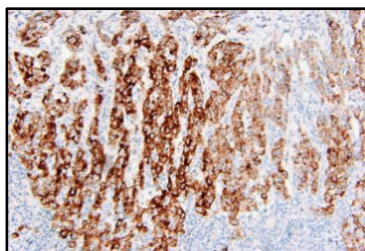


VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-4794

06679072001

IVD  50



Obrázok 1. Expresia analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) na nemalobunkovom karcinóme pľúc.

URČENÉ POUŽITIE

Protilátka VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody je určená na laboratórne použitie na kvalitatívnu detekciu proteínu kináza anaplastického lymfómu (ALK) v tkanive nemalobunkového karcinómu pľúc (NSCLC) fixovanom formalínom, zaliatom v parafíne a farbenom na prístroji BenchMark IHC/ISH. Je indikovaná ako pomôcka pri identifikovaní pacientov, ktorí spĺňajú podmienky na liečbu liekmi XALKORI® (križotinib), ZYKADIA® (ceritinib), ALECENSA® (alektinib) alebo lorlatinib.

Tento produkt má interpretovať kvalifikovaný patológ v spojení s histologickým vyšetrením, relevantnými klinickými informáciami a správnymi kontrolami.

Táto protilátka je určená na diagnostické použitie in vitro (IVD).

SÚHRN A VYSVETLENIE

Protein kináza anaplastického lymfómu (ALK) patrí do inzulínovej receptorovej superrodiny receptorov tyrozínkináz.¹ ALK je membránový glykoproteín typu I, ktorý sa bežne exprimuje v nervovom systéme.² Gén ALK sa nachádza na chromozóme 2p23 a tvorí ho 2 veľké intróny a 26 exónov.¹ Molekulárna patogénéza s ALK sa začína chromozomálnymi prestavbami, ktoré sa párujú s kódujúcimi sekvenciami 3' pre intracelulárnu signalizačnú doménu ALK s promótorovými prvkami a kódujúcimi sekvenciami 5' iných génov. Promótorové prvky a kódujúce sekvencie 5' riadia nadmernú expresiu a oligomerizáciu chimerických proteínov nezávislú na ligandoch, čo sú vlastnosti bežné v ľudských neopláziách fúzneho proteínu tyrozínkinázy.

V roku 2007 bola v bunkových líniiach NSCLC a archivovaných klinických vzorkách objavená inverzia v rámci chromozómu 2p, ktorá viedla k vytvoreniu fúzneho génu zloženého z častí génu podobného proteínu 4 asociovaného s ostatnými mikrotubulmi (EML4) a génu ALK.³ Následná séria publikovaných štúdií naznačila, že inverzie EML4-ALK vytvorili najmenej 9 katalyticky aktívnych variantov fúzneho proteínu kináza, z ktorých každý obsahuje rovnakú časť kinázy domény C-konca ALK.⁴⁻⁸ Tak ako pri fúziách génov ALK prvýkrát identifikovaných v anaplastickom veľkobunkovom lymfóme (ALCL), aj fúzny proteín EML4-ALK preukázal transformačnú aktivitu. V súlade s týmito informáciami bola expresia EML4-ALK v pľúcnych alveolárných epitelových bunkách u transgénnych myši hlásená ako silný onkogénny faktor.⁹

KLINICKÝ VÝZNAM

NSCLC je najbežnejší druh rakoviny pľúc. ALK je v súčasnosti uznávaný ako kľúčový onkogénny faktor NSCLC a hoci je proteín EML4 prevládajúcim partnerom pri fúzii, boli identifikované aj iné partnerské gény.^{10,11} Incidencia prestavieb génu ALK sa pohybuje v rozmedzí od 2 – 7 %, čo v prepočte predstavuje približne 6000 pacientov pozitívnych z hľadiska génu ALK ročne v Spojených štátoch amerických (USA) a 40000 pacientov ročne na celom svete.^{3,4,7}

Prevažná väčšina prestavieb génov ALK v prípade rakoviny pľúc sa vyskytovala skôr vo vzorkách adenokarcinómu než vo vzorkách so skvamóznou alebo malobunkovou histológiou.³⁻⁸ Niektoré dôkazy naznačujú koreláciu medzi prestavbami génov ALK a NSCLC u pacientov, ktorí boli nefajčiari alebo len ľahkí fajčiari, hoci nemusí ísť o štatisticky významný kofaktor.^{3,4,7,9} Dôležité je, že prestavby génu ALK sa zriedkavo zhodujú s mutáciami EGFR, HER2 alebo KRAS, čo preukazuje, že je pozitívna na ALKodlišný podtyp ochorenia.⁹

XALKORI® je selektívny malomolekulový ATP-kompetitívny inhibítor tyrozínkináz ALK, ROS1 a c-Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR) a ich onkogénnych variantov (napr. fúzných proteínov ALK alebo ROS1 alebo mutantných variantov c-Met/HGFR). XALKORI® preukázal inhibíciu ALK závislú od koncentrácie a fosforyláciu c-Met v analýzach založených na bunkách s využitím nádorových bunkových línii. Zároveň preukázal protinádorovú aktivitu u myši so štepom tumoru exprimujúcim fúzne proteíny EML4, alebo NPM-ALK alebo Met.^{12,13,14}

ZYKADIA® je inhibítor kinázy. K cieľom inhibície liekom ZYKADIA® určeným v biochemickej alebo bunkovej analýze pri klinicky relevantných koncentráciách patrí gén ALK, receptor rastového faktora 1 podobný inzulínu (IGF-1R), inzulínový receptor (InsR) a ROS1. ZYKADIA® z nich pôsobí najaktívnejšie proti ALK. ZYKADIA® inhibovala autofosforyláciu ALK, preukazovala inhibíciu fosforylácie nadväzujúceho signálneho proteínu STAT3 sprostredkovanú génom ALK a proliferáciu rakovinových buniek závislých od ALK v analýzach in vitro a in vivo.

ZYKADIA® inhibovala in vitro proliferáciu bunkových línii exprimujúcich fúzne proteíny EML4-ALK a NPM-ALK a preukázala inhibíciu rastu štepu NSCLC pozitívneho na EML4-ALK závislú od dávky u myši a potkanov.¹⁵

Klinický význam preskupenia génov ALK bol preukázaný v randomizovaných, aktívne kontrolovaných, klinických skúšaní lieku XALKORI® vykonávaných spoločnosťou Pfizer a lieku ZYKADIA® vykonávaných spoločnosťou Novartis.^{14,15}

ALECENSA® je vysokoselektívny a silný inhibítor tyrozínkinázy ALK a RET, ktorý inhibuje intracelulárne signálne dráhy zapojené do proliferácie a prežívania nádorových buniek, a preto podporuje smrť rakovinových buniek a inhibuje rast a proliferáciu nádorových buniek.¹⁶ Na základe predklinických údajov nie je ALECENSA® substrátom efluxných transportérov (PGP alebo BCRP) v hematocencefalickej bariére, a preto sa môže distribuovať do centrálneho nervového systému a uchovávať sa v ňom. Regresia tumoru vyvolaná liekom ALECENSA® v predklinických modeloch štepov z cudzieho tkaniva u myši vrátane protinádorovej aktivity v mozgu a predĺžené prežívanie v modeloch intrakraniálnych nádorov u zvierat.¹⁷ ALECENSA® je dobre tolerovaný a poskytuje ovládateľný bezpečnostný profil.^{18 – 20}

Lorlatinib je selektívny malomolekulový adenosíntrifosfát (ATP)-kompetitívny do mozgu prenikajúci inhibítor tyrozínkinázy ALK tretej generácie. Je určený na prekonanie alebo prevenciu hlavných mechanizmov rezistencie, ktoré sa vyvinú po predchádzajúcej liečbe inhibítorom ALK a na preniknutie cez hematocencefalickú bariéru. Lorlatinib je tiež silný inhibítor tyrozínkinázy ROS1.²¹ In vitro lorlatinib silne inhibuje katalytickú aktivitu nezmutovej ALK a širokej škály klinicky relevantných mutantných kináz ALK vrátane tých, ktoré dávajú rezistenciu inhibítorom tyrozínkinázy ALK prvej a druhej generácie.²² Lorlatinib preukázal výraznú protinádorovú aktivitu pri nízkych nanomolárnych koncentráciách voľnej plazmy na zvieracích modeloch ukrývajúcich mutácie ALK, vrátane tých, ktoré dávajú rezistenciu inhibítorom ALK prvej a druhej generácie. Lorlatinib viedol k zmenšeniu nádoru a predĺženiu prežitia tým, že prenikol cez hematocencefalickú bariéru a dosiahol účinnú expozíciu mozgu na ortotopických zvieracích modeloch.^{23,24}

Zhoda protilátok VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (analýza VENTANA anti-ALK (D5F3)) bola preukázaná pomocou súpravy Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (ALK FISH) pri určovaní stavu ALK v NSCLC u pacienta. Súprava ALK FISH môže predstavovať technické problémy pri hodnotení výsledkov farbenia. Intrachromozomálne prestavby môžu viesť k jemnému deleniu signálu, čo môže spôsobiť potenciálne falošné negatívne výsledky.²⁵ Nedávne štúdie naznačujú, že IHC je citlivá a špecifická na určovanie stavu ALK a predstavuje životaschopnú alternatívu súpravy ALK FISH.^{10,11,25,26,27} Analýza VENTANA anti-ALK (D5F3) a jej pridružený algoritmus hodnotenia bola vytvorená na určenie stavu ALK vo vzorkách NSCLC.

V bežnej imunohistochemii (IHC) možno jednoducho použiť malé vzorky tkaniva, vďaka čomu je táto technika v kombinácii s protilátkami na detekciu antigénov dôležitých pri interpretácii karcinómu účinným nástrojom patológa pri diagnóze a prognóze ochorenia. Jedným z dôležitých markerov v NSCLC je ALK.

Interpretáciu výsledkov farbenia vzoriek tkaniva analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) je potrebné vykonať pomocou odporúčaného algoritmu hodnotenia. Histologické tkanivové preparáty majú výhodu neporušenej morfológie tkaniva, čo pomáha pri interpretácii pozitívity ALK danej vzorky. Všetky histologické testy musí interpretovať patológ a výsledky sa musia doplniť morfológickými štúdiami a riadnymi kontrolami a používať v spojení s inými klinickými a laboratórnymi údajmi. Na cieľové antigény IHC analýz má vplyv čas fixácie, typ fixatívu a vek sklíčok s rezmi, preto je potrebné postupovať opatrne pri zabezpečení kompatibility prípravy vzoriek pred farbením (pozrite si pokyny na interpretáciu primárnej protilátky VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody v prípade nemalobunkového karcinómu pľúc (NSCLC) (P/N 1011879) a časť špecifické obmedzenia uvedenú ďalej).

PRINCÍP POSTUPU

Analýza VENTANA anti-ALK (D5F3) je králičia monoklonálna primárna protilátka, ktorá sa viaže na gén ALK v tkanivových rezoch zaliatých v parafíne. Špecifickú protilátku je možné vizualizovať pomocou OptiView DAB IHC Detection Kit (kat. č. 760-700 / 06396500001) a potom OptiView Amplification Kit (kat. č. 760-099 / 06396518001 (50 testov) alebo 860-099 / 06718663001 (250 testov)). Ďalšie informácie nájdete v príslušných metodických listoch k detekčným súpravám OptiView DAB IHC Detection Kit a OptiView Amplification Kit.

DODÁVANÝ MATERIÁL

Analýza VENTANA anti-ALK (D5F3) obsahuje dostatok reagentov na 50 testov.

Jeden 5 mL dávkovač analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) obsahuje približne 70 µg králičej monoklonálnej protilátky (D5F3).

Protilátka sa riedi v PBS proteínovým nosičom a 0.05 % konzervačnou látkou ProClin 300. Koncentrácia špecifickej protilátky je približne 14 µg/mL.

Analýza VENTANA anti-ALK (D5F3) je rekombinantná králičia monoklonálna protilátka, ktorá sa vyrába ako purifikovaný supernatant bunkovej kultúry.

Pokyny na interpretáciu primárnej protilátky VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody pre nemalobunkový karcinóm pľúc (NSCLC) (P/N 1011879).

Podrobné informácie o postupoch nájdete v príslušnom metodickom liste k detekčnej súprave VENTANA: Princíp postupu, Materiál a metódy, Získavanie a príprava vzoriek na analýzu, Postupy kontroly kvality, Riešenie problémov, Interpretácia výsledkov a Obmedzenia.

POTREBNÉ MATERIÁLY, KTORÉ NIE SÚ SÚČASŤOU DODÁVKY

Farbiace reagenty, napr. detekčné súpravy VENTANA, a pomocné komponenty vrátane sklíčok na negatívnu a pozitívnu kontrolu tkaniva nie sú súčasťou dodávky.

Nie všetky produkty uvedené v metodickom liste musia byť dostupné vo všetkých regiónoch. Obráťte sa na miestneho zástupcu podpory.

