

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 513**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07786793 .5**

96 Fecha de presentación: **21.06.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2041308**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

54 Título: **Procedimiento para la detección y el diagnóstico del cáncer que implica cebadores y sondas para la detección específica del marcador MAGE-A3**

30 Prioridad:  
**21.06.2006 GB 0612342**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.10.2012**

73 Titular/es:  
**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)  
RUE DE L'INSTITUT 89  
1330 RIXENSART, BE**

72 Inventor/es:  
**COCHE, THIERRY;  
GRUSELLE, OLIVIER;  
BEER, GABRIELE, ANNE-MARIE;  
SALONGA, DENNIS y  
STEPHENS, CRAIG, LAWRENCE**

74 Agente/Representante:  
**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 389 513 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección y el diagnóstico del cáncer que implica cebadores y sondas para la detección específica del marcador MAGE-A3

**Campo de la Invención**

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico para la detección de MAGE-A3.

**Antecedentes de la Invención**

La familia de genes MAGE (antígeno del Melanoma) se identificó originalmente debido al reconocimiento de los linfocitos citolíticos derivados de linfocitos de sangre de pacientes con cáncer (Van der Bruggen y col., 1991). La familia de genes MAGE comprende actualmente más de 20 miembros y está constituida por los genes MAGE A, B, C y D (Scanlan y col., (2002) Immunol Rev. 188:22-32; Chomez y col., (2001) Cancer Res. 61(14):5544-51). Estos están agrupados en el cromosoma X (Lucas y col., 1998 Cancer Res. 58:743-752; Lucas y col., 1999 Cancer Res 59:4100-4103; Lucas y col., 2000 Int J Cancer 87:55-60; Lurquin y col., 1997 Genomics 46:397-408; Muscatelli y col., 1995 Proc Natl Acad Sci E.U.A., 92:4987-4991; Pold y col., , 1999 Genomics 59: 161-167; Rogner y col., 1995 Genomics 29:725-731), y tienen una función aún no definida (Ohman y col., 2001 Exp Cell Res. 265(2): 185-94). Los genes MAGE son altamente homólogos y los miembros de la familia MAGE-A, especialmente, tienen una homología entre 60 - 98 %. Los genes MAGE no se expresan en todas las células normales salvo en las espermatogonias y en la placenta (Haas y col., 1988 Am J Reprod Immunol Microbiol 18:47-51; Takahashi y col., 1995 Cancer Res 55:3478-382).

La re-activación de la expresión de los genes MAGE en el cáncer se debe en parte a una desmetilación anómala del promotor (De Smeets y col., 1996 Proc Natl Acad Sci E.U.A., 93(14):7149-53; De Smeets y col., 1999 Mol Cell Biol. 19(11):7327-35). Los 12 genes MAGE-A se sobre-expresan de forma variable en los siguientes cánceres: carcinoma de células transicionales, carcinoma esofágico, melanoma, carcinoma de vejiga y carcinoma pulmonar no microcítico (NSCLC) (Scanlan y col., 2002 Immunol Rev. 188:22-32). La sobre-expresión y especificidad de la expresión de MAGE en tejidos cancerosos, ha conducido a que la proteína MAGE-A3 se utilice para vacunas contra el cáncer (Scanlan y col., 2002 Immunol Rev. 188:22-32). Sin embargo, debido al amplio intervalo de expresión encontrado en pacientes con cáncer, el nivel de expresión de MAGE-A3 debe calcularse exactamente en cada paciente para dirigir la vacunación hacia pacientes que expresan la proteína. Con frecuencia la proteína MAGE-A3 se denomina indistintamente MAGE-3; ambos términos se usan en la presente invención.

*Melanoma*

Los pacientes que presentan melanoma maligno en metástasis distante (fase IV de acuerdo con la clasificación del Comité de Unión Americana en Cáncer (American Joint Committee on Cancer (AJCC)) tienen un tiempo de supervivencia promedio de un año, con un índice de supervivencia a largo plazo únicamente del 5 %. Incluso la quimioterapia convencional para el melanoma en fase IV tiene índices de respuesta terapéuticos únicamente del 8-25 %, pero sin efecto en la supervivencia general. Los pacientes con metástasis regionales (fase III) tienen una supervivencia promedio de dos a tres años con muy poca oportunidad de supervivencia a largo plazo, incluso después de un control quirúrgico adecuado de las metástasis primarias y regionales (Balch y col., 1992 Semin Surg Oncol. 8(6):400-14). La mayoría de los pacientes con melanoma en fase I a III tienen su tumor extirpado quirúrgicamente, aunque estos pacientes mantienen un riesgo sustancial de recaída. Por lo tanto sigue existiendo una necesidad para prevenir el avance del melanoma, y de tener regímenes de tratamiento mejorados para el melanoma metastásico y tratamientos complementarios para pacientes que han tenido un tumor primario extirpado.

*Cáncer de pulmón*

Existen dos tipos de cáncer de pulmón; el cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC, por las siglas en inglés *Non-Small Cell Lung Cancer*) y el cáncer pulmonar microcítico (SCLC, por las siglas en inglés *Small Cell Lung Cancer*). Los nombres simplemente describen el tipo de célula encontrada en los tumores. El NSCLC incluye carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, y carcinoma de células grandes y representa aproximadamente el 80 % de los cánceres de pulmón. El NSCLC es difícil de curar y los tratamientos disponibles tienden a tener el objetivo de prolongar la vida hasta donde sea posible y aliviar los síntomas de la enfermedad. El NSCLC es el tipo más común de cáncer de pulmón y se asocia con malos resultados. De todos los pacientes con NSCLC, aproximadamente el 25 % tiene una enfermedad loco-regional en el momento del diagnóstico y aún son candidatos de extirpación quirúrgica (fases IB, II A o IIB de acuerdo con la clasificación del AJCC). Sin embargo, más del 50 % de estos pacientes recaerán dos años después de la resección quirúrgica total. Por lo tanto existe la necesidad de proporcionar un mejor tratamiento para estos pacientes.

*Expresión de MAGE-A3*

Anteriormente, diversos procedimientos han intentado medir la expresión de los genes MAGE-A3 tanto dentro de líneas celulares como de muestras de tumor. Se han usado técnicas por RT-PCR semi-cuantitativa (De Plaen y col., 1994 Immunogenetics 40(5):360-9), otras técnicas basadas en PCR y también en micromatrices de baja densidad

(Zammatteo y col., 2002 Clinical Chemistry 48(1) 25-34). Sin embargo, en muchos de estos estudios, un problema principal ha sido la muy alta homología entre los miembros de la familia MAGE que producen positivos falsos. Para pruebas amplias de Fase II y III, se desea un ensayo cuantitativo de alto rendimiento, que sea capaz de identificar específicamente muestras que expresen MAGE-A3 y de reducir la probabilidad de muestras falsamente positivas en ensayos.

Otra dificultad surge con el uso de tejido tumoral Fijado en Formol e Incluido en Parafina (FFPE, por las siglas en inglés *Formalin Fixed Paraffin Embedded*), que es el procedimiento habitual de conservación de tejido tumoral en los centros clínicos. La fijación en formol cambia la estructura de las moléculas de ARN dentro del tejido, produciendo reticulación y también degradación parcial. La degradación parcial conduce a la creación de trocitos de ARN de entre 100 a 300 pares de bases. En técnicas de diagnóstico convencionales, estos cambios estructurales del ARN dificultan el uso de ARN extraído de tejido FFPE.

### **Breve Descripción de las Figuras**

Figura 1: Especificidad de cebadores de MAGE-A3 para la RT-PCR TaqMan dentro los miembros de la familia MAGE-A.

Figura 2: Especificidad de la sonda de Unión al Surco Menor (MGB, por las siglas *Minor Groove Binding*) para la RT-PCR TaqMan para la expresión de MAGE-A3.

Figura 3: Ensayo de especificidad de cebadores MAGE-A3 en presencia de plásmidos MAGE-A3 y MAGE-6.

Figura 4: Expresión Tumoral de MAGE-A3 medida por PCR TaqMan cuantitativa.

Figura 5: Ensayo de expresión de MAGE-A3.

Figura 6a: Especificidad de los cebadores de MAGE-A3 diseñados para usar en tejidos FFPE.

Figura 6b: Ensayo de linealidad de los cebadores sobre cantidades diferenciales de ARN.

Figura 7: Comparación entre el ensayo de congelación con ARN later y la PCR con tejido FFPE.

Figura 8: Comparación relativa de los ensayos de congelación con ARN later y MAGE-A3 basado tejido FFPE.

Figura 9: Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión del fragmento de Lipoproteína D, fragmento Mage3, y cola de histidina, y su secuencia de aminoácidos respectiva (SEC ID NO: 35 y 36).

Figura 10: Proteína de fusión de NS1-MAGE3, y cola de Histidina (SEC ID NO:37).

Figura 11: ADN que codifica la proteína de fusión NS1-MAGE3-His (SEC ID NO:38).

Figura 12: Proteína de fusión de CLYTA-MAGE3-Histidina (SEC ID NO:39).

Figura 13: ADN de la proteína de fusión CLYTA-MAGE3-His (SEC ID NO:40).

Figura 14: Alineamiento de secuencias de la familia de genes MAGE-A3 para el diseño de cebadores y sondas de la RT-PCR para MAGE-A3.

Figura 15: Alineamiento de secuencias de MAGE-A3 y MAGE-A6 para identificar regiones que contienen secuencias diana (tipografía en recuadro).

Figura 16: Clases para RT-PCR semi-cuantitativa para MAGE-A3: un ejemplo de cómo pueden asignarse cinco clases al ensayo por RT-PCR semi-cuantitativa para MAGE-A3.

Figura 17: Comparación Gráfica de valores de Ct de Plásmidos de MAGE-A usando 20, 2, 0.2 0.02 pg de ADN.

Figura 18: Comparación Gráfica de valores de Ct Delta en relación con MAGE-A3 para otros plásmidos de MAGE-A usando 20, 2, 0.2 0.02 pg de ADN.

Figura 19: Linealidad de ARN de GERL de xenoinjerto FFPE - diluciones en serie, con factor de dilución de 2, de 100 a 0,1 ng de entrada de ARN.

Figura 20: muestra una gráfica con log (base 2) de entrada de ARN frente al Ct Delta entre MAGE-A3 y  $\beta$ -actina.

### **Descripción de tablas y secuencias**

Tabla 1: Cebadores oligonucleotídicos usados para la RT-PCR semi-cuantitativa de MAGE.

Tabla 2: Cebadores oligonucleotídicos usados para la RT-PCR cuantitativa de tipo TaqMan.

Tabla 3: Comparación de la PCR semi-cuantitativa de MAGE-A3 frente a la PCR cuantitativa de tipo TaqMan

Tabla 4: Comparación de Valores Ct y Ct Delta usando la mezcla de la PCR 1 y la mezcla de la PCR 2.

Tabla 5: Cebadores oligonucleotídicos usados para RT-PCR cuantitativa TaqMan MGB de tejido congelado.

Tabla 6: Clases para RT-PCR semi-cuantitativa de MAGE-A3: un ejemplo de cómo pueden asignarse cinco clases al ensayo por RT-PCR semi-cuantitativa para MAGE-A3 (en referencia a la figura 16).

Tabla 7: Secuencias de cebador y sonda para TaqMan COBAS™ de MAGE-A3.

Tabla 8: Secuencias de cebador y sonda para TaqMan COBAS™ de beta-actina

Tabla 9: Intervalo de CT Válido de Muestra y Control para TaqMan COBAS™.

Tabla 10: Perfil de ciclo térmico para TaqMan COBAS™ - Perfil Térmico de la PCR para el Experimento de Exclusividad de MAGE-A3.

Tabla 11: Perfil Térmico de la RT-PCR para los Experimentos de Linealidad y Eficacia de la RT-PCR, Sensibilidad Analítica (Limite de Detección), Procedimiento de Correlación y Reproducibilidad.

Tabla 12: Valores de Ct de Plásmidos de MAGE-A usando 20, 2, 0.2 0.02 pg de ADN.

Tabla 13: Valores de Ct Delta Relativos a MAGE-A3 para otros plásmidos MAGE-A usando 20, 2, 0.2 0.02 pg de ADN.

Tabla 14: Validación del Experimento de Exclusividad de MAGE-A3.

Tabla 15 y Tabla 16: Detalles del Experimento de Exclusividad de MAGE-A3.

Tabla 17: Linealidad de Ct de MAGE-A3 y  $\beta$ -Actina y Ct delta de 10 copias a 11 Niveles.

- Tabla 18: Eficacia de Amplificación por RT-PCR de MAGE-A3 y  $\beta$ -actina.  
 Tabla 19: Validación del Experimento de Linealidad / Eficacia de RT-PCR.  
 Tablas 20, 21 y 22: Detalles del Experimento de Linealidad / Eficacia de RT-PCR.  
 Tabla 23: Índice de acierto del Ct de MAGE-A3, N = 24 para cada condición.  
 5 Tabla 24: Porcentaje de índice de acierto del Ct de MAGE-A3, N = 24 para cada condición.  
 Tabla 25: Índice de acierto del Ct de la  $\beta$ -actina, N = 24 para cada condición.  
 Tabla 26: Porcentaje de índice de acierto del Ct de la  $\beta$ -actina, N = 24 para cada condición.  
 Tabla 27: Valores Ct de Control con FAM de Genes MAGE.  
 Tabla 28: Valores Ct Control con HEX de la  $\beta$ -actina.  
 10 Tablas 29, 30 y 31: Detalles del Experimento del Límite de Detección.  
 Tabla 32: Resumen de Validación Cruzada de Muestras.  
 Tabla 33: Ensayos COBAS y de prototipo Positivo y Negativo mediante Comparador de Porcentaje de Coincidencia.  
 Tabla 34: Ensayos COBAS y de prototipo Positivo y Negativo mediante Comparador de Porcentaje de Coincidencia con ensayo de congelación para Resolver los Resultados Discordantes.  
 15 Tabla 35: Valores Ct del Gen MAGE de Control de Experimento.  
 Tabla 36: Valores Ct del Gen de la  $\beta$ -actina de Control de Experimento.  
 Tablas 37, 38 y 39: Detalles del Experimento del procedimiento de Correlación /Validación Cruzada.  
 Tabla 40: Proceso 1 - Umbral de la Expresión de MAGE-A3 de Controles de ARN de GERL.  
 20 Tabla 41: Proceso 1 - Respuesta de Expresión de MAGE-A3 para la Reproducibilidad de Especímenes.  
 Tabla 42: Proceso 2 - Umbral de la Expresión de MAGE-A3 de Controles de ARN de GERL.  
 Tabla 43: Proceso 2 - Respuesta de Expresión de MAGE-A3 para la Reproducibilidad de Especímenes.  
 Tabla 44: Validación de la Reproducibilidad.  
 Tablas 45, 46 y 47: Detalles del Experimento de Reproducibilidad.
- 25 SEC ID NO: 1 - MAGE3-E2F (cebador para ensayo MAGE3 semi-cuantitativo) (Tabla 1).  
 SEC ID NO: 2 - MAGE3-E3R (cebador para ensayo MAGE3 semi-cuantitativo) (Tabla 1).  
 SEC ID NO: 3 - E3 MAGE3 TMF (cebador directo para exón 3 MAGE-A3) (Tabla 2).  
 SEC ID NO: 4 - E3 MAGE3 TMR (cebador inverso para exón 3 MAGE-A3; este cebador es el complemento  
 inverso de la secuencia de exón MAGE-A3 que reconoce) (Tabla 2).  
 30 SEC ID NO: 5 - 13 MAGE3 TMF (cebador directo para intrón 3 MAGE-A3) (Tabla 2).  
 SEC ID NO: 6 - 13 MAGE3 TMR (cebador inverso para intrón 3 MAGE-A3; este cebador es el complemento  
 inverso de la secuencia de intrón MAGE-A3 que reconoce) (Tabla 2).  
 SEC ID NO: 7 - MAGEA3-775F (cebador directo para MAGE-A3) (Tabla 5).  
 SEC ID NO: 8 - MAGEA3-849R (cebador inverso para MAGE-A3; este cebador es el complemento inverso de la  
 35 secuencia MAGE-A3 que reconoce) (Tabla 5).  
 SEC ID NO: 9 - MAGEA3e-950F (cebador directo para MAGE-A3) (Tabla 5).  
 SEC ID NO: 10 - MAGEA3e-1037R (cebador inverso para MAGE-A3; este cebador es el complemento inverso  
 de la secuencia MAGE-A3 que reconoce) (Tabla 5).  
 SEC ID NO: 11 - MAGEA3f-623F (cebador directo para MAGE-A3) (Tabla 5).  
 40 SEC ID NO: 12 - MAGEA3f-697R (cebador inverso para MAGE-A3; este cebador es el complemento inverso de  
 la secuencia MAGE-A3 que reconoce) (Tabla 5).  
 SEC ID NO: 13 - E3 MAGE3 TMP (sonda para exón 3 MAGE3) (Tabla 2).  
 SEC ID NO: 14 - 13 MAGE-A3 TMP (sonda para intrón 3 MAGE3) (Tabla 2).  
 SEC ID NO: 15 - MAGEA3-801Tmc (sonda para MAGE3) (Tabla 5).  
 45 SEC ID NO: 16 - MAGEA3e- 1000Tmc (sonda para MAGE3) (Tabla 5).  
 SEC ID NO: 17 - MAGEA3f-65 ITm (sonda para MAGE3) (Tabla 5).  
 SEC ID NO: 18 - B-actina -E4F (cebador de B-actina) (Tabla 1).  
 SEC ID NO: 19 - B-actina -E6R (cebador de B-actina) (Tabla 1).  
 SEC ID NO: 20 - B-actina -TMF (cebador de B-actina) (Tabla 2).  
 50 SEC ID NO: 21 - B-actina -TMR (cebador de B-actina) (Tabla 2).  
 SEC ID NO: 22 - B-actina TMP (sonda de B-actina) (Tabla 2).  
 SEC ID NO 23 - SEC ID NO: 29: inmunopéptidos MAGE3.  
 SEC ID NO: 30 - SEC ID NO: 34: oligonucleótidos adyuvantes.  
 SEC ID NO: 35 - secuencia de nucleótidos de la proteína de fusión del fragmento de Lipoproteína D - fragmento  
 55 MAGE3 - cola de Histidina (Figura 9).  
 SEC ID NO: 36 - secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 35 (Figura 9).  
 SEC ID NO: 37 - secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de NS1 - MAGE3 - cola de histidina (Figura  
 10).  
 SEC ID NO: 38 - secuencia de nucleótidos que codifica la SEC ID NO: 37 (Figura 11).  
 60 SEC ID NO: 39 - secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de CLYTA - MAGE3 -Histidina (Figura 12).  
 SEC ID NO: 40 - secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión CLYTA-MAGE3 - histidina (Figura  
 13).  
 SEC ID NO: 41 - fragmento MAGE 1 (Figura 14).  
 SEC ID NO: 42 - fragmento MAGE 2 (Figura 14).  
 65 SEC ID NO: 43 - fragmento MAGE 4a (Figura 14).

SEC ID NO: 44 - fragmento MAGE 7 (Figura 14).  
 SEC ID NO: 45 - fragmento MAGE 8 (Figura 14).  
 SEC ID NO: 46 - fragmento MAGE 10 (Figura 14).  
 SEC ID NO: 47 - fragmento MAGE 11 (Figura 14).  
 5 SEC ID NO: 48 - fragmento MAGE 12 (Figura 14).  
 SEC ID NO: 49 - fragmento MAGE-A6 (Figura 14).  
 SEC ID NO: 50 - fragmento MAGE-A3 (Figura 14).  
 SEC ID NO: 51 - fragmento MAGE-A3 (Figura 15).  
 SEC ID NO: 52 - fragmento MAGE-A6 (Figura 15).  
 10 SEC ID NO: 53 - secuencia de sonda sintética MAGEA3F-646MOD de MAGE-A3 (Tabla 7).  
 SEC ID NO: 54 - secuencia de sonda MAGEA3F-646MOD que tiene nucleótidos no modificados.  
 SEC ID NO: 55 - secuencia cebadora de la  $\beta$ -actina RGI BACT F2 (Tabla 8).  
 SEC ID NO: 56 - secuencia cebadora de la  $\beta$ -actina RGI BACT R2 (Tabla 8).  
 SEC ID NO: 57 - secuencia de sonda de la  $\beta$ -actina HW RGIBACT H (Tabla 8).

