

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

Risultati sull'esoma rapidi,
flessibili e scalabili con il
supporto per campioni FFPE
con input ridotto

- Rilevamento di varianti rare con basse frequenze alleliche da gDNA estratto da tessuto FFPE
- Preparazione delle librerie pronte per il sequenziamento in un massimo di 10 ore con circa 4 ore di interventi manuali
- Analisi dei dati e identificazione delle varianti con elevata sensibilità analitica utilizzando l'analisi secondaria DRAGEN™
- Interpretazione definita dall'utente e generazione di report di ricerca con Illumina Connected Insights

illumina®

Sequenziamento dell'esoma dal campione alle informazioni con un partner affidabile

Nel campo della ricerca sul cancro, i campioni d'archivio fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded) contengono moltissime informazioni preziose per gli studi sul cancro. Poiché i campioni FFPE generalmente producono DNA altamente degradato, possono essere difficili da analizzare con i metodi di sequenziamento di nuova generazione (NGS, next-generation sequencing).

ILLUMINA FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment è una soluzione versatile per la preparazione delle librerie (Tabella 1) che utilizza le potenzialità della tecnologia NGS per ottenere un rilevamento altamente sensibile delle varianti a bassa abbondanza in campioni FFPE con input ridotto. Questa soluzione di un unico fornitore comprende il kit di preparazione delle librerie, Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel e i sistemi di sequenziamento Illumina a media e alta processività, fra cui NextSeq™ 2000 System e NovaSeq™ X Series. L'analisi dei dati viene eseguita utilizzando le pipeline DRAGEN disponibili in BaseSpace™ Sequence Hub e Illumina Connected Analytics. Illumina Connected Insights può essere utilizzato per consentire l'analisi e l'interpretazione definite dall'utente.

Flusso di lavoro ottimizzato

ILLUMINA FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment fa parte di un flusso di lavoro integrato per il sequenziamento dell'intero esoma (WES, Whole-Exome Sequencing) normale per il tumore che fornisce prestazioni e qualità dei dati eccellenti. Il flusso di lavoro scalabile inizia con il DNA genomico (gDNA, genomic DNA) estratto da campioni FFPE, seguito dalla preparazione e dall'arricchimento delle librerie. Le librerie arricchite sono sequenziate su sistemi Illumina a media e alta processività e l'identificazione di varianti altamente accurata viene eseguita utilizzando l'analisi secondaria DRAGEN (Figura 1). Questa soluzione di facile utilizzo offre prestazioni elevate per il sequenziamento dell'esoma, fornisce volumi di riempimento di facile automazione e consente il multiplex campioni per una scalabilità efficiente (Tabella 1).

Tabella 1: panoramica di Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

Parametro	Specifica
Tipo di DNA	gDNA da tessuto FFPE
Input di DNA	40 ng di DNA FFPE
Multiplex campioni	96-192 indici doppi unici
Indicazione dei duplicati	Identificatori molecolari univoci (UMI, unique molecular identifier) non casuali
Numero di plex di arricchimento	4 plex
Sistemi di sequenziamento supportati	NextSeq 2000 System, celle a flusso P3 o P4 NovaSeq 6000 System, celle a flusso SP, S1 o S2 NovaSeq X Series, cella a flusso 1.5B
Durata totale del flusso di lavoro ^a	≤10 ore
Interventi manuali totali	Circa 4 ore

a. Include le fasi di preparazione, arricchimento e normalizzazione delle librerie.

Preparazione veloce e flessibile delle librerie

ILLUMINA FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment è un saggio basato sulla ligazione che utilizza un'unica fase di ibridazione per la preparazione rapida delle librerie (Figura 2). Utilizza Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel e consente l'interrogazione dei target mitocondriali o di target aggiuntivi se integrato con Twist Bioscience for Illumina Mitochondrial Panel o Illumina Custom Enrichment Panel v2.

Le librerie pronte per il sequenziamento vengono preparate in un massimo di 10 ore, con solo circa quattro ore di interventi manuali, consentendo ai ricercatori di passare dal DNA estratto al sequenziamento in un solo giorno. Il QIAGEN AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (QIAGEN, n. di catalogo 80234) è raccomandato per l'estrazione del DNA da campioni FFPE.



