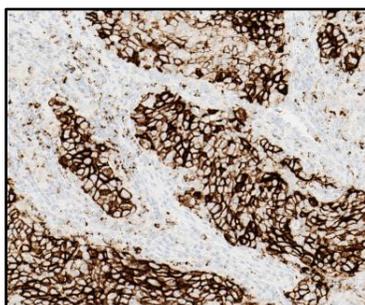


## VENTANA PD-L1 (SP142) Assay

**REF** 741-4860

08008540001

**IVD**  50



**Figura 1. Espressione di PD-L1 nel cancro del polmone non a piccole cellule.**

### USO PREVISTO

VENTANA PD-L1 (SP142) Assay è indicato per la valutazione immunostochimica della proteina Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) nelle cellule tumorali e nelle cellule immunitarie infiltranti il tumore nei tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) indicati di seguito e colorati con OptiView DAB IHC Detection Kit e OptiView Amplification Kit su uno strumento BenchMark IHC/ISH.

La determinazione dello stato PD-L1 dipende dall'indicazione e la

valutazione si basa sulla porzione di area tumorale occupata da cellule immunitarie infiltranti il tumore con espressione di PD-L1 (% IC) di qualsiasi intensità o sulla percentuale di cellule tumorali con espressione di PD-L1 (% TC) di qualsiasi intensità.

VENTANA PD-L1 (SP142) Assay è indicato come ausilio all'identificazione dei pazienti per il trattamento con le terapie elencate in Tabella 1 per i rispettivi cutoff e indicazioni conformemente all'etichetta del prodotto terapeutico approvato.

VENTANA PD-L1 (SP142) Assay può essere associato a un maggiore beneficio per il paziente con la terapia elencata in Tabella 2 per i rispettivi cutoff e indicazioni conformemente all'etichetta del prodotto terapeutico approvato.

**Tabella 1.** Indicazione companion diagnostic associata a VENTANA PD-L1 (SP142) Assay.

Indicazione per l'uso	Terapia	Cutoff
Carcinoma mammario triplo negativo (TNBC)	TECENTRIQ	≥ 1% IC
Cancro del polmone non a piccole cellule (NSCLC)	TECENTRIQ	≥ 1% TC o ≥ 1% IC

**Tabella 2.** Indicazione complementary diagnostic di VENTANA PD-L1 (SP142) Assay.

Indicazione per l'uso	Terapia	Cutoff
Cancro del polmone non a piccole cellule (NSCLC)	TECENTRIQ	≥ 50% TC o ≥ 10% IC

I risultati dei test ottenuti tramite questo prodotto devono essere interpretati da un patologo qualificato in un quadro che consideri anche gli esami istologici, i dati clinici pertinenti e i controlli adeguati.

Questo prodotto è indicato per uso diagnostico in vitro (IVD).

### SOMMARIO E SPIEGAZIONE

VENTANA PD-L1 (SP142) Assay è un'analisi immunostochimica (IHC) che utilizza un anticorpo primario monoclonale di coniglio anti-PD-L1 per riconoscere la proteina PD-L1. Questa analisi è stata co-sviluppata da Roche/Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana) e Roche/Genentech per identificare i pazienti più predisposti a rispondere al trattamento con TECENTRIQ®.

PD-L1 è una proteina transmembrana che regola negativamente le risposte immunitarie legandosi ai suoi due recettori Programmed Death-1 (PD-1) e B7.1. PD-1 è un recettore

inibitorio espresso sulle cellule T in seguito alla loro attivazione, sostenuta in stati di stimolazione cronica quali l'infezione cronica o il cancro.<sup>1</sup> Il legame tra PD-L1 e PD-1 inibisce la proliferazione delle cellule T, la produzione di citochine e l'attività citolitica, determinando l'inattivazione funzionale o l'esaurimento delle cellule T. B7.1 è una molecola espressa sulle cellule che presentano l'antigene e sulle cellule T attivate. Il legame tra PD-L1 e B7.1 sui linfociti T e sulle cellule che presentano l'antigene può mediare la sottoregolazione delle risposte immunitarie, inibendo ad esempio l'attivazione dei linfociti T e la produzione di citochine.<sup>2</sup> L'espressione di PD-L1 è stata osservata in cellule immunitarie e in cellule maligne e l'espressione aberrante della PD-L1 nelle cellule tumorali (TC) è risultata impedire l'immunità antitumorale, determinando un'evasione della risposta immunitaria.<sup>1,3</sup> Pertanto, il blocco del pathway PD-L1/PD-1 rappresenta una strategia interessante per rafforzare l'immunità dei linfociti T specifici del tumore soppressa dall'espressione di PD-L1 nel microambiente tumorale. L'associazione tra l'espressione di PD-L1 nelle TC o nelle cellule immunitarie (IC) infiltranti il tumore e il beneficio clinico degli inibitori del pathway PD-L1/PD-1 è stata segnalata in diversi tipi di cancro.<sup>3-7</sup>

Atezolizumab è un anticorpo monoclonale umanizzato ingegnerizzato Fc che si lega a PD-L1 e blocca le interazioni con i recettori PD-1 e B7.1. Atezolizumab è una immunoglobulina IgG1 kappa non glicosilata con massa molecolare calcolata di 145 kDa.

### PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

VENTANA PD-L1 (SP142) Assay utilizza un anticorpo primario monoclonale di coniglio che si lega a PD-L1 nelle sezioni di tessuto incluse in paraffina. L'anticorpo specifico può essere visualizzato utilizzando OptiView DAB IHC Detection Kit (n. di cat. 760-700 / 06396500001) seguito da OptiView Amplification Kit (n. di cat. 760-099 / 06396518001 (50 test) o 860-099 / 06718663001 (250 test)). Per ulteriori informazioni, fare riferimento agli opportuni allegati alle confezioni di OptiView DAB IHC Detection Kit e OptiView Amplification Kit.

### MATERIALI FORNITI

VENTANA PD-L1 (SP142) Assay contiene una quantità di reagente sufficiente per 50 test. Un erogatore da 5 mL di VENTANA PD-L1 (SP142) Assay contiene circa 36 µg di anticorpo monoclonale di coniglio.

L'anticorpo è diluito in soluzione salina tamponata tris 0.05 M, EDTA 0.01 M, Brij-35 0.05% con proteina di trasporto 0.3% e sodio azide 0.05%, come conservante.

La concentrazione proteica totale del reagente è di circa 3 mg/mL. La concentrazione specifica dell'anticorpo è di circa 7 µg/mL.

VENTANA PD-L1 (SP142) Assay contiene un anticorpo monoclonale ricombinante di coniglio prodotto come surmatante di coltura cellulare purificato.

Fare riferimento all'opportuna guida all'interpretazione per ottenere istruzioni dettagliate sull'interpretazione della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay in specifiche indicazioni:

- Guida all'interpretazione di VENTANA PD-L1 (SP142) Assay per TNBC (P/N 1018231EN)
- Guida all'interpretazione di VENTANA PD-L1 (SP142) Assay per NSCLC ≥ 1% TC o ≥ 1% IC - algoritmo di valutazione per fasi (P/N 1015654EN)
- Guida all'interpretazione di VENTANA PD-L1 (SP142) Assay per NSCLC ≥ 50% TC o ≥ 10% IC - algoritmo di valutazione per fasi (P/N 1015703EN)

Fare riferimento all'opportuno allegato alla confezione del kit di rilevazione VENTANA per le descrizioni dettagliate di quanto segue: Principio della procedura, Materiali e metodi, Prelievo dei campioni e preparazione per l'analisi, Procedure di controllo qualità, Risoluzione dei problemi, Interpretazione dei risultati e Limitazioni generali.

### MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

I reagenti di colorazione, quali i kit di rilevazione VENTANA e i componenti ausiliari, compresi i vetrini dei tessuti di controllo positivi e negativi, non sono forniti.

È possibile che non tutti i prodotti elencati nell'allegato alla confezione siano disponibili in tutte le aree geografiche. Rivolgersi al rappresentante dell'assistenza locale.

I reagenti e materiali seguenti possono essere necessari per la colorazione:

1. Tessuti benigni di tonsilla umana da utilizzare come tessuti di controllo
2. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (n. di cat. 790-4795 / 06683380001)
3. Vetrini per microscopia, caricati positivamente
4. Etichette con codice a barre
5. Xilene (per istologia)

6. Etanolo o alcol reagente (per istologia)
  - Soluzione al 100%: etanolo o alcol reagente non diluito
  - Soluzione al 95%: miscelare 95 parti di etanolo o alcol reagente con 5 parti di acqua deionizzata
  - Soluzione al 80%: miscelare 80 parti di etanolo o alcol reagente con 20 parti di acqua deionizzata
7. Acqua deionizzata o distillata
8. OptiView DAB IHC Detection Kit (n. di cat. 760-700 / 06396500001)
9. OptiView Amplification Kit (n. di cat. 760-099 / 06396518001(50 test) o 860-099 / 06718663001 (250 test))
10. EZ Prep Concentrate (10X) (n. di cat. 950-102 / 05279771001)
11. Reaction Buffer Concentrate (10X) (n. di cat. 950-300 / 05353955001)
12. LCS (Predilute) (n. di cat. 650-010 / 05264839001) per strumenti BenchMark XT e GX
13. ULTRA LCS (Predilute) (n. di cat. 650-210 / 05424534001) per lo strumento BenchMark ULTRA
14. Cell Conditioning Solution (CC1) (n. di cat. 950-124 / 05279801001) per strumenti BenchMark XT e GX
15. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (n. di cat. 950-224 / 05424569001) per lo strumento BenchMark ULTRA
16. Controcolorazione Hematoxylin II (n. di cat. 790-2208 / 05277965001)
17. Bluing Reagent (n. di cat. 760-2037 / 05266769001)
18. Montante permanente (Permount Fisher n. di cat. SP15-500 o equivalente)
19. Coprioggetto (sufficiente per coprire il tessuto, per esempio VWR n. di cat. 48393-060)
20. Montavetrini automatizzato (per esempio Tissue-Tek SCA Automated Coverslipper)
21. Microscopio ottico
22. Garze assorbenti
23. Strumento BenchMark IHC/ISH

## CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Alla ricezione e quando non è in uso, il prodotto va conservato a 2-8 °C. Non congelare. Per garantire la corretta erogazione di reagente e la stabilità dell'anticorpo, dopo ogni utilizzo riposizionare il tappo e riporre immediatamente l'erogatore in frigorifero in posizione verticale.

Su ogni erogatore di anticorpi è riportata la scadenza. Se conservato adeguatamente, il reagente resta stabile fino alla data indicata sull'etichetta. Non utilizzare il reagente oltre la data di scadenza indicata.

## PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I tessuti FFPE trattati normalmente sono idonei all'uso con questo anticorpo primario se usati con i kit di rilevazione VENTANA e gli strumenti BenchMark IHC/ISH. Si consiglia di utilizzare come fissativo del tessuto formalina neutra tamponata (NBF) al 10% per un minimo di 6 ore e per un massimo di 72 ore. Tempi di fissazione inferiori a 6 ore possono provocare una perdita di colorazione per la proteina PD-L1. La quantità di NBF utilizzata deve essere pari a 15-20 volte il volume di tessuto. Nessun fissativo penetrerà per più di 2-3 mm nel tessuto solido o per 5 mm nel tessuto poroso in un periodo di 24 ore. La fissazione può essere eseguita a temperatura ambiente (15-25 °C).<sup>8,9</sup>

Fissativi quali AFA (alcol-formalina-acido acetico), PREFER e altri fissativi a base di alcol hanno evidenziato una perdita di colorazione specifica della proteina PD-L1 a tutti i tempi di fissazione testati (1-72 ore) e non sono quindi consigliati per questo tipo di analisi. Consultare la guida all'interpretazione per una discussione più approfondita sull'effetto della preparazione del campione sull'intensità della colorazione di PD-L1.

