Scheda tecnica di
FoundationOne®CDx

Foundation Medicine, Inc.
150 Second Street, Cambridge, MA 02141
Telefono: 617.418.2200

IT/NONP/1912/0042

Uso previsto

FoundationOne®CDx (F1CDx) è un dispositivo diagnostico *in vitro* basato sul sequenziamento di nuova generazione, destinato alla rilevazione di sostituzioni, alterazioni di inserzione e delezione (indel) e alterazioni del numero di copie (*copy number alteration*, CNA) in 324 geni e alcuni riarrangiamenti genici, nonché delle firme genomiche, compresa l'instabilità dei microsatelliti (*microsatellite instability*, MSI) e del carico mutazionale del tumore (*tumor mutational burden*, TMB) utilizzando DNA isolato da campioni di tessuto tumorale fissati in formalina e inclusi in paraffina (*formalin-fixed paraffin embedded*, FFPE). Il test è inteso come test diagnostico associato, mirato a identificare i pazienti che potrebbero trarre beneficio dal trattamento con le terapie mirate elencate nella Tabella 1, secondo le informazioni di prescrizione approvate del prodotto terapeutico. Inoltre, F1CDx è in grado di fornire il profilo mutazionale del tumore, che potrà essere utilizzato da operatori sanitari qualificati in conformità alle linee guida oncologiche per i pazienti affetti da neoplasie maligne solide. Risultati genomici diversi da quelli mostrati nella Tabella 1 non sono prescrittivi o conclusivi per l'uso indicato di qualsiasi prodotto terapeutico specifico.

Tabella 1. Indicazioni del test diagnostico associato

Tipo di tumore	Biomarcatore/i rilevato/i	Terapia
Carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC)	Delezioni nell'esone 19 di *EGFR* e alterazioni L858R nell'esone 21 di *EGFR*	Gilotrif® (afatinib), Iressa® (gefitinib), Tagrisso® (osimertinib) o Tarceva® (erlotinib)
	Alterazioni T790M nell'esone 20 di *EGFR*	Tagrisso® (osimertinib)
	Riarrangiamenti di *ALK*	Alecensa® (alectinib), Xalkori® (crizotinib) o Zykadia® (ceritinib)
	BRAF V600E	Tafinlar® (dabrafenib) in associazione con Mekinist® (trametinib)
Melanoma	*BRAF* V600E	Tafinlar® (dabrafenib) o Zelboraf® (vemurafenib)
	BRAF V600E e V600K	Mekinist® (trametinib) o Cotellic® (cobimetinib) in associazione con Zelboraf® (vemurafenib)

Tipo di tumore	Biomarcatore/i rilevato/i	Terapia
Carcinoma mammario	Amplificazione di *ERBB2* (HER2)	Herceptin® (trastuzumab), Kadcyla® (ado-trastuzumab-emtansine) o Perjeta® (pertuzumab)
Carcinoma colorettale	*KRAS wild-type* (assenza di mutazioni nei codoni 12 e 13)	Erbitux® (cetuximab)
	KRAS wild-type (assenza di mutazioni negli esoni 2, 3 e 4) e *NRAS wild-type* (assenza di mutazioni negli esoni 2, 3 e 4)	Vectibix® (panitumumab)
Carcino ma ovarico	Alterazioni *BRCA1/2*	Lynparza® (olaparib) o Rubraca® (rucaparib)

Il test è utilizzato inoltre per la rilevazione della perdita di eterozigosi (*loss of heterozygosity*, LOH) genomica dal tessuto di carcinoma ovarico fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE). Secondo il riassunto delle caratteristiche del prodotto di RUBRACA, lo stato di positività al deficit di ricombinazione omologa (*homologous recombination deficiency*, HRD) (HRD definito per F1CDx come tBRCA-positivo e/o LOH elevata) nelle pazienti affette da carcinoma ovarico è associato a un miglioramento della sopravvivenza libera da progressione (*progression-free survival*, PFS) con la terapia di mantenimento contenente Rubraca (rucaparib).

Il test F1CDx è un test monocentrico eseguito presso Foundation Medicine, Inc.

Controindicazioni
Non esistono controindicazioni note.

Avvertenze e precauzioni

- Le alterazioni riportate possono comprendere alterazioni somatiche (non ereditarie) o della linea germinale (ereditarie); tuttavia, il test non distingue tra alterazioni della linea germinale e alterazioni somatiche. Il test non fornisce informazioni sulla suscettibilità.
- La biopsia può rappresentare un rischio per il paziente quando non è disponibile tessuto conservato in archivio da utilizzare per il test. Il medico del paziente deve determinare se il paziente è un candidato alla biopsia.
- Dovrà essere eseguito per conferma un test *reflex* con un test diagnostico associato alternativo approvato dall'FDA per i pazienti che mostrano un risultato di amplificazione di ERBB2 rilevato da un numero di copie uguale a 4 (ploidia basale del tumore +2). Sebbene questo risultato sia considerato negativo da F1CDx, in uno studio di concordanza clinica con un test FISH approvato dall'FDA, il 70% (7 campioni su 10) è stato classificato positivo e il 30% (3 campioni su 10) è stato classificato negativo con il test FISH, con un rapporto medio di 2,3. Si stima che la frequenza di un numero di copie di ERBB2 pari a 4 nel carcinoma mammario sia di circa il 2%[1].

  [1]Numerosi riferimenti bibliografici elencati in https://www.mycancergenome.org/content/disease/breast-cancer/ERBB2/238/) riportano una frequenza di sovraespressione di HER2 del 20% nel carcinoma mammario. In base allo studio di concordanza del test diagnostico associato (CDx) per HER2 F1CDx, circa il 10% dei campioni con amplificazione di HER2 aveva un numero di copie uguale a 4. Quindi, si stima in modo conservativo che la frequenza totale sia di circa il 2%.

Limitazioni

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Solo su prescrizione. Questo test deve essere richiesto da un medico qualificato, in conformità alle disposizioni del laboratorio clinico.
- Un risultato negativo non esclude la presenza di una mutazione al di sotto dei limiti di rilevazione del test.
- I campioni con <25% di tumore potrebbero avere una minore sensibilità per la rilevazione delle CNA, compreso ERBB2.

- Le prestazioni cliniche di Tagrisso® (osimertinib) nei pazienti con una mutazione T790M rilevata nell'esone 20 di EGFR, con una frazione allelica <5%, sono attualmente in fase di valutazione e non sono ancora state stabilite.
- La concordanza con altri metodi validati per la rilevazione di CNA (fatta eccezione per le amplificazioni di ERBB2 e le delezioni omozigote di BRCA1/2) e riarrangiamenti genici (fatta eccezione per ALK) non è stata dimostrata e sarà fornita in un contesto successivo all'immissione in commercio. Per tutte le CNA e i riarrangiamenti non associati alle indicazioni del CDx riportate nella Tabella 1 della sezione Uso previsto, utilizzati per le decisioni cliniche, deve essere eseguito un test di conferma utilizzando un test clinicamente validato.
- La designazione di MSI-H/MSS (*microsatellite instability-high/microsatellite stable*, instabilità dei microsatelliti elevata/microsatelliti stabili) del test F1CDx di FMI è basata sull'analisi nell'intero genoma di 95 loci di microsatelliti e non è basata sui 5 o 7 loci MSI descritti nelle linee guida attuali di pratica clinica. Per ulteriori informazioni sulla metodologia, vedere https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf17/P170019B.pdf. La soglia per MSI-H/MSS è stata determinata mediante concordanza analitica con test di confronto (IHC e PCR), utilizzando tessuto FFPE di carcinoma uterino, dell'intestino cieco e colorettale. La validità clinica della designazione qualitativa di MSI non è stata stabilita.
- Il TMB misurato da F1CDx è definito in base al calcolo del numero totale di tutte le varianti sinonime e non sinonime presenti a una frequenza allelica pari o superiore al 5% (dopo la filtrazione) ed è riportato in unità di mutazioni per megabase (mut/Mb). La validità clinica del TMB definito da questo test non è stata stabilita.
- Le decisioni relative alle cure e ai trattamenti del paziente devono essere basate sul giudizio clinico indipendente del medico curante, tenendo conto di tutte le informazioni pertinenti relative alla condizione del paziente, quali anamnesi personale e familiare del paziente, esami fisici, informazioni ottenute con altri test diagnostici e preferenze del paziente, in conformità allo standard di cura locale.
- Il test è destinato a essere eseguito da Foundation Medicine, Inc su strumenti con numeri di serie specifici controllati.
- Le alterazioni delle regioni omopolimeriche polyT potrebbero non essere rilevate in modo affidabile in BRCA1/2.
- Alcuni riarrangiamenti di grandi dimensioni in BRCA1/2, comprese delezioni genomiche su larga scala (che interessano almeno un intero esone), inserzioni o altri riarrangiamenti genomici deleteri, tra cui eventi di inversione o trasversione, potrebbero non essere rilevati da F1CDx in un 5% stimato di pazienti affette da carcinoma ovarico con mutazioni *BRCA1/2*.
- Alcune alterazioni missenso o piccole delezioni *in-frame* potenzialmente deleterie in *BRCA1/2* potrebbero non essere riportate nella sezione relativa ai risultati associati di CDx ("*CDx associated findings*") del referto del paziente, ma potrebbero essere riportate nella sezione relativa ad altre alterazioni e biomarcatori identificati ("*Other alterations and biomarkers identified*").
- Le alterazioni a frequenze alleliche inferiori al limite di rilevazione stabilito potrebbero non essere rilevate in modo costante.
- La rilevazione della LOH è stata verificata solo per le pazienti affette da carcinoma ovarico.
- Le prestazioni della classificazione della LOH non sono state stabilite per i campioni con contenuto di tumore inferiore al 35% e con punteggi di LOH vicini al *cut-off* di 16.
- L'etanolo potrebbe essere una sostanza potenzialmente interferente con la rilevazione della LOH. Gli effetti interferenti dello xilene, dell'emoglobina e dei trigliceridi sul punteggio della LOH non sono stati dimostrati.

Principio del test

FoundationOne®CDx (F1CDx) viene eseguito esclusivamente come servizio di laboratorio utilizzando DNA estratto da campioni di tumore fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE). Il test utilizza un unico metodo di estrazione del DNA da campioni FFPE prelevati con biopsia di routine o durante la resezione chirurgica, 50-1.000 ng dei quali saranno sottoposti alla preparazione della libreria dell'intero genoma con metodo *shotgun* e a cattura per ibridazione di tutti gli esoni codificanti di 309 geni correlati al tumore, una regione *promoter*, una regione non codificante (ncRNA) e alcune regioni introniche di 34 geni comunemente riarrangiati, 21 dei quali includono anche gli esoni codificanti (vedere la Tabella 2 e la Tabella 3 per l'elenco completo dei geni inclusi nel

test F1CDx). Complessivamente, il test rileva le alterazioni in 324 geni. Utilizzando la piattaforma Illumina® HiSeq 4000, alcune librerie catturate per ibridazione vengono sequenziate a un'elevata profondità uniforme (mirata a una copertura mediana di >500X con >99% di esoni a una copertura >100X). I dati del sequenziamento vengono successivamente elaborati utilizzando una *pipeline* di analisi personalizzata, progettata per rilevare tutte le classi di alterazioni genomiche, tra cui sostituzioni di basi, indel, alterazioni del numero di copie (amplificazioni e delezioni omozigote di gene) e alcuni riarrangiamenti genomici (per es. fusioni di geni). Sono inoltre riportate le firme genomiche comprese l'instabilità dei microsatelliti (MSI) e il carico mutazionale del tumore (TMB).

Tabella 2. Geni con regioni esoniche codificanti complete inclusi nel test FoundationOne®CDx per la rilevazione di sostituzioni, inserzioni e delezioni (indel) e alterazioni del numero di copie (CNA)

ABL1	*BRAF*	*CDKN1A*	*EPHA3*	*FGFR4*	*IKZF1*	*MCL1*	*NKX2-1*	*PMS2*	*RNF43*	*TET2*
ACVR1B	*BRCA1*	*CDKN1B*	*EPHB1*	*FH*	*INPP4B*	*MDM2*	*NOTCH1*	*POLD1*	*ROS1*	*TGFBR2*
AKT1	*BRCA2*	*CDKN2A*	*EPHB4*	*FLCN*	*IRF2*	*MDM4*	*NOTCH2*	*POLE*	*RPTOR*	*TIPARP*
AKT2	*BRD4*	*CDKN2B*	*ERBB2*	*FLT1*	*IRF4*	*MED12*	*NOTCH3*	*PPARG*	*SDHA*	*TNFAIP3*
AKT3	*BRIP1*	*CDKN2C*	*ERBB3*	*FLT3*	*IRS2*	*MEF2B*	*NPM1*	*PPP2R1A*	*SDHB*	*TNFRSF14*
ALK	*BTG1*	*CEBPA*	*ERBB4*	*FOXL2*	*JAK1*	*MEN1*	*NRAS*	*PPP2R2A*	*SDHC*	*TP53*
ALOX12B	*BTG2*	*CHEK1*	*ERCC4*	*FUBP1*	*JAK2*	*MERTK*	*NT5C2*	*PRDM1*	*SDHD*	*TSC1*
AMER1	*BTK*	*CHEK2*	*ERG*	*GABRA6*	*JAK3*	*MET*	*NTRK1*	*PRKAR1A*	*SETD2*	*TSC2*
APC	*C11orf30*	*CIC*	*ERRFI1*	*GATA3*	*JUN*	*MITF*	*NTRK2*	*PRKCI*	*SF3B1*	*TYRO3*
AR	*CALR*	*CREBBP*	*ESR1*	*GATA4*	*KDM5A*	*MKNK1*	*NTRK3*	*PTCH1*	*SGK1*	*U2AF1*
ARAF	*CARD11*	*CRKL*	*EZH2*	*GATA6*	*KDM5C*	*MLH1*	*P2RY8*	*PTEN*	*SMAD2*	*VEGFA*
ARFRP1	*CASP8*	*CSF1R*	*FAM46C*	*GID4 (C17orf39)*	*KDM6A*	*MPL*	*PALB2*	*PTPN11*	*SMAD4*	*VHL*
ARID1A	*CBFB*	*CSF3R*	*FANCA*	*GNA11*	*KDR*	*MRE11A*	*PARK2*	*PTPRO*	*SMARCA4*	*WHSC1*
ASXL1	*CBL*	*CTCF*	*FANCC*	*GNA13*	*KEAP1*	*MSH2*	*PARP1*	*QKI*	*SMARCB1*	*WHSC1L1*
ATM	*CCND1*	*CTNNA1*	*FANCG*	*GNAQ*	*KEL*	*MSH3*	*PARP2*	*RAC1*	*SMO*	*WT1*
ATR	*CCND2*	*CTNNB1*	*FANCL*	*GNAS*	*KIT*	*MSH6*	*PARP3*	*RAD21*	*SNCAIP*	*XPO1*
ATRX	*CCND3*	*CUL3*	*FAS*	*GRM3*	*KLHL6*	*MST1R*	*PAX5*	*RAD51*	*SOCS1*	*XRCC2*
AURKA	*CCNE1*	*CUL4A*	*FBXW7*	*GSK3B*	*KMT2A (MLL)*	*MTAP*	*PBRM1*	*RAD51B*	*SOX2*	*ZNF217*
AURKB	*CD22*	*CXCR4*	*FGF10*	*H3F3A*	*KMT2D (MLL2)*	*MTOR*	*PDCD1*	*RAD51C*	*SOX9*	*ZNF703*
AXIN1	*CD274*	*CYP17A1*	*FGF12*	*HDAC1*	*KRAS*	*MUTYH*	*PDCD1LG2*	*RAD51D*	*SPEN*	
AXL	*CD70*	*DAXX*	*FGF14*	*HGF*	*LTK*	*MYC*	*PDGFRA*	*RAD52*	*SPOP*	
BAP1	*CD79A*	*DDR1*	*FGF19*	*HNF1A*	*LYN*	*MYCL*	*PDGFRB*	*RAD54L*	*SRC*	
BARD1	*CD79B*	*DDR2*	*FGF23*	*HRAS*	*MAF*	*MYCN*	*PDK1*	*RAF1*	*STAG2*	
BCL2	*CDC73*	*DIS3*	*FGF3*	*HSD3B1*	*MAP2K1*	*MYD88*	*PIK3C2B*	*RARA*	*STAT3*	
BCL2L1	*CDH1*	*DNMT3A*	*FGF4*	*ID3*	*MAP2K2*	*NBN*	*PIK3C2G*	*RB1*	*STK11*	
BCL2L2	*CDK12*	*DOT1L*	*FGF6*	*IDH1*	*MAP2K4*	*NF1*	*PIK3CA*	*RBM10*	*SUFU*	
BCL6	*CDK4*	*EED*	*FGFR1*	*IDH2*	*MAP3K1*	*NF2*	*PIK3CB*	*REL*	*SYK*	
BCOR	*CDK6*	*EGFR*	*FGFR2*	*IGF1R*	*MAP3K13*	*NFE2L2*	*PIK3R1*	*RET*	*TBX3*	

BCORL1	*CDK8*	*EP300*	*FGFR3*	*IKBKE*	*MAPK1*	*NFKBIA*	*PIM1*	*RICTOR*	*TEK*	

Tabella 3. Geni con alcune regioni introniche per la rilevazione dei riarrangiamenti genici, uno con 3'UTR, un gene con una regione *promoter* e un gene ncRNA

ALK *introni 18, 19*	*BRCA1* *introni 2, 7, 8, 12, 16, 19, 20*	*ETV4* *introne 8*	EZR *introni 9-11*	*KIT* *introne 16*	*MYC* *introne 1*	*NUTM1* *introne 1*	*RET* *introni 7-11*	*SLC34A2* *introne 4*
BCL2 *3'UTR*	*BRCA2* *introne 2*	*ETV5* *introni 6, 7*	*FGFR1* *introni 1, 5, 17*	*KMT2A (MLL)* *introni 6-11*	*NOTCH2* *introne 26*	*PDGFRA* *introni 7, 9, 11*	*ROS1* *introni 31-35*	*TERC* *ncRNA*
BCR *introni 8, 13, 14*	*CD74* *introni 6-8*	*ETV6* *introni 5, 6**	*FGFR2* *introni 1, 17*	*MSH2* *introne 5*	*NTRK1* *introni 8-11*	*RAF1* *introni 4-8*	*RSPO2* *introne 1*	*TERT* Regione *promoter*
BRAF *introni 7-10*	*EGFR* *introni 7, 15, 24-27*	*EWSR1* *introni 7-13*	*FGFR3* *introne 17*	*MYB* *introne 14*	*NTRK2* *introne 12*	*RARA* *introne 2*	*SDC4* *introne 2*	*TMPRSS2* *introni 1-3*

*ETV6 è un partner di riarrangiamento comune di NTRK3

Riassunto e spiegazione

FoundationOne®CDx è un ampio test diagnostico associato (CDx) per cinque indicazioni tumorali. Oltre all'uso come test diagnostico associato, F1CDx fornisce informazioni su alterazioni rilevanti del tumore, che possono essere utili per la gestione del paziente in conformità alle linee guida professionali. Le informazioni generate da questo test sono di ausilio nell'identificazione dei pazienti che hanno la maggiore probabilità di trarre beneficio dai prodotti terapeutici associati, come indicato nella Tabella 1 della sezione Uso previsto.

