



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **95956** (13) **C2**  
(51) **МПК** (2011.01)  
**G01N 33/533** (2006.01)  
**A61K 35/12** (2006.01)  
**A61P 35/00**  
**C12Q 1/68** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

### (54) НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ **MAGE-A3**

1

2

(21) а200814634  
(22) 21.06.2007  
(24) 26.09.2011  
(86) РСТ/ЕР2007/056219, 21.06.2007  
(31) 0612342.6  
(32) 21.06.2006  
(33) GB  
(46) 26.09.2011, Бюл.№ 18, 2011 р.  
(72) КОХ ТЕРРІ, БЕ, ГРУСЕЛЛ ОЛІВ'Є, БЕ, СА-  
ЛОНГА ДЕННІС, US, СТЕФЕНС КРЕЙГ ЛОУРЕНС,  
US, БІР ГАБРІЄЛЬ АННМАРІ, DE  
(73) ГЛАКСОСМІТКЛАЙН БАЙОЛОДЖІКАЛЗ С.А.,  
BE  
(56) US A 5 612 201, 18.03.1997.  
WO A 03/045427, 05.06.2003.  
WO A 2005/105139, 10.11.2005.  
EP A 1 659 178, 24.05.2006.  
WO A 00/20445, 13.04.2000.  
US B2 6 811 986, 02.11.2004.  
US A 5 985 571, 16.11.1999.  
PARK J-W ET AL: "A new strategy for the diagnosis  
of MAGE-expressing cancers" JOURNAL OF  
IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER,  
AMSTERDAM, NL, vol. 266, no. 1-2, 1 August 2002  
(2002-08-01), С. 79-86.  
DALERBA PIERO ET AL: "MAGE, BAGE and GAGE  
gene expression in human rhabdomyosarcomas"  
INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 93,  
no. 1, 1 July 2001 (2001-07-01), С. 85-90.  
ZAMMATTEO N ET AL: "DNA microarray to monitor  
the expression of MAGE-A genes" CLINICAL  
CHEMISTRY, vol. 48, no. 1, January 2002 (2002-01),  
С. 25-34.  
(57) 1. Набір для визначення **MAGE-A3** у зафіксо-  
ваному у формаліні та залитому у парафін (FFPE)  
зразку тканини, що містить набір прямих та зворо-

тніх праймерів у відповідності з SEQ ID NO: 11 та  
12 та один зонд, вибраний із зонда, що складаєть-  
ся з SEQ ID NO: 53, та зонда, що складається з  
SEQ ID NO: 17, з флуоресцентним репортерним  
барвником на 5'-кінці та нефлуоресцентним гасни-  
ком на 3'-кінці.  
2. Набір за п. 1, в якому вказаний зонд складаєть-  
ся з SEQ ID NO: 17 з 6-карбоксифлуоресцеїном на  
5'- та нефлуоресцентним гасником на 3'-кінці.  
3. Спосіб визначення присутності або відсутності  
**MAGE-A3** у FFPE пухлинній тканині, що включає  
етап контактування ізольованих нуклеотидних по-  
слідовностей, одержаних з FFPE зразка пухлини,  
або таких, що походять з FFPE зразка пухлини, з  
набором праймерів та зонда згідно з пунктом 1.  
4. Спосіб за п. 3, що додатково включає етап амплі-  
фікації нуклеотидної послідовності та визначен-  
ня у зразку ампліфікованої нуклеотидної послідов-  
ності.  
5. Спосіб лікування пацієнта, що включає визна-  
чення, чи експресує пухлинна тканина **MAGE-A3**,  
при використанні способу згідно з пунктом 3, а  
потім введення композиції, що включає специфіч-  
ний для **MAGE-A3** імунотерапевтичний засіб, паці-  
єнтові.  
6. Спосіб лікування пацієнта, що є схильним до  
повторної появи пухлини, яка експресує **MAGE-A3**,  
де пацієнт піддавався лікуванню для видален-  
ня/лікування пухлинної тканини, яка експресує  
**MAGE-A3**, при цьому спосіб включає: визначення,  
чи експресує пухлинна тканина пацієнта **MAGE-**  
**A3**, при використанні способу згідно з пунктом 3, а  
потім введення композиції, що включає специфіч-  
ний для **MAGE-A3** імунотерапевтичний засіб, вка-  
заному пацієнтові.

Даний винахід відноситься до діагностичного  
способу для виявлення **MAGE-A3**. Винахід також  
відноситься до імунотерапевтичного лікування

популяції пацієнтів, які страждають від пухлин, що  
експресують **MAGE-A3**, де пацієнти які мають тка-  
нину, що експресує **MAGE-A3**, були ідентифіковані

(19) **UA** (11) **95956** (13) **C2**

при використанні діагностичного способу, описаного в даній заявці.

Родина MAGE (антиген меланоми) генів була спочатку ідентифікована завдяки вищлененню з родини цитолітичних лімфоцитів, що походять з лімфоцитів крові ракових пацієнтів (Van der Bruggen та ін., 1991). Родина MAGE генів зараз нараховує більше 20 членів та складається з генів MAGE A, B, C та D (Scanlan та ін., (2002) *Immunol Rev.* 188:22-32; Spomez та ін., (2001) *Cancer Res.* 61(14):5544-51). Вони розміщуються на хромосомі X (Lucas та ін., 1998 *Cancer Res.* 58:743-752; Lucas та ін., 1999 *Cancer Res.* 59:4100-4103; Lucas та ін., 2000 *Int J Cancer* 87:55-60; Lurquin та ін., 1997 *Genomics* 46:397-408; Muscatelli та ін., 1995 *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4987-4991; Pold та ін., 1999 *Genomics* 59 161-167; Rogner та ін., 1995 *Genomics* 29:725-731) та володіють не до кінця визначеною функцією (Ohman та ін. 2001 *Exp Cell Res.* 265(2): 185-94). Гени MAGE є високо гомологічними, а члени родини MAGE-A володіють, зокрема, 60-98% гомологією. MAGE гени не експресуються в нормальних клітинах, за винятком експресії у сперматогенії та плаценті (Haas та ін., 1988 *Am J Reprod Immunol Microbiol* 18:47-51; Takahashi та ін., 1995 *Cancer Res* 55:3478-382).

Реактивація генної експресії MAGE при раку відбувається завдяки патологічному деметилюванню промотору (De Smeets та ін., 1996 *Proc Natl Acad Sci USA* 93(14):7149-53; De Smeets та ін., 1999 *Mol Cell Biol.* 19(11):7327-35). 12 MAGE-A генів варіабельно понадекспресуються при наступних ракових захворюваннях: карцинома перехідних клітин, карцинома стравоходу, меланома, карцинома жовчного та сечового міхура та недрібноклітинна карцинома легень (NSCLC) (Scanlan та ін., 2002 *Immunol Rev.* 183:22-32). Понадекспресія та специфічність MAGE експресії у ракових тканинах привела до використання білка MAGE-A3 як антигену у ракових вакцинах (Scanlan та ін., 2002 *Immunol Rev.* 188:22-32). Проте завдяки широкому спектру експресії, що виявляється у ракових пацієнтів, рівень експресії MAGE-A3 повинен бути точно оцінений для кожного пацієнта для того, щоб спрямувати вакцинацію на пацієнтів, які експресують цей білок. MAGE-A3 часто називають почергово MAGE-3; обидві ці назви використовуються в даній заявці.

#### Меланома

Пацієнти, які мають злоякісну меланому з віддаленим метастазом (стадія IV згідно з класифікацією Американського об'єднаного з раку (AJCC)), мають середній період виживання один рік, зі значенням довгострокового виживання тільки 5%. Навіть стандартна терапія для меланоми IV стадії має значення терапевтичної відповіді тільки у 8-25%т пацієнтів, при відсутності впливу на загальний час виживання. Пацієнти з регіонарними метастазами (стадія III) мають середній період виживання від двох до трьох років з дуже низькою можливістю довгострокового виживання, навіть після адекватного хірургічного контролю первинного та регіонарного метастазів (Balch та ін., 1992 *Semin Surg Oncol.* 8(6):400-14). Більшість пацієнтів, які мають стадію I - III меланоми, піддавалися хірургічному видаленню меланоми, проте ці паціє-

нти мають суттєвий ризик розвитку рецидиву. Таким чином, залишається необхідність запобігання розвитку меланоми та одержання поліпшених режимів лікування для метастатичної меланоми та допоміжних способів лікування для пацієнтів, які піддавалися первинному видаленню пухлини.

#### Рак легень

Існує два типи раку легень: не дрібноклітинний рак легень (NSCLC) та дрібноклітинний рак легень (SCLC). Назви просто описують тип клітин, які виявлені у пухлинах. NSCLC включає карциному лускатих клітин, аденокарциному, карциному великих клітин та нараховує приблизно 80% ракових захворювань легень. NSCLC важко піддається лікуванню, та способи лікування, які є доступними, мають на меті подовжити період життя якомога більше та послабити симптоми захворювання. NSCLC є найбільш загальним типом раку легень та асоціюється з несприятливими виходами. З усіх NSCLC пацієнтів приблизно 25% мають локорегіонарне захворювання під час діагностики та все ще підлягають хірургічному видаленню (стадії IB, IIA або IIB згідно з AJCC класифікацією). Проте 50% цих пацієнтів мають рецидиви протягом двох років після повного хірургічного видалення. Таким чином, існує необхідність у забезпеченні кращого способу лікування цих пацієнтів.

#### Експресія MAGE-A3

Раніше існував ряд способів, які намагалися виміряти експресію MAGE-A3 генів як у клітинних лініях, так і у зразках пухлини. Також використовувалися напівкількісний спосіб RT-ПЛР (De Plaen та ін., 1994 *Immunogenetics* 40(5):360-9), інші методики, які базуються на ПЛР, та мікрочіп серійних розведень (Zammatteo та ін., 2002 *Clinical Chemistry* 48(1) 25-34). Проте у багатьох цих дослідженнях основна проблема полягала у дуже високій гомології між членами родини MAGE, що зумовлювало помилкові позитивні результати. Для масштабних дослідів фази II та III є бажаним аналіз з високою пропускну здатністю, здатний специфічно ідентифікувати зразки, що експресують MAGE-A3, та знижувати ймовірність наявності зразків, які є помилково виявлені як позитивні.

Інша складність виникає при застосуванні фіксованої у формаліні, заклощеної у парафін (FFPE) пухлинною тканиною, що є звичайним способом зберігання пухлинною тканини у клінічних центрах. Фіксація у формаліні змінює структуру молекул РНК у тканині, викликаючи перехресне зв'язування та часткову деградацію. Часткова деградація приводить до створення менших шматочків РНК розміром 100-300 пар основ. Ці структурні зміни РНК роблять складним застосування РНК, екстрагованої з FFPE тканини, у традиційних методиках діагностики.

#### Короткий опис малюнків

Фігура 1: Специфічність MAGE-A3 RT-ПЛР TaqMan праймерів у родині членів MAGE-A.

Фігура 2: Специфічність зонда зв'язувальної маленької бороздки (Minor Groove Binding) (MGB) TaqMan RT-ПЛР для експресії MAGE-A3.

Фігура 3: Специфічність аналізу MAGE-A3 праймерів у присутності MAGE-A3 та MAGE-6 плазмід.

Фігура 4: Пухлинна експресія *MAGE-A3*, як було виміряно шляхом кількісної TaqMan ПЛР

Фігура 5: Аналіз експресії *MAGE-A3*.

Фігура 6a: Специфічність *MAGE-A3* праймерів, сконструйованих для застосування у FFPE тканині.

Фігура 6b: Аналіз лінійності праймерів при відмінних кількостях РНК.

Фігура 7: Порівняння між аналізом пізнього заморожування РНК з аналізом ПЛР FFPE тканини.

Фігура 8: Відносне порівняння пізнього заморожування РНК та FFPE на основі *MAGE-A3* аналізів.

Фігура 9: Нуклеотидна послідовність, що кодує злитий білок на основі фрагменту ліпопротеїну D, *MAGE3* фрагменту та гістидинового хвоста, та її відповідна амінокислотна послідовність (SEQ ID NO:35 та 36).

Фігура 10: Злитий білок NS1-*MAGE3* та гістидиновий хвіст (SEQ ID NO:37)

Фігура 11: ДНК, що кодує злитий білок NS 1-*MAGE3*-His (SEQ ID NO:38)

Фігура 12: Злитий білок CLYTA-*MAGE3*-His (SEQ ID NO:39)

Фігура 13: ДНК злитого білка CLYTA-*MAGE3*-His (SEQ ID NO:40)

Фігура 14: Порівняння послідовностей родини *MAGE-A* генів для конструювання RT-ПЛР праймерів та зондів для *MAGE-A3*

Фігура 15: Порівняння *MAGE-A3* та *MAGE-A6* послідовностей для ідентифікації ділянок, що містять цільові послідовності (виділено рамкою)

Фігура 16: Класи для напівкількісної *MAGE-A3* RT-ПЛР: приклад того, як п'ять класів можуть бути призначені для проведення напівкількісного аналізу *MAGE-A3* RT-ПЛР

Фігура 17: Графічне порівняння значень *Ct*, одержаних за допомогою *MAGE-A* плазмід при використанні 20, 2, 0,2 0,02 пг ДНК

Фігура 18: Графічне порівняння значень дельта *Ct* стосовно *MAGE-A3* для інших *MAGE-A* плазмід при використанні 20, 2, 0,2 0,02 пг ДНК

Фігура 19: Лінійність FFPE Xenograft GERL РНК - двократні серійні розведення від 100 до 0,1 нг внесеної РНК

Фігура 20: показує графік залежності дельта *Ct* від log (основа 2) внесеної РНК проти між *MAGE-A3* та  $\beta$ -актином.

Опис таблиць та послідовностей

Таблиця 1: Олігонуклеотидні праймери, що використовуються для напівпрепаративної *MAGE* RT-ПЛР.

Таблиця 2: Олігонуклеотидні праймери, що використовуються для TaqMan кількісної RT-ПЛР.

Таблиця 3: Порівняння *MAGE-A3* напівкількісної ПЛР та кількісної TaqMan ПЛР.

Таблиця 4: Порівняння значень *Ct* та дельта *Ct* при використанні ПЛР суміші 1 та ПЛР суміші 2.

Таблиця 5: Олігонуклеотидні праймери, що використовуються для MGB TaqMan кількісної RT-ПЛР із замороженої тканини

Таблиця 6: Класи напівкількісної *MAGE-A3* RT-ПЛР: приклад того, як п'ять класів можуть бути призначені для напівкількісного *MAGE-A3* RT-ПЛР аналізу (відноситься до Фігури 16)

Таблиця 7: Послідовності COBAS™ TaqMan *MAGE-A3* праймера та зонда

Таблиця 8: Послідовності COBAS™ TaqMan бета-актинового праймера та зонда

Таблиця 9: Зразок та контрольний прийнятний інтервал *Ct* для COBAS™ TaqMan

Таблиця 10: COBAS™ TaqMan профіль термальної циклізації - термальний профіль ПЛР для *MAGE-A3* експерименту виключності

Таблиця 11: RT-ПЛР термальний профіль для лінійності та RT-ПЛР ефективності, аналітична чутливість (границя визначення), спосіб кореляції та експерименти щодо відтворюваності

Таблиця 12: *Ct* значення з *MAGE-A* плазмідями при використанні 20, 2, 0,2, 0,02 пг ДНК

Таблиця 13: Дельта *Ct* значення стосовно *MAGE-A3* для інших *MAGE-A* плазмід при використанні 20, 2, 0,2, 0,02 пг ДНК

Таблиця 14: Підтвердження експерименту *MAGE-A3* виключності

Таблиця 15 та Таблиця 16: Деталі експериментів щодо виключності *MAGE-A3*

Таблиця 17: Лінійність *Ct* *MAGE-A3* та  $\beta$ -актину та дельта *Ct* з 10 повторів при 11 рівнях

Таблиця 18: Ефективність RT-ПЛР ампліфікації *MAGE-A3* та  $\beta$ -актину

Таблиця 19: Експеримент по підтвердженню лінійності / ефективності RT-ПЛР

Таблиці 20, 21 та 22: Деталі експериментів з лінійності / ефективності RT-ПЛР

Таблиця 23: Значення співпадання *MAGE-A3* *Ct*, N = 24 для кожного стану

Таблиця 24: Процентне значення співпадання *Ct* для *MAGE-A3*, N = 24 для кожного стану

Таблиця 25: Значення співпадання *Ct* для  $\beta$ -актину, N = 24 для кожного стану

Таблиця 26: Процентне значення співпадання *Ct* для  $\beta$ -актину, N = 24 для кожного стану

Таблиця 27 Контрольні *Ct* для *MAGE* гену FAM

Таблиця 28: Контрольні *Ct* для  $\beta$ -актину

Таблиця 29;

Таблиця 30 та Таблиця 31: Деталі експерименту з визначення границі

Таблиця 32: Заключна перехресна валідація зразків

Таблиця 33: COBAS та прототип аналізу позитивних та негативних результатів за допомогою програми для визначення проценту відповідності

Таблиця 34: COBAS та прототип аналізу позитивних та негативних результатів за допомогою програми для визначення проценту відповідності із замороженими зразками для визначення суперечливих результатів

Таблиця 35: Експеримент з визначення контролю *Ct* гену *MAGE*

Таблиця 36: Експеримент з визначення контролю *Ct* гену  $\beta$ -актину

Таблиці 37, 38 та 39: Деталі способу кореляції / експерименту з перехресної валідації

Таблиця 40: Прогон 1 - поріг експресії *MAGE-A3* з контролів GERL РНК

Таблиця 41: Прогон 1 - сигнал експресії *MAGE-A3* для зразків відтворюваності

Таблиця 42: Прогон 2 - поріг експресії *MAGE-A3* з контролів GERL РНК

Таблиця 43: Прогон 2 - сигнал експресії *MAGE-A3* для зразків на відтворюваність

Таблиця 44: Підтвердження відтворюваності

Таблиці 45, 46 та 47: Деталі експериментів з відтворюваності

SEQ ID NO:1 - MAGE3-E2F (праймер для напівкількісного MAGE3 аналізу) (Таблиця 1)

SEQ ID NO:2 - MAGE3-E3R (праймер для напівкількісного MAGE3 аналізу) (Таблиця 1)

SEQ ID NO:3 - E3 MAGE3 TMF (прямий праймер для екзону 3 MAGE-A3) (Таблиця 2)

SEQ ID NO:4 - E3 MAGE3 TMR (зворотний праймер для екзону 3 MAGE-A3; цей праймер є зворотним компліментом послідовності екзону MAGE-A3, яку він впізнає) (Таблиця 2)

SEQ ID NO:5 -13 MAGE3 TMF (прямий праймер для інтрону 3 MAGE-A3) (Таблиця 2)

SEQ ID NO:6 -13 MAGE3 TMR (зворотний праймер для інтрону 3 MAGE-A3; цей праймер є зворотним компліментом послідовності послідовності інтрону MAGE-A3, яку він впізнає) (Таблиця 2)

SEQ ID NO:7 - MAGEA3-775F (прямий праймер для MAGE-A3) (Таблиця 5)

SEQ ID NO:8 - MAGEA3-849R (зворотний праймер для MAGE-A3; цей праймер є зворотним компліментом послідовності MAGE-A3, яку він впізнає) (Таблиця 5)

SEQ ID NO:9 - MAGEA3e-950F (прямий праймер для MAGE-A3) (Таблиця 5)

SEQ ID NO:10 - MAGEA3e-1037R (зворотний праймер для MAGE-A3; цей праймер є зворотним компліментом послідовності MAGE-A3, яку він впізнає) (Таблиця 5)

SEQ ID NO:11 - MAGEA3f-623F (прямий праймер для MAGE-A3) (Таблиця 5)

SEQ ID NO:12 - MAGEA3f-697R (зворотний праймер для MAGE-A3; цей праймер є зворотним компліментом послідовності MAGE-A3, яку він впізнає) (Таблиця 5)

SEQ ID NO:13 - E3 MAGE3 TMP (зонд для екзону 3 MAGE3) (Таблиця 2)

SEQ ID NO:14-13 MAGE-A3 TMP (зонд для інтрону 3 MAGE3) (Таблиця 2)

SEQ ID NO:15 - MAGEA3-801Tmc (зонд для MAGE3) (Таблиця 5)

SEQ ID NO:16 - MAGEA3e-1000Tmc (зонд для MAGE3) (Таблиця 5)

SEQ ID NO:17 - MAGEA3f-65 ITm (зонд для MAGE3) (Таблиця 5)

SEQ ID NO:18 - β-актин-E4P (праймер β-актину) (Таблиця 1)

SEQ ID NO:19 - β-актин-E6R (праймер β-актину) (Таблиця 1)

SEQ ID NO:20 - β-актин-TMF (праймер β-актину) (Таблиця 2)

SEQ ID NO:21 - β-актин-TMR (праймер β-актину) (Таблиця 2)

SEQ ID NO:22 - β-актин-TMP (зонд для β-актину) (Таблиця 2)

SEQ ID NO 23 - SEQ ID NO:29: імунотопетида MAGE3

SEQ ID NO:30 - SEQ ID NO:34: допоміжні олігонуклеотиди

SEQ ID NO:35 - нуклеотидна послідовність злитого білка фрагмент ліпопротеїну D - фрагмент MAGE3 - гістидиновий хвіст (Фігура 9)

SEQ ID NO:36 - амінокислотна послідовність SEQ ID NO:35 (Фігура 9)

SEQ ID NO:37 - амінокислотна послідовність злитого білка NS1 - MAGE3 - гістидиновий хвіст (Фігура 10)

SEQ ID NO:38 - нуклеотидна послідовність, що кодує SEQ ID NO:37 (Фігура 11)

SEQ ID NO:39 - амінокислотна послідовність злитого білка CLYTA-MAGE3-гістидин (Фігура 12)

SEQ ID NO:40 - нуклеотидна послідовність, що кодує злитий білок CLYTA-MAGE3-гістидин (Фігура 13)

SEQ ID NO:41 - MAGE 1 фрагмент (Фігура 14)

SEQ ID NO:42 - MAGE 2 фрагмент (Фігура 14)

SEQ ID NO:43 - MAGE 4a фрагмент (Фігура 14)

SEQ ID NO:44 - MAGE 7 фрагмент (Фігура 14)

SEQ ID NO:45 - MAGE 8 фрагмент (Фігура 14)

5E3 ID NO:46 - MAGE 10 фрагмент (Фігура 14)

SEQ ID NO:47 - MAGE 11 фрагмент (Фігура 14)

SEQ ID NO:48 - MAGE 12 фрагмент (Фігура 14)

SEQ ID NO:49 - MAGE-A6 фрагмент (Фігура 14)

SEQ ID NO:50 - MAGE-A3 фрагмент (Фігура 14)

SEQ ID NO:51 - MAGE-A3 фрагмент (Фігура 15)

SEQ ID NO:52 - MAGE-A6 фрагмент (Фігура 15)

SEQ ID NO:53 - MAGE-A3 послідовність синтетичного зонду MAGEA3F-646MOD (Таблиця 7)

SEQ ID NO:54 - MAGEA3F-646MOD послідовність зонду, що містить немодифіковані нуклеотиди

SEQ ID NO:55 - послідовність β-актинового праймера RGI BACT F2 (Таблиця 8)

SEQ ID NO:56 - послідовність β-актинового праймера RGI BACT R2 (Таблиця 8)

SEQ ID NO:57 - послідовність β-актинового зонду HW RGI BACT H (Таблиця 8)

Винахідники згідно з даним винаходом удосконалили аналіз для ідентифікації пацієнтів, які мають пухлинну тканину, що експресує MAGE-A3, які будуть, таким чином, мати переваги від застосування MAGE-A3-специфічної імунотерапії.

В одному втіленні даного винаходу забезпечується праймер, що включає нуклеотидну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:3-12. У додатковому втіленні забезпечується набір праймерів, що включає один або більше з наступних пар праймерів:

- SEQ ID NO:3 та 4;
- SEQ ID NO:5 та 6;
- SEQ ID NO:7 та 8;
- SEQ ID NO:9 та 10; та
- SEQ ID NO:11 та 12.

У додатковому аспекті даного винаходу забезпечується зонд, що включає нуклеотидну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:13-17, 53 або 54.

У додатковому втіленні забезпечується набір, що включає:

- прямий праймер;
- зворотний праймер; та
- зонд,

де компоненти (i), (ii) та (iii) є здатними до гібридизації з цільовою послідовністю MAGE-A3 при жорстких умовах, та де принаймні одна цільова послідовність (i), (ii) або (iii) відрізняється принаймні одним нуклеотидом у порівнянні з еквівалент-

ною ділянкою усіх інших нуклеотидних послідовностей MAGE A, та де набір є здатним до використання для розрізнення MAGE-A3 та MAGE-A6.

Додатково забезпечується набір, що включає:

- (i) прямий праймер;
- (ii) зворотний праймер; та
- (iii) зонд,

де компоненти (i), (ii) та (iii) є здатними до гібридизації з цільовою послідовністю MAGE-A3 при жорстких умовах, та де принаймні одна цільова послідовність (i), (ii) або (iii) відрізняється принаймні одним нуклеотидом у порівнянні з еквівалентною ділянкою нуклеотидної послідовності MAGE-A6, та де набір є здатним до використання для розрізнення MAGE-A3 та MAGE-A6.

В одному втіленні набір згідно з даним винаходом може включати наступні компоненти: (i) принаймні один праймер або набір праймерів, як описано в даній заявці; та (iii) принаймні один зонд, як описано в даній заявці. В одному прикладі компонент (i) включає SEQ ID NO:3 та 4; а компонент (ii) включає SEQ ID NO:13; альтернативно, компонент (i) включає SEQ ID NO:5 та 6; а компонент (ii) включає SEQ ID NO:14; або компонент (i) включає SEQ ID NO:7 та 8; а компонент (ii) включає SEQ ID NO:15; або компонент (i) включає SEQ ID NO:9 та 10; а компонент (ii) включає SEQ ID NO:16; або компонент (i) включає SEQ ID NO:11 та 12; а компонент (ii) включає SEQ ID NO:17; або компонент (i) включає SEQ ID NO:11 та 12; а компонент (ii) включає SEQ ID NO:53 або SEQ ID NO:54.

У додатковому втіленні даного винаходу забезпечується спосіб визначення присутності або відсутності MAGE-A3 позитивної пухлинної тканини, що включає етап контактування ізольованої нуклеотидної послідовності, одержаної з біологічного зразка, або такої, що походить від біологічного зразка, принаймні з одним праймером, як описано в даній заявці, набором праймерів, як описано в даній заявці, зондом, як описано в даній заявці або набором, як описано в даній заявці.

Інший аспект даного винаходу являє собою спосіб визначення присутності або відсутності MAGE-A3 позитивної пухлинної тканини, шляхом аналізу біологічного зразка із праймером, зондом або набором праймерів, як описано в даній заявці.

