

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx

Code-Nr. GE006

60 Tests zur Verwendung mit Dako Omnis

Inhaltsverzeichnis

1.	Verwendungszweck	2
2.	Zusammenfassung und Erklärung	2
3.	Verfahrensprinzip	2
4.	Mitgelieferte Materialien	3
5.	Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien	3
6.	Optionale Materialien	3
7.	Vorsichtsmaßnahmen	3
8.	Lagerung	4
9.	Gewebevorbereitung	4
	9.1 Paraffineingebettetes Gewebe	4
	9.2 Gewebeschnitte	4
10.	Vorbereitung der Reagenzien	5
11.	Färbeverfahren	5
	11.1 Verfahrensanweisung	5
	11.2 Vor dem Färbeverfahren	5
	11.3 Gegenfärbung	6
	11.4 Eindeckung	6
	11.5 Lagerung von gefärbten Objektträgern	6
12.	Qualitätskontrolle	6
12.1	Kontrollen auf Systemebene	6
12.2	Testbestätigung	6
12.3	Negativkontrollreagenz (optional)	6
13.	Auswertung der Färbung und Bestimmung der Färbungsintensität für NSCLC	7
14.	Gewebeauswertung	8
15.	Einschränkungen	9
	15.1 Allgemeine Einschränkungen	9
	15.2 Produktspezifische Einschränkungen	10
16.	Leistungsbewertung	10
16.1	Bewertung der nichtklinischen Leistung: Normale und neoplastische Gewebe	10
16.2	Bewertung der nichtklinischen Leistung: NSCLC	12
	16.3 Leistungsbewertung, SK006 im Vergleich zu GE006/Autostainer Link 48 im Vergleich zu Dako Omnis: NSCLC	14
	16.4 Bewertung der klinischen Leistung	14
17.	Fehlerbehandlung	20
18.	Literaturnachweise	22



PD-L1 IHC 22C3 pharmDx

Code-Nr. GE006

60 Tests zur Verwendung mit Dako Omnis

1. Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx ist ein qualitativer immunhistochemischer Assay, der den Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3, verwendet. Dieser ist für den Nachweis von PD-L1-Protein in formalinfixiertem, paraffineingebettetem (FFPE) Gewebe aus nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) mithilfe des EnVision FLEX Detektionssystems in Dako Omnis vorgesehen.

Die Expression des Proteins PD-L1 in NSCLC wird mithilfe des Tumor Proportion Score (TPS) bestimmt, der den Prozentsatz der lebensfähigen Tumorzellen mit teilweiser oder vollständiger Membranfärbung beliebiger Intensität angibt.

Übersicht diagnostische Indikationen

Tumortyp	PD-L1-Expressionsgrad	Verwendungszweck
NSCLC	TPS $\geq$ 1%	PD-L1 IHC 22C3 pharmDx dient zur Identifizierung von NSCLC-Patienten, die für eine Behandlung mit KEYTRUDA® (Pembrolizumab) in Frage kommen.*
	TPS $\geq$ 50%	

*Für die Expressions-Cutoff-Werte von PD-L1 sowie therapiebestimmende, spezifische klinische Gegebenheiten siehe das KEYTRUDA® Produktetikett.

2. Zusammenfassung und Erklärung

Die Bindung der PD-1-Liganden (L1 und PD-L2) an den PD-1-Rezeptor (welcher sich auf T-Zellen findet), hemmt die T-Zellproliferation und Zytokinproduktion. Die Hochregulierung von PD-1-Liganden kommt in einigen Tumoren vor, und die Signalgebung über diesen Signalweg kann zur Hemmung der aktiven T-Zell-Immunüberwachung von Tumoren beitragen. KEYTRUDA ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der an den PD1-Rezeptor bindet und seine Interaktion mit PD-L1 und PD-L2 blockiert, wodurch die über den PD1-Weg vermittelte Hemmung der Immunreaktion, einschließlich der Immunreaktion gegen den Tumor, freigesetzt wird.¹ Bei syngenetischen Maus-Tumormodellen führte die Blockierung der PD-1-Aktivität zu einem verringerten Tumorwachstum.²

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. SK006, wurde für die Verwendung mit Autostainer Link 48 entwickelt und in klinischen Studien für KEYTRUDA verwendet. Weitere Informationen finden Sie in der Gebrauchsanweisung für Code-Nr. SK006.³ PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. GE006 wurde für den Einsatz auf der Dako Omnis-Färbepattform neu konfiguriert. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. SK006 und GE006, verwenden zwar plattformspezifische Behälter, jedoch dieselben Reagenzien in gleichen Konzentrationen. Reagenzien für Code-Nr. GE006 sind in modularem Format in Dako Omnis-spezifischen Behältern erhältlich, die in den Abschnitten 4 und 5 aufgeführt sind.

HINWEIS: Reagenzien für SK006 und GE006 sind aufgrund ihrer plattformspezifischen Konfiguration nicht austauschbar.

NSCLC

Die von Merck Sharp & Dohme gesponserte klinische Studie KEYNOTE-024 (KN024) untersuchte die klinische Validität von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx bei der Identifizierung von bisher unbehandelten Patienten mit metastasierendem NSCLC und PD-L1-Expression (TPS $\geq$ 50%), die auf eine KEYTRUDA-Behandlung ansprechen könnten.⁴ Mit KEYTRUDA behandelte NSCLC-Patienten mit PD-L1-Expression (TPS $\geq$ 50%) zeigten bessere Ergebnisse im Vergleich zu herkömmlicher Chemotherapie. Die von Merck Sharp & Dohme gesponserte klinische Studie KEYNOTE-042 (KN042) untersuchte die klinische Validität von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx bei der Identifizierung von bisher behandelten Patienten mit metastasierendem NSCLC und PD-L1-Expression (TPS $\geq$ 1%), die auf eine KEYTRUDA-Behandlung ansprechen könnten, wobei der in KN024 gezeigte Nutzen bestätigt wurde.⁵ Siehe den Abschnitt „Bewertung der klinischen Leistung (NSCLC)“ für Details zu den Studien KN024 und KN042.

Die von Merck Sharp & Dohme gesponserte klinische Studie KEYNOTE-010 (KN010) untersuchte die klinische Validität von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx bei der Identifizierung von bisher behandelten Patienten mit metastasierendem NSCLC und PD-L1-Expression (TPS $\geq$ 1%), die auf eine KEYTRUDA-Behandlung ansprechen könnten.⁶ Mit KEYTRUDA behandelte Patienten mit PD-L1-Expression (TPS $\geq$ 1%) zeigten bessere Ergebnisse im Vergleich zu Docetaxel. Informationen zu den Details der Studie KN010 finden Sie im Abschnitt „Bewertung der klinischen Leistung (NSCLC)“.

3. Verfahrensprinzip

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. GE006 enthält optimierte Reagenzien und ein Protokoll, das für das IHC-Färbeverfahren von FFPE-Proben mithilfe von Dako Omnis erforderlich ist. Nach der Inkubation mit dem primären monoklonalen Antikörper gegen PD-L1 oder dem Negative Control Reagent (Negativkontrollreagenz, NCR) werden die Proben zunächst mit einem Peroxidase-Block, mit einem primärantikörperwertspezifischen Linker-Antikörper und anschließend mit einem gebrauchsfertigen Detektionsreagenz aus Molekülen sekundärer Antikörper und Meerrettichperoxidase-molekülen, die an ein Dextranpolymer-Backbone gekoppelt sind, inkubiert. Die enzymatische Umwandlung des anschließend zugesetzten Chromogens führt zur Präzipitation eines sichtbaren Reaktionsprodukts an der Antigenstelle. Die

Farbe der chromogenen Reaktion wird durch ein Chromogenverstärkungsreagenz modifiziert. Danach können die Proben gegengefärbt und mit Deckglas versehen werden. Die Ergebnisse werden mithilfe eines Lichtmikroskops ausgewertet. Anweisungen zum Laden und Entladen von Objektträgern, Reagenzien, Spülmengen und Abfällen finden Sie im Dako Omnis Benutzerhandbuch Basiswissen.

4. Mitgelieferte Materialien

Die aufgeführten Materialien reichen für 60 Tests: 60 mit primärem Antikörper gegen das PD-L1-Protein inkubierte Objektträger und 60 mit dem entsprechenden Negative Control Reagent inkubierte Objektträger. GE006 enthält 12 mL PD-L1 Primary Antibody und 12 mL Negative Control Reagent (beide mit einer Proteinkonzentration von ca. 3 µg/mL). GE006 wurde speziell für die Verwendung mit dem Dako Omnis Gerät optimiert. Weitere Informationen finden Sie im Dako Omnis Basic User Guide (Benutzerhandbuch Basiswissen).

Menge	Beschreibung
1 x 12 mL	Primärantikörper: Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3

**MONOCLONAL MOUSE
ANTI-PD-L1
CLONE 22C3
(Dako Omnis)**

Monoklonaler Anti-PD-L1-Mausantikörper (IgG₁) in einer gepufferten Lösung mit Stabilisierungsprotein und 0,015 mol/L Natriumazid.

1 x 12 mL	Negativkontrollreagenz
-----------	-------------------------------

**NEGATIVE CONTROL
REAGENT
(Dako Omnis)**

Monoklonaler Maus-IgG₁-Kontrollantikörper in einer gepufferten Lösung mit Stabilisierungsprotein und 0,015 mol/L Natriumazid.

5. Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Dako Omnis (Code-Nr. GI100)

EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis) (Code-Nr. GV800) oder EnVision FLEX Mini Kit, High pH (Dako Omnis) (Code-Nr. GV823)

EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis)

EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis)

EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis)

EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)*

EnVision FLEX Visualization Reagent (Dako Omnis)

EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis) (Code-Nr. GV805)

EnVision FLEX+ Mouse Linker (Dako Omnis) (Code-Nr. GV821)

EnVision FLEX DAB Enhancer (Dako Omnis) (Code-Nr. GC806)

Hematoxylin (Dako Omnis) (Code-Nr. GC808)

Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) (Code-Nr. GC807)

Clearify™ Clearing Agent (GC810)

Dako Omnis Sulfuric Acid, 0.3 M (Code-Nr. GC203)

Destilliertes oder entionisiertes Wasser (Reagenzqualität) **

Ethanol, absolut

Xylol, Toluol oder Xylolersatz

Materialien für permanentes Eindecken

Kurzzeitmesser

Mikroskop-Objektträger: Dako FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) oder SuperFrost Plus Objektträger

Lichtmikroskop (4-fache bis 40-fache Vergrößerung)

Positive und negative Gewebe zur Verfahrenskontrolle (siehe Abschnitt 12, „Qualitätskontrolle“)

pH-Messgerät (gemäß Herstellerempfehlungen kalibriert)

***HINWEIS:** EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis), Code-Nr. GV805, bei GE006 für hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) verwenden. Nicht EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis), Code-Nr. GV804, verwenden. Die Farbe der EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis), Code-Nr. GV805, ist rot.

****HINWEIS:** Möglicherweise sind nicht alle Quellen von destilliertem oder entionisiertem Wasser von ausreichender Qualität für die Vorbereitung von IHC-Reagenzien. Agilent empfiehlt, destilliertes oder entionisiertes Wasser in Reagenzqualität [entsprechend dem von CLSI spezifizierten Standard für Wasser für klinische Laborreagenzien (CLRW)] oder Wasser in ähnlicher Qualität für die Reagenzvorbereitung zu verwenden.⁷

6. Optionale Materialien

PD-L1 Control Slides (Code-Nr. T1391)

7. Vorsichtsmaßnahmen

1) Zur In-vitro-Diagnostik.

- 2) Für Fachpersonal.
- 3) Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN_3), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann NaN_3 , obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metall-Azid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Azid-Ansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.⁸
- 4) Der PD-L1 Primary Antibody und das Negative Control Reagent enthalten Material tierischen Ursprungs.
- 5) Sowohl vor als auch nach der Fixierung ist mit biologischen Proben und allen Materialien, die damit in Berührung gekommen sind, so umzugehen, als könnten sie Krankheiten übertragen. Bei der Entsorgung sind angemessene Vorsichtsmaßnahmen zu beachten.⁹
- 6) Inkubationszeiten, Temperaturen oder Methoden, die hier nicht ausdrücklich beschrieben sind, können die Ergebnisse beeinträchtigen.
- 7) Die Reagenzien wurden zur Verwendung in diesem Test optimal verdünnt. Weitere Verdünnung kann zu einer geringeren Antigenfärbung führen.
- 8) Paraffinüberreste können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
- 9) Die Ergebnisse von kleinen Studien zeigten in primären und metastasierten NSCLC-Gewebepaaren einen ähnlichen dynamischen PD-L1-Expressionsbereich auf. Es ist möglich, dass bei primären Tumoren gegenüber metastasierten Stellen im selben Patienten Unterschiede in der PD-L1-Expression vorliegen, da die Heterogenität bei jedem Tumor anders ist.
- 10) In der Regel ist es Personen unter 18 Jahren nicht gestattet, mit diesem Produkt zu arbeiten. Anwender müssen gründlich über die richtigen Arbeitsverfahren, das Gefahrenpotenzial des Produkts und die nötigen Vorsichtsmaßnahmen unterrichtet werden. Zusätzliche Informationen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt (SDS).
- 11) Geeignete persönliche Schutzausrüstung (PSA) tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
- 12) Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Richtlinien zu entsorgen.
- 13) Sicherheitsdatenblätter sind auf www.agilent.com zu finden oder auf Anfrage erhältlich.
- 14) Für Länder außerhalb der Europäischen Union müssen die lokalen KEYTRUDA-Produktetiketts beachtet werden hinsichtlich der zugelassenen Indikationen und der Cutoff-Werte für die Expression als Anhaltspunkte für die Therapie.
- 15) Die Nichteinhaltung des Wartungsplans für das Dako Omnis Instrument kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Weitere Informationen und weitere Vorsichtsmaßnahmen für das Gerät finden Sie im Dako Omnis Benutzerhandbuch Basiswissen und im Ausführlichen Benutzerhandbuch.
- 16) PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. GE006, wurde ausschließlich für Dako Omnis entwickelt und darf nicht auf anderen Färbepattformen verwendet werden. Reagenzien für die Verwendung mit Autostainer Link 48 (PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. SK006) dürfen nicht durch in Abschnitt 5 aufgeführte Reagenzien ersetzt werden.

8. Lagerung

Alle Komponenten von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. GE006 im Originalbehälter an einem dunklen Ort bei 2-8 °C lagern, wenn sie nicht in Dako Omnis verwendet werden. Während der Lagerung ist der Deckel auf allen Behältern geschlossen zu halten.

