(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202290732 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.05.17

(22) Дата подачи заявки
2020.08.28

(51) Int. Cl. ***C12Q 1/6886*** (2018.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)

(54) CAR T КОНСТРУКТ И ПРАЙМЕРЫ ДЛЯ КОМПЛЕКСА СОЗРЕВАНИЯ B-КЛЕТОК

(31) **62/894,663**
(32) **2019.08.30**
(33) **US**
(86) **PCT/IB2020/058070**
(87) **WO 2021/038524 2021.03.04**

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Джордж Ребекка, Шэнь Ди (US)

(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложены наборы зондов и праймеров и соответствующие способы и наборы для получения Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR) антигена созревания В-клеток. В изобретении также предложены наборы зондов и праймеров и соответствующие способы и наборы для выполнения количественных полимеразных цепных реакций для количественного определения интеграции трансгена антигена созревания В-клеток CAR в лекарственный препарат CAR T.

202290732 A1

202290732 A1

CAR T КОНСТРУКТ И ПРАЙМЕРЫ ДЛЯ КОМПЛЕКСА СОЗРЕВАНИЯ В-КЛЕТОК

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СМЕЖНЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает преимущество по предварительной заявке на патент США с серийным номером 62/894,663; поданной 30 августа 2019 г. Полное содержание вышеупомянутой заявки включено в настоящий документ путем ссылки.

ВКЛЮЧЕНИЕ МАТЕРИАЛА ПУТЕМ ССЫЛКИ В ТЕКСТОВЫЙ ФАЙЛ В ФОРМАТЕ ASCII

[0002] Рассматриваемая заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и полностью включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 28 августа 2020 г., называется JBI6148WOPCT1_SL.txt и имеет размер 8175 байт.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] В терапии Т-клетками используют выделенные Т-клетки, которые были генетически модифицированы для усиления их специфичности к специфическому опухолеассоциированному антигену. Генетическая модификация может включать экспрессию химерного антигенного рецептора (CAR) или экзогенного Т-клеточного рецептора для обеспечения новой антигенной специфичности Т-клетки. Т-клетки, экспрессирующие химерные антигенные рецепторы (CAR Т-клетки), могут индуцировать иммунореактивность опухоли. Антиген созревания В-клеток (BCMA) представляет собой молекулу, экспрессируемую на поверхности зрелых В-клеток и злокачественных плазмоцитов, и является молекулой-мишенью при лечении рака, например множественной миеломы. Существует потребность в более эффективных формах терапии рака с использованием CAR Т-клеток, в частности CAR Т-клеток, специфичных к опухолеассоциированному антигену BCMA.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Настоящее изобретение относится к зондам и праймерам для полимеразной цепной реакции (ПЦР), например количественной ПЦР. Настоящее изобретение также относится к наборам и способам применения зондов и праймеров, описанных в настоящем документе, для количественного определения интеграции трансгена в Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR).

[0005] В первом аспекте в изобретении предложены наборы зондов и праймеров, содержащие зонд, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, и по меньшей мере одну метку, связанную с зондом; первый праймер, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11; и второй праймер, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12 (см. пример 1, таблица 1).

[0006] В другом аспекте в изобретении предложены наборы зондов и праймеров, содержащие зонд, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, и по меньшей мере одну метку, связанную с зондом; первый праймер, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2; и второй праймер, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3 (см. пример 1, таблица 1).

[0007] В другом аспекте в изобретении предложены наборы зондов и праймеров, содержащие зонд, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 и их комбинаций, и по меньшей мере одну метку, связанную с зондом; первый праймер, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20 и их комбинаций; и второй праймер, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21 и их комбинаций (см. таблицу 1).

[0008] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна метка содержит радиоактивный изотоп, субстрат фермента, хемилюминесцентный агент, флуорофор, тушитель флуоресценции, фермент, химическое соединение или их комбинацию.

[0009] В другом аспекте в изобретении предложены наборы для количественного определения интеграции трансгена в CAR T-клетку, содержащие зонд, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, и по меньшей мере одну метку, связанную с зондом; первый праймер, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11; и второй праймер, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12.

[0010] В другом аспекте в изобретении предложены наборы для количественного определения интеграции трансгена в CAR T-клетку, содержащие зонд, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, и по меньшей мере одну метку, связанную с зондом; первый праймер, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2; и второй праймер, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

[0011] В дополнительном аспекте в изобретении предложены наборы для количественного определения интеграции трансгена в CAR T-клетку, содержащие зонд, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 и их комбинаций, и по меньшей мере одну метку, связанную с зондом; первый праймер, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20 и их комбинаций; и второй праймер, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21 и их комбинаций.

[0012] В некоторых вариантах осуществления наборов изобретения по меньшей мере одна метка, связанная с зондом, содержит радиоактивный изотоп, субстрат фермента, хемилюминесцентный агент, флуорофор, тушитель флуоресценции, фермент, химическое соединение или их комбинацию.

[0013] В одном варианте осуществления наборы изобретения содержат матрицу, которая содержит зонд. В некоторых вариантах осуществления изобретения матрица представляет собой многолуночный планшет.

[0014] В одном варианте осуществления наборы дополнительно содержат зонд человеческого альбумина (hALB), содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22 (см. пример 2, таблица 2, зонд из hALB набор 1), и по меньшей мере одну метку, связанную с зондом hALB, первый праймер hALB, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23 (таблица 2, прямой праймер из hALB набор 1), а также второй праймер hALB, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24 (таблица 2, обратный праймер из hALB набор 1). В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна метка, связанная с зондом hALB, содержит радиоактивный изотоп, субстрат фермента, хемилюминесцентный агент, флуорофор, тушитель флуоресценции, фермент, химическое соединение или их комбинацию.

[0015] В другом варианте осуществления наборы дополнительно содержат зонд человеческого альбумина (hALB), содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 28 и их комбинаций, и по меньшей мере одну метку, связанную с зондом hALB, первый праймер hALB, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29 и их комбинаций, и второй праймер, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 30 и их комбинаций (таблица 2). В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна метка, связанная с зондом hALB, содержит радиоактивный изотоп, субстрат фермента, хемилюминесцентный агент, флуорофор, тушитель флуоресценции, фермент, химическое соединение или их комбинацию.

[0016] В другом аспекте в настоящем изобретении предложены способы количественного определения интеграции трансгена в CAR T-клетку, включающие: амплификацию нуклеиновых кислот из CAR T-клетки с первым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, и вторым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты CAR;

амплификацию нуклеиновых кислот из CAR T-клетки с первым праймером hALB, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23, и вторым праймером

hALB, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты hALB;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами hALB и зондом hALB, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22, посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом hALB; и

количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом.

[0017] В другом аспекте в настоящем изобретении предложены способы количественного определения интеграции трансгена в CAR T-клетку, включающие: амплификацию нуклеиновых кислот из CAR T-клетки с первым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2, и вторым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты CAR;

амплификацию нуклеиновых кислот из CAR T-клетки с первым праймером hALB, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23, и вторым праймером hALB, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты hALB;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами hALB и зондом hALB, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22, посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом hALB; и

количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом.

[0018] В другом аспекте в настоящем изобретении предложены способы количественного определения интеграции трансгена в Т-клетку с химерным антигенным рецептором (CAR), включающие:

приведение нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки в контакт с первым праймером CAR, вторым праймером CAR, первым праймером hALB и вторым праймером hALB, причем первый праймер CAR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, второй праймер CAR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, первый праймер hALB содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23, второй праймер hALB содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24;

амплификацию нуклеиновых кислот CAR с первым праймером CAR и вторым праймером CAR, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты CAR;

амплификацию нуклеиновых кислот hALB с первым праймером hALB и вторым праймером hALB, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты hALB;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами hALB и зондом hALB посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом hALB; и

количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом.

[0019] В другом аспекте в настоящем изобретении предложены способы количественного определения интеграции трансгена в Т-клетку с химерным антигенным рецептором (CAR), включающие:

приведение нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки в контакт с первым праймером CAR, вторым праймером CAR, первым праймером hALB и вторым праймером hALB, причем первый праймер CAR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2, второй праймер CAR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3, первый праймер hALB содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23, второй праймер hALB содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24;

амплификацию нуклеиновых кислот CAR с первым праймером CAR и вторым праймером CAR, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты CAR;

амплификацию нуклеиновых кислот hALB с первым праймером hALB и вторым праймером hALB, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты hALB;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами hALB и зондом hALB посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом hALB; и

количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом.

[0020] В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предложены способы количественного определения интеграции трансгена в CAR Т-клетку, включающие: приведение нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки в контакт с первым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20 и их комбинаций, и приведение нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки в контакт со вторым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21 и их комбинаций;

приведение нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки в контакт с первым праймером hALB, содержащим нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29 и их комбинаций, и приведение нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки в контакт со вторым праймером hALB, содержащим нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 30 и их комбинаций;

приведение нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки в контакт с зондом CAR, причем зонд CAR содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 и их комбинаций;

приведение нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки в контакт с зондом hALB, при этом зонд hALB содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 28 и их комбинаций;

амплификацию нуклеиновых кислот CAR с первым праймером CAR и вторым праймером CAR, таким образом получая молекулы амплифицированных нуклеиновых кислот CAR;

амплификацию нуклеиновых кислот hALB с первым праймером hALB и вторым праймером hALB, таким образом получая молекулы амплифицированных нуклеиновых кислот hALB;

обнаружение гибридизации между молекулами амплифицированных нуклеиновых кислот CAR и зондом CAR посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;

обнаружение гибридизации между молекулами амплифицированных нуклеиновых кислот hALB и зондом hALB посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом hALB; и

количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом.

[0021] В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предложены способы получения CAR Т-клетки, включающие:

интродукцию трансгена CAR в Т-клетку для получения Т-клетки с интегрированным трансгеном; определение интеграции трансгена CAR, включающее:

амплификацию нуклеиновых кислот из Т-клетки в контакт с интегрированным трансгеном с первым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20 и их комбинаций, и вторым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21 и их комбинаций, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты CAR;

амплификацию нуклеиновых кислот из Т-клетки с интегрированным трансгеном с первым праймером референсного гена и вторым праймером референсного гена, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты референсного гена;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR, содержащим нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 и их комбинаций, посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами референсного гена и зондом референсного гена посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом референсного гена;

и

количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом;

и

получение CAR Т-клетки, содержащей по меньшей мере одну копию интегрированного трансгена CAR.

[0022] В еще одном дополнительном аспекте в настоящем изобретении предложены способы получения CAR Т-клетки, включающие:

интродукцию трансгена CAR в Т-клетку для получения Т-клетки с интегрированным трансгеном; определение интеграции трансгена CAR, включающее:

приведение нуклеиновых кислот из Т-клетки в контакт с интегрированным трансгеном с первым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11,

SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20 и их комбинаций, и приведение нуклеиновых кислот из Т-клетки в контакт с интегрированным трансгеном со вторым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21 и их комбинаций; приведение нуклеиновых кислот из клетки в контакт с интегрированным трансгеном с первым праймером hALB, содержащим нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29 и их комбинаций,

и приведение нуклеиновых кислот из Т-клетки в контакт с интегрированным трансгеном со вторым праймером hALB, содержащим нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 30 и их комбинаций;

приведение нуклеиновых кислот из Т-клетки в контакт с интегрированным трансгеном с зондом CAR, причем зонд CAR содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 и их комбинаций;

приведение нуклеиновых кислот из Т-клетки в контакт с интегрированным трансгеном с зондом hALB, при этом зонд hALB содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 28 и их комбинаций;

амплификацию нуклеиновых кислот CAR с первым праймером CAR и вторым праймером CAR, таким образом получая молекулы амплифицированных нуклеиновых кислот CAR;

амплификацию нуклеиновых кислот hALB с первым праймером hALB и вторым праймером hALB, таким образом получая молекулы амплифицированных нуклеиновых кислот hALB;

обнаружение гибридизации между молекулами амплифицированных нуклеиновых кислот CAR и зондом CAR посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;

обнаружение гибридизации между молекулами амплифицированных нуклеиновых кислот hALB и зондом hALB посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом hALB;

количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом;

и

получение CAR Т-клетки, содержащей по меньшей мере одну копию интегрированного трансгена CAR.

[0023] В аспектах настоящего изобретения также предложены CAR Т-клетки, полученные с использованием способов, описанных в настоящем документе.

[0024] В некоторых вариантах осуществления стадия обнаружения гибридизации между молекулами амплифицированных нуклеиновых кислот CAR и зондом CAR включает обнаружение изменения целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR, во время или после гибридизации относительно целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR, до гибридизации.

[0025] В некоторых вариантах осуществления стадия обнаружения гибридизации между молекулами амплифицированных нуклеиновых кислот hALB и зондом hALB включает обнаружение изменения целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом hALB, во время или после гибридизации относительно целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом hALB, до гибридизации.

[0026] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из стадий амплификации включает полимеразную цепную реакцию (ПЦР), например ПЦР в реальном времени, полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой в реальном времени (ОТ-ПЦР в реальном времени), лигазную цепную реакцию или транскрипционно опосредованную амплификацию (ТМА).

[0027] В некоторых вариантах осуществления амплифицируемые нуклеиновые кислоты представляют собой ампликоны.

[0028] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна метка, связанная с зондом CAR, содержит флуорофор. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна метка, связанная с зондом hALB, содержит флуорофор.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0029] Патент или файл заявки содержит по меньшей мере один цветной графический материал. Копии данного патента или публикации заявки на патент с цветными графическими материалами можно получить после подачи соответствующей заявки и внесения оплаты.

[0030] На ФИГ. 1 представлено гель-электрофоретическое изображение по результатам одноплексных скрининговых анализов праймеров/зонда.

[0031] На ФИГ. 2 представлено гель-электрофоретическое изображение по результатам мультиплексных скрининговых анализов праймеров/зонда.

[0032] На ФИГ. 3 представлено гель-электрофоретическое изображение трансгена (FP) набора 1 и (RP) набора 2, мультиплексированного с hALB набора 1.

[0033] На ФИГ. 4A–D представлены кривые амплификации для трансгена (FP) набора 1 и (RP) набора 2 и стандартные кривые для hALB набора 1.

[0034] На ФИГ. 5A–B представлены стандартные кривые сравнения интактного с замороженным (целевой трансген).

[0033] На ФИГ. 6 представлены стандартные кривые сравнения кольцевого с линейным (целевой трансген).

[0034] На ФИГ. 7 представлено сравнение характеризующей и типичной стандартной кривых для кПЦР трансгена.

[0035] На ФИГ. 8 представлен характеризующий стандартный линейный график для трансгена.

[0036] На ФИГ. 9 представлен пример расположения областей в планшете количественной ПЦР (кПЦР).

[0037] На ФИГ. 10 представлен пример расположения областей в планшете для оценки контроля кПЦР.

[0038] На ФИГ. 11 представлен пример линейного графика для трансгена.

[0039] На ФИГ. 12 представлен пример линейного графика для hALB.

[0040] На ФИГ. 13 представлена нуклеотидная последовательность гена человеческого сывороточного альбумина (hALB), номер доступа в GenBank M12523.1.

[0041] На ФИГ. 14 представлена SEQ ID NO: 11.

[0042] Вышеизложенное будет очевидно из представленного ниже более подробного описания примеров осуществления, как проиллюстрировано на сопроводительных рисунках, на которых одинаковые номера позиций относятся к одним и тем же частям

на разных проекциях. Графические материалы не обязательно выполнены в масштабе; вместо этого акцент сделан на иллюстрации принципов изобретения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0043] Ниже приведено описание примеров осуществления.

[0044] Ниже описаны несколько аспектов изобретения со ссылкой на примеры только в иллюстративных целях. Следует понимать, что многочисленные конкретные детали, взаимосвязи и способы изложены, чтобы обеспечить полное понимание изобретения. Однако обычному специалисту в соответствующей области техники будет понятно, что изобретение можно реализовать на практике без одной или более конкретных деталей или применять на практике другие способы, протоколы, реагенты, линии клеток и животных. Настоящее изобретение не ограничено показанным порядком действий или событий, так как некоторые действия могут происходить в другом порядке и/или одновременно с другими действиями или событиями. Более того, не все проиллюстрированные действия, стадии или события необходимы для реализации методологии в соответствии с настоящим изобретением. Многие из методик и процедур, описанных или упоминаемых в данном документе, хорошо понятны и широко применяются с использованием традиционной методологии специалистами в данной области техники.

[0045] Если не указано иное, все термины в данной области техники, обозначения и другие научные термины или терминология, используемые в данном документе, имеют значения, обычно понятные специалистам в области техники, к которой относится данное изобретение. В некоторых случаях термины с общепринятыми значениями определены в данном документе для ясности и/или для удобства ссылки, и включение таких определений в данный документ не обязательно должно толковаться как представляющее существенное отличие от того, что обычно учитывается в данной области техники. Кроме того, следует понимать, что термины, такие как термины, определенные в широко используемых словарях, следует интерпретировать как имеющие значение, соответствующее их значению в контексте соответствующей области техники и/или как определено в данном документе иным образом.

[0046] Применяемые в настоящем документе термины используются только в целях описания конкретных вариантов осуществления изобретения и не являются

ограничивающими. При использовании в данном документе формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

[0047] Термин «содержать» или его вариации, такие как «содержит» или «содержащий», при их использовании могут применяться для обозначения включения указанного элемента или целого или группы элементов или целых, но не исключения любого другого элемента или целого или группы элементов или целых.

[0048] Настоящее изобретение относится к наборам и способам количественного определения интеграции трансгена в Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR). Кроме того, предложены панели зондов и праймеров для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР), например количественной ПЦР, для количественного определения интеграции трансгена в CAR Т-клетки.

[0049] В некоторых вариантах осуществления способы и наборы трансгенной кПЦР, описанные в настоящем изобретении, включают анализ с помощью мультиплексной количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР), предназначенный для количественного определения трансгенной плазмиды BCMA CAR, интегрированной в лекарственный препарат CAR T. В обоих случаях (1) трансгенная плазмида BCMA CAR (трансген) и (2) а референсный ген человеческого альбумина (hALB) амплифицируются в данном методе количественной ПЦР. Набор праймеров и зондов для трансгенных мишеней может амплифицировать сшивку между участками CD137 и CD3z плазмиды, чтобы обеспечить обнаружение исключительно трансгенной плазмиды BCMA CAR, присутствующей в лекарственном препарате CAR T и интегрированной в него.

[0050] Химерные антигенные рецепторы

[0051] Химерный антигенный рецептор (CAR) представляет собой искусственно сконструированный гибридный белок или полипептид, содержащий антигенсвязывающие домены антитела (scFv), связанные с сигнальными доменами Т-клеток. В настоящем документе термины «Т клетки», «Т-клетки» и «Т лимфоциты» используются взаимозаменяемо. Характеристики CAR могут включать в себя их способность перенаправлять Т-клеточную специфичность и реактивность к выбранной мишени не рестриктированным по ГКГС образом с использованием

антигенсвязывающих свойств моноклональных антител. Не рестриктированное по ГКГС распознавание антигена дает Т-клеткам, экспрессирующим CAR, способность распознавать антигены независимо от процессинга антигена, таким образом обходя основной механизм ускользания опухоли от иммунного ответа. Более того, при экспрессии в Т-клетках CAR преимущественно не димеризуются с эндогенными альфа- и бета-цепями Т-клеточного рецептора (TCR).

[0052] CAR, описанные в настоящем документе, обеспечивают рекомбинантные полипептидные конструкции, содержащие по меньшей мере внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен (также называемый в данном документе «цитоплазматическим сигнальным доменом»), содержащие функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы, как определено ниже. Т-клетки, экспрессирующие CAR, называются в настоящем документе CAR Т-клетками, CAR-Т-клетками или CAR-модифицированными Т-клетками, и эти термины используются взаимозаменяемо в настоящем документе. Клетка может быть генетически модифицирована таким образом, чтобы стабильно экспрессировать на своей поверхности связывающий домен антитела, придавая новую антигенную специфичность, которая не зависит от ГКГС.

[0053] В некоторых случаях Т-клетку генетически модифицируют для стабильной экспрессии CAR, который объединяет домен распознавания антигена специфического антитела с внутриклеточным доменом дзета-цепи CD3 или белка FcγRI в один химерный белок. В одном варианте осуществления стимулирующая молекула представляет собой дзета-цепь, ассоциированную с Т-клеточным рецепторным комплексом.

[0054] Используемый в настоящем документе термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к внутриклеточному участку молекулы. Именно функциональный участок белка действует путем передачи информации внутри клетки для регуляции клеточной активности через определенные сигнальные пути, генерируя вторичные мессенджеры или действуя как эффекторы, отвечая на такие мессенджеры. Внутриклеточный сигнальный домен генерирует сигнал, который вызывает иммунную эффекторную функцию клетки, содержащей CAR, например CAR Т-клетки. К примерам иммунной эффекторной функции, например, в CAR Т-клетке, относится цитолитическая активность и хелперная активность, включая секрецию цитокинов.

[0055] В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать первичный внутриклеточный сигнальный домен. К примерам первичных внутриклеточных сигнальных доменов относятся домены, полученные от молекул, которые отвечают за первичную стимуляцию или стимуляцию, зависящую от антигена. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать костимулирующий внутриклеточный домен. К примерам костимулирующих внутриклеточных сигнальных доменов относятся домены, полученные из молекул, которые отвечают за костимулирующие сигналы или антиген-зависимую стимуляцию. Например, в случае CAR T первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность Т-клеточного рецептора, а костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность корецептора или костимулирующей молекулы.

[0056] Первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать сигнальный мотив, который известен как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. К примерам последовательностей первичной цитоплазматической сигнализации, содержащих ITAM, относятся, без ограничений, производные CD3-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d DAP10 и DAP12. В конкретном варианте осуществления сигнальная последовательность представляет собой CD3-дзета.

[0057] Термин «дзета» или альтернативно «дзета-цепь», «CD3-дзета » или «TCR-дзета» определяется как белок, представленный по номеру доступа в GenBank BAG36664.1, или эквивалентные остатки, полученные от видов, отличных от человека, например мыши, кролика, примата, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п., и «стимулирующий домен дзета», или альтернативно «стимулирующий домен CD3-дзета», или «стимулирующий домен TCR-дзета» определяется как аминокислотные остатки из цитоплазматического домена дзета-цепи, которые достаточны для функциональной передачи исходного сигнала, необходимого для активации Т-клетки. В одном аспекте цитоплазматический домен дзета содержит остатки от 52 до 164 согласно номеру доступа в GenBank BAG36664.1 или эквивалентные остатки, полученные от видов, отличных от человека, например мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п., которые представляют собой их функциональные ортологи.

[0058] Термин «костимулирующая молекула» относится к когнатному партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, опосредуя, таким образом, костимулирующий ответ Т-клетки, такой как, помимо прочего, пролиферация. Костимулирующие молекулы являются молекулами клеточной поверхности, отличными от рецепторов антигенов или их лигандов, которые необходимы для эффективного иммунного ответа. Костимулирующие молекулы включают, без ограничений, молекулу ГКГС класса 1, BTLA и Toll-подобный рецептор лигандов, а также OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) и 4-1BB (также упоминаемый как «CD137» в настоящем документе). В конкретном варианте осуществления костимулирующей молекулой является 4-1BB (CD137).

[0059] Костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может представлять собой внутриклеточный участок костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула может быть представлена в следующих семействах белков: белки рецептора ФНО, иммуноглобулиноподобные белки, рецепторы цитокинов, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM) и активирующие рецепторы NK-клеток. К примерам подобных молекул относятся CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, лиганд, который специфически связывается с CD83 и т. п.

[0060] Внутриклеточный сигнальный домен может содержать весь (то есть «полноразмерный») внутриклеточный участок или весь нативный внутриклеточный сигнальный домен молекулы, из которой он был получен, или его функциональный фрагмент.

[0061] Термин «4-1BB» относится к члену суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (РФНО) с аминокислотной последовательностью, представленной по номеру доступа в GenBank AAA62478.2, или эквивалентными остатками, полученными от видов, отличных от человека, например млекопитающего (мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п.); а «костимулирующий домен 4-1BB» определяется как аминокислотные остатки 214–255 с номером доступа в GenBank: AAA62478.2 или эквивалентные остатки видов, отличных от человека, например млекопитающего (мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п.).

[0062] В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический сигнальный домен дополнительно содержит один или более функциональных сигнальных доменов, полученных из по меньшей мере одной костимулирующей молекулы, как определено в настоящем документе. В одном варианте осуществления костимулирующая молекула выбрана из 4-1BB (то есть CD137), CD27, CD3-дзета и/или CD28. CD28 является Т-клеточным маркером, важным для Т-клеточной костимуляции. CD27 является членом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли и выступает в качестве костимулирующей молекулы иммунной контрольной точки. 4-1BB передает мощный костимулирующий сигнал на Т-клетки, стимулируя дифференцировку и повышая долгосрочную выживаемость Т-лимфоцитов. CD3-дзета связывается с TCR для генерации сигнала и содержит иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM).

[0063] В одном варианте осуществления CAR содержит внутриклеточный шарнирный домен, включающий CD8, и внутриклеточный сигнальный домен рецептора Т-клеток, содержащий CD28, 4-1BB и CD3-дзета и их комбинации.

[0064] В конкретном варианте осуществления CAR содержит трансмембранный CD8a, CD137 и кодирующие участки CD3z.

[0065] В описании дополнительно предложены праймеры, зонды и соответствующие наборы, используемые для количественного определения вариантов плазмид, интегрированных в продукты CAR T, например функциональных вариантов CAR, нуклеиновых кислот, полипептидов и белков, описанных в настоящем документе. Используемый в настоящем документе термин «вариант» относится к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или более модификаций, например замен, вставок или делеций. Используемый в настоящем документе термин «функциональный вариант» относится к CAR, полипептиду или белку, имеющему существенную или значительную идентичность последовательности или сходство с родительским CAR, полипептидом или белком, причем функциональный вариант сохраняет биологическую активность CAR, полипептида или белка, для которого он является вариантом. Функциональные варианты включают, например, те варианты CAR, полипептида или белка, которые описаны в настоящем документе (родительский CAR, полипептид или белок), которые сохраняют способность распознавать клетки-мишени в аналогичной степени, в той же

степени или в большей степени, что и родительский CAR, полипептид или белок. По отношению к родительскому CAR, полипептиду или белку функциональный вариант может быть, например, на по меньшей мере около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или более идентичен по аминокислотной последовательности родительского CAR, полипептиду или белку.

[0066] Функциональный вариант может, например, содержать аминокислотную последовательность родительского CAR, полипептида или белка с по меньшей мере одной консервативной аминокислотной заменой. В другом варианте осуществления функциональные варианты могут содержать аминокислотную последовательность родительского CAR, полипептида или белка с по меньшей мере одной неконсервативной аминокислотной заменой. В данном случае неконсервативная аминокислотная замена может не препятствовать или не ингибировать биологическую активность функционального варианта. Неконсервативная аминокислотная замена может усиливать биологическую активность функционального варианта таким образом, что биологическая активность функционального варианта увеличивается по сравнению с родительским CAR, полипептидом или белком.

[0067] Аминокислотные замены в CAR могут быть консервативными аминокислотными заменами. Консервативные аминокислотные замены известны в данной области техники и включают аминокислотные замены, при которых одну аминокислоту, имеющую определенные физические и/или химические свойства, заменяют на другую аминокислоту, обладающую такими же или аналогичными химическими или физическими свойствами. Например, консервативная аминокислотная замена может быть кислой аминокислотой, замещенной другой кислой аминокислотой (например, Asp или Glu), аминокислотой с неполярной боковой цепью, замещенной другой аминокислотой с неполярной боковой цепью (например, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val и т. д.), основной аминокислотой, замещенной другой основной аминокислотой (Lys, Arg и т. д.), аминокислотой с полярной боковой цепью, замещенной другой аминокислотой с полярной боковой цепью (Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr и т. д.), и т. д.

[0068] CAR, полипептид или белок могут состоять по существу из указанной аминокислотной последовательности или последовательностей, описанных в настоящем документе, так что другие компоненты, например другие аминокислоты, существенно не изменяют биологическую активность CAR, полипептида или белка.

[0069] Примеры модифицированных нуклеотидов, которые могут быть использованы для получения рекомбинантных нуклеиновых кислот, используемых для получения полипептидов, применяемых в способах/наборах, описанных в настоящем документе, включают, без ограничений, 5-фторурацил, 5-бромурацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил) урацил, карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, N^6-замещенный аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеуозин, 5′′-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N^6-изопентениладенин, урацил-5-оксиуксусную кислоту (v), вибутоксизин, псевдоурацил, квеуозин, бета-D-галактозилквеозин, инозин, N^6-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метинозин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксипропил) урацил и 2,6-диаминопурин.

[0070] Нуклеиновая кислота изобретения может содержать любую выделенную или очищенную нуклеотидную последовательность, которая кодирует любой из CAR, полипептидов, или белков, или их функциональных участков, или их функциональных вариантов. Альтернативно нуклеотидная последовательность может содержать последовательность, вырожденную в любую из последовательностей или комбинацию вырожденных последовательностей.

[0071] В некоторых вариантах осуществления изобретения также используется выделенная или очищенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, которая комплементарна нуклеотидной последовательности любой из нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе, или нуклеотидную последовательность, которая гибридизируется в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью любой из нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе.

[0072] Нуклеотидная последовательность, которая гибридизируется в жестких условиях, может гибридизироваться в высокожестких условиях.

[0073] Описанные в настоящем документе «высокожесткие условия» означают, что нуклеотидная последовательность специфически гибридизируется с целевой последовательностью (нуклеотидной последовательностью любой из нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе) в степени, обнаружимой сильнее, чем неспецифическая гибридизация. Высокожесткие условия включают условия, которые позволяют различить полинуклеотид с точно комплементарной последовательностью или полинуклеотид, содержащий только несколько разбросанных несовпадений из случайной последовательности, которая имеет несколько небольших участков (например, 3–12 оснований), которые соответствуют нуклеотидной последовательности. Такие небольшие участки комплементарности легче расплавляются, чем полноразмерный комплемент из 14–17 или более оснований, и гибридизация с высокой жесткостью делает их легко различимыми. Относительно высокожесткие условия будут включать, например, условия с низким содержанием соли и/или высокой температурой, такие как обеспечиваемые около 0,02–0,1 M NaCl или его эквивалентом, при температурах примерно 50–70 °C. Такие высокожесткие условия допускают небольшое несоответствие между нуклеотидной последовательностью и матрицей или целевой цепью, если таковое имеется, или особенно подходят для гибридизации с нуклеиновыми кислотами CAR, описанными в настоящем документе. Как правило, считается, что условия можно сделать более жесткими путем добавления возрастающих количеств формамида.

[0074] Используемый в настоящем документе термин «рекомбинантный вектор экспрессии» означает генетически модифицированный олигонуклеотидный или полинуклеотидный конструкт, который обеспечивает экспрессию мРНК, белка, полипептида или пептида клеткой-хозяином, когда конструкт содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую мРНК, белок, полипептид или пептид, а вектор приводят в контакт с клеткой в условиях, достаточных для экспрессии мРНК, белка, полипептида или пептида внутри клетки. Описанные в настоящем документе векторы не встречаются в природе в целом; однако части векторов могут быть природного происхождения. Описанные рекомбинантные векторы экспрессии могут содержать нуклеотиды любого типа, включая, без ограничений, ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, синтезированными или частично

полученными из природных источников и которые могут содержать природные, неприродные или измененные нуклеотиды. Рекомбинантные векторы экспрессии могут содержать межнуклеотидные связи природного происхождения или неприродного происхождения или оба типа связей. Неприродные или измененные нуклеотиды или межнуклеотидные связи не препятствуют транскрипции или репликации вектора.

[0075] В варианте осуществления рекомбинантный вектор экспрессии может быть любым приемлемым рекомбинантным вектором экспрессии и может быть использован для трансформации или трансфекции любого приемлемого хозяина. Приемлемые векторы включают векторы, предназначенные для размножения и экспансии или для экспрессии или и того и другого, такие как плазмиды и вирусы. Вектор может быть выбран из группы, состоящей из серии pUC (Fermentas Life Sciences, Глен Берни, штат Мэриленд, США), серии pBluescript (Stratagene, г. Ла-Холья, штат Калифорния, США), серии pET (Novagen, г. Мэдисон, штат Висконсин, США), серии pGEX (Pharmacia Biotech, г. Уппсала, Швеция) и серии pEX (Clontech, г. Пало-Альто, штат Калифорния, США). Можно использовать векторы бактериофагов, такие как λGT10, λGT11, λEMBL4 и λNM1149, λZapII (Stratagene). Примеры векторов экспрессии растений включают pBI01, pBI01.2, pBI121, pBI101.3 и pBIN19 (Clontech). Примеры векторов экспрессии животных включают pEUK-Cl, pMAM и pMAMneo (Clontech). Рекомбинантный вектор экспрессии может быть вирусным вектором, например ретровирусным вектором, например гамма-ретровирусным вектором.

[0076] В одном варианте осуществления рекомбинантные векторы экспрессии получали с использованием стандартных методик рекомбинантной ДНК, описанных, например, в Ausubel FM, Brent R, Kingston RE et al. (eds) (1999) Short Protocols in Molecular Biology, 4th edn. New York: Wiley Green MR и Sambrook J. (2012) Molecular cloning: a laboratory manual, 4th edn. Cold Spring Harbor, New York. Могут быть получены конструкты векторов экспрессии, которые являются кольцевыми или линейными, чтобы они содержали систему репликации, функционирующую в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Системы репликации могут быть получены, например, из ColEl, SV40, 2 мкм плазмиды, λ, бычьего вируса папилломы и т. п.

[0077] В определенных вариантах осуществления векторы экспрессии, используемые в настоящем описании, линеаризуют для приготовления рабочих исходных растворов плазмиды для получения стандартов и контрольных образцов.

[0078] Рекомбинантный вектор экспрессии может содержать регуляторные последовательности, такие как инициирующие и терминирующие кодоны транскрипции и трансляции, которые специфичны для типа хозяина (например, бактерии, гриба, растения или животного), в который должен быть введен вектор, при необходимости, при этом учитывается, основан ли вектор на ДНК или РНК.

[0079] Рекомбинантный вектор экспрессии может включать один или более маркерных генов, которые позволяют отбирать трансформированные или трансфицированные организмы-хозяева. Маркерные гены включают гены резистентности к биоцидам, например гены резистентности к антибиотикам, тяжелым металлам и т. д., комплементации в ауксотрофном хозяине для обеспечения прототрофности и т. п. Приемлемые маркерные гены для описанных векторов экспрессии включают, например, гены резистентности к неомицину/G418, гены резистентности к гистидинолу X, гены резистентности к гистидинолу, гены резистентности к тетрациклину и гены резистентности к ампициллину.

[0080] Рекомбинантный вектор экспрессии может содержать нативный или нормальный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей CAR, полипептид или белок (включая их функциональные участки и их функциональные варианты), или с нуклеотидной последовательностью, которая комплементарна или которая гибридизируется с нуклеотидной последовательностью, кодирующей CAR, полипептид или белок. Выбор промоторов, например сильных, слабых, тканеспецифичных, индуцируемых и специфичных для развития промоторов находится в рамках квалификации обычного специалиста в данной области техники. Аналогичным образом комбинирование нуклеотидной последовательности с промотором также находится в рамках квалификации специалиста в данной области техники. Промотор может представлять собой невирусный промотор или вирусный промотор, например промотор цитомегаловируса (CMV), промотор RSV, промотор SV40 или промотор, присутствующий в длинном концевом повторе вируса мышиных стволовых клеток.

[0081] Рекомбинантные векторы экспрессии могут быть разработаны либо для транзиентной экспрессии, либо для стабильной экспрессии, либо для обоих типов. Кроме того, рекомбинантные векторы экспрессии могут быть получены для конститутивной экспрессии или для индуцируемой экспрессии.

[0082] Дополнительно могут быть созданы рекомбинантные векторы экспрессии, включающие суицидальный ген. Используемый в данном документе термин «суицидальный ген» относится к гену, который заставляет клетку, экспрессирующую суицидальный ген, погибать. Суицидальный ген может быть геном, который придает чувствительность к агенту, например лекарственному средству, клетке, в которой экспрессируется ген, и заставляет клетку погибать, когда клетку приводят в контакт с агентом или она подвергается его воздействию. Суицидальные гены известны в данной области техники и включают, например, ген тимидинкиназы (TK) вируса простого герпеса (HSV), цитозин-даминазу, пуриновую нуклеозидфосфорилазу и нитроредуктазу.

[0083] В объем изобретения входят конъюгаты, например биоконъюгаты, содержащие любые CAR, полипептиды или белки (включая любые их функциональные участки или варианты), клетки-хозяева, нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, популяции клеток-хозяев или антитела или их антигенсвязывающие участки. Конъюгаты, а также способы синтеза конъюгатов в целом известны в данной области техники (см., например, Hudez, F., *Methods Mol. Biol.* 298: 209–223 (2005) и Kirin et al., *Inorg Chem.* 44(15): 5405–5415 (2005)).

[0084] В конкретном варианте осуществления рекомбинантный вектор экспрессии, используемый в вариантах осуществления изобретения, представляет собой вектор, содержащий различные компоненты химерного антигенного рецептора антигена созревания B-клеток (BCMA). Плазмида представляет собой плазмиду из 8518 пар нуклеотидов (п.н.), содержащую последовательность, кодирующую различные компоненты химерного антигенного рецептора BCMA, которая раскрывается в SEQ ID NO: 175–197, 202–205, 218–227, 239, 261–264 и 271–276 в публикации международной заявки на патент PCT № WO2017/025038 A1, содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки. В одном аспекте в изобретении плазмида кодирует внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, при этом внеклеточный антигенсвязывающий

домен связывает антиген BCMA. Используемые в настоящем документе термины «В клетки», «В-клетки» и «В лимфоциты» используются взаимозаменяемо. В одном варианте осуществления плазмида содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 175–197, 202–205, 218–227, 239, 261–264 и 271–276 из публикации международной заявки на патент PCT № WO2017/025038 A1. В некоторых вариантах осуществления плазмида содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 175–197, 202–205, 218–227, 239, 261–264 и 271–276 из публикации международной заявки на патент PCT № WO2017/025038 A1.

[0085] Термин «кодирующий» относится к свойству, присущему конкретным последовательностям нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих или определенную последовательность нуклеотидов (например, рРНК, тРНК и мРНК), или определенную последовательность аминокислот, а также к биологическим свойствам, полученным в результате этого. Таким образом, ген, кДНК или РНК кодируют белок, если в результате транскрипции и трансляции мРНК, соответствующей этому гену, вырабатывается белок в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК, так и некодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут называться кодирующими белок или другой продукт этого гена или кДНК.

[0086] Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность», включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза «нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок или РНК», может также включать интроны в той мере, в которой нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в некоторых версиях содержать интрон (-ы).

[0087] В одном варианте осуществления в настоящем описании предложен вектор экспрессии, содержащий нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO:

175–197, 202–205, 218–227, 239, 261–264 и 271–276 из публикации международной заявки на патент PCT № WO2017/025038 A1.

[0088] Термин «вектор экспрессии» относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, содержащий регулирующие экспрессию последовательности, функционально соединенные с экспрессируемой нуклеотидной последовательностью. Вектор экспрессии содержит достаточное количество цис-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут обеспечиваться клеткой-хозяином или в системе экспрессии *in vitro*. Векторы экспрессии включают все известные в данной области техники векторы, включая космиды, плазмиды (например, «голые» или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и адено-ассоциированные вирусы), которые содержат рекомбинантный полинуклеотид.