La piattaforma F1CDx utilizza la preparazione di librerie dell'intero genoma con metodo *shotgun* e la cattura per ibridazione del DNA estratto da tessuto tumorale FFPE prima del sequenziamento uniforme e profondo sulla piattaforma Illumina® HiSeq 4000. Dopo il sequenziamento, viene utilizzato un software personalizzato per determinare le varianti genomiche, compresi sostituzioni, inserzioni e delezioni (indel), alterazioni del numero di copie (CNA), riarrangiamenti genomici, instabilità dei microsatelliti (MSI) e carico mutazionale del tumore (TMB). I risultati generati dal test comprendono:

Categoria 1: indicazioni del test diagnostico associato (CDx) riportate nella Tabella 1

della sezione Uso previsto

Categoria 2: mutazioni del tumore con evidenza di significatività clinica

Categoria 3: mutazioni del tumore con significatività clinica potenziale

Contenuto del kit del test

Il test FoundationOne®CDx (F1CDx) include un kit per la spedizione dei campioni, che viene inviato ai laboratori richiedenti. Il kit per la spedizione contiene i seguenti componenti:

- Istruzioni per la preparazione dei campioni e istruzioni per la spedizione
- Etichetta per la spedizione di ritorno

Tutti gli altri reagenti, materiali e attrezzature necessarie a eseguire il test sono utilizzati esclusivamente nel laboratorio di Foundation Medicine. Il test F1CDx è destinato a essere eseguito su strumenti con numeri di serie controllati.

Prelievo del campione e richiesta del test

Per richiedere il test F1CDx, il medico richiedente o altro personale medico autorizzato deve compilare interamente e firmare il modulo di richiesta del test (*Test Requisition Form*, TRF) incluso nel kit fornito. Vedere le istruzioni per la preparazione dei campioni e istruzioni per la spedizione incluse nel kit del test.

Per informazioni più dettagliate, comprese le caratteristiche di prestazione, vedere il riassunto dell'FDA dei dati

di sicurezza e di efficacia all'indirizzo: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf17/P170019B.pdf

1. Strumenti

Il dispositivo F1CDx è destinato a essere utilizzato con i seguenti strumenti, identificati da numeri di serie specifici:

- Agilent Technologies Benchbot Workstation con Integrated Bravo Automated Liquid Handler
- Beckman Biomek NX^{P} Span-8 Liquid Handler
- Covaris LE220 Focused ultrasonicator
- Thermo Fisher Scientific KingFisher™ Flex with 96 Deep-well Head
- Sistema Illumina® cBot
- Sistema Illumina® HiSeq 4000

2. Caratteristiche di prestazione

Le caratteristiche di prestazione sono state stabilite utilizzando il DNA estratto da un'ampia gamma di tipi di tessuto FFPE; in ogni studio sono stati inclusi i tipi di tessuto associati alle indicazioni del test CDx. Nella Tabella 4 qui di seguito è riportato un riassunto dei tipi di tessuto inclusi in ogni studio. In ogni studio è stata inclusa inoltre una vasta gamma di tipi di alterazioni rappresentativi di ogni classe di alterazione (sostituzioni, inserzioni-delezioni, alterazioni del numero di copie e riarrangiamenti) in vari contesti genomici in un'ampia serie di geni, nonché l'analisi delle firme genomiche, compresi MSI e TMB. Nella Tabella 5 è riportato un riassunto dei geni e dei tipi di alterazioni associati, con i relativi studi di validazione.

Tabella 4. Riassunto dei tipi di tessuto inclusi negli studi di validazione

Tipo di tessuto o tumore	Limite di rilevazione	Precisione	Analisi pan-tumorale	Concordanza con NGS	Concordanza tra laboratori	Concordanza di CDx	Estrazione del DNA	Stabilità del DNA (parte 1)	Stabilità del vetrino FFPE	Sostanze interferenti	Bande di controllo/solidità	Codici a barre degli indici molecolari	Annotazione manuale delle varianti	Stabilità dei reagenti
Addome o parete addominale														
Ano														
Appendice														
Cavità nasale			*											
Cervello														
Cervice uterina														
Colecisti														
Colon														
Cute (melanoma)														
Diaframma														
Duodeno			*											
Endometrio			*											
Esofago														
Fegato														

Tipo di tessuto o tumore	Limite di rilevazione	Precisione	Analisi pan-tumorale	Concordanza con NGS	Concordanza tra laboratori	Concordanza di CDx	Estrazione del DNA	Stabilità del DNA (parte 1)	Stabilità del vetrino FFPE	Sostanze interferenti	Bande di controllo/solidità	Codici a barre degli indici molecolari	Annotazione manuale delle varianti	Stabilità dei reagenti
Ghiandola parotidea			*											
Ghiandola salivare														
Ghiandola surrenale														
Giunzione gastro-esofagea														
Intestino tenue														
Laringe			*											
Linfonodo														
Lingua			*											
Mammella														
Mediastino														
Milza														
Omento														
Orecchio			*											
Ossa														
Ovaio														
Pancreas														
Pancreatobiliare														
Parete toracica														
Pelvi														
Pene			*											
Pericardio														
Peritoneo														
Pleura			*											
Polmone														
Prostata														
Rene														
Resezione di Whipple														
Retto			*											
Stomaco														
Tessuti molli														
Tessuti rari*														
Testa e collo														
Tiroide														
Trachea			*											
Tuba di Falloppio														

Tipo di tessuto o tumore	Limite di rilevazione	Precisione	Analisi pan-tumorale	Concordanza con NGS	Concordanza tra laboratori	Concordanza di CDx	Estrazione del DNA	Stabilità del DNA (parte 1)	Stabilità del vetrino FFPE	Sostanze interferenti	Bande di controllo/solidità	Codici a barre degli indici molecolari	Annotazione manuale delle varianti	Stabilità dei reagenti
Uretra														
Utero														
Vagina														
Versamenti maligni														
Vescica														
Vulva														

***Incluso come "Tessuti rari" nell'analisi pan-tumorale**

Tabella 5. Riassunto dei geni e dei tipi di alterazioni inclusi negli studi di validazione

Geni	Sostituzioni	Inserzioni/delezioni	CNA	Riarrangiamenti	Precisione	Limite di rilevazione	Concordanza con NGS	Concordanza tra laboratori	Studio *in silico*	Estrazione del DNA	Banda di controllo	Sostanze interferenti
ABL1												
ACVR1B												
AKT1												
AKT2												
AKT3												
*ALK**												
ALOX12B												
AMER1 (FAM123B)												
APC												
AR												
ARAF												
ARFRP1												
ARID1A												
ASXL1												
ATM												
ATR												
ATRX												
AURKA												
AURKB												
AXIN1												
AXL												
BAP1												
BARD1												
BCL2												

Geni	Sostituzioni	Inserzioni/delezioni	CNA	Riarrangiamenti	Precisione	Limite di rilevazione	Concordanza con NGS	Concordanza tra laboratori	Studio *in silico*	Estrazione del DNA	Banda di controllo	Sostanze interferenti
BCL2L1			■					■	■		■	■
BCL2L2	■		■	■				■	■			
BCL6	■	■	■		■			■	■		■	
BCOR	■	■			■	■	■	■	■	■		
BCORL1	■	■			■	■	■	■	■	■	■	
BCR									■			
BRAF	■	■		■	■	■	■	■	■	■		■
BRCA1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
BRCA2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
BRD4	■	■			■	■		■	■	■		
BRIP1	■	■			■	■	■	■	■	■		■
BTG1	■	■			■			■	■			
BTG2									■			
BTK	■				■	■		■	■			
C11orf30 (EMSY)	■	■	■		■	■		■	■	■	■	
CALR	■						■		■			
CARD11	■	■	■		■	■		■	■			
CASP8	■	■				■		■	■		■	
CBFB									■			
CBL	■	■			■	■	■	■	■	■	■	■
CCND1	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■
CCND2	■		■					■	■			
CCND3	■		■			■		■	■	■		
CCNE1	■		■			■	■	■	■	■		
CD22	■	■			■	■			■			
CD274	■	■	■					■	■	■		
CD70									■			
CD74									■			
CD79A		■				■			■			
CD79B	■								■	■		
CDC73	■			■				■	■		■	■
CDH1	■	■			■	■	■	■	■	■		
CDK12	■	■	■			■	■	■	■			
CDK4	■		■		■		■	■	■	■		■
CDK6	■								■			■
CDK8	■		■		■	■	■	■	■		■	
CDKN1A	■	■					■	■	■	■		
CDKN1B	■	■				■		■	■			
CDKN2A	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CDKN2B	■		■		■	■		■	■	■	■	■
CDKN2C			■						■		■	
CEBPA	■	■	■		■		■	■	■	■		
CHEK1	■				■		■	■	■	■		
CHEK2	■	■				■	■	■	■			
CIC	■	■			■	■		■	■			
CREBBP	■	■			■	■	■	■	■	■	■	
CRKL	■	■			■	■			■	■		
CSF1R	■			■	■	■	■	■	■	■	■	
CSF3R	■	■			■	■	■		■		■	
CTCF	■	■			■			■	■	■	■	
CTNNA1	■	■	■	■	■			■	■	■		
CTNNB1	■	■	■	■	■		■	■	■	■		■

Geni	Sostituzioni	Inserzioni/delezioni	CNA	Riarrangiamenti	Precisione	Limite di rilevazione	Concordanza con NGS	Concordanza tra laboratori	Studio *in silico*	Estrazione del DNA	Banda di controllo	Sostanze interferenti
CUL3	■	■						■	■		■	
CUL4A	■		■		■			■	■	■	■	
CXCR4									■			
CYP17A1	■				■			■	■			■
DAXX	■	■			■	■	■	■	■			
DDR1	■	■			■	■		■	■			
DDR2	■		■		■	■	■	■	■		■	
DIS3	■		■		■	■		■	■	■	■	
DNMT3A	■	■			■		■	■	■			
DOT1L	■		■		■			■	■			
EED									■			
EGFR	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
EP300	■	■			■	■		■	■	■		
EPHA3	■				■		■	■	■			
EPHB1	■	■			■	■		■	■	■		■
EPHB4	■	■			■	■		■	■	■		■
ERBB2	■		■		■	■	■	■	■		■	■
ERBB3	■	■	■	■	■		■	■	■	■		■
ERBB4	■	■	■		■	■	■	■	■	■		
ERCC4	■				■	■		■	■	■		■
ERG	■	■			■	■		■	■	■		
ERRFI1	■	■			■			■	■	■		
ESR1	■		■		■	■	■	■	■		■	
ETV4									■			
ETV5									■			
ETV6									■			
EWSR1				■	■				■			
EZH2	■				■		■	■	■		■	
EZR									■			
FAM46C	■							■	■			
FANCA	■	■	■		■		■	■	■	■		
FANCC	■				■	■		■	■	■		■
FANCG	■	■	■		■	■		■	■	■		
FANCL	■	■				■		■	■		■	
FAS	■	■				■		■	■			
FBXW7	■	■			■	■	■	■	■	■		■
FGF10	■		■		■	■		■	■		■	
FGF12	■		■					■	■		■	
FGF14	■		■		■			■	■	■	■	■
FGF19	■	■	■		■			■	■	■	■	
FGF23	■		■			■		■	■			
FGF3	■		■	■	■	■		■	■	■	■	
FGF4	■		■		■			■	■	■	■	
FGF6	■		■					■	■	■		
FGFR1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
FGFR2	■		■	■		■	■	■	■	■		
FGFR3	■				■		■	■	■	■		■
FGFR4	■	■			■	■	■	■	■		■	
FH	■	■			■			■	■			
FLCN	■	■			■	■		■	■	■		
FLT1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
FLT3	■		■		■		■	■	■	■	■	
FOXL2	■	■			■	■		■	■		■	

Geni	Sostituzioni	Inserzioni/delezioni	CNA	Riarrangiamenti	Precisione	Limite di rilevazione	Concordanza con NGS	Concordanza tra laboratori	Studio *in silico*	Estrazione del DNA	Banda di controllo	Sostanze interferenti
FUBP1	■	■			■			■	■	■		■
GABRA6	■	■	■		■			■	■	■		
GATA3	■	■	■		■	■	■	■	■		■	
GATA4	■	■	■			■		■	■			
GATA6	■	■	■		■	■		■	■	■		
GID4 (C17orf39)	■							■	■			
GNA11	■		■	■	■		■	■	■			
GNA13	■				■			■	■	■		
GNAQ	■					■	■	■	■			
GNAS	■		■		■	■	■	■	■		■	
GRM3	■				■	■	■	■	■	■		
GSK3B	■							■	■			
H3F3A									■			
HDAC1	■				■				■			
HGF	■				■			■	■	■		■
HNF1A	■	■			■	■	■	■	■	■		
HRAS	■	■					■	■	■			■
HSD3B1	■				■			■	■			
ID3									■			
IDH1	■	■			■	■	■	■	■	■		■
IDH2	■	■			■		■	■	■	■		
IGF1R	■	■	■		■	■	■	■	■	■		■
IKBKE	■	■	■		■	■		■	■			
IKZF1	■		■		■	■	■	■	■			
INPP4B	■				■	■		■	■	■		
IRF2	■				■			■	■			
IRF4									■			
IRS2	■	■	■		■	■		■	■	■	■	
JAK1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
JAK2	■	■	■		■		■	■	■	■		
JAK3	■	■	■			■	■	■	■	■		
JUN	■					■			■			
KDM5A	■	■	■		■	■		■	■		■	
KDM5C	■			■	■	■		■	■			
KDM6A	■	■	■		■	■	■	■	■	■		
KDR	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	
KEAP1	■	■			■	■		■	■	■		■
KEL	■				■			■	■	■		■
KIT	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■
KLHL6	■	■	■		■			■	■	■	■	
KMT2A (MLL)	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	
KMT2D (MLL2)	■	■		■	■	■		■	■	■	■	
KRAS	■	■	■		■	■	■	■	■	■		
LTK	■	■			■	■		■	■	■		
LYN	■	■	■	■	■	■		■	■	■		
MAF	■				■	■			■			
MAP2K1	■						■	■	■			
MAP2K2	■			■	■	■	■	■	■			
MAP2K4	■	■	■	■			■	■	■	■		
MAP3K1	■	■	■		■	■		■	■	■	■	
MAP3K13	■		■		■	■		■	■	■	■	■
MAPK1	■	■				■	■		■			

Geni	Sostituzioni	Inserzioni/delezioni	CNA	Riarrangiamenti	Precisione	Limite di rilevazione	Concordanza con NGS	Concordanza tra laboratori	Studio *in silico*	Estrazione del DNA	Banda di controllo	Sostanze interferenti
MCL1	■		■		■		■	■	■			
MDM2	■		■		■		■		■	■		
MDM4	■		■				■	■	■	■		
MED12	■	■			■	■	■	■	■	■	■	
MEF2B	■		■		■			■	■	■	■	
MEN1	■	■			■	■	■	■	■		■	
MERTK	■							■	■			
MET	■	■			■	■	■	■	■	■		
MITF	■		■		■		■	■	■			
MKNK1	■					■		■	■	■		
MLH1	■	■	■		■	■	■	■	■			
MPL	■	■	■		■		■	■	■	■		
MRE11A	■	■	■	■	■		■	■	■			
MSH2	■	■			■	■	■	■	■		■	
MSH3	■	■			■	■			■	■		
MSH6	■	■			■	■	■	■	■	■		
MST1R	■	■			■	■		■	■	■		■
MTAP	■		■		■	■	■		■	■	■	■
MTOR	■	■			■	■	■	■	■	■		
MUTYH	■				■	■	■	■	■	■		
MYB				■				■	■			
MYC	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
MYCL	■	■	■		■			■	■			
MYCN	■	■					■	■	■			
MYD88	■						■	■	■			
NBN	■	■	■		■	■	■	■	■	■		
NF1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
NF2	■	■			■		■	■	■			
NFE2L2	■	■				■		■	■	■		
NFKBIA	■	■	■			■		■	■		■	
NKX2-1	■	■	■			■	■	■	■		■	
NOTCH1	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■
NOTCH2	■	■	■		■		■	■	■		■	■
NOTCH3	■	■			■	■		■	■	■	■	■
NPM1			■					■	■			
NRAS	■						■	■	■			
NT5C2		■				■			■			
NTRK1	■	■	■		■	■	■	■	■	■		■
NTRK2	■	■				■	■	■	■	■		■
NTRK3	■				■	■	■	■	■	■		
NUTM1									■			
P2RY8	■				■				■			
PALB2	■	■			■	■	■	■	■	■		
PARK2	■	■	■	■	■			■	■		■	
PARP1	■				■	■		■	■			
PARP2	■	■			■			■	■		■	
PARP3	■							■	■	■		■
PAX5	■		■				■	■	■			
PBRM1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
PDCD1		■				■			■			
PDCD1LG2	■	■	■		■			■	■			
PDGFRA	■		■		■	■	■	■	■	■	■	■
PDGFRB	■		■		■		■	■	■	■	■	

Geni	Sostituzioni	Inserzioni/delezioni	CNA	Riarrangiamenti	Precisione	Limite di rilevazione	Concordanza con NGS	Concordanza tra laboratori	Studio *in silico*	Estrazione del DNA	Banda di controllo	Sostanze interferenti
PDK1	■							■	■			
PIK3C2B	■	■	■	■	■	■		■	■	■		
PIK3C2G	■	■	■		■	■		■	■	■	■	■
PIK3CA	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
PIK3CB	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	
PIK3R1	■	■	■	■	■	■	■	■	■			
PIM1	■				■				■			
PMS2	■		■		■	■	■	■	■	■		
POLD1	■	■	■		■	■	■	■	■	■		■
POLE	■	■			■	■	■	■	■	■	■	
PPARG	■					■		■	■			
PPP2R1A	■	■	■		■			■	■	■	■	
PPP2R2A	■					■			■			
PRDM1	■		■			■		■	■			
PRKAR1A	■							■	■			
PRKCI	■	■	■					■	■	■	■	
PTCH1	■	■			■	■	■	■	■	■		
PTEN	■	■	■		■		■	■	■	■		
PTPN11	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■	
PTPRO	■				■				■	■		
QKI		■			■			■	■			
RAC1	■						■	■	■	■		
RAD21	■		■		■	■	■		■	■	■	
RAD51	■							■	■			
RAD51B (RAD51L1)	■		■		■	■		■	■		■	
RAD51C	■	■				■	■	■	■	■		
RAD51D (RAD51L3)	■		■		■	■	■		■			
RAD52	■		■		■			■	■			
RAD54L	■	■			■			■	■	■	■	
RAF1	■				■		■	■	■	■		■
RARA	■	■	■		■	■	■	■	■	■		
RB1	■	■	■	■	■		■	■	■	■		
RBM10	■	■				■		■	■	■		
REL	■	■						■	■			■
RET	■				■	■	■	■	■	■		
RICTOR	■		■		■	■	■	■	■	■	■	■
RNF43	■	■			■	■		■	■	■		
ROS1	■	■	■		■	■	■	■	■	■		
RPTOR	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■
RSPO2									■			
SDC4									■			
SDHA	■	■	■		■	■		■	■	■	■	■
SDHB	■							■	■			
SDHC	■		■		■				■			■
SDHD	■							■	■			
SETD2	■	■			■	■		■	■	■		
SF3B1	■				■	■	■	■	■	■		
SGK1	■		■			■			■		■	
SLC34A2									■			
SMAD2	■		■		■		■	■	■			
SMAD4	■	■	■	■	■	■	■	■	■			