15 **Sumario de la Invención**

Los inventores de la presente invención han desarrollado un ensayo para identificar pacientes que tienen un tejido tumoral que expresa MAGE-A3, que podrían beneficiarse de la inmunoterapia específica de MAGE-A3.

En una realización de la presente invención, se proporciona un conjunto de cebadores que comprende los siguientes pares de cebadores:

20 a) SEC ID NO: 11 y 12.

En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una sonda que consiste en la secuencia de nucleótidos de cualquiera de la SEC ID NO: 17, que tiene un colorante de tipo indicador fluorescente en el extremo 5' y un extintor no fluorescente en el extremo 3' o la SEC ID NO: 53.

En una realización adicional, se proporciona un kit que comprende:

25 (i) un cebador directo que consiste en la SEC ID NO: 11  
 (ii) un cebador inverso que consiste en la SEC ID NO: 12; y  
 (iii) una sonda que consiste en la SEC ID NO: 17 que en el extremo 5' tiene 6-carboxifluoresceína y en el extremo 3' un extintor no fluorescente.

30 En una realización adicional, se proporciona un kit que comprende (1) un cebador que consiste en la SEC ID NO: 11, un cebador que consiste en la SEC ID NO: 12 y una sonda que consiste en la SEC ID NO: 53.

35 En una realización adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de MAGE-A3 en tejido tumoral Fijado en Formol-Incluido en Parafina (FFPE) que comprende la etapa de poner en contacto una secuencia de nucleótidos aislada obtenida o derivada de una muestra de tejido tumoral FFPR con un conjunto de cebadores que consiste en la SEC ID NO: 11 y SEC ID NO: 12 y una sonda de acuerdo con la reivindicación 2.

En un aspecto adicional, se proporciona un procedimiento de diagnóstico de pacientes que comprende la etapa de poner en contacto una secuencia de nucleótidos aislada obtenida o derivada de una muestra de tejido tumoral con un conjunto de cebadores que consiste en la SEC ID NO: 11 y SEC ID NO: 12 y una sonda de acuerdo con la reivindicación 2 y evaluar si MAGE-A3 se expresa en la muestra.

40 Adicionalmente el procedimiento comprende la etapa de amplificar una secuencia de nucleótidos y detectar en la muestra la secuencia de nucleótidos amplificada.

45 El procedimiento puede comprender además la etapa de determinar si la secuencia de nucleótidos aislada se hibrida al cebador o a la sonda en condiciones rigurosas, detectando de esta forma si el tejido tumoral es positivo a MAGE-A3. En una realización, el procedimiento puede comprender además la etapa de usar hibridación *in situ* para detectar si la secuencia de nucleótidos se hibrida al menos con un cebador o una sonda.

**Descripción Detallada de la Invención**

50 Como se usa en la presente invención, la expresión "secuencia diana" es una región de la secuencia de ácido nucleico de MAGE-A3 (ya sea ADN o ARN, por ejemplo ADN genómico, ARN mensajero, o versiones amplificadas de los mismos) con la que la secuencia de la sonda o del cebador tiene identidad parcial (es decir, con cierto grado de desapareamiento) o total; aunque el cebador inverso es el complemento inverso (o, tal como se describió anteriormente, tiene cierto grado de desapareamiento) de la secuencia que reconoce. La secuencia diana se refiere generalmente a una región de la secuencia de MAGE-A3 que difiere al menos en un nucleótido en comparación con otra, o con el resto, de las secuencias de nucleótidos de MAGE-A. Sin embargo, en algunas realizaciones de la presente invención, la secuencia diana puede, para uno o más cebadores y sondas, ser idéntica entre las

secuencias de nucleótidos de MAGE-A, siempre que al menos uno o dos de los cebadores y sondas que se utilicen reconozcan una secuencia diana que difiere entre los genes que van a diferenciarse.

5 Por lo tanto, en una realización, una sonda o un cebador específicos pueden unirse a la secuencia diana de MAGE-A3 sin desapareamientos y unirse a la región equivalente de una secuencia de MAGE-A adicional, por ejemplo, la secuencia de MAGE-6, con desapareamientos para uno o más pares de bases.

La secuencia diana para los cebadores o sondas de la presente invención, puede ser la secuencia que tenga la mayoría de las diferencias (desapareamientos) entre los dos genes, para permitir la detección de MAGE-A3 con muy alta especificidad.

10 En una realización de la presente invención, las secuencias diana están en las regiones identificadas en el texto en cuadros de la figura 15.

15 Adecuadamente, el cebador o la sonda puede ser al menos el 95 % idéntico a la secuencia diana con respecto a la longitud del cebador o sonda, en forma adecuada mayor al 95 % idéntico, tal como 96 %, 97 %, 98 %, 99 % y más preferentemente tiene el 100 % de identidad en su longitud con la secuencia MAGE-A3 diana. Los cebadores o sondas de la presente invención pueden ser idénticos a la secuencia diana en todas las posiciones de nucleótidos del cebador o de la sonda, o pueden tener 1, 2, ó más desapareamientos dependiendo de la longitud de la sonda, temperatura, condiciones de reacción y exigencias del ensayo, por ejemplo. Por supuesto, siempre que el cebador inverso cumpla con estas condiciones para la región que es el complemento inverso de la secuencia cebadora.

Adecuadamente cada nucleótido del cebador o de la sonda puede formar un enlace de hidrógeno con su nucleótido diana equivalente.

20 Preferentemente, la complementariedad del cebador o de la sonda con la secuencia diana se evalúa mediante el grado de emparejamiento de bases A:T y C:G, de modo que un nucleótido de adenina (A) se empareje con una timina (T), y de modo que un nucleótido de guanina (G) se empareje con una citosina (C), o viceversa. En la forma de ARN, la timina T puede sustituirse por el uracilo U.

25 Cuando se usa inosina en sondas universales, por ejemplo, entonces la complementariedad también puede evaluarse a través del grado de interacciones de nucleótidos diana de inosina (sonda).

30 Por consiguiente, la presente invención proporciona un cebador que consiste en la secuencia de nucleótidos de las SEC ID NO. 1-12, tal como se muestra en las Tablas 1 y 2. El término "cebador" se usa en la presente invención para referirse a cualquier secuencia de oligonucleótidos monocatenaria que pueda usarse como un cebador, por ejemplo, en tecnología PCR. Por lo tanto, un 'cebador' de acuerdo con la presente invención se refiere a una secuencia de oligonucleótidos monocatenaria que puede actuar como un punto de inicio para la síntesis de un producto de extensión de cebador que es sustancialmente idéntico (para un cebador directo) o sustancialmente el complemento inverso (para un cebador inverso) a la cadena de ácido nucleico que va a copiarse. El diseño (longitud y secuencia específica) del cebador, dependerá de la naturaleza de las dianas de ADN y/o ARN y de las condiciones en las cuales se usa el cebador (tales como temperatura y fuerza iónica).

35 Tal como se usa en la presente invención, la expresión "condiciones rigurosas" significa cualesquiera condiciones de hibridación que permitan que los cebadores se unan específicamente a una secuencia de nucleótidos dentro de la secuencia de nucleótidos MAGE-A3, pero no a cualesquiera otras secuencias de nucleótidos MAGE. La "unión específica" o "hibridación específica" de una sonda con una región de la secuencia de nucleótidos MAGE-A3, significa que el cebador o la sonda forma un dúplex (secuencia de nucleótidos bicatenaria) con parte de esta región o con toda la región en las condiciones experimentales usadas, y que en dichas condiciones la sonda o el cebador no forma un dúplex con otras regiones de la secuencia de nucleótidos presentes en la muestra que va a analizarse. Deberá entenderse que los cebadores y las sondas de la presente invención que se diseñan para la hibridación específica dentro de una región de la secuencia de nucleótidos MAGE-A3, puede quedar completamente dentro de dicha región o puede, en un mayor grado, solapar con dicha región (por ejemplo, formar un dúplex con nucleótidos fuera así como dentro de dicha región).

40 En forma adecuada, la hibridación específica de una sonda con una región diana de ácido nucleico se produce en condiciones de hibridación "rigurosas", tales como 3X SSC, SDS al 0,1 %, a una temperatura de 50 °C. Los expertos en la técnica saben cómo variar los parámetros de temperatura, longitud de sonda y concentración salina, de modo que pueda lograrse la hibridación específica. Las condiciones de hibridación y lavado, son bien conocidas y se ilustran, por ejemplo, en la Publicación de Sambrook, y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), particularmente en su capítulo 11.

45 La presente invención proporciona además un conjunto de cebadores que consiste en los siguientes pares de cebadores:

Conjunto 5: SEC ID NO: 1 1 y 12

La presente invención proporciona además una sonda que comprende la secuencia de nucleótidos de cualquiera de

la SEC ID NO: 17 que tiene un colorante indicador fluorescente en el extremo 5' y un extintor no fluorescente en el extremo 3', o la SEC ID NO: 53. El término "sonda" se usa en la presente invención para referirse a cualquier secuencia de oligonucleótidos monocatenaria que pueda unirse al ácido nucleico y usarse como una sonda, por ejemplo, para tecnología PCR:

5 En una realización de la presente invención, en la que se usa una sonda en un procedimiento en combinación con un par de cebadores, el par de cebadores debe permitir la amplificación de parte o de todo el fragmento del polinucleótido MAGE-A3 al cual pueden unirse las sondas o en el cual las sondas se inmovilizan en un soporte sólido.

10 Adicionalmente, el cebador y/o la sonda pueden comprender un marcador que permita detectar la sonda. Los ejemplos de marcadores que pueden usarse incluyen: marcadores fluorescentes, por ejemplo, 6-carboxifluoresceína (6FAM™), NED™ (Applied Biosystems), HEX™ o VIC™ (Applied Biosystems); marcadores TAMRA™ (Applied Biosystems, CA, USA); marcadores quimioluminiscentes, por ejemplo, sondas de Rutenio; y etiquetas radioactivas, por ejemplo, tritio en la forma de timidina tritiada. También puede usarse <sup>32</sup>-Fósforo como una radioetiqueta.

15 En una realización de la presente invención, la sonda puede comprender un colorante indicador fluorescente en su extremo 5' y un colorante extintor en su extremo 3'. El colorante indicador fluorescente puede comprender 6-carboxifluoresceína (6FAM) y el colorante extintor puede comprender un extintor no fluorescente (NFQ, siglas en inglés de *Quencher Non-Fluorescent*). Opcionalmente, a la sonda puede añadirse una proteína de unión al surco menor (Minor Groove Binder, MGB™; Applied Biosystems, CA, USA.), por ejemplo, en el extremo 3' de la sonda.

20 En una realización, puede usarse una sonda MGB™ Eclipse (Epoch Biosciences, WA, E.U.A.). Las sondas MGB™ Eclipse tienen un extintor oscuro Eclipse™ y un resto MGB™ colocado en el extremo 5' de la sonda. En el extremo 3' de la sonda se localiza un colorante indicador fluorescente.

En una realización, las secuencias del cebador y de la sonda de la presente invención pueden contener o comprender estructuras o bases de nucleótidos de origen natural, por ejemplo, adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) y uracilo (U).

25 En una realización adicional, pueden incluirse análogos sintéticos o modificados de estructuras o bases de nucleótidos en la secuencia de la sonda. Por sintético o modificado se entiende una estructura o base de nucleótidos que no es de origen natural. Dichas bases sintéticas o modificadas pueden sustituir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o todas las bases en la secuencia de la sonda. En una realización, la Citosina puede sustituirse por 5-etil dC y la Timina puede sustituirse por 5-propinil dU. El extintor BHQ2 también puede incluirse dentro de la secuencia.

30 La presente invención proporciona adicionalmente un kit como se describe en las reivindicaciones 3 o 4.

Las secuencias de MAGE-A3 y MAGE-A6 son altamente homólogas, teniendo el 98 % de alineamiento de su nucleótido y un alineamiento del 95 % de sus secuencias de proteína. Con el objeto de identificar en forma específica las secuencias MAGE-A3, es necesario identificar cebadores y sondas que sean capaces de diferenciar entre MAGE-A3 y MAGE-A6.

35 En una realización, la presente invención proporciona un conjunto de cebadores y/o sondas que se hibridan específicamente con una secuencia diana de MAGE-A3 en condiciones rigurosas, en las cuales al menos una de las secuencias diana del cebador o sonda, difiere al menos en un nucleótido en comparación con la región equivalente de todas las otras secuencias de nucleótidos MAGE A y en el que el conjunto es capaz de diferenciar entre MAGE-A3 y MAGE-A6.

40 En una realización, la presente invención proporciona un conjunto de cebadores y/o sondas que se hibridan específicamente con una secuencia diana de MAGE-A3 en condiciones rigurosas, en las cuales al menos una de las secuencias diana del cebador o sonda difiere al menos en un nucleótido en comparación con la región equivalente de la secuencia de nucleótidos MAGE A6, y en el que el conjunto es capaz de diferenciar entre MAGE-A3 y MAGE-A6.

45 En una realización, la secuencia diana de al menos un cebador o una sonda puede diferir en un nucleótido en la secuencia diana de MAGE-A3, en comparación con la región equivalente de MAGE-A6. En una realización adicional, la secuencia diana de al menos un cebador o una sonda puede diferir en dos nucleótidos en comparación con la región equivalente de MAGE-A6.

50 En una realización, un kit que comprende dos cebadores y una sonda puede tener las siguientes diferencias en las secuencias diana de los cebadores y sondas:

- (i) la secuencia diana de uno de los dos cebadores o sondas difiere en un nucleótido entre MAGE-A3 y MAGE-A6;
- (ii) la secuencia diana de un cebador o sonda no mencionado en la parte (i), difiere en un nucleótido entre MAGE-A3 y MAGE-A6; y
- (iii) la secuencia diana del cebador o sonda restante es idéntico tanto a MAGE-A3 como MAGE-A6.

55

Por ejemplo, en una realización, un kit que comprende un cebador A, un cebador B y una sonda C puede comprender las siguientes diferencias en las secuencias diana:

- (i) la secuencia diana del cebador A difiere en un nucleótido entre MAGE-A3 y MAGE-A6;
- (ii) la secuencia diana del cebador B difiere en dos nucleótidos entre MAGE-A3 y MAGE-A6; y
- (iii) la secuencia diana de la sonda C es idéntica tanto para MAGE-A3 como para MAGE-A6.

Por ejemplo, en una realización, un kit que comprende un cebador A, un cebador B y una sonda C, puede comprender las siguientes diferencias en las secuencias diana:

- (i) la secuencia diana del cebador A, difiere en dos nucleótidos entre MAGE-A3 y MAGE-A6;
- (ii) la secuencia diana del cebador B es idéntica tanto para MAGE-A3 como para MAGE-A6; y
- (iii) la secuencia diana de la sonda C difiere en un nucleótido entre MAGE-A3 y MAGE-A6;

Por ejemplo, en una realización, un kit que comprende un cebador A, un cebador B y sonda C puede comprender las siguientes diferencias en las secuencias diana:

- (i) la secuencia diana del cebador A es idéntica tanto para MAGE-A3 como para MAGE-A6;
- (ii) la secuencia diana para el cebador B difiere en un nucleótido entre MAGE-A3 y MAGE-A6; y
- (iii) la secuencia diana de la sonda C difiere en dos nucleótidos entre MAGE-A3 y MAGE-A6;

En una realización, el kit puede comprender: el par de cebadores que consiste en la SEC ID NO: 11 y 12 y la sonda que consiste en la SEC ID NO:17.

En una realización adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de MAGE-A3 en tejido tumoral Fijado en Formol Incluido en Parafina (FFPE), que comprende la etapa de poner en contacto una secuencia de nucleótidos obtenida o derivada de una muestra de tejido tumoral FFPE con un conjunto de cebadores que consiste en la SEC ID NO: 11 y 12 y una sonda de acuerdo con la realización 2. Por tejido tumoral positivo a MAGE-A3, se entiende cualesquiera tumores o células tumorales que expresan el antígeno de MAGE-A3 que se ha aislado de un paciente. El procedimiento, tal como se describe en el presente documento, puede usarse para determinar si la muestra biológica comprende o consiste en un tejido tumoral positivo a MAGE-A3.

Por muestra biológica se entiende una muestra de tejido o células de un paciente que se ha extirpado o aislado del paciente.

Se proporciona además un procedimiento de diagnóstico de pacientes, que comprende la etapa de poner en contacto una secuencia de nucleótidos obtenida o derivada de una muestra de tejido tumoral Fijado en Formol Incluido en Parafina (FFPE) con un conjunto de cebadores que consiste en la SEC ID NO: 11 y 12 y una sonda de acuerdo con la realización 2 y evaluar si MAGE-A3 se expresa en la muestra.

En una realización, la secuencia de nucleótidos es, o se ha aislado de, la muestra biológica.

La expresión "obtenido o derivado de", tal como se usa en la presente invención, significa que se usará de forma inclusiva. Esto es, se entiende que incluye cualquier secuencia de nucleótidos aislada directamente de una muestra tumoral o cualquier secuencia de nucleótidos derivada de la muestra, por ejemplo, a través del uso de transcripción inversa para producir ARNm o ADNc.

Un procedimiento de la presente invención puede comprender además amplificar la secuencia de nucleótidos y detectar en la muestra la secuencia de nucleótidos amplificada. Como alternativa o adicionalmente, el procedimiento de la presente invención puede comprender además poner en contacto la secuencia de nucleótidos aislada o amplificada con una o más sondas tal como se describe en el presente documento.

En una realización, la secuencia de nucleótidos se aísla o se purifica de la muestra tumoral. En RT-PCR, la contaminación de ADN genómico puede conducir a resultados positivos falsos. En una realización, el ADN genómico se elimina o se elimina sustancialmente de la muestra a ensayar o se incluye en los procedimientos de la presente invención.

Los procedimientos de la presente invención son adecuados para detectar tejido tumoral positivo a MAGE-A3. En una realización la presente invención, el tejido positivo a MAGE-A3 puede detectarse usando hibridación *in situ*. Por hibridación *in situ*, se entiende una reacción de hibridación realizada usando un cebador o una sonda de acuerdo con la presente invención en cromosomas intactos, células o tejidos aislados de un paciente para observación directa de sitios morfológicos de secuencias de ADN o ARN específicas.

La hibridación de los polinucleótidos puede realizarse usando cualquier procedimiento de hibridación y sistema de detección adecuados. Los ejemplos de sistemas de hibridación incluyen transferencia puntual convencional, transferencias de Southern, y procedimientos de intercalado (sándwich). Por ejemplo, un procedimiento adecuado puede incluir una estrategia de hibridación inversa, en la que se inmovilizan sondas específicas de tipo en un soporte sólido en ubicaciones distintas conocidas (puntos, líneas, u otras figuras) y los ácidos polinucleicos

amplificados se marcan para detectar la formación de híbridos. Las secuencias de ácidos nucleico específicas de MAGE-A3, por ejemplo, una sonda o cebador, como se describe en el presente documento, pueden marcarse con biotina y el híbrido puede detectarse mediante un acoplamiento de biotina con estreptavidina con un sistema de desarrollo de color no radioactivo. Sin embargo, también pueden emplearse otros sistemas de hibridación inversa, por ejemplo, como se ilustra en la Publicación de Gravitt y col., (Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36(10): 3020-3027), cuyos contenidos también se incorporan por referencia. La condiciones de hibridación y de lavado convencionales, se describen en la Publicación de Kleter y col., Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(8): 2508-2517 y se optimizarán en las circunstancias determinadas para mantener la especificidad y sensibilidad requeridas por la longitud y secuencia de la sonda(s) y cebador(s).

