

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx
SK006

50 testów do stosowania w urządzeniu Autostainer Link 48

Spis treści

1.	Przeznaczenie.....	2
2.	Podsumowanie i wyjaśnienie	2
	2.1 NSCLC	2
	2.2 Rak urotelialny.....	3
	2.3 HNSCC.....	3
	2.4 Czerniak	3
3.	Zasada procedury	3
4.	Dostarczane materiały	3
5.	Materiały wymagane, ale niedostarczane.....	5
6.	Środki ostrożności	5
7.	Przechowywanie.....	6
8.	Przygotowanie próbek	6
	8.1 Skrawki zatopione w parafinie	7
	8.2 Zalecenia dotyczące przechowywania skrawków	7
	8.2.1 Zalecenia dotyczące przechowywania skrawków NSCLC	7
	8.2.2 Zalecenia dotyczące przechowywania skrawków raka urotelialnego	7
	8.2.3 Zalecenia dotyczące przechowywania skrawków HNSCC.....	7
	8.2.4 Zalecenia dotyczące przechowywania skrawków czerniaka	7
9.	Przygotowanie odczynników.....	7
10.	Procedura barwienia za pomocą urządzenia Autostainer Link 48 Solution.....	8
11.	Kontrola jakości	8
12.	Weryfikacja działania zestawu	9
13.	Ocena wybarwienia i interpretacja wartości skali	9
	13.1 NSCLC – ekspresja PD-L1 według skali Tumor Proportion Score.....	9
	13.2 Rak urotelialny – ekspresja PD-L1 według skali Combined Positive Score.....	10
	13.3 HNSCC – ekspresja PD-L1 według skali Combined Positive Score i/lub Tumor Proportion Score	11
	13.3.1 Skala Combined Positive Score	11
	13.3.2 Skala Tumor Proportion Score.....	12
	13.4 Czerniak – ekspresja PD-L1 według oceny MEL	13
14.	Ocena preparatu.....	14
15.	Ograniczenia.....	16
	15.1 Ograniczenia ogólne	16
	15.2 Ograniczenia swoiste dla danego produktu	16
16.	Ocena skuteczności.....	17
	16.1 Ocena skuteczności nieklinicznej: tkanki prawidłowe i nowotworowe	17
	16.2 Ocena skuteczności w badaniach nieklinicznych: NSCLC.....	19

16.3 Ocena skuteczności klinicznej: NSCLC	21
16.4 Ocena skuteczności nieklinicznej: rak urotelialny	25
16.5 Ocena skuteczności klinicznej: rak urotelialny	27
16.6 Ocena skuteczności w badaniach nieklinicznych: HNSCC	30
16.7 Ocena skuteczności klinicznej: HNSCC	33
16.8 Ocena skuteczności nieklinicznej: czerniak	39
17. Rozwiązywanie problemów	40
18. Piśmiennictwo	41
Objaśnienia symboli	41

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx

SK006

50 testów do stosowania w urządzeniu Autostainer Link 48

1. Przeznaczenie

Do badań diagnostycznych in vitro.

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx jest jakościowym testem immunohistochemicznym wykorzystującym przeciwciała Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3, który służy do wykrywania białka PD-L1 w utwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie tkankach niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC), raka urotelialnego, raka płaskonabłonkowego głowy i szyi (HNSCC) i czerniaka z użyciem systemu wizualizacji EnVision FLEX w urządzeniu Autostainer Link 48.

Ekspresja białka PD-L1 w przypadku NSCLC jest określana przy użyciu skali stopnia wybarwienia guza (ang. Tumor Proportion Score, TPS), która określa odsetek żywotnych komórek nowotworowych wykazujących częściowy lub całkowity odczyn błonowy o dowolnym nasileniu.

Ekspresja białka PD-L1 w przypadku raka urotelialnego jest określana przy użyciu skali łącznego wyniku wartości dodatnich (ang. Combined Positive Score, CPS), która pozwala uzyskać wynik według następującego równania: iloraz liczby wybarwionych komórek wykazujących ekspresję PD-L1 (komórki nowotworowe, limfocyty, makrofagi) i całkowitej liczby żywotnych komórek nowotworowych pomnożony przez 100.

Ekspresja białka PD-L1 w przypadku HNSCC jest określana przy użyciu skali CPS i/lub TPS.

Wskazania diagnostyczne towarzyszące

Wskazanie guza	Poziom ekspresji PD-L1	Przeznaczenie
NSCLC	TPS \geq 1%	Test PD-L1 IHC 22C3 pharmDx jest narzędziem pomocniczym służącym do rozpoznawania pacjentów z NSCLC, którzy mają zostać poddani leczeniu produktem KEYTRUDA® (pembrolizumab).*
	TPS \geq 50%	
Rak urotelialny	CPS \geq 10	Test PD-L1 IHC 22C3 pharmDx jest narzędziem pomocniczym służącym do rozpoznawania pacjentów z rakiem urotelialnym, którzy mają zostać poddani leczeniu produktem KEYTRUDA® (pembrolizumab).*
HNSCC	CPS \geq 1	Test PD-L1 IHC 22C3 pharmDx jest narzędziem pomocniczym służącym do rozpoznawania pacjentów z HNSCC, którzy mają zostać poddani leczeniu produktem KEYTRUDA® (pembrolizumab).*
	TPS \geq 50%	

*Aby uzyskać informacje dotyczące wartości granicznych ekspresji PD-L1 oraz prowadzenia leczenia w szczególnych warunkach klinicznych, należy zapoznać się z etykietą produktu KEYTRUDA®.

2. Podsumowanie i wyjaśnienie

Wiązanie ligandów PD-1, PD-L1 i PD-L2 z receptorem PD-1 występującym na powierzchni komórek T hamuje proliferację komórek T i wytwarzanie cytokin. W przypadku niektórych guzów występuje zwiększona ekspresja ligandów PD-1, a sygnalizacja z udziałem tego szlaku może przyczyniać się do hamowania czynnego nadzoru immunologicznego nad guzami przez komórki T. KEYTRUDA (pembrolizumab) jest humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym, które wiąże się z receptorem PD-1 i blokuje jego interakcję z białkami PD-L1 i PD-L2, powodując hamowanie odpowiedzi immunologicznej z udziałem szlaku PD-1, w tym przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej. W modelach myszy syngenicznych zablokowanie aktywności PD-1 spowodowało zmniejszenie wzrostu guza (1).

2.1 NSCLC

W sponsorowanym przez firmę Merck Sharp & Dohme badaniu klinicznym KEYNOTE-024 (KN024) oceniano przydatność kliniczną stosowania PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w identyfikacji nieleczonych uprzednio pacjentów z NSCLC wykazującym ekspresję PL-L1 (TPS \geq 50%), którzy mogą wykazać odpowiedź na leczenie produktem KEYTRUDA. W przypadku pacjentów z NSCLC wykazującym ekspresję

PD-L1 (TPS \geq 50%), którym podawano produkt KEYTRUDA, uzyskano poprawę wyników w porównaniu do standardowej chemioterapii. Szczegółowe informacje na temat badania KN024 zawiera część „Ocena skuteczności klinicznej (NSCLC)” poniżej (2).

W sponsorowanym przez firmę Merck Sharp & Dohme badaniu klinicznym KEYNOTE-010 (KN010) oceniano przydatność kliniczną stosowania PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w identyfikacji leczonych uprzednio pacjentów z NSCLC wykazującym ekspresję PL-L1 (TPS \geq 1%), którzy mogą wykazać odpowiedź na leczenie produktem KEYTRUDA. W przypadku pacjentów z NSCLC wykazującym ekspresję PD-L1 (TPS \geq 1%), którym podawano produkt KEYTRUDA, uzyskano poprawę wyników w porównaniu do leczenia z zastosowaniem docetakselu. Szczegółowe informacje na temat badania KN010 zawiera część „Ocena skuteczności klinicznej (NSCLC)” poniżej (3).

2.2 Rak urotelialny

W sponsorowanym przez firmę Merck Sharp & Dohme badaniu klinicznym KEYNOTE-052 (KN052) oceniano skuteczność kliniczną stosowania testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w identyfikacji uprzednio nieleczonych, niekwalifikujących się do podawania cisplatyny pacjentów z miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym rakiem urotelialnym, u których mogłaby wystąpić odpowiedź na leczenie produktem KEYTRUDA (4). Zasadność kliniczną określono u pacjentów wykazujących ekspresję PD-L1 wynoszącą CPS \geq 10. Szczegółowe informacje na temat badania KN052 zawiera część „Ocena skuteczności klinicznej (rak urotelialny)” poniżej.

W sponsorowanym przez firmę Merck Sharp & Dohme badaniu klinicznym KEYNOTE-045 (KN045) oceniano skuteczność kliniczną stosowania testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w identyfikacji pacjentów z miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym rakiem urotelialnym, z rozpoznaniem postępu choroby, podczas chemioterapii z zastosowaniem związków platyny lub po niej, u których mogłaby wystąpić odpowiedź na leczenie produktem KEYTRUDA (5). Szczegółowe informacje na temat badania KN045 zawiera część „Ocena skuteczności klinicznej (rak urotelialny)” poniżej.

2.3 HNSCC

W sponsorowanym przez firmę Merck Sharp & Dohme badaniu klinicznym KEYNOTE-048 (KN048) oceniano przydatność kliniczną stosowania PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w identyfikacji pacjentów z nawrotowym lub przerzutowym HNSCC wykazującym ekspresję PL-L1 (CPS \geq 1), którzy nie byli wcześniej leczeni systemowo na nawrotową lub przerzutową postać choroby, u których miejscowe leczenie nie przyniosłoby rezultatów i którzy mogą wykazywać odpowiedź na leczenie produktem KEYTRUDA (6). Szczegółowe informacje na temat badania KN048 zawiera część „Ocena skuteczności klinicznej (HNSCC)” poniżej.

W sponsorowanym przez firmę Merck Sharp & Dohme badaniu klinicznym KEYNOTE-040 (KN040) oceniano przydatność kliniczną stosowania PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w identyfikacji pacjentów z nawrotowym lub przerzutowym HNSCC wykazującym ekspresję PL-L1 (TPS \geq 50%), u których wystąpiła progresja choroby podczas lub po zakończeniu leczenia z użyciem związków platyny w przypadku nawrotowego lub przerzutowego HNSCC lub po chemioterapii z zastosowaniem związków platyny (podawanych w ramach leczenia indukcyjnego, skojarzonego i adjuwantowego), u których miejscowe leczenie nie przyniosłoby rezultatów i którzy mogą wykazywać odpowiedź na leczenie produktem KEYTRUDA (7). Szczegółowe informacje na temat badania KN040 zawiera część „Ocena skuteczności klinicznej (HNSCC)” poniżej.

2.4 Czerniak

Test PD-L1 IHC 22C3 pharmDx można stosować do określenia statusu białka PD-L1 u pacjentów z czerniakiem, w przypadku których rozważa się leczenie (8).

3. Zasada procedury

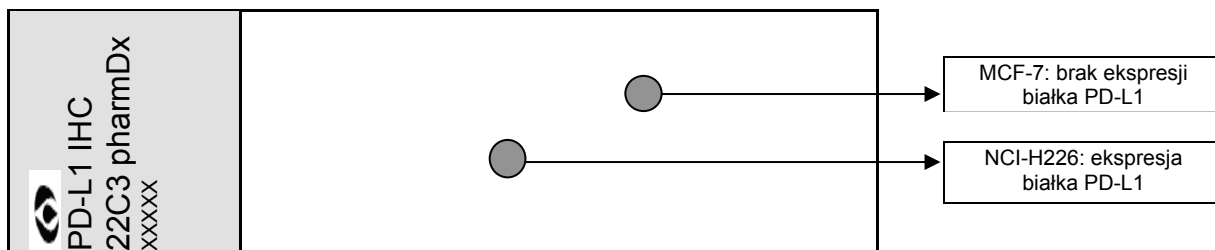
Zestaw testowy PD-L1 IHC 22C3 pharmDx zawiera zoptymalizowane odczynniki i protokół wymagany do wykonania procedury barwienia IHC skrawków tkankowych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie w urządzeniu Autostainer Link 48. Po inkubacji z pierwotnym przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko PD-L1 lub odczynnikiem Negative Control Reagent (NCR) próbki są inkubowane z przeciwciałem Linker swoistym dla gatunku gospodarza przeciwciała pierwotnego, a następnie poddawane inkubacji z gotowym do użycia odczynnikiem do wizualizacji, składającym się z cząsteczek przeciwciała wtórnego i cząsteczek peroksydazy chrzastkowej (HRP) sprzężonych z polimerowym szkieletem dekstranu. Konwersja enzymatyczna dodanego następnie chromogenu powoduje wytrącanie się osadu będącego widocznym produktem reakcji w miejscu występowania antygenu. Barwa reakcji chromogennej zmienia się w zależności od odczynnika wzmacniającego działanie chromogenu. Następnie próbkę można poddać barwieniu kontrastowemu i przykryć szkiełkiem nakrywkowym. Interpretacja wyników odbywa się za pomocą mikroskopu świetlnego.

4. Dostarczane materiały

Każdy zestaw obejmuje 19,5 mL przeciwciała pierwszorzędowego PD-L1 (o stężeniu białka ok. 3 μ g/mL) oraz odczynniki niezbędne do przeprowadzenia 50 testów w maksymalnie 15 pojedynczych seriach. Wyszczególnione poniżej materiały są wystarczające do wykonania 50 testów (50 preparatów inkubowanych z przeciwciałem pierwotnym przeciwko PD-L1 i 50 preparatów inkubowanych z odpowiednim odczynnikiem Negative Control Reagent (NCR); łącznie 100 preparatów). W przypadku większych skrawków tkankowych nie można zagwarantować dostępności trzech stref nakraplania (3 \times 150 μ L) na preparat. Należy zauważyć, że stosowanie większych skrawków zmniejszy całkowitą liczbę dostępnych testów w zestawie,

Zestaw zawiera materiały wystarczające do wykonania maksymalnie 15 pojedynczych serii odczynów.

Objętość	Opis
1 x 34,5 mL	Odczynnik Peroxidase-Blocking Reagent PEROXIDASE-BLOCKING REAGENT Roztwór buforowy zawierający nadtlenek wodoru, detergent i azydek sodu o stężeniu 0,015 mol/L.
1 x 19,5 mL	Przeciwciało pierwotne: Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3 MONOCLONAL MOUSE ANTI-PD-L1 CLONE 22C3 Mysie przeciwciało monoklonalne (IgG1) skierowane przeciwko PD-L1 w roztworze buforowym zawierającym białko stabilizujące i azydek sodu o stężeniu 0,015 mol/L.
1 x 15 mL	Kontrola ujemna NEGATIVE CONTROL REAGENT Kontrolne mysie przeciwciało monoklonalne IgG w roztworze buforowym zawierającym białko stabilizujące i azydek sodu o stężeniu 0,015 mol/L.
1 x 34,5 mL	Mouse LINKER LINKER, ANTI-MOUSE Królicze przeciwciało drugorzędowe skierowane przeciwko immunoglobulinom mysim w roztworze buforowym zawierającym białko stabilizujące i azydek sodu o stężeniu 0,015 mol/L.
1 x 34,5 mL	Odczynnik Visualization Reagent-HRP VISUALIZATION REAGENT-HRP Dekstran sprzężony z cząsteczkami peroksydazy i cząsteczkami koziego przeciwciała drugorzędowego skierowanego przeciwko immunoglobulinom króliczym i mysim w roztworze buforowym zawierającym białko stabilizujące i środek przeciwbakteryjny.
15 x 7,2 mL	Odczynnik DAB+ Substrate Buffer DAB+ SUBSTRATE BUFFER Roztwór buforowy zawierający nadtlenek wodoru i środek przeciwbakteryjny.
1 x 5 mL	Roztwór DAB+ Chromogen DAB+ CHROMOGEN Tetrachlorowodorek 3,3'-diaminobenzyny w rozpuszczalniku organicznym.
1 x 34,5 mL	DAB Enhancer DAB ENHANCER Wodny roztwór siarczanu miedzi.
6 x 30 mL	Roztwór EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH, 50x EnVision FLEX TARGET RETRIEVAL SOLUTION LOW pH (50x) Roztwór buforowy, pH 6,1, zawierający detergent i środek przeciwbakteryjny.
15 preparatów	Preparaty kontrolne PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Control Slides CONTROL SLIDES Każdy preparat zawiera osad komórek dwóch linii komórkowych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie: NCI-H226** o umiarkowanej ekspresji białka PD-L1 oraz MCF-7 niewykazujące ekspresji białka PD-L1.



** Dr AF Gazdar i dr JD Minna z NIH zyskali uznanie dzięki swojemu wkładowi w opracowanie linii komórkowych NCI-H226 (nr ATCC: CRL-5826™) (9).

Uwaga: wszystkie odczynniki z zestawu zostały opracowane specjalnie do stosowania z tym zestawem. Aby test działał prawidłowo, nie należy stosować substytutów innych niż roztwór EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (nr kat. K8005). Zestaw PD-L1 IHC 22C3 pharmDx jest przeznaczony do stosowania w urządzeniu Autostainer Link 48. W celu uzyskania dalszych informacji należy zapoznać się z podręcznikami użytkownika urządzeń Autostainer Link 48 i PT Link.

5. Materiały wymagane, ale niedostarczane

Moduł do obróbki wstępnej PT Link Pre-treatment Module (nr kat. PT100/PT101/PT200)

Urządzenie Autostainer Link 48 (nr kat. AS480)

Bufor EnVision FLEX Wash Buffer (20x) (nr kat. K8007)

Hematoxylin (nr kat. K8008)

Woda destylowana lub dejonizowana (woda o jakości odpowiedniej dla odczynników)

Stoper

Tkanki wykazujące odczyn dodatni i ujemny do stosowania w charakterze prób kontrolnych (patrz część Kontrola jakości)

Szkiełka mikroskopowe: Dako FLEX IHC Microscope Slides (nr kat. K8020) lub Superfrost Plus z ładunkiem elektrostatycznym

Szkiełka nakrywkowe

Środek do trwałego zatapiania i odczynniki pomocnicze wymagane do nałożenia szkiełek nakrywkowych

Mikroskop świetlny (obiektyw o powiększeniu 4–40x)

6. Środki ostrożności

- 1) Do badań diagnostycznych in vitro.
- 2) Do stosowania przez wyszkolony personel.
- 3) Opisany produkt zawiera silnie toksyczny w czystej postaci związek chemiczny – azydek sodu (NaN_3). Azydek sodu (NaN_3) zastosowany w produkcie w stężeniu, które nie jest sklasyfikowane jako niebezpieczne, może reagować z elementami kanalizacji wykonanymi z ołowiu i miedzi, powodując nagromadzenie silnie wybuchowych azydków metali. Po usunięciu spłukać dużą ilością wody, aby zapobiec nagromadzeniu się azydków metali w kanalizacji (10).
- 4) Przeciwciała pierwszorzędowe, odczynniki Negative Control Reagent, Linker i Visualization Reagent zawierają materiały pochodzenia zwierzęcego.
- 5) Próbkę przed i po utrwaleniu oraz wszystkie materiały mające z nimi kontakt należy traktować jako potencjalnie zakaźne i usuwać przy zachowaniu odpowiednich środków ostrożności (11).
- 6) Czasy inkubacji, temperatury lub metody inne niż podane mogą przyczynić się do uzyskiwania błędnych wyników.
- 7) Odczynniki zostały optymalnie rozcieńczone. Dalsze rozcieńczanie może skutkować utratą zdolności barwienia antygenów.
- 8) Jakość odczynników Visualization Reagent, Liquid DAB+ Chromogen i roztworu roboczego DAB+ Substrate-Chromogen może ulec pogorszeniu pod wpływem nadmiernej ekspozycji na światło. Nie należy przechowywać elementów urządzenia ani przeprowadzać barwienia w miejscach silnie naświetlonych, np. w bezpośrednim świetle słonecznym.
- 9) Pozostałości parafiny mogą prowadzić do uzyskania wyników fałszywie ujemnych.
- 10) Zastosowanie objętości odczynników innych niż zalecane może skutkować utratą widocznej immunoreaktywności PD-L1.
- 11) Wyniki mniejszych badań wykazały podobne zakresy dynamicznej ekspresji PD-L1 w parach próbek guzów pierwotnych i przerzutowych NSCLC oraz raka urotelialnego. Istnieje możliwość występowania różnic w ekspresji PD-L1 w guzach pierwotnych w porównaniu z przerzutowymi u tego samego pacjenta ze względu na fakt, że każdy guz ma unikatową heterogeniczność.
- 12) Duże skrawki tkankowe mogą wymagać zastosowania odczynnika w ilości 3 x 150 μL .
- 13) Zasadniczo zakazuje się pracy z produktem osobom poniżej 18. roku życia. Użytkownicy muszą być szczegółowo przeszkoleni w zakresie prawidłowych procedur postępowania, niebezpiecznych właściwości produktu i niezbędnych środków ostrożności. Dodatkowe informacje zawiera Karta Charakterystyki Substancji.
- 14) W celu uniknięcia kontaktu z oczami i skórą należy nosić odpowiednie osobiste wyposażenie ochronne.
- 15) Niewykorzystany roztwór usuwać zgodnie z rozporządzeniami lokalnymi, wojewódzkimi i krajowymi.
- 16) Karty Charakterystyki Substancji są dostępne na stronie www.agilent.com lub na żądanie.
- 17) Karty Charakterystyki Substancji odczynnika Peroxidase-Blocking Reagent i odczynnika Visualization Reagent-HRP są dostępne na żądanie.
- 18) W przypadku krajów spoza Unii Europejskiej zatwierdzone wskazania i wartości graniczne ekspresji pomocne w leczeniu zamieszczone są na lokalnej etykiecie produktu KEYTRUDA.



Niebezpieczeństwo

Odczynnik DAB+ Substrate Buffer: zawiera imidazol.

H360D	Może działać szkodliwie na dziecko w łonie matki.
P201	Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
P280	Stosować rękawice ochronne. Stosować ochronę oczu lub twarzy. Stosować odzież ochronną.
P308 + P313	W przypadku narażenia lub styczności: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
P405	Przechowywać pod zamknięciem.
P501	Zawartość i pojemnik usuwać zgodnie z lokalnymi, regionalnymi, krajowymi i międzynarodowymi przepisami.



Niebezpieczeństwo

Odczynnik DAB+ Chromogen: zawiera tetrachlorowodorek 3,3-diaminobenzydyny.

H350	Może powodować raka.
H341	Podjeżdza się, że powoduje wady genetyczne.
P201	Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
P280	Stosować rękawice ochronne. Stosować ochronę oczu lub twarzy. Stosować odzież ochronną.
P308 + P313	W przypadku narażenia lub styczności: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
P405	Przechowywać pod zamknięciem.
P501	Zawartość i pojemnik usuwać zgodnie z lokalnymi, regionalnymi, krajowymi i międzynarodowymi przepisami.



Ostrzeżenie

DAB Enhancer

H400	Działa silnie toksycznie na organizmy wodne.
H411	Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.
P273	Unikać uwalniania do środowiska.
P391	Zebrać wyciek.
P501	Zawartość i pojemnik usuwać zgodnie z lokalnymi, regionalnymi, krajowymi i międzynarodowymi przepisami.



Ostrzeżenie

Roztwór EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x)

H319	Działa drażniąco na oczy.
H411	Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.
P280	Stosować ochronę oczu lub twarzy.
P273	Unikać uwalniania do środowiska.
P264	Dokładnie umyć ręce po użyciu.
P305 + P351 + P338	W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
P501	Zawartość i pojemnik usuwać zgodnie z lokalnymi, regionalnymi, krajowymi i międzynarodowymi przepisami.

Zawiera 5-bromo-5-nitro-1,3-dioksan. Może wywoływać reakcje alergiczne.

7. Przechowywanie

Wszystkie elementy zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, w tym preparaty kontrolne, należy przechowywać w ciemnym miejscu w temperaturze 2–8°C, gdy nie są używane w urządzeniu Autostainer Link 48.

Nie używać zestawu po upływie daty ważności nadrukowanej na zewnętrznej powierzchni opakowania zestawu. Jeśli odczynniki są przechowywane w warunkach innych niż podane w ulotce dołączonej do opakowania, użytkownik musi je zweryfikować.

Nie ma wyraźnych oznak wskazujących na niestabilność produktu, dlatego równoległe z odczynnikami na materiale pochodzącym od pacjentów należy wykonywać dodatnie i ujemne próby kontrolne.

8. Przygotowanie próbek

Z próbkami tkankowymi należy postępować w sposób umożliwiający zachowanie tkanki do barwienia IHC. W przypadku wszystkich próbek tkankowych należy stosować standardowe metody obróbki tkanek.

8.1 Skrawki zatopione w parafinie

Próbki tkankowe FFPE nadają się do użycia. Inne środki utrwalające nie zostały zatwierdzone i mogą powodować błędne wyniki. Zalecany czas utrwalania w 10% roztworze obojętnej buforowanej formaliny (NBF) wynosi 12–72 godzin, jednak w badaniu z użyciem ograniczonej liczby próbek utrwalonych w 10% roztworze NBF wykazano, że czasy utrwalania wynoszące 4–168 godzin nie miały systematycznego wpływu na detekcję PD-L1. Czasy utrwalania ≤ 3 godzin mogą skutkować zróżnicowaną detekcją PD-L1. Próbki należy przygotować w formie bloczków o grubości 3 lub 4 mm utrwalonych w formalinie, odwodnionych i oczyszczonych w serii kąpieli alkoholowych i ksylenowych, a następnie infiltrowanych płynną parafiną. Temperatura parafiny nie powinna przekraczać 60°C. Utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie bloczki tkankowe NSCLC, które mają co najmniej 5 lat, mogą utracić immunoreaktywność PD-L1.