Geni	Sostituzioni	Inserzioni/delezioni	CNA	Riarrangiamenti	Precisione	Limite di rilevazione	Concordanza con NGS	Concordanza tra laboratori	Studio *in silico*	Estrazione del DNA	Banda di controllo	Sostanze interferenti
SMARCA4	■	■			■	■	■	■	■			
SMARCB1	■	■					■	■	■			
SMO	■	■		■	■	■	■	■	■			
SNCAIP	■	■	■		■			■	■	■	■	■
SOCS1	■							■	■			
SOX2	■		■			■		■	■		■	
SOX9	■	■			■	■		■	■	■	■	■
SPEN	■	■		■	■	■		■	■	■		■
SPOP	■		■	■	■	■	■	■	■	■		
SRC	■		■		■		■	■	■	■		
STAG2	■	■					■	■	■	■		
STAT3	■	■	■		■			■	■	■		
STK11	■	■	■	■	■		■	■	■	■		■
SUFU	■						■	■	■	■		
SYK	■				■	■		■	■	■		
TBX3	■	■	■	■	■	■		■	■	■		
TEK	■		■		■			■	■	■		
TERC			■					■	■		■	
TERT (promotore)	■					■		■	■	■	■	■
TET2	■	■			■	■	■	■	■	■	■	
TGFBR2	■	■			■	■	■	■	■	■		
TIPARP	■		■			■		■	■		■	■
TMPRSS2				■				■	■			
TNFAIP3	■	■	■		■	■		■	■	■		
TNFRSF14	■	■			■			■	■			
TP53	■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■
TSC1	■	■			■	■	■	■	■	■		
TSC2	■	■			■	■	■	■	■	■	■	■
TYRO3	■	■			■	■		■	■	■	■	
U2AF1	■						■	■	■			
VEGFA	■							■	■	■		■
VHL	■						■	■	■			
WHSC1	■	■			■	■			■	■		
WHSC1L1	■	■	■		■				■			
WT1	■	■					■	■	■	■		■
XPO1	■	■			■			■	■	■		
XRCC2				■	■				■			
ZNF217	■	■	■		■	■		■	■	■	■	
ZNF703	■	■	■		■	■		■	■	■		■

2.1 Concordanza - confronto con un metodo ortogonale

La rilevazione delle alterazioni con il test F1CDx è stata confrontata con i risultati di un test NGS validato esternamente (NGSve). Complessivamente vi erano 157 geni sovrapposti tra i due test. Nel confronto tra le alterazioni corte, comprese sostituzioni di basi e indel, rilevate da F1CDx e dal metodo ortogonale sono stati inclusi 188 campioni provenienti da 46 tumori diversi. Nella Tabella 6 qui di seguito è riportato un riassunto della concordanza percentuale positiva (*Positive Percent Agreement*, PPA) e della concordanza percentuale negativa (*Negative Percent Agreement*, NPA). Sono state osservate differenze tra le piattaforme nell'identificazione di alterazioni di varianti di significatività incerta (*variants of unknown significance*, VUS), che si prevede dipendano dalle differenze di filtrazione utilizzate nel test F1CDx e nel test NGSve. Sono stati inoltre calcolati il valore

predittivo negativo e il valore predittivo positivo, che hanno mostrato di essere diversi rispetto alla concordanza percentuale perché le due piattaforme filtrano le VUS in modo differente. Le alterazioni discordanti non relative alla filtrazione delle VUS sono state causate principalmente da delezioni con bassa frazione allelica nelle regioni omopolimeriche. La *pipeline* di identificazione delle varianti di F1CDx impone un filtro basato su MAF ≥0,10 per le indel nelle regioni omopolimeriche per ridurre la probabilità di identificare dei falsi positivi a causa di artefatti introdotti dalla tecnologia. In questo senso, la differenza osservata era dovuta alle diverse soglie di filtro tra le due piattaforme. Per ulteriori risultati di concordanza relativi alle varianti associate al test CDx, vedere il Riassunto degli studi clinici nella Sezione 4.

Tabella 6. Riassunto della concordanza per le varianti corte, incluse sostituzioni e indel

	F1CDx+ /NGSve+	F1CDx- /NGSve+	F1CDx+ /NGSve-	F1CDx- /NGSve-	PPA [IC al 95%]*	NPA [IC al 95%]*
Tutte le varianti corte	1.282	73	375	284.218	94,6% [93,3%-95,8%]	99,9% [99,9%-99,9%]
Sostituzioni	1.111	39	334	242.540	96,6% [95,4%-97,6%]	99,9% [99,8%-99,9%]
Indel	171	34	41	41.678	83,4% [77,6%-88,2%]	99,9% [99,9%-99,9%]

*La PPA e la NPA sono state calcolate senza aggiustamento per la distribuzione dei campioni arruolati utilizzando il test sviluppato in laboratorio per FoundationOne (*FoundationOne Laboratory Developed Test*, F1 LDT), pertanto queste stime potrebbero essere distorte verso l'alto.

2.2 Concordanza - confronto con FoundationOne®

Per supportare l'uso dei dati retrospettivi generati utilizzando FoundationOne® (F1 LDT), è stato condotto uno studio di concordanza con F1CDx. In questo studio è stata valutata una serie di prova di 165 campioni. La PPA e la NPA tra F1CDx e F1 LDT, utilizzando il test F1 come metodo di riferimento, sono state calcolate per tutte le alterazioni, nonché per le alterazioni suddivise per tipo: varianti corte, alterazioni del numero di copie (CNA) e riarrangiamenti. Nello studio sono state incluse complessivamente 2.325 varianti, tra cui 2.026 varianti corte, 266 alterazioni del numero di copie e 33 riarrangiamenti. I risultati dello studio sono riassunti nella Tabella 7 qui di seguito.

Tabella 7. Riassunto della concordanza tra laboratori nel confronto tra FoundationOne®CDx e FoundationOne LDT (F1)

	F1CDx+/F1 LDT+	F1CDx-/F1 LDT+	F1CDx+/F1 LDT-	F1CDx-/F1 LDT-	PPA	NPA
Tutte le varianti	2.246	33	46	322.890	98,6%	99,99%
Tutte le varianti corte	1.984	19	23	299.099	99,1%	99,99%
Sostituzioni	1.692	10	19	254.854	99,4%	99,99%
Indel	292	9	4	44.245	97,0%	99,99%
Tutte le CNA	230	14	22	19.204	94,3%	99,9%
Amplificazioni	157	10	12	14.671	94,0%	99,9%
Perdite	73	4	10	4.533	94,8%	99,8%
Riarrangiamenti	32	0	1	4.587	100,0%	99,98%

Sono stati valutati i referti qualitativi per la MSI (MSI-H o MSS) nei test F1 LDT e F1CDx. La PPA, la NPA e la concordanza percentuale complessiva (*Overall Percent Agreement*, OPA) dello stato della MSI tra i due test sono state calcolate per tutti i 165 campioni. Dei 165 campioni, 5 erano MSI-H secondo F1 LDT e 160 erano MSS secondo F1 LDT; è stato osservato un campione discordante. Il campione discordante è stato identificato come MSS da F1 LDT e come MSI-H da F1CDx. Dopo la verifica manuale, il caso discordante aveva un punteggio MSI

vicino alla soglia utilizzata per classificare lo stato della MSI. La PPA era del 100% con un intervallo di confidenza al 95% (IC al 95%) di 47,8-100%, la NPA era del 99,5% con un IC al 95% di 96,6%-99,98% e l'OPA era del 99,4% con un IC al 95% di 96,7%-99,98%.

La concordanza del TMB è stata valutata confrontando il risultato del TMB in termini di mutazioni per Mb. Le analisi sono state condotte per esaminare i 21 campioni con punteggio di TMB ≥10, nonché tutti i 153 campioni con punteggi di TMB diversi da zero. La concordanza del punteggio di TMB tra i test F1CDx e FoundationOne LDT era definita come il rapporto tra i due punteggi su scala logaritmica, rapporto logaritmico (ϑDX1/ϑT7). L'IC *bootstrap* al 90% del rapporto rientra nell'intervallo di equivalenza (-0,5; +0,5), quindi i punteggi del TMB sono considerati equivalenti. Le informazioni dettagliate sono riassunte nella Tabella 8 qui di seguito. Con l'analisi di regressione lineare condotta utilizzando il TMB calcolato con F1 LDT come predittore e il TMB calcolato con F1CDx come esito, si è ottenuta un'intercetta di -0,27782 [IC al 95%: -0,662; 0,106] e una pendenza di 0,94064 [IC al %95: 0,919; 0,963]. Nella Figura 1 qui di seguito è mostrata una rappresentazione grafica dei dati.

Tabella 8. Riassunto dei dati di concordanza dei punteggi di TMB

Analisi	**Numero di campioni**	**IC *bootstrap* al 90% del rapporto *log* ($\vartheta_{DX1}/\vartheta_{T7}$)**	**Criteri di accettabilità**
Punteggio TMB F1 LDT ≥10	21	(-0,246; -0,047)	IC al 90% entro (-0,5; 0,5)
Punteggio TMB diverso da zero con F1 LDT o F1CDx	153	(-0,237; -0,120)	

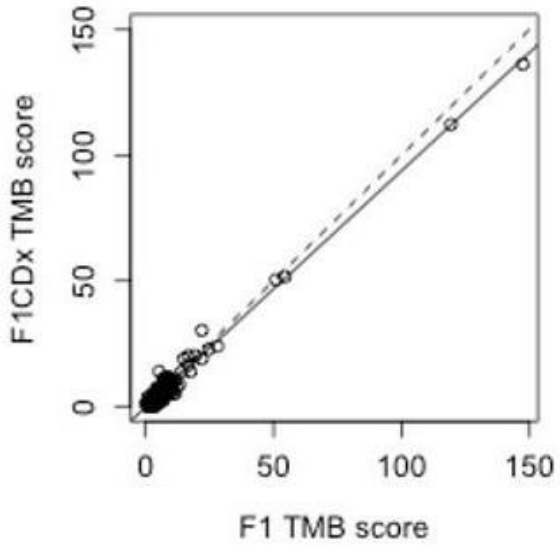

Figura 1. Confronto dei punteggi di TMB con F1CDx e dei punteggi di TMB con F1 LDT. La linea nera continua rappresenta la regressione lineare del punteggio di TMB F1CDx ~ TMB F1 LDT, mentre la linea tratteggiata rappresenta il grafico diagonale che denota y=x.

2.3 Concordanza - confronto delle identificazioni di LOH e HRD con FoundationFocus™ CDx BRCA LOH

Per supportare la refertazione della LOH su F1CDx, è stato condotto uno studio di concordanza in cui sono stati confrontati i risultati dei dati analizzati utilizzando la *pipeline* versione 3.1.3 di F1CDx con i dati di FoundationFocus™ CDx *BRCA* LOH (FFocus). In questa analisi è stata inclusa una replica casuale dei campioni di precisione FFocus LOH sPMA e una replica dello studio FFocus LOH sPMA LoD per un totale di 25 campioni. I risultati dello studio sono riassunti nella Tabella 9a qui di seguito.

Tabella 9a: Riassunto della concordanza dei confronti delle identificazioni della LOH

Concordan	**Stima**	**IC al 95%**	**Criteri di**

za		(esatto)	accettabilità
OPA	96,0%	79,6%-99,9%	Basso IC al 95% >85%
PPA	94,70%	74,0%-99,9%	PPA >90%
NPA	100,00%	54,1%-100,0%	NPA >90%

La concordanza dell'identificazione dello stato di HRD è stata determinata valutando i dati ottenuti con la sperimentazione clinica ARIEL3 utilizzando la *pipeline* di F1CDx. Questi dati sono riassunti nelle Tabelle 9b e 9c qui di seguito.

Tabella 9b: Contingenza dello stato di HRD con F1CDx v3.1.3 e dello stato di HRD con FFocus in 518 campioni provenienti dallo studio ARIEL3. I numeri in grassetto sono i numeri dei casi con risultato di HRD determinato da entrambe le soluzioni *pipeline* e sono utilizzati nel calcolo della concordanza della Tabella 10c

Stato di HRD		F1CDx v3.1.3			
		Indeterminato	**Negativo**	**Positivo**	**Totale**
FFocus	**Indeterminato**	22	5	0	27
	Negativo	1	**156**	**8**	165
	Positivo	1	**8**	**317**	326
	Totale	24	169	325	518

Tabella 9c: Concordanza tra lo stato di HRD con F1CDx v3.1.3 e lo stato di HRD con FFocus in 489 campioni con risultato di HRD determinato con entrambi i test nello studio ARIEL3

	Percentuale di concordanza [IC al 95%]
PPA	97,5%[95,2%-98,9%]
NPA	95,1%[90,6%-97,9%]
OPA	96,7%[94,7%-98,1%]

2.4 Confrontabilità dei tessuti

È stata condotta un'analisi retrospettiva su larga scala, utilizzando 80.715 campioni di 43 tipi di tessuto, per stabilire la confrontabilità delle prestazioni dei test in diversi tipi di tessuto tumorale. Lo studio aveva l'obiettivo di stabilire che le prestazioni del test dopo l'estrazione del DNA fossero indipendenti dal tipo di tessuto da cui era stato estratto il DNA. Nell'analisi retrospettiva dei dati sono stati inclusi i campioni analizzati con il test F1 LDT. I dati relativi all'estrazione del DNA e quelli successivi all'estrazione del DNA sono stati valutati per la confrontabilità delle prestazioni in diversi tipi di tessuto. La serie dei dati per l'analisi comprendeva campioni clinici di routine analizzati utilizzando il test F1 LDT dal 25 marzo 2015 al 13 marzo 2017.

Per 39 dei 43 tipi di tessuto, ≥90% dei campioni ha superato il controllo di qualità dell'estrazione del DNA. Per gli altri quattro tipi di tessuto (polmone, pancreas, pelvi e prostata), i tassi di superamento del controllo di qualità dell'estrazione del DNA erano rispettivamente dell'89,6%, 89%, 89% e 79,7%. Ciascuno di questi quattro tipi di tessuto ha caratteristicamente biopsie di piccole dimensioni e potrebbe essere più probabile che necessiti anche di una macro-dissezione.

Tra i campioni inclusi nel test allo stadio di preparazione della libreria (*Library Construction*, (LC), per 39 dei 43 tipi di tessuto è stato generato un referto del paziente in ≥90% dei campioni. I quattro tipi al di sotto del 90% includono tessuto pancreatobiliare, appendice, pericardio e prostata e i loro tassi di superamento del controllo di qualità erano rispettivamente dell'83%, 88%, 79% e 84%. Per questi quattro tipi di tessuto, la causa più frequente

di insuccesso è stata una bassa purezza del tumore, senza alterazioni rilevate. La resa media della LC nei vari tipi di tessuto era compresa tra 7.050 ng e 8.643 ng rispetto al minimo richiesto di 545 ng. La percentuale di campioni che hanno superato il controllo di qualità della LC per ogni tipo di tessuto era compresa tra il 98% e il 100%. Dopo la cattura per ibridazione (*Hybrid Capture*, HC), la resa media tra i vari tipi di tessuto era compresa tra 434 ng e 576 ng, ben al di sopra del requisito minimo di 140 ng. La percentuale di campioni che hanno superato il controllo di qualità della HC per i vari tipi di tessuto era compresa tra il 97% e il 100%. La copertura mediana media degli esoni valutata nei vari tipi di tessuto era compresa tra 702X e 793X, con una percentuale di campioni che hanno superato il controllo di qualità per la copertura mediana nei vari tipi di tessuto compresa tra il 96% e il 100%. L'uniformità della copertura è stata valutata calcolando la percentuale media di bersagli con una copertura >100X nei vari tipi di tessuto ed è risultata compresa tra il 99,0% e il 99,8%. La percentuale di campioni che hanno superato questo parametro di controllo di qualità era compresa tra il 98% e il 100%. Il tasso medio di errore di sequenziamento, valutato in vari tipi di tessuto, è 0,0028-0,0031, ben al di sotto del tasso di errore richiesto (0,01) per l'accettabilità del test. Il tasso di superamento del controllo di qualità per tutti i tipi di tessuto era del 100% per il tasso di errore. I dati delle prestazioni relativi a questo studio sono riassunti nella Tabella 10 qui di seguito.

Tabella 10. Riassunto dell'analisi successiva all'estrazione del DNA

Nome del parametro di controllo di qualità	Specifica del controllo di qualità di F1CDx	Prestazioni medie del controllo di qualità in vari tipi di tessuto	Tasso di superamento del controllo di qualità in vari tipi di tessuto	Tipi di tessuto con un tasso di superamento del controllo di qualità ≥90%
Tasso complessivo di superamento/qualificazione del referto	Tasso di superamento: ≥90% dei campioni	N/A	79%-98%	39/43 (90,6%)
Resa della LC	≥545 ng	7.050-8.643 ng	98-100%	43/43 (100%)
Resa della libreria dopo la HC	≥140 ng	434-576 ng	97-100%	43/43 (100%)
Copertura mediana degli esoni	≥250X	702-793X	96-100%	43/43 (100%)
Percentuale di copertura dei bersagli >100X	≥95% dei bersagli a copertura ≥100X	99,0%-99,8% dei bersagli	98%-100%	43/43 (100%)
Tasso di errore del sequenziamento	<1%	0,0028-0,0031	100%	43/43 (100%)
Dati del numero di copie con artefatti	N/A*	N/A	93,8-100%	43/43 (100%)

*solo informativo, non una specifica

2.5 Specificità analitica

2.5.1 Sostanze interferenti

La solidità del processo del test F1CDx è stata determinata valutando campioni umani fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) in presenza di sostanze interferenti esogene ed endogene. Sono stati valutati in duplicato cinque campioni FFPE che rappresentavano cinque tipi di tumore (ovarico, polmonare, colorettale, mammario e melanoma) e includevano tipi di varianti rappresentative (sostituzione, indel, amplificazione, delezione omozigote e riarrangiamento (Tabella 11). Sono state inoltre valutate 54 alterazioni corte (sostituzioni e indel). È stata valutata l'aggiunta di sostanze interferenti tra cui melanina (endogena), etanolo (esogena), proteinasi K (esogena) e codici a barre degli indici molecolari (*molecular index barcodes*, MIB) (esogena) per determinare se influivano sul test F1CDx; i risultati sono stati confrontati con la condizione di controllo (senza sostanze interferenti).