Figura 1: dai campioni ai report con un singolo partner. Illumina supporta un flusso di lavoro ottimizzato per il WES, che include la preparazione delle librerie, il sequenziamento e l'analisi dei dati.

a. La linea di prodotti Illumina Connected Insights supporta l'analisi definita dall'utente grazie alle chiamate basate su interfaccia di programmazione applicativa (API, Application Programming Interface) indirizzate a fonti di contenuti di terze parti. L'integrazione di Illumina Connected Insights sarà disponibile con un aggiornamento del software DRAGEN nel secondo trimestre del 2025.

Copertura flessibile e scalabile

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment utilizza un pannello di arricchimento dell'esoma mirato, completo e aggiornato. Questa copertura mirata rende possibile una soluzione WES conveniente e normale per il tumore con un numero ottimale di campioni per corsa di sequenziamento (Tabella 2). La copertura del genoma mitocondriale (chrM) può essere aggiunta facilmente utilizzando Twist Bioscience for Illumina Mitochondrial Panel come pannello addizionale nel protocollo Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment. Le regioni di interesse specifiche possono essere aggiunte con pannelli addizionali personalizzati con un massimo di 10.000 sonde utilizzando Illumina Custom Enrichment Panel v2.

Prestazioni di alta qualità

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment presenta la stessa preparazione delle librerie e la stessa chimica di arricchimento di Illumina Cell-Free DNA with Enrichment per consentire prestazioni eccezionali con i campioni FFPE.

 Per maggiori informazioni, leggere la [scheda tecnica Illumina Cell-Free DNA Prep with Enrichment](#).

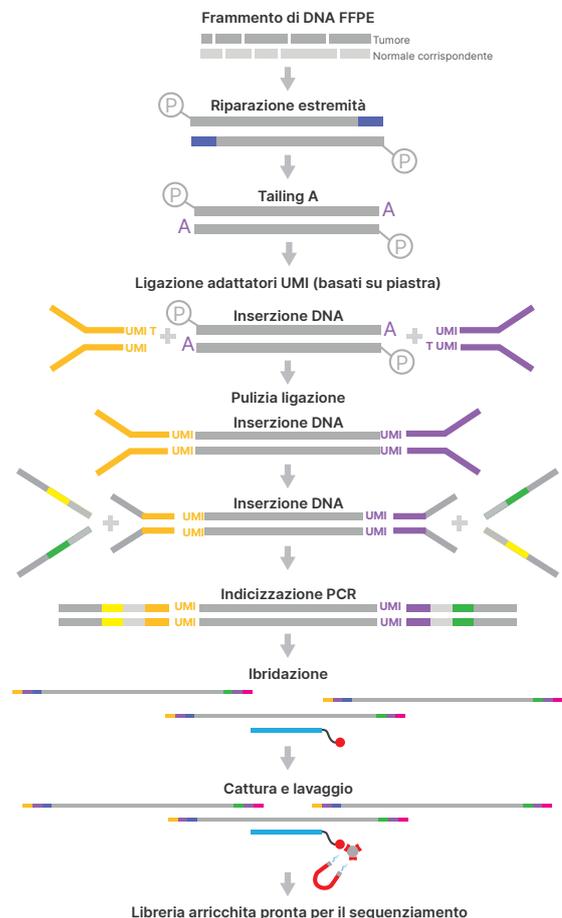


Figura 2: preparazione ottimizzata delle librerie basata sulla ligazione con arricchimento dell'esoma. Dopo l'arricchimento con cattura ibrida, le librerie dell'esoma sono pronte per il sequenziamento.

Tabella 2: numero di plex di sequenziamento per le librerie Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

Tipo di campione	Profondità di copertura del target media desiderata ^a	Letture single-end raccomandate	Numero massimo di librerie per cella a flusso					
			NextSeq 2000 System		NovaSeq 6000 System			NovaSeq X Series
			P3	P4	SP	S1	S2	1.5B
Tumore	≥130×	≥100 milioni	8	12	4	12	28	12
Normale	≥30×	≥28 milioni	8	12	4	12	28	12

a. La copertura target media è stata calcolata con l'impostazione di non accoppiamenti sovrapposti a doppio conteggio.

