

受理号：JSZ1800077

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）

产品英文（原文）名称：PD-L1 IHC 22C3 pharmDx

产品管理类别：三类

申请人名称：美国丹科北美有限公司

Dako North America, Inc.

国家药品监督管理局

医疗器械技术审评中心

目 录

基本信息.....	3
一、 申请人名称.....	3
二、 申请人住所.....	3
三、 生产地址.....	3
产品审评摘要.....	4
一、 产品概述.....	4
二、 临床前研究摘要.....	5
三、 临床评价摘要.....	21
四、 风险分析及说明书提示.....	26
综合评价意见.....	29

基本信息

一、申请人名称

美国丹科北美有限公司 Dako North America, Inc.

二、申请人住所

6392 Via Real Carpinteria, CA 93013 United States

三、生产地址

1170 Mark Ave. Carpinteria, CA 93013 United States

产品审评摘要

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

试剂盒主要组成成分见表 1。

表 1 试剂盒主要组成成分

名称	数量	描述
过氧化物酶阻断剂	1 x 34.5 mL	含有过氧化氢、去垢剂和 0.015 mol/L 叠氮化钠的缓冲溶液。
一抗：单克隆小鼠抗 PD-L1，克隆 22C3	1 x 19.5 mL	单克隆小鼠 (IgG1, kappa) 抗 PD-L1，溶于含有稳定蛋白和 0.015 mol/L 叠氮化钠的缓冲溶液中。
阴性对照试剂	1 x 15 mL	单克隆小鼠质控 IgG 抗体，溶于含有稳定蛋白和 0.015 mol/L 叠氮化钠的缓冲溶液中。
小鼠信号增强剂	1 x 34.5 mL	多克隆兔抗小鼠免疫球蛋白 (二抗)，溶于含有稳定蛋白和 0.015 mol/L 叠氮化钠的缓冲溶液中。
显色试剂-HRP	1 x 34.5 mL	偶联有过氧化物酶分子和多克隆山羊抗兔和抗小鼠免疫球蛋白二抗分子的葡聚糖，溶于含有稳定蛋白和抗菌剂的溶液。
DAB+底物缓冲液	15 x 7.2 mL	含有过氧化氢和抗菌剂的缓冲溶液。
DAB+色原	1 x 5 mL	3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐溶于有机溶剂。
DAB 增强剂	1 x 34.5 mL	硫酸铜溶液。
免疫组化抗原修复缓冲液	6 x 30 mL	pH 6.1，含有去垢剂和抗菌剂的缓冲溶液。
PD-L1 检测试剂	15 张切片	每张载玻片含有两个经福尔马林固定石蜡包

盒（免疫组织化学法）质控切片	埋的细胞系点：PD-L1 蛋白中度表达的 NCI-H226 和 PD-L1 蛋白阴性表达的 MCF-7。
----------------	--

（二）产品预期用途

本试剂盒用于定性检测中性福尔马林固定石蜡包埋（FFPE）的非小细胞肺癌（NSCLC）组织中的 PD-L1 蛋白，辅助鉴别可使用 KEYTRUDA®（pembrolizumab 帕博利珠单抗）治疗的 NSCLC 患者。

（三）产品包装规格

50 测试/盒

（四）产品检验原理

本试剂盒包括使用组织染色机（Autostainer Link 48）完成 FFPE 标本的免疫组织化学（IHC）染色操作所需的优化试剂和染色程序。使用 PD-L1 单克隆抗体或者阴性对照试剂与标本共同孵育后，依次用宿主一抗的特异性连接抗体和即用型显色试剂（含偶联到葡聚糖聚合物骨架上的二抗分子和辣根过氧化物酶分子）进行孵育。酶催化随后加入的色原，使之在抗原部位生成可见沉积物。通过显色增强剂改良显色反应的颜色。然后，对标本进行复染并封片。使用光学显微镜判读。

二、临床前研究摘要

（一）主要原材料

1. 主要原材料的选择

本产品的主要原材料包括：一抗、阴性对照试剂、小鼠信号增强剂、显色试剂-HRP、质控切片、牛血清白蛋白。

一抗、小鼠信号增强剂以及显色试剂-HRP 均为申请人自制，并通过免疫组化验证。质控切片所用细胞系是从ATCC资源中心获得，经申请人进行培养生产，通过免疫组化验证后获得。阴性对照试剂以及牛血清白蛋白为外购方式获得。申请人选择有资质的供应商提供的原料，并结合原料的特性，通过功能性试验，确定原材料供应商。制定了各主要原材料质量标准并经检验合格。

2. 质控设置情况

针对 NSCLC 预期用途，本试剂盒采用 NSCLC 阳性样本进行企业内部质控（Post QC），包括肿瘤比例评分（TPS）1-25%和 TPS 50-75%两份样本。对于生产批次和参考批次，PD-L1 表达<25%的阳性 NSCLC 标本必须表现出 $\leq 12\%$ 的变异性，而 PD-L1 表达 $\geq 25\%$ 的阳性 NSCLC 标本必须表现出 $\leq 17\%$ 的变异性。对于生产批次和参考批次，阳性 NSCLC 标本肿瘤细胞必须显示出相当的染色强度且变异性 ≤ 0.5 。

本产品于说明书中推荐了质量控制方案，并提供了由中度表达和阴性表达两个点组成的细胞系质控切片，用于监控染色

过程。同时也提供了阴性对照试剂：通过使用阴性对照试剂代替抗体试剂，确保染色过程的特异性。

（二）生产工艺及反应体系研究

申请人通过对试剂主要生产工艺的研究，确定了最佳生产工艺。

申请人对反应体系中的预处理时间、抗原修复液 pH、抗原修复温度、抗原修复时间、内源性过氧化物酶阻断时间、一抗孵育温度及时间、信号增强剂孵育时间、显色试剂孵育时间、DAB 增强剂孵育时间、苏木素孵育时间等条件进行筛选和优化，通过参数测试的可行性研究，确定了最佳的反应体系。

（三）分析性能评估

本产品分析性能评估内容包括：灵敏度，免疫反应性、特异性（特异性和交叉反应）、精密度、稳健性和外部重复性。

1. 灵敏度研究：

申请人检测了 127 例独立病例（ I-IV 期非小细胞肺癌 FFPE 标本），用以评估 PD-L1 的表达情况。结果显示：阳性肿瘤细胞染色范围为 0-100%，染色强度为 0-3。TPS \geq 1%时，阳性率为 43%。

2. 免疫反应性研究：

在正常组织免疫反应性研究中，申请人检测了 30 种正常组

织的免疫反应性。在免疫细胞和上皮来源的细胞中观察到膜染色。在一些细胞类型中观察到胞浆染色，但没有记录为阳性染色。在检测的细胞类型或者组织类型中没有观察到超出预期的结果。对于正常组织中的 PD-L1 IHC 表达，观察到的染色与文献报道一致。

30 种正常组织的免疫反应性总结如下表 2 所示。

表 2 正常组织反应性总结

组织类型(检测数量)	阳性膜染色：组织成分	阳性胞浆染色：组织成分	非特异性染色
肾上腺 (3)	0/3	1/3骨髓细胞	0/3
膀胱 (3)	0/3	0/3	0/3
骨髓 (3)	3/3巨核细胞	3/3巨核细胞	0/3
乳腺 (3)	0/3	0/3	0/3
小脑 (3)	0/3	0/3	0/3
大脑 (3)	0/3	0/3	0/3
子宫颈 (3)	1/3上皮细胞	0/3	0/3
结肠 (3)	2/3巨噬细胞	0/3	0/3
食道 (3)	0/3	0/3	0/3
肾脏 (3)	1/3肾小管上皮细胞	0/3	0/3
肝脏 (3)	1/3巨噬细胞 1/3肝细胞	0/3	0/3
肺 (3)	3/3肺泡巨噬细胞	0/3	0/3
间皮细胞 (3)	0/3	0/3	0/3
心肌 (3)	0/3	0/3	0/3
骨骼肌 (3)	0/3	0/3	0/3
外周神经 (3)	0/3	1/3结缔组织 / 血管	0/3
卵巢 (3)	0/3	0/3	0/3
胰腺 (3)	0/3	0/3	0/3
甲状旁腺 (3)	1/3腺上皮	0/3	0/3

组织类型(检测数量)	阳性膜染色: 组织成分	阳性胞浆染色: 组织成分	非特异性染色
脑垂体 (3)	1/3垂体前 1/3垂体后	1/3垂体前 1/3垂体后	0/3
前列腺 (3)	3/3上皮细胞	0/3	0/3
唾液腺 (3)	0/3	0/3	0/3
皮肤 (3)	0/3	0/3	0/3
小肠 (3)	0/3	0/3	0/3
脾脏 (3)	2/3巨噬细胞	0/3	0/3
胃 (3)	2/3淋巴细胞 1/3胃腺	1/3胃腺	0/3
睾丸 (3)	0/3	0/3	0/3
胸腺 (3)	3/3髓质上皮细胞	0/3	0/3
甲状腺 (3)	0/3	0/3	0/3
扁桃体 (3)	3/3隐窝上皮 2/3生发中心(巨噬细胞)	0/3	0/3
子宫 (3)	0/3	0/3	0/3

在肿瘤组织免疫反应性研究中, 申请人用 3 个组织芯片对 159 个样本进行了检测。在免疫细胞和上皮来源的细胞上观察到膜染色。在一些细胞类型中观察到胞浆染色, 但没有记录为阳性染色。在检测的肿瘤标本中没有观察到超出预期的结果。对于肿瘤组织中的 PD-L1 IHC 表达, 观察到的染色与文献报道一致。

肿瘤组织的免疫反应性总结如下表 3 所示。

表 3 肿瘤组织反应性总结

肿瘤类型	位置	PD-L1 阳性 / 总计 N=159
腺癌	阑尾	0/1
	乳腺, DCIS	0/2
	乳腺, 浸润性导管	0/7
	乳腺, 浸润性导管转移至淋巴结	0/1
	宫颈, 子宫颈内类型	0/1
	结肠	0/5
	结肠, 转移至肝脏	0/1
	结肠, 黏液性	0/1
	食管	0/1
	胆囊	1/5
	胃肠, 转移至肺	0/1
	头和颈, 硬腭	0/1
	肺	1/4
	卵巢	0/1
	卵巢, 子宫内膜样	0/1
	卵巢, 黏液性	0/1
	卵巢, 浆液性	0/1
	胰腺	0/2
	胰腺, 导管	0/3
	前列腺	0/5
	直肠	0/4
	唾液腺 / 腮腺	0/2
	小肠	0/2
	胃	0/6
	胃, 黏液性	0/1
	甲状腺, 滤泡	0/1
	甲状腺, 滤泡-乳头状	0/1
	甲状腺, 乳头状	0/3
	子宫, 透明细胞	0/1
	子宫, 子宫内膜	0/3
肾上腺皮质癌	肾上腺	0/1
星形细胞瘤	大脑	0/3
基底细胞癌	皮肤	0/1
癌	鼻咽, NPC	0/1
软骨肉瘤	骨骼	0/1
脊索瘤	盆腔	0/1

肿瘤类型	位置	PD-L1 阳性 / 总计 N=159
胚胎性癌	睾丸	0/1
室管膜细胞瘤	脑	0/1
胶质母细胞瘤	脑	0/1
肝母细胞瘤	肝脏	0/1
肝细胞癌	肝脏	0/5
胰岛细胞瘤	胰腺	0/1
间质瘤	结肠	0/1
	直肠	0/1
	小肠	0/1
平滑肌肉瘤	软组织, 胸壁	0/1
	膀胱	0/1
淋巴瘤		
间变性大细胞	淋巴结	0/1
弥漫性B细胞	淋巴结	0/4
霍奇金	淋巴结	2/2
非霍奇金	淋巴结	1/1
髓母细胞瘤	脑	0/1
髓样癌	甲状腺	0/1
黑色素瘤	直肠	0/1
	鼻腔	0/1
脑膜瘤	脑	0/2
间皮瘤	腹膜	0/1
神经母细胞瘤	腹膜后腔	0/1
神经纤维瘤	软组织, 下背部	0/1
骨肉瘤	骨骼	0/2
嗜铬细胞瘤	肾上腺	0/1
原始神经外胚层肿瘤 (PNET)	腹膜后腔	0/1
肾细胞癌		
乳头状	肾脏	0/1
透明细胞	肾脏	0/6
横纹肌肉瘤	软组织, 胚胎	0/1
	前列腺	0/1
	腹膜后腔	0/1
精原细胞瘤	睾丸	0/2
印戒细胞癌	结肠印戒细胞癌转移至卵巢	0/1
	结肠	0/1
小细胞癌	肺	0/1

肿瘤类型	位置	PD-L1 阳性 / 总计 N=159
鳞状细胞癌	食管鳞状上皮细胞癌转移至淋巴结	0/1
	子宫颈	2/5
	食管	0/7
	头和颈	0/2
	肺	1/2
	皮肤	0/2
	子宫	0/1
滑膜肉瘤	盆腔	0/1
胸腺瘤	纵隔	1/1
移行细胞癌	膀胱	0/6
	肾脏	0/1

3. 特异性研究:

申请人使用不同浓度的纯化 PD-L1 对肿瘤细胞裂解物 (NCI-H226、MCF7) 进行免疫印迹分析 (Western Blot analysis, WB)。结果表明单克隆抗 PD-L1 (克隆 22C3) 可检测免疫印迹中的纯化 PD-L1 蛋白, 对细胞裂解物中其他蛋白的交叉反应性较低。

PD-L2 的交叉反应性研究的目的是评价单克隆抗 PD-L1 (克隆 22C3) 对 PD-L1 的选择性, 并评估与 PD-L2 交叉反应性的可能性。基于细胞结合试验, 过表达人类 PD-L1 细胞标记抗 PD-L1, 克隆 22C3, 过表达人类 PD-L2 的细胞未标记抗 PD-L1, 克隆 22C3, 这些结果表明单克隆抗 PD-L1 (克隆 22C3) 对人类 PD-L1 具有特异性。

4. 精密性研究:

申请人采用三批试剂盒进行了批间检测，采用一批试剂盒分别进行仪器间和批内、操作员间、日间、同一轮检测内、日内的检测。采用 bootstrap 法计算平均阴性百分比一致率 (ANA)、平均阳性百分比一致率 (APA) 和总体一致率 (OA)，双侧 95% 置信区间。对于一致性结果为 100% 的研究，采用 Wilson Score 法计算 $TPS \geq 1\%$ 和 $TPS \geq 50\%$ 临界值的阴性百分比一致率 (NPA)、阳性百分比一致率 (PPA) 和总体一致率 (OA)，双侧 95% 置信区间。结果显示，当 $TPS \geq 1\%$ 和 $TPS \geq 50\%$ 时，仪器间/批内、操作员间、日间、批间、同一轮检测内，符合 NSCLC 验收标准。下表 4、表 5 显示了精密度研究的一致率。

表 4 同一个场所检测的精密度 ($TPS \geq 1\%$)

