенного биотина (например, для печени, головного мозга, молочной железы, почек), в зависимости от разновидности иммунного окрашивания.<sup>31</sup>
10. Как и в случае любого исследования методом ИHC, отрицательный результат означает, что антиген не обнаружен, а не то, что антиген отсутствует в исследуемых клетках или тканях.

#### ОСОБЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Антитело VENTANA anti-ALK (D5F3) оптимизировано для использования с приборами BenchMark IHC/ISH в комбинации с OptiView DAB IHC Detection Kit и 16-минутным временем инкубации первичного антитела, если в протоколе выбран вариант OptiView Amplification.
2. Препарат ткани пациента необходимо окрашивать с помощью реагента Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (№ по каталогу: 790-4795/06683380001). Другие реагенты для отрицательного контроля непригодны для использования в данном исследовании.
3. Данное исследование не было валидировано для использования с цитологическими мазками или декальцифицированными образцами.
4. Ткань пациента должна быть окрашена в течение 3 месяцев с момента получения среза из блока тканей. У срезов, хранившихся при комнатной температуре более 3 месяцев, отмечена потеря интенсивности окрашивания методом VENTANA anti-ALK (D5F3).
5. Компания Ventana рекомендует фиксировать образцы в течение по меньшей мере 6 часов в 10 %-м растворе нейтрального забуференного формалина или цинк-формалине. Время фиксации и типы фиксаторов, отличные от рекомендованных, могут привести к ложноотрицательным результатам. Такие фиксаторы, как AFA, PREFER, B5 и другие фиксаторы на спиртовой и (или) кислотной основе, продемонстрировали, что в них происходит потеря специфического окрашивания белка ALK. Дополнительно об этом см. Руководство по интерпретации анализа VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody для немелкоклеточной карциномы легких (NSCLC), № по каталогу: 1011879.
6. При использовании антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) отмечены некоторые дефекты окрашивания. Легкая цитоплазматическая зернистость в альвеолярных макрофагах может присутствовать как на микропрепаратах, обработанных anti-ALK, так и на окрашенных микропрепаратах реагентов для отрицательного контроля, что означает наличие артефактов, создаваемых системой детекции, и не должно оцениваться как положительное в отношении anti-ALK окрашивание. Кроме того, в некротических участках опухоли наблюдалось точечное окрашивание — его также не следует учитывать при оценке образца пациента. При использовании антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) также наблюдается окрашивание нервной ткани, включая нервы, а также иногда — окрашивание лимфорегикулярных клеток с лимфоцитарными инфильтратами. Дополнительно об этом см. Руководство по оценке результатов исследования VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody для немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), № по каталогу: 1011879.
7. Из-за применения OptiView Amplification Kit на тканевых контролях можно наблюдать легкую вариативность в общей интенсивности окрашивания. Примеры приемлемого окрашивания см. в Руководстве по оценке.

## ПРОБЛЕМЫ И ИХ УСТРАНЕНИЕ

Если в тканевых контролях системного уровня неметастатической карциномы легких человека или аппендикса человека или же в образцах пациента наблюдается ненадлежащее окрашивание, нужно убедиться в том, что техобслуживание аппарата BenchMark ULTRA, BenchMark XT или BenchMark GX выполняется с соблюдением соответствующих инструкций. Если никаких технических проблем или отклонений не обнаружено, перед повторным запуском свяжитесь с местным представителем службы поддержки.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для исследования с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) путем окрашивания многочисленных нормальных и опухолевых тканей человеческого тела были определены аналитическая специфичность и чувствительность метода. Результаты приведены в Таблицах 6 и 7.

### Специфичность

Таблица 6. Специфичность и чувствительность исследования с использованием антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) в нормальных тканях. Исследование с использованием нормальных тканей, фиксированных формалином и залитых в парафин.

| Ткань                 | Кол-во положительных результатов/общее число случаев | Ткань                           | Кол-во положительных результатов/общее число случаев |
|-----------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------|
| Головной мозг         | 0/3 *                                                | Тимус                           | 0/3                                                  |
| Мозжечок              | 0/3                                                  | Миелоидная ткань (костный мозг) | 0/3                                                  |
| Надпочечник           | 0/3                                                  | Легкое                          | 0/3                                                  |
| Яичник                | 0/3                                                  | Сердце                          | 0/3                                                  |
| Поджелудочная железа  | 0/3                                                  | Пищевод                         | 0/3                                                  |
| Паращитовидная железа | 0/3                                                  | Желудок                         | 0/3                                                  |
| Гипофиз               | 0/3**                                                | Тонкий кишечник                 | 0/3***                                               |
| Яичко                 | 0/3                                                  | Толстый кишечник                | 0/3***                                               |
| Щитовидная железа     | 0/3                                                  | Печень                          | 0/3                                                  |
| Молочная железа       | 0/3                                                  | Слюнная железа                  | 0/3                                                  |
| Селезенка             | 0/3                                                  | Почка                           | 0/3                                                  |
| Миндалины             | 0/3                                                  | Простата                        | 0/3                                                  |
| Эндометрий            | 0/3                                                  | Шейка матки                     | 0/3                                                  |
| Скелетная мышца       | 0/4                                                  | Кожа                            | 0/3                                                  |
| Нерв (тонкий)         | 0/3                                                  | Мезотелий и легкое              | 0/3                                                  |

\*-2/3 Малое количество глиальных клеток в головном мозге демонстрировало слабо или умеренно положительный результат.

\*\* 3/3 Гипофиз имел слабое окрашивание.

\*\*\* Ганглионарные клетки в 4 из 6 образцов ткани кишечника имели положительное окрашивание на ALK разной степени интенсивности.

## Чувствительность

Таблица 7. Специфичность и чувствительность исследования с использованием антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) в неопластических тканях. Исследование с использованием неопластических тканей, фиксированных формалином и залитых в парафин.

| Патология                                             | Кол-во положительных результатов/общее число случаев |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Глиобластома                                          | 0/1                                                  |
| Атипичная менингиома                                  | 0/1                                                  |
| Злокачественная эпендимома                            | 0/1                                                  |
| Злокачественная олигодендроглиома                     | 0/1                                                  |
| Серозная аденокарцинома яичника                       | 1/1                                                  |
| Аденокарцинома яичника                                | 0/1                                                  |
| Карцинома островковых клеток                          | 0/1                                                  |
| Аденокарцинома поджелудочной железы                   | 0/1                                                  |
| Семинома                                              | 0/1                                                  |
| Эмбриональная карцинома                               | 0/1                                                  |
| Медуллярная карцинома                                 | 0/1                                                  |
| Папиллярная карцинома                                 | 0/1                                                  |
| Внутрипротоковая карцинома молочной железы            | 0/1                                                  |
| Инвазивная протоковая карцинома молочной железы       | 0/2                                                  |
| Диффузная В-клеточная лимфома                         | 0/3                                                  |
| Недифференцированная мелкоклеточная карцинома легкого | 0/1                                                  |
| Плоскоклеточная карцинома легкого                     | 0/1                                                  |
| Аденокарцинома легкого                                | 0/1                                                  |
| Плоскоклеточная карцинома пищевода                    | 0/1                                                  |
| Аденокарцинома пищевода                               | 0/1                                                  |
| Муцинозная аденокарцинома желудка                     | 0/1                                                  |
| Гастроинтестинальная аденокарцинома                   | 0/1                                                  |
| Злокачественная интерстициома                         | 0/1                                                  |
| Ректальная аденокарцинома                             | 0/1                                                  |
| Злокачественная ректальная интерстициома              | 0/1                                                  |
| Гепатоцеллюлярная карцинома                           | 0/1                                                  |
| Гепатобластома                                        | 1/1                                                  |
| Светлоклеточная карцинома почки                       | 0/1                                                  |
| Аденокарцинома простаты                               | 0/2                                                  |
| Лейомиома                                             | 0/1                                                  |
| Аденокарцинома эндометрия                             | 0/1                                                  |
| Светлоклеточная карцинома эндометрия                  | 0/1                                                  |

| Патология                                           | Кол-во положительных результатов/общее число случаев |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Плоскоклеточная карцинома матки                     | 0/2                                                  |
| Эмбриональная рабдомиосаркома                       | 0/1                                                  |
| Злокачественная меланома заднего прохода            | 0/1                                                  |
| Базальноклеточная карцинома                         | 0/1                                                  |
| Плоскоклеточная карцинома                           | 0/1                                                  |
| Нейрофиброма                                        | 0/1                                                  |
| Ретроперитонеальная нейробластома                   | 1/1                                                  |
| Злокачественная мезотелиома                         | 0/1                                                  |
| Лимфома Ходжкина                                    | 0/1                                                  |
| Анапластическая крупноклеточная лимфома             | 0/1                                                  |
| Переходно-клеточная карцинома мочевого пузыря       | 0/1                                                  |
| Лейомиосаркома низкой степени дифференциации        | 0/1                                                  |
| Остеосаркома                                        | 0/1                                                  |
| Веретенноклеточная рабдомиосаркома                  | 0/1                                                  |
| Лейомиосаркома промежуточной степени дифференциации | 0/1                                                  |

#### Согласованность платформ (связующее исследование)

Антитело VENTANA anti-ALK (D5F3) было выпущено для использования с аппаратами BenchMark XT и GX. Для того чтобы продемонстрировать эквивалентные рабочие характеристики данного антитела при использовании аппаратных платформ BenchMark ULTRA и BenchMark XT, было проведено связующее исследование. В рамках данного исследования проводилось сравнение статуса клинической экспрессии ALK (на основе алгоритма оценки экспрессии ALK, приведенного в табл. 5) в 184 уникальных образцах NSCLC, окрашенных при помощи антитела VENTANA anti-ALK (D5F3), между двумя данными платформами. Полученные в результате окрашивания микропрепараты проходили процедуру маскирования и рандомизации, после чего оценивались тремя патоморфологами. Результаты данного исследования согласованности платформ приведены в Таблицах 8 и 9.

**Таблица 8.** Согласованность результатов, полученных при помощи приборов BenchMark XT и BenchMark ULTRA.

| Согласованность между платформами BenchMark ULTRA и BenchMark XT для метода анализа VENTANA anti-ALK (D5F3) |              |              |       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------|-------|
| BenchMark                                                                                                   | BenchMark XT |              |       |
| ULTRA                                                                                                       | Положительно | Отрицательно | Всего |
| Положительно                                                                                                | 85           | 1            | 86    |
| Отрицательно                                                                                                | 1            | 97           | 98    |
| Всего                                                                                                       | 86           | 98           | 184   |

**Таблица 9.** Согласованность данных относительно статуса экспрессии ALK между аппаратными платформами BenchMark XT и BenchMark ULTRA.

| Уровень согласованности между платформами                                                      | Процент совпадения положительных результатов (95 % ДИ) | Процент совпадения отрицательных результатов (95 % ДИ) | Общий процент совпадения (95 % ДИ) |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Согласованность получаемых данных между аппаратными платформами BenchMark XT и BenchMark ULTRA | 98,8 %<br>(93,7–99,8 %)                                | 99,0 %<br>(94,4–99,8 %)                                | 98,9 %<br>(96,1–99,7 %)            |

#### Толщина тканевых срезов

Толщина ткани была оценена с помощью 4 уникальных образцов NSCLC человека (3 образца, положительных по ALK, и 1 образец, отрицательный по ALK), а также 4 уникальных образцов человеческого аппендикса. Ткани были подготовлены в виде срезов и протестированы двукратно; срезы имели толщину 3, 4, 5, 6 и 7 микрон. При использовании антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) ткани любой толщины продемонстрировали надлежащее специфическое окрашивание в присутствии ALK и соответствующие уровни фоновое окрашивания. В рамках диапазона исследованной толщины изменения статуса экспрессии ALK в срезах отмечено не было. Компания Ventana рекомендует использовать для анализа образцы толщиной 4–6 микрон.

#### Исследования повторяемости и внутрилабораторной прецизионности

Повторяемость и внутрилабораторная прецизионность окрашивания VENTANA anti-ALK (D5F3) оценивалась с использованием аппаратов для окрашивания микропрепаратов BenchMark ULTRA, XT и GX в сочетании с наборами OptiView DAB Detection и OptiView Amplification kits.

Была проведена оценка десяти уникальных образцов ткани NSCLC (5 ALK-положительных и 5 ALK-отрицательных) на аппаратах BenchMark XT и BenchMark ULTRA. Для определения внутрисуточной прецизионности по 5 микропрепаратов из каждого образца ткани NSCLC окрашивали с использованием одного аппарата BenchMark XT или одного аппарата BenchMark ULTRA. Для определения внутриплатформенной прецизионности по 3 микропрепарата из каждого образца ткани NSCLC окрашивали с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) на трех аппаратах BenchMark XT и по 2 микропрепарата каждого образца ткани NSCLC окрашивали на трех аппаратах BenchMark ULTRA. Для определения межсуточной прецизионности по 2 микропрепарата из каждого образца ткани NSCLC окрашивали с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) на одном аппарате BenchMark XT или BenchMark ULTRA в течение 5 дней (не подряд). В пределах каждой группы тканей для каждого аппарата все микропрепараты были замаскированы и рандомизированы. Каждая группа отдельно оценивалась патоморфологом с использованием алгоритма оценки окрашивания по методу с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) (приведенному в Таблице 5). Для всех микропрепаратов образцов ткани NSCLC были получены эквивалентные результаты иммуногистохимического окрашивания на ALK. Сводные результаты по повторяемости и внутрилабораторной прецизионности для аппаратов BenchMark XT и BenchMark ULTRA приведены в Таблицах 10 и 11 соответственно.

Было проведено межплатформенное исследование, сравнивающее рабочие характеристики метода с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) для аппаратов BenchMark XT и BenchMark GX. В рамках данного исследования оценивались два многотканевых блока, содержащие 8 образцов ткани NSCLC (3 ALK-положительных, 1 ALK-отрицательный в каждом блоке). Для такого сравнения было выполнено окрашивание 5 дублирующих микропрепаратов на трех приборах BenchMark XT и трех приборах BenchMark GX. Окрашивание этих микропрепаратов оценивали с использованием алгоритма оценки иммуногистохимического окрашивания VENTANA anti-ALK (D5F3), приведенного в Таблица 5. Для всех микропрепаратов образцов ткани NSCLC были получены эквивалентные результаты иммуногистохимического окрашивания на ALK с использованием двух данных платформ. Резюме полученных результатов приведено в Таблица 12.

Кроме того, были оценены повторяемость и внутрилабораторная прецизионность окрашивания при помощи анализа с применением антитела VENTANA anti-ALK

(D5F3) на образцах аппендикса человека (контроль системного уровня). В этом исследовании было использовано восемь образцов тканей аппендикса человека. Для определения внутрисуточной прецизионности по 13 повторно приготовленным микропрепаратам, взятых из двух многотканевых блоков, содержащих 4 образца аппендикса, окрашивали на одном аппарате BenchMark XT. Для определения межаппаратной прецизионности по 5 повторно приготовленным микропрепаратам, взятых из двух многотканевых блоков, содержащих 4 образца аппендикса, окрашивали с помощью антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) на трех аппаратах BenchMark XT. Для определения внутрисуточной прецизионности по 5 повторно приготовленным микропрепаратам, взятых из каждого из двух многотканевых блоков, содержащих 4 образца аппендикса, окрашивали с помощью антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) на одном и том же аппарате BenchMark XT в течение 5 дней (не подряд). Все предметные стекла были оценены патоморфологом в соответствии с алгоритмом оценивания анализа VENTANA anti-ALK (D5F3) для контрольной ткани аппендикса (приведен в табл. 4). Для всех повторно изготовленных микропрепаратов образцов ткани аппендикса были получены эквивалентные результаты иммуногистохимического окрашивания на ALK. Общее значение (в процентах) согласованности для межсуточной и межаппаратной повторяемости (для 3 аппаратов) составило 100 %, тогда как внутрисуточная повторяемость (измеренная в течение 5 дней, не следовавших подряд друг за другом) составила 98 %.

**Таблица 10.** Повторяемость и внутрилабораторная прецизионность окрашивания с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) для отдельных образцов ткани NSCLC с использованием аппарата BenchMark XT.

| Повторяемость/прецизионность окрашивания образцов ткани NSCLC     | N = общее количество предметных стекол, оцененных в составе группы | Общий процент совпадений результатов для статуса экспрессии ALK (95 % ДИ) |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Внутрисуточная повторяемость                                      | 50                                                                 | 100 % (97,5–100 %)                                                        |
| Внутриплатформенная прецизионность (Для 3 аппаратов BenchMark XT) | 60                                                                 | 100 % (97,9–100 %)                                                        |
| Межсуточная прецизионность (5 непоследовательных дней)            | 100                                                                | 100 % (98,7–100 %)                                                        |

**Таблица 11.** Повторяемость и внутрилабораторная прецизионность окрашивания с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) для отдельных образцов ткани NSCLC с использованием аппарата BenchMark ULTRA.

| Повторяемость/прецизионность окрашивания образцов ткани NSCLC        | N = общее количество предметных стекол, оцененных в составе группы | Общий процент совпадений результатов для статуса экспрессии ALK (95 % ДИ) |
|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Внутрисуточная повторяемость                                         | 50                                                                 | 100 % (92,9–100,0 %)                                                      |
| Внутриплатформенная прецизионность (Для 3 аппаратов BenchMark ULTRA) | 60                                                                 | 100 % (94,0–100,0 %)                                                      |
| Межсуточная прецизионность (5 непоследовательных дней)               | 100                                                                | 100 % (96,3–100,0 %)                                                      |

**Таблица 12.** Межплатформенная прецизионность окрашивания с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) образцов ткани NSCLC, полученных из многотканевых блоков, с использованием аппаратов BenchMark XT и BenchMark GX.

| Прецизионность окрашивания ткани NSCLC                                                                    | N = общее количество предметных стекол, оцененных в составе группы | Общий процент совпадений результатов для статуса экспрессии ALK |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Межплатформенная прецизионность при использовании аппаратов BenchMark XT и BenchMark GX (для 3 аппаратов) | 30                                                                 | 100 %                                                           |

### Повторяемость между партиями

Повторяемость между партиями антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) определялась путем тестирования трех партий антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) на 38 уникальных случаях NSCLC (21 положительный по ALK образец (из 18 уникальных случаев) и 20 образцов тканей NSCLC, отрицательных по ALK) с помощью аппарата BenchMark XT с использованием набора для обнаружения OptiView DAB IHC Detection kit и набора для амплификации OptiView Amplification kit. Все образцы окрашивали дважды при помощи каждой из трех партий первичных антител. Перед оценкой клинического статуса все предметные стекла были замаскированы и рандомизированы в соответствии с алгоритмом оценки результатов исследования с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3), приведенным в Таблице 5, а затем их оценивали три патоморфолога. Для всех трех партий результаты окрашивания по ALK совпадали более чем на 90 % на выборке из 41 обследованного образца тканей NSCLC. Результаты представлены в виде таких показателей, как общий процент совпадения, процент совпадения положительных результатов и процент совпадения отрицательных результатов. Общий процент совпадения между партиями составил 99,2 %; следовательно, метод с использованием антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) дает воспроизводимые результаты окрашивания от партии к партии. Результаты приведены в Таблице 13.

Повторяемость между партиями антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) определялась путем тестирования трех партий антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) на 30 уникальных случаях NSCLC (15 положительных по ALK образцов и 15 образцов тканей NSCLC, отрицательных по ALK) с помощью аппарата BenchMark ULTRA с использованием набора для обнаружения OptiView DAB IHC Detection kit и набора для амплификации OptiView Amplification kit. Все образцы окрашивали дважды при помощи каждой из трех партий первичных антител.

Перед оценкой клинического статуса все предметные стекла были замаскированы и рандомизированы в соответствии с алгоритмом результатов исследования с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3), приведенным в Таблице 5, а затем их оценивал патоморфолог. Для всех трех партий результаты окрашивания по ALK совпадали более чем на 90 % на выборке из 30 обследованного образца тканей NSCLC. Результаты представлены в виде таких показателей, как общий процент совпадения, процент совпадения положительных результатов и процент совпадения отрицательных результатов. Общий процент совпадения между партиями составил 99,1 %; следовательно, метод с использованием антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) дает воспроизводимые результаты окрашивания от партии к партии. Результаты приведены в Таблице 14.

Также повторяемость между партиями антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) была оценена при помощи 12 уникальных образцов ткани аппендикса человека. Повторяемость была определена путем тестирования трех партий антител совместно с тремя партиями наборов для обнаружения OptiView DAB IHC Detection kit и наборов для амплификации OptiView Amplification Kit с использованием трех аппаратов BenchMark XT. Общая частота совпадения результатов для соответствующих элементов тканей аппендикса с положительным и отрицательным окрашиванием с использованием анализа VENTANA anti-ALK (D5F3) составила 100 %.

**Таблица 13.** Уровень согласованности повторяемости между партиями на выборке из 41 образца ткани NSCLC на аппарате BenchMark XT. Были исследованы двадцать один ALK-положительный образец (из 18 уникальных случаев) и 20 ALK-отрицательных образцов.

| Уровни согласованности повторяемости между партиями | Среднее количество положительных совпадений (95 % ДИ) | Среднее количество отрицательных совпадений (95 % ДИ) | Общий процент совпадения (95 % ДИ) |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Среднее для всех трех сравнений партий              | 99,2 %<br>(97,4–100 %)                                | 99,1 %<br>(96,8–100 %)                                | 99,2 %<br>(97,5–100 %)             |

**Таблица 14.** Уровень согласованности повторяемости между партиями на выборке из 30 образцов ткани NSCLC на аппарате BenchMark ULTRA. Были исследованы пятнадцать ALK-положительных образцов и 15 ALK-отрицательных образцов.

| Уровни согласованности повторяемости между партиями | Процент совпадения положительных результатов (95 % ДИ) | Процент совпадения отрицательных результатов (95 % ДИ) | Общий процент совпадения (95 % ДИ) |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Среднее для всех трех сравнений партий              | 98,9 %<br>(96,8–99,6 %)                                | 99,3 %<br>(97,3–99,8 %)                                | 99,1 %<br>(97,9–99,6 %)            |

#### Исследования прецизионности между экспертами

Было выполнено несколько исследований прецизионности результатов между экспертами: два на аппарате BenchMark XT и одно на аппарате BenchMark ULTRA. В исследовании прецизионности между экспертами с применением аппарата BenchMark XT три патоморфолога в общей сложности оценили 185 уникальных случаев. В этих 185 случаях имела место корреляция со 100 ALK-положительными и 100 ALK-отрицательными блоками, которые были окрашены с использованием антитела VENTANA anti-ALK (D5F3). Перед оценкой ИГХ-окрашивания по ALK образцы были замаскированы и рандомизированы в соответствии с алгоритмом оценки результатов исследования VENTANA anti-ALK (D5F3), приведенным в Таблице 5. Результаты, приведенные ниже в Таблице 15, отображают показатели прецизионности между экспертами, полученные в данной группе клинического исследования для уникальных случаев.