Tabella 11. Riassunto dei tipi di tumore e dei tipi di varianti inclusi nello studio

Tipo di tumore	Gene (e variante, se rilevante)	Tipo di variante
CRC	*FGFR1*	Riarrangiamento
	BCL2L1	Amplificazione
	AXIN1 c.1058G>A (R353H)	Sostituzione
	SOX9 c.768_769insGG (R257fs*23)	Inserzione
Carcinoma mammario	*ERBB2*	Amplificazione
	AKT1	Amplificazione
	CCND1	Amplificazione
Carcinoma polmonare	*CDKN2A*	Delezione omozigote
	CDKN2B	Delezione omozigote
	EGFR	Amplificazione
Carcinoma ovarico	*BRCA1* c.5263_5264insC (Q1756fs*74)	Inserzione
	ERCC4 c.2395C>T	Sostituzione
	TP53 c.779_779delC (S261fs*84)	Delezione
Melanoma	*BRAF* c.1799T>A (V600E)	Sostituzione
	TP53 c. 856G>A (E286K)	Sostituzione
	IGF1R	Amplificazione

Le sostanze interferenti comprendevano melanina, etanolo, proteinasi K e codici a barre degli indici molecolari, come indicato nella Tabella 12 qui di seguito. In questo studio, ognuno dei cinque campioni FFPE è stato analizzato in due o quattro repliche ciascuno, generando un totale di 170 dati relativi ai cinque campioni (10 senza sostanze interferenti, 80 per la valutazione della melanina, dell'etanolo e della proteinasi K e 80 per i codici a barre degli indici molecolari).

Tabella 12. Sostanze interferenti valutate

Sostanze	Livello	N. di campioni	N. di repliche/campione
Nessuna sostanza interferente	-	5	2
Melanina	0,025 µg/ml	5	2
Melanina	0,05 µg/ml	5	2
Melanina	0,1 µg/ml	5	2
Melanina	0,2 µg/ml	5	2
Proteinasi K	0,04 mg/ml	5	2
Proteinasi K	0,08 mg/ml	5	2
Etanolo	5%	5	2
Etanolo	2,5%	5	2

Sostanze	Livello	N. di campioni	N. di repliche/campione
MIB	0	5	4
MIB	5%	5	4
MIB	15%	5	4
MIB	30%	5	4

Le sostanze sono state considerate non interferenti se, rispetto all'assenza di sostanze interferenti, la resa del DNA era sufficiente a soddisfare i requisiti standard del processo di isolamento del DNA (≥55 ng), se la qualità era sufficiente a creare prodotti in base alle specifiche di preparazione della libreria (≥545 ng) e di cattura per ibridazione (≥140 ng) e se il tasso di successo del campione (frazione di campioni che hanno soddisfatto tutti i requisiti e le specifiche del processo), in tutte le repliche aggregate, è ≥90%. L'analisi della sequenza è stata valutata come concordanza percentuale per ciascun campione ed è stata calcolata come numero di repliche con l'identificazione corretta dell'alterazione refertata per il numero totale di repliche analizzate. La concordanza percentuale (frazione delle identificazioni corrette) è stata calcolata in tutte le repliche. L'accettabilità della concordanza richiedeva un minimo del 90% di identificazioni corrette in ogni categoria di trattamento.

Tutti i campioni analizzati a tutti i livelli di sostanze interferenti hanno soddisfatto i requisiti e le specifiche del processo, raggiungendo il criterio di accettabilità ≥90%, a indicare che la qualità dei campioni non è stata influenzata dalle sostanze interferenti ai livelli valutati. La concordanza delle varianti per le valutazioni di melanina, proteinasi K e MIB era del 100%, mentre era del 95,3% per la valutazione dell'etanolo; ciascuna ha soddisfatto il criterio di accettabilità ≥90%, a indicare che le prestazioni non erano influenzate dalle sostanze interferenti analizzate. Oltre alle varianti scelte per rappresentare i tipi di alterazioni specifici riassunti nella Tabella 11, i campioni inclusi nello studio contenevano altre 54 alterazioni corte (sostituzioni e indel) e mostravano una concordanza del 100% in tutte le repliche per ogni variante.

Vedere il Riassunto dei dati di sicurezza e di efficacia per P160018 per ulteriori studi di interferenza nei quali è stata valutata l'interferenza di tessuto necrotico, trigliceridi, emoglobina e xilene, oltre a etanolo, proteinasi K e MIB, nel tessuto ovarico e sono state valutate le alterazioni *BRCA1/2*.

2.5.2 Analisi *in silico* - specificità delle esche di cattura per ibridazione

La specificità delle esche è stata determinata mediante una valutazione della copertura al livello di base per regioni bersaglio incluse nel test F1CDx. La mancanza di specificità delle esche e/o un'insufficiente inclusione di esche determinerebbero regioni di letture mappate di qualità ridotta a causa della cattura di contenuto fuori bersaglio. Questa analisi ha mostrato che tutte le regioni che potrebbero contenere alterazioni legate a indicazioni diagnostiche associate mostrano costantemente qualità elevata (MQS ≥ 30), con una copertura profonda ≥250X. Quando si valuta l'intera serie di geni, il 99,45% delle singole basi in regioni di codifica mirate +/-2 coppie di basi (*base pair*, bp) del sito di *splicing* intronico fiancheggiante è coperto con una copertura ≥100X e il 91,45% delle singole basi entro introni mirati a livello di piattaforma ha una copertura ≥100X**.**

2.5.3 *Carryover*/contaminazione crociata

Non sono stati osservati *carryover* o contaminazione crociata quando si sono alternati campioni positivi e negativi per le varianti di *BRCA1* e *BRCA2*, valutate con un andamento a scacchiera (vedere il Riassunto dei dati di sicurezza e di efficacia per P160018). Inoltre, sono stati esaminati i dati ottenuti con piastre contenenti un livello elevato confermato di amplificazioni *ERBB2*, alterazioni T790M di *EGFR* o fusioni di *ALK* per determinare la contaminazione crociata nei pozzetti adiacenti contenenti campioni negativi confermati. Non è stata osservata nessuna contaminazione.

2.6 Precisione: ripetibilità e riproducibilità

In questo studio sono state valutate la ripetibilità e la riproducibilità delle alterazioni associate alle indicazioni del test CDx e delle alterazioni a livello di piattaforma, compresa la concordanza per MSI, TMB e MAF delle varianti corte. La ripetibilità tra le aliquote intra-serie (analizzate sulla stessa piastra alle stesse condizioni) e la riproducibilità delle aliquote tra serie (analizzate su piastre diverse in condizioni diverse) sono state valutate e

confrontate in tre sequenziatori diversi e con tre lotti di reagenti diversi nell'arco di più giorni di esecuzione da parte di più operatori.

Complessivamente 47 campioni presentavano alterazioni rappresentative di alterazioni associate al test CDx, nonché alterazioni esemplari in una grande varietà di contesti genomici, come mostrato nelle Tabelle 13 e 14 qui di seguito. Ciascun campione conteneva inoltre ulteriori alterazioni che sono state incluse nella valutazione per un totale di 717 alterazioni valutate. La lunghezza massima di un'inserzione in questo studio era di 30 bp e la delezione più lunga era di 263 bp.

Tabella 13. Serie di campioni selezionati per la validazione del test CDx

Gene	Numero di campioni univoci	Alterazione	Tipo di tumore
EGFR	3	Delezione nell'esone 19	NSCLC
	2	L858R nell'esone 21	
	2	T790M nell'esone 20	
KRAS	3	Sostituzione dei codoni 12/13	CRC
ALK	3	Fusione	NSCLC
BRAF	3	V600E/V600K	Melanoma
ERBB2	3	Amplificazione	Carcinoma mammario

Tabella 14. Serie di campioni selezionati per la validazione della piattaforma

Tipo di alterazione	Numero di campioni univoci	Dimensione dell'alterazione	Contesto genomico
Sostituzione	3	-	-
Inserzione corta	2	1-2 bp	Ripetizioni omopolimeriche
Inserzione corta	2	1-2 bp	Ripetizioni dinucleotidiche
Inserzione corta	2	3-5 bp	-
Inserzione corta	2	>5 bp	-
Delezione corta	2	1-2 bp	Ripetizioni omopolimeriche
Delezione corta	2	1-2 bp	Ripetizioni dinucleotidiche
Delezione corta	2	3-5 bp	-
Delezione corta	2	>5 bp	-
Amplificazione	3	-	-
Delezione omozigote	3	-	-
Riarrangiamento	3	-	-

I risultati hanno dimostrato che il test F1CDx è solido per quanto riguarda la ripetibilità e la riproducibilità di

identificazione delle alterazioni genomiche. In tutti i campioni, l'insuccesso del processo pre-sequenziamento è dell'1,5% e il tasso di nessuna identificazione è dello 0,18% per MSI, del 6,38% per TMB (tutti) e dello 0,22% per TMB (>10 mut/Mb). Nell'ambito della valutazione della ripetibilità e della riproducibilità per le varianti del test CDx, tutte le varianti di tutti i campioni erano concordanti al 100%. La percentuale di identificazioni negative in ogni sede di variante CDx per i campioni *wild-type* era del 100%.

Analogamente, la ripetibilità e la riproducibilità a livello di piattaforma hanno mostrato una concordanza complessiva elevata tra i vari tipi alterazioni e tassi elevati di identificazione di positivi e negativi a livello di campione, come riassunto nelle Tabelle 15 e 16 qui di seguito. Lo studio a livello di piattaforma ha incluso in totale 443 sostituzioni, 188 indel, 55 amplificazioni del numero di copie, 13 perdite del numero di copie e 18 riarrangiamenti nella serie di varianti di tutti i campioni.

Tabella 15. Riproducibilità tra le serie di varianti (numero di copie, riarrangiamento, sostituzione, indel)

Tipo di variante	N. di varianti	N. di confronti validi	N. di concordanze	Concordanza percentuale positiva	IC al 95% Limite inferiore	IC al 95% Limite superiore
CNA	68	67.524	67.300	99,67%	99,62%	99,71%
Riarrangiamenti	18	17.874	17.851	99,87%	99,81%	99,92%
Sostituzioni	443	439.899	439.649	99,94%	99,94%	99,95%
Indel	188	186.684	186.319	99,80%	99,78%	99,82%
Tutte le varianti	717	711.981	711.119	99,88%	99,87%	99,89%

Tabella 16. Tassi di identificazione di positivi e negativi per campione per le varianti di piattaforma (N=717)

Tipo/i di alterazione valutato/i		IC al 95% esatto			IC al 95% esatto	
	Tasso di identificazione di positivi*	Inferiore	Superiore	Tasso di identificazione di negativi**	Inferiore	Superiore
CNA/RI/SOS	100,00%	99,40%	100,00%	99,98%	99,95%	99,99%
CNA/SOS/indel	99,37%	98,38%	99,83%	99,96%	99,92%	99,98%
SOS/indel	100,00%	99,10%	100,00%	99,97%	99,95%	99,99%
CNA/SOS/indel	97,84%	96,89%	98,56%	99,84%	99,78%	99,89%
SOS/indel	99,81%	98,94%	100,00%	99,98%	99,95%	99,99%
SOS/indel	99,60%	97,81%	99,99%	99,94%	99,90%	99,97%
CNA/SOS/indel	98,33%	97,11%	99,14%	99,98%	99,96%	100,00%
SOS/indel	100,00%	99,83%	100,00%	99,97%	99,94%	99,99%
CNA/SOS/indel	100,00%	99,32%	100,00%	99,98%	99,96%	100,00%
RI/SOS/indel	96,46%	94,14%	98,05%	99,96%	99,92%	99,98%
CNA/SOS	98,67%	97,27%	99,46%	99,98%	99,96%	100,00%
CNA/RI/SOS/indel	96,27%	95,39%	97,02%	99,87%	99,82%	99,91%
RI/SOS/indel	98,23%	97,48%	98,80%	99,66%	99,58%	99,73%
CNA/SOS/indel	98,32%	97,57%	98,89%	99,92%	99,88%	99,95%
SOS/indel	99,30%	98,90%	99,58%	99,90%	99,86%	99,94%
CNA/RI/SOS/indel	85,42%	82,27%	88,20%	99,89%	99,84%	99,93%
RI/SOS/indel	97,75%	96,42%	98,68%	99,98%	99,95%	99,99%
RI/SOS/indel	95,30%	92,97%	97,03%	99,96%	99,93%	99,98%
CNA/RI/SOS/indel	100,00%	98,31%	100,00%	99,89%	99,84%	99,93%
CNA/RI/SOS/indel	100,00%	99,25%	100,00%	99,96%	99,93%	99,98%
CNA/SOS	96,83%	94,90%	98,17%	99,94%	99,90%	99,97%
CNA/RI/SOS/indel	95,97%	94,06%	97,40%	99,98%	99,96%	100,00%
CNA/SOS/indel	100,00%	99,42%	100,00%	99,93%	99,89%	99,96%
CNA/RI/SOS/indel	100,00%	99,30%	100,00%	99,95%	99,91%	99,97%

Tipo/i di alterazione valutato/i		IC al 95% esatto			IC al 95% esatto	
	Tasso di identificazione di positivi*	Inferiore	Superiore	Tasso di identificazione di negativi**	Inferiore	Superiore
RI/SOS	100,00%	99,05%	100,00%	100,00%	99,98%	100,00%
CNA/SOS	96,99%	95,39%	98,15%	99,84%	99,79%	99,89%
CNA/RI/SOS/indel	100,00%	98,95%	100,00%	99,93%	99,89%	99,96%
CNA/RI/SOS/indel	99,80%	99,29%	99,98%	99,98%	99,96%	100,00%

*Abbreviazioni: SOS=sostituzione, indel=inserzione o delezione, CNA=alterazione del numero di copie, RI=riarrangiamento

Per la valutazione della MSI, è stata osservata una concordanza del 100%, con un limite inferiore del 99,7% e un limite superiore del 100%. Per la determinazione del TMB, tredici campioni hanno soddisfatto i criteri di inclusione (TMB ≥10) per la valutazione della ripetibilità e della riproducibilità. Dodici dei 13 campioni (92,3%) hanno soddisfatto i requisiti di coefficiente di variazione (CV) ≤20%; un campione non è rientrato per poco in questo requisito, con un CV del 21% per la ripetibilità e un CV del 23% per la riproducibilità. È stato determinato che l'origine presunta della variabilità era un bassa profondità di copertura di questo campione.

2.6.1 Riproducibilità tra lotti di reagenti

Sono stati valutati tre lotti di reagenti critici in quattro repliche per campione con un disegno fattoriale saturo. I reagenti sono stati valutati come kit preparati internamente per ogni fase del processo (LC, HC, sequenziamento). L'uso di tre lotti di reagenti diversi non ha influito sulle prestazioni. Ventisette dei 28 campioni (96,4%) hanno mostrato stime di concordanza appaiata (APA e ANA) superiori al 95%; un campione ha mostrato stime di APA inferiori al 90% (da 85,9% a 88,7%). Le stime di ANA erano maggiori del 99%. È stato determinato che l'origine presunta della variabilità era il numero di copie di amplificazioni non focali con un basso numero di copie vicino alla soglia di identificazione osservata in un campione; nessun lotto specifico di reagenti ha mostrato prestazioni diverse tra i tre utilizzati per questo campione.

2.6.2 Riproducibilità tra strumenti

Sono state sequenziate quattro repliche per campione su ciascuno dei tre sequenziatori Illumina HiSeq4000, numeri di serie K00255, K00256 e K00257, con un disegno fattoriale saturo. L'uso di tre sequenziatori diversi non ha influito sulle prestazioni. Ventisette dei 28 campioni (96,4%) hanno mostrato stime di concordanza appaiata (APA e ANA) di almeno il 97%; un campione ha mostrato stime di APA inferiori al 90% (da 86,6% a 89,2%). Le stime di ANA erano maggiori del 99%. È stato determinato che l'origine presunta della variabilità era il numero di copie di amplificazioni non focali con un basso numero di copie vicino alla soglia di identificazione osservata in un campione; nessun sequenziatore specifico ha mostrato prestazioni diverse tra i tre utilizzati per questo campione.

2.7 Sensibilità analitica: limite di rilevazione (*Limit of Detection*, LoD) e limite di bianco (*Limit of Blank*, LoB)

È stato determinato il limite di rilevazione (LoD) delle alterazioni valutate con il test F1CDx. I LoD di sette (7) biomarcatori CDx sono riassunti nelle Tabelle 178-1 e 17-2 qui di seguito. Per la validazione della piattaforma del test F1CDx sono state valutate altre dodici (12) categorie di tipi di alterazione. È stato selezionato un singolo campione di tumore FFPE per ciascuna delle categorie di varianti. Per ogni campione, sono stati valutati sei livelli di MAF, con 13 repliche per livello, per un totale di 78 repliche per campione. Per la valutazione del LoD a livello di piattaforma, le indel sono state raggruppate insieme (contesto diverso dalle ripetizioni omopolimeriche) perché sono simili per quanto riguarda le caratteristiche di LoD. Le indel erano inserzioni da 1 bp a 42 bp e delezioni fino a 276 bp. Le indel nel contesto delle ripetizioni omopolimeriche avevano un LoD più elevato, dipendente dalla durata del contesto di ripetizione. Sono stati inoltre valutati il LoD di MSI-H, LOH e TMB. Il LoD per le alterazioni rappresentative rilevate dalla piattaforma F1CDx è riassunto nelle Tabelle 18-1 e 18-2.