[0089] Способы получения CAR T-клеток и количественного определения интеграции трансгена в CAR T-клетку

[0090] В одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы количественного определения интеграции трансгена в CAR T-клетку, включающие:

приведение нуклеиновых кислот из CAR T-клетки в контакт с первым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20 и их комбинаций, и приведение нуклеиновых кислот из CAR T-клетки в контакт со вторым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21 и их комбинаций;

приведение нуклеиновых кислот из CAR T-клетки в контакт с первым праймером hALB, содержащим нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29 и их комбинаций, и приведение нуклеиновых кислот из CAR T-клетки в контакт со вторым праймером hALB, содержащим нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 30 и их комбинаций;

приведение нуклеиновых кислот из CAR T-клетки в контакт с зондом CAR, причем зонд CAR содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 и их комбинаций;

приведение нуклеиновых кислот из CAR T-клетки в контакт с зондом hALB, при этом зонд hALB содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 28 и их комбинаций;

амплификацию ампликонов CAR с первым праймером CAR и вторым праймером CAR, таким образом получая молекулы амплифицированных нуклеиновых кислот CAR;

амплификацию ампликонов hALB с первым праймером hALB и вторым праймером hALB, таким образом получая молекулы амплифицированных нуклеиновых кислот hALB;

обнаружение гибридизации между молекулами амплифицированных нуклеиновых кислот CAR и зондом CAR посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;

обнаружение гибридизации между молекулами амплифицированных нуклеиновых кислот hALB и зондом hALB посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом hALB; и

количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом.

[0091] В некоторых вариантах осуществления стадии приведения в контакт для праймеров CAR выполняют в отдельной реакции от праймеров hALB. В других вариантах осуществления стадии приведения в контакт выполняют в ходе одной и той же реакции (т. е. мультиплексно).

[0092] В некоторых вариантах осуществления стадии приведения в контакт для зондов CAR выполняют в отдельной реакции от зондов hALB. В других вариантах осуществления стадии приведения в контакт выполняют в ходе одной и той же реакции (т. е. мультиплексно).

[0093] В некоторых вариантах осуществления стадии амплификации для ампликонов CAR выполняют в отдельной реакции от ампликонов hALB. В других вариантах осуществления стадии амплификации выполняют в ходе одной и той же реакции (то есть мультиплексно).

[0094] В некоторых вариантах осуществления стадии обнаружения для гибридизации нуклеиновых кислот CAR и зондов CAR выполняют в отдельной реакции от нуклеиновых кислот hALB и зондов hALB. В других вариантах осуществления стадии обнаружения выполняют в ходе одной и той же реакции (то есть мультиплексно).

[0095] В некоторых вариантах осуществления способы включают амплификацию нуклеиновых кислот CAR с первым праймером CAR длиной от около 20 до около 40 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления первый праймер CAR выполнен с возможностью гибридизации в условиях высокой жесткости с нуклеотидной последовательностью CAR, приведенной ниже в любой из SEQ ID NO: 175–197, 202–205, 218–227, 239, 261–264 и 271–276 из публикации международной заявки на патент PCT № WO2017/025038 A1.

[0096] Праймер, то есть нуклеотидная последовательность, которая гибридизируется в жестких условиях, может гибридизироваться в высокожестких условиях.

[0097] В некоторых вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 20. В конкретных вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 20.

[0098] В некоторых вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична,

на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 2. В конкретных вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 2.

[0099] В некоторых вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 5. В конкретных вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 5.

[00100] В некоторых вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 8. В конкретных вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя

нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 8.

[00101] В некоторых вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 11.

[00102] В некоторых вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 11. В конкретных вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 11.

[00103] В некоторых вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 14. В конкретных вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 14.

[00104] В некоторых вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности,

которая приведена ниже в SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 17. В конкретных вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 17.

[00105] В некоторых вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 20. В конкретных вариантах осуществления первый праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 20.

[00106] В некоторых вариантах осуществления способы включают амплификацию нуклеиновых кислот CAR со вторым праймером CAR длиной от около 20 до около 40 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления второй праймер CAR выполнен с возможностью гибридизации в условиях высокой жесткости с нуклеотидной последовательностью CAR, приведенной ниже в любой из SEQ ID NO: 175–197, 202–205, 218–227, 239, 261–264 и 271–276 из публикации международной заявки на патент PCT № WO2017/025038 A1.

[00107] В некоторых вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 9, SEQ

ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 21. В конкретных вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 21.

[00108] В некоторых вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 3. В конкретных вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 3.

[00109] В некоторых вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 6. В конкретных вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя

нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 6.

[00110] В некоторых вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 9. В конкретных вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 9.

[00111] В некоторых вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 12. В конкретных вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 12.

[00112] В некоторых вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на

по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 15. В конкретных вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 15.

[00113] В некоторых вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 18. В конкретных вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 18.

[00114] В некоторых вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 21. В конкретных вариантах осуществления второй праймер CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 21.

[00115] В некоторых вариантах осуществления способы включают гибридизацию молекулы нуклеиновой кислоты CAR со специфическим зондом CAR длиной от около

20 до около 40 и обнаружение гибридизации между нуклеиновой кислотой CAR и зондом. В некоторых вариантах осуществления в зонд введена метка с возможностью обнаружения. В некоторых вариантах осуществления специфический зонд CAR выполнен с возможностью гибридизации в условиях высокой жесткости с нуклеотидной последовательностью CAR, приведенной ниже в любой из SEQ ID NO: 175–197, 202–205, 218–227, 239, 261–264 и 271–276 из публикации международной заявки на патент PCT № WO2017/025038 A1.

[00116] В некоторых вариантах осуществления стадии обнаружения гибридизации могут быть выполнены с использованием традиционных методик молекулярной биологии, известных в данной области, таких как, без ограничений, гель-электрофорез, Саузерн-блоттинг и/или т. п.

[00117] В некоторых вариантах осуществления специфический зонд CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 19.

[00118] В некоторых вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 19. В конкретных вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 19.

[00119] В некоторых вариантах осуществления специфический зонд CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной

последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 1. В конкретных вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 1.

[00120] В некоторых вариантах осуществления специфический зонд CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 4. В конкретных вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 4.

[00121] В некоторых вариантах осуществления специфический зонд CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 7. В конкретных вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 7.

[00122] В некоторых вариантах осуществления специфический зонд CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 10. В конкретных вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 10.

[00123] В некоторых вариантах осуществления специфический зонд CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 13. В конкретных вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 13.

[00124] В некоторых вариантах осуществления специфический зонд CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 16. В

конкретных вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 16.

[00125] В некоторых вариантах осуществления специфический зонд CAR включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 19. В конкретных вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 19.

[00126] В некоторых вариантах осуществления способы включают амплификацию нуклеиновых кислот hALB с первым праймером hALB длиной от около 20 до около 40 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления первый праймер hALB выполнен с возможностью гибридизации в условиях высокой жесткости с нуклеотидной последовательностью hALB, приведенной ниже в SEQ ID NO: 31 (ФИГ. 13).

[00127] В некоторых вариантах осуществления первый праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления первый праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 29. В конкретных вариантах осуществления первый праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична

нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 29.

[00128] В некоторых вариантах осуществления первый праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления первый праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 23. В конкретных вариантах осуществления первый праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 23.

[00129] В некоторых вариантах осуществления первый праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления первый праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 26. В конкретных вариантах осуществления первый праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 26.

[00130] В некоторых вариантах осуществления первый праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления первый праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на

по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 29. В конкретных вариантах осуществления первый праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 29.

[00131] В некоторых вариантах осуществления способы включают амплификацию нуклеиновых кислот hALB со вторым праймером hALB длиной от около 20 до около 40 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления второй праймер hALB выполнен с возможностью гибридизации в условиях высокой жесткости с нуклеотидной последовательностью hALB, приведенной ниже в SEQ ID NO: 31.

[00132] В некоторых вариантах осуществления второй праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления второй праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 30. В конкретных вариантах осуществления второй праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 30.

[00133] В некоторых вариантах осуществления второй праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления второй праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на

по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 24. В конкретных вариантах осуществления второй праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 24.

[00134] В некоторых вариантах осуществления второй праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления второй праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 27. В конкретных вариантах осуществления второй праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 27.

[00135] В некоторых вариантах осуществления второй праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления второй праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 30. В конкретных вариантах осуществления второй праймер hALB включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 30.

[00136] В некоторых вариантах осуществления способы включают гибридизацию молекулы нуклеиновой кислоты hALB со специфическим зондом hALB длиной от около 20 до около 40 и обнаружение гибридизации между нуклеиновой кислотой hALB

и зондом. В некоторых вариантах осуществления в зонд введена метка с возможностью обнаружения. В некоторых вариантах осуществления специфический зонд hALB выполнен с возможностью гибридизации в условиях высокой жесткости с нуклеотидной последовательностью hALB, приведенной ниже в SEQ ID NO: 31.

[00137] В некоторых вариантах осуществления стадии обнаружения гибридизации могут быть выполнены с использованием традиционных методик молекулярной биологии, известных в данной области, таких как, без ограничений, гель-электрофорез, Саузерн-блоттинг и/или т. п.

[00138] В некоторых вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 28. В конкретных вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 28.

[00139] В некоторых вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 22. В конкретных вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность,

которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 22.

[00140] В некоторых вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 25. В конкретных вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 25.

[00141] В некоторых вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична или на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 96% идентична, на по меньшей мере около 97% идентична, на по меньшей мере около 98% идентична или на по меньшей мере около 99% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 28. В конкретных вариантах осуществления зонд включает в себя нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 28.

[00142] В конкретном аспекте в настоящем изобретении предложены способы количественного определения интеграции трансгена в CAR T-клетку, включающие: приведение нуклеиновых кислот из CAR T-клетки в контакт с первым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11 и приведение нуклеиновых кислот из CAR T-клетки в контакт со вторым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12;

приведение нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки в контакт с первым праймером hALB, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23 и приведение нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки в контакт со вторым праймером hALB, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24;

приведение нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки в контакт с зондом CAR, причем такой зонд CAR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10;

приведение нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки в контакт с зондом hALB, при этом такой зонд hALB содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22;

амплификацию нуклеиновых кислот CAR с первым праймером CAR и вторым праймером CAR, таким образом получая молекулы амплифицированных нуклеиновых кислот CAR;

амплификацию нуклеиновых кислот hALB с первым праймером hALB и вторым праймером hALB, таким образом получая молекулы амплифицированных нуклеиновых кислот hALB;

обнаружение гибридизации между молекулами амплифицированных нуклеиновых кислот CAR и зондом CAR посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;

обнаружение гибридизации между молекулами амплифицированных нуклеиновых кислот hALB и зондом hALB посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом hALB; и количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом.

[00143] В некоторых вариантах осуществления обнаружение гибридизации между молекулами амплифицированных нуклеиновых кислот CAR и зондом CAR включает обнаружение изменения целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR, во время или после гибридизации относительно целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR, до гибридизации.

[00144] В некоторых вариантах осуществления стадия обнаружения гибридизации между молекулами амплифицированных нуклеиновых кислот hALB и зондом hALB включает обнаружение изменения целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом hALB, во время или после гибридизации относительно целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом hALB, до гибридизации.

[00145] В другом аспекте в настоящем изобретении предложены способы количественного определения интеграции трансгена в CAR Т-клетку, включающие:

амплификацию нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки с первым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, и со вторым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты CAR;

амплификацию нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки с первым праймером референсного гена и вторым праймером референсного гена, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты референсного гена;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами референсного гена и зондом референсного гена посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом референсного гена; и

количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом.

[00146] В другом аспекте в настоящем изобретении предложены способы получения CAR Т-клетки, включающие:

интродукцию трансгена CAR в Т-клетку для получения Т-клетки с интегрированным трансгеном;

определение интеграции трансгена CAR, включающее:

амплификацию нуклеиновых кислот из Т-клетки с интегрированным трансгеном с первым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, и вторым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты CAR;

амплификацию нуклеиновых кислот из Т-клетки с интегрированным трансгеном с первым праймером референсного гена и вторым праймером референсного гена, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты референсного гена;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10,

посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами референсного гена и зондом референсного гена посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом референсного гена; и

количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом;

и

получение CAR Т-клетки, содержащей по меньшей мере одну копию интегрированного трансгена CAR.

[00147] В аспектах настоящего изобретения также предложены CAR Т-клетки, полученные с использованием способов, описанных в настоящем документе.

[00148] Термин «референсный ген» относится к внутреннему контролю реакции с последовательностями, отличными от целевого гена. Для того чтобы ген рассматривался как референсный, он должен соответствовать нескольким важным критериям (Chervoneva I, Li Y, Schulz S, Croker S, Wilson C, Waldman SA, Hyslop T. Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. *BMC Bioinforma*. 2010; 11:253. doi: 10.1186/1471-2105-11-253.). Наиболее важно то, что на его уровень экспрессии не должны влиять экспериментальные факторы. Кроме того, он должен демонстрировать минимальную вариабельность своей экспрессии в тканях и при различных физиологических состояниях организма. Желательно выбирать референсный ген с пороговым циклом, который близок к интересующему гену. Референсный ген должен демонстрировать вариабельность, связанную с несовершенствами применяемой технологии и подготовительных процедур — гарантируя тем самым, что любое изменение в количестве генетического материала будет в одинаковой степени влиять на объект исследования и контроль. К примерам «референсных генов», которые соответствуют перечисленным выше критериям, относятся основные гены метаболизма, называемые генами жизненно важных функций, которые по определению задействованы в процессах, важных для выживаемости клеток. Гены жизненно важных функций, подходящие для использования в качестве референсных генов, должны также экспрессироваться на стабильном и нерегулируемом постоянном уровне (Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G,

Grisar T, Igout A, Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits. *J Biotechnol*. 1999; 75:291–295. doi: 10.1016/S0168-1656(99)00163-7). К генам жизненно важных функций, которые можно использовать в качестве «референсных генов» в способах, наборах и праймерах/зондах настоящего изобретения, без ограничений относятся LDHA, NONO, PGK1, PPIH, C1orf43, CHMP2A, EMC7, GPI, PSMB2, PSMB4, RAB7A, REEP5, SNRPD3, VCP и VPS29.

[00149] В другом аспекте в изобретении предложены способы количественного определения интеграции трансгена в Т-клетку с химерным антигенным рецептором (CAR), включающие:

приведение нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки в контакт с первым праймером CAR, вторым праймером CAR, первым праймером референсного гена и вторым праймером референсного гена, причем первый праймер CAR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, а второй праймер CAR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12;

амплификацию нуклеиновых кислот CAR с первым праймером CAR и вторым праймером CAR, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты CAR;

амплификацию нуклеиновых кислот первого референсного гена с первым праймером референсного гена и вторым праймером референсного гена, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты референсного гена;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами референсного гена и зондом референсного гена посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом референсного гена; и

количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом.

[00150] В некоторых вариантах осуществления обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR включает обнаружение изменения целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной

с зондом CAR, во время или после гибридизации относительно целевого сигнала от метки, связанной с зондом CAR, до гибридизации. В некоторых вариантах осуществления обнаружение гибридизации между молекулами амплифицированных нуклеиновых кислот референсного гена и зондом референсного гена включает обнаружение изменения целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом референсного гена, во время или после гибридизации относительно целевого сигнала от метки, связанной с зондом референсного гена, до гибридизации. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна метка, связанная с зондом референсного гена, содержит флуорофор.

[00151] В некоторых вариантах осуществления стадии обнаружения гибридизации могут быть выполнены с использованием традиционных методик молекулярной биологии, известных специалистам в данной области, таких как, без ограничений, гель-электрофорез, Саузерн-блоттинг и/или т. п.

[00152] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из стадий амплификации включает полимеразную цепную реакцию (ПЦР), например ПЦР в реальном времени, полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой в реальном времени (ОТ-ПЦР в реальном времени), лигазную цепную реакцию (ЛЦР) или транскрипционно опосредованную амплификацию (ТМА).

[00153] ПЦР хорошо известна специалистам в данной области. Этот метод широко используется в молекулярной биологии для получения множества копий определенного сегмента ДНК. С помощью ПЦР происходит экспоненциальная амплификация одной копии (или более) последовательности ДНК, чтобы получить от тысяч до миллионов дополнительных копий данного конкретного сегмента ДНК. В основе большинства методов ПЦР лежит термоциклирование. При термоциклировании реагенты проходят повторяющиеся циклы нагрева и охлаждения для проведения различных зависимых от температуры реакций — плавления ДНК и ферментативной репликации ДНК. В ПЦР используются два основных реагента — праймеры (короткие одноцепочечные нуклеотидные фрагменты, известные как олигонуклеотиды с последовательностью, комплементарной целевому участку ДНК) и ДНК-полимераза. На первой стадии ПЦР в процессе плавления ДНК при высокой температуре происходит физическое разделение двух цепочек двойной спирали ДНК. На второй стадии температуру понижают, и

праймеры связываются с комплементарными последовательностями ДНК. Затем две цепочки ДНК становятся матрицами для ДНК-полимеразы для ферментативной сборки новой цепочки ДНК из свободных нуклеотидов, присутствующих в реакционной смеси. По мере продолжения ПЦР саму полученную ДНК используют в качестве матрицы для репликации, таким образом, происходит экспоненциальная амплификация матрицы исходной ДНК. Как правило, в сферах, требующих применения ПЦР, используют термостабильную ДНК-полимеразу, например Taq-полимеразу — фермент, первоначально выделенный из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*.

[00154] Количественная ПЦР или ПЦР в реальном времени (кПЦР), как известно специалистам в данной области, позволяет оценить количество конкретной последовательности, присутствующей в образце — методика, часто применяемая для количественного определения уровней экспрессии гена. Количественная ПЦР является апробированным инструментом для количественного определения ДНК, которое измеряет накопление продукта ДНК после каждого цикла амплификации ПЦР. кПЦР обеспечивает количественное определение и обнаружение определенной последовательности ДНК в реальном времени, поскольку измеряет концентрацию в процессе синтеза.

[00155] Полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), как известно специалистам в данной области, представляет собой лабораторную методику, объединяющую обратную транскрипцию РНК в ДНК (комплементарную ДНК или кДНК) и амплификацию конкретных целевых ДНК с помощью ПЦР. Ее обычно используют для измерения количества конкретной РНК. Этого достигают посредством мониторинга реакции амплификации по флуоресценции с использованием методики, называемой ПЦР в реальном времени или количественной ПЦР (кПЦР). Комбинацию ОТ-ПЦР и кПЦР традиционно используют для анализа экспрессии гена и количественного определения РНК.

[00156] Как известно специалистам в данной области, лигазная цепная реакция (ЛЦР) является одним из методов амплификации ДНК. Лигазная цепная реакция (ЛЦР) представляет собой процесс амплификации, который отличается от ПЦР тем, что использует термостабильную лигазу для связывания вместе двух зондов или других молекул, которые затем могут быть амплифицированы с помощью стандартных циклов ПЦР.

[00157] Транскрипционно опосредованная амплификация (TMA), как известно специалистам в данной области, представляет собой изотермическую систему амплификации нуклеиновой кислоты в одной пробе, где используются два фермента — РНК-полимераза и обратная транскриптаза. В отличие от ПЦР и ЛЦР метод TMA включает транскрипцию РНК (с применением РНК-полимеразы) и синтез ДНК (с применением обратной транскриптазы), чтобы получить ампликон РНК (исходное соединение или продукт амплификации) из целевой нуклеиновой кислоты.

[00158] В некоторых вариантах осуществления в способах, представленных в настоящем описании, используются другие методы количественной ПЦР, известные специалистам в области, такие как, без ограничений, цифровая ПЦР (цПЦР).

[00159] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна метка, связанная с зондом CAR, содержит флуорофор. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна метка, связанная с зондом hALB, содержит флуорофор. При использовании в настоящем документе термин «флуорофор» относится к любому флуоресцентному соединению или белку, которые могут быть использованы для количественного определения и обнаружения нуклеотидных последовательностей, с которыми гибридизируются зонды.

[00160] Настоящее описание также относится к праймерам, которые способны к гибридизации с нуклеиновой кислотой CAR и ее амплификации, например с нуклеотидной последовательностью, охватывающей сшивку CD137/CD3z конструкта CAR. Описанные праймеры могут быть использованы в способах, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления длина этих праймеров составляет от около 20 до около 40 нуклеотидов, и они способны к гибридизации в высокожестких условиях с нуклеотидной последовательностью CAR, приведенной ниже в любой из SEQ ID NO: 175–197, 202–205, 218–227, 239, 261–264 и 271–276 из

[00161] публикации международной заявки на патент № WO2017/025038 A1. В некоторых вариантах осуществления эти праймеры содержат нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления эти праймеры дополнительно содержат нуклеотидную

последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 21.

[00162] Настоящее описание также относится к зондам, которые способны к гибридизации с различными нуклеотидными последовательностями CAR и их дискриминации, например с различными нуклеотидными последовательностями, охватывающими сшивку CD137/CD3z конструкта CAR. Описанные зонды могут быть использованы в способах, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления длина этих зондов составляет от около 20 до около 40 нуклеотидов, и они способны к гибридизации в высокожестких условиях с нуклеотидной последовательностью CAR, приведенной ниже в любой из SEQ ID NO: 175–197, 202–205, 218–227, 239, 261–264 и 271–276 из публикации международной заявки на патент PCT № WO2017/025038 A1. В некоторых вариантах осуществления эти зонды содержат нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 95% идентична нуклеотидной последовательности, которая приведена ниже в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 19.

[00163] В одном аспекте в изобретении предложены наборы зондов и праймеров, содержащие зонд, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, и по меньшей мере одну метку, связанную с зондом; первый праймер CAR, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11; и второй праймер CAR, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12. В одном варианте осуществления наборы зондов и праймеров дополнительно содержат зонд hALB, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22, и по меньшей мере одну метку, связанную с зондом; первый праймер hALB, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23; и второй праймер hALB, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24.

[00164] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна метка содержит радиоактивный изотоп, субстрат фермента, хемилюминесцентный агент, флуорофор, тушитель флуоресценции, фермент, химическое соединение или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления люминесценция меток может быть вызвана за счет использования фотохимических, химических и электрохимических средств.

[00165] В настоящем изобретении также предложены наборы для количественного определения интеграции трансгена в CAR Т-клетку. Используемый в настоящем документе термин «набор» относится к комбинации реагентов и других материалов. Предполагается, что набор может включать в себя реагенты, такие как буферные вещества, стабилизирующие белок реагенты, системы генерации сигнала (например, системы генерации сигнала флуоресценции), антитела, контрольные белки, а также контейнеры для проведения тестирования (например, планшеты для микротитрования и т. д.). Предполагается, что термин «набор» не будет ограничен конкретной комбинацией реагентов и/или других материалов. В одном варианте осуществления набор дополнительно содержит инструкции по применению реагентов. Набор может быть упакован любым приемлемым образом, как правило, с компонентами в одном контейнере или в различных контейнерах, если необходимо, вместе с листом инструкций по проведению теста. В некоторых вариантах осуществления наборы также включают в себя образец положительного контроля. Наборы могут быть произведены различными способами, известными специалистам в данной области.

[00166] В одном аспекте наборы для количественного определения интеграции трансгена в CAR Т-клетку содержат: зонд, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, и по меньшей мере одну метку, связанную с зондом; первый праймер, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11; и второй праймер, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12. В одном варианте осуществления наборы дополнительно содержат зонд hALB, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22, и по меньшей мере одну метку, связанную с зондом; первый праймер hALB, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23; и второй праймер hALB, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24.

[00167] В некоторых вариантах осуществления наборов изобретения по меньшей мере одна метка, связанная с зондом, содержит радиоактивный изотоп, субстрат фермента, хемилюминесцентный агент, флуорофор, тушитель флуоресценции, фермент, химическое соединение или их комбинацию.

[00168] В одном варианте осуществления наборы изобретения содержат матрицу, которая содержит зонд. В некоторых вариантах осуществления изобретения матрица представляет собой многолуночный планшет.

[00169] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна метка, связанная с зондом hALB, содержит радиоактивный изотоп, субстрат фермента, хемилюминесцентный агент, флуорофор, тушитель флуоресценции, фермент, химическое соединение или их комбинацию.

[00170] При использовании в аспектах, описанных в изобретении, термин «метка» относится к функциональной группе, которая способна формировать регистрируемый сигнал, т. Е., сигнал, который может быть обнаружен в незначительной степени с помощью средств обнаружения, которые генерируют сигнал. К примерам таких приемлемых средств относятся спектроскопические или фотохимические средства, например флуоресценция или люминесценция, или биохимические, иммунохимические или химические средства, такие как изменения в физических, биохимических, иммунохимических или химических свойств при контакте с регистрирующим аналитическим соединением или при реакции с полипептидом или смесью полипептид/фермент с образованием обнаруживаемого комплекса. Таким образом, при использовании в настоящем документе термин «метка» подразумевает включение как функциональных групп, которые могут быть обнаружены непосредственно, таких как радиоизотопы или флуорохромы, так и реакционноспособных функциональных групп, которые обнаруживаются опосредованно в ходе реакции, в которой образуется регистрируемый продукт, таких как ферменты, которые реагируют с субстратом с образованием продукта, обнаруживаемого спектрофотометрически. Отмечается, что реагент метки может содержать функциональную группу радиоактивной метки, такую как радиоизотоп. В одном варианте осуществления зонд гибридизации настоящего документа содержит нерадиоактивную метку, чтобы предотвратить осложнения, связанные с анализом радиоактивности.

[00171] Для применения схем обнаружения метки в способах и наборах, описанных в изобретении, в нуклеотидные основания вводят метки посредством ковалентного связывания соединения, чтобы сформировать сигнал флуоресценции или хемилюминесценции после введения dNTP в удлиненный

[00172] праймер/матрицу ДНК. К примерам флуоресцентных соединений для введения метки в dNTP без ограничений относятся флуоресцеин, родамин и BODIPY (4,4-дифтор-4-бор-3a,4a-диаза-s-индацен). См. «Handbook of Molecular Probes and Fluorescent Chemicals», предлагаемую Molecular Probes, Inc. (г. Юджин, штат Орегон).

Примеры хемилюминесцентных соединений, которые могут быть использованы, включают, без ограничений, люминол и диоксетаноны (см. Gundennan and McCapra, «Chemiluminescence in Organic Chemistry», Springer-Verlag, Berlin Heidleberg, 1987).

[00173] Флуоресцентно или хемилюминесцентно меченные dNTP добавляют по отдельности к системе матрицы ДНК, содержащей матрицу ДНК после отжига с праймером, ДНК-полимеразу, в соответствующей буферной среде. По истечении времени реакции избыток dNTP удаляют, и систему зондируют, чтобы убедиться во включении нуклетотида с флуоресцентной или хемилюминесцентной меткой в матрицу ДНК. Обнаружение включенного нуклеотида может быть осуществлено с помощью различных способов, которые могут зависеть от вида использованной метки.

[00174] Для флуоресцентно-меченных dNTP систему матрицы ДНК можно облучать оптическим излучением с длиной волны, которую активно поглощает метка. Флуоресценцию метки обнаруживают с использованием, например, фотодетектора с оптическим фильтром, который отсекает любой рассеянный свет на длине волны возбуждения.

[00175] В дополнительном варианте осуществления, в котором в наборах и способах, описанных в настоящем документе, использовано флуоресцентное обнаружение, флуоресцентная метка связывается с dNTP посредством фоторасщепляемого или химически расщепляемого линкера, и метка отщепляется после реакции удлинения и удаляется из системы матрицы в кювету обнаружения, где наличие и количество такой метки определяют по оптическому возбуждению на соответствующей длине волны с обнаружением флуоресценции. В этом варианте осуществления сведена к минимуму вероятность тушения флуоресценции из-за наличия множества флуоресцентных меток в непосредственной близости друг от друга на цепочке праймера, которая достраивается комплементарно участку повторов по одному основанию в матрице, и появляется возможность оптимизировать точность определения числа повторов. Кроме того, возбуждение флуоресценции в отдельной кювете сводит к минимуму возможность фотолитического повреждения системы праймера/матрицы ДНК.

[00176] В одном варианте осуществления зонд содержит метку 5’ 6-FAM™ (флуоресцеин). 6-AM™ является единственным изомерным производным флуоресцеина. FAM™ представляет собой флуоресцентный краситель, связанный с

олигонуклеотидами, и совместим с большинством оборудования для обнаружения флуоресценции. При pH ниже 7 он протонируется и демонстрирует пониженную интенсивность флуоресценции; как правило, его используют в диапазоне pH 7,5–8,5. FAM™ может связываться с 5'- или 3'-концами олигонуклеотидов.

[00177] В одном варианте осуществления зонд содержит метку 5'HEX™ (гексахлорофлуоресцеин). Гексахлорофлуоресцеин является химически родственным соединением флуоресцеина, которое используют для мультиплексных анализов с FAM™. HEX™ может связываться только с 5'-концом олигонуклеотида.

[00178] В настоящем описании также рассматривается применение любых других меток, известных специалистам в области, которые могут быть использованы для введения метки зондов, как описано в настоящем документе, например, без ограничений, VIC®, TET™, JOE™, NED™, PET®, ROX™, TAMRA™, TET™, Texas Red®, ATTO™ 532, Cy3, Tye™ 563, Tye™ 665, TEX 615™, Cy5, ZEN™, Iowa Black® FQ, Iowa Black® RQ, DABYCL и Yakima Yellow™.

[00179] В одном варианте осуществления зонд содержит метку тушителя флуоресценции. Метка тушителя может быть использована в качестве двойного тушителя в реакциях, описанных в настоящем документе. В одном варианте осуществления зонд содержит тушитель Iowa Black® FQ. Iowa Black® FQ обладает широким спектром поглощения в диапазоне от 420 до 620 нм с пиковым поглощением при 531 нм. Тушитель используют с флуоресцеином и другими флуоресцентными красителями с испусканием в спектральном диапазоне от зеленого до розового. В настоящем описании рассматривается использование любых меток флуоресцентного тушителя, известных специалистам в данной области, таких как, например, без ограничений, ZEN™, Black Hole Quencher® (BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3 и т. д.).

[00180] Методы и наборы трансгенной кПЦР, описанные в настоящем изобретении, включают анализ с помощью мультиплексной количественной полимеразной цепной реакции (количественная ПЦР), предназначенный для количественного определения трансгенной плазмиды BCMA CAR, интегрированной в лекарственный препарат CAR T. Существуют две целевых молекулы, амплифицируемые в рамках данного метода кПЦР: (1) трансгенная плазмида BCMA CAR (трансген) и (2) референсный ген человеческого альбумина (hALB). Набор праймеров и зондов для трансгенных

мишеней амплифицирует сшивку между участками CD137 и CD3z плазмиды, чтобы обеспечить обнаружение исключительно трансгенной плазмиды BCMA CAR, присутствующей в лекарственном препарате CAR T и интегрированной в него. Результаты числа копий референсного гена hALB используют для расчетов представляемого результата числа копий вектора (VCN) на клетку для каждого образца, тестированного в ходе реакции кПЦР.

[00181] Ниже приведено описание примеров осуществления.

[00182] Вариант 1 осуществления. Набор зондов и праймеров, содержащий: зонд, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, и по меньшей мере одну метку, связанную с зондом; первый праймер, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11; и второй праймер, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12.

[00183] Вариант 2 осуществления. Набор зондов и праймеров по варианту осуществления 1, в котором по меньшей мере одна метка содержит радиоактивный изотоп, субстрат фермента, хемилюминесцентный агент, флуорофор, тушитель флуоресценции, фермент, химическое соединение или их комбинацию.

[00184] Вариант 3 осуществления. Набор для количественного определения интеграции трансгена в Т-клетку с химерными антигенными рецепторами (CAR), содержащий: зонд, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, и по меньшей мере одну метку, связанную с зондом; первый праймер, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11; и второй праймер, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12.

[00185] Вариант 4 осуществления. Набор по варианту 3 осуществления, в котором по меньшей мере одна метка, связанная с зондом, содержит радиоактивный изотоп, субстрат фермента, хемилюминесцентный агент, флуорофор, тушитель флуоресценции, фермент, химическое соединение или их комбинацию.

[00186] Вариант 5 осуществления. Набор по варианту 3 осуществления, содержащий матрицу, содержащую зонд.

[00187] Вариант 6 осуществления. Набор по варианту 5 осуществления, в котором матрица представляет собой многолуночный планшет.

[00188] Вариант 7 осуществления. Набор по варианту 3 осуществления, дополнительно содержащий зонд человеческого альбумина (hALB), содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22, и по меньшей мере одну метку, связанную с зондом hALB, первый праймер hALB, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23, и второй праймер hALB, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24.

[00189] Вариант 8 осуществления. Набор по варианту 7 осуществления, в котором по меньшей мере одна метка, связанная с зондом hALB, содержит радиоактивный изотоп, субстрат фермента, хемилюминесцентный агент, флуорофор, тушитель флуоресценции, фермент, химическое соединение или их комбинацию.

[00190] Вариант 9 осуществления. Набор по варианту 3 осуществления, дополнительно содержащий зонд референсного гена и по меньшей мере одну метку, связанную с зондом референсного гена, первый праймер референсного гена и второй праймер референсного гена.

[00191] Вариант 10 осуществления. Способ количественного определения интеграции трансгена в Т-клетку с химерным антигенным рецептором (CAR), включающий:
амплификацию нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки с первым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, и вторым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты CAR;
амплификацию нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки с первым праймером hALB, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23, и вторым праймером hALB, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты hALB;
обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;
обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами hALB и зондом hALB, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22, посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом hALB; и

количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом.

[00192] Вариант 11 осуществления. Способ количественного определения интеграции трансгена в Т-клетку с химерным антигенным рецептором (CAR), включающий:

приведение нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки в контакт с первым праймером CAR, вторым праймером CAR, первым праймером hALB и вторым праймером hALB, причем первый праймер CAR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, второй праймер CAR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, первый праймер hALB содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23, второй праймер hALB содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24;

амплификацию нуклеиновых кислот CAR с первым праймером CAR и вторым праймером CAR, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты CAR;

амплификацию нуклеиновых кислот hALB с первым праймером hALB и вторым праймером hALB, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты hALB;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами hALB и зондом hALB посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом hALB; и

количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом.

[00193] Вариант 12 осуществления. Способ по варианту 10 или 11 осуществления, в котором обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR включает обнаружение изменения целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR, во время или после гибридизации относительно целевого сигнала от метки, связанной с зондом CAR, до гибридизации.

[00194] Вариант 13 осуществления. Способ по варианту 10 или 11 осуществления, в котором обнаружение гибридизации между амплифицированными молекулами нуклеиновых кислот hALB и зондом hALB включает обнаружение изменения целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом hALB, во время или после гибридизации относительно целевого сигнала от метки, связанной с зондом hALB, до гибридизации.

[00195] Вариант 14 осуществления. Способ по варианту 10 или 11 осуществления, в котором амплификация включает полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

[00196] Вариант 15 осуществления. Способ по варианту 14 осуществления, в котором ПЦР представляет собой ПЦР в реальном времени, полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой в реальном времени (ОТ-ПЦР в реальном времени), лигазную цепную реакцию (ЛЦР) или транскрипционно опосредованную амплификацию (ТМА).

[00197] Вариант 16 осуществления. Способ по варианту 10 осуществления, в котором по меньшей мере одна метка, связанная с зондом CAR, содержит флуорофор.

[00198] Вариант 17 осуществления. Способ по варианту 10 осуществления, в котором по меньшей мере одна метка, связанная с зондом hALB, содержит флуорофор.

[00199] Вариант 18 осуществления. Способ количественного определения интеграции трансгена в Т-клетку с химерным антигенным рецептором (CAR), включающий:

амплификацию нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки с первым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, и вторым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты CAR;

амплификацию нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки с первым праймером референсного гена и вторым праймером референсного гена, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты референсного гена;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами референсного гена и зондом референсного гена посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом референсного гена; и
количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом.

[00200] Вариант 19 осуществления. Способ количественного определения интеграции трансгена в Т-клетку с химерным антигенным рецептором (CAR), включающий:
приведение нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки в контакт с первым праймером CAR, вторым праймером CAR, первым праймером референсного гена и вторым праймером референсного гена, причем первый праймер CAR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, второй праймер CAR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12;
амплификацию нуклеиновых кислот CAR с первым праймером CAR и вторым праймером CAR, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты CAR;
амплификацию нуклеиновых кислот первого референсного гена с первым праймером референсного гена и вторым праймером референсного гена, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты референсного гена;
обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;
обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами референсного гена и зондом референсного гена посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом референсного гена; и
количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом.

[00201] Вариант 20 осуществления. Способ по варианту 18 или 19 осуществления, в котором обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR включает обнаружение изменения целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR, во время или после

гибридизации относительно целевого сигнала от метки, связанной с зондом CAR, до гибридизации.

[00202] Вариант 21 осуществления. Способ по варианту 18 или 19 осуществления, в котором обнаружение гибридизации между молекулами амплифицированных нуклеиновых кислот референсного гена и зондом референсного гена включает обнаружение изменения целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом референсного гена, во время или после гибридизации относительно целевого сигнала от метки, связанной с зондом референсного гена, до гибридизации.

[00203] Вариант 22 осуществления. Способ по варианту 18 или 19 осуществления, в котором амплификация включает полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

[00204] Вариант 23 осуществления. Способ по варианту 22 осуществления, в котором ПЦР представляет собой ПЦР в реальном времени, полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой в реальном времени (ОТ-ПЦР в реальном времени), лигазную цепную реакцию (ЛЦР) или транскрипционно опосредованную амплификацию (TMA).

[00205] Вариант 24 осуществления. Способ по варианту 18 осуществления, в котором по меньшей мере одна метка, связанная с зондом CAR, содержит флуорофор.

[00206] Вариант 25 осуществления. Способ по варианту 18 осуществления, в котором по меньшей мере одна метка, связанная с зондом референсного гена, содержит флуорофор.

[00207] Вариант 26 осуществления. Способ получения Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR), включающий:
интродукцию трансгена CAR в Т-клетку для получения Т-клетки с интегрированным трансгеном;
определение интеграции трансгена CAR, включающее:
амплификацию нуклеиновых кислот из Т-клетки с интегрированным трансгеном с первым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, и вторым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты CAR;

амплификацию нуклеиновых кислот из Т-клетки с интегрированным трансгеном с первым праймером референсного гена и вторым праймером референсного гена, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты референсного гена;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами референсного гена и зондом референсного гена посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом референсного гена;

количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом; и

получение CAR Т-клетки, содержащей по меньшей мере одну копию интегрированного трансгена CAR.

[00208] Вариант 27 осуществления. Способ по варианту 26 осуществления, в котором обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR включает обнаружение изменения целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR, во время или после гибридизации относительно целевого сигнала от метки, связанной с зондом CAR, до гибридизации.

[00209] Вариант 28 осуществления. Способ по варианту 26 осуществления, в котором обнаружение гибридизации между амплифицированными молекулами нуклеиновых кислот референсного гена и зондом референсного гена

[00210] включает обнаружение изменения целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом референсного гена, во время или после гибридизации относительно целевого сигнала от метки, связанной с зондом референсного гена, до гибридизации.

[00211] Вариант 29 осуществления. Способ по варианту 26 осуществления, в котором амплификация включает полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

[00212] Вариант 30 осуществления. Способ по варианту 29 осуществления, в котором ПЦР представляет собой ПЦР в реальном времени, полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), полимеразную цепную реакцию с обратной

транскриптазой в реальном времени (ОТ-ПЦР в реальном времени), лигазную цепную реакцию (ЛЦР) или транскрипционно опосредованную амплификацию (TMA).

[00213] Вариант 31 осуществления. Способ по варианту 26 осуществления, в котором по меньшей мере одна метка, связанная с зондом CAR, содержит флуорофор.

[00214] Вариант 32 осуществления. Способ по варианту 26 осуществления, в котором по меньшей мере одна метка, связанная с зондом референсного гена, содержит флуорофор.

[00215] Вариант 33 осуществления. CAR T-клетка, полученная способом по любому из вариантов 26–32 осуществления.

[00216] Представленные ниже примеры приведены для дополнительного описания некоторых из описанных в настоящем документе вариантов осуществления. Примеры призваны проиллюстрировать, но не ограничить описанные варианты осуществления.

