

**Monoclonal Mouse  
Anti-Human PD-L1**  
Clone 22C3

**English  
Code M3653**

<b>Intended use</b>	For in vitro diagnostic use. Monoclonal Mouse Anti-Human PD-L1, Clone 22C3, is intended for use in immunohistochemistry. This antibody labels PD-L1 in normal and neoplastic tissue. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified pathologist. This antibody is intended to be used after the primary diagnosis of tumor has been made by conventional histopathology using nonimmunologic histochemical stains.
<b>Synonyms for antigen</b>	Programmed Death-Ligand 1 (1).
<b>Summary and explanation</b>	Binding of the PD-1 ligands, PD-L1 and PD-L2, to the PD-1 receptor found on T cells, inhibits T cell proliferation and cytokine production (2). Up-regulation of PD-1 ligands occurs in some tumors and signaling through this pathway can contribute to inhibition of active T-cell immune surveillance of tumors (3). Blockade of PD-1 interaction with PD-L1 and PD-L2 releases PD-1 pathway-mediated inhibition of the immune response, including the anti-tumor immune response (4).  Refer to Dako's <i>General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> or the detection system instructions of IHC procedures.
<b>Reagent provided</b>	Monoclonal mouse antibody provided in liquid form in 0.05 mol/L Tris-HCl, 0.015 mol/L sodium azide, 1% bovine serum albumin, pH 7.2. <u>Clone:</u> 22C3 (5). <u>Isotype:</u> IgG1. <u>Mouse IgG concentration mg/L:</u> See label on vial.  The protein concentration between lots may vary without influencing the optimal dilution. The titer of each individual lot is compared and adjusted to a reference lot to ensure a consistent immunohistochemical staining performance from lot-to-lot.
<b>Immunogen</b>	Human extracellular domain of PD-L1 (Phe19-Thr239) fused to a human IgG1 fragment (R&D Systems Catalogue No. 156-B7-100) (5)
<b>Specificity</b>	In Western blotting of recombinant human PD-L1 protein, Monoclonal Mouse Anti-Human PD-L1, Clone 22C3 labels a band corresponding to ~40 kDa (5).
<b>Precautions</b>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. For professional users.</li><li>2. This product contains sodium azide (NaN<sub>3</sub>), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.</li><li>3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.</li><li>4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.</li><li>5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.</li></ol>
<b>Storage</b>	Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.
<b>Specimen preparation</b>	<u>Paraffin sections:</u> The antibody can be used for labeling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm. <u>Pre-treatment:</u> Please refer to EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Code K8005) for instructions on how to perform pretreatment of slides.
<b>Staining procedure</b>	These are guidelines only. Optimal conditions may vary depending on specimen type and preparation method, and should be validated individually by each laboratory. The performance of this antibody should be established by the user when utilized with other manual staining systems or automated platforms. <u>Dilution:</u> The recommended dilution of Monoclonal Mouse Anti-Human PD-L1, Clone 22C3, Code M3653, is 1:50. Dilute the antibody in Dako Antibody Diluent with Background-Reducing Components (Code S3022). Incubate pretreated tissue sections for 30 minutes at room temperature.

**Negative control:** The recommended negative control reagent is Dako Negative Control, Mouse IgG1 (Code X0931) diluted to the same IgG1 concentration as the primary antibody. Unless the stability of the diluted antibody and negative control has been established in the actual staining procedure, dilute these reagents immediately prior to use. Positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens.

**Visualization:** The recommended EnVision™ FLEX HRP visualization system is using 30-minute incubation at room temperature. The incubation time for EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) (Code K8021/K8022) is 30 minutes at room temperature. Follow the procedure enclosed with the selected visualization system(s).

Note: Use EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, **Low pH** (50x) (Code K8005) for HIER.

The incubation time for DAB enhancer (S196131-2) is 5 minutes at room temperature.

**Counterstaining:** The recommended counterstain is EnVision™ FLEX Hematoxylin (Code K8008/K8018). For optimal results, non-aqueous, permanent mounting medium is recommended.

**Controls:** Positive and negative control tissues should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include tonsil and the cells/structures should display reaction patterns as described for this tissue in the "Performance characteristics" section.

**Staining interpretation** The cellular staining pattern is membranous.

**Performance characteristics**

Normal tissues:

Plasma membrane staining was observed on immune cells and cells of epithelial origin. Cytoplasmic staining was noted in some cell types but was not recorded as positive staining. Table 1 summarizes PD-L1 immunoreactivity on the recommended panel of normal tissues. All tissues were formalin-fixed and paraffin-embedded and stained with Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3 according to the instructions in this package insert. There were no unexpected results observed in cell types or tissue types tested. The observed staining was consistent with the reported literature for PD-L1 IHC expression in normal tissues (1, 2).