Tabella 17-1. Riassunto dei LoD per le alterazioni associate alle indicazioni del test CDx (varianti corte). Il LoD è basato sulla frazione allelica

Alterazione	LoD[1] Frazione allelica (%) (tasso di	LoD[2] Frazione allelica (%) (*probit*)

	accuratezza del 100%)	
L858R di ***EGFR***	2,4%	<2,4% (tutte rilevate)
Delezione nell'esone 19 di ***EGFR***	5,1%	3,4%
Alterazione T790M di ***EGFR***	2,5%	1,8%
KRAS G12/G13	2,3%	<2,3% (tutte rilevate)
BRAF V600E/K	2,0%	<2,0% (tutte rilevate)
BRCA1/2[3] **Alterazione in contesto non ripetitivo o omopolimerico <4 bp** **Delezione in omopolimero da 8 bp**	N/A N/A	5,9% 15,3%

1I calcoli del LoD per le varianti CDx sono stati basati sull'approccio del tasso di accuratezza, perché c'erano meno di tre livelli con un tasso di accuratezza compreso tra il 10% e il 90% per tutte le varianti CDx (escluse le varianti *BRCA*1/2). Il LoD calcolato con l'approccio del tasso di accuratezza è definito come il livello minimo con un tasso di accuratezza del 100% (scenario peggiore).
2Calcoli del LoD per le varianti CDx basati sull'approccio *probit* con una probabilità di rilevazione del 95%.
3Vedere il Riassunto dei dati di sicurezza e di efficacia per P160018.

Tabella 17-2. Riassunto della sensibilità analitica basata sulla purezza del tumore per i biomarcatori associati alle indicazioni del test CDx

Alterazione	**Purezza del tumore (%) (tasso di accuratezza del 100%)**[1]	**Purezza del tumore (%) (*probit*)**[2]
Fusione ***ALK***	2,6%[3]	1,8%
Amplificazione di ***ERBB2***	25,3%[4]	19,7%
Delezione omozigote in *BRCA2* (HD)	8,8%[5]	Non calcolata
LOH[6]	35%	30%

1I calcoli della sensibilità per le varianti CDx sono stati basati sull'approccio del tasso di accuratezza, perché c'erano meno di tre livelli con un tasso di accuratezza compreso tra il 10% e il 90%. Il LoD calcolato con l'approccio del tasso di accuratezza è definito come il livello minimo con un tasso di accuratezza del 100% (scenario peggiore).
2Calcoli della sensibilità per le varianti CDx basati sull'approccio *probit* con una probabilità di rilevazione del 95%.
3Il numero di letture chimeriche per il campione valutato è 16 alla frazione tumorale indicata.
4Il numero di amplificazioni del numero di copie per il campione valutato è 6 alla frazione tumorale indicata.
5Il calcolo del LoD per *BRCA2* HD era basato sull'approccio del tasso di accuratezza, perché si è ottenuta un'identificazione corretta a ogni livello di diluizione analizzato; questo rende inapplicabile la regressione *probit*.
6Vedere il Riassunto dei dati di sicurezza e di efficacia per P160018/S001.

Tabella 18-1. Riassunto di LoD rappresentativi per la piattaforma F1CDx (varianti corte)

Categoria di variante	**Sottocategoria**	**N**	**LoD**[1] **dell'intervallo - frazione allelica (%)**
Sostituzioni di basi	nota[3] altra[4]	21[2] 166	1,8-7,9[2] 5,9-11,8
Indel in contesto non omopolimerico, incluse inserzioni fino a 42 bp e delezioni fino a 276 bp	nota altra	3 17	4,5-6,5 6,0-10,2
	Ripetizione da 5 bp	8	10,0-12,2

Indel in contesto omopolimerico	Ripetizione da 6 bp	2	13,6-13,7
	Ripetizione da 7 bp	4	16,3-20,4
	Ripetizione da 8 bp	3	17,0-20,0

1I calcoli del LoD per le varianti della piattaforma erano basati sull'approccio del tasso di accuratezza per le varianti con meno di tre livelli con un tasso di accuratezza compreso tra il 10% e il 90% e sull'approccio *probit* per le varianti con almeno tre livelli con un tasso di accuratezza compreso tra il 10% e il 90%. Il LoD calcolato con l'approccio del tasso di accuratezza è definito come il livello minimo con un tasso di accuratezza del 100% (scenario peggiore).
2I dati comprendono un'alterazione nella regione *promoter TERT*, 124C>T (LoD del 7,9%). *TERT* è l'unica regione *promoter* interrogata ed è estremamente arricchita per il contesto ripetitivo di poly-G, non presente nelle regioni codificanti.
3Le alterazioni classificate come "nota" sono quelle elencate in COSMIC.
4Le alterazioni classificate come "altra" comprendono eventi di troncatura nei geni soppressori dei tumori (*splicing*, *frame-shift* e nonsenso) nonché varianti che compaiono in sedi *hotspot* ma non hanno una specifica associazione COSMIC o sono considerate varianti di significatività incerta (VUS) in considerazione della mancanza di evidenze riportate e del cambiamento conclusivo della funzione.

Tabella 18-2. Riassunto della sensibilità analitica rappresentativa della purezza del tumore per le alterazioni rilevate dalla piattaforma F1CDx (varianti del numero di copie e riarrangiamenti)

Categoria di variante	**N**	**Intervallo Purezza del tumore (%)[1]**
Amplificazioni del numero di copie (CNA>10)	8	9,6%-18,5%
Amplificazioni del numero di copie (6≤CNA≤10)	7	19,5%-58,3%[2]
Numero di copie: delezioni omozigote	3	33,4%-33,4%
Riarrangiamenti genomici	3	9,2%-14,9%
MSI-H	3	8,3%-15,8%

1I calcoli della sensibilità per le varianti della piattaforma erano basati sull'approccio del tasso di accuratezza per le varianti con meno di tre livelli con un tasso di accuratezza compreso tra il 10% e il 90% e sull'approccio *probit* per le varianti con almeno tre livelli con un tasso di accuratezza compreso tra il 10% e il 90%. Il LoD calcolato con l'approccio del tasso di accuratezza è definito come il livello minimo con un tasso di accuratezza del 100% (scenario peggiore).
2Max rappresenta l'alterazione VUS alla soglia di identificazione.

Il LoB di zero è stato confermato dalla valutazione delle alterazioni all'interno dei campioni LoB, con una percentuale di risultati falsi positivi inferiore al 5% (rischio α di errore di tipo I=0,05). Per la valutazione del LoB sono stati utilizzati 75 campioni. Per tutte le alterazioni valutate per il LoD, è stato confermato il LoB di zero. È stato condotto uno studio simile per le alterazioni di *BRCA* (PMA P160018) senza identificazioni false positive di *BRCA* osservate, il che conferma il LoB di zero per *BRCA*.

2.8 Stabilità

2.8.1 Stabilità dei reagenti

Vengono utilizzati reagenti identici con le stesse specifiche, che seguono gli stessi protocolli, per entrambi i test FoundationFocus CDx*BRCA* e F1CDx. Per i dati delle prestazioni di stabilità dei reagenti, vedere il Riassunto dei dati di sicurezza e di efficacia per P160018. La stabilità dichiarata dei reagenti è di 4 mesi per i kit di preparazione della libreria (LC) e di cattura per ibridazione (HC) e di 3 mesi per i kit di sequenziamento.

2.8.2 Stabilità del DNA

La stabilità del DNA è stata valutata con una rassegna retrospettiva di dati generati utilizzando il test FoundationOne LDT. Sono stati valutati 47 campioni clinici univoci di 21 tessuti diversi. La serie dei campioni copriva 200 alterazioni comprensive di variazioni nucleotidiche, indel, amplificazioni del numero di copie, perdite del numero di copie e riarrangiamenti. La durata della conservazione del DNA al momento dell'analisi era compresa tra 48 e 464 giorni, con una mediana di 184 giorni e una media di 199 giorni. Complessivamente 199 alterazioni su 200 erano concordanti. Un campione vecchio di 242 giorni con una sola identificazione di alterazione che soddisfaceva i criteri di inclusione era discordante; tuttavia, questo campione è stato classificato come non soddisfacente tutti i criteri del controllo di qualità a causa di altri problemi di qualità. L'età del DNA per

il campione con discordanza era di 242 giorni. Altri 16 campioni avevano identificazioni concordanti con un'età del DNA >242 giorni. In base a questi dati, il DNA conservato in conformità alle procedure interne può essere considerato stabile per un massimo di sei mesi. Questi dati retrospettivi sono ulteriormente supportati da uno studio prospettico condotto utilizzando campioni di tumore ovarico; vedere il Riassunto dei dati di sicurezza e di efficacia per P160018. È in corso un altro studio prospettico di stabilità del DNA.

2.8.3 Stabilità dei campioni FFPE

Lo studio sulla stabilità dei vetrini FFPE (FFPE Slide Stability Study) è uno studio tuttora in corso con dati riassunti per T_0, T_1 (30 giorni) e T_2 (6 mesi). Questo studio ha valutato la stabilità del tessuto tumorale FFPE preparato in vetrini prima dell'estrazione del DNA, da utilizzare nel test F1CDx. Sono stati utilizzati cinque campioni di tumore, tra cui carcinoma ovarico, carcinoma polmonare, carcinoma colorettale, melanoma e carcinoma mammario, contenenti varie alterazioni del DNA, come descritto nella Tabella 19 qui di seguito. I cinque campioni sono stati selezionati per includere tipi di alterazione specifici, che rispecchiassero le alterazioni identificate dal test CDx, ma hanno mostrato di contenere anche altre alterazioni (13 CNA, un riarrangiamento, 53 sostituzioni di basi e cinque indel; vedere la Tabella 20). Per valutare la stabilità del tessuto FFPE pre-sezionato per le alterazioni genomiche, è stata calcolata la concordanza tra i risultati dai momenti temporali definiti per ciascun campione, confrontando l'identificazione dell'alterazione riportata a ogni momento temporale di *follow-up* con l'identificazione dell'alterazione al basale (T_0). Le alterazioni al momento temporale di 30 giorni e al momento temporale di 6 mesi hanno una concordanza del 100% con i risultati basali del giorno 0 (T_0). I vetrini FFPE sono considerati stabili per almeno 6 mesi. L'ulteriore valutazione ai mesi 12 e 15 determinerà la stabilità dei vetrini FFPE oltre i 6 mesi.

Tabella 19. Risultati di stabilità al basale, a 30 giorni e a 6 mesi

Tessuto	**Identificazione basale (T_0)**		**Concordanza percentuale con T_0**	**Concordanza percentuale con T_0**
	Gene	**Effetto della variante**	**30 giorni (T_1)**	**6 mesi (T_2)**
Ovaio	*BRCA1*	c.1340_1341insG, p.H448fs*8	100% (2/2)	100% (2/2)
Polmone	*KRAS*	c.34G>T, p.G12C	100% (2/2)	100% (2/2)
CRC	*PIK3CA*	c.3139C>T, p.H1047Y	100% (2/2)	100% (2/2)
Melanoma	*CDKN2A*	Delezione omozigote	100% (2/2)	100% (2/2)
Melanoma	*CDKN2B*	Delezione omozigote	100% (2/2)	100% (2/2)
Mammella	*ERBB2*	Amplificazione	100% (1/1)	100% (2/2)

Tabella 20. Concordanza percentuale per ogni tipo di variante

Tipo di variante	**Numero di varianti**	**Concordanza percentuale a 30 giorni (T_1) (n. di concordanze/totale)**	**LB, UB dell'IC al 95% a 2 code***	**Concordanza percentuale a 6 mesi (T_2) (n. di concordanze/totale)**	**LB, UB dell'IC al 95% a 2 code***
Numero di copie	13	100% (23/23)	85,2%-100,0%	100% (26/26)	86,8%-100,0%
Riarrangiamento	1	100% (2/2)	15,8%-100,0%	100% (2/2)	15,8%-100,0%
Sostituzione	53	100% (98/98)	96,3%-100,0%	100% (106/106)	96,6%-100,0%
Inserzione/delezione	5	100% (7/7)	59,0%-100,0%	100% (10/10)	69,2%-100,0%

*LB: limite inferiore; UB: limite superiore

2.9 Interscambiabilità dei lotti di reagenti

Vengono utilizzati reagenti identici con le stesse specifiche, che seguono gli stessi protocolli, per entrambi i test FoundationFocus CDx*BRCA* e FoundationOne®CDx. Per i dati di interscambiabilità dei lotti di reagenti, vedere il Riassunto dei dati di sicurezza e di efficacia per P160018.

2.10 Valutazione generale degli strumenti di laboratorio e dei reagenti

2.10.1 Amplificazione del DNA

Vengono utilizzati reagenti e strumenti identici con le stesse specifiche, che seguono gli stessi protocolli, per entrambi i test FoundationFocus CDx*BRCA* e FoundationOne®CDx. Per i dati delle prestazioni di amplificazione del DNA, vedere il Riassunto dei dati di sicurezza e di efficacia per P160018.

2.10.2 Estrazione del DNA

Sono state valutate le prestazioni dell'estrazione del DNA da campioni di tumore FFPE. La procedura di estrazione del DNA per il test F1CDx è stata valutata analizzando campioni FFPE che comprendevano due campioni per tipo di tessuto per dieci tipi di tessuto tumorale diversi, tra cui carcinoma polmonare, mammario, ovarico, colorettale, cerebrale, epatico, pancreatico, tiroideo, della vescica e melanoma, con tipi rappresentativi diversi di alterazioni. I campioni sono stati analizzati in duplicato per un totale di 240 estrazioni, utilizzando due diversi processori di particelle magnetiche KingFisher Flex Magnetic Particle Processors (120 estrazioni per processore) e confrontando tre lotti di reagenti di estrazione diversi (80 estrazioni per lotto di reagenti). La resa media del DNA è stata calcolata in dodici (12) repliche per ogni campione. Tutte le rese medie del DNA erano significativamente al di sopra del requisito minimo di 55 ng, con un resa minima di 758,3 ng. Solo un'aliquota di campione delle 240 repliche non ha soddisfatto le specifiche di resa del DNA e i tassi di successo basati sul lotto di reagenti e sullo strumento sono risultati rispettivamente del 98,8% (79/80) e del 99,2% (119/120), che superano i criteri di accettabilità (≥90%). È stata inoltre analizzata la concordanza di tutte le alterazioni genomiche rilevate per tutte le varianti nelle 12 repliche per ogni campione. La Tabella
21 contiene un riassunto della concordanza tra le repliche. Dopo l'immissione in commercio sarà condotto uno studio con altri dieci campioni.

Tabella 21. Riassunto della concordanza tra le repliche nello studio sull'estrazione del DNA

Gruppo	$N_{concordanza}$	N_{totale}	Concordanza	IC al 95%
Sostituzioni (tutte le MAF)	2.700	2.969	90,9%	[89,9%-91,9%]
Sostituzioni (MAF >10%)	1.631	1.637	99,6%	[99,2%-99,9%]
Sostituzioni (tutte le MAF, escluso il campione ipermutato)*	1.663	1.685	98,7%	[98%-99,1%]
Indel (tutte)	465	476	97,7%	[95,9%-98,8%]
Numero di copie: amplificazione	307	314	97,8%	[95,4%-99%]
Numero di copie: perdita	132	144	91,7%	[85,9%-95,3%]
Riarrangiamento	84	90	93,3%	[85,9%-97,2%]

*Un campione incluso nello studio era ipermutato, in quanto conteneva numerose alterazioni vicine al LoD, e mostrava evidenza di contaminazione esterna. La concordanza delle sostituzioni era dell'80,8% per questo campione.

2.11 Bande di controllo/solidità

Sono stati condotti studi con bande di controllo per valutare l'impatto della variabilità del processo per quanto riguarda la misurazione della concentrazione di DNA in vari stadi del processo. Le bande di controllo sono state valutate rispetto alla variabilità del processo osservata e misurata per la preparazione della libreria (LC), la cattura per ibridazione (HC) e il sequenziamento. Ciascuno dei tre esperimenti con bande di controllo ha dimostrato prestazioni affidabili e solide a tutti i livelli di *input* di DNA valutati.

Complessivamente sono stati trattati 255 campioni: novanta (90) per valutare l'*input* di DNA nella LC, novanta (90) per valutare l'*input* di DNA nella HC e settantacinque (75) per valutare l'*input* di DNA nel sequenziamento. Per l'*input* della LC, sono stati analizzati cinque campioni in triplicato a sei diversi livelli di *input* di DNA, che rappresentano valori da -20% e -50% dal limite inferiore (50 ng) a +20% e +50% dal limite superiore (1.000 ng) necessari per la LC (n=90). Sono stati analizzati cinque campioni in triplicato a sei diversi livelli di *input* di DNA, che rappresentano da -25% e -50% dal limite inferiore (0,5 µg) a +25% e +50% dal limite superiore (2,0 ng) per l'*input* della HC. Il terzo componente dello studio con bande di controllo ha valutato l'*input* di DNA catturato nella

reazione di sequenziamento. Sono stati analizzati cinque campioni in triplicato a sei diversi livelli di *input* di DNA, che rappresentano ±10% e ±20% dalla quantità necessaria per il sequenziamento (1,75 nM; n=75). La concordanza delle alterazioni rilevate è stata calcolata per ogni condizione in tutte le repliche analizzate correttamente. I risultati di questo studio confermano la solidità del processo del test F1CDx. Il disegno e i risultati dello studio sono mostrati di seguito nelle Tabelle da 22-1 a 22-4.

Tabella 22-1. Riassunto del tasso di successo per processo e per livello di *input* e concordanza delle sostituzioni (SOS) tra le repliche analizzate correttamente

Processo	Livello di *input*	N. di insuccessi dei campioni	Tipo di variante	N. di successi di concordanza	N. di confronti di varianti	Tasso di successo (IC al 95%) (numero di confronti concordanti)
LC	25 ng	1/15	SOS	184	184	100,0% (98,0%-100,0%)
LC	40 ng	0/15	SOS	192	192	100,0% (98,1%-100,0%)
LC	50 ng	0/15	SOS	191	192	99,5% (97,1%-100%)
LC	1.000 ng	0/15	SOS	192	192	100,0% (98,1%-100,0%)
LC	1.200 ng	0/15	SOS	191	192	99,5% (97,1%-100%)
LC	1.500 ng	0/15	SOS	190	192	99,0% (96,3%-99,9%)
HC	0,25 µg	15/15	SOS	0	0	NA* (nessun campione sequenziato)
HC	0,375 µg	12/15	SOS	30	30	100,0% (88,4%-100,0%)
HC	0,5 µg	1/15	SOS	166	166	100,0% (97,8%-100,0%)
HC	2,0 µg	0/15	SOS	192	192	100,0% (98,1%-100,0%)
HC	2,5 µg	0/15	SOS	192	192	100,0% (98,1%-100,0%)
HC	3,0 µg	0/15	SOS	192	192	100,0% (98,1%-100,0%)
Seq	1,4 nM	0/15	SOS	192	192	100,0% (98,1%-100,0%)
Seq	1,575 nM	1/15	SOS	180	180	100,0% (98,0%-100,0%)
Seq	1,75 nM	1/15	SOS	184	184	100,0% (98,0%-100,0%)
Seq	1,925 nM	0/15	SOS	192	192	100,0% (98,1%-100,0%)
Seq	2,1 nM	0/15	SOS	192	192	100,0% (98,1%-100,0%)

*Insuccesso per tutti i campioni al livello di *input* di 0,25 µg, di conseguenza, non sono disponibili dati da presentare per quel livello.