ПРИМЕР 1. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ТРАНСГЕННОЙ кПЦР

[00217] Общий обзор метода

[00218] Описанный пример метода трансгенной кПЦР представляет собой мультиплексную количественную полимеразную цепную реакцию (кПЦР), предназначенную для количественного определения трансгенной плазмиды BCMA CAR (в примерах называемой «плазмидой pLLV-LICAR2SIN»), интегрированной в лекарственный препарат CAR T. В данном методе кПЦР проводят амплификацию следующего: (1) трансгенная плазмида pLLV-LICAR2SIN (трансген) (трансген с нуклеотидной последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 175–197, 202–205, 218–227, 239, 261–264 и 271–276 из публикации международной заявки на патент PCT № WO2017/025038 A1**)** и (2) референсный ген человеческого альбумина (hALB). Набор праймеров и зондов для трансгенных мишеней амплифицирует сшивку между участками CD137 и CD3z плазмиды, чтобы обеспечить обнаружение исключительно трансгенной плазмиды pLLV-LICAR2SIN, присутствующей в лекарственном препарате CAR T и интегрированной в него. Результаты числа копий референсного гена hALB используют для расчетов представляемого результата числа копий вектора (VCN) на клетку для каждого образца, тестированного в ходе реакции кПЦР. Результаты для образца VNC/клетка после применения метода трансгенной кПЦР приведены для

контроля безопасности, чистоты и идентичности образцов лекарственного препарата CAR T.

[00219] Построение трансгенных праймеров и зондов

[00220] Трансгенная плазмида BCMA CAR, называемая «плазмидой pLLV-LICAR2SIN», представляет собой плазмиду из 8518 пар нуклеотидов (п.н.), содержащую последовательности, кодирующие множество различных компонентов химерного антигенного рецептора (CAR) антигена созревания В-клеток (BCMA). Целевой трансген кПЦР был необходим только для того, чтобы обнаруживать присутствие плазмиды pLLV-LICAR2SIN и ее интеграцию в лекарственный препарат CAR T, а также то, что целевой участок должен принадлежать исключительно конструкту BCMA CAR. Для обеспечения специфичности целевого трансгена кПЦР были сконструированы пары праймеров и зондов, нацеленные на по меньшей мере одну сшивку между по меньшей мере двумя участками плазмиды pLLV-LICAR2SIN, кодирующими конструкт CAR. Во-первых, необходимо было идентифицировать подходящие участки в плазмиде pLLV-LICAR2SIN.

[00221] Наибольшие по длине в парах нуклеотидов (п.н.) кодирующие участки, которые интегрируются в геном лекарственного препарата CAR T и специфичны для конструкта CAR, принадлежат двум вариабельным участкам тяжелой цепи конструкта BCMA CAR. Такие два участка разделены короткой линкерной последовательностью. Участок нуклеотидной последовательности, соответствующий двум вариабельным участкам тяжелой цепи, и линкер вводили в программу Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) на сайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), чтобы определить, могут ли эти участки быть подходящими целями для метода трансгенной кПЦР. Однако результаты BLAST указывали на множество совпадений для различных вариабельных участков иммуноглобулина среди многих видов, включая *homo sapiens*. Поэтому кодирующие участки для двух вариабельных компонентов тяжелой цепи CAR были определены как неподходящие мишени для метода трансгенной кПЦР.

[00222] Сшивка между участками CD137 и CD3z плазмиды pLLV-LICAR2SIN включена в участок плазмиды, который интегрирован в геном лекарственного препарата CAR T, и является компонентом BCMA CAR. По своей длине кодирующий

участок CD3z плазмиды pLLV-LICAR2SIN является второй по длине в п.н. кодирующим участком сегмента CAR плазмиды, что делает его более подходящим целевым участком благодаря возможности использования большего числа потенциально подходящих пар праймеров и зондов, которые могут быть получены из большого кодирующего участка. Кодирующий участок CD3z является непосредственно смежной с кодирующим участком CD137 плазмиды. На противоположной стороне кодирующего участка CD137 находятся каркасные последовательности плазмиды, которые не являются специфичными для конструкта BCMA CAR. Поэтому сшивка между CD137 и CD3z была единственным возможным вариантом, подходящим в качестве цели, если предполагалось включать большой кодирующий участок CD3z в праймеры и зонды при конструировании.

[00223] Для конструирования подходящих пар праймеров и зондов для тестирования в ходе разработки метода кПЦР использовали PrimerQuest® Tool от Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) (г. Коралвилл, штат Айова)(https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index). Нуклеотидную последовательность плазмиды pLLV-LICAR2SIN, соответствующую кодирующим участкам CD137 и CD3z, вводили в PrimerQuest Tool. Оптимальную температуру плавления (Tm) задавали равной 60 °C, и нуклеотиды, соответствующие сшивке между CD137 и CD3z, вводили в «Overlap Junction List», чтобы гарантировать, что и прямой, и обратный праймеры будут перекрывать эту сшивку. Результатом стали четыре пары праймеров и зондов (см. таблицу 1). Две пары имели прямой праймер, охватывающий сшивку CD137/CD3z, и две пары имели обратный праймер, охватывающий сшивку. Затем корректировали параметры конструирования для ограничения структуры зонда так, чтобы он охватывал сшивку CD137/CD3z. В результате получали три дополнительных пары праймеров и зондов (см. таблицу 1) — всего семь пар праймеров и зондов, подходящих для тестирования в ходе разработки метода кПЦР. Все 7 пар праймеров/зондов обрабатывали на сайте NCBI BLAST для проверки возможной перекрестной реактивности в геноме человека. Ни один из результатов применения BLAST для любой из 7 пар не указывал на возможность перекрестной реактивности.

Таблица 1. Пары праймеров и зондов, нацеленные на сшивку CD137/CD3z

Наименование набора олигонуклеотидов	Олигонуклеотиды	Последовательность (3'–5')	Длина продукта ПЦР (п.н.)
Трансген (FP) набор 1	Прямой	GGATGTGAACTGAGAGTGAAG (SEQ ID NO: 5)	104
	Обратный	TCCTCTCTTCGTCCTAGATTG (SEQ ID NO: 6)	
	Зонд	TTATAGAGCTGGTTCTGGCCCTGC (SEQ ID NO: 4)	
Трансген (FP) набор 2	Прямой	TGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCA (SEQ ID NO: 2)	93
	Обратный	CTTCGTCCTAGATTGAGCTCGT (SEQ ID NO: 3)	
	Зонд	AGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATA (SEQ ID NO: 1)	
Трансген (RP) набор 1	Прямой	GGCAGAAAGAAACTCCTGTAT (SEQ ID NO: 8)	129
	Обратный	CTTCACTCTCAGTTCACATCC (SEQ ID NO: 9)	
	Зонд	TCTTCTGGAAATCGGCAGCTACAGC (SEQ ID NO: 7)	
Трансген (RP) набор 2	Прямой	CCAGTACAAACTACTCAAGAGG (SEQ ID NO: 11)	90
	Обратный	GCTGAACTTCACTCTCAGTT (SEQ ID NO: 12)	
	Зонд	TCTTCTGGAAATCGGCAGCTACAGC (SEQ ID NO: 10)	
Трансген (PRB) набор 1	Прямой	CTGCCGATTTCCAGAAGAAG (SEQ ID NO: 14)	132
	Обратный	TCCTCTCTTCGTCCTAGATTG	
		(SEQ ID NO: 15)	
	Зонд	AGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGT (SEQ ID NO: 13)	
Трансген (PRB) набор 2	Прямой	CTGTAGCTGCCGATTTCC (SEQ ID NO: 17)	145
	Обратный	ATCGTACTCCTCTCTTCGTC (SEQ ID NO: 18)	
	Зонд	AGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGT (SEQ ID NO: 16)	
Трансген (PRB) набор 3	Прямой	CTGCCGATTTCCAGAAGAAG (SEQ ID NO: 20)	132
	Обратный	TCCTCTCTTCGTCCTAGATTG (SEQ ID NO: 21)	
	Зонд	AGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGT (SEQ ID NO: 19)	

Примечание. FP = прямой праймер охватывает сшивку; RP = обратный праймер охватывает сшивку; PRB = зонд охватывает сшивку

[00224] Три набора праймеров и зондов hALB использовали для тестирования в ходе разработки метода кПЦР (см. таблицу 2). Один набор был взят из опубликованной статьи (S Charrier et al. Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients. *Gene Therapy* (2007) 14, 415–428.), второй был взят из способа анализа цифровой ПЦР, проведенного КИО, и в конечном счете не использовался, а третий набор был сконструирован с использованием PrimerQuest Tool и участка гена hALB, которая была выбрана в качестве целевой как в опубликованной статье, так и для наборов праймеров и зондов ССНМС hALB. Все 3 пары праймеров/зондов обрабатывали на сайте NCBI BLAST для проверки возможной перекрестной реактивности с любым не относящимся к hALB продуктом в геноме человека. Ни один из результатов применения BLAST для любой из 3 пар не указывал на возможность перекрестной реактивности.

Таблица 2. Пары праймеров и зондов hALB

Наименование набора олигонуклеотидов	Олигонуклеотиды	Последовательность (3'–5')	Длина продукта ПЦР (п.н.)
hALB набор 1	Прямой	TCATCTCTTGTGGGCTGTAATC (SEQ ID NO: 23)	123
	Обратный	TGCTGGTTCTCTTTCACTGAC (SEQ ID NO: 24)	
	Зонд	AGGGAGAGATTTGTGTGGGCATGAC (SEQ ID NO: 22)	
hALB набор 2	Прямой	GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT (SEQ ID NO: 26)	139
	Обратный	ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC (SEQ ID NO: 27)	
	Зонд	CCTGTCATGCCCACACAAATCTCTCC (SEQ ID NO: 25)	
hALB набор 3	Прямой	CTGTCATGCCCACACAAA (SEQ ID NO: 29)	95
	Обратный	ATAAGGCTATCCAAACTCATGG (SEQ ID NO: 30)	
	Зонд	CCCTGGCATTGTTGTCTTTGCAGA (SEQ ID NO: 28)	

Примечание. Набор 1 = набор hALB CCHMC; Набор 2 = набор hALB из опубликованной статьи; Набор 3 = набор hALB собственного конструирования

[00225] Скрининг праймеров и зондов

[00226] Проводили скрининг 7 различных наборов трансгенных праймеров и зондов и 3 различных наборов праймеров и зондов hALB посредством проведения обычных реакций кПЦР с лекарственным препаратом CAR T, имитационной ДНК Т-клетки в качестве образцов с добавкой плазмиды pLLV-LICAR2SIN и имитационной ДНК Т-клетки. Имитационную ДНК Т-клетки изолировали из Т-клеток, которые проходили такой же процесс селекции и амплификации, как и продукт CAR T до трансдукциии лентивектором. Продукты кПЦР для CAR Т-клетки, имитационной Т-клетки, имитационной ДНК Т-клетки с добавкой плазмиды pLLV-LICAR2SIN и продукты кПЦР образца «контроля без матрицы» (NTC) анализировали на агарозном геле. Любой набор праймеров/зондов, который не приводил к формированию единственной полосы продукта ПЦР ожидаемой длины, исключали из дальнейшей разработки метода трансгенной кПЦР. Наличие полосы димера праймера ~ 25 п.н. также отмечалось во всех продуктах кПЦР, включая образец NTC, но эта полоса относится к ожидаемому производному продукту реакции кПЦР. Только наборы праймеров/зондов трансген (FP) набор 1 и трансген (RP) набор 2 давали ожидаемую целевую полосу, при этом в геле наблюдалось только две полосы < 50 п.н. Одна из полос < 50 п.н., вероятно, относилась к ожидаемым димерам праймера. Вторую полосу < 50 п.н. невозможно четко различить в образце NTC, и не удалось определить, что могло быть возможным источником этой дополнительной полосы с низким молекулярным весом. На ФИГ. 1 представлены примеры гель-электрофоретического изображения по результатам обычного скринингового анализа праймеров/зонда. Только набор праймеров/зондов hALB набор

3 был исключен из дальнейшей разработки метода кПЦР по причине дополнительных неожиданных полос, наблюдавшихся в продуктах кПЦР для CAR T, имитационной Т-клетки и имитационной ДНК Т-клетки с добавлением образцов плазмиды. Для всех 3 наборов праймеров/зондов также наблюдали две полосы < 50 п.н. Одна из полос < 50 п.н., вероятно, относилась к ожидаемым димерам праймера. Вторая полоса < 50 п.н. не была четко видна в образце NTC, и не удалось определить, что могло быть возможным источником этой дополнительной полосы с низким молекулярным весом. Однако в условиях этой одинаковой организации полос с низким молекулярным весом, наблюдавшейся также для всех наборов праймеров/зондов трансгена, и с учетом того, что оптимизация количества праймеров или зонда в реакциях и тестирование различных температур отжига не привели к исчезновению полосы, предполагалось, что эта дополнительная полоса является результатом присутствия урацил-ДНК-гликозилаз (UNG) в основной смеси кПЦР или следствием каких-либо других малозначимых производных продуктов кПЦР.

[00227] Следующей стадией процесса скрининга наборов праймеров/зондов трансгена был анализ 2 приемлемых наборов (FP набор 1 и RP набор 2) в реакциях мультиплексной кПЦР с двумя приемлемыми наборами праймеров/зондов hALB (набор 1 и набор 2) с использованием стандартной кривой. Стандартную кривую получали путем добавления к имитационной ДНК Т-клетки известной концентрации плазмиды pLLV-LICAR2SIN и выполнения пяти 5-кратных последовательных разбавлений этого образца имитационной Т-клетки с добавкой с использованием буфера ТЕ с низким содержанием EDTA в качестве разбавителя. Образец для каждой точки стандартной кривой получали и замораживали в виде одноразовых аликвот. Оба набора трансгенных праймеров/зондов сначала тестировали с hALB набор 2 в мультиплексной кПЦР. Кроме того, анализировали ДНК CAR T и образец имитационной ДНК Т-клетки для оценки специфичности мультиплексной реакции. Ниже приведены критерии стандартной кривой, которым, как ожидалось, должны были соответствовать мишени как трансгена, так и hALB, чтобы быть приемлемыми для дальнейшей разработки метода трансгенной кПЦР: (1) $R^2 \geq 0{,}98$ и (2) эффективность кПЦР 90–110%. ДНК CAR Т должна была демонстрировать измеримую амплификацию для мишеней как трансгена, так и hALB, тогда как образец имитационной ДНК Т-клетки должен был демонстрировать измеримую амплификацию только для мишени hALB и отсутствие

амплификации для мишени трансгена, чтобы соответствовать требованиям специфичности анализа.

[00228] Мультиплексная реакция трансгена (FP) набор 1 и hALB набор 2 приводит к приемлемым результатам по R^2 на уровне > 0,98 для мишеней как трансгена, так и hALB, но ни одна из стандартных кривых для не приводит к эффективности кПЦР в приемлемом диапазоне. Мультиплексная реакция трансгена (RP) набор 2 и hALB набор 2 также продемонстрировал приемлемые результаты по R^2 на уровне > 0,98 для мишеней как трансгена, так и hALB. Стандартная кривая трансгена также приводила к эффективности кПЦР в пределах приемлемого диапазона, но для стандартной кривой hALB это не наблюдалось. Мультиплексные реакции трансгена (FP) набор 1/hALB набор 2 и трансгена (RP) набор 2/hALB набор 2 продемонстрировали приемлемые результаты по специфичности, при этом в образце ДНК CAR T отмечается измеримая амплификация для обеих мишеней, и для имитационной ДНК Т-клетки измеримая амплификация отмечалась только для мишени hALB, при этом для мишени трансгена амплификация не наблюдалась. Продукты мультиплексной кПЦР также анализировали на геле, чтобы выявить наличие нецелевых полос при проведении мультиплексной реакции двух наборов праймеров/зондов (см. пример изображения гель-электрофореза на ФИГ. 2). Для любой из мультиплексных реакций в результатах гелей не наблюдалось никаких неожиданных полос. Было принято решение провести тест стандартной кривой в обычных реакциях, чтобы определить возможность влияния мультиплексности реакции на эффективность кПЦР. С учетом того, что в мультиплексной реакции в приемлемом диапазоне была только эффективность реакции трансгена (RP) набор 2, в обычной реакции тестировали только наборы праймеров/зондов трансгена (RP) набор 2 и hALB набор 2. Обычная реакция для трансгена (RP) набор 2 приводила к снижению эффективности кПЦР, которая оказывалась за пределами приемлемого диапазона. Обычная реакция для hALB набор 2 приводила к повышению эффективности кПЦР, которая оказывалась в пределах приемлемого диапазона. Ни попытки оптимизировать концентрации праймеров/зондов обоих целевых наборов олигонуклеотидов, ни использование более высокой температуры отжига не улучшали эффективности любой стандартной кривой мишени в мультиплексных реакциях. Затем проводили мультиплексные реакции для обоих приемлемых наборов праймеров/зондов трансгена с праймерами/зондами hALB набор 1.

[00229] Сначала проводили мультиплексную реакцию трансгена (FP) набор 1 и hALB набор 1 и получали $R^2 > 0,98$ для стандартной кривой только hALB. Для стандартной кривой мишени трансгена R^2 составлял $< 0,97$. Стандартные кривые мишеней как трансгена, так и hALB демонстрировали эффективность вне приемлемого диапазона, и у мишени трансгена наблюдалась меньшая эффективность, чем в случае мультиплексной реакции с праймерами/зондами hALB набор 2. Обычная реакция hALB набор 1 демонстрировала $R^2 \geq 0,98$ и приводила к аналогичной эффективности, которая отмечалась в мультиплексной реакции. Новую стандартную кривую строили по 5 точкам в рамках схемы 4-кратного разбавления и с использованием меньшего количества плазмиды pLLV- LICAR2SIN и имитационной ДНК Т-клетки в стандарте № 1. Такой подход использовали в рамках попытки повысить эффективности кПЦР за счет возможного разбавления любых потенциальных ингибиторов ПЦР, которые могли присутствовать в исходной имитационной ДНК Т-клетки, а также за счет снижения количества имитационной ДНК Т-клетки, необходимого для получения более крупных партий и стандартов. Как приемлемые наборы праймеров/зондов трансгена, так и набор праймеров/трансгена hALB набор 1 впоследствии тестировали в мультиплексных реакциях с использованием этой новой стандартной кривой. Значения R^2 и эффективности для обеих стандартных кривых как трансгена, так и hALB хорошо укладывались в приемлемый диапазон для мультиплексной реакции трансген (FP) набор 1/ hALB набор 1 и мультиплексной реакции трансген (RP) набор 2/hALB набор 1 с использованием новой стандартной кривой. Проводили также анализ продуктов мультиплексной реакции кПЦР на геле, чтобы убедиться в отсутствии нецелевых полос (см. ФИГ. 3). Во всех мультиплексных реакциях нецелевые полосы отсутствовали. Несмотря на близкие показатели эффективности между мультиплексными реакциями двух наборов трансгенных праймеров/зондов, форма кривых амплификации мишени трансгена для мультиплексной реакции трансгена (RP) набор 2/hALB набор 1 была более характерна для типичной сигмоидной кривой с более выраженным верхним плато, чем для мультиплексной реакции трансген (FP) набор 1/hALB набор 1 (см. ФИГ. 4). Поэтому наборы праймеров/зондов трансген (RP) набор 2 и hALB набор 1 были выбраны для дальнейшей разработки метода трансгенной кПЦР.

[00230] Устранение проблем воспроизводимости эффективности.

[00231] Мультиплексную реакцию трансген (RP) набор 2/hALB набор 1 с использованием схемы новой стандартной кривой повторяли, чтобы определить

воспроизводимость приемлемых результатов для R^2 и эффективностей. Однако соответствие стандартной кривой для обеих мишеней как трансгена, так и hALB для повторного анализа составляло всего лишь 88% и 89% соответственно. Попытка оптимизировать концентрации праймеров/зондов для обеих мишеней незначительно улучшила эффективность для обеих мишеней, но эксперименты с увеличением температуры отжига и применение энхансеров ПЦР DMSO, TMAC и бетаина не приводило к таким результатам. В то же время исследовали воспроизводимость результатов по эффективности, и возникал вопрос, можно ли увеличить диапазон VCN/клетка, охватываемый стандартной кривой 4-кратного разбавления, чтобы снизить возможный предел количественного определения при анализе. Поэтому проводили мультиплексные реакции с использованием пяти замороженных образцов стандартных точек 4-кратного разбавления, а также получали стандартную кривую из пяти точек 5-кратного разбавления замороженного стандарта № 1. Впоследствии в мультиплексной реакции кПЦР одновременно получали две стандартные кривые. Для стандартной кривой 4-кратного разбавления получали эффективности 94% и 91% для мишеней трансгена и hALB соответственно. Для стандартной кривой 5-кратного разбавления получали эффективности 102% и 99% для мишеней трансгена и hALB соответственно. Предполагалось, что увеличение эффективности, наблюдавшееся в стандартной кривой 5-кратного разбавления по сравнению с 4-кратным, могло быть следствием повышенной варьируемости в нижних точках стандартной кривой в случае, когда такие нижние точки стандартной кривой относятся к замороженным образцам, по сравнению с разбавлением замороженного стандарта № 1, чтобы получить свежие стандарты № 2–5 непосредственно перед получением кривой в ходе анализа.

[00232] Кривые 4-кратного и 5-кратного разбавления повторяли, чтобы убедиться в том, что эффективности по-прежнему демонстрировали улучшение для 5-кратной «свежей» стандартной кривой по сравнению с точками 4-кратной «замороженной» стандартной кривой. При повторном анализе для стандартной «замороженной» кривой 4-кратного разбавления получали эффективности 94% и 88% для мишеней трансгена и hALB соответственно. Для стандартной «свежей» кривой 5-кратного разбавления получали эффективности 102% и 99% для мишеней трансгена и hALB соответственно. Проводили дополнительные анализы, чтобы дополнительно удостовериться в воспроизводимости таких результатов сравнения «замороженной» и «свежей» стандартных кривых (см. ФИГ. 5). Было определено, что основная причина проблем

варьируемости, наблюдаемой для эффективностей стандартной кривой, была связана с использованием точек «замороженной» стандартной кривой. Поэтому было принято решение готовить только стандарт № 1 и замораживать его в виде одноразовых аликвот. Такой замороженный стандарт № 1 в дальнейшем будет использован для получения свежих стандартов № 2–5 непосредственно перед проведением любого анализа. Было также определено, что для расширения диапазона VCN/клетка в анализе в дальнейшем будет использована стандартная кривая 5-кратного разбавления.

[00233] Устранение проблем расхождений VCN/клетка при проведении кцПЦР

[00234] Анализы проводили для сбора данных, а также для приготовления по меньшей мере первых 6 партий материала. В анализе VCN/клетка использовали мишени участков промотора RU5 каркаса плазмиды pLLV-LICAR2SIN [АВТОРЫ ИЗОБРЕТЕНИЯ: Нужна ли дополнительная более подробная информация для описания таких участков, или приведенные данные достаточно конкретны для специалиста в данной области?] Метод трансгенной кПЦР призван заменить такой каркасный метод, поскольку существует нормативное требование о том, что для клеточной терапии мишенью анализа VCN/клетка кПЦР должен быть трансгенный участок плазмиды CAR. Поэтому требовалось, чтобы результаты метода VCN/клетка были сопоставимы с результатами метода трансгенной кПЦР. В методе трансгенной кПЦР тестировали геномную ДНК из CAR T и сравнивали с результатами для образца LB_12. Проводили кцПЦР для трансгенных стандартов и контрольных образцов, чтобы определить точность установленных значений числа копий трансгена и hALB. Также проводили кцПЦР образца LB_12 ДНК, чтобы определить истинное значение VCN/клетка.

[00235] В реакции кцПЦР использовали праймеры/зонды трансгена (RP) набор 2 и hALB набор 1 в основной смеси BioRad Supermix for Probes для кцПЦР. Использовали условия термоциклирования, рекомендованные в наборе Supermix. В соответствии с рекомендациями для получения наиболее точных результатов кцПЦР было необходимо ферментативное расщепление ДНК, поэтому к основной смеси добавляли EcoRI. Было подтверждено, что EcoRI осуществляет лишь однократное расщепление плазмиды pLLV-LICAR2SIN и не расщепляет участок амплификации в мишенях трансгена или hALB. Результаты кцПЦР подтвердили, что трансгенные стандарты и контрольные образцы для копий трансгена и hALB были выбраны верно, но результат для LB_12 был в большей степени сопоставим с результатом для RU5 VCN/клетка. Было

непонятно, почему трансгенные стандарты и контрольные образцы были правильными, тогда как кцПЦР определила, что результаты для VCN/клетка по результатам кПЦР для LB_12 оказались неточными. Поэтому использовали ферменты, которые расщепляют плазмиду pLLV-LICAR2SIN более одного раза, полагая, что меньшие фрагменты ДНК для гДНК LB_12 могут обеспечить более точные результаты. Опробовали два дополнительных фермента, один с двукратным расщеплением, а второй с трехкратным расщеплением, но результаты VCN/клетка в кцПЦР не изменились. Поэтому было проведено ферментативное расщепление нескольких образцов ДНК CAR T и двух трансгенных контрольных образцов, остановка реакции и трансгенная кПЦР ДНК вместе с нерасщепленными стандартами, контрольными образцами и образцами CAR T. Результаты VCN/клетка для расщепленных контрольных образцов были в ~ 3,8 раза выше результатов VCN/клетка для нерасщепленных образцов, тогда как для расщепленных образцов CAR T результаты VCN/клетка были в ~ 1,3 раза ниже результатов для нерасщепленных образцов CAR T. Эти результаты поставили под сомнение необходимость линеаризации плазмиды pLLV- LICAR2SIN, чтобы получить точные результаты VCN/клетка для образцов.

[00236] Линеаризацию плазмиды pLLV-LICAR2SIN проводили посредством расщепления плазмиды с использованием фермента EcoRI. Ферментативное расщепление останавливали и проводили количественное определение линеаризованной плазмиды. Линеаризованную плазмиду разбавляли до соответствия числу копий трансгена в стандартной кривой трансгена 5-кратного разбавления и проводили анализ трансгенной кПЦР. Анализ также проводили для ДНК LB_12 CAR T, и рассчитывали данные VCN/клетка по результатам для кольцевой (нерасщепленной) и линеаризованной стандартной кривой. Значения Ct для точек линеаризованной стандартной кривой были в ~ 2 раз ниже, чем для точек нерасщепленной стандартной кривой (см. ФИГ. 6). Кроме того, полученные для LB_12 результаты VCN/клетка, рассчитанные из линеаризованной стандартной кривой, были сопоставимы с полученными в кцПРЦ, а также с полученными в дополнительном методе RU5 кПЦР, тогда как результаты VCN/клетка, рассчитанные по кольцевой (нерасщепленной) стандартной кривой, были в ~ 4 раз выше. Таким образом, подтвердилась необходимость в линеаризации плазмиды pLLV-LICAR2SIN, чтобы получить точные результаты для VCN/клетка. Было получено две партии стандарта и контрольных образцов линеаризованной плазмиды, одна крупная партия для использования в

качестве партии согласно Правилам производства и контроля качества лекарственных средств (GMP) для контроля готовой продукции клинической партии и любого другого GMP исследования, и одна меньшая партия для использования при обучении специалистов по анализу и в любой не связанной с GMP деятельности.

[00237] Линейность постоянного количества ДНК, присущая образцу

[00238] Образец ДНК разбавляли до концентрации 0,02 мкг/мл и проводили анализ кПЦР для 5 мкл для всего 100 нг ДНК на каждую реакцию. Можно проводить анализ непосредственно для образцов с исходными концентрациями < 0,02 мкг/мкл, но приемлемый диапазон для копий hALB должен быть скорректирован исходя из количества ДНК, вводимого в реакцию. Стандартную кривую получали для начальной концентрации имитационной ДНК Т-клетки 0,05 мкг/мкл и разбавляли буфером ТЕ с низким содержанием EDTA, чтобы получить стандартную кривую для мишеней как трансгена, так и hALB (см. таблицу 3). Для обеспечения сохранения линейности анализа в приемлемом диапазоне в случае, если стандартную кривую строили при постоянном количестве имитационной гДНК Т-клетки, характерном для данного образца, получали характеризующую стандартную кривую для имитационной ДНК Т-клетки в концентрации 0,02 мкг/мкл и с последовательными разбавлениями 0,02 мкг/мкл имитационной ДНК Т-клетки (см. таблицу 4). Эту стандартную кривую впоследствии анализировали одновременно с обычной стандартной кривой, чтобы убедиться в линейности анализа (см. ФИГ. 7). Также строили график логарифма наблюдаемых копий в зависимости от ожидаемых копий, чтобы удостовериться в том, что измеренные результаты числа трансгенных копий для характеризующей стандартной кривой приводили к линейной зависимости с $R^2 \geq 0{,}98$ (см. ФИГ. 8).

[00239] Характеризующая стандартная кривая продемонстрировала по-прежнему существующую возможность точного количественного определения числа трансгенных копий при концентрации ДНК, соответствующей обычным концентрациям в образце (0,02 мкг/мкл).

Таблица 3. Стандартная кривая кПЦР трансгена

Стандарт №	**Объем предыдущего стандарта (мкл)**	**Объем буфера ТЕ (мкл)**	**Кратность разбавления**	**Копии трансгена**	**Копии hALB**
1	Н/П	Н/П	Н/П	121212,121	75757,576
2	5	20	5	24242,424	15151,515
3	5	20	5	4848,485	3030,303
4	5	20	5	969,697	606,061
5	5	20	5	193,939	121,212

Таблица 4. Характеризующая стандартная кривая кПЦР трансгена

Стандарт №	**Объем предыдущего стандарта (мкл)**	**Объем имитационной ДНК при 0,02 мкг/мкл (мкл)**	**Кратность разбавления**	**Число трансгенных копий**	**Число копий hALB**
1	Н/П	Н/П	Н/П	121212,121	30303,030
2	5	20	5	24242,424	30303,030
3	5	20	5	4848,485	30303,030
4	5	20	5	969,697	30303,030
5	5	20	5	193,939	30303,030

[00240] Аттестация метода

[00241] Аттестацию метода трансгенной кПЦР осуществляли в соответствии с руководящими указаниями Международной конференции по гармонизации (ICH) и MIQE (требованиями по минимальной информации для публикации данных экспериментов количественной ПЦР в реальном времени). Для проведения аттестации метода проводили три анализа. Проведенный анализ удовлетворял критериям соответствия для всех параметров аттестации метода, установленных в протоколе аттестации метода. В таблице 5 приведены параметры аттестации метода, критерии соответствия и результаты аттестации (см. пример 2).

Таблица 5. Сводные данные по аттестации метода трансгенной мультиплексной кПЦР

Параметр	Критерии соответствия	Результаты
Воспроизводимость	% CV результатов трех измерений VCN/клетка для среднего и слабого контролей анализа для каждого достоверного аттестационного анализа должен составлять ≤ 30%.	Средний контроль (2,00 VCN/клетка): 4–6% Слабый контроль (0,20 VCN/клетка): 4–6%
Внутрилабораторная воспроизводимость	% CV результатов измерений VCN/клетка для среднего и слабого контролей анализа для всех достоверных аттестационных анализов должен составлять ≤ 30%.	Средний контроль (2,00 VCN/клетка): 4% Слабый контроль (0,20 VCN/клетка): 6%

Специфичность (имитационная ДНК Т-клетки)	Все значения Ct повторных измерений для имитационной ДНК Т-клетки должны относиться к категории «не определяется» для мишени трансгена, и при этом для каждого достоверного аттестационного анализа среднее число копий hALB должно находиться в пределах 21 212–39 394.	Мишень трансгена: для каждого анализа все значения Ct повторных измерений относились к категории «не определяется». Мишень hALB: среднее число копий hALB находилось в диапазоне 28 719–29 611.
Специфичность (ДНК CAR T)	Все повторные измерения ДНК CAR T должны демонстрировать количественно определяемый результат трансгена, и при этом для каждого достоверного аттестационного анализа среднее число копий hALB должно находиться в пределах в пределах 21 212–39 394.	Мишень трансгена: все значения числа копий были определимы количественно и находились в диапазоне 4592,801–5153,907. Мишень hALB: среднее число копий hALB находилось в диапазоне 31 552–33 725.
Диапазон (мишень трансгена)	Диапазон определяется как диапазон числа копий, охватываемый стандартной кривой по 5 точкам, при условии, что мишень трансгена удовлетворяет всем критериям в отношении точности, линейности и внутрилабораторной воспроизводимости.	Диапазон: 193,939–121 212,121 копий
Диапазон (мишень hALB)	Диапазон определяется как диапазон числа копий, который охватывает стандартная кривая по 5 точкам, при условии, что мишень hALB соответствует всем критериям точности, линейности и внутрилабораторной воспроизводимости.	Диапазон: 121,212–75 757,576 копий
LOQ (мишень трансгена)	Предел количественного определения (LOQ) определяется как результат для числа копий трансгена для образца с наименьшим LOQ, для которого должен наблюдаться % CV ≤ 20% для результата среднего числа копий трансгена и результатов среднего VCN/клетка, а также % извлечения в пределах 70–130% для результата среднего числа копий трансгена и результата среднего VCN/клетка для каждого достоверного аттестационного анализа.	LOQ: число копий трансгена образца LOQ 0,02 VCN/клетка составляет 303,030.
LOQ (мишень hALB)	LOQ определяется как значение числа копий стандарта № 5, при условии, что мишень hALB соответствует всем критериям точности, линейности и внутрилабораторной воспроизводимости.	LOQ: 121,212 копий

ПРИМЕР 2. Метод трансгенной кПЦР

[00242] 1.0 Цель

1.1 В настоящем примере представлен вариант процедуры проведения анализа с помощью количественной ПЦР в реальном времени (кПЦР) для количественного определения плазмиды LiCAR, интегрированной в продукт CAR T. Анализ проводят в форме мультиплексной кПЦР, где в качестве мишени выступает сшивка между участками CD137 и CD3z плазмиды LiCAR, а также человеческий альбумин (референсный ген).

[00243] 2.0 Область применения

2.1 Этот метод может быть применен к CAR T-клеткам после сбора клеток непосредственно до подготовки состава дозы для определения следующих параметров:

2.1.1 Число копий вектора

2.1.2 Эффективность трансдукции

2.1.3 Идентичность экспрессии LiCAR

[00244] 3.0 Определения и сокращения

3.1 LOQ (предел количественного определения)

3.2 NTC (контроль без матрицы)

3.3 Ct (порог цикла)

3.4 CV (коэффициент вариации)

3.5 SD (стандартное отклонение)

3.6 hALB (человеческий альбумин)

3.7 BCMA (антиген созревания B-клеток)

3.8 VCN (число копий вектора)

[00245] 4.0 Оборудование

4.1 Центрифуга, способная центрифугировать 96-луночные планшеты ПЦР (например: Beckman Coulter, Allegra X-14R с ротором SX4750 и поворотным держателем для 96-луночного планшета)

4.2 Система для ПЦР в реальном времени QuantStudio 6

4.3 Морозильная камера с температурой -70 °C

4.4 Морозильная камера с температурой -20 °C

4.5 Калиброванные 8- или 12-канальные пипетки (20, 50 мкл или другого соответствующего объема), например: пипетки Rainin

4.6 Калиброванные одноканальные пипетки (20, 100, 200, 1000 мкл или другого соответствующего объема), например: пипетки Rainin

4.7 Холодильник или холодильная камера, способные поддерживать температуру 2–8 °C

4.8 Программное обеспечение QuantStudio PCR вер. 1.3 или выше

4.9 Вихревая мешалка

4.10 Бокс биологической безопасности

[00246] 5.0 Материалы

Примечание. Материалы с оговоркой «например» могут быть заменены аналогичными материалами

без предварительной сертификации. Для материалов с оговоркой «или эквивалент» до использования для тестирования образцов необходимо подтвердить эквивалентность альтернативной замены.

5.1 Вода без ДНКаз/РНКаз, например: Invitrogen кат. № 10977015.

5.2 Основная смесь TaqPath ProAmp, ThermoFisher кат. № A30866 или эквивалент.

5.3 Сертифицированная партия трансгена BCMA и праймеры и зонды ALB, специально созданные последовательности от IDT или эквивалент.

5.4 Сертифицированная партия трансгена BCMA стандарт № 1

5.5 Сертифицированная партия среднего и слабого контроля трансгена BCMA

5.6 1X буфер TE с низким содержанием EDTA, pH 8,0, без РНКаз/ДНКаз, например: Quality Biological кат. № 351-324-721.

5.7 Центрифужные пробирки 0,5 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: Eppendorf кат. № 022431005

5.8 Центрифужные пробирки 1,5 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: Eppendorf кат. № 022431021

5.9 Центрифужные пробирки 2 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: Eppendorf кат. № 022431048

5.10 Центрифужные пробирки 5 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: Eppendorf кат. № 0030119460

5.11 Наконечники пипеток, стерильные, с фильтром (20, 200, 1000 мкл или другого соответствующего объема), например: Rainin кат. № 30389226, 30389240, 30398213

5.12 96-луночные планшеты для ПЦР, Applied Biosystems, кат. № 4483343, 4483354, 4483349, 4483350, 4483395 или эквивалент

5.13 Оптическая адгезивная пленка Micro Amp, Applied Biosystems, кат. № 4311971 или эквивалент

5.14 Емкости для реагентов без РНКаз/ДНКаз, например: VistaLabs кат. № 3054-1002

[00247] 6.0 Меры предосторожности

6.1 При работе в лаборатории использовать надлежащие СИЗ.

6.2 При работе с опасными химическими веществами следовать специальным инструкциям для конкретных условий работы. Более подробную информацию см. в паспорте безопасности производителя.

6.3 Все стадии отбора проб пипетками необходимо осуществлять с использованием асептических методик в боксе биологической безопасности. Проводящим анализ рекомендуется использовать одноразовые нарукавники при выполнении всех стадий процедуры, чтобы свести к минимуму риск загрязнения любых материалов или реагентов.

[00248] 7.0 Процедура

7.1 Приготовить аликвоту каждого из перечисленных ниже компонентов:

7.1.1 Прямой праймер трансгена BCMA рабочий исходный раствор 10 мкМ

7.1.2 Обратный праймер трансгена BCMA рабочий исходный раствор 10 мкМ

7.1.3 Зонд трансгена BCMA рабочий исходный раствор 10 мкМ

7.1.4 Прямой праймер hALB рабочий исходный раствор 10 мкМ

7.1.5 Обратный праймер hALB рабочий исходный раствор 10 мкМ

7.1.6 Зонд hALB рабочий исходный раствор 10 мкМ

7.1.7 Сертифицированный стандарт № 1 трансгена BCMA для кПЦР

7.1.8 Сертифицированный средний контроль 2,00 копии/клетка трансгена BCMA для кПЦР

7.1.9 Сертифицированный слабый контроль 0,20 копии/клетка трансгена BCMA для кПЦР

7.2 Получить мультиплексную основную смесь для соответствующего числа реакций в соответствии с таблицей 6. Можно внести дополнительные добавочные реакции, включая больше образцов, чем фактически будет проанализировано. Например, если будет проанализировано 10 образцов, но требуется более 10 добавочных реакций, которые уже включены в расчеты в таблице, следует указать, что будет проанализировано 11 образцов (т. е. N = 11). Каждый дополнительный образец будет увеличивать объем для 3 реакций.

Таблица 6. Композиция основной смеси

Реагент	**Объем для N образцов (мкл)***	**Конечная концентрация в 25 мкл суммарной реакции**
Основная смесь TaqPath ProAmp	12,5 x (34 + 3N)	1X
Вода без ДНКаз/РНКаз	5,625 x (34 + 3N)	Н/П
Прямой праймер трансгена (10 мкМ)	0,25 x (34 + 3N)	100 нМ
Обратный праймер трансгена (10 мкМ)	0,25 x (34 + 3N)	100 нМ
Зонд трансгена FAM (10 мкМ)	0,5 x (34 + 3N)	200 нМ
Прямой праймер hALB (10 мкМ)	0,1875 x (34 + 3N)	75 нМ
Обратный праймер hALB (10 мкМ)	0,1875 x (34 + 3N)	75 нМ
Зонд hALB HEX (10 мкМ)	0,5 x (34 + 3N)	200 нМ

* Формула представляет собой объем компонента, необходимый для одной реакции 25 мкл, помноженный на сумму 24 лунок стандартов/контролей плюс 10 добавочных реакций (34) и 3* число образцов (по 3 лунки реакции на образец).

7.3 Пробирку с основной смесью в течение непродолжительного времени перемешивать в вихревой мешалке и отставить.

7.4 Приготовить стандарты № 2–5 с использованием буфера TE с низким содержанием EDTA в соответствии с таблицей 7. Перед тем как переходить к следующей стадии разбавления, обязательно перемешивать каждый разбавленный образец в течение непродолжительного времени.