Das Reagenz darf nach Ablauf des auf dem Reagenzbehälter angegebenen Verfallsdatum nicht mehr verwendet werden. Werden die Reagenzien nicht entsprechend den in dieser Packungsbeilage angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese vom Anwender validiert werden.

Die Stabilität des Reagenz im Gerät für Code-Nr. GE006 wurde für 375 Stunden validiert. Nach dem Abschluss der Färbung sollten die Reagenzien aus Dako Omnis entfernt und in sicher verschlossenen Behältern an einem dunklen Ort bei 2-8 °C gelagert werden. Informationen zur Stabilität im Gerät aller Hilfsstoffe, einschließlich verdünnter Arbeitslösungen von Wash Buffer und EnVision FLEX Target Retrieval Solution, finden Sie in den entsprechenden Gebrauchsanweisungen. Die Zeitdauer im Gerät von Reagenzien wird von der Dako Omnis Software erfasst; Details siehe das Benutzerhandbuch Basiswissen und das Ausführliche Benutzerhandbuch von Dako Omnis.

HINWEIS: Es gibt keine offensichtlichen visuellen Anzeichen, die auf eine falsche Lagerung oder Handhabung dieses Produkts während der Haltbarkeitsdauer des Produkts hinweisen. Positiv- und Negativkontrollen sollten zur gleichen Zeit mit der Patientenprobe durchgeführt werden, vorzugsweise auf demselben Objektträger, um die Leistung des Produkts während seiner Haltbarkeitsdauer zu überwachen. Wird während der Haltbarkeitsdauer ein Problem mit dem Antikörper vermutet, das nicht durch unsachgemäße Produktlagerung oder Handhabung bzw. andere Abweichungen in den Laborverfahren erklärt werden kann, wenden Sie sich an den Pathologie-Kundendienst von Agilent. Weitere Informationen finden Sie in den Abschnitten 17 (Fehlerbehandlung) und 12 (Qualitätskontrolle).

9. Gewebevorbereitung

Mit Proben muss so umgegangen werden, dass sich das Gewebe noch für die IHC-Färbung eignet. Bei allen Proben sollten Standardverfahren der Gewebeverarbeitung eingesetzt werden.

9.1 Paraffineingebettetes Gewebe

FFPE-Gewebeprobe sind zur Verwendung geeignet. Andere Fixiermittel wurden nicht validiert und könnten fehlerhafte Ergebnisse verursachen. Es wird eine Fixierzeit von 12 bis 72 Stunden in 10% neutralem, gepuffertem Formalin (NBF) empfohlen. Fixierzeiten von ≤ 3 Stunden können einen variablen PD-L1-Nachweis zur Folge haben. Proben sollten auf einer Dicke von 3 mm oder 4 mm geschnitten, in Formalin fixiert und in einer absteigenden Alkoholreihe und Xylol dehydriert werden, gefolgt von einer Infiltration mit geschmolzenem Paraffin. Die Temperatur des Paraffins darf 60 °C nicht überschreiten. FFPE-Gewebeblöcke, die 5 Jahre alt oder älter sind, können zu einem Verlust der PD-L1-Immunreaktivität führen.

9.2 Gewebeschnitte

Von den FFPE-Gewebeprobe werden Schnitte von ca. 4 bis 5 µm Stärke angefertigt. Nach dem Schneiden sollten die Gewebe auf Dako FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) oder auf Superfrost Plus Objektträgern eingedeckt und anschließend für 1 Stunde in einen bei 58 ± 2 °C kalibrierten Ofen gestellt werden.

Um die Antigenität aufrechtzuerhalten, sollten die Gewebeschnitte nach dem Eindecken auf den Objektträgern bei 2-8 °C (bevorzugt) an einem dunklen Ort oder bei einer Raumtemperatur von bis zu 25 °C aufbewahrt werden. Schnitte müssen bei einer Lagerung bei 2 bis 8 °C (bevorzugt) oder bei 25 °C innerhalb von fünf Monaten gefärbt werden. Die Lagerungs- und Handhabungsbedingungen der Objektträger dürfen nach dem Eindecken zu keinem Zeitpunkt 25 °C übersteigen, um die Gewebeintegrität und die Antigenität zu gewährleisten.

Die Gewebeproben müssen sich auf dem Objektträger innerhalb des definierten Färbebereichs befinden. Abmessungen des Färbebereichs des Objektträgers siehe Benutzerhandbuch Basiswissen zu Dako Omnis.

10. Vorbereitung der Reagenzien

Vor der Verwendung müssen die Benutzer die entsprechenden PSA-Anweisungen befolgen und sich mit allen Komponenten vertraut machen (siehe „Vorsichtsmaßnahmen“).

EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (GV805) und Wash Buffer (20x) (GC807) müssen entsprechend ihrer Gebrauchsanweisung auf eine Konzentration von 1x verdünnt werden. Die Farbe der FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (GV805) ist Rot.

Der pH-Wert von 1x Target Retrieval Solution muss $6,1 \pm 0,2$ betragen. 1x-konzentrierte Target Retrieval Solution mit einem pH-Wert unter 5,9 kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Nach der Vorbereitung unter keinen Umständen den pH-Wert der 1x Target Retrieval Solution verändern. Wenn ein Problem mit dem pH-Wert der Target Retrieval Solution vermutet wird, siehe den Abschnitt zur Fehlerbehandlung für weitere Informationen.

Reagenzien brauchen vor dem Laden in das Gerät nicht auf Raumtemperatur abgeglichen zu werden. Sie sollten jedoch vor dem Beginn des Färbeverfahrens in das Gerät geladen werden, dadurch ist eine ausreichende Abgleichzeit gegeben.

11. Färbeverfahren

11.1 Verfahrensanweisung

Der Benutzer sollte diese Anweisungen aufmerksam durchlesen und sich vor Gebrauch mit allen Komponenten und dem Gerät vertraut machen (siehe Abschnitt „Vorsichtsmaßnahmen“).

Das automatisierte Färbeverfahren für PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. GE006, umfasst die Entparaffinierung von Gewebeschnitten, Demaskierung und Färben. Die Objektträger werden in die nasse Entladestation entladen. Alle Protokollschritte sind in der Dako Omnis Software vorprogrammiert. Das Protokoll „PD-L1 IHC 22C3 pharmDx“ wird mit PD-L1 Primary Antibody Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3, und das Protokoll „PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Negative Control Reagent“ mit dem Isotyp-abgestimmten Negative Control Reagent verwendet. Detaillierte Anweisungen zum Laden der Objektträger und Reagenzien sind dem Dako Omnis Benutzerhandbuch Basiswissen zu entnehmen.

Die Reagenzien und die Anweisungen wurden für eine optimale Leistung konzipiert. Weitere Verdünnungen der Kit-Reagenzien oder Abänderungen der Inkubationstemperaturen können zu fehlerhaften oder unstimulierten Ergebnissen führen. Unterschiede bei der Gewebeverarbeitung und bei den technischen Verfahren im Labor des Benutzers können die Ergebnisse des Assays hinfällig machen.

HINWEIS: Labors in bestimmten Höhenlagen sollten während der wärmeinduzierten Epitopdemaskierung die beste Methode für die Erhaltung der benötigten Temperatur (95 bis 99 °C) selbst ermitteln. Jegliche Anpassungen, die erforderlich sind, um höhen spezifische Bedenken zu beseitigen, müssen vom Benutzer validiert werden. Weitere Informationen zur Erstellung neuer Protokolle finden Sie im Ausführlichen Dako Omnis Benutzerhandbuch.

11.2 Vor dem Färbeverfahren

1. In der Software der Dako Link Omnis Arbeitsstation das für jeden Objektträger anzuwendende „PD-L1 IHC 22C3 pharmDx“- oder „PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Negative Control Reagent“-Protokoll auswählen.
2. Darauf achten, dass die Software der Dako Link Omnis Workstation so konfiguriert ist, dass die Objektträgeretiketten mit angezeigtem Protokollnamen gedruckt werden.
3. Etiketten für jeden Träger ausdrucken und auf den Glasobjektträgern befestigen.
4. Die Objektträger dann in den Objektträgerhalter setzen. Der Objektträgerhalter ist groß genug für einen bis fünf Objektträger.
5. Es müssen sich Spülflaschen mit Flüssigkeit im Gerät befinden, die durch das Dako Omnis Gerät registriert wurden. Flüssigkeiten für Spülflaschen:
 - a. Clearify Clearing Agent (Code-Nr. GC810)
 - b. EnVision FLEX Target Retrieval Solution Low pH (Code-Nr. GV805), **verdünnt auf 1-fache Arbeitskonzentration mit destilliertem oder entionisiertem Wasser**
 - c. Wash Buffer (Code-Nr. GC807), **verdünnt auf 1-fache Arbeitskonzentration mit destilliertem oder entionisiertem Wasser**
6. Sicherstellen, dass alle Klappdeckel der Behälter offen und in dieser Position verriegelt sind, bevor alle benötigten Reagenzien in das Reagenzienvorratsmodul geladen werden:
 - a. Monoclonal Mouse Anti-Human PD-L1, Clone 22C3, Code-Nr. GE006
 - b. Negative Control Reagent, Code-Nr. GE006

- c. EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis), Code-Nr. GV800 oder GV823
 - d. EnVision FLEX Visualization Reagent (Dako Omnis), Code-Nr. GV800 oder GV823
 - e. EnVision FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis), Code-Nr. GV800 oder GV823
 - f. EnVision FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis), Code-Nr. GV800 oder GV823
 - g. EnVision FLEX+ Mouse LINKER (Dako Omnis), Code-Nr. GV821
 - h. EnVision FLEX DAB Enhancer (Dako Omnis), Code-Nr. GC806
 - i. Optional: Hematoxylin (Dako Omnis), Code-Nr. GC808 oder entsprechend
 - j. Schwefelsäure, 0.3 M, Code-Nr. GC203
7. Den Objektträgerhalter in das Dako Omnis laden.
 8. Die Anweisungen auf dem Touchscreen befolgen und auf „Done“ (Fertig) tippen, damit das Färbeverfahren gestartet wird.
 9. Sicherstellen, dass die Entladestation für Objektträger mit destilliertem oder entionisiertem Wasser gefüllt ist, um ein Austrocknen der Objektträger zu vermeiden.

HINWEIS: Die Protokolle „PD-L1 IHC 22C3 pharmDx“ oder „PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Negative Control Reagent“ auf dem Dako Omnis Gerät können auf der Dako Link Omnis Arbeitsstation überwacht werden.

11.3 Gegenfärbung

Objektträger sollten mit Dako Hematoxylin (Code-Nr. GC808) gegengefärbt werden. Die Protokolle „PD-L1 IHC 22C3 pharmDx“ und „PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Negative Control Reagent“ auf Dako Omnis beinhalten einen Gegenfärbungsschritt, der für 3 Minuten mit Hematoxylin (Dako Omnis) (Code-Nr. GC808) vorprogrammiert ist. Die Objektträger sind zur Eindeckung bereit, wenn sie aus der Entladestation des Dako Omnis Geräts geholt werden. Der Gegenfärbungsschritt kann bearbeitet werden, wenn eine Kopie des Protokolls erstellt wird. Wenn andere Gegenfärbungen als das empfohlene Dako Hematoxylin (Code-Nr. GC808) bevorzugt und Anpassungen im Protokoll vorgenommen werden, müssen diese vom Anwender validiert werden. Weitere Informationen zur Erstellung neuer Protokolle finden Sie im Ausführlichen Dako Omnis Benutzerhandbuch.

11.4 Eindeckung

Nach dem Färben im Dako Omnis Gerät müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und mit nichtwässrigen, permanenten Eindeckmethoden auf den Objektträger aufgebracht werden.

11.5 Lagerung von gefärbten Objektträgern

Es kann zu einer gewissen Abschwächung der Färbung kommen, wobei verschiedene Faktoren, darunter die Gegenfärbung, die Eindeckmittel und -methoden und die Lagerungsbedingungen der Objektträger, eine Rolle spielen. Gefärbte Objektträger im Dunkeln bei Raumtemperatur (20-25 °C) aufbewahren, um ein Verblässen zu vermeiden.

12. Qualitätskontrolle

PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. GE006, wurde durch Immunhistochemie unter Verwendung der oben beschriebenen erforderlichen Reagenzien und Färbeverfahren einer Qualitätskontrolle unterzogen. Unterschiede bei Gewebefixierung, -verarbeitung und -einbettung im Labor des Anwenders können zu deutlich unterschiedlichen Ergebnissen führen. Weitere Informationen finden Sie in den Leitlinien des College of American Pathologists (CAP) Accreditation Program for Immunohistochemistry.¹⁰ Weitere Informationen finden Sie auch im „Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods“ und im CLSI „Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline“.^{11,12}

12.1 Kontrollen auf Systemebene

Für jedes Färbeverfahren sollten Vergleiche mit Positiv- und Negativkontrollgewebe (wird vom Labor bereitgestellt) durchgeführt werden. Mit diesen Qualitätskontrollen lässt sich die Validität des Färbeverfahrens sicherstellen, einschließlich Reagenzien, Gewebeverarbeitung und Geräteleistung. Es wird empfohlen, das Kontrollgewebe auf demselben Objektträger wie das Patientengewebe zu färben. Bei der Positivkontrolle sollte es sich um Gewebe mit positiver Biomarker-Expression handeln, das auf die gleiche Weise wie das Patientengewebe fixiert ist. Interne positive Elemente des Patientengewebes können als Positivkontrollen verwendet werden. Bei den Negativkontrollen sollte es sich um Gewebe ohne Biomarker-Expression handeln. Interne negative Elemente des Patientengewebes können als Negativkontrollen verwendet werden. Wenn Kontrollen nicht auf dieselbe Weise fixiert werden wie das Patientengewebe, kann die Kontrolle nur als Färbekontrolle für die Reagenzien- und Geräteleistung verwendet werden. Siehe Tabelle 3 für weitere Informationen zur Qualitätskontrolle, einschließlich HE-gefärbter Patientengewebeproben und zu vom Labor bereitgestellten positiven und negativen Kontrollgeweben.