**Table 1: Summary of Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3 normal tissue reactivity**

Tissue Type (# tested)	Positive Tissue Elements	Tissue Type (# tested)	Positive Tissue Elements
Adrenal (3)	0/3	Parathyroid (3)	1/3 Glandular epithelium
Bone marrow (3)	3/3 Megakaryocyte	Pancreas (3)	0/3
Breast (3)	0/3	Pituitary (3)	1/3 Anterior hypophysis
Cerebellum (3)	0/3		1/3 Posterior hypophysis
Cerebrum (3)	0/3	Prostate (2)	2/2 epithelium
Cervix (3)	1/3 epithelial cells	Salivary Gland (3)	0/3
Colon (3)	1/3 Lymphocytes	Skin (3)	0/3
	1/3 Macrophages	Small Intestine (3)	0/3
Esophagus (3)	0/3	Spleen (3)	2/3 Macrophages
Kidney (3)	1/3 Tubular epithelium	Stomach (3)	2/3 Lymphocytes
Liver (3)	1/3 Macrophages		1/3 gastric glands
	1/3 Hepatocytes	Testis (3)	0/3
Lung (3)	3/3 Macrophages	Thymus (3)	3/3 Medulla
Mesothelial cells (2)	0/2	Thyroid (3)	0/3
Muscle, cardiac (3)	0/3	Tonsil (3)	3/3 Crypt epithelium
Muscle, skeletal (3)	0/3		2/3 macrophages
Nerve, peripheral (3)	0/3	Uterus (3)	0/3
Ovary (3)	0/3		

Abnormal tissues:

Plasma membrane staining was observed on immune cells and cells of epithelial origin. Cytoplasmic staining was noted in some cell types but was not recorded as positive staining. Table 2 summarizes PD-L1 immunoreactivity on a panel of neoplastic tissues. All tissues were formalin-fixed and paraffin-embedded and stained with Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3 according to the instructions in this package insert. There were no unexpected results observed in the tumor specimens tested. The observed staining was consistent with the reported literature for PD-L1 IHC expression in neoplastic tissues (1-4).

**Table 2: Summary of Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3 neoplastic tissue reactivity**

Tumor Type	Location	PD-L1 positive/total N=159
Adenocarcinoma	Appendix	0/1
	Breast, DCIS	0/2
	Breast, invasive ductal	0/7
	Breast, invasive ductal metastatic to lymph node	0/1
	Cervix, endocervical type	0/1
	Colon	0/5
	Colon, metastatic to liver	0/1
	Colon, mucinous	0/1
	Esophagus	0/1
	Gallbladder	1/5
	GI, metastatic to lung	0/1
	Head & neck, hard palate	0/1
	Lung	1/4
	Ovary	0/1
	Ovary, endometrioid	0/1
	Ovary, mucinous	0/1
	Ovary, serous	0/1
	Pancreas	0/2
	Pancreas, ductal	0/3
	Prostate	0/5
	Rectum	0/4
	Salivary/parotid gland	0/2
	Small intestine	0/2
	Stomach	0/6
Stomach, mucinous	0/1	
Thyroid, follicular	0/1	
Thyroid, follicular-papillary	0/1	
Thyroid, papillary	0/3	
Uterus, clear cell	0/1	
Uterus, endometrium	0/3	
Adrenocortical carcinoma	Adrenal	0/1
Astrocytoma	Cerebrum	0/3
Basal cell carcinoma	Skin	0/1
Carcinoma	Nasopharyngeal, NPC	0/1
Chondrosarcoma	Bone	0/1
Chordoma	Pelvic cavity	0/1
Embryonal carcinoma	Testis	0/1
Ependymoma	Brain	0/1
Glioblastoma	Brain	0/1
Hepatoblastoma	Liver	0/1
Hepatocellular carcinoma	Liver	0/5
Islet Cell tumor	Pancreas	0/1
Interstitialoma	Colon	0/1
	Rectum	0/1
	Small intestine	0/1
Leiomyosarcoma	Soft tissue, chest wall	0/1
	Bladder	0/1
Lymphoma		
Anaplastic Large Cell	Lymph node	0/1

