



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101932723 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 10

(21) 申请号 200880117371. 0

(22) 申请日 2008. 09. 17

(30) 优先权数据

60/960, 128 2007. 09. 17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 05. 17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2008/003142 2008. 09. 17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/037438 EN 2009. 03. 26

(73) 专利权人 肿瘤甲基化科学公司

地址 比利时斯达-提曼

专利权人 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司

(72) 发明人 I·弗拉森布雷克 K·比劳

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 张萍 李连涛

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

(56) 对比文件

Geng Qiu 等. 5' CpG island methylation

analysis identifies the MAGE-A1 and MAGE-A3 genes as potential markers of HCC.《Clinical Biochemistry》.2006, 第 39 卷 259-266.

Junichi Furuta 等. Promoter methylation profiling of 30 genes in human malignant melanoma.《Cancer Sci》.2004, 第 95 卷(第 12 期), 962-968.

Se J. Jang 等. Activation of Melanoma Antigen Tumor Antigens Occurs Early in Lung Carcinogenesis.《cancer research》.2001, 第 61 卷 7959-7963.

Andreas M. Rickert 等. ReW nement of single-nucleotide polymorphism genotyping methods on human genomic DNA: ampli X uor allele-speciW c polymerase chain reaction versus ligation detection reaction-TaqMan.《Analytical Biochemistry》.2004, 第 330 卷 288-297.

审查员 韦炜

权利要求书1页 说明书40页

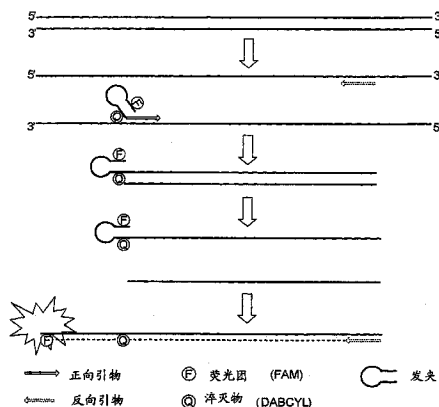
序列表14页 附图14页

(54) 发明名称

改进的对 MAGE-A 表达的检测

(57) 摘要

寡核苷酸、引物或探针包含 SEQ ID NO. 5、6、7、2、3、4、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 25 中任意的核苷酸序列。该类核苷酸可用于基因(特别是 MAGE-A3 基因)甲基化状态的检测。该类核苷酸在用于确定 MAGE-A3 基因甲基化状态以及用于诊断癌症、指导治疗 and 选择治疗对象的引物对、试剂盒和方法中可用。所述引物或探针可以包含环或发夹结构并可以在实时甲基化特异 PCR 中使用。



1. 用于检测 MAGE-A3 基因的甲基化状态的寡核苷酸引物对, 其中一种引物由 SEQ ID NO :7 的核苷酸序列组成以及第二种引物由 SEQ ID NO :6 的核苷酸序列组成, 其中所述第二种引物用形成荧光共振能量转移对的供体部分和受体部分的标记。

2. 用于检测 MAGE-A3 基因甲基化状态的试剂盒, 其包含如权利要求 1 定义的引物对。

3. 检测含 DNA 样品中非甲基化 MAGE-A3 基因存在和 / 或数量的方法, 其中所述方法不用于诊断或治疗疾病, 包括:

(a) 用亚硫酸氢盐试剂接触 / 处理所述含 DNA 样品, 所述试剂选择性修饰 DNA 中的非甲基化胞嘧啶残基以产生可检出的经修饰残基, 但所述试剂不修饰甲基化的胞嘧啶残基,

(b) 使用根据权利要求 1 的引物对扩增所述样品中的 DNA, 以及

(c) 检测扩增的 DNA 的存在和 / 或数量。

4. 权利要求 1 所述的寡核苷酸引物对在制备用于检测含 DNA 样品中的 MAGE-A3 基因甲基化状态的试剂盒的用途。

改进的对 MAGE-A 表达的检测

技术领域

[0001] 本发明涉及对 MAGE-A 家族基因表达的检测。更具体地,本发明涉及检测甲基化或非甲基化形式 MAGE-A3 的方法以及相关寡核苷酸、引物、探针、引物对和试剂盒。本发明的方法涉及扩增技术,特别是基于荧光的实时和终点 PCR 方法,并且具有诊断、预后和治疗应用。

背景技术

[0002] MAGE 基因属于癌症/睾丸抗原家族。MAGE 基因家族包含超过 20 个成员,其由 MAGEA、B、C 和 D 基因组成 (Scanlan 等, (2002) Immunol Rev. 188 :22-32 ;Chomez 等, (2001) Cancer Res. 61 (14) :5544-51)。它们在染色体 X 上成簇 (Lucas 等, 1998 Cancer Res. 58. 743-752 ;Lucas 等, 1999 Cancer Res 59 :4100-4103 ;Lucas 等, 2000 Int J Cancer 87 :55-60 ;Lurquin 等, 1997 Genomics 46 :397-408 ;Muscatelli 等, 1995 Proc Natl Acad Sci USA 92 :4987-4991 ;PoId 等, 1999 Genomics 59 :161-167 ;Rogner 等 1995 Genomics 29 :725-731), 并且具有尚未确定的功能 (Ohman 等 2001 Exp Cell Res. 265 (2) :185-94)。MAGE 基因具有高度的同源性,尤其是, MAGE-A 家族的成员具有 60-98% 的同源性。

[0003] 人 MAGE-A3 基因在多种类型的肿瘤中表达,包括黑素瘤 (Furuta 等, 2004 Cancer Sci. 95, 962-968.)、膀胱癌、肝细胞癌 (Qiu 等, 2006. Clinical Biochemistry 39, 259-266)、胃癌 (Honda 等, 2004 British Journal of Cancer 90, 838-843)、结肠直肠癌 (Kim 等, 2006 World Journal of Gastroenterology 12, 5651-5657) 以及肺癌 (NSCLC) (Scanlan 等 2002 Immunol Rev. 188 :22-32 ;Jang 等 2001 Cancer Res. 61, 21 :7959-7963)。除了睾丸生殖细胞或胎盘之外,在任何正常成体组织中未观察到其表达 (Haas 等, 1988 Am J Reprod Immunol Microbiol 18 :47-51 ;Takahashi 等, 1995 Cancer Res 55 :3478-382)。

[0004] 抗原特异性癌症免疫疗法 (Antigen-Specific Cancer Immunotherapeutics, ASCI) 代表设计用于训练免疫系统以高度特异性方式识别并清除癌细胞的新药物类型。由此, ASCI 允许靶向治疗。ASCI 具有两个基本组分:引导特异性针对癌细胞的免疫应答的“肿瘤抗原”和“佐剂系统”,其包含被选来增加抗肿瘤免疫应答的免疫激活化合物。W099/40188 中描述了适用于 ASCI 的 MAGE-A3 抗原和构建物,最近已经报道了令人鼓舞的在非小细胞肺癌 (Non Small Lung Cancer, NSCLC) 患者中使用 MAGE-A3 ASCI 的二期研究结果 (J. Clin. Oncol. Vol. 25, No. 18S (June 20 Suppl.) 2007 :7554)。

[0005] 重要的是拥有下述的定量高通量测定,即:能够特异性鉴定会受益于免疫治疗的 MAGE-A3 表达患者,出于给药目的监测 MAGE-A3 表达,在临床试验中鉴定 MAGE-A3 表达样品,或者简单地鉴定早期癌症患者。已经描述了许多可应用的诊断方法,其包括半定量 RT-PCR (De Plaen 等, 1994 Immunogenetics 40 (5) :360-9), 其它基于 PCR 的技术以及低密度微阵列 (Zammatteo 等, 2002 Clinical Chemistry 48 (1) 25-34)。此外, W02007/147876 中描述了用于联合 MAGE-A3 ASCI 使用的改进的 RT-PCR 方法。

[0006] 现有测定最大的缺点在于它们需要分离 RNA 来评估 MAGEA3 的表达。甲醛固定石

蜡包埋 (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE)) 肿瘤组织是临床中心常用的肿瘤组织保存方法。在甲醛中固定改变了组织中 RNA 分子的结构,造成交联以及部分降解。部分降解导致产生 100-300 碱基对的较小 RNA 片段。这些 RNA 的结构改变限制了从 FFPE 组织中提取的 RNA 应用于检测 MAGE3 表达水平。

[0007] 本发明的目的是提供消除了现有测定缺点的改进测定。

[0008] 基因甲基化是基因表达的重要调控因素。特别地,特定基因启动子区域 CpG 二核苷酸对中发现的胞嘧啶残基甲基化可以通过下调基因表达对许多疾病状况有贡献。例如,肿瘤抑制基因的异常甲基化可导致这些基因上调或下调,因此与许多癌症的存在和发展相关 (Hoffmann 等,2005Biochem Cell Biol183:296-321)。异常基因甲基化模式经常是组织来源特异性的。因此,特定基因甲基化状态的检测可能具有预后或诊断应用,并且可用于确定疾病的相对阶段以及预测对具体治疗类型的响应 (Laird.2003 Nat Rev Cancer 3:253-266)。

[0009] 在凝胶上显现结果的甲基化-特异性 PCR (MSP) (基于凝胶的 MSP 测定) 广泛应用于测定基因的表现遗传学沉默 (Esteller M 等, Cancer Res2001;61:3225-9.), 尽管已开发了使用其它技术的定量检测 (Laird PW., Nat RevCancer 2003;3:253-66;Eads 等, Nucleic Acids Res 2000;28:E32;Mikeska T, 等, J Mol Diagn 2007)。

[0010] 许多基于荧光的技术可用于实时监测核酸扩增反应。一个这样的技术描述于 US 6,090,552 和 EP 0912597, 其已知以 **Amplifluor®** 形式出售。此方法还适用于终点监测核酸扩增反应。Vlassenbroeck 等人 (Vlassenbroeck 等,2008. Journal of Molec.Diagn., V10, No. 4) 还描述了使用 **Amplifluor®** 技术的标准化直接实时 MSP 测定。

发明内容

[0011] 本发明涉及检测 MAGE-A3 表达的改进方法和 / 或测定。本发明还涉及某些类型的治疗,特别是基于抗原特异性癌症免疫疗法 (ASCI) 对患者进行治疗,所述患者通过使用本文所述的寡核苷酸、引物、探针、引物对、试剂盒和 / 或方法被鉴定为表达 MAGE-A3。通过测定 MAGE-A3 基因的甲基化状态而不是测定基因表达水平本身来监测 MAGE-A3 蛋白表达。本发明人显示出,它们的甲基化检测的甲基化状态结果与 RT-PCR 测定获得的结果具有良好的一致性,所述 RT-PCR 测定建立了受益于 MAGE-A3 免疫疗法的 NSCLC 中 MAGE-A3 表达的预测值。因此,所述测定可用于选择适于治疗的患者,用于预测成功治疗患者的可能性,以及可用于帮助患者选择治疗。

[0012] 在一个方面,本发明提供了寡核苷酸、引物或探针,所述寡核苷酸、引物或探针包含 SEQ ID NO. 2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 25 中任意的核苷酸序列或者基本由其组成或者由其组成,所述寡核苷酸、引物或探针可用于检测基因的甲基化状态。

[0013] 所述寡核苷酸、引物或探针优选包含 5' 到 3' 顺序的下列连续序列或基本由其组成或由其组成:

[0014] (a) 约 6 至 30 个核苷酸的第一核苷酸序列,其中所述第一核苷酸序列中的核苷酸用选自分子能量转移对的供体部分 (moiety) 和受体部分的第一部分标记,其中所述供体部分在受激发时发出一个或多个特定波长的荧光,所述受体部分吸收和 / 或淬灭所述供体

部分发射的所述荧光；

[0015] (b) 第二单链核苷酸序列,其包含约 3 至 20 个核苷酸、基本由其组成或者由其组成；

[0016] (c) 第三核苷酸序列,其包含约 6 至 30 个核苷酸、基本由其组成或由其组成,其中所述第三核苷酸序列中的核苷酸用选自所述供体部分和所述受体部分的第二部分标记,所述第二部分是所述组 (group) 中未用于标记所述第一核苷酸序列的成员,其中所述第三核苷酸序列反向互补于所述第一核苷酸序列,从而所述第一核苷酸序列与所述第三核苷酸序列之间可形成双链体使得所述第一部分和所述第二部分邻近,从而当供体部分受激发发射荧光时,受体部分吸收并淬灭所述供体部分发射的所述荧光;以及

[0017] (d) 在引物的 3'端,第四单链核苷酸序列,其包含约 8 至 40 个核苷酸、基本由其组成或者由其组成,所述核苷酸在其 3'端包含 SEQ ID NO. 2、4、5、7、8、11、13、14、16、17、19 或 25 中的任意核苷酸序列；

[0018] 其中当未形成所述双链体时,所述第一部分和所述第二部分分开一定距离,该距离阻止所述第一和第二部分之间的分子能量转移。

[0019] 3'端的特异性核苷酸序列允许测定 MAGE-A3 基因的甲基化状态。用合适试剂处理之后,这些引物优先结合非甲基化形式的 MAGEA3 基因 (如本文所讨论的)。本文讨论了这些寡核苷酸的性能,这些讨论可经必要的修改加以应用。通过核酸聚合酶,这些特异性核苷酸序列能够引发与包含 MAGE A 家族基因的甲基化或非甲基化 DNA 部分的核酸链互补的核苷酸序列的合成。

[0020] 更优选地,所述寡核苷酸、引物或探针由 SEQ ID NO. 3、6、9、12、15 或 18 的核苷酸序列组成并用于扩增目的基因的部分。

[0021] 本发明还提供了包含下列引物的引物对,所述引物包含 SEQ ID NO. 2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 25 中任意的核苷酸序列,或基本由其组成或者由其组成。

[0022] 在另一个方面,本发明还提供了包含至少一个引物、引物对或引物组的试剂盒,所述引物、引物对或引物组包含 SEQ ID NO. 2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 25 中任意的核苷酸序列,或基本由其组成或者由其组成。所述试剂盒用于检测基因、特别是 MAGE-A 家族基因例如 MAGE-A3 的甲基化状态。

[0023] 在另一个方面,本发明提供了检测含 DNA 样品中 Mage-A3 基因甲基化状态的方法,其包括：

[0024] (a) 用试剂接触 / 处理含 DNA 样品,所述试剂选择性修饰 DNA 中的非甲基化胞嘧啶残基以产生可检出的经修饰残基,但所述试剂不修饰甲基化的胞嘧啶残基

[0025] (b) 使用至少一个引物对扩增至少一部分的甲基化或非甲基化目的基因,所述引物对的至少一个引物设计成仅分别结合用所述试剂处理之后的甲基化或非甲基化 DNA,其中所述引物对中的至少一个引物包含 SEQ ID NO. 2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 25 中的任意核苷酸序列 (根据需要),或基本由其组成或者由其组成。

[0026] 在另一个方面,本发明提供了诊断癌症或者癌症倾向性 (predisposition) 的方法,包括通过使用本文所述的寡核苷酸、引物或探针、引物对、试剂盒或方法检测样品中 MAGE-A3 基因的甲基化状态,其中样品中存在非甲基化 MAGE-A3 指示癌症或者癌症倾向性。

[0027] 在另一个方面,本发明提供了确定 MAGE-A3 阳性肿瘤存在的方法,包括通过使用本文所述的寡核苷酸、引物或探针、引物对、试剂盒或方法检测样品中 MAGE-A3 基因的甲基化状态,其中存在非甲基化 MAGE-A3 指示 MAGE-A3 阳性肿瘤的存在。“MAGE-A3 阳性肿瘤”指表达 MAGE-A3 抗原的任何肿瘤或肿瘤细胞(分离自患者)。

[0028] 本发明还提供了鉴定和/或选择适于用 MAGE-A3 免疫疗法治疗的患者的方法,包括通过使用本文所述的寡核苷酸、引物或探针、引物对、试剂盒或方法检测样品中 MAGE-A3 基因甲基化状态,其中如果 MAGE-A3 基因是非甲基化的,则(优选地)鉴定和/或选择所述对象进行 MAGE-A3 免疫疗法。因此,具有非甲基化 MAGEA3 的患者优于所述基因甲基化的患者。

[0029] 或者,如果所述基因是非甲基化的,则优选地不鉴定和/或选择所述对象进行使用 MAGE-A3 免疫疗法的治疗。

[0030] 在相关方面,本发明提供了预测成功治疗癌症的可能性的方法,包括使用本文所述的寡核苷酸、引物或探针、引物对、试剂盒或方法检测样品中 MAGE-A3 基因甲基化状态,其中如果所述基因是非甲基化的,则使用 MAGE-A3 免疫疗法成功治疗的可能性高于所述基因甲基化的情况。

[0031] 或者,样品中没有非甲基化的 MAGE-A3 指示对使用 MAGE-A3 免疫疗法治疗有抗性的可能性高于所述基因非甲基化的情况。因此,甲基化 MAGE-A3 基因的检测指示使用免疫疗法成功治疗的可能性低。

[0032] 在另外的相关方面,本发明提供了选择合适癌症治疗方案的方法,包括使用本文所述的寡核苷酸、引物或探针、引物对、试剂盒或方法检测样品中 MAGE-A3 基因甲基化状态,其中如果所述基因是非甲基化的,则选择免疫疗法进行治疗。

[0033] 或者,如果所述基因是非甲基化的,则指示不使用免疫疗法治疗。

[0034] 本发明还提供了在对象中治疗癌症的方法,包括施用免疫疗法,其中已基于对 MAGE-A3 基因甲基化状态的检测选择所述患者进行治疗,其中根据本发明的任何方法或者通过使用本文所述的寡核苷酸、引物或探针、引物对、试剂盒或者方法检测 MAGE-A3 基因的甲基化状态。

[0035] 优选地,对于本文所述的所有不同方面,非甲基化 MAGE-A3 基因的检出对应于 MAGE-A3 蛋白水平的提高。

[0036] 本发明还提供了治疗患者的方法,包括:根据本发明的任何方法通过使用本文所述寡核苷酸、引物或探针、引物对、试剂盒或方法测定 MAGE-A3 基因的甲基化状态,以及然后向所述患者施用根据本文所述的包含 MAGE-A3 的组合物。如果发现所述 MAGE-A3 基因是非甲基化的,优选施用所述组合物。

[0037] 在另一个方面,本发明还提供了治疗易感于 MAGE-A3 表达(MAGE-A3-expressing)肿瘤复发的患者的方法,所述患者已经接受治疗除去了肿瘤组织,所述方法包括:根据本发明的任何方法或者通过使用本文所述寡核苷酸、引物或探针、引物对、试剂盒或方法测定肿瘤组织中 MAGE-A3 基因的甲基化状态,以及然后向所述患者施用根据本文所述的包含 MAGE-A3 的组合物。如果发现所述 MAGE-A3 基因是非甲基化的,优选施用所述组合物。

[0038] 在本发明的又一个方面,提供了包含 MAGE-A3 的组合物在制备用于治疗肿瘤患者的药物中的用途,其中已基于对 MAGE-A3 基因甲基化状态的检测选择所述患者进行治疗,

其中根据本发明的任何方法或者通过使用本文所述的寡核苷酸、引物或探针、引物对、试剂盒或者方法检测 MAGE-A3 基因的甲基化状态。本发明还提供了包含 MAGE-A3 的组合物,其用于治疗肿瘤患者,其中已基于对 MAGE-A3 基因甲基化状态的检测选择所述患者进行治疗,其中根据本发明的任何方法或者通过使用本文所述的寡核苷酸、引物或探针、引物对、试剂盒或者方法检测 MAGE-A3 基因的甲基化状态。

[0039] 在本发明的又一个实施方式中,提供了包含 MAGE-A3 的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗易感于 MAGE-A3 表达肿瘤复发的患者,其中已基于对 MAGE-A3 基因甲基化状态的检测选择所述患者进行治疗,其中根据本发明的任何方法或者通过使用本文所述的寡核苷酸、引物或探针、引物对、试剂盒或者方法检测 MAGE-A3 基因的甲基化状态。还提供了包含 MAGE-A3 的组合物,其用于治疗易感于 MAGE-A3 表达肿瘤复发的患者,其中已基于对 MAGE-A3 基因甲基化状态的检测选择所述患者进行治疗,其中根据本发明的任何方法或者通过使用本文所述的寡核苷酸、引物或探针、引物对、试剂盒或者方法检测 MAGE-A3 基因的甲基化状态。

[0040] 发明详述

[0041] 本发明提供了用于检测含 DNA 样品中甲基化或非甲基化 MAGE-A3 基因存在和 / 或数量的测定。为了开发此测定,需要鉴定 MAGE-A3 基因中易于甲基化的区域,并且开发特定的可以区分 MAGE-A3 基因的非甲基化形式和甲基化形式区的寡核苷酸。

[0042] 因此,在第一方面,本发明提供了寡核苷酸,其包含 SEQ ID NO. 2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 25 中任意的核苷酸序列,或者基本由其组成,或者由其组成。这些寡核苷酸可用于检测目的基因的甲基化状态。所述寡核苷酸可用作引物和 / 或探针。在某些实施方式中,所述寡核苷酸检测非甲基化形式的所述基因。用于检测非甲基化形式的合适寡核苷酸包含 SEQ ID NO. 2、4、5、7、8、11、13 或 25 中任意的核苷酸序列,或者基本由其组成,或者由其组成。用于检测甲基化形式的合适寡核苷酸包含 SEQ ID NO. 14、16、17 或 19 中任意的核苷酸序列,或者基本由其组成,或者由其组成。在某些实施方式中,如本发明所述这些寡核苷酸包含发夹结构。这些优选的寡核苷酸包含根据 SEQ ID NO. 3、6、9 和 12 的序列,以检测非甲基化形式的所述基因,以及 SEQ ID NO. 15 和 18,以检测甲基化形式的所述基因。

[0043] 本发明的“基因”或“目的基因”优选地为 MAGEA3 和 / 或 MAGEA6 基因。MAGEA3 和 MAGEA6 是由 HUGO 基因命名委员会批准的基因符号。MAGEA3 基因位于 X 染色体 (位置 q28),其基因序列以登录号 NM 005362 和 ENSG00000197172 列出。MAGE-A3 基因编码黑素瘤抗原家族 A, 3。MAGEA6 基因位于 X 染色体 (位置 q28)。MAGE-A3 经常可互换地被称为 MAGE-3 或 MAGEA3。类似地,MAGE-A6 经常可互换地被称为 MAGE-6 或 MAGEA6;其所有均在本文中使用。这些基因的低甲基化可能与癌症发生相关联,例如黑素瘤或肺癌 (包括 NSCLC)。

