

DOI: 10.18027/2224-5057-2019-9-4-25-31

**Цитирование:** Завалишина Л.Э., Повилайтите П.Э., Савелов Н.А., Андреева Ю.Ю., Петров А.В. и др. Сравнение иммуногистохимических тестов в рамках исследования CLOVER Российского общества клинической онкологии. Злокачественные опухоли. 2019;9(4):25–31

## СРАВНЕНИЕ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ ТЕСТОВ В РАМКАХ ИССЛЕДОВАНИЯ CLOVER РОССИЙСКОГО ОБЩЕСТВА КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ

Л.Э. Завалишина<sup>1</sup>, П.Э. Повилайтите<sup>2</sup>, Н.А. Савелов<sup>3</sup>, Ю.Ю. Андреева<sup>1</sup>, А.В. Петров<sup>2</sup>, Г.А. Раскин<sup>4</sup>, Е.А. Харитонова<sup>5</sup>, И.М. Пугач, А.А. Румянцев<sup>6</sup>, Г.А. Франк<sup>1</sup>, Е.Н. Имянитов<sup>7</sup>, И.В. Тимофеев<sup>6</sup>, С.А. Тюлядин<sup>6</sup>

1. ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

2. ГБУ Ростовской области «Патолого-анатомическое бюро», Ростов-на-Дону, Россия

3. ГБУЗ «Московская городская онкологическая больница № 62 Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва, Россия

4. ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

5. Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии», Москва, Россия

6. ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

7. ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

8. АНО «Бюро по изучению рака почки», Москва, Россия

### Резюме:

**Введение.** Целью исследования CLOVER, проведенного Российским обществом клинической онкологии, было попарное сравнение трех валидированных иммуногистохимических (ИГХ) тестов PD-L1 (Ventana SP142, Ventana SP263, Dako 22C3) на одной и той же популяции пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). Данное исследование — это первое крупное российское сравнительное исследование по оценке определения уровней экспрессии PD-L1 методами иммуногистохимии.

**Материалы и методы.** Работа проведена на 473 образцах НМРЛ, полученных из Биобанка. Иммуногистохимическое исследование проведено с использованием 3 клонов антител. Четыре подготовленных патологоанатома независимо оценивали процентное содержание положительно окрашенных опухолевых клеток (ОК) и иммунных клеток (ИК). Для оценки корреляции ОК и ИК между различными анализами и прогностических свойств одного теста для другого был проведен конкордантный анализ.

**Результаты.** Число PD-L1-позитивных клеток (1% и более) было выше среди ИК по сравнению с ОК во всех трех иммуногистохимических исследованиях. Коэффициенты корреляции Пирсона (PCC) для ОК составили 0,71, 0,87 и 0,75 между 22C3/SP142, 22C3/SP263 и SP263/SP142 соответственно. Значения PCC для ИК составили 0,45, 0,61 и 0,68 для тех же пар. Было получено высокое совпадение положительных и отрицательных результатов (>91%) между окрашиванием, полученным с антителами 22C3 и SP263 для иммуноонкологических препаратов в 1 линии.

**Выводы.** Наиболее высокая корреляция ИГХ анализов была получена при попарном сравнении 22C3 и SP263. Клон 22C3 можно рассматривать в качестве замены SP263 при лечении НМРЛ в первой линии. Клон SP142 показал более слабую экспрессию в ОК и ИК по сравнению с двумя другими анализами у пациентов с плоскоклеточным раком.

**Ключевые слова:** немелкоклеточный рак легкого, ингибиторы контрольных точек иммунитета, оценка экспрессии PD-L1, иммуногистохимический метод.

В последние годы в терапии немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) появился новый подход, основанный на ингибиторах контрольных точек иммунитета, таких как рецептор программируемой клеточной гибели 1 (PD-1) и его лиганд PD-1 (CD274) [1]. Было создано несколько лекарственных препаратов, основанных на ингибировании либо PD-1, либо PD-L1.