Diffuse B-cell	Lymph node	0/4
Hodgkin	Lymph node	2/2
Non-Hodgkin	Lymph node	1/1
Medulloblastoma	Brain	0/1
Medullary carcinoma	Thyroid	0/1
Melanoma	Rectum	0/1
	Nasal cavity	0/1
Meningioma	Brain	0/2
Mesothelioma	Peritoneum	0/1
Neuroblastoma	Retroperitoneum	0/1
Neurofibroma	Soft tissue, lower back	0/1
Osteosarcoma	Bone	0/2
Pheochromocytoma	Adrenal	0/1
Primitive Neuroectodermal Tumor (PNET)	Retroperitoneum	0/1
Renal Cell carcinoma		
Papillary	Kidney	0/1
Clear Cell	Kidney	0/6
Rhabdomyosarcoma	Soft tissue, embryonal	0/1
	Prostate	0/1
	Retroperitoneum	0/1
Seminoma	Testis	0/2
Signet Ring Cell carcinoma	Metastatic colon signet ring cell carcinoma to ovary	0/1
	Colon	0/1
Small cell carcinoma	Lung	0/1
Spermatocytoma	Testis	0/2
Squamous Cell carcinoma	Metastatic esophageal squamous cell carcinoma to lymph node	0/1
	Cervix	2/5
	Esophagus	0/7
	Head & neck	0/2
	Lung	1/2
	Skin	0/2
	Uterus	0/1
Synovial Sarcoma	Pelvic cavity	0/1
Thymoma	Mediastinum	1/1
Transitional Cell carcinoma	Bladder	0/6
	Kidney	0/1

---

## Français

### Réf. M3653

<b>Utilisation prévue</b>	<p>Pour utilisation diagnostique in vitro.</p> <p>Le Monoclonal Mouse Anti-Human PD-L1, Clone 22C3, est destiné à être utilisé en immunohistochimie. L'anticorps marque la protéine PD-L1 dans les tissus sains et néoplasiques. L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste certifié. Cet anticorps est destiné à être utilisé après un diagnostic primaire de tumeur par histopathologie traditionnelle utilisant des colorations histochimiques non immunologiques.</p>
<b>Synonymes de l'antigène</b>	Ligand de mort programmée 1 (1).
<b>Résumé et explication</b>	<p>La liaison des ligands de PD-1, PD-L1 et PD-L2, au récepteur PD-1 détecté sur les lymphocytes T inhibe la prolifération des lymphocytes T et la production de cytokine (2). Une régulation en amont des ligands PD-1 se produit dans certaines tumeurs et la signalisation par cette voie peut contribuer à l'inhibition de la surveillance immunitaire active des tumeurs par les lymphocytes T (3). Le blocage de l'interaction de PD-1 avec les ligands PD-L1 et PD-L2 permet l'inhibition par la voie PD-1 de la réponse immunitaire, notamment la réponse immunitaire anti-tumorale (4).</p> <p>Se référer au document <i>General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> (Instructions générales de coloration immunohistochimique) de Dako ou aux instructions du système de détection relatives aux procédures IHC.</p>
<b>Réactif fourni</b>	<p>L'anticorps monoclonal de souris fourni sous forme liquide dans un tampon Tris-HCl à 0,05 mol/L, contenant de l'azide de sodium à 0,015 mol/L et 1% de sérum albumine bovine, pH 7,2.</p> <p><u>Clone</u> : 22C3 (5). <u>Isotype</u> : IgG1.</p> <p><u>Concentration des IgG de souris en mg/L</u> : voir l'étiquette sur le flacon.</p> <p>La concentration en protéines peut varier d'un lot à l'autre sans que cela influence la dilution optimale. Le titre de chaque lot est comparé et ajusté par rapport à un lot de référence pour assurer des performances de coloration immunohistochimiques cohérentes d'un lot à l'autre.</p>
<b>Immunogène</b>	Le domaine extracellulaire humain de PD-L1 (Phe19-Thr239) a fusionné avec un fragment IgG1 humain (Catalogue R&D Systems N°156-B7-100) (5)
<b>Spécificité</b>	Dans les analyses par Western blot de protéines humaines recombinantes PD-L1, le Monoclonal Mouse Anti-Human PD-L1, Clone 22C3 marque une bande correspondant à ~40 kDa (5).
<b>Précautions d'emploi</b>	<p>6. Pour utilisateurs professionnels.</p> <p>7. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.</p> <p>8. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.</p> <p>9. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau.</p> <p>10. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.</p>
<b>Conservation</b>	Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par des différences dans les procédures du laboratoire et qu'un problème lié à l'anticorps est suspecté, contacter l'assistance technique de Dako.
<b>Préparation des échantillons</b>	<p><u>Coupes en paraffine</u> : l'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus inclus en paraffine et fixés au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons tissulaires doit être d'environ 4 µm.</p> <p><u>Prétraitement</u> : se reporter à la notice de la solution EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (réf. K8005) pour des instructions concernant le prétraitement des lames.</p>

## Procédure de coloration

Il ne s'agit là que de conseils. Les conditions optimales peuvent varier en fonction du type de prélèvement et de la méthode de préparation, et doivent être validées individuellement par chaque laboratoire. Les performances de cet anticorps doivent être établies par l'utilisateur lorsqu'il est utilisé avec d'autres systèmes de coloration manuelle ou plates-formes automatisées.