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment mostra prestazioni eccezionali dei saggi di arricchimento con i campioni di tessuto FFPE. Le librerie sono state preparate a partire da 40 ng di DNA FFPE di input da 12 coppie normali per il tumore utilizzando Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment Kit e Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel. Il sequenziamento è stato eseguito su NovaSeq 6000 System utilizzando la cella a flusso S1 con una profondità di sequenziamento mirata di almeno 100 milioni di letture single-end per il tumore e almeno 28 milioni di letture single-end per i campioni normali corrispondenti. Le librerie di tumori da campioni FFPE di media e alta qualità mostrano una profondità media di copertura target superiore a 130× (dove la copertura media target è stata calcolata con l'impostazione di non accoppiamenti sovrapposti a doppio conteggio) e almeno il 90% dei target ha raggiunto una copertura di almeno 50×, con un impatto minimo su altre metriche di controllo qualità (QC, quality control) delle librerie (Figura 3).

Rilevamento sensibile delle varianti a bassa frequenza

La libreria Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment rileva piccole varianti di DNA a basse frequenze alleliche delle varianti (VAF, variant allele frequency). Le librerie sono state preparate utilizzando 40 ng di Seraseq Tumor Mutation DNA Mix v2 AF10 (SeraCare, n. di catalogo 0710-0094) come campione di "tumore" e 40 ng di Seraseq FFPE WT (DNA/RNA) Reference Material (SeraCare, n. di catalogo 0710-0137) come campione "normale" accoppiato. La miscela di mutazioni è stata diluita a una percentuale inferiore al 10% VAF. Sono stati preparati dodici replicati delle librerie "tumorali" e quattro "normali" per ogni livello VAF. Le 13 librerie arricchite con 4 plex con Twist for Illumina Exome 2.5 Panel sono state sequenziate su due celle a flusso S2 su NovaSeq 6000 System a una lunghezza di lettura di 2 × 151 bp.

Per l'analisi, le letture di sequenziamento delle librerie di tumori sono state sottocampionate a una profondità di lettura di 100 milioni, 70 milioni e 46 milioni di letture single-end per esplorare la relazione tra la copertura sul target compressa in base agli identificatori UMI e il rilevamento delle varianti. Le letture per le librerie normali sono state sottocampionate a 28 milioni di letture single-end. L'identificazione di varianti è stata eseguita utilizzando DRAGEN Somatic App in BaseSpace Sequence Hub.

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment rileva le amplificazioni geniche a una variazione pari a 2,5. I replicati delle librerie sono stati preparati utilizzando 40 ng o 20 ng (quattro replicati ciascuno) di Seraseq Solid Tumor CNV Mix +3 copies (SeraCare, n. di catalogo 0710-2866) come campione di "tumore" e 40 ng di DNA da Seraseq FFPE WT (DNA/RNA) Reference Material (SeraCare, n. di catalogo 0710-0137) come campione "normale" accoppiato. Le librerie sono state sequenziate su una cella a flusso S1 su NovaSeq 6000 System a una lunghezza di lettura di 2×151 bp e le letture di sequenziamento sono state sottocampionate a 100 milioni di letture single-end per la miscela CNV e a 28 milioni di letture per il campione di riferimento del DNA WT. L'identificazione di CNV Somatic è stata eseguita con DRAGEN Somatic App in BaseSpace Sequence Hub utilizzando un file di riferimento da un pannello di normali costruiti da 45 campioni di tessuto FFPE normali e analizzati con l'algoritmo di segmentazione predefinito DRAGEN. I valori riportati sono la media e la deviazione standard degli otto replicati della miscela CNV e confrontati con la variazione prevista riportata da SeraCare.

Il saggio raggiunge il 90% di rilevamento di varianti a singolo nucleotide (SNV, single nucleotide variant) (Figura 4A) e inserzioni/delezioni (indel) (Figura 4B) al 5% di VAF da input di 40 ng con 100 milioni di letture single-end. La sensibilità al 6-7% di VAF rimane elevata con appena 46 milioni di letture per libreria di tumori. È stata osservata una sensibilità del 100% per il rilevamento di 12 amplificazioni geniche a una variazione di circa 2,5 volte in un campione di controllo con tre copie aggiuntive per gene (Figura 5).