Le sezioni vanno tagliate a uno spessore di circa 4 µm e montate su vetrini di vetro caricati positivamente. I vetrini devono essere colorati immediatamente poiché l'antigenicità delle sezioni di tessuto tagliate potrebbe diminuire con il passare del tempo e risultare compromessa 2 mesi dopo il taglio dal blocco di paraffina per i campioni NSCLC, TNBC e di tonsille (consultare la guida all'interpretazione e la sezione Caratteristiche prestazionali riportata nel seguito).

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Per uso diagnostico in vitro (IVD).
2. Solo per uso professionale.
3. Non usare oltre il numero di test specificato.

4. I vetrini caricati positivamente possono essere suscettibili a sollecitazioni ambientali con conseguente colorazione inadeguata di tutti i dosaggi IHC (ad esempio, assenza di anticorpo primario o controcolorazione sul tessuto). Richiedere al proprio rappresentante Roche una copia del documento "Impacts of Environmental Stresses on IHC Positively Charged Slides" per comprendere meglio come utilizzare questi tipi di vetrini.
5. I materiali di origine umana o animale devono essere maneggiati come materiali a rischio biologico e smaltiti mediante precauzioni appropriate. In caso di esposizione, attenersi alle direttive sanitarie delle autorità responsabili.<sup>10,11</sup>
6. Evitare il contatto dei reagenti con gli occhi e le mucose. Se i reagenti entrano in contatto con aree sensibili, lavare con acqua abbondante.
7. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti, poiché può causare risultati non corretti.
8. Per ulteriori informazioni sull'uso di questo dispositivo, fare riferimento al manuale per l'operatore dello strumento BenchMark IHC/ISH e alle istruzioni per l'uso di tutti i componenti necessari.
9. Consultare le autorità locali e/o statali in relazione al metodo di smaltimento consigliato.
10. Le etichette di sicurezza dei prodotti seguono principalmente le linee guida GHS dell'UE. La scheda dati di sicurezza è disponibile su richiesta per gli utilizzatori professionali.
11. Per segnalare sospetti incidenti gravi correlati a questo dispositivo, contattare il rappresentante locale Roche e l'autorità competente dello Stato membro o del paese in cui risiede l'utilizzatore.

## PROCEDURA DI COLORAZIONE

Gli anticorpi primari VENTANA sono stati sviluppati per l'uso sugli strumenti BenchMark IHC/ISH in abbinamento ai kit di rilevazione e agli accessori VENTANA. Fare riferimento alla Tabella 3 per il protocollo di colorazione consigliato e le procedure di colorazione richieste. Qualsiasi deviazione dalle procedure di test consigliate può inficiare i risultati attesi. È indispensabile utilizzare e documentare controlli appropriati. Gli utenti che modificano le procedure di analisi consigliate si devono assumere ogni responsabilità relativamente all'interpretazione dei risultati.

Questo anticorpo è stato ottimizzato per tempi di incubazione specifici; tuttavia, l'utilizzatore deve convalidare i risultati ottenuti con questo reagente.

È possibile visualizzare i parametri per le procedure automatizzate, stamparli e modificarli conformemente alla procedura descritta nel manuale di istruzioni dello strumento. Fare riferimento all'opportuno allegato alla confezione del kit di rilevazione VENTANA per maggiori dettagli sulle procedure di colorazione IHC.

**Tabella 3.** Protocollo di colorazione consigliato e procedure di colorazione richieste per VENTANA PD-L1 (SP142) Assay e Rabbit Monoclonal Negative Control Ig con OptiView DAB IHC Detection Kit e OptiView Amplification Kit su uno strumento BenchMark ULTRA, BenchMark XT o BenchMark GX.

Procedura di colorazione:		ULTRA VENTANA PDL1 (SP142) XT VENTANA PDL1 (SP142) GX VENTANA PDL1 (SP142)
Fase del protocollo	Input parametro	
Cottura	Opzionale	
Anticorpo (primario)	VENTANA PD-L1 (SP142) selezionato oppure Controllo negativo selezionato	
Controcolorazione	Hematoxylin II, 4 minuti	
Post-controcolorazione	Bluing, 4 minuti	

## PROCEDURE DI CONTROLLO QUALITÀ

### Rabbit Monoclonal Negative Control Ig

Acquisire un vetrino di controllo negativo del reagente corrispondente per ogni campione come ausilio all'interpretazione dei risultati. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig, un anticorpo di controllo negativo del reagente, è specificamente indicato per questa analisi ed è utilizzato al posto dell'anticorpo primario per valutare le colorazioni aspecifiche. La procedura di colorazione del controllo negativo del reagente deve essere uguale al

periodo di incubazione dell'anticorpo primario. L'utilizzo di reagenti di controllo negativo diversi o il mancato utilizzo del reagente di controllo negativo consigliato potrebbe causare risultati falsati.

### Tessuto di controllo delle tonsille

Un tessuto di controllo deve essere incluso in ogni corsa di colorazione. I tessuti benigni di tonsilla umana idonei devono essere utilizzati come controllo. Il tessuto di controllo deve essere fissato il prima possibile e trattato in modo identico ai tessuti del paziente. Tale tessuto può consentire di controllare tutte le fasi dell'analisi, dalla preparazione del tessuto fino alla colorazione. Il tessuto delle tonsille contiene elementi di colorazione positivi e negativi per la proteina PD-L1 ed è quindi idoneo all'uso come tessuto di controllo. I componenti del tessuto di colorazione positivi e negativi sono utilizzati per confermare che l'analisi abbia funzionato correttamente.

La colorazione adeguata dei componenti del tessuto delle tonsille viene descritta nella Tabella 4 e nelle guide all'interpretazione.

### Verifica dell'analisi

Prima dell'uso iniziale di un anticorpo o di un sistema di colorazione in una procedura diagnostica, è necessario verificare la specificità dell'anticorpo effettuando l'analisi su una serie di tessuti con caratteristiche prestazionali IHC note che rappresentino tessuti PD-L1 positivi e negativi (fare riferimento alle Procedure di controllo qualità precedentemente descritte in questa sezione del foglietto illustrativo e alle indicazioni per il controllo qualità del College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist<sup>12</sup> o alle linee guida approvate CLS<sup>13</sup>). Ripetere queste procedure di controllo qualità per ciascun nuovo lotto di anticorpi o ogni volta che vengono modificati i parametri dell'analisi. I tessuti NSCLC e TNBC con stato PD-L1 noto, nonché i campioni benigni di tonsille umane, sono idonei alla verifica dell'analisi.

### INTERPRETAZIONE DELLA COLORAZIONE / RISULTATI PREVISTI

La procedura di immunocolorezione automatizzata VENTANA provoca la precipitazione di un prodotto di reazione di colore marrone (DAB) in corrispondenza dei siti dell'antigene individuati dall'anticorpo VENTANA PD-L1 (SP142) Assay. Il vetrino o i vetrini colorati devono essere interpretati da un patologo qualificato con l'ausilio di un microscopio ottico. Un patologo qualificato con esperienza nelle procedure immunocitochimiche dovrà valutare i tessuti di controllo e qualificare il prodotto colorato prima di interpretare i risultati.

### Interpretazione del tessuto di controllo delle tonsille

Il tessuto di controllo delle tonsille colorato deve essere esaminato per garantire la corretta colorazione. La presenza di colorazione PD-L1 all'interno di macrofagi e linfociti nei centri germinativi e nell'epitelio reticolare della cripta delle tonsille si può utilizzare come elemento di tessuto positivo. L'assenza di colorazione nell'epitelio squamoso superficiale e cellule immunitarie negative nelle regioni interfollicolari delle tonsille fungono da elementi di tessuto negativi. I criteri di accettabilità sono elencati in Tabella 4 (fare riferimento alle guide all'interpretazione per una discussione più approfondita).

Se i tessuti di controllo non evidenziano una colorazione adeguata, qualsiasi risultato ottenuto con i campioni del paziente deve essere considerato come non valutabile ed è necessario ripetere la colorazione.

**Tabella 4.** Criteri di valutazione del tessuto di controllo delle tonsille.

Accettabile	Non accettabile
Elementi positivi del tessuto: colorazione PD-L1 da moderata a intensa nei linfociti e nei macrofagi nei centri germinativi, con colorazione diffusa nelle cellule epiteliali reticolari della cripta.	Eccessiva colorazione di fondo non specifica, che oscura l'identificazione delle cellule PD-L1-positive.
Elementi negativi del tessuto: cellule immunitarie PD-L1-negative nelle regioni interfollicolari con epitelio squamoso superficiale negativo.	Colorazione PD-L1 da debole ad assente nei linfociti e nei macrofagi nei centri germinativi e nelle cellule epiteliali reticolari della cripta.

### Controllo reagente negativo

Una colorazione aspecifica, se presente, avrà un aspetto diffuso e può essere valutata utilizzando il vetrino di controllo negativo del reagente colorato con Rabbit Monoclonal Negative Control Ig. Per l'interpretazione dei risultati della colorazione, prendere in considerazione cellule intatte, poiché spesso le cellule necrotiche o degradate assumono una colorazione aspecifica. Se la colorazione di fondo è eccessiva, i risultati del campione

sottoposto a test non devono essere considerati validi. Nelle guide all'interpretazione è possibile trovare esempi di colorazione di fondo per la presente analisi.

### Tessuto del paziente

Le cellule tumorali (TC) vengono quantificate come percentuale di cellule tumorali con presenza percettibile di colorazione della membrana PD-L1 di qualsiasi intensità. Le cellule immunitarie infiltranti il tumore (IC) vengono quantificate come porzione dell'area tumorale, inclusi stroma intratumorale associato e stroma peritumorale contiguo, occupata da IC con colorazione PD-L1 di qualsiasi intensità. Il tessuto del paziente deve essere valutato in base all'algoritmo di valutazione di VENTANA PD-L1 (SP142) Assay specifico per l'indicazione descritto nella sezione Caratteristiche prestazionali. Fare riferimento alla guida all'interpretazione per l'indicazione specifica per ulteriori informazioni e immagini rappresentative.

### LIMITAZIONI GENERALI

- L'IHC è un processo diagnostico a più fasi che necessita di formazione specialistica nella scelta dei reagenti appropriati, nella selezione dei tessuti, nella fissazione, processazione, preparazione del vetrino per immunocitochimica e nell'interpretazione dei risultati di colorazione.
- La colorazione tessutale dipende dalla manipolazione e dalla processazione del tessuto prima della colorazione. Condizioni inappropriate di fissazione, congelamento, scongelamento, lavaggio, asciugatura, riscaldamento, taglio o la contaminazione con altri tessuti o fluidi possono produrre artefatti, intrappolamento degli anticorpi o risultati falsi negativi. Variazioni nella fissazione e nei metodi di inclusione o le irregolarità intrinseche del tessuto possono provocare risultati incoerenti.
- Una controcolorazione eccessiva o incompleta può compromettere l'interpretazione corretta dei risultati.
- L'interpretazione clinica di qualunque colorazione positiva o della sua assenza deve essere valutata nel contesto dell'anamnesi clinica, della morfologia e di altri criteri istopatologici. L'interpretazione clinica di qualsiasi colorazione o della sua assenza deve essere integrata con studi morfologici, controlli a livello di sistema e da altri test diagnostici. La responsabilità dell'impiego degli anticorpi, dei reagenti e dei metodi utilizzati per interpretare la preparazione colorata spetta al patologo qualificato. È necessario eseguire la colorazione in un laboratorio certificato e autorizzato, sotto la supervisione di un patologo responsabile della revisione dei vetrini colorati e che garantisca l'adeguatezza dei controlli positivi e negativi.
- Ventana Medical Systems, Inc. fornisce anticorpi e reagenti a una diluizione ottimale per l'uso, purché le istruzioni fornite siano rispettate. Qualsiasi deviazione dalle procedure di test consigliate può inficiare i risultati attesi. È indispensabile utilizzare e documentare controlli appropriati. Gli utenti che modificano le procedure di analisi consigliate si devono assumere ogni responsabilità relativamente all'interpretazione dei risultati.
- Questo prodotto non è destinato all'uso nella citometria a flusso perché le caratteristiche prestazionali non sono state determinate.
- I reagenti possono dare luogo a reazioni inattese in tessuti non testati precedentemente. La possibilità di reazioni inattese, anche in gruppi di tessuti già esaminati, non può essere completamente esclusa a causa della variabilità biologica dell'espressione dell'antigene nei neoplasmi e altri tessuti patologici.<sup>14,15</sup>
- I tessuti ottenuti da soggetti affetti dal virus dell'epatite B e contenenti l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) possono evidenziare una colorazione aspecifica con la perossidasi di rafano.<sup>16</sup>
- I risultati falsi positivi possono essere identificati grazie al legame non immunologico delle proteine o ai prodotti di reazione del substrato. Questi risultati possono anche talvolta dipendere da un'attività di pseudo-perossidasi (eritrociti), da un'attività di perossidasi endogena (citocromo C) o dalla biotina endogena (ad es., fegato, cervello, mammella, reni) in funzione del tipo di immunocolorezione impiegata.<sup>17</sup>
- Come in qualsiasi altro test immunocitochimico, un risultato negativo indica che l'antigene non è stato rilevato, non che l'antigene era assente nelle cellule o nei tessuti sottoposti all'analisi.