**Dilution :** la dilution recommandée pour l'anticorps Monoclonal Mouse Anti-Human PD-L1, Clone 22C3, réf. M3653, est de 1:50. Diluer l'anticorps avec le produit Dako Antibody Diluent with Background-Reducing Components (réf. S3022). Incuber les coupes de tissu prétraitées pendant 30 minutes à température ambiante.

**Contrôle négatif :** le réactif de contrôle négatif recommandé est le Dako Negative Control, Mouse IgG1 (réf. X0931), dilué à la même concentration en IgG1 que l'anticorps primaire. À moins que la stabilité de l'anticorps dilué et du contrôle négatif n'ait été établie lors de la procédure de coloration en cours, diluer ces réactifs immédiatement avant utilisation. Des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patients.

**Visualisation :** le système de visualisation EnVision™ FLEX HRP recommandé assure une incubation de 30 minutes à température ambiante. La durée d'incubation du système EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) (réf. K8021/K8022) est de 30 minutes à température ambiante. Suivre la procédure incluse dans le(s) système(s) de révélation sélectionné(s).

Remarque : utiliser la solution EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, **Low pH** (50x) (réf. K8005), pour la méthode HIER.

La durée d'incubation du DAB enhancer (S196131-2) est de 5 minutes à température ambiante.

**Contre-coloration :** le contre-colorant recommandé est le produit EnVision™ FLEX Hematoxylin (réf. K8008/K8018). Pour des résultats optimaux, l'utilisation d'un milieu de montage permanent non aqueux est recommandée.

**Contrôles :** des tissus de contrôle positifs et négatifs doivent être testés en parallèle selon le même protocole que pour les échantillons de patients. Le tissu de contrôle positif doit comprendre l'amygdale et les cellules/structures doivent présenter des schémas de réaction tels que ceux décrits pour ce tissu à la section "Performances".

## Interprétation de la coloration

Le motif de coloration cellulaire est membranaire.

## Performances

### Tissus sains :

La coloration de la membrane plasmique a été observée sur des cellules immunitaires et des cellules d'origine épithéliale. La coloration cytoplasmique a été remarquée sur certains types de cellules, mais n'a pas été retenue comme coloration positive. Le Tableau 1 résume l'immunoréactivité de PD-L1 sur le panel de tissus sains recommandé. Tous les tissus ont été fixés au formol et inclus en paraffine, puis colorés à l'anticorps Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3 conformément aux instructions de la notice. Aucun résultat inattendu n'a été observé sur les types de cellules ou de tissus testés. La coloration observée était cohérente avec celle indiquée dans les publications retenues pour l'expression par IHC de PD-L1 dans les tissus sains (1, 2).

**Tableau 1 : Résumé de la réactivité à l'anticorps Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3 dans les tissus sains**

Type de tissu (nb. testés)	Éléments tissulaires positifs	Type de tissu (nb. testés)	Éléments tissulaires positifs
Amygdale (3)	3/3 épithélium cryptique	Muscle, squelettique (3)	0/3
	2/3 macrophages	Nerf périphérique (3)	0/3
Cellules mésothéliales (2)	0/2	Œsophage (3)	0/3
Cerebrum (3)	0/3	Ovaire (3)	0/3
Cervelet (3)	0/3	Pancréas (3)	0/3
Col de l'utérus (3)	1/3 cellules épithéliales	Parathyroïde (3)	1/3 épithélium glandulaire
Côlon (3)	1/3 lymphocytes	Peau (3)	0/3
	1/3 macrophages	Poumon (3)	3/3 macrophages
Estomac (3)	2/3 lymphocytes	Prostate (2)	2/2 épithélium
	1/3 glandes gastriques	Rate (3)	2/3 macrophages
Foie (3)	1/3 macrophages	Rein (3)	1/3 épithélium tubulaire
	1/3 hépatocytes	Sein (3)	0/3
Glande salivaire (3)	0/3	Surrénale (3)	0/3
Hypophyse (3)	1/3 adénohypophyse	Testicule (3)	0/3
	1/3 neurohypophyse	Thymus (3)	3/3 médulla
Intestin grêle (3)	0/3	Thyroïde (3)	0/3
Moelle osseuse (3)	3/3 mégacaryocyte	Utérus (3)	0/3

Muscle, cardiaque (3)	0/3		
-----------------------	-----	--	--

**Tissus anormaux :**

La coloration de la membrane plasmique a été observée sur des cellules immunitaires et des cellules d'origine épithéliale. La coloration cytoplasmique a été remarquée sur certains types de cellules, mais n'a pas été retenue comme coloration positive. Le Tableau 2 résume l'immunoréactivité de PD-L1 sur un panel de tissus néoplasiques. Tous les tissus ont été fixés au formol et inclus en paraffine, puis colorés à l'anticorps Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3 conformément aux instructions de la notice. Aucun résultat inattendu n'a été observé sur les échantillons tumoraux testés. La coloration observée était cohérente avec celle indiquée dans les publications retenues pour l'expression par IHC de PD-L1 dans les tissus néoplasiques (1-4).