Nasledujúce reagenty a materiály môžu byť potrebné na farbenie, nie sú však súčasťou dodávky:

1. Vzorky ľudského appendixu alebo ALK-pozitívneho a ALK-negatívneho nemalobunkového karcinómu pľúc na použitie ako kontrolné tkanivo
2. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (kat. č. 790-4795 / 06683380001)
3. Kladne nabité mikroskopické sklíčka
4. OptiView DAB IHC Detection Kit (kat. č. 760-700 / 06396500001)
5. OptiView Amplification Kit (kat. č. 760-099 / 06396518001 (50 testov) alebo kat. č. 860-099 / 06718663001 (250 testov))
6. EZ Prep Concentrate (10X) (kat. č. 950-102 / 05279771001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat. č. 950-300 / 05353955001)
8. LCS (Predilute) (kat. č. 650-010 / 05264839001)
9. ULTRA LCS (Predilute) (kat. č. 650-210 / 05424534001)
10. Cell Conditioning Solution (CC1) (kat. č. 950-124 / 05279801001)
11. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat. č. 950-224 / 05424569001)
12. Hematoxylin II (kat. č. 790-2208 / 05277965001)
13. Bluing Reagent (kat. č. 760-2037 / 05266769001)
14. Permanentné montážne médium
15. Krycie sklíčko
16. Automat na krycie sklíčka
17. Univerzálne laboratórne vybavenie
18. Prístroj BenchMark IHC/ISH

SKLADOVANIE A STABILITA

Po prijatí a vtedy, keď sa nepoužíva, skladujte pri teplote 2 – 8 °C. Nezmrazujte.

Po každom použití je nutné opätovne nasadiť uzáver dávkovača a dávkovač umiestniť hneď do chladničky vo vertikálnej polohe, aby ste zaistili správnu dodávku reagentu a stabilitu protilátky.

Na každom dávkovači protilátky je uvedený dátum expirácie. Ak sa činidlo správne skladuje, zachováva svoje vlastnosti až do dátumu uvedeného na štítku. Nepoužívajte činidlo po dátume expirácie.

PRÍPRAVA VZORIEK

Bežne spracované, fixované formalínom a zaliat v parafíne (FFPE) tkanivá sú vhodné na použitie s touto primárnou protilátkou, ak sa použijú spolu s detekčnými súpravami VENTANA a prístrojmi BenchMark IHC/ISH.

Na základe modelov štepov z cudzieho tkaniva vytvorených z ľudskej bunkovej línie NSCLC NCI-H2228 pozitívnej na ALK sa na fixáciu tkaniva odporúča 10 % neutrálny pufrovaný formalín (NBF) na najmenej 6 hodín. Čas fixácie kratší ako 6 hodín vedie k značnej strate intenzity farbenia v prípade ALK. Prijateľným fixatívom v priebehu času fixácie najmenej 6 hodín je aj zinok-formalín. Použitie množstvo má byť 15- až 20-násobkom objemu tkaniva. Žiadny fixatív neprenikne v priebehu 24 hodín viac ako 2 až 3 mm do pevného tkaniva alebo 5 mm do pórovitého tkaniva. Fixáciu možno vykonať pri izbovej teplote (15 – 25 °C).^{28,29}

Fixatívy ako alkohol-formalín-kyselina octová (AFA), PREFER, B5 a iné fixatívy s obsahom kyseliny a/alebo alkoholu preukázali stratu intenzity farbenia pre ALK vo všetkých testovacích časoch fixácie (1 až 72 hodín). Neodporúča sa používať tieto fixatívy s touto analýzou. Štúdie o oneskorení fixácie zároveň odhalili stratu intenzity farbenia pri ALK, keď vzorky s preparátmi štepu z cudzieho tkaniva neboli fixované do 6 hodín od excízie. Pozri návod na interpretáciu pre ďalšie zváženie vplyvu prípravy vzoriek na intenzitu farbenia ALK.

Narežte rezy hrubé približne 4 µm a uložte ich na kladne nabitú sklenenú sklíčku. Sklíčka sa majú zafarbiť urýchlene, pretože antigénnosť rezaných tkanivových rezov sa môže časom znižovať a je narušená 3 mesiace po narezaní z parafínového bloku (pozri nižšie pokyny na interpretáciu a kapitolu Charakteristika výkonu).

VAROVANIA A BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA

1. Určené na diagnostické použitie in vitro (IVD).
2. Určené len pre odborníkov.
3. Nepoužívajte po vykonaní stanoveného počtu testov.
4. **UPOZORNENIE:** V Spojených štátoch amerických federálny zákon povoľuje predaj tejto pomôcky iba prostredníctvom alebo na objednávku lekára. (Rx Only)
5. Roztok ProClin 300 sa používa ako konzervačná látka v tejto reagentii. Táto látka je zaradená ako dráždivá látka a pri kontakte s kožou môže spôsobiť senzibilizáciu. Pri manipulácii dodržiavajte primerané bezpečnostné opatrenia. Zabráňte kontaktu reagentii s očami, kožou a so sliznicami. Používajte ochranný odev a rukavice.
6. Kladne nabitú sklíčku môžu byť citlivé na vplyvy okolitého prostredia, čo vedie k nevhodnému farbeniu. O ďalšie informácie o tom, ako používať tieto typy sklíčok, požiadajte zástupcu spoločnosti Roche.
7. S materiálmi ľudského alebo živočíšneho pôvodu je potrebné zaobchádzať ako s biologicky nebezpečným materiálom a ich likvidácia musí zahŕňať náležité bezpečnostné opatrenia. V prípade expozície je potrebné dodržiavať zdravotné pokyny zodpovedných orgánov.^{30,31}
8. Zabráňte kontaktu reagentii s očami a sliznicami. Ak sa reagentie dostanú do kontaktu s citlivými oblasťami, zmyte ich veľkým množstvom vody.
9. Zabráňte mikrobiálnej kontaminácii reagentii, pretože to môže spôsobiť nesprávne výsledky.
10. Ďalšie informácie o používaní tohto zariadenia nájdete v používateľskej príručke k prístroju BenchMark IHC/ISH a v návodoch na použitie všetkých potrebných komponentov na stránke dialog.roche.com.
11. Informácie o spôsobe likvidácie získate od miestnych a/alebo štátnych orgánov.
12. Označenie bezpečnosti produktov v prvom rade zodpovedá usmerneniu GHS EÚ. Na požiadanie možno profesionálnemu používateľovi poskytnúť kartu bezpečnostných údajov.
13. Pri hlásení podozrenia na závažné incidenty spojené s touto pomôckou sa obráťte na miestneho zástupcu spoločnosti Roche a kompetentný orgán členského štátu alebo krajiny, v ktorej má používateľ sídlo.

Tento produkt obsahuje komponenty klasifikované v súlade s nariadením (ES) č. 1272/2008 takto:

Tabuľka 1. Informácie o nebezpečnosti.

Nebezpečnosť	Kód	Upozornenie
	H317	Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu.
	P261	Predchádzajte vdychovaniu hmly alebo výparov.
	P272	Kontaminovaný pracovný odev nie je povolené používať mimo pracoviska.
	P280	Noste ochranné rukavice.
	P333 + P313	V prípade podráždenia kože: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.

Nebezpečnosť	Kód	Upozornenie
	P362 + P364	Kontaminovaný odev vyzlečte a pred ďalším použitím vyperte.
	P501	Zneškodnite obsah/nádoby v schválenom zariadení na likvidáciu odpadu.

Tento produkt obsahuje CAS č. 55965-84-9, reakčná zmes 5-chloro-2-metyl-2H-izotiazol-3-ónu a 2-metyl-2H-izotiazol-3-ónu (3:1).

POSTUP FARBENIA

Analýza VENTANA anti-ALK (D5F3) bola vyvinutá na použitie v prístrojoch BenchMark IHC/ISH v kombinácii s detekčnými súpravami Rabbit Monoclonal Negative Control Ig, OptiView DAB IHC Detection Kit, OptiView Amplification Kit a pomocnými reagensiami. Odporúčané protokoly farbenia uvádzajú tabuľky nižšie.

Táto protilátka je optimalizovaná na uvedené časy inkubácie, ale používateľ musí výsledky získané pomocou tejto reagentie overiť. Odchýlenie od protokolu farbenia v Tabuľka 2, Tabuľka 3 alebo Tabuľka 4 môže viesť k falošne pozitívnym alebo falošne negatívnym výsledkom. Pre prístroj BenchMark ULTRA bol vytvorený postup farbenia špecifický pre ALK, **U VENTANA ALK (D5F3)**. Pred výberom podmienok protokolu farbenia z postupu farbenia špecifického pre ALK musí mať prístroj BenchMark ULTRA softvér VSS 12.3 s postupom farbenia OptiView v5 alebo vyššou verziou.

Parametre automatizovaných postupov sa môžu zobrazíť, tlačíť a editovať podľa postupu uvedeného v používateľskej príručke k prístroju. Podrobné informácie o postupoch farbenia v imunohistochemii nájdete v príslušnom metodickom liste k detekčnej súprave VENTANA.

Ďalšie podrobnosti o správnom používaní tejto pomôcky nájdete v metodickom liste inline dávkovača spojenom s P/N 790-4794.

Tabuľka 2. Odporúčaný protokol farbenia pre analýzu VENTANA anti-ALK (D5F3) a Rabbit Monoclonal Negative Control Ig s detekčnou súpravou OptiView DAB IHC Detection Kit a OptiView Amplification Kit v prístrojoch BenchMark ULTRA alebo BenchMark ULTRA PLUS.

Postup farbenia	U VENTANA ALK (D5F3)
Krok protokolu	Zadanie parametrov
Protilátka (primárna)	VENTANA ALK AB – 16 min. (Ak nie je vybraná žiadna reagentia, predvolená bude 4794) -4794 -4796 -7155 -7157 (Vyššie vyberte reagentiu na základe oblasti distribúcie.) alebo Negative Control
Kontrastné farbivo	Hematoxylin II, 4 minúty
Následné kontrastné farbivo	Bluing, 4 minúty

Tabuľka 3. Odporúčaný protokol farbenia pre analýzu VENTANA anti-ALK (D5F3) a Rabbit Monoclonal Negative Control Ig s detekčnou súpravou OptiView DAB IHC Detection Kit a OptiView Amplification Kit v prístrojoch BenchMark XT.

Typ postupu	Metóda
Možnosť synchronizácie IHC	Zvolené ^a
Odstránenie parafínu	Zvolené
Úprava buniek (Odmaskovanie antigénu)	CC1, 92 minút, 100 °C

Typ postupu	Metóda
Inhibitor preprimárnej peroxidázy	Zvolené
Protilátka (primárna)	Ventana anti-ALK (D5F3) [-4794] alebo Rabbit Mono Neg [-4795] 16 minút, 37 °C
OptiView HQ Univ Linker	12 minút
OptiView HRP Multimer	12 minút
OptiView Amplification	Zvolené
OV AMP H2O2, OV Amplifier	8 minút
OV AMP Multimer	8 minút
Kontrastné farbivo	Hematoxylin II, 4 minúty
Následné kontrastné farbivo	Bluing, 4 minúty

^a Tento voliteľný krok sa uplatňuje iba pri použití s detekčnou súpravou XT OptiView DAB v4 a neplatí pre predchádzajúce verzie softvéru.

Tabuľka 4. Odporúčaný protokol farbenia pre analýzu VENTANA anti-ALK (D5F3) a Rabbit Monoclonal Negative Control Ig s detekčnou súpravou OptiView DAB IHC Detection Kit a OptiView Amplification Kit v prístrojoch BenchMark GX.

Typ postupu	Metóda
Odstránenie parafínu	Zvolené
Úprava buniek (Odmaskovanie antigénu)	CC1, 92 minút, 100 °C
Inhibitor preprimárnej peroxidázy	Zvolené
Protilátka (primárna)	Ventana anti-ALK (D5F3) [-4794] alebo Rabbit Mono Neg [-4795] 16 minút, 37 °C
OptiView HQ Univ Linker	12 minút
OptiView HRP Multimer	12 minút
OptiView Amplification	Zvolené
OV AMP H2O2, OV Amplifier	8 minút
OV AMP Multimer	8 minút
Kontrastné farbivo	Hematoxylin II, 4 minúty
Následné kontrastné farbivo	Bluing, 4 minúty

Vzhľadom na variáciu vo fixácii a spracovaní tkaniva a všeobecné laboratórne prístroje a podmienky prostredia môže byť nutné zvýšiť alebo znížiť inkubáciu primárnych protilátok, úpravu buniek alebo predúpravu proteáz na základe individuálnych vzoriek, použitej detekcie a preferencie čitateľa. Ďalšie informácie o premenných fixácie uvádza „Immunohistochemistry Principles and Advances“.³²

POSTUPY KONTROLY KVALITY

Rabbit Monoclonal Negative Control Ig

Spolu s každou vzorkou je nutné merať aj príslušný preparát negatívneho kontrolného činidla, čo slúži ako pomôcka pri interpretácii výsledkov. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig, protilátka negatívneho kontrolného činidla pre túto analýzu a používa sa namiesto primárnej protilátky s cieľom vyhodnotiť nešpecifické farbenie. Postup farbenia negatívnej kontrolnej reagentie sa musí rovnať inkubačnej dobe primárnej protilátky. Použitie odlišného negatívneho kontrolného činidla alebo nepoužitie odporúčaného negatívneho kontrolného činidla môže viesť k nesprávnym výsledkom.

Kontroly na úrovni systému

Kontroly na úrovni systému je potrebné vykonávať so vzorkami pacienta. Môže ísť buď o vzorky tkaniva ľudského appendixu³³, alebo vzorky tkaniva NSCLC, pri ktorých je známe, či sú ALK pozitívne alebo negatívne.

Kontrolné tkanivo musí byť autopsia, biopsia alebo chirurgická vzorka pripravená a zašixovaná čo najskôr rovnakým spôsobom ako testované rezy. Takéto tkanivo môže monitorovať všetky kroky analýzy od prípravy tkaniva po farbenie. Použitie tkanivového rezu fixovaného alebo spracovaného odlišne od testovacej vzorky zabezpečuje kontrolu všetkých reagencií a krokov metódy okrem fixácie a prípravy tkaniva.