12.2 Testbestätigung

Vor dem erstmaligen Gebrauch eines Färbesystems in einem diagnostischen Verfahren sollte der Benutzer die Leistung des Assays durch Testen an einer Reihe von Geweben aus dem Labor mit bekannten IHC-Leistungseigenschaften verifizieren, unter denen sich bekannt positive und negative Gewebe befinden. Zusätzliche Informationen sind in den beschriebenen Verfahren und Richtlinien zur Qualitätskontrolle enthalten. Diese Maßnahmen sind für jede neue Antikörpercharge bzw. bei jeder Veränderung der Assayparameter zu wiederholen. Optionen zur Fehlerbehandlung für potentielle Probleme, deren Ursachen und empfohlene Korrekturmaßnahmen sind in Tabelle 17 dargestellt.

12.3 Negativkontrollreagenz (optional)

Zur Beurteilung unspezifischer Färbung und zur besseren Interpretation der spezifischen Färbung an der Antigenstelle wird bei einem Teil jedes Patientengewebes das Negative Control Reagent anstelle des primären Antikörpers benutzt. Das Dako Omnis-Protokoll „PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Negative Control Reagent“ für Objektträger verwenden, die mit dem Negative Control Reagent gefärbt wurden.

13. Auswertung der Färbung und Bestimmung der Färbungsintensität für NSCLC

Alle lebensfähigen Tumorzellen auf dem gesamten Gewebeschnitt müssen ausgewertet und in die Beurteilung der PD-L1-Intensität aufgenommen werden. Auf dem PD-L1-gefärbten Objektträger müssen mindestens 100 lebensfähige Tumorzellen vorhanden sein, damit die Gewebeprobe als zur PD-L1-Auswertung geeignet betrachtet werden kann.

Die Auswertung von Objektträgern muss von einem Pathologen mithilfe eines Lichtmikroskops vorgenommen werden. Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbung und zur Bestimmung der Färbungsintensität ist ein Objektiv mit 10- bis 40-facher Vergrößerung ausreichend. Jede wahrnehmbare Membranfärbung von Tumorzellen sollte in die Bewertung aufgenommen werden.

Die PD-L1-Proteinexpression wird mithilfe des Tumor Proportion Score (TPS) bestimmt, der den Prozentsatz der lebensfähigen Tumorzellen mit teilweiser oder vollständiger Membranfärbung beliebiger Intensität angibt.

$$\text{TPS (\%)} = \frac{\text{Anzahl der PD-L1-Zellen mit Färbung (Tumorzellen)}}{\text{Gesamtanzahl lebensfähiger Tumorzellen}} \times 100$$

Bewerten Sie partielle oder vollständige Zellmembranfärbungen ($\geq 1+$), die sich von zytoplasmatischer Färbung unterscheiden. Eine zytoplasmatische Färbung ist als unspezifisch zu betrachten und wird bei der Bewertung der Färbungsintensität nicht berücksichtigt. Normale Zellen und tumorassoziierte Immunzellen wie zum Beispiel infiltrierende Lymphozyten oder Makrophagen **dürfen nicht** in die Bewertung zur Bestimmung des PDL1-Expressionsgrads aufgenommen werden.

Tabelle 1 enthält Details dazu, welche Gewebeelemente für die Bestimmung des Tumor Proportion Score aufgenommen oder ausgeschlossen werden.

Tabelle 1. TPS – Ein-/Ausschlusskriterien für NSCLC

Gewebeteile	In die TPS-Bewertung für NSCLC aufgenommen	Von der TPS-Bewertung für NSCLC ausgeschlossen
Tumorzellen	Lebensfähige Tumorzellen mit überzeugender teilweiser oder vollständiger Membranfärbung beliebiger Intensität	Alle zytoplasmatischen Färbungen ausschließen
Immunzellen	Nicht aufgenommen	Alle Färbungen von Immunzellen ausschließen, wie: • Mononukleare Entzündungszellen (große Lymphozyten, Monozyten, Lungenmakrophagen) • Plasmazellen • Neutrophile
Andere	Nicht aufgenommen	Folgende Färbungen ausschließen: • Normale Zellen in der Nähe von Tumorzellen • Stromazellen (Fibroblasten) • Nekrotische Zellen und/oder Zellrückstände • Anthrakotisches Pigment

Für jedes Färbeverfahren sollten die Gewebe zur Bestimmung der Validität des Färbedurchlaufs und zur Bewertung der Färbung des Patientengewebes in der in Tabelle 3 angegebenen Reihenfolge untersucht werden. Untersuchen Sie die mit PD-L1 und dem Negative Control Reagent (falls verwendet) aus PD-L1 IHC 22C3 pharmDx gefärbten Patientenproben bei der Bewertung der PD-L1-Expression. Mit dem NCR gefärbte Gewebe müssen eine spezifische Färbung von 0 und eine nichtspezifische Färbung von $\leq 1+$ aufweisen.

Für das Gewebe gilt eine PD-L1-Expression als vorhanden, wenn der TPS bei mindestens 1% der lebensfähigen Tumorzellen eine Membranfärbung in beliebiger Intensität aufweist. Für das Gewebe gilt eine hohe PD-L1-Expression als vorhanden, wenn der TPS bei $\geq 50\%$ der lebensfähigen Tumorzellen eine Membranfärbung in beliebiger Intensität aufweist (Tabelle 2).

Tabelle 2. PD-L1-Expressionsstatus auf der Grundlage des Tumor Proportion Score

Tumor Proportion Score			
PD-L1-Expressionsgrade	TPS < 1%	TPS $\geq$ 1%	TPS $\geq$ 50%
PD-L1-Expressionsstatus	Keine PD-L1-Expression	PD-L1-Expression	Hohe PD-L1-Expression

Weitere Erläuterungen sind dem PD-L1 IHC 22C3 pharmDx NSCLC Interpretation Manual (Auswertungshandbuch) zu entnehmen.

14. Gewebeauswertung

Tabelle 3. Empfohlene Reihenfolge der Gewebeauswertung

Proben	Grundprinzip	Anforderungen
1. Mit HE gefärbtes Patientengewebe	Zuerst wird eine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung der Patientengewebe ausgewertet, um Histologie und Erhaltungszustand des Gewebes zu beurteilen.	Die PD-L1 IHC 22C3 pharmDx und HE-Färbung sollten auf Serienschnitten desselben Paraffinblocks der Gewebeprobe durchgeführt werden. Die Gewebeproben sollten intakt und gut erhalten sein und das Vorhandensein eines Tumors bestätigen.
2. Positivkontrollgewebe, gefärbt mit PD-L1 Primary Antibody (aus dem Labor)	Als Nächstes sollte das mit PD-L1-Primärantikörpern gefärbte Positivkontrollgewebe untersucht werden. Bekanntermaßen Positivkontrollgewebe sollte nur zur Überprüfung der korrekten Funktionsweise der verarbeiteten Gewebe und Testreagenzien verwendet werden, NICHT aber zur Unterstützung der spezifischen Diagnose anhand von Patientenproben.	Die Kontrollen sollten Biopsate oder Gewebeproben aus einem operativen Eingriff desselben Tumortyps wie bei der Patientenprobe sein. Sie sollten alsbald auf dieselbe Weise wie die Patientengewebe fixiert, verarbeitet und eingebettet werden. Zur Auswertung der Ergebnisse müssen gut erhaltene Gewebeproben verwendet werden, da nekrotische oder degenerierte Zellen oft eine unspezifische Färbung aufweisen. Die für die Positivkontrollen gewählten Gewebe sollten bei Färbung mit PD-L1 eine schwache bis mäßige positive Färbung aufweisen, um den Nachweis geringer Veränderungen der Assay-Sensitivität zu unterstützen. In jedem Färbeverfahren sollte Positivkontrollgewebe enthalten sein. Es werden Kontrollen des Gewebes auf dem Objektträger empfohlen. Mit PD-L1 Primary Antibody gefärbte Gewebeschnitte: Es sollte eine Braunfärbung der Plasmamembran zu beobachten sein. Unspezifische Färbung sollte eine Intensität von $\leq 1+$ haben. Wenn die Positivkontrollgewebe keine Färbung aufweisen, müssen die Ergebnisse der Patientengewebe für ungültig erklärt werden.
3. Optional: Positivkontrollgewebe, gefärbt mit Negative Control Reagent (aus dem Labor)	Das Negative Control Reagent kann verwendet werden, um die Probe des Positivkontrollgewebes zu färben, falls dies für die Fehlerbehebung erforderlich ist.	Mit Negative Control Reagent gefärbte Gewebeschnitte: Keine Membranfärbung. Unspezifische Färbung sollte eine Intensität von $\leq 1+$ haben.
4. Negativkontrollgewebe, gefärbt mit PD-L1 Primary Antibody (aus dem Labor)	Als Nächstes sollte das mit dem PD-L1-Primärantikörper gefärbte Negativkontrollgewebe (bekanntermaßen PDL1-negativ) untersucht werden, um die Spezifität der Markierung des Target-Antigens durch den primären Antikörper zu verifizieren. Alternativ können auch negative Bereiche des Positivkontrollgewebes als Negativkontrollgewebe dienen, dieses ist jedoch vom Anwender zu verifizieren.	Die Kontrollen sollten Biopsate oder Gewebeproben aus einem operativen Eingriff desselben Tumortyps wie bei der Patientenprobe sein. Sie sollten alsbald auf dieselbe Weise wie die Patientengewebe fixiert, verarbeitet und eingebettet werden. Zur Auswertung der Ergebnisse müssen gut erhaltene Gewebeproben verwendet werden, da nekrotische oder degenerierte Zellen oft eine unspezifische Färbung aufweisen. In jedem Färbeverfahren sollte Negativkontrollgewebe enthalten sein. Es werden Kontrollen des Gewebes auf dem Objektträger empfohlen. Mit PD-L1 Primary Antibody gefärbte Gewebeschnitte: keine Membranfärbung in Tumorzellen. Unspezifische Färbung sollte eine Intensität von $\leq 1+$ haben. Falls das Negativkontrollgewebe eine spezifische Zellmembranfärbung aufweist, sollten die Ergebnisse der Patientenproben als ungültig betrachtet werden.
5. Optional: Negativkontrollgewebe, gefärbt mit dem Negative Control Reagent (aus dem Labor)	Das Negative Control Reagent kann verwendet werden, um die Probe des Negativkontrollgewebes zu färben, falls dies für die Fehlerbehebung erforderlich ist.	Mit Negative Control Reagent gefärbte Gewebeschnitte: Keine Membranfärbung. Unspezifische Färbung sollte eine Intensität von $\leq 1+$ haben.

Proben	Grundprinzip	Anforderungen
6. Optional: Färbung des Patientengewebes mit Negative Control Reagent	Mit dem Negative Control Reagent aus PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. GE006 gefärbtes Patientengewebe untersuchen. Das Negative Control Reagent wird anstelle des primären Antikörpers verwendet und hilft bei der Interpretation der spezifischen Färbung an der Antigenstelle.	Das Fehlen einer Zellmembranfärbung verifiziert die spezifische Markierung des Zielantigens durch den primären Antikörper. Unspezifische Färbung sollte eine Intensität von $\leq 1+$ haben. Wenn mit Negative Control Reagent gefärbtes Patientengewebe keine entsprechende Färbung aufweist, gilt das mit dem Primärantikörper gefärbte entsprechende Patientengewebe als nicht auswertbar und das Patientengewebe muss erneut getestet werden.
7. Färbung des Patientengewebes mit PD-L1 Primary Antibody	Mit dem PD-L1 Primary Antibody aus PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. GE006, gefärbte Patientenprobe(n) zuletzt untersuchen, um den PD-L1-Proteinstatus zu beurteilen. Spezielle Angaben zur Immunreaktivität von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx dem Abschnitt „Zusammenfassung und Erklärung“ sowie den Abschnitten zu den „Beschränkungen“ und den „Leistungseigenschaften“ entnehmen.	Die Intensität der positiven Färbung ist im Kontext einer während des Färbeverfahrens eventuell beobachteten unspezifischen Färbung zu bewerten. Wenn eine unspezifische Färbung beobachtet wird, wird Negative Control Reagent empfohlen. Wie bei allen immunhistochemischen Tests bedeutet ein Ergebnis mit fehlender Färbung, dass das Antigen nicht nachgewiesen wurde, aber nicht unbedingt, dass das Antigen in den getesteten Zellen/Geweben nicht vorhanden war. Alle lebensfähigen Tumorzellen der gesamten PD-L1-gefärbten Patientenprobe auf dem Objektträger müssen ausgewertet und in die Bewertung der PD-L1-Intensität aufgenommen werden. Es müssen mindestens 100 lebensfähige Tumorzellen vorhanden sein, damit die Gewebeprobe als zur PD-L1-Auswertung geeignet betrachtet werden kann. Siehe Abschnitt 13, Auswertung der Färbung und Bestimmung der Färbungsintensität, zur Beurteilung des Patientengewebes.