Próbki tkankowe należy pociąć na skrawki o grubości 4–5 µm. Po pocięciu tkanek na skrawki należy je umieścić na szkiełkach mikroskopowych Dako FLEX IHC (nr kat. K8020) lub SuperFrost Plus, a następnie umieścić na godzinę w ciepłarnie w temperaturze 58°C ± 2°C.

8.2 Zalecenia dotyczące przechowywania skrawków

W celu zachowania antygenowości po osadzeniu skrawków tkankowych na szkiełkach należy je przechowywać w ciemności w temperaturze 2–8°C (preferowane warunki) lub w temperaturze pokojowej nieprzekraczającej 25°C. Po osadzeniu preparatów należy je przechowywać i poddawać obróbce w temperaturze nieprzekraczającej 25°C, aby zachować integralność i antygenowość tkanek.

8.2.1 Zalecenia dotyczące przechowywania skrawków NSCLC

Skrawki należy wybarwić w ciągu 6 miesięcy przy przechowywaniu w temperaturze 2–8°C (preferowane warunki) lub w temperaturze 25°C.

8.2.2 Zalecenia dotyczące przechowywania skrawków raka urotelialnego

Skrawki należy wybarwić w ciągu 6 miesięcy przy przechowywaniu w temperaturze 2–8°C (preferowane warunki) lub w temperaturze 25°C.

8.2.3 Zalecenia dotyczące przechowywania skrawków HNSCC

Skrawki należy wybarwić w ciągu 6 miesięcy przy przechowywaniu w temperaturze 2–8°C (preferowane warunki) lub w ciągu 4 miesięcy przy przechowywaniu w temperaturze 25°C.

8.2.4 Zalecenia dotyczące przechowywania skrawków czerniaka

Skrawki należy wybarwić w ciągu 4 miesięcy przy przechowywaniu w temperaturze 2–8°C (preferowane warunki) lub w ciągu 2 miesięcy przy przechowywaniu w temperaturze 25°C.

9. Przygotowanie odczynników

Przed barwieniem należy przygotować następujące odczynniki:

Roztwór EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x)

Przygotować wystarczającą ilość roztworu 1x Target Retrieval Solution, Low pH, poprzez rozcieńczenie roztworu Target Retrieval Solution, Low pH (50x), w stosunku 1:50 wodą destylowaną lub dejonizowaną (wodą o jakości odpowiedniej dla odczynników); pH roztworu 1x Target Retrieval Solution musi wynosić $6,1 \pm 0,2$. 1x. Roztwór Target Retrieval Solution o pH poniżej 5,9 może dawać błędne wyniki. Jedna butelka 30 mL roztworu Target Retrieval Solution, Low pH (50x), rozcieńczonego w stosunku 1:50 daje 1,5 L roztworu 1x, co wystarcza do napełnienia jednego zbiornika urządzenia PT Link i analizy 24 preparatów. Roztwór 1x Target Retrieval Solution należy zutilizować po trzech użyciach i nie używać go po upływie 5 dni od rozcieńczenia.

Jeśli jest to wymagane, dostępny jest również dodatkowy roztwór EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x), nr kat. K8005.

Bufor EnVision FLEX Wash Buffer (20x)

Przygotować wystarczającą ilość buforu Wash Buffer poprzez rozcieńczenie buforu Wash Buffer (20x) w stosunku 1:20 wodą destylowaną lub dejonizowaną (wodą o jakości odpowiedniej dla odczynników) do etapów płukania. Niewykorzystany roztwór 1x należy przechowywać w temperaturze 2–8°C nie dłużej niż 1 miesiąc. W przypadku zmętnienia bufor nie nadaje się do użycia. W celu uzyskania dalszych informacji należy zapoznać się z podręcznikiem użytkownika urządzenia Autostainer Link 48.

Bufor EnVision FLEX Wash Buffer (20x) jest dostępny pod nr kat. K8007.

Roztwór DAB+ Substrate-Chromogen Solution

Roztwór należy dokładnie wymieszać przed użyciem. Wytrącanie się osadu w roztworze nie wpływa na jakość barwienia.

Aby przygotować roztwór DAB+ Substrate-Chromogen Solution, należy dodać jedną kroplę odczynnika Liquid DAB+ Chromogen na mL buforu DAB+ Substrate Buffer i wymieszać.*** Przygotowany odczynnik Substrate-Chromogen pozostaje stabilny przez 5 dni, jeśli jest przechowywany w ciemności w temperaturze 2–8°C.

Ważne uwagi:

- ***W przypadku używania całej butelki buforu DAB+ Substrate Buffer należy dodać 9 kropeł roztworu DAB+ Chromogen. Widniejąca na etykiecie informacja 7,2 mL oznacza objętość do wykorzystania i nie stanowi części objętości martwej (1,8 mL) butelki.
- Roztwór Liquid DAB+ Chromogen w butelce może przyjmować odcienie od przejrzystego do lawendowo-brązowego. Barwa roztworu nie wpływa na działanie produktu. Wykonywać rozcieńczenie zgodnie z wytycznymi przedstawionymi powyżej. Dodanie nadmiernej ilości roztworu Liquid DAB+ Chromogen do buforu DAB+ Substrate Buffer spowoduje osłabienie dodatniego odczynu.

10. Procedura barwienia za pomocą urządzenia Autostainer Link 48 Solution

Uwagi dotyczące procedury

Użytkownik powinien przeczytać dokładnie niniejsze instrukcje i zapoznać się ze wszystkimi elementami oraz odnoszącymi się do nich środkami ostrożności przed użyciem urządzenia (patrz część Środki ostrożności).

Przed przystąpieniem do barwienia immunohistochemicznego wszystkie odczynniki należy doprowadzić do temperatury pokojowej (20–25°C). Wszystkie procedury inkubacji należy również przeprowadzać w temperaturze pokojowej.

W trakcie procedury barwienia nie wolno dopuścić do wyschnięcia skrawków tkankowych. Wyszuszone skrawki tkankowe mogą wykazywać nasilony nieswoisty odczyn.

Wszystkie wymagane kroki i czasy inkubacji procedury barwienia są wstępnie zaprogramowane w oprogramowaniu Dako Link. W celu uzyskania dalszych informacji na temat protokołów programowania, ładowania preparatów i odczynników należy zapoznać się z podręcznikami użytkownika urządzeń Autostainer Link 48 i PT Link.

Uwaga: odczynniki i instrukcje dostarczane z systemem opracowano z myślą o uzyskaniu optymalnych wyników podczas pracy z zalecanymi odczynniki i materiałami. Dalsze rozcieńczenie odczynników bądź zmiana czasów lub temperatur inkubacji może prowadzić do uzyskania błędnych lub niezgodnych wyników.

Protokół barwienia

Należy wybrać protokół barwienia PD-L1 IHC 22C3 pharmDx z opcji w menu rozwijanym oprogramowania Dako Link.

Wszystkie wymagane kroki i czasy inkubacji procedury barwienia są wstępnie zaprogramowane w urządzeniu Autostainer Link 48. Jeśli na serwerze brakuje właściwych protokołów PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, należy skontaktować się z przedstawicielem działu wsparcia technicznego w celu ich uzyskania.

Krok 1: Procedura odparafinowania, ponownego nawodnienia i odmaskowania antygenu („3-w-1”)

Szczegółowe instrukcje zawiera podręcznik użytkownika urządzenia PT Link.

Ustawić w urządzeniu PT Link (nr kat. PT100/PT101/PT200) dla cykli Preheat (Ogrzewanie wstępne) i Cool (Schładzanie) temperaturę 65°C. Dla cyklu Heat (Ogrzewanie) ustawić temperaturę 97°C i czas 20 minut.

- ▶ Napełnić każdy zbiornik urządzenia PT Link 1,5 L roztworu roboczego Target Retrieval Solution, Low pH, 1x, w celu pokrycia skrawków tkankowych.
- ▶ Ogrzać wstępnie roztwór Target Retrieval Solution do temperatury 65°C.
- ▶ Zanurzyć statywy urządzenia Autostainer zawierające skrawki tkankowe utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie we wstępnie ogrzanym roztworze roboczym Target Retrieval Solution, Low pH, (1x), znajdującym się w zbiorniku urządzenia PT Link. Inkubować przez 20 minut w temperaturze 97°C.
- ▶ Po zakończeniu inkubacji w roztworze do odmaskowania antygenu i spadku temperatury do 65°C należy wyjąć wszystkie statywy urządzenia Autostainer ze zbiornika PT Link i natychmiast umieścić je w zbiorniku (np. stacji PT Link Rinse Station, nr kat. PT109) zawierającym rozcieńczony (1x) bufor Wash Buffer o temperaturze pokojowej (nr kat. K8007).
- ▶ Inkubować preparaty w rozcieńczonym buforze Wash Buffer o temperaturze pokojowej przez 5 minut.

Krok 2: Procedura barwienia

Po wykonaniu procedury odparafinowania, nawodnienia i odmaskowania antygenu („3-w-1”) statywy urządzenia Autostainer umieszcza się w urządzeniu Autostainer Link 48. Urządzenie przeprowadza proces barwienia, dodając odpowiedni odczynnik, monitorując czas inkubacji i płucząc preparaty pomiędzy kolejnymi odczynniki. Czasy zastosowania odczynników są wstępnie zaprogramowane w oprogramowaniu Dako Link.

Krok 3: Barwienie kontrastowe

Preparaty należy poddać barwieniu kontrastowemu w roztworze Hematoxylin (Link) (nr kat. K8008) przez 5 minut. Czas inkubacji w hematoksylinie jest wstępnie zaprogramowany w protokole.

Etap 4: Zatapianie

Wymagany jest bezwodny środek do trwałego zatapiania.

Uwaga: w zależności od kilku czynników, m.in. barwienia kontrastowego, materiałów i metod zatapiania oraz warunków przechowywania preparatów, może dojść do blaknięcia wybarwionych preparatów. Aby zminimalizować to zjawisko, preparaty należy przechowywać w ciemności w temperaturze pokojowej (20–25°C).

11. Kontrola jakości

Odczynniki wchodzące w skład zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx zostały poddane immunohistochemicznej kontroli jakości przy użyciu wymienionych powyżej procedur odmaskowania antygenu i barwienia. Odstępstwa od zalecanych w laboratorium procedur utrwalań, obróbki i zatapiania preparatów tkankowych mogą powodować istotne różnice w wynikach. Każda seria barwienia powinna obejmować preparaty do kontroli jakości. Preparaty do kontroli jakości przedstawiono w tabeli 6. Obejmują one wybarwioną metodą H&E próbkę tkanki pacjenta, zapewniane przez laboratorium dodatnie i ujemne próbki kontrolne tkanek oraz preparat kontrolnej linii komórkowej dostarczany przez firmę Dako (12). Należy postępować zgodnie z wytycznymi dotyczącymi kontroli jakości programu College of American Pathologists (CAP) Accreditation Program for Immunohistochemistry. Dodatkowe informacje zawiera również dokument CLSI Quality Assurance for Immunocytochemistry Approved Guideline (12, 13, 14).

12. Weryfikacja działania zestawu

Przed pierwszym zastosowaniem systemu barwienia w ramach procedury diagnostycznej użytkownik powinien zweryfikować jakość testu. W tym celu należy wykonać testy z użyciem serii tkanek zapewnianych przez laboratorium o znanej charakterystyce odczynów IHC, odpowiadających tkankom o odczynie dodatnim i ujemnym. Należy zapoznać się z procedurami kontroli jakości przedstawionymi w części Kontrola jakości powyżej. Powyższe procedury kontroli jakości należy powtarzać dla każdej nowej partii przeciwciał lub w przypadku zmiany parametrów testu. W tabeli 33 przedstawiono opcje rozwiązywania potencjalnych problemów, ich przyczyny oraz sugerowane działania korygujące.

13. Ocena wybarwienia i interpretacja wartości skali

Należy zapoznać się ze wskazaniami w celu uzyskania informacji na temat odpowiedniej oceny i interpretacji.

13.1 NSCLC – ekspresja PD-L1 według skali Tumor Proportion Score

Wszystkie żywotne komórki guza w obrębie całego skrawka tkankowego należy poddać ocenie i uwzględnić w ocenie punktowej PD-L1. Aby próbka została uznana za odpowiednią do oceny PD-L1, preparat wybarwiony w kierunku PD-L1 musi zawierać 100 żywotnych komórek guza.

Ocena preparatów powinna być przeprowadzana przez patologa z użyciem mikroskopu świetlnego. Do oceny punktowej odczynu immunohistochemicznego służy obiektyw o powiększeniu 10–40x. W ocenie należy uwzględnić widoczny odczyn błonowy komórek guza.

Ekspresja białka PD-L1 jest określana przy użyciu skali TPS, która określa odsetek żywotnych komórek guza wykazujących częściowy lub całkowity odczyn błonowy o dowolnym nasileniu.

$$TPS (\%) = \frac{\text{Liczba wybarwionych komórek z ekspresją PD-L1 (komórki nowotworowe)}}{\text{Całkowita liczba żywotnych komórek nowotworowych}} \times 100$$

Ocenie należy poddać częściowe lub całkowite wybarwienie błon komórkowych ($\geq 1+$), które różni się od odczynu cytoplazmatycznego. Odczyn cytoplazmatyczny należy traktować jako odczyn nieswoisty i pomijać go w ocenie nasilenia odczynu. Komórki prawidłowe i komórki układu immunologicznego związane z guzem, takie jak limfocyty naciekające czy makrofagi, **nie powinny** być uwzględniane w ocenie punktowej służącej do określenia ekspresji PD-L1.

W tabeli 1 poniżej przedstawiono szczegółowe informacje dotyczące elementów tkanek, które są uwzględniane i pomijane podczas określania stopnia wybarwienia guza.

Tabela 1. Kryteria uwzględniania/pomijania w ocenie TPS w przypadku NSCLC

Elementy tkankowe	Uwzględniany w ocenie TPS w przypadku NSCLC	Pomijany w ocenie TPS w przypadku NSCLC
Komórki nowotworowe	<ul style="list-style-type: none"> Przekonujący częściowy lub całkowity odczyn błonowy (o dowolnym nasileniu) u żywych komórek nowotworowych 	<ul style="list-style-type: none"> Z pominięciem jakiegokolwiek odczynu cytoplazmatycznego
Komórki układu immunologicznego	<ul style="list-style-type: none"> Nie uwzględniono 	Z pominięciem jakiegokolwiek odczynu komórek układu immunologicznego, takich jak: <ul style="list-style-type: none"> jednojądrzaste komórki zapalne (duże limfocyty, monocyty, makrofagi płucne), komórki osocza, neutrofile.
Inne	<ul style="list-style-type: none"> Nie uwzględniono 	Z pominięciem jakiegokolwiek odczynu: <ul style="list-style-type: none"> prawidłowych komórek sąsiadujących z komórkami nowotworowymi, komórek zrębu (fibroblastów), komórek martwiczych i/lub pozostałości komórkowych, złogów czarnego barwnika pochodzącego od węgla.

Podczas każdej serii barwienia preparaty należy poddać analizie w kolejności przedstawionej w tabeli 6 (część dot. oceny preparatów) w celu ustalenia ważności serii odczynów i umożliwienia oceny wybarwienia próbki tkanki. Podczas oceny ekspresji PD-L1 należy zbadać tkanki pacjenta wybarwione PD-L1 oraz odczynnikiem NCR z zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. Próbkę wybarwioną z użyciem odczynnika NCR muszą wykazywać odczyn swoisty wynoszący 0 i nieswoisty wynoszący $\leq 1+$.

Próbkę należy traktować jako wykazującą ekspresję PD-L1, jeśli w skali TPS $\geq 1\%$ żywotnych komórek guza wykazuje odczyn błonowy o dowolnym nasileniu. Próbkę należy traktować jako wykazującą wysoki poziom ekspresji PD-L1, jeśli w skali TPS $\geq 50\%$ żywotnych komórek guza wykazuje wybarwienie błony komórkowej o dowolnym nasileniu.

Skala stopnia wybarwienia guza (TPS)			
Poziom ekspresji PD-L1	TPS < 1%	TPS = 1–49%	TPS $\geq 50\%$
Stan ekspresji PD-L1	Brak ekspresji PD-L1	Ekspresja PD-L1	Wysoki poziom ekspresji PD-L1

Dodatkowe wytyczne zawiera dokument PD-L1 IHC 22C3 pharmDx NSCLC Interpretation Manual (Podręcznik interpretacji wyników testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx).

13.2 Rak urotelialny – ekspresja PD-L1 według skali Combined Positive Score

Wszystkie żywotne komórki guza w obrębie całego skrawka tkankowego należy poddać ocenie i uwzględnić w ocenie ekspresji PD-L1. Aby próbka została uznana za odpowiednią do oceny PD-L1, preparat wybarwiony w kierunku PD-L1 musi zawierać 100 żywotnych komórek guza.

Ekspresja białka PD-L1 jest określana przy użyciu skali CPS, która pozwala ocenić ekspresję według następującego równania: iloraz liczby wybarwionych komórek wykazujących ekspresję PD-L1 (komórki nowotworowe, limfocyty, makrofagi) i całkowitej liczby żywotnych komórek nowotworowych pomnożony przez 100. W celu poprawnego określenia mianownika przy dzieleniu należy właściwie wyznaczyć liczbę komórek nowotworowych, limfocytów i makrofagów. Pomimo że wynik obliczeń teoretycznie może przekroczyć 100, maksymalna wartość w skali CPS wynosi 100. Parametry umożliwiające uzyskanie wyniku w skali CPS:

$$\text{CPS} = \frac{\text{Liczba wybarwionych komórek z ekspresją PD-L1 (komórki nowotworowe, limfocyty, makrofagi)}}{\text{Całkowita liczba żywotnych komórek nowotworowych}} \times 100$$

Ocena preparatu musi być przeprowadzana przez patologa z użyciem mikroskopu świetlnego. Do oceny odczynu immunohistochemicznego służy obiektyw o powiększeniu 10x i 20x. Do oceny ekspresji PD-L1 należy użyć obiektywu o powiększeniu 20x.

Wybarwione komórki z ekspresją PD-L1 to zgodnie z definicją:

- komórki nowotworowe z przekonującym częściowym lub całkowitym liniowym odczynem błonowym (o dowolnym nasileniu), który widocznie różni się od odczynu cytoplazmatycznego, oraz
- limfocyty i makrofagi (jednojądrzaste komórki zapalne, MIC) w gniazdach komórek nowotworowych oraz sąsiadującej podpierającej tkance zrębu z przekonującym odczynem błonowym i/lub cytoplazmatycznym (o dowolnym nasileniu). Obecność jednojądrzastych komórek zapalnych musi być bezpośrednio związana z odpowiedzią organizmu na nowotwór.

Podczas każdej serii barwienia preparaty należy poddać analizie w kolejności przedstawionej w tabeli 6 (część dot. oceny preparatów) w celu ustalenia ważności serii odczynów i umożliwienia oceny wybarwienia próbki tkanki. Podczas oceny ekspresji PD-L1 należy zbadać tkanki pacjenta wybarwione PD-L1 oraz odczynnikami NCR z zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. Próbkę wybarwioną z użyciem odczynnika NCR muszą wykazywać odczyn swoisty wynoszący 0 i nieswoisty wynoszący ≤ 1+.

Mianownik CPS obejmuje wszystkie żywotne komórki nowotworowe (z ekspresją PD-L1 i bez niej). Nie obejmuje żadnych komórek układu immunologicznego, komórek prawidłowych, komórek martwiczych, wrzodów, przewlekłego zapalenia pęcherza moczowego i raka brodawkowatego o niskim stopniu złośliwości.

W tabeli 2 poniżej przedstawiono szczegółowe informacje dotyczące elementów tkanek, które są uwzględniane i pomijane w liczniku CPS w przypadku raka urotelialnego.

Tabela 2. Kryteria uwzględniania/pomijania w liczniku CPS w przypadku raka urotelialnego

Elementy tkankowe	Uwzględnione w liczniku	Pomijane w liczniku
Komórki nowotworowe	<ul style="list-style-type: none"> • Przekonujący częściowy lub całkowity liniowy odczyn błonowy (o dowolnym nasileniu) żywotnych komórek raka urotelialnego, w tym: <ul style="list-style-type: none"> • Rak brodawkowaty o wysokim stopniu złośliwości • Rak in situ (CIS) • Naciek na blaszkę włściwą, mięśniówkę lub błonę surowiczą • Rak przerzutowy 	<ul style="list-style-type: none"> • Komórki guza niewykazujące odczynu • Komórki nowotworowe z odczynem wyłącznie cytoplazmatycznym • Rak brodawkowaty o niskim stopniu złośliwości†
Komórki układu immunologicznego	<ul style="list-style-type: none"> • Odczyn błonowy i/lub cytoplazmatyczny* (o dowolnym nasileniu) jednojądrzastych komórek zapalnych (MIC) w gniazdach komórek nowotworowych oraz w sąsiadującej podpierającej tkance zrębu**: ○ Limfocyty (w tym skupiska limfocytów) ○ Makrofagi*** • Ocenie poddawane są tylko komórki MIC bezpośrednio związane z odpowiedzią na guza. 	<ul style="list-style-type: none"> • Jednojądrzaste komórki zapalne nie wykazujące odczynu • Jednojądrzaste komórki zapalne (w tym skupiska limfocytów) związane z wrzodami, przewlekłym zapaleniem pęcherza moczowego i innymi procesami niepowiązanymi z guzem • Jednojądrzaste komórki zapalne związane z prawidłowymi strukturami • Neutrofile, eozynofile i komórki osocza • Ziarniniaki występujące ze względu na obecność BCG††

Elementy tkankowe	Uwzględnione w liczniku	Pomijane w liczniku
Komórki innego typu	<ul style="list-style-type: none"> Nie uwzględniono 	<ul style="list-style-type: none"> Zdrowe komórki Komórki zrębu (w tym fibroblasty) komórek martwiczych i/lub pozostałości komórkowych,

*W przypadku **jednojądrzastych komórek zapalnych** odczyn błonowy często trudno odróżnić od odczynu cytoplazmatycznego ze względu na wysoki wskaźnik N:C. Z tego względu w wynikach skali uwzględniany jest odczyn błonowy i/lub cytoplazmatyczny jednojądrzastych komórek zapalnych.

**Za sąsiadujące jednojądrzaste komórki zapalne uznaje się komórki znajdujące się w obejmującym guz polu powiększenia 20x. Należy jednak wykluczać jednojądrzaste komórki zapalne NIEZWIĄZANE bezpośrednio z odpowiedzią organizmu na obecność guza.

***Makrofagi i histocyty są uznawane za takie same komórki.

†Jeśli guz obejmuje wyłącznie raka brodawkowatego o niskim stopniu złośliwości, wynik należy tak oznaczyć.

††Bacillus Calmette-Guérin

Wartość ekspresji białka PD-L1 w próbce pacjenta dzieli się na dwie kategorie: CPS < 10 oraz CPS ≥ 10. Informacje na temat przeprowadzania testu PD-L1 w szczególnych warunków klinicznych zawiera etykieta produktu KEYTRUDA®.

Dodatkowe wytyczne zawiera dokument PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Urothelial Carcinoma Interpretation Manual (Podręcznik interpretacji wyników testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx dotyczących raka urotelialnego).

13.3 HNSCC – ekspresja PD-L1 według skali Combined Positive Score i/lub Tumor Proportion Score

13.3.1 Skala Combined Positive Score

Wszystkie żywotne, inwazyjne komórki guza w obrębie całego skrawka tkankowego należy poddać ocenie i uwzględnić w ocenie ekspresji PD-L1. Aby próbka została uznana za odpowiednią do oceny PD-L1, preparat wybarwiony w kierunku PD-L1 musi zawierać co najmniej 100 żywotnych, inwazyjnych komórek guza.

Ekspresja białka PD-L1 jest określana przy użyciu skali CPS, która pozwala ocenić ekspresję według następującego równania: iloraz liczby wybarwionych komórek wykazujących ekspresję PD-L1 (komórki nowotworowe, limfocyty, makrofagi) i całkowitej liczby żywotnych komórek nowotworowych pomnożony przez 100. W celu poprawnego określenia mianownika przy dzieleniu należy właściwie wyznaczyć liczbę komórek nowotworowych, limfocytów i makrofagów. Pomimo że wynik obliczeń teoretycznie może przekroczyć 100, maksymalna wartość w skali CPS wynosi 100. Parametry umożliwiające uzyskanie wyniku w skali CPS:

$$\text{CPS} = \frac{\text{Liczba wybarwionych komórek z ekspresją PD-L1 (komórki nowotworowe, limfocyty, makrofagi)}}{\text{Całkowita liczba żywotnych komórek nowotworowych}} \times 100$$

Ocena preparatu musi być przeprowadzana przez patologa z użyciem mikroskopu świetlnego. Do oceny odczynu immunohistochemicznego służy obiektyw o powiększeniu 10x i 20x. Do oceny ekspresji PD-L1 należy użyć obiektywu o powiększeniu 20x.

Wybarwione komórki z ekspresją PD-L1 to zgodnie z definicją:

- komórki nowotworowe z przekonującym częściowym lub całkowitym liniowym odczynem błonowym (o dowolnym nasileniu), który widocznie różni się od odczynu cytoplazmatycznego, oraz
- limfocyty i makrofagi (jednojądrzaste komórki zapalne, MIC) w gniazdach komórek nowotworowych oraz sąsiadującej podpierającej tkance zrębu z przekonującym odczynem błonowym i/lub cytoplazmatycznym (o dowolnym nasileniu). Obecność jednojądrzastych komórek zapalnych musi być bezpośrednio związana z odpowiedzią organizmu na nowotwór.

Podczas każdej serii barwienia preparaty należy poddać analizie w kolejności przedstawionej w tabeli 6 (część dot. oceny preparatów) w celu ustalenia ważności serii odczynów i umożliwienia oceny wybarwienia próbki tkanki. Podczas oceny ekspresji PD-L1 należy zbadać tkanki pacjenta wybarwione PD-L1 oraz odczynnikiem NCR z zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. Próbkę wybarwioną z użyciem odczynnika NCR muszą wykazywać odczyn swoisty wynoszący 0 i nieswoisty wynoszący ≤ 1+.

