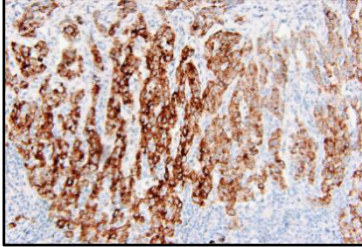


VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-4794

06679072001

IVD  50



Şekil 1. Küçük hücreli olmayan akciğer karsinomunda VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ekspresyonu.

KULLANIM AMACI

VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody, bir BenchMark IHC/ISH cihazında boyanmış, formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü, küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu (NSCLC) dokusunda anaplastik lenfoma kinaz (ALK) proteininin kalitatif saptamasında laboratuvar kullanımına yöneliktir. XALKORI® (krizotinib), ZYKADIA® (seritinib), ALECENSA® (alektinib) veya lorlatinib ile tedaviye uygun hastaların tanımlanmasında yardımcı olarak

endikedir.

Bu ürün, uzman bir patolog tarafından histolojik inceleme, ilgili klinik bilgiler ve doğru kontrollerle birlikte yorumlanmalıdır.

Bu antikor in vitro diagnostik (IVD) kullanıma yöneliktir.

ÖZET VE AÇIKLAMA

Anaplastik lenfoma kinaz (ALK) proteini, reseptör tirozin kinazların insülin reseptörü üst ailesinin bir üyesidir.¹ ALK, sinir sisteminde normal şartlarda eksprese edilen bir tip I membran glikoproteinidir.² ALK geni kromozom 2p23 içinde bulunur ve 2 büyük intron ve 26 eksondan oluşur.¹ ALK'nin dahil olduğu moleküler patogeneze, ALK intraselüler sinyalizasyon alanına yönelik 3' kodlama sekansları ile diğer genlerin 5' promotör elementleri ve kodlama sekansları arasında bağlantı kuran kromozomal yeniden düzenlemeler ile başlar. 5' promotör elementleri ve kodlama sekansları, füzyon tipi protein tirozin kinaz insan neoplazmlarındaki genel özellikler olarak kimerik proteinlerin aşırı ekspresyonunu ve liganddan bağımsız oligomerizasyonunu tetikler.

2007 yılında NSCLC hücre hatlarında ve arşivlenmiş klinik numunelerde kromozom 2p içerisinde, ekinoderm mikrotübül ile ilişkili protein benzeri 4 (EML4) geninin bazı kısımlarını ve ALK genini içeren bir füzyon gen ürünü oluşumu ile sonuçlanan bir inversiyon keşfedilmiştir.³ Yayınlanmış çalışmaların sonraki dizisinde, EML4-ALK inversiyon olaylarının, her biri ALK C terminal kinaz alanının aynı kısmını içeren en az 9 katalitik olarak aktif kinaz füzyon proteini varyantı oluşturduğu belirtilmiştir.⁴⁻⁸ İlk olarak anaplastik büyük hücreli lenfomada (ALCL) tanımlanan ALK geni füzyonlarında olduğu gibi, EML4-ALK füzyon proteininin transforme edici aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu ile tutarlı olarak, transgenik farelerde akciğer alveolar epitelyal hücrelerinde EML4-ALK ekspresyonunun güçlü bir onkogenik faktör olduğu bildirilmiştir.⁹

KLİNİK ANLAMLILIK

NSCLC en yaygın akciğer kanseri türüdür. ALK mevcut durumda NSCLC'de kilit bir onkogenik uyarıcı olarak kabul edilmektedir ve baskın füzyon partneri EML4 olmasına rağmen, başka füzyon partner genleri de tanımlanmıştır.^{10,11} ALK gen yeniden düzenlemelerinin insidansının %2-7 aralığında değiştiği görülmektedir, bu ise Birleşik Devletler'de (ABD) yaklaşık 6000 ALK pozitif hasta/yıl ve dünya genelinde 40000 hasta/yıla karşılık gelmektedir.^{3,4,7}

Akciğer kanserinde ALK geni yeniden düzenlemelerinin büyük çoğunluğu, skuamöz veya küçük hücreli histolojiler yerine adenokarsinom numunelerinde yer almıştır.³⁻⁸ Bazı deliller, "hiç sigara içmemiş" veya "az sigara tüketen" durumdaki hastalarda ALK geni yeniden düzenlemeleri ile NSCLC arasında bir korelasyon ileri sürmektedir, ancak bu durum, istatistiksel olarak anlamlı bir kofaktör olmayabilir.^{3,4,7,9} Daha da önemlisi, ALK geni yeniden düzenlemeleri EGFR, HER2 veya KRAS mutasyonları ile nadiren kesişmektedir; bu da ALK pozitifliğinin farklı bir hastalık alt türü olduğunu göstermektedir.⁹

XALKORI®, ALK, ROS1 ve c-Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR) tirozin kinazların ve bunların onkogenik varyantlarının (örneğin ALK veya ROS1 füzyon proteinleri veya c-Met/HGFR mutant varyantları) seçici, ATP ile yarışan, küçük moleküllü bir inhibitördür. XALKORI®, tümör hücre hatlarını kullanarak hücre temelli tayinlerde konsantrasyona bağlı ALK inhibisyonu ve c-Met fosforilasyonu göstermiştir. Ayrıca, EML4 veya NPM-ALK füzyon proteinlerini veya Met'i eksprese eden tümör ksenogreftleri olan farelerde antitümör aktivitesi göstermiştir.^{12,13,14}

ZYKADIA® bir kinaz inhibitördür. Klinik olarak ilgili konsantrasyonlarda biyokimyasal veya selüler tayinlerde tanımlanan ZYKADIA® inhibisyonu hedefleri arasında ALK, insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü (IGF-1R), insülin reseptörü (InsR) ve ROS1 yer alır. Bunlar içinden ZYKADIA®, ALK'ye karşı en aktif olandır. ZYKADIA®, ALK'nin otofosforilasyonunu inhibe etmiştir, aşağı yönde sinyalizasyon proteini STAT3'ün ALK aracılı fosforilasyonunda ve in vitro ve in vivo tayinlerde ALK'ye bağlı kanser hücrelerinin proliferasyonunda inhibisyon sergilemiştir.

ZYKADIA®, EML4-ALK ve NPM-ALK füzyon proteinlerini eksprese eden hücre hatlarının in vitro proliferasyonunu inhibe etmiştir ve farelerde ve sıçanlarda EML4-ALK pozitif NSCLC ksenogreft büyümesinde doza bağlı inhibisyon sergilemiştir.¹⁵

ALK geni yeniden düzenlemelerinin klinik anlamlılığı, Pfizer tarafından yürütülen XALKORI® ilacına yönelik ve Novartis tarafından yürütülen ZYKADIA® ilacına yönelik randomize, aktif kontrollü klinik çalışmalarda gösterilmiştir.^{14,15}

ALECENSA®, tümör hücresi proliferasyonunda ve sağkalımında rol oynayan intraselüler sinyal yollarını inhibe eden ve dolayısıyla kanser hücresi ölümünü artıran ve tümör hücresi çoğalması ve proliferasyonunu inhibe eden yüksek oranda seçici ve güçlü bir ALK ve RET tirozin kinaz inhibitördür.¹⁶ Preklinik verilere dayalı olarak, ALECENSA® kan beyin bariyerindeki dışarı akış transportörlerinin (PGP veya BCRP) bir substratı değildir ve dolayısıyla merkezi sinir sistemi içine dağılıbilir ve burada tutulabilir. ALECENSA®, beyinde antitümör aktivitesi ve intrakraniyal tümör hayvan modellerinde uzatılmış sağkalım dahil olmak üzere preklinik fare ksenogreft modellerinde tümör regresyonunu indüklemiştir.¹⁷ ALECENSA® iyi tolere edilir ve yönetilebilir bir güvenlik profili sunar.¹⁸⁻²⁰

Lorlatinib, üçüncü nesil, seçici, adenozin trifosfat (ATP) ile yarışan, beyne nüfuz eden, küçük moleküllü bir ALK tirozin kinaz inhibitördür. Daha önceki ALK inhibitör tedavisini takiben gelişen temel direnç mekanizmalarını aşmak veya engellemek ve kan-beyin bariyerine nüfuz etmek üzere tasarlanmıştır. Lorlatinib aynı zamanda güçlü bir ROS1 tirozin kinaz inhibitördür.²¹ Lorlatinib in vitro olarak, mutasyona uğramamış ALK'nin ve birinci ve ikinci nesil ALK tirozin kinaz inhibitörlerine direnç gösterenler dahil olmak üzere, klinik olarak ilgili çok çeşitli mutant ALK kinazların katalitik aktivitesini etkili bir şekilde inhibe eder.²² Lorlatinib, birinci ve ikinci nesil ALK inhibitörlerine direnç gösterenler dahil olmak üzere ALK mutasyonları barındıran hayvan modellerinde, düşük nanomolar serbest plazma konsantrasyonlarında belirgin antitümör aktivitesi sergilemiştir. Lorlatinib, ortotopik hayvan modellerinde kan-beyin bariyerine nüfuz ederek ve etkili beyin maruziyeti elde ederek tümör küçülmesi sağlamış ve sağkalımı uzatmıştır.^{23,24}

VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini), bir hastanın NSCLC'si için ALK durumunun belirlenmesinde Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (ALK FISH) ile uyum sergilemiştir. ALK FISH, boyama sonuçlarının değerlendirilmesinde teknik zorluklara yol açabilir. İntrakromozomal yeniden düzenlemeler, ufak sinyal ayrılması sağlayarak potansiyel yanlış negatiflere yol açabilir.²⁵ Son çalışmalar, IHC'nin ALK durumunu belirlemede hassas ve spesifik olduğunu ve ALK FISH için geçerli bir alternatif olduğunu belirtmektedir.^{10,11,25,26,27} VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ve ilişkili puanlama algoritması, NSCLC numunelerindeki ALK durumunu belirlemek için geliştirilmiştir.

Küçük doku örnekleri, rutin immünohistokimya (IHC) için kolaylıkla kullanılabilir ve bu tekniği, karsinom yorumlaması için önemli antijenleri saptayan antikorlar ile birlikte, patolog açısından hastalık tanısı ve prognozu için etkili bir araç haline getirir. ALK, NSCLC'nin önemli bir belirteçidir.

Doku örneklerinin VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini boyama sonuçlarının yorumlanması, önerilen puanlama algoritması kullanılarak yapılmalıdır. Histolojik doku preparatları, örneğin ALK pozitiflik durumunun yorumlanmasına yardımcı olmak için intakt doku morfolojisi avantajına sahiptir. Tüm histolojik testler bir patolog tarafından yorumlanmalı ve sonuçlar, morfolojik çalışmalarla ve uygun kontrollerle tamamlanıp diğer klinik ve laboratuvar verileriyle birlikte kullanılmalıdır. IHC tayinlerinin hedef antijenleri fiksasyon süresinden, sabitleyici tipinden ve kesilen slaytların süresinden etkilenir; bu nedenle boyama öncesinde numune hazırlığının uyumluluğunu sağlamaya dikkat edilmelidir (Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Karsinomu (NSCLC) için VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody Yorumlama Kılavuzuna (P/N 1011879) ve aşağıdaki Özel Kısıtlamalar bölümüne bakın).

PROSEDÜR PRENSİBİ

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini, parafine gömülü doku kesitlerinde ALK'ye bağlanan bir tavşan monoklonal primer antikordur. Antikor, OptiView DAB IHC Detection Kit (Kat. No. 760-700 / 06396500001) ve ardından OptiView Amplification Kit (Kat. No. 760-099 / 06396518001 (50 test) veya 860-099 / 06718663001 (250 test)) kullanılarak görselleştirilebilir. Daha fazla bilgi için uygun OptiView DAB IHC Detection Kit ve OptiView Amplification Kit yöntem tablolarına bakın.

ÜRÜNLE BİRLİKTE VERİLEN MALZEME

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini, 50 test için yeterli miktarda reaktif içerir.

Bir adet 5 mL'lik VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini dağıtıcı, yaklaşık 70 µg tavşan monoklonal (D5F3) antikoru içerir.

Antikor, taşıyıcı protein ve bir koruyucu olan %0.05 ProClin 300 içeren PBS içinde seyreltilir.

Spesifik antikor konsantrasyonu yaklaşık 14 µg/mL'dir.

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini, saflaştırılmış hücre kültürü üst fazı olarak üretilen bir rekombinant tavşan monoklonal antikordur.

Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Karsinomu (NSCLC) için VENTANA anti-ALK (D5F3) Rabbit Monoclonal Primary Antibody Yorumlama Kılavuzu (P/N 1011879).

Şu konularda ayrıntılı açıklamalar için uygun VENTANA saptama kiti yöntem tablosuna bakın: Prosedür Prensibi, Materyal ve Metotlar, Numune Toplama ve Analiz için Hazırlama, Kalite Kontrol Prosedürleri, Sorun Giderme, Sonuçların Yorumlanması ve Kısıtlamalar.