15. Einschränkungen

15.1 Allgemeine Einschränkungen

- Immunhistochemie ist ein diagnostisches Mehrschritts-Verfahren, das hinsichtlich der Auswahl der geeigneten Reagenzien, der Auswahl, Fixierung und Verarbeitung von Geweben sowie der Vorbereitung des Objektträgers für die Immunhistochemie und der Auswertung der Färbungsergebnisse ein Spezialtraining erfordert.
- Gewebefärbungen hängen von der sachgemäßen Handhabung und Verarbeitung des Gewebes vor der Färbung ab. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schneiden oder Verunreinigung durch andere Gewebe oder Flüssigkeiten kann zu Artefakten, Antikörper-Trapping oder falsch-negativen Ergebnissen führen. Widersprüchliche Ergebnisse können auf Unterschiede bei den Fixierungs- und Einbettungsmethoden oder auf Unregelmäßigkeiten innerhalb des Gewebes zurückzuführen sein.
- Übermäßige oder unvollständige Gegenfärbung kann die sachgemäße Auswertung der Ergebnisse beeinträchtigen.
- Färbeartefakte, die durch unspezifische DAB-Chromogenpartikel verursacht werden, erfordern einen erneuten Test der gefärbten Objektträger, wenn die Artefakte die Auswertung der PD-L1-Färbung beeinträchtigen. Die Hintergrundfärbung sollte durch den Vergleich von Gewebe, das mit dem Primärantikörper gefärbt ist, und dem mit Negative Control Reagent gefärbten Gewebe bewertet werden.
- Die klinische Auswertung jeder PD-L1-Färbung muss im Rahmen des klinischen Bildes, der Morphologie und anderer histopathologischer Kriterien erfolgen. Die klinische Auswertung einer Färbung oder deren Ausbleiben muss durch morphologische Studien und geeignete Kontrollen sowie durch andere diagnostische Tests ergänzt werden. Für die Auswertung der gefärbten Präparate ist ein qualifizierter Pathologe zuständig, der mit Antikörpern, Reagenzien und den zur Auswertung der gefärbten Präparate angewandten Methoden vertraut ist. Die Färbung muss in einem offiziell zugelassenen, lizenzierten Labor unter Aufsicht eines Pathologen erfolgen, dessen Aufgabe es ist, die gefärbten Objektträger zu überprüfen und die Eignung der Positiv- und Negativkontrollen zu gewährleisten.
- Gewebe von mit dem Hepatitis-B-Virus infizierten Personen und Gewebe mit Hepatitis-B-Virus-Oberflächenantigen (HBsAg) können mit Meerrettichperoxidase eine unspezifische Färbung aufweisen.¹³
- Reagenzien können in zuvor nicht getesteten Gewebetypen unerwartete Reaktionen zeigen. Selbst in getesteten Gewebetypen kann aufgrund von biologischen Unterschieden bei der Antigen-Expression in Neoplasmen oder anderen pathologischen Geweben die Möglichkeit unerwarteter Reaktionen nicht völlig ausgeschlossen werden.¹⁴ Kontaktieren Sie den Pathologie-Kundendienst von Agilent bei dokumentierten, unerwarteten Reaktionen.
- Aufgrund der nicht-immunologischen Bindung von Proteinen oder Substrat-Reaktionsprodukten können falsch-positive Ergebnisse auftreten. Sie können ebenfalls durch Pseudoperoxidaseaktivität (Erythrozyten) und endogene Peroxidaseaktivität (Cytochrom C) hervorgerufen werden.¹¹
- Die in diesem System enthaltenen Anweisungen und Reagenzien wurden für eine optimale Leistung konzipiert. Weitere Verdünnung der Reagenzien oder Abänderungen der Inkubationszeiten oder -temperaturen können zu fehlerhaften oder unstimulierten Ergebnissen führen. Jegliche Veränderungen des Protokolls müssen vom Anwender validiert werden.
- Objektträger, die im Objektträger-Protokoll auf der Dako Omnis Arbeitsstation gekennzeichnet sind, müssen von qualifizierten Mitarbeitern untersucht werden. Siehe Dako Omnis Benutzerhandbuch Basiswissen
- Abgebrochene Objektträger weisen darauf hin, dass während des Färbens erhebliche Probleme aufgetreten sind. Diese sollten nicht verwendet werden. Das Gewebe muss erneut gefärbt werden. Weitere Informationen finden Sie im Dako Omnis Benutzerhandbuch.

15.2 Produktspezifische Einschränkungen

- 1) Falsch-negative Ergebnisse können die Folge eines mit der Zeit stattfindenden Antigenabbaus in den Geweben sein. Gewebe sollte im Rahmen der Lagerungsempfehlungen für Schnitte gefärbt werden (siehe Abschnitt 8).
- 2) Zum Erzielen optimaler und reproduzierbarer Ergebnisse für das PD-L1-Protein ist dieses mit einer Demaskierung auf dem Dako Omnis Gerät vorzubehandeln, wenn die Gewebe routinemäßig (in neutralem, gepuffertem Formalin) fixiert und paraffineingebettet werden.
- 3) Die Verwendung von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx bei Geweben mit anderen Fixiermitteln als Formalin wurde nicht validiert.
- 4) Die Verwendung von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx für Feinnadelaspirate wurde nicht validiert.
- 5) Die Verwendung von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx auf entkalkten Geweben wurde nicht validiert.

16. Leistungsbewertung

Die Daten zur Reaktivität (Spezifität) von normalem und neoplastischem Gewebe in Abschnitt 16.1 werden PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. SK006 entnommen. In beiden Produkten (GE006 und SK006) wird Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3, verwendet. Die Gewebereaktivität von Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3, ist nicht von dem für das Färbeverfahren verwendeten Gerät abhängig. Informationen zur Bewertung der Leistung von Empfindlichkeit und Präzision bei NSCLC-Geweben finden Sie in Abschnitt 16.2.

Agilent hat eine Vergleichsstudie zur Bewertung der Leistung von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. GE006, mit FFPE NSCLC-Geweben unter Verwendung von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. SK006, als Referenz durchgeführt. Diese Studie hat eine Leistungsäquivalenz ergeben. Die Ergebnisse dieser Studie finden Sie in Abschnitt 16.3.

16.1 Bewertung der nichtklinischen Leistung: Normale und neoplastische Gewebe

Normalgewebe: Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Immunreaktivität von Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3, anhand der empfohlenen Auswahl von Normalgeweben. Eine Plasmamembranfärbung wurde bei Immunzellen und Zellen epithelialen Ursprungs beobachtet. Bei einigen Zelltypen trat eine zytoplasmatische Färbung auf, wurde aber nicht als positive Färbung verzeichnet. Alle Gewebe waren FFPE und wurden mit PD-L1 IHC 22C3 pharmDx gemäß den Anweisungen dieser Packungsbeilage eingefärbt. Bei den getesteten Zell- oder Gewebetypen wurden keine unerwarteten Ergebnisse beobachtet. Die auftretende Färbung stimmte mit der angegebenen Fachliteratur zur PD-L1-IHC-Expression in normalem Gewebe überein.^{15, 16}

Tabelle 4: Zusammenfassung der Reaktivität von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx in normalem Gewebe

Tissue Type (Gewebetyp) (Anz. getestet)	Positive Färbung der Plasmamembran: Gewebe- Elemente	Positive zytoplasmatische Färbung: Gewebe-Elemente	Unspezifische Färbung
Brust (3)	0/3	0/3	0/3
Dickdarm (3)	2/3 Makrophagen	0/3	0/3
Dünndarm (3)	0/3	0/3	0/3
Eierstock (3)	0/3	0/3	0/3
Gehirn (3)	0/3	0/3	0/3
Harnblase (3)	0/3	0/3	0/3
Haut (3)	0/3	0/3	0/3
Herzmuskel (3)	0/3	0/3	0/3
Hypophyse (3)	1/3 anterioren Hypophysen 1/3 posterioren Hypophysen	1/3 anterioren Hypophysen 1/3 posterioren Hypophysen	0/3
Kleinhirn (3)	0/3	0/3	0/3
Knochenmark (3)	3/3 Megakaryozyten	3/3 Megakaryozyten	0/3
Leber (3)	1/3 Makrophagen 1/3 Hepatozyten	0/3	0/3
Lunge (3)	3/3 Alveolarmakrophagen	0/3	0/3
Magen (3)	2/3 Lymphozyten 1/3 Magendrüsen	1/3 Magendrüsen	0/3
Mandeln (3)	3/3 Kryptenepithelien 2/3 Keimzentren (Makrophagen)	0/3	0/3
Mesothelzellen (3)	0/3	0/3	0/3
Milz (3)	2/3 Makrophagen	0/3	0/3
Nebenniere (3)	0/3	1/3 Markzellen	0/3
Nebenschilddrüse (3)	1/3 Drüsenepithelien	0/3	0/3
Nerv, peripher (3)	0/3	1/3 Bindegewebe/Gefäßen	0/3
Niere (3)	1/3 Tubulusepithelien	0/3	0/3
Pankreas (3)	0/3	0/3	0/3
Prostata (3)	3/3 Epithelien	0/3	0/3
Schilddrüse (3)	0/3	0/3	0/3
Skelettmuskulatur (3)	0/3	0/3	0/3
Speicheldrüse (3)	0/3	0/3	0/3
Speiseröhre (3)	0/3	0/3	0/3
Testis (3)	0/3	0/3	0/3
Thymus (3)	3/3 Markepithelien	0/3	0/3
Uterus (3)	0/3	0/3	0/3
Zervix (3)	1/3 Epithelien	0/3	0/3

Neoplastische Gewebe: Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Immunreaktivität von Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3, anhand der empfohlenen Auswahl von neoplastischen Geweben. Eine Plasmamembranfärbung wurde bei Immunzellen und Zellen epithelialen Ursprungs beobachtet. Bei einigen Zelltypen trat eine zytoplasmatische Färbung auf, wurde aber nicht als positive Färbung verzeichnet. Alle Gewebe waren FFPE und wurden mit PD-L1 IHC 22C3 pharmDx gemäß den Anweisungen dieser Packungsbeilage eingefärbt. Bei den getesteten Tumorproben wurden keine unerwarteten Ergebnisse beobachtet. Die auftretende Färbung stimmte mit der angegebenen Fachliteratur zur PD-L1-IHC-Expression in neoplastischem Gewebe überein.¹⁵⁻¹⁸

Tabelle 5: Zusammenfassung der Reaktivität von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx in neoplastischem Gewebe

Tumortyp	Location (Standort)	PD-L1- positiv/insgesamt (N = 159)
Adenokarzinome	Blinddarm	0/1
	Brust, DCIS	0/2
	Brust, invasiv-dukta	0/7
	Brust, invasiv-dukta mit Lymphknotenmetastasen	0/1
	Dickdarm	0/5
	Dickdarm, mit Lebermetastasen	0/1
	Dickdarm, muzinös	0/1
	Dünndarm	0/2
	Eierstock, endometrioid	0/1
	Eierstock, muzinös	0/1
	Eierstock, serös	0/1
	Eierstöcke	0/1
	Gallenblase	1/5
	GI, mit Lungenmetastasen	0/1
	Kopf und Hals, harter Gaumen	0/1
	Lunge	1/4
	Magen	0/6
	Magen, muzinös	0/1
	Pankreas	0/2
	Pankreas, dukta	0/3
	Prostata	0/5
	Rektum	0/4
	Schilddrüse, follikulär	0/1
	Schilddrüse, follikulär-papillär	0/1
	Schilddrüse, papillär	0/3
	Speichel-/Parotisdrüse	0/2
	Speiseröhre	0/1
	Uterus, Endometrium	0/3
	Uterus, klarzellig	0/1
	Zervix, endozervikaler Typ	0/1
Astrozytom	Großhirn	0/3
Basaliom	Haut	0/1
Chondrosarkom	Knochen	0/1
Chordom	Beckenhöhle	0/1
Embryonales Karzinom	Hoden	0/1
Ependymom	Gehirn	0/1
Glioblastom	Gehirn	0/1
Hepatoblastom	Leber	0/1
Inselzelltumor	Pankreas	0/1
Interstitialom	Dickdarm	0/1
	Dünndarm	0/1
	Rektum	0/1
Karzinom	Nasopharyngeal, NPC	0/1
Klarzellig	Niere	0/6
Kleinzelliges Karzinom	Lunge	0/1
Leberzellkarzinom	Leber	0/5
Leiomyosarkom	Blase	0/1
	Weichteilgewebe, Brustwand	0/1
Lymphom		
Anaplastisch großzellig	Lymphknoten	0/1
Diffus, B-Zell-	Lymphknoten	0/4
Hodgkin	Lymphknoten	2/2
Non-Hodgkin	Lymphknoten	1/1
Medulläres Karzinom	Schilddrüse	0/1
Medulloblastom	Gehirn	0/1
Melanom	Nasenhöhle	0/1
	Rektum	0/1
Meningiom	Gehirn	0/2

Tumortyp	Location (Standort)	PD-L1-positiv/insgesamt (N = 159)
Mesotheliom	Peritoneum	0/1
Nebennierenkarzinom	Nebenniere	0/1
Neuroblastom	Retroperitoneum	0/1
Neurofibrom	Weichteilgewebe, unterer Rücken	0/1
Nierenzellkarzinom		
Osteosarkom	Knochen	0/2
Papillär	Niere	0/1
Phäochromozytom	Nebenniere	0/1
Plattenepithelkarzinom	Haut	0/2
	Kopf und Hals	0/2
	Lunge	1/2
	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus mit Lymphknotenmetastasen	0/1
	Speiseröhre	0/7
	Uterus	0/1
	Zervix	2/5
Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)	Retroperitoneum	0/1
Rhabdomyosarkom	Prostata	0/1
	Retroperitoneum	0/1
	Weichteilgewebe, embryonal	0/1
Seminom	Hoden	0/2
Siegelringzellkarzinom	Dickdarm	0/1
	Siegelringzellkarzinom des Colon mit ovariellen Metastasen	0/1
Spermatozytom	Hoden	0/2
Synovialsarkom	Beckenhöhle	0/1
Thymom	Mediastinum	1/1
Übergangszellkarzinom	Blase	0/6
	Niere	0/1

16.2 Bewertung der nichtklinischen Leistung: NSCLC

Analytische Empfindlichkeit: NSCLC

Die analytische Empfindlichkeit von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. GE006, wurde an 105 FFPE-Gewebeproben eindeutiger Fälle von nichtkleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) im Stadium I bis IV mit einer gewerblichen Produktionscharge getestet. Die Bewertung der PD-L1-Expression zeigte Färbung bei positiven Tumorzellen in einem Bereich von 0-100% und eine Färbeintensität von 0-3.

Präzision: NSCLC

Die Präzision von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. GE006, wurde bei Agilent Technologies bewertet. Die prozentuale Negativübereinstimmung (Average Negative percent Agreement, NPA), die prozentuale Positivübereinstimmung (Average Positive percent Agreement, PPA) und die Gesamtübereinstimmung (Overall percent Agreement, OA) wurden mit einem zweiseitigen 95%-Konfidenzintervall nach der Bootstrapping-Methode für die Cutoffs von TPS $\geq 1\%$ und TPS $\geq 50\%$ berechnet. Bei Studien, die zu einer Übereinstimmung von 100,0% geführt haben, wurden zweiseitige 95%-Konfidenzintervalle für NPA, PPA und OA mithilfe der Wilson-Bewertungsmethode berechnet.