精密度研究	诊断临界值	研究设计	一致率 (95% CI)
不同仪器之间	$TPS \geq 1\%$	分别在六台组织染色机 (Autostainer Link 48) 上对 24 例不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本 (12 例 PD-L1 阴性和 12 例 PD-L1 阳性) 进行检测。	NPA 100% (94.0-100%) PPA 100% (94.0-100%) OA 100% (96.9-100%)
不同操作员之间	$TPS \geq 1\%$	六个操作员在同一台组织染色机 (Autostainer Link 48) 上对 24 例不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本 (12 例 PD-L1 阴性和 12 例 PD-L1 阳性) 进行检测。	NPA 100% (93.9-100%) PPA 100% (94.0-100%) OA 100% (96.9-100%)
不同天之间	$TPS \geq 1\%$	在非连续六天中，在组织染色机 (Autostainer Link 48) 上对 24 例不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本 (12 例 PD-L1 阴性和 12 例 PD-L1 阳	NPA 100% (94.0-100%) PPA 100% (94.0-100%) OA 100% (96.9-100%)

精密度研究	诊断临界值	研究设计	一致率 (95% CI)
不同批次间	TPS ≥ 1%	性) 进行检测。 使用三个批次试剂分别在组织染色机 (Autostainer Link 48) 上对24例不同程度PD-L1 IHC表达的NSCLC标本 (13例PD-L1阴性和11例PD-L1阳性) 进行检测, 在每批次检测中, 每例重复检测3次。	ANA 98.3% (95.9-100%) APA 97.9% (94.6-100%) OA 98.1% (95.3-100%)
同一轮检测内 (重复性)	TPS ≥ 1%	对24例不同程度PD-L1 IHC表达的NSCLC标本 (12例PD-L1阴性和12例PD-L1阳性) 在组织染色机 (Autostainer Link 48) 上进行检测, 每一例在同一轮中重复检测6次。	NPA 100% (94.0-100%) PPA 100% (93.8-100%) OA 100% (96.8-100%)

表 5 同一个场所检测的精密度 (TPS ≥ 50%)

精密度研究	诊断临界值	研究设计	一致率 (95% CI)
不同仪器之间	TPS ≥ 50%	分别在六台组织染色机 (Autostainer Link 48) 上对16例不同程度PD-L1 IHC表达的NSCLC标本 (10例PD-L1阴性和6例PD-L1阳性) 进行检测。	NPA 100% (92.9-100%) PPA 100% (88.6-100%) OA 100% (95.4-100%)
不同操作员之间	TPS ≥ 50%	六个操作员在同一台组织染色机 (Autostainer Link 48) 上对16例不同程度PD-L1 IHC表达的NSCLC标本 (10例PD-L1阴性和6例PD-L1阳性) 进行检测。	NPA 100% (92.7-100%) PPA 100% (88.6-100%) OA 100% (95.4-100%)
不同天之间	TPS ≥ 50%	在非连续六天中, 在组织染色机 (Autostainer Link 48) 上对16例不同程度PD-L1 IHC表达的NSCLC标本 (10例PD-L1阴性和6例PD-L1阳性) 进行检测。	NPA 100% (92.9-100%) PPA 100% (88.6-100%) OA 100% (95.4-100%)

精密度研究	诊断临界值	研究设计	一致率 (95% CI)
不同批次间	TPS ≥ 50%	使用三个批次试剂分别在组织染色机 (Autostainer Link 48) 上对16例不同程度PD-L1 IHC表达的NSCLC标本 (8例PD-L1阴性和8例PD-L1阳性) 进行检测, 在每批次检测中, 每例重复检测3次。	NPA 100% (92.6-100%) PPA 100% (92.6-100%) OA 100% (96.2-100%)
同一轮检测内 (重复性)	TPS ≥ 50%	对16例不同程度PD-L1 IHC表达的NSCLC标本 (10例PD-L1阴性和6例PD-L1阳性) 在组织染色机 (Autostainer Link 48) 上进行检测, 每一例在同一轮中重复检测6次。	NPA 100% (92.9-100%) PPA 100% (88.6-100%) OA 100% (95.4-100%)
日内	TPS ≥ 50%	对16例不同程度PD-L1 IHC表达的NSCLC标本 (10例PD-L1阴性和6例PD-L1阳性) 在组织染色机 (Autostainer Link 48) 上进行检测, 同一天内检测两轮, 重复检测三天。	NPA 100% (88.3-100%) PPA 100% (82.4-100%) OA 100% (92.4-100%)

5. 稳健性研究:

申请人使用一个批次试剂盒, 当 $TPS \geq 1\%$ 时, 对 24 例 NSCLC 标本进行稳健性检测。检测包括组织切片厚度、显微镜用载玻片类型、抗原修复时间、抗原修复温度、抗原修复液 pH 值、抗原修复液重复使用率。采用 bootstrap 法计算 ANA、APA 和总体一致率 OA, 双侧 95% 置信区间。对于一致性结果为 100% 的研究, 采用 Wilson Score 法计算 $TPS \geq 1\%$ 临界值的 NPA、PPA 和 OA, 双侧 95% 置信区间。结果表明, $TPS \geq 1\%$ 时, 组织切片厚度、显微镜用载玻片类型、抗原修复时间、抗原修复温度、

抗原修复液 TRS pH 值、抗原修复液重复使用，符合 NSCLC 验收标准。下表 6 显示了稳健性条件。

表 6 稳健性条件列表

检测项目	检测条件
组织切片厚度	调整组织切片厚度，证明试剂盒对NSCLC标本的检测结果具有一致性：4 μm（最佳）、3 μm和5 μm。
PT Link时间	调整PT Link孵育时间，证明试剂盒对NSCLC标本的检测结果具有一致性：在方案规定温度97℃下，20分钟（最佳）、18分钟和22分钟。
PT Link温度	调整PT Link孵育温度，证明试剂盒对NSCLC标本的检测结果具有一致性：在最佳孵育时间20分钟下，97℃（最佳）、95℃和99℃。
抗原修复液（TRS）pH值	调整抗原修复液pH值，证明试剂盒对NSCLC标本的检测结果具有一致性：pH 6.1（最佳）、pH 5.8和pH 6.4。
TRS重复使用	调整抗原修复液重复使用次数，证明试剂盒对NSCLC标本的检测结果具有一致性：新鲜使用与第2次使用与第三次使用。

6. 外部重复性：

本研究采用随机盲法设计，使用消除识别信息的 NSCLC 剩余样本，在三个外部检测实验室进行检测以确定外部重复性。研究包括两部分，研究部分 A：3 个实验室使用同一批次试剂盒分别在 1 天内分 2 轮对 46 份 NSCLC 样本（1%和 50%的临界值各 36 例样本）进行染色。各实验室由一名操作员负责染色，每个实验室重复进行 5 次染色（5 次染色在非连续 5 天进行），整个染色过程在至少 20 天完成。每个实验室由一名观察者负责读片（相同的切片读片时，读片间隔时间需有超过 3 天的清除期，

以消除读片记忆)。研究部分 B: 在 3 个检测实验室分别由 1 名观察者对已经染色的 78 份 NSCLC 样本 (1%和 50%的临界值, 各 62 例样本) 组织切片读片 3 次 (相同的切片读片时, 读片间隔时间需有超过 3 天的清除期, 以消除读片记忆)。采用 bootstrap 方法计算 $TPS \geq 1\%$ 临界值和 $TPS \geq 50\%$ 临界值时的 ANA、APA、OA。结果见表 7 和表 8。

表 7 三个外部场所检测的重复性 ($TPS \geq 1\%$)

重复性研究	诊断临界值	研究设计	一致率% (95% CI)
不同场所之间	$TPS \geq 1\%$	分别在非连续五天中对 36 例不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本 (16 例 PD-L1 阴性和 20 例 PD-L1 阳性) 进行检测。对三个不同场所的场所间分析, 共进行 2700 对配对比较。	ANA 94.8% (90.3-98.4%) APA 95.5% (91.2-98.7%) OA 95.2% (90.8-98.6%)
同一场所内	$TPS \geq 1\%$	分别在非连续五天中, 在三个研究场所对 36 例不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本 (16 例 PD-L1 阴性和 20 例 PD-L1 阳性) 进行检测。对三个不同场所的场所内分析, 共进行 1080 对配对比较。	ANA 96.2% (94.1-97.5%) APA 96.7% (95.0-97.9%) OA 96.5% (95.2-97.4%)
不同观察者之间	$TPS \geq 1\%$	对 62 例经 PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 染色的不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本 (28 例 PD-L1 阴性和 34 例 PD-L1 阳性) 进行评分, 评分由分别来自三个研究场所的三位病理医生在非连续三天中进行。对三个不同场所的不	ANA 85.8% (79.3-91.8%) APA 88.2% (82.2-93.3%) OA 87.1% (81.0-92.6%)

重复性研究	诊断临界值	研究设计	一致率% (95% CI)
		同观察者间分析, 共进行1674对配对比较。	
同一观察者内	TPS \geq 1%	对62例经PD-L1检测试剂盒(免疫组织化学法)染色的不同程度PD-L1 IHC表达的NSCLC标本(28例PD-L1阴性和34例PD-L1阳性)进行评分, 评分由分别来自三个研究场所的三位病理医生在非连续三天中进行。对三个不同场所的观察者内分析, 共进行558对配对比较。	ANA93.7% (90.0-96.1%) APA94.8% (91.6-96.7%) OA 94.3% (92.0-95.9%)

表 8 三个外部场所检测的重复性 (TPS \geq 50%)

重复性研究	诊断临界值	研究设计	一致率% (95% CI)
不同场所之间	TPS \geq 50%	分别在非连续五天中对36例不同程度PD-L1 IHC表达的NSCLC标本(21例PD-L1阴性和15例PD-L1阳性)进行检测。对三个不同场所的场所间分析, 共进行2700对配对比较。	ANA90.3% (84.4-95.2%) APA85.2% (75.6-92.9%) OA 88.3% (81.4-94.3%)
同一场所内	TPS \geq 50%	分别在非连续五天中, 在三个研究场所对36例不同程度PD-L1 IHC表达的NSCLC标本(21例PD-L1阴性和15例PD-L1阳性)进行检测。对三个不同场所的场所内分析, 共进行1080对配对比较。	ANA91.9% (88.8-94.8%) APA87.6% (82.5-92.2%) OA 90.2% (86.3-93.7%)
不同观察者之间	TPS \geq 50%	对62例经PD-L1检测试剂盒(免疫组织化学法)染色的不同程度PD-L1 IHC表达的NSCLC标本(30例PD-L1阴性和32例PD-L1阳性)进行评分, 评分由分别来自三个研究场所的三位病理医生在非连续三天中进行。对三个不同场所的不同观察者间	ANA92.6% (87.8-96.7%) APA92.8% (88.1-96.8%) OA 92.7% (88.1-96.8%)

重复性研究	诊断临界值	研究设计	一致率% (95% CI)
		分析, 共进行1674对配对比较。	
同一观察者内	TPS ≥ 50%	对62例经PD-L1检测试剂盒(免疫组织化学法)染色的不同程度PD-L1 IHC表达的NSCLC标本(30例PD-L1阴性和32例PD-L1阳性)进行评分, 评分由分别来自三个研究场所的三位病理医生在非连续三天中进行。对三个不同场所的观察者内分析, 共进行558对配对比较。	ANA96.4% (94.0-98.5%) APA96.5% (94.3-98.6%) OA96.4% (94.3-98.6%)

7. 申请人提交了2018年北欧免疫组化质量控制机构 NordiQC 进行的伴随模块 C3 评估。146 间实验室参与了此次评估, 本试剂盒总体通过率为 89% (31/35), 在 CE IVD/FDA 批准的商用试剂盒组中, 评分结果优异。

(四) 阳性判断值或参考区间研究

临界值依据 KEYNOTE-001 确定。KEYNOTE-001 是一项在具有进展性局部晚期或者转移性癌症, 主要为黑色素瘤或者 NSCLC 受试者中进行的多中心、开放标签、I 期试验。KEYNOTE-001 临床受试者分成两个互相独立的子集, 以便两个子集中没有一例受试者会出现重叠。一个子集用作训练子集, 用于开发评分方法和定义临界值, 下文称为生物标志物训练子集。另一个单独的子集用于验证临界值, 确认该 PD-L1 表达组中帕博利珠单抗的疗效。

来源于 KEYNOTE-001 中的生物标志物训练子集中共有 146

例 NSCLC 受试者用于评价 PD-L1 试剂盒评分和临界值，使用多种潜在的评分方法实施使用受试者特征曲线分析（ROC）进行的评分和解释。为了最大限度地确认帕博利珠单抗缓解患者，最终选择 $TPS \geq 1\%$ 的临界值，因为这是可以重复且准确地染色和评分的最低临界值。

在 KEYNOTE-042 研究中，使用 $TPS \geq 1\%$ 作为受试者入选临界值，以总生存期为主要终点，比较了帕博利珠单抗单药疗法与标准护理化疗对 NSCLC 患者的效果。研究结果显示，帕博利珠单抗相对于化疗显著改善了总生存期。

综合以上研究确认，如果肿瘤细胞呈现出任意强度的膜染色且 $TPS \geq 1\%$ ，则应判定标本存在 PD-L1 表达。

（五）稳定性研究

申请人对试剂盒的稳定性研究包括实时稳定性，使用/机载稳定性和工作稳定性研究。同时也对切片稳定性进行了研究。

实时稳定性：使用三批 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 避光保存的试剂盒，分别在第 0、6、12、14 个月取出检测不同样本，包括阳性组织块，阴性组织块，临界值附近的组织块，结果符合接收标准。因此确定申报产品的货架稳定性为： $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 避光保存，有效期 10 个月。

使用/机载稳定性：将运输模拟结束后，一个批次的试剂盒进行使用中/机载稳定性研究。每个试剂盒可使用15次。进行使用/机载稳定性时，将此批次的所有待测试剂盒转移到室温下放置至少6个小时，重复16次（使用总次数外加一次循环）。结果显示可循环16次。

工作液稳定性：对一批试剂盒进行DAB底物-显色液和抗原修复液的工作/再使用稳定性试验。结果显示：DAB底物-显色液在2℃~8℃避光保存，可保存5天；抗原修复液在PT Link中进行脱蜡、水化和抗原修复（三合一）操作，最多使用3次，室温下可保存5天。

实时切片稳定性：对NSCLC组织切片中PD-L1在室温和2℃~8℃的切片稳定性进行了评价。结果表明，切片存储在室温和2℃~8℃长达6个月的条件下，染色结果和质控相当。PD-L1信号在12个月时均出现下降。基于实时检测结果，NSCLC组织切片应在切片后6个月内染色。

三、临床评价摘要

本产品为伴随诊断试剂，是Dako与Merck共同开发的产品。本次申请提交的临床试验，即为共同开发的临床试验包括KEYNOTE-042国际多中心临床试验及国内扩展临床试验。申请人另外提供了中国境内完成的该试剂与Ventana公司生产的