Kontroly tkaniva appendixu alebo tkaniva NSCLC pozitívneho alebo negatívneho na ALK

Kontrolné tkanivo pozitívne na ALK a negatívne na ALK musí byť spracované s každým vykonaným postupom farbenia analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3).

Prípady NSCLC s farbením reprezentujúcim klinicky ALK pozitívne a klinicky ALK negatívne výsledky sú vhodné na optimálnu kontrolu kvality vrátane detekcie malej degradácie reagencie alebo problémov s nedodržaním špecifikácie súvisiacej s prístrojom.

Tkanivo ľudského appendixu obsahuje pozitívne a negatívne sa sfarbujujúce prvky pre proteín ALK a je vhodné aj na použitie ako kontrola na úrovni systému. Pozitívne sa sfarbujujúce komponenty tkaniva sa používajú na potvrdenie toho, že bola protilátka aplikovaná a prístroj správne fungoval. Negatívne sa sfarbujujúce prvky sa používajú na detekciu malej degradácie reagencie alebo problémov s nedodržaním špecifikácie súvisiacej s prístrojom.

Vhodné farbenie tkaniva NSCLC pozitívneho alebo negatívneho na ALK a komponenty tkaniva appendixu sú opísané v Tabuľka 5 a Tabuľka 6 a v pokynoch na interpretáciu.

Známe pozitívne a známe negatívne kontrolné tkanivo, ktoré sa používa na monitorovanie účinnosti analýzy ALK na vzorkách pacientov, musí byť fixované a spracované podobným spôsobom ako vzorka pacienta. V opačnom prípade možno kontrolné tkanivá používať iba na monitorovanie správneho fungovania testovacích reagencií. Kontrolné tkanivá sa nemajú používať ako pomôcka pri diagnostikovaní vzoriek pacientov.

Overenie analýzy

Pred počiatočným použitím protilátky alebo systému farbenia pri diagnostickom postupe je potrebné overiť špecifickosť protilátky jej otestovaním na sérii tkanív so známymi charakteristikami IHC výkonu, ktorý predstavuje pozitívne a negatívne tkanivá ALK (pozri Postupy kontroly kvality, ktoré boli odporúčané v tejto časti príbalového letáku a odporúčania Kontroly kvality zo strany College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist³⁴ alebo CLSI Approved Guideline³⁵). Tieto postupy kontroly kvality je potrebné zopakovať pri každej novej šarži protilátky, prípadne ak dôjde k zmene parametrov analýzy. Na overenie analýzy sú vhodné tkanivá NSCLC so známym stavom ALK alebo vzorky ľudského appendixu.

INTERPRETÁCIA FARBenIA / OČAKÁVANÉ VÝSLEDKY

Automatizovaný postup imunofarbenia VENTANA spôsobuje zrazenie do hneď zafarbeného reakčného produktu DAB v miestach antigénu lokalizovaných analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3). Skôr ako sa budú výsledky interpretovať, musí kvalifikovaný patológ so skúsenosťami s IHC postupmi vyhodnotiť negatívne kontrolné reagencie, kontroly na úrovni systému a určiť zafarbený produkt.

Pozitívne/negatívne kontroly tkaniva na úrovni systému

Farbené pozitívne a negatívne kontroly tkaniva je potrebné preskúmať s cieľom zaistiť, že všetky reagencie fungujú správne. Prítomnosť správne sfarbeného produktu reakcie na pozitívnom kontrolnom tkanive v rámci cytoplazmatického farbenia cieľových buniek indikuje pozitívnu reaktivitu.

Ak pozitívna kontrola alebo negatívna kontrola nepreukáže vhodné farbenie alebo preukáže zmenu v klinickej diagnostickej interpretácii, akékoľvek výsledky testovacích vzoriek treba považovať za neplatné.

Tabuľka 5. Kritériá hodnotenia kontroly tkaniva appendixu. Reprezentatívne obrázky sú uvedené v pokynoch na interpretáciu.

Prijateľné	Neprijateľné
Prítomnosť silného granulovaného cytoplazmatického farbenia v gangliónových bunkách. (Pozrite si poznámku)	Nepítomnosť silného granulovaného cytoplazmatického farbenia v gangliónových bunkách.

Prijateľné	Neprijateľné
Nepítomnosť silného granulovaného cytoplazmatického farbenia v bunkách žľazového epitelu, svaly a lymfoidnom tkanive (nedostatočné alebo riedke farbenie lymforetikulárnych buniek v lymfoidných agregátoch).	Nadmerné nešpecifické farbenie pozadia žľazových epitelových buniek, svaly alebo lymfoidného tkaniva, ktoré ovplyvňujú hodnotenie.

Poznámka: Nerv vo svalových vrstvách appendixu vykazuje pozitívne farbenie.

Negatívna kontrolná reagencia

Nešpecifické farbenie, ak je prítomné, bude mať difúzny vzhľad. Je ho možné vyhodnotiť pomocou sklička s negatívnou kontrolnou reagentiou zafarbenou pomocou súpravy Rabbit Monoclonal Negative Control Ig. Na interpretáciu výsledkov zafarbenia treba použiť intaktné bunky, pretože nekrotické alebo degenerované bunky majú často nešpecifické zafarbenie. Ak je farbenie pozadia nadmerné, výsledky testovanej vzorky treba považovať za neplatné. Príklady farbenia pozadia na prijateľnej úrovni pre túto analýzu nájdete v pokynoch na interpretáciu.

Tkanivo pacienta

Tkanivo pacienta musí byť hodnotené podľa algoritmu hodnotenia analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3), ktorý uvádza Tabuľka 6. Pozrite si pokyny na interpretáciu.

Tabuľka 6. Algoritmus hodnotenia analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3). Reprezentatívne obrázky sú uvedené v pokynoch na interpretáciu.

Klinická interpretácia	Popis zafarbenia
Pozitívne na ALK	Prítomnosť silného granulovaného cytoplazmatického farbenia v nádorových bunkách (akékoľvek percento pozitívnych nádorových buniek). Určité prvky farbenia je potrebné vylúčiť vrátane: - ľahkého cytoplazmatického bodkovania v alveolárnych makrofágoch, - buniek neurálneho pôvodu (nervové a gangliónové bunky), - farbenia žľazového epitelu a - roztrúsených lymforetikulárnych buniek s lymfocytickými infiltrátmi. Určité farbenie pozadia možno pozorovať aj v normálnej sliznici pri NSCLC (vrátane mucinu) a v nekrotických oblastiach nádoru, ktoré je potrebné vylúčiť z klinického hodnotenia.
Negatívne na ALK	Nepítomnosť silného granulovaného cytoplazmatického farbenia v nádorových bunkách.

ŠPECIFICKÉ OBMedZENIA

- Táto analýza nebola potvrdená na používanie s cytologickými stermi alebo dekalifikovanými vzorkami.
- Tkanivo pacienta sa musí zafarbiť do 3 mesiacov od rezu z bloku tkaniva. Pri analýze VENTANA anti-ALK (D5F3) bola na rezoch uložených pri izbovej teplote dlhšie ako 3 mesiace pozorovaná strata účinnosti farbenia.
- S analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) boli pozorované určité artefakty farbenia. Na farbených sklíčkach kontrolnej reagencie anti-ALK aj negatívnej kontrolnej reagencie môže byť v alveolárnych makrofágoch prítomné ľahké granulované cytoplazmatické bodkovanie, ktoré naznačuje, že ide o artefakt systému detekcie a nemalo by sa hodnotiť ako pozitívne farbenie anti-ALK. Okrem toho bolo pozorované bodové farbenie v nekrotických oblastiach nádoru. Ani takéto farbenie by sa počas hodnotenia vzorky pacienta nemalo zohľadňovať. S analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) bolo pozorované aj farbenie nervového tkaniva vrátane nervu a príležitostných lymforetikulárnych buniek v rámci lymfocytického infiltrátu. Ďalšiu diskusiu nájdete v pokynoch na interpretáciu.
- Na kontrolných tkanivách možno pozorovať miernu variabilitu celkovej intenzity farbenia spôsobenú súpravou OptiView Amplification Kit. Príklady prijateľnej účinnosti farbenia nájdete v pokynoch na interpretáciu.

CHARAKTERISTIKA VÝKONU

ANALYTICKÁ ÚČINNOSŤ

Vykonal sa testy farbenia na zistenie citlivosti, špecifickosti, presnosti a metódy zrovnania a výsledky sú uvedené nižšie.

Citlivosť a špecifickosť

Tabuľka 7. Citlivosť/špecifickosť analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) sa stanovila testovaním FFPE normálnych tkanív.

Tkanivo	Počet pozitívnych/všetkých prípadov	Tkanivo	Počet pozitívnych/všetkých prípadov
Mozog ^a	0/3	Týmus	0/3
Mozoček	0/3	Myeloidný (kostná dreň)	0/3
Nadoblička	0/3	Pľúca	0/3
Vaječník	0/3	Srdce	0/3
Pankreas	0/3	Pažerák	0/3
Prištítna teliesko	0/3	Žalúdok	0/3
Podmozgová žľaza ^b	0/3	Tenké črevo ^c	0/3
Semenník	0/3	Hrubé črevo ^c	0/3
Štítna žľaza	0/3	Pečeň	0/3
Prsník	0/3	Slinná žľaza	0/3
Slezina	0/3	Oblička	0/3
Mandľa	0/3	Prostata	0/3
Endometrium	0/3	Krčok maternice	0/3
Kostrový sval	0/4	Koža	0/3
Nerv (rozptýlený)	0/3	Mezotel	0/3

^a 2/3 Niekoľko gliových buniek v mozgu vykázalo slabú až miernu pozitívitu.

^b 3/3 Podmozgová žľaza vykázala slabé farbenie.

^c Gangliónové bunky v rámci 4/6 črevných tkanív sa zafarbili pozitívne na ALK v rôznej intenzite.

Tabuľka 8. Citlivosť/špecifickosť analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) sa stanovila testovaním rôznych FFPE tkanív.

Patológia	Počet pozitívnych/všetkých prípadov
Glioblastóm (mozog)	0/1
Meningeóm (mozog)	0/1
Ependymóm (mozog)	0/1
Oligodendroglióm (mozog)	0/1
Serózný adenokarcinóm (vaječník)	1/1
Adenokarcinóm (vaječník)	0/1
Neuroendokrinná neoplázia (pankreas)	0/1
Adenokarcinóm (pankreas)	0/1
Seminóm (semenník)	0/1
Embryonálny karcinóm (semenník)	0/1

Patológia	Počet pozitívnych/všetkých prípadov
Medulárny karcinóm (štítna žľaza)	0/1
Papilárny karcinóm (štítna žľaza)	0/1
Duktálny karcinóm in situ (prsník)	0/1
Invazívny duktálny karcinóm (prsník)	0/2
Lymfóm B-buniek, NOS (slezina)	0/3
Malobunkový karcinóm (pľúca)	0/1
Karcinóm skvamóznych buniek (pľúca)	0/1
Adenokarcinóm (pľúca)	0/1
Karcinóm skvamóznych buniek (pažerák)	0/1
Adenokarcinóm (pažerák)	0/1
Mucinózný adenokarcinóm (žalúdok)	0/1
Adenokarcinóm (gastrointestinálny)	0/1
Gastrointestinálny stromálny tumor (GIST) (hrubé črevo)	0/1
Adenokarcinóm (konečník)	0/1
Gastrointestinálny stromálny tumor (GIST) (konečník)	0/1
Hepatocelulárny karcinóm (pečeň)	0/1
Hepatoblastóm (pečeň)	1/1
Jasnobunkový karcinóm (oblička)	0/1
Adenokarcinóm (prostata)	0/2
Leiomyóm (maternica)	0/1
Adenokarcinóm (maternica)	0/1
Jasnobunkový karcinóm (maternica)	0/1
Karcinóm skvamóznych buniek (maternica)	0/2
Embryonálny rabdomyosarkóm	0/1
Melanóm (anus)	0/1
Karcinóm z bazálnych buniek (koža)	0/1
Karcinóm skvamóznych buniek (koža)	0/1
Neurofibróm (lumbárny)	0/1
Neuroblastóm (retroperitoneum)	1/1
Mezotelióm	0/1
Hodgkinov lymfóm (lymfatická uzlina)	0/1
Anaplastický veľkobunkový lymfóm (lymfatická uzlina)	0/1
Urotelový karcinóm (močový mechúr)	0/1
Leiomyosarkóm	0/2
Osteosarkóm	0/1
Rabdomyosarkóm vretenovitých buniek	0/1

Zhoda platforiem (Premost'ovacia štúdia)

Analýza VENTANA anti-ALK (D5F3) bola najprv vydaná v prístrojoch BenchMark XT a GX. Na preukázanie rovnakého výkonu analýzy medzi prístrojmi BenchMark ULTRA a BenchMark XT bola vykonaná premost'ovacia štúdia. Táto štúdia hodnotila klinický stav ALK (na základe algoritmu hodnotenia ALK, ktorý uvádza Tabuľka 6) v 184 jedinečných vzorkách NSCLC farbených analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) v oboch platformách. Výsledné zafarbené sklička boli zaslepené a randomizované a potom ich vyhodnotili traja patológovia. Výsledky zhody platforiem v rámci tejto štúdie uvádza Tabuľka 9 a Tabuľka 10.

Tabuľka 9. Zhoda výsledkov medzi prístrojmi BenchMark XT a BenchMark ULTRA.

Zhoda analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) medzi prístrojmi BenchMark ULTRA a BenchMark XT			
BenchMark ULTRA	BenchMark XT		Celkom
	Pozitívne	Negatívne	
Pozitívne	85	1	86
Negatívne	1	97	98
Celkom	86	98	184

Tabuľka 10. Zhoda stavu ALK medzi prístrojmi BenchMark XT a BenchMark ULTRA.