Mianownik CPS obejmuje wszystkie żywotne, inwazyjne komórki nowotworowe (z ekspresją PD-L1 i bez niej). Pomijane są wszystkie komórki układu immunologicznego, komórki niezłośliwe, nieżywotne komórki guza, komórki raka in situ, komórki zrębu (w tym fibroblasty), komórki martwicze i/lub pozostałości komórkowe.

W tabeli 3 poniżej przedstawiono szczegółowe informacje dotyczące elementów tkanek, które są uwzględniane i pomijane w liczniku CPS w przypadku HNSCC.

Tabela 3. Kryteria uwzględniania/pomijania w liczniku CPS w przypadku HNSCC

Elementy tkankowe	Uwzględnione w liczniku	Pomijane w liczniku
Komórki nowotworowe	<ul style="list-style-type: none"> Przekonujący częściowy lub całkowity liniowy odczyn błonowy (o dowolnym nasileniu) żywotnych, inwazyjnych komórek nowotworowych 	<ul style="list-style-type: none"> Komórki nowotworowe niewykazujące odczynu Komórki nowotworowe z odczynem wyłącznie cytoplazmatycznym Rak in situ (CIS)

Elementy tkankowe	Uwzględnione w liczniku	Pomijane w liczniku
Komórki układu immunologicznego	<ul style="list-style-type: none"> Odczyn błonowy i/lub cytoplazmatyczny* (o dowolnym nasileniu) jednojądrzastych komórek zapalnych (MIC) w gniazdach komórek nowotworowych oraz w sąsiadującej podpierającej tkance zrębu**: o Limfocyty (w tym skupiska limfocytów) o Makrofagi*** Ocenie poddawane są tylko komórki MIC bezpośrednio związane z odpowiedzią na guza. 	<ul style="list-style-type: none"> Jednojądrzaste komórki zapalne nie wykazujące odczynu Jednojądrzaste komórki zapalne (w tym skupiska limfocytów) związane z wrzodami lub inne procesy zapalne Jednojądrzaste komórki zapalne związane z rakiem in situ Jednojądrzaste komórki zapalne związane z niezłośliwymi strukturami Neutrofile, eozynofile i komórki plazmatyczne
Komórki innego typu	<ul style="list-style-type: none"> Nie uwzględniono 	<ul style="list-style-type: none"> Komórki niezłośliwe Komórki zrębu (w tym fibroblasty) Komórki martwicze i/lub pozostałości komórkowe

*W przypadku **jednojądrzastych komórek zapalnych** odczyn błonowy często trudno odróżnić od odczynu cytoplazmatycznego ze względu na wysoki wskaźnik N:C. Z tego względu w wynikach skali uwzględniany jest odczyn błonowy i/lub cytoplazmatyczny jednojądrzastych komórek zapalnych.

Za **sąsiadujące jednojądrzaste komórki zapalne uznaje się komórki znajdujące się w obejmującym guz polu powiększenia 20x. Należy jednak wykluczać jednojądrzaste komórki zapalne **NIEZWIĄZANE** bezpośrednio z odpowiedzią organizmu na obecność guza.

***Makrofagi i histiocyty są uznawane za takie same komórki

Próbka powinna być uznana za wykazującą ekspresję PD-L1, gdy CPS ≥ 1 .

Skala Combined Positive Score			
Poziom ekspresji PD-L1	CPS < 1	CPS ≥ 1	CPS ≥ 20

Informacje na temat skuteczności klinicznej związanej z poziomem ekspresji PD-L1 zamieszczono w punkcie 16.7. Dodatkowe wytyczne zawiera dokument PD-L1 IHC 22C3 pharmDx HNSCCPS Interpretation Manual (Podręcznik interpretacji wyników testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w skali CPS).

13.3.2 Skala Tumor Proportion Score

Wszystkie żywotne, inwazyjne komórki guza w obrębie całego skrawka tkankowego należy poddać ocenie i uwzględnić w ocenie punktowej PD-L1. Aby próbka została uznana za odpowiednią do oceny PD-L1, preparat wybarwiony w kierunku PD-L1 musi zawierać co najmniej 100 żywotnych, inwazyjnych komórek guza.

Ocena preparatów powinna być przeprowadzana przez patologa z użyciem mikroskopu świetlnego. Do oceny punktowej odczynu immunohistochemicznego służy obiektyw o powiększeniu 10–20x. W ocenie należy uwzględnić widoczny odczyn błonowy komórek guza.

Ekspresja białka PD-L1 jest określana przy użyciu skali TPS, która określa odsetek żywotnych komórek guza wykazujących częściowy lub całkowity odczyn błonowy o dowolnym nasileniu.

$$TPS (\%) = \frac{\text{Liczba wybarwionych komórek z ekspresją PD-L1 (komórki nowotworowe)}}{\text{Całkowita liczba żywotnych komórek nowotworowych}} \times 100$$

Ocenie należy poddać częściowe lub całkowite wybarwienie błon komórkowych ($\geq 1+$), które różni się od odczynu cytoplazmatycznego. Odczyn cytoplazmatyczny należy traktować jako odczyn nieswoisty i pomijać go w ocenie nasilenia odczynu. Komórki prawidłowe i komórki układu immunologicznego związane z guzem, takie jak limfocyty naciekające czy makrofagi, **nie powinny** być uwzględniane w ocenie punktowej służącej do określenia ekspresji PD-L1.

Mianownik TPS obejmuje wszystkie żywotne, inwazyjne komórki nowotworowe (z ekspresją PD-L1 i bez niej). Pomijane są wszystkie komórki układu immunologicznego, komórki niezłośliwe, nieżywotne komórki guza, komórki raka in situ, komórki zrębu (w tym fibroblasty), komórki martwicze i/lub pozostałości komórkowe.

W tabeli 4 poniżej przedstawiono szczegółowe informacje dotyczące elementów tkanek, które są uwzględniane i pomijane w liczniku TPS w przypadku HNSCC.

Tabela 4. Kryteria uwzględniania/pomijania w liczniku TPS w przypadku HNSCC

Elementy tkankowe	Uwzględnione w liczniku	Pomijane w liczniku
Komórki nowotworowe	<ul style="list-style-type: none"> Przekonujący częściowy lub całkowity liniowy odczyn błonowy (o dowolnym nasileniu) żywotnych, inwazyjnych komórek nowotworowych 	<ul style="list-style-type: none"> Żywotne, inwazyjne komórki nowotworowe niewykazujące odczynu Komórki nowotworowe z odczynem wyłącznie cytoplazmatycznym Rak in situ (CIS)

Elementy tkankowe	Uwzględnione w liczniku	Pomijane w liczniku
Inne	<ul style="list-style-type: none"> Nie uwzględniono 	<ul style="list-style-type: none"> Komórki układu immunologicznego Komórki niezłośliwe Komórki zrębu (w tym fibroblasty) komórek martwiczych i/lub pozostałości komórkowych,

Podczas każdej serii barwienia preparaty należy poddać analizie w kolejności przedstawionej w tabeli 6 (część dot. oceny preparatów) w celu ustalenia ważności serii odczynów i umożliwienia oceny wybarwienia próbki tkanki. Podczas oceny ekspresji PD-L1 należy zbadać tkanki pacjenta wybarwione PD-L1 oraz odczynnikiem NCR z zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. Próbki wybarwione z użyciem odczynnika NCR muszą wykazywać odczyn swoisty wynoszący 0 i nieswoisty wynoszący $\leq 1+$.

Próbkę należy traktować jako wykazującą ekspresję PD-L1, jeśli w skali TPS $\geq 50\%$ żywotnych, inwazyjnych komórek nowotworowych wykazuje odczyn błonowy o dowolnym nasileniu.

Skala stopnia wybarwienia guza (TPS)		
Poziom ekspresji PD-L1	TPS < 50%	TPS $\geq 50\%$

Dodatkowe wytyczne zawiera dokument PD-L1 IHC 22C3 pharmDx HNSCC TPS Interpretation Manual (Podręcznik interpretacji wyników testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w skali TPS).

13.4 Czerniak – ekspresja PD-L1 według oceny MEL

Wszystkie żywotne komórki guza w obrębie całego skrawka tkankowego należy poddać ocenie i uwzględnić w ocenie punktowej PD-L1. Aby próbka została uznana za odpowiednią do oceny PD-L1, preparat wybarwiony w kierunku PD-L1 musi zawierać 100 żywotnych komórek guza.

Ocena preparatów powinna być przeprowadzana przez patologa z użyciem mikroskopu świetlnego. Do oceny punktowej odczynu immunohistochemicznego służy obiektyw o powiększeniu 10–40x.

Ekspresję białka PD-L1 określa się za pomocą skali Melanoma Score (ocena MEL), gdzie ocenia się stosunek guza i powiązanych komórek układu immunologicznego, w których zachodzi ekspresja białka PD-L1 o dowolnym nasileniu (słaby, umiarkowany lub silny odczyn), względem wszystkich żywych komórek nowotworowych oraz powiązanych komórek układu immunologicznego wykazujących ekspresję PD-L1. Wynik oceny MEL będzie zgłaszany następująco:

Ocena MEL						
	Ocena MEL 0	Ocena MEL 1	Ocena MEL 2	Ocena MEL 3	Ocena MEL 4	Ocena MEL 5
% wybarwionych komórek	0%	< 1%	$\geq 1\% - < 10\%$	$\geq 10\% - < 33\%$	$\geq 33\% - < 66\%$	$\geq 66\%$

W ocenie MEL należy uwzględnić widoczny częściowy lub całkowity odczyn błonowy komórek nowotworowych. Odczyn cytoplazmatyczny komórek nowotworowych należy traktować jako odczyn nieswoisty i wykluczać go z oceny ekspresji PD-L1.

W ocenie MEL należy uwzględnić widoczny częściowy lub całkowity odczyn błonowy i/lub cytoplazmatyczny związanych z nowotworem komórek układu immunologicznego. Związane z nowotworem komórki układu immunologicznego to jednojądrzaste komórki zapalne zlokalizowane wewnątrz gniazd komórek nowotworowych lub przylegające do nich.

UWAGA: podczas interpretacji próbek od pacjentów z czerniakiem może występować brązowe zabarwienie wynikające z obecności melaniny. W komórkach nowotworowych i makrofagach (melanofagach) może znajdować się niewielka ilość melaniny, co może utrudniać interpretację. Podczas oceny odczynu błonowego należy wykluczyć melaninę. Zdecydowanie zaleca się porównanie preparatu po barwieniu pod kątem PD-L1 względem kolejnego skrawka wybarwionego za pomocą odczynnika NCR w celu identyfikacji i wykluczenia obecności melaniny. Jeśli znacznie podwyższona zawartość melaniny uniemożliwia ocenę odczynu błonowego komórek nowotworowych, ekspresję PD-L1 można uznać za niemożliwą do oceny.

Próbki guza wybarwione z użyciem odczynnika NCR muszą wykazywać odczyn swoisty wynoszący 0 i nieswoisty odczyn tła wynoszący $\leq 1+$.

W tabeli 5 poniżej przedstawiono szczegółowe informacje dotyczące elementów tkanek, które są uwzględniane i pomijane podczas oceny MEL.

Tabela 5. Kryteria uwzględniania/pomijania w ocenie MEL w przypadku czerniaka

Elementy tkankowe	Uwzględniony w ocenie MEL w przypadku czerniaka	Pomijany w ocenie MEL w przypadku czerniaka
Komórki nowotworowe	<ul style="list-style-type: none"> Przekonujący częściowy lub całkowity odczyn błonowy (o dowolnym nasileniu) u żywych komórek nowotworowych 	<ul style="list-style-type: none"> Z pominięciem jakiegokolwiek odczynu cytoplazmatycznego
Komórki układu immunologicznego	<ul style="list-style-type: none"> Odczyn błonowy i/lub cytoplazmatyczny (o dowolnym nasileniu) komórek układu immunologicznego lub jednojądrzastych komórek zapalnych (MIC) w gniazdach komórek nowotworowych oraz sąsiadującej podpierającej tkance zrębu (przenikającej nowotwór), takie jak: <ul style="list-style-type: none"> duże limfocyty (skupiska limfocytów), monocyty. 	<p>Z pominięciem jakiegokolwiek odczynu:</p> <ul style="list-style-type: none"> komórek układu immunologicznego w zrębie poza gniazdami komórek nowotworowych, komórki osocza, neutrofile.
Inne	<ul style="list-style-type: none"> Nie uwzględniono 	<p>Z pominięciem jakiegokolwiek odczynu:</p> <ul style="list-style-type: none"> prawidłowych komórek sąsiadujących z komórkami nowotworowymi, komórek zrębu (fibroblastów), komórek martwiczych i/lub pozostałości komórkowych, melaniny endogennej.

Podczas każdej serii barwienia preparaty należy poddać analizie w kolejności przedstawionej w tabeli 6 (część dot. oceny preparatów) w celu ustalenia ważności serii odczynów i umożliwienia oceny wybarwienia próbki tkanki.

Dodatkowe wytyczne zawiera dokument PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Melanoma Interpretation Manual (Podręcznik interpretacji wyników testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx).

14. Ocena preparatu

Tabela 6. Zalecana kolejność oceny preparatów

Próbki	Uzasadnienie	Wymogi
1. Barwienie H&E (zapewniane przez laboratorium)	W pierwszej kolejności oceniany jest preparat wybarwiony hematoksyliną i eozyną (H&E) w celu określenia budowy histologicznej tkanki oraz jakości jej utwalenia.	Test PD-L1 IHC 22C3 pharmDx i barwienie H&E należy przeprowadzić na kolejnych skrawkach pochodzących z tego samego bloczka parafinowego próbki. Próbki tkanek powinny być nienaruszone i dobrze utwalone, a także odpowiadać rozpoznanemu typowi histologicznemu nowotworu.
2. Preparat kontrolnej linii komórkowej (Dostarczony z zestawem)	Najpierw należy poddać analizie preparaty kontrolnej linii komórkowej wybarwione przeciwciałem pierwszorzędowym przeciwko PD-L1 z zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w celu ustalenia, czy wszystkie odczynniki działają prawidłowo. Preparat kontrolnej linii komórkowej zawiera osad komórek z linii komórkowych wykazujących i niewykazujących ekspresji PD-L1.	Każda seria odczynów powinna obejmować jeden preparat kontrolnej linii komórkowej, który należy wybarwić przeciwciałem pierwszorzędowym przeciwko PD-L1. <i>Kryteria dopuszczalności NCI-H226 (kontrolna linia komórkowa wykazująca ekspresję PD-L1):</i> <ul style="list-style-type: none"> Odczyn błonowy $\geq 70\%$ komórek Średnie nasilenie odczynu $\geq 2+$ Nasilenie odczynu nieswoistego $< 1+$. <i>Kryteria dopuszczalności MCF-7 (kontrolna linia komórkowa niewykazująca ekspresji PD-L1):</i> <ul style="list-style-type: none"> Brak odczynu swoistego Nasilenie odczynu nieswoistego $< 1+$. Niekiedy może dojść do wybarwienia kilku komórek z osadu komórek MCF-7. Zastosowanie mają następujące kryteria dopuszczalności: dopuszczalna jest obecność ≤ 10 komórek z wyraźnym odczynem błonowym lub odczynem cytoplazmatycznym o nasileniu $\geq 1+$ w obrębie osadu komórek MCF-7. <p>Jeśli którakolwiek z kontrolnych linii komórkowych nie spełnia tych kryteriów, wszystkie wyniki próbek pacjenta należy uznać za nieważne.</p>

Próbki	Uzasadnienie	Wymogi
<p>3. Preparaty tkankowe dodatniej próby kontrolnej</p> <p>(zapewniane przez laboratorium)</p>	<p>W następnej kolejności należy ocenić preparaty tkankowe dodatniej próby kontrolnej wybarwione z użyciem pierwotnego przeciwciała przeciwko PD-L1 i odczynnika Negative Control Reagent. Preparaty te służą do weryfikacji skuteczności metody utrwalania i procesu odmaskowania antygenu. Znane dodatnie tkankowe próby kontrolne powinny być stosowane wyłącznie w celu monitorowania prawidłowego działania poddanych obróbce tkanek i odczynników testowych, a NIE pomocniczo podczas formułowania diagnozy próbek pacjenta.</p>	<p>Próby kontrolne należy sporządzić z materiałów biopsyjnych/chirurgicznych pobranych z tych samych guzów, co próbki pacjenta, możliwie szybko utrwalonych, poddanych obróbce i zatopionych w sposób analogiczny do próbki (próbek) pacjenta.</p> <p>Do interpretacji wyników barwienia należy wybierać jedynie próbki nienaruszone, ponieważ komórki nekrotyczne lub uszkodzone często wykazują odczyn nieswoisty.</p> <p>Tkanki wybrane jako dodatnie próby kontrolne powinny dawać podczas barwienia w kierunku PD-L1 odczyn dodatni o nasileniu słabym lub umiarkowanym, wskazujący na zdolność do wykrycia niewielkich zmian czułości testu.</p> <p>Każda seria odczynów powinna obejmować dwa preparaty tkankowe dodatniej próby kontrolnej.</p> <p>Preparat wybarwiony przeciwciałem przeciwko PD-L1: powinny być widoczne błony komórkowe wybarwione na brązowo. Odczyn nieswoisty powinien wynosić $\leq 1+$.</p> <p>Preparat wybarwiony odczynnikiem Negative Control Reagent: brak odczynu błonowego. Odczyn nieswoisty powinien wynosić $\leq 1+$.</p> <p>Jeżeli potwierdzenie dodatniego odczynu za pomocą dodatniej tkankowej próby kontrolnej nie powiedzie się, należy uznać wyniki badanych próbek za nieważne.</p>
<p>4. Preparaty tkankowe ujemnej próby kontrolnej</p> <p>(zapewniane przez laboratorium)</p>	<p>Następnie należy ocenić preparaty tkankowe ujemnej próby kontrolnej (niewykazujące ekspresji PD-L1) wybarwione z użyciem przeciwciała pierwszorzędowego przeciwko PD-L1 i odczynnika Negative Control Reagent w celu zweryfikowania swoistości znakowania docelowego antygenu przez przeciwciała pierwszorzędowe. Fragmenty tkankowe dodatniej próby kontrolnej z odczynem ujemnym mogą służyć w charakterze ujemnej próby kontrolnej, lecz powinno to zostać zweryfikowane przez użytkownika.</p>	<p>Próby kontrolne należy sporządzić z materiałów biopsyjnych/chirurgicznych pobranych z tych samych guzów, co próbki pacjenta, możliwie szybko utrwalonych, poddanych obróbce i zatopionych w sposób analogiczny do próbki (próbek) pacjenta.</p> <p>Każda seria odczynów powinna obejmować dwa preparaty tkankowe ujemnej próby kontrolnej.</p> <p>Preparat wybarwiony przeciwciałem przeciwko PD-L1: brak odczynu błonowego w komórkach nowotworowych. Odczyn nieswoisty powinien wynosić $\leq 1+$.</p> <p>Preparat wybarwiony odczynnikiem Negative Control Reagent: brak odczynu błonowego. Odczyn nieswoisty powinien wynosić $\leq 1+$.</p> <p>Jeżeli preparaty tkankowe ujemnego preparatu kontrolnego wykazują błonowy odczyn swoisty, wyniki próbki pacjenta należy uznać za nieważne.</p>
<p>5. Preparat kontrolny z tkanki migdałków (opcjonalny)</p> <p>(zapewniane przez laboratorium)</p>	<p>Tkankę migdałków utrwaloną, poddaną obróbce i zatopioną w sposób analogiczny do próbki (próbek) pacjenta można wykorzystać w charakterze dodatkowej próby kontrolnej do oceny czułości, swoistości i nieswoistego odczynu tła testu.</p>	<p>Odczyn dodatni o dużym nasileniu powinien zostać wykryty w części komórek nabłonkowych krypt migdałków, a odczyn o słabym i umiarkowanym nasileniu — w części makrofagów pęcherzykowych w ośrodkach rozmnażania. Odczyn ujemny powinien być widoczny w komórkach śródbłonna, w fibroblastach, a także w komórkach nabłonka powierzchniowego.</p>
<p>6. Preparat tkankowy pacjenta wybarwiony z użyciem odczynnika Negative Control Reagent</p>	<p>Próbki pacjenta wybarwione z użyciem odczynnika Negative Control Reagent z zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx należy poddać analizie. Odczynnik Negative Control Reagent jest wykorzystywany zamiast przeciwciała pierwotnego i ułatwia interpretację swoistego odczynu w miejscu występowania antygenu.</p>	<p>Brak odczynu błonowego wskazuje na swoiste znakowanie antygenu docelowego przez przeciwciała pierwotne. Odczyn nieswoisty powinien wynosić $\leq 1+$.</p>

Próbki	Uzasadnienie	Wymogi
7. Preparat tkankowy pacjenta wybarwiony z użyciem przeciwciała pierwszorzędowego przeciwko PD-L1	Na końcu należy przeanalizować cały preparat próbki pacjenta wybarwiony przeciwciałem pierwszorzędowym przeciwko PD-L1 z zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx.	<p>Ocenę nasilenia odczynu dodatniego należy przeprowadzać w kontekście każdego nieswoistego odczynu tła obecnego w preparatach pacjenta z odczynnikiem Negative Control Reagent w obrębie tej samej serii.</p> <p>Podobnie jak w przypadku każdego testu immunohistochemicznego, wynik ujemny oznacza, że nie wykryto antygeny, co nie znaczy, że nie był on obecny w analizowanych komórkach/tkankach.</p> <p>Wszystkie żywotne komórki guza w obrębie całego preparatu pacjenta barwionego w kierunku PD-L1 należy poddać ocenie i uwzględnić w ocenie punktowej PD-L1. Aby próbka została uznana za odpowiednią do oceny PD-L1, musi ona zawierać 100 żywotnych komórek guza.</p> <p>Wytyczne interpretacji oceny ekspresji PD-L1 znajdują się w części „Ocena wybarwienia i interpretacja wartości skali”.</p>

15. Ograniczenia

15.1 Ograniczenia ogólne

- 1) Technika immunohistochemiczna jest wieloetapową metodą diagnostyczną wymagającą specjalistycznego przeszkolenia w doborze odpowiednich odczynników, tkanek, sposobu utrwalania i obróbki, przygotowania preparatu immunohistochemicznego oraz interpretacji wyników barwienia.
- 2) Odczyn tkankowy zależy od przygotowania i obróbki tkanki przed barwieniem. Nieprawidłowe utrwalanie, zamrażanie, rozmrażanie, przemywanie, suszenie, ogrzewanie, dzielenie na skrawki lub zanieczyszczenie innymi tkankami lub cieczami może powodować powstawanie artefaktów, blokowanie przeciwciał lub wyniki fałszywie ujemne. Niespójne wyniki mogą być spowodowane zmianami w zakresie metod utrwalania i zatapiania lub przez naturalne nieregularności w obrębie tkanek.
- 3) Nadmierne lub niepełne barwienie kontrastowe może utrudniać prawidłową interpretację wyników.
- 4) Interpretacja kliniczna odczynu ekspresji PD-L1 musi być prowadzona w kontekście objawów klinicznych, obrazu morfologicznego i innych kryteriów histopatologicznych. Interpretacja kliniczna wystąpienia barwienia lub jego braku musi być uzupełniona o badania morfologiczne z wykorzystaniem odpowiednich prób kontrolnych i innych testów diagnostycznych. Odpowiedzialność za interpretację wybarwionych preparatów spoczywa na wykwalifikowanym patologu z doświadczeniem w zakresie stosowanych przeciwciał, odczynników i metod. Barwienie należy wykonać w certyfikowanym laboratorium pod nadzorem patologa odpowiedzialnego za przeglądanie i ocenę wybarwionych preparatów oraz właściwe wykonanie dodatnich i ujemnych prób kontrolnych.
- 5) Tkanki pochodzące od osób zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu B i zawierające antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B (HBsAg) mogą wykazywać odczyn nieswoisty w reakcji z peroksydazą chrzanową (14).
- 6) W typach tkanek, które nie zostały uprzednio przetestowane, odczynniki mogą wykazywać nieoczekiwane reakcje. Nie można całkowicie wykluczyć wystąpienia nieoczekiwanych reakcji, nawet w przetestowanych typach tkanek, z uwagi na zmienność biologiczną ekspresji antygenów w tkankach nowotworowych i innych tkankach patologicznych. W przypadku uzyskania nieoczekiwanych reakcji należy przesłać odpowiednią dokumentację do działu wsparcia technicznego firmy Agilent.
- 7) Wiązanie białek lub produktów reakcji na drodze mechanizmów innych niż immunologiczne może być przyczyną wyników fałszywie dodatnich. Mogą one również wystąpić na skutek aktywności pseudoperoxydazy (erytrocyty) i endogennej peroksydazy (cytochrom C) (13).
- 8) Odczynniki i instrukcje dostarczane z systemem opracowano z myślą o uzyskaniu optymalnych wyników. Dalsze rozcieńczenie odczynników bądź zmiana czasów lub temperatur inkubacji może prowadzić do uzyskania błędnych lub niezgodnych wyników.