Пембролизумаб, анти-PD-1 гуманизированное антитело, рекомендуется в качестве препарата первой линии для пациентов с метастатическим НМРЛ с уровнем экспрессии PD-L1 более 50%, выявляемым иммуногистохимическим (ИГХ) методом с диагностическим антителом 22C3 (Agilent) [2,3]. Недавно пембролизумаб был одобрен к применению в качестве препарата первой линии для

## Собственные исследования

лечения метастатического НМРЛ в комбинации с пеметрекседом и карбоплатином независимо от экспрессии PD-L1 [4] или в качестве препарата второй линии для пациентов с уровнем экспрессии PD-L1  $\geq 1\%$  [5].

Атезолизумаб, анти-PD-L1 гуманизированное антитело, одобрен в комбинации с химиотерапией и бевацизумабом в качестве терапии первой линии для пациентов с метастатическим НМРЛ независимо от уровня экспрессии PD-L1 [6]. Тестирование PD-L1 в данном случае не требуется, но оно может давать полезную информацию [7]. В исследовании ОАК пациенты с высокой экспрессией PD-L1 имели наибольший выигрыш от атезолизумаба по сравнению с доцетакселом [8]. Высокий уровень экспрессии определяли как экспрессию PD-L1 в 50% и более опухолевых клеток (ОК) и в 10% и более опухолевых инфильтрирующих иммунных клеток (ИК) с использованием диагностического антитела SP142 (Ventana Medical Systems).

Ниволумаб — анти-PD-1 антитело — показан при использовании в качестве последующей терапии у всех пациентов с НМРЛ независимо от уровня экспрессии PD-L1 [9]. Дурвалумаб, анти-PD-L1 антитело, одобрен в качестве консолидирующей терапии для пациентов с нерезектабельным НМРЛ III стадии, которые не прогрессировали после 2 или более циклов окончательной одновременной химиолучевой терапии на основе платины [10]. Преимущество без прогрессирования выживаемости при применении дурвалумаба наблюдалось независимо от статуса PD-L1 (<25% или  $\geq 25\%$  позитивных опухолевых клеток), окрашенных диагностическим антителом SP263 (Ventana Medical Systems) до химиолучевой терапии).

Оценка экспрессии PD-L1 в опухолях легкого применяется в качестве биомаркера чувствительности к ингибиторам иммунных контрольных точек, но ее практическое использование оставляет еще много вопросов и проблем как для онкологов, так и для патологов. Так, для определения PD-L1 статуса опухоли и прогнозирования ее ответа на иммунотерапию в клинических исследованиях и рутинной практике используются различные антитела, методы детекции, инструментальные платформы, методы интерпретации и значения отсечения для каждого антитела. Однако патологоанатомические отделения в настоящее время не всегда располагают всеми автоматизированными платформами и реагентами для различных диагностических исследований *in vitro*. Кроме того, выявление экспрессии PD-L1 в НМРЛ проводится после молекулярного тестирования (EGFR, ALK, ROS1), что может повлиять на длительность диагностики и ее стоимость. Поэтому актуальным является вопрос о возможности замены одного диагностикума другим, а также клиническая значимость результатов, получаемых с использованием разных клонов антител.

Целью исследования «CLOVER», проведенного Российским обществом клинической онкологии (RUSSCO), было попарное сравнение трехвалидированных ИГХ тестов PDL1 (22C3, SP142 и SP263) на одной и той же популяции пациентов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования биобанк «RUSSCO» предоставил 500 архивных образцов НМРЛ (фиксированные формалином и залитые в парафин блоки). Время хранения блока составляло от 0,5 до 1 года. Четыреста семьдесят три образца содержали достаточно материала для анализа (27 были исключены из окончательного анализа, поскольку они не соответствовали требованиям к образцам для ИГХ). Пациенты были преимущественно мужского пола (68%) со средним возрастом 61,3 года (диапазон 28–85 лет). Образцы взяты у пациентов с НМРЛ I–IV стадии. Согласно классификации TNM, опухоли T1, T2, T3 и T4 наблюдались у 78 (16,5%), 137 (29,0%), 63 (13,3%), и 195 (41,2%) пациентов, соответственно. Метастазы в лимфатических узлах были обнаружены у 353 (75%) пациентов; у 236 (50%) больных имелись отдаленные метастазы. Образцы НМРЛ имели положительный EGFR у 81 пациента (17%), у 37 (8%) зарегистрирован положительный ALK и у 91 (19%) — вариант плоскоклеточного рака. Ни один из больных не получал лучевой или системной терапии до хирургического лечения.