Miera zhody týkajúca sa zhody medzi platformami	Percento pozitívnej zhody (95 % CI)	Percento negatívnej zhody (95 % CI)	Percento celkovej zhody (95 % CI)
Zhoda medzi prístrojmi BenchMark XT a BenchMark ULTRA	98.8 % (93.7 – 99.8 %)	99.0 % (94.4 – 99.8 %)	98.9 % (96.1 – 99.7 %)

Hrúbka tkaniva

Hrúbka tkaniva bola hodnotená s použitím 4 jedinečných prípadov ľudského NSCLC (3 ALK pozitívne a 1 ALK negatívne) a 4 jedinečných prípadov ľudského apendixu. Tkanivá boli narezané a testované duplicitne vo veľkostiach 3, 4, 5, 6 a 7 mikróv. Všetky hrúbky tkaniva vykazovali vhodné špecifické farbenie pre ALK a vhodné úrovne pozadia pre analýzu VENTANA anti-ALK (D5F3). V rozsahu tejto hrúbky nevykazovali žiadne vzorky zmenu klinického stavu ALK. Vzorky na analýzu sa majú rezať na 4 – 6 mikróv.

Štúdie opakovateľnosti a strednej presnosti

Opakovateľnosť a stredná presnosť analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) boli hodnotené v prístrojoch BenchMark ULTRA, XT a GX v kombinácii so súpravami OptiView DAB IHC Detection a OptiView Amplification.

Desať jedinečných vzoriek tkaniva NSCLC (5 ALK pozitívnych a 5 ALK negatívnych) bolo hodnotených v prístrojoch BenchMark XT a BenchMark ULTRA. Pri testovaní presnosti v rámci dňa sa 5 replík skličiek z každej zo vzoriek NSCLC farbil v jednom prístroji BenchMark XT alebo jednom prístroji BenchMark ULTRA. Pri testovaní presnosti v rámci prístroja sa 3 replíky skličiek každej zo vzoriek NSCLC zafarbili analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) v troch prístrojoch BenchMark XT a 2 replíky skličiek každej zo vzoriek NSCLC sa zafarbili v troch prístrojoch BenchMark ULTRA. V prípade presnosti medzi dňami sa 2 replíky skličiek z každej zo vzoriek NSCLC zafarbili analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) v jednom prístroji BenchMark XT alebo BenchMark ULTRA počas 5 po sebe nasledujúcich dní. Všetky sklička boli zaslepené a randomizované v rámci kohorty tkanív každého prístroja. Každú kohortu hodnotil individuálne patológ pomocou algoritmu hodnotenia analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) (uvádza Tabuľka 6). Každá replikovaná vzorka NSCLC dosiahla rovnaké výsledky IHC farbenia ALK. Zhmutie výsledkov opakovateľnosti a strednej presnosti pre prístroje BenchMark XT a BenchMark ULTRA nájdete jednotlivo v Tabuľka 11 a Tabuľka 12.

Bola vykonaná štúdia presnosti medzi platformami, ktorá porovnávala výkon analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) v prístrojoch BenchMark XT a BenchMark GX. V tejto štúdii boli hodnotené dva viackaniové bloky, z ktorých každý obsahoval 8 vzoriek NSCLC (3 ALK pozitívne, 1 ALK negatívna na každý blok). Pri tomto porovnaní bolo 5 replík sklička farbených v troch prístrojoch BenchMark XT a troch prístrojoch BenchMark GX. Tieto sklička boli hodnotené z hľadiska vhodného farbenia na základe IHC algoritmu hodnotenia VENTANA anti-ALK (D5F3), ktorý uvádza Tabuľka 6. Každá replikovaná

vzorka NSCLC dosiahla rovnaké výsledky IHC farbenia ALK medzi danými dvomi platformami. Súhrn výsledkov uvádza Tabuľka 13.

Okrem toho bola hodnotená opakovateľnosť farbenia analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) na ľudskom apendixe (kontrola na systémovej úrovni). V tejto štúdii bolo použitých osem jedinečných tkanív ľudského apendixu. Pri testovaní presnosti v rámci dňa bolo zafarbených 13 replík skličiek z dvoch viackaniových blokov so 4 vzorkami apendixu v jednom prístroji BenchMark XT. V prípade presnosti medzi prístrojmi bolo farbených 5 replík skličiek z dvoch viackaniových blokov so 4 vzorkami apendixu, pričom každá bola farbená analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) v troch prístrojoch BenchMark XT. V prípade presnosti medzi dňami sa 5 replík skličiek z každého z dvoch viackaniových blokov so 4 vzorkami apendixu farbilo analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) v jednom prístroji BenchMark XT počas 5 po sebe nasledujúcich dní. Všetky sklička vyhodnotil patológ pomocou príručky na hodnotenie analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) pre kontrolné tkanivo apendixu (uvedené v Tabuľka 5). Každá replikovaná vzorka apendixu dosiahla rovnaké výsledky IHC farbenia ALK. Percento celkovej zhody pri opakovateľnosti v rámci dňa a medzi prístrojmi (v 3 prístrojoch) bolo 100 % a opakovateľnosť medzi dňami (v priebehu 5 po sebe nasledujúcich dní) dosiahlo 98 %.

Tabuľka 11. Opakovateľnosť a stredná presnosť analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) pri individuálnych vzorkách NSCLC farbených v prístroji BenchMark XT.

Opakovateľnosť/presnosť na tkanive NSCLC	N = Celkový počet skličiek hodnotených v kohorte	Percento celkovej zhody pri stave ALK (95 % CI)
Opakovateľnosť v rámci dňa	50	100 % (97.5 – 100 %)
Presnosť v rámci platformy (v 3 prístrojoch BenchMark XT)	60	100 % (97.9 – 100 %)
Presnosť medzi dňami (5 po sebe nasledujúcich dní)	100	100 % (98.7 – 100 %)

Tabuľka 12. Opakovateľnosť a stredná presnosť analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) pri individuálnych vzorkách NSCLC farbených v prístroji BenchMark ULTRA.

Opakovateľnosť/presnosť na tkanive NSCLC	N = Celkový počet skličiek hodnotených v kohorte	Percento celkovej zhody pri stave ALK (95 % CI)
Opakovateľnosť v rámci dňa	50	100 % (92.9 – 100.0 %)
Presnosť v rámci platformy (v 3 prístrojoch BenchMark ULTRA)	60	100 % (94.0 – 100.0 %)
Presnosť medzi dňami (5 po sebe nasledujúcich dní)	100	100 % (96.3 – 100.0 %)

Tabuľka 13. Presnosť analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) medzi platformami na viackaniovom bloku vzoriek NSCLC s použitím prístrojov BenchMark XT a BenchMark GX.

Presnosť na tkanive NSCLC	N = Celkový počet skličiek hodnotených v kohorte	Percento celkovej zhody pri stave ALK
Presnosť medzi platformami prístrojov BenchMark XT a BenchMark GX (v 3 prístrojoch)	30	100 %

Reprodukovateľnosť medzi šaržami

Reprodukovateľnosť medzi šaržami analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) bola určená testovaním troch šarží analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) na 38 jedinečných prípadoch NSCLC (21 ALK pozitívnych vzoriek (z 18 jedinečných prípadov) a 20 ALK negatívnych

vzorok tkaniva NSCLC) v prístroji BenchMark XT pomocou detekčných súprav OptiView DAB IHC Detection a OptiView Amplification. Všetky prípady sa zafarbili duplicitne s každou z troch šarží primárnej protilátky. Sklička boli zaslepené a randomizované pred vyhodnotením klinického stavu podľa algoritmu hodnotenia analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) (uvedený v Tabuľka 6). Všetky tri šarže protilátky preukázali viac ako na 90 % zhodné výsledky farbenia pri stave ALK v 41 hodnotených vzorkách tkaniva NSCLC. Výsledky sú uvedené ako percento celkovej zhody, miera priemernej pozitívnej zhody a priemernej negatívnej zhody. Miera celkového percenta zhody medzi šaržami bola 99.2 %, a preto je analýza VENTANA anti-ALK (D5F3) opakovateľná, pokiaľ ide o výsledky farbenia v šaržiach protilátky. Výsledky uvádza Tabuľka 14.

Reprodukovateľnosť analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) medzi šaržami pomocou prístroja BenchMark ULTRA bola určená testovaním troch šarží analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) na 30 jedinečných prípadoch NSCLC (15 ALK pozitívnych vzoriek a 15 ALK negatívnych vzoriek tkaniva NSCLC) pomocou detekčných súprav OptiView DAB IHC Detection a OptiView Amplification. Všetky prípady sa zafarbili duplicitne s každou z troch šarží primárnej protilátky. Sklička boli zaslepené a randomizované pred vyhodnotením klinického stavu podľa algoritmu hodnotenia analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) (uvedený v časti Tabuľka 6) patológom. Všetky tri šarže protilátky preukázali viac ako na 90 % zhodné výsledky farbenia pri stave ALK v 30 hodnotených vzorkách tkaniva NSCLC. Výsledky sú uvedené ako percento celkovej zhody, miera priemernej pozitívnej zhody a priemernej negatívnej zhody. Miera celkového percenta zhody medzi šaržami bola 99.1 %, a preto je analýza VENTANA anti-ALK (D5F3) opakovateľná, pokiaľ ide o výsledky farbenia v šaržiach protilátky. Výsledky uvádza Tabuľka 15.

Hodnotená bola aj reprodukovateľnosť analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) medzi šaržami pomocou 12 jedinečných vzoriek tkaniva ľudského appendixu. Reprodukovateľnosť bola určená testovaním troch šarží protilátky v kombinácii s tromi šaržami súprav OptiView DAB IHC Detection a OptiView Amplification v troch prístrojoch BenchMark XT. Celková miera zhody pri prvkoch vhodného pozitívneho a negatívneho farbenia appendixu pomocou analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) bola 100 %.

Tabuľka 14. Miery zhody reprodukovateľnosti medzi šaržami medzi 41 vzorkami tkaniva NSCLC v prístroji BenchMark XT. Testovaných bolo 21 ALK pozitívnych vzoriek (z 18 jedinečných prípadov) a 20 ALK negatívnych vzoriek.

Miery zhody reprodukovateľnosti medzi šaržami	Priemerná pozitívna zhoda (95 % CI)	Priemerná negatívna zhoda (95 % CI)	Percento celkovej zhody (95 % CI)
Priemer všetkých troch porovnaní medzi šaržami	99.2 % (97.4 – 100 %)	99.1 % (96.8 – 100.0 %)	99.2 % (97.5 – 100 %)

Tabuľka 15. Miery zhody reprodukovateľnosti medzi šaržami medzi 30 vzorkami tkaniva NSCLC v prístroji BenchMark ULTRA. Testovaných bolo 15 ALK pozitívnych vzoriek a 15 ALK negatívnych vzoriek.

Miery zhody reprodukovateľnosti medzi šaržami	Percento pozitívnej zhody (95 % CI)	Percento negatívnej zhody (95 % CI)	Percento celkovej zhody (95 % CI)
Priemer všetkých troch porovnaní medzi šaržami	98.9 % (96.8 – 99.6 %)	99.3 % (97.3 – 99.8 %)	99.1 % (97.9 – 99.6 %)

Štúdie presnosti medzi čitateľmi

Bolo vykonaných niekoľko štúdií presnosti medzi čitateľmi: dve štúdie v prístroji BenchMark XT a jedna v prístroji BenchMark ULTRA.

V štúdiu presnosti medzi čitateľmi v prístroji BenchMark XT hodnotili traja patológovia celkovo 185 jedinečných prípadov. 185 prípadov korelovalo so 100 ALK pozitívnymi a 100 ALK negatívnymi blokmi, ktoré boli farbené analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3). Prípady boli pred vyhodnotením výsledkov IHC farbenia pre ALK zaslepené a randomizované podľa algoritmu hodnotenia analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3), ako uvádza Tabuľka 6. Výsledky, ktoré uvádza Tabuľka 16 nižšie, odrážajú miery presnosti čitateľa a presnosti medzi čitateľmi pre jedinečné prípady z kohorty štúdie.

Tabuľka 16. Štúdia presnosti medzi čitateľmi č. 1 v prístroji BenchMark XT

Presnosť medzi čitateľmi	Priemerná pozitívna zhoda (95 % CI)	Priemerná negatívna zhoda (95 % CI)	Percento celkovej zhody (95 % CI)
Priemer porovnaní všetkých troch čitateľov	98.8 % (97.3 – 100 %)	99.0 % (97.7 – 100 %)	98.9 % (97.4 – 100 %)

Štúdia presnosti medzi čitateľmi č. 2 na prístroji BenchMark XT bola vykonaná na kohorte prípadov z randomizovanej klinickej štúdie vzoriek pacientov s ALK pozitívnym NSCLC zaradených pomocou súpravy Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Približne 300 prípadov bolo farbených analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) v prístroji BenchMark XT. Prípady boli zaslepené z hľadiska stavu ALK FISH, randomizované a poskytnuté trom čitateľom, ktorí hodnotili výsledky IHC farbenia ALK podľa algoritmu hodnotenia analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3), ktorý uvádza Tabuľka 6. Výsledky, ktoré uvádza Tabuľka 17, odrážajú miery presnosti medzi čitateľmi z tejto kohorty klinického skúšania.