15.2 Ograniczenia swoiste dla danego produktu

- 1) Wyniki fałszywie ujemne mogą być spowodowane procesem stopniowego rozkładu antygeny w tkankach. Próbki powinny zostać wybarwione zgodnie z zaleceniami dotyczącymi przechowywania skrawków (patrz część „Zalecenia dotyczące przechowywania skrawków”).
- 2) W celu uzyskania optymalnych i powtarzalnych wyników skrawki tkankowe utrwalone w rutynowy sposób (w obojętnej buforowanej formalinie) i zatopione w parafinie wymagają wstępnego odmaskowania antygeny białka PD-L1.
- 3) Nie należy zastępować odczynników odczynnikami o innych numerach partii bądź pochodzącymi od innych producentów. Jedynym wyjątkiem jest roztwór EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x), dostępny pod nr. kat. K8005.
- 4) Wybarwione kontrolne linie komórkowe są przeznaczone tylko do weryfikacji serii odczynów i nie powinny być używane do oceny punktowej reakcji barwienia skrawków tkankowych.
- 5) Stosowanie testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx na tkankach utrwalonych za pomocą środków utrwalających innych niż formalina nie zostało zweryfikowane.
- 6) Stosowanie testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx na próbkach pobranych metodą cienkoigłową nie zostało zweryfikowane.
- 7) Stosowanie testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx na odwapnionych tkankach nie zostało zatwierdzone i nie jest zalecane.
- 8) Klinicyści powinni zachować ostrożność podczas interpretacji wyników testu przy wartości granicznej CPS ≥ 20 , ponieważ test PD-L1 IHC 22C3 pharmDx nie spełnił wcześniej określonych kryteriów dopuszczalności dla procentowej zgodności wyników dodatnich w dwóch niezależnych międzyśrodkowych badaniach odtwarzalności ani procentowej zgodności wszystkich wyników w jednym międzyśrodkowym badaniu odtwarzalności, przeprowadzonym na próbkach HNSCC przy wartości granicznej CPS ≥ 20 . Wszystkie wcześniej określone kryteria dopuszczalności zostały spełnione w niezależnym międzyśrodkowym badaniu odtwarzalności, przeprowadzonym na próbkach HNSCC przy wartości granicznej CPS ≥ 1 .

16. Ocena skuteczności

16.1 Ocena skuteczności nieklinicznej: tkanki prawidłowe i nowotworowe

Tkanki prawidłowe: w tabeli 7 przedstawiono podsumowanie immunoreaktywności przeciwciał Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3 w obrębie zalecanego panelu tkanek prawidłowych. Odczyn błonowy zaobserwowano w przypadku komórek układu immunologicznego oraz komórek pochodzenia nabłonkowego. Odczyn cytoplazmatyczny zaobserwowano w niektórych typach komórek, lecz nie zarejestrowano go jako odczynu dodatniego. Wszystkie tkanki zostały utrwalone w formalinie, zatopione w parafinie i wybarwione z użyciem zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, zgodnie z instrukcjami zamieszczonymi w ulotce dołączonej do opakowania. W obrębie analizowanych typów komórek i tkanek nie uzyskano nieoczekiwanych wyników. Obserwowany odczyn był zgodny z danymi literaturowymi dotyczącymi ekspresji PD-L1 IHC w tkankach prawidłowych (11, 12).

Tabela 7: Podsumowanie reaktywności zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w tkankach prawidłowych

Rodzaj tkanki (liczba badanych przypadków)	Dodatni odczyn błonowy: elementy tkankowe	Dodatni odczyn cytoplazmatyczny: elementy tkankowe	Odczyn nieswoisty
Grasica (3)	3/3 Nabłonek rdzenia	0/3	0/3
Gruzoł krokowy (2)	2/2 Nabłonek	0/2	0/2
Gruzoły sutkowe (3)	0/3	0/3	0/3
Jajniki (3)	0/3	0/3	0/3
Jądra (3)	0/3	0/3	0/3
Jelito cienkie (3)	0/3	0/3	0/3
Komórki międzyzłonka (2)	0/2	0/2	0/2
Macica (3)	0/3	0/3	0/3
Mięsień sercowy (3)	0/3	0/3	0/3
Mięśnie szkieletowe (3)	0/3	0/3	0/3
Migdałki (3)	3/3 Nabłonek krypt migdałków 2/3 Centrum rozrodcze (makrofagi)	0/3	0/3
Mózg (3)	0/3	0/3	0/3
Mózdzek (3)	0/3	0/3	0/3
Nadnercza (3)	0/3	1/3 Komórki szpiku	0/3
Nerki (3)	1/3 Nabłonek kanalików	0/3	0/3
Nerwy obwodowe (3)	0/3	1/3 Tkanka łączna/naczynia	0/3
Okreźnica (3)	2/3 Makrofagi	0/3	0/3
Płuca (3)	3/3 Makrofagi pęcherzykowe	0/3	0/3
Przełyk (3)	0/3	0/3	0/3
Przysadka mózgowa (3)	1/3 Przedni płat przysadki 1/3 Tylne płat przysadki	1/3 Przedni płat przysadki 1/3 Tylne płat przysadki	0/3
Przytarczycy (3)	1/3 Nabłonek gruczołowy	0/3	0/3
Skóra (3)	0/3	0/3	0/3
Szypik kostny (3)	3/3 Megakariocyty	3/3 Megakariocyty	0/3
Szyjka macicy (3)	1/3 Nabłonek	0/3	0/3
Śledziona (3)	2/3 Makrofagi	0/3	0/3
Ślinianki (3)	0/3	0/3	0/3
Tarczycy (3)	0/3	0/3	0/3
Trzustka (3)	0/3	0/3	0/3
Wątroba (3)	1/3 Makrofagi 1/3 Hepatocyty	0/3	0/3
Żołądek (3)	2/3 Limfocyty 1/3 Gruczoły żołądkowe	1/3 Gruczoły żołądkowe	0/3

Tkanki nowotworowe: w tabeli 8 przedstawiono podsumowanie immunoreaktywności przeciwciał Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3 w obrębie panelu tkanek nowotworowych. Odczyn błonowy zaobserwowano w przypadku komórek układu immunologicznego oraz komórek pochodzenia nabłonkowego. Odczyn cytoplazmatyczny zaobserwowano w niektórych typach komórek, lecz nie zarejestrowano go jako odczynu dodatniego. Wszystkie tkanki zostały utrwalone w formalinie, zatopione w parafinie i wybarwione z użyciem zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, zgodnie z instrukcjami zamieszczonymi w ulotce dołączonej do opakowania. W obrębie analizowanych próbek guza nie zaobserwowano nieoczekiwanych wyników. Obserwowany odczyn był zgodny z danymi literaturowymi dotyczącymi ekspresji PD-L1 IHC w tkankach nowotworowych (15-18).

Tabela 8: Podsumowanie reaktywności zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w tkankach nowotworowych

Typ guza	Lokalizacja	Wykazujące ekspresję PD-L1/wszystkie N = 159
Chłoniak		
Chłoniak anaplastyczny z dużych komórek	Węzły chłonne	0/1
Chłoniak Hodgkina	Węzły chłonne	2/2
Chłoniak nieziarniczy	Węzły chłonne	1/1
Chłoniak rozlany z komórek B	Węzły chłonne	0/4
Chrzęstniakomięsak	Kości	0/1
Czerniak		
	Odbytnica	0/1
	Jama nosowa	0/1

Typ guza	Lokalizacja	Wykazujące ekspresję PD-L1/wszystkie N = 159	
Glejak	Mózg	0/1	
Grasiczak	Sródpiersie	1/1	
Guz chromochłonny	Nadnercza	0/1	
Guz komórek wysp	Trzustka	0/1	
Gwiaździak	Mózgowie	0/3	
Kostniakomięsak	Kości	0/2	
Międzybłoniak	Otrzewna	0/1	
Mięsak maziówkowy	Jama miednicy	0/1	
Mięśniakomięsak gładkokomórkowy	Tkanki miękkie, ściana klatki piersiowej	0/1	
	Pęcherz	0/1	
Mięśniakomięsak prążkowy	Tkanki miękkie, typ zarodkowy	0/1	
	Gruzoł krokowy	0/1	
	Przestrzeń zaotrzewnowa	0/1	
Nasieniak	Jądra	0/2	
Nerwiak zarodkowy	Przestrzeń zaotrzewnowa	0/1	
Nerwiakowłókniak	Tkanki miękkie, odcinek krzyżowy	0/1	
Oponiak	Mózg	0/2	
Prymitywny guz neuroektodermalny (PNET)	Przestrzeń zaotrzewnowa	0/1	
Rak	Jama nosowo-gardłowa; rak jamy nosowo-gardłowej	0/1	
Rak drobnokomórkowy	Płuca	0/1	
Rak gruczolowy	Wyrostek robaczkowy	0/1	
	Gruzoł sutkowy, rak przewodowy in situ	0/2	
	Gruzoł sutkowy, rak przewodowy inwazyjny	0/7	
	Gruzoł sutkowy, rak przewodowy inwazyjny z przerzutami do węzłów chłonnych	0/1	
	Szyjka macicy, typ wewnątrzszyjkowy	0/1	
	Okreżnica	0/5	
	Okreżnica, przerzuty do wątroby	0/1	
	Okreżnica, rak śluzowy	0/1	
	Przełyk	0/1	
	Pęcherzyk żółciowy	1/5	
	Przewód pokarmowy, przerzuty do płuc	0/1	
	Głowa i szyja, podniebienie twarde	0/1	
	Płuca	1/4	
	Jajniki	0/1	
	Jajniki, rak endometrioidalny	0/1	
	Jajniki, rak śluzowy	0/1	
	Jajniki, rak surowiczy	0/1	
	Trzustka	0/2	
	Trzustka, rak przewodowy	0/3	
	Gruzoł krokowy	0/5	
	Odbytnica	0/4	
	Gruzoł ślinowy/ślinianka przyuszna	0/2	
	Jelitko cienkie	0/2	
	Żołądek	0/6	
	Żołądek, rak śluzowy	0/1	
	Tarczycza, rak pęcherzykowy	0/1	
	Tarczycza, rak pęcherzykowo-brodawkowaty	0/1	
	Tarczycza, rak brodawkowaty	0/3	
	Macica, rak jasnokomórkowy	0/1	
	Macica, rak endometrium	0/3	
	Rak kory nadnerczy	Nadnercza	0/1
	Rak nerkowokomórkowy		
Rak brodawkowaty	Nerka	0/1	
Rak jasnokomórkowy	Nerka	0/6	
Rak płaskonabłonkowy	Rak płaskonabłonkowy przełyku, przerzutowy do węzłów chłonnych	0/1	
	Szyjka macicy	2/5	
	Przełyk	0/7	
	Głowa i szyja	0/2	
	Płuca	1/2	
	Skóra	0/2	
	Macica	0/1	
Rak podstawnokomórkowy	Skóra	0/1	
Rak przejściowokomórkowy	Pęcherz	0/6	
	Nerka	0/1	

Typ guza	Lokalizacja	Wykazujące ekspresję PD-L1/wszystkie N = 159
Rak rdzeniowy	Tarczyca	0/1
Rak wątrobowokomórkowy	Wątroba	0/5
Rak z komórek sygnetycznych	Rak okrężnicy z komórek sygnetycznych, przerzutowy do jajników	0/1
	Okrężnica	0/1
Rak z komórek śródmiąższowych	Okrężnica	0/1
	Odbytnica	0/1
	Jelito cienkie	0/1
Rak zarodkowy	Jądra	0/1
Rdzeniak	Mózg	0/1
Spermatocytoma	Jądra	0/2
Struniak	Jama miednicy	0/1
Wątrobiak zarodkowy	Wątroba	0/1
Wyściółczak	Mózg	0/1

16.2 Ocena skuteczności w badaniach nieklinicznych: NSCLC

Badania niekliniczne przeprowadzono na utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie próbkach NSCLC.

Czułość/swoistość analityczna: NSCLC

Czułość analityczna testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx została sprawdzona za pomocą partii produkcyjnej na 127 różnych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie próbkach NSCLC w stadiach I-IV. Ocena ekspresji PD-L1 wykazała występowanie odczynu u 0-100% komórek guza z ekspresją o nasileniu odczynu 0-3.

Dokładność: NSCLC

Dokładność testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx została oceniona w ośrodku firmy Dako. Średnią procentową zgodność wyników ujemnych (ang. average negative percent agreement, ANA), średnią procentową zgodność wyników dodatnich (ang. average positive percent agreement, APA) oraz procentową zgodność wszystkich wyników (ang. overall percent agreement, OA) obliczono z wykorzystaniem odpowiednich 95-procentowych dwustronnych przedziałów ufności z użyciem metody bootstrapowej dla wartości granicznych TPS $\geq 1\%$ i TPS $\geq 50\%$. W badaniach, które dały 100% zgodności, procentową zgodność wyników ujemnych (ang. negative percent agreement, NPA), procentową zgodność wyników dodatnich (ang. positive percent agreement, PPA) oraz zgodność wszystkich wyników (ang. overall agreement, OA) obliczono z wykorzystaniem odpowiednich 95-procentowych dwustronnych przedziałów ufności z wykorzystaniem metody Wilsona dla wartości granicznych TPS $\geq 1\%$ i TPS $\geq 50\%$.

Tabela 9: Dokładność testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx zbadana w jednym ośrodku (TPS $\geq 1\%$)

Badanie dokładności	Graniczna wartość diagnostyczna	Typ badania	% zgodności (95% CI)
Pomiędzy urządzeniami	TPS $\geq 1\%$	Każda z 24 próbek z NSCLC (12 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 12 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w każdym z sześciu urządzeń Autostainer Link 48.	NPA 100,0% (94,0-100,0%) PPA 100,0% (94,0-100,0%) OA 100,0% (96,9-100,0%)
Pomiędzy operatorami	TPS $\geq 1\%$	Każda z 24 próbek z NSCLC (12 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 12 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana przez sześciu analityków w jednym urządzeniu Autostainer Link 48.	NPA 100,0% (93,9-100,0%) PPA 100,0% (94,0-100,0%) OA 100,0% (96,9-100,0%)
Pomiędzy dniami	TPS $\geq 1\%$	Każda z 24 próbek z NSCLC (12 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 12 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w ciągu 6 nienastępujących po sobie dni w urządzeniu Autostainer Link 48.	NPA 100,0% (94,0-100,0%) PPA 100,0% (94,0-100,0%) OA 100,0% (96,9-100,0%)
Pomiędzy partiami	TPS $\geq 1\%$	Każda z 24 próbek z NSCLC (13 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 11 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w trzech powtórzeniach z każdą z trzech partii odczynników w urządzeniu Autostainer Link 48.	ANA 98,3% (95,9-100,0%) APA 97,9% (94,6-100,0%) OA 98,1% (95,3-100,0%)
W obrębie serii (powtarzalność)	TPS $\geq 1\%$	Każda z 24 próbek z NSCLC (12 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 12 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w sześciu powtórzeniach w obrębie jednej serii w urządzeniu Autostainer Link 48.	NPA 100,0% (94,0-100,0%) PPA 100,0% (93,8-100,0%) OA 100,0% (96,8-100,0%)

NPA = procentowa zgodność wyników ujemnych; PPA = procentowa zgodność wyników dodatnich; OA = zgodność wszystkich wyników
ANA = średnia procentowa zgodność wyników ujemnych; APA = średnia procentowa zgodność wyników dodatnich; TPS = skala stopnia wybarwienia guza

Tabela 10: Dokładność testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx zbadana w jednym ośrodku (TPS ≥ 50%)

Badanie dokładności	Graniczna wartość diagnostyczna	Typ badania	% zgodności (95% CI)
Pomiędzy urządzeniami	TPS ≥ 50%	Każda z 24 próbek z NSCLC (12 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 12 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w każdym z sześciu urządzeń Autostainer Link 48.	NPA 100,0% (94,9–100,0%) PPA 100,0% (94,9–100,0%) OA 100,0% (97,4–100,0%)
Pomiędzy operatorami	TPS ≥ 50%	Każda z 24 próbek z NSCLC (12 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 12 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana przez sześciu analityków w jednym urządzeniu Autostainer Link 48.	ANA 94,0% (89,3-98,6%) APA 93,1% (85,8-98,6%) OA 93,6% (87,8-98,6%)
Pomiędzy dniami	TPS ≥ 50%	Każda z 24 próbek z NSCLC (12 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 12 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w ciągu 6 nienastępujących po sobie dni w urządzeniu Autostainer Link 48.	NPA 100,0% (94,9–100,0%) PPA 100,0% (94,9–100,0%) OA 100,0% (97,4–100,0%)
Pomiędzy partiami	TPS ≥ 50%	Każda z 24 próbek z NSCLC (12 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 12 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w trzech powtórzeniach z każdą z trzech partii odczynników w urządzeniu Autostainer Link 48.	ANA 93,3% (88,5-97,1%) APA 93,7% (88,7-97,4%) OA 93,5% (88,9-97,2%)
W obrębie serii (powtarzalność)	TPS ≥ 50%	Każda z 24 próbek z NSCLC (12 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 12 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w sześciu powtórzeniach w obrębie jednej serii w urządzeniu Autostainer Link 48.	NPA 100,0% (94,0–100,0%) PPA 100,0% (95,6–100,0%) OA 100,0% (97,4–100,0%)

NPA = procentowa zgodność wyników ujemnych; PPA = procentowa zgodność wyników dodatnich; OA = zgodność wszystkich wyników
ANA = średnia procentowa zgodność wyników ujemnych; APA = średnia procentowa zgodność wyników dodatnich; TPS = skala stopnia wybarwienia guza

Odtwarzalność zewnętrzna: NSCLC

Odtwarzalność zewnętrzną testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx oceniono w trzech zewnętrznych ośrodkach badawczych. Średnie procentowe zgodności obliczono z powodu braku naturalnej wartości odniesienia dla parametrów odtwarzalności, takich jak ośrodek czy obserwator. Średnią procentową zgodność wyników ujemnych (ang. average negative percent agreement, ANA), średnią procentową zgodność wyników dodatnich (ang. average positive percent agreement, APA) oraz procentową zgodność wszystkich wyników (ang. overall percent agreement, OA) obliczono z wykorzystaniem odpowiednich 95-procentowych dwustronnych przedziałów ufności z użyciem metody bootstrapowej dla wartości granicznych TPS ≥ 1% i TPS ≥ 50%.

Tabela 11: Odtwarzalność testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx przeprowadzonego w trzech ośrodkach zewnętrznych (TPS ≥ 1%)

Badanie odtwarzalności	Graniczna wartość diagnostyczna	Typ badania	% zgodności (95% CI)
Pomiędzy ośrodkami	TPS ≥ 1%	Każda z 36 próbek NSCLC (16 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 20 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w ciągu 5 nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona pomiędzy trzema ośrodkami w oparciu o porównanie łącznie 2700 par.	ANA 94,8% (90,3-98,4%) APA 95,5% (91,2–98,7%) OA 95,2% (90,8-98,6%)
W obrębie ośrodka	TPS ≥ 1%	Każda z 36 próbek NSCLC (16 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 20 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w ciągu 5 nienastępujących po sobie dni w każdym z trzech ośrodków badawczych. Analiza została przeprowadzona w obrębie trzech ośrodków w oparciu o porównanie łącznie 1080 par.	ANA 96,2% (94,1-97,5%) APA 96,7% (95,0-97,9%) OA 96,5% (95,2-97,4%)
Pomiędzy obserwatorami	TPS ≥ 1%	Ocena 62 próbek NSCLC (28 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 34 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC i wybarwionych za pomocą testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx została przeprowadzona przez trzech patologów (jednego w każdym z trzech ośrodków badawczych) w ciągu 3 nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona pomiędzy trzema ośrodkami w oparciu o porównanie łącznie 1674 par.	ANA 85,8% (79,3-91,8%) APA 88,2% (82,2-93,3%) OA 87,1% (81,0-92,6%)

Badanie odtwarzalności	Graniczna wartość diagnostyczna	Typ badania	% zgodności (95% CI)
W obrębie obserwatora	TPS \geq 1%	Ocena 62 próbek NSCLC (28 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 34 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC i wybarwionych za pomocą testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx została przeprowadzona przez trzech patologów (jednego w każdym z trzech ośrodków badawczych) w ciągu 3 nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona w trzech ośrodkach w oparciu o porównanie łącznie 558 par.	ANA 93,7% (90,0-96,1%) APA 94,8% (91,6-96,7%) OA 94,3% (92,0-95,9%)

ANA = średnia procentowa zgodność wyników ujemnych; APA = średnia procentowa zgodność wyników dodatnich; TPS = skala stopnia wybarwienia guza

Tabela 12: Odtwarzalność testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx przeprowadzonego w trzech ośrodkach zewnętrznych (TPS \geq 50%)

Badanie odtwarzalności	Graniczna wartość diagnostyczna	Typ badania	% zgodności (95% CI)
Pomiędzy ośrodkami	TPS \geq 50%	Każda z 36 próbek NSCLC (21 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 15 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w ciągu 5 nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona pomiędzy trzema ośrodkami w oparciu o porównanie łącznie 2700 par.	ANA 90,3% (84,4-95,2%) APA 85,2% (75,6-92,9%) OA 88,3% (81,4-94,3%)
W obrębie ośrodka	TPS \geq 50%	Każda z 36 próbek NSCLC (21 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 15 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w ciągu 5 nienastępujących po sobie dni w każdym z trzech ośrodków badawczych. Analiza została przeprowadzona w obrębie trzech ośrodków w oparciu o porównanie łącznie 1080 par.	ANA 91,9% (88,8-94,8%) APA 87,6% (82,5-92,2%) OA 90,2% (86,3-93,7%)
Pomiędzy obserwatorami	TPS \geq 50%	Ocena 62 próbek NSCLC (30 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 32 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC i wybarwionych za pomocą testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx została przeprowadzona przez trzech patologów (jednego w każdym z trzech ośrodków badawczych) w ciągu 3 nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona pomiędzy trzema ośrodkami w oparciu o porównanie łącznie 1674 par.	ANA 92,6% (87,8-96,7%) APA 92,8% (88,1-96,8%) OA 92,7% (88,1-96,8%)
W obrębie obserwatora	TPS \geq 50%	Ocena 62 próbek NSCLC (30 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 32 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC i wybarwionych za pomocą testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx została przeprowadzona przez trzech patologów (jednego w każdym z trzech ośrodków badawczych) w ciągu 3 nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona w trzech ośrodkach w oparciu o porównanie łącznie 558 par.	ANA 96,4% (94,0-98,5%) APA 96,5% (94,3-98,6%) OA 96,4% (94,3-98,6%)

ANA = średnia procentowa zgodność wyników ujemnych; APA = średnia procentowa zgodność wyników dodatnich; TPS = skala stopnia wybarwienia guza

16.3 Ocena skuteczności klinicznej: NSCLC

KEYNOTE-024: kontrolowane badanie kliniczne z udziałem pacjentów z NSCLC, którzy nie byli wcześniej poddawani leczeniu

Ocenę bezpieczeństwa klinicznego i skuteczności pembrolizumabu przeprowadzono w ramach badania KEYNOTE-024 – wieloośrodkowego badania kontrolowanego dotyczącego leczenia wcześniej nieleczzonego przerzutowego NSCLC. Wzięli w nim udział pacjenci, u których wykazano ekspresję PD-L1 na podstawie testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w skali TPS \geq 50% (2). Pacjentom poddanym randomizacji (1:1) co 3 tygodnie podawano pembrolizumab w dawce wynoszącej 200 mg (n = 154) lub poddawano ich chemioterapii z zastosowaniem związków platyny wybranych przez badacza (n = 151; w tym pemetrekse + karboplatyna, pemetrekse + cisplatyna, gemcytabina + cisplatyna, gemcytabina + karboplatyna lub paklitaksel + karboplatyna. Pacjenci z nowotworem typu nieplaskonabłonkowego mogli być poddawani leczeniu podtrzymującemu z zastosowaniem pemetreksedu). Pacjentom podawano pembrolizumab do momentu wystąpienia niedopuszczalnego poziomu toksyczności lub postępu choroby. Pomimo postępu choroby leczenie mogło być kontynuowane, jeżeli pacjent był w stabilnym stanie klinicznym i zdaniem badacza czerpał korzyści kliniczne wynikające z leczenia. Z badania zostali wykluczeni pacjenci z mutacjami genów EDNRB lub ALK w guzach, pacjenci z chorobą autoimmunologiczną wymagającą leczenia ogólnego w ciągu 2 lat terapii, pacjenci wymagający leczenia preparatami immunosupresyjnymi, a także pacjenci, którzy otrzymali dawkę napromieniowania klatki piersiowej przekraczającą wartość 30 Gy w ciągu poprzednich 26 tygodni. Ocena stanu guza była przeprowadzana co 9 tygodni. Pacjenci poddawani chemioterapii, u których niezależnie stwierdzono postęp choroby, mogli przejść do grupy otrzymującej pembrolizumab.

Wyjściowa charakterystyka 305 pacjentów biorących udział w badaniu KEYNOTE-024 jest następująca: średni wiek wyniósł 65 lat (54% to osoby w wieku 65 lat lub starsze); 61% to mężczyźni; 82% uczestników należało do rasy białej, a 15% do odmiany azjatyckiej; stan sprawności w skali ECOG wyniósł 0 (35%) i 1 (65%). Charakterystyka choroby: nowotwór typu płaskonabłonkowego (18%) i niepłaskonabłonkowego; białaczka mieloblastyczna M1 (99%); przerzuty nowotworowe do mózgu (9%).

Pierwszorzędownym punktem końcowym oceny skuteczności był czas przeżycia bez progresji choroby (PFS) oceniany na podstawie niejawnej i niezależnej analizy centralnej (BICR) zgodnie z kryteriami RECIST w wersji 1.1. Drugorzędowymi punktami końcowymi oceny skuteczności były całkowity czas przeżycia (OS) i wskaźnik obiektywnej odpowiedzi na leczenie (ORR) oceniane na podstawie niejawnej i niezależnej analizy centralnej (BICR) zgodnie z kryteriami RECIST w wersji 1.1. W tabeli 13 zamieszczono główne kryteria oceny skuteczności dla grup wyodrębnionych zgodnie z zaplanowanym leczeniem (ITT).