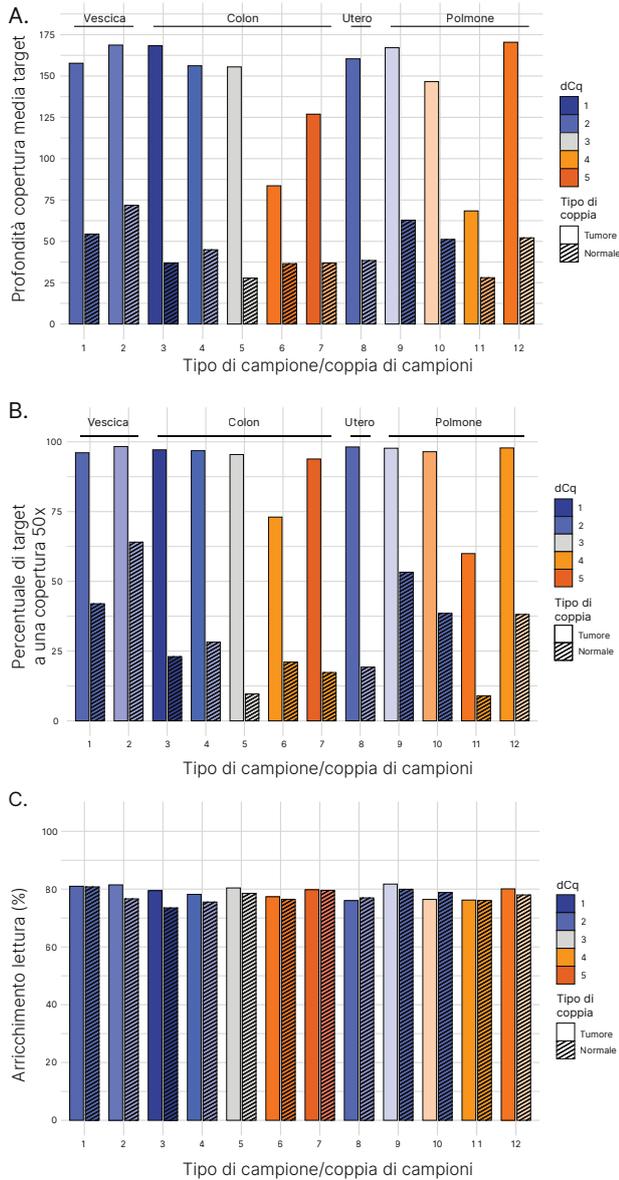


Figura 3: metriche delle prestazioni per i campioni di tessuto FFPE. Le librerie normali per il tumore da campioni di tessuto FFPE di media e alta qualità hanno ottenuto eccellenti metriche di arricchimento, tra cui arricchimento della lettura superiore al 70%, elevata profondità media di copertura del target e più del 90% dei target con copertura di almeno 50x.

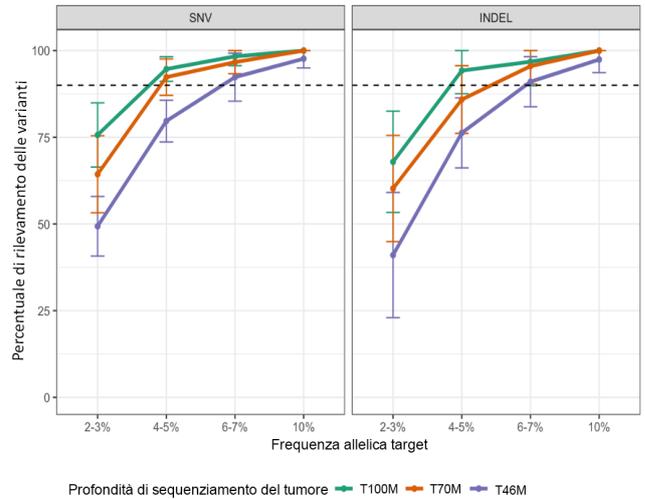


Figura 4: rilevamento delle varianti a bassa VAF. I risultati dimostrano che Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment raggiunge il 90% di rilevamento di SNV e indel al 5% di VAF da un input di 40 ng con 100 milioni di letture single-end (linea verde). Come previsto, il tasso di rilevamento per le varianti VAF del 4-5% diminuisce con il numero di letture. Tuttavia, la sensibilità rimane elevata per le varianti intorno al 6-7% di VAF con appena 46 milioni di letture single-end (linea viola) per libreria di tumori. La linea tratteggiata rappresenta il 90% del rilevamento delle varianti.