У додатковому аспекті забезпечується спосіб діагностики пацієнта, що включає етап контактування ізольованої нуклеотидної послідовності, одержаної з біологічного зразка, або такої, що походить від біологічного зразка, принаймні з одним праймером, як описано в даній заявці, набором праймерів, як описано в даній заявці, зондом, як описано в даній заявці, або набором, як описано в даній заявці, та оцінку, чи експресується MAGE-A3 у зразку.

Спосіб може додатково включати етап ампліфікації нуклеотидної послідовності та визначення у зразку ампліфікованої нуклеотидної послідовності.

Ще в одному аспекті забезпечується спосіб визначення присутності або відсутності MAGE-A3 позитивної пухлинної тканини, що включає контактування ізольованої нуклеотидної послідовності, одержаної з біологічного зразка, або такої, що походить від біологічного зразка, принаймні з одним

праймером або зондом, як описано в даній заявці. Спосіб може додатково включати етап визначення, чи гібридується нуклеотидна послідовність з принаймні одним праймером або зондом при жорстких умовах, що, таким чином, дає можливість визначити, чи є пухлинна тканина MAGE-A3 позитивною. В одному втіленні спосіб може додатково включати етап використання *in situ* гібридизації для визначення, чи гібридується нуклеотидна послідовність з принаймні одним праймером або зондом.

Способи, як описано в даній заявці, можуть використовуватися для біологічного зразка, який являє собою заморожену тканину; альтернативно або додатково, способи, описані в даній заявці, можуть проводитися на біологічному зразку, який являє собою тканину, що зберігається у парафіні, наприклад, являє собою фіксовану у формаліні або закладену у парафін тканину (FFPE).

Даний винахід додатково забезпечує спосіб лікування пацієнта, що включає визначення, чи експресує пухлинна тканина пацієнта MAGE-A3 при використанні способу, як описано в даній заявці, та потім введення композиції, що включає імунотерапію або імунотерапевтичний засіб на основі MAGE-A3, як описано в даній заявці, пацієнтові.

У додатковому втіленні забезпечується спосіб лікування пацієнта, чутливого до рецидиву пухлини, що експресує MAGE-A3, при цьому пацієнт піддавався лікуванню для видалення / лікування пухлинної тканини, що експресує MAGE-A3, де спосіб включає визначення, чи експресує пухлинна тканина пацієнта MAGE-A3 при використанні способу, як описано в даній заявці, а потім введення композиції, що включає імунотерапію або імунотерапевтичний засіб на основі MAGE-A3, як описано в даній заявці, пацієнтові.

У додатковому втіленні даного винаходу забезпечується застосування композиції, що включає імунотерапію або імунотерапевтичний засіб на основі MAGE-A3, у виробництві лікарського засобу для лікування пацієнта, що страждає від пухлини, яка експресує MAGE-A3, де пацієнт ідентифікується як такий, що має пухлинну тканину, яка експресує MAGE-A3, при використанні способу, як описано в даній заявці.

Ще в одному додатковому втіленні забезпечується композиція, що включає імунотерапію або імунотерапевтичний засіб на основі MAGE-A3, у виробництві лікарського засобу для лікування пацієнта, чутливого до рецидивів пухлини, що експресує MAGE-A3, де пацієнт ідентифікується як такий, що має пухлинну тканину, яка експресує MAGE-A3, при використанні способу, як описано в даній заявці.

В одному втіленні забезпечується спосіб лікування або застосування, як описано в даній заявці, в якому композиція, що включає імунотерапію або імунотерапевтичний засіб на основі MAGE-A3, включає MAGE-A3 антиген або його пептид. В одному втіленні MAGE-A3 антиген або його пептид включає або складається з EVDPIGHLY.

MAGE-A3 антиген або пептид для застосування у даному винаході може бути злитим або кон'югованим з білком носія. В одному втіленні білок

носія може бути вибраним з білка D, NS1 або CLyA або їх фрагментів.

В одному втіленні даного винаходу композиція, що включає імунотерапію або імунотерапевтичний засіб на основі MAGE-A3, може додатково включати ад'ювант. Наприклад ад'ювант може включати один або більше, або комбінацію наступних: 3D-MPL; солі алюмінію; олігонуклеотиди, що містять CpG, сапонінвмісні ад'юванти, такі, як QS21 або ISCOM; емульсії типу масло-у-воді та ліпосоми. В одному втіленні ад'ювант може включати 3D-MPL, олігонуклеотиди, що містять CpG та QS21.

Як використовується в даній заявці, термін «цільова послідовність» являє собою ділянку послідовності нуклеїнової кислоти MAGE-A3 (або ДНК, або РНК, наприклад, геномну ДНК, інформаційну РНК або їх ампліфіковані варіанти), з якою послідовність зонда або праймера має часткову (тобто, до деякої міри не співпадає) або повну ідентичність; незважаючи на те, що зворотний праймер є зворотним компліментом (або, як вказано вище, має деяке неспівпадання) послідовності, яку він впізнає. Цільова послідовність в загальному випадку відноситься до ділянки MAGE-A3 послідовності, що відрізняється принаймні одним нуклеотидом у порівнянні з іншою або усіма іншими MAGE-A нуклеотидними послідовностями. Проте у деяких втіленнях даного винаходу цільова послідовність може для одного або більше праймерів та зондів бути ідентичною для MAGE-A нуклеотидних послідовностей, за умови, що принаймні один або два праймери та зонд, які використовуються, впізнають цільову послідовність, яка відрізняється між генами, які піддають диференціації.

Таким чином, в одному втіленні специфічний праймер або зонд будуть зв'язуватися з цільовою MAGE-A3 послідовністю при відсутності неспівпадань та зв'язуватися з еквівалентною ділянкою подальшої MAGE-A послідовності, наприклад, послідовністю MAGE-6, з неспівпаданням однієї або більше пар основ.

Цільова послідовність для праймерів або зонда згідно з даним винаходом можуть являти собою послідовність, що має найбільші відмінності (неспівпадань) між двома генами, що дає можливість визначати MAGE-A3 з дуже високою специфічністю.

В одному втіленні даного винаходу цільові послідовності являють собою ділянки, ідентифіковані у виділеному тексті на Фігурі 15.

Прийнятим чином праймер або зонд можуть бути принаймні на 95% ідентичними цільовій послідовності по всій довжині праймера або зонда, бажано більше, ніж на 95% ідентичними, наприклад, на 96%, 97%, 98%, 99%, та найбільш бажано мають 100% ідентичність по своїй довжині з цільовою послідовністю MAGE-A3. Праймери або зонди винаходу можуть бути ідентичними з цільовою послідовністю в усіх нуклеотидних положеннях праймера або зонда, або можуть мати 1, 2 або більше неспівпадань, наприклад, в залежності від довжини зонда, температури, умов реакції та вимог аналізу. Звичайно, за умови, що зворотний праймер задовольняє цим вимогам до ділянки, яка

є зворотним компліментом до послідовності праймера.

Є прийнятним, коли кожний нуклеотид праймера або зонда може утворювати водневий зв'язок з відповідним цільовим нуклеотидом.

Бажано, коли комплементарність праймера або зонда із цільовою послідовністю оцінюють ступенем спарювання основ A:T та C:G, так, що аденіновий (A) нуклеотид парується з тиміновим (T), а гуаніновий (G) нуклеотид парується з цитозиним (C), або навпаки. У формі РНК Т може замінюватися на У (урацил).

Якщо, наприклад, інозин використовується в універсальних зондах, то комплементарність може також оцінюватися ступенем взаємодій інозину (зонд) та цільового нуклеотиду.

Згідно з цим даний винахід забезпечує праймер, що включає нуклеотидну послідовність, вибрану з SEQ ID NO:1-12, як показано у Таблицях 1 та 2. Термін «праймер» використовується в даній заявці для розуміння будь-якої одноланцюгової олігонуклеотидної послідовності, здатної використовуватися як праймер, наприклад, у методиці ПЛР. Таким чином, «праймер» згідно з винаходом відноситься до одноланцюгової олігонуклеотидної послідовності, що є здатною діяти як точка ініціації синтезу подовження продукту праймера, що є суттєво ідентичним (для прямого праймера) або суттєво ідентичним зворотному компліменту (для зворотного праймера) ланцюга нуклеїнової кислоти, що копіюється. Модель (довжина та специфічна послідовність) праймера буде залежати від природи ДНК та/або РНК мішеней та від умов, при яких використовується праймер (таких, як температура, іонна сила).

Праймери можуть складатися з нуклеотидної послідовності, представленої у SEQ ID NO:1-12, або можуть мати 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100 або більше пар основ, які містяться або не містяться у межах послідовностей SEQ ID NO:1-12, за умови, що вони є прийнятними для специфічного зв'язування цільової послідовності у межах MAGE-A3 нуклеотидної послідовності при жорстких умовах. У разі необхідності можуть бути проведені незначні модифікації праймерів або зондів стосовно довжини або послідовності для підтримання специфічності та чутливості, які є необхідними при певних обставинах. Зонди та/або праймери, приведені в даній заявці, можуть бути подовжені у довжину, або довжина може бути зменшена, наприклад, на 1, 2, 3, 4 або 5 нуклеотидів у будь-якому напрямку.

Як використовується в даній заявці, термін «жорсткі умови» означає будь-які умови гібридизації, які дозволяють праймерам специфічно зв'язуватися з нуклеотидною послідовністю у межах MAGE-A3 нуклеотидної послідовності, але не з будь-якою іншою MAGE нуклеотидною послідовністю. «Специфічне зв'язування» або «специфічна гібридизація» зонда з ділянкою MAGE-A3 нуклеотидної послідовності означає, що праймер або зонд утворює дуплекс (дволанцюгову нуклеотидну послідовність) з частиною цієї ділянки або з цілою ділянкою при використовуваних експериментальних умовах, та що при цих умовах праймер або зонд не утворює дуплекса з іншими ділянками ну-

клеотидної послідовності, що є присутньої у зразку, який піддається аналізу. При цьому є зрозумілим, що праймери та зонди згідно з даним винаходом, які є призначеними для специфічної гібридизації у межах ділянки MAGE-A3 нуклеотидної послідовності, можуть не співпадати повністю із вказаною ділянкою або можуть до значного ступеня перекриватися із вказаною ділянкою (тобто формувати дуплекс з нуклеотидами як поза вказаною ділянкою, так і у межах вказаної ділянки).

Є прийнятним, коли специфічна гібридизація зонда з цільовою ділянкою нуклеїнової кислоти проходить при «жорстких умовах гібридизації», таких, як 3 X SSC, 0,1% SDS, при 50°C. Спеціаліст в даній області знає, як варіювати параметри температури та концентрацію солі так, щоб можна було досягти специфічної гібридизації. Умови гібридизації та промивання є добре відомими та приведені, наприклад, у Sambrook, та ін., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989) зокрема, глава 11 у цій роботі.

Даний винахід додатково забезпечує набір праймерів, що включає один або більше з наступних праймерів:

Набір 1: SEQ ID NO:3 та 4
Набір 2: SEQ ID NO:5 та 6
Набір 3: SEQ ID NO:7 та 8
Набір 4: SEQ ID NO:9 та 10
Набір 5: SEQ ID NO:11 та 12

Даний винахід додатково забезпечує зонд, що включає нуклеотидну послідовність, яка являє собою будь-яку з SEQ ID NO:13-17, 53 або 54. Термін «зонд» використовується в даній заявці для позначення будь-якої одноланцюгової олігонуклеотидної послідовності, здатної до зв'язування з нуклеїновою кислотою, та такої, що використовується як зонд, наприклад, у ПЛР методиці: Зонди можуть складатися з нуклеотидної послідовності, представлені у SEQ ID NO:13-17, 53 або 54, або можуть являти собою 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100 або більше пар основ, які містяться або не містяться у межах послідовності SEQ ID NO:13-17, 53 або 54 за умови, що вони є прийнятними для специфічного зв'язування з цільовою послідовністю у межах MAGE-A3 нуклеотидної послідовності.

В одному втіленні винаходу, де зонд використовується у способі у комбінації з парою праймерів, ця пара праймерів буде дозволяти проводити ампліфікацію частини або усього MAGE-A3 полінуклеотидного фрагменту, з яким зонди є здатними зв'язуватися або з яким зонди імобілізуються на твердій підложці.

Праймер та/або зонд може додатково включати маркер, що дозволяє визначати зонд. Приклади маркерів, що можуть використовуватися, включають: флуоресцентні маркери, наприклад, 6-карбоксіфлуоресцеїн (6FAM<sup>TM</sup>), NED<sup>TM</sup> (Applied Biosystems), HEX<sup>TM</sup> або VIC<sup>TM</sup> (Applied Biosystems); TAMRA<sup>TM</sup> маркери (Applied Biosystems, CA, USA); хемілюмінісцентні маркери, наприклад, зонди на основі рутенію; та радіоактивні мітки, наприклад, третій у формі тритіюваного

тимідину. <sup>32</sup>-Фосфор може також використовуватися як радіомітка.

В одному втіленні даного винаходу зонд може включати флуоресцентний репортерний барвник на своєму 5'-кінці та барвник для гасіння на своєму 3'-кінці. Флуоресцентний репортерний барвник може включати 6-карбоксіфлуоресцеїн (6FAM), а барвник для гасіння може включати нефлуоресцентний агент для гасіння (NFQ). Необов'язково, білок зв'язувальної маленької бороздки (MGB<sup>TM</sup>; Applied Biosystems CA, USA) може додаватися до зонда, наприклад, до 3'-кінця зонда.

В одному втіленні може використовуватися MGB<sup>TM</sup> Eclipse зонд (Epoch Biosciences, WA, USA). MGB<sup>TM</sup> Eclipse зонди мають Eclipse<sup>TM</sup> темний агент для гасіння та MGB<sup>TM</sup> залишок, розміщений на 5'-кінці зонда. Флуоресцентний репортерний барвник розміщується на 3'-кінці зонда.

В одному втіленні праймер та зонд послідовності згідно з даним винаходом можуть містити або включати існуючі в природі нуклеотидні структури або основи, наприклад, аденін (A), цитозин (C), гуанін (G), тимін (T) та урацил (U).

У додатковому втіленні синтетичні або модифіковані аналоги нуклеотидних структур або основ можуть включатися у послідовність зонда. Під синтетичними або модифікованими розуміють неіснуючу в природі нуклеотидну структуру або основу. Такі синтетичні або модифіковані основи можуть замінювати 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або усі основи у послідовності зонда. В одному втіленні цитозин може замінений на 5-метил dC, а тимін може бути замінений на 5-пропініл dU. BHQ2 агент для гасіння може також включатися у послідовність.

Даний винахід додатково забезпечує набір, що включає наступні компоненти: (i) принаймні один праймер або набір праймерів, як описано в даній заявці; та (ii) принаймні один зонд, як описано в даній заявці. В одному втіленні набір включає один прямий праймер, один зворотний праймер та послідовність зонда, яка має цільову послідовність у межах ділянки, ампліфікованої прямим та зворотним праймерами. У цьому втіленні набір праймерів є здатним до ампліфікації частини (амплікона) послідовності MAGE-A3, а зонд є здатним до гібридизації при жорстких умовах з ампліконом.

Послідовності MAGE-A3 та MAGE-A6 є високо гомологічними, маючи 98% співпадання своїх нуклеотидних та 95% співпадання своїх білкових послідовностей. Для того, щоб специфічно ідентифікувати MAGE-A3 послідовності, є необхідним ідентифікувати праймери та зонди, здатні до диференціації між MAGE-A3 та MAGE-A6.

В одному втіленні даний винахід забезпечує набір праймерів та/або зондів, які специфічно гібридизуються із цільовою послідовністю MAGE-A3 при жорстких умовах, де принаймні одна цільова послідовність праймера або зонда відрізняється принаймні одним нуклеотидом у порівнянні з еквівалентною ділянкою усіх інших MAGE A нуклеотидних послідовностей, та де набори є здатними до розрізнення між MAGE-A3 та MAGE-A6.

В одному втіленні даний винахід забезпечує набір праймерів та/або зондів, які специфічно гібридизуються із цільовою послідовністю MAGE-A3 при жорстких умовах, де принаймні одна цільова

послідовність праймера або зонда відрізняється принаймні одним нуклеотидом у порівнянні з еквівалентною ділянкою MAGE A6 нуклеотидної послідовності, та де набори є здатними до розрізнення між MAGE-A3 та MAGE-A6.

В одному втіленні цільова послідовність принаймні одного праймера або зонда може відрізнятися одним нуклеотидом у цільовій послідовності MAGE-A3 у порівнянні з еквівалентною ділянкою MAGE-A6. У додатковому втіленні цільова послідовність принаймні одного праймера або зонда може відрізнятися двома нуклеотидами у порівнянні з еквівалентною ділянкою MAGE-A6.

В одному втіленні набір, що включає два праймери та один зонд, може мати наступні відмінності у цільових послідовностях праймерів та зонда:

(i) цільова послідовність одного з двох праймерів або зондів відрізняється одним нуклеотидом між MAGE-A3 та MAGE-A6;

(ii) цільова послідовність праймерів або зонда, не згаданого у частині (i), відрізняється одним нуклеотидом між MAGE-A3 та MAGE-A6; та

(iii) цільова послідовність праймера або зонда, що залишилися, є ідентичною з обома MAGE-A3 та MAGE-A6;

Наприклад, в одному втіленні набір, що включає праймер А, праймер В та зонд С, може включати наступні відмінності у цільових послідовностях:

(i) цільова послідовність праймера А відрізняється одним нуклеотидом між MAGE-A3 та MAGE-A6;

(ii) цільова послідовність праймера В відрізняється двома нуклеотидами між MAGE-A3 та MAGE-A6;

та

(iii) цільова послідовність зонда С є ідентичною обома MAGE-A3 та MAGE-A6.

Наприклад, в одному втіленні набір, що включає праймер А, праймер В та зонд С, може включати наступні відмінності у цільових послідовностях:

(i) цільова послідовність праймера А відрізняється двома нуклеотидами між MAGE-A3 та MAGE-A6;

(ii) цільова послідовність праймера В є ідентичною обома MAGE-A3 та MAGE-A6; та

(iii) цільова послідовність зонда С відрізняється одним нуклеотидом між MAGE-A3 та MAGE-A6;

Наприклад, в одному втіленні набір, що включає праймер А, праймер В та зонд С, може включати наступні відмінності у цільових послідовностях:

(i) цільова послідовність праймера А є ідентичною обома MAGE-A3 та MAGE-A6;

(ii) цільова послідовність праймера В відрізняється одним нуклеотидом між MAGE-A3 та MAGE-A6;

та

(iii) цільова послідовність зонда С відрізняється двома нуклеотидами між MAGE-A3 та MAGE-A6;

В одному втіленні набір може включати: пару праймерів послідовностей SEQ ID NO:3 та 4 або таких, що включають послідовності SEQ ID NO:3 та 4, та зонд послідовності SEQ ID NO:13 або такий, що включає послідовність SEQ ID NO:13; пару

праймерів послідовностей SEQ ID NO:5 та 6 або таких, що включають послідовності SEQ ID NO:5 та 6, та зонд послідовності SEQ ID NO:14 або такий, що включає послідовність SEQ ID NO:14; пару праймерів послідовностей SEQ ID NO:7 та 8 або таких, що включають послідовності SEQ ID NO:7 та 8, та зонд послідовності SEQ ID NO:15 або такий, що включає послідовність SEQ ID NO:15; пару праймерів послідовностей SEQ ID NO:9 та 10 або таких, що включають послідовності SEQ ID NO:9 та 10, та зонд послідовності SEQ ID NO:16 або такий, що включає послідовність SEQ ID NO:16; та/або пару праймерів послідовностей SEQ ID NO:11 та 12 або таких, що включають послідовності SEQ ID NO:11 та 12, та зонд послідовності SEQ ID NO:17 або такий, що включає послідовність SEQ ID NO:17.

У додатковому втіленні даного винаходу забезпечується спосіб визначення присутності або відсутності MAGE-A3 позитивної пухлинної тканини, що включає етап контактування нуклеотидної послідовності, одержаної з біологічного зразка, або такої, що походить від біологічного зразка, принаймні з одним праймером або принаймні з одним набором праймерів або зондом, як описано в даній заявці. Під MAGE-A3 позитивною пухлинною тканиною розуміють будь-які пухлини або пухлинні клітини, що експресують MAGE-A3 антиген, які були ізольовані від пацієнта. Спосіб, як описано в даній заявці, може використовуватися для визначення, чи включає біологічний зразок або чи складається біологічний зразок з MAGE-A3 позитивною пухлинною тканиною.

Під біологічним зразком розуміють зразок тканини або клітини, одержані від пухлини, яка була видалена або ізольована від пацієнта.

Додатково забезпечується спосіб діагностики пацієнта, що включає етап контактування нуклеотидної послідовності, одержаної з біологічного зразка, або такої, що походить від біологічного зразка, принаймні з одним праймером або принаймні з одним набором праймерів або зондом, як описано в даній заявці, та оцінку, чи експресується MAGE-A3 у зразку.

В одному втіленні нуклеотидна послідовність являє собою біологічний зразок або є такою, що була ізольована із біологічного зразка.

Термін «одержаний з або такий, що походить від», як використовується в даній заявці розуміється як такий, що використовується включно. Тобто він призначений для охоплення будь-якої нуклеотидної послідовності, що була безпосередньо ізольована із зразка пухлини, або будь-якої нуклеотидної послідовності, що походить від зразка, наприклад, при використанні зворотної транскрипції, для одержання мРНК або кДНК.

Спосіб згідно з даним винаходом може додатково включати ампліфікацію нуклеотидної послідовності та визначення у зразку ампліфікованої нуклеотидної послідовності. Альтернативно або додатково, спосіб згідно з даним винаходом може додатково включати контактування ізольованої або ампліфікованої нуклеотидної послідовності з одним або більше зондами, як описано в даній заявці.



В одному втіленні нуклеотидну послідовність ізолюють або очищують із зразка пухлини. При RT-ПЛР контамінація геномної ДНК може приводити до помилково позитивних результатів. В одному втіленні геномну ДНК видаляють або суттєво видаляють зі зразка, який піддається аналізу, або включають у способи згідно з даним винаходом.

Способи згідно з даним винаходом є прийнятними для визначення MAGE-A3 позитивної пухлинної тканини. В одному втіленні даного винаходу MAGE-A3 позитивна тканина може визначатися при використанні *in situ* гібридизації. Під *in situ* гібридизацією розуміють реакцію гібридизації, яку проводять при використанні праймера або зонда згідно з даним винаходом на інтактних хромосомах, клітинах або тканинах, ізольованих від пацієнта, для безпосередньої візуалізації морфологічних сайтів специфічної ДНК або РНК послідовності.

Гібридизації полінуклеотидів може проводитися при використанні будь-якого прийнятного способу гібридизації та системи виявлення. Приклади гібридизаційних систем включають традиційні дот-блот гібридизацію, Саузерн блоттинг-аналіз та сендвіч-метод. Наприклад, прийнятний спосіб може включати підхід зворотної гібридизації, де типоспецифічні зонди імобілізують на твердій підложці у відомих різних місцях (точках, лініях або інших фігурах), та ампліфіковані полінуклеїнові кислоти піддають мічення для того, щоб визначити утворення гібридів. Специфічні для MAGE-A3 послідовності нуклеїнові кислоти, наприклад, зонд або праймер, як описано в даній заявці, можуть піддаватися міченню за допомогою злиття біотинустрептавідину з нерадіоактивною системою, що розвиває забарвлення. Проте можуть також використовуватися системи зворотної гібридизації, наприклад, як проілюстровано у Gravitt та ін., (Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36(10): 3020-3027), зміст цього джерела є введеним у дану заявку як посилання. Стандартні умови гібридизації та промивання є описаними у Kleter та ін., Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(8): 2508-2517, та будуть піддаватися оптимізації при даних обставинах для підтримання специфічності та чутливості, що є необхідними для довжини та послідовності зонда(ів) та праймера(ів).

В одному втіленні спосіб згідно з даним винаходом може включати застосування:

- a) пари праймерів, що включають SEQ ID NO:3 та 4; та зонда, що включає SEQ ID NO:13;
- b) пари праймерів, що включають SEQ ID NO:3 та 4; та зонда, що включає SEQ ID NO:17
- c) пари праймерів, що включають SEQ ID NO:3 та 4; та зонда, що включає SEQ ID NO:53
- d) пари праймерів, що включають SEQ ID NO:3 та 4; та зонда, що включає SEQ ID NO:54
- e) пари праймерів, що включають SEQ ID NO:5 та 6, та зонда, що включає SEQ ID NO:14;
- f) пари праймерів, що включають SEQ ID NO:7 та 8, та зонда, що включає SEQ ID NO:15;
- g) пари праймерів, що включають SEQ ID NO:9 та 10, та зонда, що включає SEQ ID NO:16;
- h) пари праймерів, що включають SEQ ID NO:11 та 12, та зонда, що включає SEQ ID NO:17;

i) пари праймерів, що включають SEQ ID NO:11 та 12; та зонда, що включає SEQ ID NO:53; та/або

j) пари праймерів, що включають SEQ ID NO:11 та 12; та зонда, що включає SEQ ID NO:54

Способи, як описано в даній заявці, є прийнятними для застосування на свіжій тканині, замороженій тканині, тканині, що зберігається у парафіні, та/або тканині, що зберігається в етанолі. Добре відомі процедури екстракції та очистки є доступними від для ізоляції РНК або ДНК зі зразка (наприклад, є описаними у Sambrook та ін., 1989). РНК або ДНК може використовуватися безпосередньо після екстракції зі зразка або більш бажано після етапу ампліфікації полінуклеотиду (наприклад, ПЛР). У специфічних випадках, як наприклад, для аналізів зворотної гібридизації, може бути необхідним зворотно транскрибувати РНК у кДНК перед ампліфікацією. У двох останніх випадках полінуклеотид є таким, що «походить від зразка».

В одному втіленні, в якому зразок являє собою тканину, що зберігається у парафіні, можуть використовуватися наступні набори праймерів та зондів:

- a) пара праймерів, що включає SEQ ID NO:7 та 8, зонд, який включає SEQ ID NO:15;
- b) пара праймерів, що включає SEQ ID NO:9 та 10, та зонд, який включає SEQ ID NO:16;
- c) пара праймерів, що включає SEQ ID NO:11 та 12 та зонд, який включає SEQ ID NO:17;
- d) пара праймерів, що включає SEQ ID NO:11 та 12; та зонд, який включає SEQ ID NO:53; та/або
- e) пара праймерів, що включає SEQ ID NO:11 та 12; та зонд, який включає SEQ ID NO:54

Даний винахід додатково забезпечує спосіб лікування пацієнта, який включає: визначення, чи експресує пухлинна тканина пацієнта MAGE-A3 при використанні способу, як описано в даній заявці, та введення композиції, що включає MAGE-A3 антиген, епітоп або похідну антигену, або специфічне для MAGE-A3 антитіло, або імуноглобулін, вказаному пацієнтові. Пацієнт може мати пухлинну тканину, що експресує MAGE-A3 (активний набір захворювання), або може бути чутливим до рецидивів пухлини, що експресує MAGE-A3, де пацієнт піддавався видаленню/лікуванню пухлинної тканини, що експресує MAGE-A3 (допоміжний набір).