[0044] 易于甲基化的 CpG 二核苷酸通常集中在人基因的启动子区。在优选实施方式中,通过确定所述基因启动子区域的甲基化水平来评估所述基因的甲基化状态。“启动子”是转录起始位点 (TSS) 的上游区域,其从 TSS 延伸约 10kb、3kb、1kb、500bp 或者 150 至 300bp。对于 MAGE-3,启动子区域的 CpG 分布相当缺乏。

[0045] 术语“甲基化状况”或者“甲基化状态”指 DNA 序列内一个或多个 CpG 二核苷酸处存在或不存在 5- 甲基胞嘧啶 (“5-mCyt”)。“高甲基化”定义为甲基化水平高于正常水平

的增加。因此,它涉及基因的特定 CpG 位点处胞嘧啶的异常甲基化 (5-mCyt),经常是在启动子区。例如可以通过确定非癌细胞中甲基化的水平来确定甲基化的正常水平。

[0046] “低甲基化”指,相对于“正常”DNA 序列(在合适对照样品中发现的)中相应 CpG 二核苷酸处发现的 5-mCyt 的量,(测试 DAN 样品的)DNA 序列内一个或多个 CpG 二核苷酸处 5-mCyt 存在减少。同样,例如可以通过确定非癌细胞中甲基化的水平来确定甲基化的“正常”水平。在本发明中,MAGE-A3 和 / 或 MAGE-A6 基因的低甲基化指示此肿瘤相关抗原基因表达增加,其提供了可靠的癌症指标。

[0047] 在第二方面中,本发明提供了检测含 DNA 样品中甲基化或非甲基化基因的存在和 / 或数量的方法,其包括将所述含 DNA 样品与至少一种寡核苷酸相接触的步骤,所述寡核苷酸包含 SEQ ID NO. 2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 25 中任意的核苷酸序列,或基本由其组成,或由其组成。所述方法优选地包括评估所述基因是甲基化还是非甲基化的额外步骤。如本文所述,这可能取决于寡核苷酸是否稳定结合所述含 DNA 样品中的 DNA。

[0048] 用于评估甲基化状态的技术基于不同的方法。可利用应用本发明寡核苷酸的任何合适技术。在一个实施方式中,检测甲基化 CpG 二核苷酸基序的方法使用选择性修饰 DNA 中非甲基化胞嘧啶残基以产生可检出的经修饰残基的试剂。所述试剂不修饰甲基化的胞嘧啶残基,因此允许在下游过程中区分非甲基化和甲基化核酸分子,所述下游过程优选地可包括核酸扩增。在一个实施方式中,所述试剂用作选择性脱去非甲基化胞嘧啶残基的氨基。因此,在暴露于所述试剂之后,非甲基化 DNA 含有与相应甲基化 DNA 不同的核苷酸序列。胞嘧啶的脱氨基导致出现尿嘧啶残基,其具有与胸腺嘧啶相同的碱基配对性质,而不同于胞嘧啶的碱基配对行为。这使得有可能区分甲基化和非甲基化胞嘧啶。

[0049] 用于评估序列差异的有用的常规技术使用寡核苷酸引物。有两种引物设计的方法可用。第一,可以设计自身不覆盖任何 DNA 甲基化可能位点的引物。不同甲基化的位点的序列变化位于两个引物结合位点之间,对序列变化的显现需要进一步的测定步骤。第二,可以设计与甲基化或非甲基化版本的初始处理序列特异性杂交的引物。杂交之后,可进行扩增反应,使用本领域已知的任何检测系统测定扩增产物。扩增产物的存在表明所述引物与 DNA 杂交。所述引物的特异性表明 DNA 是否已经过修饰或未经修饰,其继而表明 DNA 是否已被甲基化。如果与靶标有足够的互补区域,例如 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 或 22 个核苷酸,那么所述引物还可含有不干扰杂交但可能对其它操作有用的额外核苷酸残基。这些其它残基的实例可以是限制性内切酶切割位点,配体结合位点或者因子结合或连接子或重复,或者用于可视化目的的残基。所述寡核苷酸引物可以或不使得它们对于经修饰的甲基化残基是特异性的。用作引物的优选寡核苷酸包含 SEQ ID NO. 2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 25 中任意的核苷酸序列,或者基本由其组成,或者由其组成。

[0050] 另一种区分经修饰和非修饰核酸的方法是使用寡核苷酸探针。这些探针可直接与经修饰核酸或者经修饰核酸的进一步产物(例如扩增得到的产物)杂交。基于探针的测定利用了寡核苷酸与特异性序列的杂交以及随后对该杂交物的检测。在检测扩增产物之前,可以还有另外的纯化步骤,例如沉淀步骤。可以使用任何本领域已知的检测系统标记寡核苷酸探针。这些包括但不限于:荧光部分、放射性同位素标记部分、生物发光部分、发光部

分、化学发光部分、酶、底物、受体或配体。用作探针的优选寡核苷酸包含 SEQ ID NO. 2、4、5、7、8、11、13、14、16、17、19 或 25 中的任意核苷酸序列,或者基本由其组成,或者由其组成。

[0051] “寡核苷酸引物”在本文中可互换地指“引物”。类似地,“寡核苷酸探针”在本文中可互换地指“探针”。

[0052] 在优选实施方式中,使用甲基化特异性 PCR(MSP) 确定所述基因(或其部分,尤其是 CpG 岛)的甲基化状态。

[0053] MSP 技术为本领域技术人员所熟知。在 MSP 方法中,使用设计用于区分非甲基化 DNA 与甲基化 DNA 的引物对扩增 DNA,其利用了亚硫酸氢钠处理结果的序列差异(Herman JG 等., Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Sep 3 ;93(18) :9821-6 和 WO 97/46705)。MSP 方法的具体实例有实时定量 MSP(QMSP),其允许可靠地实时定量甲基化 DNA。

[0054] 实时方法一般是基于连续光学监测扩增过程,并且利用荧光标记的试剂,所述试剂在产物中的结合可以被定量,并且该定量指示模板中序列的拷贝数。这些标记的试剂可以是荧光染料,其优先结合双链 DNA,与双链 DNA 的结合大大提高了其荧光。或者,可使用带标记的引物和/或带标记的探针。它们代表了公知市售实时扩增技术的具体应用,例如 TAQMAN、MOLECULARBEACONS、AMPLIFLUOR 和 SCORPION、DzyNA 等等。这些实时方法经常被用于聚合酶链式反应(PCR)。

[0055] TaqMan 技术使用线性水解的寡核苷酸探针,其含有荧光染料和淬灭染料。当照射时,激发的荧光染料将能量转移到附近的淬灭染料分子,而不是发射荧光(FRET 原理)。TaqMan 探针退火至 PCR 产物的内部区域,在复制模板时被聚合酶的核酸外切酶活性所切割。这使得淬灭剂的活性终止,报告染料开始发射荧光,每个循环中的增加与探针切割的比例成正比。

[0056] 分子信标也包含荧光和淬灭染料,但是它们被设计成当在溶液中游离时为发夹结构,其导致两种染料非常接近以发生荧光能量共振转移(FRET)。当退火步骤中该信标与靶标杂交时,所述发夹线性化,两种染料(供体和受体/淬灭剂)分开。检测到的来自供体的荧光增加与可用 PCR 产物的量相关联。

[0057] 利用蝎型探针(scorpion probe),使用单个寡核苷酸实现序列特异性引发和 PCR 产物检测。所述蝎型探针维持非杂交状态的茎-环构型,荧光团和淬灭剂之间发生 FRET。茎的 3' 部分还包含于引物的延伸产物互补的序列。此序列通过非扩增单体与特异性引物的 5' 端相连。在蝎型引物延伸之后,所述特异性探针序列能够与延伸的扩增子内的互补序列结合,由此打开发夹环,使得荧光团和淬灭剂分开,提供荧光信号。

[0058] 在重甲基(Heavymethyl)中,所述引发是甲基化特异性的,但是非延伸的寡核苷酸阻断物提供了用于代替引物自身的此特异性。该阻断物结合甲基化特异性形式的亚硫酸氢盐处理的 DNA,其结合部位与引物结合部位重叠。当所述阻断物结合时,所述引物就无法结合,因此不产生扩增子。重甲基可以与实时检测联合使用。

[0059] Plexor™ qPCR 和 qRT-PCR 系统利用两个经修饰核苷酸之间的特异性相互作用,来实现定量 PCR 分析。PCR 引物之一含有邻近 5' 端 iso-dC 残基的荧光标记。第二 PCR 引物是未标记的。反应混合物包含脱氧核苷酸和用淬灭剂 dabcy1 标记的 iso-dGTP。Dabcy1-iso-dGTP 优先并入与 iso-dC 残基互补的位置。dabcy1-sio-dGTP 在此位置的引入导致互补链上荧光染料的淬灭以及荧光的减少,其允许在扩增过程中的定量。对于这些多

重反应,每个靶序列可使用带有不同荧光团的引物对。

[0060] 因此,包含 SEQ ID NO. 2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 25 中任意核苷酸序列,或基本由其组成,或由其组成的寡核苷酸可用作上述方法的引物或探针,以检测目的基因的甲基化状态。

[0061] 在一个优选实施方式中,本发明提供了检测含 DNA 样品中甲基化或非甲基化目的基因存在和 / 或数量的实时方法,其包括:

[0062] (a) 用试剂接触 / 处理所述含 DNA 样品,所述试剂选择性修饰 DNA 中的非甲基化胞嘧啶残基以产生可检出的经修饰残基,但所述试剂不修饰甲基化的胞嘧啶残基

[0063] (b) 使用至少一个引物对扩增至少一部分甲基化或非甲基化目的基因,所述引物对中的至少一个引物设计成仅分别结合用所述试剂处理之后的甲基化或非甲基化 DNA 序列,其中所述引物对中的至少一个引物包含 SEQ ID NO. 2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18 或 19 中任意核苷酸序列,或基本由其组成,或由其组成。

[0064] 本发明方法中的目的基因优选地是 MAGE-A3 和 / 或 MAGEA6 基因。优选地,所述引物对中的至少一个引物是含有茎环结构的引物,所述茎环结构带有分子能量转移对的供体和受体部分,所述分子能量转移对的供体和受体部分的设置使得在不扩增时,所述受体部分淬灭由所述供体部分发射的荧光(激发后),以及在扩增过程中,所述茎环结构被破坏使得所述供体和受体部分分开到足以产生可检出的荧光信号。这可以实时检测,以提供对甲基化或非甲基化目的基因存在的指示。所述引物对中的包含 SEQ ID NO. 2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18 或 19 中任意核苷酸序列,或基本由其组成,或由其组成的引物优选带有所述茎环结构。

[0065] 在某些实施方式中,确定甲基化或非甲基化基因的基因拷贝数。此处,本文所述方法优选包括另外步骤:

[0066] (c) 相对于标准曲线对甲基化或非甲基化目的基因的实时检测的结果定量,产生基因拷贝数输出。

[0067] 优选地,步骤(c)另外的特征在于在循环阈值小于 40 时认为所述扩增是有效的。

[0068] 对于例如 MageA3 和 / 或 MageA6 基因的基因来说,检测非甲基化版本的所述基因可能是最相关的。

[0069] 本发明的方法允许实时检测样品中甲基化或非甲基化目的基因的存在。因为本发明的方法是定量方法,所以还可以随着反应的进行测定甲基化或非甲基化形式目的基因的(相对的)量。但是,不需要利用实时方法。可仅为了发现靶标 DNA 是否存在于样品中而进行分析。终点扩增检测技术利用与广泛用于实时 PCR 的相同的方法。所以,本发明的方法可涵盖检测含 DNA 样品中甲基化或非甲基化目的基因存在和 / 或数量的终点法。

[0070] 因此,本发明提供了检测含 DNA 样品中甲基化或非甲基化目的基因存在和 / 或数量的(终点)方法,其包括:

[0071] (a) 用试剂接触 / 处理所述含 DNA 样品,所述试剂选择性修饰 DNA 中的非甲基化胞嘧啶残基以产生可检出的经修饰残基,但所述试剂不修饰甲基化的胞嘧啶残基

[0072] (b) 使用至少一个引物对扩增至少一部分甲基化或非甲基化目的基因,所述引物对中的至少一个引物设计成仅分别结合用所述试剂处理之后的甲基化或非甲基化 DNA 序列,其中所述引物对中的至少一个引物包含 SEQ ID NO. 2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、

15、16、17、18、19 或 25 中的任意核苷酸,或基本由其组成,或由其组成。

[0073] 如上所述,本发明方法中的目的基因优选地是 MAGE-A3 和 / 或 MAGEA6 基因。优选地,所述引物对中至少一个引物是含有茎环结构的引物,所述茎环结构带有特征如上所述的分子能量转移对的供体和受体部分。包含 SEQ ID NO. 2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18 或 19 中的任意核苷酸序列,或基本由其组成,或者由其组成的所述引物对中的引物优选地带有所述茎环结构。

[0074] 对于 MAGE-A3 和 / 或 MAGE-A6 基因来说,检测非甲基化版本的所述基因可能是最相关的。包含 SEQ ID NO. 2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13 或 25 中任意核苷酸序列的,或者基本由其组成,或者由其组成的引物设计成用于检测用所述试剂处理后的非甲基化 MAGEA3DNA。

[0075] 非甲基化基因的缺乏将指示甲基化基因的存在。但是,甲基化基因的检测也在本发明的范围内。包含 SEQ ID NO. 14、15、16、17、18 或 19 中任意核苷酸序列的,或者基本由其组成,或者由其组成的引物设计成用于检测用所述试剂处理后的非甲基化 MAGEA3 DNA。

[0076] 在要求甲基化或非甲基化基因拷贝数的情况下,所述方法优选地包括另外的步骤:

[0077] (c) 相对于标准曲线对甲基化或非甲基化目的基因的检测结果定量,产生基因拷贝数输出。

[0078] 所有本发明的实施方式适用于本发明的终点方面,因此可经必要的修改加以应用。终点分析可能需要使用荧光平板读数器或其它合适装置来测定扩增结束时的荧光。

[0079] 本发明的方法最优选是对于任何合适(含 DNA)测试样品进行的离体或体外方法。但是,在一个实施方式中,所述方法还可包括获得所述样品的步骤。所述测试样品是含 DNA 样品,特别是包含目的基因的含 DNA 样品。本发明的方法可用于诊断疾病,特别是当目的基因甲基化(已知)与疾病发生相关联的情况。

[0080] 所述含 DNA 样品可包含任何合适的组织样品或体液。优选地,所述测试样品获得自人对象。对于癌症应用,所述样品可包含取自怀疑为癌性的组织或者取自代表性体液的组织样品。

[0081] MAGE-A3 基因的低甲基化已经与肺癌相关联。因此,在一个实施方式中,用于本发明方法的包含 MAGE-A3 基因的测试样品优选包含肺细胞或者来自肺细胞的核酸。最优选地,所述样品是福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 的组织。肺癌有两种类型:非小细胞肺癌 (NSCLC) 和小细胞肺癌 (SCLC)。名称简单地描述了肿瘤中发现的细胞类型。所述测试样品优选地包含来自非小细胞肺癌 (NSCLC) 的细胞或核酸。NSCLC 包括鳞状细胞癌、腺癌和大细胞癌,其占到肺癌的约 80%。在优选实施方式中,当癌症是 NSCLC 时,样品是肺组织样品或痰样品。NSCLC 很难治愈,可用的治疗的目的倾向于尽可能延长寿命和减轻疾病症状。NSCLC 是最常见的肺癌类型,并且与差的后果相关联。

[0082] MAGE-A3 基因的低甲基化也已经与膀胱癌相关联。因此,在另外的实施方式中,用于本发明方法的更优选的测试样品包含移行膀胱细胞或者鳞状癌膀胱细胞。优选地,所述测试样品获得自膀胱组织。更优选地,其来自于尿,并且含有来自移行膀胱细胞或者鳞状癌膀胱细胞的核酸。所述测试样品可来源于液体尿、其沉淀物或者尿中的沉淀物。可使用任何合适的方法收集组织和体液,其中的许多是本领域公知的。

[0083] MAGE-A3 基因的低甲基化也已经与黑素瘤相关联。黑素瘤是有颜色易得到的

(accessible) 病变,其在组织病理期限上界限分明。早期的放射状生长期 (RGP) 黑素瘤可侵入表皮和乳突真皮,但是没有转移的能力;在此阶段进行切除几乎可以完全治愈。随后的垂直生长期 (VGP) 表示向更具侵略性阶段的转变,其能够转移。因此,非常关注在 RGP/VGP 变化中发生的基因表达改变。因此,在另外的实施方式中,用于本发明方法的更优选的测试样品包含黑素瘤细胞。优选地,所述测试样品获得自皮肤病灶。

[0084] 用于本发明方法的其它含 DNA 样品包括用于诊断、预后或个体化医学用途的样品。这些样品可获得自手术样品,例如活组织检查或者细针吸出物,来自石蜡包埋的组织,来自冷冻的肿瘤组织样品,来自新鲜肿瘤组织样品或者来自新鲜或冷冻的体液。非限制性实例包括全血、骨髓、脑脊髓液、腹膜液、胸膜液、淋巴液、血清、血浆、尿、乳糜、大便、精液、痰、乳头吸出物、唾液、拭子样品、结肠洗出样品以及刷出样品。可使用任何合适的方法收集组织和体液,许多这样的方法是本领域公知的。可直接进行石蜡包埋样品的评估,或者在组织切片上进行。术语“样品”、“患者样品”和“患者的样品”可互换地使用,如上所述意为来自患者的含 DNA 样品。

[0085] 本发明的方法可以针对纯化的或未纯化的含 DNA 样品进行。但是,在优选实施方式中,在步骤 (a) (试剂处理步骤) 之前或者作为预先的步骤,从含 DNA 样品中分离 / 提取 / 纯化 DNA。可利用任何合适的 DNA 分离技术。可在标准教科书中见到提纯方法的例子,例如分子克隆 (Molecular Cloning—A Laboratory Manual) (第三版), Sambrook and Russell (具体参见其中附录 8 和第 5 章)。在一个优选实施方式中,纯化包括醇沉淀 DNA。优选的醇包括乙醇和异丙醇。合适的纯化方法还包括基于盐的沉淀方法。因此,在一个具体实施方式中,DNA 纯化方法包括使用高浓度的盐沉淀杂质。所述盐可包括例如乙酸钾和 / 或乙酸铵,或基本由其组成或者由其组成。所述方法可另外包括除去已沉淀杂质然后通过醇沉淀回收 DNA 的步骤。

[0086] 在一个替代性实施方式中,DNA 纯化方法基于使用有机溶剂从细胞裂解物中萃取杂质。因此,在一个实施方式中,所述方法包括使用苯酚、氯仿和异戊醇提取 DNA。使用合适的条件来确保杂质分离进入有机相,而 DNA 保留在水相中。其它的试剂盒使用磁珠、二氧化硅膜等。这些试剂盒在本领域中是公知的,并且是市售的。本发明的方法可使用 **PUREGENE®** DNA 纯化试剂盒。

[0087] 在这些纯化方法的优选实施方式中,通过醇沉淀回收提取的 DNA,例如乙醇或异丙醇沉淀。

[0088] 福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 的肿瘤组织是临床中心常见的肿瘤组织保存方法。这些 FFPE 包埋的样品要求在 DNA 提取之前进行脱蜡步骤。在一个优选实施方式中,FFPE 组织样品或固定于载玻片上的样品材料首先通过二甲苯处理脱蜡。与二甲苯接触的时间应足以使得二甲苯接触样品并与其相互作用。在一个更优选的实施方式中,FFPE 样品在 100%二甲苯中脱蜡约 2 小时。该步骤可重复一次以确保完全脱蜡。在二甲苯处理后,使用 70%乙醇将样品再水化。

[0089] 根据需要,本发明的方法也可包括 (也在步骤 (a) 之前或者作为预备步骤) 对样品中分离 / 提取 / 纯化的 DNA 进行定量。对样品中的 DNA 进行定量可使用任何合适的方法完成。对核酸的定量可以例如基于使用分光光度计、荧光计或 UV 透射仪。合适技术的例子描述于标准教科书中,例如分子克隆 (Molecular Cloning—A Laboratory Manual) (第三

版), Sambrook and Russell(具体参见其中附录 8)。在一个优选实施方式中,试剂盒例如来自 MolecularProbes, Invitrogen 的 **Picogreen®** DNA 定量试剂盒可用于对 DNA 进行定量。

[0090] 本发明的方法依赖于选择性修饰 DNA 中的非甲基化胞嘧啶残基以产生可检出的经修饰残基的试剂。所述试剂的作用方式已经进行了阐述。在一个优选实施方式中,选择性修饰 DNA 中非甲基化胞嘧啶残基一产生可检出的经修饰残基但是不修饰甲基化胞嘧啶残基的试剂包括亚硫酸氢盐试剂或基本由其组成或由其组成 (Frommer 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 199289 :1827-1831)。一些含有亚硫酸氢盐的试剂是本领域已知的,用于进行脱氨基作用反应的合适试剂盒是市售的(例如来自 Zymo Research 的 EZ DNA 甲基化试剂盒)。用于本发明方法的特别优选的试剂包括亚硫酸氢钠或者基本由其组成或者由其组成。

[0091] 一旦用所述试剂对样品中的 DNA 进行了处理,然后需要检测由所述试剂引起的核苷酸序列的差异。使用核酸扩增方法进行该检测。如所述,功能相关的甲基化最经常与基因的启动子区域相关联。具体地,所谓的“CpG 岛”包含相对高的 CpG 残基出现率 (incidence), 并且经常在基因的启动子区发现。存在多种软件程序来鉴定目的基因中的 CpG 岛。因此,本发明的方法可包括使用至少一个引物对扩增至少一部分甲基化或非甲基化目的基因。如上所讨论的,因为待研究甲基化状态的目的残基通常在目的基因的所定义的 CpG 岛和 / 或启动子区域中发现,所以所述引物对通常仅仅扩增基因的一部分(在该区域内)而不是整个基因。根据本发明方法可扩增任何合适的基因部分,只要扩增产物作为目的基因存在的可靠指标是可检出的。特别地,容易检出的扩增产物为约 50 至 250bp。甚至更优选地,使用为了扩增甲基化或非甲基化目的基因的至少一个引物对的扩增产生约 100 至 200bp 或者 50 至 100bp 的扩增产物。这对于组织样品来说是特别相关的,尤其是石蜡包埋的样品,在其中通常获得的 DNA 质量受限并且可能需要较小的扩增子。在一个优选实施方式中,可检出的扩增产物包含至少 SEQ ID NO. 2、4、5、7、8、11、13、14、16、17 或 19 中任意的核苷酸序列。优选地,产生(约)100bp、110bp、115bp、120bp、125bp、126bp、130bp、135bp、140bp 或 142bp 的扩增产物。