### LIMITAZIONI SPECIFICHE

- VENTANA PD-L1 (SP142) Assay è stato approvato esclusivamente su strumenti BenchMark IHC/ISH con OptiView DAB IHC Detection Kit e OptiView Amplification Kit e non è approvato per qualsiasi altro tipo di rilevazione o strumento.

- I vetrini dei campioni dei pazienti devono essere colorati con Rabbit Monoclonal Negative Control Ig. Altri reagenti di controllo negativi non sono idonei per quest'analisi
- Quest'analisi non è stata convalidata per l'uso con campioni citologici o campioni ossei decalcificati.
- I tessuti del paziente devono essere colorati entro 2 mesi dal taglio dal blocco di tessuto nel caso di NSCLC, TNBC e tessuti delle tonsille. È stata osservata una perdita di prestazioni di colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay nel caso di sezioni di tessuto conservate a temperatura ambiente per periodi superiori a quelli menzionati.
- Si consiglia di fissare i campioni in NBF al 10% per un periodo compreso tra 6 e 72 ore. L'impiego di tempi e tipi di fissazione diversi da quelli raccomandati possono produrre risultati falsi negativi. Fissativi quali AFA, PREFER e altri fissativi a base di alcol hanno evidenziato una perdita di colorazione specifica della proteina PD-L1. Fare riferimento alla guida all'interpretazione per una discussione più approfondita.
- Artefatti quali macchie DAB, punti vuoti, punti DAB e/o chiazzeria possono richiedere la ripetizione della colorazione qualora interferiscano con l'interpretazione della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay. Confrontare sempre il vetrino colorato PD-L1 con il controllo negativo del reagente per assicurarsi che il fondo sia accettabile. Fare riferimento alla guida all'interpretazione per una discussione più approfondita.
- Nel controllo benigno delle tonsille umane, nei tessuti di testicolo e cervelletto sono stati osservati punti DAB occasionali, mentre nei tessuti ipofisari e pancreatici normali (cellule acinose) è stata osservata una colorazione nucleare focale (Tabella 5); tuttavia, la colorazione nucleare non è inclusa nella valutazione della colorazione di VENTANA PD-L1 (SP142) Assay.

## CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

### INFORMAZIONI GENERALI

Sono stati condotti studi di specificità, sensibilità, impatto dello spessore del tessuto, ripetibilità e precisione intermedia della colorazione, nonché test relativi a precisione dell'operatore, riproducibilità inter-laboratorio e studi sugli esiti clinici, e i risultati sono elencati nella sezione seguente.

#### Osservazioni generali sull'analisi

Salvo diversa indicazione, gli intervalli di confidenza (CI) bilaterali al 95% intorno alle stime di concordanza per tutti gli studi (esclusi gli studi di efficacia clinica) sono stati calcolati con il metodo bootstrap a percentili su 2.000 campioni bootstrap. Se la stima puntuale della concordanza percentuale positiva (PPA), della concordanza percentuale negativa (NPA) o della concordanza percentuale complessiva (OPA) è pari a 0% o 100%, si è utilizzato il metodo del punteggio di Wilson per calcolare il CI al 95%. Se la stima puntuale della concordanza positiva media (APM) e della concordanza negativa media (ANM) è pari a 0% o 100% per il confronto a coppie, si è utilizzato il metodo del punteggio di Wilson di trasformazione per calcolare il CI al 95%.

#### Sensibilità e specificità

Array contenenti vari tessuti normali e neoplastici sono stati colorati con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay e valutati per l'eventuale presenza di colorazione delle cellule immunitarie (qualsiasi colorazione di cellule immunitarie, di qualsiasi intensità), come descritto in Tabella 5 e Tabella 6.

**Tabella 5.** La sensibilità/specifità della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay è stata determinata testando tessuti normali fissati in formalina e inclusi in paraffina.

Tessuto	N. casi positivi <sup>[a]</sup> /totali	Tessuto	N. casi positivi <sup>[a]</sup> /totali
Ghiandola surrenale	1/3	Muscolo, cardiaco	0/3
Vescica	3/36 <sup>[b]</sup>	Muscolo, scheletrico	0/2
Tessuto mammario	1/66	Mieloidi	0/2
Cervelletto	0/3 <sup>[c]</sup>	Nervo, periferico	0/3
Cervello	0/3	Ovaio	0/3

Tessuto	N. casi positivi <sup>[a]</sup> /totali	Tessuto	N. casi positivi <sup>[a]</sup> /totali
Cervice	0/2	Pancreas	0/3 <sup>[d]</sup>
Colon	2/3	Paratiroideo	0/2
Endometrio	2/3	Prostata	0/3
Esofago	0/3	Ghiandola salivare	2/3
Ipofisi	0/3 <sup>[d]</sup>	Cute	0/3
Intestino tenue	1/3	Milza	3/3
Rene	2/3	Stomaco	0/3
Ghiandola linguale	0/1	Testicolo	0/3 <sup>[c]</sup>
Fegato	0/3	Timo	3/3
Polmone	1/25	Ghiandola tiroidea	1/3
Linfonodo	3/3	Tonsille	3/3 <sup>[c]</sup>
Mesotelio	0/3		

[a] Colorazione cellule immunitarie di qualsiasi intensità [b] Colorazione focale cellule immunitarie

[c] Si sono osservati punti DAB focali in 1/3 dei tessuti di cervelletto, 1/3 dei tessuti di testicolo e nel controllo normale delle tonsille

[d] Si è osservata una colorazione nucleare in 1/3 dei tessuti di pancreas e 1/3 dei tessuti di ipofisi

**Tabella 6.** La sensibilità/specifità della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay è stata determinata testando vari tessuti neoplastici fissati in formalina e inclusi in paraffina.

Origine	Patologia	N. casi positivi <sup>[a]</sup> /totali	
		Cellule immunitarie	Cellule tumorali
Addome	Mesotelioma maligno	1/1	0/1
Schiena	Neurofibroma	1/1	0/1
Vescica	Leiomioma maligno di basso grado	0/1	0/1
Vescica	Carcinoma a cellule transizionali	1/1	0/1
Osso	Osteosarcoma	0/1	0/1
Tessuto mammario	Carcinoma duttale invasivo	1/2	0/2
Tessuto mammario	Carcinoma intraduttale con infiltrato precoce	1/1	0/1
Cervello	Gioblastoma	1/1	0/1
Cervello	Meningioma atipico	0/1	0/1
Cervello	Ependimoma maligno	0/1	0/1
Cervello	Oligodendroglioma	0/1	0/1
Colon	Adenocarcinoma	1/1	0/1

Origine	Patologia	N. casi positivi <sup>[a]</sup> /totali	
		Cellule immunitarie	Cellule tumorali
Colon	Interstizioma	0/1	0/1
Esofago	Carcinoma neuroendocrino	0/1	0/1
Esofago	Adenocarcinoma	1/1	0/1
Intestino	Adenocarcinoma	1/1	0/1
Intestino	Sarcoma stromale	1/1	0/1
Rene	Carcinoma a cellule chiare	1/1	0/1
Fegato	Carcinoma epatocellulare	0/1	0/1
Fegato	Epatoblastoma	1/1	0/1
Polmone	Adenocarcinoma	0/1	0/1
Polmone	Carcinoma indifferenziato a piccole cellule	1/1	1/1
Polmone	Carcinoma a cellule squamose	1/1	0/1
Linfonodo	Linfoma diffuso a cellule B	1/1 <sup>[b]</sup>	1/1 <sup>[b]</sup>
Linfonodo	Linfoma di Hodgkin	1/1	1/1
Mediastino	Linfoma diffuso a cellule B	1/1 <sup>[b]</sup>	1/1 <sup>[b]</sup>
Muscolo, liscio	Leiomiomasarcoma maligno di grado moderato	1/1	0/1
Muscolo, striato	Rabdomiosarcoma embrionale	0/1	0/1
Ovaio	Adenocarcinoma sieroso	1/1	0/1
Ovaio	Adenocarcinoma	1/1	0/1
Pancreas	Tumore delle cellule insulari	0/1	0/1
Pancreas	Adenocarcinoma	1/1	0/1
Cavità pelvica	Linfoma anaplastico a grandi cellule	1/1 <sup>[b]</sup>	1/1 <sup>[b]</sup>
Prostata	Adenocarcinoma	0/2	0/2
Retto	Adenocarcinoma	1/1	1/1
Retto	Interstizioma maligno moderato	0/1	0/1
Retto	Melanoma maligno	1/1	0/1
Retroperitoneo	Neuroblastoma	1/1	0/1
Retroperitoneo	Rabdomiosarcoma a cellule fusate	0/1	0/1
Cute	Carcinoma delle cellule basali	1/1	0/1
Cute	Carcinoma a cellule squamose	1/1	0/1
Milza	Linfoma diffuso a cellule B	1/1 <sup>[b]</sup>	1/1 <sup>[b]</sup>
Stomaco	Carcinoma a cellule ad anello con castone	1/1	0/1
Testicolo	Seminoma	1/1	0/1

Origine	Patologia	N. casi positivi <sup>[a]</sup> /totali	
		Cellule immunitarie	Cellule tumorali
Testicolo	Carcinoma embrionale	0/1	0/1
Tiroide	Carcinoma midollare	0/1	0/1
Tiroide	Carcinoma papillare	0/1	1/1
Cervice uterina	Carcinoma a cellule squamose	2/2	0/2
Utero	Leiomioma	0/1	0/1
Utero	Adenocarcinoma	1/1	0/1
Utero	Carcinoma a cellule chiare dell'endometrio	1/1	1/1

[a] Colorazione delle cellule immunitarie o tumorali di qualsiasi intensità

[b] Non è stato possibile distinguere la colorazione delle cellule tumorali e delle cellule immunitarie

## CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI - NSCLC

### Algoritmo di valutazione - NSCLC

Il tessuto NSCLC deve essere valutato in base all'algoritmo di valutazione di VENTANA PD-L1 (SP142) Assay per NSCLC fornito in Tabella 7 e Tabella 8. Il campione deve essere considerato caratterizzato da espressione di PD-L1 se presenta  $\geq 1\%$  TC o  $\geq 1\%$  IC e caratterizzato da un'espressione elevata di PD-L1 se presenta  $\geq 50\%$  TC o  $\geq 10\%$  IC. Fare riferimento alla guida all'interpretazione (P/N 1015654EN e 1015703EN) per ulteriori informazioni e immagini rappresentative.