Даний винахід додатково забезпечує застосування композиції, що включає MAGE-A3 антиген, епітоп або похідну антигену, або специфічне для MAGE-A3 антитіло, або імуноглобулін у виробництві лікарського засобу для лікування пацієнта, що страждає від пухлини, яка експресує MAGE-A3, або є чутливим до рецидивів пухлини, що експресує MAGE-A3, де пацієнт є ідентифікований як такий, що має, або такий, що мав пухлинну тканину, яка експресує MAGE-A3, при використанні діагностичного способу, набору, праймера або зонда, як описано в даній заявці.

Композиція, що включає MAGE-A3 антиген, епітоп або похідну антигену, може включати MAGE-A3 антиген або його пептид. В одному втіленні MAGE-A3 антиген або його пептид включає пептид або складається з пептиду EVDPIGHLY. MAGE-A3 антиген або пептид може бути злитим

або кон'югованим з білком носія, який може бути вибраним з білка D, NS1 або CLyA або їх фрагментів.

В одному втіленні композиція може додатково включати ад'ювант; наприклад, ад'ювант, що включає один або більше, або наступних: 3D-MPL; солі алюмінію; олігонуклеотиди, що містять CpG; сапонінвмісні ад'юванти, такі, як QS21 або ISCOM; емульсії масло-у-воді та ліпосоми.

Таким чином, даний винахід забезпечує клінічне застосування способу скринінгу зразків тканини від пацієнтів, що являють собою людей, на присутність або відсутність експресії MAGE-A3. Такі зразки можуть складатися, наприклад, з вмісту пункційної біопсії, зразків хірургічної резекції або тканини лімфатичних вузлів. Наприклад, ці способи включають одержання зразка біопсії, який не обов'язково піддають фракціонуванню шляхом криптостатичного виготовлення зрізів для збагачення пухлинних клітин до 80% загальної популяції клітин. У деяких втіленнях нуклеїнові кислоти можна екстрагувати з цих зразків при використанні методик, що є добре відомими в галузі техніки. В інших втіленнях нуклеїнові кислоти, екстраговані зі зразка тканини, можуть бути ампліфіковані при використанні методик, добре відомих в області техніки. Рівень MAGE-A3 експресії може бути визначений та може порівнюватися із статистично прийнятними групами та/або контролюми пацієнтів, негативних стосовно MAGE-A3.

В одному втіленні діагностичний спосіб включає визначення, чи експресує суб'єкт MAGE-A3 генний продукт, наприклад, шляхом визначення відповідного рівня мРНК та/або рівня білка продукту гена. Наприклад, при використанні таких методик, як Нозерн блотінг-аналіз, полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскриптазою (RT-ПЛР), напівкількісна RT-ПЛР, кількісна RT-ПЛР, TaqMan ПЛР, in situ гібридизація, імунопреципітація, Вестерн блоттінг-аналіз або імуногістохімія. Згідно з цим способом клітини або тканина можуть бути одерждані від суб'єкта, після чого рівень мРНК та/або білка порівнюють з такими для тканини, що не експресує MAGE-A3.

TagMan ПЛР методика

Taq ДНК полімераза володіє 5'-3' екзонуклеазною активністю. Taqman ПЛР аналіз використовує цю екзонуклеазну активність для розщеплення подвійно мічених зондів сполучених з комплементарними цільовими послідовностями під час ПЛР ампліфікації.

Коротко, РНК екстрагують зі зразка та синтезують кДНК (зворотна транскрипція). кДНК потім додають до ПЛР реакційної суміші, що містить стандартні ПЛР компоненти (див, наприклад, компоненти, що постачаються Roche (CA, USA) для Taqman ПЛР. Реакційна суміш додатково містить зонд, що сполучається з матрицею нуклеотидної послідовності між двома праймерами (тобто у межах послідовності, ампліфікованої шляхом ПЛР, «амплікона»). Зонд включає флуоресцентний репортерний барвник на 5'-кінці та барвник для гасіння на 3'-кінці. Барвник для гасіння є здатним гасити репортерну флуоресценцію, але тільки в тому випадку, коли два барвники знаходяться бли-

зько один до одного: це відбувається у випадку інтактних зондів.

Під час та після ампліфікації зонд розкладається за допомогою Taq ДНК полімерази, при цьому визначають флуоресценцію.

Для кількісних вимірювань використовується кількість циклів ПЛР, при яких досягається порогове значення на рівні 10-кратного стандартного відхилення від емісії базової лінії Ця кількість циклів, що називається порогом циклу (Ct), є обернено пропорційною початковій кількості цільової кДНК та дозволяє вимірювати кількість кДНК. По суті, чим більше цільової РНК є присутньою у зразку, тим нижче значення Ct, що одержують.

Вимірювання, одержані для значення Ct, порівнюють з такими для конститутивного гена. Це враховує будь-які помилки на основі кількості загальної РНК, що додається до кожної реакції зворотної транскрипції (на основі поглинання певної довжини хвилі), та її якості (тобто, наявності деградації): жоден з цих параметрів не є надійним для вимірювання кількості вихідного матеріалу. Таким чином, транскрипти конститутивного гена піддаються кількісному аналізу як ендogenous контроль. Бета-актин є одним з найбільш використовуваних неспецифічних конститутивних генів, незважаючи на те, що інші також можуть використовуватися.

Ще в одному додатковому втіленні винаходу забезпечується спосіб лікування пацієнта, що страждає від пухлини, яка експресує MAGE-A3, при цьому спосіб включає визначення при застосуванні способу даного винаходу, чи експресує пацієнт MAGE-A3 білок, та подальше введення композиції, що включає MAGE-A3 антиген, антиген, епітоп або похідну антигену, або специфічне для MAGE-A3 антитіло, або імуноглобулін, для запобігання або полегшення рецидивів захворювання. Пацієнт може спочатку одержувати лікування таке, як резекція хірургічним шляхом будь-якої пухлини, або інше лікування за допомогою хіміотерапії або променевої терапії.

Таким чином, винахід додатково забезпечує застосування MAGE-специфічної імунотерапії у виробництві лікарського засобу для лікування пацієнтів, що страждають від пухлини, яка експресує MAGE-A3, або пацієнтів, які вже одержували лікування (хірургічне лікування, хіміотерапію, радіотерапію) для видалення або лікування пухлини, що експресує MAGE-A3, при цьому вказаний пацієнт був визначений як такий, що має пухлинну тканину, що експресує MAGE-A3, при використанні діагностичного способу, набору, праймера або зонда згідно з даним способом.

Таким чином, цей винахід може використовуватися для пацієнтів, що мають форми раку, при яких експресується MAGE-A3, такі, як: меланома; рак молочної залози; рак жовчного або сечового міхура, включаючи карциному перехідних клітин; рак легень, включаючи недрібноклітинну карциному легень (NSCLC); рак голови та шиї, включаючи карциному стравоходу; карциному лускатих клітин; рак печінки; множинну мієлому та карциному кишечнику. В одному втіленні винахід може використовуватися у лікуванні пацієнтів у допоміжному (післяопераційному) режимі при таких формах

раку, зокрема, при раку легень та меланомі. Винахід також знаходить застосування у лікуванні метастатичних форм раку.

#### Імунотерапія

Композиції згідно з даним винаходом, прийняті для застосування у способах для лікування пацієнтів, є такими, що є здатними підвищувати специфічну для MAGE-A3 імунну відповідь. Композиція буде містити принаймні один епітоп з продукту MAGE-A3 гена. Такий епітоп може бути присутнім як пептидний антиген, що є необов'язково ковалентно зв'язаним з носієм. Альтернативно, можуть використовуватися більші білкові фрагменти. Проте фрагменти та пептиди для застосування, коли є прийнятним чином презентовані, повинні бути здатними підвищувати імунну відповідь проти MAGE-A3, наприклад, специфічну для MAGE-A3 імунну відповідь.

Приклади пептидів, що можуть використовуватися у даному винаході, включають наступні MAGE-A3 пептиди:

SEQ ID NO	Пептидна послідовність
SEQ ID NO:23	FLWGPRALV
SEQ ID NO:24	MEVDPIGHLV
SEQ ID NO:25	VHFLLLKYRA
SEQ ID NO:26	LVHFLLLKYR
SEQ ID NO:27	LKYRAREPVT
SEQ ID NO:28	ACYEFLWGPRALVETS
SEQ ID NO:29	TQHVFQENYLEY

В одному втіленні антиген може включати MAGE пептид або білок, зв'язаний з імунологічним злитим білком-партнером, який сприяє експресії. MAGE білок може бути таким повної довжини MAGE-A3 або може включати фрагмент MAGE3, наприклад, амінокислоти 3-314 MAGE3 (загалом 312 амінокислот).

Антиген та партнер можуть бути хімічно кон'юговані або можуть експресуватися як рекомбінантний злитий білок. У втіленні, в якому антиген та партнер експресуються як рекомбінантний злитий білок, це може дозволити підвищити рівні білка, що продукується в експресійній системі, порівняно з незлитим білком. Так, партнер злиття може допомагати у забезпеченні Т-хелперних епітопів (імунологічний партнер злиття), бажано, Т-хелперних епітопів, які впізнаються імунною системою людини, та/або допомагати з експресії білка (енхансер експресії) з більш високим виходом, ніж у випадку нативного рекомбінантного білка. В одному втіленні партнер злиття може являти собою як імунологічний партнер злиття, так і партнер, що підвищує експресію.

В одному втіленні винаходу імунологічний партнер злиття, що може використовуватися, є таким, що походить від білка D, поверхневого білка грам-негативної бактерії *Haemophilus influenza* B (WO91/18926) або його похідною. Похідна білка D може включати першу 1/3 білка або приблизно першу 1/3 білка. В одному втіленні перші 109 залишків білка D можуть використовуватися як партнер злиття для забезпечення MAGE-A3 антигену з додатковими Т-клітинними епітопами та підвищувати рівень експресії в *E. coli* (діючи, таким чином, як енхансер експресії). В альтернативному втіленні

похідна білка D може включати перші N-термінальні 100-110 амінокислот або приблизно перші N-термінальні 100-110 амінокислот. В одному втіленні білок D або його похідна можуть бути ліпідовані, та може використовуватися ліпопротеїн D: ліпідний хвіст може забезпечувати оптимальну презентацію антигену для клітин, що презентують антиген.

В одному втіленні MAGE-A3 може являти собою білок D-MAGE-A3/His, білок злиття, який містить 432 амінокислотні залишки. Цей злитий білок включає амінокислоти 1-109 білка D, ліпопротеїну, що присутнім на поверхні грам-негативної бактерії *Haemophilus Influenzae* B, 312 амінокислот з MAGE-A3 білка (амінокислоти 3-314), спейсер та полігістидиновий хвіст (His), що може поліпшувати очистку злитого білка під час продукційного процесу, наприклад:

i) сигнальну послідовність, що складається з 18 залишків, та перші 109 залишків процесованого білка D, сигнальна послідовність відщеплюється від злитого білка під час продукції, залишаючи 109 залишків;

ii) два неспоріднені залишки (метіонін та аспарагінова кислота);

iii) залишки 3-314 нативного MAGE-3 білка;

iv) два гліцинові залишки, що функціонують як шарнірна ділянка;

v) сім гістидинових залишків.

В альтернативному втіленні описана вище конструкція за винятком (i) може замінюватися на послідовність, що включає перші N-термінальні 100-110 амінокислот або приблизно перші N-термінальні 100-110 амінокислот білка D.

MAGE-3 може експресуватися як білок, злитий на N-термінальному кінці з білком D, та злитий на C-термінальному кінці з послідовністю семи гістидинових залишків (гістидиновий хвіст). Білок D являє собою D-зв'язуючий імуноглобулін білок вагою 42 кДа, що розміщується на поверхні грам-негативної бактерії *Haemophilus Influenzae* B.

В іншому втіленні імунологічний партнер злиття білка D може замінюватися білком, відомим як LytA. LytA походить від *Streptococcus pneumoniae*, що синтезує N-ацетил-L-аланін амідазу, амідазу LytA, (кодується геном LytA (Gene, 43 (1986) стор. 265-272)), аутолизин, що специфічно розкладає деякі зв'язки у пептидоглікановому скелеті. C-термінальний домен LytA білка відповідає за афінність до холіну або деяких аналогів холіну, таких, як DEAE. Ця властивість була використана для розробки експресуючих C-LytA плазмід *E. coli*, корисних для експресії злитих білків. Очистка гібридних білків, що містять C-LytA фрагмент на своєму амінотермінальному кінці, була описана (Biotechnology: 10, (1992) стор. 795-798). В одному втіленні може використовуватися C-термінальна частина молекули. Втілення може використовувати повторювану частину молекули LytA, що виявлена на C-термінальному кінці, починаючи від залишка 178. В одному втіленні LytA частина може включати залишки 188-305.

В одному втіленні даного винаходу MAGE-A3 білок може включати дериватизований вільний тіол. Такі антигени були описані в WO 99/40188.

Зокрема, можуть використовуватися карбоксиамідовані або карбоксиметиловані похідні.

В одному втіленні даного винаходу асоційований з пухлиною антиген включає молекулу MAGE-A3-білка D. Нуклеотидна та амінокислотна послідовності для цієї молекули є представленими на Фігурі 9 (SEQ ID NO:35 та SEQ ID NO:36). Цей антиген та ті, що підсумовані нижче, є описаними більш детально у WO 99/40188.

У додаткових втіленнях даного винаходу асоційований з пухлиною антиген може включати будь-які з наступних злитих білків:

Злитий білок NS1-MAGE3 та гістидиновий хвіст, наприклад, як показано на Фігурах 10 та 11 (SEQ ID NO:37 та SEQ ID NO:38); злитий білок CLYTA-MAGE3-гістидин, наприклад, як показано на Фігурах 12 та 13 (SEQ ID NO:39 та SEQ ID NO:40).

Додаткове втілення згідно з даним винаходом включає застосування імунотерапевтичного агента на основі нуклеїнової кислоти, що включає молекули нуклеїнової кислоти, які кодують специфічний MAGE-A3 антиген, асоційований з пухлиною, як описано в даній заявці. В одному втіленні даного винаходу послідовності можуть бути вбудовані у прийнятний експресійний вектор та використовуються для ДНК/РНК вакцинації. Мікробні вектори, що експресують нуклеїнові кислоти, можуть також використовуватися як імунотерапевтичні агенти, що доставляють за допомогою вектора.

Приклади прийнятних вірусних векторів включають ретровірусні, лентівірусні, аденовірусні вектори, асоційовані з аденовірусом вектори, вектори на основі вірусу герпесу, включаючи такі на основі вірусу простого герпесу, вектори на основі альфа-вірусу, вірусу віспи, такі, як, Сапагурох, та системи на основі вірусу вакцини. Методики генного переносу при використанні цих вірусів є відомим спеціалістові в даній області техніки. Ретровірусні вектори, наприклад, можуть використовуватися для стабільної інтеграції полінуклеотиду винаходу у хазяїнський геном, проте така рекомбінація не є бажаною. Дефектні за реплікацією аденовірусні вектори, на противагу до цього, залишаються епісомальними, та таким чином, дозволяють здійснювати транзйентну експресію. Вектори, здатні направляти експресію в клітинах комах (наприклад, бакуловірусні вектори), у клітинах людини, дріжджів або у бактеріях можуть використовуватися для одержання значних кількостей MAGE-A3 білка, який кодується полінуклеотидами даного винаходу, наприклад, для застосування у вигляді субодиничних вакцин або в імуноаналізах.

У бажаних втіленнях аденовірус, що використовується як живий вектор, є дефектним мавпячим аденовірусом. Типово, такі вектори містять EI делецію та можуть вирощуватися на лініях клітин, що є трансформованими EI геном. Бажані мавпячі аденовіруси являють собою віруси, ізольовані від шимпанзе. Зокрема, C68 (що також є відомим як Рап 9) (див. патент США № 6083 716) та Рап 5, 6 та Рап 7 (WO 03/046124) є бажаними для застосування у даному винаході. Таким чином, ці вектори можуть використовуватися для вбудовування гетерологічного гену даного винаходу, завдяки чому генний продукт може бути експресований. Засто-

сування композиція та виробництво таких рекомбінантних аденовірусних векторів детально представлено у WO 03/046142.

Традиційні рекомбінантні методики для одержання послідовності нуклеїнової кислоти та одержання експресійних векторів є описаними у Maniatis та ін., Molecular Cloning - A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor, 1982-1989.

Для імунотерапевтичних агентів на основі білків білки згідно з даним винаходом забезпечуються або розчинними у рідкій формі, або у ліофілізованій формі.

Кожна доза для людини може включати 1 - 1000 мкг білка. В одному втіленні доза може включати 30 - 300 мкг білка.

Імунотерапевтичний агент, як описано в даній заявці, може додатково включати вакцинний ад'ювант та/або імуностимуляторний цитокін або хемокін.

Прийнятні вакцинні ад'юванти для застосування у даному винаході, є комерційно доступними, такими, як наприклад, неповний та повний ад'ювант Фрейнда (Difco Laboratories, Detroit, MI); ад'ювант 65 Merck (Merck та Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA); солі алюмінію, такі, як гель гідроксиду алюмінію (алюм) або фосфат алюмінію; солі кальцію, заліза або цинку; нерозчинна суспензія ацилованого тирозину; ациловані цукри; катіонно та аніонно дериватизовані полісахариди; поліфосфазени; мікросфери, здатні до біорозкладання; монофосфорил ліпід А та QUIL A. Цитокіни, такі, як GM-CSF або інтерлейкін-2, -7, або -12, та хемокіни можуть також використовуватися як ад'юванти.

У композиціях винаходу може бути бажаним, щоб ад'ювантна композиція індуквала імунну відповідь переважно Th1-типу. Високі рівні цитокінів Th1-типу (наприклад, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 та IL-12) мають тенденцію до сприяння індукції опосередкованих клітинами імунних відповідей на введений антиген. Згідно з одним втіленням, в якому відповідь переважно є такою Th1-типу, рівень цитокінів Th1-типу буде підвищуватися більш в значній мірі, ніж рівень цитокінів Th2-типу. Рівень цих цитокінів може бути легко оцінений при використанні стандартних аналізів. Для огляду родин цитокінів див. Mosmann та Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7:145-173, 1989.

Згідно з цим прийнятні ад'юванти, що можуть використовуватися для індукції відповіді переважно Th1-типу, включають, наприклад, комбінацію монофосфосерил ліпиду А, такого, як 3-де-О-ацилований монофосфосерил ліпід А (3D-MPL) разом із сіллю алюмінію. 3D-MPL або інші ліганди толоподібного рецептора 4 (TLR4), такі, як аміноалкіл глюкозамінід фосфати, як розкрито у WO 9850399, WO 0134617 та WO 03065806, можуть також використовуватися окремо для генерації відповіді Th1-типу.

Інші відомі ад'юванти, які можуть переважно індукувати імунну відповідь Th1-типу, включають TLR9 антагоністи, такі, як неметиловані олігонуклеотиди, що містять CpG Олігонуклеотиди характеризуються тим, що CpG динуклеотид є немети-

лованим. Такі олігонуклеотиди є добре відомим та є описаними, наприклад, у WO 96/02555.

Прийнятні олігонуклеотиди включають:

SEQ ID NO:30	TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT	CpG 1826
SEQ ID NO:31	TCT CCC AGC GTG CGC CAT	CpG 1758
SEQ ID NO:32	ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG	
SEQ ID NO:33	TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT	CpG 2006, CpG 7909
SEQ ID NO:34	TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT	CpG 1668

СрG-вмісні олігонуклеотиди можуть також використовуватися окремо або у комбінації з іншими ад'ювантами. Наприклад, поліпшена система включає комбінацію СрG-вмісного олігонуклеотиду та похідної сапоніну, зокрема, комбінацію СрG та QS21, як розкрито у WO 00/09159 та WO 00/62800.

Композиція може додатково включати емульсію масло-у-воді та/або токоферол.

Інший прийнятний ад'ювант являє собою сапонін, наприклад, QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), що може використовуватися окремо або у комбінації з іншими ад'ювантами. Наприклад, поліпшена система втягує комбінацію монофосфосерил ліпиду А та похідної сапоніну, як наприклад, комбінація QS21 та 3D-MPL, як описано у WO 94/00153, або менш реактогенну композицію, в якій QS21 гаситься холестеринном, як описано у WO 96/33739. Інші прийнятні композиції включають емульсію масло-у-воді та токоферол. Особливо потужна ад'ювантна композиція, що включає QS21, 3D-MPL та токоферол в емульсії масло-у-воді, є описаною у WO 95/17210.

В іншому втіленні ад'юванти можуть бути рецептовані у ліпосомній композиції. Використовувана кількість 3D-MPL в загальному випадку є невеликою, проте в залежності від імунотерапевтичної композиції може знаходитися в інтервалі в 1-1000 мкг на дозу, бажано 1-500 мкг на дозу, та більш бажано від 1 до 100 мкг на дозу.

В одному втіленні ад'ювантна система включає три імуностимулятори: СрG олігонуклеотид, 3D-MPL та QS21, представлені або в ліпосомній композиції, в емульсії масло-у-воді, як описано у WO 95/17210.

Кількість СрG або імуностимуляторних олігонуклеотидів в ад'ювантах або імунотерапевтичних агентах згідно з даним винаходом в загальному випадку є невеликою, проте в залежності від імунотерапевтичної композиції може знаходитися в інтервалі 1-1000 мкг на дозу, бажано 1-500 мкг на дозу, та більш бажано від 1 до 100 мкг на дозу.

Кількість сапоніну для застосування в ад'ювантах згідно з даним винаходом може знаходитися в інтервалі -1000 мкг на дозу, бажано 1-500 мкг на дозу, та більш бажано 1-250 мкг на дозу та найбільш бажано від 1 до 100 мкг на дозу.

В загальному випадку кожна доза для людини може включати 0,1-1000 мкг антигену, наприклад, 0,1-500 мкг, 0,1-100 мкг, або від 0,1 до 50 мкг. Оптимальна кількість для конкретного імунотерапевтичного засобу може бути встановлена за допомогою стандартних досліджень, що втягують спостереження за оптимальними імунними відповідями у вакцинованих суб'єктах. Після початкової вакцинації, суб'єкти можуть одержувати одну або декілька бустерних імунізацій, розділених адекватним чином.

інші прийнятні ад'юванти включають Montanide ISA 720 (Seppic, France), SAF (Chiron, California, United States), ISCOM (CSL), MF-59 (Chiron), Ribi Detox, RC-529 (GSK, Hamilton, MT) та інші аміноа-клілглюкозамініди 4-фосфати (AGP).

Згідно з цим забезпечується імуногенна композиція для застосування у способі згідно з даним винаходом, що включає антиген, як розкрито в даній заявці, та ад'ювант, де ад'ювант включає один або більше з 3D-MPL, QS21, СрG олігонуклеотиду, поліетиленового етеру або естеру, або комбінацію двох або більше цих ад'ювантів. Антиген в імуногенній композиції може бути представлений в носії на основі емульсії масло-у-воді або вода-у-маслі, або у ліпосомній композиції.

В одному втіленні ад'ювант може включати один або більше з 3D-MPL, QS21 та імуностимуляторного СрG олігонуклеотиду. В одному втіленні є присутніми усі три імуностимулятори. В іншому втіленні 3D-MPL та QS21 в емульсії масло-у-воді при відсутності СрG олігонуклеотиду.

Композиція для застосування у способі згідно з даним винаходом може включати фармацевтичну композицію, що містить асоційований з пухлинною антиген, як описано в даній заявці, або злитий білок, у фармацевтично прийнятному наповнювачі.

У цьому описі та пунктах формули, що йдуть далі, якщо контекст не вимагає іншого, слово «включають» та його варіації, такі, як «включає» та «такий, що включає» будуть передбачати включення вказаного цілого або етапу, або групи вказаних цілих або етапів, але не виключення будь-якого іншого цілого або етапу, або групи цілих або етапів.

Винахід далі буде описаний з посиланням на наступні, необмежуючі приклади, в яких RT-ПЛР відноситься до полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскриптазою:

#### ПРИКЛАДИ

##### Приклад 1

Напівкількісна ПЛР - Заморожені зразки тканини

Праймери: SEQ ID NO:1 та SEQ ID NO:2

Екстракція РНК: спосіб очистки РНК при використанні рідкого азоту

Невеликі шматочки тканини піддавали різкому заморожуванню у рідкому азоті, а потім поміщали у ступку для механічного подрібнення товкачем. 100 мг одержаного порошку додавали до 100 мкл TriPure реагенту для ізоляції, та РНК екстрагували згідно з інструкціями виробника (Qiagen, Venlo, Netherlands). Концентрацію РНК визначали із значення оптичної густини при 260 нм.

Напівкількісна MAGE-A3 RT-ПЛР

Напівкількісну RT-ПЛР проводили так, як описано De Plaen та ін. (Immunogenetics 40:360, 1994).

Синтез кДНК з 2 мкг загальної РНК проводили в 20 мкл суміші, що містить 1 × буфер для першого ланцюга, 0,5 мМ кожного dNTP, 10 мМ дитіотреїтолу, 20 од. інгібітора рРНКаз, 2 мМ оліго (dT) 15 та 200 од. M-MLV зворотної транскриптази, протягом 1 години 30 хвилин при 42°C. 50 нг кДНК ампліфікували за допомогою ПЛР в 25 мкл суміші, що містить праймери, специфічні для MAGE-A3 (SEQ ID NO 1 та 2). 10 мкл аліквоти кожної реакційної суміші розганяли при використанні електрофорезу на агарозному 1% гелі та візуалізували за допомогою флуоресценції броміду етидію. Розміри ампліконів складали 725 п.о. та 805 п.о., коли мРНК та геному ДНК (гДНК) піддавали ампліфікації, відповідно.

Позитивні контролю для напівкількісної MAGE-A3 RT-ПЛР:

У ці експерименти вводили три позитивні контролю:

(i) Клонований фрагмент MAGE-A3 геномної ДНК додавали до кожної ПЛР реакційної суміші. Це забезпечувало фрагмент розміром 805 п.о. (на 80 п.о. більше, ніж фрагмент, одержаний з кДНК), який завжди представлений при відсутності ПЛР інгібування. Він діяв як позитивний контроль для перевірки ефективності ПЛР в MAGE-A3 негативних зразках;

(ii) Для кожного MAGE-A3 аналізу синтез кДНК проводили паралельно на пухлинних зразках та на РНК, екстрагованій з клітинної лінії «Gerl» меланоми MZ-2-3.0. Для того, щоб вважатися позитивним зразки повинні давати сигнал при 1% кДНК рівня Gerl клітинної лінії MZ-2-3.0.

(iii) ПЛР бета-актину (Таблиця 1) проводили на кожному зразку для того, щоб визначити зразки із сильно деградованою РНК. Якщо сигнал бета-актину, що генерувався від MAGE-A3 негативного пухлинного зразка, був слабше за сигнал, генерований від MZ-2-3.0, то кількість циклів доводили до клітинного зразка так, щоб інтенсивність бета-актинового амплікона досягала необхідного рівня.