10 En una realización, el procedimiento de la presente invención puede comprender el uso de:

a) el par de cebadores que consiste en la SEC ID NO: 11 y 12 y la sonda que consiste en la SEC ID NO: 17;

15 Los procedimientos de extracción y purificación bien conocidos están disponibles para el aislamiento de ARN o ADN de una muestra (por ejemplo en la Publicación de Sambrook y col., 1989). El ARN o ADN puede usarse directamente después de la extracción de la muestra o, más preferentemente, después de una etapa de amplificación del polinucleótido (por ejemplo, PCR). En casos específicos, tales como para ensayos de hibridación inversa, puede ser necesario invertir la transcripción de ARN o ADNc antes de la amplificación. En estos dos últimos casos, el polinucleótido amplificado "deriva" de la muestra.

20 Por lo tanto la presente invención proporciona un procedimiento para explorar, en aplicaciones técnicas, muestras de tejido de un paciente humano para determinar la presencia o ausencia de la expresión de MAGE-A3. Dichas muestras pueden consistir, por ejemplo, en núcleos de biopsia con aguja, muestras de resección quirúrgica o de tejido de nódulo linfático. Por ejemplo, estos procedimientos incluyen obtener una biopsia, que opcionalmente se fracciona seccionado con un criostato para enriquecer las células tumorales en aproximadamente el 80 % de la población de células totales. En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos pueden extraerse de estas muestras usando técnicas bien conocidas en la materia. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos extraídos de las muestras de tejido pueden amplificarse usando técnicas conocidas en la materia. El nivel de expresión de MAGE-A3 puede detectarse y compararse con grupos estadísticamente válidos y/o controles de pacientes negativos a MAGE-A3.

25 En una realización, el procedimiento de diagnóstico comprende determinar si un sujeto expresa el producto génico MAGE-A3, por ejemplo, detectando el ARNm correspondiente y/o el nivel de proteína del producto génico. Por ejemplo, el uso de técnicas tales como análisis de transferencia de Northern, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), RT-PCR semi-cuantitativa, RT-PCR cuantitativa, PCR TaqMan, hibridación *in situ*, inmunoprecipitación, análisis de transferencia de Western o inmunohistoquímica. De acuerdo con dicho procedimiento, las células o tejidos pueden obtenerse a partir de un sujeto, y el nivel de ARNm y/o de proteína compararse con el del tejido que no expresa MAGE-A3.

#### *Tecnología PCR TaqMan*

35 La Taq ADN polimerasa tiene actividad exonucleasa 5'-3'. Los ensayos mediante PCR Taqman usan esta actividad exonucleasa para escindir sondas marcadas-duales hibridadas con las secuencias diana durante la amplificación por PCR.

40 En síntesis, el ARN se extrae de una muestra y el ADNc se sintetiza (transcripción inversa). Después, el ADNc se añade a una mezcla de reacción de PCR que contiene componentes patrones de PCR (véanse, por ejemplo, los componentes suministrados por Roche (CA, E.U.A.) para la PCR Taqman. La mezcla de reacción contiene además una sonda que se hibrida con la secuencia de nucleótidos molde entre los dos cebadores (es decir dentro la secuencia amplificada mediante la reacción PCR, el "amplicón"). La sonda comprende un colorante indicador fluorescente en el extremo 5' y un colorante extintor en el extremo 3'. El extintor es capaz de extinguir la fluorescencia del indicador, aunque únicamente cuando los dos colorantes están próximos entre sí: esto ocurre para sondas intactas.

45 Durante y después de la amplificación, la Taq ADN polimerasa degrada la sonda, y se detecta cualquier fluorescencia.

50 Para mediciones cuantitativas, se usa el número de ciclos de la PCR en el que la fluorescencia alcanza un valor umbral de 10 veces la desviación típica de la emisión inicial. Este número de ciclos, denominado umbral de ciclo (Ct, *Thresold cycle* en inglés), es inversamente proporcional a la cantidad de partida de ADNc diana y permite medir la cantidad de ADNc. Esencialmente, a mayor cantidad de ARN diana presente en una muestra menor es el Ct obtenido.

55 Las mediciones obtenidas para el valor Ct, se comparan con las obtenidas para un gen constitutivo. Esto tiene en cuenta cualquier error basado en la cantidad de ARN total añadida a cada reacción de transcripción inversa (en base a la absorbancia de longitud de onda) y su calidad (por ejemplo, degradación): ninguno de los dos son parámetros fiables para medir el material de partida. Por lo tanto, las transcripciones de un gen constitutivo se cuantifican como un control endógeno. La beta-actina es uno de los genes constitutivos no específicos más usados, aunque pueden

usarse otros.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones indicadas más adelante, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que, la palabra “comprende”, y variaciones tales como “que comprende” y “comprendiendo”, implican la inclusión de un número entero indicado o una etapa o un grupo de números enteros indicados o etapas pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

La presente invención se describirá adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, en los cuales una RT-PCR se refiere a una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.

## Ejemplos

### 10 Ejemplo 1

PCR semicuantitativa - Muestras de tejido congeladas

Cebadores: SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2

*Extracción de ARN: Procedimiento de purificación de ARN con nitrógeno líquido*

Se congeló de forma instantánea un trocito de tejido en nitrógeno líquido y después se colocó en un mortero para el molido mecánico mediante un almirez. A 100 µl de un reactivo de aislamiento TriPure se añadieron 100 mg del polvo resultante y el ARN se extrajo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, Venlo, Holanda). La concentración de ARN se determinó a partir del valor de densidad óptica a 260 nm.

*RT-PCR semicuantitativa de MAGE-A3*

La RT-PCR semicuantitativa se realizó como describen De Plaen y col. (Immunogenetics 40:360, 1994). La síntesis del ADNc se realizó a partir de 2 µg de ARN total en una mezcla de 20 µl que contenía tampón 1x de primera cadena, 0,5 mM de cada dNTP, 10 mM de ditioneitol, 20 U de inhibidor de rRNAsa, 2 µM de oligo (dT) 15 y 200 U de transcriptasa inversa M-MLV durante 1h30 a una temperatura de 42 °C. Se amplificaron 50 ng de ADNc mediante PCR en una mezcla de 25 µl que contenía cebadores específicos para MAGE-3 (SEC ID NOs 1 y 2). Para cada reacción se procesó una alícuota de 10 µl en una electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se observó por fluorescencia con bromuro de etidio. Cuando se amplificaron el ARNm y el ADN genómico, los tamaños de los amplicones fueron de 725 pb y de 805 pb, respectivamente.

*Controles positivos para RT-PCR semicuantitativa de MAGE-A3:*

Se introdujeron tres controles positivos para estos experimentos:

- (i) Un fragmento clonado del ADN genómico de MAGE-A3 se añadió a cada mezcla de reacción PCR. Esto generó un fragmento de 805 pb (80 pb mayor que el fragmento generado a partir del ADNc) y siempre está presente en ausencia de inhibición PCR. Esto actúa como un control positivo para controlar la eficacia de la PCR en muestras negativas a MAGE-A3;
- (ii) Para cada ensayo MAGE-A3, se realizó la síntesis de ADNc en paralelo en muestras de tumor y en ARN extraído de la línea celular de melanoma “Gerl” MZ-2-3.0. Para considerarse como “positivas”, las muestras de tumor deben producir una señal en el 1 % del nivel del ADNc de la línea celular Gerl MZ-2-3.0.
- (iii) En cada muestra se realizó PCR con la beta-actina (tabla 1) para detectar muestras con ARN fuertemente degradado. Si la señal de la beta-actina generada a partir de una muestra de tumor negativa a MAGE-A3 era más débil que la de la señal generada a partir de MZ-2-3.0, el número de ciclos se ajustaba para la muestra clínica, de modo que la intensidad del amplicón de la beta-actina alcanzase el nivel requerido.

*Controles negativos para la RT-PCR semicuantitativa de MAGE-A3:*

Se introdujeron tres controles negativos para estos experimentos:

- (i) ARN extraído de cultivo celular LB 23-1/2, que se sabía que era negativo a MAGE-A3;
- (ii) un control de agua en la reacción-RT; y
- (iii) un control de agua en las etapas de la PCR.

### 45 Interpretación de los datos

Una muestra de 50 ng de ARNm, procedente de una muestra de tumor, se consideró positiva a MAGE-A3, cuando la cantidad de amplicón de 725 pb era igual a, o mayor que, la cantidad de amplicón obtenida usando 0,5 ng de ARN procedente del ARN de la línea celular Gerl MZ-2-3.0 (es decir equivalente al 0,1 % de ARN de Gerl; véanse los controles positivos). Las cantidades se calcularon mediante fluorescencia con bromuro de etidio. Se añadieron controles positivos y negativos.

Clases de RT-PCR semicuantitativas de MAGE-A3: se asignaron cinco clases patrón (De Paen y col., 1994) al ensayo mediante RT-PCR semicuantitativa de MAGE-A3. Estas son una medición subjetiva, y fueron, de la expresión más baja a la más alta -, -/+, +, ++, +++. En la Figura 16 se muestra un ejemplo de cómo pueden asignarse estas clases: en esta figura, las clases se asignan de acuerdo con la banda generada por el control positivo tal y como se muestra en la siguiente Tabla 6:

Tabla 6

	Control positivo ARN					
	100	50	10	2	1	0,5
Clase	+++	++		+	+/-	

Ejemplo 2: RT-PCR cuantitativa Taqman en Tiempo Real - Muestras de tejido congelado

*RT-PCR cuantitativa Taqman en tiempo real:*

Cebadores: SEC ID NO: 3 y SEC ID NO: 4; Sonda: SEC ID NO: 13 (exón)  
 Cebadores: SEC ID NO: 5 y SEC ID NO: 6; Sonda: SEC ID NO: 14 (intrón)

*PCR semicuantitativa (para estudios de comparación):*

Cebadores: SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2

Materiales y procedimientos

*Pacientes y recolección de muestras*

Mediante cirugía se obtuvieron biopsias de tumores de Carcinoma Pulmonar No Microcítico (NSCLC) de fase IB y II. Los pacientes se inscribieron en dos ensayos clínicos, el GSK 249553/004 (MAGE3-AS02B-004) y el Epidemio-MAGE3-153; los pacientes firmaron el consentimiento informado y se les explicó la naturaleza y las posibles consecuencias de los estudios. Las biopsias se sumergieron en una solución de estabilización de ARN (ARN-later, Ambion, Cambridge, UK) directamente después de la resección quirúrgica y se conservaron a -20°C. El ARNlater es un reactivo de conservación de tejidos que estabiliza y protege el ARN celular en muestras de tejido intacto, no congelado. El ARNlater elimina la necesidad de congelar inmediatamente las muestras en nitrógeno líquido.

*Extracción de ARN: Procedimiento de purificación de ARN con molino mezclador*

El tejido tumoral se retiró del ARNlater y se añadió a un Reactivo de Aislamiento TriPure (Roche, Vilvoorde, Bélgica). Posteriormente, el tejido se añadió a un molino mezclador que contenía bolas de tungsteno. Después de la rotura en el molino mezclador, de un máximo de 100 mg de tejido, se extrajo ARN celular total usando el reactivo TriPure de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, Venlo, Holanda). Se determinó la concentración de ARN a partir del valor de densidad óptica a 260 nm.

*Ensayo mediante RT-PCR Taqman de MAGE-A3 - tejido congelado*

El ADNc correspondiente a 50 ng del ARN total, se amplificó mediante PCR en una mezcla de 25 µl que contenía tampón TaqMan, MgCl<sub>2</sub> 5mM, dUTP 0,4 mM, 0,2 mM de cada nucleótido, 0,625 U de ADN polimerasa Ampli Taq oro, 0,05 U de UNG, 0,2 µM de cada uno de los cebadores oligonucleotídicos y 0,2 µM de una sonda TaqMan. Se usaron cebadores y sondas oligonucleotídicos específicos (Tabla 2; SEC ID Nos: 3, 4 y 13 y SEC ID Nos: 5, 6 y 14). Las sondas se marcaron con los colorantes FAM<sup>TM</sup>, NED<sup>TM</sup> y VIC<sup>TM</sup> (Applied Biosystems, CA, Estados Unidos) y tenían un resto de unión al surco menor (MGB<sup>TM</sup>; también de Applied Biosystems, CA, Estados Unidos). Actualmente, para las sondas específicas de MAGE, se realizan otros experimentos usando el colorante FAM en lugar de NED.

Los genes del exón de MAGE-A3 y de la beta-actina se amplificaron mediante PCR cuantitativa usando química TaqMan en el sistema 7700 ó 7900 (PE Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). La amplificación mediante PCR también se realizó en un intrón del gen de MAGE-A3 para comprobar la ausencia de contaminación de ADN genómico. El perfil de amplificación fue de 1 ciclo de 2 minutos a una temperatura de 50 °C, 1 ciclo de 12 minutos a una temperatura de 95 °C y 35 ciclos de 15 s a una temperatura de 95 °C y 1 minuto a una temperatura de 60 °C. La señal fluorescente generada por la degradación de la sonda TaqMan se detectó en tiempo real durante todas las etapas de elongación.

*Validación del ensayo mediante RT-PCR TaqMan para determinar la especificidad para MAGE-A3*

Cebadores: SEC ID NO: 3 y SEC ID NO: 4; Sonda: SEC ID NO: 13 (exon) - Taqman RT-PCR  
 Cebadores: SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2 (PCR semicuantitativa para estudios de comparación)

*Plásmidos y líneas celulares*

Los plásmidos empleados contenían el ADNc de longitud completa de los genes MAGE-A1 (MAGE-1; acceso al Genbank NM 0049881 MAGE-A2 (MAGE-2; acceso al Genbank L18920), MAGE-A3 (MAGE-A3; acceso al Genbank NM005362), MAGE-A4 (MAGE-4; acceso al Genbank 002362), MAGE-A6 (MAGE-6; acceso al Genbank NM005363), MAGE-A8 (MAGE-8; acceso al Genbank NM005364), MAGE-A9 (MAGE-9; acceso al Genbank NM005365), MAGE-A10 (MAGE-10; acceso al Genbank NM021048), MAGE-A11 (MAGE-11; acceso al Genbank NM005366) y MAGE-A12 (MAGE-12; acceso al Genbank NM005367). Las líneas celulares MZ-2-3.0 (positiva a MAGE-A3) y LB 23-1/2 (negativa a MAGE-A3) fueron un obsequio generoso del profesor Thierry Boon, instituto Ludwig, Bruselas, Bélgica.

10 La especificidad del procedimiento Taqman de MAGE-A3 se sometió a ensayo usando  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ , y  $1 \times 10^6$  copias de plásmidos que contenían el ADNc de longitud completa de los genes MAGE-A1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11 y 12.

15 En la figura 14 se muestra una comparación de secuencias de los genes MAGE A (MAGE 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11 y 12) en el área de los cebadores y sondas PCR MAGE-A3 designada. Las secuencias de los cebadores directo e inverso de MAGE-A3 están subrayadas; la secuencia de la sonda de MAGE-A3 está dentro de un cuadro. Los cebadores inversos son complementarios con la región de la secuencia que reconocen, es decir, A es T; G es C; T es A; y C es G.

*Controles positivos para la RT-PCR TaqMan de MAGE-A3:* (i) un fragmento de ADN genómico de MAGE-A3 y (ii) cantidades conocidas de ARN extraídas de la línea celular Gerl MZ 2-3.0 (una línea celular de melanoma positiva para MAGE-A3).

20 *Controles negativos para la RT-PCR TaqMan:* (i) ARN extraído de cultivo celular LB 23-1/2, que se sabía que era negativo a MAGE-A3, (ii) control de agua en la reacción RT, y (iii) control con agua en las etapas de la PCR. Se realizaron 40 ciclos de la RT-PCR. El control negativo debe ser  $\geq 35$ . Algunos de los resultados de los experimentos TaqMan se han representado como 1/Ct.

*Estadísticas: Comparación de las dos técnicas de PCR*

25 Se creó un tabla de contingencia 2 x 2 para comparar los resultados de la RT-PCR semicuantitativa (cebadores de la SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2) y PCR Taqman cuantitativa en tiempo real (Cebadores: SEC ID NO: 3 y SEC ID NO: 4; Sonda: SEC ID NO: 13), usando las técnicas descritas en el presente documento (Tabla 3). La variable de escala nominal caracterizó dos valores: positivo y negativo. Los valores negativos incluyeron índices de cero y límites; por índice límite se entiende que el índice está entre el 0,8 % y el 1,2 % de Gerl de la RT-PCR semicuantitativa y que todos los resultados del ensayo TaqMan están por debajo del 1 %. Los valores positivos se clasificaron en base a la puntuación visible de las bandas de gel en relación con la expresión de la beta-actina para el procedimiento de la RT-PCR semicuantitativa y se incluyeron todos los resultados  $\geq 1$  % del ensayo TaqMan. La coincidencia entre ambos procedimientos se calculó como el número de muestras negativas dobles más muestras positivas dobles dividido entre el número total de muestras. Se usó el ensayo de McNemar para comparar proporciones de pares discordantes (negativos-positivos). Se calcularon intervalos de confianza (C1).

*Optimización de la RT-PCR TaqMan cuantitativa*

*RT-PCR TaqMan para MAGE-A3 usando Sybr green*

40 El Sybr green es un componente que une amplicones de forma no selectiva, sin sonda específica de secuencia. Se realizó RT-PCR en tiempo real en los clones de los genes de la familia MAGE-A, usando cuatro diluciones diferentes de los clones MAGE-A (20 pg, 2 pg, 0,2 pg y 0,02 pg) (Figura 1, en la que los resultados se muestran como 1/CT en el eje-Y). Se obtuvo un resultado positivo para MAGE-A3 a un Ct (umbral de ciclo) de 14 y se obtuvo un valor de Ct de 16 para MAGE-A6 (en 20 pg de plásmidos). MAGE-A4, A8 y A9 mostraron un nivel de Ct de 30 y otros genes de MAGE mostraron expresión muy limitada a un Ct de 35 y superior.

*RT-PCR TaqMan para MAGE-A3 usando una sonda específica de secuencia*

45 Usando los mismos cebadores de MAGE-A3 (SEC ID 3 y 4) aunque con una sonda (SEC ID No 13), se sometió a ensayo la efectividad para diferenciar MAGE-A3 de A6 usando diferentes diluciones de los clones pertinentes de los miembros de la familia MAGE-A (Figura 2). En primer lugar, El Ct de MAGE-A tuvo una disminución esperada en cada una de las diluciones. El clon MAGE-A6 no mostró un 1/Ct superior, cuando se usó una sonda, lo que indicaba que no había reactividad cruzada.

50 La adición del plásmido  $1 \times 10^6$  MAGE-A6 a la dilución del plásmido MAGE-A3, tal como se muestra en la Figura 3, no tuvo efecto alguno y los resultados reflejan el resultado de la titulación del plásmido MAGE-A3. Esto no muestra un efecto competitivo de MAGE-A6 en presencia de MAGE-A3 usando la PCR TaqMan.

Resultados

*Expresión de tumor de MAGE-A3, comparación de procedimientos semicuantitativos y cuantitativos*

La PCR cuantitativa específica de TaqMan, se validó adicionalmente frente a la RT-PCR semicuantitativa convencional de MAGE-A3 (usando los cebadores de las SEC ID No 1 y 2). Se usaron 71 muestras de tumor de pacientes con NSCLC para comparar directamente entre procedimientos cuantitativos (usando los cebadores de las SEC ID NO: 3 y 4 y la sonda de la SEC ID NO: 13) y semicuantitativos de la expresión de MAGE-A3 (usando los cebadores de la SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2).

Los resultados indican una buena concordancia del 95,8 % (Tabla 3) entre los dos procedimientos con 68/71 de coincidencia. La RT-PCR TaqMan cuantitativa y el ensayo RT-PCR semicuantitativa fueron discordantes para tres muestras, en las que el ensayo de RT-PCR semicuantitativa sobreestimó la positividad de los resultados. Sin embargo, el ensayo McNemar reveló una distribución simétrica de estos tres resultados discordantes ( $p=0,25$ ), lo que indica que ninguna técnica tiende a producir resultados más discordantes en comparación con la otra técnica. En investigaciones más cercanas, el nivel variable de la expresión de la beta-actina en estas muestras dio como resultado un positivo falso para el procedimiento por RT-PCR semicuantitativa.