Таблица 7. Построение стандартной кривой 5-кратного разбавления по 5 точкам

Стандарт №	**Объем предыдущего стандарта (мкл)**	**Объем буфера TE (мкл)**	**Кратность разбавления**	**Копии трансгена**	**Копии hALB**
1	Н/П	Н/П	Н/П	121212,121	75757,576
2	5	20	5	24242,424	15151,515
3	5	20	5	4848,485	3030,303
4	5	20	5	969,697	606,061
5	5	20	5	193,939	121,212

7.5 Еще раз перемешать раствор основной смеси в течение непродолжительного времени в вихревой мешалке и перенести пипеткой смесь в резервуар для реагента.

7.6 С помощью многоканальной пипетки перенести 20 мкл основной смеси в соответствующие лунки 96-луночного планшета для ПЦР (см. ФИГ. 9)

7.7 Загрузить 5 мкл стандартов, контролей и образец ДНК в соответствующие лунки 96-луночного планшета для ПЦР с помощью одноканальной пипетки в соответствии с расположением областей в планшете на ФИГ. 9. Загрузить 5 мкл буфера TE с низким содержанием EDTA в лунки NTC.

7.8 Запечатать планшет оптической липкой пленкой и непродолжительно центрифугировать в течение при ~ 300 x g.

7.9 Установить планшет для ПЦР в приборе ПЦР.

7.10 Открыть файл «Assay Template.edt», выбрать «Save As», ввести соответствующее имя для эксперимента кПЦР и сохранить как файл .eds. Не перезаписывать файл шаблона.

7.11 Задать имя эксперимента в поле имени.

7.12 Проверить, что Experiment Properties заданы в соответствии с приведенным ниже, а условия термоциклирования (закладка Run Method) заданы верно в соответствии с приведенными в таблице 8 для реакционного объема 25 мкл.

7.12.1 Тип прибора: QuantStudio 6 Flex System

7.12.2 Тип планшета: 96-луночный (0,2 мл)

7.12.3 Тип эксперимента: Стандартная кривая

7.12.4 Реагент обнаружения: TaqMan Reagents

7.12.5 Свойства прибора: Стандартные

Таблица 8. Условия термоциклирования

Этап 1	**Этап 2**	**Этап 3 (40 циклов)**	
50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
2 мин	10 мин	15 сек	1 мин
Активация UNG	Активация полимеразы	Денатурация/плавление	Отжиг/удлинение

7.13 Выбрать запуск и кликнуть по серийному номеру прибора для проведения анализа.

[00242] 8.0 Анализ данных

8.1 Использовать автоматическую коррекцию исходной линии и функцию автоматического Ct в программном обеспечении для анализа данных, нажав «Analyze». Затем нажать «Save» для сохранения результатов анализа.

8.2 Напечатать отчет в формате PDF и включить его в документацию анализа.

8.3 Произвести расчет трех измерений VCN/клетка для каждого образца и положительного контроля следующим образом.

$$VCN/клетка = \left(\frac{Количество\ трансгена}{Количество\ hALB}\right) * 2$$

8.4 Произвести расчет среднего, стандартного отклонения и % CV по трем измерениям VCN/клетка для каждого образца и положительного контроля.

[00249] 9.0 Критерии соответствия для анализа

9.1 Критерии соответствия для анализа

9.1.1 Значение R2 стандартных кривых для трансгена и hALB должно составлять ≥ 0,97.

9.1.2 Наклон стандартной кривой должен находиться в пределах от -3,585 до -3,104 (эквивалентно эффективности ПЦР 90,08–109,97%)

9.1.3 Ни одно значение Ct повторных измерений для любого из стандартов не может относиться к категории «не определяется».

9.1.4 Все значения Ct повторных измерений NTC должны относиться к категории «не определяется» для мишеней как трансгена, так и hALB.

9.1.5 Среднее значение Ct для стандарта № 1 должно быть < 23,0 для мишени трансгена и < 22,0 для мишени hALB.

9.1.6 Значения SD для Ct для каждого стандарта должны быть ≤ 0,60 для мишеней как трансгена, так и hALB.

9.1.7 Среднее число копий hALB для среднего и слабого контроля должно составлять 30 303,030 копий +/-30% (ожидаемый диапазон: 21 212,121–39 393,939 копий).

9.1.8 Средний результат VCN/клетка для среднего контроля 2,00 VCN/клетка и слабого контроля 0,20 VCN/клетка должен составлять +/-35% целевого значения VCN/клетка для каждого контроля.

9.1.9 % CV для повторных измерений среднего и слабого положительных контролей VCN/клетка должен составлять ≤ 20%

9.1.10 В случае несоответствия по любому из перечисленных выше критериев анализ является недостоверным.

9.2 Критерии соответствия для образца

9.2.1 Среднее число копий hALB для каждого образца должно составлять 30 303,030 копий +/-30% (ожидаемый диапазон: 21 212,121–39 393,939 копий).

9.2.1.1 Если концентрация образца гДНК составляет < 0,02 мкг/мл, произвести расчет ожидаемого числа копий hALB для этого образца, исходя из количества ДНК, фактически введенного в реакции.

Пример. Концентрация образца гДНК составляет 0,01 мкг/мл. (5 мкл)(0,01 мкг/мкл) = 0,05 мкг = 50 нг образца гДНК на каждую реакцию (50 нг ДНК)(1 копия ALB / 0,0033 нг гДНК) = 15 152 копий ALB. Ожидаемый диапазон: 10 606–19 697 копий ALB.

9.2.2 Значения копий мишени hALB по результатам трех измерений для образца должны находиться в пределах диапазона Ct, который охватывает стандартная кривая hALB. Диапазон Ct определяется как наименьшее значение Ct трех измерений стандарта № 1 и наибольшее значение Ct трех измерений стандарта № 5.

9.2.3 Значения копий мишени трансгена по трем измерениям образца должны быть выше LOQ копий трансгена 303,030.

9.2.3.1 Если 1 или более повторных измерений образца для мишени трансгена меньше, чем LOQ трансгена, составляющего 303,030 копий, следует указывать, что образец ниже LOQ.

9.2.4 Если 1 или более повторных измерений образца для мишени трансгена меньше наименьшего значения Ct трансгена для стандарта № 1, следует указывать, что образец выше диапазона стандартной кривой, образец невозможно определить количественно. Например, если значения Ct трансгена для образца составляют 20,1, 19,9 и 20,2, но наименьшее значение Ct трансгена, достигнутое в стандарте № 1 составляет всего лишь 20,0, тогда повторное измерение образца 19,9 не может быть точно определено количественно, а потому данный образец должен быть промаркирован как «выше диапазона стандартной кривой, образец невозможно определить количественно». При невозможности количественного определения образца уведомить руководство и ответственного за проведение исследования.

9.2.5 % CV повторных измерений VCN/клетка образца должен составлять $\leq 20\%$.

Примечание. % CV не оценивают для образцов с повторными измерениями ниже LOQ или для образцов с невозможностью количественного определения.

9.2.6 Для любого образца, у которого все значения числа копий трансгена для всех трех повторных измерений выше LOQ и отвечающего всем приведенным выше критериям соответствия, будут приведены средние значения VCN/клетка до 2 десятичных разрядов (например: 2,02 VCN/клетка).

9.2.7 Любой образец, который не соответствует всем перечисленным выше критериям соответствия, является недостоверным.

Выделение, аттестация и разбавление геномной ДНК

[00250] 1.0 Цель

1.1 Описан пример процедуры для выделения и количественного определения гДНК для CAR T образцов или имитационных суспензий Т-клеток или замороженных конгломератов клеток.

[00251] 2.0 Область применения

2.1 Описана процедура для выделения гДНК из:

2.1.1 Образцов CAR Т-клеток после сбора, поставляемых в виде замороженных конгломератов клеток или суспензии свежих клеток.

2.1.2 Имитационных Т-клеток, поставляемых в виде замороженных конгломератов клеток или суспензии свежих клеток.

[00252] 3.0 Оборудование

3.1 Центрифуга, способная центрифугировать микроцентрифужные пробирки 1,5 мл и 5 мл (например: Beckman Coulter, Allegra X-14R с ротором SX4750 для микроцентрифужных пробирок 1,5 мл)

3.2 Флуориметр Qubit 4, Invitrogen кат. № Q33226

3.3 Морозильная камера с температурой -70 °C

3.4 Морозильная камера с температурой -20 °C

3.5 Калиброванные одноканальные пипетки (20, 100, 200, 1000 мкл или другого соответствующего объема), например: пипетки Rainin

3.6 Термоблок, способный поддерживать температуру 55 °C и подходящий для микроцентрифужных пробирок 1,5 мл и 2 мл

3.7 Холодильник или холодильная камера, способные поддерживать температуру 2–8 °C

3.8 Вихревая мешалка

3.9 Бокс биологической безопасности

[00253] 4.0 Материалы

Примечание. Материалы с оговоркой «например» могут быть заменены аналогичными материалами без предварительной сертификации. Для материалов с оговоркой «или эквивалент» до использования для тестирования образцов следует подтвердить эквивалентность альтернативной замены.

4.1 Вода без ДНКаз/РНКаз, например: Invitrogen кат. № 10977015.

4.2 Среда RPMI 1640 с L-глутамином и 25 мМ HEPES, например: Corning кат. № 10-041-CV

4.3 1X буфер TE с низким содержанием EDTA, pH 8,0, без РНКаз/ДНКаз, для молекулярной биологии, например: Quality Biological кат. № 351-324-721.

4.4 Этанол 200 спиртовых градусов (96–100%) для молекулярной биологии, например: Decon Labs кат. № 3616EA

4.5 10X фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) для молекулярной биологии, например: Affymetirx кат. № 75889

4.6 Мининабор для геномной ДНК PureLink, Invitrogen кат. № K182001

4.7 Аналитические пробирки Qubit™, Invitrogen™ кат. № Q32856 (Invitrogen, г. Карлсбад, штат Калифорния). 4.9 Набор для анализа Qubit dsDNA BR, Invitrogen кат. № Q328350

4.9 Центрифужные пробирки 0,5 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: Eppendorf кат. № 022431005

4.10 Центрифужные пробирки 1,5 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: Eppendorf кат. № 022431021

4.11 Центрифужные пробирки 2 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: Eppendorf кат. № 022431048

4.12 Центрифужные пробирки 5 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: Eppendorf кат. № 0030119460

4.13 Конические пробирки 15 мл, стерильные, например: Corning кат. № 431470

4.14 Наконечники пипеток, стерильные, с фильтром (20, 200, 1000 мкл или другого соответствующего объема), например: Rainin кат. № 30389226, 30389240, 30398213

[00254] 5.0 Меры предосторожности

5.1 При работе в лаборатории использовать надлежащие СИЗ.

5.2 При работе с опасными химическими веществами следовать специальным инструкциям для конкретных условий работы. Более подробную информацию см. в паспорте безопасности производителя.

5.2 Все стадии отбора проб пипетками необходимо осуществлять с использованием асептических методик в боксе биологической безопасности. Проводящим анализ рекомендуется использовать одноразовые нарукавники при выполнении всех стадий процедуры, чтобы свести к минимуму риск загрязнения любых материалов или реагентов.

[00255] 6.0 Процедура

6.1 При вскрытии нового мининабора для геномной ДНК PureLink обязательно добавить этанол во флаконы Wash Buffer 1 и Wash Buffer 2 в соответствии с инструкциями на этикетке каждого флакона. Хорошо перемешать содержимое флаконов после добавления этанола и указать на каждой этикетке, что этанол уже был добавлен. Вместе с отметкой о добавлении этанола указать инициалы и дату

добавления. При хранении всех компонентов при комнатной температуре набор стабилен в течение 1 года.

6.2 Задать температуру термоблока равной 55 °С и до начала экстрации ДНК дождаться достижения заданной температуры.

6.3 Экстракцию ДНК проводить с использованием конгломератов клеток. Можно использовать свежие конгломераты клеток или конгломераты клеток, хранившиеся замороженными при -70 °С. Рекомендуется проводить экстракцию минимум $2x10^6$ клеток на колонку, однако можно экстрагировать до $4x10^6$ жизнеспособных клеток на колонку.

Примечание. Несмотря на то что в спецификации производителя указано, что на каждую колонку можно экстрагировать до $5x10^6$ клеток, в настоящем методе для определения числа клеток для выделения ДНК используют число жизнеспособных клеток. Поэтому используют 20%-й буфер, допускающий наличие мертвых клеток, которые также будут содержаться в суспензии клеток. Не следует превышать указанный уровень $4x10^6$ жизнеспособных клеток на колонку. Если процент жизнеспособности менее 80%, максимальное число экстрагируемых жизнеспособных клеток на колонку следует снизить, чтобы учесть > 20% мертвых клеток, присутствующих в суспензии клеток.

6.4 Приготовление конгломератов клеток из свежей суспензии клеток.

6.4.1 Для подсчета клеток на NC-200 требуется аликвота суспензии клеток по меньшей мере 150 мкл. Аликвота может быть получена разбавлением исходной суспензии клеток в среде RPMI до объема, необходимого для того, чтобы оставаться в пределах динамического диапазона NC-200 ($5,0 \times 10^4 – 5,0 \times 10^6$ клеток/мл).

6.4.2 Для подсчета клеток использовать протокол счета.

6.4.3 Опираясь на число жизнеспособных клеток, определить объем клеток, необходимый для достижения искомого числа клеток для экстракции на каждую колонку PureLink и отобрать соответствующие аликвоты суспензии клеток в микроцентрифужные пробирки 1,5 мл или 2 мл.

Например: число жизнеспособных клеток по результатам счета NC-200 составляет $2x10^7$ клеток/мл с процентом жизнеспособности 88%. Искомое число клеток для экстракции на колонку PureLink составляет $4x10^6$ жизнеспособных клеток:

$$(клетки\ 4е6)\left(\frac{1\ мл}{клетки\ 20е6}\right) = 0{,}2\ мл$$

Поместить аликвоту 200 мкл суспензии клеток в микроцентрифужные пробирки 1,5 мл и 2 мл.

6.4.3.1 Не рекомендуется использовать аликвоту менее 100 мкл клеток на микроцентрифужную пробирку. При необходимости разбавить клетки в среде RPMI до такого числа клеток, которое позволит отбирать минимальную аликвоту 100 мкл суспензии клеток на пробирку.

6.4.4 Центрифугировать пробирки при 300xg в течение 5 мин при комнатной температуре для формирования конгломерата клеток.

6.4.5 Осторожно удалить и утилизировать среду, отделяя конгломерат (-ы) клеток.

6.4.6 Конгломерат (-ы) клеток можно сразу же использовать для выделения ДНК или хранить при -70 °C.

6.5 Экстракция ДНК

6.5.1 В случае экстракции из замороженных конгломератов клеток, прежде чем переходить к процедуре экстракции ДНК, разморозить конгломераты клеток при комнатной температуре.

6.5.2 Разбавить 10X буфер PBS до 1X, используя воду без РНКаз/ДНКаз. На каждый конгломерат клеток используют 200 мкл 1X PBS. Приготовить достаточное количество 1X PBS для ресуспендирования суммарного числа клеток, для которых будет проводиться экстракция.

6.5.3 Ресуспендировать каждый конгломерат клеток в 200 мкл 1X PBS. Перемешать, набирая в пипетку, чтобы обеспечить полное ресуспендирование конгломерата клеток.

6.5.4 В каждую пробирку добавить 20 мкл протеиназы К и перемешивать в вихревой мешалке для смешивания в течение непродолжительного времени.

6.5.5 В каждую пробирку добавить 20 мкл РНКазы А и перемешивать в вихревой мешалке для смешивания в течение непродолжительного времени.

6.5.6 Инкубировать пробирки в течение 2 мин при комнатной температуре.

6.5.7 В каждую пробирку добавить 200 мкл буфера геномного лизиса/связывания PureLink и встряхивать в течение непродолжительного времени, чтобы получить однородный раствор.

6.5.8 Установить пробирки в термоблок, предварительно нагретый до 55 °C, и инкубировать в течение 10 мин.

6.5.9 После завершения инкубации, извлечь пробирки из термоблока и добавить 200 мкл 96–100% этанола в каждую пробирку. Перемешивать на вихревой мешалке в течение непродолжительного времени для образования однородного раствора.

Примечание. Во время инкубирования при 55 °C на крышке пробирок накапливается конденсат. Открывая пробирки, следует проявлять осторожность, чтобы не допустить разбрызгивания содержимого с крышки.

6.5.10 Установить одну центрифужную колонку PureLink в каждую пробирку-сборник. Пометить крышку каждой центрифужной колонки определенным идентификатором образца, чтобы случайно не перепутать образцы. Например, центрифужные колонки могут быть помечены № партии образца. Не следует наносить метки на пробирки-сборники, поскольку в ходе выполнения протокола экстракции такие пробирки-сборники периодически утилизируются.

6.5.11 Нанести содержимое каждой пробирки с образцом после стадии 5.5.9 на помеченную соответствующим образом центрифужную колонку.

6.5.12 Центрифугировать колонку (-и) при 10 000 × g в течение 1 минуты при комнатной температуре. За время центрифугирования приготовить новые чистые пробирки-сборники для каждого образца.

6.5.13 После центрифугирования извлечь центрифужные колонки/пробирки-сборники из центрифуги. Перенести каждую центрифужную колонку в новую чистую пробирку-сборник и утилизировать отработанную пробирку-сборник вместе с фильтратом колонки.

6.5.14 Нанести 500 мкл буфера Wash Buffer 1 на каждую центрифужную колонку.

6.5.15 Центрифугировать колонку (-и) при 10 000 × g в течение 1 минуты при комнатной температуре. За время центрифугирования приготовить новые чистые пробирки-сборники для каждого образца.

6.5.16 После центрифугирования извлечь центрифужные колонки/пробирки-сборники из центрифуги. Перенести каждую центрифужную колонку в новую чистую пробирку-сборник и утилизировать отработанную пробирку-сборник вместе с фильтратом колонки.

6.5.17 Нанести 500 мкл буфера Wash Buffer 2 на каждую центрифужную колонку.

6.5.18 Центрифугировать колонку (-и) при максимальной скорости в течение 3 мин при комнатной температуре. За время центрифугирования приготовить одну микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл для каждого образца.

6.5.19 После центрифугирования извлечь центрифужную (-ые) колонку (-и)/пробирку (-и)-сборник (-и) из центрифуги. Перенести каждую центрифужную колонку в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл и утилизировать отработанную пробирку-сборник вместе с фильтратом колонки. Примечание. Не использовать пробирки-сборники, поставляемые в наборе PureLink kit для стадии 5.5.19. В наборе не поставляются дополнительные пробирки для добавочной стадии центрифугирования, поэтому необходимо использовать микроцентрифужные пробирки объемом 2 мл.

6.5.20 Центрифугировать колонку (-и) при максимальной скорости в течение 2 мин при комнатной температуре для осушения колонок. За время центрифугирования приготовить одну микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл для каждого образца. Нанести метку на каждую пробирку с указанием как минимум наименования образца и даты экстракции. Это пробирки, в которых будет произведено элюирование ДНК.

6.5.21 После центрифугирования извлечь центрифужную (-ые) колонку (-и)/пробирку (-и)-сборник (-и) из центрифуги. Перенести каждую центрифужную колонку в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл с соответствующими метками и утилизировать микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл вместе с фильтратом колонки.

6.5.22 Нанести 25 мкл геномного элюирующего буфера PureLink на колонки. Необходимо убедиться в том, что элюирующий буфер нанесен на кремнеземную мембрану, но не следует касаться мембраны или прокалывать ее наконечником пипетки.

6.5.23 Инкубировать колонки в течение 1 мин при комнатной температуре.

6.5.24 Центрифугировать колонку (-и)/пробирку (-и) при максимальной скорости в течение 1 мин при комнатной температуре для элюирования ДНК.

6.5.25 Извлечь колонку (-и)/пробирку (-и) из центрифуги и повторить стадии 5.5.22–5.5.23 с дополнительными 25 мкл геномного элюирующего буфера PureLink.

6.5.26 После инкубирования центрифугировать колонку (-и)/пробирку (-и) при максимальной скорости в течение 1,5 мин при комнатной температуре для элюирования дополнительных количеств ДНК.

6.5.27 Извлечь колонку (-и)/пробирку (-и) из центрифуги. Извлечь колонку из пробирки 1,5 мл и утилизировать колонку.

6.5.28 Элюированную ДНК можно либо хранить при -20 °С, либо сразу же провести ее количественное определение и разбавить до рабочей концентрации.

Примечание. Не следует проводить количественное определение ДНК, если ее не будут сразу же разбавлять до рабочей концентрации после количественного определения. Если было проведено количественное определение образцов, но нет возможности незамедлительно разбавить их до рабочей концентрации кПЦР, образцы следует заморозить при -20 °С, и необходимо будет провести повторное количественное определение после размораживания перед разбавлением до рабочей концентрации кПЦР.

6.6 Количественное определение ДНК

6.6.1 Количественное определение ДНК проводят с использованием набора Qubit dsDNA Broad Range и флуориметра Qubit 4. Набор отличается высокой селективностью для двухцепочечной ДНК (дцДНК) по сравнению с РНК и выполнен с возможностью обеспечения высокой точности для начальных концентраций образца 100 пг/мкл–1000 нг/мкл. Все операции с компонентами набора необходимо проводить в боксе биобезопасности и в асептических условиях во избежание загрязнения любых компонентов набора.

Примечание. Реагент Qubit dsDNA BR содержит DMSO и будет замерзать при температурах ниже комнатной. Следует избегать многократных циклов замораживания-размораживания реагента Qubit, поэтому реагент необходимо хранить при комнатной температуре. Состав буфера Qubit позволяет хранить его при комнатной температуре, и рекомендуется использовать такие условия хранения. Стандарты Qubit должны храниться при 2–8 °С.

6.6.2 Калибровку флуориметра Qubit 4 проводят с использованием двух стандартов, поставляемых в наборе Qubit dsDNA Broad Range. Необходимо приготовить стандарты и анализировать их вместе с каждым набором образцов ДНК, подлежащих количественному определению. Ни в коем случае нельзя повторно использовать калибровку после предыдущего анализа, поскольку наиболее точное количественное определение достигается в том случае, если стандарты и образцы ДНК готовятся с использованием одного и того же рабочего раствора Qubit.

6.6.3 Нанести метку на 1 аналитическую пробирку Qubit для каждого стандарта и образца, подлежащего количественному определению. Метку наносят только на

крышки пробирок. Не следует наносить метку на боковую поверхность пробирок, поскольку это будет препятствовать количественному определению.

Примечание. Только аналитические пробирки Qubit могут быть использованы для флуориметра Qubit. Эти пробирки специально выполнены с возможностью обеспечивать наиболее точные результаты.

6.6.4 Приготовить рабочий раствор Qubit, разбавляя реагент Qubit dsDNA BR в соотношении 1 : 200 в буфере Qubit dsDNA BR. Обеспечить приготовление достаточного количества рабочего раствора, чтобы его хватило как для стандартов, так и для всех образцов, подлежащих количественному определению. Минимальный необходимый объем равен (2 (2 стандарта) + число образцов, подлежащих количественному определению + 1) * 200.

Например: для количественного определения 8 образцов приготовить достаточно рабочего раствора для образцов и 2 стандарта плюс по меньшей мере один дополнительный образец для перезакладки. Предположим, по 200 мкл рабочего реагента на каждую пробирку в 11 пробирках (8 + 2 + 1 = 11 образцов): (200 мкл)(11 пробирок) = 2200 мл рабочего раствора Qubit (11 мкл реагента Qubit плюс 2189 мкл буфера Qubit).

6.6.5 Добавить 190 мкл рабочего раствора Qubit в каждую из 2 пробирок стандарта. Предварительно увлажнить наконечник пипетки рабочим раствором Qubit перед добавлением раствора в пробирки, чтобы предотвратить внесение пузырьков в реакционную смесь.

6.6.6 3–20 мкл образца ДНК может быть использовано для количественного определения с использованием набора Qubit dsDNA Broad Range при общем объеме аналитической пробирки 200 мкл. Добавить необходимый объем рабочего раствора Qubit в каждую аналитическую пробирку. Например: при использовании 3 мкл образца для количественного определения добавить 197 мкл рабочего раствора Qubit в пробирку с образцом. Предварительно увлажнить наконечник пипетки рабочим раствором Qubit перед добавлением раствора в пробирки.

6.6.7 Добавить 10 мкл каждого стандарта в соответствующую пробирку со стандартом. Перемешать содержимое пробирки со стандартом в вихревой мешалке в течение непродолжительного времени.

6.6.8 Добавить необходимое количество исходного образца ДНК в соответствующую пробирку с образцом, чтобы довести суммарный реакционный объем до 200 мкл. Например: 3 мкл образца ДНК в реакционную пробирку с образцом,

содержащую 197 мкл рабочего раствора Qubit. Перемешать содержимое каждой пробирки с образцом в вихревой мешалке в течение непродолжительного времени.

6.6.9 Инкубировать все пробирки со стандартом и образцом в течение 2 мин при комнатной температуре.

6.6.10 Сначала провести калибровку флуориметра Qubit 4 с использованием стандартов

6.6.10.1 Коснуться экрана флуориметра, чтобы вывести прибор из режима ожидания.

6.6.10.2 Выбрать опцию dsDNA на начальном экране.

6.6.10.3 На следующем экране выбрать dsDNA: Broad range.

6.6.10.4 На экране флуориметра появится запрос на выбор между считыванием новых стандартов и использованием предшествующей калибровки. Следует всегда выбирать Read Standards. Примечание. Ни в коем случае нельзя выбирать считывание образцов с использованием предшествующей калибровки (вариант Run samples), поскольку это не позволит получать наиболее точную концентрацию образца.

6.6.10.5 После запроса установить образец стандарта № 1 в Qubit. Закрыть крышку камеры для образца. Выбрать Read Standard для считывания стандарта № 1.

6.6.10.6 После запроса извлечь стандарт № 1 из камеры для образца и установить стандарт № 2. Закрыть крышку камеры для образца и выбрать Read standard для считывания стандарта № 2.

6.6.10.7 В случае успешной калибровки на экране Qubit будут отображаться ее результаты после завершения считывания стандарта

№ 2. Если калибровка оказывается неудачной, на экране Qubit будет отображаться сообщение Calibration error.

6.6.10.8 Следует убедиться в том, что показание, полученное для стандарта № 2, в по меньшей мере 10 раз выше показания, полученного для стандарта № 1.

6.6.10.9 В случае отображения ошибки калибровки или если стандарт № 2 не будет в 10 раз больше стандарта № 1. Следует повторить приготовление образцов и стандартов, используя свежий рабочий раствор Qubit. Нельзя повторно использовать уже отработанную пробирку, в которой готовили предшествующий рабочий раствор Qubit. Повторить калибровку со свежими стандартами.

6.6.10.9.1 Если калибровка прошла успешно, и показания для стандарта № 2 в по меньшей мере 10 раз больше, чем для стандарта № 1, продолжить считывание образцов (см. стадии 5.6.9.10–5.6.9.14).

6.6.10.9.2 При повторной ошибке калибровки, или если стандарт № 2 не будет в 10 раз больше стандарта № 1, обратитесь к специалисту в области данного анализа или руководителю.

6.6.10.10 После успешного проведения калибровки выбрать Run samples в нижней части экрана Standards results, чтобы начать анализ образцов.

6.6.10.11 До начала анализа первого образца на экране отображается информация об объеме образца. Использовать символы + или - для выбора объема образца, использованного для всех анализируемых образцов (3–20 мкл). Затем выбирают единицы измерения (мкг/мкл) для вывода концентрации образца из выпадающего меню.

6.6.10.12 После выбора правильного объема образца и единиц концентрации образца образец 1 устанавливают в камере для образца. Закрыть крышку камеры для образца и выбрать Read tube.

6.6.10.13 На экране отображается как исходная расчетная концентрация образца, так и концентрация образца в пробирке Qubit. Исходная расчетная концентрация образца соответствует концентрации в исходном образце ДНК.

6.6.10.13.1 Если концентрация образца находится вне диапазона набора, на экране отображается сообщение об ошибке Out of Range.

6.6.10.13.2 Нажать правую стрелку, чтобы открыть график для стандартов и результаты для образца, чтобы определить, не являются ли результаты для образца слишком высокими или слишком низкими.

6.6.10.13.3 Образцы, выходящие за пределы диапазона, следует проанализировать повторно. Использовать больший объем образца для концентраций образца, которые оказались слишком низкими. Использовать либо меньший объем образца, либо разбавление исходного раствора ДНК (приготовленного в буфере ТЕ с низким содержанием EDTA) для образцов, концентрации которых слишком велики.

Повторно исследуемые образцы должны быть проанализированы относительно новых стандартов. Образцы и стандарты должны быть приготовлены с использованием свежего рабочего раствора Qubit (не использовать повторно пробирки от предшествующего рабочего раствора Qubit).

6.6.10.14 Извлечь образец 1 из камеры для образца. Если необходимо провести анализ более одного образца, поместить следующий образец в камеру для образца, закрыть крышку камеры для образца и выбрать Read tube.

6.6.10.15 Продолжать, повторяя 5.6.9.14, пока не будут проанализированы все образцы.

6.6.10.16 Подключить Qubit к компьютеру с помощью кабеля USB, поставляемого в комплекте с флуориметром Qubit, и после появления окна AutoPlay выбрать Open device для просмотра файлов. Продолжать со стадии 5.6.9.17 для Qubit, прежде чем проводить любой дальнейший выбор опций на компьютере.

6.6.10.17 Выбрать Data на экране Sample concentration для последнего считанного образца или Home screen, чтобы открыть окно Export data, где отображается список анализов, проведенных на Qubit. Список данных включает перечисление в соответствии с проведенными анализами, отражая дату/время анализа, название анализа (dsDNA Broad Range) и число проанализированных образцов в каждом таком анализе.

Примечание. Флуориметр Qubit 4 сохраняет данные до 1000 образцов.

6.6.10.18 Коснуться окошка рядом с данными анализа, которые подлежат экспорту. В окошке появится галочка. Затем выбрать Export, чтобы экспортировать весь набор данных в компьютер.

6.6.10.19 На компьютере дважды кликнуть по Internal storage, а затем по папке Qubit 4 для доступа к экспортированным данным.

Примечание. Имя папки выглядит как QubitData_день-месяц-год, при этом дата будет соответствовать дате экспорта, а не дате анализа экспортированных данных.

6.6.10.20 Открыть папку данных и сохранить файл QubitData_день-месяц-год_минуты-часы-секунды.csv в защищенной системе

резервирования данных (например: OpenLab) или в соответствии с принятым в учреждении порядком. В соответствии с принятым в учреждении порядком данный файл также должен прилагаться к документации анализа. Примечание. В папке также содержится файл QubitData_Rna_iq_день-месяц-год_минуты-часы-секунды.csv, который относится только к анализу RNA IQ.

В этот файл .csv значения вносятся только в случае анализа RNA IQ, потому для других случаев его не следует сохранять.

6.6.10.21 Файл .csv содержит результаты проведенного анализа. Результаты будут приводиться в порядке, обратном очередности считывания образцов (т. е. от последнего считанного образца к первому считанному образцу). В столбце Test Date также указывается время проведения считывания образца, и его можно использовать для подтверждения порядка образцов, поскольку у проанализированных первыми образцов будет более ранняя отметка времени, тогда как у проанализированных последними отметки времени будут более поздними.

6.6.10.22 Значение Original sample concentration относится к концентрации исходного раствора ДНК. Если разбавление исходного раствора ДНК осуществляется в рамках анализа Qubit, значение Original sample concentration необходимо будет умножить на коэффициент разбавления для разбавленного исходного раствора ДНК, который использован в анализе Qubit для определения концентрации исходного раствора ДНК. Например: при анализе Qubit используют исходный раствор ДНК в разбавлении 1 : 10 в буфере ТЕ с низким содержанием EDTA и 3 мкл разбавления 1 : 10, значение Original

sample concentration по данным Qubit составляет 0,0561мкг/мкл, тогда концентрация неразбавленного исходного раствора ДНК составляет (0,0561 мкг/мкл)(10) = 0,561мкг/мкл.

6.7 Разбавление образца ДНК при подготовке анализа трансгенной кПЦР

6.7.1.1 Образцы следует разбавлять до 0,020 мкг/мкл в буфере ТЕ с низким содержанием EDTA. Сразу же проводят количественную оценку исходного раствора ДНК. Аликвоты образцов с концентрациями исходного раствора ДНК менее 0,020 мкг/мкл следует отбирать в соответствии со стадией 5.7.1.5 и незамедлительно использовать без дополнительных манипуляций (в чистом виде) в анализе кПЦР.

6.7.1.2 Использовать следующую формулу для определения суммарного объема 0,020 мкг/мкл разбавленной ДНК, который может быть приготовлен:

$$\textit{Суммарный объем разбавленной ДНК 0,020 мкг/мкл} = \frac{\textit{Объем исходного раствора ДНК x Концентрация исходного раствора ДНК}}{\textit{0,020 мкг/мкл}}$$

6.7.1.3 Затем определить количество буфера ТЕ с низким содержанием EDTA, необходимое для разбавления исходного раствора ДНК до 0,020 мкг/мкл, следующим образом:

$$\textit{Суммарный объем разбавленной ДНК 0,02 мкг/мкл} - \textit{Объем исходного раствора ДНК} = \textit{Объем буфера ТЕ}$$

6.7.1.4 Разбавить желательный объем исходного раствора ДНК рассчитанным объемом буфера ТЕ с низким содержанием EDTA, вычисление которого производится в 5.7.1.3, чтобы приготовить рабочую концентрацию ДНК 0,020 мкг/мкл. Рекомендуется разбавлять значительную часть исходного раствора ДНК до рабочей концентрации кПЦР 0,020 мкг/мкл, чтобы приготовить как можно большее число одноразовых аликвот образца. Однако, чтобы обеспечить достаточное количество для минимум 3 анализов кПЦР, необходимо приготовить как минимум 3 одноразовых аликвоты образца ДНК с концентрацией 0,020 мкг/мкл.

Например: концентрация исходного раствора ДНК составляет 0,0561 мкг/мкл. После использования 3 мкл ДНК для анализа Qubit остается минимум 47 мкл исходного раствора ДНК. 40 мкл исходного раствора ДНК будет использовано для разбавления до рабочей концентрации кПЦР 0,020 мкг/мкл.

$$\textit{Суммарный объем разбавленной ДНК 0,020 мкг/мкл} = \frac{\textit{40 мкл} \quad \textit{0,0561 мкг/мкл}}{\textit{0,020 мкг/мкл}}$$

$$\textit{Суммарный объем разбавленной ДНК 0,020 мкг/мкл} = 112{,}2 \text{ мкл}$$

$$112{,}2 \textit{ мкл} - 40 \textit{ мкл} = \textit{Объем буфера ТЕ}$$

$$\textit{Объем буфера ТЕ} = 72{,}2 \text{ мкл}$$

Разбавить 40 мкл исходного раствора ДНК в 72,2 мкл буфера ТЕ с низким содержанием EDTA, чтобы получить 112,2 мкл суммарного объема образца ДНК рабочего исходного раствора кПЦР с концентрацией 0,020 мкг/мкл.

6.7.1.5 Приготовить как можно больше одноразовых 20 мкл аликвот рабочего исходного раствора образца ДНК с концентрацией 0,020 мкг/мкл. В каждом анализе кПЦР используют 15 мкл ДНК, поэтому каждая аликвота будет иметь ~ 5 мкл избытка

ДНК. Во всех возможных случаях рекомендуется готовить как минимум 3 одноразовых аликвоты.

6.7.1.6 На все аликвоты должна быть нанесена метка как минимум с указанием наименования образца, концентрации аликвоты (либо 0,020 мкг/мкл или концентрации исходного раствора, если концентрация меньше 0,020 мкг/мкл) и дату получения аликвот.

6.7.1.7 Все аликвоты, а также все остающиеся исходные растворы образца ДНК должны храниться при -20 °C.

[00256] Получение и аттестация новых партий олигонуклеотидов

[00257] 1.0 Цель

1.1 Описан пример процедуры получения и аттестации новых партий олигонуклеотидов для метода трансгенной кПЦР.

[00258] 2.0 Оборудование

2.1 Центрифуга, способная центрифугировать микроцентрифужные пробирки 1,5 мл (например: Beckman Coulter, Allegra X-14R с ротором SX4750 и поворотным держателем для 96-луночного планшета и адаптеры для микроцентрифужных пробирок 1,5 мл)

2.2 Система для ПЦР в реальном времени QuantStudio 6

2.3 Морозильная камера с температурой -20 °C

2.4 Калиброванные 8- или 12-канальные пипетки (20, 50 мкл или другого соответствующего объема), например: пипетки Rainin

2.5 Калиброванные одноканальные пипетки (20, 100, 200, 1000 мкл или другого соответствующего объема), например: пипетки Rainin

2.6 Холодильник или холодильная камера, способные поддерживать температуру 2–8 °C

2.7 Программное обеспечение QuantStudio PCR вер. 1.3 или выше

2.8 Термоблок, способный поддерживать температуру 55 °C и подходящий для микроцентрифужных пробирок 1,5 мл

2.9 Вихревая мешалка

[00259] 3.0 Материалы

Примечание. Материалы с оговоркой «например» могут быть заменены аналогичными материалами без предварительной сертификации. Для материалов с оговоркой «или эквивалент» до использования для тестирования образцов следует подтвердить эквивалентность альтернативной замены.

3.1 Вода без ДНКаз/РНКаз, например: Invitrogen кат. № 10977015.

3.2 Основная смесь TaqPath ProAmp, ThermoFisher кат. № A30866 или эквивалент.

3.3 Лиофилизованные исходные образцы праймеров и зондов трансгена BCMA и hALB, специально созданные последовательности от IDT или эквивалент.

3.4 Сертифицированная партия трансгена BCMA и праймеры и зонды ALB, специально созданные последовательности от IDT или эквивалент.

3.5 Сертифицированная партия трансгена BCMA стандарт № 1

3.6 Сертифицированная партия среднего и слабого контроля трансгена BCMA

3.7 1X буфер TE с низким содержанием EDTA, pH 8,0, без РНКаз/ДНКаз, например: Quality Biological кат. № 351-324-721.

3.8 Центрифужные пробирки 0,5 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: микроцентрифужные пробирки с завинчивающейся крышкой VWR кат. № 89004-286 или Eppendorf кат. № 022431005

3.9 Центрифужные пробирки 1,5 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: Eppendorf кат. № 022431021

3.10 Центрифужные пробирки 2 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: Eppendorf кат. № 022431048

3.11 Центрифужные пробирки 5 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: Eppendorf кат. № 0030119460

3.12 Наконечники пипеток, стерильные, с фильтром (20, 200, 1000 мкл или другого соответствующего объема), например: Rainin кат. № 30389226, 30389240, 30398213

3.13 96-луночные планшеты для ПЦР, Applied Biosystems, кат. № 4483343, 4483354, 4483349, 4483350, 4483395 или эквивалент

3.14 Оптическая адгезивная пленка Micro Amp, Applied Biosystems, кат. № 4311971 или эквивалент

3.15 Емкости для реагентов без РНКаз/ДНКаз, например: VistaLabs кат. № 3054-1002

[00260] 4.0 Меры предосторожности

4.1 При работе в лаборатории использовать надлежащие СИЗ.

4.2 При работе с опасными химическими веществами следовать специальным инструкциям для конкретных условий работы. Более подробную информацию см. в паспорте безопасности производителя.

4.3 Все стадии отбора проб пипетками необходимо осуществлять с использованием асептических методик в боксе биологической безопасности. Проводящим анализ рекомендуется использовать одноразовые нарукавники при выполнении всех стадий процедуры, чтобы свести к минимуму риск загрязнения любых материалов или реагентов.

[00261] 6.0 Процедура

Примечание. Аттестация олигонуклеотидов производится как мультиплексного набора (трансген BCMA и hALB). Партия олигонуклеотидов считается израсходованной, после того как будет использована последняя аликвота любого из 6 олигонуклеотидов. Не следует смешивать и комбинировать олигонуклеотиды из одного прошедшего аттестацию набора с другим. Любые остающиеся олигонуклеотиды из ранее прошедшего аттестацию набора, который был израсходован, должны быть утилизированы.

6.1 Заказать олигонуклеотиды трансгена BCMA и олигонуклеотиды hALB (см. последовательности в таблице 9).