Негативні контролю для напівкількісної MAGE-A3 RT-ПЛР:

У ці експерименти вводили три негативні контролю:

(i) РНК, екстрагована з культури клітин LB 23-1/2, що є відомою як негативна на MAGE-A3;

(ii) водний контроль у RT-реакції та

(iii) водний контроль у ПЛР етапах.

Інтерпретація даних

Зразок 50 нг мРНК з пухлинного зразка вважається MAGE-A3 позитивним, коли кількість 725 п.о. амплікона була рівною або більшою, ніж кількість амплікона, одержаного при використанні 0,5 нг РНК із РНК, одержаної з Gerl клітинної лінії MZ-2-3.0 (тобто еквівалентна 0,1% Gerl РНК; див. позитивні контролю). Кількості оцінювали за допомогою флуоресценції з використанням броміду етидію. Додавали позитивні та негативні контролю.

Класи для напівкількісної MAGE-A3 RT-ПЛР: п'ять стандартних класів (De Plaen та ін., 1994) задавали для напівкількісного MAGE-A3 RT-ПЛР аналізу. Такі являли собою суб'єктивні вимірювання та були від найнижчого до найвищого ступеня експресії -, +/-, +, ++, +++. Приклад, як ці класи можуть бути визначені, представлений на фігурі

16: на цій фігурі класи визначаються згідно зі смугою, що притаманна позитивному контролю, як показано у Таблиці 6, що наведена нижче.

Таблиця 6

РНК позитивний контроль						
	100	50	10	2	1	0,5
Клас	+++	++		+	+/-	

Приклад 2: Кількісна RT-ПЛР Taqman у реальному часі - Заморожені зразки тканини

Кількісна RT-ПЛР Taqman у реальному часі:

Приймери: SEQ ID NO:3 та SEQ ID NO:4; Зонд: SEQ ID NO:13 (екзон)

Приймери: SEQ ID NO:5 та SEQ ID NO:6; Зонд: SEQ ID NO:14 (інтрон)

Напівкількісна ПЛР (для порівняльного дослідження):

Приймери: SEQ ID NO:1 та SEQ ID NO:2

Матеріали та способи

Пацієнти та збір зразків

Біопсії, одержані із пухлин стадії IB та II недрібноклітинної карциноми легень (NSCLC), одержували хірургічно. Пацієнтів заносили до списку на два клінічні дослідження, GSK 249553/004 (MAGE3-AS02B-004) та Epidemio-MAGE3-153; пацієнти підписували згоду та їм пояснювали природу та можливі наслідки досліджень. Зразки біопсії поміщали у розчин для стабілізації РНК (РНК-later, Ambion, Cambridge, UK) безпосередньо після хірургічної резекції та зберігали при -20°C.

РНК-later являє собою реагент для зберігання РНК, що стабілізує та захищає клітинну РНК в інтактних, незаморожених зразках тканини. РНК-later виключає необхідність негайного заморожування зразків у рідкому азоті.

Екстракція РНК: Спосіб очистки РНК при використанні змішувача та подрібнювача

Пухлинну тканину видаляли з РНК-later та додавали до реагенту для ізоляції TriPure (Roche, Vilvoorde, Belgium). Тканину потім переносили до подрібнювача з мішалкою, що містить вольфрамові кульки. Після подрібнення у подрібнювачі з мішалкою загальну клітинну РНК екстрагували максимально з 100 мг тканини при використанні реагенту TriPure згідно з інструкціями виробника (Qiagen, Venlo, Netherlands). Концентрацію РНК визначали із значення оптичної густини при 260 нм.

RT-ПЛР аналіз MAGE-A3 TaqMan - заморожене на тканина.

кДНК, що відповідає 50 нг загальної РНК, ампліфікували за допомогою ПЛР у 25 мкл суміші, що містить TaqMan буфер, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,4 мМ dUTP, 0,2 мМ кожного нуклеотиду, 0,625 од. Ampli Taq Gold ДНК полімерази, 0,05 од. UNG, 0,2 мМ кожного олігонуклеотидного праймера та 0,2 мМ TaqMan зонда. Використовували специфічні олігонуклеотидні праймери та зонди (Таблиця 2; SEQ ID 3, 4 та 13 та SEQ ID 5, 6 та 14. Зонди мітили барвниками FAM<sup>™</sup>, NED<sup>™</sup> та VIC<sup>™</sup> (Applied Biosystems, CA, USA), вони містили залишок маленької зв'язувальної бороздки (MGB<sup>™</sup>; також від Applied Biosystems, CA, USA). Додаткові експери-

менти проводили при використанні барвника FAM замість NED для специфічних для MAGE зондів.

Екзон MAGE-A3 та гени бета-актину піддавали ампліфікації за допомогою кількісної ПЛР при використанні TaqMan хімії на системі 7700 або 7900 (PE Applied Biosystems, Warrington, UK). ПЛР ампліфікацію також проводили в інtronі MAGE-A3 гена для перевірки відсутності контамінації геномною ДНК. Профіль ампліфікації являв собою 1 цикл 2 хвилини при 50°C, 1 цикл 12 хвилин при 95°C, 35 циклів 15 секунд при 95°C та 1 хвилина при 60°C. Сигнал флуоресценції, генерований розкладанням TaqMan зонду, визначали у реальному часі під час усіх етапів елонгації.

Підтвердження RT-ПЛР аналізу TaqMan для визначення специфічності для MAGE-A3

Праймери: SEQ ID NO:3 та SEQ ID NO:4; Зонд: SEQ ID NO:13 (екзон) - Taqman RT-ПЛР

Праймери: SEQ ID NO:1 та SEQ ID NO:2 (напівкількісна ПЛР - для порівняльних досліджень)

Плазмиди та клітинні лінії

Використовувані плазмиди містили кДНК повної довжини генів MAGE-A1 (MAGE-1; Genbank депозитний номер NM 0049881 MAGE-A2 (MAGE-2; Genbank депозитний номер L1 89201 MAGE-A3 (MAGE-A3; Genbank депозитний номер NM 005362), MAGE-A4 (MAGE-4; Genbank депозитний номер 002362), MAGE-A6 (MAGE-6; Genbank депозитний номер NM 005363), MAGE-A8 (MAGE-8; Genbank депозитний номер NM 005364), MAGE-A9 (MAGE-9; Genbank депозитний номер NM 005365), MAGE-A10 (MAGE-10; Genbank депозитний номер NM 021048), MAGE-A11 (MAGE-11; Genbank депозитний номер NM 005366) та MAGE-A12 (MAGE-12; Genbank депозитний номер NM 005367). Клітинні лінії MZ-2-3.0 (MAGE-A3 позитивна) та LB 23-1/2 (MAGE-A3 негативна) були люб'язно надані професором Thierry Boon, Ludwig institute, Brussels, Belgium.

Специфічність MAGE-A3 TaqMan способу аналізували при використанні  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ , та  $1 \times 10^6$  копій плазмід, що містять кДНК повної довжини генів MAGE-A1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11 та 12.

Послідовність порівняння MAGE A генів (MAGE 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11 та 12) в області сконструйованих MAGE-A3 ПЛР праймерів та зондів показана на Фігурі 14. Послідовності прямого та зворотного MAGE-A3 праймерів є підкресленими; послідовність MAGE-A3 зонда узятая у рамку. Зворотні праймери є комплементарними ділянці послідовності, яку вони впізнають, тобто A - T; G - C; T - A та C - G.

MAGE-A3 TaqMan RT-ПЛР Позитивні контролю: (i) фрагмент MAGE-A3 геномної ДНК та (ii) відомі кількості РНК, екстрагованої з Gerl клітинної лінії MZ-2-3.0 (клітинна лінія меланоми, позитивна стосовно MAGE-A3).

MAGE-A3 TaqMan RT-ПЛР Негативні контролю: (i) РНК, екстрагована з культури клітин LB 23-1/2, відома як така, що є негативною стосовно MAGE-A3, (ii) водний контроль у реакції RT, та (iii) водний контроль на етапах ПЛР. Проводили 40 циклів RT-ПЛР. Негативний контроль повинен бути  $\geq 35$ . Деякі з результатів TaqMan експериментів були представлені як 1/Ct.

Статистика: Порівняння двох ПЛР методик

Створювали таблицю  $2 \times 2$  випадкових результатів, одержаних за допомогою напівкількісної RT-ПЛР (праймери послідовностей SEQ ID NO:1 та SEQ ID NO:2) та Taqman ПЛР у реальному часі (праймери послідовностей: SEQ ID NO:3 та SEQ ID NO:4; зонд: SEQ ID NO:13), при використанні методик, описаних в даній заявці (Таблиця 3). Номінальна шкала змінних містила два значення: позитивне та негативне. Негативні значення включали 0 та суперечливі дані; під суперечливими даними розуміють дані у межах від 0,8% до 1,2% Gerl з напівкількісного RT-ПЛР, та усі результати нижчі 1% з TaqMan аналізу. Позитивні значення піддавали класифікації на основі очевидного підрахунку гелевих смуг стосовно експресії бета-актину для напівкількісного RT-ПЛР способу та включали усі результати  $\geq 1\%$  з TaqMan аналізу. Відповідність між обома способами підраховували як кількість подвійних негативних зразків плюс кількість подвійних позитивних зразків, поділену на загальну кількість зразків. McNemar аналіз використовували для порівняння співвідношень невідповідних пар (негативні-позитивні). Підраховували довірчі інтервали (CI).

Оптимізація кількісної TaqMan RT-ПЛР

TaqMan RT-ПЛР для MAGE-A3 при використанні Sybr зеленого.

Sybr зелений є компонентом, який зв'язується з ампліконами неселективно при відсутності специфічного для послідовності зонда. RT-ПЛР у реальному часі проводили на клонах генів родини MAGE-A при використанні чотирьох різних розведень MAGE-A клонів (20 пг, 2 пг, 0,2 пг та 0,02 пг) (Фігура 1, де результати показані як 1/Ct на осі Y). Позитивний результат одержували для MAGE-A3 при 14 Ct, а значення 16 Ct одержували для MAGE-A6 (при 20 пг плазмід). MAGE A4, A8 та A9 показали рівень Ct 30, а інші MAGE гени показали дуже обмежену експресію при значення Ct 35 та вище.

TaqMan RT-ПЛР для MAGE-A3 при використанні зонду, специфічного для послідовності.

При використанні тих самих MAGE-A3 праймерів (SEQ ID 3 та 4), але при наявності зонда (SEQ ID NO:13), ефективність розрізнення MAGE-A3 від A6 аналізували при використанні різних розведень релевантних клонів родини членів MAGE-A (Фігура 2). Спочатку MAGE-A3 Ct виявляло очікуване зниження у кожному розведенні. MAGE-A6 клон не показав високого значення 1/Ct, коли використовували зонд, що свідчило про відсутність перехресної реактивності.

Додання  $1 \times 10^6$  MAGE-A6 плазмиди до розведення MAGE-A3 плазмиди, як показано на Фігурі 3, не мало ніякого впливу на результат титрування MAGE-A3 плазмиди. Це показує відсутність конкурентного ефекту MAGE-A6 у присутності MAGE-A3 при використанні TaqMan ПЛР.

Результати

Пухлинна експресія MAGE-A3, порівняння напівкількісного та кількісного способів

TaqMan-специфічна кількісна ПЛР була додатково підтверджена у порівнянні зі стандартною напівкількісною RT-ПЛР для MAGE-A3 (при використанні праймерів послідовностей SEQ ID NO:1 та 2). Використовували 71 зразок пухлин від

NSCLC пацієнтів для безпосереднього порівняння кількісного (при використанні праймерів послідовностей SEQ ID NO:3 та 4 та зонду послідовності SEQ ID NO:13) та напівкількісного способів визначення експресії MAGE-A3 (при використанні праймерів послідовностей SEQ ID NO:1 та 2).

Результати показали добру відповідність 95,8% (Таблиця 3) між двома способами з 68/71, що знаходяться у відповідності. Кількісний TaqMan RT-ПЛР та напівкількісний RT-ПЛР аналізи не співпадали у трьох зразках, в яких напівкількісний RT-ПЛР аналіз завищував позитивність результатів. Проте McNemar виявив симетричний перерозподіл цих трьох результатів ( $p=0,25$ ), що свідчить про те, що жодна методика не мала тенденції до надання більшої кількості суперечливих результатів у порівнянні з іншими методиками. При більших точному дослідженні було встановлено, що змінний рівень експресії бета-актину у цих зразках приводив до помилкового позитивного результату для напівкількісного RT-ПЛР способу.

Коробчасту діаграму (Фігура 4) використовували для представлення дисперсії TaqMan ПЛР даних для кожного класу, визначеного для напівкількісної RT-ПЛР. Незважаючи на те, що відповідність двох способів на основі таблиці 2x2 випадкових результатів, була відмінною, коробчасті діаграми виявили деяке перекривання між різними класами, показуючи, що напівкількісна оцінка повністю не співпадала з кількісним TaqMan RT-ПЛР вимірюванням. Перекривання може виникати з причини того факту, що оцінку проводили різні оператори при різних обставинах, що може підвищувати варіабельність. В деякій мірі кількісний TaqMan RT-ПЛР аналіз є набагато більш незалежним від цих факторів та, таким чином, більш відтворюваним.

**ПРИКЛАД 3:** Аналіз тканини, фіксованої у парафін (FFPE), за допомогою RT-ПЛР

#### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

РНК екстрагували з FFPE зразків при використанні запатентованого способу Response Genetics Inc., як розкрито у патентах США №№ 6,613,518; 6,610,488; . 6,428,963; 6,248,535, що введені в дану заявку як посилання. Альтернативно, РНК може бути одержана з тканини, яка заключена у парафін, згідно з прийнятим опублікованим способом. Наприклад, зрізи тканини можуть видалятися з парафіну при використанні d-лімонену або іншого літичного буферу та потім промиватися в розчині на основі етанолу. Зрізи обробляють протеїназою K протягом ночі, а потім промивають. РНК може бути очищена при використанні колонкової хроматографії. Taqman RT -ПЛР у реальному часі проводили на зразках при використанні послідовностей праймерів SEQ ID NO:3 та SEQ ID NO:4 та зонду послідовності SEQ ID NO:13; праймери та зонди удосконалювали для застосування у замороженій тканині (див. Приклад 2, вище).

#### РЕЗУЛЬТАТИ: Експресія MAGE A3

Таблиця 4 показує результати, виражені як значення Ct, для фіксованої у формаліні, заключеної у парафін (FFPE) тканини. Цифри на осі Y представляють зразки пухлини людини 990118-990784. Позитивні контролю також включали в аналіз: TC1 (MAGE3); Gerl (MAGE-A3 клітинна лінія

меланоми) та CRL 1675 (клітинна лінія меланоми). Значення Ct були вищими, ніж ті, що очікували для замороженої тканини на основі праймерів напівкількісної RT-ПЛР MAGE-A3. Значення Ct на рівні 36-37 вважалося верхньою границею чутливості для цілей даних експериментів. Gerl MAGE-A3 позитивний контроль був на рівні 31 Ct та перебував у межах границі чутливості, але був набагато нижчим, ніж для напівкількісного RT-ПЛР аналізу. При використанні цих рівнів праймерів та зонду для MAGE-A3 кількісного аналізу у замороженій тканині (Таблиця 2, специфічності для екзона 3 MAGE-A3 праймери послідовностей SEQ ID NO:3 та SEQ ID NO:4 та зонд SEQ ID NO:13) можуть не бути достатньо чутливими для визначення експресії MAGE-A3 у FFPE зразках пухлини: зразки, що є позитивними на MAGE-A3, але експресують MAGE-A3 на низькому рівні, можуть не виявлятися.

Зразки позитивних контролів з FFPE тканини включали у цей експеримент: TC1 (MAGE3) та Gerl (MAGE-A3 позитивний контроль) та CRL 1675. Пухлини людини 990118-990784 піддавали аналізу за допомогою Taqman кількісної RT-ПЛР при використанні праймерів для замороженої тканини послідовностей SEQ ID NO:3 та SEQ ID NO:4 та зонду послідовності SEQ ID NO:13 при використанні РНК із заключеної у парафін тканини. Результат цього аналізу представлений на Фігурі 5.

Модернізація MAGE-A3 TaqMan праймерів для застосування у FFPE тканині

Розмір амплікона для РНК з пізніше замороженої тканини на основі MAGE-A3 аналізу (описаний у Прикладі 2), складав більше 100 п.о. Для того, щоб одержати більш чутливі результати для розкладеної РНК, що виявляється у FFPE зразках, конструювали нові праймери для зменшення розміру амплікона, для того, щоб підвищити чутливість MAGE-A3 аналізу (Таблиця 5). Для обох аналізів, описаних у Прикладах 2 та 3 MGB™ (зв'язувальна маленька бороздка) зонд використовували для підвищення специфічності аналізів. MGB зонд зв'язувався у маленькій зв'язувальній бороздці ДНК, утворюючи дуже стабільний дуплекс, що приводило до підвищення специфічності праймера.

Аналіз нових MAGE-A3 праймерів на специфічність та чутливість

Набори нових сконструйованих праймерів (Таблиця 5) піддавали аналізу на кДНК членів родини MAGE-A (Фігура 6a), де Набір 1 являв собою праймери: SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, зонд: SEQ ID NO:15; Набір 2 являв собою праймери: SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, зонд: SEQ ID NO:16; Набір 3 являв собою праймери: SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, зонд: SEQ ID NO:17; та Набір 4 являв собою праймери: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, зонд: SEQ ID NO:13.

Як показано на Фігурі 6a, праймери послідовностей SEQ ID NO:7 та 8 мали високі рівні Ct для MAGE-A3, але також й для MAGE-2 та MAGE-12. Праймери послідовностей SEQ ID NO:9 та 10 мали високі рівні Ct для MAGE-A3 та низькі рівні Ct для MAGE -A6, але це було за межами нормального інтервалу експресії MAGE-A3. Праймери послідовностей SEQ ID NO:11 та 12 були менш чутливими,



ніж такі послідовностей SEQ ID NO:9 та 10. Таким чином, у даному експерименті праймери послідовностей SEQ ID NO:9 та 10 були вибрані для подальшого аналізу на FFPE тканині. Ці праймери послідовностей SEQ ID NO:9 та 10 піддавали подальшому аналізу у серійному розведенні РНК, вони показали добрий лінійний результат до більш низьких розведень, що дає змогу запропонувати, що праймери будуть мати добру чутливість та є прийнятними для цього аналізу (Фігура 6b).

Порівняння аналізів на замороженій тканині з результатами на FFPE для MAGE-A3

Порівнювали 42 зразка FFPE пухлин при використанні праймерів послідовностей SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 та зонду SEQ ID NO:16 з тим самим аналізом, проведеним на замороженій тканині при використанні праймерів послідовностей SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 та зонду послідовності SEQ ID NO:13 (Фігура 7). Рівень позитивності аналізу

встановлювався на рівні 1% Gerl (позитивний контроль) та порівнювали безпосередньо, як виявилося, існувало деяка невідповідність між двома аналізами. Існувало кілька позитивних на MAGE-A3 пацієнтів, що не відповідали MAGE-A3 аналізу замороженої тканини; це може пояснюватися макродисекцією пухлинних ділянок, що викликає підвищення чистоти пухлинних клітин, які експресують MAGE-A3. Видалення більшості нормальних клітин, що розводять зразок, спричинювало позитивний MAGE-A3 результат. Було продемонстроване значення  $R^2$  (статистичний критерій для лінійної кореляції) 0,92 між РНК із FFPE тканини та РНК із замороженої пізніше тканини, що дає змогу передбачити добру кореляцію між двома способами (Фігура 8)

ПРИКЛАД 4 - COBAS™ Taqman MAGE-A3 аналіз

Таблиця 7

Послідовності COBAS™ TaqMan MAGE-A3 праймера та зонда

Послідовності праймера COBAS™ TaqMan MAGE-A3	
MAGEA3f-623F: (HW_MAGEA3_F; SEQ ID NO:11)	5'-TGTCGTCGGAAATTGGCAGTAT3'
MAGEA3f-697R: (HW_MAGEA3_R; SEQ ID NO:12)	5'-CAAAGACCAGCTGCAAGGAAGT3'
Послідовність COBAS™ TaqMan MAGE-A3 зонда	
MAGEA3F-646MOD SEQ ID NO:53	5'-ELFLLFFLQGLGALFLLFAGFAAAGFLLFP-3'

E = FAM репортерний барвник, F = 5-метил dC, Q = BHQ2 гасник, L = 5-пропініл dU, P = фосфат, I = HEX репортер

Послідовність MAGEA3F-646MOD зонда включає наступні модифіковані нуклеотиди (SEQ ID NO:54):

5' - TCTTCTCTGTGATCTTCAGCAAAGCTTC - 3'

Таблиця 8

Послідовності COBAS TaqMan бета-актинового праймера та зонда

Послідовності бета-актинового TaqMan праймера	
RGI_BACT_F2: (SEQ ID NO:55)	5'-GAGCGCGGCTACAGCTT-3'
RGI_BACT_R2: (SEQ ID NO:56)	5'-TCCTTAATGTCACGCACGATTT-3'
Послідовність TaqMan бета-актинового зонда	
HW_RGIBACT_H: (SEQ ID NO:57)	5'-4ACCACCAQCGGCCGAGCGGP-3'

E = FAM репортерний барвник, F = 5-метил dC, Q = BHQ2 гасник, L = 5-пропініл dU, P = фосфат, I = HEX репортер

Таблиця 9

Підтверджений інтервал для СТ зразка та контролю

Контролі	Підтверджений Ct інтервал
FFPET зразок MAGE гену 50 нг FAM	<35,2
FFPET зразок бета-актинового гену 50 нг HEX	<32,1
100 % Gerl MAGE ген 50 нг FAM	26,0-29,5
100 % Gerl бета-актиновий ген 50 нг HEX	24,0-27,0
1 % Gerl MAGE ген 0,5 нг FAM	33,0-35,5
1 % Gerl бета-актиновий ген 0,5 нг HEX	29,0-32,5
100 % UHR MAGE ген 50 нг FAM	25,0-28,0

100 % UHR бета-актиновий ген 50 нг HEX	22,0-25,0
1 % UHR Mage ген 0,5 нг FAM	31,0-33,0
1 % UHR бета-актиновий ген 0,5 нг HEX	27,0-29,0
P53 позитивний контроль ДНК 20 нг FAM	26,5-29,0
Негативний контроль (NC)	>38,0

Таблиця 10

Профіль термального циклу  
ПЛР термальний профіль експерименту виключності MAGE-A3

Етапи	Опис	Температура	Час	Кількість циклів
1	UNG деконтамінація	50 °C	5 хв.	1X
2	Денатурація	95 °C	15 сек.	2X
	Гібридизація	63 °C	25 сек.	
3	Денатурація	92 °C	15 сек.	53X
	Гібридизація	63 °C	50 сек.	
4	Завершальний цикл	40 °C	2 хв.	1X

Таблиця 11

RT-ПЛР термальний профіль для експериментів на лінійність та RT-ПЛР  
ефективність, аналітичну чутливість (границя визначення), спосіб кореляції та відтворюваність

Етапи	Опис	Температура	Час	кількість циклів
1	UNG деконтамінація	50 °C	5 хв.	1X
2	Денатурація	95 °C	1 хв.	1X
3	Зворотна транскрипція	60 °C	20 хв.	1X
4	Денатурація	95 °C	15 сек.	2X
	Гібридизація	63 °C	25 сек.	
6	Денатурація	92 °C	15 сек.	53X
	Гібридизація	63 °C	50 сек.	
7	Завершальний цикл	40 °C	2 хв.	1X

Відносно високу температуру гібридизації 63°C використовували для поліпшення MAGE-A3 специфічності відносно інших членів родини MAGE-A. Аналіз даних Ct значення для MAGE-A3 та β-актину підраховували при використанні AMPLILINK™ 3.1 програмного забезпечення (Roche, CA, USA) на COBAS™ TaqMan 48 автоматизованому аналізаторі (Roche, CA, USA) на основі аналізу параметрів, визначених у файлі визначення аналізу. Аналіз даних на генну експресію буде проводитися шляхом віднімання Ct значень для MAGE-A3 та β-актину з AMPLILINK™ для нижчих підрахунків для визначення експресії MAGE-A3 гену по відношенню до гену β-актину. Для кожного прогону включали контроль для встановлення порогового рівня MAGE-A3 експресії, що повинен бути досягнутий або повинен перевищуватися для того, щоб зразок можна було назвати MAGE-A3 позитивним. Як позитивний контроль використовували РНК з клітинної лінії GERL. GERL РНК розводили 1:100 (1% GERL) у воді та визначали Ct для MAGE-A3. Додатково аналізували нерозведену GERL РНК (100% GERL) при відсутності розведення для вимірювання Ct для β-актину. Підраховували значення дельта Ct між Ct β-актину з 100% GERL контролю мінус Ct MAGE-A3 з 1% GERL контролю та визначали відносну експресію MAGE-A3 визначали на основі розрахунків, приведених нижче:

Порогове значення експресії  

$$\text{MAGE-A3} = 2^{-(\text{Ct } \beta\text{-актину із зразка} - \text{MAGE-A3 Ct з 1 \% GERL})}$$

Для зразків, заключених у парафін, використовували таку саму стратегію контролю за винятком того, що РНК з GERL FFPE гетеротрансплантату, екстраговану при використанні Q1AGEN FFPE способу, замінювали на РНК GERL клітинної лінії для встановлення порогоу експресії.

Оскільки COBAS™ Taqman MAGE-A3 аналіз являє собою множинну реакцію, значення Ct MAGE-A3 та β-актину одержували з тієї самої пробірки. Відносну експресію MAGE-A3 підраховували для кожного зразка, який піддавали аналізу, при використанні наступного рівняння:

Експресія MAGE-A3 у досліджуваному зразку =  $2^{-(\text{Ct } \beta\text{-актину із зразка} - \text{Ct MAGE-A3 із зразка})}$

Якщо експресія MAGE-A3 у досліджувану зразку була більша або рівна такій порогового рівня MAGE-A3, встановленого для GERL РНК контролю, то зразок називали позитивним на MAGE-A3. Якщо експресія MAGE-A3 у досліджувану зразку була менша за таку порогового рівня MAGE-A3, встановленого з контролів, то зразок називали негативним на MAGE-A3.