**Tableau 2 : Résumé de la réactivité à l'anticorps Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3 dans les tissus néoplasiques**

Type de tumeur	Emplacement	Positif au PD-L1/total (N = 159)
Adénocarcinome	Appendice	0/1
	Col de l'utérus, type endocervical	0/1
	Côlon	0/5
	Côlon, métastatique jusqu'au foie	0/1
	Côlon, mucineux	0/1
	Estomac	0/6
	Estomac, mucineux	0/1
	GI, métastatique jusqu'au poumon	0/1
	Glande salivaire/parotide	0/2
	Intestin grêle	0/2
	Œsophage	0/1
	Ovaire	0/1
	Ovaire, endométrioïde	0/1
	Ovaire, mucineux	0/1
	Ovaire, séreux	0/1
	Pancréas	0/2
	Pancréas, canalaire	0/3
	Poumon	1/4
	Prostate	0/5
	Rectum	0/4
	Sein, canalaire invasif	0/7
	Sein, CCIS	0/2
	Sein, métastatique canalaire invasif jusqu'aux ganglions lymphatiques	0/1
	Tête et cou, palais dur	0/1
	Thyroïde, folliculaire	0/1
	Thyroïde, folliculaire-papillaire	0/1
	Thyroïde, papillaire	0/3
	Utérus, cellules claires	0/1
Utérus, endomètre	0/3	
Vésicule biliaire	1/5	
Astrocytome	Cerebrum	0/3
Carcinome	Nasopharyngé, NPC	0/1
Carcinome à cellules basales	Peau	0/1
Carcinome à cellules en bague à chaton	Carcinome à cellules en bague à chaton métastatique jusqu'aux ovaires	0/1
	Côlon	0/1
Carcinome à cellules rénales		
Cellules claires	Rein	0/6
Papillaire	Rein	0/1
Carcinome à cellules transitionnelles	Rein	0/1

	Vessie	0/6
Carcinome à petites cellules	Poumon	0/1
Carcinome corticosurrénal	Surrénal	0/1
Carcinome embryonnaire	Testicule	0/1
Carcinome épidermoïde	Carcinome épidermoïde œsophagien métastatique jusqu'aux ganglions lymphatiques	0/1
	Col de l'utérus	2/5
	Œsophage	0/7
	Peau	0/2
	Poumon	1/2
	Tête et cou	0/2
	Utérus	0/1
Carcinome hépatocellulaire	Foie	0/5
Carcinome médullaire	Thyroïde	0/1
Chondrosarcome	Os	0/1
Chordome	Cavité pelvienne	0/1
Épendymome	Cerveau	0/1
Glioblastome	Cerveau	0/1
Hépatoblastome	Foie	0/1
Interstitialome	Côlon	0/1
	Intestin grêle	0/1
	Rectum	0/1
Léiomyosarcome	Tissus mous, paroi thoracique	0/1
	Vessie	0/1
Lymphome		
Anaplasique à grandes cellules	Ganglion lymphatique	0/1
Diffuse à cellules B	Ganglion lymphatique	0/4
Hodgkinien	Ganglion lymphatique	2/2
Non hodgkinien	Ganglion lymphatique	1/1
Médulloblastomes	Cerveau	0/1
Mélanome	Cavité nasale	0/1
	Rectum	0/1
Méningiome	Cerveau	0/2
Mésothéliome	Péritoine	0/1
Neuroblastome	Rétropéritoine	0/1
Neurofibrome	Tissus mous, bas du dos	0/1
Osteosarcome	Os	0/2
Phéochromocytome	Surrénal	0/1
Rhabdomyosarcome	Prostate	0/1
	Rétropéritoine	0/1
	Tissus mous, embryonnaires	0/1
Sarcome synovial	Cavité pelvienne	0/1
Séminome	Testicule	0/2
Spermatocytome	Testicule	0/2
Thymome	Médiastin	1/1
Tumeur des cellules des îlots pancréatiques	Pancréas	0/1
Tumeur neuro-ectodermique primitive (TNEP)	Rétropéritoine	0/1