Tabella 22-2. Riassunto del tasso di successo per processo e per livello di *input* e concordanza delle inserzioni e delezioni (INDEL) tra le repliche analizzate correttamente

Processo	Livello di *input*	N. di insuccessi dei campioni	Tipo di variante	N. di successi di concordanza	N. di confronti di varianti	Tasso di successo (IC al 95%) (numero di confronti concordanti)
LC	25 ng	1/15	INDEL	17	17	100,0% (80,5%-100,0%)
LC	40 ng	0/15	INDEL	18	18	100,0% (81,5%-100,0%)
LC	50 ng	0/15	INDEL	18	18	100,0% (81,5%-100,0%)
LC	1.000 ng	0/15	INDEL	18	18	100,0% (81,5%-100,0%)
LC	1.200 ng	0/15	INDEL	18	18	100,0% (81,5%-100,0%)
LC	1.500 ng	0/15	INDEL	18	18	100,0% (81,5%-100,0%)

HC	0,25 µg	15/15	INDEL	0	0	NA* (nessun campione sequenziato)
HC	0,375 µg	12/15	INDEL	4	4	100,0% (39,8%-100,0%)
HC	0,5 µg	1/15	INDEL	18	18	100,0% (81,5%-100,0%)
HC	2,0 µg	0/15	INDEL	18	18	100,0% (81,5%-100,0%)
HC	2,5 µg	0/15	INDEL	18	18	100,0% (81,5%-100,0%)
HC	3,0 µg	0/15	INDEL	18	18	100,0% (81,5%-100,0%)
Seq	1,4 nM	0/15	INDEL	18	18	100,0% (81, 5%-100,0%)
Seq	1,575 nM	1/15	INDEL	16	16	100,0% (79,4%-100,0%)
Seq	1,75 nM	1/15	INDEL	17	17	100,0% (80,5%-100,0%)
Seq	1,925 nM	0/15	INDEL	18	18	100,0% (81,5%-100,0%)
Seq	2,1 nM	0/15	INDEL	18	18	100,0% (81,5%-100,0%)

* Insuccesso per tutti i campioni al livello di *input* di 0,25 µg, di conseguenza, non sono disponibili dati da presentare per quel livello.

Tabella 22-3. Riassunto del tasso di successo per processo e per livello di *input* e concordanza dei riarrangiamenti (RI) tra le repliche analizzate correttamente

Processo	Livello di *input*	N. di insuccessi dei campioni	Tipo di variante	N. di successi di concordanza	N. di confronti di varianti	Tasso di successo (IC al 95%) (numero di confronti concordanti)
LC	25 ng	1/15	RI	6	6	100,0% (54,1%-100,0%)
LC	40 ng	0/15	RI	6	6	100,0% (54,1%-100,0%)
LC	50 ng	0/15	RI	6	6	100,0% (54,1%-100,0%)
LC	1.000 ng	0/15	RI	6	6	100,0% (54,1%-100,0%)
LC	1.200 ng	0/15	RI	6	6	100,0% (54,1%-100,0%)
LC	1.500 ng	0/15	RI	6	6	100,0% (54,1%-100,0%)
HC	0,25 µg	15/15	RI	0	0	NA* (nessun campione sequenziato)
HC	0,375 µg	12/15	RI	2	2	100,0% (15,8%-100,0%)
HC	0,5 µg	1/15	RI	6	6	100,0% (54,1%-100,0%)
HC	2,0 µg	0/15	RI	6	6	100,0% (54,1%-100,0%)
HC	2,5 µg	0/15	RI	6	6	100,0% (54,1%-100,0%)
HC	3,0 µg	0/15	RI	6	6	100,0% (54,1%-100,0%)
Seq	1,4 nM	0/15	RI	8	9	88,9%(51,8%-99,7%)
Seq	1,575 nM	1/15	RI	9	9	100,0% (66,4%-100,0%)
Seq	1,75 nM	1/15	RI	8	8	100,0% (63,1%-100,0%)
Seq	1,925 nM	0/15	RI	8	9	88,9%(51,8%-99,7%)
Seq	2,1 nM	0/15	RI	7	9	77,8% (40,0%-97,2%)

* Insuccesso per tutti i campioni al livello di *input* di 0,25 µg, di conseguenza, non sono disponibili dati da presentare per quel livello.

Tabella 22-4. Riassunto del tasso di successo per processo e per livello di *input* e concordanza delle alterazioni del numero di copie (CNA) tra le repliche analizzate correttamente

Processo	Livello di *input*	N. di insuccessi dei campioni	Tipo di variante	N. di successi di concordanza	N. di confronti di varianti	Tasso di successo (IC al 95%) (numero di confronti concordanti)
LC	25 ng	1/15	CNA	128	128	100,0% (97,2%-100,0%)
LC	40 ng	0/15	CNA	132	132	100,0% (97,2%-100,0%)
LC	50 ng	0/15	CNA	132	132	100,0% (97,2%-100,0%)
LC	1.000 ng	0/15	CNA	132	132	100,0% (97,2%-100,0%)
LC	1.200 ng	0/15	CNA	132	132	100,0% (97,2%-100,0%)
LC	1.500 ng	0/15	CNA	132	132	100,0% (97,2%-100,0%)
HC	0,25 µg	15/15	CNA	0	0	NA* (nessun campione sequenziato)
HC	0,375 µg	12/15	CNA	13	14	92,9% (66,1%-99,8%)
HC	0,5 µg	1/15	CNA	107	108	99,0% (95,0%-100,0%)
HC	2,0 µg	0/15	CNA	129	132	97,7% (93,5%-99,5%)
HC	2,5 µg	0/15	CNA	129	132	97,7% (93,5%-99,5%)
HC	3,0 µg	0/15	CNA	130	132	98,5% (94,6%-99,8%)
Seq	1,4 nM	0/15	CNA	131	132	99,2% (95,9%-100,0%)
Seq	1,575 nM	1/15	CNA	122	128	95,3% (90,1%-98,3%)
Seq	1,75 nM	1/15	CNA	128	128	100,0% (97,2%-100,0%)
Seq	1,925 nM	0/15	CNA	130	132	98,5% (94,6%-99,8%)
Seq	2,1 nM	0/15	CNA	131	132	99,2% (95,9%-100,0%)

* Insuccesso per tutti i campioni al livello di *input* di 0,25 µg, di conseguenza, non sono disponibili dati da presentare per quel livello.

3. Studi clinici

Varie indicazioni del test CDx descritte nelle sezioni 3.1-3.6 erano basate su un approccio di analisi statistica di non inferiorità (NI) che utilizza il disegno di arricchimento presentato nell'articolo di Li (2016)[1], quando il campione dello studio di concordanza non è un campione casuale prelevato dalla popolazione bersaglio del test diagnostico associato (F1CDx) e non è disponibile uno standard di riferimento.
Per valutare la concordanza clinica, il test F1CDx è stato confrontato con test CDx approvati dall'FDA (CCD). Tutti gli studi basati su NI hanno superato i criteri di accettabilità specificati in ogni protocollo dello studio. Gli studi di concordanza clinica, fatta eccezione per *ALK* e T790M di *EGFR*, erano soggetti a *bias pre-screening*. Pertanto, i risultati di concordanza potrebbero essere sovrastimati o sottostimati e il tasso di insuccessi potrebbe essere sottostimato.

3.1 Studio di concordanza di FoundationOne®CDx per delezione L858R di *EGFR* nell'esone 19

La validità clinica di F1CDx come test diagnostico associato da utilizzare per l'identificazione dei pazienti affetti da NSCLC che potrebbero essere idonei al trattamento con Gilotrif® (afatinib), Iressa® (gefitinib) o Tarceva® (erlotinib) è stata stabilita analizzando retrospettivamente 282 campioni prelevati da pazienti affetti da NSCLC. I risultati diagnostici per *EGFR* ottenuti con il test F1CDx sono stati confrontati con quelli ottenuti con il test approvato **cobas**® *EGFR* Mutation Test v2 (Roche Molecular Systems). I campioni sono stati analizzati utilizzando **cobas**® *EGFR* Mutation Test (CCD1) con un numero approssimativamente uguale di campioni positivi e negativi alla mutazione, successivamente sono stati analizzati con F1CDx e quindi in una seconda replica con **cobas**® *EGFR* Mutation Test (CCD2). I campioni di NSCLC utilizzati per questo studio non provenivano da una sperimentazione clinica, quindi i dati demografici disponibili erano limitati. Per questo studio erano disponibili i dati relativi a età e sesso, che sono risultati simili a quelli dello studio cardine EURTAC.

Sono state condotte due analisi di concordanza separate: una solo con i campioni con dati completi (N=267) e

l'altra con tutti i 282 campioni, in cui i dati mancanti sono stati gestiti con imputazione multipla. I dati ottenuti con l'analisi di concordanza sono riassunti nella Tabella 23 qui di seguito.

Tabella 23. Concordanza dei risultati ottenuti con CCD1, CCD2 e F1CDX utilizzando campioni idonei

	CCD1+				CCD1-			
	CCD2+	CCD2-	CCD2 mancante	Totale	CCD2+	CCD2-	CCD2 mancante	Totale
F1CDx+	106	0	0	106	1	1*	0	2
F1CDx-	2**	1	0	3	3	153	0	156
F1CDx mancante	3	0	0	3	1	9	2	12
Totale	111	1	0	112	5	163	2	170

*****QRF006212 era l'unico campione in cui entrambe le repliche del test **cobas**® v2 hanno riportato risultati negativi mentre F1CDx ha riportato un risultato positivo per L858R con frequenza allelica del 33%. A un'ulteriore analisi, il test F1CDx ha identificato una seconda mutazione somatica in-cis (sullo stesso allele) rispetto a quella di L858R, con frequenza allelica identica solo 17 bp a valle: A864P di *EGFR*. Si sospetta pertanto che questa seconda mutazione abbia interferito con i *primer* allele-specifici di **cobas**® v2, lasciando così irrilevata l'alterazione di L858R.
******QRF005867 è stato refertato come positivo con entrambe le repliche di **cobas**® v2 per la delezione nell'esone 19, ma come negativo con F1CDx. F1CDx ha rilevato la delezione nell'esone 19, ma ha classificato la variante in modo errato come 2 mutazioni *frame-shift*. Questo sarebbe stato corretto dall'annotazione manuale, che non faceva però parte di questo studio di concordanza. Anche QRF005883 è stato refertato come positivo con entrambe le repliche di **cobas**® v2 per la delezione nell'esone 19, ma come negativo con F1CDx. F1CDx ha identificato un evento di inserzione di 18 bp nell'esone 19, con effetto proteico K745_E746insIPVAIK. Poiché **cobas**® v2 non è progettato per rilevare gli eventi di inserzione nell'esone 19, è probabile che si tratti di un errore di **cobas**® v2.

Quindici (15) campioni sono stati assegnati come dati mancanti per F1CDX, due dei quali avevano anche risultati mancanti per CCD2. I dati mancanti sono stati causati da errori di processo o da campioni che non soddisfacevano le specifiche del test.

Definendo come standard di riferimento le identificazioni di consenso tra CCD1 e CCD2, F1CDx ha raggiunto una PPA del 98,1% (106/108) (IC al 95% [93,5%-99,8%]) e una NPA del 99,4% (153/154) (IC al 95% [96,4%-100,0%]). Questi dati sono riassunti nella Tabella 24.

Tabella 24. Riassunto dei dati di concordanza utilizzando la concordanza tra CCD1 e CCD2 come riferimento

	CCD1+/CCD2+	**CCD1-/CCD2-**
F1CDX+	106	1
F1CDX-	2	153

Le mutazioni rilevate da **cobas**® *EGFR* Mutation Test includono tutte le mutazioni rilevate con therascreen® *EGFR* RGQ PCR Kit, nonché alcune ulteriori delezioni nell'esone 19/varianti di L858R. In letteratura[2,3,4] sono stati descritti vari studi di concordanza che confrontano **cobas**® *EGFR* Mutation Test e therascreen® *EGFR* RGQ PCR Kit; gli studi confermano che questi due test sono concordanti.

Verrà inoltre completato uno studio di concordanza successivo all'immissione in commercio, per il confronto di F1CDx con therascreen® *EGFR* RGQ PCR Kit.

In base ai risultati dello studio FLAURA (NCT02296125), il 18 aprile 2018 è stato approvato un altro prodotto terapeutico, osimertinib, per il trattamento di prima linea dell'NSCLC metastatico che presenta delezioni nell'esone 19 di EGFR o mutazioni di L858R nell'esone 21, come rilevato da un test approvato dall'FDA. I test diagnostici associati per questa indicazione comprendevano **cobas®** EGFR Mutation Test v2 (Roche Molecular Systems), le cui indicazioni sono state ampliate per includere Tagrisso® (osimertinib) per le stesse delezioni

dell'esone 19 di *EGFR* e le alterazioni di L858R nell'esone 21 di *EGFR*, come approvato nello studio PMA (P170019) su F1CDx il 30 novembre 2017. Di conseguenza, Tagrisso® (osimertinib) è stato aggiunto alle indicazioni di F1CDx per le delezioni dell'esone 19 di *EGFR* e le alterazioni di L858R nell'esone 21 di *EGFR* nei pazienti affetti da NSCLC.

3.2 Studio di concordanza di FoundationOne®CDx per la mutazione T790M di *EGFR*

Lo studio ha stabilito la validità clinica di F1CDx come dispositivo diagnostico associato da utilizzare per l'identificazione dei pazienti affetti da NSCLC che presentano mutazione T790M di *EGFR* e che potrebbero essere idonei al trattamento con Tagrisso® (osimertinib). I campioni dei pazienti e le informazioni demografiche corrispondenti sono stati ottenuti da AstraZeneca con gli studi clinici intitolati AURA (NCT01802632), AURA2 (NCT02094261) e AURA3 (NCT02151981). I risultati diagnostici della mutazione T790M di *EGFR* ottenuti con il test F1CDx sono stati confrontati con le identificazioni di consenso tra l'analisi originale di T790M eseguita negli studi AURA, AURA2 e AURA3 e un'analisi separata eseguita con il test approvato dall'FDA **cobas**® v2 *EGFR* Mutation Test (Roche Molecular Systems, di seguito detto test **cobas**® v2; designato come test diagnostico di confronto, CCD), utilizzando un approccio NI.

Sono state condotte due analisi di concordanza separate: una che ha incluso i campioni con dati completi (N=227) e la seconda che ha incluso tutti i 312 campioni, in cui i dati mancanti sono stati gestiti con imputazione multipla. Un riassunto della concordanza è presentato nella Tabella 25.

Tabella 25. Concordanza dei risultati ottenuti con CCD1, CCD2 e F1CDX utilizzando campioni idonei

	CCD1+				**CCD1-**			
	CCD2+	CCD2-	CCD2 mancante	Totale	CCD2+	CCD2-	CCD2 mancante	Totale
F1CDx+	87	19	1	107	8	15	0	23
F1CDx-	1	4	0	5	0	93	2	95
F1CDx Mancante	21	4	8	33	1	37	11	49
Totale	109	27	9	145	9	145	13	167

Ottantadue campioni sono stati assegnati come dati mancanti per F1CDx, rispettivamente 78 campioni senza risultati di sequenziamento con F1CDx e quattro campioni che non hanno superato il controllo di qualità dopo l'annotazione manuale. Il CCD2 aveva complessivamente 22 campioni con dati mancanti, per 19 dei quali i dati mancavano anche con F1CDx.

L'analisi di concordanza riportata qui sopra mostra che per i risultati di PPA, F1CDx è più concordante con CCD1 e CCD2 di quanto CCD1 non lo sia con CCD2; per i risultati di NPA è vero l'opposto. Vedere il diagramma di Venn qui di seguito per le identificazioni positive di T790M (Figura 2).

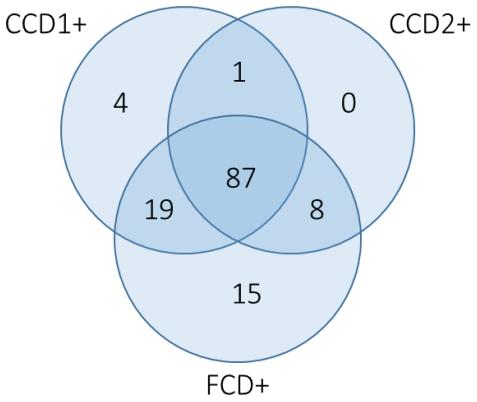

Figura 2. Diagramma di Venn per i campioni positivi alla mutazione T790M di *EGFR*

È stata osservata una differenza nella sensibilità di rilevazione tra CCD1 e CCD2; CCD1 sembra essere più sensibile di CCD2. Questo potrebbe essere attribuito al fatto che il test CCD1 è stato eseguito 2-3 anni fa utilizzando tessuto fresco prelevato con biopsia, mentre il test CCD2 è stato eseguito recentemente utilizzando DNA estratto da sezioni FFPE conservate. La Figura 3 qui di seguito illustra la correlazione tra la frequenza allelica e la rilevazione con F1CDx, CCD1 e CCD2. I risultati hanno dimostrato che F1CDx rileva le mutazioni a una frequenza allelica inferiore al 5%, che non vengono rilevate dal test **cobas**® v2. Le prestazioni cliniche in questo sottogruppo della popolazione di pazienti (pazienti con una mutazione T790M di *EGFR* rilevata con una frazione allelica <5%) sono attualmente in fase di valutazione e non sono ancora state stabilite.