Таблица 9. Олигонуклеотиды трансгенной кПЦР

Наименование олигонуклеотида	**Последовательность (5'–3')**	**Количество для заказа (минимум)**	**Очистка**
ПРЯМОЙ трансген BCMA	CCA GTA CAA ACT ACT CAA GAG G	25 нмоль олигонуклеотидов ДНК	Стандартное обессоливание
ОБРАТНЫЙ трансген BCMA	GCT GAA CTT CAC TCT CAG TT	25 нмоль олигонуклеотидов ДНК	Стандартное обессоливание
ЗОНД трансгена BCMA	/56-FAM/TC TTC TGG A/ZE/A ATC GGC AGC TAC AGC /3IABkFQ/	250 нмоль PrimeTime 5'6-FAM/ZEN/3' IB FQ	ВЭЖХ
ПРЯМОЙ hALB	TCA TCT CTT GTG GGC TGT AAT C	25 нмоль олигонуклеотидов ДНК	Стандартное обессоливание
ОБРАТНЫЙ hALB	TGC TGG TTC TCT TTC ACT GAC	25 нмоль олигонуклеотидов ДНК	Стандартное обессоливание
ЗОНД hALB	/5HEX/AG GGA GAG A/ZEN/T TTG TGT GGG CAT GAC /3IABkFQ/	250 нмоль PrimeTime 5'6-HEX/ZEN/3' IB FQ	ВЭЖХ

6.2 Олигонуклеотиды будут поставляться изготовителем в лиофилизованной форме вместе со спецификациями для каждого олигонуклеотида. Хранить лиофилизованные олигонуклеотиды при -20 °C до готовности к разведению. Лиофилизованные олигонуклеотиды могут храниться при -20 °C в течение до 12 месяцев. Примечание. На получение олигонуклеотидов от производителя в среднем требуется по меньшей мере 2 недели. Поэтому всегда следует хранить по меньшей мере один резервный лиофилизованный набор олигонуклеотидов, чтобы свести к минимуму последствия для тестирования образцов в случае возникновения проблем с новой или аттестованной партией образцов.

6.3 Разведение олигонуклеотидов

6.3.1 Извлечь исходные лиофилизованные олигонуклеотиды из хранилища при -20 °C и центрифугировать при 10 000 x g в течение 30 сек, чтобы прежде чем открывать пробирки убедиться в том, что все исходные олигонуклеотиды

находятся на дне пробирок. Не следует открывать пробирки до центрифугирования, чтобы предотвратить потери любого олигонуклеотида, который переместился со дна пробирки во время транспортировки.

6.3.2 Развести каждый олигонуклеотид до 100 мкМ исходного раствора с использованием буфера ТЕ с низким содержанием EDTA следующим образом.

6.3.2.1 Определить количество каждого олигонуклеотида в наномолях, указанное в отдельной спецификации нуклеотида.

6.3.2.2 Умножить количество наномолей на 10, чтобы получить объем буфера ТЕ, который должен быть добавлен в пробирку олигонуклеотида для получения исходного раствора с концентрацией 100 мкМ.

6.3.2.3 Добавить объем буфера ТЕ, рассчитанный на стадии 11.3.2.2, к каждому олигонуклеотиду в пробирку с соответствующим олигонуклеотидом.

6.3.2.4 Перемешать в вихревой мешалке содержимое каждой пробирки с олигонуклеотидом в течение непродолжительного времени, чтобы полностью ресуспендировать лиофилизованный олигонуклеотид в буфере ТЕ.

6.3.2.5 Проверить пробирки с праймерами, чтобы убедиться в том, что весь лиофилизованный олигонуклеотид полностью растворен в буфере ТЕ. Если окажется,

что в смеси присутствуют какие-либо частицы олигонуклеотида, которые не полностью растворились в буфере ТЕ, пробирки можно выдержать при 55 °С в течение 1–5 мин, чтобы ускорить ресуспендирование. После нагревания содержимое пробирок снова перемешивают в вихревой мешалке в течение непродолжительного времени.

6.3.3 Разбавление исходных растворов 100 мкМ до концентраций рабочего исходного раствора олигонуклеотида

6.3.3.1 Разбавить исходные растворы 100 мкМ праймеров до 10 мкМ рабочих исходных растворов с использованием буфера ТЕ с низким содержанием EDTA.

6.3.3.2 Разбавить исходные растворы 100 мкМ зондов до 10 мкМ рабочих исходных растворов с использованием буфера ТЕ с низким содержанием EDTA.

Таблица 10. Пример разбавления 100 мкМ исходного раствора олигонуклеотида до концентраций рабочего исходного раствора

Наименование олигонуклеотида	**Исходная конц. (мкМ)**	**Требуемая конц. (мкМ)**	**Объем 100 мкМ исходного раствора (мкл)**	**Объем буфера ТЕ (мкл)**	**Суммарный объем (мкл)**	**Коэффициент разбавления**
ПРЯМОЙ трансген BCMA	100	10	120	1080	1200	X10
ОБРАТНЫЙ трансген BCMA	100	10	120	1080	1200	X10
ЗОНД трансгена BCMA	100	10	120	1080	1200	X10

6.3.3.3 Приготовить аликвоты 20 мкл для всех праймеров и аликвоты 35 мкл для всех зондов в пробирках 0,5 мл с завинчивающейся крышкой. Установленных объемов аликвот достаточно для половины планшета для анализа ПЦР. При необходимости могут быть приготовлены аликвоты праймеров и зондов больших объемов, достаточные для полного планшета для анализа.

6.3.3.4 Нанести метки на все аликвоты с минимальной информацией:

6.3.3.4.1 Наименование олигонуклеотида

6.3.3.4.2 Концентрация в мкМ

6.3.3.4.3 № партии

6.3.3.4.4 Срок годности (1 год с момента разведения)

6.3.3.4.5 Хранить все рабочие исходные растворы при -20 °С.

6.3.4 Аттестация новых партий олигонуклеотидов

6.3.4.1 Только что прошедшую аттестацию партию олигонуклеотидов и новую партию олигонуклеотидов исследуют в ходе как минимум 3 независимых анализов трансгенной кПЦР с использованием аттестованной партии стандарта № 1, среднего и слабого контролей в соответствии со следующим протоколом.

6.3.4.1.1Готовят две основные смеси для каждого из 3 анализов, одна основная смесь будет приготовлена с использованием аттестованной только что партии олигонуклеотидов, а вторая основная смесь будет приготовлена с использованием новой партии олигонуклеотидов.

6.3.4.1.2Загрузить планшет кПЦР в соответствии со схемой планшета.

6.3.4.1.3Открыть «Oligo Qualification.edt» template», выбрать «Save As», ввести соответствующее имя эксперимента кПЦР и сохранить как файл a.eds. Не перезаписывать файл шаблона.

6.3.4.1.4Загрузить и проанализировать планшет кПЦР в соответствии с протоколом.

6.3.4.2 В разделе Setup выбрать Assign. Выделить лунки D1–E12, кликнуть правой кнопкой и выбрать omit. Это позволит исключить реакции новой партии олигонуклеотида из анализа. Выделить весь планшет и кликнуть Analyze.

6.3.4.3 Вывести на печать данные отчета в PDF и указать, что они относятся к анализу прошедшей аттестацию партии олигонуклеотидов.

6.3.4.3.1Должны быть удовлетворены все критерии соответствия, описанные в DSTMD-24448. В случае если любой из этих критериев соответствия не удовлетворен, анализ является недостоверным, и его необходимо повторить. Отразить любые недостоверные анализы в отчете аттестации реагента.

6.3.4.4 В разделе Setup выбрать Assign. Выделить лунки D1–E12, кликнуть правой кнопкой и выбрать include. Выделить лунки A1–B12, кликнуть правой кнопкой и выбрать omit. Это позволит исключить реакции прошедшей аттестацию партии олигонуклеотида из анализа. Выделить весь планшет и кликнуть Analyze.

6.3.4.5 Вывести на печать данные отчета в PDF и указать, что они относятся к анализу новой партии олигонуклеотидов.

6.3.4.5.1Все результаты анализа новой партии олигонуклеотидов должны удовлетворять всем критериям соответствия анализа, описанным в настоящем документе.

6.3.4.5.2Провести расчет % отличия средних значений Ct для каждого стандарта в реакциях прошедшей аттестацию и новой партии олигонуклеотидов следующим образом:

$$\%\ \text{отличия} = \left(\frac{\text{Абс.}(\text{Станд. № X ср. Ct прошедшего аттестацию олигонуклеотида} - \text{Станд. № X ср. Ct нового олигонуклеотида})}{\text{Средн.}(\text{Станд. № X ср. Ct прошедшего аттестацию олигонуклеотида \& Станд. № X ср. Ct нового олигонуклеотида})}\right) * 100$$

6.3.4.5.3Все % отличия должны быть ≤ 1,60%.

6.3.4.6 Все достоверные прошедшие аттестацию анализы должны удовлетворять критериям Ct % отличия, чтобы новая партия олигонуклеотида проходила аттестацию.

6.3.4.7 Если новая партия не удовлетворяет критериям соответствия, партия не проходит аттестацию и должна быть утилизирована. Приготовить еще одну новую партию олигонуклеотидов и провести аттестацию новой партии.

[00262] Получение рабочих исходных расходов линейной плазмиды LiCAR

[00263] 1.0 Цель

1.1 В настоящем примере описана примерная процедура линеаризации плазмиды LiCAR и пересчета концентраций плазмиды мг/мл в число копий/мкл, чтобы приготовить рабочие исходные растворы линейной плазмиды для применения в получении стандартов и контролей для метода трансгенной кПЦР.

[00264] 2.0 Оборудование

2.1 Центрифуга, способная центрифугировать микроцентрифужные пробирки 1,5 мл и 5 мл (например: Beckman Coulter, Allegra X-14R с ротором SX4750 с адаптером для микроцентрифужных пробирок 1,5 мл).

2.2 Прибор для электрофореза, например Lonza FlashGel DNA System и FlashGel Dock или устройство Invitrogen E-Gel Electrophoresis

2.3 Морозильная камера с температурой -70 °C

2.4 Холодильник или холодильная камера, способные поддерживать температуру 2–8 °C

2.5 Калиброванные одноканальные пипетки (20, 100, 200, 1000 мкл или другого соответствующего объема), например: пипетки Rainin

2.6 Флуориметр Qubit 4, Invitrogen кат. № Q33226

2.7 Термоблок, способный поддерживать температуру 37 °C и подходящий для микроцентрифужных пробирок 1,5 мл

2.8 Бокс биологической безопасности

2.9 Вихревая мешалка

[00265] 3.0 Материалы

Примечание. Материалы с оговоркой «например» могут быть заменены аналогичными материалами без предварительной сертификации. Для материалов с оговоркой «или эквивалент» до использования для тестирования образцов необходимо подтвердить эквивалентность альтернативной замены.

3.1 Исходный раствор плазмиды pLLV-LICAR2SIN LiCAR

3.2 Вода без ДНКаз/РНКаз, например: Invitrogen кат. № 10977015

3.3 EcoRI HF Enzyme, New England Biolabs кат. № R3101S или эквивалент

3.4 Набор GeneJet Gel Extraction & DNA Cleanup, ThermoFisher, кат. № K0831 или эквивалент

3.5 Предварительно сформованные гели для электрофореза, например Lonza FlashGel DNA Cassette или Invitrogen E-Gels, подходящие для разрешения высокомолекулярных полос (например: FlashGel DNA Cassettes, 1,2% 12 + 1 один уровень, Lonza кат. № 57023)

3.6 Маркер молекулярной массы и длины ДНК, приемлемый для определения размера полос по меньшей мере 8000 т.п.н. (например: E-Gel 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen кат. № 10488090) 1.1 1,5 мл центрифужные пробирки, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: Eppendorf кат. № 022431021 1.2 2 мл центрифужные пробирки, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: Eppendorf кат. № 022431048

3.7 Центрифужные пробирки 5 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: Eppendorf кат. № 0030119460

3.8 1X буфер TE с низким содержанием EDTA, pH 8,0, без РНКаз/ДНКаз, например: Quality Biological кат. № 351-324-721.

3.9 Центрифужные пробирки 0,5 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: микроцентрифужные пробирки с завинчивающейся крышкой VWR кат. № 89004-286 или Eppendorf кат. № 022431005

3.10 Наконечники пипеток, стерильные, с фильтром (20, 200, 1000 мкл или другого соответствующего объема), например: Rainin кат. № 30389226, 30389240, 30398213

[00266] 4.0 Меры предосторожности

4.1 При работе в лаборатории использовать надлежащие СИЗ.

4.2 При работе с опасными химическими веществами следовать специальным инструкциям для конкретных условий работы. Более подробную информацию см. в паспорте безопасности производителя.

4.3 Все стадии отбора проб пипетками необходимо осуществлять с использованием асептических методик в боксе биологической безопасности. Проводящим анализ рекомендуется использовать одноразовые нарукавники при выполнении всех стадий процедуры, чтобы свести к минимуму риск загрязнения любых материалов или реагентов.

[00267] 5.0 Процедура

5.1 Предварительно нагреть термоблок до 37 °C, прежде чем начинать расщепление плазмиды.

5.2 Разморозить виалу с исходным раствором плазмиды LiCAR.

5.3 Определить концентрацию ДНК LiCAR с использованием флуориметра Qubit 4 и в соответствии с процедурой, описанной в настоящем документе. Может потребоваться разбавление исходного раствора плазмиды, чтобы она находилась в диапазоне набора Qubit dsDNA BR (2–1000 нг ДНК).

5.4 Разбавить необходимое количество плазмиды, требуемое для расщепления 0,09 мкг/мкл плазмидной ДНК в воде.

Например: концентрацию исходного раствора 1,24 мкг/мкл разбавляют до 0,09 мкг/мкл, добавляя 3,63 мкл плазмидной ДНК в 46,37 мкл воды без ДНКаз/РНКаз.

5.5 Приготовить реакционную смесь ферментативного расщепления EcoRI HF при комнатной температуре и добавить каждый реагент в порядке, указанном в таблице 11.

Таблица 11. Протокол расщепления EcoRI HF плазмиды LiCar

Компонент реакции	**Объем (мкл)**
0,09 мкг/мкл плазмидной ДНК	10
10X буфер CutSmart	5
Вода без ДНКаз/РНКаз	34
EcoRI-HF (20 000 ед./мл)	1
Суммарный объем	50 мкл

Примечание. Множество реакций ферментативного расщепления с 50 мкл при необходимости могут проводиться несколько раз, чтобы получить достаточное количество линеаризованной ДНК для приготовления рабочего исходного раствора плазмиды LiCAR для получения стандартов и контролей.

5.6 Сохранить по меньшей мере 5 мкл нерасщепленной плазмидной ДНК, которые могут служить в качестве контроля интактной плазмидной ДНК в гель-электрофорезе.

5.7 Осторожно перемешать содержимое пробирок для расщепления, набирая в пипетку, или слегка щелкнув по пробирке (не перемешивайте реакционную смесь в вихревой мешалке). Быстро центрифугировать реакционную смесь в течение 5 секунд при 300 x g.

5.8 Инкубировать пробирки в термоблоке при 37 °C в течение 15 минут.

5.9 Провести очистку расщепленной плазмидной ДНК с помощью мини-набора экстракции и очистки ДНК GeneJet Gel.

Примечание. Объем, использованный для очистки ДНК, не должен превышать 200 мкл, а суммарное количество очищенной плазмидной ДНК не должно превышать 10 мкг. Если суммарный объем превышает 200 мкл, разделить объем равным образом на 2 или более пробирки, прежде чем продолжать следующие стадии очистки.

5.10 Перед началом процедуры очистки ДНК при вскрытии GenJet добавить 96–100%-й этанол во флаконы промывочного буфера в соответствии с указаниями на каждом флаконе. Подтвердить добавление этанола, указав дату добавления и инициалы на этикетке. Хранить промывочные буферы с этанолом при комнатной температуре. Также перед применением проверить все растворы в наборе на возможное осаждение соли. Растворить любые осадки путем нагревания растворов до 37 °C с последующим уравновешиванием до комнатной температуры перед использованием.

Примечание. Колонки для очистки ДНК должны храниться при 2–8 °C после доставки набора, а также если колонки не используются. После каждого применения убедиться в том, что пакет с колонками для очистки ДНК плотно закрыт.

5.11 Скорректировать объем реакционной смеси до 200 мкл, добавляя воду без ДНКаз/РНКаз. Например: добавить 150 мкл воды к 50 мкл смеси расщепленной ДНК.

5.12 Добавить 100 мкл связывающего буфера. Тщательно перемешать, набирая в пипетку.

5.13 Добавить 300 мкл этанола (96–100%) и перемешать, набирая в пипетку.

5.14 Перенести смесь в микроколонку для очистки ДНК и пробирку-сборник. Центрифугировать колонку в течение 1 минуты при 14 000 × g. Утилизировать фильтрат колонки. Вновь установить микроколонку для очистки ДНК в пробирке-сборнике. В альтернативном варианте осуществления пробирку можно установить в 2 мл микроцентрифужной пробирке и утилизировать пробирку-сборник.

5.15 Добавить 700 мкл промывного буфера (с добавкой этанола) в колонку и центрифугировать в течение 1 минуты 14 000 × g. Утилизировать фильтрат и вернуть колонку в пробирку-сборник. В альтернативном варианте осуществления пробирку можно установить в 2 мл микроцентрифужной пробирке и утилизировать пробирку-сборник.

5.16 Выполнить еще одну стадию промывки, добавив 700 мкл промывного буфера в колонку и центрифугировать в течение 1 минуты 14 000 × g. Утилизировать фильтрат и вернуть колонку в ту же пробирку-сборник. В альтернативном варианте осуществления пробирку можно установить в 2 мл микроцентрифужной пробирке и утилизировать пробирку-сборник.

5.17 Центрифугировать колонку еще 1 минуту при 14 000 × g, чтобы полностью удалить любые остатки промывочного буфера.

5.18 Перенести колонку в чистую 1,5 мл микроцентрифужную пробирку и добавить 10 мкл элюирующего буфера (поставляемого с набором GeneJet) в центр колонки. Не следует касаться или прокалывать кремнеземную мембрану наконечником пипетки.

5.19 Центрифугировать в течение 1 минуты при 14 000 × g для элюирования ДНК.

5.20 Убедиться в расщеплении плазмиды VSV-G, проведя гель-электрофорез исходной кольцевой (нерасщепленной ДНК) и линеаризованной ДНК. Рекомендуется проводить разбавление исходного раствора линеаризованной плазмиды для применения в гель-электрофорезе, чтобы сохранить максимально возможное количество линеаризованной плазмиды.

5.21 Определить концентрацию очищенной линейной плазмидной ДНК VSV-G с использованием флуориметра Qubit 4 и в соответствии с процедурой, описанной ранее в настоящем документе.

5.22 Преобразовать концентрацию линейной плазмиды, определенную на стадии 5.21, в число копий/мкл плазмиды LiCAR следующим образом:

$$(\text{конц. плазмиды по Qubit (мкг/мкл)})\left(\frac{1\ г}{1\text{x}10^{6}\ мкг}\right) = \text{конц. плазмиды (г/мкл)}$$

$$\frac{(6{,}023\ \text{x}\ 10^{22}\ \text{копий/моль})(\text{конц. плазмиды (г/мкл)})}{(660\ г/моль)(\text{размер плазмиды (п.н.)})} = \text{конц. плазмиды (копий/мкл)}$$

Например: концентрация раствора ДНК LiCAR составляет 1,03 мкг/мкл.

$$(1{,}03\ мкг/мкл)\left(\frac{1\ г}{1\text{x}10^{6}\ мкг}\right) = 1{,}03\text{x}10^{-6}\ г/мкл$$

$$\frac{(6{,}023\ \text{x}\ 10^{23}\ \text{копий/моль})(1{,}03\text{x}10^{-6}\ г/мкл)}{(660\ г/моль)(8518\ п.н)} = 1{,}103\ \text{x}\ 10^{11}\ \text{копий/мкл}$$

5.23 Разбавить исходный раствор плазмиды до рабочей концентрации, подходящей для получения стандарта и контролей в буфере ТЕ с низким содержанием EDTA.

5.24 Разбавить исходный раствор линейной плазмиды LiCAR в буфере ТЕ с низким содержанием EDTA в зависимости от необходимости приготовить рабочий исходный раствор линейной плазмиды LiCAR, подходящий для получения стандартов и контролей.

5.25 Подготовить соответствующие по объему одноразовые аликвоты рабочей концентрации плазмиды с меткой, содержащей минимальную информацию:

5.25.1 Линейная плазмида

5.25.2 Концентрация плазмиды в числе копий/мкл

5.25.3 Объем аликвоты

5.25.4 Срок хранения

5.26 Плазмиды стабильны в течение 12 месяцев при -70 °C.

[00268] Получение и аттестация новых партий стандартов

[00269] 1.0 Цель

1.1 Описан пример процедуры получения и аттестации новых партий стандартов для метода трансгенной кПЦР.

[00270] 2.0 Оборудование

2.1 Центрифуга, способная центрифугировать микроцентрифужные пробирки 1,5 мл (например: Beckman Coulter, Allegra X-14R с ротором SX4750 и поворотным держателем для 96-луночного планшета и адаптеры для микроцентрифужных пробирок 1,5 мл)

2.2 Система для ПЦР в реальном времени QuantStudio 6

2.3 Морозильная камера с температурой -20 °C

2.4 Морозильная камера с температурой -70 °C

2.5 Калиброванные 8- или 12-канальные пипетки (20, 50 мкл или другого соответствующего объема), например: пипетки Rainin

2.6 Калиброванные одноканальные пипетки (20, 100, 200, 1000 мкл или другого соответствующего объема), например: пипетки Rainin

2.7 Холодильник или холодильная камера, способные поддерживать температуру 2–8 °C

2.8 Программное обеспечение QuantStudio PCR вер. 1.3 или выше

2.9 Термоблок, способный поддерживать температуру 55 °C и подходящий для микроцентрифужных пробирок 1,5 мл

2.10 Вихревая мешалка

2.11 Бокс биологической безопасности

[00271] 3.0 Материалы

Примечание. Материалы с оговоркой «например» могут быть заменены аналогичными материалами без предварительной сертификации. Для материалов с оговоркой «или эквивалент» до использования для тестирования образцов следует подтвердить эквивалентность альтернативной замены.

3.1 Вода без ДНКаз/РНКаз, например: Invitrogen кат. № 10977015.

3.2 Основная смесь TaqPath ProAmp, ThermoFisher кат. № A30866 или эквивалент.

3.3 Конгломераты имитационных Т-клеток с 2x106-4x106 клеток в каждом конгломерате.

3.4 Сертифицированная партия трансгена BCMA и праймеры и зонды ALB, специально созданные последовательности от IDT или эквивалент.

3.5 Сертифицированная партия трансгена BCMA стандарт № 1

3.6 Сертифицированная партия среднего и слабого контроля трансгена BCMA

3.7 Аликвота рабочего исходного раствора pLLV-LICAR2SIN

3.8 1X буфер TE с низким содержанием EDTA, pH 8,0, без РНКаз/ДНКаз, например: Quality Biological кат. № 351-324-721.

3.9 Центрифужные пробирки 0,5 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: микроцентрифужные пробирки с завинчивающейся крышкой VWR кат. № 89004-286 или Eppendorf кат. № 022431005

3.10 Центрифужные пробирки 1,5 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: Eppendorf кат. № 022431021

3.11 Центрифужные пробирки 2 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: Eppendorf кат. № 022431048

3.12 Центрифужные пробирки 5 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: Eppendorf кат. № 0030119460

3.13 Наконечники пипеток, стерильные, с фильтром (20, 200, 1000 мкл или другого соответствующего объема), например: Rainin кат. № 30389226, 30389240, 30398213

3.14 96-луночные планшеты для ПЦР, Applied Biosystems, кат. № 4483343, 4483354, 4483349, 4483350, 4483395 или эквивалент

3.15 Оптическая адгезивная пленка Micro Amp, Applied Biosystems, кат. № 4311971 или эквивалент

3.16 Емкости для реагентов без РНКаз/ДНКаз, например: VistaLabs кат. № 3054-1002

[00272] 4.0 Меры предосторожности

4.1 При работе в лаборатории использовать надлежащие СИЗ.

4.2 При работе с опасными химическими веществами следовать специальным инструкциям для конкретных условий работы. Более подробную информацию см. в паспорте безопасности производителя.

4.3 Все стадии отбора проб пипетками необходимо осуществлять с использованием асептических методик в боксе биологической безопасности. Проводящим анализ рекомендуется использовать одноразовые нарукавники при выполнении всех стадий процедуры, чтобы свести к минимуму риск загрязнения любых материалов или реагентов.

[00273] 5.0 Процедура

5.1 Выделенная гДНК из конгломератов имитационных Т-клеток в соответствии с протоколом, ранее описанным в настоящем документе. Имитационные Т-клетки должны быть получены по способу производства CAR T, но без трансдукции лентивектора.

5.2 Для выделения необходимого количества гДНК будут использованы несколько кремнеземных колонок экстракции ДНК. Объединить элюированную ДНК из всех колонок, чтобы получить один исходный раствор имитационной гДНК Т-клетки до количественного определения.

5.3 После количественного определения убедиться в том, что выделено достаточное количество гДНК для приготовления нескольких аликвот, достаточных для обеспечения по меньшей мере 4 месяцев тестирования.

5.3.1 Если при первоначальном выделении гДНК не получено достаточное количество гДНК для приготовления достаточно большой партии, которая может использоваться по меньшей мере 4 месяца, можно выделить дополнительное количество конгломератов имитационных Т-клеток, объединить с первоначальным

исходным раствором имитационной ДНК Т-клетки и провести количественное определение объединенного исходного раствора с использованием Qubit.

5.4 Стандарт № 1 готовят из имитационной ДНК Т-клетки в концентрации 0,05 мкг/мкл с добавкой плазмиды pLLV-LICAR2SIN (плазмида LiCAR), так чтобы 5 мкл стандарта № 1 содержало 121 212,1212 копий плазмиды LiCAR.

5.4.1 Определить общий объем стандарта № 1, который может быть приготовлен из исходного раствора имитационной ДНК Т-клетки, следующим образом:

$$\frac{(\textit{Объем гДНК})\ (\textit{Концентрация гДНК})}{0{,}05\ \textit{мкг/мкл}} = \textit{Суммарный объем стандарта № 1}$$

Например: после количественного определения ДНК остается приблизительно 397,0 мкл имитационной гДНК Т-клетки. Концентрация гДНК составляет 0,0853 мкг/мкл. 392,0 мкл гДНК будет взято для приготовления стандарта № 1.

$$\frac{(392\ \textit{мкл})(0{,}0853\ \textit{мкг/мкл})}{0{,}05\ \text{мкг/мкл}} = 668{,}78\ \textit{мкл суммарный объем стандарта № 1}$$

5.4.2 Затем определить объем буфера ТЕ с низким содержанием EDTA + плазмида, необходимое для разбавления гДНК до 0,05 мкг/мкл, следующим образом:

$$\textit{Суммарный объем стандарта № 1} - \textit{Объем гДНК} = \textit{Объем ТЕ} + \textit{Плазмида}$$

Например: 392,0 мкл гДНК из исходного раствора гДНК будет взято для приготовления суммарного объема 668,8 мкл стандарта № 1.

$$668{,}8\ \textit{мкл} - 392{,}0\ \textit{мкл} = 276{,}8\ \textit{мкл ТЕ} + \textit{Плазмида}$$

5.4.3 Затем определить объем только плазмиды, необходимый для достижения 121 212,121 копий плазмиды LiCAR на 5 мкл стандарта № 1, следующим образом:

$$\frac{121{,}212{,}121\ \textit{копий}}{5\ \textit{мкл}} = 24\ 242{,}4242\ \textit{копий/мкл}$$

$$\frac{(24\ 242{,}4242\ \textit{копий/мкл})(\textit{Суммарный объем стандарта № 1})}{\textit{Концентрация рабочего исходного раствора плазмиды (копий/мкл)}} = \textit{Объем плазмиды}$$

Например: Суммарный объем стандарта № 1 составляет 668,8 мкл. Рабочий исходный раствор плазмиды LiCAR с 1,1035x106 копий/мкл.

$$\frac{(24{,}242.4242\ copies/uL)(668{,}8\ мкл)}{1{,}1035x10^{6}\ (копий/мкл)} = 14{,}7\ мкл\ плазмиды$$

5.4.4 Наконец, определить объем буфера TE с низким содержанием EDTA, необходимой для приготовления суммарного объема стандарта № 1.

Суммарный объем стандарта № 1 – Объем гДНК + Объем плазмиды = Объем TE

Например: суммарный объем 668,8 мкл стандарта № 1 из 392,0 мкл имитационной гДНК Т-клетки и 14,7 мкл плазмиды LiCAR.

$$668{,}8\ мкл - (392{,}0\ мкл + 14{,}7\ мкл) = 262{,}1\ мкл\ TE$$

5.5 Начать приготовление стандарта № 1, перенося определенный объем исходного раствора имитационной гДНК Т-клетки в пробирку без ДНКаз/РНКаз подходящего объема, достаточного для приготовления суммарного объема стандарта № 1 (рассчитывается на стадии 5.4.1)

5.6 В пробирку после стадии 5.5 добавить объем буфера TE с низким содержанием EDTA, рассчитанный на стадии 5.4.4.

5.7 Затем добавить объем плазмиды LiCAR, рассчитанный на стадии 5.4.3. Перемешать содержимое пробирки в вихревой мешалке в течение непродолжительного времени.

5.8 Приготовить 20 мкл одноразовых аликвот стандарта № 1 с меткой, содержащей минимальную информацию:

5.8.1 Стандарт № 1 трансгена BCMA

5.8.2 № партии

5.8.3 Дата приготовления стандарта № 1

5,9 Хранить все одноразовые аликвоты при -20 °C.

5.9.1 Аттестация новых партий стандарта №

5.9.1.1 Только что прошедший аттестацию стандарт № 1 и новую партию стандарта № 1 исследуют в ходе как минимум 3 независимых анализов трансгенной кПЦР с

использованием аттестованной партии олигонуклеотидов, среднего и слабого контролей в соответствии с протоколом, ранее описанным в настоящем документе, следующим образом.

5.9.1.1.1Одну основную смесь готовят для всех образцов стандарта и контролей.

5.9.1.1.2Построить две стандартные кривые по 5 точкам, одну с использованием прошедшей аттестацию партии стандарта № 1, а вторую с использованием новой партии стандарта № 1.

5.9.1.1.3Загрузить планшет кПЦР в соответствии со схемой планшета.

5.9.1.1.4Открыть «Standard Qualification.edt» template», выбрать «Save As», ввести соответствующее имя эксперимента кПЦР и сохранить как файл a.eds. Не перезаписывать файл шаблона.

5.9.1.1.5Загрузить и проанализировать планшет кПЦР в соответствии с протоколом, описанным в настоящем документе.

5.9.1.2 В разделе Setup выбрать Assign. Выделить лунки C1–D12, кликнуть правой кнопкой и выбрать omit. Это позволит исключить стандартную кривую для новой партии стандарта № 1 из анализа. Выделить весь планшет и кликнуть Analyze.

5.9.1.3 Вывести на печать данные отчета в PDF и указать, что они относятся к анализу прошедшей аттестацию партии стандарта № 1.

5.9.1.3.1Должны быть выполнены все критерии соответствия, описанные в настоящем документе. В случае несоответствия по любому из этих критериев соответствия, анализ является недостоверным, и его необходимо повторить. Отразить любые недостоверные анализы в отчете аттестации реагента.

5.9.1.4 В разделе Setup выбрать Assign. Выделить лунки C1–D3, кликнуть правой кнопкой и выбрать include. Выделить лунки A1–B3, кликнуть правой кнопкой и выбрать omit. Это позволит исключить стандартную кривую для прошедшей аттестацию партии стандарта № 1 из анализа. Выделить весь планшет и кликнуть Analyze.

5.9.1.5 Вывести на печать данные отчета в PDF и указать, что они относятся к анализу новой партии стандарта № 1.

5.9.1.5.1Все результаты анализа новой партии стандарта № 1 должны удовлетворять всем критериям соответствия анализа, описанным в настоящем документе.

5.9.1.6 Для соответствия требованиям аттестации среднее по результатам всех трех измерений VCN/клетка для среднего и слабого контролей по всем достоверным прошедшим аттестацию анализам должны составлять ≤ 20% ожидаемых результатов VCN/клеток для новых партий стандарта № 1.

[00274] Получение и аттестация новых партий среднего и слабого контролей

[00275] 1.0 Цель

1.1 Описан пример процедуры получения и аттестации новых партий стандартов для метода трансгенной кПЦР.

[00276] 2.0 Оборудование

2.1 Центрифуга, способная центрифугировать микроцентрифужные пробирки 1,5 мл (например: Beckman Coulter, Allegra X-14R с ротором SX4750 и поворотным держателем для 96-луночного планшета и адаптеры для микроцентрифужных пробирок 1,5 мл)

2.2 Система для ПЦР в реальном времени QuantStudio 6

2.3 Морозильная камера с температурой -20 °C

2.4 Морозильная камера с температурой -70 °C

2.5 Калиброванные 8- или 12-канальные пипетки (20, 50 мкл или другого соответствующего объема), например: пипетки Rainin

2.6 Калиброванные одноканальные пипетки (20, 100, 200, 1000 мкл или другого соответствующего объема), например: пипетки Rainin

2.7 Холодильник или холодильная камера, способные поддерживать температуру 2–8 °C

2.8 Программное обеспечение QuantStudio PCR вер. 1.3 или выше

2.9 Термоблок, способный поддерживать температуру 55 °C и подходящий для микроцентрифужных пробирок 1,5 мл

2.10 Вихревая мешалка

2.11 Бокс биологической безопасности

[00277] 3.0 Материалы

Примечание. Материалы с оговоркой «например» могут быть заменены аналогичными материалами без предварительной сертификации. Для материалов с оговоркой «или эквивалент» до использования для тестирования образцов следует подтвердить эквивалентность альтернативной замены.

3.1 Вода без ДНКаз/РНКаз, например: Invitrogen кат. № 10977015.

3.2 Основная смесь TaqPath ProAmp, ThermoFisher кат. № A30866 или эквивалент.

3.3 Конгломераты имитационных Т-клеток с 2x106-4x10^6 клеток в каждом конгломерате.

3.4 Сертифицированная партия трансгена BCMA и праймеры и зонды ALB, специально созданные последовательности от IDT или эквивалент.

3.5 Сертифицированная партия трансгена BCMA стандарт № 1

3.6 Сертифицированная партия среднего и слабого контроля трансгена BCMA

3.7 Аликвота рабочего исходного раствора pLLV-LICAR2SIN

3.8 1X буфер TE с низким содержанием EDTA, pH 8,0, без РНКаз/ДНКаз, например: Quality Biological кат. № 351-324-721.

3.9 Центрифужные пробирки 0,5 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: микроцентрифужные пробирки с завинчивающейся крышкой VWR кат. № 89004-286 или Eppendorf кат. № 022431005

3.10 Центрифужные пробирки 1,5 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: Eppendorf кат. № 022431021

3.11 Центрифужные пробирки 2 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: Eppendorf кат. № 022431048

3.12 Центрифужные пробирки 5 мл, стерильные, без РНКаз/ДНКаз, например: Eppendorf кат. № 0030119460

3.13 Наконечники пипеток, стерильные, с фильтром (20, 200, 1000 мкл или другого соответствующего объема), например: Rainin кат. № 30389226, 30389240, 30398213

3.14 96-луночные планшеты для ПЦР, Applied Biosystems, кат. № 4483343, 4483354, 4483349, 4483350, 4483395 или эквивалент

3.15 Оптическая адгезивная пленка Micro Amp, Applied Biosystems, кат. № 4311971 или эквивалент

3.16 Емкости для реагентов без РНКаз/ДНКаз, например: VistaLabs кат. № 3054-1002

[00278] 4.0 Меры предосторожности

4.1 При работе в лаборатории использовать надлежащие СИЗ.

4.2 При работе с опасными химическими веществами следовать специальным инструкциям для конкретных условий работы. Более подробную информацию см. в паспорте безопасности производителя.

4.3 Все стадии отбора проб пипетками необходимо осуществлять с использованием асептических методик в боксе биологической безопасности. Проводящим анализ рекомендуется использовать одноразовые нарукавники при выполнении всех стадий процедуры, чтобы свести к минимуму риск загрязнения любых материалов или реагентов.

[00279] 5.0 Процедура

5.1 Выделенная гДНК из конгломератов имитационных Т-клеток в соответствии с протоколом, ранее описанным в настоящем документе. Имитационные Т-клетки должны быть получены по способу производства CAR T, но без трансдукции лентивектора.

5.2 Для выделения необходимого количества гДНК будут использованы несколько кремнеземных колонок экстракции ДНК. Объединить элюированную ДНК из всех колонок, чтобы получить один исходный раствор имитационной гДНК Т-клетки до количественного определения.

5.3 После количественного определения убедиться в том, что выделено достаточное количество гДНК для приготовления нескольких аликвот, достаточных для обеспечения по меньшей мере 4 месяцев тестирования. Слабый контроль представляет собой 1 : 10 разбавление среднего контроля с использованием 0,02 мкг/мкл имитационной гДНК Т-клетки в качестве разбавителя. Слабые и средние контроли необязательно готовить вместе из одного и того же исходного раствора имитационной гДНК Т-клетки, но если их готовят одновременно, необходимо будет

сохранить часть исходного раствора выделенной имитационной ДНК Т-клетки для приготовления слабого контроля. Пример, показанный в приведенных ниже стадиях, иллюстрирует порядок приготовления среднего и слабого контроля из одного и того же исходного раствора имитационной гДНК Т-клетки.

5.3.1 Если при первоначальном выделении гДНК не получено достаточное количество гДНК для приготовления достаточно большой партии обоих контролей, которая может использоваться по меньшей мере 4 месяца, можно выделить дополнительное количество конгломератов имитационных Т-клеток, объединить с первоначальным исходным раствором имитационной ДНК Т-клетки и провести количественное определение объединенного исходного раствора с использованием Qubit.

5.4 Средний контроль трансгена BCMA готовят из имитационной ДНК Т-клетки в концентрации 0,02 мкг/мкл с добавкой плазмиды pLLV-LICAR2SIN (также называемой в настоящем документе плазмидой «LiCAR»), так чтобы 5 мкл среднего контроля содержало 30 303,030 копий плазмиды LiCAR. Это соответствует числу копий вектора 2,00 копий/клетка в 5 мкл контроля.

5.4.1 Определить общий объем слабого контроля, который может быть приготовлен из исходного раствора имитационной ДНК Т-клетки, следующим образом.

$$\frac{(\textit{Объем гДНК})(\textit{Концентрация гДНК})}{0{,}02\ \textit{мкг/мкл}} = \textit{Суммарный объем среднего контроля}$$

Например: после количественного определения ДНК остается приблизительно 547,0 мкл имитационной гДНК Т-клетки. Концентрация гДНК составляет 0,0913 мкг/мкл. 298 мкл гДНК будет взято для приготовления среднего контроля.

$$\frac{(298{,}0\ \textit{мкл})(0{,}0913\ \textit{мкг/мкл})}{0{,}02\ \text{мкг/мкл}} = 1360{,}4\ \textit{мкл Суммарный объем среднего контроля}$$

5.4.2 Затем определить объем буфера TE с низким содержанием EDTA + плазмида, необходимое для разбавления гДНК до 0,02 мкг/мкл, следующим образом:

$$\textit{Суммарный объем среднего контроля} - \textit{Объем гДНК} = \textit{Объем TE} + \textit{Плазмида}$$

Например: 298,0 мкл гДНК из исходного раствора гДНК будет взято для приготовления суммарного объема 1360,4 мкл среднего контроля.

$$1360{,}4\ мкл - 298{,}0\ мкл = 1062{,}4\ мкл\ ТЕ + Плазмида$$

5.4.3 Затем определить объем одной только плазмиды, необходимый для достижения 30 303,0303 копий плазмиды LiCAR на 5 мкл среднего контроля, следующим образом.

$$\frac{30\ 303{,}030\ копий}{5\ мкл} = 6\ 060{,}606\ копий/мкл$$

$$\frac{(6\ 060{,}606\ копий/мкл)(Суммарный\ объем\ среднего\ контроля)}{Концентрация\ рабочего\ исходного\ раствора\ плазмиды\ (копий/мкл)} = Объем\ плазмиды$$

Например: Суммарный объем среднего контроля составляет 1360,4 мкл. Рабочий исходный раствор плазмиды LiCAR с 1,1035x106 копий/мкл.

$$\frac{(6\ 060{,}606\ копий/мкл)(1360{,}4\ мкл)}{1{,}103 \times 10^6\ (копий/мкл)} = 7{,}5\ мкл\ плазмиды$$

5.4.4 Наконец, определить объем буфера ТЕ с низким содержанием EDTA, необходимый для приготовления суммарного объема среднего контроля.

$$Суммарный\ объем\ среднего\ контроля - Объем\ гДНК + Объем\ плазмиды = Объем\ ТЕ$$

Например: Суммарный объем 1360,4 мкл среднего контроля из 298 мкл имитационной гДНК Т-клетки и 7,5 мкл плазмиды LiCAR.

$$1360{,}4\ мкл - (298\ мкл + 7{,}5\ мкл) = 1054{,}9\ мкл\ ТЕ$$

5.5 Приготовить средний контроль, перенося определенный объем исходного раствора имитационной гДНК Т-клетки в пробирку без ДНКаз/РНКаз подходящего объема, достаточного для приготовления суммарного объема среднего контроля (рассчитывается на стадии 5.4.1)

5.6 В пробирку после стадии 5.5 добавить объем буфера ТЕ с низким содержанием EDTA, рассчитанный на стадии 5.4.4.