GEREKİLİ OLAN FAKAT ÜRÜNLE BİRLİKTE VERİLMEYEN MALZEMELER

VENTANA saptama kiti gibi boyama reaktifleri ve negatif ve pozitif doku kontrol slaytlarını da içeren yardımcı bileşenler ürünle birlikte verilmemektedir.

Yöntem tablosunda listelenen ürünlerin hepsi tüm bölgelerde mevcut olmayabilir. Yerel destek temsilcinizle iletişime geçin.

Aşağıda yer alan reaktifler ve malzemeler boyama için gerekli olabilir fakat ürünle birlikte verilmez:

1. Kontrol dokusu olarak kullanılmak üzere insan apandisi veya ALK pozitif ve ALK negatif küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu numuneleri
2. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (Kat. No. 790-4795 / 06683380001)
3. Mikroskop slaytları, pozitif yüklü
4. OptiView DAB IHC Detection Kit (Kat. No. 760-700 / 06396500001)
5. OptiView Amplification Kit (Kat. No. 760-099 / 06396518001 (50 test) veya 860-099 / 06718663001 (250 test))
6. EZ Prep Concentrate (10X) (Kat. No. 950-102 / 05279771001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (Kat. No. 950-300 / 05353955001)
8. LCS (Predilute) (Kat. No. 650-010 / 05264839001)
9. ULTRA LCS (Predilute) (Kat. No. 650-210 / 05424534001)
10. Cell Conditioning Solution (CC1) (Kat. No. 950-124 / 05279801001)
11. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (Kat. No. 950-224 / 05424569001)
12. Hematoxylin II (Kat. No. 790-2208 / 05277965001)
13. Bluing Reagent (Kat. No. 760-2037 / 05266769001)
14. Kalıcı sabitleme ortamı
15. Lamel
16. Otomatik lamel yerleştirici
17. Genel amaçlı laboratuvar ekipmanı
18. BenchMark IHC/ISH cihazı

SAKLAMA VE STABİLİTE

Alındıktan sonra ve kullanmadığınız zamanlarda 2-8 °C'de saklayın. Dondurmayın.

Reaktifin uygun bir şekilde uygulandığından ve antikor stabilitesinden emin olmak için dağıtıcı kapağını her kullanımdan sonra yerine takın ve dağıtıcıyı derhal soğutucuya dikey konumda yerleştirin.

Her antikor dağıtıcısının bir son kullanma tarihi vardır. Düzgün bir şekilde saklanması halinde, reaktif etikette belirtilen tarihe kadar stabil kalır. Reaktifi son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.

NUMUNE HAZIRLAMA

Rutin olarak işlenmiş, formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü (FFPE) dokular, VENTANA saptama kiti ve BenchMark IHC/ISH cihazları ile birlikte kullanıldığında bu primer antikora kullanım için uygundur.

ALK için pozitif olan NCI-H2228 insan NSCLC hücre hattından oluşturulan ksenograft modellerine bağlı olarak önerilen doku fiksasyonu, en az 6 saat boyunca %10 nötr tamponlu formalindir (NBF). 6 saatten daha kısa fiksasyon süreleri ALK için önemli miktarda boyama yoğunluğu kaybı ile sonuçlanır. Çinko formalin sabitleyici de en az 6 saatlik bir fiksasyon süresi için kabul edilebilir. Kullanılan miktar, doku hacminin 15 ila 20 katı olmalıdır. Hiçbir sabitleyici, solid dokunun 2 ila 3 mm'den fazlasına veya gözenekli dokunun 5 mm'den fazlasına 24 saatlik bir sürede nüfuz etmeyecektir. Fiksasyon oda sıcaklığında (15-25 °C) gerçekleştirilebilir.^{28,29}

Alkol formalin asetik asit (AFA), PREFER sabitleyici, B5 gibi sabitleyiciler ve diğer asit ve/veya alkol içeren sabitleyiciler, test edilen tüm fiksasyon sürelerinde (1 ila 72 saat) ALK için boyama yoğunluğu kaybı sergilemiştir. Bu sabitleyicilerin bu tayinle kullanılması önerilmez. Fiksasyonda gecikme çalışmaları da, ksenograft numuneleri eksizyonun ardından 6 saat içinde sabitlenmediğinde ALK boyama yoğunluğunda bir azalma ortaya koymuştur. Numune hazırlamanın ALK boyama yoğunluğu üzerindeki etkisine dair daha ayrıntılı tartışma için yorumlama kılavuzuna bakın.

Kesitler yaklaşık 4 µm kalınlığında kesilmeli ve pozitif yüklü cam slaytlara yerleştirilmelidir. Kesilen doku kesitlerinin antijenisitesi zaman içinde azalabileceğinden ve parafin bloğundan kesildikten sonra 3 ay içinde bozulacağından slaytlar hemen boyanmalıdır (yorumlama kılavuzuna ve aşağıdaki Performans Özellikleri bölümüne bakın).

UYARILAR VE ÖNLEMLER

1. İn vitro diagnostik (IVD) kullanıma yöneliktir.
2. Sadece profesyonel kullanım içindir.
3. Belirtilen test sayısının üzerinde kullanmayın.
4. **DİKKAT:** Amerika Birleşik Devletleri'nde, Federal yasa bu cihazın satışını bir doktora veya doktor siparişiyle yapılacak şekilde sınırlamaktadır. (Rx Only)
5. ProClin 300 çözeltisi, bu reaktifte koruyucu olarak kullanılmıştır. Tahriş edici olarak sınıflandırılmıştır ve deriyle temas ettiğinde hassasiyete yol açabilir. Kullanırken uygun önlemleri alın. Reaktiflerin göz, deri ve mukoz membranlarla temas etmesini önleyin. Koruyucu giysi ve eldiven kullanın.
6. Pozitif yüklü slaytlar, uygun olmayan boyamaya yol açan çevresel streslere yatkın olabilir. Bu tür slaytların kullanımı hakkında daha fazla bilgi almak için Roche temsilcinize danışın.
7. İnsan veya hayvan kaynaklı materyaller, biyotehlikeli materyaller oldukları varsayılarak kullanılmalı ve uygun önlemler alınarak atılmalıdır. Maruz kalma durumunda, sorumlu otoritelerin sağlık direktifleri izlenmelidir.^{30,31}
8. Reaktiflerin göz ve mukoz membranlarla temas etmesini önleyin. Reaktifler hassas bölgelerle temas ederse bu bölgeleri bol suyla yıkayın.
9. Yanlış sonuçlar alınmasına neden olabileceği için reaktiflerin mikrobiyal kontaminasyona maruz kalmasını önleyin.
10. Bu cihazın kullanımı hakkında daha fazla bilgi için BenchMark IHC/ISH cihazı Kullanıcı Kılavuzuna ve tüm gerekli bileşenlerin dialog.roche.com adresinde bulunan kullanım talimatlarına bakın.
11. Önerilen imha yöntemleri hakkında bilgi almak için yerel ve/veya resmi kurumlara danışın.
12. Ürün güvenliği etiketi, öncelikli olarak EU GHS yönergelerini izler. Güvenlik bilgi formu profesyonel kullanıcı için talep üzerine temin edilir.
13. Bu cihazla ilgili şüphelenilen ciddi olayları raporlamak için yerel Roche temsilcisi ve kullanıcının bulunduğu Üye Devlet veya Ülkenin yetkili makamıyla iletişime geçin.

Bu ürün, Düzenleme (EC) No. 1272/2008 uyarınca aşağıdaki şekilde sınıflandırılan bileşenler içermektedir:

Tablo 1. Tehlike bilgileri.

Tehlike	Kod	Beyan
	H317	Alerjik deri reaksiyonuna yol açabilir.
	P261	Sis veya buharı solumaktan kaçının.
	P272	Kontamine olmuş iş kıyafetlerinin iş yeri dışına çıkarılmasına izin vermeyin.
	P280	Koruyucu eldiven takın.

Tehlike	Kod	Beyan
	P333 + P313	Deride tahriş veya kızarıklık meydana gelirse tıbbi tavsiye/yardım alın.
	P362 + P364	Kirlenmiş giysilerinizi çıkarın ve yeniden kullanmadan önce yıkayın.
	P501	İçeriği/kabı uygun bir atık imha tesisine atın.

Bu ürün CAS No. 55965-84-9 içerir, reaksiyon kütlesi: 5-kloro-2-metil-2H-izotiyazol-3-on ve 2-metil-2H-izotiyazol-3-on (3:1).

BOYAMA PROSEDÜRÜ

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini BenchMark IHC/ISH cihazlarında Rabbit Monoclonal Negative Control Ig, OptiView DAB IHC Detection Kit, OptiView Amplification Kit ve yardımcı reaktifler ile kullanım için geliştirilmiştir. Önerilen boyama protokolleri için aşağıdaki tablolara bakın.

Bu antikor spesifik inkübasyon süreleri için optimize edilmiştir ancak kullanıcı reaktifle elde edilen sonuçları doğrulamalıdır. Tablo 2, Tablo 3 veya Tablo 4'teki boyama protokolünün dışına çıkılması yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlara neden olabilir. BenchMark ULTRA cihazı için **U VENTANA ALK (D5F3)** adlı bir ALK'ye özgü boyama prosedürü geliştirilmiştir. ALK'ye özgü boyama prosedüründen protokol koşulları seçilmeden önce, BenchMark ULTRA cihazında OptiView v5 boyama prosedürü olan VSS 12.3 veya daha üst sürüm yazılım bulunmalıdır.

Otomatik prosedürlere ilişkin parametreler, cihazın Kullanıcı Kılavuzundaki prosedüre göre görüntülenebilir, yazdırılabilir ve düzenlenebilir. İmmünohistokimyasal boyama prosedürleriyle ilgili ayrıntılı bilgi için ilgili VENTANA saptama kiti yöntem tablosuna bakın.

Bu cihazın uygun kullanımına ilişkin ayrıntılar için P/N 790-4794 ile ilişkili olan iç hat dağıtıcı yöntem tablosuna bakın.

Tablo 2. BenchMark ULTRA veya BenchMark ULTRA PLUS cihazında OptiView DAB IHC Detection Kit ve OptiView Amplification Kit ile VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ve Rabbit Monoclonal Negative Control Ig için önerilen boyama protokolü.

Boyama Prosedürü	U VENTANA ALK (D5F3)
Protokol Basamağı	Parametre Girişi
	VENTANA ALK AB – 16 Dk (Hiçbir reaktif seçilmediği takdirde varsayılan 4794 olacaktır) -4794 -4796 -7155 -7157 (Yukarıdaki reaktifi dağıtım bölgesine göre seçin.) Veya Negative Control
Karşıt Boya	Hematoxylin II, 4 dakika
Karşıt Boyama Sonrası	Bluing, 4 Dakika

Tablo 3. BenchMark XT cihazında OptiView DAB IHC Detection Kit ve OptiView Amplification Kit ile VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ve Rabbit Monoclonal Negative Control Ig için önerilen boyama protokolü.

Prosedür Tipi	Yöntem
IHC Senkronizasyon Seçeneği	Seçili ^a
Deparafinizasyon	Seçili
Hücre İyileştirme (Antijen Ortaya Çıkarma)	CC1, 92 Dakika, 100 °C
Ön Primer Peroksidaz İnhibitörü	Seçili

Prosedür Tipi	Yöntem
Antikor (Primer)	Ventana anti-ALK (D5F3) [-4794] veya Rabbit Mono Neg [-4795] 16 Dakika, 37 °C
OptiView HQ Univ Linker	12 Dakika
OptiView HRP Multimer	12 Dakika
OptiView Amplification	Seçili
OV AMP H2O2, OV Amplifier	8 Dakika
OV AMP Multimer	8 Dakika
Karşıt Boya	Hematoxylin II, 4 dakika
Karşıt Boyama Sonrası	Bluing, 4 Dakika

^a Bu seçilebilir adım, yalnızca XT OptiView DAB v4 çalıştırıldığında kullanılabilir ve önceki yazılım sürümlerinde bulunmamaktadır.

Tablo 4. BenchMark GX cihazlarında OptiView DAB IHC Detection Kit ve OptiView Amplification Kit ile VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ve Rabbit Monoclonal Negative Control Ig için önerilen boyama protokolü.