С каждого блока НМРЛ были подготовлены 4 последовательных среза для проведения исследования с 3 антителами и реагентом негативного контроля. Для контроля протокола ИГХ исследования использовались контрольные клеточные линии и внутрилабораторные тканевые позитивные контроли (ткани миндалин и плаценты). Срезы (1419 стекол) окрашивали анти-PD-L1 антителами, аналогично клиническим испытаниям препаратов: пембролизумаб (клон 22C3; Agilent), атезолизумаб (клон SP142; Ventana Medical Systems), дурвалумаб (клон SP263; Ventana Medical Systems) [3,8,10]. Исследование проводилось в автоматизированных ИГХ стейнерах с использованием оптимизированного закрытого протокола, предоставленного производителем. Клон 22C3 был протестирован на автостейнере DakoLink 48 (Agilent), клоны SP142 и SP263 — на стейнере Ventana Bench Mark ULTRA (Ventana Medical Systems). Четыре подготовленных патологоанатома, сертифицированные Ventana/Roche и Dako/Agilent для интерпретации соответствующих анализов, независимо оценивали процентное содержание позитивных ОК и ИК с любой интенсивностью окрашивания. В случае расхождения мнений при интерпретации результатов принималось консенсусное решение.

## АНАЛИЗ ДАННЫХ

Мы оценивали корреляции между результатами различных анализов, определяющих экспрессию PD-L1 в ОК и ИК. Для оценки вероятности согласия или несогласия между каждой парой тестов были проведены четыре попарных сравнения относительных частот двух тестов, указывающих на положительное или отрицательное окрашивание. Была оценена условная вероятность одного теста, указывающего на положительное или отрицательное окрашивание или экспрессию РНК, с учетом результата каждого другого теста.

**Собственные исследования**

Были использованы следующие критерии оценки: для первой линии лечения НМРЛ показатель TPS (процент жизнеспособных опухолевых клеток с частичным или полным окрашиванием мембраны относительно всех жизнеспособных опухолевых клеток, присутствующих в образце)  $\geq 50\%$  для 22C3, ОК или ИК  $\geq 5\%$  для SP142, ОК  $\geq 25\%$  для SP263, а для второй линии лечения TPS  $\geq 1\%$  для 22C3, ОК  $\geq 50\%$  или ИК  $\geq 10\%$  для SP142, и ОК  $\geq 25\%$  для SP263 (табл. 1).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Наличие позитивной реакции со всеми антителами к PD-L1 отмечалось как в ОК, так и в ИК. Процент PD-L1-позитивных клеток (1% и более) был выше для ИК, чем для ОК во всех трех анализах (54% против 39% для 22C3, 49% против 21% для SP142 и 69% против 51% для SP263). Результаты окрашивания варьировали для ИК и ОК при использовании SP142 по сравнению с другими клонами. Для каждого из этих ИГХ маркеров было проведено также и сравнение по границам отсека в 10%, 25% и 50% PD-L1-позитивных клеток среди ОК и ИК. При пограничном значении положительного окрашивания в 10% ОК наибольшая доля положительных образцов наблюдалась при использовании антител 22C3 (21%) и SP263 (20%), тогда как окрашивание антителом SP142 выявило только 8% образцов, содержащих PD-L1-положительные ОК. Для более высоких отсеков (25% и 50%) были получены аналогичные результаты. При отсеке позитивного результата по 25% ОК антитела 22C3 и SP263 показали, что 16% и 15% образцов имели положительный статус, соответственно. Антитело SP142 окрашивало только 5% образцов. Окрашивание 22C3 и SP263 при точке отсека 50% ОК показало позитивный PD-L1 статус у 12% и 10% пациентов, соответственно, тогда как окрашивание SP142 выявило 3% PD-L1-позитивных образцов.