5.7 Затем добавить объем плазмиды LiCAR, рассчитанный на стадии 5.4.3. Перемешать содержимое пробирки в вихревой мешалке в течение непродолжительного времени.

5.8 Приготовить слабый контроль из среднего контроля, разбавляя средний контроль 1 : 10 с использованием 0,02 мкг/мкл имитационной гДНК Т-клетки в качестве разбавителя. Например: Приготовить 1230,0 мкл суммарного объема слабого контроля из исходного раствора среднего контроля.

$$\frac{1230{,}0\ мкл\ слабый\ контроль}{10} = 123{,}0\ мкл\ средний\ контроль$$

В качестве примера можно привести порядок приготовления слабого и среднего контролей из одного исходного раствора имитационной гДНК Т-клетки, а остальной объем среднего контроля будет использован в качестве новой партии среднего контроля.

1360,4 *мкл средний контроль* − 123,0 *мкл (для приготовления слабого контроля)* = 1237,4 *мкл остатка среднего контроля*

5.9 Определить количество 0,02 мкг/мкл имитационной гДНК Т-клетки, необходимое для приготовления требуемого суммарного объема слабого контроля. Например: Суммарный объем исходного раствора слабого контроля, который будет приготовлен, составляет 1230,0 мкл и получается разбавлением среднего контроля 1 : 10 (123,0 мкл средний контроль).

$$1230{,}0\ мкл - 123{,}0\ мкл = 1107{,}0\ мкл\ 0{,}02\ мкг/мкл\ гДНК$$

5.10 Затем разбавить необходимый объем выделенной имитационной гДНК Т-клетки до 0,02 мкг/мкл буфером ТЕ с низким содержанием EDTA. Приготовить достаточный объем 0,020 мкг/мкл гДНК (включая перезакладку), необходимый для приготовления слабого контроля (стадия 5.9). Например: 1107,0 мкл 0,02 мкг/мкл имитационной гДНК Е-клетки, необходимые для приготовления 1230,0 мкл слабого контроля. Разбавить 0,0913 мкг/мкл исходного раствора имитационной Т-клетки до 0,02 мкг/мкл.

$$\frac{(244{,}0\ мкл\ исходного\ раствора\ гДНК)(0{,}0913\ мкг/мкл)}{0{,}02\ мкг/мкл} = 1113{,}9\ мкл\ суммарный\ объем\ 0{,}02\ мкг/мкл\ гДНК$$

113,9 мкл - 244,0 мкл = 869,9 *мкл объем буфера ТЕ*

Разбавить 244,0 мкл исходного раствора имитационной гДНК Т-клетки в концентрации 0,0913 мкг/мкл 869,9 мкл буфера ТЕ с низким содержанием EDTA для приготовления достаточного объема 0,02 мкг/мкл имитационной гДНК Т-клетки для приготовления 1230,0 мкл слабого контроля.

5.11 Приготовить слабый контроль, перенося определенный объем исходного раствора имитационной гДНК Т-клетки в пробирку без ДНКаз/РНКаз подходящего объема, достаточного для приготовления желаемого суммарного объема слабого контроля.

5.12 В пробирку после стадии 5.11 добавить определенный объем буфера ТЕ с низким содержанием EDTA, рассчитанный на стадии 5.10.

5.13 Затем добавляют определенный объем среднего контроля, необходимый для приготовления слабого контроля. Перемешать содержимое пробирки в вихревой мешалке в течение непродолжительного времени.

5.14 Приготовить 20 мкл одноразовых аликвот среднего и слабого контроля с меткой, содержащей минимальную информацию:

5.14.1 Средний/слабый контроль трансгена BCMA

5.14.2 № партии

5.14.3 Дата приготовления контроля

5.15 Хранить все одноразовые аликвоты при -20 °C.

5.15.1 Аттестация новых партий контролей

5.15.1.1 Аттестованный только что средний и слабый контроли и новую партию контролей исследуют в ходе как минимум 3 независимых анализов трансгенной кПЦР с использованием прошедшей аттестацию партии олигонуклеотидов и стандартов № 1 в соответствии с протоколом, ранее описанным в настоящем документе, следующим образом:

5.15.1.1.1 Одну основную смесь готовят для всех образцов стандарта и контролей.

5.15.1.1.2 Строят одну стандартную кривую по 5 точкам с использованием прошедшей аттестацию партии стандарта № 1.

5.15.1.1.3 Загрузить планшет кПЦР в соответствии со схемой планшета на ФИГ. 10.

5.15.1.1.4 Открыть файл шаблона аттестации контролей, выбрать «Save As», ввести соответствующее имя эксперимента кПЦР и сохранить как файл a.eds. Не перезаписывать файл шаблона.

5.15.1.1.5 Загрузить и проанализировать планшет кПЦР в соответствии с файлом шаблона для аттестации контролей.

5.15.1.2 Проанализировать данные в соответствии с файлом шаблона аттестации контролей с новым набором контролей, проанализированных как образцы.

5.15.1.2.1 Должны быть удовлетворены все критерии соответствия, описанные в файле шаблона аттестации контролей.

5.15.1.3 Критерии соответствия аттестации

5.15.1.3.1 Для соответствия требованиям аттестации среднее по результатам всех трех измерений VCN/клетка для новой партии среднего и слабого контролей по всем достоверным аттестованным анализам должны составлять $\leq 35\%$ ожидаемых результатов VCN/клеток для новых партий контролей.

5.15.1.3.2 % CV результатов всех трех измерений VCN/клетка для новой партии среднего и слабого контролей для всех достоверных аттестационных анализов должен составлять $\leq 20\%$.

ПРИМЕР 3. Метод аттестации трансгенной кПЦР

[00274] 1.0 Цель

1.1 Цель настоящего примера состоит в описании результатов, полученных в ходе выполнения протокола аттестации метода трансгенной кПЦР.

[00275] 2.0 Область применения

2.1 Анализ кПЦР для количественного определения плазмиды LiCAR, интегрированной в продукт CAR T, оценивали количественно по результатам определения следующих параметров аттестации: специфичность, точность, линейность, воспроизводимость (воспроизводимость и внутрилабораторная воспроизводимость), диапазон и LOQ.

[00276] 3.0 Определения и сокращения

3.1 Количественная полимеразная цепная реакция кПЦР

3.2 Человеческий альбумин hALB

3.3 Число копий вектора VCN

3.4 CV коэффициент вариации

3.5 SD стандартное отклонение

3.6 Ct порог цикла

3.7 LOQ предел количественного определения

3.8 Разработка методов биологического анализа BMD

3.9 Контроль качества QC

[00277] 4.0 Подход анализа

4.1 Линейность анализа количественно оценивали при тестировании стандартной кривой по 5 точкам, построенной по результатам 5-кратного последовательного разбавления стандарта № 1 трансгенной кПЦР и построения результатов стандартной кривой как десятичного логарифма количества в зависимости от Ct.

4.2 Точность анализа, воспроизводимость и внутрилабораторную воспроизводимость количественно определяли по результатам тестирования стандартной кривой по 5 точкам, а также средних и слабых контролей анализа.

4.3 Точность анализа количественно определяли по результатам тестирования среднего и слабого контролей анализа.

4.4 Специфичность анализа была продемонстрирована при тестировании образца имитационной ДНК Т-клетки и репрезентативного образца ДНК CAR T, собранного в день 10.

4.5 LOQ анализа был определен при тестировании LOQ образцов 0,02 VCN/клетка и 0,014 VCN/клетка.

4.6 Три аттестационных анализа были проведены двумя специалистами по анализу при этом один из трех анализов проводили в разные дни.

[00278] 5.0 Материалы

5.1 Ознакомиться с протоколом аттестации, описанным в настоящем документе, где приводится полный перечень материалов, необходимых для проведения анализа трансгенной кПЦР.

5.2 Стандарты и контроли анализа:

5.2.1 Стандарт № 1 трансгена BCMA, № партии LM-RP3-00533A.

5.2.2 Средний контроль трансгена BCMA, № партии LM-RP3-00533B.

5.2.3 Слабый контроль трансгена BCMA, № партии LM-RP3-00533C.

5.3 Образцы специфичности анализа:

5.3.1 Имитационная ДНК Т-клетки, № партии LM-RP3-00533.

5.3.2 ДНК CAR T, LM-RP3-00541.

5.4 Образцы LOQ анализа:

5.4.1 LOQ образцов 0,02 VCN/клетка и 0,014 VCN/клетка, № партии LM-RP3-00533.

5.4.2 Набор олигонуклеотидов для трансгенного метода № партии LM-RP3-00460.

[00280] 6.0 Выводы

6.1 В настоящем примере приведены результаты, полученные в ходе выполнения протокола аттестации метода трансгенной кПЦР.

6.2 Метод продемонстрировал приемлемую точность, воспроизводимость, специфичность и линейность, которые приведены в таблице 12 (10.2–10.5). Кроме того, были определены диапазон анализа и LOQ для мишеней трансгена и hALB. Поэтому проводят аттестацию метода для тестирования материала лекарственного препарата CAR T до приготовления состава со средой для криоконсервации.

Таблица 12. Сводная информация по критериям соответствия и результатам аттестации процедуры трансгенной мультиплексной кПЦР

Параметр	Критерии соответствия	Результаты
Линейность (мишень трансгена)	Значение R^2 линейной регрессии Log_{10} от значений Ct для стандартной кривой по всем достоверным аттестационным анализам должно быть ≥ 0,97.	1,00
Воспроизводимость (стандартная кривая мишени трансгена)	% CV значений Ct по трем измерениям в каждом достоверном аттестационном анализе для каждого стандарта должен составлять ≤ 30%.	0,06–0,54%

Параметр	Критерии соответствия	Результаты
Внутрилабораторная воспроизводимость (стандартная кривая мишени трансгена)	% CV значений Ct для всех достоверных аттестационных измерений для каждого стандарта должен составлять ≤ 30%.	0,26–0,47%
Линейность (мишень hALB)	Значение R^2 линейной регрессии Log_{10} от значений Ct для стандартной кривой по всем достоверным аттестационным анализам должно быть ≥ 0,97.	1,00
Воспроизводимость (стандартная кривая мишени hALB)	% CV значений Ct по трем измерениям в каждом достоверном аттестационном анализе для каждого стандарта должен составлять ≤ 30%.	0,03–0,41%
Внутрилабораторная воспроизводимость (стандартная кривая мишени трансгена)	% CV значений Ct для всех достоверных аттестационных измерений для каждого стандарта должен составлять ≤ 30%.	0,17–0,55%
Точность	% Извлечения для среднего и слабого контролей анализа в каждом достоверном аттестационном анализе должен составлять в пределах 70–130% ожидаемого значения VCN/клетка для данного контроля.	Средний контроль (2,00 VCN/клетка) 93–95% извлечения Слабый контроль (0,02 VCN/клетка): 79–84% извлечения

Параметр	Критерии соответствия	Результаты
Воспроизводимость	% CV результатов трех измерений VCN/клетка для среднего и слабого контролей анализа для каждого достоверного аттестационного анализа должен составлять ≤ 30%.	Средний контроль (2,00 VCN/клетка): 4–6% Слабый контроль (0,02 VCN/клетка): 4–6%
Внутрилабораторная воспроизводимость	% CV результатов измерений VCN/клетка для среднего и слабого контроля анализа для	Средний контроль (2,00 VCN/клетка): 4% Слабый контроль (0,02

Параметр	Критерии соответствия	Результаты
	всех достоверных аттестационных анализов должен составлять ≤ 30%.	VCN/клетка): 6%
Специфичность (имитационная ДНК Т-клетки)	Все значения Ct повторных измерений для имитационной ДНК Т-клетки должны относиться к категории «не определяется» для мишени трансгена, и при этом для каждого достоверного аттестационного анализа среднее число копий hALB должно находиться в пределах 21 221–39 394.	Мишень трансгена: для каждого анализа все значения Ct повторных измерений относились к категории «не определяется». Мишень hALB: среднее число копий hALB находилось в диапазоне 28 719–29 611.
Специфичность (JNJ-68284528 CAR-T ДНК)	Все значения повторных измерений для JNJ-68284528 CAR-T ДНК должны демонстрировать поддающийся количественному определению результат для трансгена, и при этом для каждого достоверного аттестационного анализа среднее число копий hALB должно находиться в пределах 21 212–39 394.	Мишень трансгена: все значения числа копий были определимы количественно и находились в диапазоне 4592,801–5153,907. Мишень hALB: среднее число копий hALB находилось в пределах 31 552-33 725.
Диапазон (мишень трансгена)	Диапазон определяется как диапазон числа копий, охватываемый стандартной кривой по 5 точкам, при условии, что мишень трансгена удовлетворяет всем критериям в отношении точности,	Диапазон: 193,939–121 212,121 копий

Параметр	Критерии соответствия	Результаты
	линейности и внутрилабораторной воспроизводимости.	
Диапазон (мишень hALB)	Диапазон определяется как диапазон числа копий, охватываемый стандартной кривой по 5 точкам, при условии, что мишень hALB обеспечивает внутрилабораторную воспроизводимость.	Диапазон 121,212–75 757,576 копий
LOQ (мишень трансгена)	LOQ определяется как результат для числа копий трансгена для образца с наименьшим LOQ, для которого должен наблюдаться % CV ? 20% для результата среднего числа копий трансгена и результатов среднего VCN/клетка, а также % извлечения в пределах 70–130% для результата среднего числа копий трансгена и результата среднего VCN/клетка для каждого достоверного аттестационного анализа.	LOQ: Число копий трансгена образца LOQ 0,02 VCN/клетка составляет 303,030.
LOQ (мишень hALB)	LOQ определяется как значение числа копий стандарта № 5, при условии, что мишень hALB удовлетворяет всем критериям в отношении точности, линейности и	LOQ: 121,212 копий

Параметр	Критерии соответствия	Результаты
	внутрилабораторной воспроизводимости.	

7.0 Процедура

7.1 Все анализы проводили как описано в протоколе аттестации метода. В оценку критериев соответствия аттестации метода включались только анализы, которые удовлетворяли критериям соответствия анализа, указанным в методе.

8.0 Результаты и обсуждение

8.1 Линейность и воспроизводимость стандартной кривой (воспроизводимость и внутрилабораторная воспроизводимость)

8.1.1 Результаты для стандартной кривой по 5 точкам для всех достоверных аттестационных анализов для мишеней трансгена и hALB приведены в таблицах 13–14 и на ФИГ. 1–12. Значения R2 графиков Log10 от значений Ct для мишеней трансгена и hALB составляют 1,00. Воспроизводимость для каждого стандарта менялась в диапазоне 0,06–0,54% для мишени трансгена и в диапазоне 0,03–0,41% для мишени hALB. Внутрилабораторная воспроизводимость менялась в диапазоне 0,26–0,47% для мишени трансгена и в диапазоне 0,17–0,55% для мишени hALB.

ТАБЛИЦА 13. Результаты для стандартной кривой трансгена

	Анализ №	Ct	Среднее Ct	Ct SD	Ct % CV (воспроизводимость)	Ct % CV (внутрилабораторная воспроизводимость)
Стандарт № 1	1	20,987 21,096 21,110	21,064	0,067	0,32	0,26
	2	20,980 21,035 21,062	21,025	0,042	0,20	
	3	20,966 20,981 20,990	20,979	0,012	0,06	
Стандарт № 2	1	23,443 23,485 23,589	23,505	0,075	0,32	0,35
	2	23,432 23,422 23,510	23,455	0,048	0,20	
	3	23,318 23,348 23,393	23,353	0,038	0,16	

Стандарт № 3	1	25,923 25,828 25,807	25,853	0,062	0,24	0,30
	2	25,822 25,750 25,773	25,782	0,037	0,14	
	3	25,741 25,689 25,672	25,701	0,036	0,14	
Стандарт № 4	1	28,194 28,092 28,117	28,134	0,053	0,19	0,30
	2	28,038 28,098 28,146	28,094	0,054	0,19	
	3	27,999 27,948 27,966	27,971	0,026	0,09	
Стандарт № 5	1	30,336 30,663 30,471	30,490	0,165	0,54	0,47
	2	30,201 30,251 30,359	30,270	0,081	0,27	
	3	30,487 30,307 30,484	30,426	0,103	0,34	
			Критерии соответствия:		≤ 30	≤ 30

ТАБЛИЦА 14. Результаты для стандартной кривой hALB

	Анализ №	Ct	среднее Ct	Ct SD	Ct % CV (воспроизводимость)	Ct % CV (внутрилабораторная воспроизводимость)
Стандарт № 1	1	21,038 21,083 21,058	21,060	0,022	0,11	0,26
	2	21,080 21,188 21,175	21,147	0,059	0,28	
	3	21,081 21,058 21,050	21,063	0,017	0,08	
Стандарт № 2	1	23,454 23,415 23,491	23,453	0,038	0,16	0,17
	2	23,493 23,482 23,493	23,489	0,006	0,03	
	3	23,418 23,418 23,396	23,410	0,013	0,05	
Стандарт № 3	1	25,802 25,738 25,777	25,772	0,032	0,13	0,21
	2	25,898 25,830 25,754	25,827	0,072	0,28	

	3	25,783 25,780 25,710	25,758	0,042	0,16	
Стандарт № 4	1	28,154 28,095 28,039	28,096	0,058	0,21	0,17
	2	28,117 28,089 28,092	28,099	0,015	0,05	
	3	28,078 27,994 28,133	28,068	0,070	0,25	
Стандарт № 5	1	30,498 30,641 60,567	30,569	0,072	0,23	0,55
	2	30,804 30,819 30,698	30,773	0,066	0,21	
	3	30,508 30,288 30,505	30,434	0,126	0,41	
			Критерии соответствия:		≤ 30	≤ 30

8.2 Точность и воспроизводимость контрольных образцов для контроля качества (воспроизводимость и внутрилабораторная воспроизводимость)

8.2.1 Результаты для среднего контроля 2,00 VCN/клетка и слабого контроля 0,20 VCN/клетка приведены в таблице 15. Процент извлечения для средних результатов VCN/клетка для среднего контроля находится в диапазоне 93–95%.

Процент извлечения для средних результатов VCN/клетка для слабого контроля находится в диапазоне 79–84%. Воспроизводимость для среднего и слабого контролей находится в диапазоне 4–6%. Внутрилабораторная воспроизводимость для среднего и слабого контролей составляет 4% и 6% соответственно.

ТАБЛИЦА 15. Результаты для среднего контроля 2,00 VCN/клетка и слабого контроля 0,20 VCN/клетка

	Анализ №	Ожидаемое значение VCN/клетка	Наблюдаемое значение VCN/клетка	Ср. наблюдаемое значение VCN/клетка	SD VCN/клетка	% CV (воспроизводимость)	% извлечения	% CV (внутрилабораторная воспроизводимость)
Средний контроль	1	2,00	1,83 1,95 1,94	1,91	0,070	4	95	4
	2	2,00	1,80 1,92 1,96	1,90	0,081	4	95	
	3	2,00	1,72 1,94 1,89	1,85	0,116	6	93	
Слабый контроль	1	0,20	0,16 0,16	0,17	0,010	6	84	6

2	0,20	0,18 0,15 0,16	0,16	0,007	4	79
3	0,20	0,16 0,16 0,17 0,18	0,17	0,010	6	84
			Критерии соответствия:		≤ 30	70–130	≤ 30

8.3 Специфичность

8.3.1 В таблице 16 приведены результаты для образцов имитационной ДНК Т-клетки и ДНК CAR T, которые исследовали для оценки специфичности анализа. Все повторные измерения образцов имитационной ДНК Т-клетки были отнесены к категории «не определяется» для мишени трансгена. Все повторные измерения ДНК CAR T демонстрируют количественно определяемые результаты числа копий трансгена. Кроме того, образцы имитационной ДНК Т-клетки и ДНК CAR T отвечают требованиям критериев соответствия образца hALB в отношении числа копий hALB +/- 30% от ожидаемого числа копий 30 303,030 для 100 нг ДНК.

ТАБЛИЦА 16. Результаты для имитационной ДНК Т-клетки и ДНК CAR T

	Анализ №	Ct трансгена	Копии трансгена	Ct hALB	Копии hALB	Ср. число копий hALB
Имитационная ДНК Т-клетки	1	Не определяется	Н/П	22,476	28 874,957	29 226,484
		Не определяется	Н/П	22,474	28 918,598	
		Не определяется	Н/П	22,426	29 885,896	
		Не определяется				
		Не определяется				
	2	Не определяется	Н/П	22,505	29 269,688	29 610,689
		Не определяется	Н/П	22,491	29 537,838	
		Не определяется	Н/П	22,467	30 024,545	
		Не определяется				
		Не определяется				
	3	Не определяется	Н/П	22,487	28 520,168	28 718,760
		Не определяется	Н/П	22,489	28 481,504	
		Не определяется	Н/П	22,455	29 154,613	
		Не определяется				
		Не определяется				
Критерии соответствия		Не определяется			21 212–39 394	
	Анализ №	Ct трансгена	Копии трансгена	Ct hALB	Копии hALB	Ср. число копий hALB
JNJ-68284528 CAR-T ДНК	1	25,796	4 894,034	22,321	32 078,729	31 552,141
		25,831	4 776,155	22,356	31 328,813	
		25,830	4 779,097	22,360	31 248,881	

	2	25,742	4 792,772	22,353	32 438,480	33 725,105
		25,783	4 656,793	22,230	35 245,887	
		25,803	4 592,801	22,305	33 490,949	
	3	25,719	4 739,884	22,373	30 857,877	32 056,623
		25,597	5 153,907	22,283	33 273,906	
		25,742	4 666,396	22,318	32 038,086	
Критерии соответствия:			Количественно определяемый результат			21 212–39 394

8.4 Диапазон и LOQ

8.4.1 Мишени трансгена и hALB удовлетворяют всем критериям соответствия в отношении точности, линейности и внутрилабораторной воспроизводимости. Поэтому диапазон для мишеней как трансгена, так и hALB определяется как диапазон числа копий стандартной кривой по 5 точкам. Диапазон трансгена составляет 193,939–121 212,121 копий. Диапазон hALB составляет 121,212–75 757,576 копий. Кроме того, LOQ для мишени hALB определяется как 121,212 копий.

8.4.2 Результаты для LOQ образцов 0,014 VCN/клетка и 0,02 VCN/клетка приведены в таблице 17. По меньшей мере одно из трех значений Ct по результатам измерений для LOQ образца 0,014 VCN/клетка не попадает в диапазон Ct стандартной кривой трансгена в каждом достоверном аттестационном анализе. Поэтому значения числа копий трансгена не могут быть точно определены, и нет возможности оценить критерии LOQ. Однако LOQ образца 0,02 VCN/клетка приводило к % извлечения на уровне 73–80%. LOQ образца 0,02 VCN/клетка также приводило к % CV для среднего значения числа копий трансгена и среднего результатов VCN/клетка 1–9% и 2–11% соответственно. Поэтому LOQ мишени трансгена определяется как значение ожидаемого числа копий трансгена LOQ образца 0,02 VCN/клетка, равное 303,030 копий.

Таблица 17. Результаты для LOQ образцов 0,014 VCN/клетка и 0,02 VCN/клетка

	Анализ №	Наблюдаемое число копий трансгена	Наблюдаемое среднее число копий трансгена	Наблюдаемое SD копий трансгена	Наблюдаемый % CV копий трансгена	% извлечения количества трансгена	Наблюдаемое ср. значение VCN/клетка	Наблюдаемое SD VCN/клетка	Наблюдаемое % CV VCN/клетка	% извлечения VCN/клетка
0,014 VCN/клетка (212,121 копий трансгена)	1	Н/П 177,993 Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
	2	Н/П Н/П Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П

	3	187,975 Н/П 188,407	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
Значения количеств, обозначенные как Н/П, не поддавались количественному определению, поскольку значение Ct было выше наибольшего значения Ct для стандарта № 5 (т. е. вне диапазона Ct стандартной кривой трансгена)										
	Ана-лиз №	Наблю-даемое число копий трансгена	Наблю-даемое среднее число копий трансгена	Наблюд-аемое SD копий трансгена	Наблю-даемый % CV копий трансгена	% извле-чения коли-чества транс-гена	Наблю-даемое ср. значение VCN/ клетка	Наблю-даемое SD VCN/ клетка	Наблю-даемое % CV VCN/ клетка	% извле-чения VCN/ клетка
0,02 VCN/клетка (303,030 копий трансгена)	1	237,648 241,111 230,666	236,475	5,320	2	78	0,016	0,0002	2	80
	2	212,258 214,734 209,573	212,187	2,581	1	70	0,015	0,0003	2	73
	3	221,846 200,792 242,464	221,701	20,836	9	73	0,015	0,0016	11	75
			Критерии соответствия:		≤ 20	30–170			≤ 20	30–170

[00281] Содержание всех патентов, опубликованных заявок, ссылок, цитируемых в настоящем документе, полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

[00282] Хотя были показаны и описаны примеры осуществления, специалистам в данной области будет понятно, что возможно внесение различных изменений в форме и содержании без отступления от объема вариантов осуществления, включенных в прилагаемую формулу изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Набор зондов и праймеров, содержащий: зонд, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, и по меньшей мере одну метку, связанную с зондом; первый праймер, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11; и второй праймер, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12.

2. Набор зондов и праймеров по п. 1, в котором по меньшей мере одна метка содержит радиоактивный изотоп, субстрат фермента, хемилюминесцентный агент, флуорофор, тушитель флуоресценции, фермент, химическое соединение или их комбинацию.

3. Набор для количественного определения интеграции трансгена в Т-клетку с химерными антигенными рецепторами (CAR), содержащий: зонд, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, и по меньшей мере одну метку, связанную с зондом; первый праймер, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11; и второй праймер, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12.

4. Набор по п. 3, в котором по меньшей мере одна метка, связанная с зондом, содержит радиоактивный изотоп, субстрат фермента, хемилюминесцентный агент, флуорофор, тушитель флуоресценции, фермент, химическое соединение или их комбинацию.

5. Набор по п. 3, содержащий матрицу, содержащую зонд.

6. Набор по п. 5, в котором матрица представляет собой многолуночный планшет.

7. Набор по п. 3, дополнительно содержащий зонд человеческого альбумина (hALB), содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22, и по меньшей мере одну метку, связанную с зондом hALB, первый праймер hALB, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23, и второй праймер hALB, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24.

8. Набор по п. 7, в котором по меньшей мере одна метка, связанная с зондом hALB, содержит радиоактивный изотоп, субстрат фермента, хемилюминесцентный агент, флуорофор, тушитель флуоресценции, фермент, химическое соединение или их комбинацию.

9. Набор по п. 3, дополнительно содержащий зонд референсного гена и по меньшей мере одну метку, связанную с зондом референсного гена, первый праймер референсного гена и второй праймер референсного гена.

10. Способ количественного определения интеграции трансгена в Т-клетку с химерным антигенным рецептором (CAR), включающий:
амплификацию нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки с первым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, и вторым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты CAR;
амплификацию нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки с первым праймером hALB, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23, и вторым праймером hALB, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты hALB;
обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;
обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами hALB и зондом hALB, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22, посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом hALB; и
количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом.

11. Способ количественного определения интеграции трансгена в Т-клетку с химерным антигенным рецептором (CAR), включающий:
приведение нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки в контакт с первым праймером CAR, вторым праймером CAR, первым праймером hALB и вторым праймером hALB, причем первый праймер CAR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11,

второй праймер CAR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12,
первый праймер hALB содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23,
второй праймер hALB содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 24;
амплификацию нуклеиновых кислот CAR с первым праймером CAR и вторым праймером CAR, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты CAR;
амплификацию нуклеиновых кислот hALB с первым праймером hALB и вторым праймером hALB, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты hALB;
обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;
обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами hALB и зондом hALB посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом hALB; и
количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом.

12. Способ по п. 10 или 11, в котором обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR включает обнаружение изменения целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR, во время или после гибридизации относительно целевого сигнала от метки, связанной с зондом CAR, до гибридизации.

13. Способ по п. 10 или 11, в котором обнаружение гибридизации между амплифицированными молекулами нуклеиновых кислот hALB и зондом hALB включает обнаружение изменения целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом hALB, во время или после гибридизации относительно целевого сигнала от метки, связанной с зондом hALB, до гибридизации.

14. Способ по п. 10 или 11, в котором амплификация включает полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

15. Способ по п. 14, в котором ПЦР представляет собой ПЦР в реальном времени, полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой в реальном времени (ОТ-ПЦР в реальном времени), лигазную цепную реакцию (ЛЦР) или транскрипционно опосредованную амплификацию (ТМА).

16. Способ по п. 10, в котором по меньшей мере одна метка, связанная с зондом CAR, содержит флуорофор.

17. Способ по п. 10, в котором по меньшей мере одна метка, связанная с зондом hALB, содержит флуорофор.

18. Способ количественного определения интеграции трансгена в Т-клетку с химерным антигенным рецептором (CAR), включающий:
амплификацию нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки с первым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, и вторым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты CAR;
амплификацию нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки с первым праймером референсного гена и вторым праймером референсного гена, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты референсного гена;
обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;
обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами референсного гена и зондом референсного гена посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом референсного гена; и
количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом.

19. Способ количественного определения интеграции трансгена в Т-клетку с химерным антигенным рецептором (CAR), включающий:
приведение нуклеиновых кислот из CAR Т-клетки в контакт с первым праймером CAR, вторым праймером CAR, первым праймером референсного гена и вторым праймером

референсного гена, причем первый праймер CAR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, а второй праймер CAR содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12;

амплификацию нуклеиновых кислот CAR с первым праймером CAR и вторым праймером CAR, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты CAR;

амплификацию нуклеиновых кислот первого референсного гена с первым праймером референсного гена и вторым праймером референсного гена, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты референсного гена;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами референсного гена и зондом референсного гена посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом референсного гена; и

количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом.

20. Способ по п. 18 или 19, в котором обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR включает обнаружение изменения целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR, во время или после гибридизации относительно целевого сигнала от метки, связанной с зондом CAR, до гибридизации.

21. Способ по п. 18 или 19, в котором обнаружение гибридизации между молекулами амплифицированных нуклеиновых кислот референсного гена и зондом референсного гена включает обнаружение изменения целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом референсного гена, во время или после гибридизации относительно целевого сигнала от метки, связанной с зондом референсного гена, до гибридизации.

22. Способ по п. 18 или 19, в котором амплификация включает полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

23. Способ по п. 22, в котором ПЦР представляет собой ПЦР в реальном времени, полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой в реальном времени (ОТ-ПЦР в реальном времени), лигазную цепную реакцию (ЛЦР) или транскрипционно опосредованную амплификацию (ТМА).

24. Способ по п. 18, в котором по меньшей мере одна метка, связанная с зондом CAR, содержит флуорофор.

25. Способ по п. 18, в котором по меньшей мере одна метка, связанная с зондом референсного гена, содержит флуорофор.

26. Способ получения химерного антигенного рецептора (CAR) Т-клетки, включающий: интродукцию трансгена CAR в Т-клетку для получения интегрированного в Т-клетку трансгена;

определение интеграции трансгена CAR, включающее:

амплификацию нуклеиновых кислот из Т-клетки с интегрированным трансгеном с первым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, и вторым праймером CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты CAR;

амплификацию нуклеиновых кислот из Т-клетки с интегрированным трансгеном с первым праймером референсного гена и вторым праймером референсного гена, таким образом получая амплифицированные нуклеиновые кислоты референсного гена;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, посредством целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR;

обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами референсного гена и зондом референсного гена посредством референсного сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом референсного гена; и

количественное определение числа копий трансгена путем сравнения целевого сигнала с референсным сигналом;

и

получение CAR Т-клетки, содержащей по меньшей мере одну копию интегрированного трансгена CAR.

27. Способ по п. 26, в котором обнаружение гибридизации между амплифицированными нуклеиновыми кислотами CAR и зондом CAR включает обнаружение изменения целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом CAR, во время или после гибридизации относительно целевого сигнала от метки, связанной с зондом CAR, до гибридизации.

28. Способ по п. 26, в котором обнаружение гибридизации между молекулами амплифицированных нуклеиновых кислот референсного гена и зондом референсного гена включает обнаружение изменения целевого сигнала от по меньшей мере одной метки, связанной с зондом референсного гена, во время или после гибридизации относительно целевого сигнала от метки, связанной с зондом референсного гена, до гибридизации.

29. Способ по п. 26, в котором амплификация включает полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

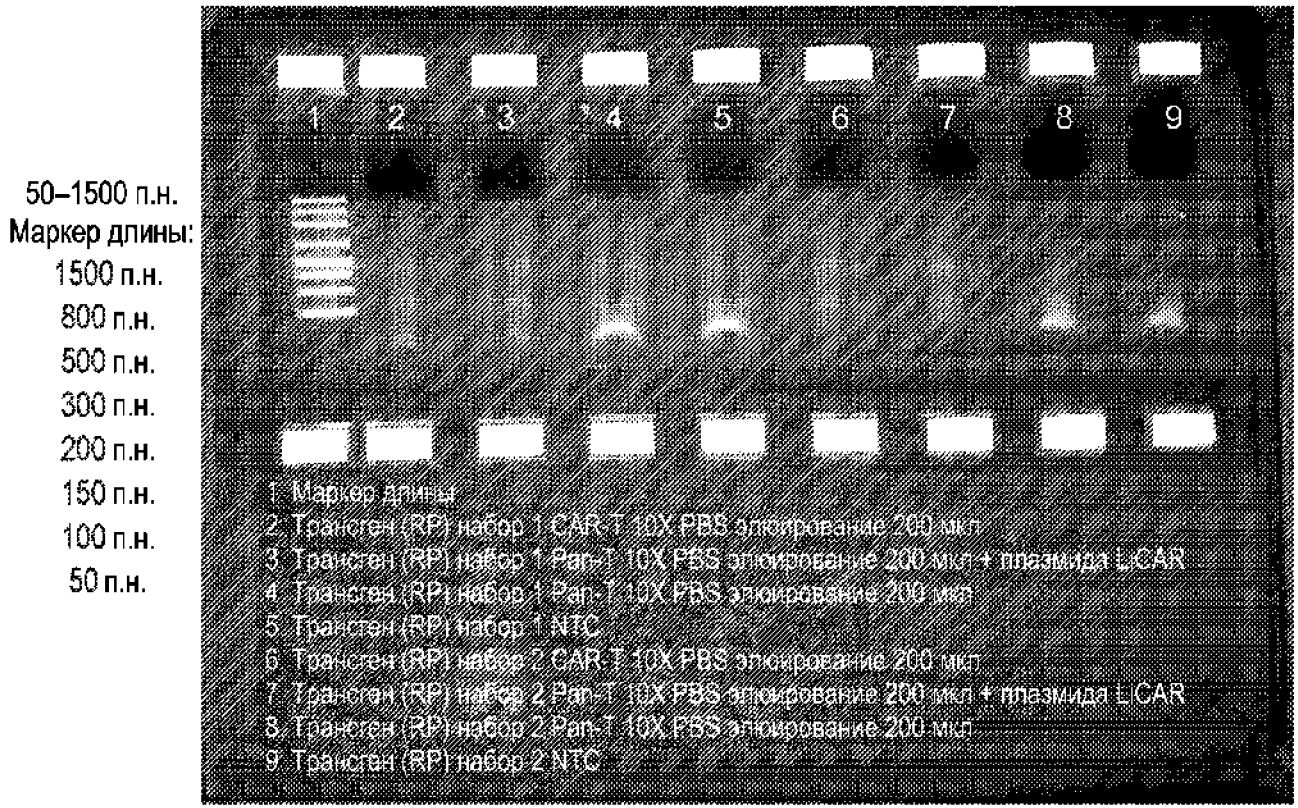
30. Способ по п. 29, в котором ПЦР представляет собой ПЦР в реальном времени, полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой в реальном времени (ОТ-ПЦР в реальном времени), лигазную цепную реакцию (ЛЦР) или транскрипционно опосредованную амплификацию (ТМА).

31. Способ по п. 26, в котором по меньшей мере одна метка, связанная с зондом CAR, содержит флуорофор.

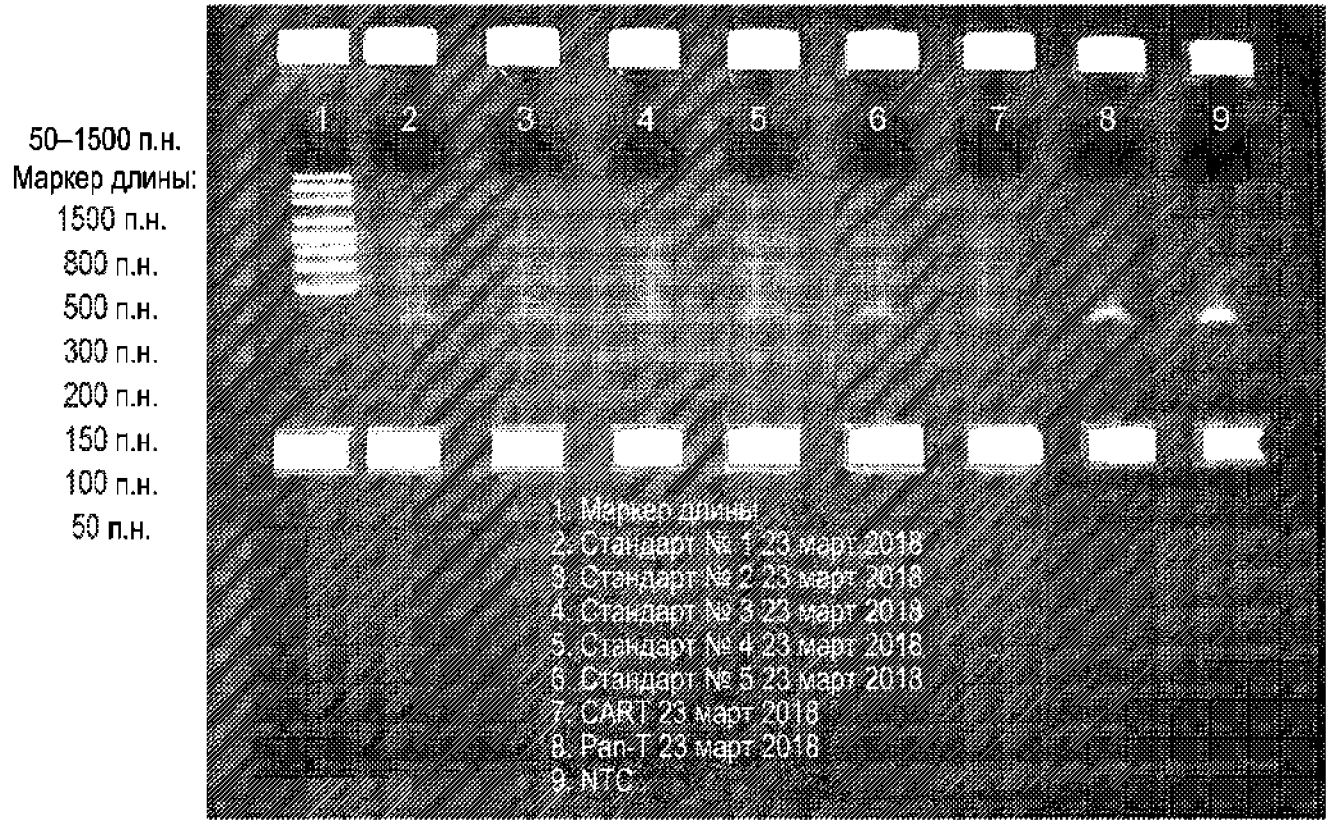
32. Способ по п. 26, в котором по меньшей мере одна метка, связанная с зондом референсного гена, содержит флуорофор.