Prosedür Tipi	Yöntem
Deparafinizasyon	Seçili
Hücre İyileştirme (Antijen Ortaya Çıkarma)	CC1, 92 Dakika, 100 °C
Ön Primer Peroksidaz İnhibitörü	Seçili
Antikor (Primer)	Ventana anti-ALK (D5F3) [-4794] veya Rabbit Mono Neg [-4795] 16 Dakika, 37 °C
OptiView HQ Univ Linker	12 Dakika
OptiView HRP Multimer	12 Dakika
OptiView Amplification	Seçili
OV AMP H2O2, OV Amplifier	8 Dakika
OV AMP Multimer	8 Dakika
Karşıt Boya	Hematoxylin II, 4 dakika
Karşıt Boyama Sonrası	Bluing, 4 Dakika

Genel laboratuvar cihazları ve çevresel koşulların yanı sıra doku fiksasyonu ve işlemindeki değişkenlikler nedeniyle bağımsız numunelere, kullanılan saptama kitine ve okuyucu tercihlerine bağlı olarak, primer antikor inkübasyonu, hücre iyileştirme veya proteaz ön işlemesi sürelerinin artırılması veya azaltılması gerekebilir. Fiksasyon değişkenleri hakkında daha fazla bilgi için bkz. "Immunohistochemistry Principles and Advances".³²

KALİTE KONTROL PROSEDÜRLERİ

Rabbit Monoclonal Negative Control Ig

Her numune için sonuçların yorumlanmasına yardımcı olacak eşleştirilmiş bir negatif reaktif kontrol slaytı çalışılmalıdır. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig bir negatif kontrol reaktifidir, bu tayin için özel olarak eşleştirilmiştir ve non-spesifik boyamayı değerlendirmek için primer antikor yerine kullanılır. Negatif reaktif kontrolü için boyama prosedürü primer antikor inkübasyon süresine eşit olmalıdır. Farklı bir negatif kontrol reaktifinin kullanılması veya önerilen negatif kontrol reaktifinin kullanılmaması hatalı sonuçlara yol açabilir.

Sistem Düzeyinde Kontroller

Sistem düzeyinde kontroller hasta örnekleri ile çalışılmalıdır. Bunlar insan apandisi³³ veya ALK pozitif/negatif olduğu bilinen NSCLC doku örnekleri olabilir.

Kontrol dokusu, test kesitleriyle aynı şekilde, mümkün olan en kısa sürede hazırlanmış ve sabitlenmiş otopsi, biyopsi veya cerrahi numuneler olmalıdır. Bu gibi dokular, doku hazırlığından boyamaya kadar analizin tüm adımlarını izleyebilir. Test numunesinden farklı şekilde sabitlenmiş veya işlenmiş bir doku kesitinin kullanılması, tüm reaktifler ve fiksasyon ile doku hazırlığı hariç yöntem adımları için kontrol sağlar.

Apandis veya ALK Pozitif/Negatif NSCLC Doku Kontrolleri

Bir ALK pozitif ve ALK negatif kontrol dokusu, gerçekleştirilen her VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini boyama prosedürü ile çalışılmalıdır.

Klinik ALK pozitif ve klinik ALK negatif kontrol dokusunu temsil eden boyaması olan NSCLC vakaları, düşük seviyelerde reaktif degradasyonunu veya cihazın spesifikasyon dışı sorunlarını saptama dahil olmak üzere optimum kalite kontrole uygundur.

İnsan apandis dokuları, ALK proteini için pozitif ve negatif boyama elementlerini içerir ve dolayısıyla bir sistem düzeyinde kontrol olarak kullanıma uygundur. Pozitif boyama doku bileşenleri, antikorun uygulandığını ve cihazın doğru şekilde çalıştığını doğrulamak için kullanılır; negatif boyama elementleri ise düşük seviyelerde reaktif degradasyonunu veya cihazın spesifikasyon dışı sorunlarını saptamak için kullanılır.

ALK pozitif ve negatif NSCLC ve apandis doku bileşenlerinin uygun şekilde boyanması, Tablo 5 ve Tablo 6'da ve yorumlama kılavuzunda açıklanmıştır.

ALK tayininin hasta numuneleri üzerindeki performansını izlemek için kullanılan bilinen pozitif ve bilinen negatif doku kontrolleri, hasta numunesi ile aynı şekilde sabitlenmeli ve işlenmelidir. Aksi takdirde doku kontrolleri yalnızca, test reaktiflerinin doğru performansını izlemek için kullanılabilir. Doku kontrolleri, hasta örneklerinin tanılanmasına yardımcı olarak kullanılmamalıdır.

Tayin Doğrulaması

Diagnostik bir prosedürde bir antikorun veya boyama sisteminin ilk kullanımından önce, antikorun spesifikitesi, bunun, ALK pozitif ve negatif dokuları temsil eden bilinen IHC performans özelliklerine sahip bir dizi doku üzerinde test edilmesi yoluyla doğrulanmalıdır (ürün prospektüsünün bu kısmında daha önce belirtilen Kalite Kontrol Prosedürlerine ve College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist³⁴ veya CLSI Approved Guideline³⁵ Kalite Kontrol tavsiyelerine bakın). Bu kalite kontrol prosedürleri her yeni antikor lotu için veya tayin parametrelerinde her değişiklik olduğunda tekrarlanmalıdır. Bilinen ALK durumuna sahip NSCLC dokuları veya insan apandis örnekleri tayin doğrulamasına uygundur.

BOYAMA YORUMLARI / BEKLENEN SONUÇLAR

VENTANA otomatik immüno-boyama prosedürü, kahverengi bir DAB reaksiyon ürününün VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile lokalize edilmiş antijen bölgelerinde çökmesine neden olur. IHC prosedürlerinde deneyimli bir uzman patolog, sonuçların yorumlanmasından önce negatif reaktif kontrollerini, sistem düzeyinde kontrolleri değerlendirerek boyanmış ürünü değerlendirmelidir.

Pozitif / Negatif Sistem Düzeyinde Doku Kontrolleri

Tüm reaktiflerin uygun şekilde işlev gösterdiğinden emin olmak için boyalı pozitif ve negatif doku kontrolleri incelenmelidir. Hedef hücrelerin sitoplazmasında pozitif kontrol dokusunda uygun şekilde renklendirilmiş reaksiyon ürünü bulunması pozitif reaktiviteye işaret eder.

Pozitif veya negatif doku kontrolleri uygun boyama sergilemezse veya klinik tanı yorumlamasında bir değişiklik sergilerse, test numunelerinin tüm sonuçları geçersiz sayılmalıdır.

Tablo 5. Apandis doku kontrolü değerlendirme kriterleri. Temsili görüntüler yorumlama kılavuzunda verilmiştir.

Kabul Edilebilir	Kabul Edilemez
Ganglion hücrelerinde güçlü granüler sitoplazmik boyama bulunması. (Nota bakın)	Ganglion hücrelerinde güçlü granüler sitoplazmik boyama bulunmaması.
Glandüler epitel hücreleri, kas ve lenfoid dokuda güçlü granüler sitoplazmik boyama bulunmaması (lenfoid agregatlarda lenforetiküler hücrelerin az veya nadir boyanması gözlenebilir).	Puanlamaya müdahale eden glandüler epitel hücreleri, kas veya lenfoid dokunun aşırı non-spesifik arka plan boyaması.

Not: Apandis kas tabakalarındaki sinir pozitif boyama gösterir.

Negatif Reaktif Kontrolü

Non-spesifik boyama varsa dağınık görünüme sahip olacaktır ve Rabbit Monoclonal Negative Control Ig ile boyanmış negatif reaktif kontrol slaytı kullanılarak değerlendirilebilir. Nekrotik veya dejenere hücreler genellikle spesifik olmayan boyama sonuçları verdiği için boyama sonuçlarını yorumlarken intakt hücreler kullanılmalıdır. Arka plan boyaması çok fazla ise, test numunesine ait sonuçlar geçersiz sayılmalıdır. Bu tayin için arka plan boyamasının kabul edilebilir seviyelerinin örnekleri yorumlama kılavuzunda bulunabilir.

Hasta Dokusu

Hasta dokusu, Tablo 6'da sağlanan VENTANA -ALK (D5F3) tayini puanlama algoritmasına göre değerlendirilmelidir. Yorumlama kılavuzuna bakın.

Tablo 6. VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini puanlama algoritması. Temsili görüntüler yorumlama kılavuzunda verilmiştir.

Klinik Yorumlama	Boyama Açıklaması
ALK için pozitif	Tümör hücrelerinde (pozitif tümör hücrelerinin herhangi bir yüzdesinde) güçlü granüler sitoplazmik boyama bulunması. Belirli boyama elementleri dışlanmalıdır, örneğin: • alveolar makrofajlarda hafif sitoplazmik noktalanma, • nöral kökenli hücreler (sinir ve ganglion hücreleri), • glandüler epitelyal boyama ve • lenfositik infiltratlar içinde dağınık lenforetiküler hücreler. NSCLC'de (müsin dahil) normal mukoza içinde ve klinik değerlendirmeden çıkarılması gereken nekrotik tümör alanlarında da bir miktar arka plan boyaması gözlenebilir.
ALK için negatif	Tümör hücrelerinde güçlü granüler sitoplazmik boyama bulunmaması.

ÖZEL KISITLAMALAR

1. Bu tayin, sitoloji smear'leri veya dekalsifiye numuneler ile kullanım için doğrulanmamıştır.
2. Hasta dokusu, doku bloğundan kesit çıkarılarak alındıktan sonra 3 ay içinde boyanmalıdır. Oda sıcaklığında 3 ayı aşkın süreyle saklanmış kesitlerde VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile boyama performansında kayıp gözlemlenmiştir.
3. VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile bazı boyama artefaktları belirtilmiştir. Anti-ALK ve negatif reaktif kontrolü ile boyalı slaytlarda alveolar makrofajlarda hafif granüler sitoplazmik noktalanma bulunabilir. Bu durum bunun, saptama sisteminin bir artefaktı olduğunu gösterir ve anti-ALK pozitif boyaması olarak değerlendirilmemelidir. Ek olarak, nekrotik tümör alanlarında noktalı boyama gözlemlenmiştir; böyle bir boyama da hasta örneği değerlendirmesi sırasında göz ardı edilmelidir. VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile sinir dahil olmak üzere nöral dokuda ve lenfositik infiltrat içinde bazı lenforetiküler hücrelerde boyama gözlemlenmiştir. Daha ayrıntılı tartışma için yorumlama kılavuzuna bakın.
4. OptiView Amplification Kit nedeniyle doku kontrollerinde genel boyama yoğunluğunda ufak değişkenlikler gözlemlenebilir. Kabul edilebilir boyama performansı örnekleri için yorumlama kılavuzuna bakın.

PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

ANALİTİK PERFORMANS

Hassasiyet, spesifite, kesinlik ve yöntem karşılaştırmasına yönelik boyama testleri yürütülmüştür ve sonuçları aşağıda listelenmiştir.

Hassasiyet ve Spesifite

Tablo 7. VENTANA anti-ALK (D5F3) tayininin hassasiyeti/spesifitesi, FFPE normal dokuların test edilmesiyle belirlenmiştir.

Doku	Pozitif/Toplam Vaka Sayısı	Doku	Pozitif/Toplam Vaka Sayısı
Serebrum ^a	0/3	Timüs	0/3
Serebellum	0/3	Miyeloid (kemik iliği)	0/3
Adrenal bez	0/3	Akciğer	0/3
Yumurtalık	0/3	Kalp	0/3
Pankreas	0/3	Özofagus	0/3
Paratiroid bezi	0/3	Mide	0/3
Hipofiz bezi ^b	0/3	İnce bağırsak ^c	0/3
Testis	0/3	Kolon ^c	0/3
Tiroit	0/3	Karaciğer	0/3
Meme	0/3	Tükürük bezi	0/3
Dalak	0/3	Böbrek	0/3
Bademcik	0/3	Prostat	0/3
Endometriyum	0/3	Rahim boynu	0/3
İskelet kası	0/4	Deri	0/3
Sinir (seyrek)	0/3	Mezotelyum	0/3

^a 2/3 Serebrumdaki bazı glial hücreler zayıf ila orta pozitiflik göstermiştir.

^b 3/3 Hipofiz bezi zayıf boyanmıştır.

^c 4/6 intestinal dokularda gangliyon hücreleri ALK için değişen yoğunluklarda pozitif boyanmıştır.

Tablo 8. VENTANA anti-ALK (D5F3) tayininin hassasiyeti/spesifitesi, çeşitli FFPE dokuların test edilmesiyle belirlenmiştir.