V prípade štúdie presnosti medzi čitateľmi na prístroji BenchMark ULTRA bola hodnotená kohorta 184 jedinečných prípadov NSCLC. Kohorta pozostávala z 90 ALK pozitívnych a 94 ALK negatívnych prípadov farbených analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) v prístroji BenchMark ULTRA. Prípady boli zaslepené, randomizované a poskytnuté trom čitateľom, ktorí hodnotili výsledky IHC farbenia ALK podľa algoritmu hodnotenia analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3), ktorý uvádza Tabuľka 6. Tabuľka 18 odráža mieru presnosti medzi čitateľmi z tejto štúdie.

Tabuľka 17. Štúdia presnosti medzi čitateľmi č. 2 z hľadiska stavu ALK vo vzorkách NSCLC získaných z kohorty č. 1 klinického porovnania metód farbených analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) v prístroji BenchMark XT.

Presnosť medzi čitateľmi	Priemerná pozitívna zhoda (95 % CI)	Priemerná negatívna zhoda (95 % CI)	Percento celkovej zhody (95 % CI)
Priemer porovnaní všetkých troch čitateľov	97.6 % (95.0 – 99.5 %)	99.5 % (98.9 – 99.9 %)	99.1 % (98.2 – 99.8 %)
Čitateľ 1 verzus čitateľ 2	99.1 % (97.1 – 100 %)	99.8 % (99.4 – 100 %)	99.7 % (98.2 – 99.9 %)
Čitateľ 1 verzus čitateľ 3	96.3 % (92.3 – 99.2 %)	99.2 % (98.3 – 99.8 %)	98.6 % (96.6 – 99.5 %)
Čitateľ 2 verzus čitateľ 3	97.2 % (93.5 – 100 %)	99.4 % (98.6 – 100 %)	99.0 % (97.1 – 99.7 %)

Tabuľka 18. Štúdia presnosti medzi čitateľmi z hľadiska stavu ALK vo vzorkách NSCLC farbených analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) v prístroji BenchMark ULTRA.

Presnosť medzi čitateľmi	Priemerná pozitívna zhoda (95 % CI)	Priemerná negatívna zhoda (95 % CI)	Percento celkovej zhody (95 % CI)
Priemer porovnaní všetkých troch čitateľov	98.4 % (96.5 – 99.6 %)	98.6 % (96.9 – 99.7 %)	98.5 % (96.7 – 99.6 %)
Čitateľ 1 verzus čitateľ 2	98.9 % (96.8 – 100 %)	98.9 % (97.0 – 100 %)	98.9 % (96.0 – 99.7 %)
Čitateľ 1 verzus čitateľ 3	98.8 % (96.7 – 100 %)	99.0 % (97.2 – 100 %)	98.9 % (96.0 – 99.7 %)
Čitateľ 2 verzus čitateľ 3	97.6 % (94.7 – 99.4 %)	97.9 % (95.4 – 99.5 %)	97.8 % (94.4 – 99.1 %)

Zhoda s ALK FISH

Tri kohorty boli použité na porovnanie výsledkov farbenia z analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) s ALK FISH z hľadiska klinického stavu ALK. Tieto kohorty zahŕňali škálu vzoriek ľudského tkaniva NSCLC z primárnych a metastatických nádorov aj z resekcií, ihlových

biopsií, bronchiálnych biopsií a blokov buniek FFPE z FNA. Všetky štúdie boli hodnotené pomocou algoritmu hodnotenia (opísaný v Tabuľka 6).

Štúdia zhody č. 1

V externom laboratóriu bola vykonaná štúdia porovnávajúca analýzu VENTANA anti-ALK (D5F3) s retrospektívnymi údajmi súpravy Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Na externom pracovisku bolo zafarbených približne 100 prípadov NSCLC pomocou analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) v prístroji BenchMark XT. Analýza VENTANA anti-ALK (D5F3) preukázala > 98 % celkovej zhody s retrospektívnymi údajmi súpravy Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit v tejto kohorte vzoriek NSCLC. Podrobné výsledky uvádza Tabuľka 19 a Tabuľka 20. Všimnite si, že v 86 zo 100 prípadov boli k dispozícii údaje FISH a bol prítomný dostatočný nádor na porovnanie s IHC výsledkom ALK.

Tabuľka 19. Analýza VENTANA anti-ALK (D5F3) v porovnaní so súpravou od spoločnosti Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

Porovnanie analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) so súpravou Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit			
Analýza VENTANA anti-ALK (D5F3)	Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Celkom
	Pozitívne	Negatívne	
Pozitívne	10	0	10
Negatívne	1	75	76
Celkom	11	75	86

Tabuľka 20. Percento celkovej, miera pozitívnej a miera negatívnej zhody pri analýze VENTANA anti-ALK (D5F3) v porovnaní so súpravou Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit.

Percento celkovej, miera pozitívnej a miera negatívnej zhody			
Miera	n/N	%	95 % CI ^a
Percento celkovej zhody	85/86	98.8	93.7, 99.8
Percento pozitívnej zhody	10/11	90.9	62.3, 98.4
Percento negatívnej zhody	75/75	100.0	95.1, 100.0

^a 95 % obojstranné intervaly spoľahlivosti boli vypočítané pomocou metódy hodnotenia.

Upozorňujeme, že príprava vzorky tkaniva z tejto štúdie nebola overená z hľadiska dodržiavania postupov prípravy vzoriek odporúčaných pre túto analýzu.

Štúdia zhody č. 2

V druhom externom laboratóriu bola vykonaná štúdia porovnávajúca analýzu VENTANA anti-ALK (D5F3) s údajmi súpravy Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit na 73 prípadoch NSCLC (narezané v priebehu jedného týždňa od farbenia). Na externom pracovisku boli zafarbené prípady pomocou analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) v prístroji BenchMark XT. Analýza VENTANA anti-ALK (D5F3) preukázala > 93 % celkovej zhody s retrospektívnymi údajmi súpravy Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit v tejto kohorte vzoriek NSCLC. Podrobné výsledky uvádza Tabuľka 21 a Tabuľka 22.

Tabuľka 21. Analýza VENTANA anti-ALK (D5F3) v porovnaní so súpravou Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

Porovnanie analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) so súpravou Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit			
Analýza VENTANA anti-ALK (D5F3)	Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Celkom
	Pozitívne	Negatívne	
Pozitívne	2	4	6
Negatívne	0	56	56
Celkom	2	60	62

Tabuľka 22. Percento celkovej, miera pozitívnej a miera negatívnej zhody pri analýze VENTANA anti-ALK (D5F3) v porovnaní so súpravou Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit.

Percento celkovej, miera pozitívnej a miera negatívnej zhody			
Miera	n/N	%	95 % CI ^a
Percento celkovej zhody	58/62	93.5 %	84.6-97.5
Percento pozitívnej zhody	2/2	100 %	34.2-100.0
Percento negatívnej zhody	56/60	93 %	84.1-97.4

^a 95 % obojstranné intervaly spoľahlivosti boli vypočítané pomocou metódy hodnotenia.

Zo štyroch nezhodujúcich sa prípadov (FISH negatívny, ALK IHC pozitívny) boli ďalšie nezafarbené sklička testované ďalším ALK (iný klon a systém detekcie). Tri zo štyroch prípadov sa zhodovali s analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) z hľadiska zisteného IHC farbenia ALK.

Vyskytlo sa aj 10 prípadov, v ktorých neboli určené výsledky alebo vykonaná analýza FISH. Štyri z týchto prípadov boli pozitívne podľa analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) a s iným klonom ALK a šesť bolo negatívnych podľa IHC ALK. Jeden prípad bol pozitívny podľa FISH, avšak vzorka bola nedostatočná na farbenie pomocou IHC.

Štúdia zhody č. 3

V tejto štúdii bolo približne 300 prípadov z prebiehajúcej celosvetovej klinickej štúdie pacientov s NSCLC pozitívnym na ALK zaradených pomocou súpravy Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit farbených analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3). Ide o rovnakú kohortu, ktorá bola rozoberaná v časti o štúdiách presnosti medzi čitateľmi. Z približne 300 prípadov boli niektoré charakterizované ako „neinformatívne“ podľa FISH alebo „analýza FISH nebola vykonaná“ a dané prípady boli zafarbené a hodnotené iba na informačné účely.

Prípady boli zaslepené z hľadiska stavu FISH, randomizované a poskytnuté dvom čitateľom, ktorí hodnotili výsledky farbenia. Výsledky boli porovnané so stavom FISH získaným z celosvetovej klinickej štúdie.

Výsledky porovnania ALK IHC s ALK FISH uvádza Tabuľka 23.

Tabuľka 23. Zhoda analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) so súpravou Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit hodnotená 2 patológmi.

Porovnanie analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) so súpravou Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit				
Analýza VENTANA anti-ALK (D5F3)		Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Celkom
Čitateľ ¹		Pozitívne	Negatívne	
Čitateľ ¹	Pozitívne	37	13	50
	Negatívne	11	223	234
	Celkom	48	236	284
Čitateľ ²	Pozitívne	37	12	49
	Negatívne	11	225	236
	Celkom	48	237	285

Upozorňujeme, že príprava vzoriek tkaniva z tejto štúdie nebola overená z hľadiska dodržiavania postupov prípravy vzoriek odporúčaných pre túto analýzu.

Nezhodujúce sa prípady, ktoré boli z hľadiska analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) pozitívne na ALK, negatívne na ALK FISH:

- 4 prípady hodnotil najmenej jeden čitateľ ako ALK IHC pozitívne a FISH negatívne. Na základe preskúmania zhody bolo určené, že by sa mali hodnotiť ako IHC

negatívne. Tieto prípady mali fokálne cytoplazmatické/membránové farbenie a sú vysvetlené v pokynoch na interpretáciu.

- 9 ALK IHC pozitívnych a ALK FISH negatívnych prípadov bolo považovaných za skutočne nezhodujúce sa.

Z 9 nezhodujúcich sa prípadov malo 7 nezafarbené sklička, ktoré boli k dispozícii na ďalšie diagnostické testovanie ALK (molekulárne testovanie a testovanie IHC pomocou iného klonu a systému detekcie). Tieto výsledky doplnkového testovania naznačili, že väčšina nezhodujúcich sa prípadov uprednostnila pri stave ALK pozitívne hodnotenie IHC, keď bola ALK FISH negatívna. (Všimnite si, že narezané sklička z týchto prípadov presiahli odporúčané 3 mesiace).

Nezhodujúce sa prípady, ktoré boli z hľadiska analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) negatívne a ALK FISH pozitívne:

- 11 prípadov bolo pozitívnych podľa FISH, ale negatívnych podľa analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3). 10 prípadov malo nezafarbené sklička, ktoré boli k dispozícii na ďalšie diagnostické testovanie ALK pomocou molekulárnych technik a IHC. Tieto výsledky doplnkového testovania naznačili, že väčšina prípadov, ktoré boli negatívne podľa analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3), boli negatívne aj podľa iného systému ALK IHC, no podľa jednej alebo viacerých molekulárnych analýz boli pozitívne. Všimnite si, že sklička s rezmi z týchto prípadov presiahli odporúčané 3 mesiace pre ALK IHC.
- A na záver, 14 prípadov v kohorte bolo podľa FISH neinformatívnych (neboli získané žiadne výsledky). Z nich 3 hodnotili obaja čitatelia ako pozitívne podľa analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3). Okrem toho, v 19 prípadoch nebolo možné analýzu FISH vykonať na základe sklička H&E (zvyčajne z dôvodu nedostatočného obsahu nádoru). Z nich obaja čitatelia vyhodnotili výsledky IHC farbenia ALK ako pozitívne v 4 prípadoch. Preto malo priemerne 21 % prípadov, v ktorých neboli získané výsledky FISH, pozitívny stav ALK podľa analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3).

Štúdia reprodukovateľnosti medzi laboratóriami v prístroji BenchMark XT

Bola realizovaná štúdia reprodukovateľnosti medzi laboratóriami v prípade analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) na preukázanie reprodukovateľnosti analýzy pri určovaní klinického stavu ALK v prístroji BenchMark XT s použitím vzoriek tkaniva NSCLC (6 ALK pozitívnych a 6 ALK negatívnych) spracovaných na 1 šarži reagentie, 3 prístrojoch a 5 po sebe nenasledujúcich dní v troch externých laboratóriách. Vzorky boli randomizované a hodnotilo ich celkovo 6 čitateľov (2 čitatelia/pracovisko), ktorí nepoznali klinický stav ALK kohorty. Táto kohorta obsahovala 180 sklíčok generovaných z 12 prípadov NSCLC pozitívnych a negatívnych z hľadiska expresie ALK podľa IHC a FISH. Tieto prípady boli farbené v replikách v priebehu 21 dní v 3 laboratóriách. Výsledky uvádza Tabuľka 24. V týchto štúdiách dosiahla miera prijateľnosti v prípade morfológie a pozadia 100 %. Štúdia reprodukovateľnosti medzi laboratóriami (ILR) pre analýzu VENTANA anti-ALK (D5F3) v prístroji BenchMark XT poskytla priemernú pozitívnu zhodu (APA) a priemernú negatívnu zhodu (ANA) pri (denných) porovnaníach medzi pracoviskami, medzi čitateľmi a medzi cyklami vykonanými v pároch s využitím hodnotiteľných pozorovaní.

Tabuľka 24. ILR: Miery zhody pre analýzu VENTANA anti-ALK (D5F3) v prístroji BenchMark XT (n = 180 hodnotených sklíčok).