Наибольшая доля образцов с PD-L1-положительным окрашиванием ИК с использованием порогового значения 10% наблюдалась при использовании антител 22C3 (11%) и SP263 (9%). Антитело SP142 обнаружило 4% позитивных образцов по этому критерию. Использование более высоких отсеков резко уменьшило долю образцов с наличием позитивных иммунных клеток: при отсеке 25% — только 1,1% (22C3), 0,6% (SP142) и 0,8% (SP263). Дальнейшее увеличение величины отсека привело к еще большему снижению доли положительных образцов по окрашиванию ИК (0%–0,2%).

Для оценки результатов ИГХ исследования по окрашиванию ОК и ИК различными тестами был проведен корреляционный анализ. Коэффициенты корреляции Пирсона (PCC) для ОК составили 0,71, 0,87 и 0,75 между 22C3/SP142, 22C3/SP263 и SP263/SP142, соответственно. Значения PCC для ИК составили 0,45, 0,61 и 0,68 для тех же пар. Низкая корреляция наблюдалась между ПЦР-тестом и любым из ИГХ анализов для ОК и ИК. Например, значения PCC между PCR и 22C3 для TC и IC составили 0,36 и 0,14, соответственно.

**Таблица 1. Точки отсека для 22C3, SP142, SP263 для первой и второй линий иммунотерапии**

Линии /препарата	22C3	SP142		SP263
	TPS	ОК или ИК		ОК
Первая	$\geq 50\%$	$\geq 5\%$	$\geq 5\%$	$\geq 25\%$
Вторая	$\geq 1\%$	$\geq 50\%$	$\geq 10\%$	$\geq 25\%$

TPS — Tumor Proportion Score, ОК — опухолевые клетки, ИК — иммунные клетки.

**Таблица 2. Экспрессия PDL1 в опухолях с различным гистологическим вариантом и EGFR и ALK статусом**

ALK-EGFR-статус	22C3		SP142		SP263	
	ОК $\geq 1\%$	ИК $\geq 1\%$	ОК $\geq 1\%$	ИК $\geq 1\%$	ОК $\geq 1\%$	ИК $\geq 1\%$
EGFR - позитивный	31/81 (38%)	39/81 (48%)	19/81 (23%)	47/81 (58%)	45/81 (56%)	60/81 (74%)
EGFR - негативный	153/392 (39%)	217/392 (55%)	82/392 (21%)	187/392 (48%)	196/392 (50%)	264/392 (67%)
ALK-позитивный	17/37 (46%)	12/37 (32%)	13/37 (35%)	14/37 (38%)	17/37 (46%)	12/37 (32%)
ALK-негативный	106/335 (32%)	154/335 (46%)	51/335 (15%)	133/335 (40%)	105/335 (31%)	154/335 (46%)
Плоскоклеточный рак	42/91 (46%)	48/91 (53%)	18/91 (20%)	30/91 (33%)	57/91 (63%)	69/91 (76%)

**Таблица 3. Негативное и позитивное процентное согласование между различными ИГХ тестами в первой и второй линиях**

Вероятность негативного теста В при негативном тесте А						
Тест А	Тест В					
	SP142		SP263		22C3	
	First-line	Second-line	First-line	Second-line	First-line	Second-line
SP142	-	-	92%	85%	97%	65%
SP263	91%	98%	-	-	99%	76%
22C3	88%	99%	91%	99%	-	—
Вероятность позитивного теста В при позитивном тесте А						
SP142	-	-	65%	76%	48%	94%
SP263	68%	28%	-	-	57%	98%
22C3	82%	17%	93%	49%	-	—

Экспрессия PD-L1 выявлялась у пациентов с аденокарциномой с различным статусом драйверных мутаций и с плоскоклеточным раком (табл. 2) Антитела 22C3 и SP263 показали более высокую экспрессию на ОК и ИК по сравнению с двумя другими тестами.