---

**Deutsch**  
**Code-Nr. M3653**

<b>Verwendungszweck</b>	Zur In-vitro-Diagnostik. Monoclonal Mouse Anti-Human PD-L1, Clone 22C3, ist zur Verwendung in der Immunhistochemie bestimmt. Dieser Antikörper markiert PD-L1 in normalem und neoplastischem Gewebe. Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit geeigneten Kontrollen ergänzt werden und von einem approbierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer diagnostischer Tests des Patienten vorgenommen werden. Dieser Antikörper kommt nach der Primärdiagnose des Tumors durch konventionelle Histopathologie unter Verwendung von nicht immunologischen histochemischen Färbungen zum Einsatz.
<b>Synonyme Bezeichnungen des Antigens</b>	Programmierter Zelltod-Ligand 1 (1).
<b>Zusammenfassung und Erklärung</b>	Die Bindung der PD-1-Liganden PD-L1 und PD-L2 an den PD-1-Rezeptor, welcher sich auf T-Zellen findet, hemmt die T-Zellproliferation und Zytokinproduktion (2). Die Hochregulierung von PD-1-Liganden kommt in einigen Tumoren vor, und die Signalgebung über diesen Signalweg kann zur Hemmung der aktiven T-Zell-Immunüberwachung von Tumoren beitragen (3). Die Blockade der Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 bzw. PD-L2 führt zu einer über den PD-1-Signalweg vermittelten Hemmung der Immunreaktion, einschließlich der antitumorösen Immunreaktion (4).  Folgende Angaben bitte den <i>General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> (Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung) oder den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen.
<b>Geliefertes Reagenz</b>	Monoklonaler Maus-Antikörper in flüssiger Form in 0,05 mol/L Tris-HCl-Puffer, 0,015 mol/L Natriumazid, 1% Rinderserum-Albumin, pH 7,2. <u>Klon:</u> 22C3(5). <u>Isotyp:</u> IgG1. <u>Konzentration Maus-IgG mg/L:</u> Siehe Produktetikett. Die Proteinkonzentration kann zwischen Chargen abweichen, ohne die optimale Verdünnung zu beeinflussen. Der Titer jeder Charge wird mit dem einer Referenzcharge verglichen und dieser angeglichen, um konstante immunhistochemische Färbeergebnisse zwischen den Chargen zu gewährleisten.
<b>Immunogen</b>	Humane extrazelluläre Domäne von PD-L1 (Phe19-Thr239) fusioniert mit einem humanem IgG1-Fragment (R&D Systems, Katalog-Nr. 156-B7-100) (5)
<b>Spezifität</b>	Beim Western Blot des rekombinanten humanen PD-L1-Proteins markiert der Monoclonal Mouse Anti-Human PD-L1, Clone 22C3 eine Bande, die ~40 kDa entspricht (5).
<b>Vorsichtsmaßnahmen</b>	11. Für geschultes Fachpersonal. 12. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natriumazid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metallazid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metall-Azid-Anreicherung zu vermeiden. 13. Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden. 14. Entsprechende persönliche Schutzausrüstung (PSA) tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden. 15. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend den örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Bestimmungen zu entsorgen.
<b>Lagerung</b>	Bei 2 bis 8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer überprüft werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produkts. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientengewebeproben mitgeführt werden. Wenn eine unerwartete Anfärbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann, und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist Kontakt mit dem technischen Kundendienst von Dako aufzunehmen.

**Gewebevorbereitung**

Paraffinschnitte: Der Antikörper kann für die Markierung von formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten verwendet werden. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.

Vorbehandlung: Informationen zur Durchführung der Vorbehandlung von Objektträgern finden Sie in den Anweisungen für EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Code-Nr. K8005).

**Färbeverfahren**

Diese Angaben sind nur Richtlinien. Optimale Bedingungen können je nach Gewebetyp und Vorbereitungsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Die Leistung dieses Antikörpers sollte vom Benutzer bei einem Einsatz mit anderen manuellen Färbesystemen oder automatisierten Systemen ermittelt werden.

Verdünnung: Die empfohlene Verdünnung des Monoclonal Mouse Anti-Human PD-L1, Clone 22C3, Code-Nr. M3653, ist 1:50. Den Antikörper in Dako Antibody Diluent with Background-Reducing Components (Code-Nr. S3022) verdünnen. Die vorbehandelten Gewebeschnitte 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

Negativkontrolle: Als Negativkontrollreagenz wird Dako Negative Control, Mouse IgG1 (Code-Nr. X0931) empfohlen, das auf dieselbe IgG1-Konzentration wie der primäre Antikörper verdünnt wurde. Es wird empfohlen, Antikörper und Negativkontrolle unmittelbar vor deren Verwendung zu verdünnen, außer wenn deren Stabilität im aktuellen Färbeverfahren festgelegt ist. Positiv- und Negativkontrollen sollten zur gleichen Zeit wie die Patientengewebe getestet werden.

Detektionssystem: Das empfohlene EnVision™ FLEX HRP-Detektionssystem führt eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur durch. Die Inkubationszeit für EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) (Code-Nr. K8021/K8022) beträgt 30 Minuten bei Raumtemperatur. Das dem gewählten Detektionssystem beiliegende Verfahren befolgen.

Hinweis: EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, **Low pH** (50x) (Code-Nr. K8005) für HIER verwenden. Die Inkubationszeit für DAB Enhancer (S196131-2) beträgt 5 Minuten bei Raumtemperatur.