**Таблица 15.** Исследование прецизионности результатов №1 между экспертами на аппарате BenchMark XT

| Прецизионность между экспертами                       | Среднее количество положительных совпадений (95 % ДИ) | Среднее количество отрицательных совпадений (95 % ДИ) | Общий процент совпадения (95 % ДИ) |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Среднее значение для сравнений по всем трем экспертам | 98,8 %<br>(97,3–100 %)                                | 99,0 %<br>(97,7–100 %)                                | 98,9 %<br>(97,4–100 %)             |

Исследование прецизионности №2 между экспертами на аппарате BenchMark XT было проведено с использованием группы случаев, изучавшихся в рамках рандомизированного клинического исследования ALK-положительных образцов ткани NSCLC пациентов, полученных при помощи набора Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Около 300 случаев прошли окрашивание по методу с использованием антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) на аппарате BenchMark XT. Эти клинические случаи были замаскированы в отношении статуса по ALK FISH, рандомизированы и отправлены на оценку трем экспертам, которые выполнили оценку результатов ИГХ-окрашивания на ALK с помощью алгоритма оценки результатов исследования VENTANA anti-ALK (D5F3), представленного в Таблице 5. Результаты, приведенные в Таблице 16, отображают показатели прецизионности между исследователями, полученные в данной группе клинического исследования.

Для исследования прецизионности результатов между экспертами с использованием аппарата BenchMark ULTRA была проведена оценка группы, состоящей из 184 уникальных образцов ткани NSCLC. Данная группа состояла из 90 ALK-положительных и 94 ALK-отрицательных образцов, которые были окрашены по методу VENTANA anti-ALK (D5F3) на аппарате BenchMark ULTRA. Эти клинические случаи были замаскированы, рандомизированы и отправлены на оценку трем экспертам, которые выполнили оценку результатов ИГХ-окрашивания на ALK с помощью алгоритма оценки результатов исследования VENTANA anti-ALK (D5F3), представленного в Таблице 5. Таблица 16 отражает показатели прецизионности между экспертами, полученные в этом исследовании.

**Таблица 16.** Исследование прецизионности №2 между экспертами в отношении оценки статуса экспрессии ALK в образцах ткани NSCLC, полученных в результате сравнения клинических методов Группы № 1, окрашенных по методу VENTANA anti-ALK (D5F3) в аппарате BenchMark XT.

| Прецизионность между экспертами                           | Среднее количество положительных совпадений (95 % ДИ) | Среднее количество отрицательных совпадений (95 % ДИ) | Общий процент совпадения (95 % ДИ) |
|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Среднее для сравнений, выполненных всеми тремя экспертами | 97,6 %<br>(95,0–99,5 %)                               | 99,5 %<br>(98,9–99,9 %)                               | 99,1 % (98,2–99,8 %)               |
| Эксперт 1 в сравнении с экспертом 2                       | 99,1 %<br>(97,1–100 %)                                | 99,8 %<br>(99,4–100 %)                                | 99,7 %<br>(98,2–99,9 %)            |
| Эксперт 1 в сравнении с экспертом 3                       | 96,3 %<br>(92,3–99,2 %)                               | 99,2 %<br>(98,3–99,8 %)                               | 98,6 %<br>(96,6–99,5 %)            |
| Эксперт 2 в сравнении с экспертом 3                       | 97,2 %<br>(93,5–100 %)                                | 99,4 %<br>(98,6–100 %)                                | 99,0 %<br>(97,1–99,7 %)            |

**Таблица 17.** Прецизионность между экспертами в отношении статуса экспрессии ALK в образцах NSCLC, окрашенных по методу VENTANA anti-ALK (D5F3) в аппарате BenchMark ULTRA.

| Прецизионность между экспертами           | Среднее количество положительных совпадений (95 % ДИ) | Среднее количество отрицательных совпадений (95 % ДИ) | Общий процент совпадения (95 % ДИ) |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Среднее для всех трех сравнений экспертов | 98,4 %<br>(96,5–99,6 %)                               | 98,6 %<br>(96,9–99,7 %)                               | 98,5 %<br>(96,7–99,6 %)            |
| Эксперт 1 в сравнении с экспертом 2       | 98,9 %<br>(96,8–100 %)                                | 98,9 %<br>(97,0–100 %)                                | 98,9 %<br>(96,0–99,7 %)            |
| Эксперт 1 в сравнении с экспертом 3       | 98,8 %<br>(96,7–100 %)                                | 99,0 %<br>(97,2–100 %)                                | 98,9 %<br>(96,0–99,7 %)            |
| Эксперт 2 в сравнении с экспертом 3       | 97,6 %<br>(94,7–99,4 %)                               | 97,9 %<br>(95,4–99,5 %)                               | 97,8 %<br>(94,4–99,1 %)            |

#### Согласованность с ALK FISH

Для сравнения результатов окрашивания с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody и результатов метода ALK FISH в том, что касается статуса клинической экспрессии ALK, были отобраны три когорты образцов. В эти когорты вошли: ряд образцов ткани NSCLC человека, взятых из первичной и метастатической опухолей, в том числе при резекции, пункционной биопсии, бронхальной биопсии, а также фиксированные формалином, и залитые в парафин клеточные блоки, полученные при тонкоигольной аспирационной биопсии. Оценку всех исследований выполнили в соответствии с алгоритмом оценки (см. Таблица 5).

### Исследование согласованности 1

Исследование проводили во внешнем исследовательском центре и сравнивали окрашивание VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody с результатами окрашивания Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Во внешней лаборатории выполнили окрашивание приблизительно 100 образцов NSCLC методом VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody на аппарате BenchMark XT. Исследование с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) показало совпадение результатов с ретроспективными данными Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit относительно изученной совокупности образцов NSCLC в > 98 % случаев. Результаты приведены в Таблицах 18 и 19. Следует отметить, что в 86 из 100 случаев имелось достаточное количество ткани опухоли, исследованное методом FISH для сравнения с результатами иммуногистохимического окрашивания на ALK.

**Таблица 18.** Сравнение результатов исследования с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) и набора Abbott's Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

| Сравнение метода анализа с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) и метода анализа с применением набора Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit |                                                |              |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------|-------|
| Антитело<br>VENTANA anti-ALK<br>(D5F3)                                                                                                                    | Abbott Vysis ALK Break Apart FISH<br>Probe Kit |              | Всего |
|                                                                                                                                                           | Положительно                                   | Отрицательно |       |
| Положительно                                                                                                                                              | 10                                             | 0            | 10    |
| Отрицательно                                                                                                                                              | 1                                              | 75           | 76    |
| Всего                                                                                                                                                     | 11                                             | 75           | 86    |

**Таблица 19.** Общий процент, показатель положительных и отрицательных совпадений для исследования VENTANA anti-ALK (D5F3) по сравнению с набором Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit.

| Общий процент, показатель положительных и отрицательных совпадений |       |       |             |
|--------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------------|
| Показатель                                                         | n/N   | %     | ДИ 95 % [a] |
| Общий процент совпадения                                           | 85/86 | 98,8  | 93,7; 99,8  |
| Процент совпадения положительных результатов                       | 10/11 | 90,9  | 62,3; 98,4  |
| Процент совпадения отрицательных результатов                       | 75/75 | 100,0 | 95,1; 100,0 |

[a] Двусторонний доверительный интервал 95 %, рассчитанный по методу оценки.

Следует обратить внимание на то, что приготовление образца ткани для данного исследования не было проверено, на соответствие рекомендациям по подготовке образца.

### Исследование согласованности 2

Исследование проводили во второй внешней лаборатории и сравнивали окрашивание по методу VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody с результатами окрашивания помощью набора Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit на 73 образцах NSCLC (срез выполнен в пределах одной недели до момента окрашивания). Во внешней лаборатории выполнили окрашивание образцов с использованием метода VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody на аппарате BenchMark XT. Исследование с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) показало совпадение результатов с ретроспективными данными Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit относительно изученной совокупности образцов NSCLC в > 93 % случаев. Результаты приведены в Таблицах 20 и 21.

**Таблица 20.** Сравнение результатов исследования с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) и набора Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

| Сравнение метода анализа с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) и метода анализа с применением набора Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit |                                                |              |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------|-------|
| Антитело<br>VENTANA anti-ALK<br>(D5F3)                                                                                                                    | Abbott Vysis ALK Break Apart FISH<br>Probe Kit |              | Всего |
|                                                                                                                                                           | Положительно                                   | Отрицательно |       |
| Положительно                                                                                                                                              | 2                                              | 4            | 6     |
| Отрицательно                                                                                                                                              | 0                                              | 56           | 56    |
| Всего                                                                                                                                                     | 2                                              | 60           | 62    |

**Таблица 21.** Общий процент, показатель положительных и отрицательных совпадений для исследования VENTANA anti-ALK (D5F3) по сравнению с набором Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit.

| Общий процент, показатель положительных и отрицательных совпадений |       |        |             |
|--------------------------------------------------------------------|-------|--------|-------------|
| Показатель                                                         | n/N   | %      | ДИ 95 % [a] |
| Общий процент совпадения                                           | 58/62 | 93,5 % | 84,6–97,5   |
| Процент совпадения положительных результатов                       | 2/2   | 100 %  | 34,2–100,0  |
| Процент совпадения отрицательных результатов                       | 56/60 | 93 %   | 84,1–97,4   |

[a] Двусторонний доверительный интервал 95 %, рассчитанный по методу оценки.

Из четырех случаев несовпадения (результат FISH — отрицательный, результат иммуногистохимического окрашивания на ALK — положительный) были протестированы дополнительные неокрашенные микропрепараты с использованием другого метода окрашивания на ALK (другой клон и другая система обнаружения). Три случая из четырех совпали с результатами исследования с антителами VENTANA anti-ALK (D5F3) в части обнаружения ИГХ-окрашивания при наличии ALK. Также было выявлено 10 случаев, в которых результаты исследования методом FISH не определялись или исследование не было выполнено. Четыре из этих случаев были положительными при окрашивании с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) и другого клона ALK, а шесть случаев были отрицательными согласно ИГХ-окрашиванию по ALK. Кроме того, имелся один образец, который был FISH-положительным, однако количество ткани в нем было недостаточным для окрашивания при помощи иммуногистохимического метода.

### Исследование согласованности 3

В данном исследовании приблизительно 300 образцов, взятых из текущего всемирного клинического исследования пациентов с ALK-положительным NSCLC, которые были включены в исследование на основании окрашивания при помощи набора Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit, окрашивали с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Antibody. Это та же когорта, которая была обсуждена в разделе, посвященном исследованию прецизионности между экспертами, на странице 9 данного листка-вкладыша. Из почти 300 образцов некоторые попадали под категорию «неинформативные» по результатам FISH или «не подверглись анализу FISH» и были окрашены и оценены исключительно для получения информации.

Статус FISH для этих случаев был неизвестен. Данные случаи были отобраны случайно, кроме того, оценку результата окрашивания проводили два исследователя. Результаты сравнили со статусом FISH, который был взят из глобального клинического исследования.

Результаты сравнения иммуногистохимического исследования ALK с ALK FISH приведены в Таблице 22.

**Таблица 22.** Оценка совпадения результатов окрашивания с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) и результатов, полученных с помощью набора Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit, проведенная 2 патоморфологами.

| Сравнение результатов исследования с антителом VENTANA anti-ALK (D5F3) и набором Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit |              |                                             |              |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|---------------------------------------------|--------------|-------|
| Антитело VENTANA anti-ALK (D5F3)                                                                                             |              | Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit |              |       |
| Эксперт                                                                                                                      |              | Положительно                                | Отрицательно | Всего |
| Эксперт 1                                                                                                                    | Положительно | 37                                          | 13           | 50    |
|                                                                                                                              | Отрицательно | 11                                          | 223          | 234   |
|                                                                                                                              | Всего        | 48                                          | 236          | 284   |
|                                                                                                                              |              |                                             |              |       |
| Эксперт 2                                                                                                                    | Положительно | 37                                          | 12           | 49    |
|                                                                                                                              | Отрицательно | 11                                          | 225          | 236   |
|                                                                                                                              | Всего        | 48                                          | 237          | 285   |

Следует учесть: не было установлено, что при приготовлении образцов для данного исследования был соблюден рекомендованный порядок подготовки образцов. Несовпадающие случаи, которые были положительными при окрашивании с применением антитела VENTANA (D5F3) anti-ALK и отрицательными при использовании метода ALK FISH.

- Результаты 4 случаев были оценены как минимум одним исследователем как положительные по ALK в результате ИГХ-окрашивания, но отрицательные по методу FISH. По общему решению эти случаи были признаны отрицательными по иммуногистохимическому исследованию. В этих случаях имело место очаговое окрашивание цитоплазмы и мембран, и для разъяснения этой ситуации вам следует обратиться к Руководству по интерпретации результатов исследования VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody для немелкоклеточной карциномы легких (NSCLC), № по каталогу: 1011879.
- Было обнаружено 9 случаев с положительным результатом иммуногистохимического исследования ALK, но отрицательным по ALK FISH, которые были признаны действительно несовпадающими случаями.

Из 9 случаев несовпадения в 7 случаях имелись неокрашенные микропрепараты, которые были доступны для дополнительного диагностического тестирования ALK (молекулярный тест и иммуногистохимическое исследование с использованием другого клон и другой системы детекции). Результаты дополнительного тестирования показали, что у большинства несовпадающих случаев по результатам иммуногистохимического исследования оценка статуса экспрессии ALK была положительной, хотя результат по ALK FISH был отрицательным. (Обратите внимание на то, что в данных случаях рекомендованный срок — 3 месяца был превышен.) Несовпадающие случаи, которые были отрицательными при окрашивании с применением антитела VENTANA (D5F3) anti-ALK и положительными при использовании метода ALK FISH.

- Наблюдалось 11 случаев, которые были положительными при окрашивании по FISH, но отрицательными при окрашивании с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3). В 10 случаях имелись неокрашенные микропрепараты, которые были доступны для дополнительного диагностического тестирования ALK с использованием молекулярных методик и иммуногистохимического анализа. Результаты дополнительного тестирования показали, что большинство образцов, которые были отрицательными по результатам окрашивания с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3), были также отрицательны по ALK при использовании других методов ИГХ-окрашивания, но имели положительный результат по одному или нескольким молекулярным методам анализа. Обратите внимание на то, что в данных случаях рекомендованный для окрашивания по ALK методом ИГХ срок в 3 месяца был превышен.

- Наконец, 14 случаев из этой совокупности были неинформативными по FISH (результат не получен). 3 из них были признаны обоими экспертами положительными по результатам окрашивания с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3). Кроме того, обнаружили 19 случаев, на которых не удалось выполнить анализ FISH, основанный на стеклах, окрашенных гематоксилином и эозином (обычно по причине малого количества опухолевой ткани). Оба исследователя оценили результаты окрашивания после иммуногистохимического анализа ALK как положительные в 4 случаях. Таким образом, в среднем в 21 % случаев, в которых метод FISH не привел к получению результатов, экспрессия ALK была обнаружена при иммуногистохимическом исследовании с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3).

#### Исследование межлабораторной повторяемости на аппарате BenchMark XT

Межлабораторное исследование повторяемости результатов исследования с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) было проведено для демонстрации повторяемости теста при определении клинического статуса экспрессии ALK на аппарате BenchMark XT; при этом использовались образцы ткани NSCLC (6 положительных по ALK и 6 отрицательных); исследование проводилось на 3 аппаратах с применением 3 партий реагентов в течение 5 дней вразбивку в трех внешних лабораториях. Образцы были рандомизированы и оценены в общей сложности 6 экспертами (по 2 в каждом исследовательском центре), которые не знали заранее, каков статус экспрессии ALK в образцах предоставленной им группы. В этой когорте содержалось 180 образцов, полученных из 12 случаев NSCLC, которые проявляли как положительные, так и отрицательные результаты по ALK при окрашивании их методами ИГХ и FISH. Эти образцы неоднократно подвергали окрашиванию в течение 21 дня в трех лабораториях. Результаты приведены в Таблице 23. Уровень приемлемости в отношении морфологических структур и фонового окрашивания в данных исследованиях составил 100 %. Исследование внутрилабораторной повторяемости (Inter-Laboratory Reproducibility, ILR) для антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) на аппарате BenchMark XT позволило определить средний уровень совпадения положительных результатов (APA) и средний уровень совпадения отрицательных результатов (ANA) при сравнении результатов, полученных в разных лабораториях, разными экспертами и в ходе разных циклов в течение одного и того же дня; сравнения выполнялись попарно с использованием наблюдений, допускающих возможность оценки.

**Таблица 23.** Межлабораторная повторяемость: уровни согласованности результатов для исследования с антителами VENTANA anti-ALK (D5F3) на аппарате BenchMark XT (количество оцененных предметных стекол n = 180).

| Уровни согласованности для межлабораторной повторяемости (экспрессия ALK)       | Среднее положительное совпадение (95 % ДИ) | Среднее отрицательное совпадение (95 % ДИ) | Общий процент совпадения (95 % ДИ) |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------|
| Межлабораторная согласованность (3 лаборатории)                                 | 93,8 %<br>(76,2–100 %)                     | 94,9 %<br>(79,2–100 %)                     | 94,4 %<br>(83,3–100 %)             |
| Согласованность в течение дня (5 непоследовательных дней)                       | 99,1 %<br>(96,4–100 %)                     | 99,2 %<br>(96,9–100 %)                     | 99,2 %<br>(97,5–100 %)             |
| Согласованность между экспертами (2 эксперта в каждом исследовательском центре) | 98,8 %<br>(95,2–100 %)                     | 99,0 %<br>(95,8–100 %)                     | 98,9 %<br>(96,7–100 %)             |

#### Исследование межлабораторной повторяемости на аппарате BenchMark ULTRA

Дополнительное межлабораторное исследование повторяемости результата исследования с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) было проведено для демонстрации повторяемости анализа при определении статуса экспрессии ALK на аппарате BenchMark ULTRA; при этом использовались образцы ткани NSCLC (7 положительных по ALK и 7 отрицательных); исследование проводилось на 3 аппаратах BenchMark ULTRA с применением 3 партий реагентов в течение 5 дней

вразбивку в трех внешних лабораториях. Образцы были рандомизированы и оценены в общей сложности 6 экспертами (по 2 в каждом исследовательском центре), которые не знали заранее, каков статус экспрессии ALK в образцах предоставленной им группы. В этой когорте содержалось 210 образцов, полученных из 14 случаев NSCLC, которые проявляли как положительные, так и отрицательные результаты по ALK при окрашивании их методами ИГХ и FISH. Эти образцы неоднократно подвергали окрашиванию в течение 21 дня в трех лабораториях. Результаты приведены в Таблица 24. Уровень приемлемости результатов окрашивания по всем объединенным данным составил 99 %. Уровень приемлемости в отношении морфологических структур и фонового окрашивания в данных исследованиях составил 100 %. Результаты приведены в Таблице 25. Исследование ILR межлабораторной повторяемости для антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) на аппарате BenchMark ULTRA позволило определить уровень совпадения положительных результатов (PPA) и уровень совпадения отрицательных результатов (NPA) при сравнении объединенных результатов по всем лабораториям, экспертам и дням; в качестве эталонного стандарта при этом использовалась шкала оценки, согласованная всеми участниками исследования. **Таблица 24.** Межлабораторная повторяемость ILR: показатель совпадения результатов для окрашивания с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) на аппарате BenchMark ULTRA (количество оцененных предметных стекол n = 210).

| Уровни согласованности для межлабораторной повторяемости (экспрессия ALK) | Процент совпадения положительных результатов (95 % ДИ) | Процент совпадения отрицательных результатов (95 % ДИ) | Общий процент совпадения (95 % ДИ) |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------|
| По всем наблюдениям, допускающим возможность оценки                       | 92,8 %<br>(88,4; 95,6 %)                               | 100,0 %<br>(98,2; 100,0 %)                             | 96,4 %<br>(94,1; 97,8 %)           |

**Таблица 25.** Межлабораторная повторяемость: показатель совпадения результатов между отдельными экспертами для окрашивания с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) на аппарате BenchMark ULTRA (количество оцененных предметных стекол n = 210).

| Уровни согласованности для межлабораторной повторяемости (экспрессия ALK) по результатам отдельных экспертов | Среднее положительное совпадение (95 % ДИ) | Среднее отрицательное совпадение (95 % ДИ) | Общий процент совпадения (95 % ДИ) |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------|
| Эксперты A1 в сравнении с A2                                                                                 | 97,0 %<br>(87,5–100 %)                     | 97,3 %<br>(89,5–100 %)                     | 97,1 %<br>(90,2–99,2 %)            |
| Эксперты B1 в сравнении с B2                                                                                 | 93,5 %<br>(71,4–100 %)                     | 94,7 %<br>(81,0–100 %)                     | 94,2 %<br>(86,0–97,7 %)            |
| Эксперты C1 в сравнении с C2                                                                                 | 92,3 %<br>(66,7–100 %)                     | 93,2 %<br>(74,7–100 %)                     | 92,8 %<br>(84,1–96,9 %)            |
| Общая доля                                                                                                   | 94,3 %<br>(75,6–100 %)                     | 95,1 %<br>(81,6–100 %)                     | 94,7 %<br>(84,1–100 %)             |

#### Исследование для сравнения методов на аппарате BenchMark XT

Исследование сравнения метода было основано на группах образцов, полученных в двух независимых рандомизированных клинических исследованиях препарата crizotinib (обозначенных как исследование № 1 и исследование № 2), в которое были включены пациенты с ALK-положительной NSCLC. Состояние экспрессии ALK для этих пациентов определялось с помощью набора Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit в нескольких лабораториях исследовательских центров. Валидные результаты для метода окрашивания Vysis ALK FISH были получены в общей сложности для 1644 образцов тканей NSCLC (1018 образец для исследования № 1 и 626 образцов для исследования № 2).