Miery zhody pre reprodukovateľnosť medzi laboratóriami (Klinický stav ALK)	Priemerná pozitívna zhoda (95 % CI)	Priemerná negatívna zhoda (95 % CI)	Percento celkovej zhody (95 % CI)
Medzi pracoviskami (3 pracoviská)	93.8 % (76.2 – 100 %)	94.9 % (79.2 – 100 %)	94.4 % (83.3 – 100 %)
Medzi dňami (5 po sebe nenasledujúcich dní)	99.1 % (96.4 – 100 %)	99.2 % (96.9 – 100 %)	99.2 % (97.5 – 100 %)
Medzi čitateľmi (2 čitatelia/pracovisko)	98.8 % (95.2 – 100 %)	99.0 % (95.8 – 100 %)	98.9 % (96.7 – 100 %)

Štúdia reprodukovateľnosti medzi laboratóriami v prístroji BenchMark ULTRA

Bola realizovaná dodatočná štúdia reprodukovateľnosti medzi laboratóriami v prípade analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) na preukázanie reprodukovateľnosti analýzy pri

určovaní klinického stavu ALK v prístroji BenchMark ULTRA s použitím vzoriek tkaniva NSCLC (7 ALK pozitívnych a 7 ALK negatívnych) spracovaných na 1 šarži reagentie, 3 prístrojoch a 5 po sebe nenasledujúcich dní v troch externých laboratóriách v prístroji BenchMark ULTRA. Vzorky boli randomizované a hodnotilo ich celkovo 6 čitateľov (2 čitatelia/pracovisko), ktorí nepoznali klinický stav ALK kohorty. Táto kohorta obsahovala 210 sklíčok generovaných z 14 prípadov NSCLC pozitívnych a negatívnych z hľadiska expresie ALK podľa IHC a FISH. Tieto prípady boli farbené v replikách v priebehu 21 dní v 3 laboratóriách. Výsledky uvádza Tabuľka 25. Celková konečná miera prijateľnosti farbenia pre všetky zoskupené údaje bola 99 %. V týchto štúdiách dosiahla miera prijateľnosti v prípade morfológie a pozadia 100 %. Výsledky uvádza Tabuľka 26.

Štúdia ILR pre analýzu VENTANA anti-ALK (D5F3) v prístroji BenchMark ULTRA poskytla percento pozitívnej zhody (PPA) a percento negatívnej zhody (NPA) vo všetkých hodnotiteľných pozorovaniach získaných zo štúdie zoskupením všetkých pracovísk, čitateľov a dní pri použití konsenzuálneho skóre ako referenčného štandardu.

Tabuľka 25. ILR: Miery zhody pre analýzu VENTANA anti-ALK (D5F3) v prístroji BenchMark ULTRA (n = 210 hodnotených sklíčok).

Miery zhody pre reprodukovateľnosť medzi laboratóriami (Klinický stav ALK)	Percento pozitívnej zhody (95 % CI)	Percento negatívnej zhody (95 % CI)	Percento celkovej zhody (95 % CI)
Vo všetkých hodnotiteľných pozorovaniach	92.8 % (88.4, 95.6 %)	100.0 % (98.2, 100.0 %)	96.4 % (94.1, 97.8 %)

Tabuľka 26. Reprodukovateľnosť medzi laboratóriami: Miery zhody medzi čitateľmi pre analýzu VENTANA anti-ALK (D5F3) v prístroji BenchMark ULTRA (n = 210 hodnotených sklíčok).

Miery zhody pre reprodukovateľnosť medzi laboratóriami (Klinický stav ALK) miery zhody medzi čitateľmi	Priemerná pozitívna zhoda (95 % CI)	Priemerná negatívna zhoda (95 % CI)	Percento celkovej zhody (95 % CI)
Čitateľ A1 verus A2	97.0 % (87.5 – 100 %)	97.3 % (89.5 – 100 %)	97.1 % (90.2 – 99.2 %)
Čitateľ B1 verus B2	93.5 % (71.4 – 100 %)	94.7 % (81.0 – 100 %)	94.2 % (86.0 – 97.7 %)
Čitateľ C1 verus C2	92.3 % (66.7 – 100 %)	93.2 % (74.7 – 100 %)	92.8 % (84.1 – 96.9 %)
Celkovo	94.3 % (75.6 – 100 %)	95.1 % (81.6 – 100 %)	94.7 % (84.1 – 100 %)

Štúdia reprodukovateľnosti medzi laboratóriami a medzi čitateľmi na prístroji BenchMark ULTRA PLUS pomocou súprav OptiView DAB IHC Detection a OptiView Amplification.

Bola realizovaná štúdia reprodukovateľnosti medzi laboratóriami na prístroji BenchMark ULTRA PLUS pre analýzu VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay na preukázanie reprodukovateľnosti analýzy pri určovaní klinického stavu ALK na prístroji BenchMark ULTRA PLUS s použitím vzoriek tkaniva NSCLC (14 ALK pozitívnych a 14 ALK negatívnych) spracovaných na šarži reagentie a prístroji v každom troch externých laboratórii počas 5 po sebe nenasledujúcich dní. Vzorky boli randomizované a hodnotilo ich celkovo 6 čitateľov (2 čitatelia/pracovisko). Pre každý prípad sa všetky dostupné pozorovania čitateľov porovnali s modálnym stavom prípadu. Prijateľnosť sklička s negatívnou kontrolnou reagentiou a sklička farbeného pomocou ALK bola vyhodnotená ako 100 % pre všetkých 420 sklíčok (140 na jedno pracovisko). Výsledky nájdete v Tabuľka 27, Tabuľka 28 a Tabuľka 29.

Analýza ILR VENTANA anti-ALK (D5F3) BenchMark ULTRA PLUS poskytla percento pozitívnej zhody (PPA) a percento negatívnej zhody (NPA) vo všetkých hodnotiteľných pozorovaniach získaných zo štúdie zoskupením všetkých pracovísk, čitateľov a dní pri použití modálneho stavu ALK na úrovni prípadu ako referenčného štandardu.

Tabuľka 27. Reprodukovateľnosť medzi laboratóriami: Miery zhody pre analýzu VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay v prístroji BenchMark ULTRA PLUS (n = 420 hodnotených skličiek).

Reprodukovateľnosť klinického stavu ALK medzi laboratóriami	Percento pozitívnej zhody (95 % CI)	Percento negatívnej zhody (95 % CI)	Percento celkovej zhody (95 % CI)
Vo všetkých hodnotiteľných pozorovaniach	98.6 % (97.3, 99.7)	99.5 % (98.7 – 100 %)	99.0 % (98.3 – 99.7 %)

Okrem analýzy prístupu modálneho stavu na úrovni prípadu boli tiež vykonané analýzy prístupu v pároch a výsledky priemernej pozitívnej zhody (APA), priemernej negatívnej zhody (ANA) sú uvedené nižšie.

Tabuľka 28. Reprodukovateľnosť medzi laboratóriami: Miery zhody pre analýzu VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay v prístroji BenchMark ULTRA PLUS (n = 420 hodnotených skličiek).

Miery zhody pre reprodukovateľnosť medzi laboratóriami (Klinický stav ALK)	Priemerná pozitívna zhoda (95 % CI)	Priemerná negatívna zhoda (95 % CI)	Percento celkovej zhody (95 % CI)
Medzi pracoviskami (3 pracoviská)	98.1 % (96.6 – 99.4 %)	98.1 % (96.8 – 99.4 %)	98.1 % (96.7 – 99.4 %)
Medzi dňami (5 po sebe nasledujúcich dní)	98.3 % (96.9 – 99.4 %)	98.3 % (97.2 – 99.5 %)	98.3 % (97.1 – 99.5 %)

Tabuľka 29. Reprodukovateľnosť medzi laboratóriami: Miery zhody medzi čitateľmi pre analýzu VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay v prístroji BenchMark ULTRA PLUS (n = 420 hodnotených skličiek).

Reprodukovateľnosť klinického stavu ALK medzi laboratóriami medzi čitateľmi	Priemerná pozitívna zhoda (95 % CI)	Priemerná negatívna zhoda (95 % CI)	Percento celkovej zhody (95 % CI)
Čitateľ A1 verzus A2	99.3 % (97.7 – 100 %)	99.3 % (98.0 – 100 %)	99.3 % (97.9 – 100 %)
Čitateľ B1 verzus B2	94.8 % (90.5 – 98.6 %)	95.2 % (91.4 – 98.6 %)	95.0 % (91.1 – 98.6 %)
Čitateľ C1 verzus C2	100.0 % (97.3 – 100 %)	100.0 % (97.3 – 100 %)	100.0 % (97.3 – 100 %)
Celkovo	98.1 % (96.6 – 99.4 %)	98.1 % (96.7 – 99.4 %)	98.1 % (96.7 – 99.4 %)

Zhoda medzi prístrojmi BenchMark ULTRA PLUS a BenchMark ULTRA

Tri laboratória zo samostatných inštitúcií v Spojených štátoch sa zúčastnili štúdie zhody medzi prístrojmi BenchMark ULTRA PLUS a BenchMark ULTRA. Na použitie v tejto štúdii bolo vybraných stoštyridsaťštyri prípadov reprezentujúcich rozsah farbenia populácie určeného použitia analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3). Všetkých 144 prípadov bolo farbených v spoločnosti Ventana v prístroji BenchMark ULTRA pomocou súpravy OptiView DAB IHC Detection Kit spárovanej so súpravou OptiView Amplification Kit. Sklička s rezmi z tých istých prípadov boli randomizované a rovnomerne rozdelené (48 prípadov na pracovisko) medzi pracoviskami podieľajúcimi sa na štúdiu na farbenie v prístroji BenchMark ULTRA PLUS pomocou odporúčaného protokolu farbenia s jednou šaržou súprav OptiView DAB IHC Detection a OptiView Amplification. Dvaja patológovia na jedno pracovisko, ktorí neboli informovaní o stave prípadu, hodnotili zafarbené sklička v príslušnom prístroji BenchMark ULTRA PLUS a poskytli klinický stav. Po 2-týždňovom období vymývania boli príslušné sklička prípadu, ktoré boli predtým zafarbené v spoločnosti Ventana v prístroji BenchMark ULTRA, distribuované na príslušné pracoviská

na klinické vyhodnotenie. Okrem toho jeden interný patológ skontroloval všetky sklička štúdie a bol zaradený ako tretí patológ pre každé z pracovísk. Spoločnosť Ventana analyzovala výsledky, pričom zisťovala ALK pozitívny alebo negatívny klinický stav. Miera OPA bola 95.4 % (412/432), miera PPA 93.5 % (202/216) a miera NPA 97.2 % (210/216). Obojstranné 95 % CIs boli vypočítané pomocou percentilovej metódy bootstrap. Miery prijateľnosti pozadia a morfológie pre všetky prípady boli 100 % pre oba prístroje. Výsledky uvádza Tabuľka 30.

Tabuľka 30. Zoskupená zhoda prípadov ALK NSCLC farbených analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay v prístroji BenchMark ULTRA PLUS v porovnaní s prístrojom BenchMark ULTRA.

Stav BenchMark ULTRA PLUS ALK	Stav BenchMark ULTRA ALK		Celkom
	Pozitívne	Negatívne	
Pozitívne	202	6	208
Negatívne	14	210	224
Celkom	216	216	432
	n/N	% (95 % CI[a])	
Percento pozitívnej zhody	202/216	93.5 (89.5, 97.2)	
Percento negatívnej zhody	210/216	97.2 (94.5, 99.5)	
Percento celkovej zhody	412/432	95.4 (92.8, 97.5)	

[a] Obojstranné 95 % CIs boli vypočítané pomocou percentilovej metódy bootstrap s 2000 replikátmi vybranými so stratifikáciou podľa kvalifikačného koša [ALK pozitívne, ALK negatívne, problematické ALK pozitívne, problematické ALK negatívne].

KLINICKÁ ÚČINNOSŤ

Štúdia porovnávajúca metódy v prístroji BenchMark XT

Kohorty štúdie porovnávajúcej metódy boli generované z dvoch nezávislých randomizovaných klinických skúšaní krizotinibu (označené ako skúšanie č. 1 a skúšanie č. 2), do ktorých boli zaradení pacienti s ALK pozitívnym NSCLC. Stav ALK v prípade týchto pacientov bol určený pomocou analýzy klinického skúšania Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit vo viacerých centrálnych laboratóriách. Platné výsledky Vysis ALK FISH boli získané z celkovo 1644 vzoriek tkaniva NSCLC (1018 vzoriek pre skúšanie č. 1 a 626 vzoriek pre skúšanie č. 2).

V štúdiu porovnaním metód s analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) boli vzorky od pacientov vyšetrených do skúšania č. 1 a č. 2 odoslané do centrálného laboratória na farbenie analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) a vyhodnotenie IHC stavu ALK na základe kritérií algoritmu hodnotenia analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) (Tabuľka 6). Zo vzoriek, ktoré mali platné výsledky Vysis ALK FISH pri vyšetrení v rámci klinického skúšania, malo 933 vzoriek zo skúšania č. 1 (Tabuľka 31) a 598 vzoriek zo skúšania č. 2 (Tabuľka 33) platné výsledky aj pre analýzu VENTANA anti-ALK (D5F3).

Počty vzoriek, ktoré mali ALK pozitívne a ALK negatívne výsledky pri každej analýze sú uvedené v tabuľkách č. 31 a 33 jednotlivo pre kohorty skúšania č. 1 a č. 2. Miery zhody medzi dvomi analýzami sú uvedené v tabuľkách 32 a 34 jednotlivo pre kohorty skúšania č. 1 a č. 2. Ohlásené miery percent pozitívnej a negatívnej zhody boli jednotlivo 86.0 % a 96.3 % pre skúšanie č. 1 (Tabuľka 32) a 92.7 % a 94.8 % pri skúšaní č. 2 (Tabuľka 34).