Se usó una representación gráfica en forma de cuadro (Figura 4) para representar la dispersión de los datos de la PCR TaqMan para cada clase definida para la RT-PCR semicuantitativa. Aunque la concordancia entre ambos procedimientos, basada en la tabla de contingencia de  $2 \times 2$  fue excelente, las representaciones gráficas en forma de cuadro revelaron cierto solapamiento entre las diferentes clases, lo que indicaba que la clasificación semicuantitativa no coincidía completamente con la medición de la RT-PCR TaqMan cuantitativa. El solapamiento puede deberse al hecho de que la clasificación se realizó mediante diferentes operadores en diferentes ocasiones, lo cual puede incrementar la variabilidad. En este sentido, en ensayo mediante RT-PCR TaqMan cuantitativa es mucho más independiente de dichos factores y por lo tanto más reproducible.

### **Ejemplo 3: Análisis de tejido fijado en parafina (FFPE) mediante RT-PCR**

#### **MATERIALES Y METODOS**

El ARN se extrajo de muestras FFPE usando un procedimiento propiedad de Response Genetics Inc., tal como se desvela en las Patentes de Estados Unidos Números US6,613,518; US6,610,488; US6,428,963; US6,248,535, incorporadas en la presente invención como referencia. Alternativamente el ARN puede obtenerse de tejido fijado en parafina de acuerdo con cualquier procedimiento publicado adecuado. Por ejemplo, se pueden extraer secciones de tejido de la parafina usando d-limoneno u otro tampón de lisis, y posteriormente lavándose en una solución a base de etanol. Las secciones posteriormente pueden tratarse con proteinasa K durante una noche, y posteriormente lavarse y el ARN puede purificarse usando cromatografía de columna. Se realizó RT-PCR Taqman en tiempo real en las muestras usando los cebadores de la SEC ID NO: 3 y SEC ID NO: 4 y la sonda de la SEC ID NO: 13; cebadores y sondas desarrollados para su uso en tejido congelado (véase el Ejemplo 2 anterior).

#### **RESULTADOS: *Expresión de Mage A3***

La Tabla 4 muestra resultados expresados como valores Ct, para el tejido fijado en formol, incluido en parafina (FFPE). Los números de eje Y representan muestras de tumor humano 990118-990784. También se incluyeron en el análisis controles positivos: TC1 (Mage3); Gerl (línea celular de melanoma MAGE-A3); y CRL 1675 (línea celular de melanoma). Los valores Ct son mayores a lo que se podría esperar para los cebadores MAGE-A3 RT-PCR semicuantitativa a base de tejido congelado. El nivel de Ct de 36-37 se considera el límite máximo de sensibilidad para el propósito de estos experimentos. El control positivo para MAGE-A3 de Gerl está en un Ct de 31 y justo dentro del límite de sensibilidad, aunque reducido en gran parte del ensayo por RT-PCR semicuantitativa. Con estos niveles los cebadores y sondas para la cuantificación de MAGE-A3 en tejido congelado (Tabla 2, cebadores específicos de exón MAGE-A3 SEC ID NO: 3 y SEC ID NO: 4 y la sonda SEC ID NO: 13) pueden no ser lo suficientemente sensibles para detectar la expresión de MAGE-A3 dentro de las muestras tumorales FFPE: las muestras que son positivas a MAGE-A3 pero que únicamente expresan MAGE-A3 a niveles bajos, pueden no detectarse.

En el experimento se incluyeron muestras de controles positivos de tejido FFPE: TC1 (Mage3) y Gerl (control positivo a MAGE-A3) y CRL 1675. Se analizaron tumores humanos 990118-990784 mediante RT-PCR cuantitativa Taqman usando los cebadores de tejido congelado de las SEC ID NO: 3 y SEC ID NO: 4 y la sonda de la SEC ID NO: 13 usando ARN de tejido incluido parafina. El resultado de estos análisis se muestra en la Figura 5.

#### ***Rediseño de cebadores TaqMan de MAGE-A3 para su uso en tejido FFPE***

El tamaño del amplicón para el ensayo de MAGE-A3 basado en ARN later con tejido congelado (descrito en el ejemplo 2) es de aproximadamente 100 pb. Con objeto de obtener resultados más sensibles para el ARN degradado encontrado en muestras FFPE, se diseñaron nuevos cebadores que redujesen el tamaño del amplicón, con objeto de aumentar la sensibilidad del ensayo MAGE-A3 (Tabla 5). Para los dos ensayos descritos en los ejemplos 2 y 3 se usó una sonda MGB<sup>TM</sup> (Minor Groove Binding) para aumentar la especificidad de los ensayos. La sonda MGB se une en el interior del surco menor del ADN que forma un dúplex extremadamente estable dando como resultado un aumento en la especificidad de cebador.

#### ***Ensayo de los nuevos cebadores de MAGE-A3 para especificidad y sensibilidad***

Los conjuntos de cebadores recientemente diseñados (Tabla 5) se sometieron a ensayo en el ADNc de los miembros de la familia de genes Mage-A (Figura 6a), en el que el Conjunto 1 son los cebadores: SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, sonda: SEC ID NO: 15; el Conjunto 2 son los cebadores: SEC ID NO:9, SEC ID NO: 10, sonda: SEC ID NO: 16; el Conjunto 3 son los cebadores: SEC ID NO:11, SEC ID NO: 12, sonda: SEC ID NO: 17; y el Conjunto 4 son los cebadores: SEC ID NO:3, SEC ID NO: 4, sonda: SEC ID NO: 13.

Tal como se muestra en la figura 6a, los cebadores de las SEC ID NO: 7 y 8 tienen altos niveles de Ct para MAGE-A3, aunque también para Mage-2 y Mage-12. Los cebadores de las SEC ID NO: 9 y 10 tienen altos niveles de Ct para MAGE-A3 y un Ct ligero para MAGE-A6, aunque esto está fuera con el intervalo normal de expresión de MAGE-A3. Los cebadores de las SEC ID NO: 11 y 12 son ligeramente menos sensibles que los de las SEC ID NO: 9 y 10. Por lo tanto, en los experimentos de la presente invención, los cebadores de las SEC ID NO: 9 y 10 se seleccionaron para someter a un ensayo posterior en tejido FFPE. Adicionalmente, los cebadores de las SEC ID NO: 9 y 10 se sometieron a ensayo en una dilución en serie de ARN y mostraron un buen intervalo lineal hasta las diluciones inferiores, lo que sugiere que los cebadores deben tener una buena sensibilidad y son adecuados para el ensayo (figura 6b).

*Comparación de ensayos TaqMan de tejidos congelados frente a tejidos FFPE para MAGE-A3*

Se compararon cuarenta y dos muestras tumorales FFPE usando los cebadores SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10 y la sonda SEC ID NO: 16 completándose el mismo ensayo en tejido congelado usando los cebadores SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4 y la sonda SEC ID NO: 13 (figura 7). El nivel de positividad del ensayo se ajustó al 1 % de gerl (control positivo) y comparando directamente parece haber alguna concordancia entre los dos ensayos. Hay algunos pacientes positivos a MAGE-A3, que no coincidieron con el ensayo de tejido congelado para MAGE-A3; esto puede explicarse por la macrodissección de las áreas tumorales que originan un aumento en la pureza de las células tumorales que expresan MAGE-A3. La eliminación de la mayor parte de las células normales en dilución origina un valor An R<sup>2</sup> de resultado positivo a MAGE-A3 (ensayo estadístico para correlación lineal) de 0,92 que se mostró entre el tejido FFPE y el tejido congelado en ARNIater lo que sugiere una buena correlación entre los dos procedimientos (figura 8).

EJEMPLO 4 – Ensayo de MAGE-A3 Taqman COBAS™

Tabla 7

Secuencias de Cebador y Sonda de MAGE-A3 TaqMan COBAS™	
Secuencias de Cebadores de MAGE-A3 TaqMan COBAS™	
MAGEA3F-623F: (HW_MAGEA3_F; SEC ID N°: 11)	5' TGTCGTCGGAAATTGGCAGTAT3'
MAGEA3f-697R:(HW_MAGEA3_R; SEC ID N°: 12)	5'CAAAGACCAGCTGCAAGGAACT3'
Secuencias de la Sonda de MAGE-A3 TaqMan COBAS™	
MAGEA3F-646MOD SEC ID N°: 53	5' -ELFLLLFFLQGLGALFLLFAGFAAAGFLLFP-3'
E= Colorante Indicador FAM, F= 5-Metil dC, Q = Extintor BHQ2, L = 5-Propinil dU, P= Fosfato, I = Indicador HEX	

La secuencia de la sonda de MAGEA3F-646MOD comprende los siguientes nucleótidos modificados (SEC ID N°: 54): 5'-TCTTTCCTGTGATCTTCAGCAAAGCTTC-3'

Tabla 8

<i>Secuencias de Cebadores y Sonda de la beta actina TaqMan COBAS</i>	
Secuencias de Cebadores de la beta actina TaqMan	
RGI_BACT_F2: (SEC ID N°: 55)	5'-GAGCGCGGCTACAGCTT-3'
RGI_BACT_R2: (SEC ID N°:56)	5'-TCCTTAATGTCACGCACGATTT-3'
Secuencia de Sonda beta actina TaqMan	
HW_RGIBACT_H: (SEC ID N°: 57)	5'-IACCACCAQCGGCCGAGCGGP-3'
E= Colorante Indicador FAM, F= 5-Metil dC, Q = Extintor BHQ2, L = 5-Propinil dU, P= Fosfato, I = Indicador HEX	

Tabla 9

<i>Intervalo CT Válido de Muestra y Control</i>	
Controles	Intervalo Ct Válido
Gen Mage Muestra FFPET 50 ng de FAM	<35,2
Gen $\beta$ actina Muestra FFPET 50 ng de HEX	<32,1
Gen Mage de Gerl al 100 % 50 ng de FAM	26,0-29,5
Gen $\beta$ actina de Gerl al 100 % 50 ng de HEX	24,0-27,0
Gen Mage de Gerl al 1 % 0,5 ng de FAM	33,0-35,5
Gen $\beta$ actina de Gerl al 1 % 0,5 ng de HEX	29,0-32,5
Gen Mage de UHR al 100 % 50 ng de FAM	25,0-28,0
Gen $\beta$ actina de UHR al 100 % 50 ng de HEX	22,0-25,0
Gen Mage de UHR al 1 % 0,5 ng de FAM	31,0-33,0
Gen $\beta$ actina de UHR al 1 % 0,5 ng de HEX	27,0-29,0
Control de ADN Positivo P53 20 ng de FAM	26,5-29,0
Control Negativo (CN)	>38,0

Tabla 10

<i>Perfil de ciclos térmicos</i>				
Perfil Térmico de PCR para el Experimento de Exclusividad de MAGE-A3				
Etapas	Descripción	Temperatura	Tiempo	Número de ciclo
1	Descontaminación UNG	50 °C	5 min	1X
2	Desnaturalización	95 °C	15 seg	2X
	Hibridación	63 °C	25 seg	
3	Desnaturalización	92 °C	15 seg	53X
	Hibridación	63 °C	50 seg	
4	Post Ciclo	40 °C	2 min	1X

Tabla 11

<i>Perfil Térmico RT-PCR para Ensayos de Linealidad y Eficacia de RT-PCR, Sensibilidad Analítica (Límite de Detección), Procedimiento de Correlación y Reproducibilidad</i>				
Etapas	Descripción	Temperatura	Tiempo	Número de ciclo
1	Descontaminación UNG	50 °C	5 min	1X
2	Desnaturalización	95 °C	1 min	1X
3	Transcripción Inversa	60 °C	20 min	1X
4	Desnaturalización	95 °C	15 seg	2X
	Hibridación	63 °C	25 seg	
6	Desnaturalización	92 °C	15 seg	53X
	Hibridación	63 °C	50 seg	
7	Post Ciclo	40 °C	2 min	1X

5

Para mejorar la especificidad de MAGE-A3 con relación a los otros miembros de la familia MAGE-A se implementó una temperatura de hibridación relativamente alta de 63 °C

*Análisis de Datos*

Los valores de umbral de ciclo, Ct, para MAGE-A3 y  $\beta$ -actina se calcularon usando el programa informático

AMPLILINK™ 3.1 (Roche, CA, Estados Unidos) en la estación de trabajo del analizador COBAS™ TaqMan 48 (Roche, CA, Estados Unidos) basado en parámetros de ensayo definidos en el Archivo de Definición de Ensayo. Se realizaron análisis de datos para la expresión génica, extrayendo los valores Ct de MAGE-A3 y de β-actina a partir del programa AMPLILINK™ para cálculos descendentes para determinar la expresión del gen MAGE-A3 respecto al gen β-actina. Para cada proceso, se incluirán controles para establecer el nivel de expresión MAGE-A3 de valor de umbral que necesita cumplirse o excederse con objeto de que la muestra dé un resultado positivo a MAGE-A3. Como un control positivo, se usó ARN de la línea celular GERL. El ARN de GERL se diluyó a 1:100 (GERL al 1 %) en agua y se determinó el Ct de MAGE-A3. Además, el ARN de GERL no diluido (GERL al 100 %) se ensayó sin dilución para la medición del Ct de la β-actina. Se calcula un valor Ct delta entre Ct de la β-actina del control GERL al 100 % menos el Ct de MAGE-A3 del control GERL al 1 % y la expresión relativa de MAGE-A3 se determina en base al siguiente cálculo:

$$\text{Expresión del valor de umbral de MAGE-A3} = 2^{(\text{Ct de } \beta\text{-actina de GERL al 100 \%} - \text{Ct de MAGE-A3 de GERL al 1 \%})}$$

Para muestras incluidas en parafina, se usará la misma estrategia de control excepto que el ARN del xenoinjerto de FFPE de GERL extraído usando el procedimiento de QIAGEN para FFPE, sustituirá al ARN de la línea celular GERL para el establecimiento de la expresión de valor de umbral.

Ya que el ensayo de MAGE-A3 con Taqman COBAS™ es una reacción múltiple, los valores Ct de MAGE-A3 y β-actina derivaron del mismo tubo de reacción. Se calculó la expresión relativa de MAGE-A3 para cada muestra de ensayo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Expresión de MAGE-A3 en la muestra de ensayo} = 2^{(\text{Ct de } \beta\text{-actina de la muestra} - \text{Ct de MAGE-A3 de la muestra})}$$

Si la expresión de MAGE-A3 en la muestra de ensayo es mayor o igual a la del nivel de valor de umbral de MAGE-A3 establecido a partir de los controles de ARN de GERL, entonces la muestra se denomina positiva para MAGE-A3. Si la expresión de MAGE-A3 en la muestra de ensayo es menor que la del nivel de valor de umbral de MAGE-A3 establecido a partir de los controles, entonces la muestra se denomina negativa para MAGE-A3.

La expresión de MAGE-A3 se determinará tomando el promedio de los valores Ct de MAGE-A3 y Ct de β-actina de las copias para cada espécimen para el cálculo de Ct delta (Ct de β-actina - Ct de MAGE-A3). Si una copia tiene un Ct de MAGE-A3 o Ct de β-actina menor que el punto de corte Ct del ensayo, aunque la otra copia tenga un Ct de MAGE-A3 o un Ct de β-actina mayor al punto de corte Ct, la muestra se ensayará nuevamente. Si ambas copias tienen valores de Ct de β-actina mayores al punto de corte Ct, la muestra se marca como Ct de β-actina fuera del intervalo y no se proporciona un resultado. Si ambas copias tienen valores Ct de MAGE-A3 mayores al valor de punto de corte Ct de MAGE-A3, pero la expresión de MAGE-A3 está por encima del valor de umbral, entonces la muestra se marca como Ct de MAGE-A3 fuera de intervalo y no se proporciona resultado. Esta estrategia para análisis de datos coincide con los estudios de validación cruzada llevados a cabo para el Procedimiento de Correlación que se describen en la sección de "Procedimiento de Correlación" que se encuentra más adelante.

Para el ensayo de MAGE-A3 por Taqman COBAS™, puede implementarse ARN total de referencia humano (UHR) QPCR humano de Stratagene, como control positivo y ajustarse un valor de umbral de expresión en base a la expresión de MAGE-A3 en este ARN bien caracterizado. El UHR puede ensayarse con cada proceso junto con los controles de ARN de GERL para establecer un valor de umbral de expresión adecuado con el control UHR.

#### *Condiciones de conservación de la Muestra y del Reactivo*

Todos los ARN y ADN, incluyendo plásmidos, ADN de control positivo a P53, ARN clínico FFPE, UHR, GERL y STAC se conservaron a una temperatura de -80°C. Todos los reactivos de ensayo, incluyendo la Mezcla Maestra de ARN Universal, mezcla de cebador/sonda, combinación de cofactor y diluyente de muestra/control negativo se conservaron a una temperatura de 2-8°C.

#### *Exclusividad de MAGE-A3*

*Ensayo experimental de cebadores y sondas con plásmidos de ADN que contienen miembros de la familia MAGE-A3.*

Propósito: Determinar la capacidad del ensayo para amplificar específicamente el gen MAGE-A3, excluyendo al mismo tiempo la co-amplificación/detección significativa de otros genes relacionados.

Material de muestra: Se someterá a ensayo, ADN plasmídico que contiene MAGE-A3 y miembros de familia relacionados (para detalles de plásmidos véase el ejemplo 2 anterior).

Procedimiento: Ensayo experimental del ensayo de MAGE-A3 con TaqMan COBAS usando ADN plasmídico que contiene los miembros de la familia MAGE-A3 para determinar si los genes relacionados se amplifican y detectan en cantidades significativas.

Cada muestra de ADN plasmídico se somete a ensayo por triplicado en cuatro concentraciones de ADN diferentes

(20, 2, 0.2, 0.02 pg). El perfil de Ciclo Térmico mostrado en la tabla 10, se modificó para eliminar la etapa de transcripción inversa a una temperatura de 60 °C durante 20 minutos. La concentración del ADN plasmídico se determinó mediante análisis Nanodrop.

Análisis:

- 5 Los valores Ct para el plásmido MAGE-A3 se determinaron y se compararon con valores Ct procedentes de los plásmidos MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, y MAGE-A12. El Ct delta se calculó sustrayendo el Ct de MAGE-AX (cada miembro de familia relacionado) del Ct de MAGE-A3. Se usaron los valores promedio Ct de cuatro copias para los cálculos de Ct y Delta Ct.

Criterios de aceptación:

- 10 Los valores Ct delta deben ser mayores o iguales a 10 entre MAGE-A3 y el resto de plásmidos excepto MAGE-A6.

*Resultados de exclusividad de MAGE-A3*

En algunas ocasiones, en las Tablas y en las Figuras de la presente invención, se usa el término "CURIE" en lugar de "MAGE"; sin embargo, en todos los casos se desea el término "MAGE".

- 15 Los valores Ct se muestran, para todos los plásmidos MAGE sometidos a ensayo, en la Tabla 12 y en la Figura 17 mostradas más adelante. Para plásmidos en los que no hubo amplificación, se asignó un valor Ct de 55, ya que hubo 55 ciclos en el perfil de ciclo térmico. Como era de esperar, los Ct de MAGE-A3 son los primeros para todos los niveles sometidos a ensayo (Tabla 12 y Figura 17). Los valores Ct delta fueron mayores a 10 ciclos entre MAGE-A3 y el resto de plásmidos excepto MAGE-A6 (Tabla 13 y Figura 18). Un Ct delta entre MAGE-A3 y MAGE-A6 no fue necesario ya que el 95 % de los pacientes que expresaban MAGE-A6, también expresaban MAGE-A3.

- 20 El Ct delta entre MAGE-A3 y MAGE-A6 para 20 pg, 2 pg y 0.02 pg de entrada del ADN plasmídico fue de 9.3, 8.4, 7.8 y 8.2 ciclos, respectivamente. Como la mayor parte de los valores Ct de MAGE-A3 para ARN de muestras FFPE mostró ser mayor que 27,2 para las muestras FFPE sometidas a ensayo, la señal procedente de MAGE-A6 será mínima ya que un retraso de 8,2 ciclos podría generar un valor Ct fuera del intervalo del ensayo.

Los criterios de aceptación de exclusividad se cumplieron.