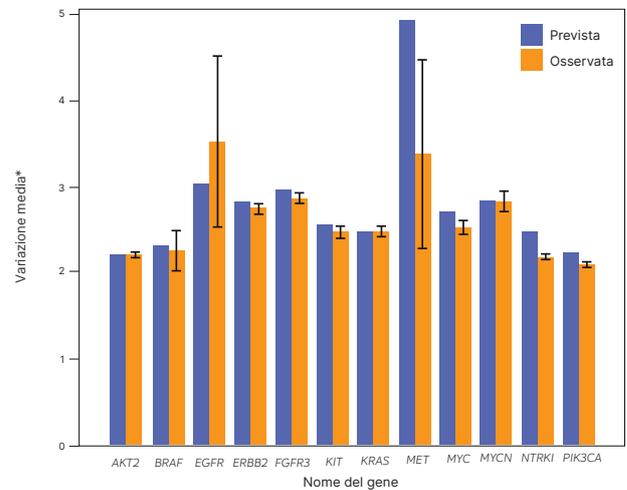


Figura 5: rilevamento dell'amplificazione genica. È stata osservata una sensibilità del 100% utilizzando Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment per il rilevamento di 12 amplificazioni geniche in un campione di controllo con tre copie aggiuntive per gene. I valori riportati sono la media e la deviazione standard degli otto replicati della miscela CNV e confrontati con la variazione prevista riportata da SeraCare. *SeraCare riferisce che i valori *BRAF*, *EGFR* e *MET* sono stati amplificati utilizzando due costrutti sintetici con piccole aree di sovrapposizione, pertanto, gli eventi CNV che coprono queste regioni di sovrapposizione possono mostrare un valore di amplificazione gonfiato.

Valutazione accurata del carico mutazionale del tumore (TMB)

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment combina il contenuto completo dell'esoma di Twist for Illumina Exome 2.5 Panel e la sofisticata pipeline di bioinformatica DRAGEN Somatic per fornire stime accurate del carico mutazionale del tumore (TMB, tumor mutational burden). La capacità di Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment di valutare il TMB è stata esaminata utilizzando gli standard di riferimento SeraCare TMB e il DNA FFPE da campioni di tessuto. Le librerie Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment sono state preparate con 40 ng di standard Seraseq gDNA TMB Mix Score 7 e TMB Mix Score 13 e i rispettivi campioni "normali" (SeraCare, n. di catalogo 0710-1326 e 0170-1586, rispettivamente). I dati di sequenziamento sono stati analizzati con DRAGEN Enrichment App e i file BAM sono stati importati come coppie normali per il tumore in DRAGEN Somatic App. I risultati mostrano che i valori TMB osservati soddisfano i valori previsti (Tabella 3).

Tabella 3: valutazione accurata del TMB con Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

Miscela Seraseq gDNA TMB	Punteggio TMB previsto	Punteggio TMB di DRAGEN Somatic App
TMB - alto	13	16,7 (0,1)
TMB - basso	7	9,4 (0,1)

I valori riportati sono la media e la deviazione standard di sei replicati tecnici.

Concordanza con TruSight™ Oncology 500

Le librerie Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment sono state preparate con 40 ng di DNA FFPE ottenuto da campioni di tumore e campioni normali abbinati. Le librerie sono state sequenziate su più celle a flusso S2 di NovaSeq 6000 System a una lunghezza di lettura di 2 × 151 bp e le letture di sequenziamento per le librerie dei tumori e normali abbinata sottocampionate al numero raccomandato di letture (Tabella 2). I dati sono stati analizzati con DRAGEN Enrichment App e i file BAM sono stati importati come coppie normali per il tumore in DRAGEN Somatic App in BaseSpace Sequence Hub. Parallelamente, 40 ng dello stesso DNA FFPE derivato da campioni di tumore sono stati elaborati con TruSight Oncology 500 e i dati sono stati analizzati utilizzando il software dell'app locale TruSight Oncology 500 v2.2.1.