PD-L1 (SP263) 试剂的比较研究试验。以及国内病理医生读片一致性研究。

1. KEYNOTE-042

KEYNOTE-042 是一项对帕博利珠单抗与含铂化疗进行比较的 III 期、多中心、国际、随机、开放性、对照临床研究，该研究在患有晚期/转移性 TPS $\geq 1\%$ NSCLC 且不携带 EGFR 突变或 ALK 变异的既往未接受过治疗的成人受试者中进行。在随机化之前，按 ECOG PS 评分 (0 与 1)、组织学 (鳞状与非鳞状)、入组研究中心的地理区域 (东亚与非东亚) 和 PD-L1 表达 (TPS $\geq 50\%$ 与 TPS 1-49%) 对受试者进行分层。受试者按 1:1 的比例被随机化至接受帕博利珠单抗治疗或接受在随机化前由研究者选择含铂化疗方案。

KEYNOTE-042 研究筛选了来自全球研究的总共 3428 例受试者，3019 例具有可评估的 PD-L1 表达的肿瘤样本，1977 例 (65.5%) 为 PD-L1 TPS $\geq 1\%$ 。最终，共有 1275 例 TPS $\geq 1\%$ 的受试者在全球研究中接受随机化，1274 例被纳入意向性治疗 (ITT) 人群 (一名在随机前死亡的受试者被错误随机)。

KEYNOTE-042 全球研究中 (n=1274)，TPS $\geq 50\%$ 人群 (HR 0.69; 95% CI 0.56-0.85; p=0.0003) 帕博利珠单抗和化疗组的中位 OS 分别为 20.0 和 12.2 个月。TPS $\geq 1\%$ 人群 (HR

0.81; 95% CI 0.71-0.93; $p=0.0018$) 中帕博利珠单抗和化疗组的中位 OS 分别为 16.7 个月和 12.1 个月。帕博利珠单抗相对于化疗显著改善了总生存期。

KEYNOTE-042 研究共筛选了 745 例中国受试者, 其中 682 例具有可评估的 PD-L1 表达的肿瘤样本, 395 例 (57.9%) 受试者的 PD-L1 TPS $\geq 1\%$ 。中国受试者中 PD-L1 表达与世界其他地区的受试者相似。最终, 在 KEYNOTE-042 中, 共有 262 例 TPS $\geq 1\%$ 的 NSCLC 中国受试者 (包括全球研究和扩展研究) 接受随机化, 并被纳入所有疗效分析的数据集中。KEYNOTE-042 中国扩展研究与全球研究的研究设计和研究实施一致。扩展研究的目的是评价中国亚群与全球人群在疗效和安全性方面的一致性。在 KEYNOTE-042 所有中国受试者的 TPS $\geq 50\%$ 人群和 TPS $\geq 1\%$ 人群中, 帕博利珠单抗相对于化疗显著改善了总生存期, 该结果和全球数据保持一致。

2. 比较研究试验:

申请人在中国医学科学院北京协和医院、中国医学科学院肿瘤医院和复旦大学附属肿瘤医院, 共入组 1053 例有效样本 (包括 NSCLC, 其它癌旁组织和良性疾病或恶性肿瘤), 与 Ventana 公司生产的 PD-L1 (SP263) 试剂检测结果进行比较研究试验, 结果显示, 阳性符合率为 99.20%, 阴性符合率为

89.71%，总符合率为 97.63%，Kappa 值为 0.9121。95%置信区间为(0.8782, 0.9461)。同时对 749 例 NSCLC 样本，按照 TPS 1%进行分析，阳性符合率为 97.38%，阴性符合率为 90.39%，总符合率为 93.59%，Kappa 值为 0.8718，95%置信区间为 (0.8368, 0.9068)。

3. 国内病理医生读片一致性研究：

申请人通过对上述比较研究试验过程中，病理医生培训、再次培训、环形比对试验和比较研究试验中部分样本的不同病理医生读片数据，进行分析总结，形成国内病理医生读片一致性分析报告。

3.1 病理医生培训：本次参与国内临床试验读片的病理医生均按统一方案接受了规范化培训，使其能准确地对染色样本进行评分。来自上述 3 家医院的 12 名病理医生经过培训，对 30 个不同病例进行评分，其中第 1 天，对 20 个 NSCLC 病例进行评分。第 2 天，对 25 个病例进行评分（10 个新病例，15 个第 1 天已经评分后，第 2 天再次评分）。结果表明病理医生不论资历深浅，观察员间和观察员内的评分结果具有良好的重现性（ $\geq 85\%$ 的一致性）。

3.2 再次培训：由于最初的 8 名病理医生，距离培训时间超过了三个月，临床试验前经过再次培训，以证明在培训和开

始研究之间的时间内，病理医生保持了评分的熟练度。从最初测试组选出 15 个的不同样本，重新评分。无论经验如何，8 名病理医生均证实了具备对 PD-L1 染色评估和准确评分的能力。对于 1%和 50%临界值，研究中心间和研究中心内评分的总体一致率均为 98.3%，这表明中国病理医生之间的评分具有良好的重现性。

3.3 环形比对试验：使用来自 3 家医院的 19 个不同 NSCLC 样本，涵盖 PD-L1 不同的 TPS 范围。3 家医院均对切片设盲，按照产品说明书进行染色和读片。所有 3 家医院 1%和 50%临界值的总体一致性分别为 100%和 98.2%。数据表明研究中心间具有极好的重现性。

3.4 比较研究试验中不同病理医生对同一样本读片一致性：试验过程中病理医生遇到难以评分的样本，由第二名病理医生读片。来源于 3 家医院的 125 份样本分别在各自医院再次读片，其中 51 例在 TPS 1%附近（TPS 0-10%），40 例在 TPS 50%附近（TPS 40-60%）。3 家医院共 11 名病理医生对 125 例样本读片，每个样本有 2 个病理医生的读片结果。数据基于最具挑战性的样本（临界值附近的样本）上分析得出，对于 TPS 1%和 TPS 50%临界值，结果总体一致性分别为 95.2%和 98.4%，证实了观察员间重现性良好。

综上所述，该产品临床试验资料对产品的临床性能进行了较全面研究，临床试验符合要求。

四、风险分析及说明书提示

参照“ISO 14971:2012 医疗器械风险管理对医疗器械的应用”标准，对本产品进行风险分析。经综合评价，本产品的受益和风险总结如下：

本产品检测结果会受到组织类型、组织固定、切片制备、切片储存条件等因素影响，同时也受到实验操作、染色评分与判读等限制，导致可能得出假阳性或假阴性的检测结果。使用者须了解检测过程中可能存在的潜在风险及检测方法的局限性。

本试剂盒用于（体外）定性检测中性福尔马林固定石蜡包埋（FFPE）的非小细胞肺癌（NSCLC）组织中的PD-L1蛋白。不合理的组织类型（如细针穿刺组织、脱钙组织）、非推荐的组织固定、不正确的切片储存以及用不满足说明书中【样本要求】的组织进行检测，会导致假阳性或假阴性结果，请严格按照产品说明书中【样本要求】及【检验方法】的要求操作。

免疫组化是一个多步骤的诊断过程，在适当试剂的选择，组织选择，组织固定，组织处理，免疫组化切片的制备以及染色结果的判读等方面都需要专门的培训。临床判定任何阳性染

色的存在或缺失，必须参考临床表现、形态学和其它组织病理学标准进行评估。临床判定任何染色的存在或缺失，必须有形态学研究和合适的对照，以及其它的诊断结果作为补充。应由熟悉所用抗体、试剂和方法的合格病理医生来判读染色切片。染色必须在经过认证许可的实验室中，在病理医生的监督下进行，此病理医生要评估染色切片，并确保阳性和阴性质控染色恰当。乙肝病毒感染者组织中含乙型肝炎病毒表面抗原（HBsAg），可能对辣根过氧化物酶表现出非特异性染色。由于蛋白或底物反应产物的非免疫结合，可能观察到假阳性结果。伪过氧化物酶活性（红细胞）和内源过氧化物酶活性（细胞色素C）也是可能的错误产生原因。

本产品基于组织染色机（Autostainer Link 48）平台，检测过程主要包括试剂准备，脱蜡、水化和抗原修复，染色、复染、封片及结果判读步骤。为确保检测全流程的质量得到有效控制，在产品的设计开发阶段对脱蜡、水化和抗原修复、染色步骤进行了全流程验证，为了确保检测结果的可靠性，请使用本产品配套使用的免疫组化预处理系统（PT Link）、推荐的材料及组织染色机（Autostainer Link 48）进行检测。

通过环境控制、生产监控、成品检验和增加说明书警示内容等防范措施，对该产品的已知和可预见的安全风险进行控制

和降低，剩余风险可以被控制在验收准则规定的可接受范围内，同时没有带来新的危害与安全风险。在目前认知水平上，认为该产品上市带来的获益/受益大于风险。

尽管目前认为该产品的受益大于风险，但为保证用械安全，基于对主要剩余风险的防控，已在产品说明书中介绍了该产品检验方法的局限性及使用中的注意事项。

综合评价意见

本申报项目为境外第三类体外诊断试剂产品注册，属于优先审批项目（编号：20180028）。申请人的注册申报资料符合现行要求，依据《医疗器械监督管理条例》（国务院令 第 680 号）、《体外诊断试剂注册管理办法》（国家食品药品监督管理总局令 2014 年第 5 号）等相关医疗器械法规与配套规章，经系统评价后，建议准予注册。申请人在该产品上市后应继续对重复性进行验证。请在至少三家临床机构完成，各机构对本机构 NSCLC 样本进行染色和判读，染色后切片在各家医院间进行环形比对研究。验证不同临床试验机构间、同一临床试验机构内、不同资历阅片者间、同一阅片者，对不同特征临床样本判读结果重复性。样本应当包括阴性、TPS 1%附近、阳性的病例。上述内容，作为临床补充资料在产品下一次延续注册时提交。该项临床资料应由出具数据的各临床试验机构签章。

2019 年 8 月 14 日

附件：产品说明书

附件:

PD-L1检测试剂盒（免疫组织化学法） 说明书

【产品名称】

通用名称：PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）

英文名称：PD-L1 IHC 22C3 pharmDx

【包装规格】

50 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定性检测中性福尔马林固定石蜡包埋（FFPE）的非小细胞肺癌（NSCLC）组织中的 PD-L1 蛋白，辅助鉴别可使用 KEYTRUDA®（pembrolizumab 帕博利珠单抗）治疗的 NSCLC 患者。

欲了解特定临床环境下的用药治疗及 PD-L1 检测使用指导，请参阅 KEYTRUDA®产品说明书。

PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）是一种含有小鼠抗 PD-L1（克隆号 22C3）单克隆抗体，应用于组织染色机(Autostainer Link 48)平台配套 EnVision FLEX 显色系统的免疫组化检测试剂盒。NSCLC 中 PD-L1 蛋白的表达水平由肿瘤比例评分（TPS）来确定，即任意强度下，部分或完全膜染色的活的肿瘤细胞的百分比。如果 $TPS \geq 1\%$ ，则认为该样本存在 PD-L1 表达。

供体外诊断使用。

PD-1 配体（PD-L1 和 PD-L2）可与 T 细胞表面受体 PD-1 结合，从而抑制 T 细胞的增殖和细胞因子的产生。一些肿瘤细胞中会出现 PD-1 配体表达上调，通过此通路的信号可抑制活性 T 细胞对肿瘤细胞的免疫监视。KEYTRUDA 是一种人源化单克隆抗体，它能与 PD-1 受体结合，阻断其与 PD-L1 和 PD-L2 的相互作用，从而解除 PD-1 通路介导的免疫抑制反应（包括抗肿瘤免疫反应）。在相同基因小鼠的肿瘤模型中，阻断 PD-1 活性会减缓肿瘤增长（1）。

Merck Sharp & Dohme 发起的临床研究，KEYNOTE-042（KN042），研究了经 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）鉴别具有 PD-L1 表达（ $TPS \geq 1\%$ ）且未接受过治疗的 III 期（不适合手术切除或根治性化放疗）/转移性 NSCLC 患者（可能对 KEYTRUDA 治疗有反应）的临床有效性。欲了解 KN042 研究细节，参考下方“临床性能评价（NSCLC）”部分。

Merck Sharp & Dohme 发起的临床研究，KEYNOTE-024（KN024），研究了经 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）鉴别具有 PD-L1 表达（ $TPS \geq 50\%$ ）且未接受过治疗的转移性 NSCLC 患

者（可能对 KEYTRUDA 治疗有反应）的临床有效性。欲了解 KN024 研究细节，参考下方“临床性能评价（NSCLC）”部分。

Merck Sharp & Dohme 发起的临床研究，KEYNOTE-010（KN010），研究了经 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）鉴别具有 PD-L1 表达（TPS \geq 1%）且既往接受过治疗的转移性 NSCLC 患者（可能对 KEYTRUDA 治疗有反应）的临床有效性。欲了解 KN010 研究细节，参考下方“临床性能评价（NSCLC）”部分。

【检测原理】

PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）包括使用组织染色机（Autostainer Link 48）完成 FFPE 标本的免疫组织化学（IHC）染色操作所需的优化试剂和染色程序。使用 PD-L1 单克隆抗体或者阴性对照试剂（NCR）与标本共同孵育后，依次用宿主一抗的特异性连接抗体和即用型显色试剂（含偶联到葡聚糖聚合物骨架上的二抗分子和辣根过氧化物酶分子）进行孵育。酶催化随后加入的色原，使之在抗原部位生成可见沉积物。通过显色增强剂改良显色反应的颜色。然后，对标本进行复染并封片。使用光学显微镜判读。

【主要组成成分】

提供的材料

每个试剂盒（SK006）内含 19.5 mL 的 PD-L1 抗体（蛋白浓度约 3 μ g/mL）和足够分 15 批进行 50 个样本检测的试剂。下列材料足够 50 次检测使用（包括 50 张 PD-L1 待测切片和 50 张对应的阴性待测切片，共 100 张切片）。对于较大组织切片，每张玻片可能需要 3 个滴加区域（3 x 150 μ L）。注意，这会导致试剂盒检测总数减少。

SK006 试剂盒中提供的材料最多可供 15 轮单独染色操作之用。

数量	描述
1 x 34.5 mL	过氧化物酶阻断剂 过氧化物酶阻断剂 含有过氧化氢、去垢剂和 0.015 mol/L 叠氮化钠的缓冲溶液。
1 x 19.5 mL	一抗：单克隆小鼠抗 PD-L1，克隆 22C3 单克隆小鼠抗 PD-L1（克隆 22C3） 单克隆小鼠（IgG1, kappa）抗 PD-L1，溶于含有稳定蛋白和 0.015 mol/L 叠氮化钠的缓冲溶液中。
1 x 15 mL	阴性对照试剂 阴性对照试剂