- 25 La tabla 14 muestra la validación del experimento de exclusividad de MAGE-A3; los Ct de control estuvieron dentro del intervalo validado. El experimento aprobó la validación. Las tablas 15 y 16 muestran los detalles del Experimento de Exclusividad de MAGE-A3.

*Linealidad y eficacia de la RT-PCR*

Propósito: Determinar la linealidad y la eficacia de la transcripción inversa del ensayo.

- 30 Material de muestra: Se usaron diluciones en serie del ARN de GERL de xenoinjerto de FFPE, para estudios de linealidad y eficacia de la RT-PCR.

Procedimiento: El ARN de GERL de xenoinjerto de FFPE se diluyó en serie con factor de dilución 2 de 100 ng a 0,1 ng y se sometió a ensayo usando el ensayo MAGE-A3 con TaqMan COBAS para determinar el intervalo lineal del ensayo. Se sometieron a ensayo diez copias a cada nivel de concentración.

- 35 Análisis:

Los valores Ct para cada copia tanto de MAGE-A3 como de  $\beta$ -actina se representaron gráficamente frente al log (base 2) de la concentración de entrada del ARN, para calcular la pendiente de la línea y la eficacia de la RT-PCR. Se calculó la eficacia de amplificación por RT-PCR usando la ecuación:

$$\text{Pendiente} = 1/\log(\text{base } 2) * \text{Eficacia de Amplificación (EA)}.$$

- 40 Una eficacia de amplificación de 2 equivale al 100 %. Los valores Ct delta (Ct de MAGE-A3 - Ct de  $\beta$ -actina) para cada copia se representaron gráficamente frente al log (base 2) de la concentración de entrada del ARN para determinar la pendiente Ct delta. Se calcularon los promedios, desviación típica y porcentaje de coeficiente de variación (%CV) para el Ct de MAGE-A3, Ct de  $\beta$ -actina y el Ct Delta de las diez copias.

*Linealidad de criterios de aceptación:*

- 45 El intervalo lineal del ensayo se determinó en base a los siguientes criterios:

CV de Ct de MAGE-A3 <5 %  
 CV de Ct de  $\beta$ -actina <5 %  
 CB de Ct Delta <20 %  
 -0,10 < pendiente Ct Delta <0.10

R2 > 0,95

*Criterios de Aceptación de la Eficacia de la RT-PCR:*

Eficacia de amplificación por RT-PCR de MAGE-A3 >80 %

Eficacia de amplificación por RT-PCR de  $\beta$ -actina >80 %

- 5 Diferencia de eficacia de amplificación por RT-PCR entre MAGE-A3 y  $\beta$ -actina dentro del 10 %.

*Resultados de eficacia de linealidad/RT-PCR*

10 La figura 20 muestra una gráfica con un log (base 2) de entrada de ARN frente a valores Ct para MAGE-A3 y  $\beta$ -actina. El ensayo de MAGE-A3 por TaqMan COBAS es lineal entre valores de entrada de 100 - 0.1 ng de ARN de GERL extraído del xenoinjerto de FFPE usando el procedimiento QIAGEN basado en valores R2. Los valores R2 fueron 0,983 para MAGE-A3 y 0,998 para la  $\beta$ -actina. Estos valores están por encima de la especificación de R2 > 0,95. Además, el Ct tanto de MAGE-A3 como el de  $\beta$ -actina de las 10 copias en cada nivel sometido a ensayo, está por debajo de la especificación del VC < 5 %, tal como se muestra en la tabla 17. La eficacia de amplificación por RT-PCR de MAGE-A3 y de la  $\beta$ -actina se calculó a partir de la pendiente de la línea generada del log representado gráficamente (base 2) de entrada de ARN frente a valores Ct de MAGE-A3 y  $\beta$ -actina mostrados en la figura 19. La

15 eficacia de amplificación por RT-PCR puede calcularse usando la siguiente ecuación:

$$\text{Pendiente} = -1/\text{Log}(\text{base } 2) * \text{Eficacia de Amplificación (EA)}.$$

La eficacia de amplificación fue de 2,14 (107 %) y DE 2,06 (103.1 %) para MAGE-A3 y  $\beta$ -actina, respectivamente. La EA estuvo por encima arriba de la especificación del 80 % para MAGE-A3 y la  $\beta$ -actina. La diferencia en la EA entre los dos genes fue de 3,9 %, lo cual también estuvo dentro de la especificación de +10 %.

20 La figura 20, muestra una gráfica con log (base 2) de entrada de ARN frente a Ct Delta entre MAGE-A3 y  $\beta$ -actina. La pendiente de Delta Ct es de 0,0474, y está dentro de la especificación de pendiente de -0,10 a 0,10. En los dos niveles más bajos de entrada de ARN sometidos a ensayo (0,2 y 0,1 ng), el % del CV para el Ct Delta estuvo por encima de la especificación del 20 %. Como resultado, los últimos dos niveles de entrada de ARN no se incluyeron en el intervalo lineal del ensayo. El intervalo lineal del ensayo usando el ARN de xenoinjerto de GERL es de 100 ng

25 - 0,39 ng de ARN.

En base a estos datos, se cumplieron los criterios de aceptación para la linealidad y eficacia por RT-PCR.

La tabla 18 muestra la Eficacia de la Amplificación por RT-PCR de MAGE-A3 y de la  $\beta$ -actina; la tabla 19 es la Validación del Experimento de Linealidad/Eficacia por RT-PCR.

Los Cts de control estuvieron dentro del intervalo validado. El experimento aprobó la validación.

- 30 *Las tablas 20, 21 y 22 proporcionan detalles del experimento de Linealidad / Eficacia por RT-PCR*

*Sensibilidad Analítica (Límite de Detección)*

35 Propósito: Establecer la concentración más baja de ARN, en la que la expresión del gen MAGE-A3 puede detectarse mediante el ensayo de MAGE-A3 por TaqMan COBAS™ al menos en 95 % de las veces. Material de muestra: Se evaluó la sensibilidad analítica usando ARN aislado de tejido de xenoinjerto FFPE usando el kit QIAGEN RNeasy FFPE con una etapa de DNasa adicional. El ARN se extrajo de los xenoinjertos FFPE derivados de dos líneas celulares diferentes de ARN. Un xenoinjerto denominado GERL, expresaba MAGE-A3. El otro xenoinjerto denominado STAC no expresaba MAGE-A3. El ARN de estos dos xenoinjertos se usó para experimentos de mezcla con el objeto de ensayar el ARN de GERL al 5 % en un fondo de ARN de STAC al 95 %, ARN de GERL al 1 % en un fondo de ARN de STAC al 99 % y ARN de GERL al 0,5 % en un fondo de ARN de STAC al 99,5 %. Estas tres mezclas diferentes de ARN de GERL y STAC se sometieron a ensayo a cuatro niveles diferentes de ARN total.

40 Procedimiento: Se generaron veinticuatro resultados de ensayo de cuatro series de dilución independientes de las mezclas de ARN de GERL y STAC. Se sometieron a ensayo cuatro niveles de entrada de ARN (100, 50, 25 y 12,5 ng). Se sometieron a ensayo seis copias para cada nivel.

45 Análisis: Determinar el nivel de ARN al cual se obtiene el intervalo de positividad >95 % de MAGE-A3 en base al valor Ct dentro del intervalo de ensayo validado.

Criterios de aceptación: LOD < 50 ng de entrada ARN total para detección del 1 % de GERL.

*Límite de resultados de detección*

50 El índice de acierto se define como el valor de umbral de ciclo, Ct, dentro del intervalo lineal del ensayo en base a los experimentos de linealidad descritos en este informe. Para determinar el extremo de intervalo de Ct, se realizó el promedio de los Ct de MAGE-A3 y  $\beta$ -actina del nivel de entrada de ARN de 0,39 ng del estudio de linealidad

(extremo del intervalo lineal) y se calcularon los límites de confianza de 95 % para los Ct de MAGE-A3 y  $\beta$ -actina. En base a estos cálculos, el Ct de MAGE-A3 debe ser menor o igual a 35,2 y el Ct de la  $\beta$ -actina debe ser menor a 32,1 para la muestra que se considera como un acierto. Los índices de acierto de MAGE-A3 y  $\beta$ -actina se muestran en la tabla 23 y tabla 25. Los porcentajes del índice de acierto para MAGE-A3 y  $\beta$ -actina se muestran en la tabla 24 y tabla 26.

El límite de detección es de 50 ng de ARN de entrada, en el que el ARN de GERL al 1 % diluido en ARN de STAC al 99 % se detecta > 95 % de las veces en base al Ct de MAGE-A3 que se encuentra dentro del intervalo del ensayo validado. Se cumplen los criterios de aceptación para la Sensibilidad Analítica (límite de detección).

*Validación de Experimento del Límite de Detección.* Los Ct de control FAM del gen MAGE se muestran en la tabla 27; los Ct de control HEX de  $\beta$ -actina se muestran en la tabla 28. Los Ct de control están dentro del intervalo validado. El experimento aprobó la validación.

Las Tablas 29, 30, 31 muestran los detalles del experimento del límite de detección.

#### *Correlación del procedimiento*

Propósito: Correlacionar y validar en forma cruzada el ensayo de MAGE-A3 por TaqMan COBAS™ y un ensayo prototipo en muestras FFPET clínicas.

Material de muestra: Se analizaron aproximadamente 120 muestras FFPET clínicas de calidad adecuada usando el ensayo de MAGE-A3 por TaqMan COBAS y usando el ensayo prototipo.

Procedimiento: Se extrajo ARN usando el kit QIAGEN™ RNeasy FFPE con una etapa de DNasa adicional. Se realizó una extracción para cada muestra FFPET, la muestra se dividió y se sometió a ensayo una alícuota mediante el ensayo de MAGE-A3 por TaqMan COBAS y se sometió a ensayo una alícuota usando el ensayo prototipo. Se procesaron controles idénticos para ambos ensayos para establecer el valor de umbral de la expresión de MAGE-A3.

#### Análisis:

La respuesta de MAGE-A3 para cada muestra se registró como positiva o negativa en base al valor de umbral de la expresión de MAGE-A3 generado por los controles de ARN de GERL. Los resultados entre los dos ensayos se compararon para establecer el positivo y negativo a través del comparador de valores de porcentaje de coincidencia del ensayo RMS.

Para los cálculos de porcentaje de coincidencia, se usaron los resultados obtenidos previamente usando el ensayo de la RT-PCR de dos etapas para tejido congelado, para resolver los resultados discordantes.

Positivo determinado por el comparador de porcentaje de coincidencia =  $N^{\circ}$  de muestras denominadas correctamente expresadoras de MAGE-A3 /  $N^{\circ}$  de muestras sometidas a ensayo \* 100.

Negativo determinado por el comparador de porcentaje de coincidencia: =  $N^{\circ}$  de muestras denominadas correctamente no expresadoras de MAGE-A3 /  $N^{\circ}$  número de muestras sometidas a ensayo \* 100.

#### Criterios de aceptación:

- Positivo determinado por comparador de porcentaje de coincidencia > 85 %
- Negativo determinado por el comparador de porcentaje de coincidencia > 85 %

Se realizó la validación cruzada de especímenes clínicos de un estudio clínico de NSCLC para evaluar el positivo y negativo mediante el comparador de porcentaje de coincidencia del ensayo de MAGE-A3 por TaqMan COBAS. Como un comparador para estos resultados se usó el ensayo de MAGE-A3 de prototipo RT-PCR. En el caso de discordancia entre resultados, para resolver los resultados discordantes, pueden usarse los resultados previos generados procedentes de la misma muestra, como tejido congelado reciente no micro-diseccionado manualmente.

Usando el procedimiento QIAGEN RNeasy FFPE con la etapa de digestión con DNasa I, se extrajo ARN de 131 especímenes FFPE clínicos micro-diseccionados manualmente. Posteriormente, cada muestra se dividió por igual entre RMS y RG1 para someter a ensayo usando el ensayo MAGE-A3 con TaqMan RMS COBAS y el ensayo de prototipo RGI. El análisis de datos se realizó como se describe en la sección 3, en este informe el valor de umbral de la expresión de MAGE-A3 se determinó en base al control de ARN de GERL al 1 %.

#### *Resultados del Procedimiento de Correlación / Validación cruzada*

Se extrajeron muestras de ARN de 131 especímenes clínicos de NSCLC FFPE. Siete muestras tuvieron una contaminación de ADN genómico mayor al 25 % basándose en la reacción de control RT de los RGI. Estas muestras se excluyeron del positivo y negativo determinado por los cálculos del comparador de porcentaje de coincidencia. Además, hubo 6 resultados indeterminados procedentes del ensayo COBAS y 15 del ensayo prototipo, en el que la

muestra no tuvo suficiente material en base al Ct de la  $\beta$ -actina fuera del intervalo lineal del ensayo, o la expresión de MAGE-A3 para la muestra estuvo por encima del valor de umbral, aunque el Ct de MAGE-A3 estuvo fuera del intervalo lineal. Como resultado, hubo 117 resultados del ensayo COBAS y 108 resultados del ensayo de prototipo, con datos que podían usarse para que la validación cruzada comparase los dos ensayos diferentes (tabla 32). La concordancia general entre los ensayos COBAS y de prototipo fue de 98/107 ó 91.6 % (tabla 33). El positivo a través del comparador de porcentaje de coincidencia del ensayo COBAS, usando el ensayo de prototipo como “patrón de oro”, fue de 59/64 ó 92,2 %, mientras que el negativo a través del comparador de porcentaje de coincidencia fue de 39/43 ó 90,7 % y (tabla 33). En el caso de resultados discordantes entre los ensayos COBAS y de prototipo, para resolver la discordancia, se usaron los resultados generados por el análisis de muestra de tejido congelado (Tabla 34).

De las 9 muestras con resultados discordantes entre los ensayos COBAS y de prototipo, 7 demostraron concordancia entre los ensayos COBAS y de congelación y 2 demostraron concordancia entre los ensayos de prototipo y de congelación. Como resultado, cuando se usa el resultado de congelación para resolver la discordancia, el positivo a través del comparador de porcentaje de concordancia del ensayo COBAS aumenta a 63/64 y el negativo a través del comparador de porcentaje de coincidencia aumenta a 42/43 ó al 97,7 % (tabla 34).

El positivo y el negativo determinados por el comparador de porcentaje de coincidencia del ensayo MAGE-A3 TaqMan COBAS superaron las especificaciones mayores o iguales al 85 %. Los criterios de aceptación para positivo y negativo a través del comparador de porcentaje de coincidencia se cumplieron.

*Validación Control de Correlación del Procedimiento/ Validación Cruzada*

Los Ct de los genes MAGE de control del experimento se muestran en la tabla 30; los Ct del gen de la  $\beta$ -actina de control del experimento se muestran en la tabla 31. Los Ct de control están dentro del intervalo validado. El experimento aprobó la validación.

En las tablas 37, 38 y 39 se muestran los detalles del experimento de Correlación del Procedimiento/Validación Cruzada.

*Reproducibilidad*

Propósito: demostrar la reproducibilidad y fiabilidad del ensayo a través de grupos de datos generados por operadores múltiples en días múltiples con lotes de reactivos múltiples e instrumentos múltiples.

Material de muestra:

Se extrajeron 12 muestras de las muestras clínicas de NSCLC FFPE micro-disecionadas manualmente usando el kit QIAGEN RNeasy FFPE con etapa de digestión DNasa I y se amplificaron/detectaron usando el ensayo MAGE-A3 TaqMan COBAS.

Procedimiento:

El estudio consistió en dos copias por muestra

Se sometieron a ensayo dos lotes de reactivo para la preparación de muestra QIAGEN y reactivos TaqMan.

Los experimentos se realizaron por dos operadores diferentes en dos días diferentes usando dos analizadores TaqMan 48 COBAS diferentes.

Análisis:

La expresión de MAGE-A3 de cada espécimen clínico se calculó a partir del promedio de dos copias de RT-PCR. Además, para cada copia de cada muestra se evaluó la respuesta de MAGE-A3. La reproducibilidad también se basó en la comparación de la expresión del gen MAGE-A3 calculada a partir del valor de Ct Delta entre el gen MAGE-A3 y  $\beta$ -actina. La comparación entre la expresión de MAGE-A3 para muestras sometidas a ensayo con diferentes lotes de reactivos, instrumentos, operadores y en diferentes días, se realizó usando la correlación de Pearson.

Criterios de aceptación:

> 90 % de concordancia de la respuesta de MAGE-A3 entre las muestras que son al menos 3X el límite de detección del ensayo (GERL al 3 %) de proceso a proceso y dentro de copias de procesos.

Correlación de Pearson > 90 % entre muestras.

Resultados reproducibilidad

El umbral de la expresión de MAGE-A3 es el nivel de corte de la expresión de MAGE-A3 que determina si un paciente recibirá una inmunoterapia específica de MAGE-A3. Los pacientes con expresión de MAGE-A3 igual o por

encima del valor de umbral, tendrán una respuesta positiva MAGE-A3 y recibirán tratamiento. Los pacientes con expresión de MAGE-A3 por debajo del valor de umbral tendrán una respuesta negativa a MAGE-A3 y no recibirán tratamiento. Los estudios de reproducibilidad del ensayo se basaron en la respuesta de la expresión de MAGE-A3 para cada espécimen usando las siguientes ecuaciones:

- 5 **Valor de umbral de expresión MAGE-A3 =  $2^{(\text{Ct de } \beta\text{-actina del control GERL al 100 \% - Ct de MAGE-A3 del control GERL al 1 \%)}$ .**

**Expresión de MAGE-A3 para el espécimen clínico =  $2^{(\text{Ct de } \beta\text{-actina del espécimen} - \text{Ct de MAGE-A3 del espécimen})}$**

- 10 Además, se evaluó la reproducibilidad del ensayo comparando la correlación de la expresión de MAGE-A3 entre los dos procesos mediante el Coeficiente de Correlación Producto-Momento de Pearson (r). La tabla 40 y la tabla 37 muestran el valor de umbral de la expresión de MAGE-A3 generado a partir de los controles de ARN de GERL sometidos a ensayo con el proceso 1 y 2 en base al Ct delta entre la  $\beta$ -actina y MAGE-A3. La tabla 41 y la tabla 43 muestran la respuesta de MAGE-A3 para cada uno de los 12 especímenes sometidos a ensayo en los procesos 1 y 2.

- 15 La tabla 42 muestra el proceso 2 - Valor de Umbral de la Expresión de MAGE-A3 de los Controles de ARN de GERL; la tabla 43 muestra el proceso 2 - respuesta de la Expresión de MAGE-A3 para Especímenes de Reproducibilidad.

- 20 Para todas las muestras sometidas a ensayo, hubo una correlación del 100 % para la respuesta de la expresión de MAGE-A3 entre los dos procesos. Además, la reproducibilidad del ensayo se evaluó comparando la correlación de la expresión de MAGE-A3 entre los dos procesos mediante el Coeficiente de Correlación Producto-Momento de Pearson (r). El Coeficiente de Correlación de Pearson fue de 0,987, cuando se comparó la expresión de MAGE-A3 entre los dos procesos diferentes. Se cumplieron los criterios de aceptación para la reproducibilidad.

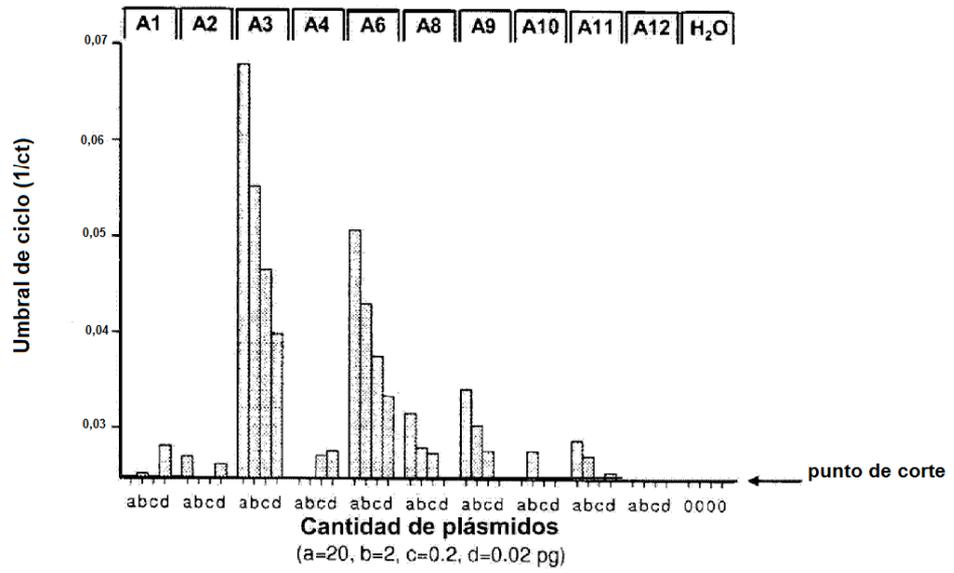
La tabla 44 muestra la Validación de la Reproducibilidad; los Ct de Control están dentro del intervalo validado. El experimento aprobó la validación.