Patoloji	Pozitif/Toplam Vaka Sayısı
Gliyoblastom (Serebrum)	0/1
Menenjiyom (Serebrum)	0/1
Ependimom (Serebrum)	0/1
Oligodendrogliyom (Serebrum)	0/1
Seröz adenokarsinom (Yumurtalık)	1/1
Adenokarsinom (Yumurtalık)	0/1
Nöroendokrin neoplazma (Pankreas)	0/1
Adenokarsinom (Pankreas)	0/1
Seminom (Testis)	0/1
Embriyonal karsinom (Testis)	0/1

Patoloji	Pozitif/Toplam Vaka Sayısı
Medüller karsinom (Tiroit)	0/1
Papiller karsinom (Tiroit)	0/1
İn situ duktal karsinom (Meme)	0/1
İnvaziv duktal karsinom (Meme)	0/2
B hücreli lenfoma; NOS (Dalak)	0/3
Küçük hücreli karsinom (Akciğer)	0/1
Skuamöz hücreli karsinom (Akciğer)	0/1
Adenokarsinom (Akciğer)	0/1
Skuamöz hücreli karsinom (Özofagus)	0/1
Adenokarsinom (Özofagus)	0/1
Müsinöz adenokarsinom (Mide)	0/1
Adenokarsinom (Gastrointestinal)	0/1
Gastrointestinal stromal tümör (GIST) (Kolon)	0/1
Adenokarsinom (Rektum)	0/1
Gastrointestinal stromal tümör (GIST) (Rektum)	0/1
Hepatoselüler karsinom (Karaciğer)	0/1
Hepatoblastom (Karaciğer)	1/1
Berrak hücreli karsinom (Böbrek)	0/1
Adenokarsinom (Prostat)	0/2
Leyomiyom (Rahim)	0/1
Adenokarsinom (Rahim)	0/1
Berrak hücreli karsinom (Rahim)	0/1
Skuamöz hücreli karsinom (Rahim)	0/2
Embriyonal rabdomiyosarkom	0/1
Melanom (Anüs)	0/1
Bazal hücreli karsinom (Deri)	0/1
Skuamöz hücreli karsinom (Deri)	0/1
Nörofibrom (Lumbar)	0/1
Nöroblastom (Retroperiton)	1/1
Mezotelyum	0/1
Hodgkin lenfoma (Lenf düğümü)	0/1
Anaplastik büyük hücreli lenfoma (Lenf düğümü)	0/1
Ürotelyal karsinom (Mesane)	0/1
Leyomiyosarkom	0/2
Osteosarkom	0/1
İğ hücreli rabdomiyosarkom	0/1

Platform Uyumu (Köprüleme Çalışması)

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ilk olarak BenchMark XT ile GX cihazlarında ortaya konmuştur. BenchMark ULTRA ile BenchMark XT cihazları arasında tayinin eşdeğer performansını göstermek için bir köprüleme çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, her iki platformda VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile boyanmış 184 benzersiz NSCLC numunesinde ALK klinik durumu (Tablo 6 içinde bulunan ALK puanlama algoritmasına bağlıdır) değerlendirilmiştir. Ortaya çıkan boyalı slaytlar körlenmiştir ve randomize edilmiştir, ardından üç patoloj tarafından değerlendirilmiştir. Bu çalışmaya yönelik platform uyumu sonuçları Tablo 9 ve Tablo 10'da bulunabilir.

Tablo 9. BenchMark XT ile BenchMark ULTRA cihazları arasındaki uyum sonuçları.

BenchMark ULTRA ile BenchMark XT cihazları arasındaki VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini uyumu			
BenchMark ULTRA	BenchMark XT		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	85	1	86
Negatif	1	97	98
Toplam	86	98	184

Tablo 10. BenchMark XT ile BenchMark ULTRA cihazları arasındaki ALK uyumu.

Platform Uyumu Uyum Oranları	Pozitif Uyum Yüzdesi (%95 CI)	Negatif Uyum Yüzdesi (%95 CI)	Genel Uyum Yüzdesi (%95 CI)
BenchMark XT cihazı ile BenchMark ULTRA cihazı arasındaki uyum	%98.8 (%93.7-99.8)	%99.0 (%94.4-99.8)	%98.9 (%96.1-99.7)

Doku Kalınlığı

Doku kalınlığı, 4 benzersiz insan NSCLC vakası (3 ALK pozitif ve 1 ALK negatif) ve 4 benzersiz insan apandis vakası kullanılarak değerlendirilmiştir. Dokular 3, 4, 5, 6 ve 7 mikronluk kesitlere ayrılmıştır ve iki kopya halinde test edilmiştir. Tüm doku kalınlıkları, ALK için uygun spesifik boyama ve VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini için kabul edilebilir arka plan seviyeleri göstermiştir. Hiçbir numune, bu kalınlık aralığı dahilinde klinik ALK durumunda bir değişim göstermemiştir. Numuneler, tayin için 4-6 mikron boyutunda kesilmelidir.

Tekrar Edilebilirlik ve Ara Kesinlik Çalışmaları

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayininin tekrar edilebilirliği ve ara kesinliği, OptiView DAB IHC Detection ve OptiView Amplification kitleri ile birlikte BenchMark ULTRA, XT ve GX cihazlarında değerlendirilmiştir.

On benzersiz NSCLC doku numunesi (5 ALK pozitif ve 5 ALK negatif), BenchMark XT ve BenchMark ULTRA cihazlarında değerlendirilmiştir. Gün içi kesinlik için, NSCLC numunelerinin her birinden 5 kopya slayt, tek bir BenchMark XT veya tek bir BenchMark ULTRA cihazında boyanmıştır. Cihaz içi kesinlik testi için, NSCLC numunelerinin her birinden 3 kopya slayt, üç BenchMark XT cihazında VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile boyanırken NSCLC numunelerinin her birinden 2 kopya slayt üç BenchMark ULTRA cihazında boyanmıştır. Günler arası kesinlik için, NSCLC numunelerinin her birinden 2 kopya slayt, ardışık olmayan 5 gün boyunca tek bir BenchMark XT veya BenchMark ULTRA cihazında VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile boyanmıştır. Tüm slaytlar körlenmiştir, her bir cihaz dokusu kohortunda randomize edilmiştir. Her bir kohort, VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini puanlama algoritması (Tablo 6'da verilmiştir) kullanılarak bir patoloj tarafından ayrı olarak değerlendirilmiştir. Her bir kopya NSCLC numunesi eşdeğer ALK IHC boyama sonucu ortaya koymuştur. BenchMark XT ve BenchMark ULTRA cihazlarının tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik sonuçlarının bir özeti, sırasıyla Tablo 11 ve Tablo 12'de bulunabilir.

BenchMark XT ve BenchMark GX cihazlarında VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini performansını karşılaştıran bir platformlar arası çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, her biri 8 NSCLC numunesi içeren iki çoklu doku bloğu (blok başına 3 ALK pozitif, 1 ALK negatif) değerlendirilmiştir. Bu karşılaştırma için, 5 kopya slayt üç BenchMark XT cihazı ve üç BenchMark GX cihazında boyanmıştır. Bu slaytlar, Tablo 6'da bulunan VENTANA anti-ALK (D5F3) IHC Puanlama Algoritmasına göre uygun boyama açısından

değerlendirilmiştir. Her bir kopya NSCLC numunesi, iki platform arasında eşdeğer ALK IHC boyama sonucu ortaya koymuştur. Sonuçların özeti Tablo 13 içinde bulunabilir.

Ek olarak, insan apandisi (sistem düzeyinde kontrol) üzerinde VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini boyamasının tekrar edilebilirliği de değerlendirilmiştir. Bu çalışma için sekiz benzersiz insan apandis dokusu kullanılmıştır. Gün içi kesinlik için, 4 apandis numunesini içeren iki çoklu doku bloğundan 13 kopya slayt, tek bir BenchMark XT cihazında boyanmıştır. Cihazlar Arası kesinlik için, her biri 4 apandis numunesi içeren iki çoklu doku bloğundan 5 kopya slayt, üç BenchMark XT cihazında VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile boyanmıştır. Günler Arası kesinlik için, 4 apandis numunesi içeren iki çoklu doku bloğunun her birinden 5 kopya slayt, ardışık olmayan 5 gün boyunca tek bir BenchMark XT cihazında VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile boyanmıştır. Tüm slaytlar, bir patoloj tarafından apandis kontrol dokusu için VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini puanlama kılavuzu kullanılarak değerlendirilmiştir (Tablo 5'te verilmiştir). Her bir kopya apandis numunesi eşdeğer ALK IHC boyama sonucu ortaya koymuştur. Gün içi ve cihazlar arası (3 cihazda) tekrar edilebilirlik için genel uyum yüzdesi %100 olmuş, günler arası tekrar edilebilirlik (ardışık olmayan 5 günde) ise %98 olmuştur.

Tablo 11. BenchMark XT cihazında boyanan ayrı NSCLC numunelerinde VENTANA anti-ALK (D5F3) tayininin tekrar edilebilirliği ve ara kesinliği.

NSCLC Doku Tekrar Edilebilirliği/Kesinliği	N = Kohortta Değerlendirilen Toplam Slayt	ALK Durumu İçin Genel Uyum Yüzdesi (%95 CI)
Gün içi Tekrar Edilebilirlik	50	%100 (%97.5-100)
Platform içi Kesinlik (3 BenchMark XT cihazında)	60	%100 (%97.9-100)
Günler Arası Kesinlik (ardışık olmayan 5 gün)	100	%100 (%98.7-100)

Tablo 12. BenchMark ULTRA cihazında ayrı NSCLC numuneleri üzerinde VENTANA anti-ALK (D5F3) tayininin tekrar edilebilirliği ve ara kesinliği.

NSCLC Doku Tekrar Edilebilirliği/Kesinliği	N = Kohortta Değerlendirilen Toplam Slayt	ALK Durumu İçin Genel Uyum Yüzdesi (%95 CI)
Gün içi Tekrar Edilebilirlik	50	%100 (%92.9-100.0)
Platform içi Kesinlik (3 BenchMark ULTRA cihazında)	60	%100 (%94.0-100.0)
Günler Arası Kesinlik (ardışık olmayan 5 gün)	100	%100 (%96.3-100.0)

Tablo 13. BenchMark XT ve BenchMark GX cihazları kullanılarak çoklu doku bloğu NSCLC numuneleri üzerinde VENTANA anti-ALK (D5F3) tayininin Platformlar Arası Kesinliği.

NSCLC Doku Kesinliği	N = Kohortta Değerlendirilen Toplam Slayt	ALK Durumu İçin Genel Uyum Yüzdesi
BenchMark XT ile BenchMark GX cihazının Platformlar Arası Kesinliği (3 cihazda)	30	%100

Lotlar Arası Tekrarlanabilirlik

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayininin lotlar arası tekrarlanabilirliği, OptiView DAB IHC Detection ve OptiView Amplification kitleri kullanılarak BenchMark XT cihazında 38 benzersiz NSCLC vakasında (21 ALK pozitif numune (18 benzersiz vakadan) ve 20 ALK negatif NSCLC doku numunesi) üç VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini lotunun test edilmesiyle belirlenmiştir. Tüm vakalar, üç primer antikor lotunun her biriyle iki kopya halinde boyanmıştır. Slaytlar, VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini puanlama algoritması

(Tablo 6'da verilmiştir) kullanılarak belirlenen şekilde klinik durum değerlendirilmesi öncesinde körlenmiş ve randomize edilmiştir. Üç antikor lotunun hepsi, değerlendirilen 41 NSCLC doku numunesinde ALK durumu için %90'dan daha fazla uyumlu boyama sonucu sergilemiştir. Sonuçlar, genel uyum yüzdesi, ortalama pozitif uyum ve ortalama negatif uyum oranları şeklinde bildirilmiştir. Lotlar arasındaki genel uyum yüzdesi oranı %99.2'dir; dolayısıyla, VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini antikor lotlarında boyama sonuçları açısından tekrarlanabilir. Sonuçlar Tablo 14'te bulunabilir.

BenchMark ULTRA cihazı kullanılarak VENTANA anti-ALK (D5F3) tayininin lotlar arası tekrarlanabilirliği, OptiView DAB IHC Detection ve OptiView Amplification kiti kullanılarak 30 benzersiz NSCLC vakasında (15 ALK pozitif numune ve 15 ALK negatif NSCLC doku numunesi) üç VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini lotunun test edilmesiyle belirlenmiştir. Tüm vakalar, üç primer antikor lotunun her biriyle iki kopya halinde boyanmıştır. Slaytlar, VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini puanlama algoritması (Tablo 6'da verilmiştir) kullanılarak belirlenen şekilde, klinik durum için değerlendirme öncesinde bir patoloğ tarafından körlenmiş ve randomize edilmiştir. Üç antikor lotunun hepsi, değerlendirilen 30 NSCLC doku numunesinde ALK durumu için %90'dan daha fazla uyumlu boyama sonucu sergilemiştir. Sonuçlar, genel uyum yüzdesi, ortalama pozitif uyum ve ortalama negatif uyum oranları şeklinde bildirilmiştir. Lotlar arasındaki genel uyum yüzdesi oranı %99.1'dir; dolayısıyla, VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini antikor lotlarında boyama sonuçları açısından tekrarlanabilir. Sonuçlar Tablo 15'te bulunabilir. VENTANA anti-ALK (D5F3) tayininin lotlar arası tekrarlanabilirliği, 12 benzersiz insan apandis doku numunesi kullanılarak değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirlik, üç BenchMark XT cihazında OptiView DAB IHC Detection ve OptiView Amplification Kit'lerin üç lotu ile birlikte üç antikor lotunun test edilmesiyle belirlenmiştir. VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini kullanılarak apandisin uygun pozitif ve negatif boyama elementlerinin genel uyum oranı %100 olmuştur.

Tablo 14. BenchMark XT cihazında 41 NSCLC doku numunesinde lotlar arası tekrarlanabilirlik uyum oranları. Yirmi bir ALK pozitif numune (18 benzersiz vakadan) ve 20 ALK negatif numune test edilmiştir.