MAGE-A3 експресія буде визначатися вибором середніх значень Ct MAGE-A3 та Ct β-актину з повторів для кожного зразка для підрахунку дельта Ct (Ct β-актину - Ct MAGE-A3). Якщо один повтор має Ct MAGE-A3 або Ct β-актину, менше за

Ct зупинки аналізу, але інший повтор має Ct MAGE-A3 або Ct  $\beta$ -актину, більше за Ct зупинки аналізу, зразок необхідно повторно проаналізувати. Якщо обидва повтори мають Ct  $\beta$ -актину, більше за Ct зупинки аналізу, то зразок маркується як такий, що має Ct  $\beta$ -актину за межами інтервалу, та результат не приводять. Якщо обидва повтори мають Ct MAGE-A3, більше за Ct зупинки аналізу, але експресія MAGE-A3 є вище порогового значення, то зразок маркується як такий, що має Ct MAGE-A3 за межами інтервалу, та результат не приводять. Ця стратегія для аналізу даних є послідовною з дослідженнями перехресного підтвердження, що проводяться для способу кореляції, що є описаним у розділ. «Спосіб кореляції», який приведено нижче.

Для COBAS™ Taqman MAGE-A3 аналізу людську QPCR контрольну загальну РНК (UHR) від Stratagene можна використовувати як позитивний контроль та заданий поріг експресії на основі MAGE-A3 експресії у цій добре охарактеризованій РНК. Розведена UHR може піддаватися аналізу з кожним прогоном разом з GERL РНК контролюми для встановлення прийнятного порогу експресії з UHR контролем.

Умови зберігання зразка та реагенту

Усі РНК та ДНК, включаючи плазмідні, P53 позитивний контроль ДНК, клінічні FFPE РНК, UHR, GERL та STAC зберігали при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Усі аналітичні реагенти, включаючи універсальну суміш РНК Master Mix, суміш праймер/зонд, суміш кофакторів та розріджувач для зразка/негативного контролю зберігали при  $2-8^{\circ}\text{C}$ .

MAGE-A3 виключність

Експериментальне дослідження праймерів та зондів з ДНК плазмідами, що містять члени родини MAGE-A

Мета: Визначити здатність аналізу до специфічної ампліфікації MAGE-A3 гену при виключенні значної сумісної ампліфікації/визначення інших споріднених генів.

Матеріал зразка: Буде аналізуватися плазмідна ДНК, що містить MAGE-A3 та споріднені члени родини (для деталей плазмід див. Приклад 2, вище).

Процедура: Експериментальне тестування COB AS TaqMan MAGE-A3. Аналіз при використанні ДНК плазмід, що містять члени MAGE-A родини, для визначення, що споріднені гени ампліфікуються та визначаються у значних кількостях.

Кожний зразок плазмідної ДНК піддавали аналізу у трьохкратній повторності при чотирьох різних концентраціях ДНК (20, 2, 0,2, 0,02 пг). Профіль термального циклу, показаний у Таблиці 1, модифікували для усунення етапу зворотної транскрипції при  $60^{\circ}\text{C}$  протягом 20 хвилин. Концентрацію плазмідної ДНК визначали за допомогою Nanodrop аналізу

Аналіз:

Визначали Ct значення для MAGE-A3 плазмід та порівнювали їх зі значеннями Ct з MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11 та MAGE-A12 плазмід. Дельта Ct підраховували шляхом віднімання Ct MAGE-A3 (кожний споріднений член родини) від Ct MAGE-Ax. Середні значення Ct з чотирьох повто-

рів використовували для підрахунку Ct та дельта Ct.

Критерії прийняття:

Дельта Ct значення повинні бути більшими або рівними 10 між MAGE-A3 та усіма іншими плазмідами за виключенням MAGE-A6.

Результати виключності MAGE-A3

У Таблицях та Фігурах в даній заявці у деяких випадках «CURIE» використовується замість «MAGE»; проте термін «MAGE» є призначеним для усіх випадків.

Значення Ct є представленими для усіх MAGE плазмід, проаналізованих у Таблиці 12 та Фігурі 17, що представлені нижче. Для плазмід не проводили ампліфікації, значення Ct 55 було задане, оскільки існувало 55 циклів у профілі термальної циклізації. Як і очікувалося, MAGE-A3 Ct були найбільш ранніми для усіх досліджених рівнів (Таблиця 12 та Фігура 17). Дельта Ct значення були більшими, ніж 10 циклів між MAGE-A3 та усіма іншими плазмідами за виключенням MAGE-A6 (Таблиця 13 та Фігура 18). Дельта Ct між MAGE-A3 та MAGE-A6 не вимагалось, оскільки 95% пацієнтів, що експресують MAGE-A6, також експресують і MAGE-A3.

Дельта Ct між MAGE-A3 та MAGE-A6 для введення 20 пг, 2 пг, 0,2 пг та 0,02 пг плазмідної ДНК складало 9,3, 8,4, 7,8, та 8,2 циклів, відповідно. Оскільки більшість MAGE-A3 Ct значень для РНК із зразків FFPE, як було показано, були більшими за 27,2 для проаналізованих зразків FFPE, сигнал від MAGE-A6 буде мінімальним, оскільки затримка у 8,2 циклів буде генерувати Ct значення за межами інтервалу аналізу.

Аналіз задовольняв критерії прийнятності для виключності.

Таблиця 14 показує MAGE-A3 експериментальне підтвердження виключності; контрольні значення Ct були у рамках затвердженого інтервалу. Експеримент пройшов валідацію. Таблиці 15 та 16 показують деталі експерименту щодо виключності MAGE-A3.

Лінійність та ефективність RT-ПЛР

Мета: Визначити лінійність та ефективність зворотної транскрипції аналізу.

Матеріал зразка: серійні розведення FFPE Xenograft GERL РНК використовували для досліджень лінійності та ефективності RT-ПЛР.

Процедура: FFPE Xenograft GERL РНК двократно серійно розводили у концентрації від 100 нг до 0,1 нг та піддавали аналізу при використанні COBAS TaqMan MAGE-A3 аналізу для визначення лінійного інтервалу аналізу. Десять повторів аналізували для кожного рівня концентрації.

Аналіз:

Ct значення для кожного повтору як для MAGE-A3, так і для  $\beta$ -актину, будували проти  $\log$  (основа 2) введеної концентрації РНК для обчислення нахилу лінії та ефективностей RT-ПЛР. Ефективність RT-ПЛР ампліфікації підраховували при використанні рівняння:

Нахил =  $-1/\log$  (основа 2) \* ефективність ампліфікації (AE).

Значення ефективності ампліфікації 2 є еквівалентним 100%. Дельта Ct значення (Ct MAGE-A3 - Ct  $\beta$ -актину) для кожного повтору будували

проти log (основа 2) введеної концентрації РНК для визначення нахилу дельта Ct. Середні значення, стандартне відхилення та значення варіаційного коефіцієнту (%CV) для Ct MAGE-A3, Ct  $\beta$ -актину та дельта Ct підраховували з усіх десяти повторів.

Прийнятність критерію лінійності:

Лінійний інтервал аналізу визначали на основі наступних критеріїв:

CV Ct MAGE-A3 < 5%

CV Ct  $\beta$ -актину < 5%

CV дельта Ct < 20%

-0,10 < нахил дельта Ct < 0,10

R2 > 0,95

Критерій прийнятності ефективності RT-ПЛР:

Ефективність MAGE-A3 RT-ПЛР ампліфікації > 80 %

Ефективність RT-ПЛР ампліфікації  $\beta$ -актину > 80 %

Різниця ефективності RT-ПЛР ампліфікації між MAGE-A3 та  $\beta$ -актином у межах 10%

Результати лінійності / ефективності RT-ПЛР

Фігура 20 показує графік log (основа 2) введеної РНК проти значень Ct для MAGE-A3 та  $\beta$ -актину. COBAS TaqMan MAGE-A3 Аналіз є лінійним між значеннями введення 100-0,1 нг GERL РНК, екстрагованої з FFPE Xenograft, при використанні QIAGEN способу на основі R2 значень.

R2 значення складали 0,983 для MAGE-A3 та 0,998 для  $\beta$ -актину. Ці значення були вищими визначення R2 > 0,95. Крім того, як Ct MAGE-A3, так і Ct  $\beta$ -актину для усіх 10 повторів на кожному проаналізованому рівні були нижчі за визначення CV < 5%, як показано у Таблиці 17.

Ефективність RT-ПЛР ампліфікації MAGE-A3 та  $\beta$ -актин з нахилу лінії, одержаної з побудови log (основа 2) введеної РНК проти Ct значень MAGE-A3 та  $\beta$ -актину, представлена на Фігурі 19. Ефективність ампліфікації RT-ПЛР може бути підрахована при використанні наступного рівняння:

Нахил =  $-1/\log$  (основа 2) \* ефективність ампліфікації (AE).

Ефективність ампліфікації була 2,14 (107%) та 2,06 (103,1%) для MAGE-A3 та  $\beta$ -актину, відповідно. AE було вище визначення 80% для MAGE-A3 та  $\beta$ -актину. Відмінність стосовно AE між двома генами складала 3,9 %, що також знаходилося в межах визначення + 10%.

Фігура 20 показує графік log (основа 2) введеної РНК проти дельта Ct між MAGE-A3 та  $\beta$ -актином. Дельта Ct нахил складав 0,0474, це значення знаходилося у межах визначення-від 0,10 до 0,10. При двох найнижчих досліджуваних рівнях введеної РНК (С,2 та 0,1 нг), %CV для дельта Ct був вище визначення 20%. В результаті цього останні два рівні введеної РНК не включалися в лінійний інтервал аналізу. Лінійний інтервал аналізу при використанні GERL Xenograft РНК складав 100 нг - 0,39 нг РНК.

На основі цих даних задовольнявся критерій прийнятності для лінійності та ефективності RT-ПЛР.

Таблиця 18 показує ефективність RT-ПЛР ампліфікації MAGE-A3 та  $\beta$ -актину; Таблиця 19 являє собою експеримент по валідації лінійності / RT-ПЛР ефективності

Контрольні Ct були у межах затвердженого інтервалу. Експеримент пройшов валідацію.

Таблиці 20, 21 та 22 забезпечують деталі експерименту на лінійність / ефективність RT-ПЛР

Аналітична чутливість (границя визначення)

Мета: Встановити найнижчу концентрацію РНК, де експресія MAGE-A3 гену може визначатися за допомогою COBAS™ TaqMan MAGE-A3 аналізу принаймні протягом 95% часу.

Матеріал зразка: Аналітичну чутливість оцінювали при використанні РНК, ізольованої з FFPE Xenograft тканини за допомогою набору QIAGEN RNeasy FFPE з додатковим етапом при використанні ДНКази. РНК екстрагували з двох FFPE Xenograft, що мають походження від двох клітинних ліній. Один Xenograft, що мав назву GERL, експресував MAGE-A3. Інший Xenograft, що мав назву STAC, не експресував MAGE-A3. РНК з цих двох Xenograft використовували для комбінаційних експериментів для того, щоб проаналізувати 5% GERL РНК на фоні 95% STAC РНК, 1% GERL РНК на фоні 99% STAC РНК та 0,5% GERL РНК на фоні 99,5% STAC РНК. Ці три різні суміші GERL та STAC РНК піддавали аналізу при чотирьох різних рівнях загальної РНК.

Процедура: Двадцять чотири результати аналізу одержували з 4 незалежних серій розведень сумішей РНК GERL та STAC. Піддавали аналізу чотири рівні введеної РНК (100, 50, 25 та 12,5 нг). Аналізували 6 повторів для кожного рівня.

Аналіз: Визначення рівня РНК, при якому > 95% позитивного значення MAGE-A3 одержують на основі значення Ct у межах затвердженого інтервалу аналізу.

Критерій прийнятності: LOD < 50 нг введеної загальної РНК для визначення 1% GERL.

Границя результатів виявлення

Значення попадання визначали як значення Ct у межах лінійного інтервалу аналізу на основі експериментів лінійності, описаних у цьому звіті. Для визначення кінця інтервалу Ct, Ct MAGE-A3 та  $\beta$ -актину для рівня введеної РНК 0,39 нг з дослідження лінійності (кінець лінійного інтервалу) піддавали усередненню та 95% довірчі границі підраховували для Ct MAGE-A3 та  $\beta$ -актину. На основі цих підрахунків Ct MAGE-A3 повинно бути меншим або рівним 35,2, а Ct  $\beta$ -актину повинно бути меншим 32,1 для зразка що вважається співпаданням. Значення співпадання для MAGE-A3 та  $\beta$ -актину є представленими у Таблиці 23 та Таблиці 25. Процент значень співпадання MAGE-A3 та  $\beta$ -актину є представленими у Таблиці 24 та Таблиці 26.

Границя визначення складає 50 нг введеної РНК, де 1% GERL РНК, розведеної у 99% STAC РНК, визначається протягом > 95% часу на основі зниження Ct MAGE-A3 у межах затвердженого інтервалу аналізу. Результати відповідали критерію прийнятності для аналітичної чутливості (границя визначення).

Експеримент для підтвердження границі визначення. Значення Ct для FAM контролю MAGE гена є представленими у Таблиці 27; Ct для HEX контролю  $\beta$ -актину є представленими у Таблиці 28. Контрольні Ct знаходилися у межах затвердженого інтервалу. Експеримент пройшов валідацію.

Таблиця 29; Таблиця 30 та Таблиця 31 представляють деталі експерименту для підтвердження меж граници визначення

Спосіб кореляції

Мета: Для кореляції та перехресного підтвердження COBAS™ TaqMan MAGE-A3 аналізу та аналізу-прототипу на зразках FFPE.

Матеріал зразків: Приблизно 120 клінічних зразків FFPE адекватної якості піддавали аналізу при використанні COBAS TaqMan MAGE-A3 аналізу та при використанні аналізу-прототипу.

Процедура: РНК екстрагували при використанні набору QIAGEN™ RNeasy FFPE з додатковим етапом із застосуванням ДНКаз. Проводили одну екстракцію для кожного FFPE зразка, розділяли зразок та одну аліквоту аналізували за допомогою COBAS TaqMan MAGE-A3 аналізу, а одну аліквоту аналізували при використанні аналізу прототипу. Ідентичні контролю розганяли для кожного з аналізів для встановлення порогу експресії MAGE-A3.

Аналіз:

MAGE-A3 сигнал для кожного зразка представляли як позитивний або негативний на основі порогу експресії MAGE-A3, генерованого GERL РНК контролюми. Порівнювали результати двох аналізів для встановлення позитивного та негативного за допомогою порівняння проценту відповідності значень RMS аналізу.

Для підрахунку проценту відповідності одержані раніше при використанні двохетапного аналізу RT-ПЛР результати для замороженої тканини використовували для розділення суперечливих результатів.

Позитивний за порівнянням проценту відповідності = кількість зразків, що правильно тестували MAGE-A3 експресію / кількість проаналізованих зразків \* 100.

Негативний за порівнянням проценту відповідності = кількість зразків, що правильно тестували відсутність MAGE-A3 експресії / кількість проаналізованих зразків \* 100.

Критерії прийнятності:

Позитивний за порівнянням проценту відповідності > 85%

Негативний за порівнянням проценту відповідності > 85%

Перехресне підтвердження клінічних зрізів з NSCLC клінічного дослідження проводили для оцінки позитивних та негативних зразків шляхом порівняння проценту відповідності за допомогою COBAS TaqMan MAGE-A3 аналізу. MAGE-A3 прототип RT-ПЛР аналізу використовували як порівняння для цих досліджень. У разі виявлення невідповідності між результатами, попередні результати, одержані з того самого зразка, що й свіжа заморожена тканина, яка не піддавалася ручному приготуванню мікрозрізів, може використовуватися для розрізнення невідповідного результату.

При використанні способу QIAGEN RNeasy FFPE з етапом перетравлювання ДНКазою РНК екстрагували з 131 FFPE зразка, які піддавали ручному приготуванню мікрозрізів. Кожний зразок потім розділяли порівну між RMS та RGI для аналізу при використанні RMS COBAS TaqMan MAGE-

A3 аналізу та RGI аналізу-прототипу. Дані аналізу представляли так, як описано у розділі 3, де порог експресії MAGE-A3 визначали на основі 1% GERL РНК контролю.

Спосіб кореляції/результати перехресної валідації

Зразки РНК екстрагували з 131 NSCLC FFPE клінічних зрізів. 7 зразків мали контамінацію геномної ДНК, більшу за 25% на еонові RGI RT контрольної реакції. Ці зразки виключалися з позитивних та негативних за допомогою підрахунків на основі порівняння проценту співпадання. Додатково, існувало 6 невизначених результатів з COBAS аналізу та 15 з аналізу прототипу, де жоден із зразків не мав достатнього матеріалу на основі Ct β-актину за межами лінійного інтервалу аналізу або експресія MAGE-A3 для зразка була більше порогового значення, але Ct MAGE-A3 знаходилося поза межами лінійного інтервалу. В результаті цього існувало 117 результатів з COBAS аналізу та 108 результатів з аналізу-прототипу з даними, що могли використовуватися для перехресної валідації для порівняння двох різних аналізів (Таблиця 32). Загальна відповідність COBAS аналізу та аналізу-прототипу складала 98/107 або 91,6% (Таблиця 33). Позитивний результат при використанні порівняння проценту відповідності COBAS аналізу при застосуванні аналізу-прототипу як «золотого стандарту» складав 59/64 або 92,2 %, у той час як негативний результат при використанні порівняння проценту відповідності складав 39/43 або 90,7 % (Таблиця 33). У випадку суперечливих результатів між COBAS аналізом та аналізом-прототипом, використовували результати, одержані із зразків замороженої тканини, для розрізнення суперечливості (Таблиця 34).

З 9 зразків із суперечливими результатами між COBAS аналізом та аналізом-прототипом 7 продемонстрували відповідність між COBAS аналізом та аналізом заморожених зразків та 2 продемонстрували відповідність між аналізом-прототипом та аналізом заморожених зразків. В результаті, при використанні заморожених зразків позитивний результат розрізнення суперечливих даних на основі порівняння проценту відповідності COBAS аналізів підвищувався до 63/64 або 98,4%, а негативний на основі порівняння проценту відповідності підвищувався до 42/43 або 97,7 % (Таблиця 34).

Позитивний та негативний на основі порівняння проценту відповідності COBAS TaqMan MAGE-A3 аналізу перевищував умову бути більшим або рівним 85%. Позитивні та негативні результати на основі порівняння проценту відповідності задовольняли критерій прийнятності.

Спосіб кореляції/перехресне підтвердження контрольної валідації

Експеримент по вивченню контролю Ct MAGE гену представлений у Таблиці 30; Експеримент по вивченню контролю Ct гена β-актину представлений у Таблиці 31. Контрольні Ct знаходяться у межах підтвердженого інтервалу. Експеримент пройшов валідацію.

Деталі способу кореляції / перехресного підтвердження контрольної валідації представлені у Таблицях 37, 38 та 39.

## Відтворюваність

Мета: Продемонструвати відтворюваність та надійність аналізу на наборах даних, одержаних багатьма операторами протягом багатьох днів з різними реагентами та множиною різних інструментів.

## Матеріал зразка:

12 зразків з NSCLC FFPE клінічних зразків, які піддавали ручному приготуванню мікрозрізів, піддавали екстракції при використанні набору QIAGEN RNeasy FFPE з етапом перетравлювання за допомогою ДНКази I ампліфікували / аналізували при використанні COBAS TaqMan MAGE-A3 аналізу.

## Процедура:

Дослідження включало два повтори на зразок.

Дві партії реагентів аналізували для QIAGEN приготування зразків та TaqMan реагентів.

Експерименти проводилися двома різними операторами у два різні дні, при використанні двох різних COBAS TaqMan 48 аналізаторів.

## Аналіз:

MAGE-A3 експресію для кожного клінічного зразка підраховували із середнього значення двох повторностей RT-ПЛР. Крім того, MAGE-A3 сигнал оцінювали для кожної повторності кожного зразка. Відтворюваність також базувалася на порівнянні експресії MAGE-A3 гена, підрахованої із значення дельта Ct між генами MAGE-A3 та β-актину. Порівняння між експресією MAGE-A3 зразків, які піддавали аналізу, проводили при використанні різних партій реагентів, пристроїв, та у різні дні, застосовуючи кореляцію Пірсона.

## Критерій прийнятності:

> 90 % MAGE-A3 значення відповідності між зразками, які є принаймні 3X границею визначення для цього аналізу (3% GERL) від одного прогону до іншого та у межах повторностей прогонів.

## Кореляція Пірсона &gt; 90% між зразками

## Результати відтворюваності

Поріг експресії MAGE-A3 являє собою рівень відсікання MAGE-A3 експресії, що визначає, чи буде пацієнт одержувати MAGE-A3 специфічну імунотерапію. Пацієнти з MAGE-A3 експресією,

рівно або такою, що перевищує порогове значення, будуть мати позитивний сигнал MAGE-A3 та будуть одержувати лікування. Пацієнти з MAGE-A3 експресією, що є нижчою порогового значення будуть мати негативний а MAGE-A3 сигнал та не будуть одержувати лікування. Дослідження відтворюваності аналізу базувалися на сигналі експресії MAGE-A3 для кожного зрізу при використанні наступних рівнянь:

Поріг експресії MAGE-A3 =  $2^{\Delta Ct}$  (Ct β-актину 100% GERL контролю - Ct MAGE-A3 1% GERL контролю)

MAGE-A3 Експресія для клінічного зразка =  $2^{\Delta Ct}$  (Ct β-актину зразка - Ct MAGE-A3 зразка)

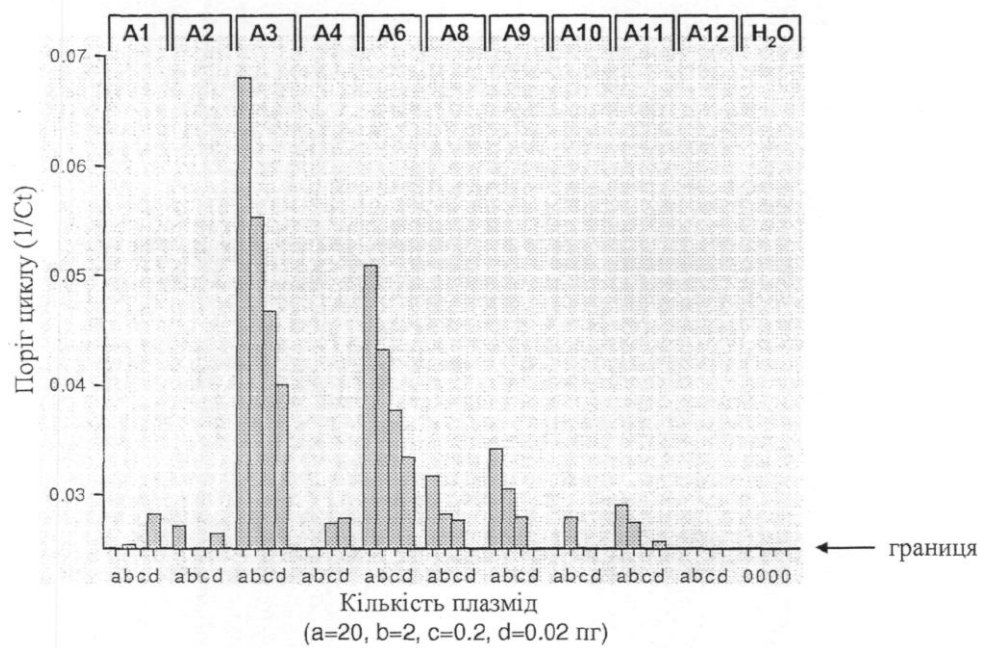
Крім того, результати аналізу відтворюваності оцінювали шляхом порівняння кореляції MAGE-A3 експресії між двома прогонами за допомогою коефіцієнту кореляції за змішаними моментами Пірсона (r). Таблиця 40 та Таблиця 37 показують поріг MAGE-A3 експресії, одержаний з GERL PHK контролів, проаналізованих при використанні прогону 1 та 2 на основі дельта Ct між β-актином та MAGE-A3. Таблиця 41 та Таблиця 43 показують MAGE-A3 сигнал для кожного з 12 зрізів, проаналізованих у прогоні 1 та 2.

Таблиця 42 показує Прогін 2 - поріг MAGE-A3 експресії з GERL PHK контролів; Таблиця 43 показує прогін 2 - сигнал MAGE-A3 експресії для зразків аналізу на відтворюваність.

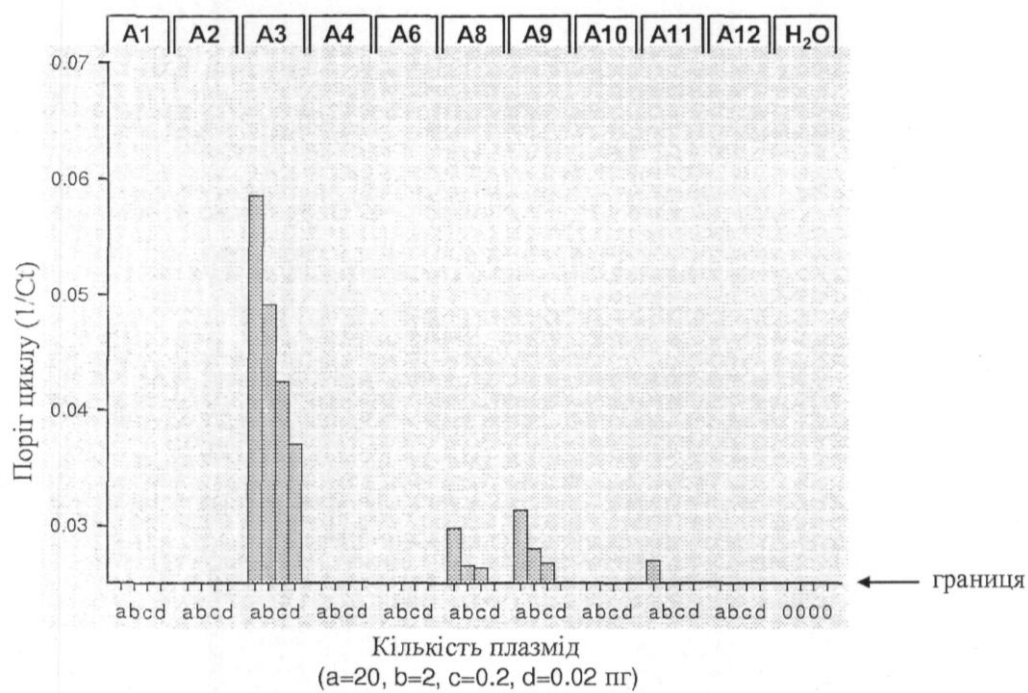
Для усіх досліджених зразків існувала 100% кореляція для сигналу MAGE-A3 експресії між двома прогонами. Крім того, результати аналізу відтворюваності оцінювали шляхом порівняння кореляції MAGE-A3 експресії між двома прогонами при використанні коефіцієнту кореляції за змішаними моментами Пірсона (r). Коефіцієнт кореляції Пірсона складав 0,987 при порівнянні MAGE-A3 експресії між двома різними прогонами. Задовольнялися критерії прийнятності для відтворюваності.

Таблиця 44 показує підтвердження відтворюваності; контрольні Ct перебувають у межах підтвердженого інтервалу. Експеримент пройшов валідацію. Деталі експерименту відтворюваності є представленими у Таблицях 45, 46 та 47.