исследовании для сравнения методов окрашивания с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) образцы, взятые из исследования № 1 и исследования № 2, были направлены в центральную лабораторию для окрашивания с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3), после чего их оценивали по выраженности экспрессии ALK в ходе ИГХ-окрашивания, используя для оценки алгоритм, специально разработанный для оценки результатов исследования с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) (Таблица 5). Из числа образцов, показавших валидные результаты при окрашивании по методу Vysis ALK FISH в ходе скрининга при отборе участников клинического исследования, 933 образца из исследования № 1 (Таблица 26) и 598 образцов из исследования № 2 (Таблица 28) также показали валидные результаты при окрашивании с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3).

Количество образцов, оказавшихся положительным по ALK и отрицательными по ALK в ходе каждого из анализов, приведены в табл. 26 для исследования № 1 и в таблице. 28 для исследования № 2. Степень согласованности результатов для двух разных методов показана в табл. 27 для исследования № 1 и в таблице 29 для исследования № 2. Степень совпадения положительных и отрицательных результатов составила 86,0 % и 96,3 % соответственно для исследования № 1 (Таблица 27) и 92,7 % и 94,8 % соответственно для исследования № 2 (Таблица 29).

**Таблица 26.** Сравнение экспрессии ALK в образцах NSCLC (группа из исследования № 1): окрашивание с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) по сравнению с набором Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit.

| Статус ALK                       |              | Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit |              |       |
|----------------------------------|--------------|--------------------------------------|--------------|-------|
|                                  |              | Положительно                         | Отрицательно | Всего |
| Антитело VENTANA anti-ALK (D5F3) | Положительно | 154                                  | 28           | 182   |
|                                  | Отрицательно | 25                                   | 726          | 751   |
|                                  | Всего        | 179                                  | 754          | 933   |

**Таблица 27.** Оценка совпадения результатов окрашивания с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) и результатов, полученных с помощью набора Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit, в исследовании № 1.

| Степень согласованности результатов по ALK для разных методов исследования | Процент совпадения положительных результатов (95 % ДИ) | Процент совпадения отрицательных результатов (95 % ДИ) | Общий процент совпадения (95 % ДИ) |
|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Антитело VENTANA anti-ALK (D5F3) и Vysis ALK Break-Apart FISH Probe Kit    | 86,0 %<br>(80,2–90,4 %)                                | 96,3 %<br>(94,7–97,4 %)                                | 94,3 %<br>(92,6–95,6 %)            |

**Таблица 28.** Сравнение экспрессии ALK в образцах NSCLC (группа из исследования № 2): окрашивание по методу с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) по сравнению с набором Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit.

| Статус ALK                       |              | Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit |              |       |
|----------------------------------|--------------|--------------------------------------|--------------|-------|
|                                  |              | Положительно                         | Отрицательно | Всего |
| Антитело VENTANA anti-ALK (D5F3) | Положительно | 179                                  | 21           | 200   |
|                                  | Отрицательно | 14                                   | 384          | 398   |
|                                  | Всего        | 193                                  | 405          | 598   |

**Таблица 29.** Оценка совпадения результатов окрашивания с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) и результатов, полученных с помощью набора Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit, в исследовании № 2.

| Степень согласованности результатов по ALK для разных методов исследования | Процент совпадения положительных результатов (95 % ДИ) | Процент совпадения отрицательных результатов (95 % ДИ) | Общий процент совпадения (95 % ДИ) |
|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Антитело VENTANA anti-ALK (D5F3) и Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit    | 92,7 %<br>(88,2-95,6 %)                                | 94,8 %<br>(92,2-96,6 %)                                | 94,1 %<br>(92,0-95,8 %)            |

Следует учесть, что образцы тканей, использованные в исследовании № 1 и исследовании № 2, не проверялись на то, были ли они приготовлены с соблюдением инструкций, рекомендуемых для подготовки образцов для окрашивания с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3).

#### Исследование клинических результатов приема препарата crizotinib

Анализ клинической эффективности исследования с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) в качестве диагностического теста для выявления пациентов, которым могло бы помочь лечение препаратом crizotinib (таргетным препаратом ALK), опирался на данные исследования № 1. Эти пациенты были тестированы с помощью метода с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) в рамках исследования сравнения двух методов, а также в дополнительном исследовании. Исследование № 1 представляло собой многоцентровое рандомизированное многонациональное открытое исследование эффективности и безопасности (исследование 3-й фазы), в котором препарат crizotinib сравнивался с химиотерапией 1-й линии (пеметрексед/цисплатин или пеметрексед/карбоплатин) у пациентов с поздними стадиями ALK-позитивного неплоскоклеточного рака типа NSCLC. При определении наличия экспрессии ALK и, следовательно, включения пациентов в исследование № 1, ткань опухоли окрашивалась с помощью набора Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (ALK FISH). На основании результатов теста Vysis ALK FISH 343 пациента были рандомизированы (172 в группу crizotinib и 171 в группу химиотерапии). В исследовании клинических результатов с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) образцы тканей участников исследования № 1 были ретроспективно окрашены с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3). Из 343 пациентов, включенных в исследование 1, 133 были тестированы с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) в соответствии с протоколом исследования сравнения методов, а еще 39 пациентов прошли через отдельный протокол исследования, то есть всего 172 пациента были обследованы с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3). Из них 166 пациентов были диагностированы как положительные или отрицательные по ALK посредством ИГХ-реакции на ALK (D5F3). Результаты по общей эффективности для этих пациентов сведены в отчет в соответствии с результатами исследования с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) в Таблица 30.

**Таблица 30.** Клиническая эффективность лечения препаратом crizotinib (выживание без прогрессирования) для пациентов, участвовавших в исследовании № 1.

| Статус ALK                              |            | OP [a] | CO [a] | ДИ 95 % [a]    | Размер выборки      |                             |
|-----------------------------------------|------------|--------|--------|----------------|---------------------|-----------------------------|
|                                         |            |        |        |                | Группа химиотерапии | Группа препарата crizotinib |
| Всего участников                        | FISH+      | 0,454  | 0,139  | (0,346; 0,596) | 171                 | 172                         |
|                                         | FISH+ [b]  | 0,407  | 0,214  | (0,267; 0,618) | 82                  | 90                          |
|                                         | FISH+/IHC+ | 0,401  | 0,237  | (0,252; 0,639) | 63                  | 78                          |
| Тестированные с помощью ALK-ИГХ реакции | FISH+/IHC- | 1,711  | 0,703  | (0,431; 6,789) | 17                  | 8                           |

[a] Наблюдавшееся отношение рисков (OP) для выживания без прогрессирования (PFS) для препарата crizotinib в сравнении с химиотерапией; стандартная ошибка (CO); и 2-сторонний 95 %-ный доверительный интервал (ДИ). Оценка результатов проводилась по спрямленной модели Кокса по следующим стратам: раса, наличие метастазов в головном мозге и оценка по ECOG.

[b] Для двух пациентов со статусом ALK FISH+ в группе химиотерапии и для 4 пациентов в группе препарата crizotinib не удалось получить ни отрицательных, ни положительных результатов по ALK ИГХ-окрашиванию.

Дополнительные анализы подстановок были проведены для того, чтобы включить в статистику пациентов с отсутствующими или невалидными результатами тестирования по методу VENTANA anti-ALK (D5F3) и для оценки устойчивости выводов, сделанных в данном исследовании. Статистический анализ дискордантных пациентов, не включенных в исследование № 1, включал моделирование ряда возможных исходов для данных пациентов. Результаты всех этих гипотетических анализов были в целом сходны с результатами анализа первичной эффективности.

#### FISH+/IHC — дискордантные случаи в исследовании № 1.

##### Исследование сравнения методов

В исследовании сравнения методов (табл. 26 и 27) 25 пациентов из исследования № 1 были оценены как FISH+/IHC-. Медианный балл оценки по методу Vysis ALK FISH (% опухолевых клеток, положительных на наличие перегруппировки в гене ALK) для этих случаев составил 20 % (среднее значение 31,6 %, CO 21,58 %), и для 14 из этих случаев оценка FISH была 25 % или менее. Тогда как все эти случаи имели оценку по методу Vysis ALK FISH выше пороговых 15 % по положительной экспрессии ALK, их оценки находились в неоднозначной зоне для метода FISH (10–50 %). Напротив, для всех пациентов, включенных в исследование по результатам ИГХ-окрашивания, балл по методу FISH имел медианное значение 58 % (среднее 56,9 %, CO 21,97 %).

##### Исследование клинических результатов

В исследовании клинических результатов 25 пациентов, участвующих в исследовании № 1, были оценены как FISH+/IHC- (см. последнюю строку в табл. 30). Восемь из этих случаев попали вследствие рандомизации в группу препарата crizotinib в клиническом исследовании. Из этих пациентов пятеро имели баллы по FISH, очень близкие к пороговым для метода FISH (15–18 % опухолевых клеток, положительных по наличию перегруппировок в гене ALK), и у них объективно наблюдались прогрессирование или стабилизация заболевания, или отсутствие ответа на лечение. У двух из 8 пациентов баллы по FISH были вне неопределенной зоны для метода FISH (66 % и 72 % опухолевых клеток, положительных по наличию перегруппировок в гене ALK), и у них частично наблюдался объективный ответ опухоли на лечение. Восьмой пациент, включенный по результатам ИГХ-метода, был отрицателен по FISH и попал в исследование по ошибке; у него наблюдался ответ на лечение неясного характера.

#### FISH-/IHC+ — дискордантные случаи в исследовании № 1

В исследовании сравнения методов с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) 28 наблюдений, отобранных для участия в исследовании № 1, имели статус FISH-/IHC+. Поскольку для включения в исследование использовался именно метод FISH и участниками исследования № 1 становились только наблюдения, квалифицированные как FISH+, по дискордантным случаям типа FISH-/IHC+ нет данных о результатах лечения.

### Исследование клинических результатов приема препарата ceritinib

Анализ клинической эффективности антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) в качестве диагностического средства для отбора пациентов, которым могло бы помочь лечение препаратом ceritinib, опирался на данные многоцентрового, открытого, рандомизированного, контролируемого активным препаратом сравнения исследования фазы 3 (исследование № 3) по оценке перорального препарата ceritinib. В исследовании сравнивались клиническая эффективность и безопасность лечения препаратом ceritinib по сравнению с химиотерапией (дублет на основе платины с пеметрекседом и последующая поддержка пеметрекседом у пациентов с прогрессирующей формой заболевания после 4 циклов терапии) у ранее не получавших лечения взрослых пациентов с ALK-положительным местным или метастатическим неплоскоклеточным раком типа NSCLC. Антитело VENTANA anti-ALK (D5F3) использовалось для окрашивания в аппарате BenchMark XT для тестирования тканей в общей сложности 1778 пациентов на возможность их участия в исследовании № 3, необходимым условием которого было наличие положительного результата по ALK. В общей сложности 376 пациентов, опухоли которых оказались ALK-позитивными, составили пул рандомизации (189 в группе препарата ceritinib и 187 в группе химиотерапии). Общая эффективность у пациентов, получавших лечение препаратом ceritinib, приведена в Таблице 31. Ceritinib показал статистически значимое и клинически осмысленное превосходство над химиотерапией, приведя к 45 %-ному снижению риска по PFS согласно данным BIRC (OP = 0,55; 95 % ДИ: 0,42, 0,73;  $p < 0,001$ ) для пациентов, выбранных с помощью метода VENTANA anti-ALK (D5F3). Медианное значение PFS по данным BIRC составило 16,6 месяца (95 % ДИ: 12,6, 27,2) и 8,1 (95 % ДИ: 5,8, 11,1) для групп препарата ceritinib и химиотерапии соответственно.

**Таблица 31.** Клиническая полезность препарата ceritinib (выживание без прогрессирования) для пациентов, включенных в исследование № 3.

| Выживание без прогрессирования                      | ZYKADIA (N=189)   | Chemotherapy (N=187) |
|-----------------------------------------------------|-------------------|----------------------|
| Медианное значение, месяцы (95 % ДИ) <sup>[a]</sup> | 16,6 (12,6; 27,2) | 8,1 (5,8; 11,1)      |
| ОР (95 % ДИ) <sup>[b]</sup>                         | 0,55 (0,42; 0,73) |                      |
| p-значение <sup>[c]</sup>                           | < 0,0001          |                      |

ОР — отношение рисков; ДИ — доверительный интервал; BIRC — независимый комитет оценивания маскированных результатов (Blinded Independent Review Committee); NR — не достигнуто; NE — не представляется возможным оценить. [a] Оценка по методу Каплана-Мейера.

[b] Регрессионная модель Кокса, спрямленная с помощью коэффициентов спрямления рандомизации (статус согласно BO3: 0 против 1–2; наличие или отсутствие метастазов в головном мозге, наличие или отсутствие предыдущей нео/адьювантной химиотерапии), использовалась для оценки отношения рисков для PFS совместно с 95 % ДИ, рассчитанным по критерию Вальда.

[c] На основании спрямленного логарифмического рангового критерия (то же спрямление, что и в случае [b]).

Уровни приемлемого окрашивания при использовании антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) в популяции пациентов, подлежащих диагностике (1778 пациентов, прошедших тестирование с помощью этого анализа), представлены в Таблице 32. Также представлены уровни приемлемых морфологических элементов и приемлемого фоновое окрашивания для микропрепаратов, окрашенных при помощи антитела VENTANA anti-ALK (D5F3). Первая попытка окрашивания методом с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) оказалась неудачной для 122 образцов, в связи с чем была предпринята повторная попытка окрашивания. По завершении этой второй попытки 48 из 122 образцов были признаны окончательно неприемлемыми (1 из-за недействительных результатов контроля серии, 30 из-за неприемлемого качества препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, и 12 из-за неприемлемого результата при отрицательном контроле реагента, 1 из-за неприемлемого фоновое окрашивания, 2 из-за неприемлемого окрашивания фона и морфологических элементов и 2 из-за того, что соответствующее предметное стекло невозможно было оценить с точки зрения ИГХ-метода). Метод с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) показал высокие уровни приемлемости

окрашивания как в первичном окрашивании, так и в окончательном: 93,1 % и 97,3 % соответственно. Окончательный показатель приемлемости окраски фона и морфологических элементов составил 99 % или выше.

**Таблица 32.** Для включения в исследование № 3 проводился скрининг рабочих характеристик первого и окончательного окрашивания с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) для исследуемых образцов NSCLC.

| Подвергшиеся оценке атрибуты окрашивания                                    | Показатель приемлемости, % (n/N) (95 % ДИ) |                                  |
|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------|
|                                                                             | Начальный *                                | Конечный **                      |
| Общий показатель приемлемости результатов окрашивания по ИГХ-методу для ALK | 93,1 % (1656/1778) (91,9–94,2 %)           | 97,3 % (1730/1778) (96,4–98,0 %) |
| Фоновое окрашивание                                                         | 99,0 % (1655/1672) (98,4–99,4 %)           | 99,8 % (1727/1730) (99,5–99,9 %) |
| Морфология                                                                  | 99,0 % (1657/1674) (98,4–99,4 %)           | 99,9 % (1728/1730) (99,6–100 %)  |

\* Первая попытка окрашивания.

\*\* Окончательная попытка окрашивания.

### Исследование клинических результатов приема препарата alectinib

Анализ клинической эффективности антитела VENTANA ALK (D5F3) в качестве диагностического средства для отбора пациентов, которым могло бы помочь лечение препаратом alectinib, опирался на данные многоцентрового, открытого, рандомизированного, контролируемого активным препаратом сравнения исследования фазы 3 (исследование № BO28984) по оценке перорального препарата alectinib. В этом исследовании сравнивали клиническую эффективность и безопасность лечения препаратом alectinib с эффективностью и безопасностью препарата crizotinib у взрослых пациентов в ALK-положительным местно-распространенным или метастатическим NSCLC, ранее не получавших лечение. Антитело VENTANA ALK (D5F3) использовалось для окрашивания в аппарате BenchMark XT для проверки в общей сложности 1239 пациентов на соответствие критериям включения в исследование № BO28984, необходимым условием которого был положительный статус по ALK по данным тестирования в центральной лаборатории. В общей сложности 303 пациента, чьи опухоли оказались ALK-положительными по данным этого анализа, прошли процедуру рандомизации и анализ для оценки эффективности (152 пациента в группе препарата alectinib и 151 — в группе препарата crizotinib). Общие результаты оценки эффективности кратко представлены в Таблице 33. Alectinib продемонстрировал статистически и клинически значимое преимущество перед препаратом crizotinib с 53 % снижением риска по PFS согласно оценке исследователя (OP 0,47, 95 % ДИ 0,34–0,65;  $p < 0,0001$ ) и 50 % снижением риска по PFS согласно оценке Независимого наблюдательного комитета (IRC) (OP 0,50, 95 % ДИ 0,36–0,7;  $p < 0,0001$ ) у пациентов, отобранных с применением антитела VENTANA ALK (D5F3). Медианное значение PFS, согласно оценке исследователя, в группе терапии препаратом alectinib не определялось, а по оценке IRC показатель составил 25,7 месяца (95 % ДИ 19,9–граница не определена) и 10,4 месяца (95 % ДИ 7,7–14,6) в группах лечения препаратами alectinib и crizotinib соответственно.

**Таблица 33.** Клиническая эффективность лечения препаратами alectinib или crizotinib (выживание без прогрессирования заболевания) для пациентов, включенных в исследование № BO28984.

| Выживание без прогрессирования заболевания по оценке исследователя | Alectinib (N = 152) | Crizotinib (N = 151) |
|--------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------|
| Медианное значение, месяцы (95 % ДИ) <sup>[a]</sup>                | HO (17,7–HO %)      | 11,1 (9,1–13,1 %)    |
| ОР (95 % ДИ) <sup>[b]</sup>                                        | 0,47 (0,34–0,65 %)  |                      |
| p-значение <sup>[c]</sup>                                          | < 0,0001            |                      |
| Выживание без прогрессирования заболевания по оценке IRC           | Alectinib (N = 152) | Crizotinib (N = 151) |
| Медианное значение, месяцы (95 % ДИ) <sup>[a]</sup>                | 25,7 (19,9–HO %)    | 10,4 (7,7–14,6 %)    |
| ОР (95 % ДИ) <sup>[b]</sup>                                        | 0,50 (0,36 –0,70 %) |                      |
| p-значение <sup>[c]</sup>                                          | < 0,0001            |                      |

ОР — отношение рисков; ДИ — доверительный интервал; IRC — Независимый наблюдательный комитет (Independent Review Committee); HO — оценка невозможна.

[a] Оценка по методу Каплана-Мейера.

[b] Отношение рисков оценивалось IRC по методу регрессии Кокса со стратификацией по расе (азиатское и неазиатское происхождение) и наличию метастазов в ЦНС на исходном уровне (наличие/отсутствие) в качестве ковариат.

[c] На основании спрямленного логарифмического рангового критерия (то же спрямление, что и в случае [b]).

Уровни приемлемого окрашивания при использовании антитела VENTANA ALK (D5F3) в популяции пациентов, подлежащих диагностике (1239 пациентов, прошедших тестирование с помощью этого анализа) были сопоставимы с результатами исследования A2301.

### Закключение

Антитело VENTANA anti-ALK (D5F3) позволяет получать воспроизводимое окрашивание при определении статуса клинической экспрессии ALK в тканях на аппаратах BenchMark ULTRA, BenchMark XT и BenchMark GX. Бинарный алгоритм оценки характеризуется высокой степенью повторяемости среди экспертов. Результаты при этом согласуются с результатами, получаемыми с помощью набора Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit в том, что касается статуса экспрессии ALK. Исследование с применением антитела VENTANA anti-ALK (D5F3) может использоваться для выявления пациентов, подходящих для лечения препаратами XALKORI® (crizotinib), ZYKADIA® (ceritinib) или ALECENSA® (alectinib).

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Kutok JL, Aster JC, et al. Molecular biology of anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2002;20(17):3691-3702.
- Iwahara T, et al. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene.* 1997;14:439-49.
- Soda M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007;448(7153):561-66.
- Inamura K, et al. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. *J Thorac Oncol.* 2008;3(1):13-17.
- Choi YL, et al. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2008;68(13):4971-6.
- Koivunen JP, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(13):4275-83.
- Shimura K, et al. EML4-ALK fusion transcripts, but no NPM-, TPM3-, CLTC-, ATIC-, or TFG-ALK fusion transcripts, in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer.* 2008;61:163-9.
- Takeuchi K, et al. Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res.* 2008;14(20):6618-24.
- Shaw AT, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol.* 2009;27(26):4247-53.
- Yi ES, et al. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol.* 2011;6(3):459-65.

- McLeer-Florin A, et al. Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study. *J of Thorac Oncol.* 2012;7(2):348-54.
- Christensen JG, et al. Cyto-reductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(12 Pt 1):3314-22.
- Yamazaki S, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of crizotinib for anaplastic lymphoma kinase inhibition and antitumor efficacy in human tumor xenograft mouse models. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;340(3):549-57.
- XALKORI package insert. Pfizer. Document ID:6427427a-821b-48b4-8f06-0477f0ae4e36. LAB-0441-6.0 June 2014
- ZYKADIA package insert Novartis. Document ID:T2015-114/T2015-115. July 2015.
- H Sakamoto, et al. CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant. *Cancer Cell.* 2011;19(5):679-90.
- Kodama T, et al. Antitumor activity of the selective ALK inhibitor alectinib in models of intracranial metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014;75(5):1023-28.
- Gadgeel S, et al. Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose finding portion of a phase 1/2 study. *Lancet Oncol.* 2014;15(10):1119-28.
- Shaw A, et al. Alectinib in ALK-positive, crizotinib-resistant, non-small-cell lung cancer: a single-group, multicenter, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(2):234-42.
- ALECENSA package insert
- Galetta D, et al. The emerging role of ALK inhibitors in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2012 Suppl 2:S545-54.
- Jokoji R, et al. Combination of morphological feature analysis and immunohistochemistry is useful for screening of EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma. *J Clin Pathol.* 2010;63(12):1066-70.
- Mino-Kenudson M, et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res.* 2010;16(5):1561-71.
- Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and practice of Histotechnology*, 2nd edition. St. Louis: The C.V. Mosby Company; 1980.
- Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
- Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances*. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
- NordicQC: Nordic Immunohistochemical Quality Control Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) (lung protocol). Assessment Run 39 2013. [http://www.nordicqc.org/Run-39-B16-H4/Assessment/Run39\\_ALK.pdf](http://www.nordicqc.org/Run-39-B16-H4/Assessment/Run39_ALK.pdf). 07-12-2013. Accessed February 26, 2014.
- College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2011.
- CLSI. *Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition*. CLSI document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.
- Herman GE, et al. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem.* 1991;66(4):194-9.
- Omata M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol.* 1980;73(5):626-32.
- Nadji M, et al. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med.* 1983;14:767.

#### ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW и логотип VENTANA являются торговыми знаками компании Roche.

Все остальные товарные знаки являются собственностью соответствующих владельцев.

© Ventana Medical Systems, Inc., 2017.

Реализуется по лицензии



#### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
D-68305 Mannheim  
Germany



[www.ventana.com](http://www.ventana.com)

Уполномоченный представитель  
в Республике Беларусь:  
ООО "Алмазмед"  
220040, г. Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.

## VENTANA PD-L1 (SP142) Assay

**REF** 741-4860

08008540001

**IVD**  $\Sigma$  50

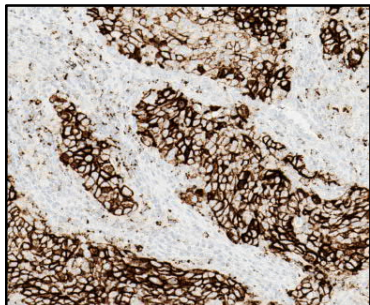


**Рисунок 1. PD-L1 Экспрессия при немелкоклеточном раке легкого.**

### ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Анализ VENTANA PD-L1 (SP142) Assay предназначен для иммуногистохимической оценки содержания лиганда-1 белка программируемой гибели клеток (PD-L1) в опухолевых клетках и иммунокомпетентных клетках, инфильтрирующих ткань опухоли, в фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) срезах опухолевой ткани, окрашенных с помощью наборов OptiView DAB IHC Detection Kit и OptiView Amplification Kit на аппарате VENTANA BenchMark IHC/ISH.

Определение статуса PD-L1 представляет собой специфичное показание, оценка статуса основана либо на соотношении области опухоли с экспрессирующими PD-L1 иммунокомпетентными клетками, инфильтрирующими ткань опухоли (%IC), любой интенсивности, либо на процентном соотношении экспрессирующих PD-L1 опухолевых клеток (%TC) любой интенсивности.

Анализ VENTANA PD-L1 (SP142) Assay предназначен для определения пациентов, которым показано лечение препаратами, перечисленными в Таб. 1 соответствии с утвержденными терапевтическими показаниями, указанными на маркировке.

Проведение анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay может быть ассоциировано с увеличением пользы для пациента при лечении, которое указано в Таб. 2, в соответствии с показаниями и допускаемой верхней границей концентрации опухолевого маркера.

**Таб. 1. VENTANA PD-L1 (SP142) Assay сопутствующие диагностические показания.**

| Показание               | Терапия   | Допускаемая верхняя граница концентрации опухолевого маркера |
|-------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------|
| Уротелиальная карцинома | TECENTRIQ | ≥ 5 % IC                                                     |

**Таб. 2. VENTANA PD-L1 (SP142) Assay дополнительные диагностические показания.**

| Показание | Терапия   | Допускаемая верхняя граница концентрации опухолевого маркера |
|-----------|-----------|--------------------------------------------------------------|
| NSCLC     | TECENTRIQ | ≥ 50 % TC или ≥ 10 % IC                                      |
|           |           | ≥ 1 % TC или ≥ 1 % IC                                        |

Клинические результаты, связанные с определением экспрессии PD-L1 смотрите в разделе «Исследование клинических результатов» на маркировке изделия для соответствующих показаний и допускаемой верхней границей концентрации опухолевого маркера.

Результаты должны интерпретироваться квалифицированным патоморфологом с учетом данных гистологического исследования, соответствующих клинических данных и сравнения с контрольными образцами.

Этот продукт предназначен для диагностики in vitro (IVD).

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ИНФОРМАЦИЯ

VENTANA PD-L1 (SP142) Assay представляет собой иммуногистохимический анализ с использованием первичного кроличьего моноклонального анти-PD-L1 для распознавания белка PD-L1. Этот анализ был разработан совместными усилиями компаний Roche/Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana) и Roche/Genentech для выявления пациентов, которые вероятнее всего ответят на лечение препаратом TECENTRIQ®.

PD-L1 — это трансмембранный белок, который подавляет иммунные ответы, связываясь с двумя рецепторами белка programmed death-1 (PD-1) и B7.1. PD-1 — это ингибиторный рецептор, который экспрессируется на Т-лимфоцитах после активации Т-лимфоцитов и поддерживается в состояниях хронической стимуляции, например при хронической инфекции или раке.<sup>1</sup> Связывание PD-L1 с PD-1 ингибирует пролиферацию Т-лимфоцитов, выработку цитокинов и цитолитическую активность, приводя к функциональной инактивации или истощению Т-лимфоцитов. B7.1 — молекула, экспрессируемая на антиген-презентирующих клетках и активированных Т-лимфоцитах. Связывание PD-L1 с B7.1. на Т-лимфоцитах и антиген-презентирующих клетках может вызывать подавление иммунных ответов, включая ингибирование активации Т-лимфоцитов и выработки цитокинов.<sup>2</sup> Экспрессия PD-L1 была отмечена в иммунокомпетентных клетках и злокачественных клетках, и было выявлено, что aberrантная экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках (TC) препятствует функционированию противоопухолевого иммунитета, приводя к ускользанию от механизмов иммунологического надзора.<sup>1,3</sup> Таким образом, прерывание метаболического пути PD-L1/PD-1 представляет собой перспективную стратегию укрепления опухолеспецифического Т-клеточного иммунитета, подавляемого экспрессией PD-L1 в опухолевом микроокружении. Имеются сведения о взаимосвязи между экспрессией PD-L1 в TC или иммунокомпетентных клетках, инфильтрирующих ткань опухоли (IC) и улучшением клинических показателей при использовании ингибиторов сигнального пути PD-L1/PD-1 для различных типов злокачественных опухолей.<sup>3-9</sup>

Атезолизумаб представляет собой препарат Fc, гуманизированное моноклональное антитело, которое связывается с PD-L1 и блокирует взаимодействие между рецепторами PD-1 и B7.1. Атезолизумаб является негликозилированным иммуноглобулином IgG1 kappa с молекулярной массой, составляющей 145 кДа.

### ПРИНЦИП ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

В состав VENTANA PD-L1 (SP142) Assay входит первичное кроличье моноклональное антитело, которое связывается с PD-L1 в срезах тканей после заливки парафином. Специфическое антитело можно визуализировать с использованием набора OptiView DAB IHC Detection Kit (№ по каталогу 760-700/06396500001), после чего используется OptiView Amplification Kit (№ по каталогу 760-099/06396518001 (50 тестов) или 860-099/06718663001 [250 тестов]). Дополнительную информацию см. на листках-вкладышах соответствующего набора OptiView DAB IHC Detection Kit или OptiView Amplification Kit.

### РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

VENTANA PD-L1 (SP142) Assay содержит реагент в количестве, достаточном для выполнения 50 тестов.

Один дозатор VENTANA PD-L1 (SP142) Assay объемом 5 мл содержит приблизительно 36 мкг кроличьего моноклонального антитела.

Антитела растворены в физиологическом растворе с трис-буфером в концентрации 0,05 моль/л, содержащем ЭДТА 0,01 моль/л, 0,05 % Brij-35 с 0,3 % белка-носителя и 0,05 % азида натрия в качестве консерванта.

Общая концентрация белка в реагенте составляет приблизительно 3 мг/мл. Концентрация специфических антител составляет около 7 мкг/мл.

VENTANA PD-L1 (SP142) Assay содержит рекомбинантные кроличьи моноклональные антитела, полученные в форме очищенного супернатанта клеточной культуры.

В соответствующем руководстве по интерпретации содержатся подробные инструкции по интерпретации окрашивания VENTANA PD-L1 (SP142) Assay в специфических условиях.

- VENTANA PD-L1 (SP142) Assay Interpretation Guide для уротелиальной карциномы (номер по каталогу 1015704EN)
- VENTANA PD-L1 (SP142) Assay Interpretation Guide для ткани NSCLC ≥ 50 % TC или ≥ 10 % IC пошаговый алгоритм оценки (номер по каталогу 1015703EN)

- VENTANA PD-L1 (SP142) Assay Interpretation Guide для ткани NSCLC  $\geq 1\%$  TC или  $\geq 1\%$  IC пошаговый алгоритм оценки (номер по каталогу 1015654EN)

На листке-вкладыше соответствующего набора для обнаружения VENTANA можно найти более подробное описание принципов действия; материалов и методов; сбора образцов тканей и подготовки к анализу; процесса контроля качества; принципов поиска и устранения проблем; результатов; общих ограничений.

### НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В КОМПЛЕКТ

В комплект поставки не входят красящие реагенты, например наборы для обнаружения VENTANA, а также вспомогательные компоненты, в том числе микропрепараты для отрицательного и положительного контроля.

Продукты, перечисленные в листке-вкладыше, могут быть недоступны в некоторых странах. Проконсультируйтесь с местным представителем службы поддержки.

Для окрашивания могут потребоваться следующие реагенты и материалы.

1. Материал доброкачественных тканей миндалин человека для использования в качестве контрольной ткани.
2. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (№ по каталогу 790-4795/06683380001)
3. Предметные стекла для микроскопа (с положительным зарядом).
4. Этикетки со штрихкодом.
5. Ксилол (гистологической степени очистки).
6. Этанол или спиртосодержащий реагент (гистологической степени очистки).
  - 100 % раствор: неразбавленный этанол или спиртосодержащий реагент.
  - 95 % раствор: смесь 95 частей этанола или спиртового реагента с 5 частями деионизированной воды.
  - 80 % раствор: смесь 80 частей этанола или спиртового реагента с 20 частями деионизированной воды.
7. Деионизированная или дистиллированная вода.
8. OptiView DAB IHC Detection Kit (№ по каталогу 760-700/06396500001).
9. OptiView Amplification Kit (№ по каталогу 760-099/06396518001 [на 50 тестов] или 860-099 / 06718663001 [на 250 тестов]).
10. EZ Prep Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-102/05279771001).
11. Reaction Buffer Concentrate (10X) (№ по каталогу 950-300/05353955001).
12. LCS (Predilute) (№ по каталогу 650-010/05264839001) для аппаратов BenchMark XT и GX.
13. ULTRA LCS (Predilute) (№ по каталогу 650-210/05424534001) для аппарата BenchMark ULTRA.
14. Cell Conditioning Solution (CC1) (№ по каталогу 950-124/05279801001) для аппаратов BenchMark XT и GX.
15. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (№ по каталогу 950-224/05424569001) для аппарата BenchMark ULTRA.
16. Контрастное окрашивание Hematoxylin II (№ по каталогу 790-2208/05277965001).
17. Bluing Reagent (№ по каталогу 760-2037/05266769001).
18. Постоянная гистологическая среда для заливки образцов (PermOUNT Fisher № по каталогу SP15-500; или эквивалентная).
19. Покровное стекло (для помещения образцов ткани под стекло, например, VWR № по каталогу 48393-060).
20. Автоматический аппарат для заключения под покровное стекло (например, Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper).
21. Световой микроскоп.
22. Гигроскопические салфетки.

### ХРАНЕНИЕ

После получения препарата и пока он не используется, его следует хранить при температуре 2–8°C. Не замораживать.

Для обеспечения надлежащей сохранности реагента и стабильности антител после каждого использования необходимо закрывать флакон-дозатор крышечкой и сразу ставить его в холодильник в вертикальном положении.

На каждом флаконе-дозаторе с раствором антител указан срок годности. При соблюдении условий хранения реагент остается стабильным до даты, указанной на этикетке. Не использовать реагент после истечения срока годности.

### ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

При использовании наборов для обнаружения VENTANA и аппаратов BenchMark IHC/ISH данное первичное антитело можно применять для окрашивания подвергшихся стандартной обработке, фиксированных формалином и залитых в парафин срезов тканей. Необходимо использовать 10 % нейтральный буферный формалин (NBF) в качестве фиксатора, при этом тканевые срезы должны находиться в формалине не менее 6 часов, но и не более 72 часов. Если продолжительность фиксации составит менее 6 часов, окрашивание PD-L1 может быть утрачено. Используемое количество NBF должно составлять от 15 до 20 объемов ткани. За 24 часа фиксатор проникает в плотную ткань не более чем на 2–3 мм, а в пористую ткань — не более чем на 5 мм. Фиксирование следует проводить при комнатной температуре (15–25 °C).<sup>10, 11</sup>

При обработке образцов такими фиксаторами, как спирт-формалин-уксусная кислота (AFA), фиксатором PREFER и другими спиртосодержащими фиксаторами наблюдалось отсутствие специфического окрашивания на PD-L1 при любом протестированном времени фиксации (1–72 часа). Поэтому их использование для данного метода не рекомендуется. Подробное обсуждение того, каким образом подготовка образца влияет на интенсивность окрашивания PD-L1, содержится в Руководствах по интерпретации.

Необходимо получить срезы толщиной приблизительно 4 мкм и нанести их на положительно заряженные предметные стекла. Микропрепараты следует немедленно окрасить, так как антигенность срезов ткани со временем может уменьшаться, и ухудшается в течение 3 месяцев после их получения путем приготовления срезов из парафинового блока для образцов уротелиальной карциномы и в течение 2 месяцев для образцов немелкоклеточной карциномы легких (NSCLC) и образцов небных миндалин (дополнительная информация приведена в руководствах по интерпретации и в разделе «Рабочие характеристики», следующем далее).

### ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для диагностики in vitro (IVD).
2. Только для профессионального использования.
3. Обладающие положительным электрическим зарядом предметные стекла могут быть подвержены неблагоприятным воздействиям со стороны окружающей среды, вследствие чего окрашивание любыми иммуногистохимическими методами приведет к неудовлетворительным результатам, например вследствие недостаточного количества первичного антитела или контрастного окрашивания в тканях. Запросите у своего представителя компании Roche копию документа "Impacts of Environmental Stresses on IHC Positively Charged Slides" для того, чтобы лучше понять принцип использования предметных стекол такого типа.
4. Материалы человеческого или животного происхождения следует считать биологически опасными материалами и утилизировать, соблюдая все необходимые меры предосторожности.
5. Избегайте контакта реагентов с глазами и слизистыми оболочками. При попадании реагентов на чувствительные участки промойте пораженные участки достаточным количеством воды.
6. Не допускайте микробного загрязнения реагентов, поскольку это может привести к получению ошибочных результатов.
7. Проконсультируйтесь с местными и (или) государственными органами в отношении рекомендованного способа утилизации.
8. Дополнительная информация о безопасности содержится в паспорте безопасности продукта и руководстве по условным обозначениям и фразам риска на сайте [www.ventana.com](http://www.ventana.com).

### ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

Анализ VENTANA PD-L1 (SP142) Assay предназначен для использования на аппаратах BenchMark IHC/ISH в комбинации с Rabbit Monoclonal Negative Control Ig, OptiView DAB IHC Detection Kit, OptiView Amplification Kit и вспомогательными реагентами. Анализ VENTANA PD-L1 (SP142) Assay должен выполняться в соответствии со специфической методикой окрашивания. Рекомендуемый протокол окрашивания и необходимая процедура окрашивания приведены в Таб. 3. Любое отклонение от рекомендованных процедур проведения теста может привести к тому, что ожидаемые результаты будут недостоверны. Необходимо использовать надлежащие контрольные образцы и документировать их использование. Пользователи, которые отклоняются от рекомендованных процедур проведения

теста, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.

Данное антитело оптимизировано для инкубации в течение конкретных периодов времени, однако пользователю необходимо провести валидацию результатов, полученных с использованием данного реагента.

Параметры автоматических процедур могут быть отображены на экране, напечатаны и отредактированы согласно процедуре, описанной в руководстве пользователя, прилагаемом к соответствующему аппарату. Подробная информация о процедурах иммуногистохимического окрашивания содержится на листке-вкладыше соответствующего набора для обнаружения VENTANA.

**Таб. 3.** Рекомендованный протокол окрашивания и необходимые методики окрашивания для анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay и материала Rabbit Monoclonal Negative Control Ig с наборами OptiView DAB IHC Detection Kit и OptiView Amplification Kit на аппаратах BenchMark ULTRA, BenchMark XT или BenchMark GX.

| Процедура окрашивания:                                                           |                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| ULTRA VENTANA PDL1 (SP142)<br>XT VENTANA PDL1 (SP142)<br>GX VENTANA PDL1 (SP142) |                                                                      |
| Этапы протокола                                                                  | Ввод параметров                                                      |
| Прогрев                                                                          | Дополнительно                                                        |
| Антитело (первичное)                                                             | VENTANA PD-L1 (SP142) Требуется<br>или<br>Negative Control Требуется |
| Контрастное окрашивание                                                          | Hematoxylin II, 4 минуты                                             |
| Обработка после контрастного окрашивания                                         | Bluing, 4 минуты                                                     |

## ПРОЦЕДУРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

### Rabbit Monoclonal Negative Control Ig

Для облегчения интерпретации результатов необходимо использовать соответствующий микропрепарат для реагента для отрицательного контроля с каждым образцом. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig, антитело для отрицательного контроля реагента, специально подобрано для данного анализа и используется вместо первичного антитела для оценки неспецифического окрашивания. Продолжительность окрашивания по методике с отрицательным контролем реагента должна равняться продолжительности инкубации с первичным антителом. Использование другого реагента отрицательного контроля или ошибки при использовании рекомендуемого реагента отрицательного контроля могут привести к получению ошибочных результатов.

### Контрольная ткань миндалин

Препарат контрольной ткани должен включаться в каждый цикл окрашивания. В качестве контроля необходимо использовать аттестованный материал доброкачественной ткани миндалин человека. Контрольный образец ткани следует зафиксировать как можно скорее и обработать способом, идентичным способу обработки ткани пациента. С помощью такой ткани можно контролировать все этапы анализа, начиная от подготовки ткани и заканчивая окрашиванием. Ткани миндалин содержат окрашиваемые и неокрашиваемые по методике определения белка PD-L1 элементы и, следовательно, пригодны для использования в качестве контрольной ткани. Окрашиваемые и неокрашиваемые тканевые структуры анализируются для подтверждения правильности проведения анализа.

Надлежащее окрашивание структур ткани небных миндалин описано в Таб. 4 и в руководствах по интерпретации.

### Верификация анализа

Прежде чем использовать антитела и красители в диагностических процедурах, следует установить специфичность антител путем проверки реактива антитела на серии тканей с известными результатами иммуногистохимического анализа (IHC), т. е. на тканях, для которых известно, какие элементы окрашиваются, а какие не окрашиваются по методике определения белка PD-L1 (см. Процедуры контроля качества, описанные выше в данном разделе вкладыша к продукту, и рекомендации по контролю качества документов College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist<sup>12</sup> или CLSI Approved Guideline<sup>13</sup>).

Эти процедуры контроля качества необходимо повторять для каждой новой партии антител или при каждом изменении параметров анализа. Для верификации анализа можно использовать ткани уротелиальной карциномы и немелкоклеточной карциномы легких (NSCLC) с известным статусом PD-L1, а также ткани доброкачественных опухолей небных миндалин человека.

## РИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Автоматизированная методика иммуногистохимического окрашивания VENTANA обеспечивает осаждение коричневого продукта реакции DAB на участках расположения антигена, выявленных с помощью антител VENTANA PD-L1 (SP142) Assay. Окрашенные микропрепараты интерпретируются квалифицированным патоморфологом с использованием средств световой микроскопии. Перед интерпретацией полученных результатов квалифицированный патоморфолог, имеющий опыт применения иммуногистохимических методик, должен оценить тканевые контроли и приемлемость качества окраски микропрепарата.

### Контрольная интерпретация ткани миндалин

Окрашенный контрольный микропрепарат ткани миндалин осматривают для подтверждения надлежащего окрашивания. Наличие окрашивания PD-L1 внутри макрофагов и лимфоцитов в герминативных центрах и в сетчатом эпителии крипт миндалин подтверждает окрашивание положительных тканевых элементов. Отсутствие окрашивания в поверхностном плоском эпителии и присутствие неокрашенных иммунных клеток в межфолликулярных областях миндалин подтверждает неокрашивание отрицательных тканевых элементов. Критерии приемлемости приведены в Таб. 4. (дополнительная информация приведена в руководствах по интерпретации.)

Если в ходе изучения контрольного микропрепарата не выявлены признаки надлежащего окрашивания, все результаты анализа образцов пациента следует считать непригодными для оценки. В этом случае требуется выполнить повторное окрашивание.

**Таб. 4.** Критерии оценки контрольной ткани миндалин.

| Приемлемо                                                                                                                                                                                          | Недопустимый результат                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Элементы положительного контроля ткани: умеренное или сильное окрашивание на PD-L1, наблюдаемое в лимфоцитах и макрофагах в зародышевых центрах и диффузное окрашивание в сетчатом эпителии крипт. | Чрезмерное неспецифическое окрашивание фона, затрудняющее идентификацию PD-L1-положительных клеток.                               |
| Элементы отрицательного контроля ткани: иммунокомпетентные клетки, отрицательные на PD-L1, в интерфолликулярных зонах с отрицательным результатом в поверхностных слоях плоского эпителия.         | Слабое окрашивание PD-L1 или его отсутствие в лимфоцитах и макрофагах в герминативных центрах и клетках сетчатого эпителия крипт. |

### Реагент отрицательного контроля

Неспецифическое окрашивание, в случае его наличия, будет иметь диффузный характер и может быть оценено с использованием микропрепарата отрицательного контроля реагента, окрашенного Rabbit Monoclonal Negative Control Ig. Для интерпретации результатов окрашивания следует использовать интактные клетки, так как клетки с признаками некроза или дегенерации часто демонстрируют неспецифическое окрашивание. Если наблюдается чрезмерное фоновое окрашивание, результаты для исследуемого образца считаются недостоверными. Примеры фонового окрашивания при данном анализе представлены в руководствах по интерпретации.