Lotlar Arası Tekrarlanabilirlik Uyum Oranları	Ortalama Pozitif Uyum (%95 CI)	Ortalama Negatif Uyum (%95 CI)	Genel Uyum Yüzdesi (%95 CI)
Lotlar arası üç karşılaştırmanın ortalaması	%99.2 (%97.4-100)	%99.1 (96.8-100.0)	%99.2 (%97.5-100)

Tablo 15. BenchMark ULTRA cihazında 30 NSCLC doku numunesinde lotlar arası tekrarlanabilirlik uyum oranları. On beş ALK pozitif numune ve 15 ALK negatif numune test edilmiştir.

Lotlar Arası Tekrarlanabilirlik Uyum Oranları	Pozitif Uyum Yüzdesi (%95 CI)	Negatif Uyum Yüzdesi (%95 CI)	Genel Uyum Yüzdesi (%95 CI)
Lotlar arası üç karşılaştırmanın ortalaması	%98.9 (%96.8-99.6)	%99.3 (%97.3-99.8)	%99.1 (%97.9-99.6)

Okuyucular Arası Kesinlik Çalışmaları

Bazı okuyucular arası kesinlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir: BenchMark XT cihazında iki çalışma ve BenchMark ULTRA cihazında bir çalışma.

BenchMark XT'de Okuyucular Arası Kesinlik Çalışmasında, üç patoloğ toplam 185 benzersiz vakayı değerlendirmiştir. VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile boyanmış 100 ALK pozitif ve 100 ALK negatif blok ile ilişkili 185 vaka. Vakalar, Tablo 6'da verilmiş olan VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini puanlama algoritmasına uygun olarak ALK IHC boyama sonuçlarının değerlendirilmesinden önce körlenmiş ve randomize edilmiştir. Aşağıdaki Tablo 16'da verilen sonuçlar, çalışma kohortundan benzersiz vakalar için okuyucular arası kesinlik oranlarını yansıtmaktadır.

Tablo 16. BenchMark XT cihazında Okuyucular Arası Kesinlik Çalışması 1

Okuyucular Arası Kesinlik	Ortalama Pozitif Uyum (%95 CI)	Ortalama Negatif Uyum (%95 CI)	Genel Uyum Yüzdesi (%95 CI)
Üç okuyucu karşılaştırmasının ortalaması	%98.8 (%97.3-100)	%99.0 (%97.7-100)	%98.9 (%97.4-100)

BenchMark XT Okuyucular Arası Kesinlik Çalışması 2, Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit için kaydedilen ALK pozitif NSCLC hasta numunelerinin bir randomize klinik çalışmasından vakaların bir kohortu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 300 vaka BenchMark XT cihazında VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile boyanmıştır. Vakalar, ALK FISH durumu açısından körlenmiş, randomize edilmiş ve Tablo 6'da verilmiş olan VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini puanlama algoritmasına uygun olarak ALK IHC boyama sonuçlarını değerlendiren üç okuyucuya sağlanmıştır. Tablo 17'de verilen sonuçlar, bu klinik çalışma kohortundan okuyucular arası kesinlik oranlarını yansıtmaktadır.

BenchMark ULTRA cihazı Okuyucular Arası Kesinlik Çalışması için 184 benzersiz NSCLC vakasından oluşan bir kohort değerlendirilmiştir. Kohort, BenchMark ULTRA cihazında VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile boyanmış 90 ALK pozitif ve 94 ALK negatif vakadan oluşmuştur. Vakalar, körlenmiş, randomize edilmiş ve Tablo 6'da verilmiş olan VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini puanlama algoritmasına uygun olarak ALK IHC boyama sonuçlarını değerlendiren üç okuyucuya sağlanmıştır. Tablo 18'de bu çalışmadan okuyucular arası kesinlik oranları yer almaktadır.

Tablo 17. BenchMark XT cihazında VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile boyanmış klinik yöntem karşılaştırması Kohort #1'den elde edilen NSCLC numunelerinde ALK durumu için Okuyucular Arası Kesinlik Çalışması 2.

Okuyucular Arası Kesinlik	Ortalama Pozitif Uyum (%95 CI)	Ortalama Negatif Uyum (%95 CI)	Genel Uyum Yüzdesi (%95 CI)
Üç okuyucu karşılaştırmasının ortalaması	%97.6 (%95.0-99.5)	%99.5 (%98.9-99.9)	%99.1 (%98.2-99.8)
Okuyucu 1 / Okuyucu 2	%99.1 (%97.1-100)	%99.8 (%99.4-100)	%99.7 (%98.2-99.9)
Okuyucu 1 / Okuyucu 3	%96.3 (%92.3-99.2)	%99.2 (%98.3-99.8)	%98.6 (%96.6-99.5)
Okuyucu 2 / Okuyucu 3	%97.2 (%93.5-100)	%99.4 (%98.6-100)	%99.0 (%97.1-99.7)

Tablo 18. BenchMark ULTRA cihazında VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile boyanmış NSCLC numunelerinde ALK durumu için Okuyucular Arası Kesinlik.

Okuyucular Arası Kesinlik	Ortalama Pozitif Uyum (%95 CI)	Ortalama Negatif Uyum (%95 CI)	Genel Uyum Yüzdesi (%95 CI)
Üç Okuyucu karşılaştırmasının ortalaması	%98.4 (%96.5-99.6)	%98.6 (%96.9-99.7)	%98.5 (%96.7-99.6)
Okuyucu 1 / Okuyucu 2	%98.9 (%96.8-100)	%98.9 (%97.0-100)	%98.9 (%96.0-99.7)
Okuyucu 1 / Okuyucu 3	%98.8 (%96.7-100)	%99.0 (%97.2-100)	%98.9 (%96.0-99.7)
Okuyucu 2 / Okuyucu 3	%97.6 (%94.7-99.4)	%97.9 (%95.4-99.5)	%97.8 (%94.4-99.1)

ALK FISH ile Uyum

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini boyama sonuçlarını ALK klinik durumu açısından ALK FISH ile karşılaştırmak için üç kohort kullanılmıştır. Kohortlar; rezeksiyonlar, iğne biyopsileri, bronşiyal biyopsiler ve FNA'lardan FFPE hücre blokları dahil olmak üzere primer ve metastatik tümörlerden bir dizi insan NSCLC doku örneğini içermiştir. Tüm çalışmalar, puanlama algoritması (Tablo 6'da verilmiştir) kullanılarak puanlanmıştır.

Uyum Çalışması 1

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile retrospektif Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit verisi karşılaştırması yapan bir harici laboratuvarında bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Harici tesis, bir BenchMark XT cihazında VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini kullanarak yaklaşık 100 NSCLC vakasını boyamıştır. VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini, bu NSCLC örnek kohortunda retrospektif Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit verileri ile > %98 genel uyum yüzdesi göstermiştir. Sonuçlar Tablo 19 ve Tablo 20 içinde detaylandırılmıştır. 100 vaka içinden 86'sının kullanılabilir FISH verisine ve ALK IHC sonucu ile karşılaştırma için mevcut yeterli tümöre sahip olduğunu unutmayın.

Tablo 19. VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit Karşılaştırması			
VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini	Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	10	0	10
Negatif	1	75	76
Toplam	11	75	86

Tablo 20. VENTANA anti-ALK (D5F3) tayininin Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit ile karşılaştırılması için genel, pozitif ve negatif uyum yüzdesi oranları.

Genel, Pozitif ve Negatif Uyum Yüzdesi Oranları			
Oran	n/N	%	%95 CI ^a
Genel Uyum Yüzdesi	85/86	98.8	93.7, 99.8
Pozitif Uyum Yüzdesi	10/11	90.9	62.3, 98.4
Negatif Uyum Yüzdesi	75/75	100.0	95.1, 100.0

^a Puan yöntemi kullanılarak hesaplanan iki taraflı %95 güven aralığı.

Bu çalışmada doku numunesi hazırlığının, bu tayin için önerilen numune hazırlama prosedürlerini izleyip izlemediğinin doğrulanmadığı belirtilmelidir.

Uyum Çalışması 2

73 NSCLC vakası (boyandıktan sonra bir hafta içinde kesilmiştir) üzerinde VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit verisi karşılaştırması yapan ikinci bir harici laboratuvarında bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Harici tesis, bir BenchMark XT cihazında VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini kullanarak vakaları boyamıştır. VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini, bu NSCLC örnek kohortunda retrospektif Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit verileri ile > %93 genel uyum yüzdesi göstermiştir. Sonuçlar Tablo 21 ve Tablo 22 içinde detaylandırılmıştır.

Tablo 21. VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit.

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit Karşılaştırması			
VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini	Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	2	4	6
Negatif	0	56	56
Toplam	2	60	62

Tablo 22. VENTANA anti-ALK (D5F3) tayininin Abbott Vysis Break Apart FISH Probe Kit ile karşılaştırılması için genel, pozitif ve negatif uyum yüzdesi oranları.

Genel, Pozitif ve Negatif Uyum Yüzdesi Oranları			
Oran	n/N	%	%95 CI ^a
Genel Uyum Yüzdesi	58/62	%93.5	84.6-97.5
Pozitif Uyum Yüzdesi	2/2	%100	34.2-100.0
Negatif Uyum Yüzdesi	56/60	%93	84.1-97.4

^a Puan yöntemi kullanılarak hesaplanan iki taraflı %95 güven aralığı.

Dört uyumsuz (FISH negatif, ALK IHC pozitif) vakada, başka bir ALK (farklı klon ve saptama sistemi) ile ek boyanmamış slaytlar test edilmiştir. Dört vakadan üçü, saptanan ALK IHC boyaması açısından VENTANA anti-ALK (D5F3) tayinine uygun çıkmıştır. FISH sonuçlarının belirlenemediği veya elde edilmediği 10 vaka daha olmuştur. Bu vakalardan dördü, VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ve diğer ALK klonu ile pozitif ve altısı ALK IHC ile negatif çıkmıştır. FISH ile pozitif olan, ancak IHC ile boyama için yeterli örneği bulunmayan bir vaka vardır.

Uyum Çalışması 3

Bu çalışmada, Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit için kaydolmuş ALK pozitif NSCLC hastalarının devam eden, global bir klinik çalışmasından yaklaşık 300 vaka VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile boyanmıştır. Bu kohort, Okuyucular Arası Kesinlik Çalışmasında daha önce tartışılan kohorttur. Yaklaşık 300 vakadan bazıları, FISH ile "aydınlatıcı olmayan" veya "FISH tayini gerçekleştirilmedi" şeklinde kategorize edilmiştir ve yalnızca bilgi amaçlı olarak boyanarak değerlendirilmiştir.

Vakalar FISH durumu açısından körlenmiş, randomize edilmiş ve boyama sonuçlarını değerlendiren iki okuyucuya sağlanmıştır. Sonuçlar, genel klinik çalışmadan elde edilen FISH durumu ile karşılaştırılmıştır.

ALK IHC ile ALK FISH karşılaştırmasının sonuçları Tablo 23'te gösterilmiştir.

Tablo 23. 2 patoloj tarafından değerlendirilen VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit uyumu.

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit Karşılaştırması				
VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini		Abbott Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		Toplam
Okuyucu		Pozitif	Negatif	
Okuyucu 1	Pozitif	37	13	50
	Negatif	11	223	234
	Toplam	48	236	284
Okuyucu 2	Pozitif	37	12	49
	Negatif	11	225	236
	Toplam	48	237	285

Bu çalışmada doku numuneleri hazırlığının, bu tayin için önerilen numune hazırlama prosedürlerini izleyip izlemediğinin doğrulanmadığı belirtilmelidir.

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ALK pozitif, ALK FISH negatif olan uyumsuz vakalar:

- En az bir okuyucu tarafından ALK IHC pozitif ve FISH negatif olarak değerlendirilen 4 vaka olmuştur. Konsensüs incelemesi üzerine, bunların IHC negatif olarak değerlendirilmesi gerektiğine karar verilmiştir. Bu vakalarda fokal sitoplazmik/membran boyama görülmüştür ve bunlar yorumlama kılavuzunda açıklanmıştır.
- Gerçekten uyumsuz vaka olarak kabul edilen 9 ALK IHC pozitif, ALK FISH negatif vaka olmuştur.

9 uyumsuz vaka içinden 7'sinde, ek ALK diagnostik testi (moleküler test ve farklı bir klon ve saptama sistemi kullanarak IHC testi) için kullanılabılır boyanmamış slaytlar vardır. Bu ek test sonuçları, uyumsuz vakaların çoğunun, ALK FISH negatif olduğunda ALK durumu için pozitif IHC değerlendirmesi lehine olduğunu göstermiştir. (Bu vakalardan elde edilen kesilmiş slaytların önerilen 3 ayı geçtiği belirtilmelidir).