Tabela 13: Wyniki skuteczności w badaniu KEYNOTE-024

Punkt końcowy	Produkt KEYTRUDA 200 mg co 3 tygodnie n = 154	Chemioterapia n = 151
PFS*		
Liczba (%) pacjentów, u których wystąpiło zdarzenie	73 (47%)	116 (77%)
Współczynnik ryzyka† (95% CI)	0,50 (0,37; 0,68)	---
Wartość p‡	< 0,001	---
Mediana w miesiącach (95% CI)	10,3 (6,7, NA)	6,0 (4,2; 6,2)
OS		
Liczba (%) pacjentów, u których wystąpiło zdarzenie	44 (29%)	64 (42%)
Współczynnik ryzyka† (95% CI)	0,60 (0,41; 0,89)	---
Wartość p‡	0,005	---
Mediana w miesiącach (95% CI)	Nie osiągnięto (NA, NA)	Nie osiągnięto (9,4, NA)
Wskaźnik obiektywnej odpowiedzi*		
ORR % (95% CI)	45% (37; 53)	28% (21; 36)
Odpowiedź całkowita %	4%	1%
Odpowiedź częściowa %	41%	27%
Czas utrzymywania się odpowiedzi§		
Mediana w miesiącach (zakres)	Nie osiągnięto (1,9+; 14,5+)	6,3 (2,1+; 12,6+)
% osób z odpowiedzią utrzymującą się ≥ 6 miesięcy	88%¶	59%#

* Zgodnie z niejawną i niezależną oceną przeprowadzoną centralnie według kryteriów RECIST 1.1

† Współczynnik ryzyka (działanie produktu KEYTRUDA w porównaniu z chemioterapią) oparto na modelu stratyfikowanego hazardu proporcjonalnego Coxa

‡ W oparciu o stratyfikowany test logarytmiczny rang

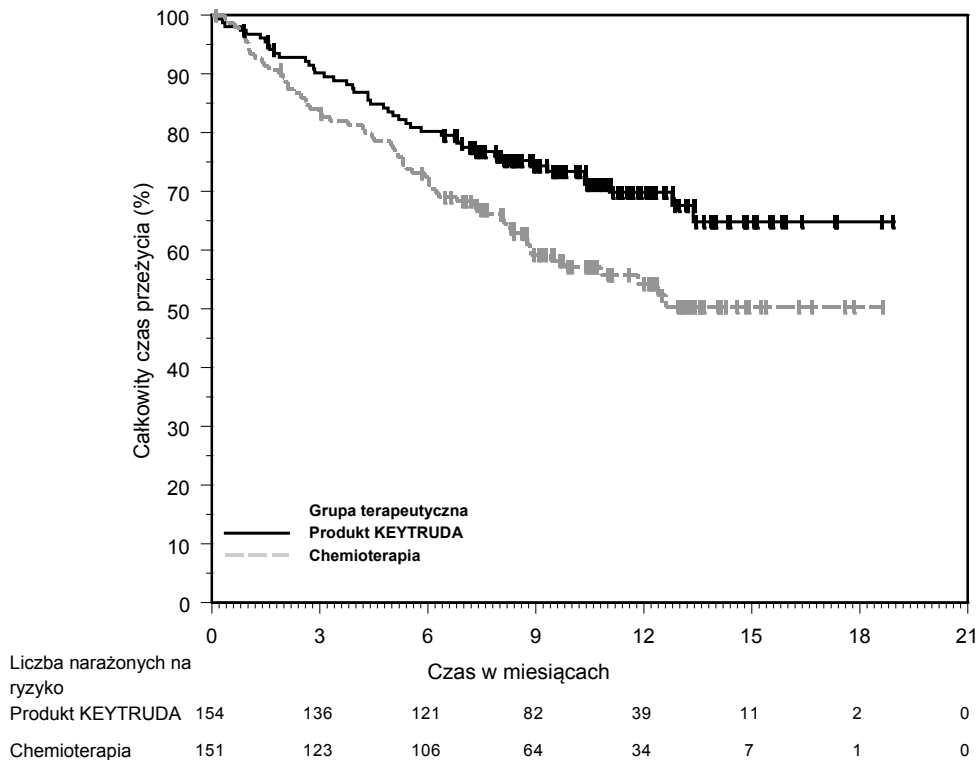
§ W oparciu o liczbę pacjentów, u których wystąpiła odpowiedź na leczenie potwierdzona jako odpowiedź całkowita lub częściowa

¶ W oparciu o estymację metodą Kaplana-Meiera; obejmuje 43 pacjentów, u których wystąpiła odpowiedź utrzymująca się przez 6 miesięcy lub dłużej

W oparciu o estymację metodą Kaplana-Meiera; obejmuje 16 pacjentów, u których wystąpiła odpowiedź utrzymująca się przez 6 miesięcy lub dłużej

NA = niedostępne

Rysunek 1: Krzywa Kaplana-Meiera całkowitego czasu przeżycia w badaniu KEYNOTE-024



KEYNOTE-010: kontrolowane badanie kliniczne z udziałem pacjentów z NSCLC wcześniej poddanych chemioterapii

Korzyści kliniczne testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx badano w ramach badania KEYNOTE-010 – wielośrodkowego, otwartego, randomizowanego badania klinicznego prowadzonego w celu oceny bezpieczeństwa klinicznego i skuteczności produktu KEYTRUDA u pacjentów z zaawansowanym NSCLC poddanych wcześniej chemioterapii z zastosowaniem związków platyny (3). Wzięli w nim udział pacjenci, u których wykazano ekspresję PD-L1 na podstawie klinicznej wersji testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (CTA) w skali TPS $\geq 1\%$. U pacjentów z mutacją aktywującą w genie EGFR lub translokacją ALK także wystąpił postęp choroby w czasie zatwierdzonego leczenia pod kątem tych mutacji przed otrzymaniem pembrolizumabu. Pacjentom poddanych randomizacji (1:1:1) co 3 tygodnie podawano pembrolizumab o stężeniu 2 mg/kg (n = 344) lub 10 mg/kg (n = 346) lub docetaksel o stężeniu 75 mg/m² (n = 343) do momentu wystąpienia niedopuszczalnego poziomu toksyczności lub postępu choroby. Z badania zostali wykluczeni pacjenci z chorobą autoimmunologiczną, pacjenci wymagający leczenia preparatami immunosupresyjnymi, a także pacjenci, którzy otrzymali dawkę napromieniowania klatki piersiowej przekraczającą wartość 30 Gy w ciągu poprzednich 26 tygodni. Ocena stanu guza była przeprowadzana co 9 tygodni. Głównymi punktami końcowymi były całkowity czas przeżycia (OS) i czas przeżycia bez progresji choroby (PFS) oceniane na podstawie niejawnej i niezależnej analizy centralnej (BICR) zgodnie z kryteriami RECIST w wersji 1.1.

W ramach CTA poddano randomizacji łącznie 1033 pacjentów z NSCLC. W celu oceny użyteczności klinicznej testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx zachowane próbki użyte podczas badania klinicznego zostały zbadane retrospektywnie przez laboratorium referencyjne w USA za pomocą testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. Tkanki nowotworowe pobrane od 529 z 1033 pacjentów zostały zbadane retrospektywnie za pomocą testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. Próbki pobrane od 413 pacjentów wykazywały ekspresję PD-L1 ($\geq 1\%$ żywotnych komórek guza wykazywało odczyn błonowy o dowolnym nasileniu), natomiast próbki od 94 pacjentów nie wykazywały ekspresji PD-L1 ($< 1\%$ żywotnych komórek guza wykazywało odczyn błonowy o dowolnym nasileniu). Wysoki poziom ekspresji PD-L1 ($\geq 50\%$ żywotnych komórek guza wykazywało odczyn błonowy o dowolnym nasileniu) wystąpił w próbkach pobranych od 163 spośród 413 pacjentów, u których wykazano ekspresję PD-L1.

Poziom zgodności osiągnięty pomiędzy CTA i testem PD-L1 IHC 22C3 pharmDx przedstawiono w tabeli 14.

Tabela 14: Zgodność CTA i testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx

Poziomy zgodności	PD-L1 Wartość graniczna	Odsetek zgodności wyników ujemnych (95% przedział ufności (CI))	Odsetek zgodności wyników dodatnich (95% przedział ufności (CI))
Zgodność CTA i PD-L1 IHC 22C3 pharmDx	TPS $\geq 1\%$	94,5% [91,4–96,6%]	80,0% [76,9–82,8%]
	TPS $\geq 50\%$	98,3% [97,1–99,0%]	73,2% [67,9–77,9%]

Wyjściowe dane demograficzne i charakterystyka były zrównoważone pomiędzy grupami terapeutycznymi pacjentów poddanych randomizacji, u których wykazano ekspresję PD-L1 po zastosowaniu testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. Średni wiek wyniósł 63 lata (44% to osoby w wieku 65 lat i starsze). Większość pacjentów stanowiły osoby rasy białej (77%) i mężczyźni (58%); stan sprawności wg ECOG w punkcie początkowym wynosił 0 (29%) lub 1 (71%). Siedemdziesiąt osiem procent (78%) pacjentów paliło tytoń w przeszłości lub obecnie. U dwudziestu dwóch procent (22%) pacjentów w badaniu histologicznym wykryto NSCLC typu płaskonabłonkowego, natomiast u 69% — NSCLC typu niepłaskonabłonkowego. Dane wyjściowe i charakterystyka demograficzna były w podobnym stopniu zrównoważone w grupach przyjmujących pembrolizumab i docetaksel w całym badaniu klinicznym.

Wyniki skuteczności leczenia przedstawiono w tabelach 15 i 16. Wykazano trwałą korzyść kliniczną w przypadku produktu KEYTRUDA podawanego pacjentom z NSCLC z ekspresją PD-L1 (TPS \geq 1%). Korzyść była większa u pacjentów o wysokim poziomie ekspresji PD-L1 (TPS \geq 50%), zgodnie z wynikami testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. Stopień korzyści był porównywalny ze stopniem w całym badaniu klinicznym. W poniższych tabelach zamieszczono podsumowanie miar oceny skuteczności dla całej populacji wykazującej ekspresję PD-L1 (TPS \geq 1%) oraz podgrupy o wysokim poziomie ekspresji PD-L1 (TPS \geq 50%) w całym badaniu klinicznym (TPS \geq 1% w badaniu CTA), a także populacji wykazującej ekspresję PD-L1 na podstawie testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. Na rysunku 2 przedstawiono krzywą Kaplana-Meiera całkowitego czasu przeżycia (TPS \geq 1%, zgodnie z wynikami testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx). W obu grupach terapeutycznych wyniki skuteczności leczenia były podobne po zastosowaniu produktu KEYTRUDA o stężeniu 2 mg/kg i 10 mg/kg.

Tabela 15: Odpowiedź na leczenie produktem KEYTRUDA u wcześniej leczonych pacjentów z NSCLC — wyniki z całego badania i dotyczące pacjentów z ekspresją PD-L1, TPS \geq 1%, zgodnie z wynikami testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx

Punkt końcowy	Produkt KEYTRUDA 2 mg/kg co 3 tygodnie		Produkt KEYTRUDA 10 mg/kg co 3 tygodnie		Docetaksel 75 mg/m ² co 3 tygodnie	
	Badanie kliniczne	PD-L1 IHC 22C3 pharmDx	Badanie kliniczne	PD-L1 IHC 22C3 pharmDx	Badanie kliniczne	PD-L1 IHC 22C3 pharmDx
Liczba pacjentów	344	140	346	142	343	131
OS						
Zgony (%)	172 (50%)	59 (42%)	156 (45%)	59 (42%)	193 (56%)	67 (51%)
Współczynnik ryzyka* (95% CI)	0,71 (0,58; 0,88)	0,54 (0,37; 0,78)	0,61 (0,49; 0,75)	0,57 (0,39; 0,82)	---	---
Wartość p [†]	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,00115	---	---
Mediana w miesiącach (95% CI)	10,4 (9,4; 11,9)	11,8 (9,6; niedostępne)	12,7 (10,0; 17,3)	12,0 (8,7; niedostępne)	8,5 (7,5; 9,8)	7,5 (6,3; 9,9)
PFS [‡]						
Zdarzenia (%)	266 (77%)	97 (69%)	255 (74%)	103 (73%)	257 (75%)	94 (72%)
Współczynnik ryzyka* (95% CI)	0,88 (0,73; 1,04)	0,68 (0,50; 0,92)	0,79 (0,66; 0,94)	0,79 (0,59; 1,06)	---	---
Wartość p [†]	0,068	0,00578	0,005	0,05767	---	---
Mediana w miesiącach (95% CI)	3,9 (3,1; 4,1)	4,9 (4,1; 6,2)	4,0 (2,6; 4,3)	4,0 (2,2; 4,6)	4,0 (3,1; 4,2)	3,8 (2,2; 4,2)
Ogólny odsetek odpowiedzi na leczenie [§]						
ORR% [§] (95% CI)	18% (14; 23)	24% (17; 32)	18% (15; 23)	20% (14; 28)	9% (7; 13)	5% (2; 11)

* Współczynnik ryzyka (działanie produktu KEYTRUDA w porównaniu z docetaksem) oparto na modelu stratyfikowanego hazardu proporcjonalnego Coxa

[†] W oparciu o stratyfikowany test logarytmiczny rang

[‡] Zgodnie z niejawną i niezależną oceną przeprowadzoną centralnie według kryteriów RECIST 1.1

[§] Wszystkie odpowiedzi na leczenie były częściowe

Tabela 16: Odpowiedź na leczenie produktem KEYTRUDA u wcześniej leczonych pacjentów z NSCLC — wyniki z całego badania klinicznego i dotyczące pacjentów z wysokim poziomem ekspresji PD-L1, TPS \geq 50%, zgodnie z wynikami testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx

Punkt końcowy	Produkt KEYTRUDA 2 mg/kg co 3 tygodnie		Produkt KEYTRUDA 10 mg/kg co 3 tygodnie		Docetaksel 75 mg/m ² co 3 tygodnie	
	Badanie kliniczne	PD-L1 IHC 22C3 pharmDx	Badanie kliniczne	PD-L1 IHC 22C3 pharmDx	Badanie kliniczne	PD-L1 IHC 22C3 pharmDx
Liczba pacjentów	139	56	151	60	152	47
OS						
Zgony (%)	58 (42%)	18 (32%)	60 (40%)	19 (32%)	86 (57%)	25 (53%)
Współczynnik ryzyka* (95% CI)	0,54 (0,38; 0,77)	0,45 (0,24; 0,84)	0,50 (0,36; 0,70)	0,29 (0,15; 0,56)	---	---
Wartość p [†]	< 0,001	0,00541	< 0,001	< 0,001	---	---
Mediana w miesiącach (95% CI)	14,9 (10,4; niedostępne)	Nie osiągnięto (9,3; niedostępne)	17,3 (11,8; niedostępne)	Nie osiągnięto (8,3; niedostępne)	8,2 (6,4; 10,7)	7,2 (4,4; 8,3)
PFS [‡]						
Zdarzenia (%)	89 (64%)	33 (59%)	97 (64%)	34 (57%)	118 (78%)	33 (70%)
Współczynnik ryzyka* (95% CI)	0,58 (0,43; 0,77)	0,47 (0,28; 0,80)	0,59 (0,45; 0,78)	0,41 (0,24; 0,70)	---	---

Punkt końcowy	Produkt KEYTRUDA 2 mg/kg co 3 tygodnie		Produkt KEYTRUDA 10 mg/kg co 3 tygodnie		Docetaksel 75 mg/m ² co 3 tygodnie	
Wartość p [†]	< 0,001	0,00221	< 0,001	< 0,001	---	---
Mediana w miesiącach (95% CI)	5,2 (4,0; 6,5)	5,9 (4,2; 9,0)	5,2 (4,1; 8,1)	4,8 (2,8; niedostępne)	4,1 (3,6; 4,3)	3,9 (2,0; 4,3)
Ogólny odsetek odpowiedzi na leczenie [‡]						
ORR% [§] (95% CI)	30% (23; 39)	37% (25; 52)	29% (22; 37)	28% (18; 41)	8% (4; 13)	4% (1; 15)

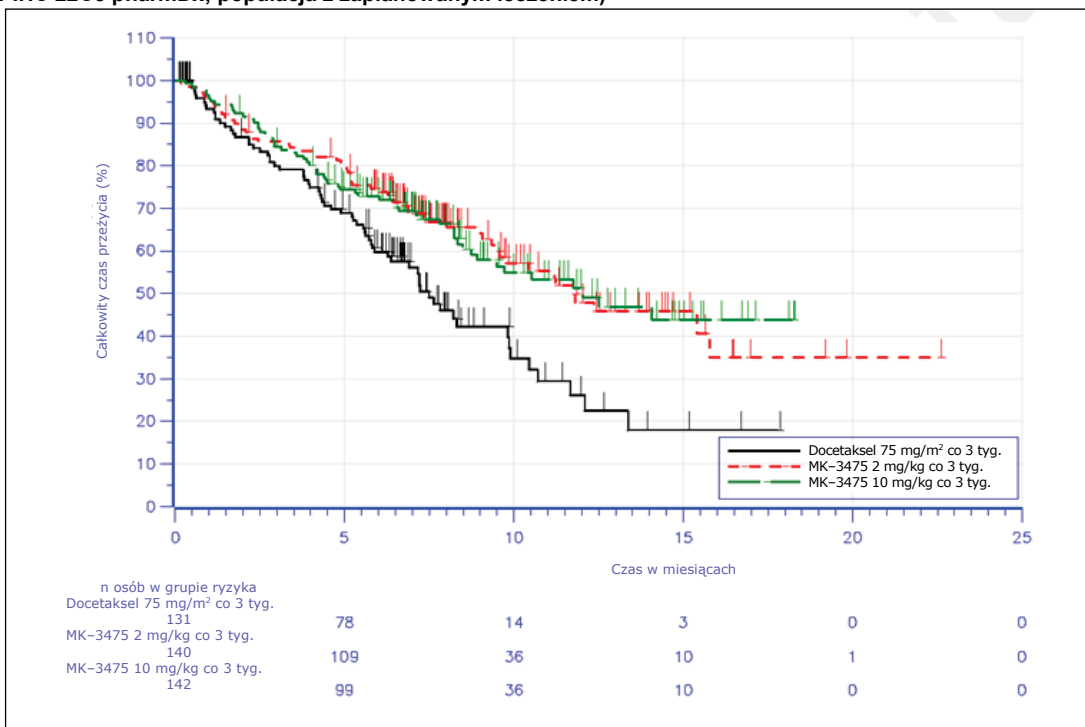
* Współczynnik ryzyka (działanie produktu KEYTRUDA w porównaniu z docetaksem) oparto na modelu stratyfikowanego hazardu proporcjonalnego Coxa

† W oparciu o stratyfikowany test logarytmiczny rang

‡ Zgodnie z niejawną i niezależną oceną przeprowadzoną centralnie według kryteriów RECIST 1.1

§ Wszystkie odpowiedzi na leczenie były częściowe

Rysunek 2: Krzywa Kaplana-Meiera całkowitego czasu przeżycia według grup terapeutycznych (TPS ≥ 1%, zgodnie z wynikami testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx; populacja z zaplanowanym leczeniem)



Wykonano dodatkowe analizy, w których uwzględniono potencjalny wpływ brakujących danych pochodzących od pacjentów wykazujących ekspresję PD-L1 (TPS ≥ 1%) na podstawie testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, ale nie wykazujących ekspresji PD-L1 (TPS < 1%) w badaniu CTA. Pacjentów z takimi wynikami testów ujęto w populacji, dla której przeznaczony jest test PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (w celach diagnostycznych, ITD); wykluczono ich jednak z badania klinicznego ze względu na brak ekspresji PD-L1 w skringingu w ramach CTA. W celu uwzględnienia tych brakujących danych przeprowadzono analizę czułości, aby określić wiarygodny zakres współczynnika ryzyka (ang. hazard ratio, HR) oszacowany w oparciu o wyniki testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx dla subpopulacji w skali TPS ≥ 1% i TPS ≥ 50% w badaniu wydajności diagnostycznej i aby sprawdzić spójność z zaobserwowanym współczynnikiem ryzyka opartym na włączeniu do badania CTA. Wyniki analizy czułości hazardu względnego wykazały, że na szacowane wartości ryzyka względnego nie ma wpływu żadne założenie osłabienia działania klinicznego w badaniu wydajności diagnostycznej.

16.4 Ocena skuteczności nieklinicznej: rak urotelialny

Badania niekliniczne przeprowadzono na utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie próbkach raka urotelialnego.

Czułość/swoistość analityczna: rak urotelialny

Czułość analityczna testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx została sprawdzona za pomocą partii produkcyjnej na 103 próbkach utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie tkanek raka urotelialnego w stadiach III-IV. Ocena ekspresji PD-L1 wykazała występowanie odczynu w zakresie CPS od 0 do 100, przy czym w 37% próbek wynik ekspresji PD-L1 wynosił CPS ≥ 10.

Dokładność: rak urotelialny

Dokładność testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx została oceniona w ośrodku firmy Dako. W celu uzyskania łącznej wartości dokładności badano dokładność pomiędzy urządzeniami, operatorami, dniami i partiami. W przypadku badań dotyczących dokładności średnią procentową zgodność wyników ujemnych (ANA), średnią procentową zgodność wyników dodatnich (APA) oraz procentową zgodność wszystkich wyników (OA) obliczono z wykorzystaniem odpowiednich 95-procentowych dwustronnych przedziałów ufności z użyciem metody bootstrapowej dla wartości granicznej CPS ≥ 10 , jak przedstawiono w tabeli 17.

Tabela 17: Dokładność testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w przypadku raka urotelialnego zbadana w jednym ośrodku (CPS ≥ 10)

Punkt końcowy dokładności	Graniczna wartość diagnostyczna	Typ badania	% zgodności (95% CI)
W obrębie serii (powtarzalność)	CPS ≥ 10	Każda z 32 próbek raka urotelialnego (17 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 15 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w pięciu powtórzeniach w obrębie jednej serii w urządzeniu Autostainer Link 48.	ANA 96,6% (93,4–100,0%) APA 95,8% (91,3–100,0%) OA 96,2% (92,5–100,0%)
Łączna wartość dokładności (suma zmiennych, które stanowiły wartości dokładności pomiędzy operatorami, urządzeniami, dniami i partiami)	CPS ≥ 10	Każda z 46 próbek raka urotelialnego (26 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 20 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana przez trzech operatorów w trzech urządzeniach Autostainer Link 48, w ciągu trzech nienastępujących po sobie dni i z użyciem 3 partii odczynników.	ANA 94,7% (88,9–98,7%) APA 93,5% (87,1–98,4%) OA 94,2% (88,4–98,6%)

ANA = średnia procentowa zgodność wyników ujemnych; APA = średnia procentowa zgodność wyników dodatnich; OA = zgodność wszystkich wyników; CPS = łączny wynik wartości dodatnich

Odtwarzalność zewnętrzna: rak urotelialny

Odtwarzalność zewnętrzną testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx oceniono w trzech zewnętrznych ośrodkach badawczych. Procentową zgodność wyników ujemnych (NPA), procentową zgodność wyników dodatnich (PPA) oraz procentową zgodność wszystkich wyników (OA) obliczono z wykorzystaniem odpowiednich 95-procentowych dwustronnych przedziałów ufności z użyciem metody Wilsona dla wartości granicznej i CPS ≥ 10 .

Tabela 18: Odtwarzalność testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w przypadku raka urotelialnego zbadana w trzech ośrodkach zewnętrznych (CPS ≥ 10)

Punkt końcowy odtwarzalności	Graniczna wartość diagnostyczna	Typ badania	% zgodności (95% CI)
Pomiędzy ośrodkami	CPS ≥ 10	Każda z 36 próbek raka urotelialnego (20 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 16 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w ciągu 5 nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona pomiędzy trzema ośrodkami w oparciu o porównanie łącznie 539 par.	NPA 94,0% (90,7–96,2%) PPA 84,6% (79,5–88,6%) OA 89,8% (86,9–92,1%)
W obrębie ośrodka	CPS ≥ 10	Każda z 36 próbek raka urotelialnego (20 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 16 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w ciągu 5 nienastępujących po sobie dni w każdym z trzech ośrodków badawczych. Analiza została przeprowadzona w obrębie trzech ośrodków w oparciu o porównanie łącznie 539 par.	NPA 96,2% (93,5–97,8%) PPA 95,0% (91,3–97,2%) OA 95,7% (93,7–97,1%)
Pomiędzy obserwatorami	CPS ≥ 10	Ocena 60 próbek raka urotelialnego (29 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 31 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC i wybarwionych za pomocą testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx została przeprowadzona przez trzech patologów (po jednym z każdego z trzech ośrodków badawczych) w ciągu 3 nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona pomiędzy trzema ośrodkami w oparciu o porównanie łącznie 540 par.	NPA 97,3% (94,6–98,7%) PPA 90,7% (86,7–93,6%) OA 93,9% (91,5–95,6%)

Punkt końcowy odtwarzalności	Graniczna wartość diagnostyczna	Typ badania	% zgodności (95% CI)
W obrębie obserwatora	CPS \geq 10	Ocena 60 próbek raka urotelialnego (29 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 31 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC i wybarwionych za pomocą testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx została przeprowadzona przez trzech patologów (po jednym z każdego z trzech ośrodków badawczych) w ciągu 3 nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona w trzech ośrodkach w oparciu o porównanie łącznie 540 par.	NPA 95,7% (92,7-97,6%) PPA 96,1% (93,0-97,9%) OA 95,9% (93,9-97,3%)

NPA = procentowa zgodność wyników ujemnych; PPA = procentowa zgodność wyników dodatnich; OA = zgodność wszystkich wyników; CPS = łączny wynik wartości dodatnich

16.5 Ocena skuteczności klinicznej: rak urotelialny

KEYNOTE-052: badanie otwarte pacjentów z rakiem urotelialnym niekwalifikujących się do chemioterapii z zastosowaniem cisplatyny

Ocenę bezpieczeństwa klinicznego i skuteczności pembrolizumabu przeprowadzono w ramach badania KEYNOTE-052 – wieloośrodkowego badania otwartego dotyczącego leczenia pacjentów z miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym rakiem urotelialnym niekwalifikujących się do chemioterapii z zastosowaniem cisplatyny. Pacjentom podawano pembrolizumab w dawce 200 mg co 3 tygodnie do momentu wystąpienia niedopuszczalnego poziomu toksyczności lub postępu choroby. Pomimo postępu choroby leczenie mogło być kontynuowane, jeżeli pacjent był w stanie stabilnym i zdaniem badacza czerpał korzyści kliniczne wynikające z leczenia. U pacjentów, u których nie zaobserwowano postępu choroby, leczenie można było prowadzić przez okres do 24 miesięcy. Z badania zostali wykluczeni pacjenci z chorobą autoimmunologiczną lub wymagający leczenia preparatami immunosupresyjnymi. Po podaniu pierwszej dawki ocenę stanu guza przeprowadzono po 9 tygodniach, a następnie — w ciągu pierwszego roku — była ona przeprowadzana co każde 6 tygodni. Po tym czasie wykonywano ją co 12 tygodni.