**Tabella 7.** Algoritmo di valutazione di VENTANA PD-L1 (SP142) per NSCLC  $\geq 1\%$  TC o  $\geq 1\%$  IC.

FASE 1	Valutazione della colorazione delle cellule tumorali (TC)	Espressione di PD-L1
	Presenza di colorazione PD-L1 percettibile della membrana di qualsiasi intensità in una percentuale di cellule tumorali $\geq 1\%$	$\geq 1\%$ TC
	Assenza di colorazione PD-L1 percettibile OPPURE Presenza di colorazione PD-L1 percettibile della membrana di qualsiasi intensità in una percentuale di cellule tumorali $< 1\%$	Passare alla Fase 2
FASE 2	Valutazione della colorazione delle cellule immunitarie (IC) infiltranti il tumore	Espressione di PD-L1
	Presenza di colorazione PD-L1 percettibile di qualsiasi intensità nelle cellule immunitarie infiltranti il tumore su una percentuale $\geq 1\%$ dell'area tumorale occupata da cellule tumorali, stroma intratumorale associato e stroma peritumorale contiguo	$\geq 1\%$ IC
	Assenza di colorazione PD-L1 percettibile OPPURE Presenza di colorazione PD-L1 percettibile di qualsiasi intensità nelle cellule immunitarie infiltranti il tumore su una percentuale $< 1\%$ dell'area tumorale occupata da cellule tumorali, stroma intratumorale associato e stroma peritumorale contiguo	$< 1\%$ TC e $< 1\%$ IC

**Tabella 8.** Algoritmo di valutazione di VENTANA PD-L1 (SP142) Assay per NSCLC ≥ 50% TC o ≥ 10% IC.

FASE 1	Valutazione della colorazione delle cellule tumorali (TC)	Espressione di PD-L1
	Presenza di colorazione PD-L1 percettibile della membrana di qualsiasi intensità in una percentuale di cellule tumorali ≥ 50%	≥ 50% TC
	Assenza di colorazione PD-L1 percettibile OPPURE Presenza di colorazione PD-L1 percettibile della membrana di qualsiasi intensità in una percentuale di cellule tumorali <50%	Passare alla Fase 2
FASE 2	Valutazione della colorazione delle cellule immunitarie (IC) infiltranti il tumore	Espressione di PD-L1
	Presenza di colorazione PD-L1 percettibile di qualsiasi intensità nelle cellule immunitarie infiltranti il tumore su una percentuale ≥ 10% dell'area tumorale occupata da cellule tumorali, stroma intratumorale associato e stroma peritumorale contiguo	≥ 10% IC
	Assenza di colorazione PD-L1 percettibile OPPURE Presenza di colorazione PD-L1 percettibile di qualsiasi intensità nelle cellule immunitarie infiltranti il tumore su una percentuale < 10% dell'area tumorale occupata da cellule tumorali, stroma intratumorale associato e stroma peritumorale contiguo	< 50% TC e < 10% IC

### Spessore del tessuto - NSCLC

Lo spessore del tessuto è stato valutato utilizzando campioni NSCLC. Le sezioni duplicate a 3, 4, 5, 6 e 7 micron sono state colorate con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay e valutate per l'espressione di PD-L1 in TC e IC. In totale sono stati valutati 42 campioni NSCLC con un intervallo di espressione di PD-L1 per ciascun livello di IC e TC.

Tutti gli spessori di tessuto hanno evidenziato un'adeguata colorazione specifica per PD-L1 e livelli di fondo accettabili per la colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay. Nessuna sezione ha presentato una variazione nel livello di espressione di PD-L1 in TC o IC nell'intervallo di spessore testato. Ventana consiglia di tagliare i campioni NSCLC a 4 micron per la colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay.

### Ripetibilità e precisione intermedia - NSCLC

Sono stati completati studi della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay di campioni NSCLC al fine di dimostrare quanto segue:

- Ripetibilità all'interno dello stesso giorno - 5 vetrini replicati ottenuti da ciascun campione NSCLC sono stati colorati con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay su un solo strumento BenchMark ULTRA in un unico giorno e valutati per l'espressione di PD-L1 in TC e IC. In totale sono stati valutati 66 campioni NSCLC con un intervallo di espressione di PD-L1 per ciascun livello di espressione di TC e IC.
- Precisione tra un giorno e l'altro - 10 vetrini ottenuti da ciascun campione NSCLC sono stati colorati con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay su un solo strumento BenchMark ULTRA in 5 giorni non consecutivi. In totale sono stati valutati 66 campioni NSCLC con un intervallo di espressione di PD-L1 per ciascun livello di espressione di IC e TC.
- Precisione di strumenti, anticorpi e lotti di kit di rilevazione - almeno 9 vetrini ottenuti da ciascun campione NSCLC sono stati colorati con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay utilizzando tre lotti di anticorpo VENTANA PD-L1 (SP142) e tre lotti accoppiati di OptiView DAB IHC Detection Kit e OptiView Amplification Kit, su tre strumenti BenchMark ULTRA. In totale sono stati valutati 92 campioni NSCLC con un intervallo di espressione di PD-L1 per ciascun livello di espressione di TC e IC.
- Precisione all'interno della piattaforma - 2 vetrini replicati ottenuti da ciascun campione NSCLC sono stati colorati con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay su tre strumenti BenchMark ULTRA, tre strumenti BenchMark XT e tre strumenti

BenchMark GX. In totale sono stati valutati 38 campioni NSCLC con un intervallo di espressione di PD-L1 per ciascun livello di espressione di IC e TC. I tassi di concordanza sono stati calcolati relativamente alla modalità del campione per ciascuna piattaforma.

Tutti i vetrini erano in cieco e randomizzati e sono stati quindi valutati per il livello di espressione di PD-L1 in TC o IC. I risultati sono riassunti in Tabella 9, Tabella 10, Tabella 11 e Tabella 12.

**Tabella 9.** Ripetibilità e precisione intermedia della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay di campioni NSCLC (espressione di PD-L1 ≥ 1% TC).

Parametro ripetibilità/precisione intermedia	Concordanza % (CI al 95%) <sup>[a]</sup>
Ripetibilità all'interno dello stesso giorno (in un unico giorno), 10 campioni NSCLC	PPA: 100.0 (86.7-100.0) NPA: 100.0 (86.7-100.0) OPA: 100.0 (92.9-100.0)
Precisione tra un giorno e l'altro (5 giorni non consecutivi), 10 campioni NSCLC	PPA: 100.0 (92.9- 100.0) NPA: 100.0 (92.9- 100.0) OPA: 100.0 (96.3- 100.0)
Precisione inter-strumentale e tra lotti (rispetto alla modalità caso-livello, tra strumenti e lotti), 18 campioni NSCLC	PPA: 99.2 (97.0-99.8) NPA: 100.0 (98.4-100.0) OPA: 99.6 (98.5-99.9)
Precisione all'interno della piattaforma (tre strumenti BenchMark ULTRA), 12 campioni NSCLC	PPA: 100.0 (86.2-100.0) NPA: 95.8 (86.0-98.8) OPA: 97.2 (90.4-99.2)
Precisione all'interno della piattaforma (tre strumenti BenchMark XT), 12 campioni NSCLC	PPA: 100.0 (86.2-100.0) NPA: 100.0 (92.6-100.0) OPA: 100.0 (94.0-100.0)
Precisione all'interno della piattaforma (tre strumenti BenchMark GX), 12 campioni NSCLC	PPA: 100.0 (86.2-100.0) NPA: 100.0 (92.6-100.0) OPA: 100.0 (94.0-100.0)

<sup>[a]</sup> CI con il metodo del punteggio di Wilson bilaterale

**Tabella 10.** Ripetibilità e precisione intermedia della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay di campioni NSCLC (espressione di PD-L1 ≥ 1% IC).

Parametro ripetibilità/precisione intermedia	Concordanza % (CI al 95%)
Ripetibilità all'interno dello stesso giorno (in un unico giorno), 8 campioni NSCLC	PPA: 100.0 (91.2-100.0) <sup>[a]</sup> NPA: 100.0 (91.2-100.0) <sup>[a]</sup> OPA: 100.0 (95.4-100.0) <sup>[a]</sup>
Precisione tra un giorno e l'altro (5 giorni non consecutivi), 8 campioni NSCLC	PPA: 100.0 (96.3-100.0) <sup>[a]</sup> NPA: 97.0 (91.6-99.0) <sup>[a]</sup> OPA: 98.5 (95.7-99.5) <sup>[a]</sup>
Concordanza tra anticorpi e tra rilevazioni (confronto a coppie), 28 campioni NSCLC	APA: 98.4 (95.7-100.0) ANA: 98.3 (95.6-100.0) OPA: 98.4 (95.9-100.0)
Concordanza inter-strumentale e tra rilevazioni (confronto a coppie), 28 campioni NSCLC	APA: 98.4 (95.8- 100.0) ANA: 98.3 (95.4-100.0) OPA: 98.4 (95.8-100.0)
Concordanza inter-strumentale e tra anticorpi (confronti a coppie), 28 campioni NSCLC	APA: 98.4 (95.9-100.0) ANA: 98.3 (95.5-100.0) OPA: 98.4 (95.8- 100.0)
Precisione all'interno della piattaforma (tre strumenti BenchMark ULTRA), 8 campioni NSCLC	PPA: 100.0 (94.0-100.0) <sup>[a]</sup> NPA: 100.0 (94.0-100.0) <sup>[a]</sup> OPA: 100.0 (96.9-100.0) <sup>[a]</sup>
Precisione all'interno della piattaforma (tre strumenti BenchMark XT), 8 campioni NSCLC	PPA: 100.0 (94.0-100.0) <sup>[a]</sup> NPA: 100.0 (94.0-100.0) <sup>[a]</sup> OPA: 100.0 (96.9-100.0) <sup>[a]</sup>

Parametro ripetibilità/precisione intermedia	Concordanza % (CI al 95%)
Precisione all'interno della piattaforma (tre strumenti BenchMark GX), 8 campioni NSCLC	PPA: 100.0 (94.0-100.0) <sup>[a]</sup> NPA: 100.0 (94.0-100.0) <sup>[a]</sup> OPA: 100.0 (96.9-100.0) <sup>[a]</sup>

[a] CI con il metodo del punteggio di Wilson bilaterale

**Tabella 11.** Ripetibilità e precisione intermedia della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay di campioni NSCLC (espressione di PD-L1  $\geq$  50% TC).

Parametro ripetibilità/precisione intermedia	Concordanza % (CI al 95%) <sup>[a]</sup>
Ripetibilità all'interno dello stesso giorno (in un unico giorno), 24 campioni NSCLC	PPA: 100.0 (94.4-100.0) NPA: 100.0 (93.5-100.0) OPA: 100.0 (96.9-100.0)
Precisione tra un giorno e l'altro (5 giorni non consecutivi), 24 campioni NSCLC	PPA: 100.0 (97.1-100.0) NPA: 100.0 (96.5-100.0) OPA: 100.0 (98.4-100.0)
Precisione inter-strumentale e tra lotti (confrontata con la modalità caso-livello, tra strumenti e lotti), 18 campioni NSCLC	PPA: 99.7 (98.1-99.9) NPA: 95.2 (91.2-97.5) OPA: 97.9 (96.2-98.9)
Precisione all'interno della piattaforma (tre strumenti BenchMark ULTRA), 10 campioni NSCLC	PPA: 100.0 (88.6-100.0) NPA: 100.0 (88.6-100.0) OPA: 100.0 (94.0-100.0)
Precisione all'interno della piattaforma (tre strumenti BenchMark XT), 10 campioni NSCLC	PPA: 96.7 (83.3-99.4) NPA: 100.0 (88.6-100.0) OPA: 98.3 (91.1-99.7)
Precisione all'interno della piattaforma (tre strumenti BenchMark GX), 10 campioni NSCLC	PPA: 100.0 (88.6-100.0) NPA: 100.0 (88.6-100.0) OPA: 100.0 (94.0-100.0)

[a] CI con il metodo del punteggio di Wilson bilaterale

**Tabella 12.** Ripetibilità e precisione intermedia della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay di campioni NSCLC (espressione di PD-L1  $\geq$  10% IC).