- 25 Los detalles del Experimento de Reproducibilidad se muestran en las tablas 45, 46 y 47.

**REIVINDICACIONES**

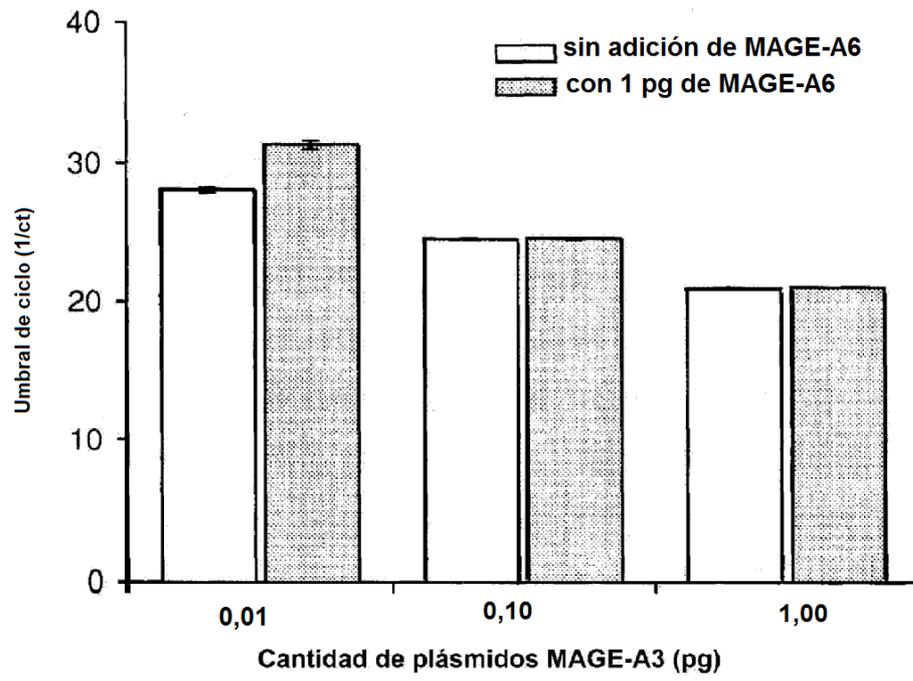
1. Un conjunto de cebadores que consiste en el siguiente par de cebadores:
  - a) SEC ID NO: 11 y SEC ID NO: 12.
2. Una sonda que consiste en:
  - 5 a) la secuencia de nucleótidos de (cualquiera de) la SEC ID NO:17, que tiene un colorante indicador fluorescente en el extremo 5' y un extintor no fluorescente en el extremo 3' o;
  - b) la SEC ID NO: 53.
3. Un kit que comprende (i) un cebador que consiste en la SEC ID NO:11; (ii) un cebador que consiste en la SEC ID NO:12; y una sonda que consiste en la SEC ID NO:17 que en el extremo 5' tiene 6-carboxifluoresceína y en el extremo 3' tiene un extintor no fluorescente.  
10
4. Un kit que comprende (i) un cebador que consiste en la SEC ID NO:11; (ii) un cebador que consiste en la SEC ID NO:12; y una sonda que consiste en la SEC ID NO:53.
5. Un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de MAGE-A3 en tejido tumoral Fijado en Formol e Incluido en Parafina (FFPE), que comprende la etapa de poner en contacto una secuencia de nucleótidos aislada obtenida o derivada de una muestra de tejido tumoral FFPE con un conjunto de cebadores que consiste en la SEC ID NO:11 y SEC ID NO:12 y una sonda de acuerdo con la reivindicación 2.  
15
6. Un procedimiento de diagnóstico en pacientes que comprende la etapa de poner en contacto una secuencia de nucleótidos aislada obtenida o derivada de una muestra de tejido tumoral FFPE con un conjunto de cebadores que consiste en la SEC ID NO:11 y SEC ID NO:12 y una sonda de acuerdo con la reivindicación 2 y evaluar si MAGE-A3 se expresa en la muestra.  
20
7. El procedimiento de la reivindicación 5 ó 6, que adicionalmente comprende la etapa de amplificar una secuencia de nucleótidos y detectar en la muestra la secuencia de nucleótidos amplificada.
8. El procedimiento de la reivindicación 5, que adicionalmente comprende la etapa de determinar si la secuencia de nucleótidos se hibrida, en condiciones rigurosas, con el cebador o con la sonda, detectando de este modo si el tejido tumoral es positivo a MAGE-A3.  
25
9. El procedimiento de la reivindicación 8, que adicionalmente comprende la etapa de usar la hibridación *in situ* para detectar si la secuencia de nucleótidos se hibrida al menos con un cebador o con una sonda.

**FIG. 1**

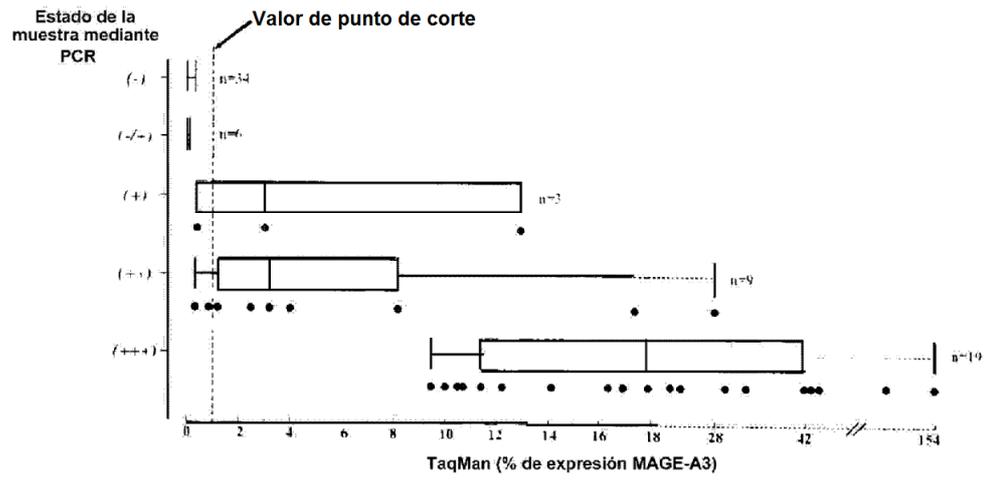




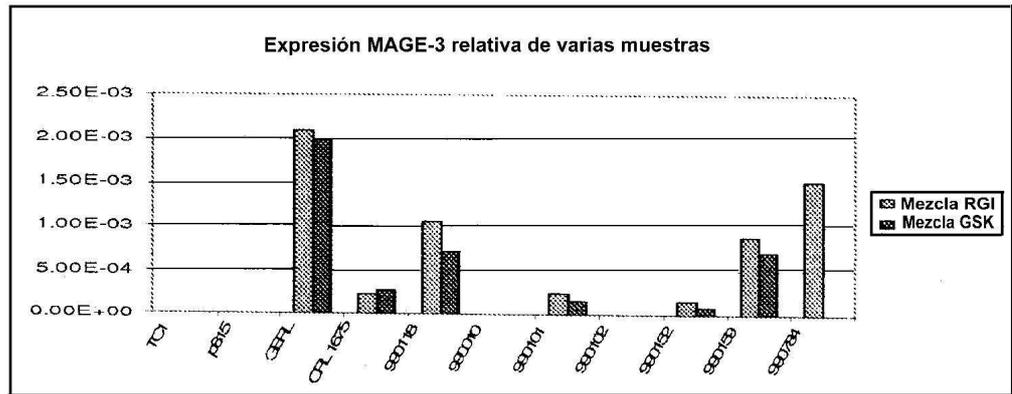
**FIG. 3**



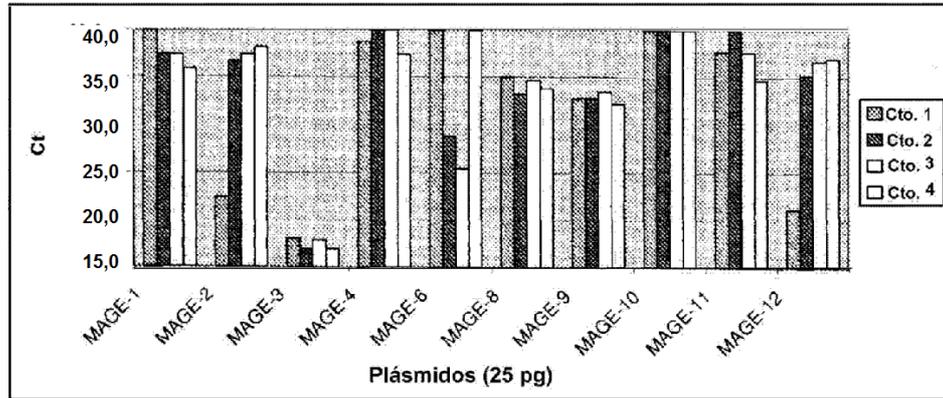
**FIG. 4**



**FIG. 5**



**FIG. 6a**



**FIG. 6b**

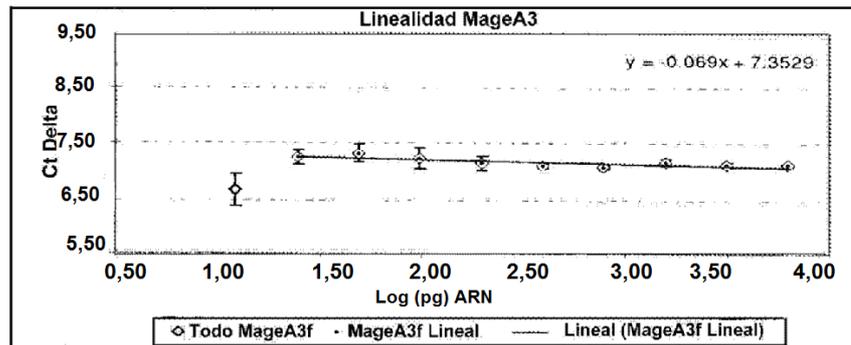
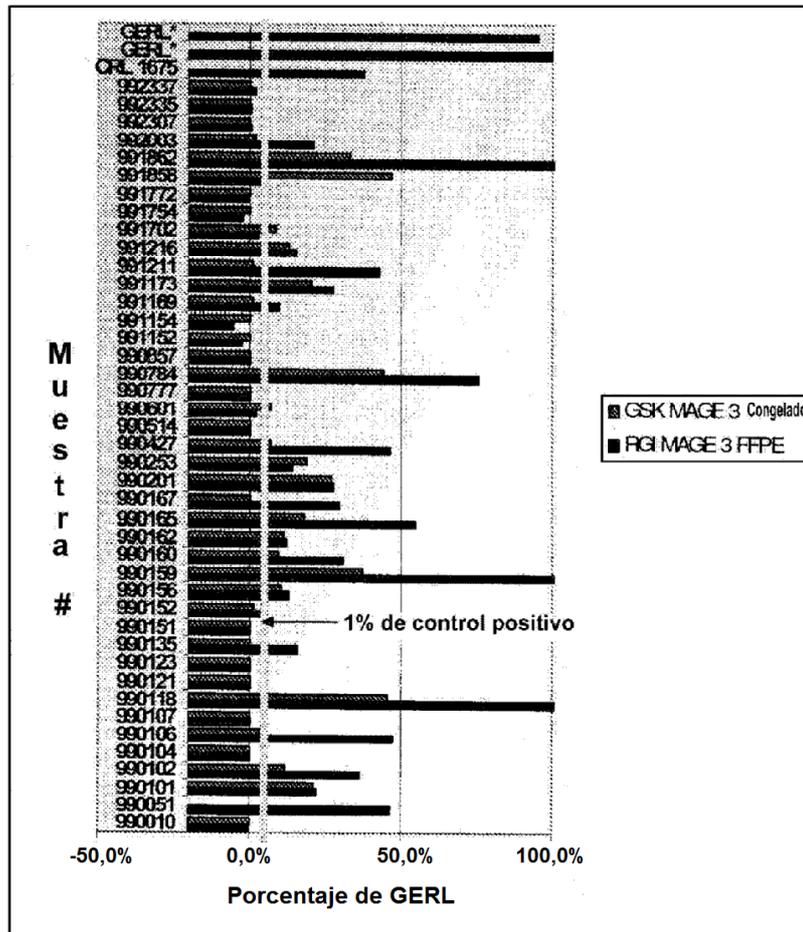
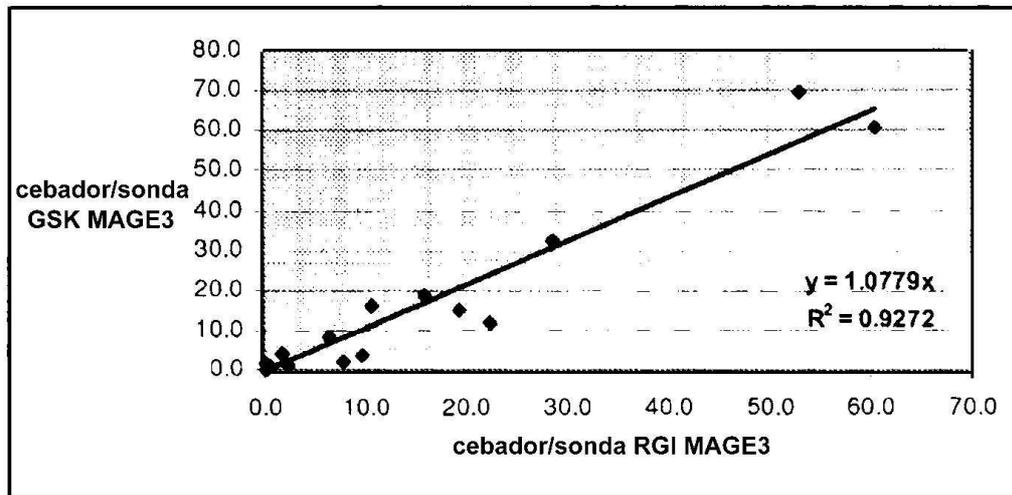


FIG. 7



**FIG. 8**





# ES 2 389 513 T3

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

# ES 2 389 513 T3

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

**FIG. 10**

Proteína de fusión de NS1-MAGE3, y cola de Histidina (SEC ID N°: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

```



**FIG. 11**

ADN que codifica la proteína de fusión NS1-MAGE3-His (SEC ID N°:38)

```

atggatcaa acaactgtgtc 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 gcctggtggg tgcgcaggct cctgctactg aggagcagga ggetgcctcc      360
tctcttcta ctctagttga agtcaccctg ggggaggtgc ctgctgccga gtcaccagat      420
cctccccaga gtctcaggg agcctccagc ctccccacta ccatgaacta ccctctctgg      480
agccaatcct atgaggactc cagcaacca gaagaggagg ggccaagcac cttccctgac      540
ctggagtccg agttccaagc agcactcagt aggaaggtgg ccgaattggt tcattttctg      600
ctcctcaagt atcgagccag ggagccggtc acaaaggcag aaatgctggg gagtgtcgtc      660
ggaaattggc agtattttct tctgtgatc ttcagcaaag cttccagttc cttgcagctg      720
gtctttggca tcgagctgat ggaagtggac cccatcgcc acttgtacat ctttgcacc      780
tgcttgggcc tctcctacga tggcctgctg ggtgacaatc agatcatgcc caaggcaggc      840
ctcctgataa tcgtcctggc cataatcgca agagagggcg actgtgcccc tgaggagaaa      900
atctgggagg agctgagtgt gttagaggtg tttgagggga ggaagacag tatcttgggg      960
gatcccaaga agctgctcac ccaacatttc gtgcaggaaa actacctgga gtaccggcag      1020
gtccccggca gtgatectgc atgttatgaa ttctgtggg gtccaagggc cctcgttgaa      1080
accagctatg tgaagtcct gcaccatag gtaaagatca gtggaggacc tcacatttcc      1140
taccacccc tgcatgagtg ggttttgaga gagggggaag agggcggtca tcaccatcac      1200
catcaccatt aa                                                                1212

```

# FIG. 12

Proteína de fusión de CLYTA-MAGE3-Histidina (SEC ID N°: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 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

```

# ES 2 389 513 T3

	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	400
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		

**FIG. 13**

ADN de la proteína de fusión CLYTA-MAGE3-His (SEC ID  
Nº:40)

```

atgaaagggg gaattgtaca ttcagacggc tcttatccaa aagacaagtt tgagaaaatc      60
aatggcactt ggtactactt tgacagttca ggctatatgc ttgcagaccg ctggaggaag      120
cacacagacg gcaactggta ctggttcgac aactcaggcg aaatggctac aggctggaag      180
aaaatcgctg ataagtggta ctatttcaac gaagaaggctg ccatgaagac aggctgggtc      240
aagtacaagg acacttggta ctacttagac gctaaagaag gcgccatggt atcaaatgcc      300
tttatccagt cagcggacgg aacaggctgg tactacctca aaccagacgg aacactggca      360
gacaggccag aattggccag catgctggac atggatctgg aacagcgtag tcagcactgc      420
aagcctgaag aaggccttga ggcccagga gaggccctgg gcctggtggg tgcgcaggct      480
cctgctactg aggagcagga ggctgcctcc tctcttctca ctctagtga agtcaccctg      540
ggggaggtgc ctgctgccga gtcaccagat cctcccaga gtctcaggg agcctccagc      600
ctcccacta ccatgaacta cctctctgag agccaatcct atgaggactc cagcaaccaa      660
gaagaggagg ggccaagcac cttccctgac ctggagtctg agttccaagc agcactcagt      720
aggaaggtgg ccaagtgggt tcattttctg ctctcaagt atcgagccag ggagccggtc      780
acaaaggcag aaatgctggg gagtgtcgtc ggaaattggc agtacttctt tctgtgatc      840
ttcagcaaag ctccgattc cttgcagctg gtctttggca tcgagctgat ggaagtggac      900
cccatcggcc acgtgtacat ctttgccacc tgcttgggcc tctcctacga tggcctgctg      960
ggtgacaatc agatcatgcc caagacaggc ttcttgataa tcatcctggc cataatcgca     1020
aaagagggcg actgtgcccc tgaggagaaa atctgggagg agctgagtgt gttagagggtg     1080
tttgagggga ggggaagacag tatcttcggg gatcccaaga agctgctcac ccaatatttc     1140
gtgcaggaaa actacctgga gtaccggcag gtccccggca gtgatcctgc atgctatgag     1200
ttctgtggg gtccaagggc cctcattgaa accagctatg tgaaagtcct gcaccatatg     1260
gtaaagatca gtggaggacc tcgcatttcc taccactcc tgcatgagtg ggctttgaga     1320
gagggggaag agggcggtca tcaccatcac catcaccatt aa                          1362