单克隆小鼠质控 IgG 抗体，溶于含有稳定蛋白和 0.015 mol/L 叠氮化钠的缓冲溶液中。

1 x 34.5 mL 小鼠信号增强剂

信号增强剂，抗小鼠

多克隆兔抗小鼠免疫球蛋白（二抗），溶于含有稳定蛋白和 0.015 mol/L 叠氮化钠的缓冲溶液中。

1 x 34.5 mL 显色试剂-HRP

显色试剂-HRP

偶联有过氧化物酶分子和多克隆山羊抗兔和抗小鼠免疫球蛋白二抗分子的葡聚糖，溶于含有稳定蛋白和抗菌剂的溶液。

15 x 7.2 mL DAB+底物缓冲液

DAB+底物缓冲液

含有过氧化氢和抗菌剂的缓冲溶液。

1 x 5 mL DAB+色原

DAB+色原

3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐溶于有机溶剂。

1 x 34.5 mL DAB 增强剂

DAB 增强剂

硫酸铜溶液。

6 x 30 mL 免疫组化抗原修复缓冲液

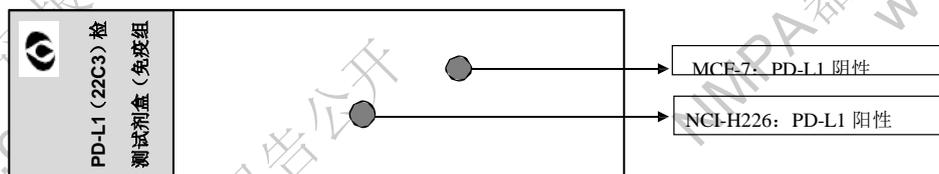
免疫组化抗原修复缓冲液，低 pH 值（50x）

pH 6.1，含有去垢剂和抗菌剂的缓冲溶液。

15 张切片 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）质控切片

质控切片

每张载玻片含有两个经福尔马林固定石蜡包埋的细胞系点：PD-L1 蛋白中度表达的 NCI-H226* 和 PD-L1 蛋白阴性表达的 MCF-7。



*感谢 NIH 的 AF Gazdar 博士和 JD Minna 博士为研发 NCI-H226 (ATCC 编号: CRL-5826™) 做出的贡献 (2)。

注: 该试剂盒包含的所有试剂都是专门配制。为了使检测不超出预期, 除免疫组化抗原修复缓冲液, 低 pH 值 (50x) (货号 K8005) 外, 其它试剂不得混用。PD-L1 (22C3) 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 已针对组织染色机 (Autostainer Link 48) 进行了条件优化, Autostainer Link 48 及 PT Link 具体使用详情, 请参考 Autostainer Link 48 及 PT Link 的用户指南。

需要但未提供的材料

免疫组化预处理系统 (PT Link Pre-treatment Module) (货号 PT100/PT101/PT200)

组织染色机 (Autostainer Link 48) (货号 AS480)

缓冲清洗液 (EnVision FLEX Wash Buffer (20x)) (货号 K8007)

苏木素染色液 (Hematoxylin) (货号 K8008)

蒸馏水或去离子水 (试剂级水)

定时器

阳性和阴性质控组织 (见“质量控制”章节)

载玻片: Dako FLEX IHC 显微载玻片 (货号 K8020) 或 Fisherbrand 阳离子防脱载玻片

盖玻片

永久性封片剂和封片所需的辅助试剂

光学显微镜 (4x-40x 物镜)

【储存条件及有效期】

储存条件

不在组织染色机 (Autostainer Link 48) 上使用时, PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 的所有组分 (包括质控片) 应置于 2℃ ~8℃ 避光保存。

超过试剂包装盒上印刷的有效期限后, 不得使用该试剂盒。 如果试剂在包装内说明书规定的条件之外储存, 用户必须验证其有效性。

该产品的失活没有明显的迹象显示。因此, 阳性质控片和阴性质控片应随患者样本一同进行染色。

有效期

2℃ ~8℃ 避光保存, 有效期 10 个月。

生产日期及失效日期

见标签。

【适用仪器】

组织染色机 (Autostainer Link 48) (货号 AS480)。

【样本要求】

样本制备

组织标本必须经过处理从而保存组织用于 IHC 染色。应对所有样本采用标准的组织处理方法。

石蜡包埋标本

建议使用经福尔马林固定、石蜡包埋 (FFPE) 的组织标本。其他固定剂尚未经过验证, 可能会得到错误的结果。推荐的固定条件是, 10% 中性缓冲福尔马林 (NBF) 中固定 12-72 小时, 然而, 采用有限样本进行的研究显示在 10% NBF 中固定 4-168 小时并没有系统的改变 PD-L1 检测结果。固定时间 ≤ 3 小时可能导致 PD-L1 检测有变化。样本应制成 3 或 4 mm 的厚块, 在福尔马林中固定, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 然后用熔化的石蜡浸透。石蜡温度不应超过 60°C。

组织样本应切成 4-5 μm 的切片。切片后, 组织切片应贴于 Dako FLEX IHC 显微镜载玻片上(货号 K8020), 或 Fisherbrand 阳离子防脱载玻片上, 然后置于 58 \pm 2°C 烤箱中烤片 1 小时。

切片储存建议

为了保存抗原活性, 一旦将组织置于载玻片上制成切片, 切片应于 2°C-8°C (首选) 或室温 (不超过 25°C) 避光保存, 并于 6 个月内染色。为了确保组织的完整性和抗原活性, 制成的切片的储存和处理环境不应超过 25°C。

【检测方法】

试剂准备

染色前必须准备以下试剂:

免疫组化抗原修复缓冲液 EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x)

使用蒸馏水或去离子水 (试剂级水), 按 1:50 比例稀释低 pH 值的抗原修复液 (50x), 配置足量的 1x 低 pH 值抗原修复液; pH 值须为 6.1 \pm 0.2。如果 pH 值低于 5.9, 可能得到错误染色结果。一瓶 30 mL 的低 pH 值抗原修复液 (50x) 经 1:50 稀释后, 可配置成 1.5 L 的 1x 试剂, 足够充满一个 PT Link 缸, 每次能够处理多达 24 张切片。该 1x 抗原修复液可在 5 天之内使用三次。

如需要, 可提供额外的低 pH 值抗原修复液 (50x), 货号为 K8005。

清洗缓冲液 EnVision FLEX Wash Buffer (20x)

使用蒸馏水或去离子水（试剂级水），按 1:20 比例稀释缓冲清洗液（20x），配置足量的缓冲清洗液供清洗步骤用。未使用的 1x 溶液在 2℃~8℃ 储存不能超过一个月。如发现浑浊，请丢弃。欲了解详情请参见组织染色机（Autostainer Link 48）用户指南。

如需额外的缓冲清洗液 EnVision FLEX Wash Buffer (20x)，货号为 Code K8007。

DAB+底物-色原溶液 DAB+ Substrate-Chromogen Solution

此溶液应在使用前彻底混匀。溶液中的沉淀不会影响染色质量。

为了制备 DAB+底物-色原溶液，每毫升的 DAB+底物缓冲液添加 1 滴液态 DAB+色原，并混匀。配置的底物-色原溶液 2℃~8℃ 避光保存，稳定期为 5 天。

重要说明：

- **如果制备一整瓶的 DAB+底物缓冲液，添加 9 滴 DAB+色原。** 尽管标签标注体积为 7.2 mL，但这是可用体积，不含该试剂瓶的“死体积”。
- 瓶中液态 DAB+色原的颜色可能在透明至淡紫棕色之间变化。这并不影响该产品性能。请根据上述指导进行稀释。往 DAB+底物缓冲液中添加过量的液态 DAB+色原会导致阳性信号退化。

组织染色机（Autostainer Link 48）染色方案

操作说明

使用前，用户应仔细阅读这些说明并熟悉所有的组分和仪器（参见“**注意事项**”）。

免疫染色前，所有试剂应平衡到室温（20℃~25℃）。相同地，所有孵育都应在室温下进行。

染色过程中，不能干片。否则可能导致非特异性的染色增加。

所有的染色步骤和孵育时间都已经预编程到 Dako Link 软件中。请参见组织染色机（Autostainer Link 48）和免疫组化预处理系统(PT Link)的用户指南，了解有关染色程序、上载切片和试剂的更多信息。

注：此系统所提供的试剂和操作说明都经过优化，使其在配合推荐的试剂和材料使用时可达到最佳性能。进一步稀释试剂或改变孵育时间或温度，可能导致结果错误或不一致。

染色方案

请在 Dako Link 下拉菜单选项中选择 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）染色方案。

所有的染色步骤和孵育时间都已预编程到组织染色机 (Autostainer Link 48) 中。如果您的服务器上沒有合适的 PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 染色方案, 请联系当地技术服务代表获得方案。

步骤 1: 脱蜡、水化和抗原修复 (三合一) 操作

详情请参见免疫组化预处理系统 (PT Link) 用户指南。

设置免疫组化预处理系统 (PT Link) (货号 PT100/PT101/PT200) 预热温度和冷却温度为 65°C。设置加热至 97°C 且维持 20 分钟。

- ▶ 每个 PT Link 缸中灌注 1.5L 低 pH 值 1x 抗原修复液工作液, 以覆盖组织切片。
- ▶ 将抗原修复液预热至 65°C。
- ▶ 将插有 FFPE 组织切片的 Autostainer 切片架浸入 PT Link 缸中, 内含预热的低 pH 值 1x 抗原修复液工作液。97°C 孵育 20 分钟。
- ▶ 待抗原修复液孵育完毕且温度冷却至 65°C 后, 从 PT Link 缸中取出插有切片的 Autostainer 切片架, 并立即放入含有室温缓冲清洗液 (货号 K8007) 的缸中 (例如, PT Link 清洗缸, 货号 PT109)。
- ▶ 切片在室温缓冲清洗液中孵育 5 分钟。

步骤 2: 染色步骤

脱蜡、水化和抗原修复 (三合一) 操作后, 将插有切片的 Autostainer 切片架放置到组织染色机 (Autostainer Link 48) 上。该仪器将按照 PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 染色方案执行染色步骤、滴加正确的试剂、监控孵育时间和冲洗切片。试剂孵育时间被预编程到 Dako Link 软件中。

步骤 3: 复染

切片应用苏木素染色液 (Link) (货号 K8008) 复染 5 分钟。苏木素染色液孵育时间被预编程到方案中。

步骤 4: 封片

要求使用非水溶性永久封片剂。

注: 某些因素可能导致染色完成的切片褪色, 这些因素包括但不限于复染、封片剂和封片方法, 以及切片储存条件。为了减少褪色, 将切片置于室温 (20°C~25 °C) 避光保存。

质量控制

PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）中的试剂已使用上面所列的抗原修复和染色操作方法，通过免疫组化进行了质量控制。用户实验室采用非推荐的组织固定、处理和包埋方法都可能导致结果有显著的变化。每轮染色中都应添加质控片。这些质控都已在表 2 中列出，包括：患者组织标本的 H&E 染色片；实验室提供的阳性和阴性质控组织；和 Dako 提供的细胞系质控片(5)。在美国，请查阅美国病理学会(CAP)免疫组化认证程序的质量控制指南；另请参阅批准的 CLSI 免疫组化质量保证指南（5、6、7），以了解更多信息。

分析验证

初次使用该诊断染色系统前，参见上述质量控制部分所列的质量控制规程。用户应测试一些实验室提供的已知其 IHC 性能特性的阳性组织和阴性组织，来验证其性能表现。当抗体批号改变，或者试验中的任何参数发生变化时，都应重新质控。潜在问题的故障排除选项、原因及推荐的解决办法请参见表 3。

染色和评分判读

NSCLC：PD-L1 的表达通过肿瘤比例评分（TPS）予以评定

PD-L1 评分必须对整张切片上所有的活的肿瘤细胞进行评估。整张切片中必须有至少 100 个活的肿瘤细胞，才能认为该切片可以进行 PD-L1 评估。

病理医生应在光学显微镜下评估切片。对于免疫组织化学染色和判读评分，使用 10-40x 放大倍率的物镜较为恰当。肿瘤细胞中任何可见的膜染色应计入评分。

评定肿瘤比例评分的指导原则和方法：

- 先在低倍镜下，检查所有保存完好的肿瘤区域。评估阳性和阴性肿瘤细胞的整体区域，需要记住的是部分膜染色或 1+膜染色在低倍镜下可能很难看到。另外要确保样本中至少有 100 个活的肿瘤细胞。
- 再在高倍镜下，包括 10 倍、20 倍和 40 倍，观察所有存在或未见膜染色的肿瘤区域。

PD-L1 蛋白的表达通过肿瘤比例评分（TPS）予以评定，其中 TPS 是在任意强度下，部分或完全膜染色的活的肿瘤细胞的百分比。

$$\text{TPS}(\%) = \frac{\text{PD-L1 染色细胞（肿瘤细胞）数量}}{\text{活的肿瘤细胞总数}} \times 100$$

胞浆染色是非特异性的染色，在进行部分或全部细胞膜染色（ $\geq 1+$ ）评估时，应加以区分，不应纳入染色强度的评估。正常细胞和肿瘤相关免疫细胞，如浸润性淋巴细胞或巨噬细胞，**不应**纳入 PD-L1 阳性测定评估。

表 1 详细列出了组织成分进行肿瘤比例评分时纳入和/或排除的情况

表 1. NSCLC 肿瘤比例评分时纳入/排除的标准

组织成分	纳入 NSCLC 的 TPS 评分	排除于 NSCLC 的 TPS 评分
肿瘤细胞	可确认的任意强度的部分或全部细胞膜染色的活的肿瘤细胞	排除所有胞浆染色
免疫细胞	不包含	排除所有免疫细胞染色，例如： <ul style="list-style-type: none"> ● 单核炎症细胞（大淋巴细胞、单核细胞、肺泡巨噬细胞） ● 浆细胞 ● 中性粒细胞
其它	不包含	排除以下所有染色： <ul style="list-style-type: none"> ● 邻近肿瘤细胞的所有正常细胞 ● 基质细胞（成纤维细胞） ● 坏死细胞和 / 或细胞碎片 ● 矽肺病色素

每轮染色中，需按表 2 的顺序评估切片，从而确定每轮染色的有效性并对样本组织的染色情况进行评估。评估患者标本的 PD-L1 表达时，应同时用 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）内的 PD-L1 抗体和阴性对照试剂进行染色。NCR 染色的样本必须无特异性染色且非特异性染色强度 $\leq 1+$ 。

如果活的肿瘤细胞呈现出任意强度的膜染色且 $TPS \geq 1\%$ ，则应判定标本存在 PD-L1 表达。如果活的肿瘤细胞呈现出任意强度的膜染色且 $TPS \geq 50\%$ ，则应判定标本存在 PD-L1 高表达。

肿瘤比例评分			
PD-L1 表达水平	TPS < 1%	TPS $\geq 1\%$	TPS $\geq 50\%$
PD-L1 表达状态	无 PD-L1 表达	有 PD-L1 表达	PD-L1 高表达