Status ekspresji PD-L1 określono z użyciem zestawu testowego PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. W celu określenia wartości granicznej CPS \geq 10 użyto danych dotyczących pierwszych 100 uczestników badania jako zestawu szkoleniowego. Zestawu walidacyjnego obejmującego dane pozostałych 270 uczestników badania użyto na potrzeby klinicznej walidacji wartości granicznej CPS \geq 10.

Pośród 370 pacjentów, u 30% (n = 110) występował guz wykazujący ekspresję PD-L1 wynoszącą CPS \geq 10. Wyjściowa charakterystyka tych pacjentów była następująca: średni wiek wynosił 73 lata, 68% pacjentów było płci męskiej, 87% rasy białej. U osiemdziesięciu dwóch procent pacjentów występował rak z przerzutami odległymi (M1), a u 18% — bez przerzutów odległych (M0). U osiemdziesięciu jeden procent pacjentów guz pierwotny występował w dolnym odcinku przewodu pokarmowego, a u 18% — w jego odcinku górnym. U siedemdziesięciu sześciu procent pacjentów występowały przerzuty do narządów wewnętrznych, w tym do wątroby (11%). Parametrami stanowiącymi powód braku kwalifikowania się do podawania cisplatyny były m.in.: wyjściowy klirens kreatyniny < 60 mL/min (45%), stan sprawności według ECOG wynoszący 2 (37%), stan sprawności według ECOG równy 2 oraz wyjściowy klirens kreatyniny < 60 mL/min (10%) i inne czynniki (8%) (niewydolność serca klasy III, neuropatia obwodowa stopnia 2 lub wyższego i utrata słuchu stopnia 2 lub wyższego). Dziewięćdziesiąt procent pacjentów nie było wcześniej poddawanych leczeniu, a 10% odbyło chemioterapię adiuwantową lub neoadiuwantową związkami platyny.

Pośród 270 pacjentów w zestawie walidacyjnym, u 30% (n = 80) występował guz wykazujący ekspresję PD-L1 wynoszącą CPS \geq 10. Wyjściowa charakterystyka tych pacjentów była następująca: średni wiek wynosił 72 lata, 68% pacjentów było płci męskiej, 86% rasy białej. U siedemdziesięciu dziewięciu procent pacjentów występował rak z przerzutami odległymi (M1), a u 21% — bez przerzutów odległych (M0). U siedemdziesięciu dziewięciu procent pacjentów guz pierwotny występował w dolnym odcinku przewodu pokarmowego, a u 20% — w jego odcinku górnym. U siedemdziesięciu ośmiu procent pacjentów występowały przerzuty do narządów wewnętrznych, w tym do wątroby (8%). Parametrami stanowiącymi powód braku kwalifikowania się do podawania cisplatyny były m.in.: wyjściowy klirens kreatyniny < 60 mL/min (41%), stan sprawności według ECOG wynoszący 2 (43%), stan sprawności według ECOG równy 2 oraz wyjściowy klirens kreatyniny < 60 mL/min (11%) i inne czynniki (5%) (niewydolność serca klasy III, neuropatia obwodowa stopnia 2 lub wyższego i utrata słuchu stopnia 2 lub wyższego). Dziewięćdziesiąt procent pacjentów nie było wcześniej poddawanych leczeniu, a 10% odbyło chemioterapię adiuwantową lub neoadiuwantową związkami platyny.

Głównym punktem końcowym był wskaźnik obiektywnej odpowiedzi (ORR) oceniany na podstawie niejawnej i niezależnej analizy centralnej (BICR) zgodnie z kryteriami RECIST w wersji 1.1. Drugorzędowymi punktami końcowymi były czas trwania odpowiedzi i całkowity czas przeżycia (OS). W tabeli 19 zamieszczono podsumowanie wyników skuteczności w przypadku pacjentów z wynikiem CPS \geq 10 w całym badaniu i podgrupy pacjentów zestawu walidacyjnego.

W tabeli 19 zamieszczono podsumowanie głównych kryteriów oceny skuteczności (ORR i OS) dla populacji uczestników badania.

Tabela 19: ORR i OS według ekspresji PD-L1

Punkt końcowy	Uczestnicy z wynikiem CPS \geq 10 w całym badaniu (N = 110)	Uczestnicy z wynikiem CPS \geq 10 w zestawie walidacyjnym (N = 80)
Wskaźnik obiektywnej odpowiedzi*		
ORR % (przedział ufności 95%)	47% (38; 57)	51% (40; 63)
Odpowiedź całkowita	19%	21%

Odpowiedź częściowa	28%	30%
Czas utrzymywania się odpowiedzi		
Mediana w miesiącach (zakres)	Nie osiągnięto (1,4+ – 26,5+)	Nie osiągnięto (1,4+ – 22,8+)
OS		
Mediana w miesiącach (95% CI)	19 (12,2,)	Nie osiągnięto (11,6,)
Wskaźnik 12-mies. OS	61%	61%

* Zgodnie z niejawną i niezależną oceną przeprowadzoną centralnie według kryteriów RECIST 1.1

U pacjentów z ekspresją PD-L1 wynoszącą CPS < 10 w całym badaniu (N = 251) ORR wynosił 21% (95%CI: 16, 26). Mediana OS w miesiącach i wskaźnik 12-mies. OS wyniosły odpowiednio 10 (8, 12) i 42%.

U pacjentów z ekspresją PD-L1 wynoszącą CPS < 10 w zestawie walidacyjnym (N = 185) ORR wynosił 22% (95%CI: 16, 29). Mediana OS w miesiącach i wskaźnik 12-mies. OS wyniosły odpowiednio 11 (8, 13) i 44%.

KEYNOTE-045: kontrolowane badanie kliniczne z udziałem pacjentów z rakiem urotelialnym wcześniej poddanych chemioterapii

Ocenę bezpieczeństwa klinicznego i skuteczności pembrolizumabu przeprowadzono w ramach badania KEYNOTE-045 – wielośrodkowego, randomizowanego (1:1) badania kontrolowanego dotyczącego leczenia pacjentów z miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym rakiem urotelialnym, z rozpoznaniem postępu choroby podczas chemioterapii z zastosowaniem związków platyny lub po niej. Wymogiem zakwalifikowania do badania było poddanie pacjentów z miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym rakiem leczeniu pierwszego rzutu z użyciem związków platyny bądź leczeniu neoadiuwantowemu/adiuwantowemu i nawrót/postęp choroby w okresie ≤ 12 miesięcy po zakończeniu terapii. Pacjentom poddanych randomizacji (1:1) podawano co 3 tygodnie produkt KEYTRUDA w dawce 200 mg (n = 270) albo dobraną przez badacza (n = 272), podawaną dożylnie co 3 tygodnie chemioterapię z użyciem albo paklitakselu w dawce 175 mg/m² (n = 84), albo docetakselu w dawce 75 mg/m² (n = 84), albo winfluniny w dawce 320 mg/m² (n = 87). Pacjentom podawano pembrolizumab do momentu wystąpienia niedopuszczalnego poziomu toksyczności lub postępu choroby. Pomimo postępu choroby leczenie mogło być kontynuowane, jeżeli pacjent był w stanie stabilnym i zdaniem badacza czerpał korzyści kliniczne wynikające z leczenia. U pacjentów, u których nie zaobserwowano postępu choroby, leczenie można było prowadzić przez okres do 24 miesięcy.

Wyjściowa charakterystyka 542 zrandomizowanych pacjentów biorących udział w badaniu KEYNOTE-045 była następująca: średni wiek wynosił 66 lat (zakres: od 26 do 88 lat; 58% to osoby w wieku 65 lat lub starsze); 74% grupy stanowili mężczyźni; 72% uczestników należało do rasy białej, a 23% do azjatyckiej. U 56% pacjentów stan sprawności w skali ECOG wynosił 1, a u 1% — 2. U 96% pacjentów występował rak z przerzutami odległymi (M1), a u 4% — bez przerzutów odległych (M0). U osiemdziesięciu siedmiu procent pacjentów występowały przerzuty do narządów wewnętrznych, w tym do wątroby (34%). U osiemdziesięciu sześciu procent pacjentów guz pierwotny występował w dolnym odcinku przewodu pokarmowego, a u 14% — w jego odcinku górnym. U piętnastu procent pacjentów wystąpił postęp choroby po uprzednim zastosowaniu chemioterapii neoadiuwantowej lub adiuwantowej związkami platyny. Dwadzieścia jeden procent pacjentów dwukrotnie poddano wcześniejszemu leczeniu układowemu w stadium przerzutowym choroby. Siedemdziesiąt sześć procent pacjentów poddano wcześniejszemu leczeniu samą cisplatiną, 23% — samą karboplatiną, a 1% — chemioterapią z zastosowaniem innych związków platyny. Status ekspresji PD-L1 określono z użyciem testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. U trzydziestu procent pacjentów ekspresja PD-L1 komórek nowotworu w skali łącznego wyniku wartości dodatnich (CPS) wynosiła ≥ 10.

W tabeli 20 zamieszczono główne kryteria oceny skuteczności dla populacji z zaplanowanym leczeniem (ITT). Krzywą Kaplana-Meiera pokazano na rysunku 3. Badanie wykazało istotny statystycznie wzrost całkowitego czasu przeżycia (OS) oraz wskaźnika obiektywnej odpowiedzi (ORR) u pacjentów zrandomizowanych do grupy otrzymującej pembrolizumab w porównaniu z grupą poddawaną chemioterapii. W odniesieniu do czasu przeżycia bez progresji choroby (PFS) nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy między grupą otrzymującą pembrolizumab a poddawaną chemioterapii.

Dalsza analiza w ramach badania KEYNOTE-045 została przeprowadzona u pacjentów z ekspresją PD-L1 w skali łącznego wyniku wartości dodatnich (CPS) wynoszącą ≥ 10 i u pacjentów z wynikiem CPS < 10 w grupie terapeutycznej z pembrolizumabem i z chemioterapią (patrz tabela 21) (5).

Tabela 20: Wyniki skuteczności w badaniu KEYNOTE-045

Punkt końcowy	Pembrolizumab 200 mg co 3 tygodnie n = 270	Chemioterapia n = 272
OS		
Liczba (%) pacjentów, u których wystąpiło zdarzenie	155 (57%)	179 (66%)
Współczynnik ryzyka* (95% CI)	0,73 (0,59; 0,91)	
Wartość p [†]	0,002	
Mediana w miesiącach (95% CI)	10,3 (8,0; 11,8)	7,4 (6,1; 8,3)
PFS[‡]		
Liczba (%) pacjentów, u których wystąpiło zdarzenie	218 (81%)	219 (81%)
Współczynnik ryzyka* (95% CI)	0,98 (0,81; 1,19)	
Wartość p [†]	0,416	
Mediana w miesiącach (95% CI)	2,1 (2,0; 2,2)	3,3 (2,3; 3,5)
Wskaźnik obiektywnej odpowiedzi[‡]		
ORR % (95% CI)	21% (16; 27)	11% (8; 16)
Odpowiedź całkowita	7%	3%
Odpowiedź częściowa	14%	8%
Wartość p [§]	0,001	
Czas utrzymywania się odpowiedzi^{‡,¶}		
Mediana w miesiącach (zakres)	Nie osiągnięto (1,6+; 15,6+)	4,3 (1,4+; 15,4+)
Liczba (% [#]) pacjentów z odpowiedzią utrzymującą się ≥ 6 miesięcy	41 (78%)	7 (40%)
Liczba (% [#]) pacjentów z odpowiedzią utrzymującą się ≥ 12 miesięcy	14 (68%)	3 (35%)

* Współczynnik ryzyka (działanie pembrolizumabu w porównaniu z chemioterapią) oparto na modelu stratyfikowanego hazardu proporcjonalnego Coxa

† W oparciu o stratyfikowany test logarytmiczny rang

‡ Zgodnie z niejawną i niezależną oceną przeprowadzoną centralnie według kryteriów RECIST 1.1

§ W oparciu o metodę Miettinen-Nurminen

¶ W oparciu o liczbę pacjentów, u których wystąpiła odpowiedź na leczenie potwierdzona jako odpowiedź całkowita lub częściowa

W oparciu o estymację metodą Kaplana-Meiera

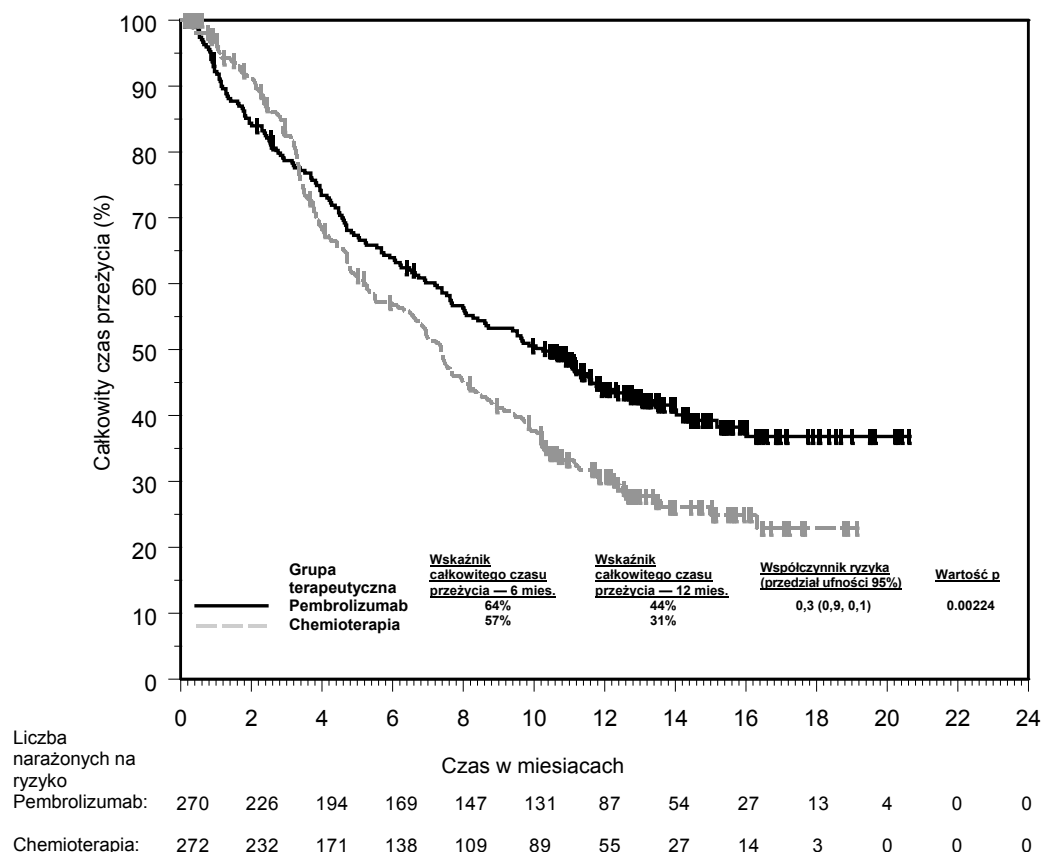
Tabela 21: Całkowity czas przeżycia w badaniu KEYNOTE-045 w odniesieniu do ekspresji PD-L1

Ekspresja PD-L1	Pembrolizumab	Chemioterapia	Współczynnik ryzyka* (95% CI)
	Całkowity czas przeżycia na podstawie danych ekspresji PD-L1 Liczba zdarzeń (liczba pacjentów)		
CPS < 10	106 (186)	116 (176)	0,80 (0,61; 1,05)
CPS ≥ 10	44 (74)	60 (90)	0,57 (0,37; 0,88)

*Współczynnik ryzyka (działanie produktu KEYTRUDA w porównaniu z chemioterapią) oparto na modelu stratyfikowanego hazardu proporcjonalnego Coxa

†U 16 pacjentów (10 z grupy otrzymującej pembrolizumab i 6 z grupy poddawanej chemioterapii) status ekspresji PD-L1 był nieznan

Rysunek 3: Krzywa Kaplana-Meiera całkowitego czasu przeżycia w podziale na grupy terapeutyczne w badaniu KEYNOTE-045 (ITT)



16.6 Ocena skuteczności w badaniach nieklinicznych: HNSCC

Badania niekliniczne przeprowadzono na próbkach HNSCC utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie.

Czułość/swoistość analityczna: HNSCC

Czułość analityczna testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx została sprawdzona za pomocą partii produkcyjnej na 112 utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie próbkach HNSCC (w stadiach I–IV). Ocena ekspresji PD-L1 wykazała występowanie odczynu w zakresie CPS od 0 do 100, przy czym w 72% próbek wynik ekspresji PD-L1 wynosił CPS ≥ 1 , a w 45% próbek – CPS ≥ 20 . W drugim niezależnym badaniu czułość analityczna testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx została sprawdzona za pomocą partii produkcyjnej na 109 utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie próbkach HNSCC (w stadiach I–IV). Ocena ekspresji PD-L1 wykazała występowanie odczynu w zakresie TPS od 0 do 100%, przy czym w 26% próbek wynik ekspresji PD-L1 wynosił TPS $\geq 50\%$.

Dokładność: HNSCC

Dokładność testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx została oceniona w ośrodku firmy Dako. W celu uzyskania łącznej wartości dokładności badano dokładność pomiędzy urządzeniami, operatorami, dniami i partiami. W przypadku badań dotyczących dokładności procentową zgodność wyników ujemnych (NPA), procentową zgodność wyników dodatnich (PPA) oraz procentową zgodność wszystkich wyników (OA) obliczono z wykorzystaniem odpowiednich 95-procentowych dwustronnych przedziałów ufności z użyciem metody bootstrapowej dla wartości granicznych CPS ≥ 1 , CPS ≥ 20 i TPS $\geq 50\%$, jak przedstawiono odpowiednio w tabelach 22, 23 i 24.

Tabela 22. Dokładność testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w przypadku HNSCC zbadana w jednym ośrodku (CPS ≥ 1)

Badanie dokładności	Graniczna wartość diagnostyczna	Typ badania	% zgodności (95% CI)
Łączna wartość dokładności* (suma zmiennych, które stanowiły wartości dokładności pomiędzy operatorami, urządzeniami, dniami i partiami)	CPS ≥ 1	Każda z 34 próbek HNSCC (12 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 22 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana przez pięciu operatorów w pięciu urządzeniach Autostainer Link 48, w ciągu 5 dni i z użyciem pięciu partii odczynników.	NPA 100,0% (94,0–100,0%) PPA 99,1% (97,3–100,0%) OA 99,4% (98,2–100,0%)
Dokładność w obrębie serii: (powtarzalność)	CPS ≥ 1	Każda z 34 próbek HNSCC (16 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 18 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w pięciu powtórzeniach w obrębie jednej serii w urządzeniu Autostainer Link 48.	NPA 98,8% (96,2–100,0%) PPA 97,8% (94,4–100,0%) OA 98,2% (95,9–100,0%)

Badanie dokładności	Graniczna wartość diagnostyczna	Typ badania	% zgodności (95% CI)
Dokładność pomiędzy obserwatorami	CPS \geq 1	Dwadzieścia cztery próbki HNSCC (11 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 13 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC, wybarwione zestawem PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, zostały zbadane przez trzech patologów w ciągu 3 nienastępujących po sobie dni, z co najmniej dwutygodniową przerwą między odczytami.	NPA 88,9% (78,8–98,0%) PPA 99,1% (97,4–100,0%) OA 94,4% (89,8–98,6%)
Dokładność w obrębie obserwatora	CPS \geq 1	Dwadzieścia cztery próbki HNSCC (11 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 13 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC, wybarwione zestawem PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, zostały zbadane przez trzech patologów w ciągu 3 nienastępujących po sobie dni, z co najmniej dwutygodniową przerwą między odczytami.	NPA 98,8% (96,0–100,0%) PPA 95,4% (92,3–98,4%) OA 96,7% (94,0–99,1%)

NPA = procentowa zgodność wyników ujemnych; PPA = procentowa zgodność wyników dodatnich; OA = zgodność wszystkich wyników; CPS = łączny wynik wartości dodatnich

*Bootstrapowa metoda percentyli nie pozwala na obliczenie przedziałów ufności, jeśli obserwowana jest zgodność 100%, dlatego do obliczenia przedziałów ufności dla łącznej wartości dokładności w przypadku zgodności wyników ujemnych użyto metody Wilsona. Należy pamiętać, że metoda Wilsona ma ograniczenia, ponieważ zakłada niezależność danych. Ponieważ jedna próbka przyczynia się do więcej niż jednego porównania względem uzgodnionej wartości, dane nie są niezależne.

Tabela 23: Dokładność testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w przypadku HNSCC zbadana w jednym ośrodku (CPS \geq 20)

Badanie dokładności	Graniczna wartość diagnostyczna	Typ badania	% zgodności (95% CI)
Łączna wartość dokładności* (suma zmiennych, które stanowiły wartości dokładności pomiędzy operatorami, urządzeniami, dniami i partiami)	CPS \geq 20	Każda z 34 próbek HNSCC (17 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 17 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana przez pięciu operatorów w pięciu urządzeniach Autostainer Link 48, w ciągu 5 dni i z użyciem pięciu partii odczynników.	NPA 100,0% (95,7–100,0%) PPA 96,5% (90,6–100,0%) OA 98,2% (95,3–100,0%)
Dokładność w obrębie serii: (powtarzalność)	CPS \geq 20	Każda z 34 próbek HNSCC (18 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 16 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w pięciu powtórzeniach w obrębie jednej serii w urządzeniu Autostainer Link 48.	NPA 97,7% (92,9–100,0%) PPA 98,7% (96,2–100,0%) OA 98,2% (95,2–100,0%)
Dokładność pomiędzy obserwatorami	CPS \geq 20	Czterdzieści osiem próbek HNSCC (27 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 21 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC, wybarwionych zestawem PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, zostało zbadane przez trzech patologów w ciągu 3 nienastępujących po sobie dni, z co najmniej dwutygodniową przerwą między odczytami.	NPA 96,3% (91,8–100,0%) PPA 93,1% (87,3–97,9%) OA 94,9% (91,4–97,9%)
Dokładność w obrębie obserwatora	CPS \geq 20	Czterdzieści osiem próbek HNSCC (27 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 21 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC, wybarwionych zestawem PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, zostało zbadane przez trzech patologów w ciągu 3 nienastępujących po sobie dni, z co najmniej dwutygodniową przerwą między odczytami.	NPA 98,0% (95,9–99,6%) PPA 96,8% (94,4–98,9%) OA 97,5% (95,8–98,8%)

NPA = procentowa zgodność wyników ujemnych; PPA = procentowa zgodność wyników dodatnich; OA = zgodność wszystkich wyników; CPS = łączny wynik wartości dodatnich

*Bootstrapowa metoda percentyli nie pozwala na obliczenie przedziałów ufności, jeśli obserwowana jest zgodność 100%, dlatego do obliczenia przedziałów ufności dla łącznej wartości dokładności w przypadku zgodności wyników ujemnych użyto metody Wilsona. Należy pamiętać, że metoda Wilsona ma ograniczenia, ponieważ zakłada niezależność danych. Ponieważ jedna próbka przyczynia się do więcej niż jednego porównania względem uzgodnionej wartości, dane nie są niezależne.

Tabela 24. Dokładność testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w przypadku HNSCC zbadana w jednym ośrodku (TPS ≥ 50%)

Badanie dokładności	Graniczna wartość diagnostyczna	Typ badania	% zgodności (95% CI)
Łączna wartość dokładności (suma zmiennych, które stanowiły wartości dokładności pomiędzy operatorami, urządzeniami oraz dniami)	TPS ≥ 50%	Każda z 32 próbek HNSCC (15 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 17 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana przez trzech operatorów w trzech urządzeniach Autostainer Link 48, w ciągu 3 dni.	NPA 97,7% (93,0–100,0%) PPA 98,0% (94,1–100,0%) OA 97,9% (94,7–100,0%)
Dokładność w obrębie serii: (powtarzalność)	TPS ≥ 50%	Każda z 32 próbek HNSCC (19 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 13 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w pięciu powtórzeniach w obrębie jednej serii w urządzeniu Autostainer Link 48.	NPA 97,9% (94,7–100,0%) PPA 96,9% (90,8–100,0%) OA 97,5% (94,4–100,0%)
Dokładność pomiędzy obserwatorami	TPS ≥ 50%	Pięćdziesiąt próbek HNSCC (26 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 24 próbki wykazujące ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC, wybarwionych zestawem PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, zostało zbadanych przez trzech patologów w ciągu 3 nienastępujących po sobie dni, z co najmniej dwutygodniową przerwą między odczytami.	NPA 92,5% (86,2–98,3%) PPA 96,8% (92,1–100,0%) OA 94,6% (90,7–98,0%)
Dokładność w obrębie obserwatora	TPS ≥ 50%	Pięćdziesiąt próbek HNSCC (26 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 24 próbki wykazujące ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC, wybarwionych zestawem PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, zostało zbadanych przez trzech patologów w ciągu 3 nienastępujących po sobie dni, z co najmniej dwutygodniową przerwą między odczytami.	NPA 96,8% (93,2–99,5%) PPA 97,3% (95,0–99,5%) OA 97,1% (94,9–98,9%)

NPA = procentowa zgodność wyników ujemnych; PPA = procentowa zgodność wyników dodatnich; OA = zgodność wszystkich wyników; TPS = skala stopnia wybarwienia guza

Odtwarzalność zewnętrzna: HNSCC

Odtwarzalność zewnętrzną testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx oceniono w trzech zewnętrznych ośrodkach badawczych. Procentową zgodność wyników ujemnych (NPA), procentową zgodność wyników dodatnich (PPA) oraz procentową zgodność wszystkich wyników (OA) obliczono z wykorzystaniem odpowiednich 95-procentowych dwustronnych przedziałów ufności z użyciem metody bootstrapowej dla wartości granicznych, CPS ≥ 1 i CPS ≥ 20, jak przedstawiono odpowiednio w tabelach 25 i 26.