Tabelle 6: Präzision von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, an nur einem Zentrum getestet (TPS $\geq 1\%$)

Präzisionsstudie	Diagnostischer Cutoff	Studiendesign	% Übereinstimmung (95%-KI)
Zwischen den Geräten, zwischen den Tagen und zwischen den Chargen	TPS $\geq 1\%$	Alle 32 NSCLC-Gewebeproben (15 PD-L1-negative und 17 PD-L1-positive) mit unterschiedlichen PD-L1-IHC-Expressionsgraden wurden mit 3 Reagenzienchargen an 3 nicht aufeinanderfolgenden Tagen auf jedem der 3 Dako Omnis Geräte getestet.	NPA 100,0% (92,1-100,0%) PPA 100,0% (93,0-100,0%) OA 100,0% (96,2-100,0%)
Innerhalb des Halters (Wiederholbarkeit)	TPS $\geq 1\%$	Alle 31 NSCLC-Gewebeproben (19 PD-L1-negative und 12 PD-L1-positive) mit unterschiedlichen PD-L1-IHC-Expressionsgraden wurden mit 5 Replikaten in einem Halter auf dem Dako Omnis Gerät getestet.	NPA 100,0% (96,1-100,0%) PPA 96,7% (90,0-100,0%) OA 98,7% (96,1-100,0%)

NPA = Prozentuale Negativübereinstimmung (Negative Percent Agreement); PPA = Prozentuale Positivübereinstimmung (Positive Percent Agreement); OA = Gesamtübereinstimmung (Overall Agreement); TPS = Tumor Proportion Score

Tabelle 7: Präzision von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, an nur einem Zentrum getestet (TPS $\geq$ 50%)

Präzisionsstudie	Diagnostischer Cutoff	Studiendesign	% Übereinstimmung (95%-KI)
Zwischen den Geräten, zwischen den Tagen und zwischen den Chargen	TPS $\geq$ 50%	Alle 52 NSCLC-Gewebeproben (24 PD-L1-negative und 28 PD-L1-positive) mit unterschiedlichen PD-L1-IHC-Expressionsgraden wurden mit 3 Reagenzienchargen an 3 nicht aufeinanderfolgenden Tagen auf jedem der 3 Dako Omnis Geräte getestet.	NPA 100,0% (94,9-100,0%) PPA 100,0% (95,6-100,0%) OA 100,0% (97,6-100,0%)
Innerhalb des Halters (Wiederholbarkeit)	TPS $\geq$ 50%	51 NSCLC-Gewebeproben (27 PD-L1-negative und 24 PD-L1-positive) mit unterschiedlichen PD-L1-IHC-Expressionsgraden wurden mit 5 Replikaten in einem Halter auf dem Dako Omnis Gerät getestet.	NPA 98,5% (96,3-100,0%) PPA 97,5% (93,3-100,0%) OA 98,0% (96,1-99,6%)

NPA = Prozentuale Negativübereinstimmung (Negative Percent Agreement); PPA = Prozentuale Positivübereinstimmung (Positive Percent Agreement); OA = Gesamtübereinstimmung (Overall Agreement); TPS = Tumor Proportion Score

Externe Reproduzierbarkeit: NSCLC

Die Reproduzierbarkeit von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. GE006 wurde an drei externen Prüfzentren bewertet. Es wurden durchschnittliche Übereinstimmungen berechnet, da in den Reproduzierbarkeitsparametern, wie zum Beispiel Prüfzentrum und Betrachter, keine natürliche Referenz existiert. Die prozentuale Negativübereinstimmung (Average Negative percent Agreement, NPA), die prozentuale Positivübereinstimmung (Average Positive percent Agreement, PPA) und die Gesamtübereinstimmung (Overall percent Agreement, OA) wurden mit einem zweiseitigen 95%-Konfidenzintervall nach der Bootstrapping-Methode für die Cutoffs von TPS $\geq$ 1% und TPS $\geq$ 50% berechnet. Bei Studien, die zu einer Übereinstimmung von 100,0% geführt haben, wurden zweiseitige 95%-Konfidenzintervalle für NPA, PPA und OA mithilfe der Wilson-Bewertungsmethode berechnet.

Tabelle 8: Reproduzierbarkeit von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, getestet an drei externen Zentren (TPS $\geq$ 1%)

Reproduzierbarkeitsstudie	Diagnostischer Cutoff	Studiendesign	% Übereinstimmung (95%-KI)
Zwischen den Zentren	TPS $\geq$ 1%	Alle 40 NSCLC-Gewebeproben (20 PD-L1-negative und 20 PD-L1-positive) mit unterschiedlichen PD-L1-IHC-Expressionsgraden wurden an 5 nicht aufeinanderfolgenden Tagen getestet. Die Vergleichsanalyse zwischen den Zentren wurde an 3 Zentren anhand von insgesamt 600 Vergleichen durchgeführt.	NPA 99,3% (98,3-100,0%) PPA 100,0% (98,7-100,0%) OA 99,7% (99,2-100,0%)
Innerhalb eines Zentrums	TPS $\geq$ 1%	Alle 40 NSCLC-Gewebeproben (20 PD-L1-negative und 20 PD-L1-positive) mit unterschiedlichen PD-L1-IHC-Expressionsgraden wurden an 5 nicht aufeinanderfolgenden Tagen an jedem der 3 Studienzentren getestet. Die Vergleichsanalyse zwischen den Zentren wurde für 3 Zentren anhand von insgesamt 600 Vergleichen durchgeführt.	NPA 99,3% (98,3-100,0%) PPA 100,0% (98,7-100,0%) OA 99,7% (99,2-100,0%)

NPA = prozentuale Negativübereinstimmung; PPA = prozentuale Positivübereinstimmung; OA = Gesamtübereinstimmung

Tabelle 9: Reproduzierbarkeit von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, getestet an drei externen Zentren (TPS $\geq$ 50%)

Reproduzierbarkeitsstudie	Diagnostischer Cutoff	Studiendesign	% Übereinstimmung (95%-KI)
Zwischen den Zentren	TPS $\geq$ 50%	Alle 40 NSCLC-Gewebeproben (20 PD-L1-negative und 20 PD-L1-positive) mit unterschiedlichen PD-L1-IHC-Expressionsgraden wurden an 5 nicht aufeinanderfolgenden Tagen getestet. Die Vergleichsanalyse zwischen den Zentren wurde an 3 Zentren anhand von insgesamt 600 Vergleichen durchgeführt.	NPA 93,7% (87,6-98,4%) PPA 91,9% (84,2-98,6%) OA 92,8% (88,0-97,0%)
Innerhalb eines Zentrums	TPS $\geq$ 50%	Alle 40 NSCLC-Gewebeproben (20 PD-L1-negative und 20 PD-L1-positive) mit unterschiedlichen PD-L1-IHC-Expressionsgraden wurden an 5 nicht aufeinanderfolgenden Tagen an jedem der 3 Studienzentren getestet. Die Vergleichsanalyse zwischen den Zentren wurde für 3 Zentren anhand von insgesamt 600 Vergleichen durchgeführt.	NPA 96,9% (94,1-99,1%) PPA 97,1% (94,7-99,3%) OA 97,0% (94,8-98,8%)

NPA = prozentuale Negativübereinstimmung; PPA = prozentuale Positivübereinstimmung; OA = Gesamtübereinstimmung

16.3 Leistungsbewertung, SK006 im Vergleich zu GE006/Autostainer Link 48 im Vergleich zu Dako Omnis: NSCLC

Die Leistungsäquivalenz von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. GE006, im Vergleich zu PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. SK006, wurde an drei Prüfszentren bewertet. Die prozentuale Negativübereinstimmung (Average Negative percent Agreement, NPA), die prozentuale Positivübereinstimmung (Average Positive percent Agreement, PPA) und die Gesamtübereinstimmung (Overall percent Agreement, OA) wurden mit einem zweiseitigen 95%-Konfidenzintervall nach der Bootstrapping-Methode für die Cutoffs von TPS $\geq 1\%$ und TPS $\geq 50\%$ berechnet.

Tabelle 10: Vergleichsstudie von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. SK006 zu Code-Nr. GE006, bewertet von drei Pathologen an drei Zentren (TPS $\geq 1\%$).

Vergleichsstudie	Diagnostischer Cutoff	Studiendesign	% Übereinstimmung (95%-KI)
SK006 im Vergleich zu GE006	TPS $\geq 1\%$	96 NSCLC-Gewebe mit unterschiedlichen PD-L1-IHC-Expressionen wurden sowohl auf Autostainer Link 48 (Code-Nr. SK006) als auch auf Dako Omnis (Code-Nr. GE006) gefärbt. Dieses Set wurde von drei verschiedenen Pathologen an drei Zentren bewertet.	NPA 97,5% (94,2-100,0%) PPA 98,8% (96,9-100,0%) OA 98,2% (96,5-99,6%)

NPA = prozentuale Negativübereinstimmung; PPA = prozentuale Positivübereinstimmung; OA = Gesamtübereinstimmung

Tabelle 11: Vergleichsstudie von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. SK006 zu Code-Nr. GE006, bewertet von drei Pathologen an drei Zentren (TPS $\geq 50\%$).

Vergleichsstudie	Diagnostischer Cutoff	Studiendesign	% Übereinstimmung (95%-KI)
SK006 im Vergleich zu GE006	TPS $\geq 50\%$	96 NSCLC-Gewebe mit unterschiedlichen PD-L1-IHC-Expressionen wurden sowohl auf Autostainer Link 48 (Code-Nr. SK006) als auch auf Dako Omnis (Code-Nr. GE006) gefärbt. Dieses Set wurde von drei verschiedenen Pathologen an drei Standorten bewertet	NPA 91,6% (85,3-97,1%) PPA 97,1% (94,2-99,3%) OA 94,3% (91,0-97,2%)

NPA = prozentuale Negativübereinstimmung; PPA = prozentuale Positivübereinstimmung; OA = Gesamtübereinstimmung

16.4 Bewertung der klinischen Leistung

Alle klinischen Studien wurden unter Verwendung von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code-Nr. SK006 durchgeführt. Die Daten in Abschnitt 16.3 unterstützen die Leistungsäquivalenz von GE006 im Vergleich zu SK006.

KEYNOTE 042: Kontrollierte Studie an zuvor unbehandelten NSCLC-Patienten

Die Sicherheit und Wirksamkeit von Pembrolizumab wurde in KEYNOTE-042 untersucht, einer multizentrischen, kontrollierten Studie zur Behandlung von zuvor unbehandeltem, lokal fortgeschrittenem oder metastatischem NSCLC.⁵ Das Studiendesign war ähnlich wie bei KEYNOTE-024 (siehe unten), außer dass Patienten eine PD-L1-Expression mit einem TPS $\geq 1\%$, ermittelt mit dem PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, aufwiesen. Die Patienten wurden 1:1 für den Erhalt von Pembrolizumab in einer Dosis von 200 mg alle 3 Wochen (n = 637) oder einer platinhaltigen Chemotherapie nach Wahl des Prüfarztes randomisiert (n = 637; einschließlich Pemetrexed + Carboplatin oder Paclitaxel + Carboplatin; Patienten mit nicht-Plattenepithel-NSCLC konnten eine Erhaltungstherapie mit Pemetrexed erhalten). Die Beurteilung des Tumorstatus wurde in den ersten 45 Wochen alle 9 Wochen und danach alle 12 Wochen durchgeführt.

Von den 1.274 Patienten in KEYNOTE-042 hatten 599 (47%) Tumore mit PD-L1-Expression mit einem TPS $\geq 50\%$, ermittelt mit dem PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. Die Ausgangscharakteristika dieser 599 Patienten umfassten: medianes Alter 63 Jahre (45% 65 Jahre oder älter); 69% männlich; 63% weiße Hautfarbe, 32% asiatisch, 17% hispanisch oder Latino; ECOG-Leistungsstatus 0 bzw. 1: 31% bzw. 69%. Die Krankheitsmerkmale waren: Plattenepithel-NSCLC (37%) und Nicht-Plattenepithel-NSCLC (63%); Stadium IIIA (0,8%); Stadium IIIB (9%); Stadium IV (90%); und behandelte Hirnmetastasen (6%).

Das primäre Maß für die Wirksamkeit war das Gesamtüberleben (Overall Survival, OS). Die sekundären Messgrößen für die Wirksamkeit waren progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtansprechrate (ORR), bewertet gemäß RECIST 1.1 in einer verblindeten unabhängigen zentralen Prüfung (BICR). Die Studie zeigte eine statistisch signifikante Verbesserung des OS bei Patienten, deren Tumore PD-L1 TPS $\geq 1\%$ exprimierten, randomisiert für die Pembrolizumab-Monotherapie im Vergleich zur Chemotherapie (HR 0,82; 95%-KI 0,71, 0,93 bei der abschließenden Analyse) und bei Patienten, deren Tumore PD-L1 TPS $\geq 50\%$ exprimierten, randomisiert für Pembrolizumab-Monotherapie im Vergleich zur Chemotherapie. Tabelle 12 gibt einen Überblick über die wichtigsten Wirksamkeitsmesswerte für die TPS $\geq 50\%$ -Population bei der abschließenden Analyse, die bei einer mittleren Nachsorge von 15,4 Monaten durchgeführt wurde. Die Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben für die Population mit TPS $\geq 50\%$ ist in Abbildung 1 dargestellt.