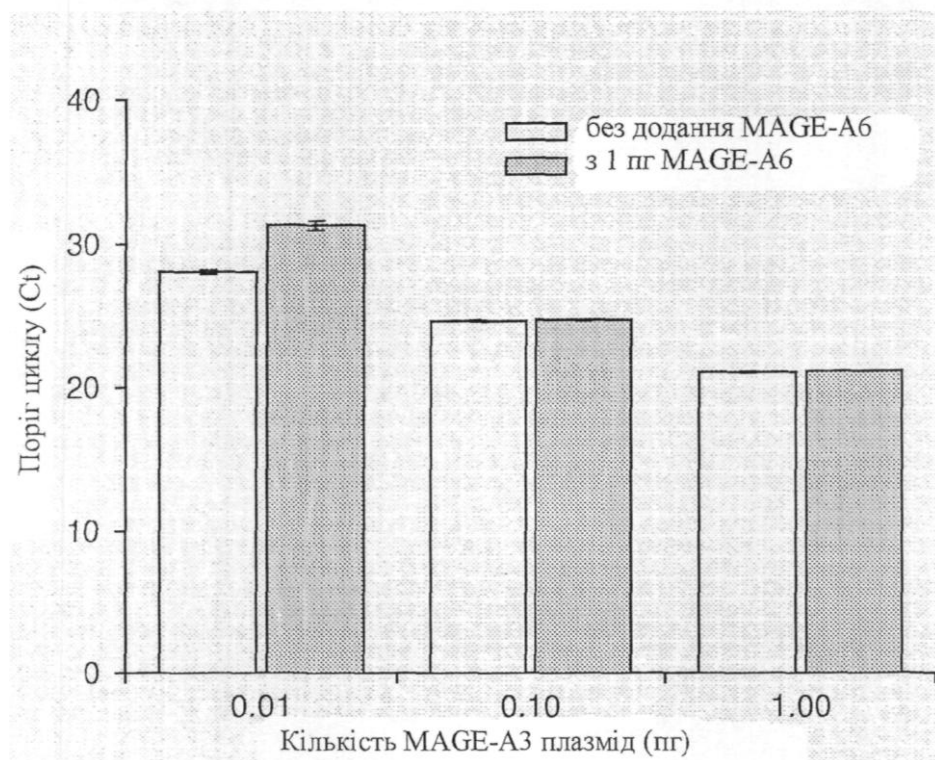
Фігура 1



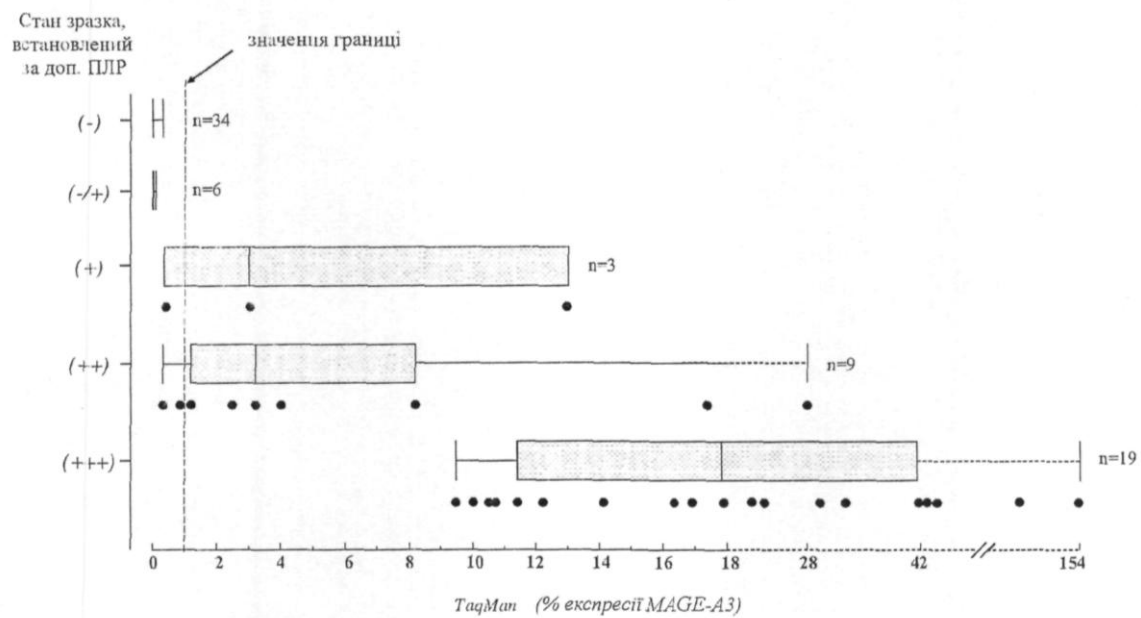
Фігура 2



Фігура 3

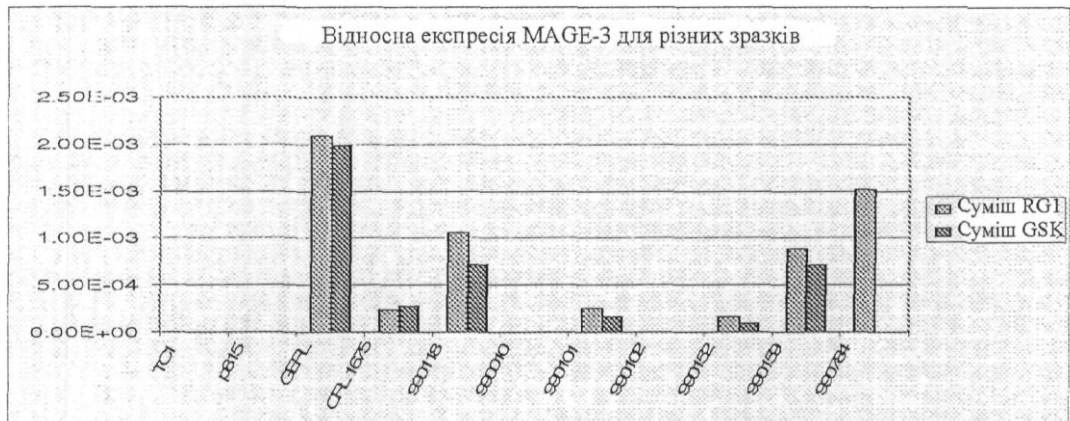


Фігура 4

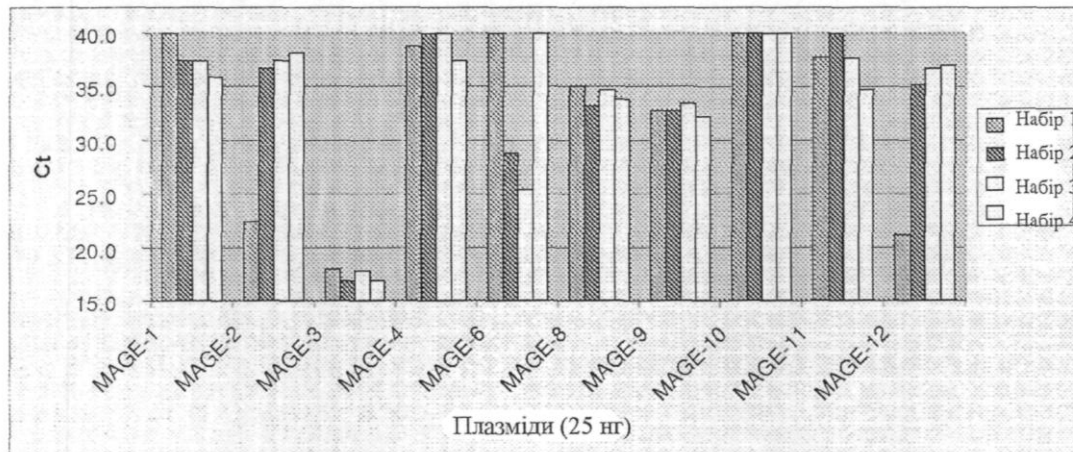




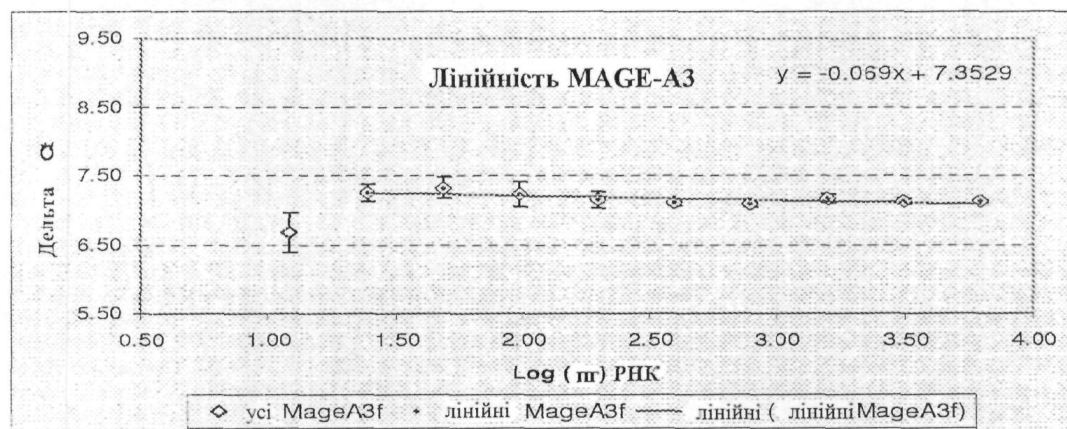
Фігура 5



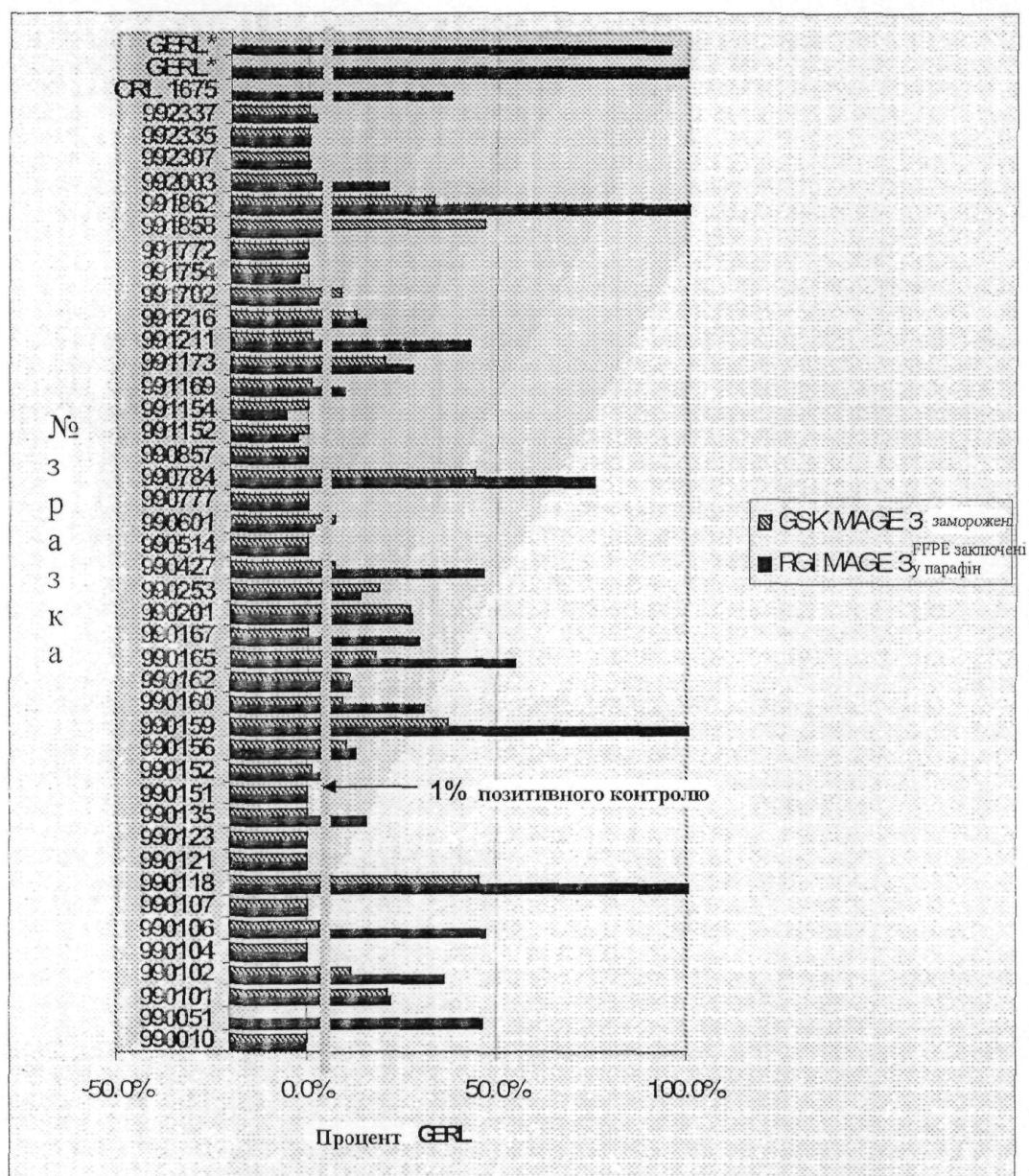
Фігура 6a



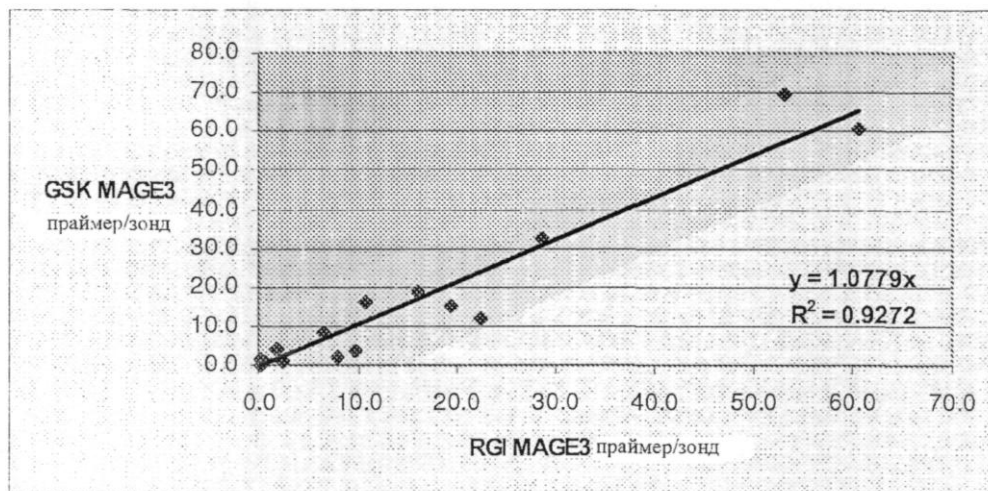
Фігура 6b



Фігура 7



Фігура 8



## Фігура 9

Нуклеотидна послідовність, що кодує злитий білок фрагмента білка D, фрагмента Mage3 та гістидинового хвоста, та його відповідна амінокислотна послідовність (SEQ ID NO: 35 та 36).

atg gat cca aaa act tta gcc ctt tct tta tta gca gct ggc gta cta	48
Met Asp Pro Lys Thr Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ala Ala Gly Val Leu	
1 5 10 15	
gca ggt tgt agc agc cat tca tca aat atg gcg aat acc caa atg aaa	96
Ala Gly Cys Ser Ser His Ser Ser Asn Met Ala Asn Thr Gln Met Lys	
20 25 30	
tca gac aaa atc att att gct cac cgt ggt gct agc ggt tat tta cca	144
Ser Asp Lys Ile Ile Ile Ala His Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Leu Pro	
35 40 45	
gag cat acg tta gaa tct aaa gca ctt gcg ttt gca caa cag gct gat	192
Glu His Thr Leu Glu Ser Lys Ala Leu Ala Phe Ala Gln Gln Ala Asp	
50 55 60	
tat tta gag caa gat tta gca atg act aag gat ggt cgt tta gtg gtt	240
Tyr Leu Glu Gln Asp Leu Ala Met Thr Lys Asp Gly Arg Leu Val Val	
65 70 75 80	
att cac gat cac ttt tta gat ggc ttg act gat gtt gcg aaa aaa ttc	288
Ile His Asp His Phe Leu Asp Gly Leu Thr Asp Val Ala Lys Lys Phe	
85 90 95	
cca cat cgt cat cgt aaa gat ggc cgt tac tat gtc atc gac ttt acc	336
Pro His Arg His Arg Lys Asp Gly Arg Tyr Tyr Val Ile Asp Phe Thr	
100 105 110	
tta aaa gaa att caa agt tta gaa atg aca gaa aac ttt gaa acc atg	384
Leu Lys Glu Ile Gln Ser Leu Glu Met Thr Glu Asn Phe Glu Thr Met	
115 120 125	
gat ctg gaa cag cgt agt cag cac tgc aag cct gaa gaa ggc ctt gag	432
Asp Leu Glu Gln Arg Ser Gln His Cys Lys Pro Glu Glu Gly Leu Glu	
130 135 140	
gcc cga gga gag gcc ctg ggc ctg gtg ggt gcg cag gct cct gct act	480
Ala Arg Gly Glu Ala Leu Gly Leu Val Gly Ala Gln Ala Pro Ala Thr	

57	95956	58
145	150	155 160
gag gag cag gag gct gcc tcc tcc tct tct act cta gtt gaa gtc acc 528		
Glu Glu Gln Glu Ala Ala Ser Ser Ser Ser Thr Leu Val Glu Val Thr		
165	170	175
ctg ggg gag gtg cct gct gcc gag tca cca gat cct ccc cag agt cct 576		
Leu Gly Glu Val Pro Ala Ala Glu Ser Pro Asp Pro Pro Gln Ser Pro		
180	185	190
cag gga gcc tcc agc ctc ccc act acc atg aac tac cct ctc tgg agc 624		
Gln Gly Ala Ser Ser Leu Pro Thr Thr Met Asn Tyr Pro Leu Trp Ser		
195	200	205
caa tcc tat gag gac tcc agc aac caa gaa gag gag ggg cca agc acc 672		
Gln Ser Tyr Glu Asp Ser Ser Asn Gln Glu Glu Glu Gly Pro Ser Thr		
210	215	220
ttc cct gac ctg gag tcc gag ttc caa gca gca ctc agt agg aag gtg 720		
Phe Pro Asp Leu Glu Ser Glu Phe Gln Ala Ala Leu Ser Arg Lys Val		
225	230	235 240
gcc gaa ttg gtt cat ttt ctg ctc ctc aag tat cga gcc agg gag ccg 768		
Ala Glu Leu Val His Phe Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Ala Arg Glu Pro		
245	250	255
gtc aca aag gca gaa atg ctg ggg agt gtc gtc gga aat tgg cag tat 816		
Val Thr Lys Ala Glu Met Leu Gly Ser Val Val Gly Asn Trp Gln Tyr		
260	265	270
ttc ttt cct gtg atc ttc agc aaa gct tcc agt tcc ttg cag ctg gtc 864		
Phe Phe Pro Val Ile Phe Ser Lys Ala Ser Ser Ser Leu Gln Leu Val		
275	280	285
ttt ggc atc gag ctg atg gaa gtg gac ccc atc ggc cac ttg tac atc 912		
Phe Gly Ile Glu Leu Met Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr Ile		
290	295	300
ttt gcc acc tgc ctg ggc ctc tcc tac gat ggc ctg ctg ggt gac aat 960		
Phe Ala Thr Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu Gly Asp Asn		
305	310	315 320
cag atc atg ccc aag gca ggc ctc ctg ata atc gtc ctg gcc ata atc 1008		
Gln Ile Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu Ala Ile Ile		
325	330	335

59	95956	60	
gca aga gag ggc gac tgt gcc cct gag gag aaa atc tgg gag gag ctg			1056
Ala Arg Glu Gly Asp Cys Ala Pro Glu Glu Lys Ile Trp Glu Glu Leu			
340	345	350	
agt gtg tta gag gtg ttt gag ggg agg gaa gac agt atc ttg ggg gat			1104
Ser Val Leu Glu Val Phe Glu Gly Arg Glu Asp Ser Ile Leu Gly Asp			
355	360	365	
ccc aag aag ctg ctc acc caa cat ttc gtg cag gaa aac tac ctg gag			1152
Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln His Phe Val Gln Glu Asn Tyr Leu Glu			
370	375	380	
tac cgg cag gtc ccc ggc agt gat cct gca tgt tat gaa ttc ctg tgg			1200
Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asp Pro Ala Cys Tyr Glu Phe Leu Trp			
385	390	395	400
ggt cca agg gcc ctc gtt gaa acc agc tat gtg aaa gtc ctg cac cat			1248
Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Leu His His			
405	410	415	
atg gta aag atc agt gga gga cct cac att tcc tac cca ccc ctg cat			1296
Met Val Lys Ile Ser Gly Gly Pro His Ile Ser Tyr Pro Pro Leu His			
420	425	430	
gag tgg gtt ttg aga gag ggg gaa gag ggc ggt cat cac cat cac cat			1344
Glu Trp Val Leu Arg Glu Gly Glu Glu Gly Gly His His His His His			
435	440	445	
cac cat taa			1353
His His			
450			

## Фігура 10

Злитий білок NS1-MAGE3 та гістидиновий хвіст (SEQ ID NO:37)

```

Met Asp Pro Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
1           5           10           15
His Val Arg Lys Arg Val Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala Pro Phe
           20           25           30
Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser
           35           40           45
Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr Arg Ala Gly Lys Gln Ile
           50           55           60
Val Glu Arg Ile Leu Lys Glu Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr
65           70           75           80
Met Asp Leu Glu Gln Arg Ser Gln His Cys Lys Pro Glu Glu Gly Leu
           85           90           95
Glu Ala Arg Gly Glu Ala Leu Gly Leu Val Gly Ala Gln Ala Pro Ala
           100          105          110
Thr Glu Glu Gln Glu Ala Ala Ser Ser Ser Ser Thr Leu Val Glu Val
           115          120          125
Thr Leu Gly Glu Val Pro Ala Ala Glu Ser Pro Asp Pro Pro Gln Ser
           130          135          140
Pro Gln Gly Ala Ser Ser Leu Pro Thr Thr Met Asn Tyr Pro Leu Trp
145          150          155          160
Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Ser Ser Asn Gln Glu Glu Glu Gly Pro Ser
           165          170          175
Thr Phe Pro Asp Leu Glu Ser Glu Phe Gln Ala Ala Leu Ser Arg Lys
           180          185          190
Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Ala Arg Glu
           195          200          205
Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu Gly Ser Val Val Gly Asn Trp Gln
           210          215          220
Tyr Phe Phe Pro Val Ile Phe Ser Lys Ala Ser Ser Ser Leu Gln Leu
225          230          235          240
Val Phe Gly Ile Glu Leu Met Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr
           245          250          255
Ile Phe Ala Thr Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu Gly Asp
           260          265          270
Asn Gln Ile Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu Ala Ile
           275          280          285
Ile Ala Arg Glu Gly Asp Cys Ala Pro Glu Glu Lys Ile Trp Glu Glu
           290          295          300

```

63	95956	64
Leu Ser Val Leu Glu Val Phe Glu Gly Arg Glu Asp Ser Ile Leu Gly		
305	310	315 320
Asp Pro Lys Lys Leu Thr Gln His Phe Val Gln Glu Asn Tyr Leu		
325	330	335
Glu Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asp Pro Ala Cys Tyr Glu Phe Leu		
340	345	350
Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Leu His		
355	360	365
His Met Val Lys Ile Ser Gly Gly Pro His Ile Ser Tyr Pro Pro Leu		
370	375	380
His Glu Trp Val Leu Arg Glu Gly Glu Glu Gly Gly His His His His		
385	390	395 400
His His His		

## Фігура 11

ДПК, що кодує злитий білок NS1-MAGE3-His (SEQ ID NO:38)

atggatccaa acactgtgtc aagctttcag gtagattgct ttctttggca tgtccgcaaa	60
cgagttgcag accaagaact aggtgatgcc ccattccttg atcggcttcg ccgagatcag	120
aaatccctaa gaggaagggg cagcactctt ggtctggaca tcgagacagc cacacgtgct	180
ggaaagcaga tagtggagcg gattctgaaa gaagaatccg atgaggcact taaaatgacc	240
atggatctgg aacagcgtag tcagcactgc aagcctgaag aaggccttga ggcccagga	300
gaggccctgg gcctgggtgg tgcgcaggct cctgctactg aggagcagga ggctgcctcc	360
tcctcttcta ctctagttga agtcacctg ggggaggtgc ctgctgccga gtcaccagat	420
cctcccaga gtctcaggg agcctccagc ctcccacta ccatgaacta ccctctctgg	480
agccaatcct atgaggactc cagcaacca gaagaggagg ggccaagcac ctccctgac	540
ctggagtcgg agttccaagc agcactcagt aggaagggtg ccgaattggt tcattttctg	600
ctcctcaagt atcgagccag ggagccggtc acaaaggcag aaatgctggg gagtgtcgtc	660
ggaaattggc agtattttct tctgtgac ttcagcaaag cttccagttc cttgcagctg	720
gtctttggca tcgagctgat ggaagtggac cccatcggcc acttgtagat ctttgccacc	780
tgcttgggcc tctcctacga tggcctgctg ggtgacaatc agatcatgcc caaggcaggc	840
ctcctgataa tcgtcctggc cataatcgca agagagggcg actgtgcccc tgaggagaaa	900
atctgggagg agctgagtgt gttagagggtg tttgagggga gggaagacag tatcttgagg	960
gatcccaaga agctgctcac ccaacatttc gtgcaggaaa actacctgga gtaccggcag	1020
gtccccggca gtgacctgc atgttatgaa ttctgtggg gtccaagggc cctcgttgaa	1080
accagctatg tgaaagtcct gcaccatag gttaaagatca gtggaggacc tcacatttcc	1140
taccaccccc tgcagtagtg ggttttgaga gagggggaag agggcgggtca tcaccatcac	1200
catcaccatt aa	1212