Parametro ripetibilità/precisione intermedia	Concordanza % (CI al 95%)
Ripetibilità all'interno dello stesso giorno (in un unico giorno), 24 campioni NSCLC	PPA: 98.3 (91.1-99.7) <sup>[a]</sup> NPA: 100.0 (94.0-100.0) <sup>[a]</sup> OPA: 99.2 (95.4-99.9) <sup>[a]</sup>
Precisione tra un giorno e l'altro (5 giorni non consecutivi), 24 campioni NSCLC	PPA: 96.2 (91.3-98.3) <sup>[a]</sup> NPA: 98.2 (93.6-99.5) <sup>[a]</sup> OPA: 97.1 (94.1-98.6) <sup>[a]</sup>
Concordanza tra anticorpi e tra rilevazioni (confronto a coppie), 28 campioni NSCLC	APA: 95.1 (91.1-98.1) ANA: 90.2 (82.3-96.2) OPA: 93.4 (88.7-97.5)
Concordanza inter-strumentale e tra lotti di rilevazione (confronto a coppie), 28 campioni NSCLC	APA: 96.3 (93.2-98.8) ANA: 92.7 (86.0-97.7) OPA: 95.1 (91.2-98.4)
Concordanza inter-strumentale e tra anticorpi (confronti a coppie), 28 campioni NSCLC	APA: 96.3 (93.1-98.8) ANA: 92.6 (85.9-97.8) OPA: 95.1 (91.1-98.4)
Precisione all'interno della piattaforma (tre strumenti BenchMark ULTRA), 8 campioni NSCLC	PPA: 100.0 (94.0-100.0) <sup>[a]</sup> NPA: 100.0 (94.0-100.0) <sup>[a]</sup> OPA: 100.0 (96.9-100.0) <sup>[a]</sup>

Parametro ripetibilità/precisione intermedia	Concordanza % (CI al 95%)
Precisione all'interno della piattaforma (tre strumenti BenchMark XT), 8 campioni NSCLC	PPA: 100.0 (94.0-100.0) <sup>[a]</sup> NPA: 100.0 (94.0-100.0) <sup>[a]</sup> OPA: 100.0 (96.9-100.0) <sup>[a]</sup>
Precisione all'interno della piattaforma (tre strumenti BenchMark GX), 8 campioni NSCLC	PPA: 100.0 (94.0-100.0) <sup>[a]</sup> NPA: 100.0 (94.0-100.0) <sup>[a]</sup> OPA: 100.0 (96.9-100.0) <sup>[a]</sup>

[a] CI con il metodo del punteggio di Wilson bilaterale

### Concordanza tra piattaforme - NSCLC

Singoli vetrini ciascuno da 44 campioni NSCLC per l'espressione di PD-L1  $\geq$  1% TC o  $\geq$  1% IC (23 PD-L1  $\geq$  1% TC o  $\geq$  1% IC e 21 PD-L1  $<$  1% TC e  $<$  1% IC) e 44 campioni NSCLC per l'espressione di PD-L1  $\geq$  50% TC o  $\geq$  10% IC (21 PD-L1  $\geq$  50% TC o  $\geq$  10% IC e 23 PD-L1  $<$  50% TC e  $<$  10% IC) sono stati colorati con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay su uno strumento BenchMark ULTRA (riferimento), uno strumento BenchMark XT e uno strumento BenchMark GX.

Tutti i vetrini erano in cieco e randomizzati e sono stati quindi valutati con l'algoritmo di valutazione VENTANA PD-L1 (SP142) Assay per NSCLC (Tabella 7 per NSCLC  $\geq$  1% TC o  $\geq$  1% IC e Tabella 8 per NSCLC  $\geq$  50% TC o  $\geq$  10% IC). I risultati sono riassunti in Tabella 13 e Tabella 14.

**Tabella 13.** Concordanza tra piattaforme della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay di campioni NSCLC (espressione di PD-L1  $\geq$  1% TC o  $\geq$  1% IC).

Concordanza tra piattaforme	Concordanza % (CI al 95%) <sup>[a]</sup>
BenchMark ULTRA: BenchMark XT	PPA: 100.0 (85.7-100.0) NPA: 100.0 (84.5-100.0) OPA: 100.0 (92.0-100.0)
BenchMark ULTRA: BenchMark GX	PPA: 100.0 (85.7-100.0) NPA: 100.0 (84.5-100.0) OPA: 100.0 (92.0-100.0)

[a] CI con il metodo del punteggio di Wilson bilaterale

**Tabella 14.** Concordanza tra piattaforme della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay di campioni NSCLC (espressione di PD-L1  $\geq$  50% TC o  $\geq$  10% IC).

Concordanza tra piattaforme	Concordanza % (CI al 95%) <sup>[a]</sup>
BenchMark ULTRA: BenchMark XT	PPA: 95.2 (77.3-99.2) NPA: 100.0 (85.7-100.0) OPA: 97.7 (88.2-99.6)
BenchMark ULTRA: BenchMark GX	PPA: 95.2 (77.3-99.2) NPA: 100.0 (85.1-100.0) OPA: 97.7 (87.9-99.6)

[a] CI con il metodo del punteggio di Wilson bilaterale

### Studio sulla precisione dell'operatore - NSCLC

Per valutare la precisione inter-operatore e intra-operatore, tre patologi hanno esaminato 80 casi NSCLC unici per valutare l'espressione di PD-L1  $\geq$  1% TC o  $\geq$  1% IC e 80 campioni NSCLC per valutare l'espressione di PD-L1  $\geq$  50% TC o  $\geq$  10% IC, entro un intervallo di espressione di PD-L1, che erano stati colorati con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay. I campioni erano in cieco e sono stati randomizzati prima della valutazione dello stato PD-L1 utilizzando l'algoritmo di valutazione VENTANA PD-L1 (SP142) Assay per NSCLC (Tabella 7 per NSCLC  $\geq$  1% TC o  $\geq$  1% IC e Tabella 8 per NSCLC  $\geq$  50% TC o  $\geq$  10% IC). Gli operatori hanno assegnato il punteggio ai casi per due volte con un intervallo di almeno due settimane fra le letture. I tassi di concordanza tra gli operatori e tra le diverse letture di ciascun patologo sono riassunti in Tabella 15 e Tabella 16.

**Tabella 15.** Precisione dell'operatore della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay di campioni NSCLC (espressione di PD-L1  $\geq$  1% TC o  $\geq$  1% IC).

Precisione dell'operatore	Concordanza % (CI al 95%)
Precisione inter-operatore (media dei confronti a coppie, operatore con operatore, dalla prima lettura)	APA: 93.7 (88.8- 97.3) ANA: 90.7 (83.3- 96.2) OPA: 92.5 (87.5-96.7)
Precisione intra-operatore (media dei tassi di concordanza dei tre operatori tra la prima e la seconda lettura)	APA: 95.4 (92.0-98.1) ANA: 93.4 (88.3-97.2) OPA: 94.6 (90.8- 97.5)

**Tabella 16.** Precisione dell'operatore della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay di campioni NSCLC (espressione di PD-L1  $\geq$  50% TC o  $\geq$  10% IC).

Precisione dell'operatore	Concordanza % (CI al 95%)
Precisione inter-operatore (media dei confronti a coppie, operatore con operatore, dalla prima lettura)	APA: 88.8 (82.0-94.1) ANA: 89.0 (82.2-94.4) OPA: 88.9 (82.8-94.1)
Precisione intra-operatore (media dei tassi di concordanza dei tre operatori tra la prima e la seconda lettura)	APA: 93.7 (89.9-96.6) ANA: 93.6 (89.8-96.7) OPA: 93.6 (90.3-96.6)

#### Studio di riproducibilità inter-laboratorio - NSCLC

È stato condotto uno studio di riproducibilità inter-laboratorio per la colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay per dimostrare la riproducibilità dell'analisi nella determinazione dello stato PD-L1 in campioni di tessuto NSCLC. Ventotto campioni NSCLC unici per l'espressione di PD-L1  $\geq$  1% TC o  $\geq$  1% IC e 28 campioni NSCLC per l'espressione di PD-L1  $\geq$  50% TC o  $\geq$  10% IC entro un intervallo di espressione di PD-L1 sono stati colorati presso 3 laboratori esterni in ciascuno di 5 giorni non consecutivi su un periodo di almeno 20 giorni. Prima della colorazione, i vetrini sono stati messi in cieco e randomizzati. Presso ciascun sito, i vetrini colorati sono stati valutati indipendentemente da 2 patologi (operatori) utilizzando l'algoritmo di valutazione di VENTANA PD-L1 (SP142) Assay per NSCLC (Tabella 7 per NSCLC  $\geq$  1% TC o  $\geq$  1% IC e Tabella 8 per NSCLC  $\geq$  50% TC o  $\geq$  10% IC). I risultati sono riassunti in Tabella 17 e Tabella 18.

**Tabella 17.** Riproducibilità inter-laboratorio della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay di campioni NSCLC (espressione di PD-L1  $\geq$  1% TC o  $\geq$  1% IC).

Riproducibilità inter-laboratorio	Concordanza % (CI al 95%)
Concordanza complessiva (confrontata con un punteggio per consenso, in tutti i siti, i giorni e per tutti gli operatori)	PPA: 97.1 (94.9- 98.3)[a] NPA: 89.9 (86.6- 92.5)[a] OPA: 93.5 (91.6-95.0)[a]
Concordanza inter-sito (media dei confronti a coppie, sito con sito)	APA: 88.4 (78.9- 94.1) ANA: 86.6 (79.6-92.2) OPA: 87.6 (86.8- 88.3)[a]
Concordanza inter-operatore (media dei confronti a coppie, operatore con operatore, per ciascun sito)	APA: 89.2 (80.8- 94.3) ANA: 87.5 (81.3- 92.5) OPA: 88.4 (84.9- 91.2)[a]

[a] CI con il metodo del punteggio di Wilson bilaterale

**Tabella 18.** Riproducibilità inter-laboratorio della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay di campioni NSCLC (espressione di PD-L1  $\geq$  50% TC o  $\geq$  10% IC).

Riproducibilità inter-laboratorio	Concordanza % (CI al 95%)
Concordanza complessiva (confrontata con un punteggio per consenso, in tutti i siti, i giorni e per tutti gli operatori)	PPA: 86.6 (83.0-89.5)[a] NPA: 99.8 (98.7-100.0)[a] OPA: 93.2 (91.3-94.7)[a]

Riproducibilità inter-laboratorio	Concordanza % (CI al 95%)
Concordanza inter-sito (media dei confronti a coppie, sito con sito)	APA: 89.5 (80.9-95.5) ANA: 92.1 (84.4-97.1) OPA: 91.0 (90.3-91.6)[a]
Concordanza inter-operatore (media dei confronti a coppie, operatore con operatore, per ciascun sito)	APA: 93.9 (89.3-97.4) ANA: 95.4 (90.6-98.2) OPA: 94.7 (92.2-96.5)[a]

[a] CI con il metodo del punteggio di Wilson bilaterale

#### PRESTAZIONI CLINICHE - NSCLC $\geq$ 1% TC o $\geq$ 1% IC

È stato condotto uno studio randomizzato open-label di fase III, GO29436 (IMpower150), per valutare l'efficacia e la sicurezza di Tecentriq in combinazione con paclitaxel e carboplatino (CP), con o senza Avastin (bevacizumab), in pazienti non precedentemente trattati con chemioterapia con NSCLC a cellule non squamose metastatico. È stato arruolato un totale di 1.202 pazienti randomizzati in rapporto 1:1:1. La randomizzazione è stata stratificata per sesso, presenza di metastasi epatiche ed espressione di PD-L1 in TC e IC.

I pazienti sono stati randomizzati in uno dei seguenti tre bracci di trattamento.