Tabelle 12: Wirksamkeitsergebnisse (PD-L1 TPS ≥ 50%) in KEYNOTE-042

Endpunkt	Pembrolizumab 200 mg alle 3 Wochen n = 299	Chemotherapie n = 300
Gesamtüberleben (OS)		
Anzahl Patienten (%) mit Ereignis	180 (60%)	220 (73%)
Hazard-Ratio* (95% KI)	0,70 (0,58, 0,86)	
p-Wert†	0,0003	
Median in Monaten (95% KI)	20,0 (15,9, 24,2)	12,2 (10,4, 14,6)
Progressionsfreies Überleben (PFS)		
Anzahl Patienten (%) mit Ereignis	238 (80%)	250 (83%)
Hazard-Ratio* (95% KI)	0,84 (0,70, 1,01)	
Median in Monaten (95% KI)	6,5 (5,9, 8,5)	6,4 (6,2, 7,2)
Objektive Ansprechrte		
ORR%, (95% KI)	39% (34, 45)	32% (27, 38)
Vollständiges Ansprechen %	1%	0,3%
Partielles Ansprechen %	38%	32%
Dauer des Ansprechens‡		
Median in Monaten (Bereich)	22,0 (2,1+, 36,5+)	10,8 (1,8+, 30,4+)
% mit Dauer ≥ 18 Monate	57%	34%

* Hazard-Ratio (Pembrolizumab im Vergleich zu Chemotherapie) basierend auf dem stratifizierten Cox-Proportional-Hazards-Modell

† Basierend auf einem stratifizierten Log-Rank-Test

‡ Basierend auf Patienten mit dem besten objektiven Ansprechen, bestätigt als vollständiges oder partielles Ansprechen

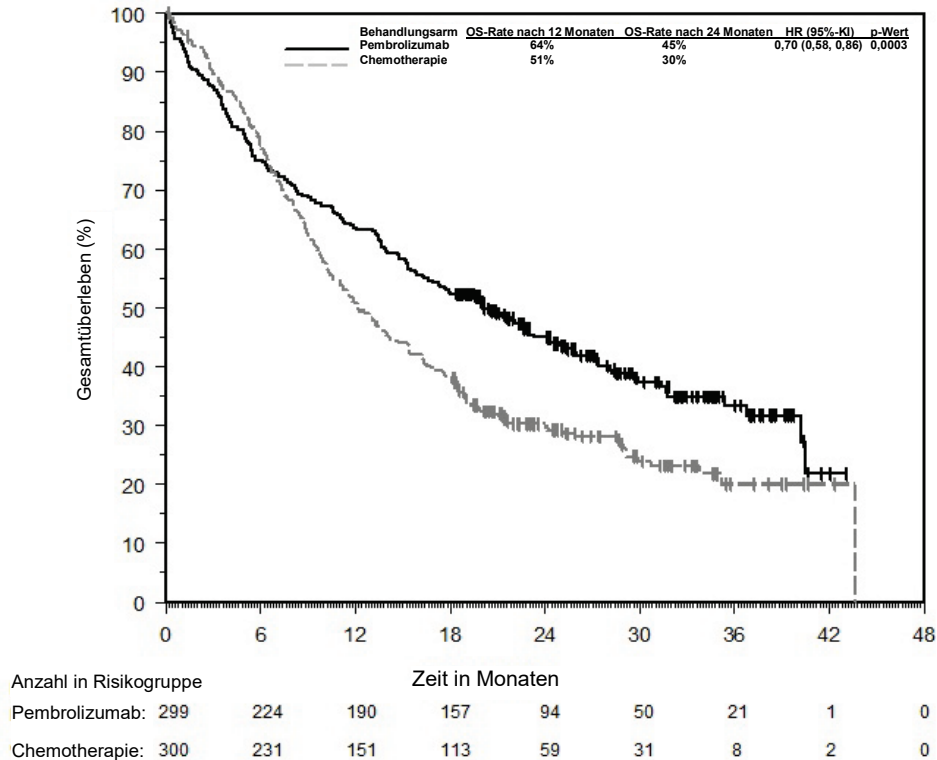


Abbildung 1. Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben nach Behandlungsarm bei KEYNOTE-042 (Patienten mit PD-L1-Expression, TPS ≥ 50%, Intent-to-Treat-Population)

Die Ergebnisse einer exploratorischen post-hoc-Untergruppenanalyse zeigten bei Patienten, die nie Raucher waren, einen Trend zu einem geringeren Überlebensvorteil von Pembrolizumab im Vergleich zur Chemotherapie, sowohl während der ersten 4 Monate als auch während der gesamten Dauer der Behandlung. Aufgrund der exploratorischen Natur dieser Untergruppenanalyse können jedoch keine endgültigen Schlussfolgerungen gezogen werden.

KEYNOTE-024: Kontrollierte Studie an zuvor unbehandelten NSCLC-Patienten

Die Sicherheit und Wirksamkeit von Pembrolizumab wurde in KEYNOTE-024 untersucht, einer multizentrischen, kontrollierten Studie zur Behandlung von zuvor unbehandeltem metastatischem NSCLC.⁴ Patienten hatten eine PD-L1-Expression mit einem TPS $\geq 50\%$, ermittelt anhand von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. Die Patienten wurden 1:1 für den Erhalt von Pembrolizumab in einer Dosis von 200 mg alle 3 Wochen (n = 154) oder einer platinhaltigen Chemotherapie nach Wahl des Prüfarztes (n = 151; einschließlich Pemetrexed + Carboplatin, Pemetrexed + Cisplatin, Gemcitabin + Cisplatin, Gemcitabin + Carboplatin oder Paclitaxel + Carboplatin) randomisiert. (Patienten mit Nicht-Plattenepithel-NSCLC konnten eine Pemetrexed-Erhaltungstherapie erhalten.) Die Patienten wurden bis zum Erreichen einer nicht akzeptablen Toxizität oder bis zur Krankheitsprogression mit Pembrolizumab behandelt. Die Behandlung konnte auch im Fall der Krankheitsprogression fortgesetzt werden, wenn der Patient klinisch stabil war und nach Einschätzung des Prüfarztes daraus einen klinischen Vorteil zog. Patienten ohne Krankheitsprogression konnten bis zu 24 Monate behandelt werden. Ausgeschlossen von der Studie waren Patienten mit genomischen EGFR- oder ALK-Tumoraberrationen; Autoimmunerkrankungen, die innerhalb von 2 Jahren nach der Behandlung eine systemische Therapie erforderten; einem Gesundheitszustand, der eine Immunsuppression erforderlich machte; sowie Patienten, die innerhalb der vorangegangenen 26 Wochen über 30 Gy thorakale Bestrahlung erhalten hatten. Alle 9 Wochen wurde eine Beurteilung des Tumorstatus durchgeführt. Chemotherapiepatienten mit unabhängig bestätigter Krankheitsprogression konnten zur Behandlung mit Pembrolizumab wechseln.

Die 305 Patienten in KEYNOTE-024 wiesen folgende Ausgangscharakteristika auf: medianes Alter 65 Jahre (54% 65 Jahre oder älter); 61% männlich; 82% weiße Hautfarbe, 15% asiatisch; ECOG-Leistungsstatus 0 bzw. 1: 35% bzw. 65%. Die Krankheitsmerkmale waren: Plattenepithel-NSCLC (18%) und Nicht-Plattenepithel-NSCLC (82%); M1 (99%) und Gehirnmastasen (9%).

Die primäre Messgröße für die Wirksamkeit war das progressionsfreie Überleben (PFS), bewertet gemäß RECIST 1.1 in einer verblindeten unabhängigen zentralen Prüfung (BICR). Die primären Messgrößen für die Wirksamkeit waren Gesamtüberleben (OS) und Gesamtansprechrate (ORR), (bewertet gemäß RECIST 1.1 in einer verblindeten unabhängigen zentralen Prüfung (BICR)). Tabelle 13 zeigt eine Zusammenfassung der wichtigsten Messgrößen für die Wirksamkeit für die gesamte Intent-to-Treat-Population (ITT-Population). PFS- und ORR-Ergebnisse werden aus einer Zwischenanalyse mit einer medianen Nachsorge von 11 Monaten ermittelt. Die OS-Ergebnisse werden aus der abschließenden Analyse bei einer medianen Nachsorge von 25 Monaten ermittelt.

Tabelle 13. Wirksamkeitsergebnisse in KEYNOTE-024

Endpunkt	Pembrolizumab 200 mg alle 3 Wochen n = 154	Chemotherapie n = 151
Progressionsfreies Überleben (PFS)		
Anzahl Patienten (%) mit Ereignis	73 (47%)	116 (77%)
Hazard-Ratio* (95% KI)	0,50 (0,37, 0,68)	
p-Wert [†]	< 0,001	
Median in Monaten (95% KI)	10,3 (6,7, k. A.)	6,0 (4,2, 6,2)
Gesamtüberleben (OS)		
Anzahl Patienten (%) mit Ereignis	73 (47%)	96 (64%)
Hazard-Ratio* (95% KI)	0,63 (0,47, 0,86)	
p-Wert [†]	0,002	
Median in Monaten (95% KI)	30,0 (18,3, k. A.)	14,2 (9,8, 19,0)
Objektive Ansprechrare		
ORR%, (95% KI)	45% (37, 53)	28% (21, 36)
Vollständiges Ansprechen %	4%	1%
Partielles Ansprechen %	41%	27%
Dauer des Ansprechens[‡]		
Median in Monaten (Bereich)	Nicht erreicht (1,9+, 14,5+)	6,3 (2,1+, 12,6+)
% mit Dauer ≥ 6 Monate	88% [§]	59% [¶]

* Hazard-Ratio (Pembrolizumab im Vergleich zu Chemotherapie) basierend auf dem stratifizierten Cox-Proportional-Hazards-Modell

[†] Basierend auf einem stratifizierten Log-Rank-Test

[‡] Basierend auf Patienten mit dem besten objektiven Ansprechen, bestätigt als vollständiges oder partielles Ansprechen

[§] Basierend auf Kaplan-Meier-Schätzungen; einschließlich 43 Patienten mit Ansprechen von 6 Monaten oder länger

[¶] Basierend auf Kaplan-Meier-Schätzungen; einschließlich 16 Patienten mit Ansprechen von 6 Monaten oder länger

k. A. = keine Angabe

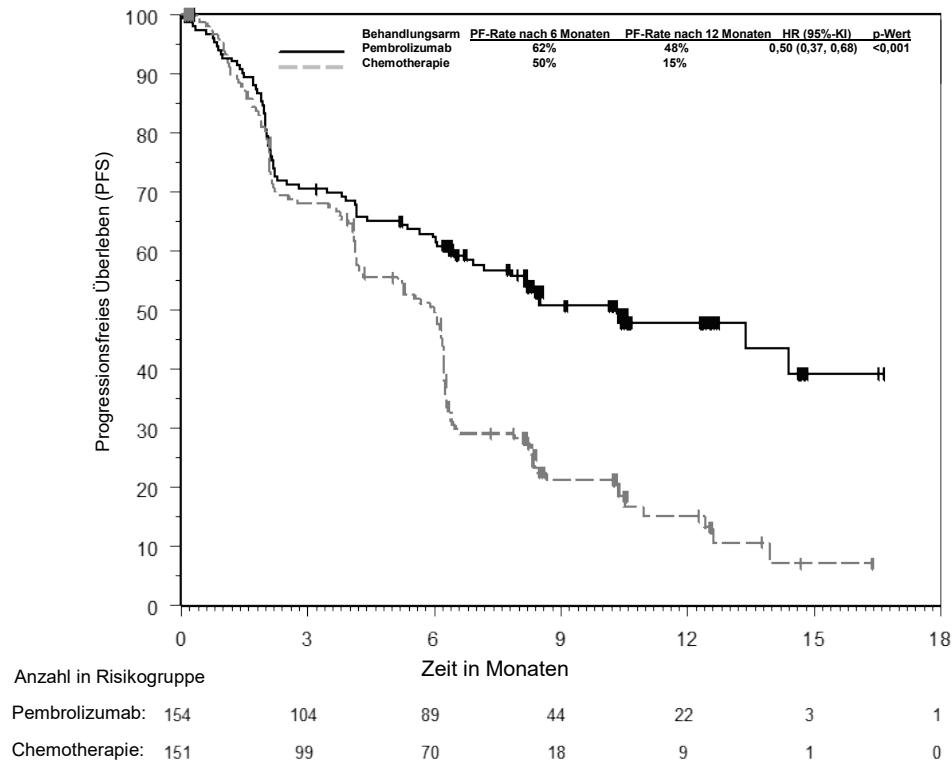


Abbildung 2. : Kaplan-Meier-Kurve für das progressionsfreie Überleben nach Behandlungsarm in KEYNOTE-024 (Intent-to-Treat-Population)

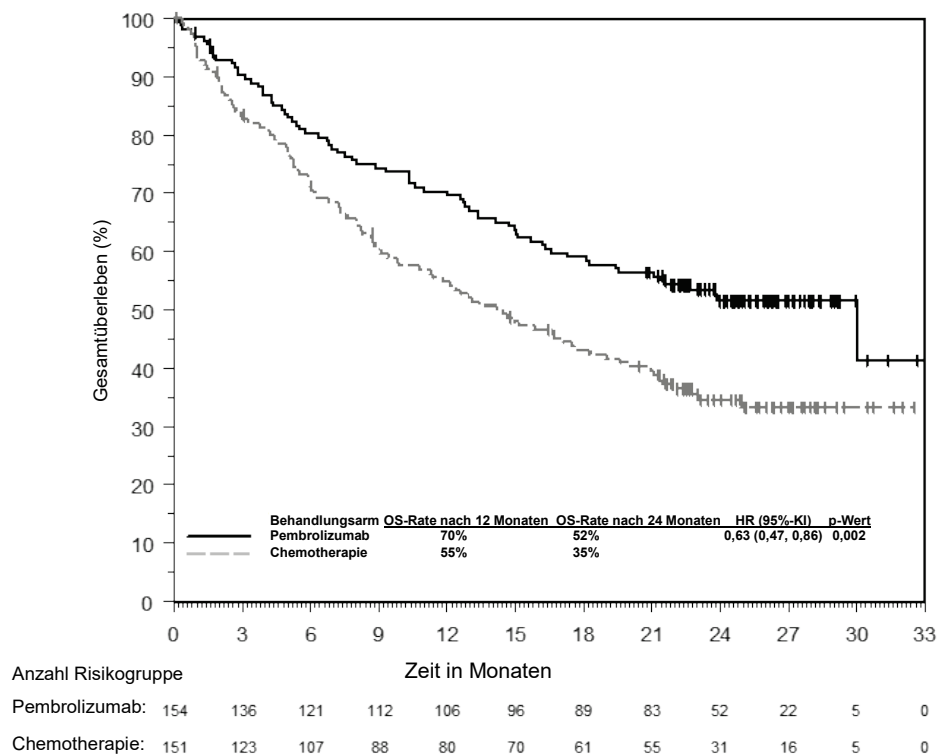


Abbildung 3: Kaplan-Meier-Kurve für Gesamtüberleben nach Behandlungsarm in KEYNOTE-024 (Intent-to-Treat-Population)

Bei einer Untergruppenanalyse wurde bei einer geringen Anzahl von Patienten, die nie-Raucher waren, ein geringerer Überlebensvorteil von Pembrolizumab im Vergleich zur Chemotherapie beobachtet. Aufgrund der geringen Anzahl von Patienten können aus diesen Daten jedoch keine endgültigen Schlussfolgerungen gezogen werden.

KEYNOTE-010: Kontrollierte Studie an zuvor mittels Chemotherapie behandelten NSCLC-Patienten

Der klinische Nutzen von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx wurde in KEYNOTE-010, einer randomisierten, multizentrischen, offenen klinischen Studie zur Bewertung der Sicherheit und Wirksamkeit von KEYTRUDA bei Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC, die zuvor mit einer Platin enthaltenden Chemotherapie behandelt worden waren, untersucht.⁵ Die Patienten hatten eine PD-L1-Expression mit einem TPS $\geq 1\%$, ermittelt anhand einer klinischen Studienversion von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. Patienten mit einer EGFR-aktivierenden Mutation oder einer ALK-Translokation erfuhren ebenfalls bei der für diese Mutationen zugelassenen Therapie eine Krankheitsprogression, bevor sie Pembrolizumab erhielten. Die Patienten wurden 1:1:1 für den Erhalt von Pembrolizumab in einer Dosis von 2 mg/kg (n = 344) bzw. 10 mg/kg (n = 346) alle 3 Wochen oder Docetaxel in einer Dosis von 75 mg/m² alle 3 Wochen (n = 343) bis zur Krankheitsprogression oder bis zum Erreichen einer nicht akzeptablen Toxizität randomisiert. Ausgeschlossen von der Studie waren Patienten mit einer Autoimmunerkrankung; einem Gesundheitszustand, der eine Immunsuppression erforderlich machte; sowie Patienten, die innerhalb der vorangegangenen 26 Wochen über 30 Gy thorakale Bestrahlung erhalten hatten. Alle 9 Wochen wurde eine Beurteilung des Tumorstatus durchgeführt. Die primären Messgrößen für die Wirksamkeit waren Gesamtüberleben (OS) und progressionsfreies Überleben (PFS), bewertet gemäß RECIST 1.1 in einer verblindeten unabhängigen zentralen Prüfung (BICR).