## Фігура 12

## Злитий білок CLYTA-MAGE3-гістидин (SEQ ID NO:39)

```

Met Lys Gly Gly Ile Val His Ser Asp Gly Ser Tyr Pro Lys Asp Lys
1           5           10           15
Phe Glu Lys Ile Asn Gly Thr Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser Ser Gly Tyr
          20           25           30
Met Leu Ala Asp Arg Trp Arg Lys His Thr Asp Gly Asn Trp Tyr Trp
          35           40           45
Phe Asp Asn Ser Gly Glu Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Ile Ala Asp
          50           55           60
Lys Trp Tyr Tyr Phe Asn Glu Glu Gly Ala Met Lys Thr Gly Trp Val
65           70           75           80
Lys Tyr Lys Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp Ala Lys Glu Gly Ala Met
          85           90           95
Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp Gly Thr Gly Trp Tyr Tyr
          100          105          110
Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp Arg Pro Glu Leu Ala Ser Met
          115          120          125
Leu Asp Met Asp Leu Glu Gln Arg Ser Gln His Cys Lys Pro Glu Glu
          130          135          140
Gly Leu Glu Ala Arg Gly Glu Ala Leu Gly Leu Val Gly Ala Gln Ala
145          150          155          160
Pro Ala Thr Glu Glu Gln Glu Ala Ala Ser Ser Ser Ser Thr Leu Val
          165          170          175
Glu Val Thr Leu Gly Glu Val Pro Ala Ala Glu Ser Pro Asp Pro Pro
          180          185          190
Gln Ser Pro Gln Gly Ala Ser Ser Leu Pro Thr Thr Met Asn Tyr Pro
          195          200          205
Leu Trp Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Ser Ser Asn Gln Glu Glu Gly
          210          215          220
Pro Ser Thr Phe Pro Asp Leu Glu Ser Glu Phe Gln Ala Ala Leu Ser
225          230          235          240
Arg Lys Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Ala
          245          250          255
Arg Glu Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu Gly Ser Val Val Gly Asn
          260          265          270
Trp Gln Tyr Phe Phe Pro Val Ile Phe Ser Lys Ala Ser Ser Ser Leu
          275          280          285
Gln Leu Val Phe Gly Ile Glu Leu Met Glu Val Asp Pro Ile Gly His
          290          295          300
Leu Tyr Ile Phe Ala Thr Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu
305          310          315          320
Gly Asp Asn Gln Ile Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu

```

67	95956	68
325	330	335
Ala Ile Ile Ala Arg Glu Gly Asp Cys Ala Pro Glu Glu Lys Ile Trp		
340	345	350
Glu Glu Leu Ser Val Leu Glu Val Phe Glu Gly Arg Glu Asp Ser Ile		
355	360	365
Leu Gly Asp Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln His Phe Val Gln Glu Asn		
370	375	380
Tyr Leu Glu Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asp Pro Ala Cys Tyr Glu		
385	390	395
Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val		
405	410	415
Leu His His Met Val Lys Ile Ser Gly Gly Pro His Ile Ser Tyr Pro		
420	425	430
Pro Leu His Glu Trp Val Leu Arg Glu Gly Glu Glu Gly Gly His His		
435	440	445
His His His His His		
450		

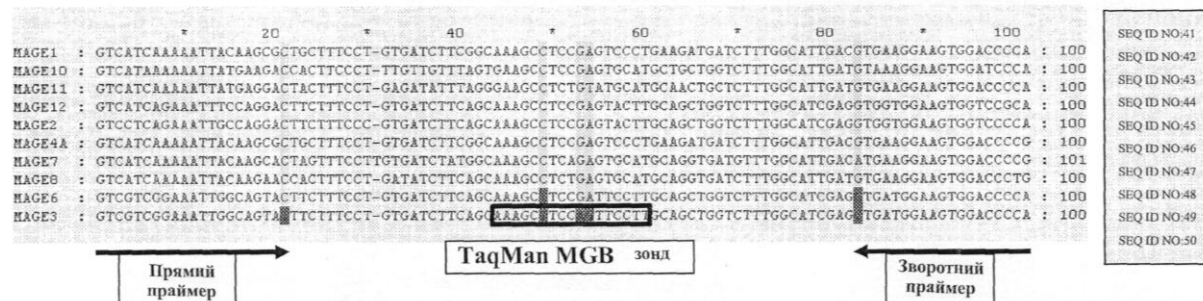
### Фігура 13

#### ДНК злитого білка CLYTA-MAGE3-His (SEQ ID NO:40)

atgaaagggg gaattgtaca ttcagacggc tcttatccaa aagacaagtt tgagaaaatc	60
aatggcaactt ggtactactt tgacagttca ggctatatgc ttgcagaccg ctggaggaag	120
cacacagacg gcaactggta ctggttcgac aactcaggcg aaatggctac aggctggaag	180
aaaatcgctg ataagtggta ctatttcaac gaagaaggtg ccatgaagac aggctgggtc	240
aagtacaagg acacttggtg ctacttagac gctaaagaag gcgccatggt atcaaatgcc	300
tttatccagt cagcggacgg aacaggctgg tactacctca aaccagacgg aacactggca	360
gacagggccag aattggccag catgctggac atggatctgg aacagcgtag tcagcactgc	420
aagcctgaag aaggccttga ggcccagga gaggccctgg gctggtggg tgcgcaggct	480
cctgctactg aggagcagga ggctgectcc tctcttctc ctctagttga agtcacctg	540
ggggaggtgc ctgctgccga gtcaccagat cctcccaga gtcctcaggg agcctccagc	600
ctcccacta ccatgaacta cctctctgag agccaatct atgaggactc cagcaaccaa	660
gaagaggagg ggccaagcac cttccctgac ctggagtctg agttccaagc agcactcagt	720
aggaaggtgg ccaagtgggt tcattttctg ctctcaagt atcgagccag ggagccggtc	780
acaaaggcag aaatgctggg gagtgtcgtc ggaaattggc agtacttctt tctgtgtatc	840
ttcagcaaaag ctctcgattc cttgcagctg gtctttggca tcgagctgat ggaagtggac	900
cccacgggc acgtgtacat ctttgccacc tgctggggc tctctacga tggcctgctg	960
ggtgacaatc agatcatgcc caagacaggc ttcttgataa tcatcctggc cataatcgca	1020
aaagagggcg actgtgcccc tgaggagaaa atctgggagg agctgagtgt gttagaggtg	1080
tittagaggga gggaagacag tatcttcggg gatcccaaga agctgctcac ccaatatttc	1140
gtgcaggaaa actacctgga gtaccggcag gtcccggca gtgacctgc atgctatgag	1200
ttctgtggg gtccaagggc cctcattgaa accagctatg tgaaagtcct gcaccatatg	1260
gtaaagatca gtggaggacc tcgcatttcc taccactcc tgcagagtgt ggctttgaga	1320
gagggggaag agggcggtca tcaccatcac catcaccatt aa	1362

Фігура 14

Порівняння послідовностей родини гена MAGE-A для конструювання RT-ПЛР праймерів та зонда для MAGE-A3. Порівняння послідовностей членів родини MAGE-A поблизу сайту RT-ПЛР праймерів, сконструйованих для TaqMan MGB RT-ПЛР. Зонд розміщений усередині амплікона. Оліонуклеотидні праймери та зонди призначені для гібридизації у ділянках найбільшої відмінності між MAGE-A3 та іншими членами родини. Прямий праймер є послідовністю SEQ ID NO:3; зворотний праймер є послідовністю SEQ ID NO:4, а зонд має послідовність SEQ ID NO:13

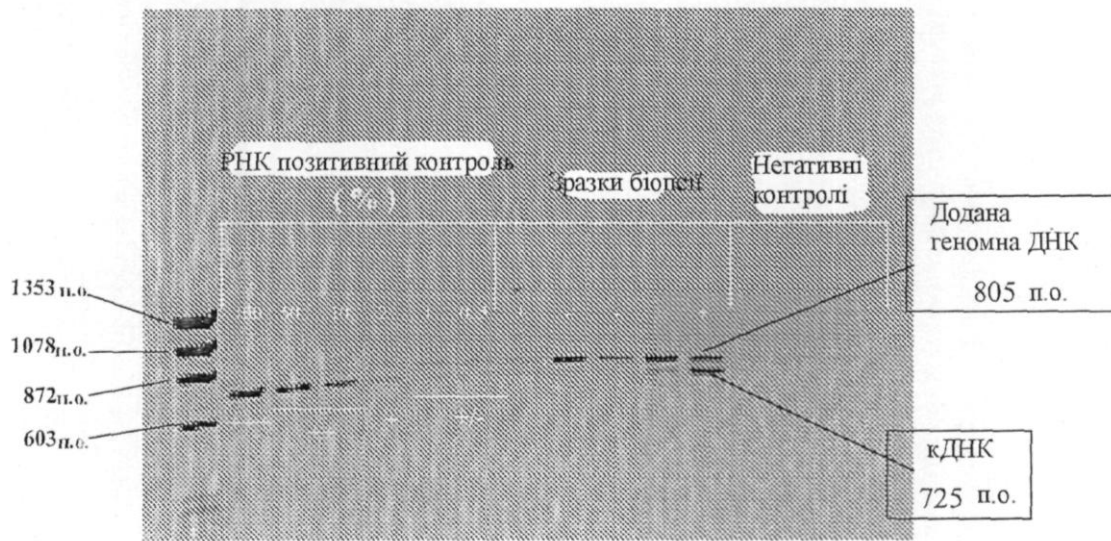


Фігура 15

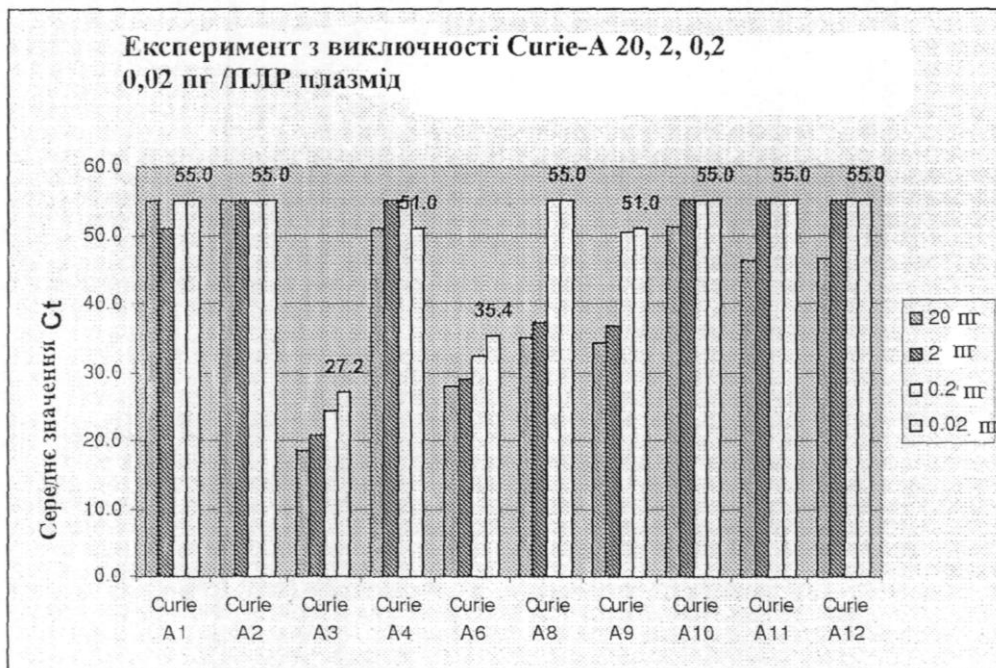
Порівняння MAGE-A3 (SEQ ID NO:51) та MAGE-A6 (SEQ ID NO:52)



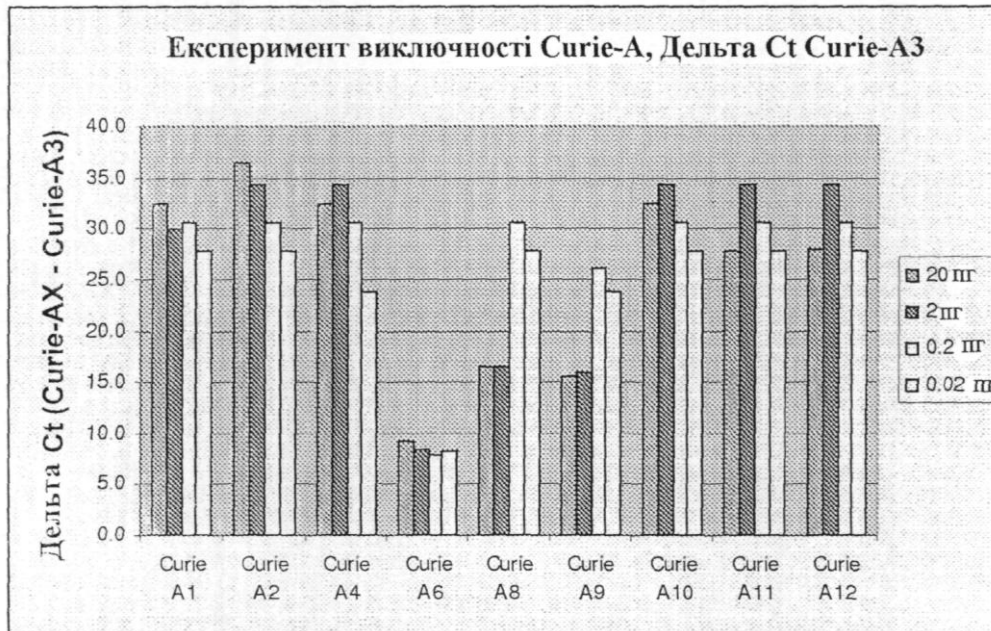
Фігура 16



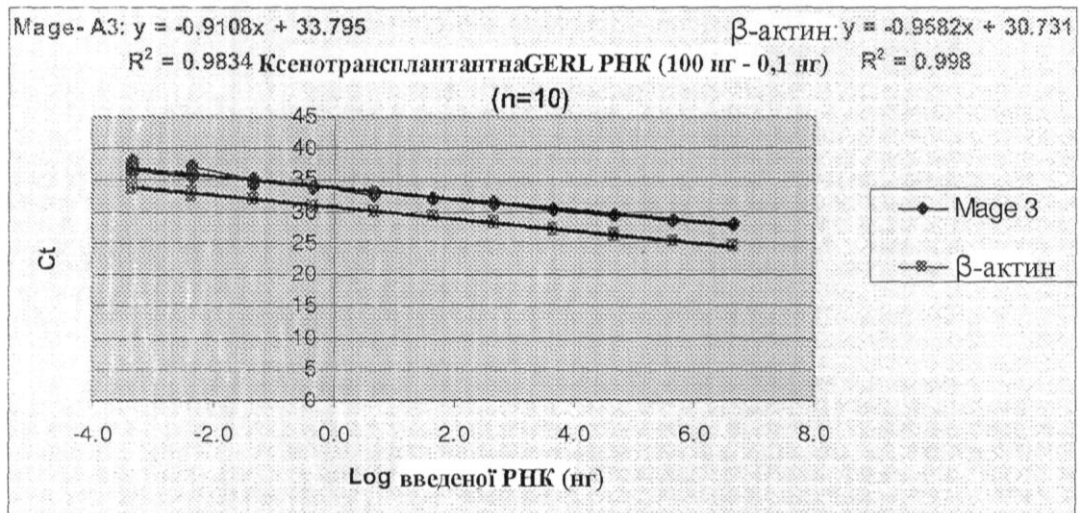
Фігура 17: Графічне порівняння значень Ct із MAGE-A плазмід при використанні 20, 2, 0,2 0,02 пг ДНК



Фігура 18: Графічне порівняння значень дельта Ct у порівнянні з MAGE-A3 для інших MAGE-A плазмід при використанні 20, 2, 0,2 0,02 пг ДНК

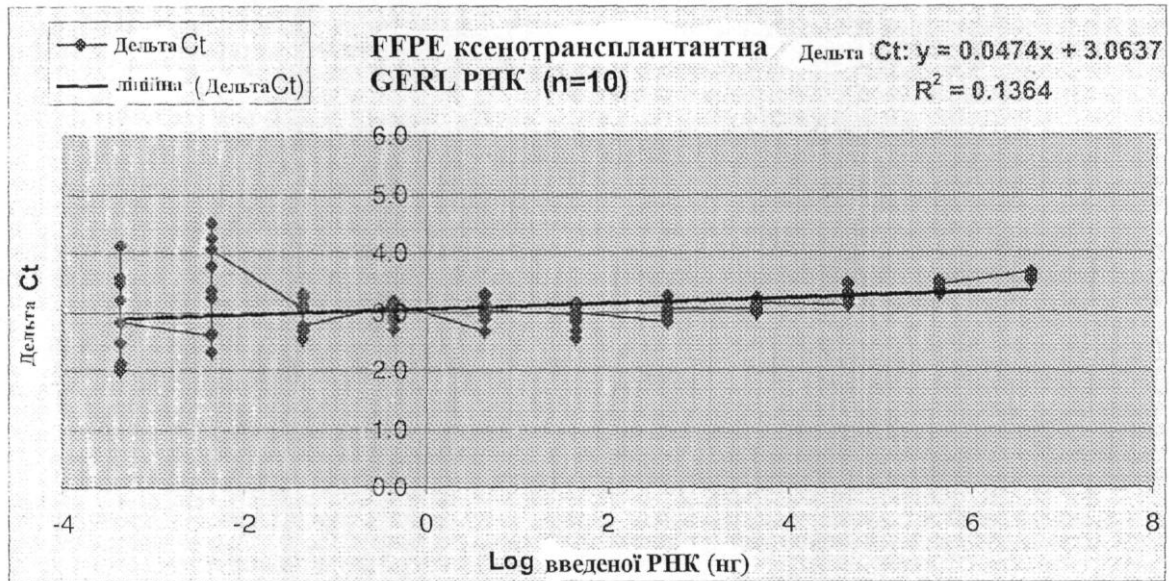


Фігура 19: Лінійність FFPE ксенотрансплантної GERL РНК - двократні серійні розведення від 100 до 0,1 нг внесеної РНК





Фігура 20: Залежність дельта Ct від log (основа 2) ведення РНК для FFPE ксенотрансплантатної GERL РНК



Таблиця 1. Олігонуклеотидні праймери, що використовуються для напівкількісної MAGE RT-ПЛР

SEQ ID NOs	Назва	Послідовність	Специфічність	Амплікон гДНК	мРНК
SEQ ID NO: 1	MAGE3-E2F	TGGAGGACCAGAGGCCCCC	MAGE-A3	805 п.о.	725 п.о.
SEQ ID NO: 2	MAGE3-E3R	GGACGATTATCAGGAGGCCTGC			
SEQ ID NO: 18	β-актин-E4F	GGCATCGTGATGGACTCCG	β-актин	615 п.о. + 615 п.о.	830 п.о.
SEQ ID NO: 19	β-актин-E6R	GCTGGAAGGTGGACAGCGA			

F-прямий, R-зворотний, п.о.- пар основ

Таблиця 2. Олігонуклеотидні праймери, що використовуються для TaqMan кількісної RT-ПЛР.

		Назва	Послідовність	Праймер	Барвник
Специфічні праймери для екзона 3 MAGE-A3					
SEQ ID NO: 3	E3 MAGE3 TMF	GTCGTCGGAAATTGGCAGTAT		Прямий	FAM; NFQ-MGB
SEQ ID NO: 4	E3 MAGE3 TMR	TGGGGTCCACTTCCATCAG		Зворотний	
SEQ ID NO: 13	E3 MAGE3 TMP	AAAGCTTCCAGTTCCTT		Зонд	
Специфічні праймери для інтрона 3 MAGE-A3					
SEQ ID NO: 5	I3 MAGE3 TMF	TAAGCCTTTGTTAGAGCCTCCAA		Прямий	NED; NFQ-MGB
SEQ ID NO: 6	I3 MAGE3 TMR	GGAGAGAGGGAGCATGTGAGA		Зворотний	
SEQ ID NO: 14	I3 MAGE3 TMP	TTCCATTTCAGTACTCAG		Зонд	
Специфічні для β-актину праймери					
SEQ ID NO: 20	β-актин- TMF	CTGGAACGGTGAAGGTGACA		Прямий	VIC; NFQ-MGB
SEQ ID NO: 21	β-актин- TMR	CGGCCACATTGTGAACTTTG		Зворотний	
SEQ ID NO: 22	β-актин- TMP	TGCTCGCTCCAACC		Зонд	

**Таблиця 3**

RT-ПЛР	TaqMan ПЛР		
	негативн.	позитивн.	загальн.
негативн.	40	0	40
позитивн.	3	28	31
загальн.	43	28	71

Таблиця 4

Значення Ct

	MAGE-3 екзон		MAGE-3 інтрон		β-актин	
	RG1	GSK	RG1	GSK	RG1	GSK
TC1	40.00	40.00	40.00	40.00	39.25	37.40
p815	34.07	33.94	40.00	40.00	33.22	32.76
GERL	31.77	31.38	34.45	33.83	23.11	22.69
CRL 1675	33.19	32.90	34.63	34.53	21.68	21.43
990118	33.11	32.99	35.13	34.23	23.63	23.17
990010	37.42	40.00	40.00	40.00	23.03	22.67
990101	35.81	36.10	37.94	38.57	23.86	23.48
990102	38.19	38.74	40.00	39.42	26.94	26.56
990133	кількість недостатня					
990152	35.97	37.61	39.22	38.44	23.36	23.00
990159	36.80	36.73	37.77	37.52	26.66	26.27
990784	35.90	38.13	36.77	37.90	26.54	26.09

Таблиця 5

SEQ ID NO	Послідовність Набір/пазва	Послідовність	5'-мітка	3'-мітка
	Набір1 (ds)			
15	MAGEA3-801Tmc	CAG GAG GCC TGC CTT	6-FAM	MGBNFQ
7	MAGEA3-775F	TGCTGGGTGACAATCAGATCAT	Розмір амплікона: 75 п.о.	
8	MAGEA3-849R	CGCCCTCTCTTGCGATTATG		
	Набір2 (ds)			
16	MAGEA3e-1000Tmc	TTCATAACATGCAGGATCAC	6-FAM	MGBNFQ
9	MAGEA3e-950F	CCAACATTTCTGTCAGGAA	Амплікон: 88 п.о. Tm 82 C	
10	MAGEA3e-1037R	CCTTGACCCACAGGAA		
	Набір3 (ds)			
17	MAGEA3f-651Tm	CCT GTG ATC TTC AGC AAA	6-FAM	MGBNFQ
11	MAGEA3f-623F	TGTCGTCGGAAATTGGCAGTAT	Розмір амплікона: 75 п.о. 79 C	
12	MAGEA3f-697R	CAAAGACCAGCTGCAAGGAACT		



Таблиця 7

Послідовності COBAS™ TaqMan MAGE-A3 праймера та зонда

Послідовності праймера COBAS™ TaqMan MAGE-A3	
MAGEA3F-623F: (HW_MAGEA3_F; SEQ ID NO: 11)	5'TGTCGTCGGAAATTGGCAGTAT3'
MAGEA3F-697R: (HW_MAGEA3_R; SEQ ID NO: 12)	5'CAAAGACCAGCTGCAAGGAACT3'
Послідовність COBAS™ TaqMan MAGE-A3 зонда	
MAGEA3F-646MOD SEQ ID NO: 53	5'-ELFLLFFLQGLGALFLLFAGFAAAGFLLFP-3'

E= FAM репортерний барвник, F= 5-метил dC, Q = BHQ2 гасник, L = 5-пропініл dU, P= фосфат, I = HEX репортер

Послідовність MAGEA3F-646MOD зонда включає наступні модифіковані нуклеотиди (SEQ ID NO:54):

5' - TCCTTCCTGTGATCTTCAGCAAAGCTTC - 3'

Таблиця 8

Послідовності COBAS TaqMan бета-актинового праймера та зонда

Послідовності бета-актинового TaqMan праймера	
RGI_BACT_F2: (SEQ ID NO: 55)	5'-GAGCGCGGCTACAGCTT-3'
RGI_BACT_R2: (SEQ ID NO: 56)	5'-TCCTTAATGTCACGCACGATTT-3'
Послідовність TaqMan бета-актинового зонда	
HW_RGIBACT_H: (SEQ ID NO:57)	5'-IACCACCAQCGGCCGAGCGGP-3'

E= FAM репортерний барвник, F= 5-метил dC, Q = BHQ2 гасник, L = 5-пропініл dU, P= фосфат, I = HEX репортер

Таблиця 9

Підтверджений інтервал для СТ зразка та контролю

Контролі	Підтверджений Ct інтервал
FFPET зразок Mage гену 50 нг FAM	<35,2
FFPET зразок бета-актинового гену 50 нг HEX	<32,1
100% Gerl Mage ген 50 нг FAM	26,0-29,5
100% Gerl бета-актиновий ген 50 нг HEX	24,0-27,0
1% Gerl Mage ген 0,5 нг FAM	33,0-35,5
1% Gerl бета-актиновий ген 0,5 нг HEX	29,0-32,5
100% UHR Mage ген 50 нг FAM	25,0-28,0
100% UHR бета-актиновий ген 50 нг HEX	22,0-25,0
1% UHR Mage ген 0,5 нг FAM	31,0-33,0
1% UHR бета-актиновий ген 0,5 нг HEX	27,0-29,0
P53 позитивний контроль ДНК 20 нг FAM	26,5-29,0
Негативний контроль (NC)	>38,0

Таблиця 10

Профіль термального циклу

ПЛР термальний профіль експерименту виключності MAGE-A3

Етапи	Опис	Температура	Час	Кількість
1	UNG деконтамінація	50°C	5 хв.	1X
2	Денатурація	95°C	15 сек.	2X
	Гібридизація	63°C	25 сек.	
3	Денатурація	92°C	15 сек.	53X
	Гібридизація	63°C	50 сек.	
4	Завершальний цикл	40°C	2 хв.	1X

Таблиця 11

RT-ПЛР термальний профіль для експериментів на лінійність та RT-ПЛР ефективність, аналітичну чутливість (границя визначення), спосіб кореляції та відтворюваність

Етапи	Опис	Температура	Час	Кількість
1	UNG деконтамінація	50°C	5 хв.	1X
2	Денатурація	95°C	1 хв.	1X
3	Зворотна транскрипція	60°C	20 хв.	1X
4	Денатурація	95°C	15 сек.	2X
	Гібридизація	63°C	25 сек.	
6	Денатурація	92°C	15 сек.	53X
	Гібридизація	63°C	50 сек.	
7	Завершальний цикл	40°C	2 хв.	1X

Відносно високу температуру гібридизації 63°C використовували для поліпшення MAGE-A3 специфічності відносно інших членів родини MAGE-A.

Таблиця 12: Ct значення з MAGE-A плазмід при використанні 20, 2, 0,2, 0,02 пг ДНК

Введення	Curie A1	Curie A2	Curie A3	Curie A4	Curie A6	Curie A8	Curie A9	Curie A10	Curie A11	Curie A12
20 пг	55.0	55.0	18.5	51.0	27.8	35.1	34.1	51.1	46.4	46.5
2 пг	50.9	55.0	20.7	55.0	29.1	37.2	36.7	55.0	55.0	55.0
0.2 пг	55.0	55.0	24.4	55.0	32.2	55.0	50.5	55.0	55.0	55.0
0.02 пг	55.0	55.0	27.2	51.0	35.4	55.0	51.0	55.0	55.0	55.0

Таблиця 13: Значення дельта Ct стосовно MAGE-A3 для інших MAGE-A плазмід при використанні 20, 2, 0,2, 0,02 пг ДНК

Введення	Curie A1	Curie A2	Curie A3	Curie A4	Curie A6	Curie A8	Curie A9	Curie A10	Curie A11	Curie A12
20 пг	32.6	36.5	0.0	32.5	9.3	16.6	15.6	32.6	27.8	28.0
2 пг	30.1	34.3	0.0	34.3	8.4	16.5	16.0	34.3	34.3	34.3
0.2 пг	30.6	30.6	0.0	30.6	7.8	30.6	26.1	30.6	30.6	30.6
0.02 пг	27.8	27.8	0.0	23.8	8.2	27.8	23.8	27.8	27.8	27.8

Таблиця 14: Експеримент підтвердження виключності MAGE-A3

Контроль	Прогон1	Прогон2	Прогон3	Прогон4	Прогон5	Прогон6	Прогон7	Прогон8
P53 (20пг)	28.3	28.3	28.6	28.2	28.4	28.5	28.6	28.5
NC	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0
NC	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0
NC	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0

Контрольні значення Ct були у межах підтвердженого інтервалу. Експеримент пройшов валідацію.