[0092] 所述引物对中至少一个引物,优选两个引物,设计成仅仅与用所述试剂处理后的甲基化或非甲基化 DNA 序列结合。因此,根据所述方法的应用,所述引物通过仅仅与基因的甲基化形式(其在用所述试剂处理之后保持未修饰)或者基因的非甲基化形式(其被所述试剂修饰)碱基配对来区分甲基化和非甲基化基因。所以,所述引物必须覆盖目的基因中至少一个甲基化位点。优选地,所述引物与包含至少 1、2、3、4、5、6、7 或 8 个甲基化位点的基因区域结合。最优选地,所述引物设计为结合其中引物结合位点内 CpG 对中所有胞嘧啶残基都是甲基化或非甲基化的序列,即“完全甲基化”或“完全非甲基化”序列。但是,如果单个或几个甲基化位点具有功能相关性,所述引物可设计成结合为了结合有效发生仅仅这些残基必须是甲基化(保持为胞嘧啶)或非甲基化(转变为尿嘧啶)的靶序列。可以通过合适的引物设计完全避免其它(无功能相关性)可能的甲基化位点,或者引物可设计成独立结合这些较少相关性位点的甲基化状态(例如通过在引物序列中合适位置包含 G 和 A 残基的混合)。因此,仅仅当甲基化或非甲基化形式的目的基因存在于原始含 DNA 样品中时,才预期出现扩增产物。另外的或者作为替代的,对于所述引物对中至少一个引物仅仅结合用所述试剂处理后的非甲基化 DNA 序列,而另一个引物结合仅结合处理后的甲基化 DNA,可

能是合适的,例如当基因包含甲基化的功能性重要位点以及分开的非甲基化功能性重要位点时。

[0093] 优选地,所述引物对中至少一个引物是含有茎环或“发夹”结构的引物,所述结构带有分子能量转移对的供体和受体部分。根据需要,此引物可以是或不是区分甲基化和非甲基化 DNA 的引物。所述引物的设置使得在没有扩增时,受体部分淬灭供体部分在激发后发射的荧光。因此,在引物引导的扩增之前或者没有扩增时,所述茎环或“发夹”结构保持完好。供体部分发射的荧光被受体部分有效地接收,导致荧光淬灭。

[0094] 在扩增期间,所述引物的茎环或发夹结构的构型改变。特别的,一旦引物掺入扩增产物,以及特别地掺入双链 DNA(特别是在第二轮扩增期间),所述茎环或发夹结构被破坏。此结构上的变化使得供体和受体部分充分分离,受体部分不再能够有效淬灭供体部分所发射的荧光。因此,供体部分产生可检出的荧光信号。对此信号实时检测,以提供对甲基化或非甲基化目的基因的基因拷贝数的指示。

[0095] 因此,本发明的方法可利用寡核苷酸来扩增核酸,所述寡核苷酸用分子能量转移(MET) 标签可检出地进行标记。所述引物包含 MET 对的供体和 / 或受体部分,其掺入扩增反应的扩增产物中,使得所扩增的产物含有 MET 对的供体和受体部分两者。

[0096] 当所扩增的产物是双链时,掺入扩增产物的 MET 对可以在同一条链上或者当扩增是三扩增(tri-amplification) 时在不同的链上。在用于扩增的聚合酶具有 5' -3' 核酸外切酶活性的某些情况下, MET 对部分之一可以被核酸外切酶活性从至少一些扩增产物群体中切下。此核酸外切酶活性对本发明的扩增方法无害。

[0097] 如本文所述,本发明的方法可适于许多扩增核酸序列的方法,包括聚合酶链式反应(PCR)、三扩增及其它扩增体系。

[0098] 在一个优选实施方式中, MET 是荧光共振能量转移(FRET), 其中用供体和受体部分对寡核苷酸进行标记,其中所述供体部分是荧光团,所述受体部分可以是荧光团,使得供体部分所发射的荧光能量被受体部分所吸收。所述受体部分可以是淬灭剂。因此,扩增引物是含有供体和受体部分的发夹引物,其设置使得所述受体部分淬灭所述供体的荧光。当所述引物掺入扩增产物时,其构型变化,淬灭终止,可检测到所述供体部分的荧光。

[0099] 本发明的方法允许检测没有预先分离非掺入寡核苷酸的扩增产物。此外,它们允许通过将带标记的寡核苷酸掺入到产物中直接检测扩增产物。

[0100] 在一个优选实施方式中,本发明的方法还涉及确定参照基因的表达。参照基因对于允许不同样品之间的比较来说十分重要。通过选择被认为在所比较的样品之间稳定且可靠表达的合适基因,检测参照基因和目的基因的扩增考虑了样品中变异性,例如原料的量、酶效率、样品降解等等。在可靠的输入 DNA 量存在下,参照基因理想地应该为在所测试的样品之间表达不变的基因。因此,来自目的基因的结果可以针对相应拷贝数的参照基因归一化。本发明的合适参照基因包括 β -肌动蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、核糖体 RNA 基因例如 18S 核糖体 RNA 和 RNA 聚合酶 II 基因(Radonic A. 等, Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jan 23 ;313(4) :856-62)。在一个特别优选的实施方式中,所述参照基因是 β -肌动蛋白。

[0101] 因此,本发明方法的另外特征可以是使用至少一个引物对扩增参照基因的至少一部分,其中所述引物对中的至少一个引物是含有具有上述特征的茎环结构的引物。

[0102] 根据本发明方法可扩增参照基因任何合适的部分,只要扩增产物作为参照基因存在的可靠指标是可检出的。特别地,容易检出的扩增产物为约 50 至 250bp。甚至更优选地,使用为了扩增参照基因的至少一个引物对的扩增产生约 100 至 200bp 的扩增产物。这对于组织样品来说是特别适当的,由其石蜡包埋的样品,在其中通常获得的 DNA 质量受限。

[0103] 在一些参照基因包括在本发明方法中的实施方式中,所述方法的特征还可以有,包括针对甲基化或非甲基化目的基因的标准曲线对(实时)检测结果进行定量的方法步骤还包括针对参照基因的标准曲线对参照基因实时检测的结果进行定量,以产生每种情况的基因拷贝数输出,任选地还包括通过用甲基化或非甲基化目的基因的基因拷贝数除以参照基因基因拷贝数来对结果进行归一化。

[0104] 另外,所述方法的特征是循环阈值小于 40 时扩增被认为是有效的。优选地,对于目的基因和参照基因都是如此。

[0105] 至少一部分参照基因的扩增通常利用至少一个引物对。优选地,与目的基因相同,所述引物对中至少一个引物是含茎环结构的引物,所述结构带有分子能量转移对的供体和受体部分。扩增过程中这种结构的作用方式已经进行了解释。

[0106] 用于本发明方法的“发夹”引物最优选如 US6,090,552 和 EP0912597 所述,其内容以整体并入本文。这些引物是市售的 **Amplifluor®** 引物。因此,在一个特别优选的实施方式中,用于扩增目的基因和 / 或参照基因一部分的含有茎环结构的引物包含 5' 至 3' 顺序的下列序列或者基本由其组成或者由其组成:

[0107] (a) 约 6 至 30 个核苷酸的第一核苷酸序列,其中所述第一核苷酸序列中的核苷酸用选自分子能量转移对的供体部分和受体部分的第一部分标记,其中所述供体部分在受激发时发出一个或多个特定波长的荧光,所述受体部分吸收和 / 或淬灭所述供体部分发射的所述荧光;

[0108] (b) 第二单链核苷酸序列,其包含约 3 至 20 个核苷酸、基本由其组成或者由其组成;

[0109] (c) 第三核苷酸序列,其包含约 6 至 30 个核苷酸、基本由其组成或由其组成,其中所述第三核苷酸序列中的核苷酸用选自所述供体部分和所述受体部分的第二部分标记,所述第二部分是所述组中未用于标记所述第一核苷酸序列的成员,其中所述第三核苷酸序列反向互补于所述第一核苷酸序列,从而所述第一核苷酸序列与所述第三核苷酸序列之间可形成双链体使得所述第一部分和所述第二部分邻近,从而当供体部分受激发发射荧光时,受体部分吸收并淬灭所述供体部分发射的所述荧光;以及

[0110] (d) 在引物的 3' 端,第四单链核苷酸序列,其包含约 8 至 40 个核苷酸、基本由其组成或者由其组成,所述核苷酸在其 3' 端包含 SEQ ID NO. 2、4、5、7、8、11、13、14、16、17、19 或 25 中的任意序列(因此能够通过核酸聚合酶引发与包含所述基因的甲基化或非甲基化 DNA 部分的核酸链互补的核苷酸序列的合成);其中当未形成所述双链体时,所述第一部分和所述第二部分分开一定距离,该距离阻止所述第一和第二部分之间的分子能量转移。

[0111] 在一个特别优选的实施方式中,所述供体部分和受体部分形成荧光能量共振转移(FRET)对。分子能量转移(MET)是能量非放射性地供体分子和受体分子之间转移的过程。荧光能量共振转移(FRET)是 MET 的一种形式。FRET 来自于某些化合物的性质;当暴露于特定光波长导致激发时,它们发出不同波长的光(即它们发出荧光)。这些化合物被

称为荧光团。在 FRET 中,能量非放射性地作为荧光团的供体分子与受体分子之间长距离传递(10-100 埃)。供体吸收光子并将该能量非放射性地传递给受体(**Förster**, 1949, Z. Naturforsch. A4 :321-327 ;Clegg, 1992, Methods Enzymol. 211 :353-388)。当激发和发射光谱重叠的两个荧光团距离很近时,一个荧光团的激发会导致其发光,该光的波长被第二荧光团所吸收并激活其发出荧光。换句话说,所述第一(供体)荧光团的激发态能量通过共振诱导偶极-偶极交互作用转移至邻近的第二(受体)荧光团。因此,供体分子的半衰期减少,其荧光淬灭,而受体分子的荧光强度增加并且去极化。当供体的激发态能量转移到非荧光团受体时,供体的荧光淬灭,而所述受体没有随后发射荧光。在该情况下,所述受体起淬灭剂作用。淬灭剂和受体(acceptor)都可在本发明中应用。可参与荧光能量共振转移(FRET)的分子对称为 FRET 对。为了发生能量转移,供体和受体分子必须通常非常接近(至多 70 至 100 埃)(Clegg, 1992, Methods Enzymol. 211 :353-388 ;Selvin, 1995, Methods Enzymol. 246 :300-334)。能量转移的效率随着供体和受体分子距离的增加快速降低。根据**Förster** (1949, Z. Naturforsch. A4 :321-327),能量转移的效率与 $D \times 10^{-6}$ 成正比,其中 D 是供体和受体之间的距离。事实上,这表示 FRET 最多在约 70 埃的距离上可最有效地发生。常用于 FRET 的分子在独立的章节中讨论。荧光团是供体还是受体根据其激发和发射光谱进行定义,其的荧光团是成对的。例如, FAM 被 488nm 波长的光最有效地激发,发射光的光谱为 500 至 650nm,最大发射波长为 525nm。FAM 是用于 JOE、TAMRA 和 ROX 的合适供体荧光团(所有这些均具有 514nm 的最大激发)。

[0112] 在一个特别优选的实施方式中,所述供体部分是荧光素或其衍生物,所述受体部分是 DABCYL。优选地,荧光素衍生物包含 6-羧基荧光素,或基本由其组成,或由其组成。

[0113] MET 标记可连接在所述引物的任何合适位点。在一个特别优选的实施方式中,所述供体和受体部分位于茎环结构的互补核苷酸上,使得当茎环完好时,所述部分彼此在物理上非常接近。然而,本发明的引物可以用处于任意下述位置的部分来标记,所述位置有效允许一旦所述引物掺入扩增产物在供体和受体没有扩增和分离的情况下各个供体和受体之间发生 MET/FRET。

[0114] 因为不与靶基因结合,所以所述茎环或发夹结构序列不依赖于靶基因的核苷酸序列(目的基因或参照基因)。因此,可以设计“通用”茎环或发夹序列,其随后可与序列特异性引物结合以便于目的基因的实时检测。主要的序列要求是所述序列形成茎环/发夹结构,其在没有扩增时是稳定的(因此确保有效淬灭)。因此,所述引物的序列特异性部分结合模板链并引导互补链的合成。因此,所述引物在第一轮扩增中变成扩增产物的一部分。当互补链合成时,扩增经过茎环/发夹结构而发生。这使得荧光团和淬灭剂分子分离,由此导致荧光随着扩增的进行而产生。

[0115] 茎环结构优选存在于扩增所用引物的序列特异性部分的 5' 端。

[0116] 如上所述,此检测序列一般用 FRET 对标记。优选地, FRET 中的一个部分朝向、接近或处于所述序列的 5' 端,另一部分朝向、接近或处于所述序列的 3' 端,使得当茎环或发夹结构保持完好时,两个部分之间的 FRET 有效。

[0117] 如实验章节详细描述,引物必须仔细选择,以确保本发明方法的灵敏度和特异性。因此,用于检测所述基因甲基化状态的特别优选的引物包括包含如下所示核苷酸序列或基本由其组成或由其组成的引物:

- [0118] 5' -AGCGATGCGTTCGAGCATCGCU-3' (SEQ ID NO. 1)
- [0119] 5' -ATTTTGTGTTGGAATTTAGGGTAG-3' (SEQ ID NO. 2)
- [0120] 和 / 或,
- [0121] 5' -AGCGATGCGTTCGAGCATCGCUCCAACATCAAACCATCACTCA-3' (SEQ ID NO. 3)
- [0122] 和 / 或,
- [0123] 5' -CCAACATCAAACCATCACTCA-3' (SEQ ID NO. 4)
- [0124] 和 / 或,
- [0125] 5' -TGGAATTTAGGGTAGTATTGT-3' (SEQ ID NO. 5)
- [0126] 和 / 或,
- [0127] 5' -AGCGATGCGTTCGAGCATCGCUTGGAATTTAGGGTAGTATTGT-3' (SEQ ID NO. 6)
- [0128] 和 / 或,
- [0129] 5' -CCCTCCACCAACATCAAA-3' (SEQ ID NO. 7)
- [0130] 和 / 或,
- [0131] 5' -TTAGGATGTGATGTTATTGATTTGT-3' (SEQ ID NO. 8)
- [0132] 和 / 或,
- [0133] 5' -AGCGATGCGTTCGAGCATCGCUTTAGGATGTGATGTTATTGATTTGT-3' (SEQ ID NO. 9)
- [0134] 和 / 或,
- [0135] 5' -TGTTTGAATTTAGGGTAGTATTGT-3' (SEQ ID NO. 11)
- [0136] 和 / 或,
- [0137] 5' -AGCGATGCGTTCGAGCATCGCUTGTTTGAATTTAGGGTAGTATTGT-3' (SEQ ID NO. 12)
- [0138] 和 / 或,
- [0139] 5' -CCATCACTCATTACTCAAAACAAA-3' (SEQ ID NO. 13)
- [0140] 和 / 或,
- [0141] 5' -ATTTTGTTCGGAATTTAGGGTAG-3' (SEQ ID NO. 14)
- [0142] 和 / 或,
- [0143] 5' -AGCGATGCGTTCGAGCATCGCUCCGACGTCAAACCGTCGCTCG-3' (SEQ ID NO. 15)
- [0144] 和 / 或,
- [0145] 5' -CCGACGTCAAACCGTCGCTCG-3' (SEQ ID NO. 16)
- [0146] 和 / 或,
- [0147] 5' -CGGAATTTAGGGTAGTATCGT-3' (SEQ ID NO. 17)
- [0148] 和 / 或,
- [0149] 5' -AGCGATGCGTTCGAGCATCGCUCCCTCCGCCGACGTCAAA-3' (SEQ ID NO. 18)
- [0150] 和 / 或,
- [0151] 5' -CCCTCCGCCGACGTCAAA-3' (SEQ ID NO. 19)
- [0152] SEQ ID NO 1 表示发夹结构的序列。
- [0153] SEQ ID NO 2、5、8 或 11 表示正向引物序列,其与亚硫酸氢盐转化的 Mage 启动子非甲基化序列互补
- [0154] SEQ ID NO 1 表示发夹结构序列
- [0155] SEQ ID NO 6、9 和 12 包含发夹结构序列以及分别包含 SEQ ID NO. 5、8 和 11 的序

列。

[0156] SEQ ID NO. 4、7 和 13 表示反向引物序列,其与亚硫酸氢盐转化的 Mage 启动子非甲基化序列互补。

[0157] SEQ ID NO 3 包含发夹结构序列以及 SEQ ID NO. 4 的序列。

[0158] SEQ ID NO 14 和 17 表示正向引物序列,其与亚硫酸氢盐转化的 Mage 启动子甲基化序列互补

[0159] SEQ ID NO. 16 和 19 表示反向引物序列,其与亚硫酸氢盐转化的 Mage 启动子甲基化序列互补。

[0160] SEQ ID NO 15 和 18 包含发夹结构序列以及分别包含 SEQ ID NO. 16 和 19 的序列。

[0161] 如实验章节中详细所述, MAGE-A3 的表达和甲基化水平在包含 SEQ ID NO. 2、5 或 11 的测定中显示出最佳一致性,所有三个引物包含序列 5' TGGAATTTAGGGTAG 3' (SEQ ID NO. 25)。因此,在另一个实施方式中,结合 MAGE-A3 的启动子区的优选引物包含 SEQ ID NO. 25。所述引物与亚硫酸氢盐转变的 MAGE-A3 序列互补的部分优选小于 25bp;优选 23、22、21、20 或 19bp 长。因此,此优选引物的 Mage-A3 特异性部分优选地为 24 至 18bp,或者 23 至 19bp 长。优选,长 19bp。因此,所述引物可包含序列 5'-ATTTTGTGGTGGTAGTATTG T-3' (SEQ ID NO. 26) 的 23、22、21、20 或 19 个连续碱基的任意序列。所述引物的 Mage-A3 特异性部分最优选由 SEQ ID NO. 2、4、5 或 7 所示核苷酸序列组成。

[0162] 包含 SEQ ID NO. 2、3、4、5、6、7、8、9、11、12 或 13 中任意核苷酸序列或基本由其组成或由其组成的引物对检测低甲基化(非甲基化)MAGE-A3 基因特别有用。优选的引物具有 SEQ ID NO. 2、3、4、5、6 或 7 的核苷酸序列。

[0163] 包含 SEQ ID NO. 14、15、16、17、18 或 19 中任意核苷酸序列或基本由其组成或由其组成的引物对检测高甲基化(甲基化)MAGE-A3 基因特别有用。

[0164] 优选用于本发明方法/试剂盒和测定的引物对包含至少一个下述引物,即该引物包含 SEQ ID NO. 2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 25 中任意核苷酸序列或基本由其组成或由其组成。优选地引物对包含以下的任意核苷酸序列或基本由其组成或由其组成:SEQ ID NO. 2 和 3;SEQ ID NO. 6 和 7;SEQ ID NO. 9 和 4;SEQ ID NO. 12 和 13;SEQ ID NO. 14 和 15;或 SEQ ID NO. 17 和 18。最优选的引物对包含 SEQ ID NO. 6 和 7 的核苷酸序列,或基本由其组成,或由其组成。

[0165] 所述引物之一或两者可以用合适茎环或发夹结构标记或者合成为包含合适的茎环或发夹结构,所述结构带有供体和受体部分,优选在 5' 端,如上文详细所述。在一个优选实施方式中,所述引物之一或两者可以,优选在 5' 端,用茎环结构标记或者合成为包含茎环结构,所述茎环结构包含下述核苷酸序列或基本由其组成或由其组成

[0166] 5'-AGCGATGCGTTCGAGCATCGCU-3' (SEQ ID NO :1)。

[0167] 此检测序列一般用 FRET 对标记。优选地,FRET 中的一个部分朝向、接近或处于所述序列的 5' 端,另一部分朝向、接近或处于所述序列的 3' 端,使得当茎环或发夹结构保持完好时,两个部分之间的 FRET 有效。在一个特别优选的实施方式中,所述茎环或发夹结构,由其是包含 SEQ ID NO :1 所示序列或基本由其组成或由其组成的核酸,在 5' 端用 FAM 标记在 3' 端用 DABCYL 标记。其它优选的组合在本文中有讨论,这些讨论可经必要的修改加以应用。

[0168] 这些引物形成本发明的不同方面。这些引物的其它特征在下文详细说明中（实验部分）有总结。应注意这些序列的变体可用于本发明。特别的，可根据需要添加其它侧翼序列，例如用以改善结合特异性或者茎环的形成。变体序列优选地与 SEQ ID NO :1 至 9 和 11 至 19 或 25 所示引物和 / 或探针的核苷酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或者至少 99% 的核苷酸序列同一性。所述引物和发夹结构可根据需要掺入合成核苷酸类似物，或者可以是基于 DNA、RNA 或 PNA 的，或其混合物。类似地，根据需要可利用作为替代的荧光供体和受体部分 /FRET 对。除了用荧光供体和受体部分标记之外，所述引物可包含经修饰的寡核苷酸以及其它附加基团和标记，只要不损害作为本发明方法中引物和 / 或茎环 / 发夹结构的功能。

[0169] 对每个引物对来说，至少一个引物用分子能量转移对的供体和受体部分标记，其设置使得在不扩增时，所述受体部分淬灭由所述供体部分发射的荧光（激发后），以及在扩增过程中，所述茎环结构破坏使得所述供体和受体部分分开到足以产生可检出荧光信号，对其实时检测以提供所述基因的基因拷贝数指示。优选地，所述供体部分和所述受体部分是 FRET 对。在一个实施方式中，所述供体部分和所述受体部分选自：5-羧基荧光素或 6-羧基荧光素 (FAM)、2',7'-二甲氧基-4',5'-二氯-6-羧基荧光素 (JOE)、罗丹明、6-羧基罗丹明 (R6G)、N,N,N'-四甲基-6-羧基罗丹明 (TAMRA)、6-羧基-X-罗丹明 (ROX)、5-(2'-氨基乙基)氨基萘-1-磺酸 (EDANS)、邻氨基苯甲酰胺、香豆素、铽螯合衍生物、孔雀绿、活性红 4、DABCYL、四甲基罗丹明、茚丁酸酯、曙红硝基酪氨酸、乙锭和得克萨斯红。在另一个实施方式中，所述供体部分选自：荧光素、5-羧基荧光素或 6-羧基荧光素 (FAM)、5-(2'-氨基乙基)氨基萘-1-磺酸 (EDANS)、邻氨基苯甲酰胺、香豆素、铽螯合衍生物、孔雀绿和活性红 4，所述受体部分选自：DABCYL、四甲基罗丹明、茚丁酸酯、曙红硝基酪氨酸、乙锭和得克萨斯红。优选地，所述供体部分是荧光素或其衍生物，所述受体部分是 DABCYL，最优选地所述供体部分是 6-羧基荧光素。本文讨论了其它优选的组合，特别是在多重性背景中，本发明这些方法也设想了这些组合。