Auf der Grundlage des CTA wurden insgesamt 1.033 NSCLC-Patienten für die Studie randomisiert. Zur Auswertung des klinischen Nutzens von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx wurden archivierte Proben aus der klinischen Studie nachträglich in einem Referenzlabor in den USA mit PD-L1 IHC 22C3 pharmDx getestet. Von 529 dieser 1.033 Patienten wurde Tumorgewebe nachträglich mittels PD-L1 IHC 22C3 pharmDx getestet. Die Gewebe von 413 Patienten wiesen eine PD-L1-Expression auf ($\geq 1\%$ der lebensfähigen Tumorzellen zeigten eine Membranfärbung beliebiger Intensität) und die Gewebe von 94 Patienten wiesen keine PD-L1-Expression auf ($< 1\%$ der lebensfähigen Tumorzellen zeigten eine Membranfärbung beliebiger Intensität). Von diesen 413 Patienten mit PD-L1-Expression wiesen die Gewebeproben von 163 Patienten eine hohe PD-L1-Expression auf ($\geq 50\%$ der lebensfähigen Tumorzellen zeigten eine Membranfärbung beliebiger Intensität).

Die erreichten Übereinstimmungsraten zwischen dem CTA und PD-L1 IHC 22C3 pharmDx sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Übereinstimmung von CTA gegenüber PD-L1 IHC 22C3 pharmDx

Übereinstimmungsraten	PD-L1 Cutoff	Prozentuale Negativübereinstimmung (95%-Konfidenzintervall (KI))	Prozentuale Positivübereinstimmung (95%-Konfidenzintervall (KI))
CTA ggü. 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%]

Unter den randomisierten Patienten mit PD-L1-Expression gemäß PD-L1 IHC 22C3 pharmDx waren die demographischen und anderen Baseline-Charakteristika unter den Behandlungsarmen sehr ausgewogen verteilt. Das mediane Alter betrug 63 Jahre (44% davon 65 Jahre und älter). Die meisten Patienten waren weiß (77%) und männlich (58%); der ECOG-Leistungsstatus am Ausgangspunkt war 0 (29%) oder 1 (71%). 78% der Patienten waren ehemalige oder aktive Raucher. Bei 22% der Patienten waren laut Histologie Plattenepithelien betroffen, bei 69% war dies nicht der Fall. Die Baseline- und demographischen Charakteristika in den Pembrolizumab- und Docetaxel-Armen der klinischen Studie insgesamt waren ähnlich gut ausgewogen.

Die Wirksamkeitsergebnisse sind in Tabellen 15 und 16 zusammengefasst. KEYTRUDA zeigte einen dauerhaften klinischen Nutzen bei NSCLC-Patienten mit PD-L1-Expression (TPS $\geq 1\%$) und noch höheren klinischen Nutzen bei Patienten mit hoher PD-L1-Expression (TPS $\geq 50\%$), ermittelt mittels PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. Der Umfang des Nutzens war mit dem der klinischen Studie insgesamt vergleichbar. Die folgende Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der wichtigsten Messgrößen für die Wirksamkeit in der Gesamtpopulation mit PD-L1-Expression (TPS $\geq 1\%$) und in der Untergruppe mit hoher PD-L1-Expression (TPS $\geq 50\%$) für die klinische Studie insgesamt (TPS $\geq 1\%$ nach CTA) und in der Population mit PD-L1-Expression ermittelt mittels PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. Die Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben (OS) (TPS $\geq 1\%$, ermittelt mittels PD-L1 IHC 22C3 pharmDx) ist in Abb. 4 dargestellt. Die Wirksamkeitsergebnisse waren für die Arme mit 2 mg/kg und 10 mg/kg KEYTRUDA gleich.

Tabelle 15: Ansprechen auf KEYTRUDA bei zuvor behandelten NSCLC-Patienten: Klinische Studie insgesamt und Patienten mit hoher PD-L1-Expression, TPS $\geq 1\%$, ermittelt mittels PD-L1 IHC 22C3 pharmDx

Endpunkt	KEYTRUDA 2 mg/kg alle 3 Wochen		KEYTRUDA 10 mg/kg alle 3 Wochen		Docetaxel 75 mg/m ² alle 3 Wochen	
	Klinische Studie	PD-L1 IHC 22C3 pharmDx	Klinische Studie	PD-L1 IHC 22C3 pharmDx	Klinische Studie	PD-L1 IHC 22C3 pharmDx
Anzahl Patienten	344	140	346	142	343	131
Gesamtüberleben (OS)						
Todesfälle (%)	172 (50%)	59 (42%)	156 (45%)	59 (42%)	193 (56%)	67 (51%)
Hazard Ratio* (95% KI)	0,71 (0,58, 0,88)	0,54 (0,37, 0,78)	0,61 (0,49, 0,75)	0,57 (0,39, 0,82)	---	---
p-Wert†	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,00115	---	---
Median in Monaten (95% KI)	10,4 (9,4, 11,9)	11,8 (9,6, k. A.)	12,7 (10,0, 17,3)	12,0 (8,7, k. A.)	8,5 (7,5, 9,8)	7,5 (6,3, 9,9)
Progressionsfreies Überleben (PFS)‡						
Ereignisse (%)	266 (77%)	97 (63%)	255 (74%)	103 (73%)	257 (75%)	94 (72%)
Hazard Ratio* (95% KI)	0,88 (0,73, 1,04)	0,68 (0,50, 0,92)	0,79 (0,66, 0,94)	0,79 (0,59, 1,06)	---	---
p-Wert†	0,068	0,00578	0,005	0,05767	---	---
Median in Monaten (95% KI)	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)

Endpunkt	KEYTRUDA 2 mg/kg alle 3 Wochen		KEYTRUDA 10 mg/kg alle 3 Wochen		Docetaxel 75 mg/m ² alle 3 Wochen	
Gesamtansprechrate (ORR)[‡]						
ORR% [§] (95% KI)	18% (14, 23)	24% (17, 32)	18% (15, 23)	20% (14, 28)	9% (7, 13)	5% (2, 11)

* Hazard Ratio (KEYTRUDA im Vergleich zu Docetaxel) basierend auf dem stratifizierten Cox-Proportional-Hazards-Modell

† Basierend auf einem stratifizierten Log-Rank-Test

‡ Bewertet gemäß RECIST 1.1 in einer verblindeten unabhängigen zentralen Prüfung (BICR)

§ Bei allen Ansprechen handelte es sich um ein partielles Ansprechen

Tabelle 16: Ansprechen auf KEYTRUDA bei zuvor behandelten NSCLC-Patienten: Klinische Studie insgesamt und Patienten mit hoher PD-L1-Expression, TPS ≥ 50%, ermittelt mittels PD-L1 IHC 22C3 pharmDx

Endpunkt	KEYTRUDA 2 mg/kg alle 3 Wochen		KEYTRUDA 10 mg/kg alle 3 Wochen		Docetaxel 75 mg/m ² alle 3 Wochen	
	Klinische Studie	PD-L1 IHC 22C3 p harmDx	Klinische Studie	PD-L1 IHC 22C3 p harmDx	Klinische Studie	PD-L1 IHC 22C3 pharmDx
Anzahl Patienten	139	56	151	60	152	47
Gesamtüberleben (OS)						
Todesfälle (%)	58 (42%)	18 (32%)	60 (40%)	19 (32%)	86 (57%)	25 (53%)
Hazard Ratio* (95% KI)	0,54 (0,38, 0,77)	0,45 (0,24, 0,84)	0,50 (0,36, 0,70)	0,29 (0,15, 0,56)	---	---
p-Wert [†]	< 0,001	0,00541	< 0,001	< 0,001	---	---
Median in Monaten (95% KI)	14,9 (10,4, k. A.)	Nicht erreicht (9,3, k. A.)	17,3 (11,8, k. A.)	Nicht erreicht (8,3, k. A.)	8,2 (6,4, 10,7)	7,2 (4,4, 8,3)
Progressionsfreies Überleben (PFS)[‡]						
Ereignisse (%)	89 (64%)	33 (59%)	97 (64%)	34 (57%)	118 (78%)	33 (70%)
Hazard Ratio* (95% KI)	0,58 (0,43, 0,77)	0,47 (0,28, 0,80)	0,59 (0,45, 0,78)	0,41 (0,24, 0,70)	---	---
p-Wert [†]	< 0,001	0,00221	< 0,001	< 0,001	---	---
Median in Monaten (95% KI)	5,2 (4,0, 6,5)	5,9 (4,2, 9,0)	5,2 (4,1, 8,1)	4,8 (2,8, k. A.)	4,1 (3,6, 4,3)	3,9 (2,0, 4,3)
Gesamtansprechrate (ORR)[‡]						
ORR% [§] (95% KI)	30% (23, 39)	37% (25, 52)	29% (22, 37)	28% (18, 41)	8% (4, 13)	4% (1, 15)

* Hazard Ratio (KEYTRUDA im Vergleich zu Docetaxel) basierend auf dem stratifizierten Cox-Proportional-Hazards-Modell

† Basierend auf einem stratifizierten Log-Rank-Test

‡ Bewertet gemäß RECIST 1.1 in einer verblindeten unabhängigen zentralen Prüfung (BICR)

§ Bei allen Ansprechen handelte es sich um ein partielles Ansprechen

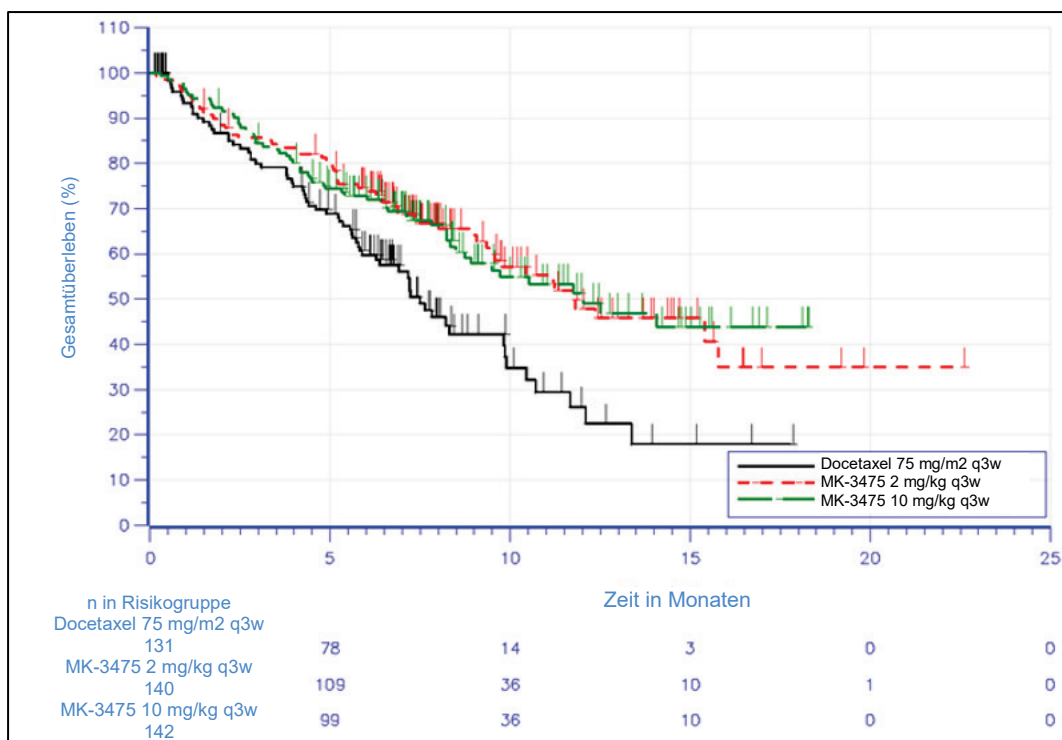


Abbildung 4: Kaplan-Meier-Kurve für Gesamtüberleben (OS) nach Behandlungsarm (TPS $\geq$ 1% ermittelt mittels PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Intent-to-Treat-Population)

Zusätzliche Robustheitsanalysen wurden durchgeführt, um die mögliche Auswirkung fehlender Daten aufgrund von Patienten mit PD-L1-Expression (TPS $\geq$ 1%) nach PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, aber ohne PD-L1-Expression (TPS < 1%) nach CTA zu berücksichtigen. Patienten mit solchen Testergebnissen sind Teil der Intended-Use-/Intent-to-Diagnose- (ITD-) Population von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx; jedoch wurden sie aufgrund der fehlenden PD-L1-Expression gemäß dem CTA-Screening von der klinischen Studie ausgeschlossen. Zur Berücksichtigung dieser fehlenden Daten wurde eine Empfindlichkeitsanalyse durchgeführt, um den plausiblen Bereich für die Hazard Ratio (HR) zu ermitteln. Für die HR wurde ein Schätzwert anhand von PD-L1 IHC 22C3 pharmDx in den Unterpopulationen mit TPS $\geq$ 1% und TPS $\geq$ 50% innerhalb der ITD-Gruppe angenommen, um die Übereinstimmung mit der beobachteten HR basierend auf der Studienaufnahme mit dem CTA zu prüfen. Die Ergebnisse der Empfindlichkeitsanalyse hinsichtlich der Hazard Ratio belegten, dass die HR-Schätzwerte jedweder Annahme zur Abschwächung der Therapiewirkung innerhalb der ITD-Gruppe standhalten.