Таблиця 15 та Таблиця 16: Деталі експериментів щодо виключності MAGE-A3

Виріб/реагент	ID/серія
MMX (універсальна)	CW120406
праймер/зонд	JL011507
MgOAc MnOAc суміш	CW012607
p53 0.4 пг/мкл	120506HL
H <sub>2</sub> O	C08E41
P-1000	3250
P-200	3248
P-20	3244
біозахисна добавка	6

к-лоток	серія	СТМ48
72910	6004153	1093
72512	6004153	1093
72867	6004153	1012
72561	6004153	1012
78933	6004153	1074
78804	6004153	1074
78950	6004153	108
78852	6004153	108

Цифрові дані місця зберігання: J:\Дослідження по виявленню\генний профіль\GSK\IDE експеримент\MAGE виключність  
Згадування у робочому зошиті: HL38027, JL38664, KM34771

Таблиця 17: Лінійність Ct MAGE-A3 та  $\beta$ -актину та дельта Ct з 10 повторностей на 11 рівнях

Ксенотрансплантована GERL-b у воді (n=10)										
Розведення	Введена РНК (нг)	MAGE-A3			$\beta$ -актин			Дельта Ct		
		Av Ct	STD	%CV	Av Ct	STD	%CV	Дельта Ct	Stdev	%CV
1	100	28.0	0.097	0.35%	24.4	0.086	0.35%	3.6	0.05	1.47%
2	50	28.7	0.087	0.30%	25.3	0.044	0.17%	3.4	0.07	1.97%
3	25	29.6	0.100	0.34%	26.3	0.069	0.26%	3.3	0.11	3.30%
4	12.5	30.3	0.073	0.24%	27.2	0.070	0.26%	3.1	0.07	2.31%
5	6.25	31.4	0.126	0.40%	28.3	0.075	0.27%	3.1	0.14	4.61%
6	3.13	32.1	0.158	0.49%	29.2	0.034	0.12%	2.9	0.18	6.27%
7	1.56	33.1	0.219	0.66%	30.0	0.073	0.24%	3.0	0.19	6.41%
8	0.78	33.9	0.162	0.48%	31.0	0.057	0.18%	2.9	0.17	5.91%
9	0.39	34.9	0.347	0.99%	32.0	0.169	0.53%	3.0	0.27	9.02%
10	0.20	36.3	0.682	1.88%	33.0	0.223	0.68%	3.3	0.78	23.49%
11	0.10	36.9	0.745	2.02%	34.0	0.244	0.72%	2.9	0.73	25.04%

Таблиця 18: Ефективність RT-ПЛР ампліфікації MAGE-A3 та  $\beta$ -актину

Введення РНК 100 - 0,1 нг	Нахил	АЕ	% ефективності
MAGE-A3	-0.9108	2.14	107.0
$\beta$ -актин	-0.9582	2.06	103.1

Таблиця 19: Експеримент по підтвердженню лінійності / ефективності RT-ПЛР

NC	Прогон1	Прогон2	Прогон3	Прогон4	Прогон5	Прогон6	Прогон7	Прогон7	Прогон7	Прогон7
MAGE-FAM	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0
MAGE-FAM	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0
MAGE-FAM	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	NA
MAGE-FAM	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	NA
$\beta$ -актин-HEX	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0
$\beta$ -актин-HEX	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0
$\beta$ -актин-HEX	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	NA
$\beta$ -актин-HEX	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	NA

Контрольні Ct були у межах затвердженого інтервалу. Експеримент пройшов валідацію.

Таблиці 20, 21 та 22: Деталі експериментів з лінійності / ефективності RT-ПЛР

Реагенти для ізоляції	Номер серії	Дата закінчення строку зберігання
Буфер PKD	121100445	01/2007
Протеїназа К	12199252	01/2007
Буфер RBC	12199582	01/2007
Колонка для видалення гДНК	12198612	01/2007
Етанол	64209 (Sigma)	01/2007
Колонка RNeasy MinElute	121100265	01/2007
ДНКаза I	12411639	01/2007
RDD	11877821	01/2007
Буфер RWT	Дослідна серія	01/2007
Буфер RPE	12199510	01/2007
Вода без РНКаз	12199577	01/2007

Виріб/реагент	ID/ серія
ММХ (універсальна)	CW120406
праймер/зонд	JL011507
MgOAc MnOAc суміш	HW121906
Gerl-b	11507
Stac-b	11507
UHR	760380
H <sub>2</sub> O	C08E41
P-1000	3250
P-200	3248
P-20	3244
біозахисна добавка	6

к-лоток	серія	СТМ48
78848/78790	6004153	1012
78817/78864	6004153	1069
72893/72957	6004153	1071
78944/78871	6004153	105
78793/78813	6004153	1067
78847/78919	6004153	1072
79010	6004153	1074

Цифрові дані місця зберігання: J:\Дослідження по виявленню/генний профіль\GSK\IDE експеримент\лінійність\RMS  
Згадування у робочому зошиті: JL38664, KM34771

Таблиця 23: Значення Ct попадання для MAGE-A3, N = 24 для кожної умови

Загальна кількість введення	0.5%Gerl 99.5%Stac	1%Gerl 99%Stac	5%Gerl 95%Stac
12.5 нг	0/24	4/24	24/24
25 нг	6/24	20/24	24/24
50 нг	23/24	24/24	24/24
100 нг	18/24	24/24	24/24

Таблиця 24: Процентне значення попадання Ct для MAGE-A3, N = 24 для кожної умови

Загальна кількість введення	0.5%Gerl 99.5%Stac	1%Gerl 99%Stac	5%Gerl 95%Stac
12.5нг	0%	16.7%	100%
25 нг	25%	83.3%	100%
50 нг	95.8%	100%	100%
100нг	75%	100%	100%

Таблиця 25: Значення Ct попадання для  $\beta$ -актину, N = 24 для кожної умови

Загальна кількість введення	0.5%Gerl 99.5%Stac	1%Gerl 99%Stac	5%Gerl 95%Stac
12.5 нг	24/24	24/24	24/24
25 нг	24/24	24/24	24/24
50нг	24/24	24/24	24/24
100нг	24/24	24/24	24/24

Таблиця 26: Процентне значення Ct попадання для  $\beta$ -актину, N = 24 для кожної умови

Загальна кількість введення	0.5%Gerl 99.5%Stac	1%Gerl 99%Stac	5%Gerl 95%Stac
12.5нг	100%	100%	100%
25нг	100%	100%	100%
50нг	100%	100%	100%
100нг	100%	100%	100%

Таблиця 27: FAM контроль Ct для гена MAGE

Контроль	Прогон1С	Прогон1Д	Прогон1А	Прогон1Б	Прогон1С	Прогон1Д	Прогон1А	Прогон1Б	Прогон1С	Прогон1Д	Прогон1А	Прогон1Б	Прогон1С	Прогон1Д	Прогон1А	Прогон1Б	Прогон1С	Прогон1Д	Прогон1А	Прогон1Б
1% Gerl	33.20	33.73	33.29	33.01	33.60	34.03	33.34	33.08	33.34	33.50	33.11	33.55	34.96	34.21	34.21	34.21	34.21	34.21	34.21	34.21
1%UHR	32.00	31.79	32.28	31.87	31.79	32.03	31.92	31.69	31.60	31.64	31.57	31.89	31.87	31.70	31.96	31.91	31.91	31.91	31.91	31.91
100% Gerl	27.35	27.31	27.36	27.34	27.38	27.57	27.76	27.62	28.04	27.51	27.75	28.02	27.83	27.60	27.82	28.05	28.05	28.05	28.05	28.05
100% UHR	25.33	25.34	25.39	25.31	25.34	25.48	25.85	25.44	25.92	25.63	25.65	25.76	26.06	25.92	25.97	26.20	26.20	26.20	26.20	26.20
NC	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0

Таблиця 28: HEX контроль Ct для  $\beta$ -актину

Контроль	Прогон1С	Прогон1Д	Прогон1А	Прогон1Б	Прогон1С	Прогон1Д	Прогон1А	Прогон1Б	Прогон1С	Прогон1Д	Прогон1А	Прогон1Б	Прогон1С	Прогон1Д	Прогон1А	Прогон1Б	Прогон1С	Прогон1Д	Прогон1А	Прогон1Б
1% Gerl	36.30	30.81	30.76	29.65	30.56	30.83	30.55	30.46	30.44	30.68	30.41	30.93	31.47	31.58	31.39	31.23	31.23	31.23	31.23	31.23
1%UHR	27.58	27.39	27.75	27.74	27.90	27.71	27.62	27.52	27.43	27.62	27.28	27.31	27.82	27.65	27.64	27.71	27.71	27.71	27.71	27.71
100% Gerl	24.82	24.57	24.74	24.71	24.70	24.93	25.07	24.76	25.41	24.82	25.00	25.23	25.04	24.89	25.04	25.15	25.15	25.15	25.15	25.15
100% UHR	22.21	22.18	22.22	22.20	22.16	22.36	22.63	22.28	22.83	22.59	22.41	22.45	22.92	22.67	22.71	22.99	22.99	22.99	22.99	22.99
NC	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0

Контрольні значення Ct були у межах затвердженого інтервалу. Експеримент пройшов валідацію.



Таблиця 29; Таблиця 30 та Таблиця 31: Деталі експерименту з визначення границі визначення

Реагенти для ізоляції Gerl & Stac	Номер серії	Дата закінчення строку зберігання
Буфер PKD	121100445	12/14/2007
Протеїназа К	12199252	12/11/2007
Буфер RBC	124101094	12/18/2007
Колонка для видалення гДНК	12198612	12/15/2007
Етанол	06H07GA	2/15/2008
Колонка RNeasy MinElute	121100265	12/6/2007
ДНКаза I	124119201	12/6/2007
RDD	124115915	12/6/2007
Буфер RWT	124114997	12/18/2007
Буфер RPE	12199510	12/15/2007
Вода без РНКаз	12199577	12/15/2007

Виріб/реагент	ID/серія
ММХ (універсальна)	CW120406
праймер/зонд	JL011507
MgOAc MnOAc суміш	CW012607
H <sub>2</sub> O	C08E41
UHR	760380
GERL	RGI 12307
STAC	RGI 12307
P-1000	3302
P-1000	3303
P-1000	3304
P-1000	3250
P-1000	3369
P-1000	1499
P-200	3308
P-200	3248
P-200	3305
P-200	1506
P-20	3245
P-20	3301
P-20	3244
ELPH-200	3313
ELPH-1000	3369
біозахисна добавка	4,5,6,1574

к-лотов	серія	СТМ48
78839/78841	6004153	1012
78856/78870	6004153	105
71641/71692	6004153	1012
78920/71697	6004153	1092
71755/71690	6004153	105
71659/71630	6004153	1093
54608/54631	6004153	1012
54671/54677	6004153	101
54580/54649	6004153	105
54587/54282	6004153	1092
54592/54619	6004153	1012
54481/54585	6004153	105

Цифрові дані місця зберігання: J:\Дослідження по виявленню/генний профіль\GSK\IDE експеримент\LOD експеримент  
Згадування у робочому зошиті: JL38664, LC38028, HL38027, KM38662, HL38661

Таблиця 32: Перехресна валідація сумарних зразків

Результати перехресної валідації	COBAS	Прототип
Загальні зразки, доступні для аналізу	131	131
Зразок без гДНК	123	123
Зразки OOR	4	10
Зразки з недостатньою кількістю РНК	2	5
Зразки, що залишилися	117	108

OOR = експресія MAGE-A3, що перевищує поріг, але Ct MAGE-A3 знаходиться за межами прийнятного інтервалу  
Зразки з недостатньою кількістю РНК = Ct β-актину за межами прийнятного інтервалу

Таблиця 33: Аналізи COBAS та прототипу позитивних та негативних зразків шляхом порівняння проценту відповідності

прототип проти COBAS	COBAS позитивний	COBAS негативний
прототип позитивний	59	5
прототип негативний	4	39

98/107 91,6% відповідність

Позитивн. при порівнянні згідно з процентом відповідності 59/64 або 92,2%

Негативн. при порівнянні згідно з процентом відповідності 39/43 або 90,7%

Таблиця 34: Аналізи COBAS та прототипу позитивних та негативних зразків шляхом порівняння проценту відповідності із замороженим зразком для розділення суперечливих результатів

RGI проти RMS GSK результатів для розділення суперечливих результатів	RMS позитивний	RMS негативний
RGI позитивний	63	1
RGI негативний	1	42

105/107 98,1 % відповідність

Позитивн. при порівнянні згідно з процентом відповідності 63/64 або 98,4%

Негативн. при порівнянні згідно з процентом відповідності 42/43 або 97,7%

Таблиця 35: Експеримент з визначення контролю Ct MAGE гена

Контроль	Прогон1	Прогон2	Прогон3	Прогон4	Прогон5	Прогон6	Прогон7	Прогон8	ПрогонA	ПрогонB	Прогон7RX
1%Gerl	34.25	34.12	34.25	33.56	33.95	34.10	34.39	34.12	33.89	34.34	33.67
1%Gerl	33.58	34.27	34.18	33.57	34.42	34.37	34.22	34.20	33.80	33.54	NA
100%Gerl	27.49	27.63	27.64	27.61	27.58	27.80	29.10	27.67	27.45	27.71	27.84
100%Gerl	27.57	27.65	27.98	27.82	27.85	27.77	28.34	27.80	27.41	27.81	NA
1%UHR	31.52	31.51	31.78	32.24	32.21	32.47	32.76	31.99	31.85	32.13	32.19
1%UHR	31.24	31.96	32.12	32.28	32.31	32.50	32.27	32.03	32.12	31.99	NA
100&UHR	25.46	25.50	25.44	25.49	25.60	25.43	27.18	25.96	25.35	25.70	26.06
100%UHR	25.50	25.50	25.68	25.57	25.54	25.54	26.54	25.75	25.34	25.74	NA
NC	>38	>38	>38	>38	>38	>38	>38	>38	>38	>38	>38
NC	>38	>38	>38	>38	>38	>38	>38	>38	>38	>38	NA

Таблиця 36: Експеримент з визначення контролю Ct гена  $\beta$ -актину

Контроль	Прогон1	Прогон2	Прогон3	Прогон4	Прогон5	Прогон6	Прогон7	Прогон8	ПрогонA	ПрогонB	Прогон7RX
1%Gerl	31.08	31.09	31.06	31.08	31.42	31.33	31.94	31.36	31.15	31.53	31.12
1%Gerl	30.91	31.84	31.03	31.02	32.02	31.47	31.39	30.74	31.10	31.04	NA
100%Gerl	24.88	24.95	24.86	25.15	25.03	25.15	26.87	24.93	24.84	25.07	25.06
100%Gerl	24.80	24.63	25.07	25.13	25.17	25.07	25.98	24.57	24.68	25.16	NA
1%UHR	27.50	27.65	27.82	28.03	28.33	28.61	28.49	27.80	28.10	28.14	28.06
1%UHR	27.31	27.95	27.95	28.03	28.41	28.37	28.47	27.39	28.08	28.07	NA
100&UHR	22.50	22.33	22.37	22.39	22.51	22.44	24.35	22.71	22.19	22.50	22.97
100%UHR	22.36	22.32	22.58	22.44	22.36	22.40	23.59	22.40	22.22	22.57	NA
NC	>38	>38	>38	>38	>38	>38	>38	>38	>38	>38	>38
NC	>38	>38	>38	>38	>38	>38	>38	>38	>38	>38	NA

Контрольні Ct у межах затвердженого інтервалу. Експеримент пройшов валідацію.



Таблиці 37, 38 та 39: Деталі експерименту способу кореляції / перехресної валідації

Реагенти для ізоляції	Номер серії	Дата закінчення строку зберігання
Буфер PKD	121100445	12/14/2007
Протеїназа К	12199252	12/11/2007
Буфер RBC	124101094	12/18/2007
Колонка для видалення гДНК	12198612	12/15/2007
Етанол	06A49GA	8/14/2007
Колонка RNeasy MinElute	121100265	12/6/2007
ДНКаз I	124119201	12/6/2007
RDD	124115915	12/6/2007
Буфер RWT	124114997	12/18/2007
Буфер RPE	12199510	12/15/2007
Вода без РНКаз	12199577	12/15/2007

Виріб/реагент	ID/серія
MMX (універсальна)	CW120406
праймер/зонд	JL011507
MgOAc MnOAc суміш	CW012607
H <sub>2</sub> O	C08E41
UHR	760380
GERL	RGI 12307
STAC	RGI 12307
P-200	3248
P-200	3305
P-200	3308
P-20	3244
P-20	3245
P-20	3301
P-2	3307
P-1000	3303
P-1000	3304
P1000	3250
P-10	3306
ELPH P-1000	3314
біохалсна добавка	4,5,6

к-лоток	серія	СТМ48
72568/72637	6004153	1092
72993/72552	6004153	1095
72498/72495	6004153	105
72583/72540	6004153	1092
72490/72596	6004153	1093
72590/72641	6004153	1012
73016/72592	6004153	1069
72930/78783	6004153	1071
72620/72541	6004153	1012
72530/75252	6004153	1067
54581	6004153	1012

Цифрові дані місця зберігання: J:\Дослідження по виявленню генний профіль\GSK\IDE експеримент\перехресна валідація  
Згадування у робочому зошиті: JL38664, LC38028, HL38027, KM38662, KM34771

Таблиця 40: Прогон 1- поріг експресії MAGE-A3 з контролів GERL РНК

Контроль GERL РНК	100% β-актин	1% Curie	ДельтаCt	Поріг Curie-A3
Повторність 1	24.56	33.48	-8.92	2.06E-03
Повторність 2	24.47	33.29	-8.82	2.21E-03
Середнє значення	24.51	33.39	-8.87	2.13E-03

Таблиця 41: Прогон 1 - сигнал експресії MAGE-A3 для зразків відтворюваності

№ доступу RGI	Зразок	Ct Mage A3	Ct β-актину	Дельта	Експресія	% Gerl	Сигнал Mage
AGG-07-0000580	990105	46.0	24.4	-21.6	3.25383E-07	0.00	негативн.
AGG-07-0000580	990105	36.3	24.5	-11.9	0.000268087	0.13	негативн.
AGG-07-0000581	990112	46.0	24.3	-21.7	2.96142E-07	0.00	негативн.
AGG-07-0000581	990112	36.5	24.4	-12.1	0.000226088	0.11	негативн.
AGG-07-0000582	990116	36.6	26.2	-10.3	0.000770965	0.36	негативн.
AGG-07-0000582	990116	36.0	26.0	-10.1	0.000936414	0.44	негативн.
AGG-07-0000583	990117	46.0	23.6	-22.4	1.8283E-07	0.00	негативн.
AGG-07-0000583	990117	37.7	23.6	-14.1	5.75628E-05	0.03	негативн.
AGG-07-0000584	990131	36.1	25.8	-10.3	0.000804481	0.38	негативн.
AGG-07-0000584	990131	36.2	25.7	-10.5	0.000692747	0.32	негативн.
AGG-07-0000585	990619	32.9	25.4	-7.5	0.005560602	2.61	позитивн.
AGG-07-0000585	990619	33.1	25.5	-7.7	0.004921188	2.31	позитивн.
AGG-07-0000586	991157	29.2	22.2	-7.0	0.007818891	3.66	позитивн.
AGG-07-0000586	991157	29.3	22.3	-7.0	0.007812905	3.66	позитивн.
AGG-07-0000587	991158	26.4	24.4	-2.0	0.250968781	117.61	позитивн.
AGG-07-0000587	991158	26.4	24.3	-2.1	0.238331954	111.69	позитивн.
AGG-07-0000588	990130	29.0	25.4	-3.6	0.081955519	38.41	позитивн.
AGG-07-0000588	990130	29.2	25.6	-3.6	0.083954419	39.34	позитивн.
AGG-07-0000589	990136	28.3	24.8	-3.5	0.087129355	40.83	позитивн.
AGG-07-0000589	990136	28.2	24.7	-3.6	0.084384326	39.54	позитивн.
AGG-07-0000590	395	31.3	24.1	-7.3	0.006411876	3.00	позитивн.
AGG-07-0000590	395	31.5	24.1	-7.5	0.005674828	2.66	позитивн.
AGG-07-0000591	512	28.6	24.5	-4.1	0.057999545	27.18	позитивн.
AGG-07-0000591	512	28.6	24.4	-4.2	0.053251449	24.95	позитивн.

Таблиця 42: Прогон 2 - поріг експресії MAGE-A3 з контролів GERL РНК

Контроль GERL РНК	100% β-актин	1% Curie	Дельта Ct	Поріг Curie-A3
Повторність 1	25.11	34.05	-8.94	2.04E-03
Повторність 2	25.32	34.18	-8.86	2.15E-03
Середнє значення	25.21	34.11	-8.90	2.09E-03

Таблиця 43: Прогон 2 - сигнал експресії MAGE-A3 для зразків відтворюваності

№ доступу RGI	Зразок	Ct Mage A3	Ct β-актину	Дельта	Експресія	% Gerl	Сигнал Mage
AGG-07-0000568	990105	36.1	26.1	-10.0	0.001006688	0.48	негативн.
AGG-07-0000568	990105	46.0	26.1	-19.9	1.0005E-06	0.00	негативн.
AGG-07-0000569	990112	46.0	26.1	-19.9	9.96715E-07	0.00	негативн.
AGG-07-0000569	990112	36.8	26.2	-10.5	0.000674353	0.32	негативн.
AGG-07-0000570	990116	36.9	27.2	-9.7	0.001187625	0.57	негативн.
AGG-07-0000570	990116	36.6	27.0	-9.6	0.001318477	0.63	негативн.
AGG-07-0000571	990117	35.7	24.6	-11.0	0.000474819	0.23	негативн.
AGG-07-0000571	990117	34.8	24.7	-10.1	0.000887085	0.42	негативн.
AGG-07-0000572	990131	46.0	26.5	-19.5	1.3292E-06	0.00	негативн.
AGG-07-0000572	990131	46.0	26.3	-19.7	1.17885E-06	0.00	негативн.
AGG-07-0000573	990619	34.6	28.5	-6.1	0.014100789	6.74	позитивн.
AGG-07-0000573	990619	34.1	28.7	-5.5	0.022281952	10.65	позитивн.
AGG-07-0000574	991157	31.1	23.3	-7.8	0.004582971	2.19	позитивн.
AGG-07-0000574	991157	31.1	23.5	-7.6	0.005138918	2.46	позитивн.
AGG-07-0000575	991158	28.8	25.6	-3.2	0.108292659	51.75	позитивн.
AGG-07-0000575	991158	28.9	25.6	-3.3	0.102863278	49.15	позитивн.
AGG-07-0000576	990130	31.1	26.4	-4.7	0.039418402	18.84	позитивн.
AGG-07-0000576	990130	31.3	26.7	-4.6	0.040843351	19.52	позитивн.
AGG-07-0000577	990136	31.8	27.0	-4.8	0.034810768	16.63	позитивн.
AGG-07-0000577	990136	31.6	26.8	-4.8	0.035601088	17.01	позитивн.
AGG-07-0000578	395	33.6	25.6	-8.0	0.004032587	1.93	позитивн.
AGG-07-0000578	395	33.0	25.3	-7.6	0.005000295	2.39	позитивн.
AGG-07-0000579	512	31.2	25.6	-5.6	0.020284412	9.69	позитивн.
AGG-07-0000579	512	31.2	25.4	-5.8	0.018051401	8.63	позитивн.

Таблиця 44: Підтвердження відтворюваності

Контроль	Прогон 1 Контроль Ct		Прогон 2 Контроль Ct	
	Ct MAGE	Ct β-актину	Ct MAGE	Ct β-актину
100% Gerl	26.5	24.6	28.1	25.1
100% Gerl	26.5	24.5	28.3	25.3
1% Gerl	33.5	32.2	34.0	30.5
1% Gerl	33.3	31.9	34.2	30.6
100% UHR	24.8	21.3	26.1	22.8
100% UHR	24.6	21.2	26.3	23.0
1% UHR	31.6	28.6	32.1	27.3
1% UHR	31.6	28.5	32.0	27.3
NC	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0
NC	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0

Контрольні Ct у межах затвердженого інтервалу. Експеримент пройшов валідацію.

Таблиці 45, 46 та 47: Деталі експерименту з відтворюваності

Реагенти для ізоляції Прогон 1	Номер серії	Дата закінчення строку зберігання
Буфер PKD	121100445	12/14/2007
Протеїназа К	12199252	12/11/2007
Буфер RBC	124101094	12/18/2007
Колонка для видалення гДНК	12198612	12/15/2007
Етанол	06H07GA	2/15/2008
Колонка RNeasy MinElute	121100265	12/6/2007
ДНКаза I	124119201	12/6/2007
RDD	124115915	12/6/2007
Буфер RWT	124114997	12/18/2007
Буфер RPE	12199510	12/15/2007
Вода без РНКаз	12199577	12/15/2007

Реагенти для ізоляції Прогон 2	Номер серії	Дата закінчення строку зберігання
Буфер PKD	124113180	2/15/2008
Протеїназа К	124125018	2/15/2008
Буфер RBC	124114320	2/15/2008
Кол. для видал. гДНК	124125864	2/15/2008
Етанол	06H07GA	2/15/2008
Кол. RNeasy MinElute	124123928	2/15/2008
ДНКаза I	124124041	2/15/2008
RDD	124122839	2/15/2008
Буфер RWT	124123852	2/15/2008
Буфер RPE	124119688	2/15/2008
Вода без РНКаз	124123699	2/15/2008

Ві проб/реагент	ID/ серія
IMX (універсальна)	CW120406
праймер/зонд	JL011507
MgOAc MnOAc суміш	CW012607
H <sub>2</sub> O	C08E41
H <sub>2</sub> O	EMD Lot# 46201
UHR	260400
UHR	760380
GERL	RGI 12307
STAC	RGI 12307
Rainin PipetLite P-1000	3302
Rainin PipetLite P-200	3307
Rainin PipetLite P-20	3244
Rainin PipetLite P-10	3306
Rainin PipetLite P-1000	3303
Rainin PipetLite P-200	3305
Rainin PipetLite P-2	3307
біохімічна добавка	4,5

к-лоток	серія	СТМ48
54562/54586	6004153	102
54669/54591	6004153	105

Цифрові дані місця зберігання: J:\Дослідження по виявленню генний профіль\GSK\IDE експеримент\Відтворюваність.  
Згадування у робочому зошиті: JL38664, LC38028, KM38662