Gegenfärbung: Die empfohlene Gegenfärbung ist EnVision™ FLEX Hematoxylin (Code-Nr. K8008/K8018). Für optimale Ergebnisse wird ein nichtwässriges permanentes Eindeckmedium empfohlen.

Kontrollen: Positiv- und Negativkontrollgewebe sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientengewebe getestet werden. Das Positivkontrollgewebe sollte Mandelgewebe enthalten, und die Zellen/Strukturen sollten die für dieses Gewebe im Abschnitt „Leistungseigenschaften“ beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen.

**Auswertung der Färbung**

Das zelluläre Färbemuster ist membranös.

**Leistungseigenschaften**Normalgewebe:

Eine Plasmamembranfärbung wurde bei Immunzellen und Zellen epithelialen Ursprungs beobachtet. Bei einigen Zelltypen trat eine zytoplasmatische Färbung auf, wurde aber nicht als positive Färbung verzeichnet. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Immunreaktivität von PD-L1 bei den empfohlenen normalen Geweben. Alle Gewebe wurden formalinfixiert, paraffineingebettet und mit Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3, gemäß den Anweisungen dieser Packungsbeilage eingefärbt. Bei den getesteten Zell- oder Gewebetypen wurden keine unerwarteten Ergebnisse beobachtet. Die auftretende Färbung stimmte mit der angegebenen Fachliteratur zur PD-L1-IHC-Expression in normalem Gewebe überein(1, 2).

**Tabelle 1: Übersicht über Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3, Reaktivität in normalem Gewebe**

Gewebetyp (Anz. getestet)	Positive Gewebe-Elemente	Gewebetyp (Anz. getestet)	Positive Gewebe-Elemente
Brust (3)	0 von 3	Mandeln (3)	3 von 3 Kryptenepithelen
Dickdarm (3)	1 von 3 Lymphozyten		2 von 3 Makrophagen
	1 von 3 Makrophagen	Mesothelzellen (2)	0 von 2
Dünndarm (3)	0 von 3	Milz (3)	2 von 3 Makrophagen
Eierstock (3)	0 von 3	Nebenniere (3)	0 von 3
Großhirn (3)	0 von 3	Nebenschilddrüse (3)	1 von 3 Drüsenepithelen
Haut (3)	0 von 3	Nerv, peripher (3)	0 von 3
Herzmuskel (3)	0 von 3	Niere (3)	1 von 3 Tubulusepithelen
Hoden (3)	0 von 3	Pankreas (3)	0 von 3
Hypophyse (3)	1 von 3 anterioren Hypophysen	Prostata (2)	2 von 2 Epithelen
	1 von 3 posterioren Hypophysen	Schilddrüse (3)	0 von 3

Kleinhirn (3)	0 von 3	Skelettmuskulatur (3)	0 von 3
Knochenmark (3)	3 von 3 Megakaryozyten	Speicheldrüsen (3)	0 von 3
Leber (3)	1 von 3 Hepatozyten	Speiseröhre (3)	0 von 3
	1 von 3 Makrophagen	Thymus (3)	3 von 3 Medullae
Lunge (3)	3 von 3 Makrophagen	Uterus (3)	0 von 3
Magen (3)	2 von 3 Lymphozyten	Zervix (3)	1 von 3 Epithelzellen
	1 von 3 Magendrüsen		

**Anormales Gewebe:**

Eine Plasmamembranfärbung wurde bei Immunzellen und Zellen epithelialen Ursprungs beobachtet. Bei einigen Zelltypen trat eine zytoplasmatische Färbung auf, wurde aber nicht als positive Färbung verzeichnet. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Immunreaktivität von PD-L1 bei neoplastischem Gewebe. Alle Gewebe wurden formalinfixiert, paraffineingebettet und mit Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3, gemäß den Anweisungen dieser Packungsbeilage eingefärbt. Bei den getesteten Tumorproben wurden keine unerwarteten Ergebnisse beobachtet. Die auftretende Färbung stimmte mit der angegebenen Fachliteratur zur PD-L1-IHC-Expression in neoplastischem Gewebe überein (1–4).




**Tabelle 2: Übersicht über Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3, Reaktivität in neoplastischem Gewebe**