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini negatif, ALK FISH pozitif olan uyumsuz vakalar:

- FISH ile pozitif, ancak VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile negatif olan 11 vaka vardır. 10 vakada, moleküler teknikler ve IHC ile ek ALK diagnostik testi için kullanılabılır boyanmamış slaytlar olmuştur. Bu ek test sonuçları, VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile negatif olan vakaların çoğunun başka bir ALK IHC sistemiyle de negatif olduğunu ancak bir veya birden fazla moleküler tayin ile pozitif olduğunu göstermiştir. Bu vakalardan elde edilen kesilmiş slaytların ALK IHC için önerilen 3 ayı geçtiği belirtilmelidir.
- Son olarak, kohortta FISH ile aydınlatıcı olmayan 14 vaka olmuştur (sonuç elde edilmemiştir). Bunların 3'ü, VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile her iki okuyucu tarafından pozitif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, H&E slaytına dayalı olarak FISH tayininin gerçekleştirilemediği (genel olarak tümör içeriğinin yetersiz olmasından dolayı) 19 vaka olmuştur. Bunlar içinden her iki okuyucu, 4 vakada ALK IHC boyama sonuçlarını pozitif olarak değerlendirmiştir. Bu nedenle, ortalama olarak, FISH sonuçlarının elde edilmediği vakaların %21'inde VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile pozitif ALK durumu elde edilmiştir.

BenchMark XT Cihazında Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik Çalışması

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini için bir Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik Çalışması, üç harici laboratuvar da 1 reaktif lotu, 3 cihaz ve ardışık olmayan 5 günde çalışılan NSCLC (6 ALK pozitif ve 6 ALK negatif) doku numuneleri kullanılarak BenchMark XT cihazında ALK klinik durumunun belirlenmesinde tayin tekrarlanabilirliğini göstermek üzere tamamlanmıştır. Numuneler randomize edilmiştir ve kohortun ALK klinik durumu açısından körlenmiş toplam 6 okuyucu (2 okuyucu/tesis) tarafından değerlendirilmiştir. Bu kohort, IHC ve FISH ile ALK ekspresyonu için pozitif ve negatif olan 12 NSCLC vakasından oluşturulan 180 slaytı içermiştir. Bu vakalar, 3 laboratuvar da 21 günde kopya halinde boyanmıştır. Sonuçlar için bkz. Tablo 24. Bu çalışmalarda morfoloji ve arka plan için kabul edilebilirlik oranı %100 olmuştur. BenchMark XT cihazında VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini için Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik (ILR) çalışması, değerlendirilebilir gözlemler kullanılarak çift olarak gerçekleştirilen tesisler arası, okuyucular arası ve çalışmalar arası (gün) karşılaştırmalar için ortalama pozitif uyum (APA) ve ortalama negatif uyum (ANA) sağlamıştır.

Tablo 24. ILR: BenchMark XT cihazında VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini için uyum oranları (değerlendirilen slayt n = 180).

Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik İçin Uyum Oranları (ALK Klinik Durumu)	Ortalama Pozitif Uyum (%95 CI)	Ortalama Negatif Uyum (%95 CI)	Genel Uyum Yüzdesi (%95 CI)
Tesisler arası (3 tesis)	%93.8 (%76.2-100)	%94.9 (%79.2-100)	%94.4 (%83.3-100)
Günler arası (ardışık olmayan 5 gün)	%99.1 (%96.4-100)	%99.2 (%96.9-100)	%99.2 (%97.5-100)
Okuyucular arası (2 okuyucu/tesis)	%98.8 (%95.2-100)	%99.0 (%95.8-100)	%98.9 (%96.7-100)

BenchMark ULTRA Cihazında Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik Çalışması

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini için ek bir Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik Çalışması, BenchMark ULTRA cihazında üç harici laboratuvar da 1 reaktif lotu, 3 cihaz ve ardışık olmayan 5 günde çalışılan NSCLC (7 ALK pozitif ve 7 ALK negatif) doku numuneleri kullanılarak BenchMark ULTRA cihazında ALK klinik durumunun belirlenmesinde tayin tekrarlanabilirliğini göstermek üzere tamamlanmıştır. Numuneler randomize edilmiştir ve kohortun ALK klinik durumu açısından körlenmiş toplam 6 okuyucu (2 okuyucu/tesis) tarafından değerlendirilmiştir. Bu kohort, IHC ve FISH ile ALK ekspresyonu için pozitif ve negatif olan 14 NSCLC vakasından oluşturulan 210 slaytı içermiştir. Bu vakalar, 3 laboratuvar da 21 günde kopya halinde boyanmıştır. Sonuçlar için

bkz. Tablo 25. Havuzlanan tüm veriler için toplam nihai boyama kabul edilebilirliği oranı %99 olmuştur. Bu çalışmalarda morfoloji ve arka plan için kabul edilebilirlik oranı %100 olmuştur. Sonuçlar için bkz. Tablo 26.

BenchMark ULTRA cihazında VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini için ILR çalışması, referans standardı olarak konsensus puanı kullanıldığında, tüm tesislerin, okuyucuların ve günlerin havuzlanmasıyla çalışmadan elde edilen tüm değerlendirilebilir gözlemlerde pozitif uyum yüzdesi (PPA) ve negatif uyum yüzdesi (NPA) sağlamıştır.

Tablo 25. ILR: BenchMark ULTRA cihazında VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini için uyum oranları (değerlendirilen slayt n = 210).

Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik İçin Uyum Oranları (ALK Klinik Durumu)	Pozitif Uyum Yüzdesi (%95 CI)	Negatif Uyum Yüzdesi (%95 CI)	Genel Uyum Yüzdesi (%95 CI)
Tüm değerlendirilebilir gözlemlerde	%92.8 (%88.4, 95.6)	%100.0 (%98.2, 100.0)	%96.4 (%94.1, 97.8)

Tablo 26. Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik: BenchMark ULTRA cihazında VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini için okuyucular arası uyum oranları (değerlendirilen slayt n = 210).

Okuyucu uyum oranları arasında Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik İçin Uyum Oranları (ALK Klinik Durumu)	Ortalama Pozitif Uyum (%95 CI)	Ortalama Negatif Uyum (%95 CI)	Genel Uyum Yüzdesi (%95 CI)
Okuyucu A1 / A2	%97.0 (%87.5-100)	%97.3 (%89.5-100)	%97.1 (%90.2-99.2)
Okuyucu B1 / B2	%93.5 (%71.4-100)	%94.7 (%81.0-100)	%94.2 (%86.0-97.7)
Okuyucu C1 / C2	%92.3 (%66.7-100)	%93.2 (%74.7-100)	%92.8 (%84.1-96.9)
Genel	%94.3 (%75.6-100)	%95.1 (%81.6-100)	%94.7 (%84.1-100)

BenchMark ULTRA PLUS Cihazında OptiView DAB IHC Detection ve OptiView Amplification Kit'ler Kullanılarak Laboratuvarlar Arası ve Okuyucular Arası Tekrarlanabilirlik Çalışması

VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay için BenchMark ULTRA PLUS Cihazı Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik Çalışması, BenchMark ULTRA PLUS cihazında, bir reaktif lotu genelinde ve ardışık olmayan 5 gün boyunca üç harici laboratuvarın her birindeki cihazda çalışılan NSCLC (14 ALK pozitif ve 14 ALK negatif) doku numuneleri kullanılarak, ALK klinik durumunun belirlenmesinde tayin tekrarlanabilirliğini göstermek üzere tamamlanmıştır. Numuneler randomize edilmiş ve toplam 6 okuyucu (2 okuyucu/tesis) tarafından değerlendirilmiştir. Her vakada, tüm kullanılabılır okuyucu gözlemleri, vakanın modal durumu ile karşılaştırılmıştır. Negatif reaktif kontrol slaytının ve ALK boyalı slaytın kabul edilebilirliği değerlendirilen 420 slaytın (tesis başına 140) hepsi için %100 olmuştur. Sonuçlar için bkz. Tablo 27, Tablo 28 ve Tablo 29

VENTANA anti-ALK (D5F3) BenchMark ULTRA PLUS ILR analizi, referans standardı olarak vaka düzeyinde modal ALK durumu kullanıldığında, tüm tesislerin, okuyucuların ve günlerin havuzlanmasıyla çalışmadan elde edilen tüm değerlendirilebilir gözlemlerde pozitif uyum yüzdesi (PPA) ve negatif uyum yüzdesi (NPA) sağlamıştır.

Tablo 27. Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik: BenchMark ULTRA PLUS cihazında VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay için Uyum oranları (değerlendirilen slayt n = 420).

ALK Klinik Durumunun Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirliği	Pozitif Uyum Yüzdesi (%95 CI)	Negatif Uyum Yüzdesi (%95 CI)	Genel Uyum Yüzdesi (%95 CI)
Tüm değerlendirilebilir gözlemlerde	%98.6 (97.3, 99.7)	%99.5 (%98.7-100)	%99.0 (%98.3-99.7)

Vaka düzeyinde modal durum yaklaşımı analizine ek olarak, çift olarak yaklaşım analizleri de gerçekleştirilmiştir ve ortalama pozitif uyum (APA), ortalama negatif uyum (ANA) sonuçları aşağıda sunulmuştur.

Tablo 28. Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik: BenchMark ULTRA PLUS cihazında VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay için uyum oranları (değerlendirilen slayt n=420).

Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik İçin Uyum Oranları (ALK Klinik Durumu)	Ortalama Pozitif Uyum (%95 CI)	Ortalama Negatif Uyum (%95 CI)	Genel Uyum Yüzdesi (%95 CI)
Tesisler arası (3 tesis)	%98.1 (%96.6-99.4)	%98.1 (%96.8-99.4)	%98.1 (%96.7-99.4)
Günler arası (ardışık olmayan 5 gün)	%98.3 (%96.9-99.4)	%98.3 (%97.2-99.5)	%98.3 (%97.1-99.5)

Tablo 29. Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik: BenchMark ULTRA PLUS cihazında VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay için okuyucular arası uyum oranları (değerlendirilen slayt n = 420).

Okuyucular Arasında ALK Klinik Durumunun Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirliği	Ortalama Pozitif Uyum (%95 CI)	Ortalama Negatif Uyum (%95 CI)	Genel Uyum Yüzdesi (%95 CI)
Okuyucu A1 / A2	%99.3 (%97.7-100)	%99.3 (%98.0-100)	%99.3 (%97.9-100)
Okuyucu B1 / B2	%94.8 (%90.5-98.6)	%95.2 (%91.4-98.6)	%95.0 (%91.1-98.6)
Okuyucu C1 / C2	%100.0 (%97.3-100)	%100.0 (%97.3-100)	%100.0 (%97.3-100)
Genel	%98.1 (%96.6-99.4)	%98.1 (%96.7-99.4)	%98.1 (%96.7-99.4)

BenchMark ULTRA PLUS ile BenchMark ULTRA cihazları arasındaki uyum

Birleşik Devletler'de yer alan ayrı kurumlardan üç laboratuvar, BenchMark ULTRA PLUS cihazı ile BenchMark ULTRA cihazı arasındaki uyuma ilişkin bir çalışmaya katılmıştır. Bu çalışmada kullanılmak üzere, VENTANA anti-ALK (D5F3) tayininin kullanım amacı popülasyonunun boyama aralığını temsil eden yüz kırk dört vaka seçilmiştir. 144 vakanın tümü Ventana'da, OptiView Amplification Kit ile eşleştirilen OptiView DAB IHC Detection Kit kullanılarak bir BenchMark ULTRA cihazında boyanmıştır. Aynı vakalardan kesilen slaytlar, OptiView DAB IHC Detection ve OptiView Amplification Kit'lerin bir lotu ile önerilen boyama protokolü kullanılarak bir BenchMark ULTRA PLUS cihazında boyanmak üzere randomize edilmiş ve çalışma tesisleri genelinde eşit olarak dağıtılmıştır (48 vaka/tesis). Vaka durumu açısından körlenmiş olan tesis başına iki patoloj, karşılık gelen BenchMark ULTRA PLUS cihazında boyanmış olan slaytları değerlendirmiş ve bir klinik durum belirtmiştir. 2 haftalık bir arınma süresinin ardından, Ventana'da önceden BenchMark ULTRA cihazında boyanmış karşılık gelen vaka slaytları, klinik değerlendirme için uygun tesislere dağıtılmıştır. Ayrıca, bir kurum içi patoloj tüm çalışma slaytlarını incelemiş ve tesislerin her biri için üçüncü bir patoloj olarak dahil edilmiştir. Sonuçlar, Ventana tarafından ALK pozitif veya negatif klinik durum bakımından analiz edilmiştir. OPA, PPA ve NPA oranları sırasıyla %95.4 (412/432), %93.5 (202/216) ve %97.2 (210/216) olmuştur. İki taraflı %95 CI'lar, yüzdelik bootstrap yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm vakalar için arka plan ve morfoloji kabul edilebilirlik oranları her iki cihazda %100 olmuştur. Sonuçlar Tablo 30'da bulunabilir.