### Ткань пациента

Опухолевые клетки (TC) оценивают по доле (в процентах) опухолевых клеток с наличием явного окрашивания мембраны PD-L1 любой интенсивности. Иммунокомпетентные клетки, инфильтрирующие ткань опухоли (IC), оцениваются в соотношении области опухоли, в том числе вызванные внутриопухолевые и продолжительной перитуморальной стромой с окрашиванием PD-L1 IC любой интенсивности. Ткань пациента должна оцениваться в соответствии со специфичным для определенного показателя алгоритмом оценки анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay, представленного в разделе «Рабочие характеристики» для

данного показателя. Дополнительные инструкции и соответствующие изображения приведены в специфичном для определенного показателя руководстве по интерпретации.

## ОБЩИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

- Иммуногистохимический анализ является многоступенчатым диагностическим процессом, для выполнения которого сотрудники должны пройти специальную подготовку по выбору необходимых реактивов и тканей, способов фиксации, обработки и изготовления иммуногистохимического препарата, а также интерпретации результатов окрашивания.
- На результаты окрашивания ткани влияет обращение с тканью и подготовка ее к окрашиванию. Ненадлежащая фиксация, замораживание, оттаивание, промывка, просушка, нагрев, микротомирование или загрязнение другими тканями или жидкостями может привести к появлению сторонних частиц, захвату антитела или получению ложноотрицательных результатов. Различия в методах фиксации и заливки или неоднородность свойств ткани могут стать причиной противоречивости получаемых результатов.
- Избыточное или неполное контрастное окрашивание может негативно повлиять на правильность интерпретации результатов.
- Клиническая интерпретация любого положительного окрашивания либо его отсутствия должна проводиться с учетом данных истории болезни, морфологии и других гистопатологических критериев. Клиническая интерпретация результатов окрашивания либо его отсутствия должна также дополняться морфологическими исследованиями, контролями системного уровня и результатами других диагностических тестов. Для верной интерпретации результатов окрашивания препарата квалифицированный патоморфолог обязан знать характеристики используемых антител, реагентов и методов. Окрашивание должно проводиться в сертифицированной и лицензированной лаборатории под контролем патоморфолога, ответственного за просмотр окрашенных микропрепаратов и обеспечение достоверности положительных и отрицательных контролей.
- Антитела и реагенты компании Ventana Medical Systems, Inc. имеют оптимальную концентрацию для применения в соответствии с прилагающейся инструкцией. Любое отклонение от рекомендованных процедур проведения теста может привести к тому, что ожидаемые результаты будут недостоверны. Необходимо использовать надлежащие контрольные образцы и документировать их использование. Пользователи, которые отклоняются от рекомендованных процедур проведения теста, должны принимать на себя всю ответственность за интерпретацию результатов пациента.
- Данный продукт не предназначен для использования в проточной цитометрии; технические характеристики не были определены.
- При использовании реагентов с тканями, которые ранее не тестировались, могут возникнуть неожиданные реакции. Возможность протекания непредвиденных реакций даже в исследованных группах тканей нельзя полностью исключить ввиду биологической вариабельности экспрессии антигенов в неоплазмах или других патологических тканях.<sup>14,15</sup>
- Ткани пациентов с гепатитом В, содержащие HBs-антиген (HBsAg), могут неспецифически окрашиваться пероксидазой хрена.<sup>16</sup>
- Ложноположительные результаты могут наблюдаться вследствие неспецифического (не иммунологического) связывания белков или продуктов реакции субстрата. Они также могут быть связаны с псевдопероксидазной активностью (эритроциты), эндогенной пероксидазной активностью (цитохром С), а также эндогенным биотином (например, печень, головной мозг, молочные железы, почки), в зависимости от типа иммунохимического окрашивания.<sup>17</sup>
- Как и в любом иммуногистохимическом тесте, отрицательный результат означает, что антиген не обнаружен. Это не равнозначно отсутствию антигена в анализируемых клетках или тканях.

## СИ ОСОБЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ IC

- Анализ VENTANA PD-L1 (SP142) Assay зарегистрирован исключительно для использования на аппаратах BenchMark IHC/ISH с OptiView DAB IHC Detection Kit и OptiView Amplification Kit и не зарегистрирован для иных наборов для обнаружения или аппаратов.
- Образцы, взятые у пациентов, следует окрашивать с применением реагента Rabbit Monoclonal Negative Control Ig. Другие реагенты для отрицательного контроля непригодны для использования в данном анализе.

- Этот анализ не проходил валидацию для использования с цитологическими образцами или декальцинированными образцами кости.
- Окрашивание ткани пациента необходимо выполнить в течение 2 месяцев с момента приготовления среза из блока ткани для NSCLC и тканей небных миндалин и в течение 3 месяцев для тканей уротелиальной карциномы. Для срезов, хранившихся при комнатной температуре более длительный период времени, а затем использованных в анализе VENTANA PD-L1 (SP142) Assay, наблюдалась потеря окрашиваемости.
- В соответствии с рекомендациями, образцы следует фиксировать в течение 6–72 часов в 10 % NBF. Использование периодов и средств фиксации, отличных от рекомендованных, может привести к получению ложноотрицательных результатов. Такие фиксаторы, как AFA, PREFER и другие фиксаторы на спиртовой основе показали потерю специфического окрашивания белка PD-L1. (Дополнительная информация приведена в руководствах по интерпретации.)
- Артефакты, в том числе пятна DAB, пятна непрокрашивания, точки DAB и (или) крапчатость, могут потребовать повторного окрашивания, если они мешают интерпретации результата анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay. Для проверки приемлемости уровня фонового окрашивания всегда сравнивайте препараты, окрашенные на PD-L1, с отрицательным контролем реагента. (Дополнительная информация приведена в руководствах по интерпретации.)
- Случайные точки DAB наблюдались на препаратах тканевого контроля доброкачественных миндалин, тканях мозжечка и яичек, а очаговое ядерное окрашивание отмечено в нормальных тканях поджелудочной железы (ацинарных клетках) и гипофиза (Таб. 5); однако оценка ядерного окрашивания не включена в алгоритм оценки окрашивания на VENTANA PD-L1 (SP142) Assay.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Были проведены испытания специфичности и чувствительности окрашивания, влияния толщины ткани, повторяемости и промежуточной прецизионности, а также испытания прецизионности заключений эксперта, межлабораторной воспроизводимости и клинических исходов. Результаты этих испытаний представлены в следующем разделе.

### Замечания общего порядка по анализу

Если не указано иное, расчет двустороннего 95 % доверительного интервала (CI) для оценок согласованности для всех исследований (за исключением исследований клинической эффективности) производится с использованием метода перцентильных бутстрапов из 2000 образцов бутстрапов. Если оценка положительной процентной согласованности (PPA), отрицательной процентной согласованности (NPA) или общей процентной согласованности (OPA) составляет 0 % или 100 %, то для расчета 95 % доверительных интервалов использовался метод оценки Уилсона. Если оценка средней положительной согласованности (APA) и средней отрицательной согласованности (ANA) составляет 0 % или 100 % для парного сравнения, то использовался метод оценки Уилсона для расчета 95 % доверительных интервалов.

### Специфичность

Наборы различных нормальных тканей окрашивали посредством VENTANA PD-L1 (SP142) Assay и оценивали на наличие окрашивания иммунных клеток (любое окрашивание иммунных клеток любой интенсивности), как описано в Таб. 5.

Таб. 5. Специфичность VENTANA PD-L1 (SP142) Assay определяли путем окрашивания зафиксированных формалином и залитых в парафин здоровых тканей.

| Ткань           | № положительно */ всего случаев | Ткань            | № положительно */ всего случаев |
|-----------------|---------------------------------|------------------|---------------------------------|
| Надпочечник     | 1/3                             | Мышца, сердечная | 0/3                             |
| Мочевой пузырь  | 3/36 **                         | Мышца, скелетная | 0/2                             |
| Молочная железа | 1/3                             | Костный мозг     | 0/2                             |

| Ткань            | № положительно */ всего случаев | Ткань                 | № положительно */ всего случаев |
|------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| Мозжечок         | 0/3 ***                         | Нерв, периферический  | 0/3                             |
| Головной мозг    | 0/3                             | Яичник                | 0/3                             |
| Шейка матки      | 0/2                             | Поджелудочная железа  | 0/3 ****                        |
| Толстая кишка    | 2/3                             | Паращитовидная железа | 0/2                             |
| Эндометрий       | 2/3                             | Простата              | 0/3                             |
| Пищевод          | 0/3                             | Слюнная железа        | 2/3                             |
| Гипофиз          | 0/3 ****                        | Кожа                  | 0/3                             |
| Кишечник, тонкий | 1/3                             | Селезенка             | 3/3                             |
| Почка            | 2/3                             | Желудок               | 0/3                             |
| Язычная железа   | 0/1                             | Яичко                 | 0/3 ***                         |
| Печень           | 0/3                             | Вилочковая железа     | 3/3                             |
| Легкое           | 1/25                            | Щитовидная железа     | 1/3                             |
| Лимфоузел        | 3/3                             | Миндалины             | 3/3 ***                         |
| Мезотелий        | 0/3                             |                       |                                 |

\* Окрашивание иммунокомпетентных клеток любой интенсивности.

\*\* Очаговое окрашивание иммунокомпетентных клеток.

\*\*\* Очаговые точки DAB были обнаружены в 1 из 3 образцов ткани мозжечка и в 1 из 3 образцов ткани яичка, а также в контрольном образце здоровой ткани миндалин.

\*\*\*\* Ядерное окрашивание было выявлено в 1/3 тканей поджелудочной железы и 1/3 тканей гипофиза.

### Чувствительность

Оценка набора опухолевых тканей на окрашивание иммунокомпетентных и опухолевых клеток посредством VENTANA PD-L1 (SP142) Assay выполнена согласно описанию в Таб. 6.

**Таб. 6.** Чувствительность окрашивания реагентом VENTANA PD-L1 (SP142) Assay определяли путем тестирования зафиксированных формалином и залитых в парафин препаратов различных опухолевых тканей.

| Источник        | Патология                   | Кол-во положительных образцов */общее кол-во образцов |                   |
|-----------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------|
|                 |                             | Иммуно-компетентные клетки                            | Опухолевые клетки |
| Брюшная полость | Злокачественная мезотелиома | 1/1                                                   | 0/1               |
| Спина           | Нейрофиброма                | 1/1                                                   | 0/1               |

| Источник         | Патология                                       | Кол-во положительных образцов */общее кол-во образцов |                   |
|------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------|
|                  |                                                 | Иммуно-компетентные клетки                            | Опухолевые клетки |
| Мочевой пузырь   | Лейомиосаркома низкой степени злокачественности | 0/1                                                   | 0/1               |
| Мочевой пузырь   | Переходноклеточная карцинома                    | 1/1                                                   | 0/1               |
| Кость            | Остеосаркома                                    | 0/1                                                   | 0/1               |
| Молочная железа  | Инвазивная протоковая карцинома                 | 1/2                                                   | 0/2               |
| Молочная железа  | Интрадуктальная карцинома с ранним инфильтратом | 1/1                                                   | 0/1               |
| Головной мозг    | Глиобластома                                    | 1/1                                                   | 0/1               |
| Головной мозг    | Атипичная менингиома                            | 0/1                                                   | 0/1               |
| Головной мозг    | Злокачественная эпендимомы                      | 0/1                                                   | 0/1               |
| Головной мозг    | Олигодендроглиома                               | 0/1                                                   | 0/1               |
| Толстая кишка    | Аденокарцинома                                  | 1/1                                                   | 0/1               |
| Толстая кишка    | Интерстициальная опухоль                        | 0/1                                                   | 0/1               |
| Пищевод          | Нейроэндокринная карцинома                      | 0/1                                                   | 0/1               |
| Пищевод          | Аденокарцинома                                  | 1/1                                                   | 0/1               |
| Стенка кишечника | Аденокарцинома                                  | 1/1                                                   | 0/1               |
| Стенка кишечника | Стромальная саркома                             | 1/1                                                   | 0/1               |
| Почка            | Светлоклеточная карцинома                       | 1/1                                                   | 0/1               |
| Печень           | Гепатоцеллюлярная карцинома                     | 0/1                                                   | 0/1               |
| Печень           | Гепатобластома                                  | 1/1                                                   | 0/1               |
| Легкое           | Аденокарцинома                                  | 0/1                                                   | 0/1               |
| Легкое           | Недифференцированная мелкоклеточная карцинома   | 1/1                                                   | 1/1               |
| Легкое           | Плоскоклеточная карцинома                       | 1/1                                                   | 0/1               |
| Лимфоузел        | Диффузная В-клеточная лимфома                   | 1/1 **                                                | 1/1 **            |
| Лимфоузел        | Лимфома Ходжкина (Hodgkin)                      | 1/1                                                   | 1/1               |
| Средостение      | Диффузная В-клеточная лимфома                   | 1/1 **                                                | 1/1 **            |

| Источник                   | Патология                                                            | Кол-во положительных образцов */общее кол-во образцов |                   |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------|
|                            |                                                                      | Иммунокомпетентные клетки                             | Опухолевые клетки |
| Мышца, гладкая             | Умеренно злокачественная лейомиосаркома                              | 1/1                                                   | 0/1               |
| Мышца, поперечно-полосатая | Эмбриональная рабдомиосаркома                                        | 0/1                                                   | 0/1               |
| Яичник                     | Серозная аденокарцинома                                              | 1/1                                                   | 0/1               |
| Яичник                     | Аденокарцинома                                                       | 1/1                                                   | 0/1               |
| Поджелудочная железа       | Инсулинома                                                           | 0/1                                                   | 0/1               |
| Поджелудочная железа       | Аденокарцинома                                                       | 1/1                                                   | 0/1               |
| Тазовая полость            | Анапластическая крупноклеточная лимфома                              | 1/1 **                                                | 1/1 **            |
| Простата                   | Аденокарцинома                                                       | 0/2                                                   | 0/2               |
| Прямая кишка               | Аденокарцинома                                                       | 1/1                                                   | 1/1               |
| Прямая кишка               | Умеренно дифференцированная злокачественная интерстициальная опухоль | 0/1                                                   | 0/1               |
| Прямая кишка               | Злокачественная меланома                                             | 1/1                                                   | 0/1               |
| Забрюшинное пространство   | Нейробластома                                                        | 1/1                                                   | 0/1               |
| Забрюшинное пространство   | Веретенноклеточная рабдомиосаркома                                   | 0/1                                                   | 0/1               |
| Кожа                       | Базальноклеточная карцинома                                          | 1/1                                                   | 0/1               |
| Кожа                       | Плоскоклеточная карцинома                                            | 1/1                                                   | 0/1               |
| Селезенка                  | Диффузная В-клеточная лимфома                                        | 1/1 *                                                 | 1/1 *             |
| Желудок                    | Перстневидноклеточная карцинома                                      | 1/1                                                   | 0/1               |
| Яичко                      | Семинома                                                             | 1/1                                                   | 0/1               |
| Яичко                      | Эмбриональная карцинома                                              | 0/1                                                   | 0/1               |
| Щитовидная железа          | Медуллярная карцинома                                                | 0/1                                                   | 0/1               |
| Щитовидная железа          | Папиллярная карцинома                                                | 0/1                                                   | 1/1               |
| Шейка матки                | Плоскоклеточная карцинома                                            | 2/2                                                   | 0/2               |
| Матка                      | Лейомиома                                                            | 0/1                                                   | 0/1               |

| Источник | Патология                            | Кол-во положительных образцов */общее кол-во образцов |                   |
|----------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------|
|          |                                      | Иммунокомпетентные клетки                             | Опухолевые клетки |
| Матка    | Аденокарцинома                       | 1/1                                                   | 0/1               |
| Матка    | Светлоклеточная карцинома эндометрия | 1/1                                                   | 1/1               |

\* Окрашивание иммунокомпетентных клеток или опухолевых клеток, любой интенсивности.

\*\* Окрашивание опухолевых клеток и иммунных клеток дифференцировать невозможно.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ. УРОТЕЛИАЛЬНАЯ КАРЦИНОМА

### Алгоритм оценки для уротелиальной карциномы

Ткань уротелиальной карциномы должна оцениваться в соответствии с алгоритмом оценки анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay, представленного в Таб. 7. Дополнительные инструкции и соответствующие изображения приведены в Руководстве по интерпретации (номер по каталогу 1015704EN).

Таб. 7. VENTANA PD-L1 (SP142) Assay алгоритм оценки результатов для уротелиальной карциномы.

| Оценка окрашивания иммунокомпетентных клеток (IC)                                                                                                                                                                                                                                                                            | Экспрессия PD-L1 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Отсутствие явного PD-L1 окрашивания ИЛИ наличие явно окрашенных PD-L1 любой интенсивности в иммунокомпетентных клетках, инфильтрирующих ткань опухоли, которые занимают <5% площади опухоли (включая площади, занятые опухолевыми клетками, связанной с ними внутриопухолевой стромой и примыкающей околоопухолевой стромой) | < 5 % IC         |
| Наличие явно окрашенных PD-L1 любой интенсивности в иммунокомпетентных клетках, инфильтрирующих ткань опухоли, которые занимают ≥ 5% площади опухоли (включая площади, занятые опухолевыми клетками, связанной с ними внутриопухолевой стромой и примыкающей околоопухолевой стромой)                                        | ≥ 5 % IC         |

\* PD-L1 Окрашивание в опухолевых клетках не включается в оценочное определение уротелиальной карциномы у пациентов.

### Толщина ткани. Уротелиальная карцинома

Толщина ткани была оценена с помощью 5 уникальных образцов уротелиальной карциномы (3 PD-L1 ≥ 5 % IC и 2 PD-L1 < 5 % IC). В рамках каждого случая были исследованы двойные срезы по 2, 3, 4, 5, 6 и 7 микрон. Для всех вариантов толщины ткани было показано надлежащее специфическое окрашивание PD-L1 и приемлемые для анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay уровни фонового окрашивания. В рамках диапазона исследованной толщины изменение экспрессии PD-L1 в срезах отмечено не было. Компания Ventana рекомендует использовать для анализа с помощью VENTANA PD-L1 (SP142) Assay образцы толщиной 4 микрона.

### Повторяемость и внутрилабораторная прецизионность. Уротелиальная карцинома

Исследования образцов посредством VENTANA PD-L1 (SP142) Assay были выполнены для подтверждения следующего.

- Внутрисуточная повторяемость — по пять микропрепаратов из 24 уникальных образцов уротелиальной карциномы (12 PD-L1 ≥ 5 % IC и 12 PD-L1 < 5 % IC) были окрашены при помощи анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay на одном аппарате BenchMark ULTRA в течение одного дня.

- Межсуточная прецизионность — по 10 микропрепаратов из 24 уникальных образцов уротелиальной карциномы (12 PD-L1  $\geq$  5 % IC и 12 PD-L1 < 5 % IC) были окрашены при помощи анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay на одном аппарате BenchMark ULTRA в течение 5 непоследовательных дней.
- Прецизионность результатов между разными аппаратами и партиями — по 27 микропрепаратов из 24 уникальных образцов уротелиальной карциномы (12 PD-L1  $\geq$  5 % IC и 12 PD-L1 < 5 % IC) были окрашены при помощи анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay с использованием трех партий VENTANA PD-L1 (SP142) и трех парных партий OptiView DAB IHC Detection Kit и OptiView Amplification Kit на трех аппаратах BenchMark ULTRA.
- Внутриплатформенная прецизионность — по два микропрепарата из 10 уникальных образцов уротелиальной карциномы (3 PD-L1  $\geq$  5 % IC и 7 PD-L1 < 5 % IC) были окрашены при помощи анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay с использованием трех аппаратов BenchMark ULTRA, трех аппаратов BenchMark XT и трех аппаратов BenchMark GX. Показатели согласованности были рассчитаны относительно режима для образца, выбранного на платформе.

Все микропрепараты были замаскированы, рандомизированы и оценены с использованием алгоритма оценки анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay для уротелиальной карциномы (Таб. 7). Результаты — Таб. 8.

**Таб. 8.** Повторяемость и внутрилабораторная прецизионность окрашивания посредством метода VENTANA PD-L1 (SP142) Assay образцов ткани уротелиальной карциномы.

| Параметр повторяемости/промежуточной прецизионности                                                                                    | Согласованность, % (95 % CI) †                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Внутрисуточная повторяемость (в пределах одного дня)                                                                                   | PPA: 98,2 (90,4–99,7)<br>NPA: 100,0 (94,4–100,0)<br>OPA: 99,2 (95,4–99,9) |
| Межсуточная прецизионность (5 непоследовательных дней)                                                                                 | PPA: 91,8 (85,2–95,6)<br>NPA: 100,0 (97,1–100,0)<br>OPA: 96,3 (93,0–98,0) |
| Прецизионность результатов между разными аппаратами и партиями (3 аппарата, 3 партии антител, 3 набора для обнаружения и амплификации) | PPA: 99,4 (97,8–99,8)<br>NPA: 99,7 (98,3–99,9)<br>OPA: 99,5 (98,6–99,8)   |
| Внутриплатформенная прецизионность (три аппарата BenchMark ULTRA)                                                                      | PPA: 83,3 (60,8–94,2)<br>NPA: 100,0 (91,2–100,0)<br>OPA: 94,8 (85,9–98,2) |
| Внутриплатформенная прецизионность (три аппарата BenchMark XT)                                                                         | PPA: 94,4 (74,2–99,0)<br>NPA: 100,0 (91,6–100,0)<br>OPA: 98,3 (91,1–99,7) |
| Внутриплатформенная прецизионность (три аппарата BenchMark GX)                                                                         | PPA: 94,4 (74,2–99,0)<br>NPA: 100,0 (91,4–100,0)<br>OPA: 98,3 (91,0–99,7) |

† Двусторонний CI метода Уилсона

#### Межплатформенная согласованность. Уротелиальная карцинома

По одному микропрепарату из 44 уникальных образцов уротелиальной карциномы (22 PD-L1  $\geq$  5 % IC и 22 PD-L1 < 5 % IC) были окрашены при помощи анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay на одном аппарате BenchMark ULTRA (эталонный), одном аппарате BenchMark XT и одном аппарате BenchMark GX. Все микропрепараты были замаскированы, рандомизированы и оценены с использованием алгоритма оценки анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay для уротелиальной карциномы (Таб. 7). Результаты — Таб. 9.