Анализ совпадения результатов ИГХ исследования с разными клонами антител показал высокую корреляцию результатов для клонов 22C3 и SP263 для назначения лечения в первой линии — более 91%, как для положительных, так и для отрицательных результатов (табл. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ

CLOVER — одно из крупнейших гармонизирующих исследований, проведенное для установления степени аналитической согласованности между тремя валидированными диагностическими ИГХ тестами PD-L1, которые использовались в рандомизированных клинических испытаниях ингибиторов контрольных точек у пациентов с НМРЛ. Взаимозаменяемые ИГХ анализы могут облегчить оценку экспрессии белка в рутинной клинической практике и способствовать уменьшению времени проведения тестирования [11,12].

При сравнении результатов ИГХ анализов наиболее согласованные данные были получены при попарном сравнении 22C3 и SP263. В соответствии с предыдущими исследованиями [14–17] SP142 показал стабильно более низкие результаты, чем два других анализа. Таким образом, 22C3 можно рассматривать в качестве замены SP263 при необходимости тестирования в первой линии. Была получена высокая корреляция между окрашиванием 22C3 и SP263 с высоким PCC 0,87 для оценки ОК. Результаты проекта по сопоставимости PD-L1 ИГХ показали, что анализы 22C3 и SP263 дают сопоставимые аналитические результаты для оценки экспрессии PD-L1 на ОК по коэффициентам корреляции [14]. В нашем исследовании положительное процентное согласие между двумя анализами составило 93%, а отрицательное процентное согласие — 91%. Эти данные совпадают с данными исследования Ratcliffe et al. [15], обнаруживших, что SP263 может рассматриваться в качестве замены 22C3 (процентное положительное и отрицательное согласие — от 86% до 98,8%), расширяя показания для анализа SP263 до идентификации пациентов, имеющих показания для назначения пембролизумаба в первой линии. Однако в нашем исследовании было выявлено только 57% положительных 22C3 в случаях с положительным SP263. Поэтому необходимо проявлять осторожность при рассмотрении возможной замены 22C3 на SP263 во всех случаях тестирования. Тем не менее, мы можем предположить, что если пациент отрицателен по SP263 или SP142 в первой линии лечения, повторное тестирование другими тестами не является строго необходимым, это основано на высоком согласии данных анализов (в диапазоне от 91% до 97%) в нашем исследовании. Как правило, положительное совпадение между тремя анализами ИГХ (в диапазоне от 17% до 98%) варьировало больше, чем отрицательное процентное согласие (в диапазоне от 85% до 99%), согласно пороговому значению, используемому для сравнительных анализов. Hendry et al. получили аналогичные результаты [16]. Все три анализа (22C3, SP142 и SP263) дали высокое совпадение для

отрицательных результатов, но для положительных результатов корреляция была низкой.

Мы считаем, что для назначения иммуноонкологических препаратов во 2 линии в случае положительных анализов SP142 или SP263 повторное тестирование по 22C3 может не проводиться. Почти все случаи, которые были положительными на платформе Ventana (94–98%), также были положительными и на платформе Dako. По той же причине повторное тестирование первоначально 22C3-отрицательных образцов по SP142 или SP263 также может не потребоваться (попарное согласие между всеми парами тестов составило 99%).