欲了解更多，请参阅 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）NSCLC 判读手册。

切片评估

表 2.切片评估推荐顺序

样本	基本原理	要求
1.H&E 切片 (实验室提供)	首先评估组织样本 H&E 染色, 用于判断组织形态和保存质量。	应对同一样本蜡块的连续切片进行 PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 染色和 H&E 染色。 组织样本应完整, 保存良好并且有肿瘤。
2.细胞系质控切片 (随试剂盒提供)	需用 PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 内的 PD-L1 抗体对细胞系质控切片进行染色, 以确定所有试剂都正常。 细胞系质控切片含 PD-L1-阳性细胞系点和 PD-L1-阴性细胞系点。	每轮染色, 应添加一张细胞系质控切片用 PD-L1 抗体染色。 <i>NCI-H226 (PD-L1-阳性质控细胞系) 合格标准:</i> <ul style="list-style-type: none"> ● $\geq 70\%$ 的细胞呈现膜染色, 且平均染色强度 $\geq 2+$。 ● 非特异性染色强度 $< 1+$。 <i>MCF-7 (PD-L1-阴性质控细胞系) 合格标准:</i> <ul style="list-style-type: none"> ● 无特异性染色。 ● 非特异性染色强度 $< 1+$。注意, 偶尔会看到 MCF-7 细胞点中有几个细胞被染色。采用的合格标准如下: 总共有 ≤ 10 个细胞有明显的膜染色, 或 MCF-7 细胞点界限内胞浆染色强度 $\geq 1+$。 如果任一细胞系质控点不符合这些条件, 患者样本的所有结果都应视为无效。
3.阳性质控组织切片 (实验室提供)	接着, 应评估阳性质控组织切片的 PD-L1 抗体染色以及阴性对照试剂染色。这些切片用于检测固定方法和抗原修复过程	对照组织样本应选用与患者样本具有相同肿瘤标志物的活检 / 外科手术样本, 采用与患者样品相同的方式进行固定、处

样本	基本原理	要求
	<p>是否有效。已知表达的阳性质控组织只用于监测组织处理过程和检测试剂是否正确，而不能作为患者样品的辅助诊断。</p>	<p>理和包埋。</p> <p>通常坏死或降解的细胞会有非特异性染色，请使用完好的样本来评估染色结果。</p> <p>选用的阳性质控组织应有弱到中等的 PD-L1 阳性染色，以便能探测出检测体系的轻微变化。</p> <p>每轮染色应包括两张阳性质控组织切片。</p> <p>PD-L1 染色结果：应观察到棕色的膜染色。非特异性染色应 ≤1+。</p> <p>阴性对照试剂染色结果：不存在膜染色。非特异性染色应 ≤1+。</p> <p>如果阳性质控组织未显现出恰当的阳性染色，则测试样本的结果应视为无效。</p>
<p>4.阴性质控组织切片 (实验室提供)</p>	<p>接着，评估阴性质控组织切片（已知 PD-L1 阴性）的 PD-L1 抗体和阴性对照试剂染色，以验证抗原抗体结合的特异性。或者，也可以使用阳性质控组织中的阴性表达部位作为阴性质控组织，需用户自行验证。</p>	<p>对照组织样本应选用与患者样本具有相同肿瘤标志物的活检 / 外科手术样本，采用与患者样本相同的方式进行固定、处理和包埋。</p> <p>每轮染色应包括两张阴性质控组织切片。</p> <p>PD-L1 染色结果：肿瘤细胞没有膜染色。非特异性染色应 ≤1+。</p> <p>阴性对照试剂染色结果：没有</p>

样本	基本原理	要求
		<p>细胞膜染色。非特异性染色应$\leq 1+$。</p> <p>如果阴性质控组织切片中出现特异性的染色，则患者样本的结果应视为无效。</p>
<p>5.扁桃体质控组织（可选） （实验室提供）</p>	<p>使用人扁桃体组织作为补充质控材料，采用与患者样本相似的方式进行固定、处理和包埋，以验证分析的灵敏度、特异性和非特异性背景染色。</p>	<p>隐窝上皮部分应为强阳性染色，生发中心的滤泡巨噬细胞应为弱至中度染色。内皮细胞、成纤维细胞和表面上皮细胞中应为阴性染色。</p>
<p>6.使用阴性对照试剂染色的患者组织切片</p>	<p>接着，用PD-L1检测试剂盒（免疫组织化学法）内的阴性对照试剂对患者样本进行染色。使用阴性对照试剂代替抗体，以辅助解释抗原位置的特异性染色。</p>	<p>没有细胞膜染色则可确认抗体标记目标抗原的特异性。非特异性染色应$\leq 1+$。</p>
<p>7.使用PD-L1抗体染色的患者组织切片</p>	<p>最后，用PD-L1检测试剂盒（免疫组织化学法）内的PD-L1抗体对患者样本进行染色。</p> <p>参见“预期用途”、“局限性”和“性能特点”章节，了解与PD-L1检测试剂盒（免疫组织化学法）免疫反应有关的具体信息。</p>	<p>阳性染色的强度应参照同批次染色的阴性对照试剂切片中的非特异性背景染色来进行评估。</p> <p>跟所有免疫组化检测一样，阴性结果表示抗原未检出，而不是表示检测的细胞/组织中没有抗原。</p> <p>整张PD-L1染色切片中的所有存活肿瘤细胞都需要进行评估并计入PD-L1评分。样本中必须有至少100个肿瘤细胞，才能进行PD-L1评估。</p> <p>关于PD-L1表达评分判读指南，参见染色和评分判读。</p>

【检测结果的解释】

表 3：疑难解答

问题	可能原因	解决办法
1.切片无染色。	1a.程序错误。	1a.确认 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）程序被用于切片。
	1b.与 DAB+底物-色原溶液（DAB）反应不足。	1b.确认 DAB+底物-色原溶液制备正确。
	1c.缓冲清洗液中有叠氮钠。	1c.只使用 Dako 缓冲清洗液（货号 K8007）。
	1d.质控切片失效。	1d.检查试剂盒外包装效期和储存条件。
2.样本切片染色弱。	2a.固定方法不当。	2a.确保只使用中性缓冲福尔马林固定剂，选用批准的固定方法。
	2b.试剂添加不足。	2b.检查组织切片大小和试剂用量。
	2c.缓冲清洗液不合适。	2c.只使用 Dako 缓冲清洗液（货号 K8007）。
3.样本染色弱或者试剂盒中的质控切片上的阳性细胞系染色弱。	3a.抗原修复不足。	3a.检查是否正确进行了三合一预处理操作。
	3b. 缓冲清洗液不合适。	3b.只使用 Dako 缓冲清洗液（货号 K8007）。
4.切片背景染色过强。	4a.脱蜡不尽。	4a.检查是否正确进行了三合一预处理操作。
	4b.切片上载至组织染色机（Autostainer Link 48）时干片。	4b.确保上载玻片时，以及开始染色前，切片湿润。
	4c.试剂与组织切片的非特异性结合	4c.检查样本固定是否合适和 / 或是否有坏死。
	4d.固定方法不当。	4d.确保只使用中性缓冲福尔马林固定剂，选用推荐的固定方法。
5.掉片。	5a.载玻片选用不当。	5a.使用 Dako FLEX IHC 显微载玻片（货号 K8020）或 Fisherbrand 阳离子防脱载玻片。
	5b.标本制备不当	5b.染色前，切片应于 58±2℃烤箱中烤片 1 小时。

问题	可能原因	解决办法
6. 特异性染色过强。	6a. 使用了不恰当的固定方法。	6a. 确保选用批准的固定剂和固定方法。
	6b. 使用了不恰当的缓冲清洗液。	6b. 只使用 Dako 缓冲清洗液（货号 K8007）。
7. 抗原修复液受热时外观浑浊。	7. 抗原修复液受热时外观变得浑浊。	7. 正常现象，不影响染色。

注意： 如果出现的问题不能归因于上述任何原因，或者推荐的纠正措施不能解决问题，请拨打 Agilent 技术支持电话寻求进一步帮助。关于染色技术和样本制备的更多信息，请查阅 Dako 教育指南：免疫组化染色方法（5）（可从 Dako 获取）。

【检测方法的局限性】

局限性

一般局限性

1. 免疫组化是一个多步骤的诊断过程，在适当试剂的选择，组织选择，组织固定，组织处理，免疫组化切片的制备以及染色结果的判读等方面都需要专门的培训。
2. 组织染色情况取决于染色前组织的操作和处理。不恰当的固定、冷冻、解冻、洗涤、干燥、烤片、切片，或是其它组织或液体的污染，都可能产生干扰、抗体俘获或假阴性结果等情况。结果不一致的原因可能是固定或包埋方法的改变，也可能是由于组织内固有的不一致所导致。
3. 复染过度或不足均可导致结果判读不当。
4. 临床判定任何阳性染色的存在或缺失，必须参考临床表现、形态学和其它组织病理学标准进行评估。临床判定任何染色的存在或缺失，必须有形态学研究和合适的对照，以及其它的诊断结果作为补充。应由熟悉所用抗体、试剂和方法的合格病理医生来判读染色切片。染色必须在经过认证许可的实验室中，在病理医生的监督下进行，此病理医生要评估染色切片，并确保阳性和阴性质控染色恰当。
5. 乙肝病毒感染者组织中含 B 型乙肝表面抗原（HBsAg），可能对辣根过氧化物酶表现出非特异性染色（7）。
6. 试剂在未经检测过的组织中的表现可能超出预期。由于癌症或其它病理组织中抗原的生物学多样性，即使在已经检测过的组织类型中，也不排除可能出现超出预期的反应。如欲了解已观察到的超出预期的反应，请联系 Dako 技术支持部门。
7. 由于蛋白或底物反应产物的非免疫结合，可能观察到假阳性结果。伪过氧化物酶活性（红细

胞)和内源过氧化物酶活性(细胞色素 C)也是可能的原因(7)。

8. 随系统提供的试剂和操作说明已优化到最佳性能。进一步稀释试剂或改变孵育时间或温度可能导致错误或不一致的结果。

产品特有的局限性

1. 随着时间的延长,组织中抗原可能会降解而导致假阴性结果。请在推荐条件下储存切片,并在建议的时间内完成对切片的染色。
2. 为了获得最优和可重复的结果,当以常规方法固定组织(中性缓冲福尔马林液)并用石蜡包埋,PD-L1 蛋白需要进行抗原修复预处理。
3. 除低 pH 值 50x 的免疫组化抗原修复缓冲液外,不同批次或不同厂家的试剂盒组分不得相互混用。在需要时,可提供额外的低 pH 值抗原修复液(50x),货号为 K8005。
4. 染色的细胞系质控片只能用于确认此轮染色情况,不能用于组织切片的染色评分。
5. PD-L1 检测试剂盒(免疫组织化学法)在非福尔马林固定的组织上的使用情况,尚未经过确认。
6. PD-L1 检测试剂盒(免疫组织化学法)在细针穿刺组织的使用情况,尚未经过确认。
7. PD-L1 检测试剂盒(免疫组织化学法)在脱钙组织上的使用情况,尚未经过确认。

【产品性能指标】

非临床性能评价:正常和肿瘤组织

正常组织:表 4 总结了单克隆鼠抗 PD-L1(克隆 22C3)在推荐的一组正常组织中的免疫反应性。在免疫细胞和上皮来源的细胞中观察到膜染色。在一些细胞类型中观察到胞浆染色,但没有记录为阳性染色。根据包装内的说明书,所有组织经福尔马林固定、石蜡包埋,并采用 PD-L1 检测试剂盒(免疫组织化学法)染色。在检测的细胞类型或者组织类型中没有观察到超出预期的结果。对于正常组织中的 PD-L1 IHC 表达,观察到的染色与文献报道一致(8, 9)。

表 4: PD-L1 检测试剂盒(免疫组织化学法)正常组织反应性总结

组织类型(检测数量)	阳性膜染色:组织成分	阳性胞浆染色:组织成分	非特异性染色
肾上腺(3)	0/3	1/3 骨髓细胞	0/3
骨髓(3)	3/3 巨核细胞	3/3 巨核细胞	0/3
乳腺(3)	0/3	0/3	0/3
小脑(3)	0/3	0/3	0/3
大脑(3)	0/3	0/3	0/3
子宫颈(3)	1/3 上皮细胞	0/3	0/3
结肠(3)	2/3 巨噬细胞	0/3	0/3

组织类型（检测数量）	阳性膜染色：组织成分	阳性胞浆染色：组织成分	非特异性染色
食道（3）	0/3	0/3	0/3
肾脏（3）	1/3 肾小管上皮细胞	0/3	0/3
肝脏（3）	1/3 巨噬细胞 1/3 肝细胞	0/3	0/3
肺（3）	3/3 肺泡巨噬细胞	0/3	0/3
间皮细胞（2）	0/2	0/2	0/2
心肌（3）	0/3	0/3	0/3
骨骼肌（3）	0/3	0/3	0/3
外周神经（3）	0/3	1/3 结缔组织 / 血管	0/3
卵巢（3）	0/3	0/3	0/3
胰腺（3）	0/3	0/3	0/3
甲状旁腺（3）	1/3 腺上皮	0/3	0/3
垂体（3）	1/3 垂体前 1/3 垂体后	1/3 垂体前 1/3 垂体后	0/3
前列腺（2）	2/2 上皮细胞	0/2	0/2
唾液腺（3）	0/3	0/3	0/3
皮肤（3）	0/3	0/3	0/3
小肠（3）	0/3	0/3	0/3
脾脏（3）	2/3 巨噬细胞	0/3	0/3
胃（3）	2/3 淋巴细胞 1/3 胃腺	1/3 胃腺	0/3
睾丸（3）	0/3	0/3	0/3
胸腺（3）	3/3 髓质上皮细胞	0/3	0/3
甲状腺（3）	0/3	0/3	0/3
扁桃体（3）	3/3 隐窝上皮 2/3 生发中心（巨噬细胞）	0/3	0/3
子宫（3）	0/3	0/3	0/3

肿瘤组织：表 5 总结了单克隆鼠抗 PD-L1（克隆 22C3），在一组肿瘤组织中的免疫反应性。在免疫细胞和上皮来源的细胞上观察到膜染色。在一些细胞类型中观察到胞浆染色，但没有记录为阳性染色。根据包装内说明书，所有组织经福尔马林固定、石蜡包埋，并采用 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）染色。在检测的肿瘤标本中没有观察到超出预期的结果。对于肿瘤组织中的 PD-L1 IHC 表达，观察到的染色与文献报道一致（8-11）。

表 5: PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）肿瘤组织反应性总结

肿瘤类型	位置	PD-L1 阳性 / 总计 N=159	
腺癌	阑尾	0/1	
	乳腺, DCIS	0/2	
	乳腺, 浸润性导管	0/7	
	乳腺, 浸润性导管转移至淋巴结	0/1	
	宫颈, 子宫颈内类型	0/1	
	结肠	0/5	
	结肠, 转移至肝脏	0/1	
	结肠, 黏液性	0/1	
	食管	0/1	
	胆囊	1/5	
	胃肠, 转移至肺	0/1	
	头和颈, 硬腭	0/1	
	肺	1/4	
	卵巢	0/1	
	卵巢, 子宫内膜样	0/1	
	卵巢, 黏液性	0/1	
	卵巢, 浆液性	0/1	
	胰腺	0/2	
	胰腺, 导管	0/3	
	前列腺	0/5	
	直肠	0/4	
	唾液腺 / 腮腺	0/2	
	小肠	0/2	
	胃	0/6	
	胃, 黏液性	0/1	
	甲状腺, 滤泡	0/1	
	甲状腺, 滤泡-乳头状	0/1	
	甲状腺, 乳头状	0/3	
	子宫, 透明细胞	0/1	
	子宫, 子宫内膜	0/3	
	肾上腺皮质癌	肾上腺	0/1
	星形细胞瘤	大脑	0/3
	基底细胞癌	皮肤	0/1