**Таб. 9.** Межплатформенная согласованность окрашивания VENTANA PD-L1 (SP142) Assay на образцах уротелиальной карциномы.

| Межплатформенная согласованность | Согласованность, % (95 % CI) †                                                |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| BenchMark ULTRA: BenchMark XT    | PPA: 100,0 (84,5–100,0)<br>NPA: 100,0 (85,1–100,0)<br>OPA: 100,0 (91,8–100,0) |
| BenchMark ULTRA: BenchMark GX    | PPA: 95,2 (77,3–99,2)<br>NPA: 100,0 (85,1–100,0)<br>OPA: 97,7 (87,9–99,6)     |

† Двусторонний CI метода Уилсона

#### Прецизионность исследователя. Уротелиальная карцинома

Для оценки прецизионности между экспертами и по каждому эксперту три патоморфолога квалифицировали 60 уникальных образцов уротелиальной карциномы (30 PD-L1  $\geq$  5 % IC и 30 PD-L1 < 5 % IC), которые были окрашены при помощи анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay. Перед оценкой статуса PD-L1 с использованием алгоритма оценки VENTANA PD-L1 (SP142) Assay для уротелиальной карциномы образцы прошли процедуру маскирования и рандомизации (Таб. 7). Эксперты оценивали все образцы по два раза с промежутком между просмотрами не менее двух недель. Уровни согласованности между оценками исследователей и патоморфолога изложены в Таб. 10.

**Таб. 10.** Исследование прецизионности между экспертами и по каждому эксперту путем окрашивания с помощью анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay образцов ткани уротелиальной карциномы.

| Прецизионность эксперта                                                                                                      | Согласованность, % (95 % CI)                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Прецизионность между экспертами (парные сравнения средних величин между экспертами при первой оценке предметных стекол)      | APA: 92,7 (85,9–97,6)<br>ANA: 93,9 (88,1–98,1)<br>OPA: 93,3 (87,8–97,8) |
| Прецизионность одного эксперта (средняя частота совпадений результатов всех трех экспертов между первым и вторым просмотром) | APA: 93,4 (87,3–97,7)<br>ANA: 94,2 (88,9–98,1)<br>OPA: 93,9 (88,8–97,8) |

#### Исследование воспроизводимости результата между лабораториями. Уротелиальная карцинома

Исследование воспроизводимости результата между лабораториями в отношении окрашивания с использованием VENTANA PD-L1 (SP142) Assay выполнено для подтверждения воспроизводимости анализа при определении статуса PD-L1 в образцах ткани уротелиальной карциномы. 28 уникальных образцов уротелиальной карциномы (14 PD-L1  $\geq$  5 % IC и 14 PD-L1 < 5 % IC) окрашивали в 3 внешних лабораториях в течение 5 непоследовательных дней в период, составляющий 20 дней. Перед окрашиванием микропрепараты были замаскированы и рандомизированы. В каждом исследовательском центре окрашенные микропрепараты были независимо оценены двумя патоморфологами (исследователями). Набор образцов состоял из 420 микропрепаратов (по 140 микропрепаратов в одном центре), полученных из 28 уникальных образцов уротелиальной карциномы. Результаты — Таб. 11.

**Таб. 11.** Воспроизводимость окрашивания посредством метода VENTANA PD-L1 (SP142) Assay между лабораториями на образцах ткани уротелиальной карциномы.

| Воспроизводимость между лабораториями*                                                                   | Согласованность, % (95 % CI)                                                  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Общее количество совпадений (по сравнению с консенсусной оценкой по всем лабораториям, дням и экспертам) | PPA: 98,3 (96,6–99,2) †<br>NPA: 87,4 (83,8–90,2) †<br>OPA: 92,8 (90,9–94,4) † |

| Воспроизводимость между лабораториями*                                                                       | Согласованность, %<br>(95 % CI)                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Частота совпадений между лабораториями<br>(парные сравнения средних величин между лабораториями)             | APA: 90,7 (81,2–96,3)<br>ANA: 88,3 (78,5–94,9)<br>OPA: 89,6 (82,5–95,5) † |
| Частота совпадений между экспертами<br>(парные сравнения средних величин между экспертами одной лаборатории) | APA: 89,3 (78,1–96,0)<br>ANA: 86,6 (75,1–94,6)<br>OPA: 88,1 (84,6–90,8) † |

\* n = 419 оцененных предметных стекол.

† Двусторонний CI метод Уилсона.

### Исследование клинических результатов. Уротелиальная карцинома

Рабочие характеристики анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay были исследованы в рамках GO29293, многоцентрового открытого исследования фазы II на основании данных двух когорт, предназначенного для оценки эффективности TECENTRIQ у пациентов с местнораспространенной или метастатической уротелиальной карциномой.

Образцы пациента были окрашены при помощи анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay, приемлемость окрашивания и экспрессия PD-L1 были оценены посредством алгоритма оценки, описанного в Таб. 7. Образцы пациента представляли собой фиксированную формалином и залитую парафином (FFPE) ткань уротелиальной карциномы, полученную при биопсии (21,2 %), резекции (46,6 %), трансуретральной резекции опухоли мочевого пузыря (TURBT, 30,5 %) или неизвестного происхождения (1,6 %). 74,9 % тканей были взяты из первичной опухоли и 25,1 % — из метастатической опухоли.

В Таб. 12 описана итоговая доля препаратов, пригодных по окрашиванию для анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay, среди всех образцов уротелиальной карциномы, отобранных для GO29293. Также указана частота пригодности по морфологическим критериям и по приемлемости фонового окрашивания на PD-L1 для изготовленных микропрепаратов. Из 650 образцов первичное окрашивание 25 образцов было признано ненадлежащим, и окрашивание было выполнено повторно. При окончательном окрашивании 13 образцов из 25 были все же признаны ненадлежащими (7 образцов — в связи с неприемлемым отрицательным контролем реагента, 5 образцов — в связи с неприемлемой морфологией и 1 образец — в связи с неприемлемым фоновым окрашиванием и морфологией). В рамках анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay была продемонстрирована высокая доля препаратов, пригодных по первичному и окончательному окрашиванию, 96,2 % и 98 % соответственно. Окончательные частоты приемлемости по морфологическим критериям и фоновому окрашиванию превышали 99 %.

**Таб. 12.** VENTANA PD-L1 (SP142) Assay рабочие характеристики окрашивания при анализе в рамках GO29293, клинического исследования образцов уротелиальной карциномы.

| Показатель                            | Частота приемлемых результатов % (n/N)<br>(95 % CI) † |                                |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------|
|                                       | Начальный *                                           | Конечный **                    |
| Общая частота приемлемого окрашивания | 96,2 (625/650)<br>(94,4–97,4)                         | 98,0 (637/650)<br>(96,6–98,8)  |
| Морфологические критерии              | 98,1 (628/640)<br>(96,8–98,9)                         | 99,1 (637/643)<br>(98,0–99,6)  |
| Фоновое окрашивание                   | 98,9 (625/632)<br>(97,7–99,5)                         | 99,8 (637/638)<br>(99,1–100,0) |

\* Первая попытка окрашивания.

\*\* Окончательная попытка окрашивания.

† Двусторонний CI метода Уилсона.

В когорте 2 препарат TECENTRIQ принимали 310 пациентов с местнораспространенной или метастатической уротелиальной карциномой, у которых болезнь прогрессировала во время или после химиотерапии препаратами платины или у которых болезнь прогрессировала в течение 12 месяцев с момента лечения неoadъювантом с содержанием платины или проведения адъювантной химиотерапии. Из данного исследования были исключены пациенты: с аутоиммунным заболеванием в анамнезе, активными метастазами в головном мозге или метастазами, купирующимися кортикостероидами, пациенты, которым вводились живые или аттенуированные вакцины в течение 28 дней с момента регистрации для участия в исследовании или пациенты, которым вводились системные иммуностимулирующие агенты или системные иммуносупрессивные препараты. Пациентам вводили внутривенно 1200 мг TECENTRIQ каждые три недели до прекращения клинической пользы по оценке исследователя. Оценка ответа опухоли на лечение выполнялась каждые 9 недель в течение первых 54 недель, затем — каждые 12 недель. К основному критерию эффективности относилась подтвержденная частота объективного ответа (ORR), которая была оценена независимым наблюдательным учреждением (IRF) при помощи Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST v1.1), и продолжительность ответа (DOR).

В упомянутой когорте средний возраст составил 66 лет; 78 % — лица мужского пола; 91 % — лица европеоидной расы. У 26 % была диагностирована немышечная уротелиальная карцинома мочевого пузыря и у 78 % были диагностированы метастазы во внутренние органы. Состояние 62 % пациентов было оценено на 1 балл по шкале ECOG, исходный клиренс креатинина у 35 % пациентов составлял < 60 мл/мин. У 19 % пациентов болезнь прогрессировала после приема неoadъюванта с содержанием платины или проведения адъювантной химиотерапии. 41 % пациентов прежде получал ≥ 2 системных препаратов в рамках терапии метастатических форм рака. 73 % пациентов ранее принимали цисплатин, 26 % ранее принимали карбоплатин и 1 % пациентов проходил лечение другими препаратами на основе платины.

Образцы опухолей оценивали проспективно с использованием VENTANA PD-L1 (SP142) Assay в центральной лаборатории. Полученные результаты были использованы для определения подгрупп и анализа этих подгрупп по заранее определенному плану. Из 310 пациентов 32 % были отнесены к группе с экспрессией PD-L1, составляющей ≥ 5 % IC, остальные 68 % пациентов были отнесены к группе с экспрессией PD-L1, составляющей < 5 % IC.

Подтвержденная ORR всех пациентов и две подгруппы с экспрессией PD-L1 представлены в Таб. 13. Средняя продолжительность периода последующего наблюдения для данной когорты составила 14,4 месяца. У 59 % пациентов с прогрессирующей болезнью после неoadъювантной или адъювантной химиотерапии ORR составила 22 % (95 % CI: 12,3 %, 34,7 %).

**Таб. 13.** Сводные данные по эффективности когорты 2 GO29293 (уротелиальная карцинома).

|                                                                                          | Все пациенты<br>(N = 310) | Подгруппы по экспрессии PD-L1 |                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|----------------------|
|                                                                                          |                           | < 5 %*<br>(N = 210)           | ≥ 5 %*<br>(N = 100)  |
| Количество подтвержденных пациентов с терапевтическим ответом, которые прошли оценку IRF | 46                        | 20                            | 26                   |
| ORR % (95 % CI)                                                                          | 14,8<br>(11,1, 19,3)      | 9,5<br>(5,9, 14,3)            | 26,0<br>(17,7, 35,7) |
| Полный ответ (CR) (%)                                                                    | 5,5                       | 2,4                           | 12,0                 |
| Частичный ответ (PR) (%)                                                                 | 9,4                       | 7,1                           | 14,0                 |
| Средняя DOR, месяцев (диапазон)                                                          | NR<br>(2,1+, 13,8+)       | 12,7<br>(2,1+, 12,7)          | NR<br>(4,2, 13,8+)   |

NR = не достигнут + обозначает частично известное значение  
CI = доверительный интервал

\* Экспрессия PD-L1 в иммунокомпетентных клетках, инфильтрирующих ткань опухоли (I IC).

IMvigor130(NCT02807636) — это текущее многоцентровое рандомизированное исследование ранее не проходивших терапию пациентов с метастатической уротелиальной карциномой, подходящих для химиотерапии препаратами платины. Исследование включает три направления: монотерапия TECENTRIQ, TECENTRIQ в сочетании с химиотерапией препаратами платины (напр., cisplatin или carboplatin с gemcitabine) и только химиотерапия препаратами платины (препарат сравнения). В исследовании приняли участие пациенты, как подходящие, так и не подходящие для терапии препаратом cisplatin. Образцы опухоли оценивали проспективно с использованием VENTANA PD-L1 (SP142) Assay в центральной лаборатории. Независимый комитет по мониторингу данных (iDMC), назначенный для данного исследования, провел экспертизу первичных данных и отметил снижение выживаемости у пациентов с экспрессией PD-L1 < 5 % при монотерапии TECENTRIQ по сравнению с пациентами, которым была назначена химиотерапия препаратами платины. iDMC рекомендовал закрыть направление монотерапии для дальнейшего исследования пациентов с низкой экспрессией PD-L1; других изменений для исследования не было рекомендовано, включая изменение терапии для пациентов, которые уже были случайным образом распределены для монотерапии и получали данную терапию.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ — NSCLC

### Алгоритм оценки — NSCLC

NSCLC Ткань должна оцениваться в соответствии VENTANA PD-L1 (SP142) Assay с алгоритмом оценки анализа для NSCLC, представленным в Таб. 14 и Таб. 15. Образец считается PD-L1 экспрессивным, если образец экспрессируется  $\geq 1\%$  TC или  $\geq 1\%$  IC и имеет высокую PD-L1 экспрессию, если образец экспрессируется  $\geq 50\%$  TC или  $\geq 10\%$  IC. Дополнительные инструкции и характерные изображения представлены в руководстве по интерпретации (номер по каталогу 1015703EN и 1015654EN).

**Таб. 14.** VENTANA PD-L1 (SP142) Assay алгоритм подсчета баллов для NSCLC  $\geq 50\%$  TC или  $\geq 10\%$  IC.

| ЭТАП 1 | Оценка окрашивания опухолевых клеток (TC)                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Экспрессия PD-L1            |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
|        | Наличие явного окрашивания мембран PD-L1 любой интенсивности у $\geq 50\%$ опухолевых клеток.                                                                                                                                                                                                                                              | $\geq 50\%$ TC              |
|        | Отсутствие явного окрашивания PD-L1<br>ИЛИ<br>Наличие явного окрашивания мембран PD-L1 любой интенсивности у < 50 % опухолевых клеток                                                                                                                                                                                                      | Переход к этапу 2           |
| ЭТАП 2 | Оценка окрашивания иммунокомпетентных клеток, инфильтрирующих ткань опухоли (IC)                                                                                                                                                                                                                                                           | Экспрессия PD-L1            |
|        | Наличие явно окрашенных PD-L1 любой интенсивности в иммунокомпетентных клетках, инфильтрирующих ткань опухоли, которые занимают $\geq 10\%$ площади опухоли (включая площади, занятые опухолевыми клетками, связанной с ними внутриопухолевой стромой и примыкающей околоопухолевой стромой)                                               | $\geq 10\%$ IC              |
|        | Отсутствие явного окрашивания PD-L1<br>ИЛИ<br>Наличие явно окрашенных PD-L1 любой интенсивности в иммунокомпетентных клетках, инфильтрирующих ткань опухоли, которые занимают $\geq 10\%$ площади опухоли (включая площади, занятые опухолевыми клетками, связанной с ними внутриопухолевой стромой и примыкающей околоопухолевой стромой) | < 50 % TC<br>и<br>< 10 % IC |

**Таб. 15.** VENTANA PD-L1 (SP142) алгоритм оценки ткани NSCLC  $\geq 1\%$  TC или  $\geq 1\%$  IC.

| ЭТАП 1 | Оценка окрашивания опухолевых клеток (TC)                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Экспрессия PD-L1          |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
|        | Наличие явного окрашивания мембран PD-L1 любой интенсивности у $\geq 1\%$ опухолевых клеток.                                                                                                                                                                                                                                              | $\geq 1\%$ TC             |
|        | Отсутствие явного окрашивания PD-L1<br>ИЛИ<br>Наличие явного окрашивания мембран PD-L1 любой интенсивности у < 1 % опухолевых клеток                                                                                                                                                                                                      | Переход к этапу 2         |
| ЭТАП 2 | Оценка окрашивания иммунокомпетентных клеток, инфильтрирующих ткань опухоли (IC)                                                                                                                                                                                                                                                          | Экспрессия PD-L1          |
|        | Наличие явно окрашенных PD-L1 любой интенсивности в иммунокомпетентных клетках, инфильтрирующих ткань опухоли, которые занимают $\geq 1\%$ площади опухоли (включая площади, занятые опухолевыми клетками, связанной с ними внутриопухолевой стромой и примыкающей околоопухолевой стромой)                                               | $\geq 1\%$ IC             |
|        | Отсутствие явного окрашивания PD-L1<br>ИЛИ<br>Наличие явно окрашенных PD-L1 любой интенсивности в иммунокомпетентных клетках, инфильтрирующих ткань опухоли, которые занимают $\geq 1\%$ площади опухоли (включая площади, занятые опухолевыми клетками, связанной с ними внутриопухолевой стромой и примыкающей околоопухолевой стромой) | < 1 % TC<br>и<br>< 1 % IC |

### Влияние толщины среза ткани — NSCLC

Влияние толщины среза ткани оценивалось с использованием образцов NSCLC. Дубликатные срезы толщиной 3, 4, 5, 6 и 7 мкм окрашивали посредством VENTANA PD-L1 (SP142) Assay и оценивали экспрессию PD-L1 TC и IC. Все 42 образца NSCLC с диапазоном экспрессии PD-L1 для каждого уровня IC и TC были оценены.

Для всех вариантов толщины ткани было показано надлежащее специфическое окрашивание PD-L1 и приемлемые для анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay уровни фонового окрашивания. В рамках диапазона исследованной толщины изменение уровня PD-L1 TC или IC в срезах отмечено не было. Компания Ventana рекомендует использовать образцы NSCLC толщиной 4 мкм для окрашивания с помощью анализа VENTANA PD-L1 (SP142).

### Повторяемость и промежуточная прецизионность — NSCLC

Посредством VENTANA PD-L1 (SP142) Assay были выполнены исследования образцов NSCLC для подтверждения.

- Внутрисуточная повторяемость — по 5 микропрепаратов из каждого образца NSCLC окрашивали посредством VENTANA PD-L1 (SP142) Assay с использованием одного аппарата BenchMark ULTRA в один день и оценивали на экспрессию PD-L1 TC и IC. Все 66 образцов NSCLC с диапазоном экспрессии PD-L1 для каждого уровня TC и IC были оценены.
- Межсуточная прецизионность — по 10 микропрепаратов из каждого образца NSCLC окрашивали посредством VENTANA PD-L1 (SP142) Assay с использованием одного аппарата BenchMark ULTRA за 5 непоследовательных дней. Все 66 образцов NSCLC с диапазоном экспрессии PD-L1 для каждого уровня экспрессии TC и IC были оценены.
- Прецизионность в пределах одной партии аппарата, антител и наборов для обнаружения — не менее 9 микропрепаратов из каждого образца NSCLC были окрашены посредством VENTANA PD-L1 (SP142) Assay с использованием трех партий антител (SP142) VENTANA PD-L1 и трех парных партий OptiView DAB IHC Detection Kit и OptiView Amplification Kit на трех аппаратах BenchMark ULTRA. Все 92 образца NSCLC с диапазоном экспрессии PD-L1 для каждого уровня TC и IC были оценены.

- Внутриплатформенная прецизионность — по два микропрепарата из каждого образца NSCLC окрашивали посредством VENTANA PD-L1 (SP142) Assay с использованием трех аппаратов BenchMark ULTRA, трех аппаратов BenchMark XT и трех аппаратов BenchMark GX. Все 138 образцов NSCLC с диапазоном экспрессии PD-L1 для каждого уровня экспрессии TC и IC были оценены. Процент совпадений рассчитывался по каждому режиму оценки образцов для каждой платформы.

Все срезы были замаскированы и рандомизированы, а затем оценивались по уровню экспрессии PD-L1 TC или IC. Результаты изложены в Таб. 16, Таб. 17, Таб. 18 и Таб. 19.

**Таб. 16.** Повторяемость и промежуточная прецизионность окрашивания посредством VENTANA PD-L1 (SP142) Assay образцов NSCLC (PD-L1 экспрессия  $\geq 50\%$  TC).

| Параметр повторяемости/промежуточной прецизионности                                                                                                             | Согласованность, % (95 % CI) †                                                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Внутрисуточная повторяемость (в течение одного дня), 24 образца NSCLC                                                                                           | PPA: 100,0 (94,4–100,0)<br>NPA: 100,0 (93,5–100,0)<br>OPA: 100,0 (96,9–100,0) |
| Межсуточная прецизионность (5 непоследовательных дней), 24 образца NSCLC                                                                                        | PPA: 100,0 (97,1–100,0)<br>NPA: 100,0 (96,5–100,0)<br>OPA: 100,0 (98,4–100,0) |
| Прецизионность результатов между разными аппаратами и партиями (в сравнении с режимом оценки на уровне образца, между аппаратами и партиями), 18 образцов NSCLC | PPA: 99,7 (98,1–99,9)<br>NPA: 95,2 (91,2–97,5)<br>OPA: 97,9 (96,2–98,9)       |
| Внутриплатформенная прецизионность (три аппарата BenchMark ULTRA), 10 образцов NSCLC                                                                            | PPA: 100,0 (88,6–100,0)<br>NPA: 100,0 (88,6–100,0)<br>OPA: 100,0 (94,0–100,0) |
| Внутриплатформенная прецизионность (три аппарата BenchMark XT), 10 образцов NSCLC                                                                               | PPA: 96,7 (83,3–99,4)<br>NPA: 100,0 (88,6–100,0)<br>OPA: 98,3 (91,1–99,7)     |
| Внутриплатформенная прецизионность (три аппарата BenchMark GX), 10 образцов NSCLC                                                                               | PPA: 100,0 (88,6–100,0)<br>NPA: 100,0 (88,6–100,0)<br>OPA: 100,0 (94,0–100,0) |

† Двусторонний CI метода Уилсона.