Tabuľka 31. Porovnanie stavu ALK vo vzorkách NSCLC (kohorta zo skúšania č. 1) určeného pomocou analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) verzus Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

Stav ALK		Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		
		Pozitívne	Negatívne	Celkom
Analýza VENTANA anti-ALK (D5F3)	Pozitívne	154	28	182
	Negatívne	25	726	751
	Celkom	179	754	933

Tabuľka 32. Miery zhody medzi analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) a súpravou Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit v skúšaní č. 1.

Miery zhody medzi analýzami ALK	Percento pozitívnej zhody (95 % CI)	Percento negatívnej zhody (95 % CI)	Percento celkovej zhody (95 % CI)
Protilátka VENTANA anti-ALK (D5F3) a Vysis ALK Break-Apart FISH Probe Kit	86.0 % (80.2 – 90.4 %)	96.3 % (94.7 – 97.4 %)	94.3 % (92.6 – 95.6 %)

Tabuľka 33. Kohorta porovnania stavu ALK zo skúšania č. 2 vo vzorkách NSCLC určeného pomocou analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) verzus súprava Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

Stav ALK		Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		
		Pozitívne	Negatívne	Celkom
Protilátka VENTANA anti-ALK (D5F3)	Pozitívne	179	21	200
	Negatívne	14	384	398
	Celkom	193	405	598

Tabuľka 34. Miery zhody medzi analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) a súpravou Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit v skúšaní č. 2.

Miery zhody medzi analýzami ALK	Percento pozitívnej zhody (95 % CI)	Percento negatívnej zhody (95 % CI)	Percento celkovej zhody (95 % CI)
Analýza VENTANA anti-ALK (D5F3) a Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit	92.7 % (88.2 – 95.6 %)	94.8 % (92.2 – 96.6 %)	94.1 % (92.0 – 95.8 %)

Všimnite si, že vzorky tkaniva použité v skúšaní č. 1 a skúšaní č. 2 neboli overené z hľadiska prípravy podľa postupov prípravy vzoriek odporúčaných pre analýzu VENTANA anti-ALK (D5F3).

Štúdia potvrdzujúca klinické výsledky krizotinibu

Analýza klinickej účinnosti pre analýzu VENTANA anti-ALK (D5F3) ako diagnostickú pomôcku pri výbere pacientov, pre ktorých môže byť výhodná liečba krizotinibom, teda činidlom zameraným na ALK, bola založená na skúšaní č. 1. Títo pacienti boli testovaní analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) v rámci štúdie porovnávajúcej metódy, ako aj doplnkovej štúdie. Skúšanie č. 1 bola multicentrická medzinárodná randomizovaná otvorená štúdia účinnosti a bezpečnosti fázy 3 lieku krizotinib v porovnaní s chemoterapiou v prvej línii (pemetrexed/cisplatina alebo pemetrexed/karboplatina) u predtým neliečených pacientov s ALK pozitívnym pokročilým neskvamóznym NSCLC. Súprava Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (ALK FISH) bola použitá na určenie ALK pozitivity a vhodnosti na skúšanie č. 1. Na základe výsledkov analýzy Vysis ALK FISH bolo v randomizovanom súbore 343 pacientov (172 v ramene s krizotinibom a 171 v ramene s chemoterapiou). V štúdií potvrdzujúcej klinické výsledky analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) boli vzorky tkaniva zo skúšania č. 1 retrospektívne testované s analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3). Z 343 pacientov zaradených do skúšania č. 1, bolo 133 testovaných s analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) v rámci protokolu štúdie porovnávania metód a ďalších 39 pacientov bolo testovaných v rámci samostatného protokolu štúdie, takže celkovo bolo analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3) testovaných 172 pacientov. Z týchto pacientov bolo 166 ALK pozitívnych alebo ALK negatívnych podľa ALK (D5F3) IHC. Výsledky celkovej účinnosti u týchto pacientov sú zosumarizované podľa výsledkov analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) v Tabuľka 35.

Tabuľka 35. Klinická výhoda krizotinibu (prežívanie bez progresie) u pacientov zaradených do skúšania č. 1.

Stav ALK		HR ^a	SE ^a	95 % CI ^a	Veľkosť vzorky	
					Rameno s chemoterapiou	Rameno s krizotinibom
Celkovo zaradených	FISH+	0.454	0.139	(0.346, 0.596)	171	172
	FISH+ ^b	0.407	0.214	(0.267, 0.618)	82	90
Testovaná ALK IHC	FISH+/IHC+	0.401	0.237	(0.252, 0.639)	63	78
	FISH+/IHC-	1.711	0.703	(0.431, 6.789)	17	8

^a Pozorovaná miera rizika (HR) v prípade prežívania bez progresie (PFS) lieku krizotinib verzus chemoterapia, štandardná odchýlka (SE) a 95 % 2-stranný interval spoľahlivosti (CI). Výsledky boli odhadnuté pomocou stratifikovaného modelu Cox s nasledujúcimi vrstvami: rasa, metastázy v mozgu a skóre ECOG.

^b U dvoch pacientov ALK FISH+ v ramene s chemoterapiou a 4 pacientov v ramene s krizotinibom nebol získaný žiaden ALK pozitívny alebo negatívny IHC výsledok.

Na zaradenie pacientov s chýbajúcim alebo neplatným výsledkom testu analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) a na vyhodnotenie dôkladnosti záverov štúdie boli vykonané dodatočné imputačné závery. Štatistická analýza pacientov bez zhody, ktorí neboli zaradení do skúšania č. 1, zahŕňala simuláciu škály možných výsledkov u týchto pacientov. Výsledky zo všetkých hypotetických analýz boli vo všeobecnosti podobné výsledkom z primárnej analýzy účinnosti.

Nezhodujúce sa prípady FISH+/IHC- zo skúšania č. 1:

Štúdia porovnávajúca metódy

V štúdií porovnávajúcej metódy (Tabuľka 35), 25 pacientov zo skúšania č. 1 bolo hodnotených ako FISH+/IHC-. Stredné skóre Vysis ALK FISH (% nádorových buniek pozitívnych na prestavbu génu ALK) pri týchto prípadoch bolo 20 % (priemer 31.6 %, SD 21.58 %) a pri 14 z týchto prípadov bolo skóre FISH 25 % alebo menej. Hoci vo všetkých týchto prípadoch bolo skóre Vysis ALK FISH nad 15 % hraničnou hodnotou pozitivity ALK, ich skóre bolo v nejednoznačnej zóne FISH (10 % – 50 %). Naopak, stredné skóre FISH pozorované u všetkých zaradených pacientov testovaných s IHC bolo 58 % (priemer 56.9 %, SD 21.97 %).

Štúdia potvrdzujúca klinické výsledky

V štúdií potvrdzujúcej klinické výsledky bolo 25 pacientov zaradených do skúšania č. 1 hodnotených ako FISH+/IHC- (pozrite si posledný riadok v Tabuľka 35). Osem z týchto prípadov bolo randomizovaných do ramena klinickej štúdie s krizotinibom. Päť z týchto pacientov malo skóre FISH veľmi blízko pri hraničnej hodnote FISH (15 % – 18 % nádorových buniek pozitívnych na preskupenie génu ALK) a preukázalo aj objektívnu progresiu alebo stabilné ochorenie/žiadnu odpoveď. Dvaja z 8 pacientov mali skóre FISH mimo nejednoznačného pásma FISH (66 % a 72 % nádorových buniek pozitívnych na preskupenie génu ALK) a vykazovalo čiastočne objektívnu nádorovú odpoveď. Ôsmy IHC-pacient bol FISH- a bol zaradený do skúšania omylom. Tento pacient preukázal nejednoznačnú odpoveď.

Nezhodujúce sa prípady FISH-/IHC+ zo skúšania č. 1

V štúdií porovnávajúcej metódy pri analýze VENTANA anti-ALK (D5F3) bolo 28 prípadov vyšetrených na skúšanie č. 1 hodnotených ako FISH-/IHC+. Keďže FISH predstavovala analýzu klinického skúšania a do skúšania č. 1 boli zaradené iba prípady FISH+, nie sú pre nezhodujúce sa prípady FISH-/IHC+ k dispozícii žiadne výsledky.

Štúdia potvrdzujúca klinické výsledky Ceritinibu

Analýza klinickej účinnosti v prípade analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) ako diagnostickej pomôcky na výber pacientov, pre ktorých môže byť výhodná liečba ceritinibom, bola založená na otvorenej randomizovanej aktívne kontrolovanej multicentrickej štúdií fázy 3 (skúšanie č. 3) orálneho ceritinibu. Táto štúdia porovnávala klinickú účinnosť a bezpečnosť liečby ceritinibom s liečbou chemoterapiou (dublet na báze platiny s pemetrexedom nasledovanom udržiavaním pemetrexedu u pacientov bez

progresie ochorenia po 4 cykloch) u predtým neliečených dospelých pacientov s ALK pozitívnym, lokálne pokročilým alebo metastatickým neskvamóznym NSCLC. Analýza VENTANA anti-ALK (D5F3) bola použitá v prístroji BenchMark XT na testovanie celkovo 1778 pacientov na určenie vhodnosti na skúšanie č. 3, ktoré si vyžadovalo pozitívny stav ALK. V randomizovanom súbore bolo 376 pacientov, ktorí mali výsledky s pozitívnym ALK z analýzy (189 v ramene s ceritinibom a 187 v ramene chemoterapie). Výsledky celkovej účinnosti u pacientov liečených ceritinibom uvádza Tabuľka 36. Ceritinib preukázal štatisticky a klinicky významnú výhodu oproti chemoterapii so 45 % znížením rizika prežitia bez progresie podľa BIRC (HR = 0.55; 95 % CI: 0.42, 0.73; $p < .001$) u pacientov vybraných pomocou analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3). Priemer PFS podľa hodnotenia BIRC bol v prípade ramena s ceritinibom 16.6 mesiaca (95 % CI: 12.6, 27.2) a v prípade ramena chemoterapie 8.1 mesiaca (95 % CI: 5.8, 11.1).

Tabuľka 36. Klinická výhoda ceritinibu (prežívanie bez progresie) u pacientov zaradených do skúšania č. 3.

Prežívanie bez progresie	Ceritinib (N = 189)	Chemoterapia (N = 187)
Priemer, mesiace (95 % CI) ^a	16.6 (12.6, 27.2)	8.1 (5.8, 11.1)
HR (95 % CI) ^b	0.55 (0.42, 0.73)	
p-hodnota ^c	< 0.001	

HR = miera rizika; CI = interval spoľahlivosti; BIRC = zaslepená nezávislá hodnotiacia komisia; NR = nedosiahnuté; NE = neodhadnuteľné

^a Odhadnuté pomocou metódy Kaplan-Meier.

^b Na odhad miery rizika PFS sa použil Cox regresný model stratifikovaný stratifikačným faktorom randomizácie (stav účinnosti podľa WHO: 0 verus 1 – 2; prítomnosť alebo absencia BM, prítomnosť alebo absencia predchádzajúcej neo-/adjuvantnej chemoterapie) spolu s 95 % intervalom spoľahlivosti na základe testu Wald.

^c Na základe stratifikovaného log-rank testu (rovnaká stratifikácia ako v Poznámke b).

Miery prijateľnosti farbenia pri analýze VENTANA anti-ALK (D5F3) u populácie určenej na diagnostiku (1778 pacientov testovaných analýzou) uvádza Tabuľka 37. Hlásené boli aj miery prijateľnej morfológie a prijateľného pozadia v prípade sklíčok farbených analýzou VENTANA anti-ALK (D5F3). V prípade 122 vzoriek bol pôvodný pokus o farbenie analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) neúspešný a bol vykonaný ďalší pokus o farbenie. Pri poslednom pokuse o farbenie zostalo 48 zo 122 vzoriek neprijateľných (1 z dôvodu neplatnej kontroly cyklu, 30 z dôvodu neprijateľného farbenia H&E a 12 z dôvodu neprijateľnej negatívnej kontrolnej reagenty, 1 z dôvodu neprijateľného pozadia, 2 z dôvodu neprijateľného pozadia a morfológie a 2 z dôvodu nehodnotiteľnej IHC sklíčka). Analýza VENTANA anti-ALK (D5F3) preukázala vysokú pôvodnú a konečnú celkovú mieru prijateľnosti farbenia v hodnote jednotlivo 93.1 % a 97.3 %. Konečná miera prijateľnosti morfológie a pozadia bola 99 % alebo vyššia.

Tabuľka 37. Počiatočná a konečná charakteristika výkonu farbenia analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) pri vzorkách štúdie o NSCLC vyšetrených na zaradenie do skúšania č. 3.