17. Fehlerbehandlung

Bei ungewöhnlichen Färbungen zur Mängelbeseitigung im Abschnitt „Fehlerbehandlung“ im zuvor erwähnten Education Guide nachschlagen, oder den Pathologie-Kundendienst von Agilent verständigen.⁸

Dako Omnis ist ein automatisiertes System, das den Anwender auf Vorgänge außerhalb der Spezifikationen im Durchlauf aufmerksam macht. Weitere Informationen dazu, auf welche Bedingungen aufmerksam gemacht wird und wie dies geschieht, sind im Dako Omnis Benutzerhandbuch Basiswissen und im ausführlichen Benutzerhandbuch enthalten. Der folgende Abschnitt enthält eine Anleitung zur Fehlerbehebung bei Ergebnissen und Bedingungen, die nicht einfach über das Dako Omnis Warn- und Benachrichtigungssystem zu identifizieren sind.

Der Benutzer sollte stets die Einhaltung des Wartungsplans für das Dako Omnis-Gerät sicherstellen.

Es ist stets sicherzustellen, dass die entsprechenden Kontrollen wie im Abschnitt „Qualitätskontrolle“ beschrieben verwendet werden.

Tabelle 17: Fehlerbehandlung

Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
1. Fehlende oder schwache Färbung der Objekträger	1a. Verwendung falscher Lagerbedingungen für Reagenzien.	1a. Überprüfen, dass Reagenzien entsprechend den aufgeführten Lagerbedingungen richtig gelagert wurden.
	1b. Reagenz wird nach dem Verfallsdatum verwendet.	1b. Sicherstellen, dass das Reagenz nicht über sein Verfallsdatum hinaus verwendet wird.
	1c. Reagenz wird über seine Stabilität im Gerät hinaus verwendet.	1c. Sicherstellen, dass das Reagenz nicht über seine Stabilität im Gerät hinaus verwendet wird.
	1d. Ungeeignete Fixiermethode angewendet.	1d. Sicherstellen, dass das Patientengewebe nicht zu kurz oder zu lang fixiert wurde und dass das korrekte Fixiermittel (NBF) verwendet wurde.

Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
	1e. Übermäßig starkes Erwärmen eingedeckter Gewebeschnitte vor dem Laden auf Dako Omnis kann zu einem Verlust der Immunreaktivität und Morphologie führen.	1e. Die Gewebeschnitte maximal 1 Stunde lang bei $58 \pm 2^\circ\text{C}$ mit einem kalibrierten Ofen mit gleichmäßiger Wärmeverteilung trocknen. ¹⁹
	1f. Falsche Platzierung der Kapillardeckel in Stainer-Modulen.	1f. Platzierung der Kapillardeckel überprüfen.
	1g. Beschädigte Kapillardeckel.	1g. Unversehrtheit der Kapillardeckel überprüfen.
	1h. Es wurde kein destilliertes oder entionisiertes Wasser zur Verdünnung des Target Retrieval Solution-Konzentrats verwendet.	1h. Sicherstellen, dass destilliertes oder entionisiertes Wasser zur Vorbereitung einer 1x Target Retrieval Solution verwendet wird.
	1i. Es wurde eine falsche Target Retrieval Solution verwendet.	1i. Sicherstellen, dass die korrekte Target Retrieval Solution verwendet wird, die in den Abschnitten „Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien“ und/oder „Vorbereitung der Reagenzien“ angegeben ist.
	1j. 1x Target Retrieval Solution entspricht nicht den pH-Spezifikationen.	1j. Den pH-Wert der 1x Target Retrieval Solution prüfen. Den pH-Wert der 1x Target Retrieval Solution nicht ändern. Wenn der pH-Wert außerhalb des zulässigen Bereichs ($6,1 \pm 0,2$) liegt, 1x Target Retrieval Solution entsorgen. Eine neue 1x Target Retrieval Solution vorbereiten. Den pH-Wert der neuen 1x Target Retrieval Solution prüfen.
2. Zu starke spezifische Färbung der Objektträger	2a. Ungeeignete Fixiermethode angewendet.	2a. Nur zugelassene Fixiermittel und Fixiermethoden benutzen.
	2b. Es wurde kein destilliertes oder entionisiertes Wasser zur Verdünnung des Target Retrieval Solution-Konzentrats verwendet.	2b. Sicherstellen, dass destilliertes oder entionisiertes Wasser zur Vorbereitung einer 1x Target Retrieval Solution verwendet wird.
	2c. Es wurde eine falsche Target Retrieval Solution verwendet.	2c. Sicherstellen, dass die korrekte Target Retrieval Solution verwendet wird, die in den Abschnitten „Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien“ und/oder „Vorbereitung der Reagenzien“ angegeben ist.
	2d. 1x Target Retrieval Solution entspricht nicht den pH-Spezifikationen.	2d. Den pH-Wert der 1x Target Retrieval Solution prüfen. Den pH-Wert der 1x Target Retrieval Solution nicht ändern. Wenn der pH-Wert außerhalb des zulässigen Bereichs ($6,1 \pm 0,2$) liegt, 1x Target Retrieval Solution entsorgen. Eine neue 1x Target Retrieval Solution vorbereiten. Den pH-Wert der neuen 1x Target Retrieval Solution prüfen.
3. Zu starke unspezifische Färbung der Objektträger	3a. Beim Eindecken der Schnitte auf die Objektträger wurden Stärkezusätze verwendet.	3a. Keinerlei Stärkezusätze zur Haftung der Schnitte an der Glasoberfläche verwenden. Viele dieser Zusätze sind immunreaktiv.
	3b. Schnitte sind nach dem Färbeverfahren ausgetrocknet.	3b. Sicherstellen, dass die Entladestation mit ausreichend Wasser gefüllt ist.
	3c. Schnitte sind vor dem Versehen mit Deckglas ausgetrocknet.	3c. Vermeiden, dass gefärbte Objektträger zwischen dem Entladen von Dako Omnis und dem Versehen mit Deckglas austrocknen.
	3d. Ungeeignete Fixiermethode angewendet.	3d. Korrektes Fixiermittel benutzen. Andere Fixiermittel können zur übermäßigen Hintergrundfärbung führen.
	3e. Paraffin nicht vollständig entfernt.	3e. Zustand der Lösungsmittelanschlüsse überprüfen. Die Anschlussstücke zum Entfernen von Verunreinigungen vorsichtig schrubben. Nach dem Reinigen die Integrität der Anschlussstücke an der Rückseite der Spülflaschen überprüfen. Weitere Einzelheiten siehe Dako Omnis Benutzerhandbuch Basiswissen.
	3f. Unspezifische Bindung der Reagenzien an Gewebe.	3f. Sicherstellen, dass die korrekte Fixiermethode für das Gewebe verwendet und große Nekrosebereiche vermieden werden.
	3g. Wiederverwendung von Mischstreifen.	3g. Sicherstellen, dass neue Mischstreifen verwendet werden.

Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Maßnahme
	3h. Es wurde kein destilliertes oder entionisiertes Wasser zur Verdünnung des Target Retrieval Solution-Konzentrats verwendet.	3h. Sicherstellen, dass destilliertes oder entionisiertes Wasser zur Vorbereitung einer 1x Target Retrieval Solution verwendet wird.
	3i. Es wurde eine falsche Target Retrieval Solution verwendet.	3i. Sicherstellen, dass die korrekte Target Retrieval Solution verwendet wird, die in den Abschnitten „Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien“ und/oder „Vorbereitung der Reagenzien“ angegeben ist.
	3j. 1x Target Retrieval Solution entspricht nicht den pH-Spezifikationen.	3j. Den pH-Wert der 1x Target Retrieval Solution prüfen. Den pH-Wert der 1x Target Retrieval Solution nicht ändern. Wenn der pH-Wert außerhalb des zulässigen Bereichs ($6,1 \pm 0,2$) liegt, 1x Target Retrieval Solution entsorgen. Eine neue 1x Target Retrieval Solution vorbereiten. Den pH-Wert der neuen Target Retrieval Solution prüfen.
4. Gewebe löst sich vom Objektträger	4a. Verwendung ungeeigneter Objektträger.	4a. Dako FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) oder SuperFrost Plus Objektträger verwenden.
	4b. Unzureichende Gewebeprevorbereitung.	4b. Schnitte sollten vor der Färbung eine Stunde in einen bei 58 ± 2 °C kalibrierten Ofen gestellt werden.
5. Objektträger ist markiert	5a. Reagenz wird nach dessen Ablaufdatum verwendet.	5. Markierte Objektträger müssen von qualifiziertem Personal bewertet werden. Einen Vertreter von Agilent Technologies kontaktieren, falls weitere Maßnahmen erforderlich sind.
	5b. Das Reagenz wird in Dako Omnis über seine validierte Stabilität im Gerät hinaus gelagert.	
	5c. Wartung überfällig oder andere Faktoren.	
6. 1x Target Retrieval Solution entspricht nicht den pH-Spezifikationen	6a. pH-Messgerät ist nicht korrekt kalibriert.	6a. Sicherstellen, dass das pH-Messgerät gemäß den Herstellerempfehlungen kalibriert wird. Nach der erneuten Kalibrierung den pH-Wert der 1x Target Retrieval Solution nochmals testen. Den pH-Wert der 1x Target Retrieval Solution nicht ändern. Wenn der pH-Wert außerhalb des zulässigen Bereichs ($6,1 \pm 0,2$) liegt, 1x Target Retrieval Solution entsorgen. Eine neue 1x Target Retrieval Solution vorbereiten. Den pH-Wert der neuen 1x Target Retrieval Solution prüfen.
	6b. Zur Verdünnung des Target Retrieval Solution-Konzentrats wird minderwertiges Wasser verwendet.	6b. Sicherstellen, dass destilliertes oder entionisiertes Wasser zur Vorbereitung der 1x Target Retrieval Solution verwendet wird.
	6c. Es wurde eine falsche Target Retrieval Solution verwendet.	6c. Sicherstellen, dass die korrekte Target Retrieval Solution verwendet wird, die in Abschnitt 5 „Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien“ und/oder Abschnitt 10 „Vorbereitung der Reagenzien“ angegeben ist.

HINWEIS: Falls das Problem auf keine der oben genannten Ursachen zurückgeführt werden kann oder wenn die vorgeschlagene Maßnahme das Problem nicht behebt, bitte den Pathologie-Kundendienst von Agilent verständigen. Weitere Informationen zu Färbetechniken und Probenvorbereitung sind den zuvor genannten Werken zu entnehmen: Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods (über www.agilent.com erhältlich), Atlas of Immunohistology and Immunoperoxidase Techniques. A Practical Approach to Tumor Diagnosis.^{11,20,21}

18. Literaturnachweise

1. Garon, E. B.; Rizvi, N. A.; Hui, R.; et al. Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, 372 (21), 2018–2028.
2. Keytruda® package insert.
3. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Code SK006 [package insert]. Carpinteria, CA: Agilent Pathology Solutions; see www.agilent.com.
4. Reck, M.; Rodriguez-Abreu, D.; Robinson, A. G.; et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer (KEYNOTE-024). *N. Engl. J. Med.* **2016**, 375 (19), 1823–1833.
5. Mok, T. S. K.; Wu, Y. L.; Kudaba, I.; et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for Previously Untreated, PD-L1-Expressing, Locally Advanced or Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer (KEYNOTE-042): A Randomised, Open-Label, Controlled, Phase 3 Trial. *Lancet* **2019**, 393 (10183), 1819–1830. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32409-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32409-7).
6. Herbst, R. S.; Baas, P.; Kim, D. W.; et al. Pembrolizumab versus Docetaxel for Previously Treated, PD-L1-Positive, Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (KEYNOTE-010): A Randomised Controlled Trial. *Lancet* **2016**, 387 (10027), 1540–1550.

7. CLSI. Preparation and testing of reagent water in the clinical laboratory: Approved guideline – fourth edition. CLSI document GP40-A4-AMD. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
8. Finklea, J. Explosive Azide Hazard- Procedures For The Decontamination Of Plumbing Systems Containing Copper And/Or Lead Azides. DHHS **1976**, 78–127.
9. Callihan, D.; Gile, T.; Beavis, K.; et al. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Fourth Edition (M29-A4). M29-A4 **2014**, 34 (8).
10. Current CAP Guidelines <https://www.cap.org/protocols-and-guidelines/current-cap-guidelines>.
11. Taylor, C.; Rudbeck, L. Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods. Sixth Edition. **2013**.
12. Hewitt, S.; Robinowitz, M.; Bogen, S.; et al. Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays, CLSI Document, 2nd Edition. I/LA28-A2 **2011**, 31 (4).
13. Omata, M.; Liew, C. T.; Ashcavai, M.; et al. Nonimmunologic Binding of Horseradish Peroxidase to Hepatitis B Surface Antigen. A Possible Source of Error in Immunohistochemistry. Am. J. Clin. Pathol. **1980**, 73 (5), 626–632.
14. Herman, G. E.; Elfont, E. A. The Taming of Immunohistochemistry: The New Era of Quality Control. Biotech. Histochem. 1991, 66 (4), 194–199.
15. Okazaki, T.; Honjo, T. PD-1 and PD-1 Ligands: From Discovery to Clinical Application. Int. Immunol. **2007**, 19 (7), 813–824.
16. Brown, J. A.; Dorfman, D. M.; Ma, F.-R.; et al. Blockade of Programmed Death-1 Ligands on Dendritic Cells Enhances T Cell Activation and Cytokine Production. J. Immunol. **2003**, 170 (3), 1257–1266.
17. Cooper, W. A.; Tran, T.; Vilain, R. E.; et al. PD-L1 Expression Is a Favorable Prognostic Factor in Early Stage Non-Small Cell Carcinoma. Lung Cancer **2015**, 89 (2), 181–188.
18. Chen, B. J.; Chapuy, B.; Ouyang, J.; et al. PD-L1 Expression Is Characteristic of a Subset of Aggressive B-Cell Lymphomas
19. Hansen, B. L.; Winther, H.; Moller, K. Excessive Section Drying of Breast Cancer Tissue Prior to Deparaffinization and Antigen Retrieval Causes a Loss in HER2 Immunoreactivity. Connection **2008**, 12, 75–78.
20. Tubb, R. R.; Gerphardt, G. N.; Petras, R. E. Specimen Processing and Quality Assurance. In Atlas of Immunohistochemistry; American Society of Clinical Pathologists Press, 1986.
21. Nadji, N.; Morales, A. Immunoperoxidase Techniques. A Practical Approach to Tumor Diagnosis; 1986.

Erläuterung der Symbole

 Artikelnummer	 Temperaturbegrenzung	 In-vitro-Diagnostikum
 Hersteller	 Chargenbezeichnung	 Ausreichend für <n> Prüfungen
 Verwendbar bis	 Gebrauchsanweisung beachten	 Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft



Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd.
Santa Clara, CA 95051
United States

Tel. +44 161 492 7050
www.agilent.com

TX02438/01

Revision 2021.01