Tumortyp	Location (Standort)	PD-L1-positiv/insgesamt (N = 159)
Adenokarzinome	Blinddarm	0 von 1
	Brust, DCIS	0 von 2
	Brust, invasiv-duktral	0 von 7
	Brust, invasiv-duktral mit Lymphknotenmetastasen	0 von 1
	Dickdarm	0 von 5
	Dickdarm, mit Lebermetastasen	0 von 1
	Dickdarm, muzinös	0 von 1
	Dünndarm	0 von 2
	Eierstöcke	0 von 1
	Eierstöcke, endometrioid	0 von 1
	Eierstöcke, muzinös	0 von 1
	Eierstöcke, serös	0 von 1
	Gallenblase	1 von 5
	GI, mit Lungenmetastasen	0 von 1
	Kopf und Hals, harter Gaumen	0 von 1
	Lunge	1 von 4
	Magen	0 von 6
	Magen, muzinös	0 von 1
	Pankreas	0 von 2
	Pankreas, duktral	0 von 3
	Prostata	0 von 5
	Rektum	0 von 4
	Schilddrüse, follikulär	0 von 1
	Schilddrüse, follikulär-papillär	0 von 1
	Schilddrüse, papillär	0 von 3
	Speichel-/Parotisdrüse	0 von 2
Speiseröhre	0 von 1	
Uterus, Endometrium	0 von 3	
Uterus, klarzellig	0 von 1	
Zervix, endozervikaler Typ	0 von 1	
Astrozytom	Großhirn	0 von 3
Basaliom	Haut	0 von 1
Chondrosarkom	Knochen	0 von 1

Chordom	Beckenhöhle	0 von 1
Embryonales Karzinom	Hoden	0 von 1
Ependymom	Gehirn	0 von 1
Glioblastom	Gehirn	0 von 1
Hepatoblastom	Leber	0 von 1
Inselzelltumor	Pankreas	0 von 1
Interstitialom	Dickdarm	0 von 1
	Dünndarm	0 von 1
	Rektum	0 von 1
Karzinom	Nasopharyngeal, NPC	0 von 1
Kleinzelliges Karzinom	Lunge	0 von 1
Leberzellkarzinom	Leber	0 von 5
Leiomyosarkom	Blase	0 von 1
	Weichteilgewebe, Brustwand	0 von 1
Lymphom		
Anaplastisch großzellig	Lymphknoten	0 von 1
Diffus, B-Zell-	Lymphknoten	0 von 4
Hodgkin	Lymphknoten	2 von 2
Non-Hodgkin	Lymphknoten	1 von 1
Medulläres Karzinom	Schilddrüse	0 von 1
Medulloblastom	Gehirn	0 von 1
Melanom	Nasenhöhle	0 von 1
	Rektum	0 von 1
Meningiom	Gehirn	0 von 2
Mesotheliom	Peritoneum	0 von 1
Nebennierenkarzinom	Nebenniere	0 von 1
Neuroblastom	Retroperitoneum	0 von 1
Neurofibrom	Weichteilgewebe, unterer Rücken	0 von 1
Nierenzellkarzinom		
Klarzellig	Niere	0 von 6
Papillär	Niere	0 von 1
Osteosarkom	Knochen	0 von 2
Phäochromozytom	Nebenniere	0 von 1
Plattenepithelkarzinom	Haut	0 von 2
	Kopf und Hals	0 von 2
	Lunge	1 von 2
	Plattenepithelkarzinom des Osophagus mit Lymphknotenmetastasen	0 von 1
	Speiseröhre	0 von 7
	Uterus	0 von 1
	Zervix	2 von 5
Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)	Retroperitoneum	0 von 1
Rhabdomyosarkom	Prostata	0 von 1
	Retroperitoneum	0 von 1
	Weichteilgewebe, embryonal	0 von 1
Seminom	Hoden	0 von 2
Siegelringzellkarzinom	Dickdarm	0 von 1
	Siegelringzellkarzinom des Colon mit ovariellen Metastasen	0 von 1
Spermatozytom	Hoden	0 von 2
Synovialsarkom	Beckenhöhle	0 von 1
Thymom	Mediastinum	1 von 1
Übergangszellkarzinom	Blase	0 von 6
	Niere	0 von 1

**References /  
Bibliographie /  
Literaturnachweise**

1. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *International Immunol* 2007(19); 7:813.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Ellison AR. Technical Report: Characterization of monoclonal mouse anti-PD-L1 antibody clone 22C3. D29539/rev01/C22282, 2015

<b>REF</b>	Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Consult instructions for use <i>Consulter les instructions d'utilisation</i> <i>Gebrauchsanweisung beachten</i>
	Manufacturer Fabricant Hersteller	<b>LOT</b>	Batch code Code du lot Chargenbezeichnung
<b>EC</b> <b>REP</b>	Authorized representative in the European Community Représentant Autorisé dans la Communauté Européenne Autorisierter Repräsentant in der EU		<b>IVD</b>
		In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	



Dako North America, Inc.  
6392 Via Real  
Carpinteria, California 93013 USA

Tel 805 566 6655  
Fax 805 566 6688  
Technical Support 800 424 0021  
Customer Service 800 235 5763

**EC** **REP**

Dako Denmark A/S  
Produktionsvej 42  
DK-2600 Glostrup Denmark

Tel +45 4485 9500  
Fax +45 4485 9595

www.dako.com

PT0039/Rev C

Edition / Édition / Ausgabe 03/16