[0170] 本发明还提供了可用于实施本发明方法的试剂盒。所述试剂盒可包含有关本文所述本发明多种方法（和用途）提及的任何优选特征。因此，本发明提供了检测含 DNA 样品中甲基化或非甲基化目的基因存在和 / 或数量的试剂盒，其包含本发明的至少一个引物对。优选地，所述试剂盒包含本发明用于检测非甲基化和 / 或甲基化 MAGE-A3 基因的存在和 / 或数量的引物对，以及用于检测参照基因特别是 β -肌动蛋白的存在和 / 或数量的引物对。因此，所述试剂盒可包含引物对，所述引物对包含引物，所述引物包含 SEQ ID NO 2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 25 所示核苷酸序列或基本由其组成或由其组成。优选地，每个引物对中至少一个引物由合适的茎环或发夹结构标记，以便于实时检测，如上所讨论的（这些讨论可经必要的修改加以应用）。最优选地，每个引物对中至少一个引物掺入了茎环或发夹结构，所述结构包含 SEQ ID NO :1 所示的核苷酸序列或基本由其组成或由其组成。所述茎环结构由合适的供体和受体部分所标记，如本文所讨论的（这些讨论可经必要的修改加以应用）。

[0171] 如上所述，这些引物的其它特征在下文详细说明中（实验部分）有总结。如本文所述，应注意这些序列的变体可用于本发明。如本文所述，根据需要可利用作为替代的荧光供体和受体部分 /FRET 对。

[0172] 在一个实施方式中,如本文所述,本发明的试剂盒还包含修饰非甲基化胞嘧啶的试剂(优先于被保护的甲基化胞嘧啶残基)。这些试剂可用于区分甲基化和非甲基化的胞嘧啶残基。在一个优选实施方式中,所述试剂包含亚硫酸氢盐,优选亚硫酸氢钠。该试剂能够将非甲基化胞嘧啶残基转变为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶保持不变。残基的这一差异可用于在下游过程中区分甲基化和非甲基化核酸,例如使用区分胞嘧啶和尿嘧啶(胞嘧啶与鸟嘌呤配对,而尿嘧啶与腺嘌呤配对)的引物的 PCR。

[0173] 如针对本发明的方法所讨论的,可利用合适的对照来作为该方法的质量控制。因此,在一个实施方式中,本发明的试剂盒还包含甲基化状态已知的一种或多种对照核酸分子、基本上由其组成或者由其组成。这些(一种或多种)对照核酸分子可包含已知为或者经处理使得为甲基化的核酸和/或已知为或者经处理使得为非甲基化的核酸。合适内参基因的一个例子是 β -肌动蛋白,其通常是非甲基化的,但可以经处理使得为甲基化。

[0174] 本发明的试剂盒另外可包含合适的缓冲液和其它进行本发明权利要求方法的试剂。因此,所提供的有关本发明方法的讨论在这里可经必要的修改加以应用,出于简洁起见不再重复。在一个实施方式中,本发明的试剂盒还包含核酸扩增缓冲液、基本上由其组成或者由其组成。

[0175] 所述试剂盒还可另外包含催化核酸扩增的酶、基本由其组成或由其组成。因此,所述试剂盒还可另外包含用于核酸扩增的合适的聚合酶、基本由其组成或由其组成。实例包括 A 类和 B 类聚合酶,例如 Taq、Pfu、Vent 等。

[0176] 根据需要,所述试剂盒的多种成分可分开包装在独立的区室中,或者可以例如共同保存。

[0177] 所述试剂盒还可加入合适的使用说明,例如,其可打印在独立的纸张上或者并入试剂盒的包装中。该说明可便于本发明试剂盒用于合适的实时扩增装置,这些装置很多是市售的。

[0178] 本发明实时方法的最后一步包括对实时检测结果对比甲基化或非甲基化目的基因以及任选的参照基因(如果包含的话)的标准曲线进行定量。可使用一组标准品产生标准曲线。根据需要,每种标准品包含已知拷贝数或浓度的目的基因和/或参照基因。通常,荧光的基准值设置于表示背景荧光。例如,在一个实施方式中,利用序列检测系统(Sequence Detection System, SDS) 软件。在检测扩增产物之前,此软件设置了 3 至 15 个扩增反应循环的默认基线范围。然后,将荧光阈值定义为此基线之上的统计上显著的值。通常,所述阈值设置为基线荧光之上 10 个标准差。随装置提供了合适的软件来进行实时扩增反应。该软件自动计算反应的基线和阈值。然后,可以针对每个标准品确定循环阈值(Ct)。这是实现阈值扩增水平所需要的循环数。因此,反应混合物中基因标准品的初始浓度越高,实现特定扩增产物产量所需的循环数就越少。Ct 相对于标准品 DNA 组的已知初始拷贝数的 $\log_{10}$ 作图产生一条直线。这是标准曲线。因此,在使用时,扩增目的基因和参照基因的 Ct 值可各自内插到各自的标准曲线,以确定含 DNA 样品的拷贝数。因此,所述方法的输出是目的基因和参照基因各自的基因拷贝数。结果可以通过用甲基化或非甲基化目的基因的基因拷贝数除以参照基因的基因拷贝数来归一化。在一个优选实施方案中,使用 Applied Biosystems 7900HT 快速实时 PCR 系统来进行本发明的方法。优选地,使用 SDS 软件,优选地包括合适算法,例如 Auto CT 算法以自动产生各个检测的基线和阈值。

[0179] 虽然本发明的方法可用于任何合适的扩增方法,但是最优选使用聚合酶链式反应(PCR)进行扩增。因此,尽管PCR是优选的扩增方法,为包含基本技术的变体例如巢式PCR,等同形式也可包含在本发明的范围内。实例包括但不限于,等温扩增技术例如NASBA、3SR、TMA和三扩增,其所有均为本领域公知的,合适试剂是市售的。其它合适的扩增方法包括但不限于,连接酶链式反应(LCR)(Barringer等,1990)、MLPA、靶标多核苷酸序列选择性扩增(美国专利No. 6410276)、共有序列引发的聚合酶链式反应(美国专利No. 4437975)、侵入技术(Third Wave Technologies, Madison, WI)、链替换技术、随意引发聚合酶链式反应(WO90/06995)以及缺口替换扩增(WO2004/067726)。

[0180] 本发明的实时PCR方法一般包括下列步骤:降低温度以允许引物退火、升高温度进行引物延伸、升高温度进行变性以及降低温度以收集数据。在一个具体实施方式中,所述数据收集步骤在约60摄氏度和64摄氏度之间的温度下进行,最优选在约62摄氏度,因为其已显示产生最大的灵敏度和最特异性的结果,如实施例章节所讨论的。

[0181] 在一个具体实施方式中,聚合酶链式反应的温度特征包括40至50个重复,优选地大约45个重复的循环:

[0182] (a) 约50°C,约2分钟

[0183] (b) 约95°C,约10分钟

[0184] (c) 约95°C,约15秒

[0185] (d) 约62°C,约1分钟

[0186] 本发明方法中所示的产生特异性且灵敏性结果的优选反应流程为,第1阶段:50°C,2分钟,第2阶段:95°C,10分钟,第3阶段:95°C,15秒,59°C,30秒,59°C,30秒(=平台数据收集),45个重复。

[0187] 本发明的方法有可能用于在同一个反应中检测多于一个目的基因。通过使用数个特异性引物组,可以在相同反应混合物中进行数个核酸靶标的扩增。这可以被称为“多重”。在一个优选实施方式中,每个靶标的一个或两个引物可以是发夹引物,其由形成FRET对的荧光部分和淬灭部分标记。数个核酸靶标的扩增要求使用具有不同发射波长的不同荧光供体和/或受体部分标记每个引物组。在扩增后的检测和分析过程中,照射反应混合物并在反应中所用每个引物组的每个特定的特征性波长处进行读取。因此,可确定混合物中哪个具体靶标DNA被扩增和标记。在一个具体实施方式中,使用两个或更多用于扩增不同靶序列的引物对。因此,可以在单个含DNA样品中检测一组甲基化/非甲基化目的基因的存在和/或数量。

[0188] 多重也可用于在同一反应中检测目的基因和参照基因的背景下使用。用合适的可区分供体和/或受体部分标记的引物允许通过目的基因和参照基因的分别扩增产生信号,以进行区分。

[0189] 在一个实施方式中,通用淬灭剂与各自具有可区分的最大发射波长的(多个)合适荧光团供体一起使用。特别优选的淬灭剂是DABCYL。可以与作为淬灭剂的DABCYL一起使用下列荧光团来允许多重检测:香豆素(最大发射475nm)、EDANS(491nm)、荧光素(515nm)、萤光黄(523nm)、BODIPY(525nm)、曙红(543nm)、四甲基罗丹明(575nm)和德克萨斯红(615nm)(Tyagi等.,Nature Biotechnology,Vol. 16,Jan 1998;49-53)。其它优选的组合在本文中有讨论。

[0190] 在一个替代性实施方式中,含 DNA 样品可以分开,本发明方法对适宜部分的样品实施以获得可直接比较的结果。因此,当检测目的基因和参照基因时,样品可以分为两部分,从而允许在一部分样品中实时检测目的基因的扩增,在另一部分样品中实时检测参照基因的扩增。根据需要,将样品分开,从而允许进行合适的对照反应。此方案的益处在于通用 FRET 对可用于标记每个引物对,并消除检测一个波长范围内的发射的必要性。但是,此方法依赖于初始时获得合适样品,从而允许将样品分开。在一个具体实施方式中,虽然可利用任何合适的反应体积,扩增步骤的总反应体积为约 10 至 40 微升,更优选约 10 至 30 微升,最优选约 12 微升。

[0191] 在一个方面,本发明的寡核苷酸、引物或探针、引物对、试剂盒或方法用于诊断癌症或癌症倾向性,其中样品中存在非甲基化(或低甲基化)MAGE-A3 指示癌症或癌症倾向性。因此,本发明提供了用于诊断癌症或癌症倾向性的试剂盒、方法和引物。

[0192] “诊断”在本文中的定义包括筛选疾病或疾病前期,鉴定疾病或疾病前期,监测疾病的分级和状态及进展,检查治疗后疾病的复发以及监测特定治疗的成功。此检测还可具有预测值,其包含在术语“诊断”的定义中。此测试的预测值可用作对癌症潜在敏感性的标志物,或者作为癌症进展的标志物。因此,可在疾病有机会以可在患者中鉴定出的症状的形式展现出来之前鉴定具有风险的患者。在一个优选实施方式中,癌症选自肺癌、黑素瘤或膀胱癌。在一个优选实施方式中,用于诊断的方法和测定使用至少一个寡核苷酸,其包含 SEQ ID NO. 2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 25 中任意核苷酸序列,或基本由其组成,或由其组成。在一个优选实施方式中,癌症或癌症倾向性的诊断使用寡核苷酸,其包含 SEQ ID NO. 2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13 或 25 中任意核苷酸序列,或基本由其组成,或由其组成,并检测所述基因的非甲基化形式。在一个替代实施方式中,用于诊断的方法和测定使用至少一个寡核苷酸,其包含 SEQ ID NO. 14、16、17 或 19 中任意核苷酸序列,或基本由其组成,或由其组成。

[0193] 测试可以诊断性地实施或与治疗方案一起实施。如上所述,已经描述了确定 NSCLC 中 MAGE-A3 预测值的 RT-PCR 测定。这些测定可用于选择适于用 MAGE-A3 免疫疗法进行治疗的患者。本发明人显示了,设计用于利用本发明的寡核苷酸、引物或探针、引物对或试剂盒检测非甲基化 MAGE-A3 的测定可以可靠地针对 MAGE-A3 表达对样品进行分类。使用甲基化测试获得的甲基化状态结果与现有针对 RNA 样品使用的用于 MAGE-A3 检测的 RT-PCR 测试所得结果一致性良好。因此,所述甲基化测试具有临床用途。

[0194] 在另一个方面,本发明提供了预测在对象中癌症成功治疗可能性的方法,包括:

[0195] (a) 用试剂接触/处理获得自对象的含 DNA 测试样品,所述试剂选择性修饰 DNA 中的非甲基化胞嘧啶残基以产生可检出的经修饰残基,但所述试剂不修饰甲基化的胞嘧啶残基

[0196] (b) 使用至少一个引物对扩增至少一部分非甲基化 MAGE-A3 基因,所述引物对中的至少一个引物设计成仅分别结合用所述试剂处理之后的非甲基化 DNA 序列,其中所述引物对中的至少一个引物包含 SEQ ID NO. 2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13 或 25 中任意的核苷酸序列,或基本由其组成,或由其组成

[0197] (c) 确定 MAGE-A3 基因的甲基化状态;

[0198] 其中,样品中非甲基化 MAGE-A3 的存在指示使用 MAGE-A3 免疫疗法的成功治疗可

能性高于检测到无或低水平非甲基化 MAGE-A3 基因的情况。

[0199] 步骤 (c) 包括鉴定是否形成扩增产物。所述扩增产物的鉴定 (使用本文所述的任何合适技术) 指示样品中非甲基化或低甲基化 MAGEA3 的存在。

[0200] 当然, 相反的情况也适用, 因此本发明的方法可类似地使用以确定是否可能对 MAGEA3 免疫治疗剂有抗性或者使用其治疗不成功, 样品中不存在非甲基化 MAGE-A3 指示有可能对治疗有抗性和 / 或治疗可能不成功。在某些实施方式中, 也可在互补 (complementary) 方法中使用甲基化 DNA 的特异性引物。

[0201] 本发明的方法还可用于为患者选择合适的治疗过程, 存在非甲基化 MAGE-A3 指示 MAGE-A3 免疫治疗剂可有利地施用, 而不存在或低水平的非甲基化 MAGE-A3 指示免疫治疗剂是相反指示的 (contra-indicated)。所提供的有关本发明寡核苷酸、引物或探针、引物对、试剂盒或方法的讨论加以必要的修改适用于本方面, 因此根据需要, 本发明的本方面设想了所有实施方式。

[0202] “成功治疗的可能性”指使用所列治疗剂中的任一种或多种治疗癌症成功的可能性, 优选 MAGE-A3 免疫治疗剂或者包含 MAGE-A3 的组合物。

[0203] “抗性”定义为使用任一种特定免疫治疗剂成功治疗癌症的概率降低和 / 或实现治疗效果需要更高的剂量。

[0204] MageA3 的低甲基化可能与某些癌症类型相关联。因此, 在一个具体实施方式中, 本发明提供了检测样品中膀胱癌、肺癌包括 NSCLC 或黑素瘤倾向或发生的方法, 其包括使用本发明的寡核苷酸、引物或探针、引物对、试剂盒或方法检测 MAGE-A3 基因的甲基化状态, 其中样品中检测到非甲基化 MAGE-A3 指示癌症 (特别是黑素瘤)、肺癌 (包括非小细胞肺癌 (NSCLC))、或膀胱癌 (包括移行细胞癌) 的倾向或发生。在另一个实施方式中, 所述肿瘤或癌症选自乳腺癌; 头颈癌包括食道癌; 鳞状细胞癌; 精原细胞瘤; 肝癌; 多发性骨髓瘤和结肠癌。

[0205] 在另一个方面, 本发明提供了测定 MAGE-A3 阳性肿瘤存在的方法, 其包括使用本文所述的寡核苷酸、引物或探针、引物对、试剂盒或方法检测样品中 MAGE-A3 基因的甲基化状态, 其中非甲基化 MAGE-A3 的存在指示 MAGE-A3 阳性肿瘤的存在。

[0206] 测试可以诊断性地实施或者与治疗方案一起实施。已经开发了 MAGE-A3 特异性免疫疗法 (ASCI), 目前正在临床评价。测试还可用于确定什么样的治疗或预防方案用于患者, 并且可用于监测治疗方案的效果。

[0207] 因此, 本发明还提供了鉴定和 / 或选择适于使用 MAGE-A3 免疫疗法治疗的患者的方法, 其包括使用本文所述寡核苷酸、引物或探针、引物对、试剂盒或方法检测 MAGE-A3 基因的甲基化状态, 其中如果 MAGE-A3 基因是非甲基化的, 则所述对象鉴定为和 / 或选择进行使用 MAGE-A3 免疫疗法的治疗。

[0208] 或者, 如果所述基因不是非甲基化的, 则优选地不选择所述对象进行使用 MAGE-A3 免疫疗法的治疗。

[0209] 在一个相关方面, 本发明提供了预测成功治疗癌症可能性的方法, 其包括使用本文所述的寡核苷酸、引物或探针、引物对、试剂盒或方法检测患者样品中 MAGE-A3 基因的甲基化状态, 其中如果所述基因是非甲基化的, 则使用 MAGE-A3 免疫疗法成功治疗的可能性高于所述基因为甲基化的情况。

[0210] 换句话说,样品中不存在非甲基化 MAGE-A3 指示对使用 MAGE-A3 免疫疗法有抗性的可能性高于所述基因是非甲基化的情况。因此,检测到甲基化 MAGE-A3 基因(或者未检测到低甲基化基因)指示使用免疫疗法成功治疗的概率较低。

[0211] 因此,根据关于 MAGE-A3 基因的甲基化状态,可选择患者群体进行治疗。这导致了更加集中且个人化的医学形式,由此使得成功率提高,这是因为将使用最有可能有效的药物对患者进行治疗。

[0212] 在另一个相关方面,本发明提供了选择合适的癌症治疗方案的方法,其包括使用本文所述食物疗法因为寡核苷酸、引物或探针、引物对、试剂盒或方法检测患者样品中 MAGE-A3 基因的甲基化状态,其中如果所述基因是非甲基化的,则选择免疫疗法(特别是 MAGE 免疫疗法)进行治疗。

[0213] 或者,如果所述基因不是非甲基化的,则不指示使用免疫疗法进行治疗。

[0214] 本发明还提供了治疗对象中的癌症的方法,其包括施用免疫疗法,其中已基于根据本发明的任何方法或通过使用本文所述寡核苷酸、引物或探针、引物对、试剂盒或方法对 MAGE-A3 基因甲基化状态的测定选择所述对象进行治疗。优选地,对于本文所述的所有不同方面,非甲基化 MAGE-A3 基因的检测对应于 MAGE-A3 蛋白水平的增加。

[0215] 可用于本发明的 MAGE-A3 免疫疗法包括基于 MAGE-A3 的组合物。包含 MAGE-A3 的组合物实例包括包含全长 MAGE-A3、基本上全长 MAGE-A3 以及 MAGE-A3 片段(例如 MAGE-A3 肽)的组合物。

[0216] 可用于本发明的肽的实例包括下列 MAGE-A3 肽:

[0217]

SEQ ID NO	肽序列
SEQ ID NO :27	FLWGPRALV
SEQ ID NO :28	EVDPIGHLY
SEQ ID NO :29	MEVDPIGHLY
SEQ ID NO :30	VHFLLLKYRA
SEQ ID NO :31	LVHFLLLKYR
SEQ ID NO :32	LKYRAREPVT
SEQ ID NO :33	ACYEFLWGPRALVETS
SEQ ID NO :34	TQHFVQENYLEY

[0218] 所述 MAGE 蛋白可以是全长 MAGE-A3,或者可包含基本上全长的 MAGE3 片段,例如 MAGE3 的 3-314 位氨基酸(总长 312 个氨基酸),或者其它 MAGE-A3 片段,其中 MAGE-A3 蛋白的 N 末端和/或 C 末端缺失 1 至 10 个氨基酸。

[0219] 在一个实施方式中,所述 MAGE-A3 蛋白、片段或肽可与融合伴侣蛋白相连。

[0220] MAGE-A3 蛋白、片段或肽与融合伴侣蛋白可以是化学缀合的,或者可以作为重组融合蛋白表达。在所述抗原和伴侣以重组融合蛋白的形式表达的实施方式中,可允许在表达体系中产生比非融合蛋白更高的水平。因此,所述融合伴侣蛋白可参与提供 T 辅助表位(免疫融合伴侣蛋白),优选地人识别的 T 辅助表位,和/或参与以高于天然重组蛋白的产量表达所述蛋白(表达增强子蛋白)。在一个实施方式中,所述融合伴侣可以既是免疫融合伴侣蛋白又是表达增强伴侣蛋白。

[0221] 在本发明的一个实施方式中,可使用的免疫融合伴侣蛋白来源于蛋白 D,一种革兰氏阴性细菌即 B 型流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenza B*) 的表面蛋白 (W091/18926),或其衍生物。所述蛋白 D 衍生物可包含所述蛋白的前三分之一,或者约所述蛋白的前三分之一。在一个实施方式中,蛋白 D 的 N-端前 109 个残基可用作融合伴侣,从而为 MAGE-A3 抗原提供额外的外源 T 细胞表位并增加在大肠杆菌中的表达水平(因此也用作表达增强子)。在一个替代性实施方式中,蛋白 D 衍生物可包含 N 端前 100-110 个氨基酸或者 N 端约前 100-110 个氨基酸。在一个实施方式中,所述蛋白 D 或其衍生物可以是脂质化的,可使用脂蛋白 D:脂类尾可保证将所述抗原最佳地呈递到抗原呈递细胞。在一个替代性实施方式中,所述蛋白 D 或其衍生物不是脂质化的。蛋白 D 的“分泌序列”或“信号序列”指天然蛋白的约 1 至 16、17、18 或 19 位氨基酸。在一个实施方式中,蛋白 D 的分泌或信号序列指蛋白 D 的 N 端 19 个氨基酸。在一个实施方式中,在蛋白 D 融合伴侣的 N 端包含分泌或信号序列。如本文所用的,“前三分之一 (1/3)”、“前 109 个氨基酸”和“N-端前 100-110 个氨基酸”指蛋白 D 序列紧跟分泌或信号序列的氨基酸。所述信号序列的 2-K 和 3-L 氨基酸可任选地由氨基酸 2-M 和 3-D 取代。

[0222] 在一个实施方式中, MAGE-A3 可以是蛋白 D-MAGE-A3-His, 432 个氨基酸残基的融合蛋白。此融合蛋白包含蛋白 D 的信号序列,蛋白 D 的 1 至 109 位氨基酸、MAGE-A3 蛋白的 312 个氨基酸 (3-314 位氨基酸)、间隔子以及可便于生产过程中纯化该融合蛋白的多组氨酸尾 (His), 例如:

[0223] i) 蛋白 D 的 18 残基信号序列以及 N 端前 109 个残基;

[0224] ii) 两个非相关的残基(蛋氨酸和天冬氨酸);

[0225] iii) 天然 MAGE-3 蛋白的 3-314 位残基;