```



# FIG. 15

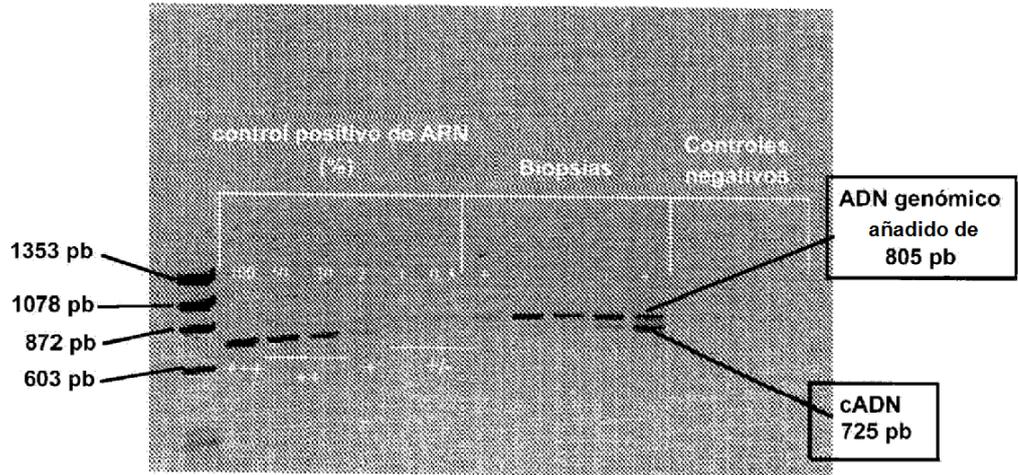
Comparación de MAGE-A3 (SEC ID N°:51) y MAGE-A6 (SEC ID N°:52)

```

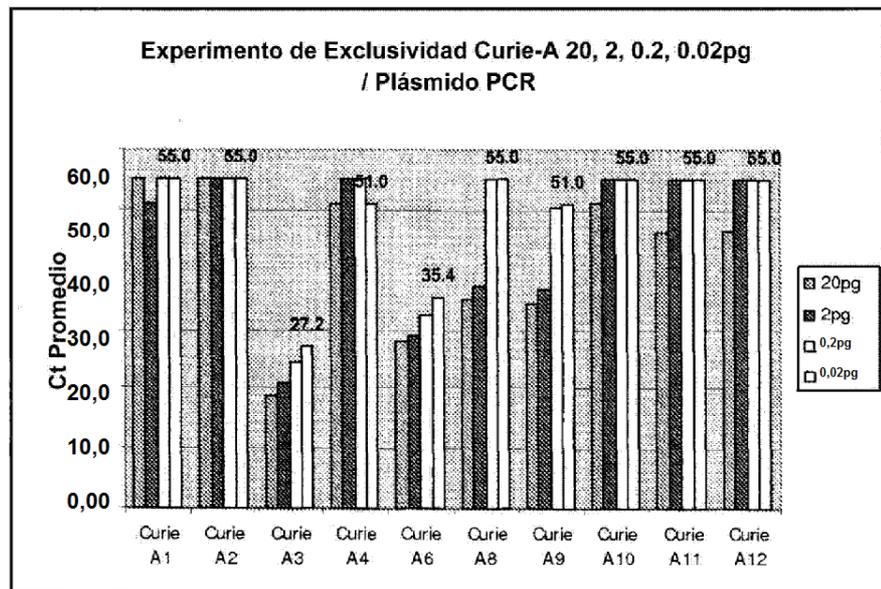
MAGE-A3 ccaagcagcactcagtaggaaggtggccgagttggttcattttctgctcctcaagtatcg
MAGE-A6 ccaagcagcactcagtaggaaggtggccagttggttcattttctgctcctcaagtatcg
MAGE-A3 agccagggagccggtcacaaaggcagaaatgctggggagtgtcgtcgggaaattggcagta
MAGE-A6 agccagggagccggtcacaaaggcagaaatgctggggagtgtcgtcgggaaattggcagta
MAGE-A3 tctctttcctgtgatcttcagcaaaacttcagttcctgcagctggtctttgcatcga
MAGE-A6 ctctcttctgtgatcttcagcaaaagcttcctcagttcctgcagctggtctttggcatcga
MAGE-A3 cctgatggaagtggaccccatcgccacttgtacatctttgccacctgctgggcctctc
MAGE-A6 gctgatggaagtggaccccatcgccacttgtacatctttgccacctgctgggcctctc
MAGE-A3 ctacgatggcctgctgggtgacaatcagatcatgcccaaggcagcctcctgataatcgt
MAGE-A6 ctacgatggcctgctgggtgacaatcagatcatgcccaaggcagcctcctgataatcgt
MAGE-A3 cctggccataatcgcaagagaggccactgtgccctgaggagaaaatctgggaggagct
MAGE-A6 cctggccat atcgcaaaagaggggcactgtgccctgaggagaaaatctgggaggagct
MAGE-A3 gagtgtgtagaggtgtttgaggggaggaagacagtatcttggggatcccaagaagct
MAGE-A6 gagtgtgtagaggtgtttgaggggaggaagacagtatcttggggatcccaagaagct
MAGE-A3 gctcaccacaacatttctgagcaggaaactacctggagtaccggcaggtccccggcagtgga
MAGE-A6 gctcaccacaatatttctgagcaggaaactacctggagtaccggcaggtccccggcagtgga
MAGE-A3 tcctgcatggttatgaa tcctgtgggtccaaggccctcgttgaaaccagctatgtgaa
MAGE-A6 tcctgcatggttatgaa tcctgtgggggtccaaggccctcattgaaaccagctatgtgaa
MAGE-A3 agtcctgcaccataggtaaagatcagtgaggacctcacatttctaccacccctgca
MAGE-A6 agtcctgcaccataggtaaagatcagtgaggacctcacatttctaccacccctgca

```

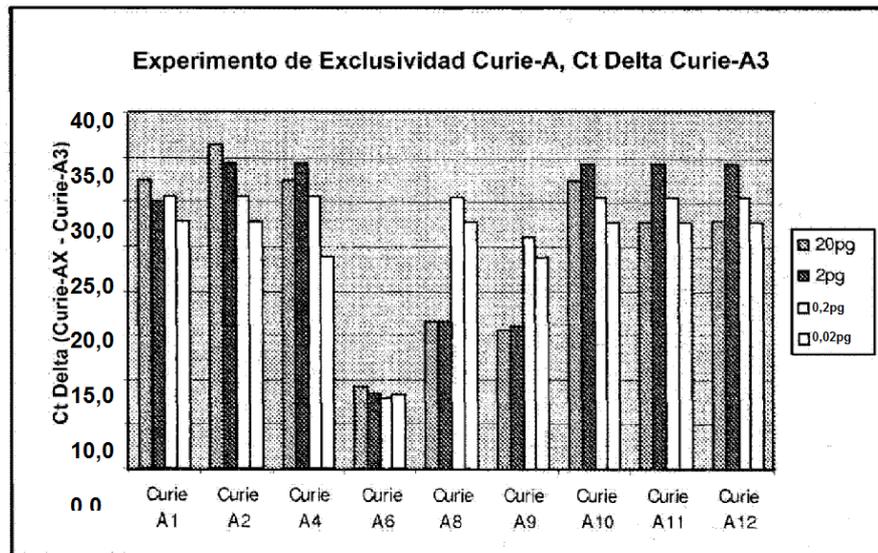
**FIG. 16**



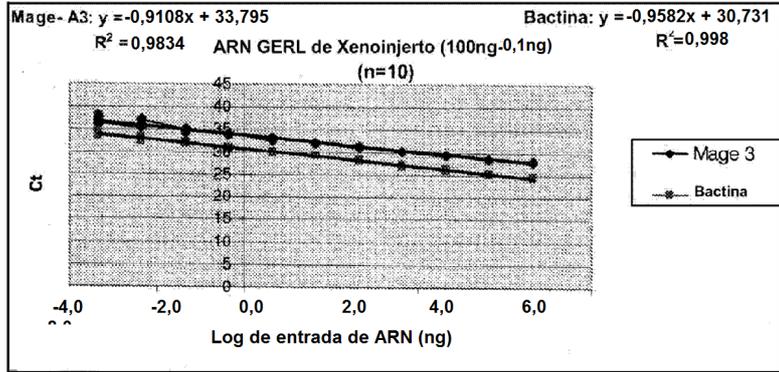
**FIG. 17:** Comparación Gráfica de valores Ct de Plásmidos MAGE-A utilizando 20, 2, 0.2 0.02 pg de ADN



**FIG. 18:** Comparación Gráfica de valores Ct Delta Relativos a MAGE-A3 para otros Plásmidos MAGE-A utilizando 20, 2, 0.2 0.02 pg de ADN



**FIG. 19:** Linealidad de ARN GERL de Xenoinjerto FEPE - diluciones en serie con factor de dilución de 2 de 100 a 0,1 ng de entrada de ARN



**FIG. 20:** Ct Delta frente a Log (en Base 2) de entrada de ARN para ARN GERL de Xenoinjerto FFP

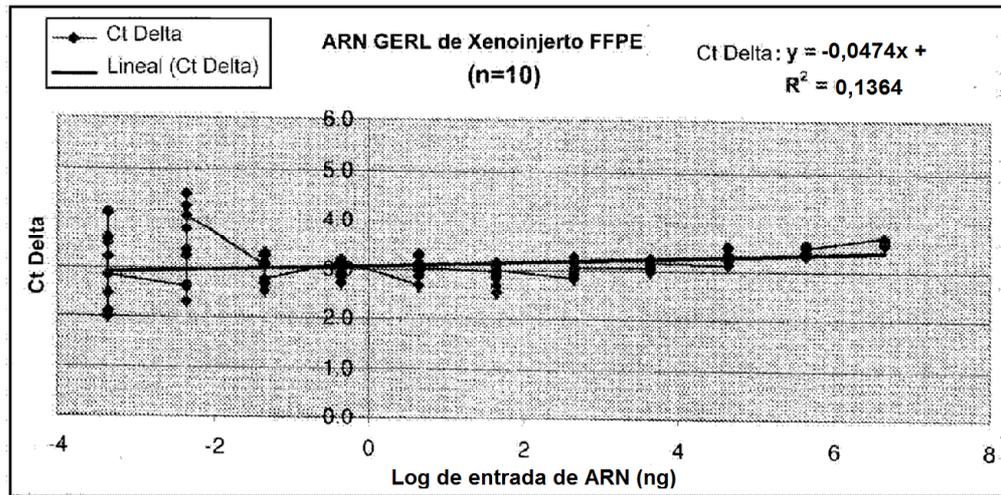


Tabla 1. Cebadores oligonucleotídicos utilizados para RT-PCR semi-cuantitativa *MAGE RT-PCR*

SEC ID N°s	Nombre	Secuencia	Especificidad	gADN de Amplicon	mARN
SEC ID N°: 1	MAGE3-E2F	TGGAGGACCAGAGGCCCCC	MAGE-A3	805 pb	725 pb
SEC ID N°: 2	MAGE3-E3R	GGACGATTATCAGGAGGCCTGC			
SEC ID N°: 18	B-actina-E4F	GGCATCGTGATGGACTCCG	$\beta$ -actina	615 pb	+ 615 pb
SEC ID N°: 19	B-actina-E6R	GCTGGAAGGTGGACAGCGA		830 pb	

F= directo, R=Inverso, bp= pares de bases

ES 2 389 513 T3

Tabla 2. Cebadores y sondas de oligonucleótidos utilizados para RT-PCR cuantitativa Taqman

	Nombre	Secuencia	Cebador	Tinta
Cebadores específicos de MAGE-A3 de Exon 3				
SEC ID Nº: 3	E3 MAGE3 TMF	GTCGTCGGAAATTGGCAGTAT	Directo	FAM; NFQ-MGB
SEC ID Nº: 4	E3 MAGE3 TMR	TGGGGTCCACTTCCATCAG	Inverso	
SEC ID Nº: 13	E3 MAGE3 TMP	AAAGCTTCCAGTTCCTT	Sonda	
Cebadores Específicos de MAGE-A3 de Intron 3				
SEC ID Nº: 5	I3 MAGE3 TMF	TAAGCCTTTGTTAGAGCCTCCAA	Directo	NED; NFQ-MGB
SEC ID Nº: 6	I3 MAGE3 TMR	GGAGAGAGGGAGCATGTGAGA	Inverso	
SEC ID Nº: 14	I3 MAGE3 TMP	TTCCATTCAGTACTCAG	Sonda	
Cebadores específicos de Beta-actina				
SEC ID Nº: 20	B-actina- TMF	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	Directo	VIC; NFQ-MGB
SEC ID Nº: 21	B-actina- TMR	CGGCCACATTGTGAACTTTG	Inverso	
SEC ID Nº: 22	B-actina- TMP	TGCTCGCTCCAACC	Sonda	

**Tabla 3**

RT-PCR	PCR TaqMan		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	40	0	40
Positivo	3	28	31
Total	43	28	71

**Tabla 4**

Valores Ct

	Exon MAGE-3		Intron MAGE-3		Beta-Actina	
	RGI	GSK	RGI	GSK	RGI	GSK
<i>TC1</i>	40.08	40.00	40.00	40.00	39.25	37.40
<i>pS15</i>	34.07	33.94	40.00	40.00	33.32	32.76
<i>GIRL</i>	31.77	31.38	34.45	33.83	23.11	22.69
<i>CRL 1675</i>	33.19	32.90	34.63	34.53	21.68	21.43
<i>990118</i>	33.11	32.99	35.13	34.23	23.63	23.17
<i>990010</i>	37.42	40.00	40.00	40.00	23.05	22.67
<i>990101</i>	35.81	36.10	37.94	38.57	23.86	23.48
<i>990102</i>	38.19	38.74	40.00	39.42	26.94	26.56
<i>990133</i>	<b>Cantidad No Suficiente</b>					
<i>990152</i>	35.97	37.61	39.22	38.44	23.36	23.00
<i>990159</i>	36.80	36.73	37.77	37.52	26.66	26.27
<i>990784</i>	35.90	38.13	36.77	37.90	26.54	26.09

**Tabla 5**

SEC ID N°	SECUENCIA GRUPO/NOMBRE	SECUENCIA	Marcador 5'	Marcador 3'
<b>GRUPO 1 (ds)</b>				
15	MAGEA3-801Tmc	CAG GAG GCC TGC CTT	6-FAM	MGBNFQ
7	MAGEA3-775F	TGCTGGGTGACAATCAGATCAT	Tamaño de Amplicon: 75pb	
8	MAGEA3-849R	CGCCCTCTCTTGCGATTATG		
<b>GRUPO 2 (ds)</b>				
16	MAGEA3e-1000Tmc	TTCATAACATGCAGGATCAC	6-FAM	MGBNFQ
9	MAGEA3e-950F	CCAACATTTCGTGCAGGAA	Amplicon: 88pb; Tm 82 C	
10	MAGEA3e-1037R	CCTTGGACCCACAGGAA		
<b>GRUPO 3 (ds)</b>				
17	MAGEA3F-651Tm	CCT GTG ATC TTC AGC AAA	6-FAM	MGBNFQ
11	MAGEA3F-623F	TGTCGTCGGAAATTGGCAGTAT	Tamaño de Amplicon: 75 pb; 79 C	
12	MAGEA3F-697R	CAAAGACCAGCTGCAAGGAACT		

**Tabla 7**

*Secuencias de Cebador y Sonda MAGE-A3 Taqman COBAS™*

<b>Secuencias de Cebador MAGE-A3 Taqman COBAS™</b>	
MAGEA3f-623F: (HW MAGEA3 F; SEC ID N° 11)	5' TGTCGTCGGAAATTGGCAGTAT 3'
MAGEA3f-697R: (HW MAGEA3 R; SEC ID N° 12)	5' CAAAGACCAGCTGCAAGGAACT3'
<b>Secuencia de Sonda MAGE-A3 Taqman COBAS™</b>	
MAGEA3F-646MOD	5'-ELFLLLFFLQGLGALFLLFAGFAAAGFLLFP-3'

E= Colorante indicador FAM, F = 5-Metilo dD, Q = BHQ2 Extintor, L = 5-propinilo dU,

P=Fosfato, I=Indicador HEX

La secuencia de la sonda MAGEA3F-646MOD comprende los siguientes nucleótidos modificados

5' - TCTTTCTGTGATCTTCAGCAAAGCTTC - 3'

**Tabla 8**

*Secuencias de Cebador y Sonda de beta-actina Taqman COBAS*

<b>Secuencias de Cebador de beta-actina COBAS</b>	
RGI BACT F2: (SEC ID N° 53)	5'-GAGCGCGGCTACAGCTT-3'
RGI BACT R2: (SEC ID N° 54)	5' -TCCTTAATGTCACGCACGATTT-3'
<b>Secuencias de Sonda de beta-actina TaqMan</b>	
HW:RGIBACT H: (SEC ID N° 55)	5'-IACCACCAQCGGCCGAGCGGP-3'

E= Colorante indicador FAM, F = 5-Metilo dD, Q = BHQ2 Extintor, L = 5-propinilo dU,

P=Fosfato, I = Indicador HEX

**Tabla 9***Intervalo CT Válido de Muestra y Control*

Controles	Intervalo Ct Válido
Gen Mage Muestra FFPET 50 ng de FAM	<35,2
Gen $\beta$ actina Muestra FFPET 50 ng de HEX	<32,1
Gen Mage de Gerl al 100% 50 ng de FAM	26,0-29,5
Gen $\beta$ actina de Gerl al 100% 50 ng de HEX	24,0-27,0
Gen Mage de Gerl al 1% 0,5 ng de FAM	33,0-35,5
Gen $\beta$ actina de Gerl al 1% 0,5 ng de HEX	29,0-32,5
Gen Mage de UHR al 100% 50 ng de FAM	25,0-28,0
Gen $\beta$ actina de UHR al 100% 50 ng de HEX	22,0-25,0
Gen Mage de UHR al 1% 0,5 ng de FAM	31,0-33,0
Gen $\beta$ actina de UHR al 1% 0,5 ng de HEX	27,0-29,0
Control de ADN Positivo P53 20 ng de FAM	26,5-29,0
Control Negativo (CN)	>38,0

**Tabla 10***Perfil de ciclo térmico*

Perfil térmico PCR para experimento de exclusividad MAGE-A3

<b>Etapas</b>	<b>Descripción</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Número de ciclo</b>
1	Descontaminación UNG	50°C	5 min.	1X
2	Desnaturalización	95°C	15 seg.	2X
	Hibridación	63°C	25 seg.	
3	Desnaturalización	92°C	15 seg.	53X
	Hibridación	63°C	50 seg.	
4	Post ciclo	40°C	2 min.	1X

**Tabla 11**

*Perfil térmico de la RT-PCR para experimentos de Linealidad y eficacia de RT-PCR, Sensibilidad Analítica (Limite de Detección) Procedimiento de Correlación y Reproducibilidad)*

<b>Etapas</b>	<b>Descripción</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Número de ciclo</b>
1	Descontaminación UNG	50°C	5 min.	1X
2	Desnaturalización	95°C	1 min.	1X
3	Transcripción inversa	60°C	20 min.	1X
4	Desnaturalización	95°C	15 seg.	2X
	Hibridación	63°C	25 seg.	
6	Desnaturalización	92°C	15 seg.	53X
	Hibridación	63°C	50 seg.	
7	Post Ciclo	40°C	2 min.	1X

Para mejorar la especificidad de MAGE-A3 con relación a otros miembros de la familia de MAGE-A3 se implementó una temperatura de hibridación relativamente alta de 63°C.

Tabla 12: Valores Ct de Plásmidos MAGE-A utilizando 20, 2, 0.2 0.02 pg de ADN

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

Tabla 13: Valores Ct Delta Relativos a MAGE-A3 para otros Plásmidos MAGE-A utilizando 20, 2, 0.2 0.02 pg de ADN

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

Tabla 14: Validación de Experimento de Exclusividad MAGE-A3

Control	Proceso1	Proceso2	Proceso3	Proceso4	Proceso5	Proceso6	Proceso7	Proceso8
P53 (20ng)	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

Los Ct de control estuvieron dentro del intervalo validado. El experimento aprobó la validación.