Tabela 25: Odtwarzalność testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w przypadku HNSCC zbadana w trzech ośrodkach zewnętrznych (CPS ≥ 1)

Badanie odtwarzalności	Graniczna wartość diagnostyczna	Typ badania	% zgodności (95% CI)
Pomiędzy ośrodkami	CPS ≥ 1	Każda z 38 próbek HNSCC (19 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 19 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w ciągu 5 nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona pomiędzy trzema ośrodkami w oparciu o łącznie 570 porównań względem uzgodnionej wartości.	NPA 96,8% (92,6–100,0%) PPA 93,3% (86,7–98,6%) OA 95,1% (91,2–98,2%)
W obrębie ośrodka	CPS ≥ 1	Każda z 38 próbek HNSCC (19 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 19 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w ciągu 5 nienastępujących po sobie dni w każdym z trzech ośrodków badawczych. Analiza została przeprowadzona w obrębie trzech ośrodków w oparciu o łącznie 570 porównań względem uzgodnionej wartości.	NPA 95,7% (91,3–99,0%) PPA 97,0% (94,5–98,9%) OA 96,3% (93,5–98,6%)
Pomiędzy obserwatorami	CPS ≥ 1	Ocena 62 próbek HNSCC (30 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 32 próbki wykazujące ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC, wybarwionych za pomocą testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, została przeprowadzona przez trzech patologów (jednego w każdym z trzech ośrodków badawczych) w ciągu 3 nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona pomiędzy trzema ośrodkami w oparciu o łącznie 556 porównań względem uzgodnionej wartości.	NPA 94,0% (89,3–97,8%) PPA 97,2% (94,4–99,3%) OA 95,7% (93,0–98,0%)

Badanie odzwierciedlenia	Graniczna wartość diagnostyczna	Typ badania	% zgodności (95% CI)
W obrębie obserwatora	CPS \geq 1	Ocena 62 próbek HNSCC (30 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 32 próbki wykazujące ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC, wybarwionych za pomocą testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, została przeprowadzona przez trzech patologów (jednego w każdym z trzech ośrodków badawczych) w ciągu trzech nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona w 3 ośrodkach w oparciu o łącznie 555 porównań względem uzgodnionej wartości.	NPA 97,3% (95,4–98,9%) PPA 98,3% (96,8–99,7%) OA 97,8% (96,8–98,9%)

NPA = procentowa zgodność wyników ujemnych; PPA = procentowa zgodność wyników dodatnich; OA = zgodność wszystkich wyników; CPS = łączny wynik wartości dodatnich

Tabela 26: Odzwierciedlenie testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx w przypadku HNSCC zbadana w trzech ośrodkach zewnętrznych (CPS \geq 20)

Badanie odzwierciedlenia	Graniczna wartość diagnostyczna	Typ badania	% zgodności (95% CI)
Pomiędzy ośrodkami	CPS \geq 20	Każda z 38 próbek HNSCC (25 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 13 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w ciągu 5 nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona pomiędzy trzema ośrodkami w oparciu o łącznie 570 porównań względem uzgodnionej wartości.	NPA 95,5% (92,0–98,4%) PPA 81,0% (71,3–90,3%) OA 90,5% (86,5–94,4%)
W obrębie ośrodka	CPS \geq 20	Każda z 38 próbek HNSCC (25 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 13 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w ciągu 5 nienastępujących po sobie dni w każdym z trzech ośrodków badawczych. Analiza została przeprowadzona w obrębie trzech ośrodków w oparciu o łącznie 570 porównań względem uzgodnionej wartości.	NPA 96,9% (94,6–98,8%) PPA 90,6% (86,3–94,9%) OA 94,9% (92,8–96,8%)
Pomiędzy obserwatorami	CPS \geq 20	Ocena 62 próbek HNSCC (31 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 31 próbki wykazujące ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC, wybarwionych za pomocą testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, została przeprowadzona przez trzech patologów (jednego w każdym z trzech ośrodków badawczych) w ciągu 3 nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona pomiędzy trzema ośrodkami w oparciu o łącznie 556 porównań względem uzgodnionej wartości.	NPA 93,1% (87,2–97,8%) PPA 91,0% (85,7–95,7%) OA 92,1% (88,2–95,5%)
W obrębie obserwatora	CPS \geq 20	Ocena 62 próbek HNSCC (31 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 31 próbki wykazujące ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC, wybarwionych za pomocą testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, została przeprowadzona przez trzech patologów (jednego w każdym z trzech ośrodków badawczych) w ciągu 3 nienastępujących po sobie dni. Analiza została przeprowadzona w trzech ośrodkach w oparciu o łącznie 555 porównań względem uzgodnionej wartości.	NPA 96,8% (94,5–98,7%) PPA 97,8% (96,0–99,3%) OA 97,3% (95,9–98,6%)

NPA = procentowa zgodność wyników ujemnych; PPA = procentowa zgodność wyników dodatnich; OA = zgodność wszystkich wyników; CPS = łączny wynik wartości dodatnich

Uwaga: wyniki badań nie spełniły wcześniej określonych kryteriów dopuszczalności dla procentowej zgodności wyników dodatnich między ośrodkami (CPS \geq 20) w dwóch niezależnych badaniach oraz zgodności wszystkich wyników między ośrodkami (CPS \geq 20) w jednym badaniu.

16.7 Ocena skuteczności klinicznej: HNSCC

KEYNOTE-048: kontrolowane badanie z zastosowaniem monoterapii i terapii skojarzonej u wcześniej nieleczonych pacjentów z nawrotowym lub przerzutowym HNSCC

W wieloośrodkowym, randomizowanym, otwartym, czynnie kontrolowanym badaniu KEYNOTE-048 oceniano skuteczność pembrolizumabu u pacjentów z potwierdzonym histologicznie przerzutowym lub nawrotowym HNSCC jamy ustnej, gardła lub krtani, którzy wcześniej nie byli leczeni systemowo z powodu nawrotowej lub przerzutowej postaci choroby i u których miejscowe leczenie nie

przyniosłoby rezultatów. Pacjenci z rakiem jamy nosowo-gardłowej, aktywną chorobą autoimmunologiczną wymagającą leczenia układowego w ciągu 2 lat od zakończenia leczenia lub stanem chorobowym wymagającym immunosupresji nie kwalifikowali się do badania. Randomizację stratyfikowano przez ekspresję PD-L1 guza (TPS \geq 50% lub $<$ 50%), status zakażenia HPV (dodatni lub ujemny) oraz stan sprawności w skali ECOG (0 lub 1). Pacjenci byli randomizowani w stosunku 1:1:1 do jednej z następujących grup terapeutycznych:

- KEYTRUDA 200 mg co 3 tygodnie
- KEYTRUDA 200 mg co 3 tygodnie, karboplatyna AUC 5 mg/mL/min co 3 tygodnie lub cisplatyna 100 mg/m² co 3 tygodnie oraz 5-FU 1000 mg/m²/d w infuzji ciągłej przez 4 dni co 3 tygodnie (maks. 6 cykli platyny i 5-FU)
- Cetuksymab 400 mg/m² dawka nasycająca, a następnie 250 mg/m² co tydzień, karboplatyna AUC 5 mg/mL/min co 3 tygodnie lub cisplatyna 100 mg/m² co 3 tygodnie oraz 5-FU 1000 mg/m²/d w infuzji ciągłej przez 4 dni co 3 tygodnie (maks. 6 cykli platyny i 5-FU)

Leczenie pembrolizumabem trwało do czasu określenia przez badacza progresji choroby według kryteriów RECIST w wersji 1.1, niedopuszczalnej toksyczności lub przez maksymalnie 24 miesiące. Podawanie pembrolizumabu było dopuszczalne po określeniu progresji choroby według kryteriów RECIST, jeżeli pacjent był klinicznie stabilny i uznany przez badacza za czerpiącego korzyści kliniczne. Ocenę stanu guza przeprowadzono w tygodniu 9., następnie co 6 tygodni w pierwszym roku leczenia, a następnie co 9 tygodni przez 24 miesiące.

Wśród 882 pacjentów biorących udział w badaniu KEYNOTE-048 u 754 (85%) występowały guzy o ekspresji PD-L1 CPS \geq 1, co ustalono w oparciu o wyniki uzyskane za pomocą zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDxTM. Charakterystyka wyjściowa tych 754 pacjentów była następująca: średni wiek wynosił 61 lat (zakres: od 20 do 94 lat); 36% to osoby w wieku 65 lat lub starsze; 82% grupy stanowili mężczyźni; 74% uczestników należało do rasy białej, a 19% do azjatyckiej; u 61% pacjentów stan sprawności w skali ECOG wynosił 1; 77% pacjentów stanowili obecni lub byli palacze. Charakterystyka choroby była następująca: u 21% pacjentów występowało zakażenie HPV, a u 95% choroba w stadium IV (stadium IVa 21%, stadium IVb 6%, stadium IVc 69%).

Głównymi punktami końcowymi były całkowity czas przeżycia (OS) i czas przeżycia bez progresji choroby (PFS) oceniane na podstawie niejawnej i niezależnej analizy centralnej (BICR) zgodnie z kryteriami RECIST w wersji 1.1. Badanie wykazało istotną statystycznie poprawę w zakresie wartości OS u wszystkich pacjentów zrandomizowanych do grupy przyjmującej pembrolizumab w skojarzeniu z chemioterapią w porównaniu z leczeniem standardowym (HR 0,72; 95% CI 0,60–0,87) oraz u pacjentów z guzami o ekspresji PD-L1 CPS \geq 1, zrandomizowanych do grupy przyjmującej pembrolizumab w monoterapii w porównaniu z leczeniem standardowym. W tabelach 27 i 28 przedstawiono podsumowanie kluczowych wyników skuteczności pembrolizumabu u pacjentów z guzami o ekspresji PD-L1 wynoszącej CPS \geq 1 w badaniu KEYNOTE-048, na etapie końcowej analizy przeprowadzonej przy medianie okresu kontrolnego 13 miesięcy dla pembrolizumabu w skojarzeniu z chemioterapią oraz przy medianie okresu kontrolnego 11,5 miesiąca dla pembrolizumabu w monoterapii. Krzywe Kaplana Meiera dla OS w oparciu o analizę końcową przedstawiono na rysunkach 4 i 5.

Tabela 27: Wyniki skuteczności stosowania pembrolizumabu w połączeniu z chemioterapią w badaniu KEYNOTE-048 dla ekspresji PD-L1 (CPS \geq 1)

Punkt końcowy	Pembrolizumab + Chemioterapia związkami platyny + 5-FU n=242	Leczenie standardowe* n=235
OS		
Liczba (%) pacjentów, u których wystąpiło zdarzenie	177 (73%)	213 (91%)
Mediana w miesiącach (95% CI)	13,6 (10,7; 15,5)	10,4 (9,1; 11,7)
Współczynnik ryzyka [†] (95% CI)	0,65 (0,53; 0,80)	
Wartość p [‡]	0,00002	
PFS		
Liczba (%) pacjentów, u których wystąpiło zdarzenie	212 (88%)	221 (94%)
Mediana w miesiącach (95% CI)	5,1 (4,7; 6,2)	5,0 (4,8; 6,0)
Współczynnik ryzyka [†] (95% CI)	0,84 (0,69; 1,02)	
Wartość p [‡]	0,03697	
ORR		
Wskaźnik obiektywnej odpowiedzi [§] (95% CI)	36% (30,3; 42,8)	36% (29,6; 42,2)
Odpowiedź całkowita	7%	3%
Odpowiedź częściowa	30%	33%
Wartość p [¶]	0,4586	
Czas trwania odpowiedzi		
Mediana w miesiącach (zakres)	6,7 (1,6+;39,0+)	4,3 (1,2+;31,5+)
% osób z odpowiedzią utrzymującą się przez \geq 6 miesięcy	54%	34%

* Cetuksymab, platyna i 5-FU

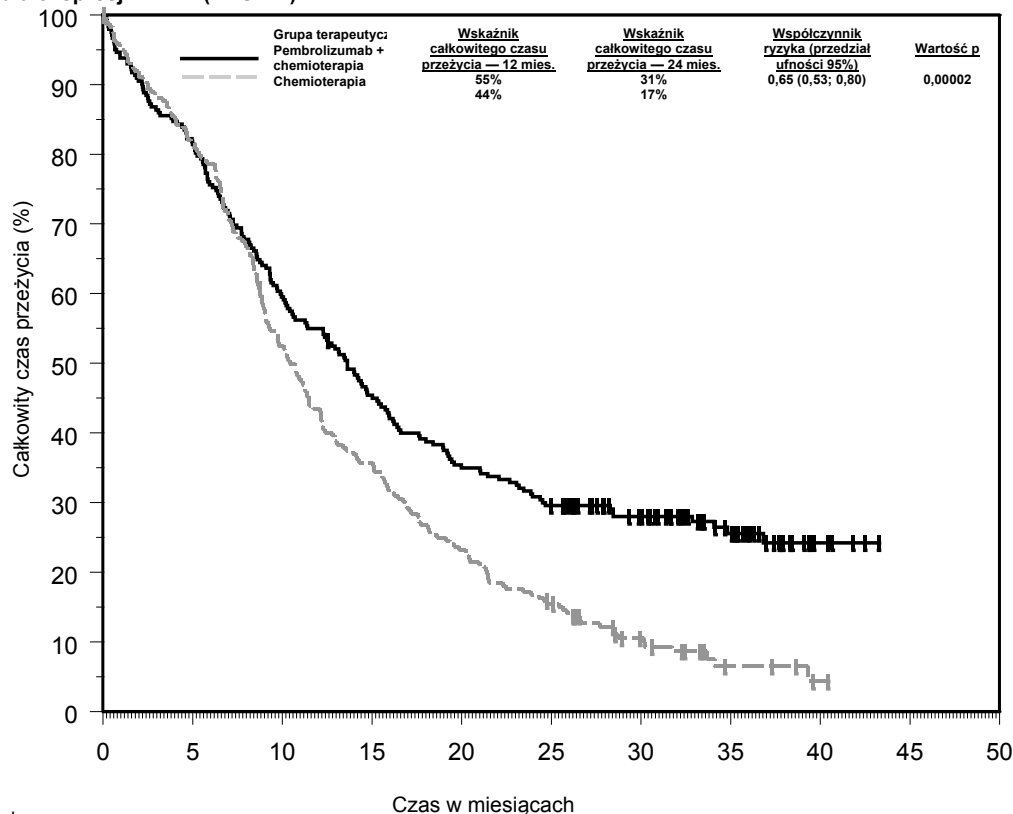
[†] W oparciu o model stratyfikowanego hazardu proporcjonalnego Coxa

[‡] W oparciu o stratyfikowany test logarytmiczny rang

[§] Odpowiedź: najlepsza obiektywna odpowiedź jako potwierdzona pełna lub częściowa odpowiedź.

[¶] W oparciu o metodę Miettinen-Nurminen stratyfikowana w skali ECOG (0 lub 1), status zakażenia HPV (dodatni lub ujemny) i status ekspresji PD-L1 (dodatni o dużym nasileniu lub dodatni o niedużym nasileniu)

Rysunek 4: Krzywa Kaplana-Meiera całkowitego czasu przeżycia w przypadku pembrolizumabu w skojarzeniu z chemioterapią w badaniu KEYNOTE-048 dla ekspresji PD-L1 (CPS ≥ 1)



	Czas w miesiącach										
Liczba narażonych na ryzyko											
Pembrolizumab + chemioterapia:	242	197	144	109	84	70	52	29	5	0	0
standardowe	235	191	122	83	54	35	17	5	1	0	0

Tabela 28: Wyniki skuteczności stosowania pembrolizumabu w monoterapii w badaniu KEYNOTE-048 dla ekspresji PD-L1 (CPS ≥ 1)

Punkt końcowy	Pembrolizumab n=257	Leczenie standardowe* n=255
OS		
Liczba (%) pacjentów, u których wystąpiło zdarzenie	197 (77%)	229 (90%)
Mediana w miesiącach (95% CI)	12,3 (10,8; 14,3)	10,3 (9,0; 11,5)
Współczynnik ryzyka† (95% CI)	0,74 (0,61; 0,90)	
Wartość p‡	0,00133	
PFS		
Liczba (%) pacjentów, u których wystąpiło zdarzenie	228 (89%)	237 (93%)
Mediana w miesiącach (95% CI)	3,2 (2,2; 3,4)	5,0 (4,8; 6,0)
Współczynnik ryzyka† (95% CI)	1,13 (0,94; 1,36)	
Wartość p‡	0,89580	
ORR		
Wskaźnik obiektywnej odpowiedzi§ (95% CI)	19,1% (14,5; 24,4)	35% (29,1; 41,1)
Odpowiedź całkowita	5%	3%
Odpowiedź częściowa	14%	32%
Wartość p¶	1,0000	
Czas trwania odpowiedzi		
Mediana w miesiącach (zakres)	23,4 (1,5+; 43,0+)	4,5 (1,2+; 38,7+)
% osób z odpowiedzią utrzymującą się przez ≥ 6 miesięcy	81%	36%

* Cetuksymab, platyna i 5-FU

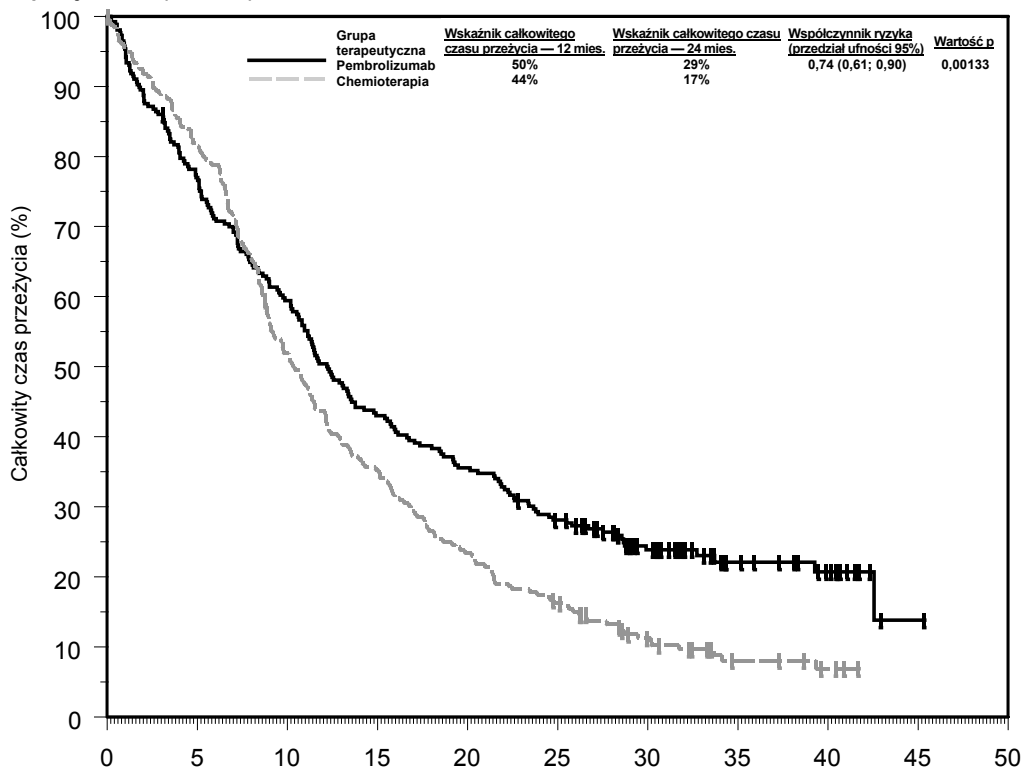
† W oparciu o model stratyfikowanego hazardu proporcjonalnego Coxa

‡ W oparciu o stratyfikowany test logarytmiczny rang

§ Odpowiedź: Najlepsza obiektywna odpowiedź jako potwierdzona pełna lub częściowa odpowiedź.

¶ W oparciu o metodę Miettinen-Nurminen stratyfikowana w skali ECOG (0 lub 1), status zakażenia HPV (dodatni lub ujemny) i status ekspresji PD-L1 (dodatni o dużym nasileniu lub dodatni o niedużym nasileniu)

Rysunek 5: Krzywa Kaplana-Meiera całkowitego czasu przeżycia w przypadku pembrolizumabu w monoterapii w badaniu KEYNOTE-048 dla ekspresji PD-L1 (CPS ≥ 1)



Liczba narażonych na ryzyko	Czas w miesiącach										
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Pembrolizumab:	257	197	152	110	91	70	43	21	13	1	0
standardowe	255	207	131	89	59	40	21	9	5	0	0

W badaniu KEYNOTE-048 przeprowadzono analizę wśród pacjentów z guzami o ekspresji PD-L1 wynoszącej CPS ≥ 20 [pembrolizumab w skojarzeniu z chemioterapią: n=126 (49%) w porównaniu z leczeniem standardowym: n=110 (43%) i pembrolizumab w monoterapii: n=133 (52%) w porównaniu z leczeniem standardowym: n=122 (48%)] (patrz tabela 29).

Tabela 29: Wyniki skuteczności stosowania pembrolizumabu w skojarzeniu z chemioterapią i pembrolizumabu w monoterapii w badaniu KEYNOTE-048 dla ekspresji PD-L1 (CPS ≥ 20)

Punkt końcowy	Pembrolizumab + Chemioterapia związkami platyny + 5-FU n=126	Leczenie standardowe* n=110	Pembrolizumab w monoterapii n=133	Leczenie standardowe* n=122
OS				
Liczba (%) pacjentów, u których wystąpiło zdarzenie	84 (66,7)	98 (89,1)	94 (70,7)	108 (88,5)
Mediana w miesiącach (95% CI)	14,7 (10,3; 19,3)	11,0 (9,2; 13,0)	14,8 (11,5; 20,6)	10,7 (8,8; 12,8)
Współczynnik ryzyka† (95% CI)	0,60 (0,45; 0,82)		0,58 (0,44; 0,78)	
Wartość p‡	0,00044		0,00010	
Wskaźnik OS po 6 mies. (95% CI)	74,6 (66,0; 81,3)	80,0 (71,2; 86,3)	74,4 (66,1; 81,0)	79,5 (71,2; 85,7)
Wskaźnik OS po 12 mies. (95% CI)	57,1 (48,0; 65,2)	46,1 (36,6; 55,1)	56,4 (47,5; 64,3)	44,9 (35,9; 53,4)
Wskaźnik OS po 24 mies. (95% CI)	35,4 (27,2; 43,8)	19,4 (12,6; 27,3)	35,3 (27,3; 43,4)	19,1 (12,7; 26,6)
PFS				
Liczba (%) pacjentów, u których wystąpiło zdarzenie	106 (84,1)	104 (94,5)	115 (86,5)	114 (93,4)
Mediana w miesiącach (95% CI)	5,8 (4,7; 7,6)	5,3 (4,9; 6,3)	3,4 (3,2; 3,8)	5,3 (4,8; 6,3)
Współczynnik ryzyka† (95% CI)	0,76 (0,58; 1,01)		0,99 (0,76; 1,29)	

Wartość p [†]	0,02951		0,46791	
Wskaźnik PFS po 6 mies. (95% CI)	49,4 (40,3; 57,9)	47,2 (37,5; 56,2)	33,0 (25,2; 41,0)	46,6 (37,5; 55,2)
Wskaźnik PFS po 12 mies. (95% CI)	23,9 (16,7; 31,7)	14,0 (8,2; 21,3)	23,5 (16,6; 31,1)	15,1 (9,3; 22,2)
Wskaźnik PFS po 24mies. (95% CI)	14,6 (8,9; 21,5)	5,0 (1,9; 10,5)	16,8 (10,9; 23,8)	6,1 (2,7; 11,6)
ORR				
Wskaźnik obiektywnej odpowiedzi [§] (95% CI)	42,9 (34,1; 52,0)	38,2 (29,1; 47,9)	23,3 (16,4; 31,4)	36,1 (27,6; 45,3)
Czas trwania odpowiedzi				
Liczba osób, u których wystąpiła odpowiedź	54	42	31	44
Mediana w miesiącach (zakres)	7,1 (2,1+ – 39,0+)	4,2 (1,2+ – 31,5+)	22,6 (2,7+ – 43,0+)	4,2 (1,2+ – 31,5+)

* Cetuksymab, platyna i 5-FU

† W oparciu o model stratyfikowanego hazardu proporcjonalnego Coxa

‡ W oparciu o stratyfikowany test logarytmiczny rang

§ Odpowiedź: najlepsza obiektywna odpowiedź jako potwierdzona pełna lub częściowa odpowiedź.

W badaniu KEYNOTE048 przeprowadzono analizę podgrupy badawczej wśród pacjentów z guzami o ekspresji PDL1 CPS ≥ 1 do < 20 [pembrolizumab w skojarzeniu z chemioterapią: n=116 (45%) w porównaniu z leczeniem standardowym: n=125 (49%) i pembrolizumab w monoterapii: n=124 (48%) w porównaniu z leczeniem standardowym: n=133 (52%)] (patrz tabela 30).