[0226] iv) 用作绞链区的两个甘氨酸残基;以及

[0227] v) 七个组氨酸残基。

[0228] 此分子的氨基酸序列显示于图 10 (SEQ ID NO:40)。该抗原及下文所总结的那些更详细地描述于 W099/40188 中。

[0229] 在另一个实施方式中,所述免疫融合伴侣蛋白可以是称为 LytA 的蛋白或其衍生的蛋白。LytA 来源于肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*),其合成 N-乙酰基-L-丙氨酸酰胺酶,即酰胺酶 LytA, (由 LytA 基因编码 (Gene, 43 (1986) 265-272 页)),其是一种特异性降解肽聚糖骨架中某些键的自溶素。LytA 蛋白的 C 端结构域负责与胆碱或者一些胆碱类似物例如 DEAE 的亲水性。已经对此性能有所研究,开发出大肠杆菌 -LytA 表达质粒,其可用于表达融合蛋白。在其氨基端含有 C-LytA 片段的杂合蛋白的纯化已经有描述 (Biotechnology:10, (1992) 795-798)。在一个实施方式中,可使用所述分子的 C 端部分。可使用起始于 178 位残基的在 C 端发现的 LytA 分子的重复部分。在一个实施方式中, LytA

部分可包括 188-305 位残基。

[0230] 其它融合伴侣包括来自流感病毒的非结构蛋白 NS1 (红细胞凝集素)。在一个实施方式中,可利用 NS 1 的 N 端 81 个氨基酸,尽管可使用不同的片段,只要它们包含 T 辅助表位。

[0231] 在本发明的一个实施方式中, MAGE-A3 蛋白可包含衍生化的游离巯基。这样的抗原已描述于 W099/40188。特别地,可使用羧基酰胺化或羧基甲基化衍生物。

[0232] 在另一个实施方式中, MAGE-A3 组合物包含编码本文所述 MAGE-A3 蛋白、片段或肽或融合蛋白的核酸分子。在本发明的一个实施方式中,所述序列可插入到合适的表达载体中,可用于 DNA/RNA 疫苗。表达所述核酸的微生物载体也可用作载体递送的免疫治疗剂。

[0233] 合适病毒载体的例子包括基于逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒包括单纯疱疹病毒、 α 病毒、痘病毒例如金丝雀痘病毒和牛痘病毒的体系。使用这些病毒的基因转移方法是本领域技术人员已知的。例如,可使用逆转录病毒载体来将本发明的多核苷酸稳定整合宿主基因组中,尽管不优选这样的重组。相反地,复制缺陷腺病毒载体保持为附加体形式,因此允许瞬时表达。能够在昆虫细胞 (例如杆状病毒载体)、人细胞、酵母或细菌中驱动表达的载体可用于产生大量由本发明多核苷酸编码的 MAGE-A3 蛋白,例如用作亚单位疫苗或免疫测定。

[0234] 在又一个优选实施方式中,用作活载体的腺病毒是复制缺陷型猿腺病毒。通常,这些病毒含有 E1 缺失,可以在转化了 E1 基因的细胞系中培养。优选的猿腺病毒是分离自黑猩猩的病毒。特别的, C68 (也称为 Pan 9) (参见美国专利 No. 6083716) 和 Pan 5、6 和 Pan 7 (W0 03/046124) 优选用于本发明。可操作这些载体以插入本发明的异源基因,使得可表达所述基因产物。这些重组腺病毒载体的用途、配方和制造在 W0 03/046142 中详细描述。

[0235] 获得核酸序列和产生表达载体的常规重组技术描述于 Maniatis 等., Molecular Cloning-A Laboratory Manual ;Cold Spring Harbor, 1982-1989。

[0236] 对于基于蛋白的组合物而言,本发明的蛋白可以溶于液体的形式或者冻干的形式提供。

[0237] 每人剂量可包含 1 至 1000 微克蛋白。在一个实施方式中,所述剂量可包含 30-300 微克蛋白。

[0238] 本文所述含 MAGE-A3 的组合物还可包含疫苗佐剂和 / 或免疫刺激细胞因子或趋化因子。

[0239] 用于本发明的合适疫苗佐剂是市售的,例如弗氏不完全佐剂和完全辅剂 (Difco Laboratories, Detroit, MI); Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA); 铝盐例如氢氧化铝凝胶 (alum) 或磷酸铝; 钙、铁或锌盐; 酰基化酪氨酸的不悬液; 酰基化糖; 阳离子或阴离子衍生化的多糖; 聚磷腈; 生物可降解的微球体; 单磷酸脂 A 和 quil A。细胞因子,例如 GM-CSF 或白细胞介素 -2、-7 或 -12 以及趋化因子也可用作佐剂。

[0240] 在一个实施方式中,所述佐剂可包含单磷酸脂 A 例如 3-de-O- 酰基化单磷酸脂 A (3D-MPL) 和铝盐的组合。或者,所述佐剂可包含 3D-MPL, 或其它 toll 样受体 4 (TLR4) 配体,例如氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸酯,如 W0 98/50399、W0 01/34617 和 W0 03/065806 中所公开的。

[0241] 可使用的另一种佐剂是皂角苷,例如 QS21(Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA),其可单独使用或者与其它佐剂联合使用。例如,在一个实施方式中,本方法提供了单磷酸脂 A 与皂角苷衍生物的组合,例如 QS21 和 3D-MPL 的组合,如 WO 94/00153 中所述,或者其中 QS21 被胆固醇淬灭的组合物,如 W096/33739 中所述。其它的合适制剂包括水包油乳剂和维生素 E。在一个实施方式中,所述佐剂包含水包油乳剂中的 QS21、3D-MPL 和维生素 E,如 WO 95/17210 中所述。

[0242] 用于本发明的其它佐剂可包含 TLR9 拮抗剂,例如含非甲基化 CpG 的寡核苷酸,其中 CpG 二核苷酸是非甲基化的。这些寡核苷酸是公知的,描述于例如 WO 96/02555。

[0243] 用于本发明的合适寡核苷酸(在此背景下)可包括:

[0244]

SEQ ID NO :35	TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT	CpG 1826
SEQ ID NO :36	TCT CCC AGC GTG CGC CAT	CpG 1758
SEQ ID NO :37	ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG	
SEQ ID NO :38	TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT	CpG 2006, CpG 7909
SEQ ID NO :39	TCC ATGACG TTC CTGATG CT	CpG 1668

[0245] 含 CpG 寡核苷酸也可单独使用或者与其它佐剂联合使用。例如,在一个实施方式中,所述佐剂包含含 CpG 寡核苷酸与皂角苷衍生物的组合,特别地包含如 WO 00/09159 和 WO 00/62800 所公开的 CpG 与 QS21 的组合。

[0246] 因此,本发明提供了如本文所述的包含 MAGE-A3 的组合物,其中所述佐剂包含 3D-MPL、QS21、CpG 寡核苷酸、聚乙烯醚或酯中的一种或多种或者这些佐剂的两种或更多种的组合。在一些实施方式中,所述组合物中 MAGE-A3 组分可以水包油或油包水乳液形式存在,或者以脂质体制剂存在。

[0247] 在一个实施方式中,所述佐剂可包含 3D-MPL、QS21 和免疫激活 CpG 寡核苷酸中的一种或多种。在一个实施方式中,存在所有三种佐剂成分。所述成分可以脂质体制剂或水包油乳剂形式存在,例如 WO 95/17210 中所述的。

[0248] 在另一个实施方式中,3D-MPL 和 QS21 以水包油乳液形式存在,没有 CpG 寡核苷酸。

[0249] 所用的 3D-MPL 的量一般很小,但是取决于所述制剂可以为 1-1000 微克/剂,优选 1-500 微克/剂,更优选 1 至 100 微克/剂。

[0250] 本发明佐剂中 CpG 或免疫激活寡核苷酸的量一般很少,但是取决于所述制剂可以为 1-1000 微克/剂,优选 1-500 微克/剂,更优选 1 至 100 微克/剂。

[0251] 本发明佐剂中所用皂角苷的量可以为 1-1000 微克/剂,优选 1-500 微克/剂,更优选 1 至 250 微克/剂,最优选 1 至 100 微克/剂。

[0252] 本文所述的佐剂制剂可另外包含水包油乳液和 / 或维生素 E, 或者配制为脂质体组合物。

[0253] 其它合适的佐剂包括 Montanide ISA 720 (Seppic, France)、SAF (Chiron, California, United States)、ISCOMS (CSL)、MF-59 (Chiron)、Ribi Detox、RC-529 (GSK, Hamilton, MT) 以及其它氨基烷基氨基葡萄糖苷 4- 磷酸酯 (AGP)。

[0254] 一般地, 每人剂量可包含 0.1 至 1000 微克的抗原, 例如 0.1 至 500 微克、0.1 至 100 微克或者 0.1 至 50 微克。可通过标准研究确定特定免疫治疗剂的最佳量, 所述研究包括观察接种对象中的适当免疫应答。在最初的接种之后, 对象可接受一次或多次适当间隔的加强免疫。

[0255] 作为替代地, 用于本发明方法的组合物可包括药物组合物, 其包含在可药用赋形剂中的本文所述 MAGE-A3。

[0256] 接下来参考下列非限制性实施例描述本发明:

附图说明

[0257] 图 1 :MAGEA3_U 引物在非反转序列上的位置 (图 1a-SEQ ID NO :10) 以及对应的反转序列上的位置 (图 1b-SEQ ID NO :41)。MAGEA3_G01 U 引物位置由框显示, MAGEA3_G02U 引物位置高亮显示, MAGEA3_FURUTAU 引物位置以粗体显示, MAGEA3_QIU U 引物位置以下划线显示, 由  表示的 G 位置对应于转录起始位点。

[0258] 图 2 :MAGEA3_G0_2_U 引物在非反转序列上的位置 (图 2a-SEQ ID NO :10) 以及对应的反转序列上的位置 (图 2b-SEQ ID NO :41), 下划线起点为转录起始位点。

[0259] 图 3 :检测限示意图。

[0260] 图 3a :MAGEA3_G0_2U :输入 U DNA (LNCaP 细胞) 相对 Ct 值作图, 1.5ng 的 U 输入 DNA 仍可检出

[0261] 图 3b :MAGEA3_Furuta_U :输入 U DNA (Ger1 细胞) 相对 Ct 值作图, 1.5ng 的 U 输入 DNA 仍可检出

[0262] 图 4 :Amplifluor® 技术的示意图。

[0263] 所述引物对中至少一个引物 (在该情况下为正向引物) 包含“发夹”结构, 其带有分子能量转移对的供体 (FAM) 和受体部分 (DABCYL)。在不扩增时, 供体部分发射的荧光被受体部分有效地接收, 导致荧光淬灭。在扩增期间, 引物被掺入扩增产物。在第二轮扩增中, 茎环或发夹结构被破坏。受体部分不再能够有效淬灭供体部分发射的荧光。因此, 供体部分产生可检出的荧光信号。

[0264] 图 5 :样品分类 (甲基化、非甲基化或无效) 的判定树 (Decision tree)。

[0265] 图 6 :黑素瘤样品中的 MAGE-A3 甲基化状态 :通过将真阳性率 (灵敏度) 作为假阳性率 (100- 特异性) 的函数作图, 计算 4 个 MAGE-A3 非甲基化测定的受试者工作特征 (ROC) 曲线。

[0266] 图 6a :G0_1_U 测定 :灵敏度 91.7%、特异性 76.5%、截断 214.8, 曲线下面积 (AUC) 为 0.912。95% CI 范围为 0.781 至 0.977, 面积 = 5 的显著性 $P = 0.0001$ 。

[0267] 图 6b :G0_2_U 测定 :灵敏度 87.5%、特异性 100%、截断 292.6, 曲线下面积 (AUC) 为 0.971。95% CI 范围为 0.863 至 0.996, 面积 = 5 的显著性 $P = 0.0001$ 。

[0268] 图 6c :Furuta_U 测定 :灵敏度 66.7 %、特异性 100 %、截断 943.1, 曲线下面积 (AUC) 为 0.939。95% CI 范围为 0.817 至 0.989, 面积 = 5 的显著性 $P = 0.0001$ 。

[0269] 图 6d :Qiu_U 测定 :灵敏度 83.3 %、特异性 94.1 %、截断 431.1, 曲线下面积 (AUC) 为 0.944。95% CI 范围为 0.824 至 0.990, 面积 = 5 的显著性 $P = 0.0001$ 。

[0270] 图 6e :四个测定中每个所得结果的总结表。

[0271] 图 7 :肺活组织检查中的 MAGE-A3 甲基化状态 :通过将真阳性率 (灵敏度) 作为假阳性率 (100- 特异性) 的函数作图, 计算 4 个 MAGE-A3 非甲基化测定的受试者工作特征 (ROC) 曲线。

[0272] 图 7a :GO_1_U 测定 :灵敏度 84.6 %、特异性 91.7 %、截断 115.8, 曲线下面积 (AUC) 为 0.954。95% CI 范围为 0.868 至 0.990, 面积 = 5 的显著性 $P = 0.0001$ 。

[0273] 图 7b :GO_2_U 测定 :灵敏度 88.5 %、特异性 94.4 %、截断 108.28, 曲线下面积 (AUC) 为 0.971。95% CI 范围为 0.893 至 0.996, 面积 = 5 的显著性 $P = 0.0001$ 。

[0274] 图 7c :Furuta_U 测定 :灵敏度 84.6 %、特异性 91.7 %、截断 296.8, 曲线下面积 (AUC) 为 0.949。95% CI 范围为 0.861 至 0.988, 面积 = 5 的显著性 $P = 0.0001$ 。

[0275] 图 7d :Qiu_U 测定 :灵敏度 84.6 %、特异性 91.7 %、截断 176.71, 曲线下面积 (AUC) 为 0.948。95% CI 范围为 0.859 至 0.988, 面积 = 5 的显著性 $P = 0.0001$ 。

[0276] 图 7e :肺活组织检查的四个测定中每个所得结果的总结表。

[0277] 图 8 :肺 FFPE 样品中的 MAGE-A3 甲基化状态 :通过将真阳性率 (灵敏度) 作为假阳性率 (100- 特异性) 的函数作图, 计算 4 个 MAGE-A3 非甲基化测定的受试者工作特征 (ROC) 曲线。

[0278] 图 8a :GO_1_U 测定 :灵敏度 84.0 %、特异性 96.0 %、截断 21.88, 曲线下面积 (AUC) 为 0.933。95% CI 范围为 0.825 至 0.984, 面积 = 5 的显著性 $P = 0.0001$ 。

[0279] 图 8b :GO_2_U 测定 :灵敏度 84.0 %、特异性 96.3 %、截断 17.75, 曲线下面积 (AUC) 为 0.932。95% CI 范围为 0.826 至 0.983, 面积 = 5 的显著性 $P = 0.0001$ 。

[0280] 图 8c :Furuta_U 测定 :灵敏度 80.0 %、特异性 96.2 %、截断 214.26, 曲线下面积 (AUC) 为 0.923。95% CI 范围为 0.813 至 0.979, 面积 = 5 的显著性 $P = 0.0001$ 。

[0281] 图 8d :Qiu_U 测定 :灵敏度 72.0 %、特异性 96.2 %、截断 68.91, 曲线下面积 (AUC) 为 0.912。95% CI 范围为 0.799 至 0.973, 面积 = 5 的显著性 $P = 0.0001$ 。

[0282] 图 8e :肺 FFPE 样品的四个测定中每个所得结果的总结表。

[0283] 图 9 :在反应过程的不同步骤掺入时黑色素对 PCR 抑制的影响。

[0284] 图 9a :通过 MAGE-A3U 实时 MSP 处理的有和没有掺入的黑色素 LNCaP 细胞系材料。BT = 亚硫酸氢盐处理。

[0285] 图 9b :通过 Gst-Pi M 实时 MSP 处理的有和没有掺入的黑色素 MCF7 细胞系材料。

[0286] 图 10 :蛋白 D-MAGE-A3-His

[0287] 单下划线 = 蛋白 D 的前 109 个氨基酸

[0288] 双下划线 = 蛋白 D 信号序列 (18aa)

[0289] **加框** = 插入的 / 替换的序列 : 在 2-3 位 Met-Asp (替换的) ; 在 128-129 位 Met-Asp (插入的) 以及在 442-443 位 Gly-Gly (插入的)

[0290] **粗体** = MAGE3 的片段 :MAGE3 的 3-314 位氨基酸 (共 312AA)

[0291] 灰色 = 7 个 his 的尾

[0292] 发明详述 - 实验部分

[0293] 实施例 1 :实时 Amplifluor 测定

[0294] 开发了基于直接实时荧光的甲基化特异性 PCR 测定 (实时 MSP 测定), 以确定 MGMT 启动子的甲基化状态 (Vlassenbroeck 等., J Mol Diagn 2008, 10 :332-337)。此技术在第 70 页图 4 的图例中举例说明和概括。

[0295] 使用该技术成功地进行了 Mage-A3 的分析物定量。这由平行扩增 / 定量过程组成, 其中使用 Mage-A3 的特异性引物和引物 / 检测物对, 使用了 ABI **Prism®** 7900HT 装置 (Applied Biosystems) 上的 **Amplifluor®** 测定格式。

[0296] 正向引物 / 检测物和反向引物在反应混合物中的引物终浓度均为 100nM。每个 PCR 反应使用 12.5 微升含有 Rox 的 iTaq™ Supermix (BioRad, 2x 缓冲液)。包含 5 微升经修饰模板 DNA 在内的每个反应的总体积为 25 微升。ABI7900HT SDS 装置在使用 10 分钟前打开, 使得加热盖达到 105 摄氏度。使用下列温度特征 :阶段 1 :50 摄氏度 2 分钟, 阶段 2 :95 摄氏度 10 分钟, 阶段 3 :95 摄氏度 15 秒, 62 摄氏度 1 分钟 (平台数据收集), 重复 45 次。

[0297] 按照如下所述产生用作标准曲线的质粒材料 :PCR 扩增并克隆由引物确定的启动子序列 (使用合适的分离的且经亚硫酸氢盐修饰的细胞系 DNA)。通过测序验证序列, 并将其与公开的启动子序列进行比较。

[0298] 包括标准曲线 (2×10^6 -20 个拷贝), 以通过将未知样品的 Ct 值内插 (interpolation) 到标准曲线来确定未知样品的拷贝数。β-肌动蛋白用作测定中的参照基因。

[0299] 实施例 2 :MAGE-A3 测定和引物设计

[0300] 除了新引物序列之外, 合成可用于检测非甲基化 MAGE-A3 的引物, 如 Qiu 等人 :Clinical Biochemistry 39(2006), 259-2; Jang 等人 :Cancer Research 61(2001), 7959-7963 和 Furuta 等人 :Cancer Sci 95(2004), 962-968 所述的, 并显示于表 1。

[0301] 使用适于 MSP 要求的 Primer3 软件进行用于检测非甲基化或者甲基化形式 Mage A3 的正向 (F) 和反向 (R) 引物的电子 (in silico) 设计 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>)。条件如下 :扩增子大小 :60-120nt ;引物大小 :18-27nt ;熔解温度 :55-65 摄氏度 ;最大 3' 自我互补 = 0 ;TSS 周围的 200bp 窗口 (返回数 = 2000)。

[0302] 设计 U_ 引物用以检测非甲基化 Mage-A3, 而设计 M_ 引物用以检测甲基化 Mage-A3。最后, 保留引物 A MAGE_A3 和 MAGEA3_GO_1_U_F、MAGEA3_GO_2_U_R、MAGEA3_GO_1_U_R_AMP、MAGEA3_GO_2_U_F_AMP、MAGEA3_GO_1_M_F、MAGEA3_GO_2_M_F、MAGEA3_GO_1_M_R_AMP 和 MAGEA3_GO_2_M_R_AMP 进行进一步的研究。U 引物相对于转录起始位点 (TSS) 的位置显示于图 1 和图 2 中。引物的位置在转录起始位点周围。

[0303] 正向或反向引物之一合成为包含合适的茎环或发夹结构, 该结构在 5' 端带有供体和受体部分, 具有核苷酸序列 :5' AGCGATGCGTTTCGAGCATCGCU3' (SEQ ID NO 1)。

[0304] 测试了不同的 MAGEA3 引物组合。最后, 保留 4 个 U- 测定和 2 个 M- 测定进行进一步的开发。每个测定所选择的引物组合在表 1 中概述。

[0305]

名称	测定 — 扩增子长 度	5'至3'序列 检测物修饰: 5' FAM 和内部 dUdabeyl
MAGEA3_GO_1_U_ F 正向引物	U 测定 (组 2)	ATTTTGTGTTTGGGAATTTAGGGTA G (SEQ ID NO. 2)
MAGEA3_GO_1_U_ R_AMP 反向检测物	- 142 bp	AGCGATGCGTTCGAGCATCGCU CCAACATCAAACCATCACTCA (SEQ ID NO. 3)
MAGEA3_GO_2_U_ F_AMP 正向检测物	U 测定 (组 3)	AGCGATGCGTTCGAGCATCGCU TGGAATTTAGGGTAGTATTGT (SEQ ID NO. 6)
MAGEA3_GO_2_U_ R 反向引物	- 140 bp	CCCTCCACCAACATCAAA (SEQ ID NO. 7)
MAGEA3_FURUTA_ U_F_AMP 正向检测 物	U 测定 (组 7)	AGCGATGCGTTCGAGCATCGCU TTAGGATGTGATGTTATTGATTT GT (SEQ ID NO. 9)
MAGEA3_FURUTA_ U_R 反向引物	- 110 bp	CCAACATCAAACCATCACTCA (SEQ ID NO. 4)
MAGEA3_QIU_U_F_ AMP 正向检测物	U 测定 (组 9)	AGCGATGCGTTCGAGCATCGCU TGTTTGGGAATTTAGGGTAGTATT GT (SEQ ID NO. 12)
MAGEA3_QIU_U_R 反向引物	- 126 bp	CCATCACTCATTACTCAAAACA AA (SEQ ID NO. 13)
ACTB_F_AMP	参照—	<u>AGCGATGCGTTCGAGCATCGCU</u>

[0306]

名称	测定 — 扩增子长度	5'至3'序列 检测物修饰: 5' FAM 和内部 dUdabcyl
正向检测物	125 bp	TAGGGAGTATATAGGTTGGGGA AGTT (SEQ ID NO. 21, 或 <u>SEQ ID</u> <u>NO: 1</u> +SEQ ID NO: 20)
ACTB_R 反向引物		AACACACAATAACAAACACAAA TTCAC (SEQ ID NO. 22)
MAGEA3_GO_1_M_ F 正向引物	M 测定 (组 2)	ATTTTGTTCGGAATTTAGGGTA G (SEQ ID NO. 14)
MAGEA3_GO_1_M_ R_AMP 反向检测物	- 142 bp	AGCGATGCGTTCGAGCATCGCU CCGACGTCAAACCGTCGCTCG (SEQ ID NO. 15)
MAGEA3_GO_2_M_ F 正向引物	M 测定 (组 4)	CGGAATTTAGGGTAGTATCGT (SEQ ID NO. 17)
MAGEA3_GO_2_M_ R_AMP 反向检测物	- 140 bp	AGCGATGCGTTCGAGCATCGCU CCCTCCGCCGACGTCAAA (SEQ ID NO. 18)