33. CAR Т-клетка, полученная способом по любому из пп. 26–32.

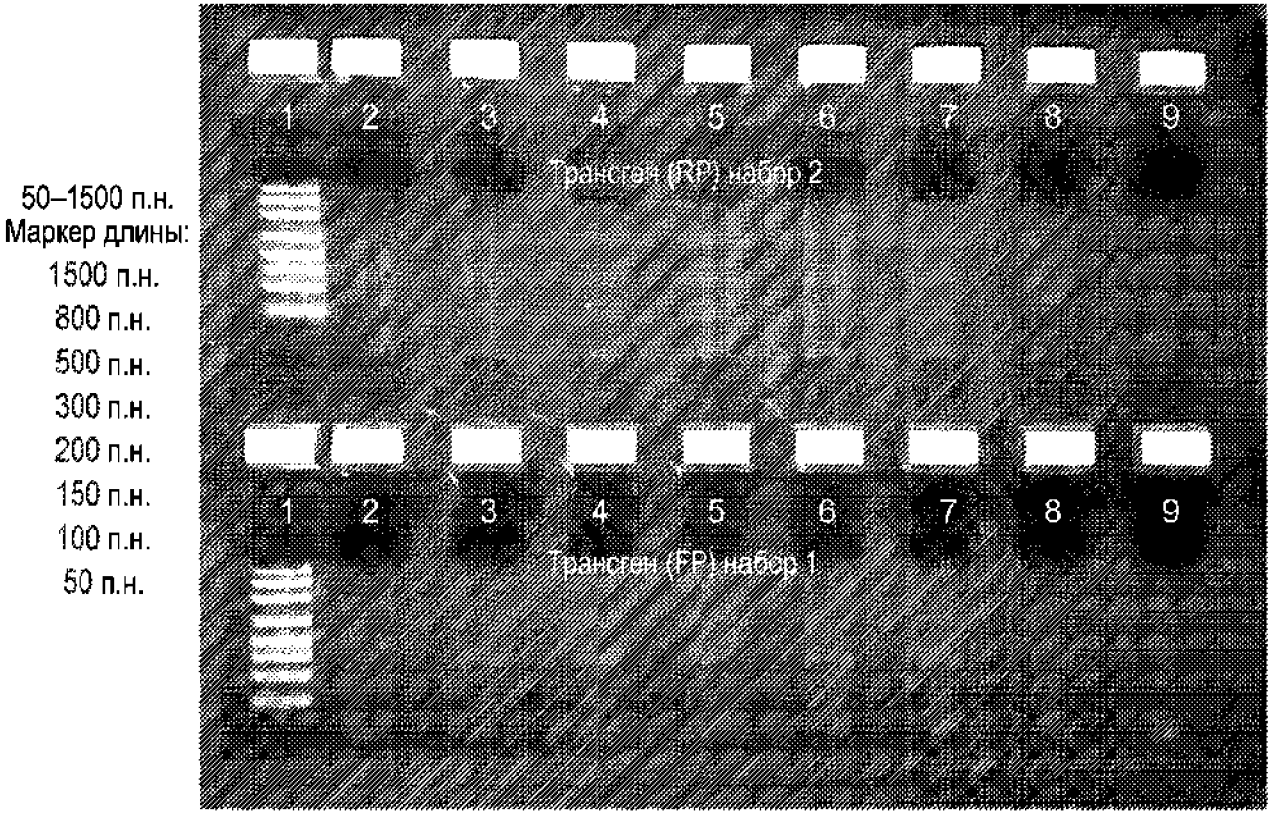
ФИГ. 1


50–1500 п.н.
Маркер длины:
1500 п.н.
800 п.н.
500 п.н.
300 п.н.
200 п.н.
150 п.н.
100 п.н.
50 п.н.
1 2 3 4 5 6 7 8 9
1. Маркер длины
2. Трансген (RP) набор 1 CAR-T 10X PBS элюирование 200 мкл
3. Трансген (RP) набор 1 Pan-T 10X PBS элюирование 200 мкл + плазмида LiCAR
4. Трансген (RP) набор 1 Pan-T 10X PBS элюирование 200 мкл
5. Трансген (RP) набор 1 NTC
6. Трансген (RP) набор 2 CAR-T 10X PBS элюирование 200 мкл
7. Трансген (RP) набор 2 Pan-T 10X PBS элюирование 200 мкл + плазмида LiCAR
8. Трансген (RP) набор 2 Pan-T 10X PBS элюирование 200 мкл
9. Трансген (RP) набор 2 NTC
Трансген (RP) набор 1
Продукт* = 129 п.н.
Трансген (RP) набор 2
Продукт* = 90 п.н.
* Длина продукта определяется по выравниваниям олигонуклеотидов с последовательностью плазмиды LiCAR

ФИГ. 2


50–1500 п.н.
Маркер длины:
1500 п.н.
800 п.н.
500 п.н.
300 п.н.
200 п.н.
150 п.н.
100 п.н.
50 п.н.
1
2
3
4
5
6
7
8
9
1. Маркер длины
2. Стандарт № 1 23 март 2018
3. Стандарт № 2 23 март 2018
4. Стандарт № 3 23 март 2018
5. Стандарт № 4 23 март 2018
6. Стандарт № 5 23 март 2018
7. CART 23 март 2018
8. Pan-T 23 март 2018
9. NTC
Трансген (RP) набор 2
Продукт* = 90 п.н.
hLAB набор 2
Продукт = 129 п.н.

ФИГ. 3



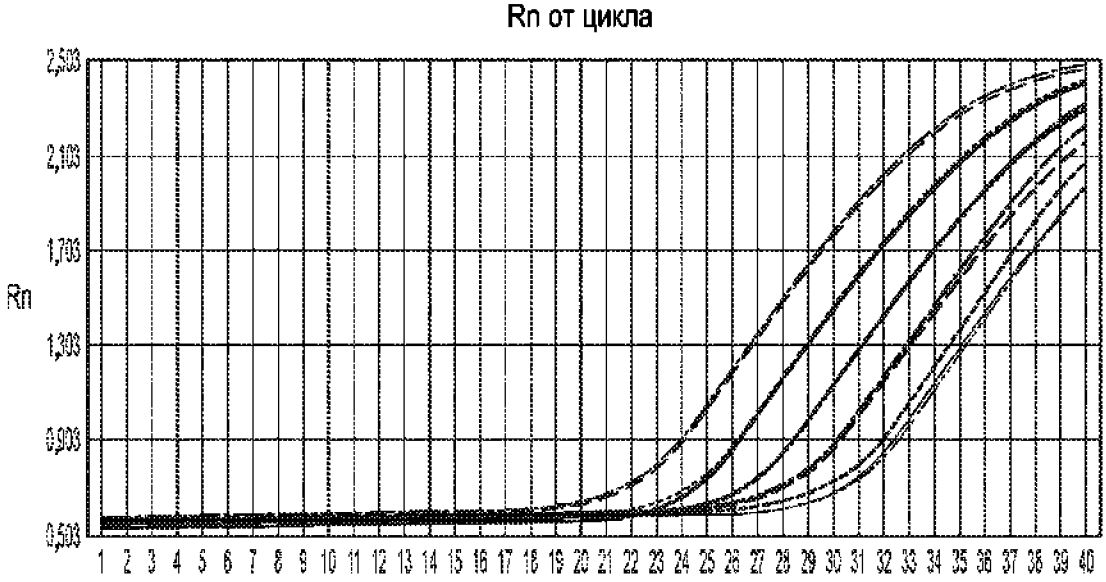
Трансген (RP) набор 1
Продукт* = 104 п.н.

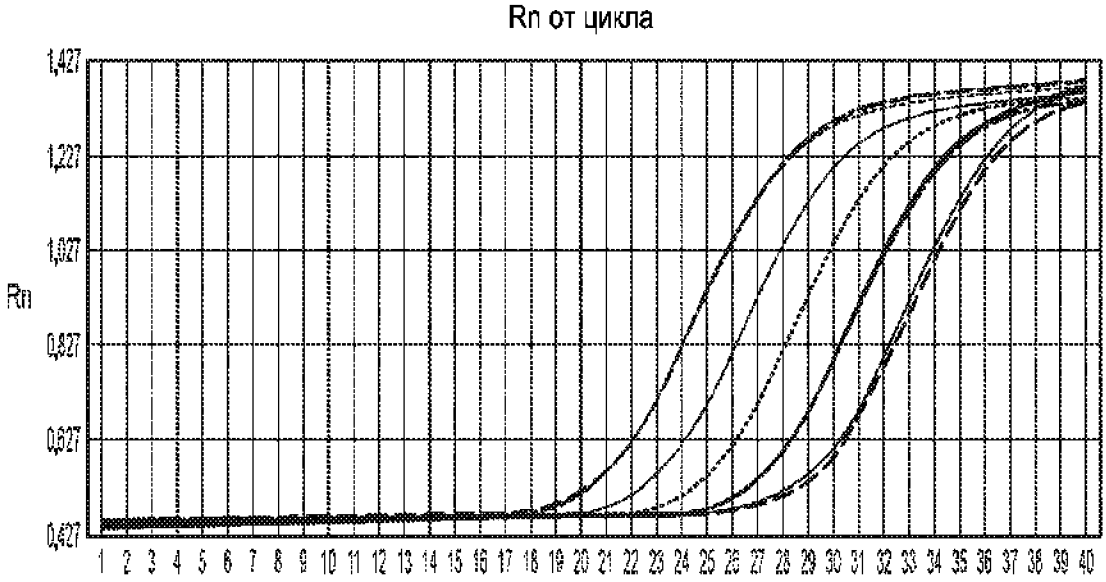
Трансген (RP) набор 2
Продукт* = 90 п.н.

hLAB набор 1
Продукт = 123 п.н.

1. Маркер длины
2. Стандарт № 1 06 апр 2018
3. Стандарт № 2 06 апр 2018
4. Стандарт № 3 06 апр 2018
5. Стандарт № 4 06 апр 2018
6. Стандарт № 5 06 апр 2018
7. Средний контроль 06 апр 2018
8. Слабый контроль 06 апр 2018
9. NTC

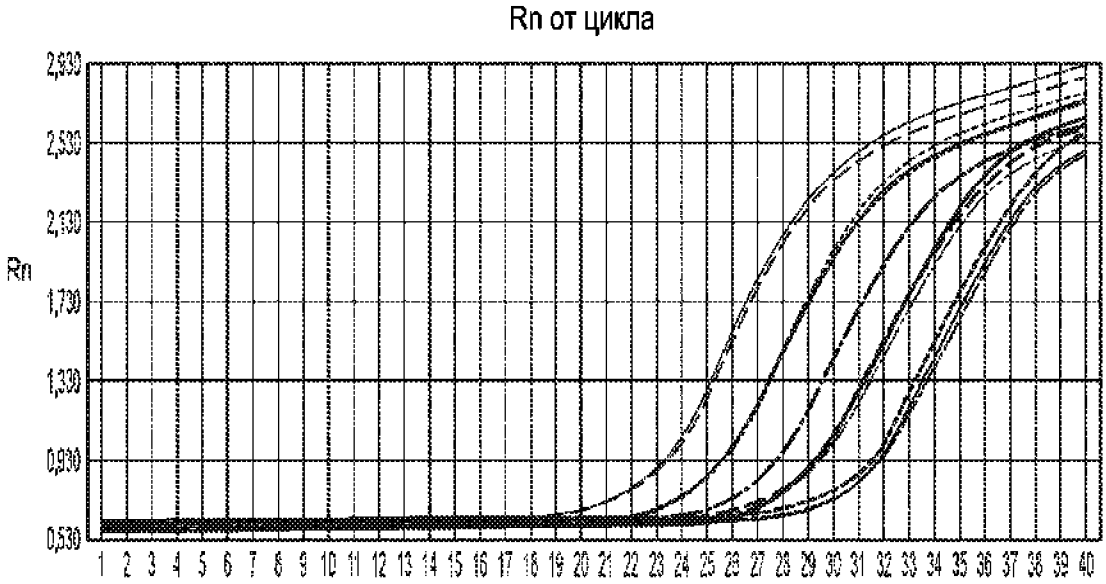
ФИГ. 4A

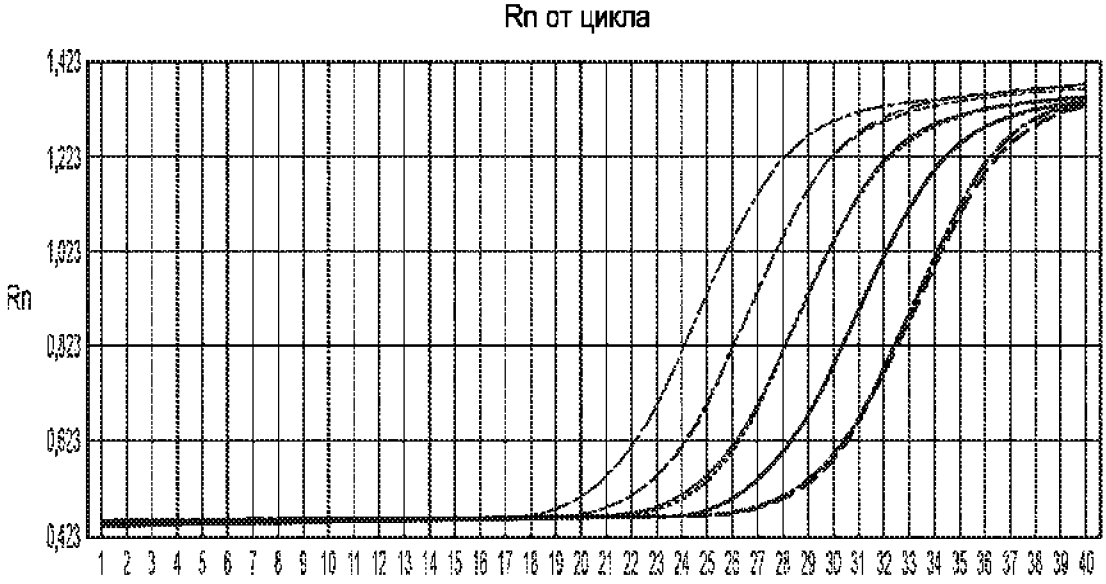

Rn от цикла
Rn
2,503
2,103
1,703
1,303
0,903
0,503
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40


Rn от цикла
Rn
1,427
1,227
1,027
0,827
0,627
0,427
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

ФИГ. 4B

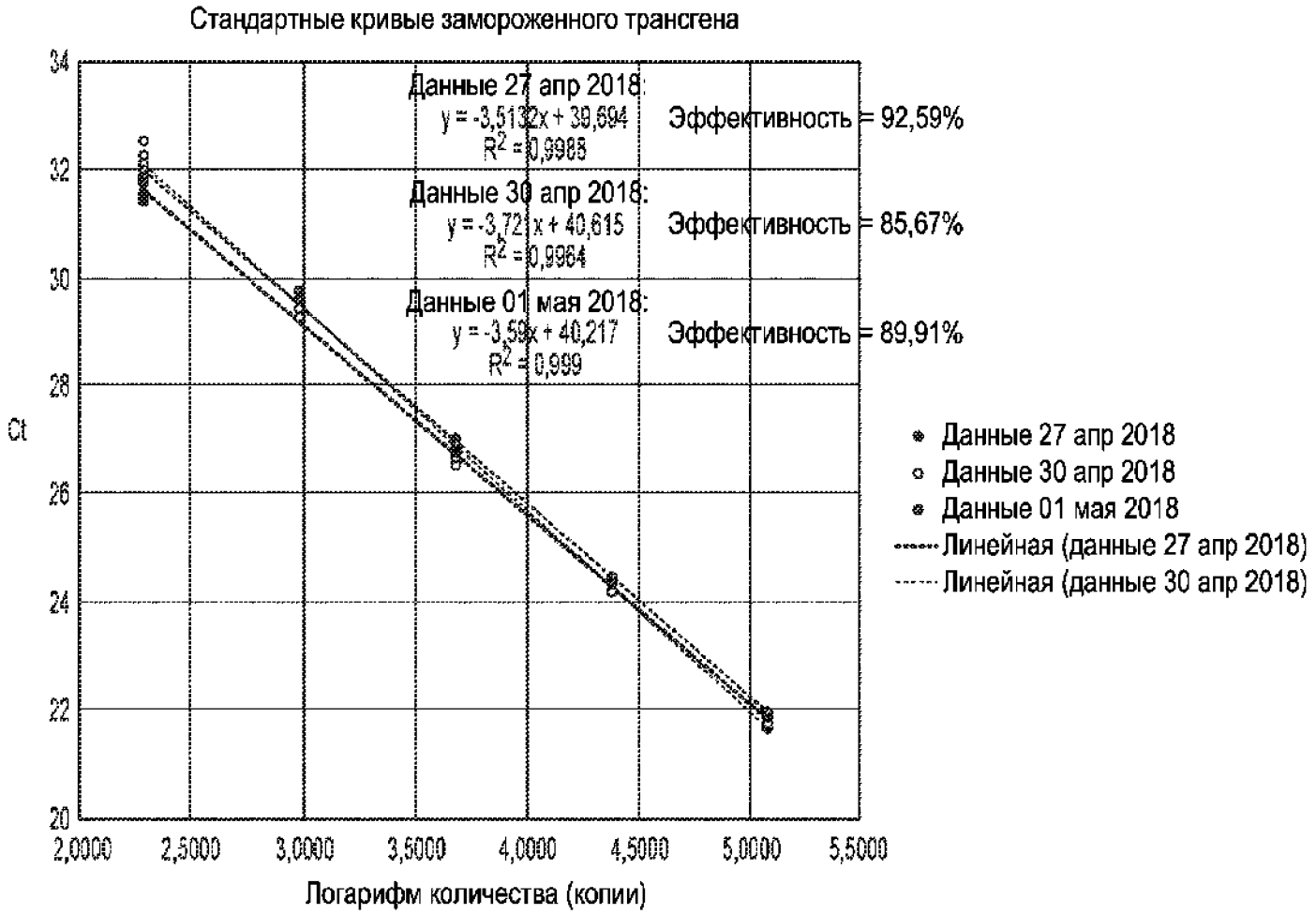
ФИГ. 4C


Rn от цикла
Rn
2,930
2,530
2,130
1,730
1,330
0,930
0,530
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

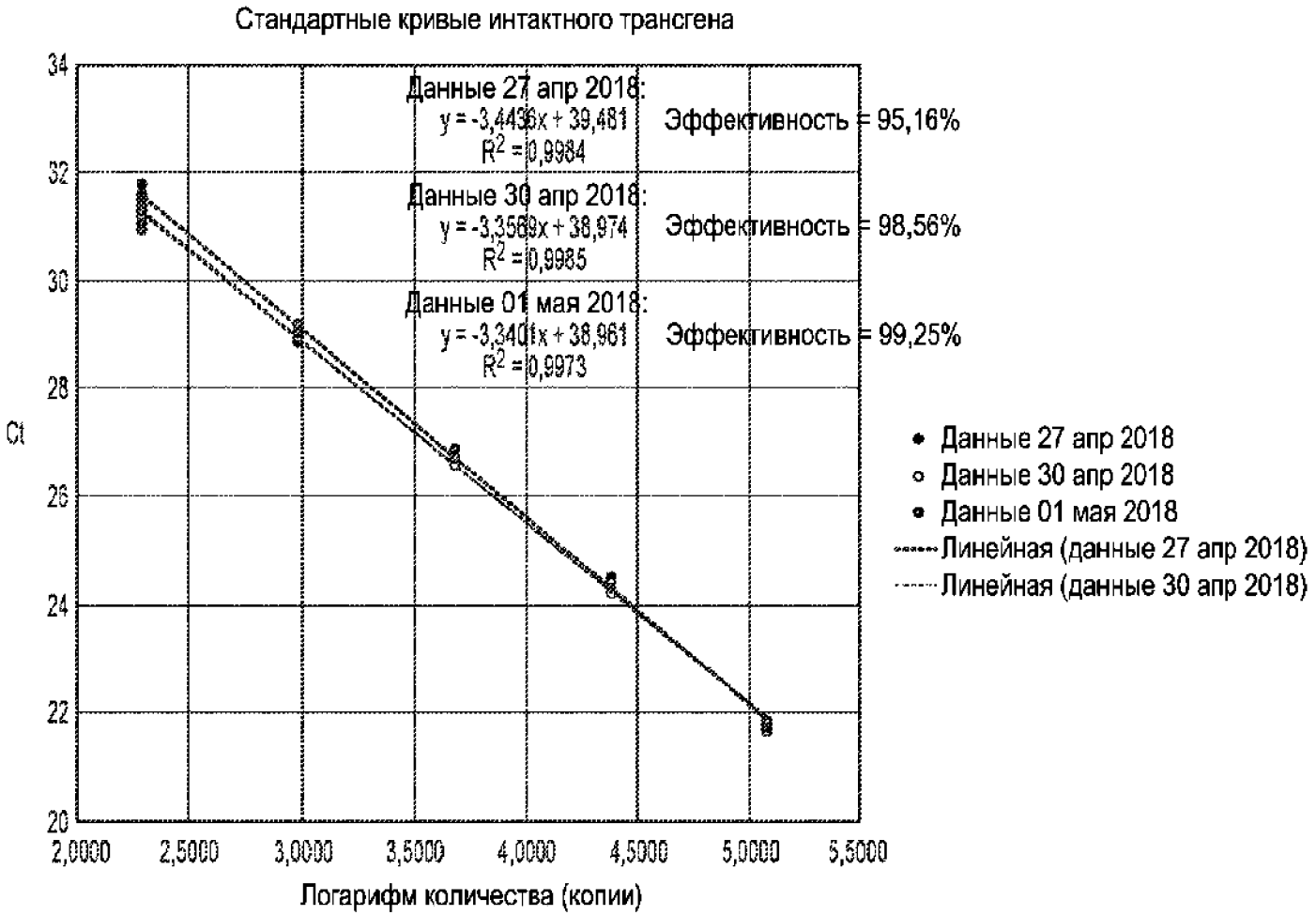

Rn от цикла
Rn
1,423
1,223
1,023
0,823
0,623
0,423
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

ФИГ. 4D

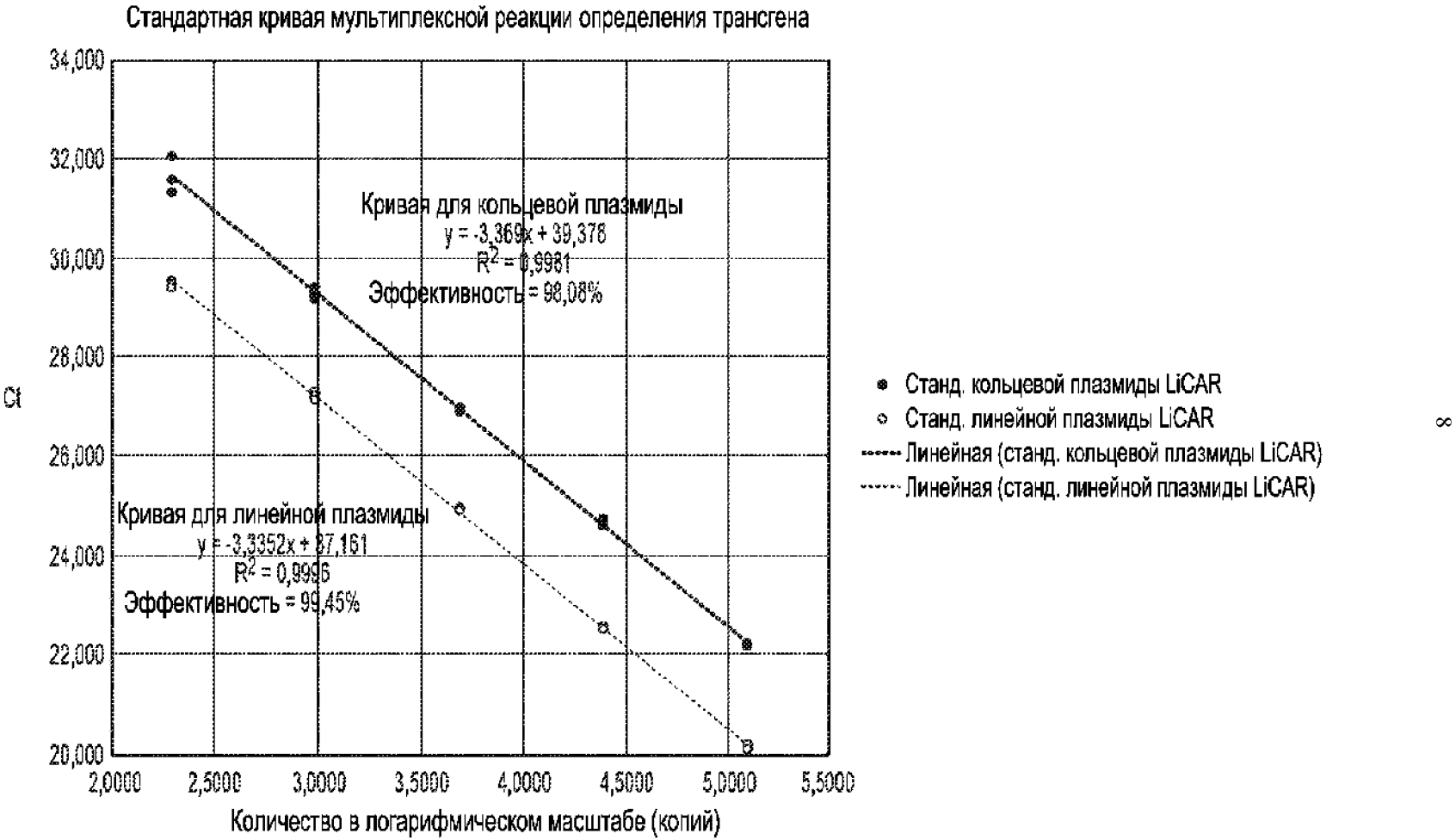
ФИГ. 5А


Стандартные кривые замороженного трансгена
Данные 27 апр 2018:
y = -3,5132x + 39,694
R² = 0,9983
Эффективность = 92,59%
Данные 30 апр 2018:
y = -3,72x + 40,615
R² = 0,9964
Эффективность = 85,67%
Данные 01 мая 2018:
y = -3,59x + 40,217
R² = 0,999
Эффективность = 89,91%
Ct
34
32
30
28
26
24
22
20
2,0000
2,5000
3,0000
3,5000
4,0000
4,5000
5,0000
5,5000
Логарифм количества (копии)
Данные 27 апр 2018
Данные 30 апр 2018
Данные 01 мая 2018
Линейная (данные 27 апр 2018)
Линейная (данные 30 апр 2018)

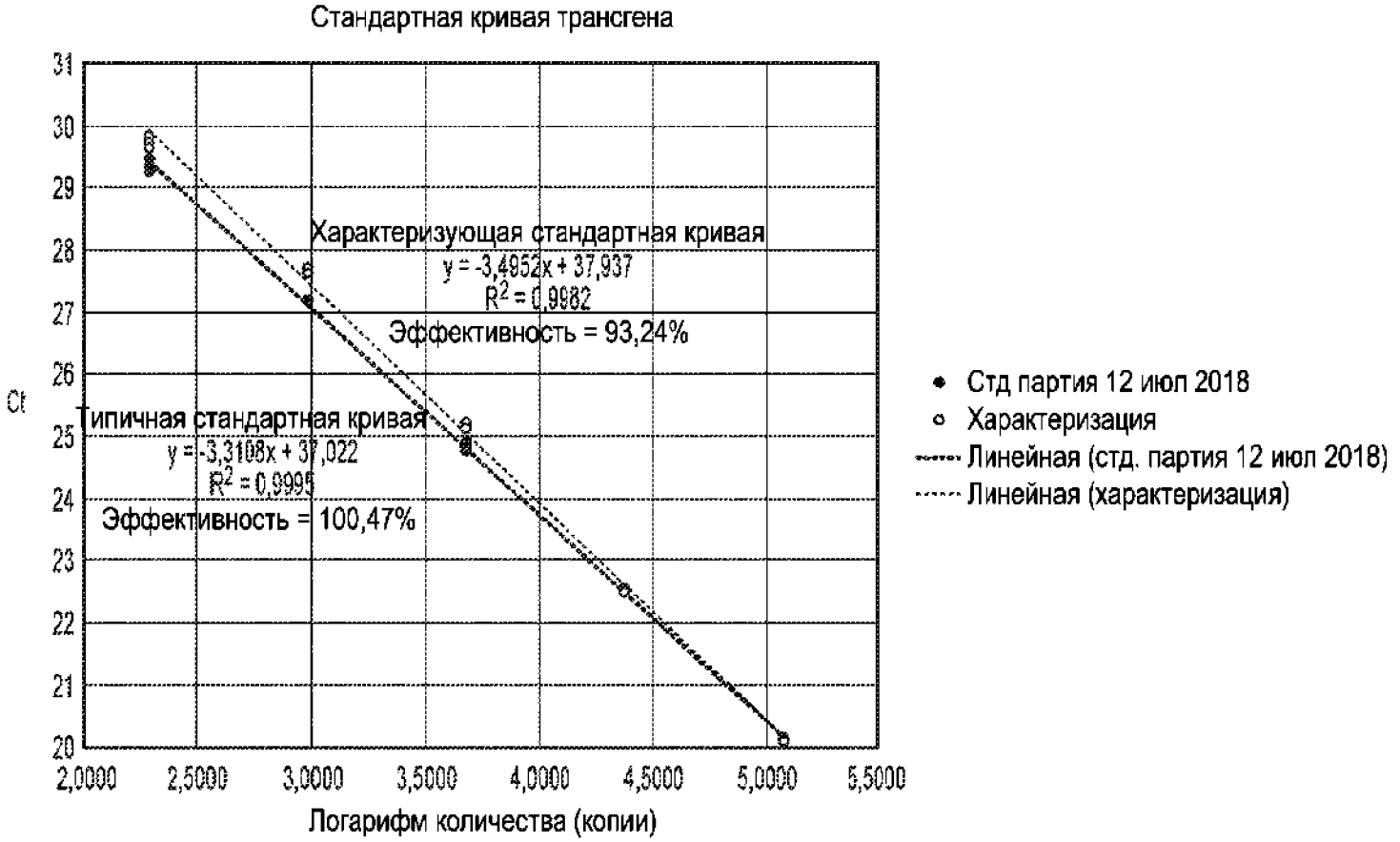
ФИГ. 5B


Стандартные кривые интактного трансгена
Данные 27 апр 2018:
y = -3,4436x + 39,481
R2 = 0,9984
Эффективность = 95,16%
Данные 30 апр 2018:
y = -3,3589x + 38,974
R2 = 0,9985
Эффективность = 98,56%
Данные 01 мая 2018:
y = -3,3401x + 38,961
R2 = 0,9973
Эффективность = 99,25%
Ct
34
32
30
28
26
24
22
20
2,0000
2,5000
3,0000
3,5000
4,0000
4,5000
5,0000
5,5000
Логарифм количества (копии)
Данные 27 апр 2018
Данные 30 апр 2018
Данные 01 мая 2018
Линейная (данные 27 апр 2018)
Линейная (данные 30 апр 2018)

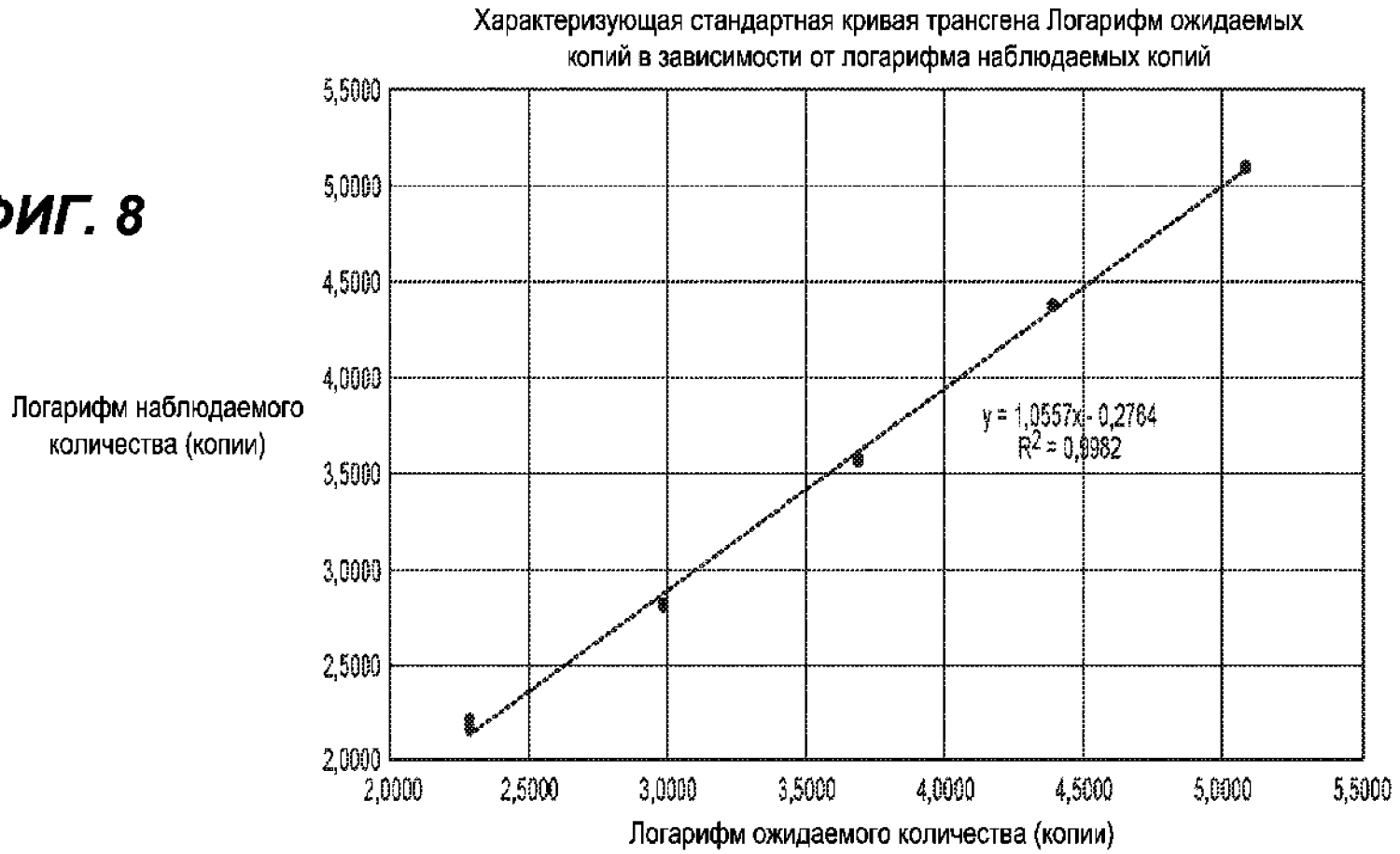
ФИГ. 6


Стандартная кривая мультиплексной реакции определения трансгена
34,000
32,000
30,000
28,000
26,000
24,000
22,000
20,000
2,0000
2,5000
3,0000
3,5000
4,0000
4,5000
5,0000
5,5000
Количество в логарифмическом масштабе (копий)
Кривая для кольцевой плазмиды
y = -3,369x + 39,378
R2 = 0,9981
Эффективность = 98,08%
Кривая для линейной плазмиды
y = -3,3352x + 37,161
R2 = 0,9996
Эффективность = 99,45%
Станд. кольцевой плазмиды LiCAR
Станд. линейной плазмиды LiCAR
Линейная (станд. кольцевой плазмиды LiCAR)
Линейная (станд. линейной плазмиды LiCAR)

ФИГ. 7


Стандартная кривая трансгена
Характеризующая стандартная кривая
y = -3,4952x + 37,937
R2 = 0,9982
Эффективность = 93,24%
Типичная стандартная кривая
y = -3,3108x + 37,022
R2 = 0,9995
Эффективность = 100,47%
Ct
31
30
29
28
27
26
25
24
23
22
21
20
2,0000
2,5000
3,0000
3,5000
4,0000
4,5000
5,0000
5,5000
Логарифм количества (копии)
Стд партия 12 июл 2018
Характеризация
Линейная (стд. партия 12 июл 2018)
Линейная (характеризация)

ФИГ. 8


Характеризующая стандартная кривая трансгена Логарифм ожидаемых копий в зависимости от логарифма наблюдаемых копий
Логарифм наблюдаемого количества (копии)
5,5000
5,0000
4,5000
4,0000
3,5000
3,0000
2,5000
2,0000
y = 1,0557x - 0,2764
R2 = 0,9982
2,0000
2,5000
3,0000
3,5000
4,0000
4,5000
5,0000
5,5000
Логарифм ожидаемого количества (копии)

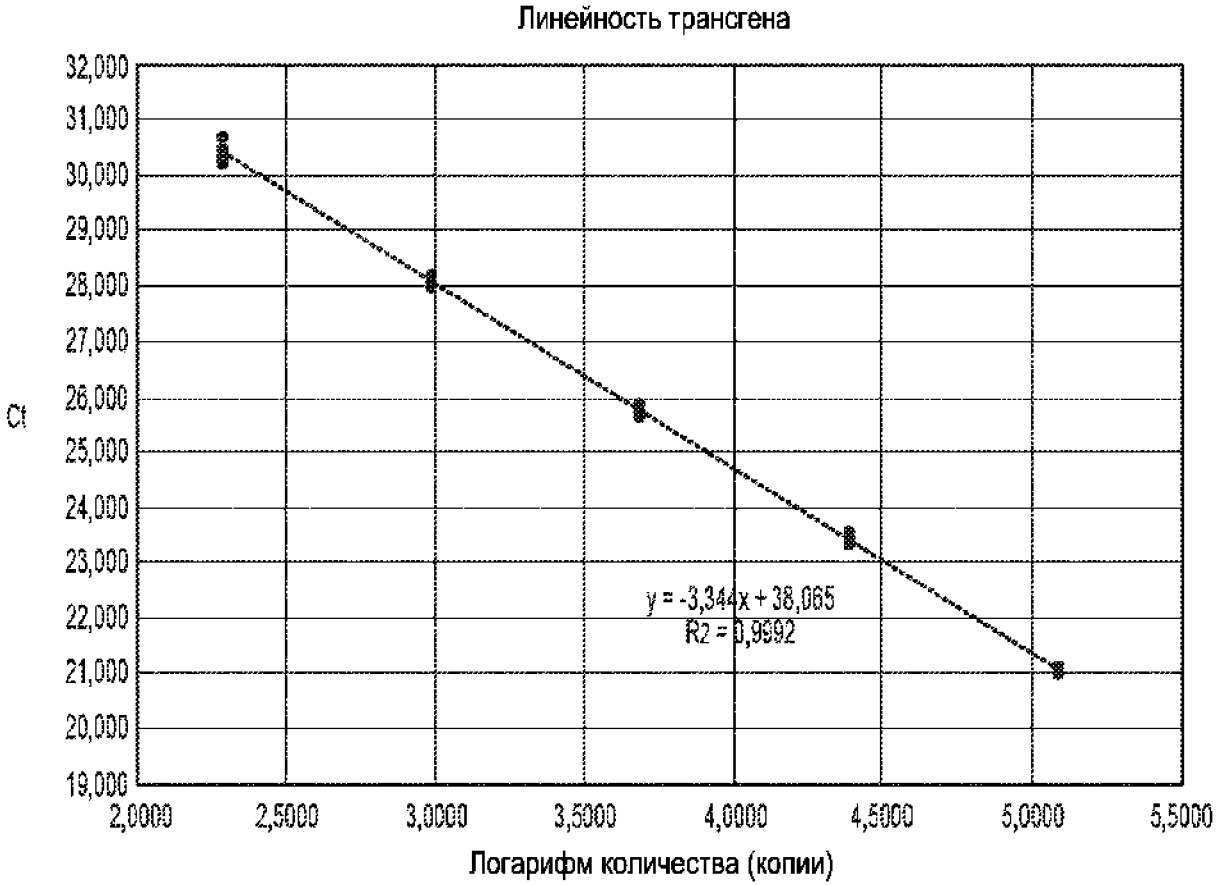
ФИГ. 9

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	***Стандарт № 1***			***Стандарт № 2***			***Стандарт № 3***			***Стандарт № 4***		
B	***Стандарт № 5***			*NTC*			*BCMA средний контроль*			*BCMA слабый контроль*		
C	Образец 1			Образец 2			Образец 3			Образец 4		
D	Образец 5			Образец 6			Образец 7			Образец 8		
E	Образец 9			Образец 10			Образец 11			Образец 12		
F	Образец 13			Образец 14			Образец 15			Образец 16		
G	Образец 17			Образец 18			Образец 19			Образец 20		
H	Образец 21			Образец 22			Образец 23			Образец 24		