Tablo 30. BenchMark ULTRA PLUS / BenchMark ULTRA Cihazlarında VENTANA anti-ALK (D5F3) Assay ile Boyanmış ALK NSCLC Vakalarının Havuzlanmış Uyumu.

BenchMark ULTRA PLUS ALK Durumu	BenchMark ULTRA ALK Durumu		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	202	6	208
Negatif	14	210	224
Toplam	216	216	432
	n/N	% (%95 CI[a])	
Pozitif Uyum Yüzdesi	202/216	93.5 (89.5, 97.2)	
Negatif Uyum Yüzdesi	210/216	97.2 (94.5, 99.5)	
Genel uyum yüzdesi	412/432	95.4 (92.8, 97.5)	

[a] İki taraflı %95 CI'lar, nitelendirme grubuna göre sınıflandırma [ALK pozitif, ALK negatif, zorlu ALK pozitif, zorlu ALK negatif] ile seçilen 2000 kopya ile yüzdelik bootstrap yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

KLİNİK PERFORMANS

BenchMark XT Cihazında Yöntem Karşılaştırması Çalışması

Yöntem Karşılaştırma Çalışması kohortları, ALK pozitif NSCLC hastalarının kaydedildiği iki bağımsız, randomize, krizotinib klinik çalışmasından (Çalışma #1 ve Çalışma #2 olarak belirtilmiştir) oluşturulmuştur. Bu hastalar için ALK durumu, birçok merkez laboratuvarında Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit klinik çalışma tayini kullanılarak belirlenmiştir. Geçerli Vysis ALK FISH sonuçları, toplamda 1644 NSCLC doku numunesi (Çalışma #1 ve #2 için sırasıyla 1018 ve 626) elde edilmiştir.

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini Yöntem Karşılaştırması Çalışmasında, Çalışma #1 ve #2 için taranan hastaların numuneleri, VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile boyama ve VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini puanlama algoritması kriterlerine (Tablo 6) dayalı ALK IHC durumuna yönelik değerlendirme için bir merkez laboratuvara gönderilmiştir. Klinik çalışma taramasında geçerli Vysis ALK FISH sonuçları veren numuneler içinden, Çalışma #1'den 933 numune (Tablo 31) ve Çalışma #2'den 598 numune (Tablo 33) de VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini için geçerli sonuçlar vermiştir.

Her bir tayin için ALK pozitif ve ALK negatif sonuçlar veren numune sayısı, Çalışma #1 ve #2 kohortları için sırasıyla Tablo 31 ve 33'de gösterilmektedir. İki tayin arasındaki uyum oranları, Çalışma #1 ve #2 kohortları için sırasıyla Tablo 32 ve 34'da gösterilmektedir. Raporlanan pozitif ve negatif uyum yüzdesi oranları, sırasıyla Çalışma #1 için %86.0 ve %96.3 (Tablo 32) ve sırasıyla Çalışma #2 için %92.7 ve %94.8 (Tablo 34) olmuştur.

Tablo 31. NSCLC numunelerinde ALK durumu karşılaştırması (Çalışma #1'den kohort) VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini / Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit kullanılarak belirlenmiştir.

ALK Durumu		Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		
		Pozitif	Negatif	Toplam
VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini	Pozitif	154	28	182
	Negatif	25	726	751
	Toplam	179	754	933

Tablo 32. Çalışma #1'de VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit arasındaki uyum oranları.

ALK Tayinleri arasındaki Uyum Oranları	Pozitif Uyum Yüzdesi (%95 CI)	Negatif Uyum Yüzdesi (%95 CI)	Genel Uyum Yüzdesi (%95 CI)
VENTANA anti-ALK (D5F3) antikoru ve 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)

Tablo 33. NSCLC numunelerinde Çalışma #2'den ALK durumu karşılaştırma kohortu, VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini / Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit kullanılarak belirlenmiştir.

ALK Durumu		Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit		
		Pozitif	Negatif	Toplam
VENTANA anti-ALK (D5F3) antikoru	Pozitif	179	21	200
	Negatif	14	384	398
	Toplam	193	405	598

Tablo 34. Çalışma #2'de VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit arasındaki uyum oranları.

ALK Tayinleri arasındaki Uyum Oranları	Pozitif Uyum Yüzdesi (%95 CI)	Negatif Uyum Yüzdesi (%95 CI)	Genel Uyum Yüzdesi (%95 CI)
VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ve 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)

Çalışma #1 ve Çalışma #2'de kullanılan doku numunelerinin, VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini için önerilen numune hazırlama prosedürlerine göre hazırlandığının doğrulanmadığı belirtilmelidir.

Krizotinib Klinik Sonuç Çalışması

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayininin bir ALK hedeflenmiş ajan olan krizotinib ile tedaviden fayda sağlayabilecek hastaların seçimi için bir diagnostik araç olarak klinik etkililik analizi Çalışma #1'e dayanmaktadır. Bu hastalar, Yöntem Karşılaştırması Çalışması ve bir ek çalışma kapsamında VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile test edilmiştir. Çalışma #1, ALK pozitif, ileri skuamöz olmayan NSCLC'li daha önce tedavi görmemiş hastalarda krizotinib ile birinci basamak kemoterapi (pemetreksed/sisplatin veya pemetreksed/karboptatin) için çok merkezli, çok uluslu, randomize, açık etiketli, Faz 3 etkililik ve güvenlik çalışmasıdır. ALK pozitiflik durumunu ve Çalışma #1 için çalışma uygunluğunu belirlemek üzere Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (ALK FISH) kullanılmıştır. Vysis ALK FISH tayini sonuçlarına dayalı olarak 343 hasta randomize kümede (172 hasta krizotinib kolunda ve 171 hasta kemoterapi kolunda) yer almıştır. VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini Klinik Sonuç Çalışmasında, Çalışma #1'den doku numuneleri VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile retrospektif olarak test edilmiştir. Çalışma #1'e katılan 343 hastadan 133'ü, Yöntem Karşılaştırması Çalışması kapsamında VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile test edilmiştir ve 39 hasta daha, ayrı bir çalışma protokolü kapsamında test edilmiştir; VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile toplamda 172 hasta test edilmiştir. ALK (D5F3) IHC ile, bu hastalardan 166'sına ALK pozitif veya ALK negatif teşhisi konulmuştur. Bu hastalar için genel etkililik sonuçları Tablo 35'te yer alan VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini sonuçlarına göre özetlenmektedir.

Tablo 35. Çalışma #1'e kayıtlı hastalar için krizotinib klinik faydası (ilerlemesiz sağkalm).

ALK Durumu		HR ^a	SE ^a	%95 CI ^a	Örneklem Boyutu	
					Kemoterapi Kolu	Krizotinib Kolu
Toplam Kayıtlı	FISH+	0.454	0.139	(0.346, 0.596)	171	172
ALK IHC ile Test Edilen	FISH+ ^b	0.407	0.214	(0.267, 0.618)	82	90
	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 Kemoterapi ile karşılaştırılabilir olarak krizotinibde ilerlemesiz sağkalm (PFS) için gözlemlenen tehlike oranı (HR); standart hata (SE) ve 2 taraflı %95 güven aralığı (CI). Sonuçlar, şu katmanlara göre sınıflandırılmış Cox modeli kullanılarak tahmin edilmiştir: ırk, beyin metastazı ve ECOG puanı.

^b Kemoterapi kolundaki iki ALK FISH+ hasta ve krizotinib kolundaki 4 hasta için pozitif veya negatif ALK IHC sonucu elde edilmemiştir.

Eksik veya geçersiz VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini test sonuçlarına sahip hastaları dahil etmek ve çalışma sonuçlarının sağlamlığını değerlendirmek için ek veri atama analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma #1'e kaydedilmemiş uyumsuz hastaların istatistiksel analizi, bu hastalar için bir dizi olası sonuç simülasyonunu içermiştir. Varsayımsal analizlerin tamamından elde edilen sonuçlar, genel olarak birincil etkililik analizinden elde edilenlere benzerdir.

Çalışma #1'den FISH+/IHC- Uyumsuz Vakaları:

Yöntem Karşılaştırması Çalışması

Yöntem Karşılaştırması Çalışmasında (Tablo 35), Çalışma #1'den 25 hasta FISH+/IHC- olarak değerlendirilmiştir. Bu vakalar için medyan Vysis ALK FISH puanı (ALK geni yeniden düzenlemesi bakımından pozitif %tümör hücreleri) %20 olmuştur (ortalama %31.6, SD %21.58) ve bu vakaların 14'ü için FISH puanı %25 veya altında olmuştur. Tüm vakalarda Vysis ALK FISH puanları ALK pozitifliği için %15 eşliğinin üzerinde olmasına rağmen bunların puanları FISH için belirsiz bölgededir (%10-%50). Bunun aksine IHC ile test edilen kayıtlı hastaların tamamı için gözlemlenen medyan FISH puanı %58 olmuştur (ortalama %56.9, SD %21.97).

Klinik Sonuç Çalışması

Klinik Sonuç Çalışmasında, Çalışma #1'e kayıtlı 25 hasta FISH+/IHC- olarak değerlendirilmiştir (Tablo 35'un son satırına bakın). Bu vakalardan sekizi, klinik çalışmanın krizotinib koluna randomize edilmiştir. Bu hastalardan beşinde, FISH puanları FISH eşliğine (tümör hücrelerinin %15-%18'i ALK geni yeniden düzenlemesi bakımından pozitif) çok yakındır ve bu hastalar ayrıca objektif ilerleme veya stabil hastalık/yanıt yok durumu sergilemiştir. 8 hastadan ikisinde FISH puanları FISH için belirsiz bölge (tümör hücrelerinin %66 ve %72'si ALK geni yeniden düzenlemesi bakımından pozitif) dışındadır ve bu hastalar, kısmi bir objektif tümör yanıtı sergilemiştir. Sekizinci IHC- hasta FISH- bir hastadır ve hatalı şekilde kaydedilmiştir; bu hasta belirsiz yanıt sergilemiştir.

Çalışma #1'den FISH-/IHC+ Uyumsuz Vakaları

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini Yöntem Karşılaştırması Çalışmasında, Çalışma #1 için taranan 28 vaka FISH-/IHC+ olarak değerlendirilmiştir. FISH klinik çalışma tayini olduğundan ve Çalışma #1'e yalnızca FISH+ vakalar kaydedildiğinden, FISH-/IHC+ uyumsuz vakalarına dair sonuç verileri mevcut değildir.

Seritinib Klinik Sonuç Çalışması

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayininin seritinib ile tedaviden fayda sağlayabilecek hastaların seçimi için bir diagnostik araç olarak klinik etkililik analizi, oral seritinibin bir açık etiketli, randomize, aktif kontrollü, çok merkezli, Faz 3 (Çalışma #3) çalışmasına dayalıdır. Bu çalışmada, ALK pozitif, lokal olarak ileri veya metastatik, skuamöz olmayan NSCLC'li daha önce tedavi görmemiş yetişkin hastalarda seritinib ile kemoterapinin (pemetreksed ile platinyum bazlı çiftli ve ardından 4 kürün ardından ilerleyici hastalığı olmayan hastalarda pemetreksed bakımı) klinik etkililiği ve güvenliği karşılaştırılmıştır. VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini, bir pozitif ALK durumu gerektiren Çalışma #3 uygunluğu için toplamda

1778 hastayı test etmek için BenchMark XT cihazında kullanılmıştır. Tümörleri tayinden ALK pozitif sonuçlar elde eden toplamda 376 hasta randomize kümesinde (189 seritinib kolunda ve 187 kemoterapi kolunda) yer almıştır. Seritinib ile tedavi edilen hastaların genel etkililik sonuçları Tablo 36'de özetlenmektedir. Seritinib, VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini kullanılarak seçilen hastalar için BIRC'ye göre PFS'de %45 risk düşüşü (HR = 0.55; %95 CI: 0.42, 0.73; p < .001) ile kemoterapiye göre istatistiksel olarak anlamlı ve klinik olarak anlamlı bir fayda göstermiştir. BIRC değerlendirilmesine göre medyan PFS, seritinib kolu için 16.6 ay (%95 CI: 12.6, 27.2) ve kemoterapi kolu 8.1 ay (%95 CI: 5.8, 11.1) olmuştur.

Tablo 36. Çalışma #3'e kayıtlı hastalar için seritinibin klinik faydası (ilerlemesiz sağkalm).

İlerlemesiz Sağkalm	Seritinib (N = 189)	Kemoterapi (N = 187)
Medyan, ay (%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 değeri ^c	< 0.001	

HR = tehlike oranı; CI = güven aralığı; BIRC = Körlenmiş Bağımsız İnceleme Komitesi; NR = ulaşılamadı; NE = tahmin edilemez

^a Kaplan-Meier yöntemi kullanılarak tahmin edilmiştir.

^b Randomizasyon sınıflandırma faktörlerine göre sınıflandırılan bir Cox regresyon modeli (WHO performans durumu: 0 / 1-2; BM varlığı veya yokluğu, daha önceki neo/adjuvan kemoterapi varlığı veya yokluğu, Wald testine dayalı %95 CI ile birlikte PFS'nin tehlike oranını tahmin etmek için kullanılmıştır.