[0307] 表 1 :MAGEA3 的引物和 amplifluor 检测物的序列

[0308] 实施例 3 :分析测定的性能

[0309] 使用重新构建的底物证明该测定的分析性能 (检出限和特异性)。

[0310] 检出限

[0311] 为了确定 MSP 对非甲基化模式的灵敏性,连续稀释阳性证实的细胞系材料 (LNCaP 和 Ger1),将其与对照 (阴性) 细胞系 DNA (DU145) 混合。制备 1/10、1/100 和 1/500 的稀释度 (参见表 2)。使用来自 Zymo Research 的 EZDNA 甲基化试剂盒对总量 750ng 的 DNA (U DNA+M DNA) 进行亚硫酸氢盐处理。

[0312]

U DNA (ng) [LNCaP 或 Ger1]	M DNA (ng) [DU145]
750ng	0ng
75ng	675ng
7.5ng	742.5ng
1.5ng	748.5ng
0ng	750ng

[0313] 表 2 :细胞混合物稀释方案

[0314] 随后,将 2.4 微升化学处理的 DNA 用作 MAGEA3 实时 MSP 的模板,使用非甲基化 GO_2_U 测定 (LNCaP/DU145 DNA 混合物) 和非甲基化 Furuta 测定 (Ger1/DU145 DNA 混合物) 的特异性引物。结果在图 3 中显示。

[0315] 如所见的, MAGEA3 GO_2_U 和 MAGEA3_Furuta 实时 MSP 的检测下限可重复地设置在 1.5ng (1/500 稀释),这考虑了整个样品制备程序。因为每个 PCR 反应使用 10% 的样品,最终的分析灵敏度是 0.15ng。

[0316] 分析特异性

[0317] 通过使用了 CpGenome™ 通用甲基化 / 非甲基化 DNA (Chemicon International, CA, USA ;目录号 #S7821 和目录号 #S7822) 的 MSP 以及随后的琼脂糖凝胶分析确认 MAGEA3 GO_1_U/GO_2_U/Furuta_U 和 QIU_U 引物组的特异性。简言之,在 I Cycler (Bio-Rad) 上进行 amplifluor 实时 MSP,其使用下列温度设置 :阶段 1 :50 摄氏度 2 分钟,阶段 2 :95 摄氏度 10 分钟,阶段 3 :95 摄氏度 15 秒,62 摄氏度 1 分钟 (=平台数据收集),重复 45 次。引物高特异性对基于 Amplifluor 的检测来说是必需的,所以在阶段 3 施加温度梯度,以选择最佳退火温度 (57 摄氏度、58.1 摄氏度、60.3 摄氏度和 61.8 摄氏度)。

[0318] 在 3% 琼脂糖凝胶上将所有所得的 PCR 产物进行电泳。当 CpGenome™ 通用甲基化 DNA 用作模板 DNA 时 (在 57 摄氏度下测试) 没有可见条带,证实了对非甲基化 DNA 的特异性。

[0319] 另外,使用序列比对在 MAGE-A 家族的其它基因成员中研究 MAGEA3 测定的特异性。在表 3 中显示 MAGE-A3 GO_1_U/GO_2_U/Furuta_U 和 QIU_U 引物组相对于 MAGE-A2 和 MAGE-A12 序列 (反转 (converted) 序列) 的错配数。所研究的 U 引物显示对 MAGE-A3U/MAGE-A6U 是特异性的。

[0320]

		MAGE-A2	MAGE-A12
测定:	引物:	错配	错配
GO_1 U	正向	3	3
	反向	1	1
	总计	4	4
GO_2 U	正向	6	6
	反向	0	0
	总计	6	6
Furuta U	正向	1	2
	反向	1	1
	总计	2	3
Qiu U	正向	6	6
	反向	6	6
	总计	12	12

[0321] 表 3 :序列比对

[0322] 克隆 MAGE-A3 调节序列和性能标准曲线

[0323] 使用表 4 中所示的侧翼引物克隆 364bp 的调节性 MAGE-A3 U DNA 序列。

[0324]

侧翼引物	靶标或基因名	正义 (S), 反义 (A)	5'至 3'的序列
MAGEA3_FL_1_S	MAGEA3	S	ATTTTGAGGGATGATCGAAG (SEQ ID NO 23)
MAGEA3_FL_1_AS	MAGEA3	A	CTAAAATAAAACCCGCCTCA (SEQ ID NO 24)

[0325] 表 4 :用于产生 MAGEA3 质粒材料的侧翼引物

[0326] 此克隆的材料用作实时 MSP 的标准曲线材料。首先通过进行两个平板的 6 个标准曲线 (2×10^6 – 2×10^1 拷贝) (2 个不同的操作者, 3 个 PCR 混合物 / 操作者 / 平板) 证实可重复性。监测斜率、PCR 效率和 R^2 值, 给出可接受的结果。

[0327] 性能标准曲线

[0328] 一式两份加载连续稀释的 MAGEA3 质粒材料 (2×10^6 至 2×10^1 拷贝 / $5 \mu\text{l}$), 使用表 1 中列出的引物和 Amplifluor 检测物序列, 采用下列优化的温度设置: 阶段 1 :50 摄氏度 2 分钟, 阶段 2 :95 摄氏度 1 分钟, 阶段 3 :95 摄氏度 15 秒, 59 摄氏度 30 秒, 59 摄氏度 30 秒 (平台数据收集), 重复 45 次。使用 SDS 2.2 软件 (Applied Biosystems) 产生结果, 输出

为 Ct 值（扩增曲线跨过阈值时的循环数，由软件自动设置）。标准曲线的性能显示于表 5。

[0329]

名称	斜率	R ²	效率
MAGEA3_U 组 2 标准曲线 (质粒)	3.6736	0.9999	87.2%
MAGEA3_U 组 3 标准曲线 (质粒)	3.6994	0.9998	86.3%
MAGEA3_U 组 7 标准曲线 (质粒)	3.6108	0.9994	89.2%
MAGEA3_U 组 9 标准曲线 (质粒)	3.4885	0.9988	93.5%
MAGEA3_M 组 2 标准曲线 (质粒)	3.8601	0.9997	81.6%
MAGEA3_M 组 4 标准曲线 (质粒)	3.6701	0.9997	87.3%

[0330] 表 5 :MAGEA3 的斜率和 PCR 效率总结

[0331] 实施例 4 :测定对于细胞系材料的性能

[0332] 研究了 19 个细胞系的 MAGEA3 甲基化状态。下面分别显示对于 MAGEA3U 和 M 测定来说最佳的甲基化和非甲基化细胞系。

[0333]

	β-肌动蛋白		引物组 U_2			引物组 U_3				
细胞系:	Ct:	拷贝:	Ct:	拷贝:	比值:	Ct:	拷贝:	比值:	Ct:	拷贝:
Gerl (108216)	29.28	2086	29.57	1403	673	29.73	1753	841	26.97	2431
Staq (108217)	28.09	4484	35.93	26	6	UND			34.41	16
CRL9609 (108218)	27.58	6192	32.47	225	36	34.98	73	12	29.80	358
LNCaP	28.82	2814	28.54	2684	954	28.64	3364	1195	25.88	5085
Du145	29.07	2393	>40			UND			>40	
HL60	28.29	3940	39.89	2.10	0.53	>40			>40	

[0334] 表 6 :通过 MAGEA3U 测定处理的细胞系

[0335]

	β-肌动蛋白		引物组 M_2			引物组 M_4		
细胞系:	Ct:	拷贝:	Ct:	拷贝:	比值:	Ct:	拷贝:	比值:
Gerl (108216)	29.28	2086	>40			>40		
Staq (108217)	28.09	4484	29.09	1388	309	27.54	2100	468
CRL9609 (108218)	27.58	6192	27.63	3363	543	26.89	3200	517
LNCaP	28.82	2814	>40			>40		
Du145	29.07	2393	29.72	945	395	28.96	839	351
HL60	28.29	3940	28.97	1492	379	27.91	1657	421

[0336] 表 7 :通过 MAGEA3M 测定处理的细胞系

[0337] 实施例 5 :中间精密度

[0338] 通过对非甲基化和甲基化版本的 MAGEA3 启动子序列重复进行相同的测定来测试中间精密度。重复地测量不同数量的完全修饰的 MAGEA3 U 和 MAGEA3M 启动子 DNA 分子 (标准曲线材料)。另外,通过在不同的两天 (每天每个操作员一式两份地进行 3 个不同的标准曲线稀释) 由两个不同的熟练实验室操作员 (操作员 A 和 B) 重复地进行测定来测试操作员因素。

[0339] 表 8 和 9 概述了测试 GO 1 和 GO 2U 和 M MAGEA3 测定的中间精密度所进行的实验。显示对于相同数量的分子所有结果的标准偏差在 0.11 和 1.29 之间。所有相关系数 (不同操作员和日期) 的概述显示于表 9 中,平均 R^2 的范围为 0.9959 至 0.9997)。

[0340]

Log 拷贝	GO_1_U 所有 Ct 值的 平均数 (SD)	GO_2_U 所有 Ct 值的平 均数 (SD)	Furuta 所有 Ct 值的 平均数 (SD)	GO_1_M 所有 Ct 值的 平均数 (SD)	GO_2_M 5 所有 Ct 值的 平均数 (SD)
6.30	17.69 (0.27)	19.31 (0.33)	17.23 (0.84)	17.78 (0.47)	17.73 (0.12)
5.30	21.41 (0.23)	22.98 (0.37)	20.70 (0.87)	21.55 (0.44)	21.32 (0.11)
4.30	25.00 (0.27)	26.64 (0.39)	24.30 (0.86)	25.36 (0.46)	24.90 (0.11)
3.30	28.70 (0.37)	30.34 (0.68)	27.85 (0.78)	29.21 (0.36)	28.51 (0.14)
2.30	32.77 (1.28)	34.06 (0.46)	31.42 (0.85)	33.26 (0.52)	32.10 (0.38)
1.30	36.24 (1.16)	37.86 (1.29)	34.97 (1.20)	37.23 (1.20)	35.75 (1.25)
	$R^2 = 0.9997$	$R^2 = 1.000$	$R^2 = 1.000$	$R^2 = 0.9998$	$R^2 = 1.000$

[0341] 表 8 :检测中间精密度 (在不同的两天,操作员 A 和 B) :栏目 1 :分子数量 (log), 后面的栏目 :每个 MAGEA3 测定的平均 Ct 值和标准偏差

[0342]

天	操作者	点	R ² GO_1_U	R ² GO_2_U	R ² Furuta	R ² GO_1_M	R ² GO_2_M
1	A	6	0.9993	0.9974	0.9999	0.9972	0.9996
1	A	6	0.9993	0.9998	0.9993	0.9991	0.9992
1	A	6	0.9997	0.9969	0.9992	0.9988	0.9994
1	B	6	0.9997	0.9989	0.9999	0.9996	0.9999
1	B	6	0.9996	0.9971	0.9998	0.9986	0.9996
1	B	6	0.9983	0.9987	0.9999	0.9998	0.9959
2	A	6	0.9950	0.9996	0.9997	0.9989	0.9912
2	A	6	0.9988	0.9966	0.9998	0.9990	0.9994
2	A	6	0.9997	0.9957	0.9996	0.9970	0.9997
2	B	6	0.9995	0.9994	0.9999	0.9976	0.9980
2	B	6	0.9975	0.9997	0.9998	0.9998	0.9999
2	B	6	0.9648	1.0000	0.9992	0.9976	0.9999
			平均 0.9959	平均 0.9983	平均 0.9997	平均 0.9986	平均 0.9985

[0343] 表 9 :所发现的每个分析的稀释系列的相关系数

[0344] 实施例 6 :黑色素干扰

[0345] 之前已有报道称对含有黑色素的样品进行 PCR 的效率低。

[0346] Eckhart 等人 (2000) 发现来源于黑素细胞的 RNA 和 cDNA 制剂都含有 RT-PCR 抑制剂,其与核酸共纯化。对候选抑制剂黑色素的研究显示其可逆地结合热稳定的 DNA 聚合酶并抑制其活性。在通过 MAGEA3 U amplifluor 测定处理黑素瘤样品之前,研究了黑色素可能导致的抑制。

[0347] 如 Eckhart 等人所述制备合成黑色素。简言之,将黑色素 (SIGMA M8631) 以 2mg/ml 的浓度溶于蒸馏水,彻底涡旋混匀,在室温下水浴超声处理 10 分钟。通过在 9000g 下离心除去不溶的黑色素。通过在反应过程的不同步骤加入黑色素来测试可能的抑制作用:

[0348] 1) 在提取之前:将 1 微克和 5 微克制备的黑色素添加到 250,000 个 LNCaP 细胞和 250,000 个 MCF7 细胞

[0349] 2) 提取后:将 1 微克和 5 微克制备的黑色素添加到 1 微克 LNCaP 和 MCF7DNA

[0350] 3) 亚硫酸氢盐处理后:将 1 微克和 5 微克制备的黑色素直接掺入 PCR 反应。改变亚硫酸氢盐洗脱体积以使得在 PCR 反应中具有恒定的模板浓度 (称为“a”,例如 LNCaP a)

或恒定的模板量（称为“b”，例如 LNCaP b）。

[0351] 将这些含有黑色素的 LNCaP 和 MCF7 样品与对应地非掺入黑色素的样品同时进行处理。

[0352] 使用**PUREGENE®** DNA 纯化试剂盒和 EZ DNA 甲基化试剂盒进一步处理样品。将化学修饰的 DNA 用作 MAGEA3 U、Gst-Pi M 和 ACTB 实时 MSP 的输入材料。

[0353] 计算所测试基因启动子和 ACTB 参照基因的回收拷贝数并针对每个情况进行比较。

[0354] 结果显示于图 9。当在 DNA 提取之前或之后加入黑色素时，没有观察到显著的 PCR 抑制作用。黑色素仅在直接掺入 PCR 反应时显示明显的抑制。与 RT-PCR 不同，可以通过实时 MSP 处理具有高黑色素含量的黑素瘤样品，而没有 PCR 抑制的风险。

[0355] 实施例 7：黑素瘤 / 肺样品的 MAGE-A3 甲基化状态以及与 RNA 表达的一致性

[0356] 材料和方法

[0357] 临床样品

[0358] 由 GSKBio 提供来自黑素瘤和肺癌的手术样品：根据 GSKBio RNA 表达数据将基因组 DNA 样品（gDNA）、**RNA later®**溶液中的活组织检查材料以及相应的甲醛固定石蜡包埋组织（FFPE）分为 MAGEA3 阳性或 MAGEA3 阴性。所提供样品组的概述在表 10 中详述。

[0359]

诊断组	样品类型	样品数	通过 RT-PCR 对 MAGEA3 RNA 表达的分类
黑素瘤	gDNA	41	24 个阳性
			17 个阴性
NSCLC	RNA later® 中的组织	61	26 个阳性
			35 个阴性
NSCLC	FFPE	52	26 个阳性*
			26 个阴性*

[0360] 表 10：临床样品收集

[0361] * 根据相应 **RNA later®**组织进行的分类

[0362] 细胞系：

[0363] 每个测定中包含细胞系作为阳性和阴性对照。在对临床样品进行 amplifluor 实时 MSP 测定之前，对细胞系材料确认所述测定的灵敏度和特异性。在表 11 中概述最佳的 MAGEA3 甲基化和非甲基化细胞系。Ger1、Staq enCRL9609 获得自 GSKBio，细胞系 LNCaP 和 DU145 购自美国典型培养物保藏中心（American Type Culture Collection）。

[0364]

	MAGEA3 RNA 表达状态	MAGEA3 甲基化状态
Gerl	阳性	非甲基化
Staq	阴性	甲基化
CRL9609	阴性	甲基化
LNCaP	未测	非甲基化
DU145	未测	甲基化

[0365] 表 11 :MAGEA3 对照细胞系

[0366] DNA 分离:

[0367] 首先在 750 微升二甲苯中将甲醛固定石蜡包埋的样品脱蜡 2 小时。进行第二次二甲苯处理 (400 μ l 二甲苯, 2 小时), 然后加入 250 微升 70% 的乙醇, 之后以 13000rpm 离心 15 分钟。除去上清, 在室温下将样品风干。

[0368] 在除去 RNA later® 溶液后, 使用刀片将 RNA later® 中的样品切成非常小的块。

[0369] 然后, 使用经典的苯酚 / 氯仿提取法提取 DNA, 并重悬于 50 微升 LoTE (3mM TRIS, 0.2mM EDTA, pH8.0)。

[0370] 使用 Picogreen® dsDNA 定量试剂盒 (Molecular Probes, #_P7589) 按照制造商的建议对 DNA 进行定量。随该试剂盒提供的 λ DNA 用于制备标准曲线。使用 FluoStar Galaxy 平板读数器 (BMG Lab technologies, Germany) 收集数据。

[0371] DNA 修饰: 使用来自 Zymo Research 的 EZ DNA 甲基化试剂盒对 1.5 μ g DNA 进行亚硫酸氢盐修饰。

[0372] 简言之, 45 微升等分试样与 5 微升的 M- 稀释缓冲液混合, 在 37 摄氏度下 1100rpm 摇动孵育 15 分钟。然后, 加入 100 微升稀释的 CT 转化 (conversion) 试剂, 将样品在 70 摄氏度下黑暗中以 1100rpm 摇动孵育 3 小时。转化后, 再根据制造商的说明对样品进行脱盐和脱磺酸盐, 在 25 微升 Tris-HCl 1mM pH8.0 中洗脱。修饰的 DNA 保存于 -80 摄氏度至进一步处理。

[0373] DNA 扩增: 在来自 Applied Biosystems 的 7900HT 快速实时 PCR 循环仪上进行实时 MSP。

[0374] 测试设计成靶向非甲基化版本基因启动子序列的四个 MAGEA3 低甲基化测定与所提供的 RNA 表达数据的一致性, 所述 RNA 表达数据是根据 WO2007/147876 中所述方法检测, 例如, 使用表 2 的引物和探针, SEQ ID NO: 3、4 和 13 的 MAGE-A3 外显子 3 特异性引物和探针。还测定了独立的参照基因 β -肌动蛋白 (ACTB)。引物和 amplifluor 检测物序列显示于表 1。

[0375] 将 2.4 微升经修饰的基因组 DNA 样品添加到 12 微升终体积的 PCR 反应, 其包含: 6 微升含 Rox 的 iTaq™ Supermix (BioRad, 2x 缓冲液), 正向引物 / 检测物和反向引物的终引物浓度均为 100nM。每个 MAGEA3 设计的循环条件为: 50 摄氏度 2 分钟; 95 摄氏度 10 分

钟 ;然后 45 个循环的 95 摄氏度 15 秒、59 摄氏度 30 秒 [对于 ACTB 为 62 摄氏度] 和 59 摄氏度 30 秒 [对于 ACTB 为 62 摄氏度] (=平台数据收集)。

[0376] 使用 SDS 2.2.2 软件 (Applied Biosystems) 产生结果,输出为 Ct 值 (扩增曲线跨越阈值的循环数,由软件自动设置),然后用于根据 $20-2 \times 10^6$ 基因拷贝等价物 (equivalents) 的标准曲线上所作图的值的线性回归计算拷贝数,使用含有亚硫酸氢盐修饰的目的序列的质粒 DNA 或纯化的 PCR 产物。计算 MAGEA3 和 ACTB 之间的比值,得到测定结果。为了解释该数据,根据非盲性 RNA 表达数据定义临床截断值 (阈值)。

[0377] 根据图 5 中所示的判定树将样品分为甲基化、非甲基化或无效的。

[0378] 每个测定中包含细胞系作为阳性和阴性对照,其在 DNA 提取步骤进入程序。

[0379] 当符合下列标准时认为测定是有效的 :a) 两个标准曲线的 PCR 效率均高于 80% ; b) 至少 4 个相关数据点的 r^2 高于 0.990 ;c) 两个重复 (duplicates) 之间的 $\Delta Ct < 1.5$; d) 通常包括的 NTC 未扩增 ;e) 可检出阳性细胞系测定对照的 10% 的 1.5 微克转化反应 ;以及 f) 在标准曲线内未检出阴性细胞系测定对照的 10% 的 1.5 微克转化反应。

[0380] 结果

[0381] 甲基化和基因表达之间的一致性:

[0382] 黑素瘤:

[0383] 针对相同样品组比较 MAGEA3 的表达和甲基化水平。总共,使用 RT-PCR 和实时 MSP 处理了 41 份黑素瘤样品。测试了几种 MAGEA3 U amplifluor 测定设计,以确定哪种测定与 GSK 提供的 RNA 表达数据的一致性最佳。以具有最大一致性以及最少假阳性的方式设置临床截断值 (参见表 12)。这些样品中 MAGEA3 甲基化状态的 ROC 曲线显示于图 6。在 17 个阴性样品中,9 个是其它 MAGE-A 家族成员阳性的 ;GO_2_U 和 Furuta U 测定正确地将这 9 个样品归类 (100% 特异性)。

[0384] 将这些数据汇总,MAGEA3_GO_2_U 测定运行最佳,其具有 92.7% 的一致性和 100% 的特异性。

[0385]

	MAGEA3_G O_1_U	MAGEA3_GO_ 2_U	MAGEA3 Furuta U	MAGEA3 Qiu U
截断值	315	330	946	434
正确归类 MAGEA3 阴性 (GSK → 17)	13	17	17	16
正确归类 MAGEA3 阳性 (GSK → 24)	22	21	16	20
正确归类样品 (样品总数 :41)	35	38	33	36

一致性	85.4%	92.7%	80.5%	87.8%
-----	-------	-------	-------	-------

[0386] 表 12 :黑素瘤样品一致性数据

[0387] 肺样品 (活组织检查和 FFPE) :

[0388] 对不同的样品组测试如上所述的相同设置 ;通过 4 个 MAGEA3 Uamplifluor 测定筛选 52 个肺 FFPE 样品和 61 个 RNA later® 中的肺组织,并与相应的 RNA 数据比较一致性。

[0389] 这些肺活组织检查和 FFPE 样品中 MAGEA3 甲基化状态的 ROC 曲线分别显示于图 7 和图 8 中。在 MAGEA3 阴性样品中,9 个是其它 MAGE-A 家族成员阳性的 ;MAGEA3U 测定正确地将全部的 9 个样品归类 (100% 特异性)。所得结果证实了 MAGEA3_GO_2_U 测定是运行最佳的测定,其在 FFPE 中具有 90.4% 的一致性以及在活组织检查中具有 91.8% 的一致性,保持 100% 的特异性 (表 13)。