Экспрессия PD-L1 в ОК у пациентов с EGFR-негативным и EGFR-позитивным НМРЛ была очень сходной независимо от метода оценки. Напротив, более значительные различия в экспрессии PD-L1 были обнаружены в ИК. Пациенты с ALK-позитивным раком легких чаще экспрессировали PD-L1 в ОК, чем пациенты без ALK-перестроек, однако малая выборка не позволяет сделать однозначных выводов. Клон SP142 показал более слабую экспрессию в ОК и ИК по сравнению с двумя другими анализами у пациентов с плоскоклеточным раком. В рамках исследования CLOVER проводился также сравнительный анализ применения ПЦР для определения уровня экспрессии PD-L1, который показал низкую корреляцию ПЦР и ИГХ, в связи с чем определение экспрессии PD-L1 в рутинной практике надо проводить только ИГХ маркерами [18].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование CLOVER демонстрирует, что при сравнении данных ИГХ анализов наиболее согласованные результаты были получены при попарном сравнении 22C3 и SP263. В соответствии с предыдущими исследованиями, SP142 показал стабильно более низкие результаты, чем два других анализа. Мы предполагаем, что анализ 22C3 может предсказать тот же результат (положительный или отрицательный) анализа SP263 у пациентов в терапии первой линии ингибиторами контрольных точек. Пациенты, классифицированные как отрицательные по анализу с SP263 или SP142 с использованием соответствующего правила отсека для лечения первой линии, с высокой вероятностью будут классифицированы как отрицательные любым другим тестом. У пациентов с положительным SP263 и SP142 или отрицательным 22C3 повторное тестирование во второй линии лечения не является необходимым. Новые клинические исследования могут внести коррективы в существующие сейчас значения точек отсека для различных диагностик и в критерии оценки.

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Лариса Э. Завалишина, д. б. н., профессор кафедры патологической анатомии ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия, e-mail: zavalishina1@mail.ru

**Патриция Э. Повилайтите**, д. б. н., ГБУ Ростовской области «Патолого-анатомическое бюро», Ростов-на-Дону, Россия

**Никита А. Савелов**, Заведующий патологоанатомическим отделением, врач-патологоанатом высшей квалификационной категории ГБУЗ г. Москвы «Городская онкологическая больница № 62» ДЗМ, Москва, Россия

**Юлия Ю. Андреева**, д. м. н., врач-патологоанатом, профессор кафедры патологической анатомии ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

**Алексей В. Петров**, ГБУ Ростовской области «Патолого-анатомическое бюро», Ростов-на-Дону, Россия

**Григорий А. Раскин**, д. м. н., руководитель отдела патологической анатомии ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

**Екатерина А. Харитонов**, руководитель медицинского отдела Российское общество клинической онкологии, Москва, Россия

**Алексей А. Румянцев**, врач-онколог отделения клинической фармакологии и химиотерапии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

**Георгий А. Франк**, д. м. н., проф., акад. РАМН, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

**Евгений Н. Имянитов**, член-корреспондент РАН, д. м. н., профессор, Руководитель отдела биологии опухолевого роста лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

**Илья В. Тимофеев**, директор Бюро по изучению рака почки, Москва, Россия

**Сергей А. Тюляндин**, д. м. н., проф., заведующий отделением клинической фармакологии и химиотерапии, заместитель директора по научной работе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

DOI: 10.18027/2224-5057-2019-9-4-25-31

For citation: Zavalishina L. E., Povilaitite P. E., Savelov N. A., Andreeva Yu. Yu., Petrov A. V. et. al. Comparison of immunohistochemical tests in the CLOVER study by Russian society of clinical oncology. Malignant Tumours. 2019; 9(4):25–31 (In Russ)

## COMPARISON OF IMMUNOHISTOCHEMICAL TESTS IN THE CLOVER STUDY BY RUSSIAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY

L. E. Zavalishina<sup>1</sup>, P. E. Povilaitite<sup>2</sup>, N. A. Savelov<sup>3</sup>, Yu. Yu. Andreeva<sup>1</sup>, A. V. Petrov<sup>2</sup>, G. A. Raskin<sup>4</sup>,  
E. A. Kharitonova<sup>5</sup>, I. M. Pugach, A. A. Rumyantsev<sup>6</sup>, G. A. Frank<sup>1</sup>, E. N. Imyanitov<sup>7</sup>, I. V. Tsimafeyeu<sup>8</sup>,  
S. A. Tjulandin<sup>6</sup>

1. Russian Medical Academy of Continuous Medical Education, Moscow, Russia
2. State Budgetary Institution of Rostov Region, Anatomic Pathology Bureau, Rostov-on-Don, Russia
3. Moscow City Oncology Hospital No. 62, Moscow Department of Health, Moscow, Russia
4. Russian Scientific Center of Radiology and Surgical Technologies named after Acad. A. M. Granov, Saint Petersburg, Russia
5. Russian Society of Clinical Oncology, Moscow, Russia
6. N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia
7. National Medical Research Center of Oncology named after N. N. Petrov, Saint Petersburg, Russia
8. Kidney Cancer Research Bureau, Moscow, Russia