- Braccio A: Tecentriq 1.200 mg, paclitaxel 175 mg/m<sup>2</sup> o 200 mg/m<sup>2</sup> e carboplatino AUC 6 mg/mL/min il giorno 1 di ciascun ciclo di 21 giorni per un massimo di 4 o 6 cicli
- Braccio B: Tecentriq 1.200 mg, bevacizumab 15 mg/kg, paclitaxel 175 mg/m<sup>2</sup> o 200 mg/m<sup>2</sup> e carboplatino AUC 6 mg/mL/min il giorno 1 di ciascun ciclo di 21 giorni per un massimo di 4 o 6 cicli
- Braccio C: bevacizumab 15 mg/kg, paclitaxel 175 mg/m<sup>2</sup> o 200 mg/m<sup>2</sup> e carboplatino AUC 6 mg/mL/min il giorno 1 di ciascun ciclo di 21 giorni per un massimo di 4 o 6 cicli.

Carboplatino e paclitaxel sono somministrati fino al completamento di 4 o 6 cicli, o fino alla progressione della malattia o fino a tossicità inaccettabile, a seconda di quale condizione si verifichi per prima. La dose iniziale di paclitaxel per pazienti di razza/etnia asiatica è stata di 175 mg/m<sup>2</sup> a causa del più alto livello complessivo di tossicità ematologiche in pazienti di paesi asiatici rispetto ai pazienti di paesi non asiatici.

Ai pazienti che non evidenziavano progressione della malattia in seguito al completamento o all'interruzione della chemioterapia a base di platino veniva somministrato:

- Braccio A: Tecentriq 1.200 mg per endovena il giorno 1 di ciascun ciclo di 21 giorni fino alla perdita di beneficio clinico secondo la valutazione del ricercatore
- Braccio B: Tecentriq 1.200 mg e bevacizumab 15 mg/kg per endovena il giorno 1 di ciascun ciclo di 21 giorni. Tecentriq veniva somministrato fino alla perdita di beneficio clinico secondo la valutazione del ricercatore per Tecentriq, mentre bevacizumab veniva somministrato fino alla progressione della malattia o fino a tossicità inaccettabile
- Braccio C: bevacizumab 15 mg/kg per endovena il giorno 1 di ciascun ciclo di 21 giorni fino alla progressione della malattia o fino a tossicità inaccettabile.

I pazienti venivano esclusi in caso di anamnesi di malattia autoimmune; somministrazione di un vaccino vivo attenuato entro i 28 giorni precedenti la randomizzazione; somministrazione di agenti immunostimolanti sistemici entro 4 settimane o di farmaci immunosoppressori sistemici entro le 2 settimane precedenti la randomizzazione; metastasi al SNC attive o non trattate; chiara infiltrazione del tumore nei grandi vasi toracici o chiara cavitazione delle lesioni polmonari, come evidente all'imaging. Le valutazioni del tumore sono state effettuate ogni 6 settimane per le prime 48 settimane a partire dal ciclo 1, giorno 1 e in seguito ogni 9 settimane.

Le caratteristiche demografiche e le caratteristiche della patologia al basale della popolazione oggetto dello studio (ITT) erano bilanciate tra i bracci dello studio. L'età mediana era di 63 anni (intervallo: da 31 a 90) e il 60% dei pazienti era di sesso maschile. I pazienti erano in maggioranza bianchi (82%). Circa il 10% dei pazienti possedeva mutazioni EGFR note, il 4% riarrangiamenti ALK noti, il 14% metastasi epatiche al basale e la maggior parte dei pazienti era composta da fumatori attuali o ex-fumatori (80%). Nel complesso, il 95% dei pazienti presentava NSCLC a cellule non squamose con istologia di adenocarcinoma. Lo stato di performance ECOG al basale era 0 (43%) o 1 (57%).

Le caratteristiche demografiche e le caratteristiche della patologia al basale nei pazienti con espressione di PD-L1  $\geq 1\%$  TC o  $\geq 1\%$  IC (che non possiedono mutazioni EGFR o riarrangiamenti ALK) erano bilanciate tra i bracci del trattamento. Il 51% dei tumori dei pazienti presentava un'espressione di PD-L1  $\geq 1\%$  (di seguito denominata espressione PD-L1  $\geq 1\%$ ) e il 49% dei tumori dei pazienti presentava un'espressione di PD-L1  $< 1\%$  TC e  $< 1\%$  IC.

La popolazione ITT-WT è definita come tutti i pazienti randomizzati, esclusi quelli con aberrazioni del tumore con profilo genomico ALK o EGFR.

I tassi di accettabilità della colorazione per VENTANA PD-L1 (SP142) Assay sono stati calcolati per la popolazione ITD a livello di soggetto (Tabella 19). VENTANA PD-L1 (SP142) Assay ha riportato elevati tassi di accettabilità complessivi iniziali (ossia first-pass) e finali della colorazione per l'analisi a livello di soggetto. I tassi di accettabilità finali di morfologia e fondo si sono rivelati superiori al 99%.

**Tabella 19.** Caratteristiche prestazionali della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay di NSCLC per IMpower150 (GO29436), livello di soggetto: popolazione ITD<sup>[a]</sup>.

Attributo	Tasso di accettabilità % (n/N) (CI al 95%) <sup>[b]</sup>	
	Iniziale <sup>[c]</sup>	Finale <sup>[d]</sup>
Tasso di accettabilità complessivo della colorazione	88.7 (1584/1786) (87.1, 90.1)	98.0 (1751/1786) (97.3, 98.6)
Morfologia	99.9 (1609/1610) (99.6, 100.0)	99.9 (1769/1770) (99.7, 100.0)
Fondo	99.1 (1609/1623) (98.6, 99.5)	100.0 (1769/1769) (99.8, 100.0)

[a] La popolazione ITD (Intent-to-Diagnose) è costituita da tutti i pazienti per i quali è stata tentata una valutazione diagnostica VENTANA PD-L1 (SP142) nel quadro dello screening per lo studio GO29436

[b] CI con il metodo del punteggio di Wilson bilaterale

[c] Tentativo di colorazione iniziale [d] Tentativo di colorazione finale

Al momento dell'analisi della OS finale per Tecentriq + CP rispetto a bevacizumab + CP, i pazienti presentavano un periodo di follow-up mediano di 39.3 mesi. La popolazione ITT-WT con pazienti i cui tumori hanno espressione di PD-L1  $\geq 1\%$ , sebbene non formalmente testati, ha evidenziato un miglioramento della OS con Tecentriq + CP rispetto a bevacizumab + CP (HR non stratificato di 0.71; [CI al 95%: 0.55, 0.91]) con una durata mediana della OS pari a 24.4 mesi, 8.4 mesi in più rispetto a quanto osservato nel braccio bevacizumab + CP, in cui è pari a 16.0 mesi. Ciò corrisponde a una riduzione relativa del 29% nel rischio di decesso associato a Tecentriq + CP rispetto a bevacizumab + CP nella popolazione selezionata. I tassi di riferimento di OS senza eventi nella popolazione ITT-WT con espressione PD-L1  $\geq 1\%$  a uno e due anni nel braccio Tecentriq + CP sono stati rispettivamente del 70.6% e del 51.5% rispetto al 55.9% e al 36.9% nel braccio bevacizumab + CP.

Al momento dell'analisi finale per PFS, l'HR della PFS non stratificato è stato di 0.74 [CI al 95%: 0.58, 0.94] nei pazienti trattati con Tecentriq + CP rispetto a bevacizumab + CP (sottogruppo ITT-WT con un'espressione di PD-L1  $\geq 1\%$ ).

### PRESTAZIONI CLINICHE - NSCLC $\geq 50\%$ TC O $\geq 10\%$ IC

Le prestazioni di VENTANA PD-L1 (SP142) Assay sono state esaminate in OAK (NCT02008227), uno studio multicentrico, internazionale, randomizzato, open-label di fase III progettato per valutare l'efficacia e la sicurezza del trattamento con TECENTRIQ in pazienti con NSCLC localmente avanzato o metastatico con progressione della malattia durante o in seguito a un regime contenente platino.

I campioni dei pazienti sono stati colorati con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay e valutati per l'accettabilità della colorazione, nonché per l'espressione di PD-L1. I campioni dei pazienti erano di tessuto NSCLC FFPE proveniente da biopsie con ago (34.5%), biopsie punch (16.3%), resezioni (28.7%) o di altro tipo (20.5%); il 66.6% proveniva da tumori primari e il 33.4% da tumori metastatici.

La Tabella 20 descrive il tasso di accettabilità complessivo della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay fra tutti i campioni NSCLC esaminati per lo studio. Sono indicati anche i tassi di morfologia e fondo accettabili per i vetrini colorati per PD-L1. Su un totale di 1.185 campioni, per 72 il tentativo iniziale di colorazione non è riuscito ed è stato necessario ripetere la colorazione. 26 dei 72 campioni sono rimasti non accettabili (1 a causa del controllo delle tonsille inaccettabile, 19 a causa del controllo negativo del reagente inaccettabile e 6 a causa della morfologia o del fondo inaccettabile). VENTANA

PD-L1 (SP142) Assay ha riportato elevati tassi di accettabilità complessivi iniziali (ossia first-pass) e finali della colorazione: rispettivamente 93.9% e 97.8%. I tassi di accettabilità finali di morfologia e fondo si sono rivelati superiori al 99%.

**Tabella 20.** Caratteristiche prestazionali della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay di NSCLC per OAK (NCT02008227).

Attributo	Tasso di accettabilità % (n/N) (CI al 95%) <sup>[a]</sup>	
	Iniziale <sup>[b]</sup>	Finale <sup>[c]</sup>
Tasso di accettabilità complessivo della colorazione	93.9 (1113/1185) (92.4-95.1)	97.8 (1159/1185) (96.8-98.5)
Morfologia	98.5 (1122/1139) (97.6-99.1)	99.6 (1160/1165) (99.0-99.8)
Fondo	98.2 (1119/1139) (97.3-98.9)	99.7 (1161/1165) (99.1-99.9)

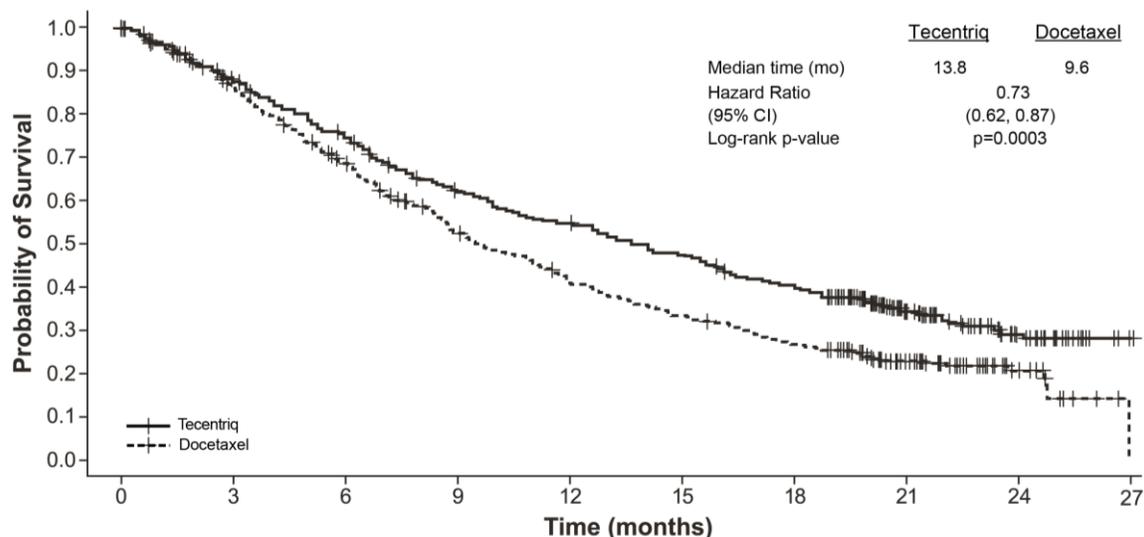
[a] CI con il metodo del punteggio di Wilson bilaterale

[b] Tentativo di colorazione iniziale [c] Tentativo di colorazione finale

Lo studio OAK ha coinvolto 1.225 pazienti e la popolazione dell'analisi primaria ha riguardato i primi 850 pazienti randomizzati; i pazienti idonei sono stati stratificati per stato di espressione di PD-L1 nelle IC, per numero di regimi chemioterapici precedenti e per istologia. I pazienti sono stati randomizzati (1:1) al fine di ricevere TECENTRIQ tramite somministrazione endovenosa alla dose di 1.200 mg ogni 3 settimane fino al raggiungimento del livello di tossicità inaccettabile o fino alla progressione radiografica o clinica oppure docetaxel tramite somministrazione endovenosa alla dose di 75 mg/m<sup>2</sup> ogni 3 settimane fino alla perdita di beneficio clinico secondo la valutazione del ricercatore. I campioni di tumore sono stati valutati prospetticamente per l'espressione di PD-L1 sulle TC e IC utilizzando VENTANA PD-L1 (SP142) Assay e i risultati sono stati utilizzati per definire i sottogruppi dell'espressione di PD-L1 per le analisi prestabilite descritte di seguito.