[0390]

	MAGEA3 GO 2 U	
	FFPE	活组织检查
截断值	29	112
正确归类 MAGEA3 阴性 (GSK)	26/26	33/35
正确归类 MAGEA3 阳性 (GSK)	21/26	23/26
正确归类	47	56
总样品	52	61
一致性	90.4%	91.8%

[0391] 表 13 :肺样品一致性数据 (MAGEA3_GO_2_U 测定)

[0392] 实施例 8 :通过 MAGEA3 测定检测肺样品

[0393] 通过 MAGEA3 (U & M 测定版本) 和 β -肌动蛋白测定处理来自肺癌的 DNA,平行处理 LNCaP & DU145 对照细胞系。测试了几种 MAGEA3 Uamplifluor 测定设计,以确定哪种测定与 MAGEA3 GO_2 U 测定的一致性最佳。使用如实施例 7 所述的实验条件。标准曲线显示高于 80% 的效率。 R^2 高于 0.99。对于 MAGEA3 GO_2 U 测定截断值设在 29 ;对于 MAGEA3 GO_1 U 测定设在 22 ;对于 MAGEA3 Furuta U 测定设在 229 ;对于 MAGEA3 Qiu 测定设在 87 ;对于 MAGEA3 GO_1 M 测定设在 148 以及对于 MAGEA3 GO_2 M 测定设在 167。针对相同样品组比较 MAGEA3 的甲基化水平。结果显示于表 14 和 15。对于 MAGEA3 GO_2 U 测定 (截断值 = 29) :

[0394] -3 个样品归类为无效,这些样品不包含在与其它 U & M 测定的比较中 ;

[0395] -9 个样品归类为非甲基化 ;

[0396] -15 个样品归类为甲基化。

[0397] 对于有效样品,四个MAGEA3 U测定给出相似的结果,与MAGEA3 GO_2U测定有96%的一致性。MAGEA3 M测定给出与MAGEA3 GO_2 U测定71%和75%的一致性。

[0398]

	<u>MAGEA3 U</u> <u>组 3 (GO 2</u> <u>U)</u>	<u>MAGEA3 U</u> <u>组 2 (GO 1</u> <u>U)</u>	<u>MAGEA3 U</u> <u>组 7(Furuta</u> <u>U, 重复)</u>	<u>MAGEA3 U</u> <u>组 9 (Qiu</u> <u>U)</u>
甲基化 (/15):	15	14	14	14
非甲基化 (/9):	9	9	9	9
<u>总计</u>	24	23	23	23
<u>一致性:</u>	<u>100%</u>	<u>96%</u>	<u>96%</u>	<u>96%</u>

[0399] 表 14 :比较不同U测定的总表,其显示于GO_2 U测定相比的U测定所计算出的一致性(该表仅考虑有效样品)。

	<u>MAGEA3 U</u> <u>组 3 (GO 2</u> <u>U)</u>	<u>MAGEA3 M</u> <u>组 2 (GO 1</u> <u>M)</u>	<u>MAGEA3 M</u> <u>组 4 (GO 2</u> <u>M)</u>
[0400] 甲基化 (/15):	15	11	13
非甲基化 (/9):	9	6	5
<u>总计</u>	24	17	18
<u>一致性:</u>	<u>100%</u>	<u>71%</u>	<u>75%</u>

[0401] 表 15 :比较不同M测定的总表,其显示与GO_2 U测定相比的M测定所计算出的一致性(该表仅考虑有效样品)。

[0402] 本发明不限于本文所述具体实施方式的范围。事实上,除了本文所描述的那些之外,从前述说明和附图出发本发明的许多修改对于本领域技术人员来说是显而易见的。这些修改落入所附权利要求的范围。此外,认为本文所述的所有实施方式广泛适用,并且根据需要可与任何及所有其它一致实施方式相组合。

[0403] 本文引用了多个出版物,其公开通过引用以整体并入本文。

序列表

<110> 肿瘤甲基化科学公司 (OncoMethylome Sciences SA)

葛兰素史密丝克莱恩生物公司 (GlaxoSmithKline Biologicals)

<120> 改进的对 MAGE-A 表达的检测

<130>P94294W001

<150>US 60/960,128

<151>2007-09-17

<160>41

<170>PatentIn version 3.4

<210>1

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸 (发夹)

<400>1

agcgatgcgt tcgagcatcg cu

22

<210>2

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>2

atTTTTgttt ggaatttagg gtag

24

<210>3

<211>43

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 发夹引物

<400>3

agcgatgcgt tcgagcatcg cuccaacatc aaaccatcac tca

43

<210>4

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>4

ccaacatcaa accatcactc a

21

<210>5

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>5

tggaatttag ggtagtattg t

21

<210>6

<211>43

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 发夹引物

<400>6

agcgatgcgt tcgagcatcg cutggaattt agggtagtat tgt

43

<210>7

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>7

ccctccacca acatcaaa

18

<210>8

<211>25

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>8

ttaggatgtg atgttattga tttgt

25

<210>9

<211>47

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>9

agcgatgcgt tcgagcatcg cuttaggatg tgatgttatt gatttgt 47

<210>10

<211>203

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>MAGE-A3 未反转序列的部分

<400>10

catgcttacc tccacccccca tccgatecccc atccaggcag aatccagttc caccctgcc	60
cggaaccacag ggtagtaccg ttgccaggat gtgacgccac tgacttgccg attggaggtc	120
agaagaccgc gagattctcg ccctgagcaa cgagcgacgg cctgacgtcg gcggagggaa	180
gccggcccag gctcggtgag gag	203

<210>11

<211>25

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>11

tgttttggaat ttaggtagt attgt	25
-----------------------------	----

<210>12

<211>47

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 发夹引物

<400>12

agcgatgcgt tcgagcatcg cutgttttga atttagggta gtattgt	47
---	----

<210>13

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>13

ccatcactca ttactcaaaa caaa

24

<210>14

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>14

atTTTTgttc ggaatttagg gtag

24

<210>15

<211>43

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 发夹引物

<400>15

agcgatgcgt tcgagcatcg cuccgacgtc aaaccgtcgc tcg

43

<210>16

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>16

ccgacgtcaa accgtcgctc g

21

<210>17

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>17

cggaatttag ggtagtatcg t

21

<210>18

<211>40

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 发夹引物

<400>18

agcgatgcgt tcgagcatcg cuccctccgc cgacgtcaaa

40

<210>19

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>19

ccctccgccg acgtcaaa

18

<210>20

<211>26

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>20

tagggagtat ataggttggg gaagtt

26

<210>21

<211>48

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 发夹引物

<400>21

agcgatgcgt tcgagcatcg cutagggagt atataggttg gggaagtt

48

<210>22

<211>27

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>22

aacacacaat aacaaacaca aattcac

27

<210>23

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>23

attttgaggg atgatcgaag

20

<210>24

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>24

ctaaaataaa acccgctca

20

<210>25

<211>15

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>Overlapping primer sequence

<400>25

tggaatttag gtag

15

<210>26

<211>30

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合引物序列

<400>26

atTTTTgttt ggaatttagg gtagtattgt

30

<210>27

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>MAGE-A3 肽

<400>27

Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val

1 5

<210>28

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>MAGE-A3 肽

<400>28

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr

1 5

<210>29

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>MAGE-A3 肽

<400>29

Met Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr

1 5 10

<210>30

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>MAGE-A3 肽

<400>30

Val His Phe Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Ala

1 5 10

<210>31

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>MAGE-A3 肽

<400>31

Leu Val His Phe Leu Leu Leu Lys Tyr Arg

1 5 10

<210>32

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>MAGE-A3 肽

<400>32

Leu Lys Tyr Arg Ala Arg Glu Pro Val Thr

1 5 10

<210>33

<211>16

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>MAGE-A3 肽

<400>33

Ala Cys Tyr Glu Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser

1 5 10 15

<210>34

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>MAGE-A3 肽

<400>34

Thr Gln His Phe Val Gln Glu Asn Tyr Leu Glu Tyr

1

5

10

<210>35

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>35

tccatgacgt tcctgacgtt

20

<210>36

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>36

tctcccagcg tgcgccat

18

<210>37

<211>30

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>37

accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg 30

<210>38

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>38

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt 24

<210>39

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>39

tcgatgacgt tcctgatgct 20

<210>40

<211>450

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 加标签的重组 MAGE-A3

<400>40

Met Asp Pro Lys Thr Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ala Ala Gly Val Leu

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

Gln Ile Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu Ala Ile Ile	
325	330 335
Ala Arg Glu Gly Asp Cys Ala Pro Glu Glu Lys Ile Trp Glu Glu Leu	
340	345 350
Ser Val Leu Glu Val Phe Glu Gly Arg Glu Asp Ser Ile Leu Gly Asp	
355	360 365
Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln His Phe Val Gln Glu Asn Tyr Leu Glu	
370	375 380
Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asp Pro Ala Cys Tyr Glu Phe Leu Trp	
385	390 395 400
Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Leu His His	
405	410 415
Met Val Lys Ile Ser Gly Gly Pro His Ile Ser Tyr Pro Pro Leu His	
420	425 430
Glu Trp Val Leu Arg Glu Gly Glu Glu Gly Gly His His His His His	
435	440 445
His His	
450	

<210>41

<211>203

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 亚硫酸氢盐反转的 MAGE-A3 序列

<400>41

tatgtttatt tttattttta ttgattttt atttaggtag aatttagttt ttttttggt	60
tggaatttag ggtagtattg ttgttaggat gtgatgttat tgatttgtgt attggagggt	120
agaagattgt gagatttttg ttttgagtaa tgagtgatgg tttgatgttg gtggagggaa	180
gttggttttag gtttggtgag gag	203

MAGEA3_GO_1_U
MAGEA3_GO_2_U
MAGEA3_FURUTA_U
MAGEA3_OIU_U
■ 转录起始位点

CATGCTTACCTCCACCCCCATCCGATCCCCATCCAGGCA
GAATCCAGTTCCACCCCTGCCCGGAACCCAGGGTAGTAC
CGTTGCCAGGATGTGACGCCACTGACTTGCGCAT
TGGAGGTCAGAAGACCGCAGATTCTCGCCCTGAGCAA
CGAGCGACGGCCTGACGTCGGCGGAGGGAAGCCG
GCCCAGGCTCGGTGAGGAG (SEQ ID NO. 10)

图 1a

TATGTTTATTTTATTTTATTTGATTTTATTTAGGTAGA
ATTTAGTTTTATTTTGTGTTGGAATTTAGGGTAGTATTGTT
GTTAGGATGTGATGTTATTGATTTGTGTATTGGAG
GTTAGAAGATTGTAGATTTTGTGTTTGTAGTAA TGAGT
GATGGTTTGATGTTGGTGGAGGGAAGTTGGTTTAGG
TTTGGTGAGGAG (SEQ ID NO. 41)

图 1b

MAGE-A3_GO_2 U (118bp)

CATGCTTACCTCCACCCCATCCGATCCCATCCAGGCAGAATCC
AGTTCCACCCCTGCCCGGAACCCAGGGTAGTACCGTTGCCAGG
ATGTGACGCCACTGACTTGCGCATTGGAGGTCAGAAGACCGCGA
GATTCTCGCCCTGAGCAACGAGCGACGGCCTGACGTCGGCGGA
GGGAAGCCGGCCCAGGCTCGGTGAGGAG

图 2a

MAGE-A3_GO_2 U (118bp)

TATGTTTATTTTTATTTTTATTTGATTTTTATTTAGGTAGAATTTAG
TTTTATTTTTGTTTGGAATTTAGGGTAGTATTGTTGTTAGGATGT
GATGTTATTGATTTGTGTATTGGAGGTTAGAAGATTGTGAGATT
TTGTTTTGAGTAATGACTGATGGTTTGATGTTGGTGAGGGAAG
TTGGTTTAGGTTTGGTGAGGAG

图 2b

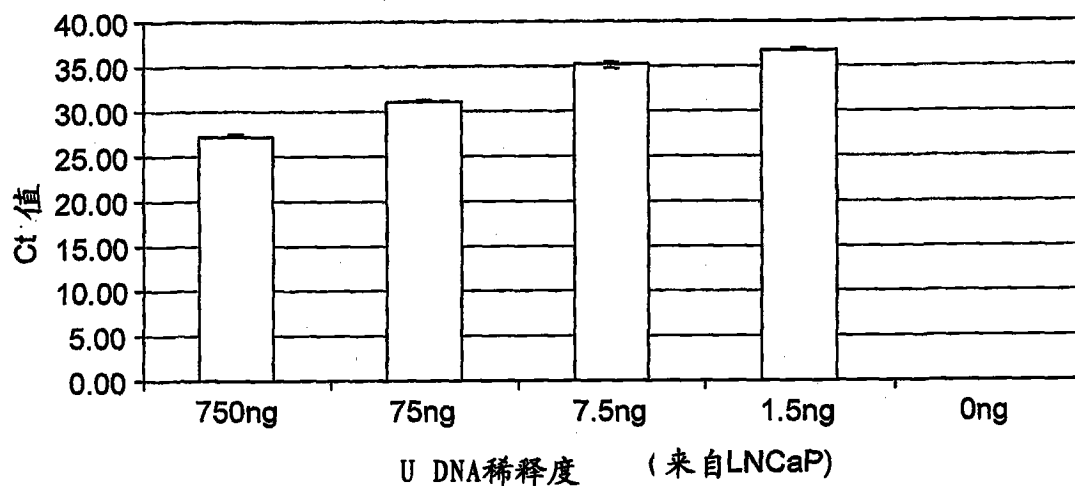


图 3a

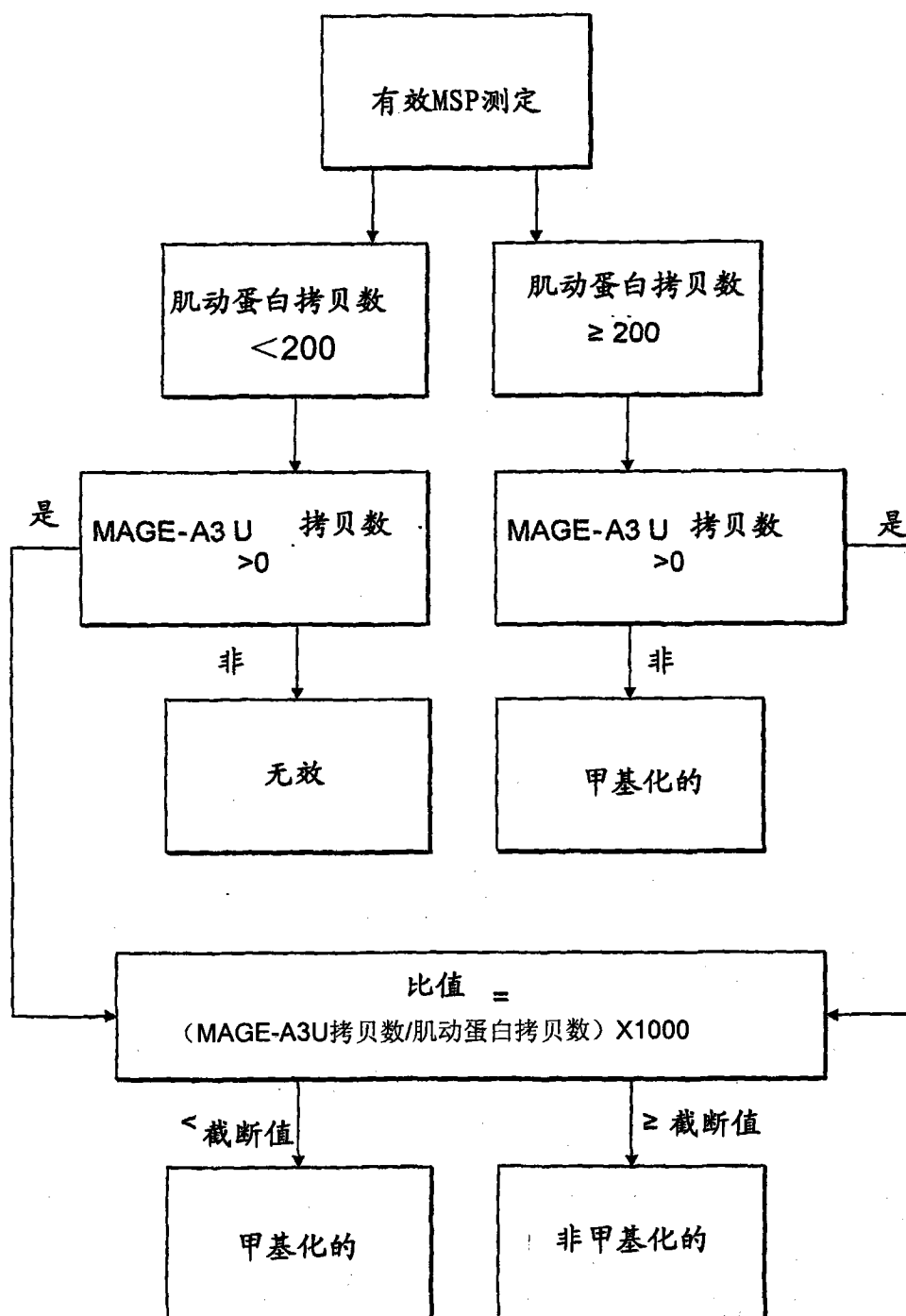


图 5

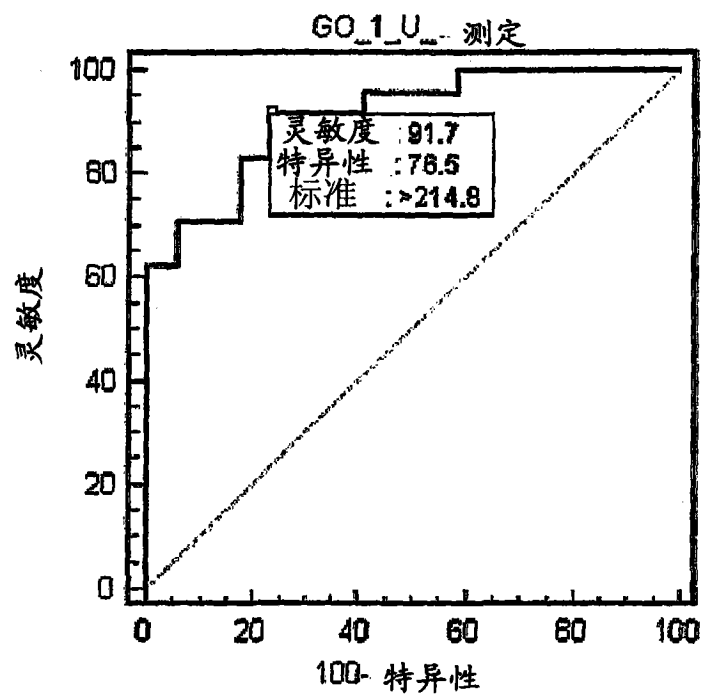


图 6a

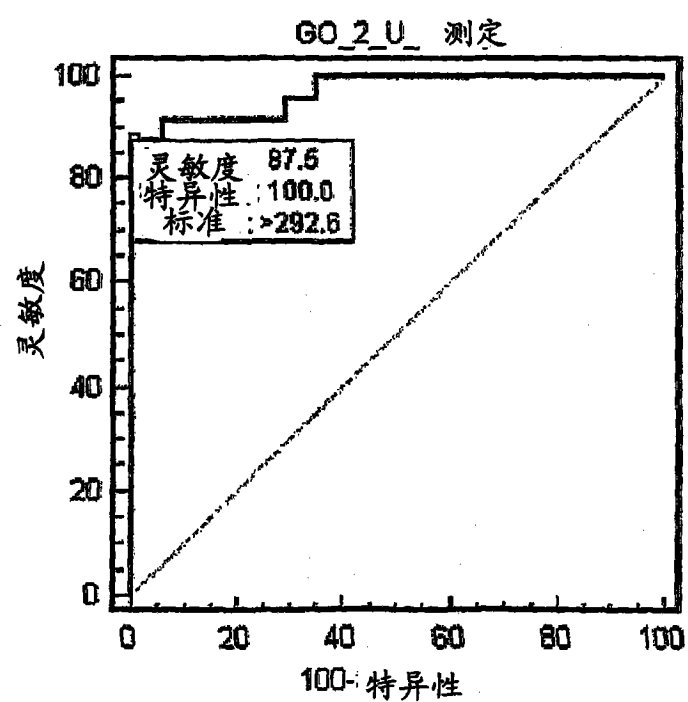


图 6b

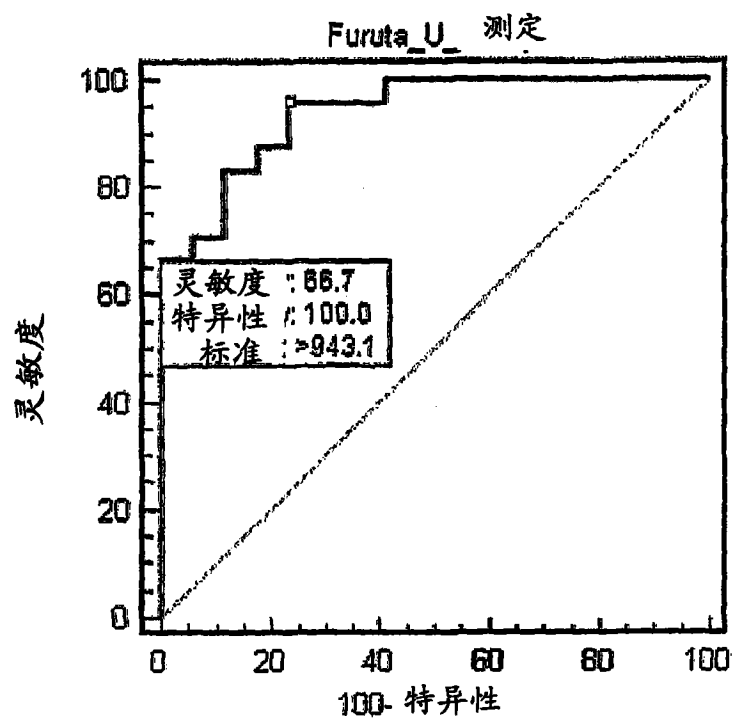


图 6c

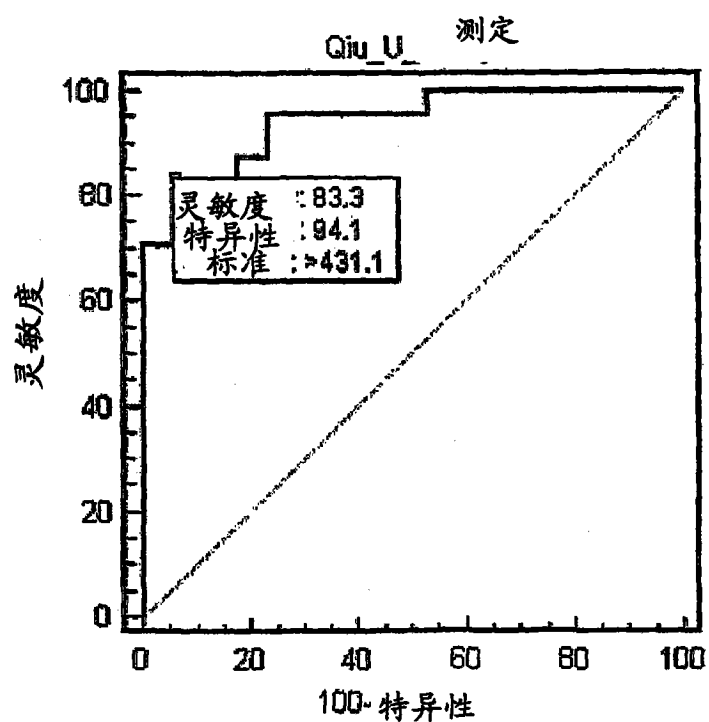


图 6d

	GO_1 U 测定	GO_2 U 测定	Furuta U 测定	Qiu U 测定
ROC 曲线下面积 (AUC)	0.912	0.971	0.939	0.944
标准误差	0.0455	0.0258	0.0377	0.0361
95% 置信区间	0.781 to 0.977	0.863 to 0.996	0.817 to 0.989	0.824 to 0.990
显著性水平 P (面积0.5)	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