**Таб. 17.** Повторяемость и промежуточная прецизионность окрашивания посредством VENTANA PD-L1 (SP142) Assay образцов NSCLC (PD-L1 экспрессия  $\geq 10\%$  IC).

| Параметр повторяемости/промежуточной прецизионности                                                                           | Согласованность, % (95 % CI)                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Внутрисуточная повторяемость (в течение одного дня), 24 образца NSCLC                                                         | PPA: 98,3 (91,1–99,7) †<br>NPA: 100,0 (94,0–100,0) †<br>OPA: 99,2 (95,4–99,9) † |
| Межсуточная прецизионность (5 непоследовательных дней), 24 образца NSCLC                                                      | PPA: 96,2 (91,3–98,3) †<br>NPA: 98,2 (93,6–99,5) †<br>OPA: 97,1 (94,1–98,6) †   |
| Частота совпадений результатов между разными партиями антител и наборов для обнаружения (парные сравнения), 28 образцов NSCLC | APA: 95,1 (91,1–98,1)<br>ANA: 90,2 (82,3–96,2)<br>OPA: 93,4 (88,7–97,5)         |
| Межприборная согласованность и согласованность между партиями для обнаружения (сдвоенное сравнение), 28 образцов NSCLC        | APA: 96,3 (93,2–98,8)<br>ANA: 92,7 (86,0–97,7)<br>OPA: 95,1 (91,2–98,4)         |

| Параметр повторяемости/промежуточной прецизионности                                             | Согласованность, % (95 % CI)                                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Межприборная согласованность и согласованность антител (сдвоенное сравнение), 28 образцов NSCLC | APA: 96,3 (93,1–98,8)<br>ANA: 92,6 (85,9–97,8)<br>OPA: 95,1 (91,1–98,4)             |
| Внутриплатформенная прецизионность (три аппарата BenchMark ULTRA), 8 образцов NSCLC             | PPA: 100,0 (94,0–100,0) †<br>NPA: 100,0 (94,0–100,0) †<br>OPA: 100,0 (96,9–100,0) † |
| Внутриплатформенная прецизионность (три аппарата BenchMark XT), 8 образцов NSCLC                | PPA: 100,0 (94,0–100,0) †<br>NPA: 100,0 (94,0–100,0) †<br>OPA: 100,0 (96,9–100,0) † |
| Внутриплатформенная прецизионность (три аппарата BenchMark GX), 8 образцов NSCLC                | PPA: 100,0 (94,0–100,0) †<br>NPA: 100,0 (94,0–100,0) †<br>OPA: 100,0 (96,9–100,0) † |

† Двусторонний CI метода Уилсона.

**Таб. 18.** Повторяемость и промежуточная прецизионность окрашивания посредством VENTANA PD-L1 (SP142) Assay образцов NSCLC (экспрессия PD-L1  $\geq 1\%$  TC).

| Параметр повторяемости/промежуточной прецизионности                                                                                     | Согласованность, % (95 % CI) †                                                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Внутрисуточная повторяемость (в течение одного дня), 10 образцов NSCLC                                                                  | PPA: 100,0 (86,7–100,0)<br>NPA: 100,0 (86,7–100,0)<br>OPA: 100,0 (92,9–100,0) † |
| Межсуточная прецизионность (5 непоследовательных дней), 10 образцов NSCLC                                                               | PPA: 100,0 (92,9–100,0)<br>NPA: 100,0 (92,9–100,0)<br>OPA: 100,0 (96,3–100,0)   |
| Точность взаимодействия приборов и участков (по сравнению с режимом на уровне корпуса, для разных приборов и партий), 18 образцов NSCLC | PPA: 99,2 (97,0–99,8)<br>NPA: 100,0 (98,4–100,0)<br>OPA: 99,6 (98,5–99,9)       |
| Внутриплатформенная прецизионность (три аппарата BenchMark ULTRA), 12 образцов NSCLC                                                    | PPA: 100,0 (86,2–100,0)<br>NPA: 95,8 (86,0–98,8)<br>OPA: 97,2 (90,4–99,2)       |
| Внутриплатформенная прецизионность (три аппарата BenchMark XT), 12 образцов NSCLC                                                       | PPA: 100,0 (86,2–100,0)<br>NPA: 100,0 (92,6–100,0)<br>OPA: 100,0 (94,0–100,0)   |
| Внутриплатформенная прецизионность (три аппарата BenchMark GX), 12 образцов NSCLC                                                       | PPA: 100,0 (86,2–100,0)<br>NPA: 100,0 (92,6–100,0)<br>OPA: 100,0 (94,0–100,0)   |

† Двусторонний CI метода Уилсона.

**Таб. 19.** Повторяемость и промежуточная прецизионность окрашивания посредством VENTANA PD-L1 (SP142) Assay образцов NSCLC (экспрессия PD-L1  $\geq 1\%$  IC).

| Параметр повторяемости/промежуточной прецизионности                      | Согласованность, % (95 % CI)                                                        |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Внутрисуточная повторяемость (в течение одного дня), 8 образцов NSCLC    | PPA: 100,0 (91,2–100,0) †<br>NPA: 100,0 (91,2–100,0) †<br>OPA: 100,0 (95,4–100,0) † |
| Межсуточная прецизионность (5 непоследовательных дней), 8 образцов NSCLC | PPA: 100,0 (96,3–100,0) †<br>NPA: 97,0 (91,6–99,0) †<br>OPA: 98,5 (95,7–99,5) †     |

| Параметр повторяемости/промежуточной прецизионности                                                                           | Согласованность, % (95 % CI)                                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Частота совпадений результатов между разными партиями антител и наборов для обнаружения (парные сравнения), 28 образцов NSCLC | APA: 98,4 (95,7–100,0)<br>ANA: 98,3 (95,6–100,0)<br>OPA: 98,4 (95,9–100,0)          |
| Межприборная согласованность и согласованность между наборами для обнаружения (сдвоенное сравнение), 28 образцов NSCLC        | APA: 98,4 (95,8–100,0)<br>ANA: 98,3 (95,4–100,0)<br>OPA: 98,4 (95,8–100,0)          |
| Межприборная согласованность и согласованность антител (сдвоенное сравнение), 28 образцов NSCLC                               | APA: 98,4 (95,9–100,0)<br>ANA: 98,3 (95,5–100,0)<br>OPA: 98,4 (95,8–100,0)          |
| Внутриплатформенная прецизионность (три аппарата BenchMark ULTRA), 8 образцов NSCLC                                           | PPA: 100,0 (94,0–100,0) †<br>NPA: 100,0 (94,0–100,0) †<br>OPA: 100,0 (96,9–100,0) † |
| Внутриплатформенная прецизионность (три аппарата BenchMark XT), 8 образцов NSCLC                                              | PPA: 100,0 (94,0–100,0) †<br>NPA: 100,0 (94,0–100,0) †<br>OPA: 100,0 (96,9–100,0) † |
| Внутриплатформенная прецизионность (три аппарата BenchMark GX), 8 образцов NSCLC                                              | PPA: 100,0 (94,0–100,0) †<br>NPA: 100,0 (94,0–100,0) †<br>OPA: 100,0 (96,9–100,0) † |

† Двусторонний CI метода Уилсона.

#### Межплатформенная согласованность — NSCLC

Каждый образец был выбран из 44 образцов ткани NSCLC при экспрессии PD-L1  $\geq 50\%$  TC или  $\geq 10\%$  IC (в 21 образце экспрессия PD-L1  $\geq 50\%$  TC или  $\geq 10\%$  IC, в 23 образцах экспрессия PD-L1  $< 50\%$  TC и  $< 10\%$  IC) и из 44 образцов ткани NSCLC при экспрессии PD-L1  $\geq 1\%$  TC или  $\geq 1\%$  IC (в 23 образцах экспрессия PD-L1  $\geq 1\%$  TC или  $\geq 1\%$  IC, в 21 образце экспрессия PD-L1  $< 1\%$  TC и  $< 1\%$  IC). Отдельные образцы были окрашены для анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay на аппаратах BenchMark ULTRA (эталонный), BenchMark XT и BenchMark GX.

Все образцы VENTANA PD-L1 (SP142) Assay были ослеплены и рандомизированы, а затем проанализированы с помощью алгоритма оценки NSCLC (в Таб. 14 представлены данные по NSCLC с  $\geq 50\%$  TC или  $\geq 10\%$  IC, в Таб. 15 представлены данные по NSCLC с  $\geq 1\%$  TC или  $\geq 1\%$  IC). Результаты изложены в Таб. 20 и Таб. 21.

**Таб. 20.** Межплатформенная согласованность окрашивания с использованием VENTANA PD-L1 (SP142) Assay образцов NSCLC (PD-L1 экспрессия  $\geq 50\%$  TC или  $\geq 10\%$  IC).

| Межплатформенная согласованность | Согласованность, % (95 % CI) †                                            |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| BenchMark ULTRA: BenchMark XT    | PPA: 95,2 (77,3–99,2)<br>NPA: 100,0 (85,7–100,0)<br>OPA: 97,7 (88,2–99,6) |
| BenchMark ULTRA: BenchMark GX    | PPA: 95,2 (77,3–99,2)<br>NPA: 100,0 (85,1–100,0)<br>OPA: 97,7 (87,9–99,6) |

† Двусторонний CI метода Уилсона.

**Таб. 21.** Межплатформенная согласованность окрашивания с использованием VENTANA PD-L1 (SP142) Assay образцов NSCLC (экспрессия PD-L1  $\geq 1\%$  TC или  $\geq 1\%$  IC).

| Межплатформенная согласованность | Согласованность, % (95 % CI) †                                                |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| BenchMark ULTRA: BenchMark XT    | PPA: 100,0 (85,7–100,0)<br>NPA: 100,0 (84,5–100,0)<br>OPA: 100,0 (92,0–100,0) |
| BenchMark ULTRA: BenchMark GX    | PPA: 100,0 (85,7–100,0)<br>NPA: 100,0 (84,5–100,0)<br>OPA: 100,0 (92,0–100,0) |

† Двусторонний CI метода Уилсона.

#### Исследования прецизионности оценок эксперта — NSCLC

Для оценки прецизионности оценок одного и разных экспертов, три патоморфолога оценивали 80 уникальных образцов NSCLC с диапазоном экспрессии PD-L1, которые были окрашены с использованием VENTANA PD-L1 (SP142) Assay. Образцы ослеплялись и рандомизировались до оценки их PD-L1 статуса с использованием алгоритма VENTANA PD-L1 (SP142) Assay для оценки NSCLC (в Таб. 14 представлены данные по NSCLC с  $\geq 50\%$  TC или  $\geq 10\%$  IC, в Таб. 15 представлены данные по NSCLC с  $\geq 1\%$  TC или  $\geq 1\%$  IC). Эксперты оценивали все образцы по два раза с промежутком между просмотрами не менее двух недель. Уровни согласованности между оценками исследователей и патоморфолога изложены в Таб. 22 и Таб. 23.

**Таб. 22.** Прецизионность эксперта в отношении анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay образцов NSCLC (экспрессия PD-L1  $\geq 50\%$  TC или  $\geq 10\%$  IC).

| Прецизионность эксперта                                                                                                      | Согласованность, % (95 % CI)                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Прецизионность между экспертами (парные сравнения средних величин между экспертами при первой оценке предметных стекол)      | APA: 88,8 (82,0–94,1)<br>ANA: 89,0 (82,2–94,4)<br>OPA: 88,9 (82,8–94,1) |
| Прецизионность одного эксперта (средняя частота совпадений результатов всех трех экспертов между первым и вторым просмотром) | APA: 93,7 (89,9–96,6)<br>ANA: 93,6 (89,8–96,7)<br>OPA: 93,6 (90,3–96,6) |

**Таб. 23.** Прецизионность эксперта в отношении анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay образцов NSCLC (PD-L1 экспрессия  $\geq 1\%$  TC или  $\geq 1\%$  IC).

| Прецизионность эксперта                                                                                                      | Согласованность, % (95 % CI)                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Прецизионность между экспертами (парные сравнения средних величин между экспертами при первой оценке предметных стекол)      | APA: 93,7 (88,8–97,3)<br>ANA: 90,7 (83,3–96,2)<br>OPA: 92,5 (87,5–96,7) |
| Прецизионность одного эксперта (средняя частота совпадений результатов всех трех экспертов между первым и вторым просмотром) | APA: 95,4 (92,0–98,1)<br>ANA: 93,4 (88,3–97,2)<br>OPA: 94,6 (90,8–97,5) |

#### Исследование воспроизводимости результата между лабораториями — NSCLC

Исследование воспроизводимости результата между лабораториями в отношении окрашивания с использованием VENTANA PD-L1 (SP142) Assay выполнено для подтверждения воспроизводимости анализа при определении статуса PD-L1 в образцах тканей NSCLC. В 3 независимых лабораториях в каждый из 5 непоследовательных дней за период не менее 20 дней было окрашено 28 уникальных образцов NSCLC с диапазоном экспрессии PD-L1. Перед окрашиванием микропрепараты были замаскированы и рандомизированы. На каждом участке

окрашенные стекла были независимо оценены 2 патоморфологами (экспертами) с использованием алгоритма VENTANA PD-L1 (SP142) Assay для NSCLC (в Таб. 14 представлены данные по NSCLC с  $\geq 50$  % TC или  $\geq 10$  % IC, в Таб. 15 представлены данные по NSCLC с  $\geq 1$  % TC или  $\geq 1$  % IC). Результаты изложены в Таб. 24 и Таб. 25.

**Таб. 24.** Воспроизводимость результата между лабораториями в отношении анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay образцов NSCLC (PD-L1 экспрессия  $\geq 50$  % TC или  $\geq 10$  % IC).

| Воспроизводимость между лабораториями                                                                     | Согласованность, % (95 % CI)                                                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Общее количество совпадений (по сравнению с консенсусной оценкой по всем лабораториям, дням и экспертам)  | PPA: 86,6 (83,0–89,5) <sup>†</sup><br>NPA: 99,8 (98,7–100,0) <sup>†</sup><br>OPA: 93,2 (91,3–94,7) <sup>†</sup> |
| Частота совпадений между лабораториями (парные сравнения средних величин между лабораториями)             | APA: 89,5 (80,9–95,5)<br>ANA: 92,1 (84,4–97,1)<br>OPA: 91,0 (90,3–91,6) <sup>†</sup>                            |
| Частота совпадений между экспертами (парные сравнения средних величин между экспертами одной лаборатории) | APA: 93,9 (89,3–97,4)<br>ANA: 95,4 (90,6–98,2)<br>OPA: 94,7 (92,2–96,5) <sup>†</sup>                            |

<sup>†</sup> Двусторонний CI метода Уилсона.

**Таб. 25.** Воспроизводимость результата между лабораториями в отношении анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay образцов NSCLC (экспрессия PD-L1  $\geq 1$  % TC или  $\geq 1$  % IC).

| Воспроизводимость между лабораториями                                                                     | Согласованность, % (95 % CI)                                                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Общее количество совпадений (по сравнению с консенсусной оценкой по всем лабораториям, дням и экспертам)  | PPA: 97,1 (94,9–98,3) <sup>†</sup><br>NPA: 89,9 (86,6–92,5) <sup>†</sup><br>OPA: 93,5 (91,6–95,0) <sup>†</sup> |
| Частота совпадений между лабораториями (парные сравнения средних величин между лабораториями)             | APA: 88,4 (78,9–94,1)<br>ANA: 86,6 (79,6–92,2)<br>OPA: 87,6 (86,8–88,3) <sup>†</sup>                           |
| Частота совпадений между экспертами (парные сравнения средних величин между экспертами одной лаборатории) | APA: 89,2 (80,8–94,3)<br>ANA: 87,5 (81,3–92,5)<br>OPA: 88,4 (84,9–91,2) <sup>†</sup>                           |

<sup>†</sup> Двусторонний CI метод Уилсона.

### Исследование клинических результатов — NSCLC $\geq 50$ % TC или $\geq 10$ % IC

Результаты выполнения анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay были исследованы в работе OAK (NCT02008227), многоцентровом международном рандомизированном открытом исследовании III фазы по оценке эффективности и безопасности лечения препаратом TECENTRIQ пациентов с локально распространенным или метастазирующим NSCLC и прогрессией опухоли во время или после курса терапии платиносодержащими препаратами.

Образцы пациентов были окрашены с помощью VENTANA PD-L1 (SP142) Assay и оценены на приемлемость окрашивания и экспрессию PD-L1. Образцы пациентов были представлены фиксированными формалином и залитыми в парафин биоптатами NSCLC. Биоптаты были получены при тонкоигольной биопсии (34,5 %), трепанобиопсии (16,3 %), резекции (28,7 %) или другим способом (20,5 %); 66,6 % образцов были получены из первичных опухолей и 33,4 % — из метастатических опухолей.

В Таб. 26 представлены данные по общей частоте приемлемости окрашивания посредством VENTANA PD-L1 (SP142) Assay для всех образцов NSCLC, отобранных для исследования. Также указана частота пригодности по морфологическим критериям и по приемлемости фоновое окрашивания на PD-L1 для изготовленных микропрепаратов. Из 1185 образцов первичное окрашивание 72 образцов было

признано ненадлежащим, и окрашивание было выполнено повторно. 26 образцов из 72 были все же признаны ненадлежащими (1 образец — в связи с неприемлемым тканевым контролем небных миндалин, 19 образцов — в связи с неприемлемым отрицательным контролем реагента и 6 образцов — в связи с неприемлемым фоновым окрашиванием или морфологией). В рамках анализа VENTANA PD-L1 (SP142) Assay была продемонстрирована высокая доля препаратов, пригодных по первичному и окончательному окрашиванию: 93,9 % и 97,8 % соответственно. Окончательные частоты приемлемости по морфологическим критериям и фоновому окрашиванию превышали 99 %.

**Таб. 26.** VENTANA PD-L1 (SP142) Assay NSCLC рабочие характеристики окрашивания при анализе в рамках OAK (NCT02008227).

| Показатель                            | Частота приемлемых результатов % (n/N) (95 % CI) <sup>†</sup> |                              |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------|
|                                       | Начальный *                                                   | Конечный **                  |
| Общая частота приемлемого окрашивания | 93,9 (1113/1185) (92,4–95,1)                                  | 97,8 (1159/1185) (96,8–98,5) |
| Морфологические критерии              | 98,5 (1122/1139) (97,6–99,1)                                  | 99,6 (1160/1165) (99,0–99,8) |
| Фоновое окрашивание                   | 98,2 (1119/1139) (97,3–98,9)                                  | 99,7 (1161/1165) (99,1–99,9) |

\* Первая попытка окрашивания

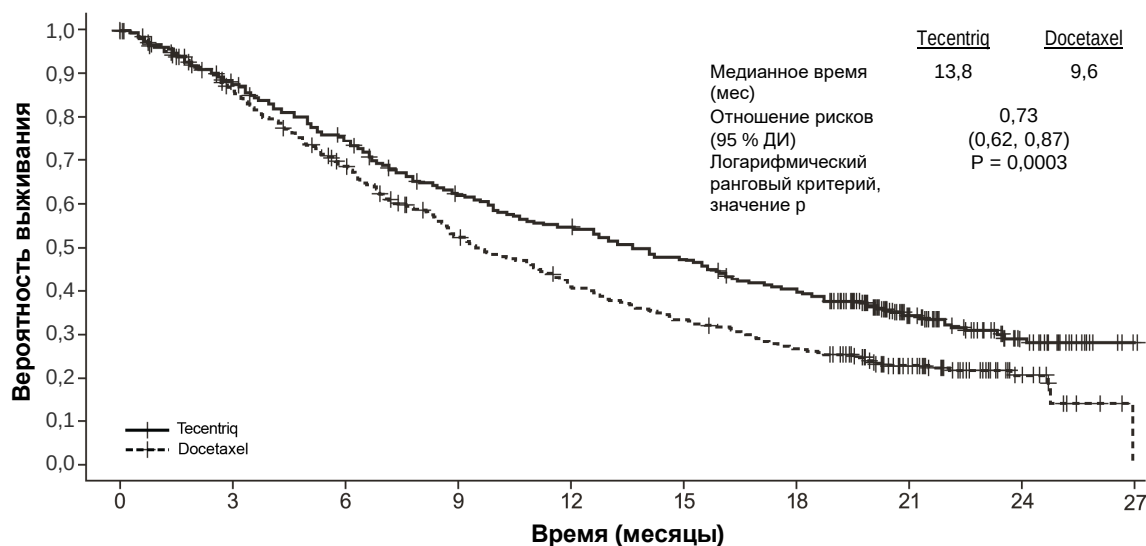
\*\* Окончательная попытка окрашивания

<sup>†</sup> Двусторонний CI метод Уилсона

Для участия в OAK исследовании зарегистрировалась 1225 пациентов, при этом популяция первичного анализа состояла из первых 850 рандомизированных пациентов. Подходящие пациенты были разделены в группы по статусу экспрессии PD-L1 в IC, по количеству предшествующих химиотерапий и показателям гистологии. Пациентов случайным образом в равной пропорции (1:1) распределили по группам лечения – 1200 мг TECENTRIQ внутривенно каждые 3 недели до достижения неприемлемой токсичности или подтверждение средствами клинической или лучевой диагностики прогрессии опухоли, или 75 мг/м<sup>2</sup> доцетаксела внутривенно каждые 3 недели до потери клинической пользы от этого режима по оценке исследователя. Экспрессию PD-L1 на TC и IC в образцах опухолей оценивали проспективно с использованием VENTANA PD-L1 (SP142) Assay. Полученные результаты были использованы для определения подгрупп по экспрессии PD-L1 и анализа этих подгрупп по заранее определенному плану, описанному ниже.

В OAK исследовании среди пациентов популяции первичного анализа средний возраст пациентов составил 64 года (диапазон: от 33 до 85), 61 % пациентов — лица мужского пола. Большинство пациентов были европеоидами (70 %). Приблизительно у 3/4 пациентов был диагностирован неплоскоклеточный рак (74 %), 10 % пациентов с мутацией рецептора эпителиального фактора роста (EGFR), 0,2 % пациентов с перераспределением ALK и большинство пациентов курили на момент проведения исследования или курили в прошлом (82 %). Исходный функциональный статус по шкале ECOG был равен 0 (37 %) или 1 (63 %). 75 % пациентов получали ранее только один режим химиотерапии с препаратом платины. Основным мерой исходов по эффективности в этом OAK исследовании являлась общая выживаемость (OS) в популяции первичного анализа (первые 850 рандомизированных пациентов). Результаты OAK исследования с медианой продолжительности наблюдения 21 месяц представлены в Таб. 27 и на рисунке 2.