Tabela 30: Wyniki skuteczności stosowania pembrolizumabu w skojarzeniu z chemioterapią i pembrolizumabu w monoterapii w badaniu KEYNOTE-048 dla ekspresji PD-L1 ($1 \leq \text{CPS} < 20$)

Punkt końcowy	Pembrolizumab + Chemioterapia związkami platyny + 5-FU n=116	Leczenie standardowe* n=125	Pembrolizumab w monoterapii n=124	Leczenie standardowe* n=133
OS				
Liczba (%) pacjentów, u których wystąpiło zdarzenie	93 (80,2)	115 (92,0)	103 (83,1)	121 (91,0)
Mediana w miesiącach (95% CI)	12,7 (9,4; 15,3)	9,9 (8,6; 11,5)	10,8 (9,0; 12,6)	10,1 (8,7; 12,1)
Współczynnik ryzyka [‡] (95% CI)	0,71 (0,54; 0,94)		0,86 (0,66; 1,12)	
Wskaźnik OS po 6 mies. (95% CI)	76,7 (67,9; 83,4)	77,4 (69,0; 83,8)	67,6 (58,6; 75,1)	78,0 (70,0; 84,2)
Wskaźnik OS po 12 mies. (95% CI)	52,6 (43,1; 61,2)	41,1 (32,4; 49,6)	44,0 (35,1; 52,5)	42,4 (33,9; 50,7)
Wskaźnik OS po 24 mies. (95% CI)	25,9 (18,3; 34,1)	14,5 (9,0; 21,3)	22,0 (15,1; 29,6)	15,9 (10,3; 22,6)
PFS				
Liczba (%) pacjentów, u których wystąpiło zdarzenie	106 (91,4)	117 (93,6)	113 (91,1)	123 (92,5)
Mediana w miesiącach (95% CI)	4,9 (4,2; 5,3)	4,9 (3,7; 6,0)	2,2 (2,1; 2,9)	4,9 (3,8; 6,0)
Współczynnik ryzyka [‡] (95% CI)	0,93 (0,71; 1,21)		1,25 (0,96; 1,61)	
Wskaźnik PFS po 6 mies. (95% CI)	40,1 (31,0; 49,0)	40,0 (31,2; 48,5)	24,2 (17,1; 32,0)	41,4 (32,8; 49,7)
Wskaźnik PFS po 12 mies. (95% CI)	15,1 (9,1; 22,4)	11,3 (6,4; 17,7)	17,5 (11,4; 24,0)	12,1 (7,2; 18,5)
Wskaźnik PFS po 24mies. (95% CI)	8,5 (4,2; 14,7)	5,0 (1,9; 10,1)	8,3 (4,3; 14,1)	6,3 (2,9; 11,5)
ORR				
Wskaźnik obiektywnej odpowiedzi [‡] (95% CI)	29,3 (21,2; 38,5)	33,6 (25,4; 42,6)	14,5 (8,8; 22,0)	33,8 (25,9; 42,5)
Czas trwania odpowiedzi				
Liczba osób, u których wystąpiła odpowiedź	34	42	18	45
Mediana w miesiącach (zakres)	5,6 (1,6+; 25,6+)	4,6 (1,4+; 31,4+)	NR (1,5+; 38,9+)	5,0 (1,4+; 38,7+)

* Cetuksymab, platyna i 5-FU

† W oparciu o model stratyfikowanego hazardu proporcjonalnego Coxa

‡ Odpowiedź: najlepsza obiektywna odpowiedź jako potwierdzona pełna lub częściowa odpowiedź.

KEYNOTE-040: kontrolowane badanie kliniczne z udziałem pacjentów z HNSCC wcześniej poddanych chemioterapii związkami platyny

W badaniu KEYNOTE-040 – wielośrodkowym, otwartym, randomizowanym, kontrolowanym badaniu dotyczącym leczenia histologicznie potwierdzonego nawrotowego lub przerzutowego HNSCC jamy ustnej, gardła lub krtani – analizowano bezpieczeństwo i skuteczność stosowania pembrolizumabu u pacjentów, u których wystąpiła progresja choroby w trakcie lub po chemioterapii związkami platyny stosowanej w leczeniu nawrotowego lub przerzutowego HNSCC lub po chemioterapii związkami platyny stosowanej w ramach leczenia indukcyjnego, sprzężonego lub adjuwantowego, i u których miejscowe leczenie nie przyniosłoby rezultatów. Pacjenci zostali poddani stratyfikacji według ekspresji PD-L1 (TPS $\geq 50\%$), statusu zakażenia HPV i stanu sprawności w skali ECOG, a następnie poddani randomizacji (1:1), aby otrzymać pembrolizumab 200 mg co 3 tygodnie (n=247) lub leczenie standardowe (n=248): metotreksat 40 mg/m² raz w tygodniu (n=64), docetaksel 75 mg/m² raz na 3 tygodnie (n=99) lub cetuksymab w dawce nasycającej 400 mg/m², a następnie 250 mg/m² co tydzień (n=71). Pomimo postępu choroby leczenie mogło być kontynuowane, jeżeli pacjent był w stanie stabilnym i zdaniem badacza czerpał korzyści kliniczne wynikające z leczenia.

Z badania wykluczono pacjentów z rakiem jamy nosowo-gardłowej, aktywną chorobą autoimmunologiczną wymagającą leczenia układowego w ciągu dwóch lat od zakończenia leczenia, stanem chorobowym wymagającym immunosupresji oraz pacjentów poddanych co najmniej trzykrotnie wcześniejszemu leczeniu układowemu nawrotowego i/lub przerzutowego HNSCC. Ocenę stanu guza przeprowadzono po 9 tygodniach, następnie co 6 tygodni do tygodnia 52, a następnie co 9 tygodni przez 24 miesiące.

Wśród 495 pacjentów biorących udział w badaniu KEYNOTE-040 u 129 (26%) występowały guzy o ekspresji PD-L1 TPS \geq 50%, co ustalono w oparciu o wyniki uzyskane za pomocą zestawu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. Wyjściowa charakterystyka tych 129 pacjentów była następująca: średni wiek wynosił 62 lata (40% pacjentów w wieku 65 lub starszych); 81% stanowili mężczyźni; 78% pacjentów należało do rasy białej, 11% do azjatyckiej, a 2% do rasy czarnej; u 23% i 77% pacjentów stan sprawności w skali ECOG wynosił odpowiednio 0 lub 1; u 19% pacjentów występowało zakażenie HPV. U sześćdziesięciu siedmiu procent pacjentów występował rak z przerzutami odległymi (M1), w większości w stadium IV (stadium IV 32%, stadium IVa 14%, stadium IVb 4%, stadium IVc 44%). U szesnastu procent (16%) pacjentów wystąpiła progresja choroby po neoadjuwantowej lub adjuwantowej chemioterapii związkami platyny, 84% pacjentów poddano wcześniej jednokrotnie lub dwukrotnie leczeniu układowemu przerzutowej postaci choroby.

Pierwszorzędowym punktem końcowym była wartość OS dla grup wyodrębnionych zgodnie z zaplanowanym leczeniem (ITT) Po wstępnej analizie HR dla wartości OS wynosił 0,82 (95% CI: 0,67; 1,01) z jednostronną wartością p 0,0316. Mediana OS wynosiła 8,4 miesiąca dla pembrolizumabu w porównaniu z 7,1 miesiąca dla standardowego leczenia. W tabeli 31 zamieszczono podsumowanie głównych kryteriów oceny skuteczności dla populacji z TPS \geq 50%. Krzywą Kaplana-Meiera OS dla populacji z TPS \geq 50% przedstawiono na rysunku 6.

Table 31: Skuteczność stosowania pembrolizumabu 200 mg co 3 tygodnie u pacjentów z HNSCC (TPS \geq 50%) leczonych wcześniej chemioterapią związkami platyny w badaniu KEYNOTE-040.

Punkt końcowy	Pembrolizumab 200 mg co 3 tygodnie n=64	Leczenie standardowe* n=65
OS		
Liczba (%) pacjentów, u których wystąpiło zdarzenie	41 (64)	56 (86)
Współczynnik ryzyka [†] (95% CI)	0,53 (0,35; 0,81)	
Wartość p [‡]	0,001	
Mediana w miesiącach (95% CI)	11,6 (8,3; 19,5)	6,6 (4,8; 9,2)
PFS[§]		
Liczba (%) pacjentów, u których wystąpiło zdarzenie	52 (81)	58 (89)
Współczynnik ryzyka [†] (95% CI)	0,58 (0,39; 0,86)	
Wartość p [‡]	0,003	
Mediana w miesiącach (95% CI)	3,5 (2,1; 6,3)	2,1 (2,0; 2,4)
Wskaźnik (%) po 6 mies. (95% CI)	40,1 (28,1; 51,9)	17,1 (8,8; 27,7)
Ogólny odsetek odpowiedzi na leczenie[§]		
ORR% (95% CI)	26,6 (16,3; 39,1)	9,2 (3,5; 19,0)
Wartość p [¶]	0,0009	
Odpowiedź całkowita	5%	2%
Odpowiedź częściowa	22%	8%
Stabilność choroby	23%	23%
Czas utrzymywania się odpowiedzi^{§,#}		
Mediana w miesiącach (zakres)	Nie osiągnięto (2,7; 13,8+)	6,9 (4,2; 18,8)
Liczba (%) [‡] pacjentów z odpowiedzią utrzymującą się \geq 6 miesięcy	9 (66)	2 (50)

* Metotreksat, docetaksel lub cetuksymab

† Współczynnik ryzyka (działanie pembrolizumabu w porównaniu z leczeniem standardowym) oparty na modelu stratyfikowanego hazardu proporcjonalnego Coxa

‡ Jednostronna wartość p w oparciu o test logarytmiczny rang

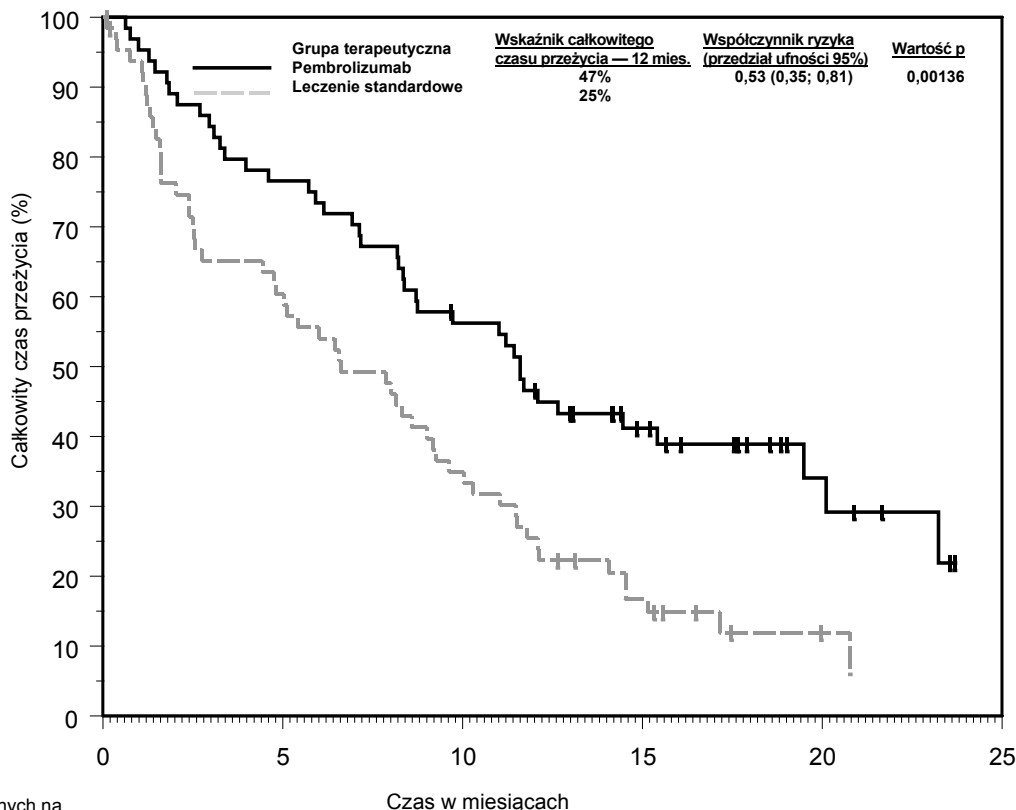
§ Na podstawie niejawnej i niezależnej analizy centralnej (BICR) zgodnie z kryteriami RECIST w wersji 1.1

¶ W oparciu o metodę Miettinen-Nurminen

W oparciu o liczbę pacjentów, u których wystąpiła odpowiedź na leczenie, potwierdzona jako odpowiedź całkowita lub częściowa

‡ W oparciu o estymację metodą Kaplana-Meiera

Rysunek 6: Krzywa Kaplana-Meiera całkowitego czasu przeżycia według grupy terapeutycznej w badaniu KEYNOTE-040 dla ekspresji PD-L1 (TPS ≥ 50%)



	Czas w miesiącach					
Liczba narażonych na ryzyko	0	5	10	15	20	25
Pembrolizumab:	64	49	35	19	7	1
Leczenie standardowe:	65	38	22	9	2	0

16.8 Ocena skuteczności nieklinicznej: czerniak

Czułość analityczna: czerniak

Czułość analityczna testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx została sprawdzona za pomocą partii produkcyjnej na 137 różnych próbkach utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie tkanek czerniaka. Ocena ekspresji PD-L1 wykazała występowanie dynamicznego zakresu odczynu w komórkach nowotworowych i komórkach układu immunologicznego, z ekspresją o natężeniu odczynu 0–3.

Dokładność: czerniak

Dokładność testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx na podstawie próbek czerniaka została oceniona w ośrodku firmy Dako. Średnią procentową zgodność wyników ujemnych (ANA), średnią procentową zgodność wyników dodatnich (APA) oraz procentową zgodność wszystkich wyników (OA) obliczono z wykorzystaniem 95-procentowych dwustronnych przedziałów ufności z użyciem metody bootstrapowej dla ekspresji PD-L1 ≥ 1% (ocena MEL ≥ 2), jak przedstawiono w tabeli 32. W badaniach, które dały 100% zgodności, procentową zgodność wyników ujemnych (NPA), procentową zgodność wyników dodatnich (PPA) oraz zgodność wszystkich wyników (OA) obliczono z wykorzystaniem odpowiednich 95-procentowych dwustronnych przedziałów ufności z wykorzystaniem metody Wilsona.

Tabela 32: Dokładność testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx zbadana w jednym ośrodku (ocena MEL ≥ 2 (≥ 1%))

Badanie dokładności	Ocena MEL	Ekspresja PD-L1	Typ badania	% zgodności (95% CI)
Pomiędzy urządzeniami	≥ 2	≥ 1%	Każda z 16 próbek czerniaka (7 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 9 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w każdym z sześciu urządzeń Autostainer Link 48.	NPA 100,0% (91,6–100,0%) PPA 100,0% (93,4–100,0%) OA 100,0% (96,2–100,0%)
Pomiędzy operatorami	≥ 2	≥ 1%	Każda z 16 próbek czerniaka (7 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 9 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana przez sześciu analityków w jednym urządzeniu Autostainer Link 48.	NPA 100,0% (91,6–100,0%) PPA 100,0% (93,4–100,0%) OA 100,0% (96,2–100,0%)
Pomiędzy dniami	≥ 2	≥ 1%	Każda z 16 próbek czerniaka (7 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 9 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w ciągu 6 nienastępujących po sobie dni w urządzeniu Autostainer Link 48.	NPA 100,0% (91,6–100,0%) PPA 100,0% (93,4–100,0%) OA 100,0% (96,2–100,0%)

Badanie dokładności	Ocena MEL	Ekspresja PD-L1	Typ badania	% zgodności (95% CI)
Pomiędzy partiami	≥ 2	≥ 1%	Każda z 16 próbek czerniaka (7 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 9 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w trzech powtórzeniach z każdą z trzech partii odczynników w urządzeniu Autostainer Link 48.	ANA 97,0% (92,3–100,0%) APA 97,4% (93,5–100,0%) OA 97,2% (93,1–100,0%)
W obrębie serii	≥ 2	≥ 1%	Każda z 16 próbek czerniaka (7 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 9 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC została zbadana w sześciu powtórzeniach w obrębie jednej serii w urządzeniu Autostainer Link 48.	NPA 100,0% (91,6–100,0%) PPA 100,0% (93,4–100,0%) OA 100,0% (96,2–100,0%)
Pomiędzy obserwatorami	≥ 2	≥ 1%	Ocena 48 próbek czerniaka (18 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 30 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC i wybarwionych za pomocą testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx została przeprowadzona przez trzech patologów w ciągu 3 nienastępujących po sobie dni.	ANA 87,7% (79,3-94,7%) APA 91,8% (85,4-96,7%) OA 90,1% (83,1-95,8%)
W obrębie obserwatora	≥ 2	≥ 1%	Ocena 48 próbek czerniaka (22 próbek niewykazujących ekspresji PD-L1 i 26 próbek wykazujących ekspresję PD-L1) o różnych wartościach ekspresji PD-L1 IHC i wybarwionych za pomocą testu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx została przeprowadzona przez trzech patologów w ciągu 3 nienastępujących po sobie dni.	ANA 89,9% (82,9-95,7%) APA 90,7% (83,3-96,2%) OA 90,3% (83,3-95,8%)

NPA = procentowa zgodność wyników ujemnych; PPA = procentowa zgodność wyników dodatnich; OA = zgodność wszystkich wyników
ANA = średnia procentowa zgodność wyników ujemnych; APA = średnia procentowa zgodność wyników dodatnich

17. Rozwiązywanie problemów

Tabela 33: Rozwiązywanie problemów










Problem	Prawdopodobna przyczyna	Zalecane postępowanie
1. Brak barwienia preparatów.	1a. Błąd związany z programowaniem.	1a. Sprawdzić, czy do programowania preparatów wybrano program PD-L1 IHC 22C3 pharmDx.
	1b. Brak reakcji z roztworem DAB+ Substrate-Chromogen Solution (DAB).	1b. Sprawdzić, czy roztwór DAB+ Substrate-Chromogen Solution został przygotowany prawidłowo.
	1c. Obecność azydku sodu w buforze płuczającym.	1c. Używać wyłącznie buforu płuczającego Dako (nr kat. K8007).
	1d. Degradacja preparatu kontrolnego.	1d. Sprawdzić datę ważności i warunki przechowywania zestawu zamieszczone na zewnętrznej powierzchni opakowania.
2. Słabe wybarwienie preparatów.	2a. Zastosowano niewłaściwą metodę utrwalania.	2a. Upewnić się, że stosowany jest wyłącznie roztwór obojętnej buforowanej formaliny jako środek utrwalający oraz zatwierdzone metody utrwalania.
	2b. Niedostateczna objętość zastosowanego odczynnika.	2b. Sprawdzić wielkość skrawka tkankowego i objętość zastosowanego odczynnika.
	2c. Zastosowano niewłaściwy bufor płuczający.	2c. Używać wyłącznie buforu płuczającego Dako (nr kat. K8007).
3. Słabe wybarwienie preparatów lub linii komórek dodatnich w obrębie preparatu kontrolnego dostarczonego przez firmę Dako.	3a. Niewystarczające odmaskowanie antygeny.	3a. Sprawdzić, czy przeprowadzono prawidłowo procedurę obróbki wstępnej „3-w-1”.
	3b. Zastosowano niewłaściwy bufor płuczający.	3b. Używać wyłącznie buforu płuczającego Dako (nr kat. K8007).
4. Nadmierne wybarwienie tła preparatów.	4a. Niecałkowicie usunięta parafina.	4a. Sprawdzić, czy przeprowadzono prawidłowo procedurę obróbki wstępnej „3-w-1”.
	4b. Wyschnięte preparaty podczas ładowania do urządzenia Autostainer Link 48.	4b. Sprawdzić, czy preparaty są zwilżone buforem podczas ładowania i przed rozpoczęciem serii.
	4c. Nieswoiste wiązanie odczynników ze skrawkami tkankowymi.	4c. Sprawdzić próbki pod kątem właściwego utrwalenia i/lub obecności martwicy.
	4d. Zastosowano niewłaściwą metodę utrwalania.	4d. Upewnić się, że jako środek utrwalający stosuje się wyłącznie roztwór obojętnej buforowanej formaliny oraz zalecane metody utrwalania.
5. Tkanki oddzielone od szkiełek.	5a. Zastosowanie nieprawidłowych szkiełek mikroskopowych.	5a. Należy używać szkiełek Dako FLEX IHC Microscope Slides (nr kat. K8020) lub szkiełek z ładunkiem elektrostatycznym (np. Superfrost Plus).
	5b. Nieodpowiednie przygotowanie próbek.	5b. Pocięte skrawki należy przed barwieniem umieścić na 1 godzinę w cieplarni w temperaturze 58°C ± 2°C.
6. Za silny odczyn swoisty.	6a. Zastosowano niewłaściwą metodę utrwalania.	6a. Upewnić się, że stosowane są wyłącznie zatwierdzone środki utrwalające i metody utrwalania.
	6b. Zastosowano niewłaściwy bufor płuczający.	6b. Używać wyłącznie buforu płuczającego Dako (nr kat. K8007).
7. Roztwór Target Retrieval Solution po podgrzaniu ulega zmętnieniu.	7. Po podgrzaniu roztwór Target Retrieval Solution ulega zmętnieniu.	7. Jest to normalne zjawisko, które nie ma wpływu na proces barwienia.

UWAGA: jeśli problemu nie daje się przypisać żadnej z powyższych przyczyn bądź zalecane działanie korekcyjne jest nieskuteczne, należy się skontaktować z działem wsparcia technicznego firmy Agilent w celu uzyskania dalszej pomocy. Dodatkowe informacje na temat technik barwienia oraz przygotowywania próbek zawiera poradnik szkoleniowy firmy Dako: Immunohistochemical Staining Methods (Metody barwienia immunohistochemicznego) (12) (dostarczany przez firmę Agilent).

18. Piśmiennictwo

1. Keytruda® package insert.
2. Reck, M, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer (KEYNOTE-024). *The New England Journal of Medicine* (NJEM.org) 2016 Oct 09; 1-11.
3. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Perez-Garcia J, Han JY, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *The Lancet online*; 2015 Dec 19.
4. Balar AV, Castellano D, O'Donnell PH, et al. First-line pembrolizumab in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and unresectable or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-052): A multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2017;18(11):1483-1492.
5. Bellmunt J, de Wit R, Vaught DJ, et al. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *NEJM*; 376 (11): 1015-26.
6. Burtress B, et al. KEYNOTE-048: Phase 3 study of first-line pembrolizumab (P) for recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma (R/M HNSCC). ESMO 2018 Congress. 22 October 2018.
7. Cohen EE, Harrington KJ, Le-Tourneau C, et al. Pembrolizumab versus standard-of care therapy for recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma (R/M HNSCC): Phase 3 KEYNOTE-040 trial. *Ann Oncol*. 2017;28(Suppl 5):628.
8. Daud A, Wolchok J, Robert C, Hwu WJ, Weber J, Ribas A, et al. Programmed Death-Ligand 1 Expression and Response to the Anti-Programmed Death 1 Antibody Pembrolizumab in Melanoma. *Journal of Clinical Oncology* (jco.ascopubs.org) 2016 Oct 11.
9. Phelps R, Johnson B, Ihde D, Gazdar A, Carbone D, McClintock P, et al., *Journal of Cellular Biochemistry Supplement* (1996) 24:32-91.
10. Department of Health, Education and Welfare, National Institutes for Occupational Safety and Health, Rockville, MD. "Procedures for the decontamination of plumbing systems containing copper and/or lead azides." DHHS (NIOSH) Publ. No. 78-127, Current 13. August 16, 1976.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document M29-A3 [ISBN 1-56238-567-4]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 – 1898 USA, 2000.
12. Taylor CR and Rudbeck L. Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods. Sixth Edition. Dako, Carpinteria, California; 2013.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCCLS). Quality assurance for Design Control and Implementation of Immunocytochemistry Assays; Approved guideline. CLSI document I/LA28-A2; Vol. 31 No. 4 (ISBN 1-56238-745-6) CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087USA; 2011.
14. Omata M, Liew C-T, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B s surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Path* 1980; 73:626.
15. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *International Immunol* 2007(19); 7:813.
16. Brown JA, Dorfman DM, Ma F-R, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, et al. Blockade of Programmed Death-1 Ligands on Dendritic Cells Enhances T Cell Activation and Cytokine Production. *J Immunol* 2003;170:1257-11.
17. Cooper WA, Tran T, Vilain RE, Madore J, Seliger CI, Kohonen-Cornish M, et al. PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. *Lung Cancer* 2015; 89:181.
18. Chen B, Chapuy B, Ouyang J et al. PD-L1 Expression Is Characteristic of a Subset of Aggressive B-cell Lymphomas and Virus-Associated Malignancies. *Clin Cancer Res* 2013; 19:3462-3473.
19. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leigh N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *New Eng J Med* 2015; 372:2018-28.

Objaśnienia symboli

 REF	Numer katalogowy		Ograniczenie temperatury	 IVD	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Producent	 LOT	Numer partii		Zawiera odczynnik w ilości wystarczającej na <n> testów
	Zużyć przed		Sprawdzić w instrukcji obsługi	 EC REP	Autoryzowany przedstawiciel w Unii Europejskiej



Dako North America, Inc.
6392 Via Real
Carpinteria, California 93013 USA

Tel 805 566 6655
Fax 805 566 6688
Technical Support 800 424 0021
Customer Service 800 235 5763



Dako Denmark ApS
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup Denmark

Tel +45 4485 9500
Fax +45 4485 9595
www.agilent.com

PT0020/Rev F

Wersja 2019.11