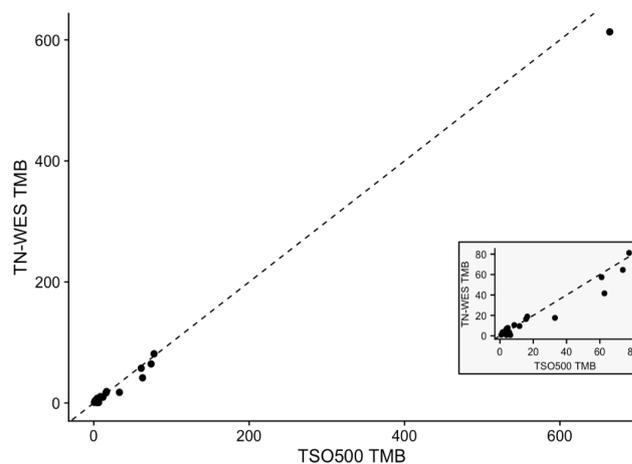


Figura 6: valutazione TMB accurata. La valutazione TMB con Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment mostra un'elevata concordanza con i punteggi TMB ottenuti con TruSight Oncology 500. Il grafico a inserto mostra i valori TMB ingranditi a ≤ 80 .

I risultati mostrano un'elevata concordanza ($R^2 = 0,999$) con il punteggio TMB riportato dal flusso di lavoro TruSight Oncology 500, dimostrando prestazioni eccellenti di Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment per la valutazione di questo biomarcatore oncologico chiave (Figura 6). È in fase di sviluppo una pipeline di analisi per i biomarcatori di instabilità microsatellitare (MSI, microsatellite instability) e di carenza di ricombinazione omologa (HRD, homologous recombination deficiency); i risultati di DRAGEN Somatic App devono essere considerati preliminari. Per maggiori informazioni su questi biomarcatori, contattare il proprio specialista delle vendite.

Flessibilità dei contenuti con Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment è compatibile con sonde personalizzate progettate per coprire nuovi target o per aumentare la copertura di regioni di interesse maggiori. I pannelli vengono progettati per un elenco personalizzato di target e aggiunti facilmente al protocollo di Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment sotto forma di sonde addizionate. I pannelli personalizzati Illumina v2 vengono progettati tramite lo [strumento di progettazione online DesignStudio™](#) o con l'aiuto del team Illumina Concierge.

Tabella 4: compatibilità di Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment con contenuti aggiuntivi

Pannello	Twist for Illumina Mitochondrial	Custom Enrichment v2 Panel A	Custom Enrichment v2 Panel B	
Dimensione del pannello (basi)	16.659	244.283	1.590.551	
Numero di sonde	139	2.804	10.353	
Numero di geni coperti	37	79	1.038	
Rapporto tra pannello addizionato/ pannello dell'esoma	0,008 ^a	0,4 ^a	0,4 ^a	
Lecture di sequenziamento ^b	100 milioni	100 milioni	100 milioni	110 milioni-220 milioni ^c
Copertura target media esoma ^d	136×	137×	111×	151×
Copertura target media regione addizionata ^d	1.397×	193×	52×	72×
Percentuale di copertura target esoma ≥50×	93%	93%	85%	93%
Percentuale di copertura target addizionati ≥50×	99,70%	99%	42%	57%

a. 2 µL di diluizione 1:50 da Twist for Illumina Mitochondrial Panel o 2 µL di Custom Enrichment v2 Panel miscelati con 3 µL di Twist for Illumina Exome 2.5 Panel.

b. Numero di lecture di sequenziamento single-end in milioni.

c. Indica l'intervallo di lecture di sequenziamento osservate per i diversi campioni di tumore con DNA FFPE.

d. La copertura target media è stata calcolata con l'impostazione di non accoppiamenti sovrapposti a doppio conteggio.