^c Sınıflandırılmış log sıra testine dayalıdır (Not b ile aynı sınıflandırma).

Tedavi amaçlı popülasyonda (tayin ile 1778 hasta test edilmiştir) VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini için boyama kabul edilebilirliği oranları Tablo 37'te bildirilmiştir. VENTANA anti-ALK (D5F3) tayiniyle boyanmış slaytlar için kabul edilebilir morfoloji ve kabul edilebilir arka plan oranları da bildirilmektedir. 122 numune için ilk VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini boyama çalışması başarısız olmuştur ve başka bir boyama çalışması gerçekleştirilmiştir. Son boyama çalışmasında, 122 numuneden 48'i kabul edilemez olarak (1'i geçersiz çalışma kontrolü, 30'u kabul edilebilir olmayan H&E, 12'si kabul edilebilir olmayan negatif reaktif kontrolü, 1'i kabul edilebilir olmayan arka plan, 2'si kabul edilebilir olmayan arka plan ve morfoloji ve 2'si değerlendirilebilir olmayan IHC slaytı nedeniyle) kalmıştır. VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini, sırasıyla %93.1 ve %97.3 olmak üzere yüksek ilk ve son toplam boyama kabul edilebilirliği oranları sergilemiştir. Son morfoloji ve arka plan kabul edilebilirlik oranları %99 veya daha fazla olmuştur.

Tablo 37. Çalışma #3'e kayıt için taranan NSCLC çalışma numunelerinin ilk ve son VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini boyama performansı özellikleri.

Değerlendirilen Boyama Özellikleri	Kabul Edilebilirlik Oranı % (n/N) (%95 CI)	
	İlk Boyama Çalışması	Son Boyama Çalışması
Genel ALK IHC boyama kabul edilebilirliği oranı	%93.1 (1656/1778) (%91.9-94.2)	%97.3 (1730/1778) (%96.4-98.0)
Arka plan boyaması	%99.0 (1655/1672) (%98.4-99.4)	%99.8 (1727/1730) (%99.5-99.9)
Morfoloji	%99.0 (1657/1674) (%98.4-99.4)	%99.9 (1728/1730) (%99.6-100)

Alektinib Klinik Sonuç Çalışması

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayininin alektinib ile tedaviden fayda sağlayabilecek hastaların seçimi için bir diagnostik araç olarak klinik etkililik analizi, oral alektinibin bir açık etiketli, randomize, aktif kontrollü, çok merkezli, Faz 3 (Çalışma #BO28984) çalışmasına dayalıdır. Bu çalışmada, ALK pozitif, lokal olarak ilerlemiş veya metastatik NSCLC'li, daha önce tedavi görmemiş yetişkin hastalarda alektinib tedavisi ile krizotinib tedavisinin klinik etkililiği ve güvenliği karşılaştırılmıştır. VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini, bir merkezi test

ile bir pozitif ALK durumu gerektiren Çalışma #BO28984 uygunluğu için toplamda 1239 hastayı test etmek için BenchMark XT cihazında kullanılmıştır. Tümörleri tayinden ALK pozitif sonuçlar elde eden toplamda 303 hasta randomize edilmiştir ve etkililik için analiz edilmiştir (152 alektinib kolunda ve 151 krizotinib kolunda). Genel etkililik sonuçları Tablo 38'te özetlenmektedir. Alektinib, VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini kullanılarak seçilen hastalar için araştırmacı değerlendirmesine göre PFS'de %53 risk düşüşü (HR = 0.47, %95 CI: 0.34, 0.65; p < 0.0001) ve IRC'ye göre PFS'de %50 risk düşüşü (HR = 0.50, %95 CI: 0.36, 0.7; p < 0.0001) ile krizotinibe göre istatistiksel olarak anlamlı ve klinik olarak anlamlı bir fayda göstermiştir. Alektinib kolunda araştırmacı değerlendirmesine göre medyan PFS'ye ulaşamamıştır ve IRC değerlendirmesine göre bu değer, alektinib ve krizotinib kolları için sırasıyla 25.7 ay (%95 CI: 19.9, NE) ve 10.4 ay (%95 CI: 7.7, 14.6) olmuştur.

Tablo 38. Çalışma #BO28984'e kayıtlı hastalar için alektinib veya krizotinibin klinik faydası (ilerlemesiz sağkalm).

İlerlemesiz Sağkalm Araştırmacı değerlendirilmeli	Alektinib (N = 152)	Krizotinib (N = 151)
Medyan, ay (%95 CI) ^a	NE (%17.7, NE)	11.1 (%9.1, 13.1)
HR (%95 CI) ^b	0.47 (%0.34, 0.65)	
p değeri ^c	< 0.0001	
İlerlemesiz Sağkalm IRC değerlendirilmeli	Alektinib (N = 152)	Krizotinib (N = 151)
Medyan, ay (%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 değeri ^c	< 0.0001	

HR = tehlike oranı; CI = güven aralığı; IRC = Bağımsız İnceleme Komitesi; NE = tahmin edilemez

^a Kaplan-Meier yöntemi kullanılarak tahmin edilmiştir.

^b Tehlike oranı, IRC tarafından İrk (Asya ve Asya dışı) ve başlangıçtaki CNS metastazları (var/yok) ortak değişkenleri için sınıflandırılmış Cox regresyonu ile tahmin edilmiştir

^c Sınıflandırılmış log sıra testine dayalıdır ([b] ile aynı sınıflandırma).

Tedavi amaçlı popülasyonda (tayin ile 1239 hasta test edilmiştir) VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini için boyama kabul edilebilirliği oranları çalışma A2301 sonuçlarına benzerdir.

Lorlatinib Klinik Çalışma Sonucu

Lorlatinibin, daha önce metastatik hastalık için sistemik tedavi görmemiş, ALK pozitif NSCLC hastalarının tedavisindeki etkililiği, açık etiketli, randomize, aktif kontrollü, çok merkezli bir çalışmada (Çalışma B7461006; NCT03052608; CROWN) belirlenmiştir. Hastaların 0-2 değerinde ECOG performans durumuna ve VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile belirlendiği şekilde ALK pozitif NSCLC'ye sahip olmaları şart koşulmuştur. Leptomeningeal metastazlar dahil olmak üzere, tedavi edilmiş veya edilmemiş asemptomatik merkezi sinir sistemi (CNS) metastazları görülen nörolojik olarak stabil hastalar çalışma için uygun kabul edilmiştir.

Günde bir kez oral yoldan 100 mg lorlatinib (n = 149) veya günde iki kez oral yoldan 250 mg krizotinib (n = 147) almak üzere toplam 296 hasta 1:1 oranında randomize edilmiştir. Randomizasyon, etnik kökene (Asya / Asya dışı) ve başlangıçta CNS metastazlarının varlığı veya yokluğuna göre sınıflandırılmıştır. Her iki kolda tedavi, hastalık ilerlemesine veya kabul edilemez toksisiteye kadar sürdürülmüştür. Temel etkililik sonucu ölçütü, versiyon 1.1'e (RECIST v1.1) göre Körlenmiş Bağımsız Merkezi İnceleme (BIRC) ile belirlendiği şekilde ilerlemesiz sağkalm (PFS) olmuştur.

Çalışma sonuçları, lorlatinib kolunda krizotinib koluna göre, BIRC'ye göre hastalık ilerlemesi veya ölüm riskinde %72 düşüş (HR = 0.28; %95 CI: 0.19, 0.41; p < 0.0001; Tablo 39) ile PFS'de önemli ve istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme ortaya koymuştur. OS verileri, klinik veri eşliğinde yeterli olgunluğa ulaşmamıştır.

Başlangıçta beyin metastazı görülen veya görülmeyen katılımcılar üzerinde yapılan alt grup analizleri, birincil PFS sonucuyla tutarlı sonuçlar vermiştir. CNS'nin, tek başına veya eş zamanlı sistemik ilerleme ile, hastalık ilerlemesinin ilk bölgesi olma olasılığı, lorlatinib

kolunda (%2.7) krizotinib koluna göre (%23.8), 0.06 (%95 CI: 0.02, 0.18) değerinde nedene özgü sınıflandırılmış HR ile belirgin ölçüde daha düşük olmuştur.³⁶

Tablo 39. Çalışma B7461006'da (CROWN) Genel Etkililik Sonuçları.

İlerlemesiz Sağkalım (BICR ile Değerlendirilmiş)	Lorlatinib (N = 149)	Krizotinib (N = 147)
Olay sayısı, n (%)	41 (%27.5)	86 (%58.5)
İlerleyici hastalık, n (%)	32 (%21.5)	82 (%55.8)
Ölüm, n (%)	9 (%6.0)	4 (%2.7)
12 ayda PFS olasılığı (%95 CI) ^a	0.78 (0.70, 0.84)	0.39 (0.30, 0.48)
Tehlike oranı (%95 CI) ^b	0.28 (0.19, 0.41)	
p değeri ^c	< 0.0001	

Kısaltmalar: CI = güven aralığı; NE = tahmin edilemez; PFS = ilerlemesiz sağkalım.

^a CI'lar, orijinal ölçüğe geri dönüşüm ile log-log dönüşümü kullanılarak türetilmiştir.

^b Cox orantılı tehlike modeline dayalı olarak sınıflandırılmış tehlike oranı.

^c Sınıflandırılmış log sıra testine dayalı tek taraflı p değeri.

232 Çalışma B7461006 tarama numunesinin merkezi laboratuvarlarda VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini ile test edilmesiyle, neredeyse Çalışma A2301'de gözlemlenen değerlerle aynı olan boyama kabul edilebilirliği oranları elde edilmiştir.

SONUÇ

VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini, BenchMark IHC/ISH cihazlarında klinik ALK durumu için boyama sonuçları açısından tekrarlanabilir. İkili puanlama algoritması okuyucular arasında yüksek oranda tekrarlanabilir. Tayin ALK durumu için Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit ile uyumludur. VENTANA anti-ALK (D5F3) tayini; XALKORİ® (krizotinib), ZYKADIA® (seritinib), ALECENSA® (alektinib) veya lorlatinib ile tedaviye uygun hastaların tanımlanmasında kullanılabilir.

SORUN GİDERME

Sistem düzeyinde insan NSCLC veya apandis doku kontrollerinde veya hasta numunelerinde uygun olmayan boyama gözlenirse, BenchMark IHC/ISH cihazı için cihaz bakım prosedürlerine uyulduğundan emin olun. Hiçbir teknik sorun veya sapma bildirilmemişse, bu durumda bir tekrar çalışması gerçekleştirilmeden önce lütfen yerel destek temsilciniz ile iletişime geçin.

REFERANSLAR

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

- Yi ES, et al. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol.* 2011;6(3):459-65.
- McLeer-Florin A, et al. Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study. *J of Thorac Oncol.* 2012;7(2):348-54.
- Christensen JG, et al. Cytoreductive 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 ptiens with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose fining prtion of a phase ½ 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 broadspectrum potency against ALK-resistant mutations. *J Med Chem* 2014;57:4720-44.
- Gainor J, Dardaei L, et al. Molecular mechsansims of resistance to first and second generation ALK inhibitors in ALK-rearranged lung cancer. *Cancer Discov* 2016;6:1118-33.
- Zou H, Qiuhua L. 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.
- 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.
- 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).

NOT: Bu belgede, ondalık bir sayının tam sayı ve kesir kısımlarını ayırmak için ondalık ayırıcı olarak her zaman nokta kullanılmıştır. Binlik basamaklar için ayırıcı kullanılmamıştır.

Güvenlik ve performans özetini burada bulabilirsiniz:

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Semboller

Ventana, ISO 15223-1 standardında listelenenlere ek olarak aşağıdaki sembol ve işaretleri kullanmaktadır (ABD için: kullanılan sembollerin tanımları için dialog.rocke.com adresine bakın):



Küresel Ticari Ürün Numarası



Benzersiz Cihaz Tanımlaması



Tıbbi cihazı Avrupa Birliği'ne ithal eden kuruluşu belirtir

REVİZYON GEÇMİŞİ

Rev	Güncellemeler
B	Klinik Anlamlılık, Uyarılar ve Önlemler, Boyama Prosedürü, Boyama Yorumları/Beklenen Sonuçlar, Analitik Performans, Referanslar ve Fikri Mülkiyet bölümlerinde güncellemeler yapıldı. BenchMark ULTRA PLUS cihazı eklendi.

FİKRİ MÜLKİYET

VENTANA, BENCHMARK, OPTIVIEW ve VENTANA logosu Roche şirketinin ticari markalarıdır.

Tüm diğer ticari markalar, ilgili sahiplerinin mülkiyetindedir.

© 2022 Ventana Medical Systems, Inc.

Aşağıdaki ruhsat sahibi tarafından satılır



İLETİŞİM BİLGİLERİ



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

www.rocke.com