图 6e

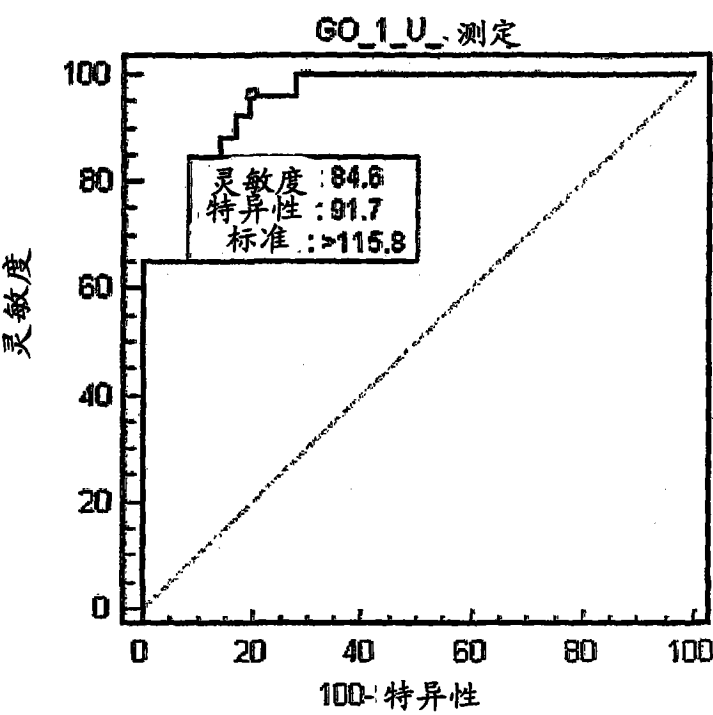


图 7a

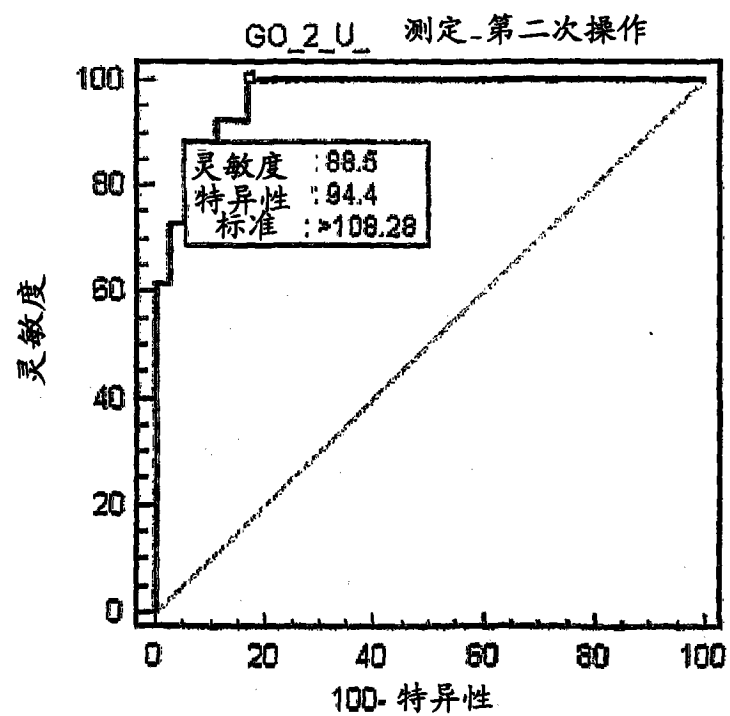


图 7b

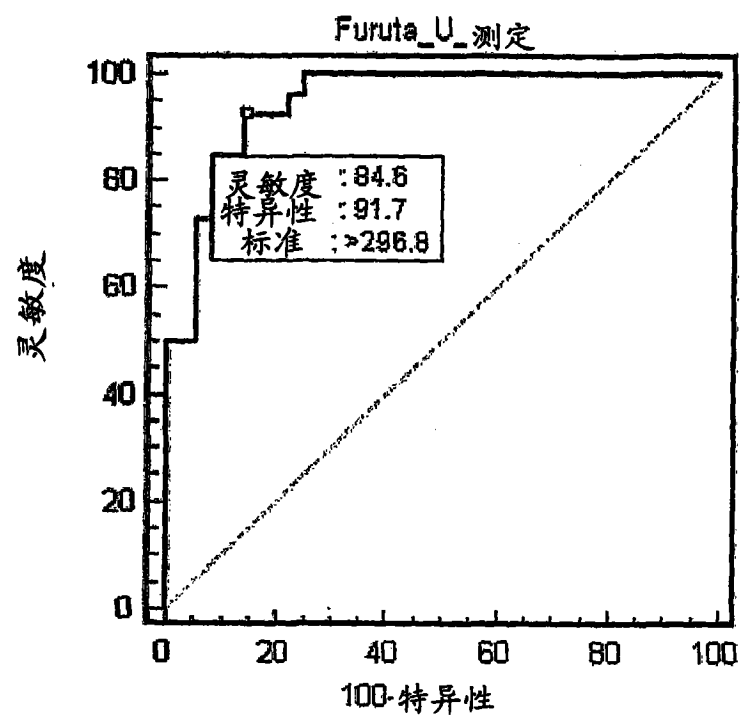


图 7c

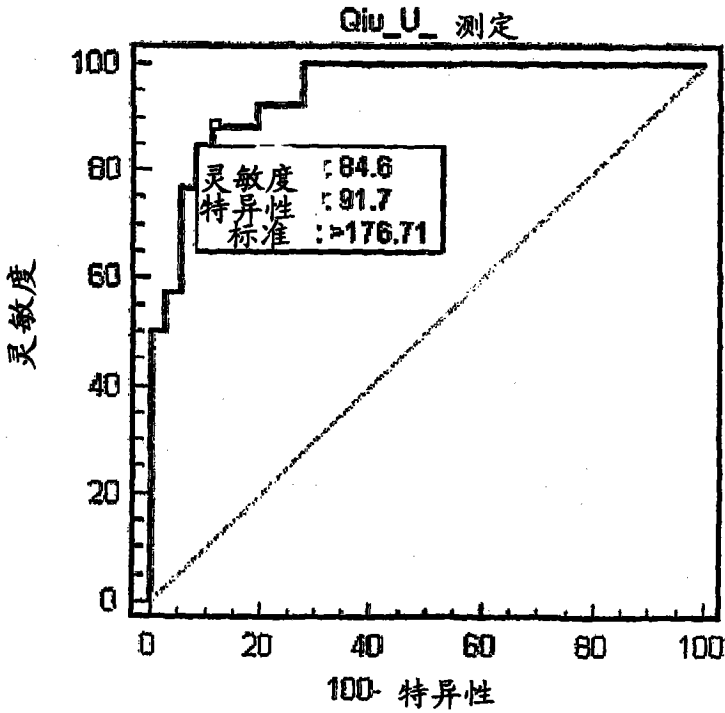


图 7d

	GO_1 U 测定	GO_2 U 测定(second run)	Furuta U 测定	Qiu U 测定
ROC曲线下面积 (AUC)	0.954	0.971	0.949	0.948
标准误差	0.03	0.0238	0.0316	0.032
95% 置信区间	0.868 to 0.990	0.893 to 0.996	0.861 to 0.988	0.859 to 0.988
显著性水平F (面积=0.5)	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

图 7e

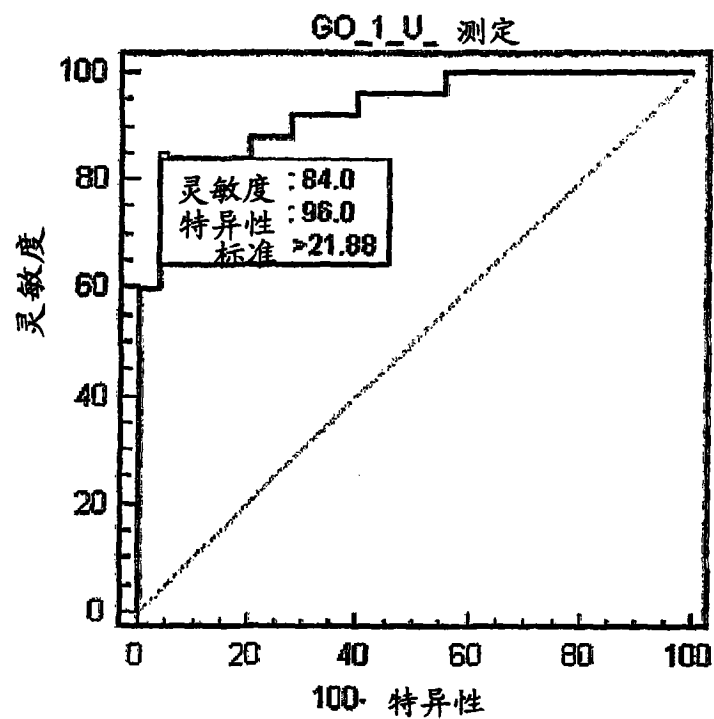


图 8a

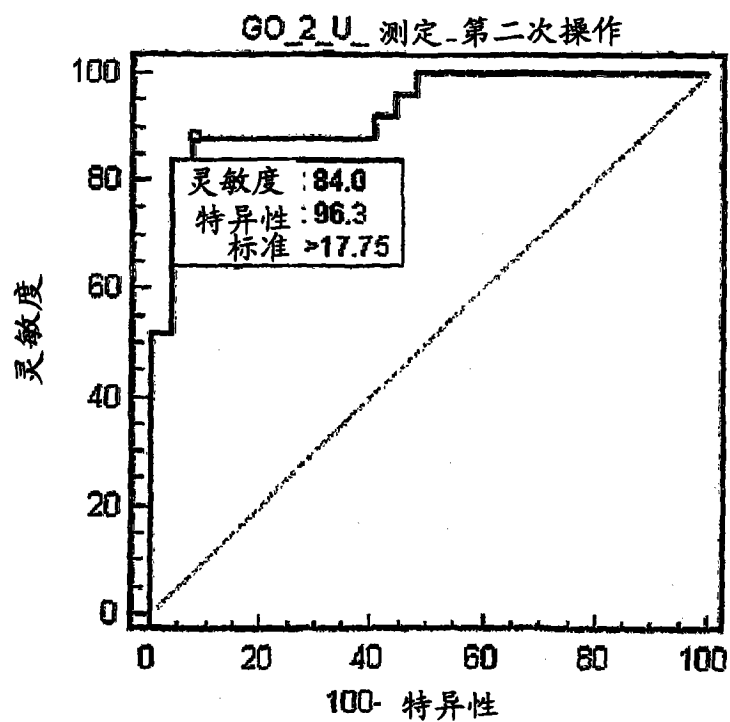


图 8b

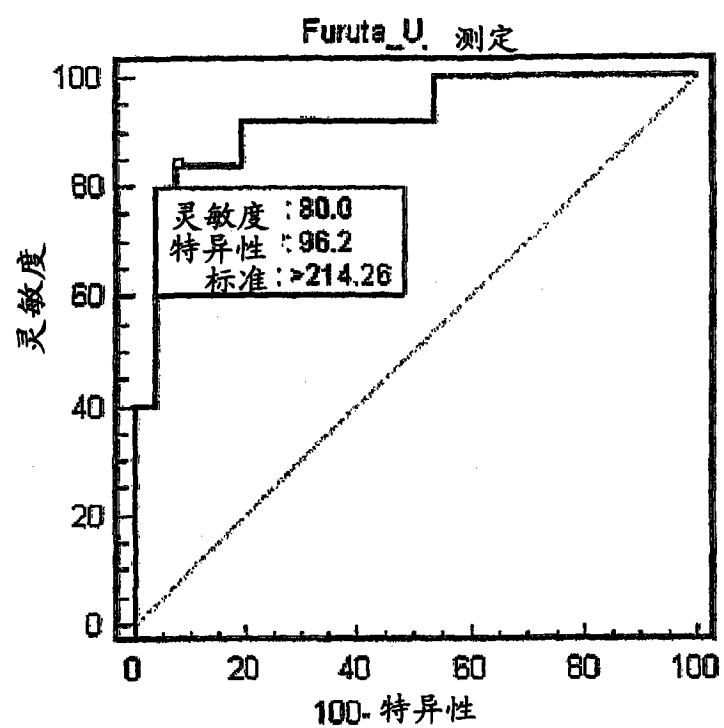


图 8c

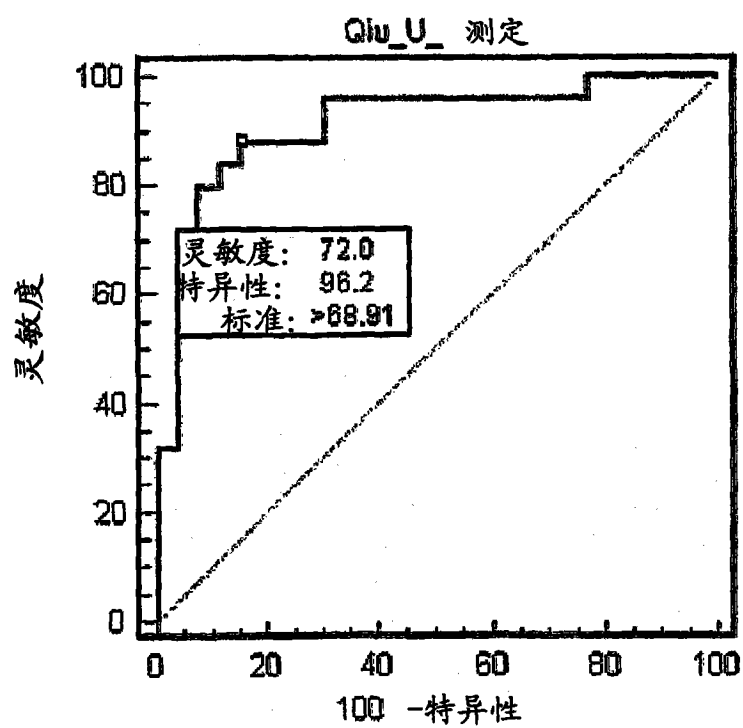


图 8d

	GO_1 U 测定	GO_2 U 测定 (第二次操作)	Furuta U 测定	Qiu U 测定
ROC曲线下面积 (AUC)	0.933	0.932	0.923	0.912
标准误差	0.0376	0.0377	0.0401	0.0428
95% 置信区间	0.825 to 0.984	0.826 to 0.983	0.813 to 0.979	0.799 to 0.973
显著性水平 P (面积)	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

图 8e

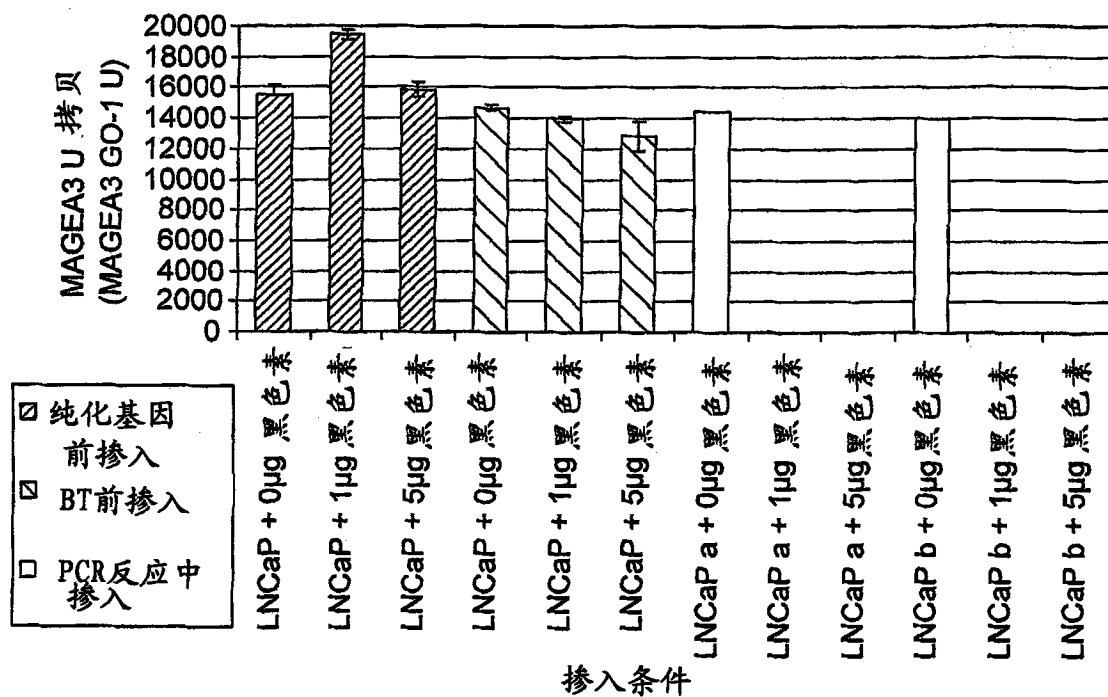


图 9a

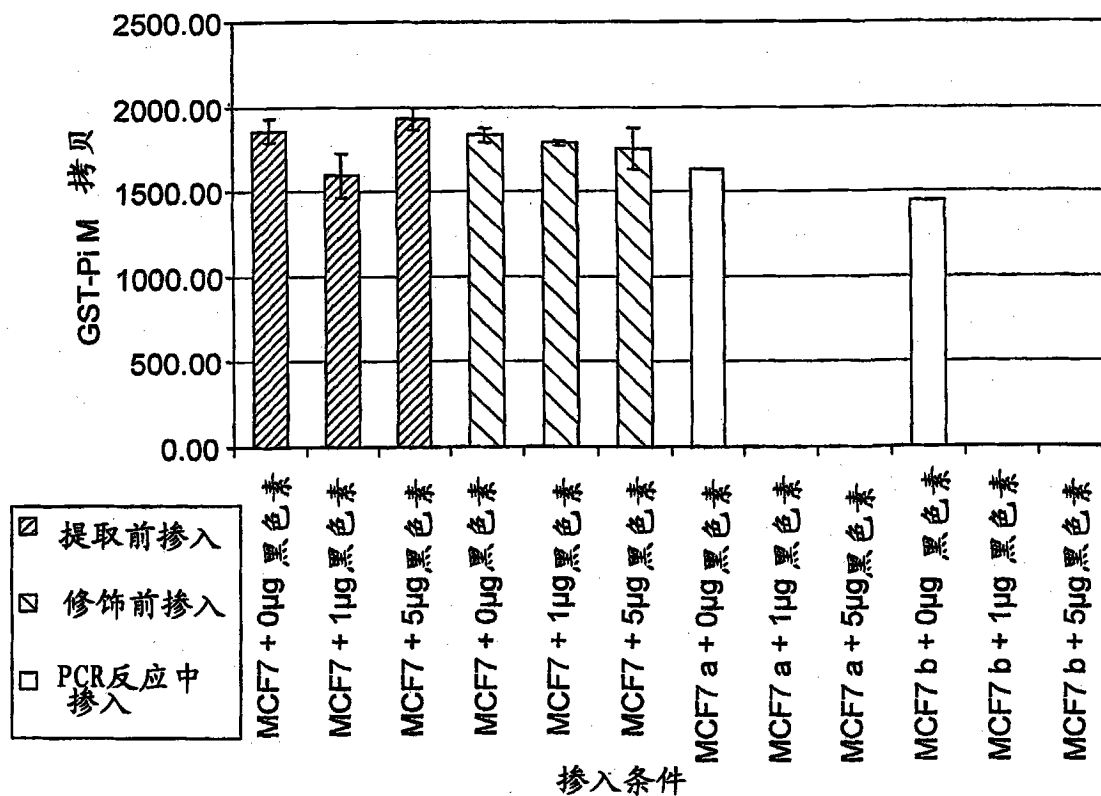


图 9b

蛋白 D-MAGE-A3-His
(SEQ ID NO:40)

MDETLALSL LAAGVLGCS SHSSNMANTQ MKSDKIILAH RGASGYLPEH - 50
 TLESKALAFQ QADYLEQDL AMTKDGRLLV IHDHFLDGLT DVAKKFPHRH -100
 RKDGRYYVID FTLKEIQSLE MTENFETMDL EQRSQHCKPE EGLEARGEAL -150
 GLVGAQAPAT EEQEAAASSS TLVEVTIGEV PAESPDPPO SPQGASSLPT -200
 TMNYPINQSQ YEDSSNQEEE GPSTFPDLES EFQAALSRKV AELVHFLLLK -250
 YRAREPVTKA EMLGSVVGNW QYFFPVIFSK ASSSLQLVEG IELMEVDPIG -300
 HLYIFATCLG LSYDGLLGDN QIMPKAGLLI IVLAIAREG DCAPEEKIWE -350
 ELSVLEVFEG REDSILGDPK KLLTQHFFVQE NYLEYRQVPG SDPACYEFLW -400
 GPRALVETSY VKVLHHMVKI SGGPHISYPP LHEWVLREGE EGHHHHHHH* -450

单下划线=蛋白D的前109个氨基酸

双下划线=蛋白D信号序列 (18 aa)

加框=插入的/替换的序列: 在2-3位Met-Asp(替换的); 在128-129位Met-Asp(插入的) 以及在442-443位Gly-Gly(插入的)

粗体=MAGE3的片段: MAGE3的3-314位氨基酸 (共312 AA)

灰色=7个 his的尾

图 10