Per dimostrare la compatibilità di Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment con un'ampia gamma di dimensioni di pannelli addizionati, il protocollo Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment è stato eseguito con Twist for Illumina Mitochondrial Panel o due Illumina Custom Enrichment Panel v2 (Tabella 4). I risultati dimostrano una correlazione tra la dimensione del pannello addizionato e la copertura dell'esoma e dei target addizionati. Una copertura maggiore si ottiene con il pannello mitocondriale piccolo, mentre un'eccellente copertura si ottiene sia per l'esoma sia per i target addizionati quando si utilizza un pannello addizionato di medie dimensioni (Panel A). Per il Panel B addizionato grande, la copertura dell'esoma rimane elevata mentre la copertura per la regione target del pannello addizionato è modesta, ma può essere aumentata con un sequenziamento più profondo. In presenza di pannelli addizionati, si osserva una copertura più profonda delle regioni sovrapposte (Figura 7A) o una copertura di sequenziamento per nuovi target (Figura 7B). Inoltre, sono stati osservati un aumento di circa 10 volte sulla profondità media della copertura target e la percentuale di target con copertura di un massimo di 50× nelle regioni target di Custom Enrichment v2 Panel B quando il pannello addizionato è stato combinato con Twist for Illumina Exome 2.5 Panel durante la reazione di arricchimento (Tabella 5).

Tabella 5: Illumina Custom Enrichment v2 Panel addizionato per migliorare le metriche di arricchimento

Parametro	Twist for Illumina Exome 2.5	Twist for Illumina Exome 2.5 + Panel addizionato ^a
Profondità media della copertura target per la regione addizionata ^b	5,5×	52×
Uniformità della copertura addizionata	20%	89%
Percentuale di target addizionati con copertura ≥20×	5%	78%
Percentuale di target addizionati con copertura ≥50×	4%	42%

a. Custom Enrichment v2 Panel B, vedere la Tabella 4 per i dettagli del pannello.
b. La copertura target media è stata calcolata con l'impostazione di non accoppiamenti sovrapposti a doppio conteggio.