Образцы опухолей оценивали проспективно с использованием VENTANA PD-L1 (SP142) Assay в центральной лаборатории. Полученные результаты были использованы для определения подгрупп по экспрессии PD-L1 и анализа этих подгрупп по заранее определенному плану. Из 850 пациентов 16 % были отнесены в группу с высокой экспрессией PD-L1, определяемой как экспрессия PD-L1  $\geq 50$  % TC или  $\geq 10$  % IC. Поисковые показатели эффективности анализа OS подгруппы на основании экспрессии PD-L1, отношение рисков составило 0,41 (95 % CI: 0,27; 0,64) в подгруппе высокой экспрессии PD-L1 и 0,82 (95 % CI: 0,68; 0,98) у пациентов с невысокой экспрессией PD-L1.



Количество пациентов в группе риска

|           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |   |   |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|---|---|
| Tecentriq | 425 | 407 | 382 | 363 | 342 | 326 | 305 | 279 | 260 | 248 | 234 | 223 | 218 | 205 | 198 | 188 | 175 | 163 | 157 | 141 | 116 | 74 | 54 | 41 | 28 | 15 | 4 | 1 |
| Docetaxel | 425 | 390 | 365 | 336 | 311 | 286 | 263 | 236 | 219 | 195 | 179 | 168 | 151 | 140 | 132 | 123 | 116 | 104 | 98  | 90  | 70  | 51 | 37 | 28 | 16 | 6  | 3 |   |

Отношение рисков оценивается на основе стратифицированной модели Кокса, p-значение – на основе стратифицированного логарифмического рангового критерия

**Рисунок 2. Kaplan-Meier кривая по общей выживаемости в популяции первичного анализа исследования OAK (NCT02008227).**

**Таб. 27. Результаты оценки эффективности в популяции первичного анализа из исследования OAK (NCT02008227).**

| Общая выживаемость (OS)     | Атезолизумаб<br>(n = 425) | Доцетаксел<br>(n = 425) |
|-----------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Смертельные исходы (%)      | 271 (64)                  | 298 (70)                |
| Медиана, месяцы (95 % CI)   | 13,8 (11,8, 15,7)         | 9,6 (8,6, 11,2)         |
| Отношение рисков* (95 % CI) | 0,73 (0,62, 0,87)         |                         |
| p-значение**                | 0,0003                    |                         |
| 12 месяцев OS (%)           | 218 (55)                  | 151 (41)                |
| 18 месяцев OS (%)           | 157 (40)                  | 98 (27)                 |

\* Стратифицировано по экспрессии PD-L1 в иммунокомпетентных клетках, инфильтрирующих ткань опухоли, числу предшествующих режимов химиотерапии и гистологическим особенностям

\*\* На основе стратифицированного логарифмического рангового критерия  
CI = Доверительный интервал

#### Исследование клинических результатов — NSCLC ≥ 1% TC или ≥ 1% IC

Эффективность TECENTRIQ была исследована в многоцентровом, международном, рандомизированном, открытом исследовании IMpower150 (NCT02366143) среди пациентов, не получавших химиотерапию, с метастатическим плоскоклеточным раком NSCLC. В исследовании приняли участие 1202 пациента, стратифицированных по полу, наличию метастазов в печени и статусу экспрессии PD-L1 по TC и IC. Пациентов рандомизировали на три группы (в соотношении 1:1:1) в зависимости от получаемого лечения.

- TECENTRIQ (atezolizumab) по 1200 мг в сочетании с паклитакселом и карбоплатином каждые 3 недели в течение четырех или шести курсов, затем atezolizumab 1200 мг каждые 3 недели до прекращения клинической пользы (группа A).

- TECENTRIQ (atezolizumab) по 1200 мг в сочетании с бевацизумабом, паклитакселом и карбоплатином каждые 3 недели в течение четырех или шести курсов с последующим приемом atezolizumab по 1200 мг до прекращения клинической пользы, и бевацизумаб каждые 3 недели до начала прогрессирования заболевания или до достижения неприемлемой токсичности (группа B)
- Бевацизумаб с паклитакселом и карбоплатином каждые 3 недели в течение четырех или шести курсов с последующим приемом бевацизумаба каждые 3 недели до начала прогрессирования заболевания или до достижения неприемлемой токсичности (группа C)

Основные характеристики заболевания и демографические характеристики обследуемых групп не отличались между группами лечения. Средний возраст пациентов составил 63 лет (диапазон: от 31 до 90), 60 % пациентов — лица мужского пола. Большинство пациентов были европеоидами (82 %). Приблизительно в 10 % случаев у пациентов была диагностирована мутация рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), у 4 % пациентов наблюдали перераспределение ALK, у 14 % в начале исследования были обнаружены метастазы в печени. Большинство пациентов (80 %), принимающих участие в исследовании, являлись настоящими или бывшими курильщиками. Исходный функциональный статус по шкале ECOG был равен 0 (43 %) или 1 (57 %). У 51 % пациентов наблюдали экспрессию PD-L1 опухолью ≥ 1 % TC или ≥ 1 % IC, у 49 % пациентов экспрессия PD-L1 < 1 % TC и < 1 % IC.

На момент проведения окончательного анализа для определения PFS, среднее время наблюдения составляло 15,3 месяца. В популяции ITT, у пациентов с мутацией EGFR или перераспределением ALK, которые ранее получали терапию ингибиторами тирозинкиназы, наблюдали клинически значимое улучшение PFS в группе B по сравнению с группой C (HR 0,61, 95 % CI: 0,52, 0,72; медиана PFS 8,3 по сравнению с 6,8 месяцами).

На момент проведения промежуточной оценки анализа OS средняя продолжительность наблюдения составила 19,7 месяцев. Результаты обновленного анализа PFS в ITT популяции, а также ключевые результаты указанного анализа обобщены в Таб. 28. Кривая Kaplan-Meier OS в популяции ITT приводится на рисунке 3. На рисунке 5 приведены результаты OS в подгруппах ITT и PD-L1. На рисунках 4 и 6 представлены обновленные результаты PFS.

Таб. 28. Результаты эффективности для популяции всех включенных в исследование пациентов, принявших хотя бы одну дозу препарата, в IMpower150.

| Критерии эффективности                                                                    | Группа А<br>(Атезолизумаб +<br>Паклитаксель +<br>Карбоплатин) | Группа В<br>(Атезолизумаб +<br>Бевацизумаб +<br>Паклитаксель +<br>Карбоплатин) | Группа С<br>(Бевацизумаб +<br>Паклитаксель +<br>Карбоплатин) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| <b>Дополнительные конечные точки<sup>#</sup></b>                                          |                                                               |                                                                                |                                                              |
| Оцененная исследователем PFS (RECIST v1.1) <sup>‡</sup>                                   | n = 402                                                       | n = 400                                                                        | n = 400                                                      |
| Количество случаев (%)                                                                    | 330 (82,1)                                                    | 291 (72,8)                                                                     | 355 (88,8)                                                   |
| Медианная продолжительность PFS (месяцы)                                                  | 6,7                                                           | 8,4                                                                            | 6,8                                                          |
| 95 % CI                                                                                   | (5,7, 6,9)                                                    | (8,0, 9,9)                                                                     | (6,0, 7,0)                                                   |
| Стратифицированное отношение рисков **** <sup>†</sup> (95 % CI)                           | 0,91 (0,78, 1,06)                                             | 0,59 (0,50, 0,69)                                                              | ---                                                          |
| р-значение *,**                                                                           | 0,2194                                                        | < 0,0001                                                                       |                                                              |
| 12 месяцев PFS (%)                                                                        | 24                                                            | 38                                                                             | 20                                                           |
| OS промежуточный анализ <sup>‡</sup>                                                      | n = 402                                                       | n = 400                                                                        | n = 400                                                      |
| Количество смертей (%)                                                                    | 206 (51,2)                                                    | 192 (48,0)                                                                     | 230 (57,5)                                                   |
| Медианное время до событий (месяцы)                                                       | 19,5                                                          | 19,8                                                                           | 14,9                                                         |
| 95 % CI                                                                                   | (16,3, 21,3)                                                  | (17,4, 24,2)                                                                   | (13,4, 17,1)                                                 |
| Стратифицированное отношение рисков **** <sup>†</sup> (95 % CI)                           | 0,85 (0,71, 1,03)                                             | 0,76 (0,63, 0,93)                                                              | ---                                                          |
| р-значение *,**                                                                           | 0,0983                                                        | 0,006                                                                          |                                                              |
| 6 месяцев OS (%)                                                                          | 84                                                            | 85                                                                             | 81                                                           |
| 12 месяцев OS (%)                                                                         | 66                                                            | 68                                                                             | 61                                                           |
| <b>Лучший общий ответ, оцениваемый исследователем ***<sup>†</sup>, ‡<br/>(RECIST 1.1)</b> | n = 401                                                       | n = 397                                                                        | n = 393                                                      |
| Число респондентов (%)                                                                    | 163 (40,6)                                                    | 224 (56,4)                                                                     | 158 (40,2)                                                   |
| 95 % CI                                                                                   | (35,8, 45,6)                                                  | (51,4, 61,4)                                                                   | (35,3, 45,2)                                                 |
| Число полных ответов (%)                                                                  | 8 (2,0)                                                       | 11 (2,8)                                                                       | 3 (0,8)                                                      |
| Число частичных ответов (%)                                                               | 155 (38,7)                                                    | 213 (53,7)                                                                     | 155 (39,4)                                                   |
| <b>Оцененная исследователем DOR<sup>‡</sup> (RECIST v1.1)</b>                             | n = 163                                                       | n = 224                                                                        | n = 158                                                      |
| Медиана в месяцах                                                                         | 8,3                                                           | 11,5                                                                           | 6,0                                                          |
| 95 % CI                                                                                   | (7,1, 11,8)                                                   | (8,9, 15,7)                                                                    | (5,5, 6,9)                                                   |

<sup>#</sup> Первичные конечные точки эффективности были PFS и OS, их проанализировали в популяции ITT дикого типа (WT), т.е. исключая пациентов с EGFR мутациями или перераспределением ALK.

\* На основе стратифицированного логарифмического рангового критерия.

\*\* В информационных целях; в популяции ITT сравнения между группой В и группой С, а также между группой А и группой С еще не были формально проверены в соответствии с предварительно определенной иерархией анализа.

\*\*\* Наилучший общий ответ для полного и частичного ответа.

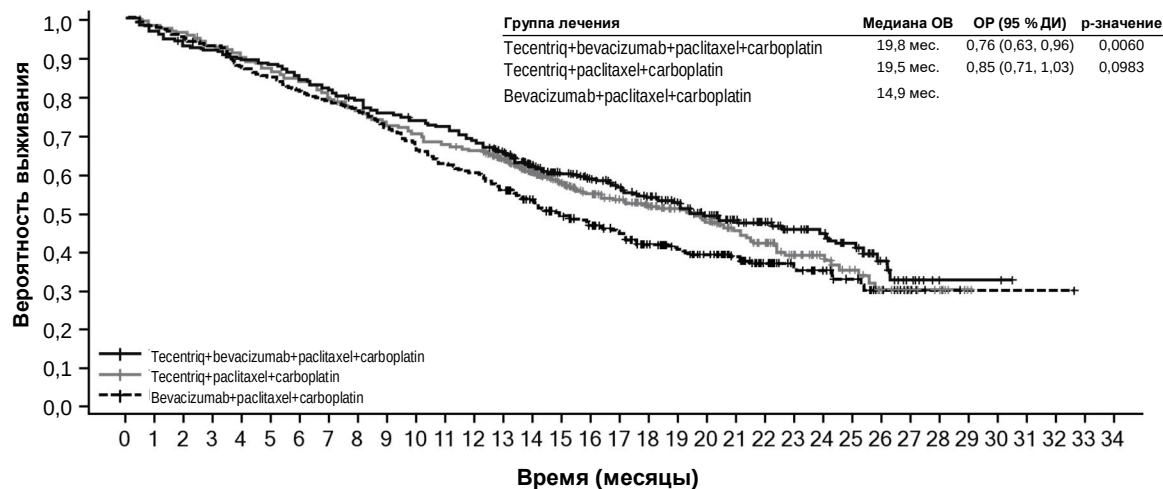
\*\*\*\* Стратифицированы по полу, наличию метастазов печени и выраженности PD-L1 в TC и IC.

<sup>†</sup> Группа С является группой сравнения для всех отношений рисков.

<sup>‡</sup> Обновленные результаты анализа PFS и промежуточный анализ OS, результаты на 22 января 2018 г. при клинически допускаемой верхней границе концентрации опухолевого маркера.

PFS = выживаемость без прогрессирования; RECIST = Response Evaluation Criteria in Solid Tumours v1.1.

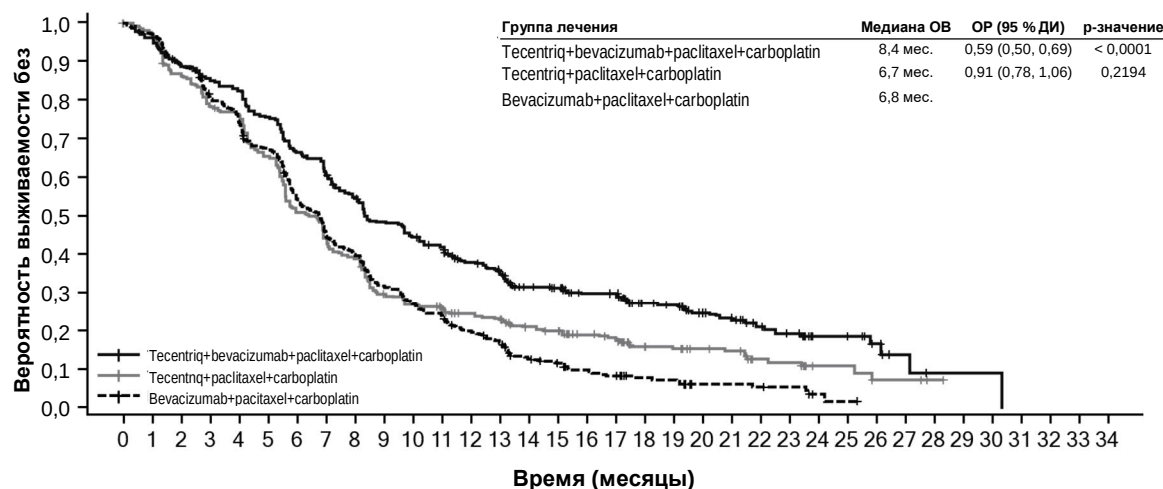
CI = доверительный интервал; DOR = продолжительность ответа; OS = общая выживаемость.



**Количество пациентов в группе риска**

|                                              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |
|----------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|---|---|---|
| Tecentriq+bevacizumab+paclitaxel+carboplatin | 400 | 380 | 367 | 361 | 351 | 347 | 333 | 320 | 308 | 297 | 288 | 281 | 265 | 244 | 208 | 185 | 162 | 147 | 130 | 112 | 93 | 73 | 62 | 45 | 38 | 32 | 18 | 10 | 2 | 2 | 2 |   |
| Tecentriq+paclitaxel+carboplatin             | 402 | 391 | 382 | 369 | 357 | 343 | 332 | 314 | 301 | 287 | 275 | 266 | 258 | 237 | 204 | 176 | 153 | 136 | 120 | 107 | 93 | 76 | 59 | 44 | 31 | 25 | 15 | 10 | 7 | 1 |   |   |
| Bevacizumab+paclitaxel+carboplatin           | 400 | 388 | 376 | 366 | 344 | 335 | 317 | 303 | 293 | 278 | 255 | 241 | 233 | 209 | 180 | 154 | 139 | 123 | 104 | 90  | 78 | 68 | 51 | 41 | 36 | 27 | 15 | 6  | 3 | 1 | 1 | 1 |

Рисунок 3. Кривая Каплана-Мейера общей выживаемости, IMpower150.



**Количество пациентов в группе риска**

|                                              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |   |   |   |   |  |
|----------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|---|---|---|---|--|
| Tecentriq+bevacizumab+paclitaxel+carboplatin | 400 | 376 | 352 | 336 | 326 | 297 | 262 | 240 | 215 | 189 | 174 | 163 | 141 | 127 | 96 | 91 | 76 | 58 | 55 | 40 | 35 | 26 | 22 | 13 | 12 | 7 | 3 | 1 | 1 | 1 |  |
| Tecentriq+paclitaxel+carboplatin             | 402 | 387 | 343 | 313 | 302 | 258 | 204 | 171 | 154 | 116 | 105 | 100 | 87  | 83  | 66 | 62 | 48 | 43 | 31 | 29 | 25 | 23 | 14 | 13 | 6  | 6 | 3 | 3 | 1 |   |  |
| Bevacizumab+paclitaxel+carboplatin           | 400 | 385 | 353 | 318 | 297 | 261 | 213 | 176 | 154 | 122 | 104 | 93  | 74  | 62  | 43 | 35 | 26 | 22 | 16 | 15 | 8  | 8  | 7  | 6  | 2  | 1 |   |   |   |   |  |

Рисунок 4. Кривая Каплана-Мейера выживаемости без прогрессирования, IMpower150.

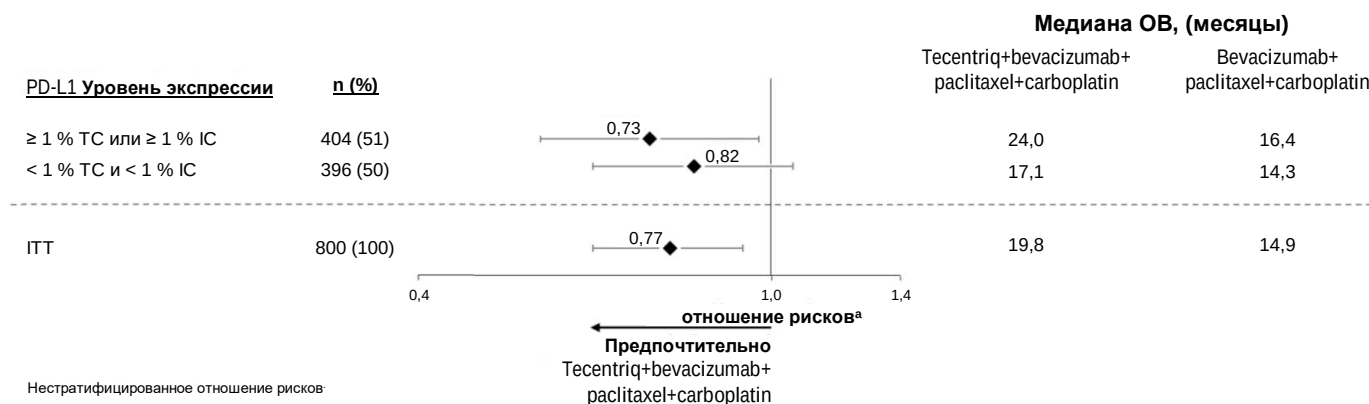


**Рисунок 5. Форест-диаграмма общей выживаемости в исследовании IMpower150, группа В по сравнению с группой С.**

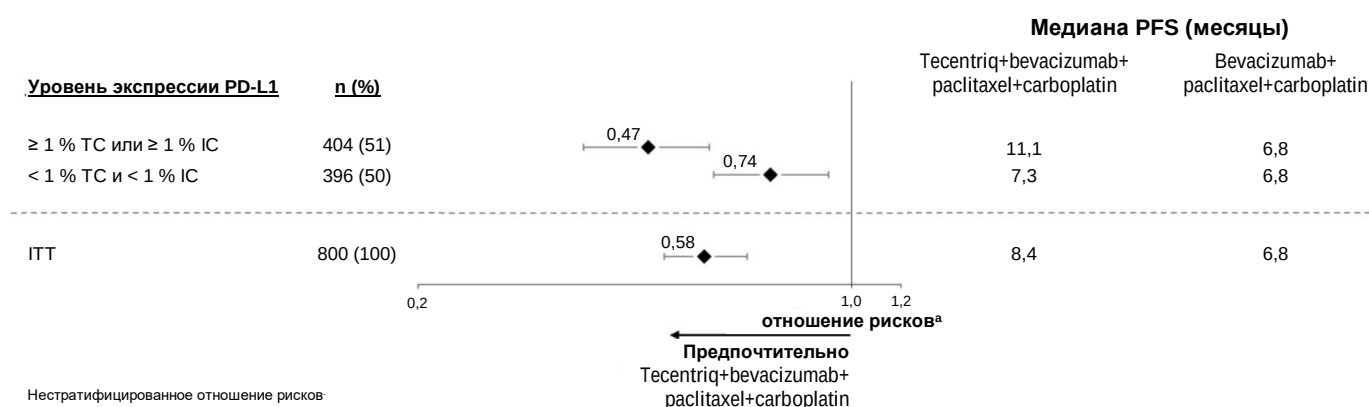


**Рисунок 6. Форест-диаграмма прогрессии выживаемости в исследовании IMpower150, группа В по сравнению с группой С.**

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56(5):739-745.
- Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, et al. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity.* 2007;27(1):111-122.
- Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature.* 2014;515(7528):563-567.
- Bellmunt J, Mullane SA, Werner L, et al. Association of PD-L1 expression on tumor-infiltrating mononuclear cells and overall survival in patients with urothelial carcinoma. *Ann Oncol.* 2015;26(4):812-817.
- Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol.* 2010;28(19):3167-3175.
- Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet.* 2016;387(10030):1837-1846.
- Powles T, Eder JP, Fine GD, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature.* 2014;515(7528):558-562.
- Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet.* 2016;387(10031):1909–20.
- Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(26):2443-2454.
- Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
- Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances*. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
- Anatomic Pathology Checklist. College of American Pathologists. Jul 28, 2015.
- CLSI. *Quality assurance for design control and implementation of immunohistochemistry assay: approved guidelines*. 2nd edition Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.

14. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech Histochem. 1991;66(4):194-199.
15. Hautzer NW, Wittkuhn JF, McCaughey WT. Trypsin digestion in immunoperoxidase staining. J Histochem Cytochem. 1980;28(1):52-53.
16. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Pathol. 1980;73(5):626-632.
17. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. Lab Med. 1983;14:767

#### ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW и логотип VENTANA являются товарными знаками Roche. Все остальные товарные знаки являются собственностью их соответствующих владельцев.

© Ventana Medical Systems, Inc. и Roche Diagnostics International, Inc., 2019 г.

#### КОНТАКТЫ



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
D-68305 Mannheim  
Germany

Уполномоченный представитель  
в Республике Беларусь:  
ООО "Алмазмед"  
220040, г.Минск ул. Восточная 33 пом.3, к.1.



[www.ventana.com](http://www.ventana.com)