### Abstract:

**Introduction.** The goal of the CLOVER study performed by the Russian Society of Clinical Oncology, was a pairwise comparison of three validated PD-L1 immunohistochemical (IHC) tests (Ventana SP142, Ventana SP263, Dako 22C3) in the patient population with non-small cell lung cancer (NSCLC). This study is the first large Russian comparative study to evaluate PD-L1 expression levels using immunohistochemistry methods.

**Materials and methods.** The study was conducted on 473 NSCLC samples from Biobank. The IHC tests were carried out with 3 antibody clones. Four trained pathologists independently evaluated the percentage of positively stained tumor cells (TC) and immune cells (IC). To assess the correlation of TC and IC between different runs and the prognostic values of one test for another, a concordant analysis was used.

# Собственные исследования

**Results.** The number of PD-L1-positive cells ( $\geq 1\%$ ) was higher among IC compared with TC in all three IHC tests. Pearson correlation coefficients (PCC) for TCs were 0.71, 0.87, and 0.75 for 22C3/SP142, 22C3/SP263 and SP263/SP142, respectively. PCC values for ICs were 0.45, 0.61, and 0.68 for the same pairs. A high coincidence of positive and negative results ( $>91\%$ ) was obtained between the staining with antibodies 22C3 and SP263 of immuno-oncological agents in the 1st line.

**Conclusions.** The highest correlation between IHC tests was obtained by pairwise comparison of 22C3 and SP263. Clone 22C3 can be considered as a substitute for SP263 in the first-line treatment of NSCLC. Clone SP142 showed weaker expression in TC and IC compared to the other two tests in patients with non-small cell lung cancer.

**Keywords:** non-small cell lung cancer, immune checkpoint inhibitors, PD-L1 expression assessment, immunohistochemical method.

## INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Larisa E. Zavalishina**, MD, DSc Biol, Professor, Anatomic Pathology Department of the Russian Medical Academy of Continuous Medical Education, Moscow, Russia, e-mail: zavalishina1@mail.ru

**Patricia E. Povilaitite**, MD, DSc Biol, State Budgetary Institution of Rostov Region Anatomic Pathology Bureau, Rostov-on-Don, Russia

**Nikita A. Savelov**, Head of the Pathology Department, Pathologist of the highest qualification category, Moscow City Oncology Hospital No. 62 of the Moscow Department of Health, Moscow, Russia.

**Yulia Yu. Andreeva**, MD, PhD, DSc, Anatomic Pathologist, Professor, Anatomic Pathology Department, Russian Medical Academy of Continuous Medical Education, Moscow, Russia.

**Alexey V. Petrov**, MD, State Budgetary Institution of Rostov Region Anatomic Pathology Bureau, Rostov-on-Don, Russia

**Grigori A. Raskin**, MD, PhD, DSc, Head of Anatomic Pathology Department, Russian Scientific Center of Radiology and Surgical Technologies named after Acad. A. M. Granov, Saint Petersburg, Russia

**Ekaterina A. Kharitonova**, Head of Medical Department, Russian Society of Clinical Oncology, Moscow, Russia

**Aleksey A. Rumyantsev**, MD, medical oncologist, Clinical Pharmacology and Chemotherapy, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia

**Georgy A. Frank**, MD, PhD, DSc, Professor, Academician of Russian Academy of Medical Sciences, Head of Anatomic Pathology Department of the Russian Medical Academy of Continuous Medical Education, Moscow, Russia.

**Evgeny N. Imyanitov**, MD, PhD, DSc, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Tumor Growth Biology, Laboratory of Molecular Oncology, National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Petrov, Saint Petersburg, Russia.