肿瘤类型	位置	PD-L1 阳性 / 总计 N=159
癌	鼻咽, NPC	0/1
软骨肉瘤	骨骼	0/1
脊索瘤	盆腔	0/1
胚胎性癌	睾丸	0/1
室管膜细胞瘤	脑	0/1
胶质母细胞瘤	脑	0/1
肝母细胞瘤	肝脏	0/1
肝细胞癌	肝脏	0/5
胰岛细胞瘤	胰腺	0/1
间质瘤	结肠	0/1
	直肠	0/1
	小肠	0/1
平滑肌肉瘤	软组织, 胸壁	0/1
	膀胱	0/1
淋巴瘤		
间变性大细胞	淋巴结	0/1
弥漫性 B 细胞	淋巴结	0/4
霍奇金	淋巴结	2/2
非霍奇金	淋巴结	1/1
髓母细胞瘤	脑	0/1
髓样癌	甲状腺	0/1
黑色素瘤	直肠	0/1
	鼻腔	0/1
脑膜瘤	脑	0/2
间皮瘤	腹膜	0/1
神经母细胞瘤	腹膜后腔	0/1
神经纤维瘤	软组织, 下背部	0/1
骨肉瘤	骨骼	0/2
嗜铬细胞瘤	肾上腺	0/1
原始神经外胚层肿瘤 (PNET)	腹膜后腔	0/1
肾细胞癌		
乳头状	肾脏	0/1
透明细胞	肾脏	0/6
横纹肌肉瘤	软组织, 胚胎	0/1
	前列腺	0/1
	腹膜后腔	0/1
精原细胞瘤	睾丸	0/2
印戒细胞癌	结肠印戒细胞癌转移至卵巢	0/1
	结肠	0/1
小细胞癌	肺	0/1
精原细胞瘤	睾丸	0/2
鳞状细胞癌	食管鳞状上皮细胞癌转移至淋巴结	0/1
	子宫颈	2/5
	食管	0/7
	头和颈	0/2

肿瘤类型	位置	PD-L1 阳性 / 总计 N=159
胸腺瘤	肺	1/2
	皮肤	0/2
	子宫	0/1
	盆腔	0/1

肿瘤类型	位置	PD-L1 阳性 / 总计 N=159
	纵隔	1/1
移行细胞癌	膀胱	0/6
	肾脏	0/1

非临床性能评价: NSCLC

分析灵敏度 / 特异性

PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 的分析灵敏度是 用一批试剂检测在 127 例独立病例 (I-IV 期非小细胞肺癌 (NSCLC) FFPE 标本) 上评估的。评估 PD-L1 的表达表明其阳性肿瘤细胞染色范围为 0-100%，染色强度为 0-3。

精密度: NSCLC

在安捷伦实验室评价 PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 的精密度。采用 bootstrap 法计算平均阴性百分比一致率 (ANA)、平均阳性百分比一致率 (APA) 和总体一致率 (OA)，双侧 95% 置信区间。对于一致性结果为 100% 的研究，采用 Wilson Score 法计算 $TPS \geq 1\%$ 和 $TPS \geq 50\%$ 临界值的阴性百分比一致率 (NPA)、阳性百分比一致率 (PPA) 和总体一致率 (OA)，双侧 95% 置信区间。

表 6: 同一个场所 PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 检测的精密度 ($TPS \geq 1\%$)

精密度研究	诊断临界值	研究设计	一致率 (95% CI)
不同仪器之间	$TPS \geq 1\%$	分别在六台组织染色机 (Autostainer Link 48) 上对 24 例不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本 (12 例 PD-L1 阴性和 12 例 PD-L1 阳性) 进行检测。	NPA 100% (94.0-100%) PPA 100% (94.0-100%) OA 100% (96.9-100%)
不同操作员之间	$TPS \geq 1\%$	六个操作员在同一台组织染色机 (Autostainer Link 48) 上对 24 例不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本 (12 例 PD-L1 阴性和 12 例 PD-L1 阳性) 进行检测。	NPA 100% (93.9-100%) PPA 100% (94.0-100%) OA 100% (96.9-100%)
不同天之间	$TPS \geq 1\%$	在非连续六天中，在组织染色机 (Autostainer Link 48) 上对 24 例不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本 (12 例 PD-L1 阴性和 12 例 PD-L1 阳性) 进行检测。	NPA 100% (94.0-100%) PPA 100% (94.0-100%) OA 100% (96.9-100%)

精密度研究	诊断临界值	研究设计	一致率 (95% CI)
不同批次间	TPS \geq 1%	使用三个批次试剂分别在组织染色机(Autostainer Link 48)上对 24 例不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本(13 例 PD-L1 阴性和 11 例 PD-L1 阳性) 进行检测, 在每批次检测中, 每例重复检测 3 次。	ANA 98.3% (95.9-100%) APA 97.9% (94.6-100%) OA 98.1% (95.3-100%)
同一轮检测内 (重复性)	TPS \geq 1%	对 24 例不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本 (12 例 PD-L1 阴性和 12 例 PD-L1 阳性) 在组织染色机(Autostainer Link 48)上进行检测, 每一例在同一轮中重复检测 6 次。	NPA 100% (94.0-100%) PPA 100% (93.8-100%) OA 100% (96.8-100%)

NPA=阴性百分比一致率; PPA=阳性百分比一致率; OA=总体一致率; ANA=平均阴性一致率; APA=平均阳性一致率; TPS=肿瘤比例评分

表 7: 同一个场所 PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 检测的精密度 (TPS \geq 50%)

精密度研究	诊断临界值	研究设计	一致率 (95% CI)
不同仪器之间	TPS \geq 50%	分别在六台组织染色机 (Autostainer Link 48) 上对 16 例不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本 (10 例 PD-L1 阴性和 6 例 PD-L1 阳性) 进行检测。	NPA 100% (92.9-100%) PPA 100% (88.6-100%) OA 100% (95.4-100%)
不同操作员之间	TPS \geq 50%	六个操作员在同一台组织染色机 (Autostainer Link 48) 上对 16 例不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本 (10 例 PD-L1 阴性和 6 例 PD-L1 阳性) 进行检测。	NPA 100% (92.7-100%) PPA 100% (88.6-100%) OA 100% (95.4-100%)
不同天之间	TPS \geq 50%	在非连续六天中, 在组织染色机 (Autostainer Link 48) 上对 16 例不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本 (10 例 PD-L1 阴性和 6 例 PD-L1 阳性) 进行检测。	NPA 100% (92.9-100%) PPA 100% (88.6-100%) OA 100% (95.4-100%)
不同批次间	TPS \geq 50%	使用三个批次试剂分别在组织染色机(Autostainer Link 48)上对 16 例不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本 (8 例 PD-L1 阴性和 8 例 PD-L1 阳性) 进行检测, 在每批次检测中, 每例重复检测 3	NPA 100% (92.6-100%) PPA 100% (92.6-100%) OA 100% (96.2-100%)

精密度研究	诊断临界值	研究设计	一致率 (95% CI)
		次。	
同一轮检测内 (重复性)	TPS ≥ 50%	对 16 例不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本 (10 例 PD-L1 阴性和 6 例 PD-L1 阳性) 在组织染色机 (Autostainer Link 48) 上进行检测, 每一例在同一轮中重复检测 6 次。	NPA 100% (92.9-100%) PPA 100% (88.6-100%) OA 100% (95.4-100%)
日内	TPS ≥ 50%	对 16 例不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本 (10 例 PD-L1 阴性和 6 例 PD-L1 阳性) 在组织染色机 (Autostainer Link 48) 上进行检测, 同一天内检测两轮, 重复检测三天。	NPA 100% (88.3-100%) PPA 100% (82.4-100%) OA 100% (92.4-100%)

NPA=阴性百分比一致率; PPA=阳性百分比一致率; OA=总体一致率; TPS=肿瘤比例评分

外部重复性: NSCLC

在三个外部场所对 PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 的重复性进行评价。因为重复性参数 (例如, 试验场所和观察者) 中无自然参考, 只计算平均一致性。采用 bootstrap 方法计算 TPS ≥ 1% 临界值和 TPS ≥ 50% 临界值时的平均阴性百分比一致率 (ANA), 平均阳性百分比一致率 (APA), 总体百分比一致率 (OA), 双侧 95% 置信区间。

表 8: 三个外部场所 PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 检测的重复性 (TPS ≥ 1%)

重复性研究	诊断临界值	研究设计	一致率% (95% CI)
不同场所之间	TPS ≥ 1%	分别在非连续五天中对 36 例不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本 (16 例 PD-L1 阴性和 20 例 PD-L1 阳性) 进行检测。对三个不同场所的场所间分析, 共进行 2700 对配对比较。	ANA 94.8% (90.3-98.4%) APA 95.5% (91.2-98.7%) OA 95.2% (90.8-98.6%)
同一场所内	TPS ≥ 1%	分别在非连续五天中, 在三个研究场所对 36 例不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本 (16 例 PD-L1 阴性和 20 例 PD-L1 阳性) 进行检测。对三个不同场所的场所内分析, 共进行 1080 对配对比较。	ANA 96.2% (94.1-97.5%) APA 96.7% (95.0-97.9%) OA 96.5% (95.2-97.4%)

重复性研究	诊断临界值	研究设计	一致率% (95% CI)
不同观察者之间	TPS ≥ 1%	对 62 例经 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）染色的不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本(28 例 PD-L1 阴性和 34 例 PD-L1 阳性)进行评分, 评分由分别来自三个研究场所的三位病理医生在非连续三天中进行。对三个不同场所的不同观察者间分析, 共进行 1674 对配对比较。	ANA 85.8% (79.3-91.8%) APA 88.2% (82.2-93.3%) OA 87.1% (81.0-92.6%)
同一观察者内	TPS ≥ 1%	对 62 例经 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）染色的不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本(28 例 PD-L1 阴性和 34 例 PD-L1 阳性)进行评分, 评分由分别来自三个研究场所的三位病理医生在非连续三天中进行。对三个不同场所的观察者内分析, 共进行 558 对配对比较。	ANA 93.7% (90.0-96.1%) APA 94.8% (91.6-96.7%) OA 94.3% (92.0-95.9%)

ANA=平均阴性一致率; APA=平均阳性一致率; OA=总体一致率; TPS=肿瘤比例评分

表 9: 三个外部场所 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）检测的重复性 (TPS≥50%)

重复性研究	诊断临界值	研究设计	一致率% (95% CI)
不同场所之间	TPS ≥ 50%	分别在非连续五天中对 36 例不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本(21 例 PD-L1 阴性和 15 例 PD-L1 阳性)进行检测。对三个不同场所的场所间分析, 共进行 2700 对配对比较。	ANA 90.3% (84.4-95.2%) APA 85.2% (75.6-92.9%) OA 88.3% (81.4-94.3%)
同一场所内	TPS ≥ 50%	分别在非连续五天中, 在三个研究场所对 36 例不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本 (21 例 PD-L1 阴性和 15 例 PD-L1 阳性) 进行检测。对三个不同场所的场所内分析, 共进	ANA 91.9% (88.8-94.8%) APA 87.6% (82.5-92.2%) OA 90.2% (86.3-93.7%)

重复性研究	诊断临界值	研究设计	一致率% (95% CI)
		行 1080 对配对比较。	
不同观察者之间	TPS ≥ 50%	对 62 例经 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）染色的不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本(30 例 PD-L1 阴性和 32 例 PD-L1 阳性)进行评分, 评分由分别来自三个研究场所的三位病理医生在非连续三天中进行。对三个不同场所的不同观察者间分析, 共进行 1674 对配对比较。	ANA 92.6% (87.8-96.7%) APA 92.8% (88.1-96.8%) OA 92.7% (88.1-96.8%)
同一观察者内	TPS ≥ 50%	对 62 例经 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）染色的不同程度 PD-L1 IHC 表达的 NSCLC 标本(30 例 PD-L1 阴性和 32 例 PD-L1 阳性)进行评分, 评分由分别来自三个研究场所的三位病理医生在非连续三天中进行。对三个不同场所的观察者内分析, 共进行 558 对配对比较。	ANA 96.4% (94.0-98.5%) APA 96.5% (94.3-98.6%) OA 96.4% (94.3-98.6%)

ANA=平均阴性一致率；APA=平均阳性一致率；OA=总体一致率；TPS=肿瘤比例评分

临床性能评价：NSCLC

KN042：作为单药一线治疗转移性 NSCLC

KEYNOTE-042 (NCT02220894) 研究了 KEYTRUDA 的疗效。它是一项在 1274 例的 III 期（不适合手术切除或根治性化放疗）或转移性(既往未接受过治疗)、经 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）筛选的 PD-L1 阳性 (TPS ≥ 1%) NSCLC 受试者中开展的随机、多中心、开放标签、对照试验。不适合接受 EGFR 或 ALK 基因突变、2 年内需要全身治疗的自身免疫性疾病、患有需要免疫抑制的疾病，或者在研究开始前 26 周内接受过超过 30 Gy 胸部放射治疗的患者。根据美国东部肿瘤协作组 (ECOG) 体能状况评分量表 (0 或 1)、组织学 (鳞状或非鳞状) 特征、受试者入组中心的地理区域 (东亚 或 非东亚) 和 PD-L1 表达状态 (TPS ≥ 50% 或 TPS 1%-49%) 对受试者进行随机分层。患者按 1:1 比例随机接受 KEYTRUDA 200 mg 每 3 周一次静脉给药治疗或研究者选择的如下任意一种含铂双药治疗：

- 第1天卡铂 AUC 5 或 6 mg/mL / min Q3W 联用培美曲塞 500 mg/m² Q3W 治疗最长 6 个周期，之后可选用培美曲塞 500 mg/m² Q3W 治疗（仅非鳞状组织学类型）；
- 第1天卡铂 AUC 5 或 6 mg/mL / min Q3W 联用紫杉醇 200 mg/m² Q3W 治疗最长 6 个周期，之后可选用培美曲塞 500 mg/m² Q3W 治疗（仅非鳞状组织学类型）。