Nello studio OAK, tra i pazienti facenti parte della popolazione dell'analisi primaria, l'età mediana era di 64 anni (intervallo: da 33 a 85) e il 61% dei pazienti era di sesso maschile. I pazienti erano in maggioranza bianchi (70%). Circa tre quarti dei pazienti erano affetti da malattia non squamosa (74%), il 10% presentava mutazione EGFR nota, lo 0.2% possedeva riarrangiamenti ALK noti e la maggior parte dei pazienti era composta da fumatori attuali o ex-fumatori (82%). Lo stato di performance ECOG al basale era 0 (37%) o 1 (63%). Il settantacinque per cento dei pazienti aveva ricevuto un solo regime terapeutico precedente a base di platino. La principale misura dell'efficacia dello studio di fase III è stata la sopravvivenza globale (OS) nella popolazione dell'analisi primaria (primi 850 pazienti randomizzati). I risultati dello studio OAK, con un follow-up mediano di 21 mesi, sono presentati in Tabella 21 e in Figura 2.

I campioni di tumore sono stati valutati prospetticamente utilizzando VENTANA PD-L1 (SP142) Assay presso un laboratorio centrale e i risultati sono stati utilizzati per definire i sottogruppi dell'espressione di PD-L1 per le analisi prestabilite. Degli 850 pazienti, il 16% è stato classificato come caratterizzato da un'espressione elevata di PD-L1, ossia un'espressione di PD-L1 che copre un'area  $\geq 50\%$  TC o  $\geq 10\%$  IC. In un'analisi esplorativa dei sottogruppi di efficacia dell'OS basata sull'espressione di PD-L1, il rapporto di rischio è risultato pari a 0.41 (CI al 95%: 0.27, 0.64) nel sottogruppo avente espressione elevata di PD-L1 e 0.82 (CI al 95%: 0.68, 0.98) nei pazienti che non presentavano espressione elevata di PD-L1.



No. Patients at Risk	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27																		
Tecentriq	425	407	382	363	342	326	305	279	260	248	234	223	218	205	198	188	175	163	157	141	116	74	54	41	28	15	4	1
Docetaxel	425	390	365	336	311	286	263	236	219	195	179	168	151	140	132	123	116	104	98	90	70	51	37	28	16	6	3	

Hazard ratio is estimated based on a stratified Cox model; p-value is estimated based on a stratified log-rank test.

Figura 2. Curva di Kaplan-Meier della sopravvivenza globale nella popolazione dell'analisi primaria dello studio OAK (NCT02008227).

Tabella 21. Esiti di efficacia nella popolazione dell'analisi primaria dello studio OAK (NCT02008227).

Sopravvivenza globale (OS)	Atezolizumab (n=425)	Docetaxel (n=425)
Decessi (%)	271 (64)	298 (70)
Mediana, mesi (CI al 95%)	13.8 (11.8, 15.7)	9.6 (8.6, 11.2)
Rapporto di rischio <sup>[a]</sup> (CI al 95%)	0.73 (0.62, 0.87)	
Valore p <sup>[b]</sup>	0.0003	
OS a 12 mesi (%)	218 (55)	151 (41)
OS a 18 mesi (%)	157 (40)	98 (27)

[a] Stratificato in base all'espressione di PD-L1 nelle cellule immunitarie infiltranti il tumore, al numero di regimi chemioterapici precedenti e all'istologia  
 [b] In base al log-rank test stratificato, CI = intervallo di confidenza

### CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI - TNBC

#### Algoritmo di valutazione - TNBC

Il tessuto TNBC deve essere valutato in base all'algoritmo di valutazione di VENTANA PD-L1 (SP142) Assay per TNBC fornito in Tabella 22. Fare riferimento alla guida all'interpretazione (P/N 1018231EN) per ulteriori informazioni e immagini rappresentative.

Tabella 22. Algoritmo di valutazione di VENTANA PD-L1 (SP142) Assay per TNBC.

Valutazione della colorazione delle cellule immunitarie (IC) <sup>[a]</sup>	Espressione di PD-L1
Assenza di colorazione PD-L1 percettibile OPPURE Presenza di colorazione PD-L1 percettibile di qualsiasi intensità nelle cellule immunitarie infiltranti il tumore su una percentuale < 1% dell'area tumorale occupata da cellule tumorali, stroma intratumorale associato e stroma peritumorale contiguo	< 1% IC
Presenza di colorazione PD-L1 percettibile di qualsiasi intensità nelle cellule immunitarie infiltranti il tumore su una percentuale ≥ 1% dell'area tumorale occupata da cellule tumorali, stroma intratumorale associato e stroma peritumorale contiguo	≥ 1% IC

[a] La colorazione PD-L1 nelle cellule tumorali non deve essere inclusa nella determinazione della valutazione del tessuto TNBC del paziente.

#### Spessore del tessuto - TNBC

Lo spessore del tessuto è stato valutato utilizzando 10 campioni TNBC unici (5 PD-L1 ≥ 1% IC e 5 PD-L1 < 1% IC). Per ciascun caso sono state testate sezioni duplicate a 2, 3, 4, 5, 6, e 7 micron. Tutti gli spessori di tessuto hanno evidenziato un'adeguata colorazione specifica per PD-L1 e livelli di fondo accettabili per la colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay. Nessuna sezione ha presentato una variazione nello stato PD-L1 nell'intervallo di spessore testato. Ventana consiglia di tagliare i campioni a 4 micron per la colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay.

### Ripetibilità e precisione intermedia - TNBC

Sono stati completati studi della colorazione con VENTANA PD-L1 Assay di campioni TNBC al fine di dimostrare quanto segue:

- Ripetibilità all'interno dello stesso giorno - 5 vetrini replicati ciascuno da 24 campioni TNBC unici (12 PD-L1  $\geq$  1% IC e 12 PD-L1 < 1% IC) sono stati colorati con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay su un solo strumento BenchMark ULTRA in un unico giorno.
- Precisione tra un giorno e l'altro - 10 vetrini ciascuno da 24 campioni TNBC unici (12 PD-L1  $\geq$  1% IC e 12 PD-L1 < 1% IC) sono stati colorati con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay su un solo strumento BenchMark ULTRA in 5 giorni non consecutivi.
- Precisione inter-strumentale e tra lotti - 27 vetrini ciascuno da 24 campioni TNBC unici (12 PD-L1  $\geq$  1% IC e 12 PD-L1 < 1% IC) sono stati colorati con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay utilizzando tre lotti di anticorpo VENTANA PD-L1 (SP142) e tre lotti accoppiati di OptiView DAB IHC Detection Kit e OptiView Amplification Kit, su tre strumenti BenchMark ULTRA.
- Precisione all'interno della piattaforma - 2 vetrini replicati ciascuno da 10 campioni TNBC (5 PD-L1  $\geq$  1% IC e 5 PD-L1 < 1% IC) sono stati colorati con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay su tre strumenti BenchMark ULTRA, tre strumenti BenchMark XT e tre strumenti BenchMark GX. I tassi di concordanza sono stati calcolati relativamente alla modalità del campione per ciascuna piattaforma.

Tutti i vetrini erano in cieco e randomizzati e sono stati quindi valutati utilizzando l'algoritmo di valutazione di VENTANA PD-L1 (SP142) Assay per TNBC (Tabella 22). I risultati sono riassunti in Tabella 23.

**Tabella 23.** Ripetibilità e precisione intermedia della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay di campioni TNBC.

Parametro ripetibilità/precisione intermedia	Concordanza % (CI al 95%)
Ripetibilità all'interno dello stesso giorno (in un unico giorno)	PPA: 100.0 (94.0-100.0) NPA: 95.0 (87.2-100.0) OPA: 97.5 (93.3-100.0)
Precisione tra un giorno e l'altro (5 giorni non consecutivi)	PPA: 100.0 (96.9-100.0) NPA: 96.7 (92.7-100.0) OPA: 98.3 (96.3-100.0)
Precisione inter-strumentale e tra lotti (3 strumenti, 3 lotti di anticorpi e 3 lotti di kit di rilevazione e kit di amplificazione)	PPA: 98.3 (96.0-100.0) NPA: 99.2 (97.2-100.0) OPA: 98.6 (97.1-99.8)
Precisione all'interno della piattaforma (tre strumenti BenchMark ULTRA)	PPA: 100.0 (88.6-100.0) NPA: 96.7 (88.9-100.0) OPA: 98.3 (95.0-100.0)
Precisione all'interno della piattaforma (tre strumenti BenchMark XT)	PPA: 100.0 (88.6-100.0) NPA: 100.0 (88.6-100.0) OPA: 100.0 (94.0-100.0)
Precisione all'interno della piattaforma (tre strumenti BenchMark GX)	PPA: 93.3 (83.3-100.0) NPA: 96.7 (88.9-100.0) OPA: 95.0 (90.0-100.0)

### Concordanza tra piattaforme - TNBC

Vetrini singoli ciascuno da 44 campioni TNBC unici (22 PD-L1  $\geq$  1% IC e 22 PD-L1 < 1% IC) sono stati colorati con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay su uno strumento BenchMark ULTRA (riferimento), uno strumento BenchMark XT e uno strumento BenchMark GX. Tutti i vetrini erano in cieco e randomizzati e sono stati quindi valutati utilizzando l'algoritmo di valutazione di VENTANA PD-L1 (SP142) Assay per TNBC (Tabella 22). I risultati sono riassunti in Tabella 24.

**Tabella 24.** Concordanza tra piattaforme della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay di campioni TNBC.

Concordanza tra piattaforme	Concordanza % (CI al 95%) <sup>[a]</sup>
BenchMark ULTRA: BenchMark XT	PPA: 100.0 (86.2-100.0) NPA: 90.0 (69.9-97.2) OPA: 95.5 (84.9-98.7)
BenchMark ULTRA: BenchMark GX	PPA: 100.0 (86.2-100.0) NPA: 85.0 (64.0-94.8) OPA: 93.2 (81.8-97.7)

[a] CI con il metodo del punteggio di Wilson bilaterale

### Precisione dell'operatore - TNBC

Per valutare la precisione inter-operatore e intra-operatore, tre patologi hanno esaminato 60 campioni TNBC unici (30 PD-L1  $\geq$  1% IC e 30 PD-L1 < 1% IC) che erano stati colorati con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay. I campioni erano in cieco e sono stati randomizzati prima della valutazione dello stato PD-L1 utilizzando l'algoritmo di valutazione di VENTANA PD-L1 (SP142) Assay per TNBC (Tabella 22). Gli operatori hanno assegnato il punteggio ai casi per due volte con un intervallo di almeno due settimane fra le letture. I tassi di concordanza tra gli operatori e tra le diverse letture di ciascun patologo sono riassunti in Tabella 25.

**Tabella 25.** Precisione inter-operatore e intra-operatore della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay di campioni TNBC.