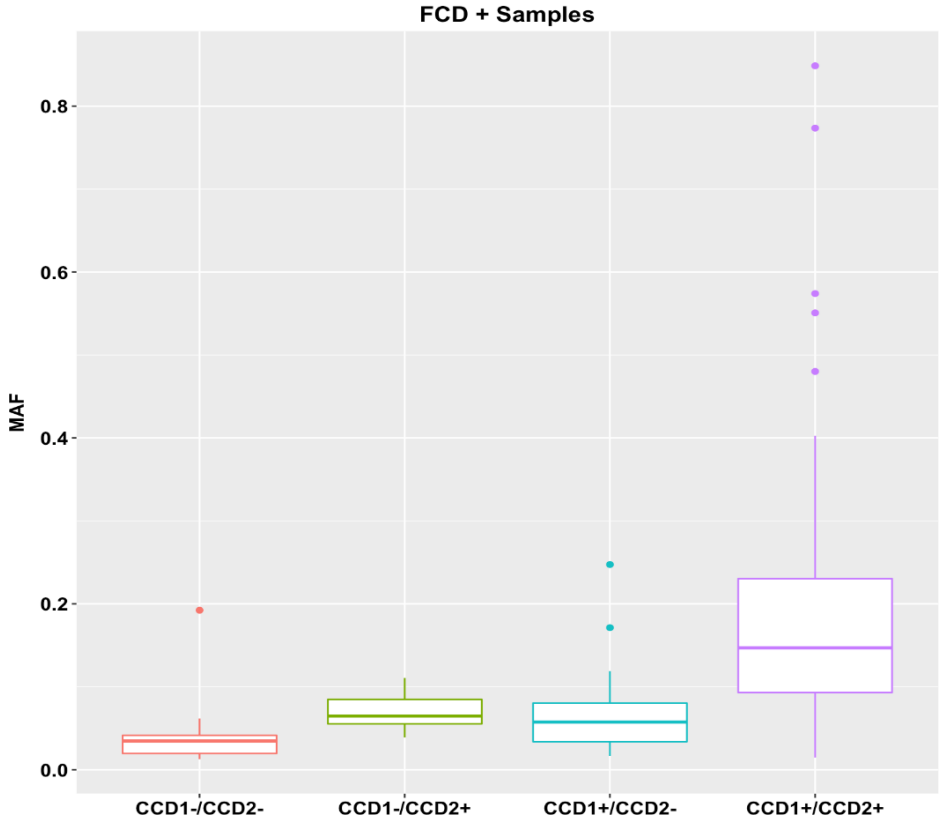

Figura 3. Distribuzione di MAF nei campioni F1CDx+ (FCD)

Definendo come standard di riferimento le identificazioni di consenso tra CCD1 e CCD2, F1CDx ha raggiunto una PPA del 98,9% (87/88) (IC al 95% [93,8%-100,0%]) e una NPA dell'86,1% (93/108) (IC al 95% [78,1%-92,0%]), come riassunto nella Tabella 26 qui di seguito.

Tabella 26. Riassunto dei dati di concordanza utilizzando la concordanza tra CCD1 e CCD2 come riferimento

	CCD1+/CCD2+	**CCD1-/CCD2-**
F1CDx+	87	15
F1CDx-	1	93

3.3 Studio di concordanza di FoundationOne®CDx per *ERBB2* (HER2)

È stata stabilita la validità clinica di F1CDx come dispositivo diagnostico associato utilizzato per l'identificazione di pazienti idonei al trattamento con terapie approvate mirate a HER2, tra cui Herceptin® (trastuzumab), Kadcyla® (ado-trastuzumab-emtansine) e Perjeta® (pertuzumab). È stato condotto uno studio utilizzando 317 campioni retrospettivi preventivamente sottoposti a *screening*, prelevati da pazienti affetti da carcinoma mammario avanzato. Il tasso di insuccesso *pre-screening* non è noto, tuttavia il gruppo di campioni è stato arricchito con campioni con HER2+ in rapporto compreso tra 2 e 3, che rappresenta il 27% dei campioni rispetto all'intervallo atteso di 8-10% riportato in letteratura[5,6]. I risultati positivi per l'amplificazione di *ERBB2* ottenuti con il test F1CDx sono stati confrontati con quelli ottenuti con il test approvato HER2 FISH PharmDx® Kit (Dako Denmark A/S). I campioni utilizzati per questo studio non provenivano da una sperimentazione clinica, quindi i dati demografici disponibili erano limitati. Per questo studio erano disponibili i dati relativi all'età e all'etnia. I dati relativi all'età sono stati confrontati con la sperimentazione clinica *Danish Study for the Danish Breast Cancer Group* 89-D del 1990 ed è stato osservato che presentavano una distribuzione simile, sebbene l'età media fosse più elevata per i campioni concordanti.

I dati di concordanza sono riassunti nella Tabella 27 qui di seguito.

Tabella 27. Concordanza dei risultati ottenuti con CCD1, CCD2 e F1CDx utilizzando campioni idonei

	CCD1+			**CCD1-**		
	CCD2+	CCD2-	Totale	CCD2+	CCD2-	Totale
F1CDx+	101	2	103	3	3	6
F1CDx-	12	10	22	6	180	186
Totale	113	12	125	9	183	192

La prevalenza della mutazione *ERBB2*/HER2 nella popolazione bersaglio è basata sulle linee guida dell'ASCO e si stima che sia del 17,5%. Per valutare l'impatto della prevalenza sui risultati principali di questo studio, è stata condotta un'analisi di sensibilità utilizzando il limite inferiore e superiore delle linee guida per la prevalenza, rispettivamente del 15% e del 20%. L'analisi di sensibilità ha mostrato inoltre che la prevalenza non influiva sulle conclusioni dello studio. La distribuzione dell'età è simile nella popolazione bersaglio, per tutti i campioni analizzati. Tuttavia, c'erano dati demografici mancanti nella popolazione di campioni. Per l'analisi dei dati mancanti utilizzando l'imputazione multipla, i risultati mostrano che in base all'ipotesi di dati mancanti in modo casuale (MAR, *missing at random*), i risultati non validi del test non hanno influito sulle conclusioni dello studio.

Nella Figura 4 sono illustrati i diagrammi di Venn per i campioni risultati positivi o negativi alla mutazione di amplificazione di *ERBB2*/HER2 con tutti e tre i test (F1CDx, CCD1 e CCD2).

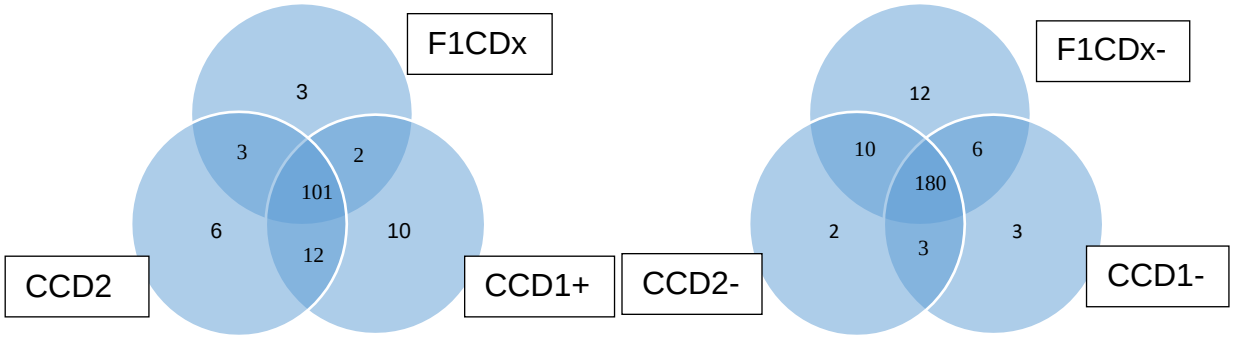

Figura 4. Diagrammi di Venn per i campioni positivi (riquadro di sinistra) e negativi (riquadro di destra) all'amplificazione di *ERBB2*

Questi due diagrammi di Venn mostrano la concordanza tra F1CDx, CCD1 e CCD2. Per i campioni F1CDx+, la concordanza di F1CDx con CCD1 o CCD2 era migliore della concordanza tra i test CCD1 e CCD2 basati sulla stessa piattaforma; per i campioni F1CDx-, F1CDx era più costante nell'identificazione delle alterazioni negative rispetto a CCD1 o CCD2.

Utilizzando le identificazioni di consenso tra CCD1 e CCD2 come standard di riferimento, ovvero limitando l'analisi solo ai campioni per i quali CCD1 e CCD2 sono concordanti, i risultati sono:

Tabella 28. Riassunto dei dati di concordanza utilizzando la concordanza tra CCD1 e CCD2 come riferimento

	CCD1+/CCD2+	**CCD1-/CCD2-**
F1CDx+	101	3
F1CDx-	12	180

In base a questi risultati, la PPA è dell'89,4% (101/113) (IC al 95% [82,2%-94,4%]) e la NPA è del 98,4% (180/183) (IC al 95% [95,3%-99,7%]).

3.4 Studio di concordanza di FoundationOne®CDx per *ALK*

È stata stabilita la validità clinica di F1CDx come dispositivo diagnostico associato utilizzato per l'identificazione di pazienti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), idonei al trattamento con terapie approvate mirate ad *ALK*, tra cui Alecensa® (alectinib), X*ALK*ori® (crizotinib) o Zykadia® (ceritinib). Lo studio è stato condotto utilizzando 175 campioni tumorali prelevati da pazienti affetti da NSCLC confermato istologicamente; sono stati inclusi sia i pazienti arruolati sia quelli che non hanno superato lo *screening* nella sperimentazione clinica NCT02075840, numero dello studio di Roche BO28984 (detto anche studio ALEX), che è uno studio multicentrico di fase III, randomizzato, controllato con principio attivo, in aperto, il cui disegno prevedeva la valutazione dell'efficacia e della sicurezza del trattamento con alectinib rispetto al trattamento con crizotinib in partecipanti affetti da NSCLC avanzato, positivo al riarrangiamento di *ALK*, naïve al trattamento. I risultati diagnostici di *ALK* ottenuti con il test F1CDx sono stati confrontati con quelli ottenuti con il test approvato dall'FDA Ventana *ALK* (D5F3) CDx ("Ventana IHC", Ventana Medical Systems, Inc.) e il test Vysis *ALK* Break-Apart FISH Probe Kit ("Vysis FISH", Abbott Molecular). I risultati del test Vysis FISH utilizzati sono stati ottenuti con lo studio ALEX. In questo studio di concordanza, la maggior parte dei campioni proveniva dalla popolazione bersaglio della sperimentazione clinica NCT02075840. I risultati di concordanza sono riassunti nella Tabella 29 qui di seguito.

Tabella 29. Concordanza dei risultati ottenuti con CCD1, CCD2 e F1CDx utilizzando campioni idonei

	CCD1+			CCD1-		
	CCD2+	CCD2-	Totale	CCD2+	CCD2-	Totale
F1CDx+	78	1	79	3	0	3
F1CDx-	6*	7	13	5	75	80
Totale	84	8	92	8	75	83

*Due campioni contenevano riarrangiamenti di *ALK* che sono stati rilevati da F1CDx, ma che sono stati classificati come negativi in base al protocollo dello studio.

Nella Figura 5 sono illustrati i diagrammi di Venn per i campioni risultati positivi o negativi al riarrangiamento di *ALK* con tutti e tre i test (F1CDx, CCD1 e CCD2).

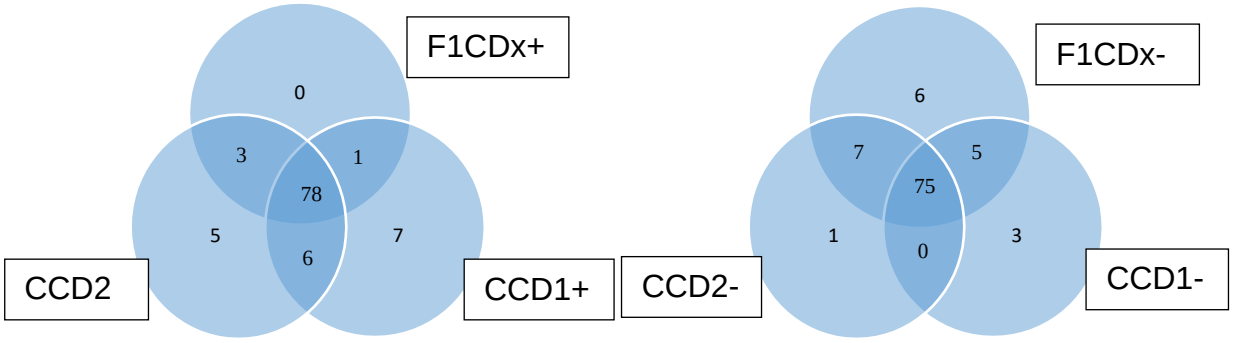

Figura 5. Diagrammi di Venn per i campioni positivi (riquadro di sinistra) e negativi (riquadro di destra) al riarrangiamento di *ALK*

Questi due diagrammi di Venn mostrano la concordanza tra F1CDx, CCD1 e CCD2. Sono stati osservati vari campioni con risultati discordanti tra CCD1 e CCD2. Questo era prevedibile perché il test Vysis FISH (CCD2) è una tecnologia che analizza a livello di DNA mentre il test IHC Ventana *ALK* esamina l'espressione delle proteine. Una volta esclusi i campioni che erano discordanti tra CCD1 e CCD2, la concordanza tra i campioni F1CDx+ con CCD1+ e CCD2+ era superiore alla concordanza tra i campioni CCD1+ e CCD2+. Per i campioni F1CDx-, F1CDx era più costante nell'identificare le alterazioni negative rispetto a CCD1 o CCD2.

Utilizzando le identificazioni di consenso tra CCD1 e CCD2 come standard di riferimento, ovvero limitando l'analisi solo ai campioni per i quali CCD1 e CCD2 sono concordanti, i risultati sono:

Tabella 30. Riassunto dei dati di concordanza utilizzando la concordanza tra CCD1 e CCD2 come riferimento

	CCD1+/CCD2+	CCD1-/CCD2-
F1CDx+	78	0
F1CDx-	6*	75

*Due campioni contenevano riarrangiamenti di *ALK* che sono stati rilevati da F1CDx, ma che sono stati classificati come negativi in base al protocollo dello studio.

In base a questi risultati, la PPA è del 92,9% (78/84) (IC al 95% [85,1%-97,3%]) e la NPA è del 100% (75/75) (IC al 95% [95,2%-100,0%]).

3.5 Studio di concordanza di FoundationOne®CDx per *KRAS*

È stata stabilita la validità clinica di F1CDx come dispositivo diagnostico associato utilizzato per l'identificazione di pazienti affetti da carcinoma colorettale, che potrebbero non trarre beneficio da alcuni trattamenti inibitori di *EGFR*, tra cui Erbitux® (cetuximab) o Vectibix® (panitumumab), a causa delle alterazioni di *KRAS*. Lo studio è

stato condotto utilizzando 342 campioni retrospettivi prelevati da pazienti affetti da carcinoma colorettale (CRC) avanzato di prima linea o linea successiva. I campioni utilizzati in questo studio sono stati sottoposti a *pre-screening* utilizzando il test sviluppato in laboratorio FoundationOne (F1 LDT) o il test di un fornitore esterno per arricchire di campioni positivi. Il tasso di insuccesso *pre-screening* utilizzando il test F1 LDT era del 3,7%, mentre quello del fornitore esterno è sconosciuto. I risultati diagnostici di *KRAS* ottenuti con il test F1CDx sono stati confrontati con quelli ottenuti con il test approvato therascreen® *KRAS* RGQ PCR Kit (Qiagen). I campioni utilizzati per questo studio non provenivano da una sperimentazione clinica, quindi i dati demografici disponibili erano limitati. Per questo studio erano disponibili i dati relativi all'età, al sesso e all'etnia. Le caratteristiche di età e sesso erano simili tra lo studio di concordanza di F1CDx e gli studi cardine; la percentuale di campioni maschili nello studio di concordanza era leggermente inferiore rispetto agli studi cardine (CRYSTAL e PRIME). I dati di concordanza sono riassunti nella Tabella 31 qui di seguito.

Tabella 31. Concordanza dei risultati ottenuti con CCD1, CCD2 e F1CDx utilizzando campioni idonei

	CCD1+				CCD1-			
	CCD2+	CCD2-	CCD2 mancante	Totale	CCD2+	CCD2-	CCD2 mancante	Totale
F1CDx+	173	0	2	175	0	0	0	0
F1CDx-	0	2	0	2	1	154	7	162
F1CDx Mancante	0	0	0	0	0	3	0	3
Totale	173	2	2	177	1	157	7	165

Dodici (12) campioni sono stati assegnati come dati mancanti, di cui 3 campioni con dati mancanti per F1CDx e 9 campioni con dati mancanti per CCD2.

La prevalenza della mutazione *KRAS* nella popolazione bersaglio è basata sullo studio CRYSTAL condotto con cetuximab (35,6%) e sullo studio PRIME condotto con panitumumab (40%). Le statistiche principali relative a PPA e NPA tra F1CDx e le due repliche del test therascreen® (CCD1 e CCD2) sono state stimate in base ai risultati riportati nella Tabella 32. È stata utilizzata l'imputazione multipla per la gestione dei dati mancanti ed è stato mostrato che i dati mancanti non influivano sulle conclusioni dello studio. Le statistiche riassuntive di età e sesso erano estremamente simili alle stime dello studio cardine CRYSTAL (su cetuximab) e dello studio PRIME (su panitumumab).

Definendo come standard di riferimento le identificazioni di consenso tra CCD1 e CCD2, F1CDx ha raggiunto una PPA del 100% (173/173) (IC al 95% [97,9%-100,0%]) e una NPA del 100% (154/154) (IC al 95% [97,6%-100,0%]).

Tabella 32. Riassunto dei dati di concordanza utilizzando la concordanza tra CCD1 e CCD2 come riferimento

	CCD1+/CCD2+	**CCD1-/CCD2-**
F1CDx+	173	0
F1CDx-	0	154

3.6 Studio di concordanza di FoundationOne®CDx per *BRAF*

È stata stabilita la validità clinica di F1CDx come dispositivo diagnostico associato utilizzato per l'identificazione di pazienti affetti da melanoma, che potrebbero essere idonei al trattamento con terapie approvate mirate a *BRAF*. Lo studio è stato condotto utilizzando 305 campioni retrospettivi prelevati da pazienti affetti da melanoma avanzato. 157 campioni utilizzati in questo studio sono stati sottoposti a *pre-screening* utilizzando il test sviluppato in laboratorio FoundationOne (F1 LDT) e 27 sono stati sottoposti a *pre-screening* con il test di un fornitore esterno

per arricchire di campioni positivi. Il tasso di insuccesso *pre-screening* utilizzando il test F1 LDT era del 3,7%, mentre quello del fornitore esterno è sconosciuto. I risultati diagnostici per *BRAF* ottenuti con il test F1CDx sono stati confrontati con quelli ottenuti con il test approvato **cobas**® *BRAF* V600 (Roche Molecular Systems). Questi campioni non provenivano da una sperimentazione clinica e i dati demografici disponibili erano limitati a età e sesso. Le distribuzioni di età e sesso della popolazione bersaglio (sperimentazione BRIM-3) hanno mostrato di essere sovrapponibili.

L'analisi di concordanza ha mostrato che i limiti superiori dell'intervallo di confidenza (IC) al 95% a una coda erano inferiori al 20% per tutte e quattro le ipotesi di NI valutate. Si può quindi concludere con una confidenza del 95% che le differenze di risultati tra i test F1CDx e **cobas**® sono inferiori al 20%, ovvero il margine di non inferiorità (NI). I risultati di concordanza sono riassunti nella Tabella 33 qui di seguito.