KEYTRUDA 治疗将持续直至出现实体瘤疗效评价标准 (RECIST) 第 1.1 版 (调整为每个患者最多跟踪 10 个目标病灶和每个器官最多跟踪 5 个目标病灶) 定义的疾病进展、不可接受的毒性反应或最长 24 个月。如果患者临床上病情稳定并且研究者认为患者临床获益，则允许 KEYTRUDA 给药超过 RECIST 定义的疾病进展的时限。对于随后发生的疾病进展，可以重新启动 KEYTRUDA 治疗，并且可以额外给药长达 1 年。每 9 周进行一次肿瘤状态评估。主要终点是总生存期 OS。次要终点是盲法独立中心审查 (BICR) 根据实体瘤疗效评价标准 (RECIST) 第 1.1 版 (调整为每个患者最多跟踪 10 个目标病灶和每个器官最多跟踪 5 个目标病灶) 进行评估的无进展生存期 PFS 和客观缓解率 ORR。

研究人群特征如下：中位年龄是 63 岁 (范围：25 至 90 岁)，45% 为年龄 65 岁或以上的患者；71% 为男性；64% 为白人，30% 为亚裔，和 2% 的黑人；19% 为西班牙裔或拉美裔；69% 的 ECOG 体能状况评分为 1；39% 的组织分型为鳞癌，61% 的组织分型为非鳞癌；87% 为 M1 疾病患者，13% 经研究者评估不适合手术切除或者根治性放疗 (包括 2% 的 IIIA 患者和 11% 的 IIIB 患者)；5% 的患者在基线时存在经治疗的脑转移。47% 的 NSCLC 患者 TPS ≥ 50%，53% 的 NSCLC 患者 TPS 为 1% 至 49%。

该试验表明，与化疗相比，随机分配到 KEYTRUDA 组的患者的 OS 具有统计学显著性改善。表 10 和图 1 总结了 KEYNOTE-042 中 PD-L1 TPS ≥ 50% 亚组患者和所有 PD-L1 TPS ≥ 1% 随机患者的关键疗效指标。

表 10: KEYNOTE-042 中所有随机化患者 (TPS ≥ 1% 和 TPS ≥ 50%) 的疗效结果

终点	TPS ≥ 1%		TPS ≥ 50%	
	KEYTRUDA 200 mg 每 3 周 1 次 n=637	化疗 n=637	KEYTRUDA 200 mg 每 3 周 1 次 n=299	化疗 n=300
总生存期 OS				
事件发生数 (%)	371 (58%)	438 (69%)	157 (53%)	199 (66%)
中位值 (月) (95% CI)	16.7 (13.9, 19.7)	12.1 (11.3, 13.3)	20.0 (15.4, 24.9)	12.2 (10.4, 14.2)
风险比* (95% CI)	0.81 (0.71, 0.93)		0.69 (0.56, 0.85)	
p 值†	0.00364		0.0006	
无进展生存期 PFS				
事件发生数 (%)	507 (80%)	506 (79%)	221 (74%)	233 (78%)

中位值 (月) (95% CI)	5.4 (4.3, 6.2)	6.5 (6.3, 7.0)	7.1 (5.9, 9.0)	6.4 (6.1, 6.9)
风险比*† (95% CI)	1.07 (0.94, 1.21)		0.81 (0.67, 0.99)	
P 值†	-‡		NS§	
客观缓解率				
ORR† (95% CI)	27% (24, 31)	27% (23, 30)	39% (33.9, 45.3)	32% (26.8, 37.6)
完全缓解率	0.5%	0.5%	0.7%	0.3%
部分缓解率	27%	26%	39%	32%
缓解持续时间				
持续时间≥ 12 个月的百分比¶	47%	16%	42%	17%
持续时间≥ 18 个月的百分比¶	26%	6%	25%	5%

*基于分层 Cox 比例风险模型

†基于分层对数秩检验; P值边界为0.0291

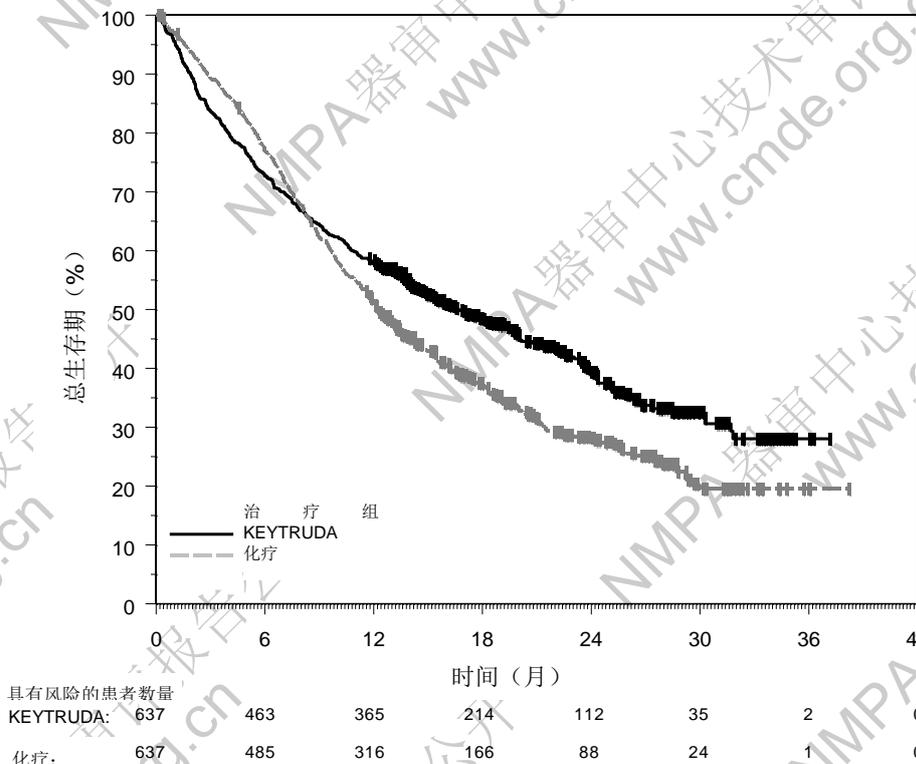
‡由于次要终点的序贯检验程序, 未评估统计学显著性

§与 0.0291 的 P 值对比不显著

¶基于观察到的持续时间

在预先指定的 TPS 1-49% NSCLC 患者探索性亚组分析中, pembrolizumab 组的 OS 中位数为 13.4 个月(95% CI: 10.7, 18.2), 化疗组为 12.1 个月(95% CI: 11.0, 14.0), HR 为 0.92 (95% CI: 0.77, 1.11)。

图 1: KEYNOTE-042 中所有随机化患者 (TPS≥1%) 的总生存期 Kaplan-Meier 曲线



KEYNOTE 024：一线治疗 NSCLC 患者对照试验

KEYTRUDA 的疗效在实验 24 中进行了研究，此研究是一项随机、开放标签、多中心的对照试验(12)。主要入组标准是经 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）筛选的 PD-L1 阳性（TPS [肿瘤比例评分] ≥ 50%或更高）、既往未接受治疗的转移性 NSCLC 患者。不适合接受 EGFR 或 ALK 基因突变、2 年内需要全身治疗的自身免疫性疾病、患有需要免疫抑制的疾病，或者在研究开始前 26 周内接受过超过 30 Gy 胸部放射治疗的患者。患者随机接受 KEYTRUDA 200 mg 每 3 周一次（n = 154）或研究者选择的含铂化疗（n = 151；包括培美曲塞+卡铂，培美曲塞+顺铂，吉西他滨+顺铂，吉西他滨+卡铂，或紫杉醇+卡铂。非鳞状 NSCLC 患者可接受培美曲塞维持治疗）。KEYTRUDA 治疗将持续直至出现不可接受的毒性、发生疾病进展或最多 35 次给药。对于随后发生的疾病进展，可以重新启动 KEYTRUDA 治疗，并且可以额外给药长达 1 年。如果患者临床上病情稳定并且研究者认为患者临床获益，则允许 KEYTRUDA 给药超过疾病进展的时限。每 9 周进行一次肿瘤状态评估。发生疾病进展的化疗患者可以选择 KEYTRUDA 治疗。

试验 24 中的 305 例患者的基线特征为：中位数年龄为 65 岁（54%的患者年龄 ≥ 65 岁）；61% 为男性；82% 为白人，15% 为亚裔；35% 的 ECOG 体能状态为 0；65% 的 ECOG 体能状态为 1。疾病特征为鳞状细胞癌（18%）和非鳞状细胞癌（82%）；M1（99%）；脑转移（9%）。

主要终点是盲法独立中心审查（BICR）根据实体瘤疗效评价标准 RECIST 1.1 进行评估的无进展生存期 PFS。其它疗效指标为 BICR 基于 RECIST 1.1 评估的总生存期（OS）和客观缓解率（ORR）。表 11 总结了所有意向治疗（ITT）人群的关键疗效指标。

表 11：KEYNOTE -024 的疗效

终点	KEYTRUDA 200 mg, 每 3 周一次 (n=154)	化疗 n=151
PFS*		
患者人数 (%)	73 (47%)	116 (77%)
危害比† (95% CI)	0.50 (0.37, 0.68)	---
P 值†	<0.001	---
中位值 (月) (95% CI)	10.3 (6.7, NA)	6.0 (4.2, 6.2)
OS		
患者数 (%)	44 (29%)	64 (42%)
危害比† (95% CI)	0.60 (0.41, 0.89)	---
P 值†	0.005	---
中位值 (月) (95% CI)	未达到(NA, NA)	未达到 (9.4, NA)
客观缓解率*		
ORR % (95% CI)	45% (37, 53)	28% (21, 36)

完全缓解率	4%	1%
部分缓解率	41%	27%

*BICR 基于 RECIST 1.1 进行的评估

†危害比 (KEYTRUDA 与化疗相比)

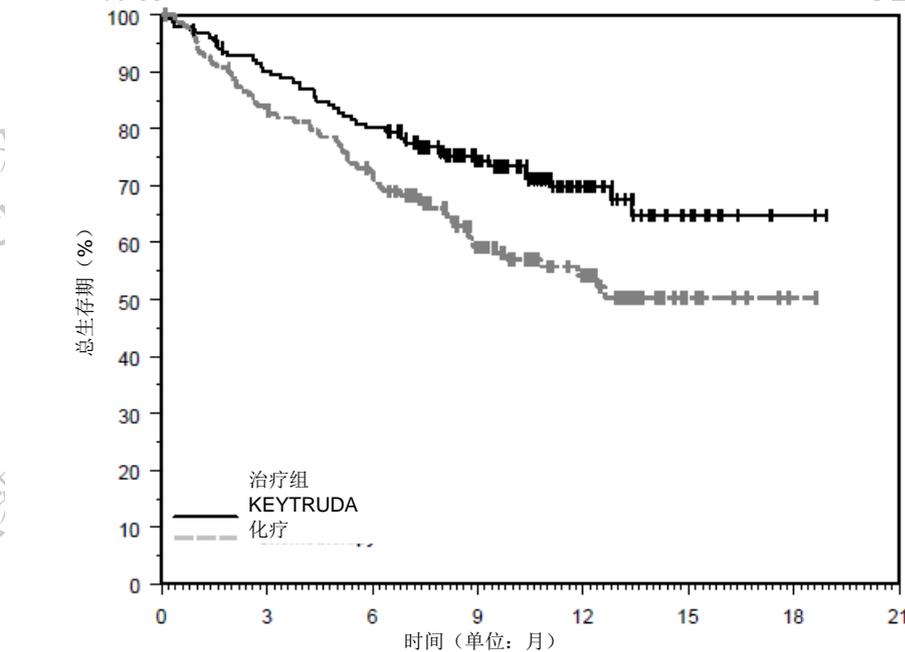
基于分层 Cox 比例风险模型

‡基于分层对数秩检验

NA = 不适用

在 69 例随机分配接受 200mg KEYTRUDA 治疗并获得了客观缓解的患者中，缓解持续时间范围为 1.9+至 14.5+月。这些缓解患者中，88%的缓解持续时间 \geq 6 个月（基于 Kaplan-Meier 估计值；图 2）。

图 2: KEYNOTE-024 的总生存期的 Kaplan-Meier 曲线。



KEYNOTE 010: 既往接受过化疗的 NSCLC 患者中开展的对照试验

在 KEYNOTE 010 (1:1 随机且为多中心、开放式的对照试验) 中研究 KEYTRUDA 功效 (13)。关键入选标准为, 接受过含铂类药物化疗 (如 ALK 或 EGFR 突变靶向治疗) 后发生疾病进展的晚期 NSCLC 患者, 且使用 PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 临床试验用试剂盒 (CTA) 检测 PD-L1 表达肿瘤比例评分 (TPS) $\geq 1\%$ 。入选研究样本中回顾性的肿瘤样本占 44%, 新近获得的肿瘤样本占 56%。以下为患者入组的排除条件: 自身免疫疾病患者; 需要接受免疫抑制治疗的疾病患者; 前 26 周内接受胸部放射治疗剂量超过 30Gy 的患者。患者随机 (1:1:1) 接受 2 mg/kg (n=344) 或 10 mg/kg (n=346) KEYTRUDA 治疗, 每 3 周一次; 或每 3 周一次的 75 mg/m² 多西他赛治疗 (n=343)。患者接受 KEYTRUDA 治疗, 直至出现具有症状、进展迅速、需要紧急干预并伴随体能状态下降的不可接受的毒性反应或者疾病进展, 或者在 4 到 6 周内出现重复影像检查予以证实的不可接受的毒性反应或疾病进展。无病情进展的患者接受最长 24 个月或 35 个治疗疗程, 以时间较长者为准。后续疾病进展可重新接受最多 1 年的治疗。每 9 周进行一次肿瘤状态评估。主要疗效指标为 BICR 基于 RECIST 1.1 评估的 OS 和 PFS。

使用 CTA 试剂盒检测的研究中随机分配了 1,033 例 NSCLC 患者。为了评价 PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 的临床功效, 在一家美国参考实验室, 采用 PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织

化学法)对存档的临床研究样本进行了回顾性检测。从 1,033 例患者中,挑选了 529 例患者的肿瘤组织用 PD-L1 检测试剂盒(免疫组织化学法)进行了回顾性检测。其中,413 例患者标本有 PD-L1 表达($\geq 1\%$ 的存活肿瘤细胞表现出了任意强度的胞膜染色),94 例患者标本没有 PD-L1 表达($< 1\%$ 的存活肿瘤细胞表现出了任意强度的胞膜染色)。这 413 例有 PD-L1 表达的患者中,163 例患者标本的 PD-L1 表达量较高($\geq 50\%$ 的存活肿瘤细胞表现出了任意强度的胞膜染色)。

CTA 与 PD-L1 检测试剂盒(免疫组织化学法)之间的一致水平见表 12。

表 12: CTA 与 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）一致性比较

一致率	PD-L1 临界值	阴性一致率（95%置信区间(CI)）	阳性一致率（95%置信区间(CI)）
CTA 对比 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）	TPS \geq 1%	94.5% [91.4%-96.6%]	80.0% [76.9%-82.8%]
	TPS \geq 50%	98.3% [97.1%-99.0%]	73.2% [67.9%-77.9%]