Precisione dell'operatore	Concordanza % (CI al 95%)
Precisione inter-operatore (media dei confronti a coppie, operatore con operatore, dalla prima lettura)	APA: 91.1 (84.2-96.6) ANA: 91.1 (84.1-96.7) OPA: 91.1 (85.6-96.7)
Precisione intra-operatore (media dei tassi di concordanza dei tre operatori tra la prima e la seconda lettura)	APA: 93.8 (89.5-97.1) ANA: 93.9 (89.2-97.3) OPA: 93.9 (89.9-97.2)

### Studio di riproducibilità inter-laboratorio - TNBC

È stato condotto uno studio di riproducibilità inter-laboratorio per VENTANA PD-L1 (SP142) Assay per dimostrare la riproducibilità dell'analisi nella determinazione dello stato PD-L1 in campioni TNBC. Ventotto campioni TNBC unici (14 PD-L1  $\geq$  1% IC e 14 PD-L1 < 1% IC) sono stati colorati presso 3 laboratori esterni in ciascuno di 5 giorni non consecutivi su un periodo di almeno 20 giorni. Prima della colorazione, i vetrini sono stati messi in cieco e randomizzati. Presso ciascun sito, i vetrini colorati sono stati valutati indipendentemente da 2 patologi (operatori). In questo studio il tasso di accettabilità finale della colorazione per VENTANA PD-L1 (SP142) Assay è risultato pari a 98.6%. I risultati sono riassunti in Tabella 26.

**Tabella 26.** Riproducibilità inter-laboratorio della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay di campioni TNBC.

Riproducibilità inter-laboratorio	Concordanza % (CI al 95%)
Concordanza complessiva (confrontata con un punteggio per consenso, in tutti i siti, i giorni e per tutti gli operatori)	PPA: 93.2 (90.4-95.2)[a] NPA: 96.6 (94.4-98.0)[a] OPA: 94.8 (93.1-96.1)[a]
Concordanza inter-sito (media dei confronti a coppie, sito con sito)	APA: 91.5 (84.0-96.6) ANA: 91.3 (83.6-96.4) OPA: 91.4 (90.7-92.0)[a]
Concordanza inter-operatore (media dei confronti a coppie, operatore con operatore, per ciascun sito)	APA: 93.6 (88.2-97.0) ANA: 93.3 (87.8-96.7) OPA: 93.4 (90.6-95.4)[a]

[a] CI con il metodo del punteggio di Wilson bilaterale

## PRESTAZIONI CLINICHE - TNBC

Le prestazioni di VENTANA PD-L1 (SP142) Assay sono state esaminate in IMpassion130 (NCT02425891), uno studio multicentrico randomizzato, internazionale, in doppio cieco, controllato con placebo progettato per valutare l'efficacia e la sicurezza di atezolizumab in combinazione con nab-paclitaxel in pazienti con TNBC non resecabile localmente avanzato o metastatico che non avevano ricevuto precedente chemioterapia o terapia sistemica mirata per TNBC non operabile localmente avanzato o metastatico.

I campioni dei pazienti sono stati colorati con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay e valutati per l'accettabilità della colorazione, nonché per l'espressione di PD-L1. I campioni dei pazienti erano di tessuto TNBC FFPE proveniente da biopsie (66.8%), resezioni (29.3%) o di altro tipo (3.9%); il 64.7% proveniva da tumori primari e il 35.3% da tumori metastatici.

La Tabella 27 descrive il tasso di accettabilità complessivo della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay fra tutti i campioni TNBC esaminati per lo studio. Sono indicati anche i tassi di morfologia e fondo accettabili per i vetrini colorati per PD-L1. Su un totale di 1.284 campioni, per 52 il tentativo iniziale di colorazione non è riuscito ed è stato necessario ripetere la colorazione su 49 campioni. Sono rimasti 23 campioni non accettabili (17 dei 23 a causa del controllo negativo del reagente non accettabile e 6 a causa della morfologia o del fondo non accettabile). VENTANA PD-L1 (SP142) Assay ha riportato elevati tassi di accettabilità complessivi iniziali (ossia first-pass) e finali della colorazione: rispettivamente 96.0% e 98.0%. I tassi di accettabilità finali di morfologia e fondo si sono rivelati superiori al 98%.

**Tabella 27.** Caratteristiche prestazionali della colorazione con VENTANA PD-L1 (SP142) Assay di TNBC.

Attributo	Tasso di accettabilità % (n/N) (CI al 95%)[a]	
	Iniziale[b]	Finale[c]
Tasso di accettabilità complessivo della colorazione	96.0 (1232/1284) (94.7-96.9)	98.0 (1258/1284) (97.0-98.6)
Morfologia	98.4 (1232/1252) (97.5-99.0)	99.5 (1258/1264) (99.0-99.8)
Fondo	100.0 (1232/1232) (99.7-100.0)	100.0 (1258/1258) (99.7-100.0)

[a] CI con il metodo del punteggio di Wilson bilaterale

[b] Tentativo di colorazione iniziale [c] Tentativo di colorazione finale

IMpassion130 ha arruolato 902 pazienti; i pazienti idonei sono stati stratificati per la presenza di metastasi epatiche, trattamento precedente con taxano e per lo stato di espressione di PD-L1 in IC (IC < 1% dell'area tumorale rispetto a ≥ 1% dell'area tumorale) valutato da VENTANA PD-L1 (SP142) Assay. I pazienti sono stati randomizzati per ricevere atezolizumab (840 mg) o placebo con infusioni endovenose nei giorni 1 e 15 di ogni ciclo di 28 giorni, più nab-paclitaxel (100 mg/m<sup>2</sup>) somministrato tramite infusione endovenosa nei giorni 1, 8 e 15 di ogni ciclo di 28 giorni. I pazienti hanno ricevuto il trattamento fino alla progressione radiografica della patologia secondo RECIST v1.1,

oppure fino a tossicità inaccettabile. Il trattamento con atezolizumab è proseguito all'interruzione della somministrazione di nab-paclitaxel dovuta a tossicità inaccettabile.

Le caratteristiche demografiche e le caratteristiche della patologia al basale della popolazione oggetto dello studio erano simili tra i bracci del trattamento. I pazienti erano in maggioranza donne (99.6%), il 67.5% erano bianchi e il 17.8% asiatici, il 6.5% erano neri o afroamericani e il 4.4% erano indiani americani o nativi dell'Alaska. L'età mediana era di 55 anni (intervallo: 20-86). Lo stato di performance ECOG al basale era 0 (58.4%) o 1 (41.3%). Complessivamente, il 41% dei pazienti arruolati presentava un'espressione di PD-L1 ≥ 1% IC, il 27% aveva metastasi epatiche e il 7% metastasi cerebrali asintomatiche al basale. Circa la metà dei pazienti aveva ricevuto un taxano (51%) o antraciclina (54%) con la terapia (neo)adiuvante. Le caratteristiche demografiche dei pazienti e la patologia tumorale al basale nei pazienti con espressione di PD-L1 ≥ 1% IC erano generalmente rappresentative della popolazione più ampia dello studio.

Gli endpoint di efficacia co-primari includevano la sopravvivenza libera da progressione (PFS) valutata dal ricercatore nella popolazione ITT e in pazienti con espressione di PD-L1 ≥ 1% IC secondo RECIST v1.1 così come la sopravvivenza globale (OS) nella popolazione ITT e in pazienti con espressione di PD-L1 ≥ 1% IC. Gli endpoint di efficacia secondari includevano il tasso di risposta obiettiva (ORR) e la durata della risposta (DOR) secondo RECIST v1.1.

I risultati PFS, ORR e DOR dello studio IMpassion130 per i pazienti con espressione di PD-L1 ≥ 1% IC al momento dell'analisi finale per PFS con un follow-up mediano di 13 mesi della sopravvivenza sono riassunti in Tabella 28.

È stata eseguita un'analisi della OS aggiornata con un follow-up mediano di 18 mesi; i risultati relativi alla OS sono presentati nella Tabella 28.

**Tabella 28.** Riepilogo degli esiti di efficacia dello studio IMpassion130 in pazienti con espressione di PD-L1  $\geq$  1% IC.

Endpoint di efficacia principali	Atezolizumab + nab-paclitaxel	Placebo + nab-paclitaxel
<b>Endpoint di efficacia primari</b>	n=185	n=184
<b>PFS valutata dal ricercatore (RECIST v1.1)<sup>c</sup></b>		
Numero di eventi (%)	138 (74.6)	157 (85.3)
Durata mediana della PFS (mesi)	7.5	5.0
CI al 95%	(6.7, 9.2)	(3.8, 5.6)
Rapporto di rischio stratificato <sup>e</sup> (CI al 95%)	0.62 (0.49, 0.78)	
Valore p <sup>a</sup>	< 0.0001	
PFS a 12 mesi (%)	29.1	16.4
<b>PFS valutata dal ricercatore (RECIST v1.1) - analisi esplorativa aggiornata<sup>d</sup></b>		
Numero di eventi (%)	149 (80.5)	163 (88.6)
Durata mediana della PFS (mesi)	7.5	5.3
CI al 95%	(6.7, 9.2)	(3.8, 5.6)
Rapporto di rischio stratificato <sup>e</sup> (CI al 95%)	0.63 (0.50-0.80)	
PFS a 12 mesi (%)	30.3	17.3
<b>Analisi ad interim della OS</b>		
	n=185	n=184
Numero di decessi (%)	94 (50.8)	110 (59.8)
Tempo mediano agli eventi (mesi)	25.0	18.0
CI al 95%	(19.5, 30.6)	(13.6, 20.0)
Rapporto di rischio stratificato <sup>e</sup> (CI al 95%)	0.71 (0.54, 0.93)	

[A] In base al log-rank test stratificato.

[b] I confronti della OS tra bracci di trattamento in pazienti con espressione di PD-L1  $\geq$  1% non sono stati formalmente testati, in base alla gerarchia di analisi prestabilita.

[c] All'analisi finale per PFS e alla prima analisi ad interim per OS al cutoff clinico del 17 aprile 2018.

[d] Alla seconda analisi ad interim per OS e all'analisi PFS esplorativa al cutoff clinico del 2 gennaio 2019.

[e] Stratificati in base alla presenza di metastasi epatiche e al trattamento precedente con taxano.

PFS= sopravvivenza libera da progressione; RECIST= Response Evaluation Criteria in Solid Tumors v1.1.; CI= intervallo di confidenza; OS= sopravvivenza globale

## BIBLIOGRAFIA

1. Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56(5):739-745.
2. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, et al. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity.* 2007;27(1):111-122.
3. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature.* 2014;515(7528):563-567.
4. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol.* 2010;28(19):3167-3175.
5. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet.* 2016;387(10030):1837-1846.
6. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(26):2443-2454.
7. Schmid P, Adams S, Rugo HS, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(22):2108-2121.
8. Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
9. Roche PC, Hsi ED. *Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
10. *Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories.* (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
11. 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.
12. *Anatomic Pathology Checklist.* College of American Pathologists. Jul 28, 2015.
13. CLSI. *Quality assurance for design control and implementation of immunohistochemistry assay: approved guidelines.* 2nd edition Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
14. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem.* 1991;66(4):194-199.
15. Hautzer NW, Wittkuhn JF, McCaughey WT. Trypsin digestion in immunoperoxidase staining. *J Histochem Cytochem.* 1980;28(1):52-53.
16. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol.* 1980;73(5):626-632.
17. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med.* 1983;14:767

NOTA: nel presente documento si utilizza sempre un punto come separatore decimale per separare la parte intera di un numero decimale da quella frazionaria. I separatori per le migliaia non sono utilizzati.

## Simboli

Ventana usa i seguenti simboli e segni in aggiunta a quelli elencati nello standard ISO 15223-1:



Numero prodotto globale

## PROPRIETÀ INTELLETTUALE

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW e il logo VENTANA sono marchi commerciali di Roche. Tutti gli altri marchi commerciali sono di proprietà dei rispettivi titolari.

© 2020 Ventana Medical Systems, Inc. e Roche Diagnostics International, Inc.

## INFORMAZIONI DI CONTATTO



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
D-68305 Mannheim  
Germany  
[www.ventana.com](http://www.ventana.com)