**Ilya V. Tsimafeyeu**, MD, Director of the Kidney Cancer Research Bureau, Moscow, Russia

**Sergey A. Tjulandin**, MD, PhD, DSc, Professor, Head of Clinical Pharmacology and Chemotherapy, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Rangachari D, Costa DB. From Hope to Reality: Durable Overall Survival With Immune Checkpoint Inhibitors for Advanced Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2019 Jun 2; JCO1901207. doi: 10.1200/JCO.19.01207. [Epub ahead of print].
2. Garon EB, Hellmann MD, Rizvi NA, Carcereny E, Leighl NB, et al. Five-Year Overall Survival for Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Treated With Pembrolizumab: Results From the Phase I KEYNOTE-001 Study. *J Clin Oncol*. 2019 Jun 2; JCO1900934. doi: 10.1200/JCO.19.00934. [Epub ahead of print].
3. Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, Kowalski DM, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2019 May 4;393 (10183):1819 – 1830.
4. U. S. Food & Drug Administration. FDA approves pembrolizumab in combination with chemotherapy for first-line treatment of metastatic squamous NSCLC. <https://www.fda.gov/drugs/fda-approves-pembrolizumab-combination-chemotherapy-first-line-treatment-metastatic-squamous-nsclc> Accessed August 12, 2019.
5. Pai-Scherf L, Blumenthal GM, Li H, Subramaniam S, et al. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: First-Line Therapy and Beyond. *Oncologist*. 2017 Nov;22 (11):1392 – 1399.

6. Laktionov K. K., Sarantseva K. A., Breder V. V., Okruzhnova M. A., Peregudova M. V. Immunotherapy for non-small cell lung cancer treatment. *Malignant tumours*. 2016; (3):17–24. (In Russ.).
7. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Non-small cell lung cancer. Version 5.2019. [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/PDF/nscl.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/nscl.pdf)
8. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2017 Jan 21;389 (10066):255–265.
9. Kazandjian D, Suzman DL, Blumenthal G, Mushti S, et al. FDA Approval Summary: Nivolumab for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer With Progression On or After Platinum-Based Chemotherapy. *Oncologist*. 2016 May;21 (5):634–42.
10. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017 Nov 16;377 (20):1919–1929.
11. Imyanitov EN, Demidova IA, Gordiev MG, Filipenko ML, et al. Distribution of EGFR Mutations in 10,607 Russian Patients with Lung Cancer. *Mol Diagn Ther*. 2016 Aug;20 (4):401–6.
12. Zavalishina L, Tsimafeyu I, Povilaitite P, Raskin G, et al. RUSSCO-RSP comparative study of immunohistochemistry diagnostic assays for PD-L1 expression in urothelial bladder cancer. *Virchows Arch*. 2018 Dec;473 (6):719–724.
13. Isobe K, Kakimoto A, Mikami T, Kaburaki K, et al. PD-L1 mRNA expression in EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Oncol Rep*. 2018 Jul;40 (1):331–338.
14. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, Beasley MB, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. *J Thorac Oncol*. 2018 Sep;13 (9):1302–1311.
15. Ratcliffe MJ, Sharpe A, Midha A, Barker C, et al. Agreement between Programmed Cell Death Ligand-1 Diagnostic Assays across Multiple Protein Expression Cutoffs in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017 Jul 15;23 (14):3585–3591.
16. Hendry S, Byrne DJ, Wright GM, Young RJ, et al. Comparison of Four PD-L1 Immunohistochemical Assays in Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2018 Mar;13 (3):367–376.
17. Rimm DL, Han G, Taube JM, Yi ES et al. A prospective, multiinstitutional, pathologist-based assessment of 4 immunohistochemistry assays for PD-L1 expression in non-small cell lung cancer. *JAMA Oncol*. 2017;3:1051–1058.
18. Tsimafeyu I, Imyanitov E, Zavalishina L, et al. Agreement between PDL1 immunohistochemistry assays and polymerase chain reaction in non-small cell lung cancer: CLOVER comparison study. *Sci Rep*. 2020;10 (1):3928. Published 2020 Mar 3. doi:10.1038/s41598-020-60950-2