通过 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）检测出具有 PD-L1 表达的随机分配的患者中，治疗组之间的人口统计学和其它基线特征分布均衡。年龄中位数为 63 岁（44% 的患者年龄 \geq 65 岁）。大多数患者为白人（77%）和男性（58%）；基线 ECOG 体能状态为 0（29%）或 1（71%）。78% 的患者是既往 / 当前吸烟者。22% 的患者罹患鳞状细胞癌，69% 的患者罹患非鳞状细胞癌。整个临床研究中，帕博利珠单抗组与多西他赛组之间分布的基线和人口统计学特征相似。

表 13 和 14 对疗效进行了总结。PD-L1 表达（TPS \geq 1%）的 NSCLC 患者对 KEYTRUDA 治疗显示持久的临床获益，采用 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）检测的 PD-L1 高表达（TPS \geq 50%）的患者的临床获益更明显。获益的程度与整个临床试验中的获益程度相当。下表总结了总临床研究（TPS \geq 1%，CTA）的 PD-L1 表达（TPS \geq 1%）总人群和 PD-L1 高表达（TPS \geq 50%）亚集以及 PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）测定的 PD-L1 表达人群中的关键疗效指标。PD-L1 检测试剂盒（免疫组织化学法）测定的 OS（TPS \geq 1%）的 Kaplan-Meier 曲线见图 3。2 mg/kg 和 10 mg/kg KEYTRUDA 组的疗效相似。

表 13: 既往接受过治疗的 NSCLC 患者对 KEYTRUDA 的反应: 总体临床试验和 PD-L1 表达患者 (TPS ≥1%), 采用 PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 予以检测

终点	KEYTRUDA 2 mg/kg, 每 3 周一次		KEYTRUDA 10 mg/kg, 每 3 周一次		多西他赛 75 mg/m ² , 每 3 周一次	
	临床试验	PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法)	临床试验	PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法)	临床试验	PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法)
患者人数	344	140	346	142	343	131
OS						
死亡率 (%)	172 (50%)	59 (42%)	156 (45%)	59 (42%)	193 (56%)	67 (51%)
危害比* (95% CI)	0.71 (0.58, 0.88)	0.54 (0.37, 0.78)	0.61 (0.49, 0.75)	0.57 (0.39, 0.82)	---	---
P 值†	<0.001	<0.001	<0.001	0.00115	---	---
中位值 (月) (95% CI)	10.4 (9.4, 11.9)	11.8 (9.6, NA)	12.7 (10.0, 17.3)	12.0 (8.7, NA)	8.5 (7.5, 9.8)	7.5 (6.3, 9.9)
PFS‡						
事件率 (%)	266 (77%)	97 (63%)	255 (74%)	103 (73%)	257 (75%)	94 (72%)
危害比* (95% CI)	0.88 (0.73, 1.04)	0.68 (0.50, 0.92)	0.79 (0.66, 0.94)	0.79 (0.59, 1.06)	---	---
P 值†	0.068	0.00578	0.005	0.05767	---	---
中位值 (月) (95% CI)	3.9 (3.1, 4.1)	4.9 (4.1, 6.2)	4.0 (2.6, 4.3)	4.0 (2.2, 4.6)	4.0 (3.1, 4.2)	3.8 (2.2, 4.2)
总缓解率§						
ORR % § (95% CI)	18% (14, 23)	24% (17, 32)	18% (15, 23)	20% (14, 28)	9% (7, 13)	5% (2, 11)

* 风险比 (KEYTRUDA 与多西他赛相比), 基于分层 Cox 比例风险模型

† 基于分层对数秩检验

‡ BICR 基于 RECIST 1.1 进行的评估

§ 所有缓解均为部分缓解

表 14:

既往接受过治疗的 NSCLC 患者对 KEYTRUDA 的反应: 总体临床试验和高水平 PD-L1 表达患者 (TPS≥50%), 采用 PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 予以检测

终点	KEYTRUDA 2 mg/kg, 每 3 周一次		KEYTRUDA 10 mg/kg, 每 3 周		多西他赛 75 mg/m ² , 每 3 周	
	临床试验	PD-L1 IHC 22C3 pharmDx	临床试验	PD-L1 IHC 22C3 pharmDx	临床试验	PD-L1 IHC 22C3 pharmDx
患者人数	139	56	151	60	152	47
OS						
死亡率 (%)	58 (42%)	18 (32%)	60 (40%)	19 (32%)	86 (57%)	25 (53%)
危害比* (95% CI)	0.54 (0.38, 0.77)	0.45 (0.24, 0.84)	0.50 (0.36, 0.70)	0.29 (0.15 0.56)	---	---
P 值 [†]	<0.001	0.00541	<0.001	<0.001	---	---
中位值 (月) (95% CI)	14.9 (10.4, NA)	未达到 (9.3, NA)	17.3 (11.8, NA)	未达到 (8.3, NA)	8.2 (6.4, 10.7)	7.2 (4.4, 8.3)
PFS[‡]						
事件率 (%)	89 (64%)	33 (59%)	97 (64%)	34 (57%)	118 (78%)	33 (70%)
危害比* (95% CI)	0.58 (0.43, 0.77)	0.47 (0.28, 0.80)	0.59 (0.45, 0.78)	0.41 (0.24, 0.70)	---	---
P 值 [†]	<0.001	0.00221	<0.001	<0.001	---	---
中位值 (月) (95% CI)	5.2 (4.0, 6.5)	5.9 (4.2, 9.0)	5.2 (4.1, 8.1)	4.8 (2.8, NA)	4.1 (3.6, 4.3)	3.9 (2.0, 4.3)
总缓解率[§]						
ORR % [§] (95% CI)	30% (23, 39)	37% (25, 52)	29% (22, 37)	28% (18, 41)	8% (4, 13)	4% (1, 15)

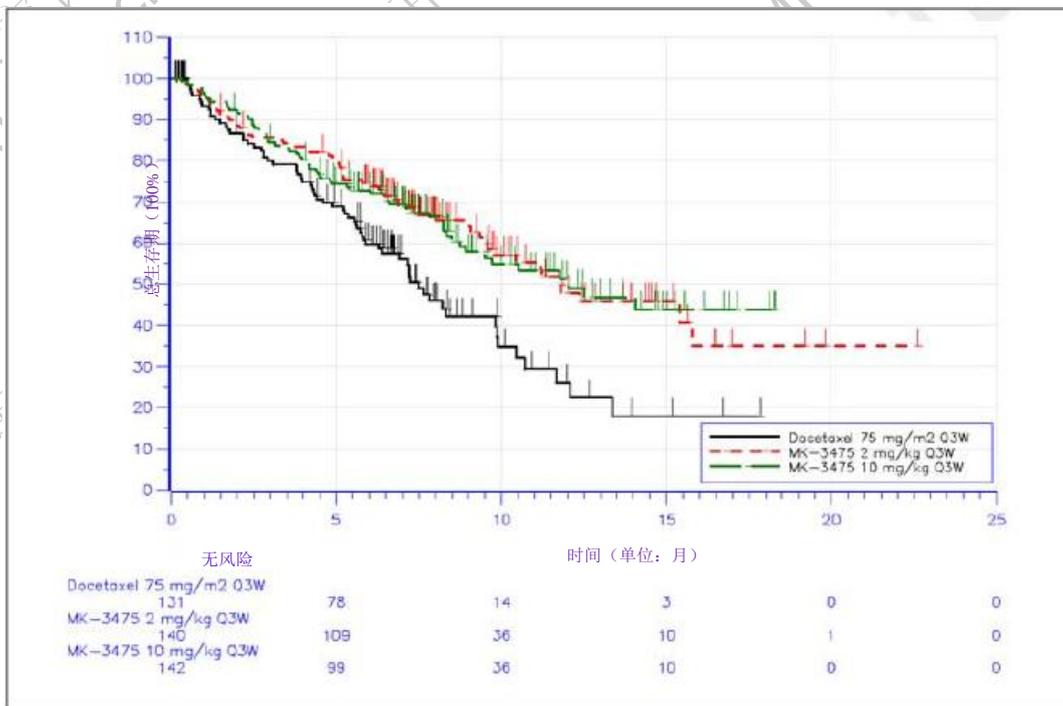
* 风险比 (KEYTRUDA 与多西他赛相比), 基于分层 Cox 比例风险模型

[†] 基于分层对数秩检验

[‡] BICR 基于 RECIST 1.1 进行的评估

[§] 所有缓解均为部分缓解

图 3: 按治疗组列出的总生存期的 Kaplan-Meier 曲线 (采用 PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 予以检测, TPS ≥1%, 意向治疗人群)



考虑到 PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 检测到 PD-L1 表达 (TPS ≥1%)、但 CTA 检测无 PD-L1 表达 (TPS <1%) 的患者数据缺失所造成的潜在影响, 因此实施了额外的稳定性分析。具有此类检测结果的患者是 PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 的预期用途 / 意向诊断 (ITD) 人群的一部分; 但是, 基于 CTA 筛选没有 PD-L1 表达, 他们被排除于临床试验。对于这些缺失的数据, 实施了灵敏度分析, 以理解 ITD 框架下基于 PD-L1 检测试剂盒 (免疫组织化学法) 测定的 TPS ≥1% 和 TPS ≥50% 亚集人群中的预估风险比 (HR) 的合理范围, 验证与 CTA 入组时的 HR 观察值之间的一致性。HR 灵敏度分析结果表明, HR 预估值对于 ITD 框架下的任何假设的治疗效果的衰减具有稳健性。

【注意事项】

1. 用于体外诊断。
2. 供专业人员使用。
3. 此产品含有叠氮化钠 (NaN₃), 纯品有较高毒性。该产品中 NaN₃ 浓度较低, 虽不归类为危险品, 但产品中的 NaN₃ 可与铅或铜管反应, 生成高度易爆的金属叠氮化物积聚物。处置时, 用大量水冲洗, 以防止管道中金属叠氮化物的蓄积 (3)。
4. 一抗、阴性对照试剂、Linker 和显色试剂包含动物来源的材料。

5. 样本（固定前和固定后）和与样本接触的所有材料均应按照传播感染类物品进行处理，并且处置时需采取适当的预防措施（4）。
6. 使用非规定的孵育时间、温度或方法可能得出错误的结果。
7. 试剂已经最优化稀释。进一步稀释可能导致抗原染色不足。
8. 显色试剂（液态 DAB+色原和制备好的 DAB+底物-色原溶液）如果暴露于过强光线下，则可能受到不利影响。避免在强光（如直射阳光）下保存系统组分或进行染色。
9. 石蜡残留可能会导致假阴性结果。
10. 使用非推荐量的试剂可能会导致 PD-L1 免疫反应量损失。
11. 一项小型研究结果显示，原发性与转移性 NSCLC 标本对之间的 PD-L1 表达水平的动态范围类似。同一患者中，原发肿瘤与转移灶之间的 PD-L1 表达水平可能存在差异。
12. 大组织切片可能需要 3x150 μ l 的试剂。
13. 作为一般性的规则，未满 18 岁的人员不允许操作本产品。必须向用户认真传达工作规程、产品的危险性质和必要的安全操作指导。请参见安全资料表（SDS）了解更多信息。
14. 佩戴合适的个人防护设备，以避免接触眼睛和皮肤。
15. 未使用的溶液应遵照当地、州和联邦法规处置。
16. 可应要求向专业用户提供安全资料表。
17. 对于美国以外的国家，请参阅当地 KEYTRUDA 产品标签从而获得批准的适应症和表达临界值，以指导治疗。



危险

DAB+色原： 1-5%的 3,3',4,4'-二氨基联苯胺盐酸盐

- | | |
|-----------|--------------------------|
| H350 | 可能致癌。 |
| H341 | 怀疑可能导致基因缺陷。 |
| P201 | 使用前，需要专门的操作说明。 |
| P202 | 操作前，阅读并理解所有安全注意事项。 |
| P280 | 佩戴防护手套。佩戴防护眼镜或面具。穿防护服。 |
| P308+P313 | 如果接触或有疑虑：就医。 |
| P405 | 上锁保存。 |
| P501 | 遵照当地、地区、国家和国际法规处置内容物和容器。 |



警告

免疫组化抗原修复缓冲液，低 pH 值（50x）： 1-5%柠檬酸

- | | |
|------|-----------------|
| H319 | 导致严重的眼睛刺激。 |
| H411 | 对水生物有毒性，影响长期持续。 |
| P280 | 佩戴防护眼镜或面具。 |
| P273 | 避免排入环境。 |

P264 操作后彻底洗手。

P305 + P351 + P338 如果进入眼睛：仔细水洗几分钟。如果配戴有隐形眼镜且方便取下，取下后继续冲洗。

P337 + P313 如果眼睛持续感觉刺激：就医。

P501 遵照当地、地区、国家和国际法规处置内容物和容器。

【标识的解释】

 产品编号	 温度限制	 体外诊断医疗器械
 制造商	 批次代码	 足够用于<N>次检测
 有效期	 查阅使用说明	 欧盟授权代表

【参考文献】

1. Keytruda® package insert.
2. R. Phelps, et al., *Journal of Cellular Biochemistry Supplement* (1996) 24:32-91.
3. Department of Health, Education and Welfare, National Institutes for Occupational Safety and Health, Rockville, MD. "Procedures for the decontamination of plumbing systems containing copper and/or lead azides." DHHS (NIOSH) Publ. No. 78-127, Current 13. August 16, 1976.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document M29-A3 [ISBN 1-56238-567-4]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 – 1898 USA, 2000.
5. Taylor CR and Rudbeck L. Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods. Sixth Edition. Dako, Carpinteria, California; 2013.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCCLS). Quality assurance for Immunocytochemistry; Approved guideline. CLSI document MM4-A (1-56238-396-5) CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA; 1999.
7. Omata M, Liew C-T, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B s surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Path* 1980; 73:626.
8. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *International Immunol* 2007 (19); 7:813.
9. Brown JA, Dorfman DM, Ma F-R, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, et al. Blockade of Programmed Death-1 Ligands on Dendritic Cells Enhances T Cell Activation and Cytokine Production. *J Immunol* 2003; 170:1257.
10. Cooper WA, Tran T, Vilain RE, Madore J, Seliger CI, Kohonen-Cornish M, et al. PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. *Lung Cancer* 2015; 89:181.
11. Chen B, Chapuy B, Ouyang J et al. PD-L1 Expression Is Characteristic of a Subset of Aggressive B-cell Lymphomas and Virus-Associated Malignancies. *Clin Cancer Res* 2013; 19:3462-3473.
12. Reck, M, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer (KEYNOTE-024). *The New England Journal of Medicine (NJEM.org)* 2016 Oct 09; 1- 11.
13. Herbst RS, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *The Lancet online*; 2015 Dec 19.
14. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *New Eng J Med* 2015; 372:2018-28.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：美国丹科北美有限公司

Dako North America, Inc.

住所：6392 Via Real Carpinteria, CA 93013 United States

生产地址：1170 Mark Ave. Carpinteria, CA 93013 United States

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

代理人的名称：安捷伦科技（中国）有限公司

住所：北京市朝阳区望京北路3号研发中心（一期）3层 3-1至3-3室

联系方式：

【医疗器械注册证编号】

【产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】