Hodnotenie atribútov farbenia	% miery prijateľnosti (n/N) (95 % CI)	
	Počiatočný pokus o farbenie	Konečný pokus o farbenie
Celková miera prijateľnosti IHC farbenia ALK	93.1 % (1656/1778) (91.9 – 94.2 %)	97.3 % (1730/1778) (96.4 – 98.0 %)
Farbenie pozadia	99.0 % (1655/1672) (98.4 – 99.4 %)	99.8 % (1727/1730) (99.5 – 99.9 %)
Morfológia	99.0 % (1657/1674) (98.4 – 99.4 %)	99.9 % (1728/1730) (99.6 – 100 %)

Štúdia potvrdzujúca klinické výsledky alektinibu

Analýza klinickej účinnosti v prípade analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) ako diagnostickej pomôcky na výber pacientov, pre ktorých môže byť výhodná liečba alektinibom, bola založená na otvorenej randomizovanej aktívne kontrolovanej multicentrickej štúdií fázy 3 (skúšanie č. BO28984) orálneho alektinibu. Táto štúdia porovnávala klinickú účinnosť a bezpečnosť liečby alektinibom s klinickou účinnosťou a bezpečnosťou krizotinibu u predtým neliečených dospelých pacientov s ALK pozitívnym, lokálne pokročilým alebo metastatickým NSCLC. Analýza VENTANA anti-ALK (D5F3) bola použitá v prístroji BenchMark XT na testovanie celkovo 1239 pacientov na určenie vhodnosti na skúšanie č. BO28984, ktoré si vyžadovalo pozitívny stav ALK pri centrálnom testovaní. Celkovo bolo 303 pacientov, ktorých nádory mali ALK pozitívne výsledky z analýzy, randomizovaných a analyzovaných z hľadiska účinnosti (152 v ramene s alektinibom a 151 v ramene s krizotinibom). Súhrn výsledkov celkovej účinnosti uvádza Tabuľka 38. Alektinib preukázal štatisticky významnú a klinicky zmysuplnú výhodu pred krizotinibom s 53 % znížením rizika PFS podľa hodnotenia skúšajúceho (HR = 0.47, 95 % CI: 0.34, 0.65; $p < 0.0001$) a 50 % znížením rizika PFS podľa IRC (HR = 0.50, 95 % CI: 0.36, 0.7; $p < 0.0001$) u pacientov vybraných pomocou analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3). Priemerné PFS podľa hodnotenia skúšajúceho nebolo dosiahnuté v ramene alektinibu a podľa hodnotenia IRC bolo 25.7 mesiaca (95 % CI: 19.9, NE) pre rameno alektinibu a 10.4 mesiaca (95 % CI: 7.7, 14.6) pre rameno krizotinibu.

Tabuľka 38. Klinická výhoda alektinibu (prežívanie bez progresie) u pacientov zaradených do skúšania č. BO28984.

Prežívanie bez progresie hodnotené skúšajúcim	Alektinib (N = 152)	Krizotinib (N = 151)
Priemer, mesiace (95 % CI) ^a	NE (17.7, % NE)	11.1 (9.1, 13.1 %)
HR (95 % CI) ^b	0.47 (0.34, 0.65 %)	
p-hodnota ^c	< 0.0001	
Prežívanie bez progresie hodnotené podľa IRC	Alektinib (N = 152)	Krizotinib (N = 151)
Priemer, mesiace (95 % CI) ^a	25.7 (19.9, % NE)	10.4 (7.7, 14.6 %)
HR (95 % CI) ^b	0.50 (0.36, 0.70 %)	
p-hodnota ^c	< 0.0001	

HR = miera rizika; CI = interval spoľahlivosti; IRC = nezávislá hodnotiacia komisia; NE = neodhadnuteľné

^a Odhadnuté pomocou metódy Kaplan-Meier.

^b Pomer rizika bol odhadnutý Cox regresiou stratifikovanou na začiatku na kovariáty rasy (ázijská verus neázijská) a metastázy CNS (prítomnosť/absencia) podľa IRC

^c Na základe stratifikovaného log-rank testu (rovnaká stratifikácia ako v bode [b]).

Miery prijateľnosti farbenia pri analýze VENTANA anti-ALK (D5F3) u populácie určenej na diagnostiku (1239 pacientov testovaných analýzou) boli porovnateľné s výsledkami v skúšaní A2301.

Výsledok klinickej štúdie Lorlatinibu

Účinnosť lorlatinibu na liečbu pacientov s ALK pozitívnymi vzorkami NSCLC, ktorí predtým nedostali systémovú liečbu metastatického ochorenia, bola stanovená v otvorenej, randomizovanej, aktívne kontrolovanej multicentrickej štúdií (štúdia B7461006; NCT03052608; CROWN). Pacienti museli mať stav výkonnosti ECOG 0 – 2 a ALK pozitívnu vzorku NSCLC podľa zistení analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3). Neurologicky stabilní pacienti s liečenými alebo neliečenými asymptomatickými metastázami centrálného nervového systému (CNS), vrátane leptomeningeálnych metastáz, spĺňali podmienky.

Celkovo 296 pacientov bolo randomizovaných v pomere 1:1, aby dostávali lorlatinib 100 mg perorálne jedenkrát denne (n = 149) alebo krizotinib 250 mg perorálne dvakrát denne (n = 147). Randomizácia bola stratifikovaná podľa etnického pôvodu (ázijský alebo neázijský) a prítomnosti alebo neprítomnosti metastáz CNS na začiatku štúdie. Liečba v oboch skupinách pokračovala až do progresie ochorenia alebo neprijateľnej toxicity. Hlavným parametrom výsledku účinnosti bolo prežívanie bez progresie ochorenia (PFS) posúdené zaslepeným nezávislým centrálnym hodnotením (BICR) podľa verzie 1.1 (RECIST v1.1).

Výsledky štúdie preukázali podstatné a štatisticky významné zlepšenie PFS v skupine s lorlatinibom v porovnaní so skupinou s krizotinibom so 72 % znížením rizika progresie ochorenia alebo úmrtia podľa BIRC (HR = 0.28; 95 % CI: 0.19, 0.41; $p < 0.0001$; Tabuľka 39). Údaje OS boli v čase medznej hodnoty klinických údajov nedostatočné.

Analýzy podskupiny u účastníkov s metastázami na mozgu alebo bez nich na začiatku štúdie priniesli výsledky konzistentné s primárnym výsledkom PFS. Pravdepodobnosť, že CNS bude prvým miestom progresie ochorenia, samostatne alebo so súbežnou systémovou progresiou, bola výrazne nižšia v skupine, ktorá dostávala lorlatinib (2.7 %) než v skupine, ktorá dostávala krizotinib (23.8 %), pričom stratifikovaná hodnota HR špecifická pre príčinu bola 0.06 (95 % CI: 0.02, 0.18).³⁶

Tabuľka 39. Celkové výsledky účinnosti v štúdiu B7461006 (CROWN).

Prežívanie bez progresie (hodnotené podľa BIRC)	Lorlatinib (N = 149)	Krizotinib (N = 147)
Počet udalostí, n (%)	41 (27.5 %)	86 (58.5 %)
Progresívne ochorenie, n (%)	32 (21.5 %)	82 (55.8 %)
Úmrtia, n (%)	9 (6.0 %)	4 (2.7 %)
Pravdepodobnosť PFS po 12 mesiacoch (95 % CI) ^a	0.78 (0.70, 0.84)	0.39 (0.30, 0.48)
Pravdepodobnosť rizika (95 % CI) ^b	0.28 (0.19, 0.41)	
p-hodnota ^c	< 0.0001	

Skratky: CI = interval spoľahlivosti; NE = neodhadnuteľné; PFS = prežívanie bez progresie.

^a CIs boli odvodené pomocou transformácie log-log so spätnou transformáciou do pôvodnej mierky.

^b Stratifikovaný pomer nebezpečnosti založený na modeli Cox proporcionálnych nebezpečností.

^c Jednostranná p-hodnota založená na stratifikovanom teste log-rank.

Testovanie analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) 232 skríningových vzoriek štúdie B7461006 v centrálnych laboratóriách prinieslo miery prijateľnosti farbenia, ktoré boli takmer totožné s mierami pozorovanými v skúšaní A2301.

ZÁVER

Výsledky farbenia analýzy VENTANA anti-ALK (D5F3) sú reprodukovateľné z hľadiska klinického stavu ALK v prístrojoch BenchMark IHC/ISH. Binárny algoritmus hodnotenia je vysoko reprodukovateľný medzi čitateľmi. Táto analýza sa zhoduje so súpravou Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit, pokiaľ ide o stav ALK. Analýzu VENTANA anti-ALK (D5F3) možno používať na identifikáciu pacientov vhodných na liečbu liekmi XALKORI® (krizotinib), ZYKADIA® (ceritinib), ALECENSA® (alektinib) alebo lorlatinib.

RIEŠENIE PROBLÉMOV

Ak bolo pozorované nevhodné farbenie na ľudských kontrolných tkanivách NSCLC alebo appendixu na úrovni systému alebo na vzorkách pacienta, zaistite, aby sa následne v prístroji BenchMark IHC/ISH vykonali postupy údržby. Ak potom nezistíte žiadne technické problémy alebo odchýlky, pred vykonaním opakovaného cyklu sa obráťte na miestneho zástupcu podpory.

LITERATÚRA

- Kutok JL, Aster JC, et al. Molecular biology of anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2002;20(17):3691-3702.
- Iwahara T, et al. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene*. 1997;14:439-49.
- Soda M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448(7153):561-66.
- Inamura K, et al. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. *J Thorac Oncol*. 2008;3(1):13-17.
- Choi YL, et al. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2008;68(13):4971-6.
- Koivunen JP, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(13):4275-83.
- Shinmura K, et al. EML4-ALK fusion transcripts, but no NPM-, TPM3-, CLTC-, ATIC-, or TFG-ALK fusion transcripts, in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer*. 2008;61:163-9.
- Takeuchi K, et al. Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res*. 2008;14(20):6618-24.
- Shaw AT, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol*. 2009;27(26):4247-53.
- Yi ES, et al. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol*. 2011;6(3):459-65.
- McLeer-Florin A, et al. Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study. *J of Thorac Oncol*. 2012;7(2):348-54.
- Christensen JG, et al. Cyto-reductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(12 Pt 1):3314-22.
- Yamazaki S, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of crizotinib for anaplastic lymphoma kinase inhibition and antitumor efficacy in human tumor xenograft mouse models. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;340(3):549-57.
- XALKORI method sheet. Pfizer. Document ID:6427427a-821b-48b4-8f06-0477f0ae4e36. LAB-0441-6.0 June 2014
- ZYKADIA method sheet. Novartis. Document ID:T2015-114/T2015-115. July 2015.
- H Sakamoto, et al. CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant. *Cancer Cell*. 2011;19(5):679-90.
- Kodama T, et al. Antitumor activity of the selective ALK inhibitor alectinib in models of intracranial metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014;75(5):1023-28.
- Gadgeel S, et al. Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose finding portion of a phase 1/2 study. *Lancet Oncol*. 2014;15(10):1119-28.
- Shaw A, et al. Alectinib in ALK-positive, crizotinib-resistant, non-small-cell lung cancer: a single-group, multicenter, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(2):234-42.
- ALECENSA method sheet. https://www.gene.com/download/pdf/alecensa_prescribing.pdf
- Alunbrig: EPAR - Product Information. <http://www.ema.europa.eu/>
- Johnson T, Richardson P, et al. Discovery of (10R)-7-amino-12-fluoro-2,10,16-trimethyl-15-oxo-10,15,16,17-tetrahydro-2H-8,4-(m etheno)pyrazolo[4,3-h][2,5,11]-benzoxadiazacyclotetradecine-3-carbonitrile (PF-06463922), a macrocyclic inhibitor of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and c-ros oncogene 1 (ROS1) with preclinical brain exposure and broad-spectrum potency against ALK-resistant mutations. *J Med Chem*. 2014;57:4720-44.
- Gainor J, Dardaei L, et al. Molecular mechanisms of resistance to first and second generation ALK inhibitors in ALK-rearranged lung cancer. *Cancer Discov*. 2016;6:1118-33.
- Zou H, Qiu H, et al. PF-06463922 is a potent and selective next-generation ROS1/ALK inhibitor capable of blocking crizotinib-resistant ROS1 mutations. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(11):3493-3498.
- Galetta D, et al. The emerging role of ALK inhibitors in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2012 Suppl 2:S545-54.
- Jokoji R, et al. Combination of morphological feature analysis and immunohistochemistry is useful for screening of EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2010;63(12):1066-70.
- Mino-Kenudson M, et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res*. 2010;16(5):1561-71.
- Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of Histotechnology, 2nd edition. St. Louis: The C.V. Mosby Company; 1980.
- Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
- Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
- Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
- Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.

33. NordiQC: Nordic Immunohistochemical Quality Control Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) (lung protocol). Assessment Run 39 2013.
http://www.nordiqc.org/Run-39-B16-H4/Assessment/Run39_ALK.pdf. 07-12-2013. Accessed February 26, 2014.
34. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2011.
35. CLSI. Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunohistochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition. CLSI document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.
36. LORBRENA package insert (method sheet).

POZNÁMKA: Na označenie hranice medzi celým číslom a zlomkovými časťami desatinnej číslice sa v celom tomto dokumente namiesto desatinnej čiarky vždy používa bodka. Na oddelenie tisícov sa nepoužívajú žiadne znaky.

Súhrn informácií o bezpečnosti a výkone nájdete tu: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Symbody

Spoločnosť Ventana používa okrem značiek uvedených v norme ISO 15223-1 aj nasledujúce symbody a značky (definície používaných značiek v USA: pozri dialog.roche.com):



Globálne číslo obchodnej položky



Jedinečná identifikácia pomôcky



Označuje subjekt, ktorý importoval zdravotnícku pomôcku do Európskej únie

HISTÓRIA REVÍZIÍ

Rev.	Aktualizácie
B	Aktualizácie častí Klinický význam, Varovania a bezpečnostné opatrenia, Postup farbenia, Interpretácia farbenia / očakávané výsledky, Analytická účinnosť, Referencie a Duševné vlastníctvo. Pridaný prístroj BenchMark ULTRA PLUS.

DUŠEVNÉ VLASTNÍCTVO

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW a logo VENTANA sú ochranné známky spoločnosti Roche.

Všetky ostatné ochranné známky sú majetkom ich príslušných vlastníkov.

© 2022 Ventana Medical Systems, Inc.

Predávané na základe licencie od



KONTAKTNÉ ÚDAJE



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany
+800 5505 6606

www.roche.com