Tabella 33. Concordanza dei risultati ottenuti con CCD1, CCD2 e F1CDx utilizzando campioni idonei

	CCD1+			**CCD1-**		
	CCD2+	CCD2-	Totale	CCD2+	CCD2-	Totale
F1CDx+	166	0	166	3	14	17
F1CDx-	1	0	1	0	121	121
Totale	167	0	167	3	135	138

Poiché il test **cobas**® ha una sensibilità inferiore per la rilevazione delle mutazioni dinucleotidiche, è stata condotta un'analisi separata in cui sono stati inclusi solo i campioni idonei senza mutazioni dinucleotidiche. Per quest'analisi erano disponibili complessivamente 273 (=305-32) campioni. I risultati di concordanza sono riassunti nella Tabella 34.

Tabella 34. Concordanza dei risultati ottenuti con CCD1, CCD2 e F1CDx utilizzando campioni idonei, esclusi i campioni con mutazioni dinucleotidiche rilevate da F1CDx

	CCD1+			**CCD1-**		
	CCD2+	CCD2-	Totale	CCD2+	CCD2-	Totale
F1CDx+	149	0	149	1	1*	2
F1CDx-	1**	0	1	0	121	121
Totale	150	0	150	1	122	123

*QRF006472 era l'unico campione in cui entrambe le repliche del test **cobas**® hanno riportato risultati negativi mentre F1CDx ha riportato un risultato positivo. La frequenza allelica di questo campione era del 3,45% con una purezza computazionale del tumore del 10%. Secondo la Tabella 4 delle istruzioni per l'uso del test **cobas**®, il test **cobas**® è in grado di rilevare correttamente tutti i campioni con mutazione *BRAF* V600E che contengono una percentuale minima di DNA mutato superiore al 5% e il cui contenuto tumorale minimo sia almeno del 15%. Quindi, la discordanza può essere spiegata dall'elevata sensibilità di F1CDx nella percentuale inferiore di DNA mutato e dalla condizione di bassa purezza del tumore.

QRF006374 era l'unico campione in cui entrambe le repliche del test **cobas® hanno riportato risultati positivi mentre F1CDx ha riportato un risultato negativo. È stata registrata una mutazione nei dati di linea (Appendice 7) con effetto proteico V600_K601>E, che è una delezione non *frame-shift* di 3 nucleotidi con effetto CDS 1799_1801delTGA. Questa mutazione più complessa ha dato come risultato V600E, ma a causa delle differenze di annotazione rispetto alla V600E canonica, è stata identificata come negativa da F1CDx.

La PPA e la NPA sono state calcolate definendo le identificazioni di consenso tra CCD1 e CCD2 come standard di riferimento. Le prestazioni osservate del test **cobas**® mostrano una sensibilità inferiore per la rilevazione delle alterazioni dinucleotidiche V600 (inclusa V600K) rispetto all'alterazione V600E 1799T>A a singolo nucleotide, in particolare alla frequenza allelica inferiore al 40% rilevata da F1CDx, pertanto, i dati presentati includeranno i risultati di PPA/NPA sia con entrambe le alterazioni, secondo il disegno dello studio, sia come solo V600E, come mostrato nella Tabella 35. È stato condotto uno studio con il test THxID™ *BRAF* kit (bioMérieux) utilizzando 29 campioni con mutazione dinucleotidica *BRAF* V600 rilevata da F1CDx e 29 campioni negativi per fornire una valutazione migliore della concordanza dei dinucleotidi V600. Sui 51 campioni con risultati validi analizzati con THxID™ *BRAF* kit (Tabella 36), si è osservato un solo risultato discordante (F1CDx-/THxID+), con una PPA del 96,3% (26/27) (IC al 95% [81,0%-99,9%]) e una NPA del 100% (24/24) (IC al 95% [85,8%-100,0%]).

Tabella 35. PPA e NPA per la rilevazione di *BRAF* V600 con cobas®

	PPA	NPA
Tutte le alterazioni V600	99,4% (166/167)	89,6% (121/135)
V600E a singolo nucleotide (1799T>A)	99,3% (149/150)	99,2% (121/122)

Tabella 36. Concordanza dei campioni dinucleotidici *BRAF* con THxID™ *BRAF* kit

Campioni dinucleotidici	THxID+	THxID-	Totale
F1CDx+	26	0	26
F1CDx-	1	24	25
Totale	27	24	51

3.7 Concordanza di FoundationOne®CDx con FoundationFocus CDx*BRCA* LOH per le identificazioni di *BRCA1, BRCA2 e LOH.*
3.8

I test F1CDx e FoundationFocus CDx*BRCA LOH* sono equivalenti fatta eccezione per una *pipeline* di analisi aggiornata in uso su F1CDx e per il software di refertazione che permette una refertazione completa di tutte le alterazioni pertinenti rilevate dalla piattaforma F1CDx. È stata condotta una validazione completa della *pipeline* di analisi, che comprendeva una solida analisi della regressione e la rianalisi dei dati dei campioni analizzati con FoundationFocus CDx *BRCA LOH*. È stato stabilito che i test sono concordanti per quanto riguarda la determinazione dello stato di HRD. La rianalisi dei dati di efficacia clinica ha dimostrato che F1CDx e FFocus hanno prestazioni simili nell'identificazione dei pazienti HRD+ che potrebbero trarre beneficio dal trattamento con rucaparib. I dettagli degli studi clinici sono riportati nel Riassunto dei dati di sicurezza e di efficacia per PMA P160018 e P160018/S001. Un riassunto della sopravvivenza libera da progressione valutata dallo sperimentatore utilizzando F1CDx è riportato nella Tabella 37 qui di seguito.

Tabella 37: Sopravvivenza libera da progressione valutata dallo sperimentatore (invPFS) utilizzando F1CDx

Coorte	*Hazard ratio* rucaparib vs placebo	Numero di pazienti	invPFS mediana (mesi)		IC al 95%
ITT	0,365	375	10,8	Rucaparib	8,3-11,4
	Valore p: <0,0001				
	IC al 95%: 0,295-0,451	189	5,4	Placebo	5,3-5,5
Tutte le popolazioni valutabili con test FMI	0,377	345	10,4	Rucaparib	8,3-11,1
	Valore p: <0,0001				
	IC al 95%: 0,302-0,469	173	5,4	Placebo	5,3-5,5
HRD+	0,302	215	13,6	Rucaparib	10,9-17,1
	Valore p: <0,0001				
	IC al 95%: 0,224-0,406	110	5,4	Placebo	5,1-5,6
tBRCA+	0,240	124	16,6	Rucaparib	11,1-22,9
	Valore p: <0,0001				
	IC al 95%: 0,159-0,364	63	5,4	Placebo	4,9-7,1
tBRCA-LOH+	0,354	91	9,7	Rucaparib	8,2-13,8
	Valore p: <0,0001				
	IC al 95%: 0,226-0,554	47	5,4	Placebo	2,9-5,6

Coorte	*Hazard ratio* rucaparib vs placebo	Numero di pazienti	invPFS mediana (mesi)		IC al 95%
tBRCA- LOH non nota	0,176 Valore p=0,0069	16	8,3	Rucaparib	5,3-24,7
	IC al 95%: 0,044-0,711	8	4,1	Placebo	2,3-8,2
tBRCA- LOH-	0,620 Valore p=0,0086	114	6,3	Rucaparib	5,4-8,3
	IC al 95%: 0,429-0,895	55	5,4	Placebo	4,1-5,6

3.9 Riassunto degli studi di concordanza clinica

Nella Tabella 38 qui di seguito è mostrato un riassunto dei risultati degli studi di concordanza clinica. Lo standard di riferimento utilizzato per calcolare la concordanza percentuale positiva (PPA) e la concordanza percentuale negativa (NPA) indicate di seguito è rappresentato dalle identificazioni di consenso tra i due metodi di confronto o analisi di confronto. I calcoli della concordanza che utilizzano unicamente le identificazioni di consenso potrebbero sovrastimare le prestazioni di F1CDx.

Tabella 38. Riassunto di PPA e NPA per gli studi di concordanza di CDx

Biomarcatore	PPA	NPA	Metodo di confronto
Delezioni nell'esone 19 di *EGFR* e L858R	98,1% (106/108)	99,4% (153/154)	**cobas**® *EGFR* Mutation Test v2
Alterazione T790M di *EGFR*	98,9% (87/88)	86,1% (93/108)	**cobas**® *EGFR* Mutation Test v1 **cobas**® *EGFR* Mutation Test v2
Riarrangiamenti di *ALK*	92,9% (78/84)	100% (75/75)	Ventana *ALK* (D5F3) CDx Assay Vysis *ALK* Break-Apart FISH Probe Kit
KRAS	100% (173/173)	100% (154/154)	therascreen® KRAS RGQ PCR Kit
ERBB2 (HER2) Amplificazioni	89,4% (101/113)	98,4% (180/183)	Dako HER2 FISH PharmDx® Kit
BRAF V600 *BRAF* V600E *BRAF* V600 dinucleotidica**	99,4% (166/167) 99,3% (149/150) 96,3% (26/27)	89,6% (121/135)* 99,2% (121/122) 100% (24/24)	**cobas**® *BRAF* V600 Mutation Test **cobas**®*BRAF* V600 Mutation Test THxID™ *BRAF* kit

* La sensibilità di rilevazione dinucleotidica di *BRAF* V600K e V600E è risultata significativamente ridotta nel test **cobas**®, in particolare per i campioni in cui F1CDx aveva rilevato i dinucleotidi a una MAF inferiore al 40%, con conseguenti valori bassi di NPA.

**È stato condotto uno studio con il test THxID™ *BRAF* kit (bioMérieux) utilizzando campioni con mutazione dinucleotidica *BRAF* V600 rilevata da F1CDx e campioni negativi per *BRAF* V600, per fornire una valutazione migliore della concordanza dei dinucleotidi V600.

3.10 Valutazione clinica della classificazione di *BRCA1/2* per il trattamento con olaparib delle pazienti affette da carcinoma ovarico

A. <u>Riassunto dello studio clinico su olaparib</u> D0818C00001 (SOLO1)

Le prestazioni cliniche di F1CDx per la classificazione di *BRCA1/2* sono state stabilite in base a un'analisi dei tumori disponibili, utilizzando il test F1CDx nello studio clinico D0818C00001 (SOLO1). SOLO1 era una sperimentazione multicentrica, di fase III, randomizzata, in doppio cieco, controllata con placebo, che ha confrontato l'efficacia di Lynparza® (olaparib) con il placebo in pazienti affette da carcinoma ovarico, carcinoma delle Tube di Falloppio o carcinoma peritoneale primario con mutazione *BRCA* (mutazione documentata in *BRCA1* o *BRCA2*) dopo la chemioterapia di prima linea contenente platino. Complessivamente 391 pazienti sono state randomizzate (2:1) al trattamento con Lynparza compresse 300 mg per via orale due volte al giorno (n=260) o con placebo (n=131). Le pazienti dovevano presentare una mutazione documentata in *BRCA1* o *BRCA2*, che rappresentasse una perdita nota o prevista di mutazione di funzione. Il trattamento è proseguito per un massimo di 2 anni oppure fino alla comparsa di progressione della malattia o di tossicità inaccettabile;

tuttavia, le pazienti con evidenza di malattia dopo 2 anni, che secondo il parere del medico curante avrebbero potuto trarre un ulteriore beneficio dalla continuazione del trattamento, hanno potuto essere trattate per più di 2 anni. La randomizzazione era stratificata in funzione della risposta alla chemioterapia di prima linea contenente platino (risposta completa o parziale). L'*endpoint* principale di efficacia era la sopravvivenza libera da progressione (PFS) valutata dallo sperimentatore secondo i criteri di valutazione della risposta nei tumori solidi (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*, RECIST), versione 1.1.

Il disegno dello studio aveva l'obiettivo di reclutare pazienti *BRCAm*, ovvero con *BRCAm (gBRCAm* o *sBRCAm)* della linea germinale o somatica. Alla data dell'inizio dello studio non era disponibile un test diagnostico oncologico approvato da un'autorità sanitaria. Le pazienti con mutazione/i nota/a *BRCA* (*gBRCA* ovvero sangue o *tBRCA* ovvero tumore) prima della randomizzazione potevano essere ammesse allo studio in base a questo risultato, purché tutti i test fossero stati eseguiti in laboratori opportunamente accreditati (ovvero, i test eseguiti solo per uso nella ricerca (*research use only*, RUO] non erano accettabili). Inoltre, le pazienti dovevano aver acconsentito a fornire dei campioni di sangue per un test *gBRCA* di conferma post-randomizzazione utilizzando un test *BRCA* della linea germinale basato sul sangue. Tuttavia, le pazienti potevano essere arruolate nello studio se presentavano un tumore *BRCAm* (*tBRCAm*) in base a un test locale, validato clinicamente. Il tessuto tumorale era richiesto per tutte le pazienti randomizzate e, dove possibile, doveva essere stato analizzato retrospettivamente prima della chiusura del database con F1CDx. Poiché poche pazienti sono state sottoposte ad analisi del tumore durante il periodo di arruolamento dello studio SOLO1, le pazienti arruolate erano prevalentemente *gBRCAm* come determinato dai risultati locali o da un test di sperimentazione clinica per *gBRCA;* 2 pazienti presentavano tumori *sBRCAm*. In base a un solido razionale biologico, si prevede che le pazienti con una mutazione BRCA di origine somatica trarranno un beneficio di efficacia clinica simile a quelle con una mutazione la cui origine è la linea germinale.

B. Contabilità della coorte PMA

Delle 391 pazienti randomizzate nello studio SOLO1, 368 (94,1%) avevano un campione di tumore disponibile per l'analisi. Di queste, 335 (85,6%) pazienti avevano un risultato valido del tessuto tumorale generato con F1CDx. Per 313 delle 335 pazienti con un risultato valido del tessuto tumorale generato con F1CDx, il test F1CDx ha confermato una mutazione deleteria *BRCA1* o *BRCA2*. La coorte PMA rappresentava l'80,1% della serie di analisi completa (*full analysis set*, FAS) dello studio SOLO1. Per 12 delle 22 pazienti per le quali F1CDx non ha confermato una mutazione deleteria nel tessuto tumorale, il risultato non è stato confermato a causa di differenze nei criteri di classificazione delle varianti utilizzati da F1CDx rispetto al test di sperimentazione clinica per *gBRCA*. Le altre 10 pazienti, per le quali le mutazioni deleterie *BRCA1/2* nel tessuto tumorale non sono state confermate, presentavano riarrangiamenti genomici costituiti da delezioni genomiche su larga scala (che interessavano almeno un intero esone) o inserzioni genomiche su larga scala, inclusi i duplicati di esoni. Queste pazienti rappresentavano 10 delle 20 pazienti totali randomizzate nello studio SOLO1, che presentavano riarrangiamenti in *BRCA1/2* rilevati dal test di sperimentazione clinica per *gBRCA*.

C. Valutazione dell'efficacia

L'*endpoint* primario di efficacia era la PFS valutata dallo sperimentatore, determinata secondo i criteri RECIST, versione 1.1. Lo studio SOLO1 ha soddisfatto l'*endpoint* primario, dimostrando un miglioramento statisticamente significativo della PFS valutata dallo sperimentatore per olaparib rispetto al placebo. I risultati di una rassegna indipendente in cieco erano compatibili.

L'efficacia del test F1CDx di FMI era basata su un sottogruppo di 313 pazienti affette da carcinoma ovarico, il cui tessuto tumorale conteneva una mutazione deleteria *tBRCAm* confermata. Nella Tabella 39 è riportato un riassunto dei principali *endpoint* di efficacia per le pazienti il cui tessuto conteneva una mutazione *tBRCAm* confermata da F1CDx. La PFS nelle pazienti con mutazione *tBRCAm* confermata da FMI era compatibile con i risultati della FAS, ovvero lo studio SOLO1 ha soddisfatto l'*endpoint* primario, dimostrando un miglioramento sostanziale della PFS con olaparib rispetto al placebo. L'analisi di sensibilità della PFS per valutare il possibile *bias* di accertamento utilizzando una revisione centralizzata indipendente in cieco (*blinded independent centralized review*, BICR) nel sottogruppo di pazienti con mutazione *tBRCAm* confermata da FMI era compatibile con l'analisi della PFS valutata con BICR nella FAS e ne ha confermato la solidità. In generale, l'*endpoint* di efficacia primario nel sottogruppo con mutazione *tBRCAm* confermata da FMI era compatibile con

la FAS.

Tabella 39. Riassunto degli *endpoint* di efficacia principali nella FAS e nel sottogruppo con mutazione *tBRCAm* rilevata da F1CDx

	FAS n=391		***tBRCAm* F1CDx n=313**	
	Olaparib (n=260)	**Placebo (n=131)**	**Olaparib (n=206)**	**Placebo (n=107)**
PFS valutata dallo sperimentatore				
Numero di eventi/numero totale di pazienti (%)	102/260 (39)	96/131 (73)	80/206 (39)	81/107 (76)
PFS mediana (mesi) [a]	Non raggiunta	13,8	Non raggiunta	11,9
HR (IC al 95%) [b]	0,30 (0,23-0,41)		0,28 (0,20-0,38)	
Valore p (a 2 code)[c]	p<0,0001		p<0,0001	

[a] La PFS è definita come il tempo trascorso dalla randomizzazione fino alla data della progressione secondo i criteri RECIST o del decesso.

[b] *Hazard ratio* di un modello dei rischi proporzionali di Cox che include la risposta alla chemioterapia precedente contenente platino (risposta completa rispetto a risposta parziale) come covariata.

[c] Il valore p deriva da un test dei ranghi logaritmici stratificato.

6. Bibliografia

1. Li M. Statistical Methods for Clinical Validation of Follow-On Companion Diagnostic Devices via an External
2. Kimura H., Ohira T., Uchida O., et al. Analytical performance of the **cobas** *EGFR* mutation assay for Japanese non-small-cell lung cancer. Lung Cancer 83, 329-333 (2014).
3. Lopez-Rios F., Angulo B., Gomez B., et al. Comparison of molecular testing methods for the detection of *EGFR* mutations in formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens of non-small cell lung cancer. J Clin Pathol 66, 381–385 (2013).
4. Wong AT, To RM, Wong CL, et al. Evaluation of 2 Real-Time PCR Assays for In Vitro Diagnostic Use in the Rapid and Multiplex Detection of *EGFR* Gene Mutations in NSCLC. Diagn Mol Pathol 22, 138-43 (2013).
5. Press et al., HER2 Gene Amplification Testing by Fluorescent In Situ Hybridization (FISH): Comparison of the ASCO-College of American Pathologists Guidelines With FISH Scores Used for Enrollment in Breast Cancer International Research Group Clinical Trials, J Clin Oncol 34:3518-3528, 2016
6. Dowsett, M. et al, Disease-Free Survival According to Degree of HER2 Amplification for Patients Treated with Adjuvant Chemotherapy With or Without 1 Year of Trastuzumab: The HERA Trial, J Clin Oncol 27:2962-2969, 2009