Tablas 15 y 16: Detalles de Experimento de Exclusividad MAGE-A3

Objeto/Reactivo	ID/Lote
MMX (Universal)	CW120406
Cebador/sonda	JL011507
Combinación MgOAc MnOAc	CW012607
p53 0.4ng/ul	120506HL
H <sub>2</sub> O	C08E41
P-1000	3250
P-200	3248
P-20	3244
Cubierta de Bioseguridad	6

k-bandeja	Lote	CTM48
72910	6004153	1093
72512	6004153	1093
72867	6004153	1012
72561	6004153	1012
78933	6004153	1074
78804	6004153	1074
78950	6004153	108
78852	6004153	108

Ubicación de Almacenamiento de Datos Digital: J:/Investigación de Descubrimiento/GenExpPerfil/GSK/Experimentos IDE/Exclusividad Mage

Referencias de Cuadernos de Anotación: HL38027, JL38664, KM34771

Tabla 17: Linealidad de Ct de MAGE-A3 y  $\beta$ -actina y Ct delta de copias a 11 niveles

GERL-b de Xenoinjerto en Agua (n=10)										
Dilución	Entrada ARN (ng)	Curie-A3			Bactina			Ct Delta		
		Promedio CT	STD	%CV	Promedio CT	STD	%CV	Ct Delta	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	0.125	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	26.49%
11	0.10	36.9	0.745	2.02%	34.0	0.244	0.72%	2.9	0.73	25.04%

Tabla 18: Eficacia de amplificación por RT-PCR de MAGE-A3 y  $\beta$ -actina

Entrada de ARN 100 - 01 ng	Pendiente	EA	% de Eficacia
MAGE-A3	-0.9108	2.14	107.0
$\beta$ -actina	-0.9582	2.06	103.1

Tabla 19 - Validación del experimento de Linealidad/Eficacia por RT-PCR

NC	Proceso1	Proceso2	Proceso3	Proceso4	Proceso5	Proceso6	Proceso7	Proceso7	Proceso7	Proceso7
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
Bactina-HEX	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0
Bactina-HEX	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0
Bactina-HEX	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	NA
Bactina-HEX	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	>38.0	NA

Los Ct control estuvieron dentro del intervalo validado. El experimento aprobó la validación.

Tablas 20, 21 y 22: Detalles del experimento de Linealidad/Eficacia por RT-PCR

Reactivos de Aislamiento	Número de Lote	Fecha de caducidad
Tampón PKD	121100445	01/2007
Proteinasa K	12199252	01/2007
Tampón RBC	12199582	01/2007
Columna Eliminadora de gADN	12198612	01/2007
Etanol	64209 (Sigma)	01/2007
Columna RNeasy MinElute	121100265	01/2007
DNase I	12411639	01/2007
RDD	11877821	01/2007
Tampón RWT	Lote de Investigación	01/2007
Tampón RPE	12199510	01/2007
Agua sin RNase	12199577	01/2007

Objeto/Reactivo	ID/Lote
MMX (Universal)	CW120406
Cebador/Sonda	JL011507
Combinación MgOAc MnOAc	HW121906
Gerl-b	11507
Stac-b	11507
UHR	760380
H <sub>2</sub> O	C08E41
P-1000	3250
P-200	3248
P-20	3244
Cubierta de Bioseguridad	6

k-bandeja	Lote	CTM48
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

Ubicación de Almacenamiento de Datos Digital: J:/Investigación de Descubrimiento/GenExpPerfil/GSK/Experimentos IDE/Linealidad/RMS  
 Referencias de Cuadernos de Anotación: JL38664, JL38664, KM34771.

Tabla 23: Índice de acierto del Ct de MAGE- N = 24 para Cada Condición

Δ3

<b>Entrada Total</b>	<b>0.5%Gerl 99.5%Stac</b>	<b>1%Gerl 99%Stac</b>	<b>5%Gerl 95%Stac</b>
12.5ng	0/24	4/24	24/24
25ng	6/24	20/24	24/24
50ng	23/24	24/24	24/24
100ng	18/24	24/24	24/24

Tabla 24: Porcentaje de índice de acierto del Ct de MAGE-A3, N = 24 para Cada Condición

Entrada Total	0.5%Gerl 99.5%Stac	1%Gerl 99%Stac	5%Gerl 95%Stac
12.5ng	0%	16.7%	100%
25ng	25%	83.3%	100%
50ng	95.8%	100%	100%
100ng	75%	100%	100%

Tabla 25 Índice de acierto del Ct de la  $\beta$ -actina, N = 24 para Cada Condición

Entrada Total	0.5%Gerl 99.5%Stac	1%Gerl 99%Stac	5%Gerl 95%Stac
12.5ng	24/24	24/24	24/24
25ng	24/24	24/24	24/24
50ng	24/24	24/24	24/24
100ng	24/24	24/24	24/24

Tabla 26: Porcentaje de índice de acierto de  $\beta$ -actina, N = 24 para Cada Condición

Entrada Total	0.5%Gerl 99.5%Stac	1%Gerl 99%Stac	5%Gerl 95%Stac
12.5ng	100%	100%	100%
25ng	100%	100%	100%
50ng	100%	100%	100%
100ng	100%	100%	100%

# ES 2 389 513 T3

Tabla 27: Valores Ct de control con FAM de genes MAGE

Control	Proceso 4C	Proceso 4D	Proceso 5A	Proceso 6C	Proceso 6D	Proceso 7A	Proceso 8C	Proceso 8D	Proceso 8A	Proceso 7B	Proceso 10C	Proceso 10D	Proceso 11A	Proceso 11B	Proceso 12B	Proceso 12BB
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	35.11
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
100% Gerl	27.35	27.31	27.36	27.34	27.38	27.57	27.78	27.62	28.04	27.51	27.75	28.02	27.83	27.60	27.82	28.05
100% UHR	25.33	25.34	25.39	25.31	25.34	25.46	25.85	26.44	25.92	25.93	25.65	25.76	26.06	25.92	25.97	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

Tabla 28: Valores Ct de control con HEX de la  $\beta$ -actina

Control	Proceso 4C	Proceso 4D	Proceso 5A	Proceso 6C	Proceso 6D	Proceso 7A	Proceso 8C	Proceso 8D	Proceso 8A	Proceso 7B	Proceso 10C	Proceso 10D	Proceso 11A	Proceso 11B	Proceso 12B	Proceso 12BB
1% Gerl	30.30	30.87	30.78	29.65	30.68	30.93	30.85	30.49	30.44	30.68	30.41	30.95	31.47	31.58	31.39	31.25
1% UHR	27.58	27.38	27.75	27.74	27.80	27.71	27.62	27.52	27.43	27.62	27.28	27.31	27.82	27.65	27.64	27.71
100% Gerl	24.82	24.67	24.74	24.71	24.70	24.98	25.07	24.78	25.41	24.82	25.00	25.23	25.04	24.89	25.04	25.15
100% UHR	22.31	22.18	22.22	22.20	22.16	22.38	22.83	22.78	22.83	22.69	22.41	22.45	22.02	22.67	22.71	22.69
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

Los Ct de control están dentro del intervalo validado. El experimento aprobó la validación.

Tabla 29; Tabla 30; y Tabla 31: Detalles del Experimento de Límite de Detección

Reactivos de Aislamiento Gerl & Stac	Número de Lote	Fecha de caducidad
Tampón PKD	121100445	12/14/2007
Proteinasa K	12199252	12/11/2007
Tampón RBC	124101094	12/18/2007
Columna Eliminadora de gADN	12198612	12/15/2007
Etanol	06H07GA	2/15/2008
Columna de RNeasy MinElute	121100265	12/6/2007
DNase I	124119201	12/6/2007
RDD	124115915	12/6/2007
Tampón RWT	124114997	12/18/2007
Tampón RPE	12199510	12/15/2007
Agua sin RNase	12199577	12/15/2007

Objeto/Reactivo	ID/Lote
MMX (Universal)	CW120406
Cebador/Sonda	JL011507
Combinación de MgOAc MnOAc	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
Cubierta de Bioseguridad	4,5,6,1574

k-bandeja	Lote	CTM48
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

Ubicación de Almacenamiento de Datos Digital: J:/Investigación de Descubrimiento/GenExpPerfil/GSK/Experimentos IDE/Experimentos LOD  
Referencias de Cuadernos de Anotación: JL38664, LC38028, HL38027, KM38662, HL38661.

**Tabla 32: Resumen de validación cruzada de muestras**

<b>Resultados de Validación Cruzada</b>	<b>COBAS</b>	<b>Prototipo</b>
Muestras Totales Disponibles para ensayo	131	131
Muestra sin gADN	123	123
Muestras OOR	4	10
Muestras de ARN insuficiente	2	5
Muestras Restantes	117	108

OOR = Expresión MAGE-A3 de la muestra por encima del umbral, aunque Ct MAGE-A3 fuera del intervalo aceptable.

Muestras de ARN Insuficiente = Ct  $\beta$ -actina fuera del intervalo aceptable.

Tabla 33: Ensayos COBAS y de prototipo, positivos y negativos mediante comparador de porcentaje de coincidencia

prototipo frente a COBAS	COBAS Positivo	COBAS Negativo
prototipo Positivo	59	5
prototipo Negativo	4	39

98/107 91.6% Concordancia

Positivo Determinado por el Comparador de Porcentaje de Coincidencia 59/64 ó 92.2%

Negativo Determinado por el Comparador de Porcentaje de Coincidencia 39/43 ó 90.7%

Tabla 34: Ensayos COBAS y de prototipo, positivos y negativos

mediante Comparador de Porcentaje de Coincidencia con

ensayo de congelación para Resolver Resultados Discordantes

RGI. frente a RMS con Resultados GSK para Resolver Discordancia	RMS Positivo	RMS Negativo
RGI Positivo	63	1
RGI Negativo	1	42

105/107 98.1% Concordancia

Positivo Determinado por el Comparador de Porcentaje de Coincidencia 63/64 ó 96,4 %

Negativo Determinado por el Comparador de Porcentaje de Coincidencia 42/43 ó 97.7%

Tabla 35: Valores Ct del gen MAGE de control de experimento

Control	Proceso 1	Proceso 2	Proceso 3	Proceso 4	Proceso 5	Proceso 6	Proceso 7	Proceso 8	Proceso 9	Proceso B	Proceso 7RX
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	33.60	33.54	NA
100%Gerl	27.49	27.63	27.84	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	>36	>38	>38	>38	NA

Tabla 36: Valores Ct de la β-actina de control de experimento

Control	Proceso 1	Proceso 2	Proceso 3	Proceso 4	Proceso 5	Proceso 6	Proceso 7	Proceso 8	Proceso 9	Proceso B	Proceso 7RX
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	31.38	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	24.83	25.07	25.13	25.17	25.07	25.96	24.57	24.68	25.16	NA
1%UHR	27.50	27.65	27.82	28.03	28.33	28.51	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	22.30	22.33	22.37	22.39	22.51	22.44	24.35	22.71	22.15	22.50	22.97
100%UHR	22.56	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

Los Ct de Control están dentro del intervalo validado. El experimento aprobó la validación.

## ES 2 389 513 T3

Tablas 37, 38 y 39 Detalles del experimento del procedimiento de correlación/validación cruzada

Reactivos de Aislamiento	Número de Lote	Fecha de caducidad
Tampón PKD	121100445	12/14/2007
Proteinasa K	12199252	12/11/2007
Tampón RBC	124101094	12/18/2007
Columna Eliminadora de gADN	12198612	12/15/2007
Etanol	06A49GA	8/14/2007
Columna RNeasy MinElute	121100265	12/6/2007
DNase I	124119201	12/6/2007
RDD	124115915	12/6/2007
Tampón RWT	124114997	12/18/2007
Tampón RPE	12199510	12/15/2007
Agua sin RNase	12199577	12/15/2007

Objeto/Reactivo	ID/Lote
MMX (Universal)	CW120406
Cebador/Sonda	JL011507
Combinación MgOAc MnOAc	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
Cubierta de Bioseguridad	4,5,6

k-bandeja	Lote	CTM48
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

Ubicación de Almacenamiento de Datos Digital: J:/Investigación de Descubrimiento/GenExpPerfil/GSK/Experimentos IDE/Validación Cruzada  
Referencias de Cuadernos de Anotación: JL38664, LC38028, HL38027, KM38662, KM34771.

Tabla 40: Proceso 1 - Umbral de la expresión de MAGE-A3 de controles ARN de GERL

Control de ARN GERL	100% $\beta$ -actina	1% Curie	Delta Ct	Valor de umbral Curie-A3
Réplica 1	24.56	33.48	-8.92	2.06E-03
Réplica 2	24.47	33.29	-8.82	2.21E-03
Promedio	24.51	33.39	-8.87	2.13E-03

Tabla 41: Proceso 2 - Respuesta de la Expresión de MAGE-A3 para la reproductibilidad de especímenes

Acceso RGI #	Muestra ID	Ct de Mage A3	Ct de $\beta$ -actina	Delta	Expresión	% Gerl	Resp. de Mage
AGG-07-0000580	990105	46.0	24.4	-21.6	3.25383E-07	0.00	Negativo
AGG-07-0000580	990105	36.3	24.5	-11.9	0.000268087	0.13	Negativo
AGG-07-0000581	990112	46.0	24.3	-21.7	2.96142E-07	0.00	Negativo
AGG-07-0000581	990112	36.5	24.4	-12.1	0.000226088	0.11	Negativo
AGG-07-0000582	990116	36.6	26.2	-10.3	0.000770965	0.36	Negativo
AGG-07-0000582	990116	36.0	26.0	-10.1	0.000936414	0.44	Negativo
AGG-07-0000583	990117	46.0	23.6	-22.4	1.8283E-07	0.00	Negativo
AGG-07-0000583	990117	37.7	23.6	-14.1	5.75628E-05	0.03	Negativo
AGG-07-0000584	990131	36.1	25.8	-10.3	0.000804481	0.38	Negativo
AGG-07-0000584	990131	36.2	25.7	-10.5	0.000692747	0.32	Negativo
AGG-07-0000585	990619	32.9	25.4	-7.5	0.005560602	2.61	Positivo
AGG-07-0000585	990619	33.1	25.5	-7.7	0.004921188	2.31	Positivo
AGG-07-0000586	991157	29.2	22.2	-7.0	0.007818891	3.66	Positivo
AGG-07-0000586	991157	29.3	22.3	-7.0	0.007812905	3.66	Positivo
AGG-07-0000587	991158	26.4	24.4	-2.0	0.250968781	117.61	Positivo
AGG-07-0000587	991158	26.4	24.3	-2.1	0.238331954	111.69	Positivo
AGG-07-0000588	990130	29.0	25.4	-3.6	0.081955519	38.41	Positivo
AGG-07-0000588	990130	29.2	25.6	-3.6	0.083954419	39.34	Positivo
AGG-07-0000589	990136	28.3	24.8	-3.5	0.087129355	40.83	Positivo
AGG-07-0000589	990136	28.2	24.7	-3.6	0.084384326	39.54	Positivo
AGG-07-0000590	395	31.3	24.1	-7.3	0.006411876	3.00	Positivo
AGG-07-0000590	395	31.5	24.1	-7.5	0.005674828	2.66	Positivo
AGG-07-0000591	512	28.6	24.5	-4.1	0.057999545	27.18	Positivo
AGG-07-0000591	512	28.6	24.4	-4.2	0.053251449	24.95	Positivo

ES 2 389 513 T3

Tabla 42: Proceso 2 - Umbral de la expresión de MAGE A3 de controles de ARN de GERL

Control de ARN GERL	100% $\beta$ -actina	1% Curie	Delta Ct	Umbral de Curie A-3
Réplica 1	25.11	34.05	-8.94	2.04E-03
Réplica 2	25.32	34.18	-8.86	2.15E-03
Promedio	25.21	34.11	-8.90	2.09E-03

Tabla 43: Proceso 2 - Respuesta de la Expresión de MAGE-A3 para la reproductibilidad de especímenes

Acceso RGI #	Muestra ID	CT de Mage A3	Ct de $\beta$ -actina	Delta	Expresión	% Gerl	Resp. de Mage
AGG-07-0000568	990105	36.1	26.1	-10.0	0.001006688	0.48	Negativo
AGG-07-0000568	990105	46.0	26.1	-19.9	1.0005E-06	0.00	Negativo
AGG-07-0000569	990112	46.0	26.1	-19.9	9.96715E-07	0.00	Negativo
AGG-07-0000569	990112	36.8	26.2	-10.5	0.000674353	0.32	Negativo
AGG-07-0000570	990116	36.9	27.2	-9.7	0.001187625	0.57	Negativo
AGG-07-0000570	990116	36.6	27.0	-9.6	0.001318477	0.63	Negativo
AGG-07-0000571	990117	35.7	24.6	-11.0	0.000474819	0.23	Negativo
AGG-07-0000571	990117	34.8	24.7	-10.1	0.000887085	0.42	Negativo
AGG-07-0000572	990131	46.0	26.5	-19.5	1.3292E-06	0.00	Negativo
AGG-07-0000572	990131	46.0	26.3	-19.7	1.17885E-06	0.00	Negativo
AGG-07-0000573	990619	34.6	28.5	-6.1	0.014100789	6.74	Positivo
AGG-07-0000573	990619	34.1	28.7	-5.5	0.022281952	10.65	Positivo
AGG-07-0000574	991157	31.1	23.3	-7.8	0.004582971	2.19	Positivo
AGG-07-0000574	991157	31.1	23.5	-7.6	0.005138918	2.46	Positivo
AGG-07-0000575	991158	28.8	25.6	-3.2	0.108292659	51.75	Positivo
AGG-07-0000575	991158	28.9	25.6	-3.3	0.102863278	49.15	Positivo
AGG-07-0000576	990130	31.1	26.4	-4.7	0.039418402	18.84	Positivo
AGG-07-0000576	990130	31.3	26.7	-4.6	0.040843351	19.52	Positivo
AGG-07-0000577	990136	31.8	27.0	-4.8	0.034810768	16.63	Positivo
AGG-07-0000577	990136	31.6	26.8	-4.8	0.035601088	17.01	Positivo
AGG-07-0000578	395	33.6	25.6	-8.0	0.004032587	1.93	Positivo
AGG-07-0000578	395	33.0	25.3	-7.6	0.005000295	2.39	Positivo
AGG-07-0000579	512	31.2	25.6	-5.6	0.020284412	9.69	Positivo
AGG-07-0000579	512	31.2	25.4	-5.8	0.018051401	8.63	Positivo

Tabla 44: Validación de la reproducibilidad

Control	Proceso 1 Cts de Control		Proceso 2 Cts de Control	
	MAGE Ct	$\beta$ -actina Ct	MAGE Ct	$\beta$ -actina Ct
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

Los Ct de Control están dentro del intervalo validado. El experimento aprobó la validación.

# ES 2 389 513 T3

Detalles del experimento de Reproducibilidad, Tablas 45, 46, 47

Proceso 1 de Reactivos de Aislamiento	Número de Lote	Fecha de caducidad
<b>Tampón PKD</b>	121100445	12/14/2007
Proteinasas K	12199252	12/11/2007
<b>Tampón RBC</b>	124101094	12/18/2007
Columna Eliminadora de gADN	12198612	12/15/2007
Etanol	06H07GA	2/15/2008
Columna de RNeasy MinElute	121100265	12/6/2007
DNase I	124119201	12/6/2007
RDD	124115915	12/6/2007
<b>Tampón RWT</b>	124114997	12/18/2007
<b>Tampón RPE</b>	12199510	12/15/2007
Agua sin RNasa	12199577	12/15/2007

Proceso 2 de Reactivos de Aislamiento	Número de Lote	Fecha de caducidad
<b>Tampón PKD</b>	124113180	2/15/2008
Proteinasas K	124125018	2/15/2008
<b>Tampón RBC</b>	124114320	2/15/2008
Columna Eliminadora de gADN	124125864	2/15/2008
Etanol	06H07GA	2/15/2008
Columna de RNeasy MinElute	124129928	2/15/2008
DNase I	124124041	2/15/2008
RDD	124122839	2/15/2008
<b>Tampón RWT</b>	124123852	2/15/2008
<b>Tampón RPE</b>	124119688	2/15/2008
Agua sin RNasa	124123699	2/15/2008

Objetivo/Reactivo	ID/Lote
MMX (Universal)	CW120406
Cebador/Sonda	JL011507
Combinación de MgOAc MnOAc	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
Cubierta de Bioseguridad	4,5

k-bandeja	Lote	CTM48
54562/54586	6004153	102
54669/54591	6004153	105

Ubicación de Almacenamiento de Datos Digital: J:/Investigación de Descubrimiento/GenExpPerfil/GSK/Experimentos IDE/Capacidad de Reproducción

Referencias de Cuadernos de Anotación: JL38664, LC38028, KM38662.