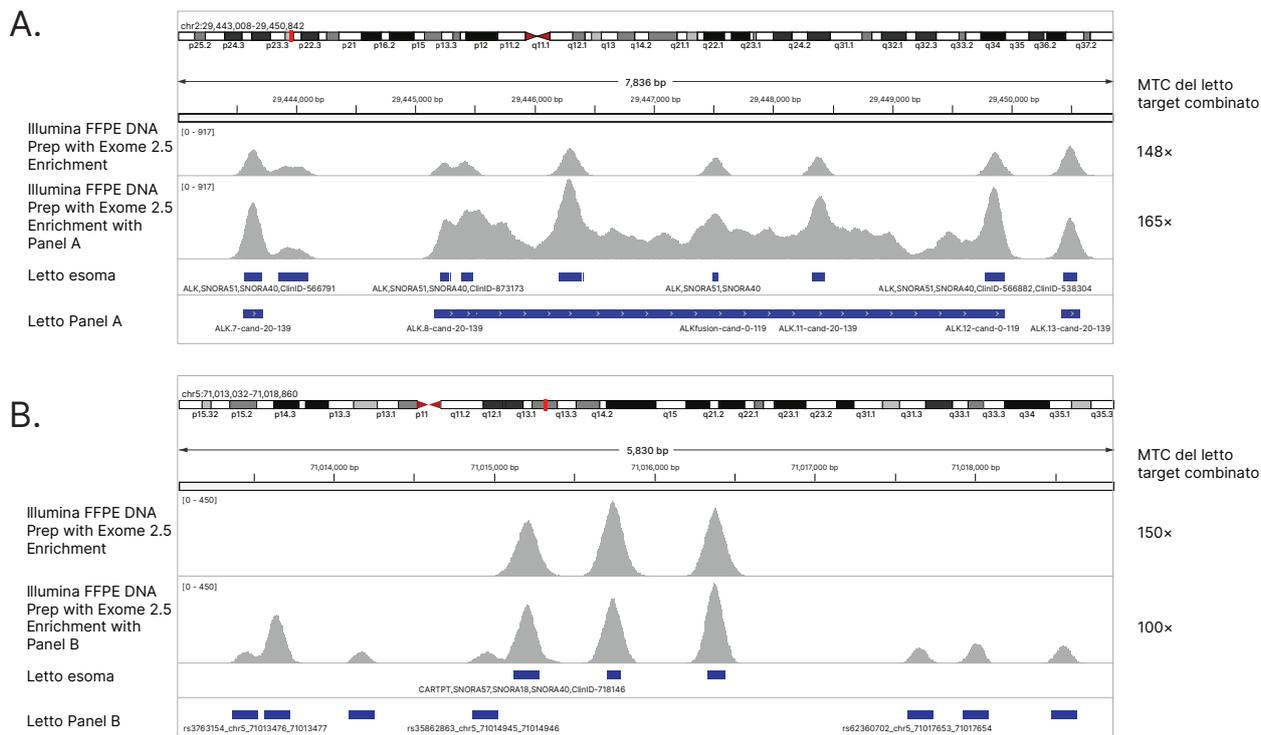


Figura 7: copertura di sequenziamento più profonda con i pannelli aggiunti Illumina Custom Enrichment v2. (A) Il confronto della copertura target media (MTC, calcolato con l'impostazione di non accoppiamenti sovrapposti a doppio conteggio) di regioni sovrapposte tra Illumina FFPE DNA Prep Exome 2.5 Enrichment Panel e Custom Enrichment v2 Panel A (vedere la Tabella 4) con o senza un pannello aggiunto mostra un aumento di copertura di oltre 2 volte in presenza del Panel A aggiunto. (B) Il confronto della copertura di nuove regioni target di Custom Enrichment v2 Panel B (vedere la Tabella 4) con o senza pannello aggiunto mostra la copertura in presenza del Panel B aggiunto.

Riepilogo

Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment offre una soluzione versatile per la preparazione delle librerie, ottimizzata per l'uso con DNA a basso input estratto da campioni di tessuto FFPE. Grazie alla soluzione Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment, i ricercatori possono rilevare variazioni somatiche a bassa frequenza con un'eccezionale sensibilità analitica. Le prestazioni elevate della soluzione Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment, insieme al sequenziamento sui potenti sistemi di sequenziamento Illumina e all'analisi accelerata dei dati, forniscono un flusso di lavoro NGS normale per il tumore di alta qualità per il DNA FFPE, che comprende l'intero processo, dall'elaborazione dei campioni all'analisi dei dati, il tutto fornito da un solo partner affidabile.

Maggiori informazioni

[Illumina FFPE DNA Prep with Exome 2.5 Enrichment](#)

[Analisi secondaria DRAGEN](#)

[Illumina Connected Insights](#)

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
Illumina Cell-Free and FFPE DNA Prep with Enrichment, Ligation (192 samples, 4-plex)	20104103
Illumina Cell-Free and FFPE DNA Prep with Enrichment, Ligation (192 samples, 4-plex), on-premises ^a	20104104
Illumina Cell-Free and FFPE DNA Prep, Ligation (16 Samples)	20104105
Illumina Cell-Free and FFPE DNA Prep, Ligation (96 Samples)	20104106
Illumina Cell-Free and FFPE DNA Prep, Enrichment (16 Reactions)	20104107
IDT for Illumina UMI DNA/RNA UD Indexes Set A, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20034701
IDT for Illumina UMI DNA/RNA UD Indexes Set B, Ligation (96 Indexes, 96 Samples)	20034702
Illumina UMI DNA/RNA UD v3 indexes Set A, Ligation (96 indexes, 96 samples)	20126235
Illumina UMI DNA/RNA UD v3 indexes Set B, Ligation (96 indexes, 96 samples)	20126237
IDT for Illumina UMI DNA/DNA Index Anchors Set A for Automation	20066404
IDT for Illumina UMI DNA/DNA Index Anchors Set B for Automation	20063213
Twist Bioscience for Illumina Exome 2.5 Panel	20076914
Twist Bioscience for Illumina Mitochondrial Panel	20093180

a. 10.000 Gb; licenza DRAGEN Server di 1 anno inclusa.



Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.
 M-GL-03347 ITA v1.0