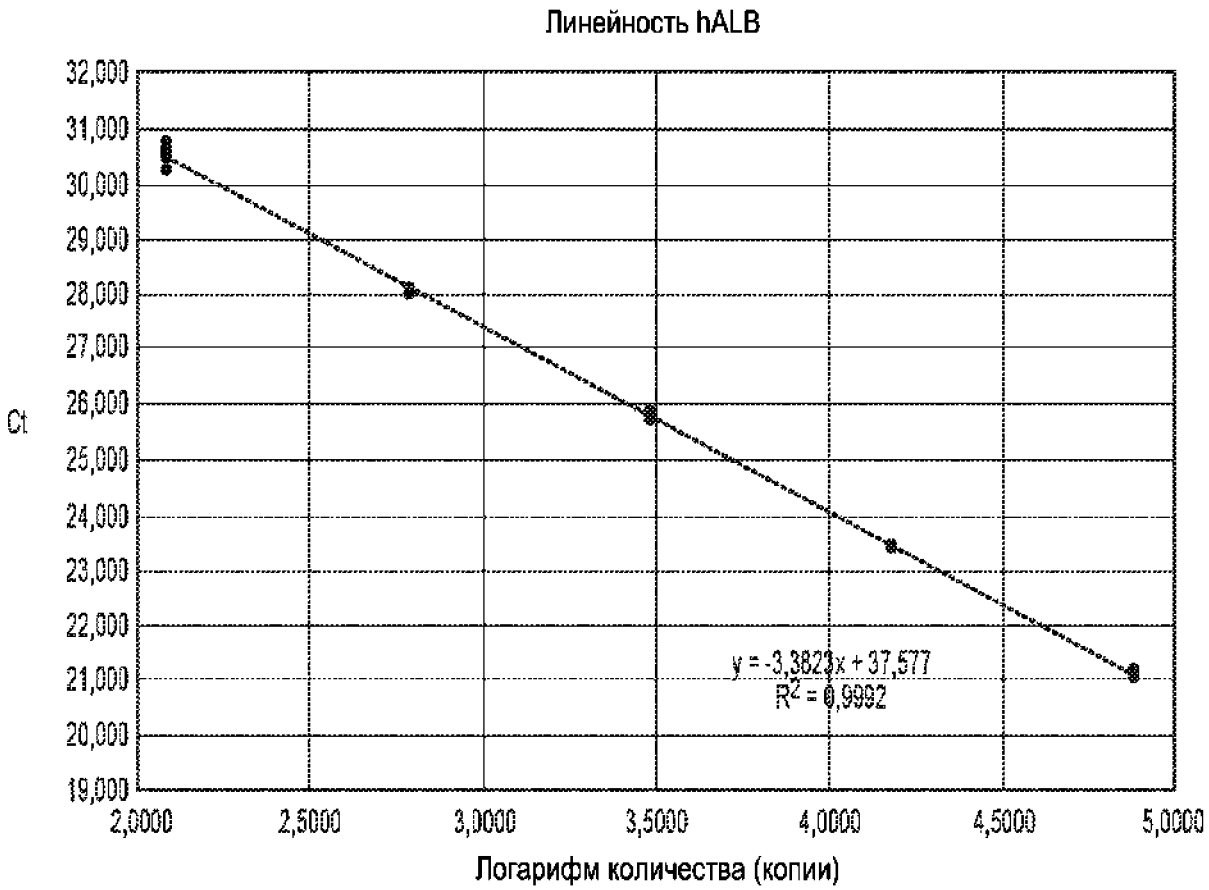
ФИГ. 10

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Стандарт № 1			Стандарт № 2			Стандарт № 3			Стандарт № 4		
B	Стандарт № 5			NTC			BCMA средний контроль (определяемая партия)			BCMA слабый контроль (определяемая партия)		
C	BCMA средний контроль (новая партия)			BCMA слабый контроль (новая партия)								
D												
E												
F												
G												
H												

ФИГ. 11


Линейность трансгена
Ct
32,000
31,000
30,000
29,000
28,000
27,000
26,000
25,000
24,000
23,000
22,000
21,000
20,000
19,000
2,0000
2,5000
3,0000
3,5000
4,0000
4,5000
5,0000
5,5000
y = -3,344x + 38,065
R2 = 0,9992
Логарифм количества (копии)

ФИГ. 12


Линейность hALB
Ct
32,000
31,000
30,000
29,000
28,000
27,000
26,000
25,000
24,000
23,000
22,000
21,000
20,000
19,000
2,0000
2,5000
3,0000
3,5000
4,0000
4,5000
5,0000
y = -3,3823x + 37,577
R² = 0,9992
Логарифм количества (копии)

ФИГ. 13

```
   1 cctttcccag ggacttctac aaggaaaaag ctagagttgg ttactgactt ctaataaata
  61 atgcctacaa tttctaggaa gttaaaagtt gacataattt atccaagaaa gaattatttt
 121 cttaacttag aatagttttt ttttttttt cagatgtagg ttttttctggc tttagaaaaa
 181 atgcttgttt ttcttcaatg gaaaataggc acacttgttt tatgtctgtt catctgtagt
 241 cagaaagaca agtctggtat ttcctttcag gactcccttg agtcattaaa aaaaatcttc
 301 ctatctatct atgtatctat catccatcta gctttgattt tttcctcttc tgtgctttat
 361 tagttaatta gtacccattt ctgaagaaga aataacataa gattatagaa aataatttct
 421 ttcattgtaa gactgaatag aaaaaatttt ctttcattat aagactgagt agaaaaaata
 481 atactttgtt agtctctgtg cctctatgtg ccatgaggaa atttgactac tggttttgac
 541 tgactgagtt atttaattaa gtaaaataac tggcttagta ctaattattg ttctgtagta
 601 tcagagaaag ttgttcttcc tactggttga gctcagtagt tcttcatatt ctgagcaaaa
 661 gggcagaggt aggatagctt ttctgaggta gagataagaa ccttgggtag ggaaggaaga
 721 tttatgaaat atttaaaaaa ttattcttcc ttcgctttgt ttttagacat aatgttaaat
 781 ttattttgaa atttaaagca acataaaaga acatgtgatt tttctactta ttgaaagaga
 841 gaaaggaaaa aaatatgaaa cagggatgga aagaatccta tgcctggtga aggtcaaggg
 901 ttctcataac ctacagagaa tttggggtca gcctgtccta ttgtatatta tggcaaagat
 961 aatcatcatc tcatttgggt ccatttttct ctccatctct gcttaactga agatcccatg
1021 agatatactc acactgaatc taaatagcct atctcagggc ttgaatcaca tgtgggccac
1081 agcaggaatg ggaacatgga atttctaagt cctatcttac ttgttattgt tgctatgtct
1141 ttttcttagt ttgcatctga ggcaacatca gctttttcag acagaatggc tttggaatag
1201 taaaaaagac acagaagccc taaaatatgt atgtatgtat atgtgtgtgt gcatgcgtga
1261 gtacttgtgt gtaaattttt cattatctat aggtaaaagc acacttggaa ttagcaatag
1321 atgcaatttg ggacttaact ctttcagtat gtcttatttc taagcaaagt atttagtttg
1381 gttagtaatt actaaacact gagaactaaa ttgcaaacac caagaactaa aatgttcaag
1441 tgggaaatta cagttaaata ccatggtaat gaataaaagg tacaaatcgt ttaaactctt
1501 atgtaaaatt tgataagatg ttttacacaa ctttaataca ttgacaaggt cttgtggaga
1561 aaacagttcc agatggtaaa tatacacaag ggatttagtc aaacaatttt ttggcaagaa
1621 tattatgaat tttgtaatcg gttggcagcc aatgaaatac aaagatgagt ctagttaata
1681 atctacaatt attggttaaa gaagtatatt agtgctaatt tccctccgtt tgtcctagct
1741 tttctcttct gtcaacccca cacgcctttg gcacaatgaa gtgggtaacc tttatttccc
1801 ttctttttct ctttagctcg gcttattcca ggggtgtgtt tcgtcgagat gcacgtaaga
1861 aatccatttt tctattgttc aacttttatt ctatttcccc agtaaaataa agttttagta
1921 aactctgcat ctttaaagaa ttattttggc atttatttct aaaatggcat agtattttgt
1981 atttgtgaag tcttacaagg ttatcttatt aataaaattc aaacatccta ggtaaaaaaa
2041 aaaaaaggtc agaattgttt agtgactgta attttctttt gcgcactaag gaaagtgcaa
2101 agtaacttag agtgactgaa acttcacaga atagggttga agattgaatt cataactatc
2161 ccaaagacct atccattgca ctatgcttta tttaaaaacc acaaaacctg tgctgttgat
2221 ctcataaata gaacttgtat ttatatttat tttcatttta gtctgtcttc ttggttgctg
2281 ttgatagaca ctaaaagagt attagatatt atctaagttt gaatataagg ctataaatat
2341 ttaataattt taaaaatagt attcttggta attgaattat tcttctgttt aaaggcagaa
2401 gaaataattg aacatcatcc tgagtttttc tgtaggaatc agagcccaat attttgaaac
2461 aaatgcataa tctaagtcaa atggaaagaa atataaaaag taacattatt acttcttgtt
2521 ttcttcagta tttaacaatc cttttttttc ttcccttgcc cagacaagag tgaggttgct
2581 catcggttta aagatttggg agaagaaaat ttcaaagcct tgtaagttaa aatattgatg
2641 aatcaaattt aatgtttcta atagtgttgt ttattattct aaagtgctta tatttccttg
2701 tcatcagggt tcagattcta aaacagtgct gcctcgtaga gttttctgcg ttgaggaaga
2761 tattctgtat ctgggctatc caataaggta gtcactggtc acatggctat tgagtacttc
2821 aaatatgaca agtgcaactg agaaacaaaa acttaaattg tatttaattg tagttaattt
2881 gaatgtatat agtcacatgt ggctaatggc tactgtattg gacagtacag ctctggaact
2941 tgcttggtgg aaaggacttt aatataggtt tcctttggtg gcttacccac taaatcttct
3001 ttacatagca agcattcctg tgcttagttg ggaatattta attttttttt ttttttaaga
3061 cagggtctcg ctctgtcgcc caggctggag tgcagtggcg caatctcggc tcactgcaaa
```

Продолжение на следующей странице

Продолжение с предыдущей страницы

```
3121 ctccgctccc gggttcacgc cattctcctg cctcagcctc ccgagtagct gggactacag
3181 gcgcccgcca tcacgcccgg ctaatctttt gtatttttag tagagatggg gtttcaccgt
3241 gtgccaggat ggtctcaatc tcctgacatc gtgatctgcc cacctcggcc tcccaaagtg
3301 ctgggattac aggagtgagt caccgcgccc ggcctattta aatgtttttt aatctagtaa
3361 aaaatgagaa aattgttttt ttaaaagtct acctaatcct acaggctaat taaagacgtg
3421 tgtggggatc aggtgcggtg gttcacacct gtaatcccag cactttggaa ggctgatgca
3481 ggaggattgc ttgagcccag gagtacaaga ccagcctggg caagtctctt taaaaaaaac
3541 aaaacaaaca aacaaaaaaa ttaggcatgg tggcacatgc ctgtagtcct agctacttag
3601 gaggctgacg taggaggatc gtttggacct gagaggtcaa ggctacagtg agccatgatt
3661 gtgccactgc actccagcct gggtgacaga gtgagactct gtctcaaaaa agaaaaagga
3721 aatctgtggg gtttgtttta gttttaagta attctaagga ctttaaaaat gcctagtctt
3781 gacaattaga tctatttggc atacaatttg cttgcttaat ctatgtgtgt gcatagatct
3841 actgacacac gcatacatat aaacattagg gaactaccat tctctttgcg taggaagcca
3901 catatgccta tctaggcctc agatcatacc tgatatgaat aggctttctg gataatggtg
3961 aagaagatgt ataaaagata gaacctatac ccatacatga tttgttctct agcgtagcaa
4021 cctgttacat attaaagttt tattatacta catttttcta catcctttgt ttcagggtgt
4081 tgattgcctt tgctcagtat cttcagcagt gtccatttga agatcatgta aaattagtga
4141 atgaagtaac tgaatttgca aaaacatgtg ttgctgatga gtcagctgaa aattgtgaca
4201 aatcacttgt aagtacattc taattgtgga gattctttct tctgtttgaa gtaatcccaa
4261 gcatttcaaa ggaatttttt ttaagttttc tcaattatta ttaagtgtcc tgatttgtaa
4321 gaaacactaa aaagttgctc atagactgat aagccattgt ttcttttgtg atagagatgc
4381 tttagctatg tccacagttt taaaatcatt tctttattga gaccaaacac aacagtcatg
4441 gtgtatttaa atggcaattt gtcatttata aacacctctt tttaaaattt gaggtttggt
4501 ttctttttgt agaggctaat agggatatga tagcatgtat ttatttattt atttatctta
4561 ttttattata gtaagaaccc ttaacatgag atctaccctg ttatattttt aagtgtacaa
4621 tccattattg ttaactacgg gtacactgtt gtatagctta ctcatcttgc tgtattaaaa
4681 ctttgtgccc attgattagt aacccctcgt ttcgtcctcc cccagccact ggcaaccagc
4741 attatactct ttgattctat gagtttgact actttagcta ccttatataa gtggtattat
4801 gtactgttta tctttttatg actgacttat ttcccttagc atagtgcatt caaagtccaa
4861 ccatgttgtt gcctattgca gaatttcctt cttttcaagg ctgaataata ttccagtgca
4921 tgtgtgtacc acattttctt tatccattaa tttgttgatt gatagacatt taggttggtt
4981 ttctacatct tgactatcat gaatagtgtt gcaatgaaca caggagagct actatctctt
5041 agagatgata tcatggtttt tatcatcaga aaacacccac tgatttctat gctaattttg
5101 ttacctgggt ggaataatag tacagctata tattcctcat tttagatatc tttgtatttc
5161 tacatacaat aaaaaagcag agtacttagt catgttgaag aactttaaac ttttagtatt
5221 tccagatcaa tcttcaaaac aaggacaggt ttatctttct ctcaccactc aatctatata
5281 tacctcttgt gggcaaggcc agtttttatc actggagcct ttcccctttt tattatgtac
5341 ctctccctca cagcagagtc aggactttaa ctttacacaa tactatggct ctacatatga
5401 aatcttaaaa atacataaaa attaataaat tctgtctaga gtagtatatt ttccctgggg
5461 ttacgattac tttcataata aaaattagag ataaggaaag gactcattta ttggaaagtg
5521 attttaggta acatttctgg aagaaaaatg tctatatctt aatagtcact taatatatga
5581 tggattgtgt tactcctcag ttttcaatgg catatactaa aacatggccc tctaaaaagg
5641 gggcaaatga aatgagaaac tctctgaatg tttttctccc ctaggtgaat tcacctgctg
5701 cttagaagct tattttctct tgatttctgt tataatgatt gctcttaccc tttagtttta
5761 agtttcaaaa taggagtcat ataactttcc ttaaagctat tgactgtctt tttgtcctgt
5821 tttattcacc atgagttata gtgtgacagt taattcttat gaaaattata tagagatggt
5881 taaatcatca gaaactgtaa acctcgattg ggaggggaag cggattttta aatgatttcc
5941 tgaccaagct taaccagtat attaaatcct ttgtactgtt ctttggctat aaagaaaaaa
6001 ggtactgtcc agcaactgaa acctgctttc ttccatttag catacccttt ttggagacaa
6061 attatgcaca gttgcaactc ttcgtgaaac ctatggtgaa atggctgact gctgtgcaaa
6121 acaagaacct gagagaaatg aatgcttctt gcaacacaaa gatgacaacc caaacctccc
6181 ccgattggtg agaccagagg ttgatgtgat gtgcactgct tttcatgaca atgaagagac
6241 atttttgaaa aagtaagtaa tcagatgttt atagttcaaa attaaaaagc atggagtaac
6301 tccataggcc aacactctat aaaaattacc ataacaaaaa tattttcaac attaagactt
6361 ggaagttttg ttatgatgat tttttaaaga agtagtattt gataccacaa aattctacac
6421 agcaaaaaat atgatcaaag atattttgaa gtttattgaa acaggataca atctttctga
6481 aaaatttaag atagacaaat tatttaatgt attacgaaga tatgtatata tggttgttat
```

Продолжение на следующей странице

Продолжение с предыдущей страницы

6541 aattgatttc gttttagtca gcaacattat attgccaaaa tttaaccatt tatgcacaca
6601 cacacacaca cacacacact taacccttct ttccacatac ttaaagaatg acagagacaa
6661 gaccatcatg tgcaaattga gcttaattgg ctaattagat atctttggaa tttggaggtt
6721 ctggggagaa tgtcgattac aattatttct gtaatattgt ctgctataga aaagtgactg
6781 ttttttcttt tcaaaattta gatacttata tgaaattgcc agaagacatc cttactttta
6841 tgccccggaa ctcctttttt ttgctaaaag gtataaagct gcttttacag aatgttgcca
6901 agctgctgat aaagctgcct gcctgttgcc aaaggtatta tgcaaaagaa tagaaaaaaa
6961 gagttcatta tccaacctga ttttgtccat tttgtggcta gatttaggga acctgagtgt
7021 ctgatacaaa ctttccgaca tggtcaaaaa agccttcctt ttatctgtct tgaaaatctt
7081 tcatctttga aggcctacac tctcgtttct tcttttaaga tttgccaatg atgatctgtc
7141 agaggtaatc actgtgcatg tgtttaaaga tttcaccact ttttatggtg gtgatcacta
7201 tagtgaaata ctgaaacttg tttgtcaaat tgcacagcaa ggggacacag ttcttgttta
7261 tcttttcatg ataatttta gtagggaggg aattcaaagt agagaatttt actgcatcta
7321 gatgcctgag ttcatgcatt cattccataa atatatatta tggaatgctt tatttcttt
7381 tctgaggagt ttactgatgt tggtggagga gagactgaaa tgaattatac acaaaattta
7441 aaaattagca aaattgcagc ccctgggata ttagcgtact ctttctctga ctttttcccc
7501 actttaagg ctcttttccc tggcaatgtt tccagttggt ttctaactac atagggaatt
7561 ccgctgtgac cagaatgatc gaatgatctt tcctttttctt agagagcaaa atcattattc
7621 gctaaaggga gtacttggga atttaggcat aaattatgcc ttcaaaattt aatttggcac
7681 agtctcatct gagcttatgg aggggtgttt catgtagaat ttttcttcta attttcatca
7741 aattattcct ttttgtagct cgatgaactt cgggatgaag ggaaggcttc gtctgccaaa
7801 cagagactca agtgtgccag tctccaaaaa tttggagaaa gagctttcaa agcatggtaa
7861 atacttttaa acatagttgg catctttata acgatgtaaa tgataatgct tcagtgacaa
7921 attgtacatt tttatgtatt ttgcaaagtg ctgtcaaata catttctttg gttgtctaac
7981 aggtagaact ctaatagagg taaaaatcag aatatcaatg acaatttgac attatttta
8041 atcttttctt ttctaaatag ttgaataatt tagaggacgc tgtccttttt gtcctaaaaa
8101 aagggacaga tatttaagtt ctatttattt ataaaatctt ggactcttat tctaatggtt
8161 cattattttt atagagctgt aggcatggtt ctttatttaa ttttttaaag ttatttttaa
8221 tttttgtgga tacagagtag gtatacatat ctacggggta tatgagatat tttgatataa
8281 gtatacaaca tatataatcc ctttatttaa ttttatcttc cccccaatga tctaaaacta
8341 tttgcttgtc cttttatgtc ttatagttaa attcagtcac caactaagtt gaagttactt
8401 cttatttttg catagctcca gctctgatct tcatctcatg tttttgcctg agcctctgtt
8461 ttcatattac ttagttggtt ctgggagcat actttaatag ccgagtcaag aaaaatacta
8521 gctgccccgt cacccacact cctcacctgc tagtcaacag caaatcaaca caacaggaaa
8581 taaaatgaaa ataatagaca ttatgcatgc tctctagaaa ctgtcaattg aactgtattt
8641 gctcatcatt cctaccatct acaccaccaa aatcaaccaa atttatgaaa aaaaaacagc
8701 cccaacataa aattatacac agataaacag gctatgattg gttttgggaa agaagtcacc
8761 tttacctgat ttaggcaact gtgaaatgac tagagaatga agaaaattag acgtttacat
8821 cttgtcatag agtttgaaga tagtgctgga tctttctttt tataagtaag atcaataaaa
8881 actccctcat tctgtagaag ttatgatttc ttttctaaga gacctttaga agtcagaaaa
8941 aatgtgtttc aattgagaaa aaagataact ggagtttgtg tagtacttcc cagattataa
9001 aatgcttttg tatgtattat ctaatttaat cctcaaaact tcttcaattt agcatgttgt
9061 catgacactg cagaggctga agctcagaga cgctgagccc tctgctaaca agtcctactg
9121 ctaacaagtg ataaagccag agctggaagt cacatctgga ctccaaacct gatgcttctc
9181 agcctgttgc ccctttaga gttcctttct aatttctgct tttatgactt gctagatttc
9241 tacctaccac acacactctt aaatggataa ttctgcccta aggataagtg attaccattt
9301 ggttcagaac tagaactaat gaattttaaa aattatttct gtatgtccat tttgaatttt
9361 cttatgagaa atagtatttg cctagtgttt tcatataaaa tatcgcatga taataccatt
9421 ttgattggcg attttctttt tagggcagta gctcgcctga gccagagatt tcccaaagct
9481 gagtttgcag aagtttccaa gttagtgaca gatcttacca aagtccacac ggaatgctgc
9541 catggagatc tgcttgaatg tgctgatgac agggtaaaga gtcgtcgata tgctttttgg
9601 tagcttgcat gctcaagttg gtagaatgga tgcgtttggt atcattggtg atagctgaca
9661 gtgggttgag attgtcttct gtgctttcgt ctgtcctatc ttcaatcttt ccctgcctat
9721 ggtggtggta ccttttctgtt tttaacctgc tataaattac cagataaacc cattcactga
9781 tttgtaactc ctttcagtca tgctctaact gtaaatgaag gcttaaactg aagtagaaca
9841 gttacaaggt tttacttggc agaacatctt gcaagggtaga tgtctaagaa gatttttttt
9901 tctttttta agacagagtt tcgctcttgt ttcccaggct ggggtgcaat ggtgtgatct

Продолжение на следующей странице

Продолжение с предыдущей страницы

```
 9961 tggctcagcg caacctctgc ctcctgggtt caagtgattt tcatgcctca gcctcccaag
10021 tagctgggat tacaggcatg cgccaccaca cctggctaat tttgtatttt tagtagaggc
10081 ggggtttcac catattgtcc agactggtct cgaactcctg acctcaggtg atccacccgc
10141 cttggcctcc caaagtgctg ggattacagg catgagccac cttgcccagc ctaagaagat
10201 tttttgaggg aggtaggtgg acttggagaa ggtcactact tgaagagatt tttggaaatg
10261 atgtattttt cttctctata ttccttccct taattaactc tgtttgttag atgtgcaaat
10321 atttggaatg atatctcttt tctcaaaact tataatattt tctttctccc ttcttcaag
10381 attaaactta tgggcaaata ctagaatcct aatctctcat ggcacttttt ggaaaatttta
10441 aggcggttat tttatatatg taagcagggc ctatgactat gatcttgact catttttcaa
10501 aaatcttcta tattttattt agttatttgg tttcaaaagg cctgcactta attttggggg
10561 attatttgga aaaacagcat tgagttttaa tgaaaaaaac ttaaatgccc taacagtaga
10621 aacataaaat taataaataa ctgagctgag cacctgctac tgattagtct atttttaatta
10681 agtgggaatg tttttgtagt cctatctaca tctccaggtt taggagcaaa cagagtatgt
10741 tcatagaagg aatatgtgta tggtcttaga atacaatgaa catgttctgc caacttaata
10801 aaggtctgag gagaaagtgt agcaatgtca attcgtgttg aacaatttcc accaacttac
10861 ttataggcgg accttgccaa gtatatctgt gaaaatcaag attcgatctc cagtaaactg
10921 aaggaatgct gtgaaaaacc tctgttggaa aaatcccact gcattgccga agtggaaaat
10981 gatgagatgc ctgctgactt gccttcatta gctgctgatt ttgttgaaag taaggatgtt
11041 tgcaaaaact atgctgaggc aaaggatgtc ttcctgggca tgtaagtaga taagaaatta
11101 ttctttttata gctttggcat gacctcacaa cttaggagga tagcctaggc ttttctgtgg
11161 agttgctaca atttccctgc tgcccagaat gtttcttcat ccttcccttt cccaggcttt
11221 aacaattttt gaaatagtta attagttgaa tacattgtca taaaataata catgttcacg
11281 gcaaagctca acattccttа ctccttaggg gtatttctga aaatacgtct agaaacattt
11341 tgtgtatata taaattatgt atacttcagt cattcattcc aagtgtattt cttgaacatc
11401 tataatatat gtgtgtgact atgtattgcc tgtctatcta actaatctaa tctaatctag
11461 tctatctatc taatctatgc aatgatagca aagaagtata aaaagaaata tagagtctga
11521 cacaggtgct ttatatttgg tgaaaagacc agaagttcag tataatggca atatggtagg
11581 caactcaatt acaaaataaa tgtttacgta ttgtcagaag ttgtggtgat aaactgcatt
11641 tttgttgttg gattatgata atgcactaaa taatatttcc taaaattatg taccctacaa
11701 gatttcactc atacagagaa gaaagagaat attttaagaa catatctctg cccatctatt
11761 tatcagaatc cttttgagat gtagtttaaa tcaaacaaaa tgttaataaa aataacaagt
11821 atcattcatc aaagacttca tatgtgccaa gcagtgtgtg ctttgtgtag attatgtcat
11881 atagttctca taatccacct tccgagacag atactattta ttttttgaga cagagtttta
11941 ctcttgttgc ccaggctgga gtgcaatggt gccatctcgg ctcaccacaa cctcgcctc
12001 ccaggttcaa gcgattctcc tgcctcagcc tcctgggatt acaggcatgc accaccatgc
12061 ctggctaatt ttgtattttt agtagagatg gggtttcacc atgttggtca gactggtctc
12121 aaactcctga cctctggtga tatgcctgcc tcagcctcct aaagtgctgg gattacaggc
12181 atgagccact gtgcccagcc gacagatact attattattt ccattctacc gagaaggaga
12241 ctaaggctct gatcatttaa ataagttgcc taaggtgatg cagtgatata agtagcagag
12301 ctaggaattg agccttggta actttaactc tggaccccaa gtccttagct actaagcttt
12361 actgcatggg gtttagtcaa attaagactt ttggaatatg agttactttt gagattagct
12421 ttgtgatatt ttttgtgctc atttgtccaa caaagtctat tttattttca tcttaattag
12481 gtttttgtat gaatatgcaa gaaggcatcc tgattactct gtcgtgctgc tgctgagact
12541 tgccaagaca tatgaaacca ctctagagaa gtgctgtgcc gctgcagatc ctcatgaatg
12601 ctatgccaaa gtggtaggtt tattgttgga aaaaaatgta gttctttgac tgatgattcc
12661 aataatgaga aagaaaaata atgcaagaat gtaaaatgat atacagtgca atttagatct
12721 tttcttgaga tggtttcaat tctggaatct taaacatgaa agaaaaagta gccttagaat
12781 gattaacaaa atttagacta gttagaatag aaagatctga atagagcaat ctctaaaaaa
12841 ttttgatctt ttttttcttt tttcacaatc ctgagaacaa aaaaaaatta aatttaaatg
12901 ttaattagaa gatatttaac ttagatgtaa agtgagttaa cctgattcca ggattaatca
12961 agtactagaa ttagtatctt atggcaaatt atagaaccta tccctttaga atatttttcaa
13021 atcttttttga ggatgtttag gaatagtttt acaagnaatt aagttaggag aggaaatctg
13081 ttctggagga tttttagggt tcccactagc atatgtaatg gtttctgaac tattcagaat
13141 cagagaaaac tcatttttcc tgctttcaag aagctactgt atgccaggca ccatgcacaa
13201 acaatgacca acgtaaaatc tctcatttttg gagagcctgg aatctaactg gaaaggtgaa
13261 ctaataataa taatatgtac aatcatagcc atcatttatt aaacttttat tatatgcaag
13321 gcactgttta atttcattag cttacctggt ttacagagca gctctatgag atgagtgcca
```

Продолжение на следующей странице

Продолжение с предыдущей страницы

```
13381 tctttgcccc tattttaggg ataaggattc cgaaatgtgg agatggtaag taaaattgca
13441 caactgaaga atgagttaca tgacttggct caaatactgg tcattgaact ccagagcctg
13501 aatattctta accacttaca tgatgcaagc tcaccaaata aatagttcga atgtattgtg
13561 acagagcggc attgatattc atctattcat gtggctttga gtaggaagaa gaaaggatat
13621 cattctgacc agaggggtga aaaacaacct gcatctgatc ctgaggcata atactattaa
13681 cacaattctt ttatgtttca gttcgatgaa tttaaacctc ttgtggaaga gcctcagaat
13741 ttaatcaaac aaaattgtga gctttttgag cagcttggag agtacaaatt ccagaatgcg
13801 taagtaattt ttattgactg atttttttta tcaatttgta attatttaag acttaatata
13861 tgagccacct agcatagaac ttttaagaat gaaaatacat tgcatatttc taatcactct
13921 ttgtcaagaa agataggaga ggagagataa aatagttgat ggggtggaga ggtctatatt
13981 tgaatgtagt ctaaaaattg ttctcttaag attggaagta tgtaggctgg gagggtaaat
14041 accaaatctt ggtatatcag aactgagcat gtcccttgaa ggttaagaaa tagttaatgg
14101 gcaaatagag catggcaata ttttgtagag cagcaagtag taggccttga atagatgtcg
14161 ctcaaaaagt aatatgtaag ctgaacacaa aaatgtaaca aatgaattta gatacatatt
14221 tgaatattaa attcaggttg tttgggagat gcacctagtc tttgatggtt aaacctttcc
14281 ctccatagaa gagacagaga cagaatggct tgctggacta atgtcccaat tcaatagagt
14341 cttatctacg aaggttaaaa acaagaagag acatattata cagtagatat ttattgtgtg
14401 gctcatacac atggtgctct tctgattatg gattttagag ataataacag tgaacaagac
14461 atagtttctt tcctcgagta gattaaagtc atacattgac ttttaatggt gactggcatt
14521 cttaatacat gattattata tattaggtac catgtcagat taattataat actttactat
14581 ttttaattta accettgaac tatccctatt gagtcagata tatttccttc catttctac
14641 ttgtatcttt caagtttagc atatgctgat acatatgaag ctctctccag gttttattga
14701 aagaagaaat taataaattt attaatgtca ctgaattagg caactcactt tcccaagatt
14761 atgcaagtgg tacaggtgga actcaaagcc aagtttaact agttgttcag gagaatgttt
14821 tctaccctcc actaacccac tactctgcag atggagataa tatgatgaat ggaacatagc
14881 aacatcttag ttgattccgg ccaagtgttc tctgttttat ctactatgtt agacagtttc
14941 ttgccttgct gaaaacacat gacttctttt tttcaggcta ttagttcgtt acaccaagaa
15001 agtaccccaa gtgtcaactc caactcttgt agaggtctca agaaacctag gaaaagtggg
15061 cagcaaatgt tgtaaacatc ctgaagcaaa aagaatgccc tgtgcagaag actatgtgag
15121 tctttaaaaa aatataataa attaataatg aaaaaatttt accttagat attgataatg
15181 ctagctttca taagcagaag gaagtaatgt gtgtgtgtgc atgtttgtgt gcatgtgtgt
15241 gtgcatgcac gtgtgtgtat gtgtgatatt ggcagtcaag gccccgagga tgataatttt
15301 ttttttttt ttgagacgga gtctcgcttt gttgtccagg ctggagtgca gtggtgccat
15361 ctcggctcac tgcaacctcc gcctcccaag ttcaagccat tctcctgcct cagcctccca
15421 agtagctggg actacaggtg catgccacca tgcctggcta atttttgta ttttagtag
15481 aaaattttca gttcaccctc ttttgaattt ctgtctcct gcctgttctt tagctatccg
15541 tggtcctgaa ccagttatgt gtgttgcatg agaaaacgcc agtaagtgac agagtcacca
15601 aatgctgcac agaatccttg gtgaacaggc gaccatgctt ttcagctctg gaagtcgatg
15661 aaacatacgt tcccaaagag tttaatgctg aaacattcac cttccatgca gatatatgca
15721 cactttctga gaaggagaga caaatcaaga aacaaacgtg aggagtattt cattactgca
15781 tgtgtttgta gtcttgatag caagaactgt caattcaagc tagcaacttt ttcctgaagt
15841 agtgattata tttcttagag gaaagtattg gagtgttgcc cttattatgc tgataagagt
15901 acccagaata aaatgaataa ctttttaaag acaaaatcct ctgttataat attgctaaaa
15961 ttattcagag taatattgtg gattaaagcc acaatagaat aacatgttag accatattca
16021 gtagaaaaag atgaacaatt aactgataaa tttgtgcaca tggcaaatta gttaatggga
16081 accataggag aatttatttc tagatgtaaa taattatttt aagtttgccc tatggtggcc
16141 ccacacatga gacaaacccc caagatgtga cttttgagaa tgagacttgg ataaaaaaca
16201 tgtagaaatg caagccctga agctcaactc cctattgcta tcacaggggt tataattgca
16261 taaaatttag ctatagaaag ttgctgtcat ctcttgtggg ctgtaatcat cgtctaggct
16321 taagagtaat attgcaaaac ctgtcatgcc cacacaaatc tctccctggc attgttgtct
16381 ttgcagatgt cagtgaaaga gaaccagcag ctcccatgag tttggatagc cttatttttct
16441 atagcctccc cactgaaggg agcaaagttt aagaaccaaa tataaagttt ctcatcttta
16501 tagatgagaa aaattttaaa taaagtccaa gataattaaa tttttaagga tcatttttag
16561 ctctttaata gcaataaaac tcaatatgac ataatatggc acttccaaaa tctgaataat
16621 atataattgc aatgacatac ttctttttcag agatttactg aaaagaaatt tgttgacact
16681 acataacgtg atgagtggtt tatactgatt gtttcagttg gtcttcccac caactccatg
16741 aaagtggatt ttattatcct catcatgcag atgagaatat tgagacttat agcggtatgc
```

Продолжение на следующей странице

Продолжение с предыдущей страницы

```
16801 ctggcccaag tactcagagt tgcctggctc caagatttat aatcttaaat gatgggacta
16861 ccatccttac tctctccatt tttctatacg tgagtaatgt ttttttgttt ttttttttt
16921 ctttttccat tcaaactcag tgcacttgtt gagctcgtga aacacaagcc caaggcaaca
16981 aaagagcaac tgaaagctgt tatggatgat ttcgcagctt ttgtagagaa gtgctgcaag
17041 gctgacgata aggagacctg ctttgccgag gaggtactac agttctcttc attttaatat
17101 gtccagtatt catttttgca tgtttggtta ggctagggct tagggatttg tatatcaaag
17161 gaggctttgt acatgtggga cagggatctt attttacaaa caattgtctt acaaaatgaa
17221 taaaacagca ctttgttttt atctcctgct ctattgtgcc atactgttga atgtttataa
17281 tgcatgttct gtttccaaat ttgtgatgct tatgaatatt aataggaata tttgtaaggc
17341 ctgaaatatt ttgatcatga aatcaaaaca ttaatttatt taaacattta cttgaaatgt
17401 ggtggtttgt gatttagttg attttatagg ctagtgggag aatttacatt caaatgtcta
17461 aatcacttaa aatttccctt tatggcctga cagtaacttt tttttattca tttggggaca
17521 actatgtccg tgagcttcca tccagagatt atagtagtaa attgtaatta aaggatatga
17581 tgcacgtgaa atcactttgc aatcatcaat agcttcataa atgttaattt tgtatcctaa
17641 tagtaatgct aatatttttcc taacatctgt catgtctttg tgttcagggt aaaaaacttg
17701 ttgctgcaag tcaagctgcc ttaggcttat aacatcacat ttaaaagcat ctcaggtaac
17761 tatattttga attttttaaa aaagtaacta taatagttat tattaaaata gcaaagattg
17821 accatttcca agagccatat agaccagcac cgaccactat tctaaactat ttatgtatgt
17881 aaatattagc ttttaaaatt ctcaaaatag ttgctgagtt gggaaccact attatttcta
17941 ttttgtagat gagaaaatga agataaacat caaagcatag attaagtaat tttccaaagg
18001 gtcaaaattc aaaattgaaa ccaaggtttc agtgttgccc attgtcctgt tctgacttat
18061 atgatgcggt acacagagcc atccaagtaa gtgatggctc agcagtggaa tacttctgga
18121 attaggctga accacatgaa agagtgcttt atagggcaaa aacagttgaa tatcagtgat
18181 ttcacatggt tcaacctaat agttcaactc atcctttcca ttggagaata tgatggatct
18241 accttctgtg aactttatag tgaagaatct gctattacat ttccaatttg tcaacatgct
18301 gagctttaat aggacttatc ttcttatgac aacatttatt ggtgtgtccc cttgcctagc
18361 ccaacagaag aattcagcag ccgtaagtct aggacaggct taaattgttt tcactggtgt
18421 aaattgcaga aagatgatct aagtaatttg gcatttattt taataggttt gaaaaacaca
18481 tgccatttta caaataagac ttatatttgt ccttttgttt ttcagcctac catgagaata
18541 agagaaagaa aatgaagatc aaaagcttat tcatctgttt ttctttttcg ttggtgtaaa
18601 gccaacaccc tgtctaaaaa acataaattt ctttaatcat tttgcctctt ttctctgtgc
18661 ttcaattaat aaaaaatgga aagaatctaa tagagtggta cagcactgtt atttttcaaa
18721 gatgtgttgc tatcctgaaa attctgtagg ttctgtggaa gttccagtgt tctctcttat
18781 tccacttcgg tagaggattt ctagtttctt gtgggctaat taaataaatc attaatactc
18841 ttctaagtta tggattataa acattcaaaa taatattttg acattatgat aattctgaat
18901 aaaagaacaa aaaccatggt ataggtaagg aatataaaac atggctttta ccttagaaaa
18961 aacaattcta aaattcatat ggaatcaaaa aagagcctgc ag
```

ФИГ. 14

Последовательность - Трансген FWD 25 нмоль ДНК олигонуклеотида, 22 нуклеотида

5'- CCA GTA CAA ACT ACT CAA GAG G -3'

Свойства

Tm (50 мМ NaCl):* 52,5 °C
Содержание по ГХ: 45,5%
Молекулярная масса: 6721,4
нмоль/OD260: 4,5
мкг/OD260: 30,1
Коэффициент экст.: 223 000 л/(моль см)

Количество олигонуклеотидов

5,7= 25,6 =0,17
OD_{260} нмоль mg

Для 100 мкМ: добавить 256 мкл

Отправлено

REBECCA GEORGE
JANSSEN RESEARCH & DEVELOPMENT LL
200 GREAT VALLEY PKWY
MALVERN, PA 19355
США
6106516441
№ клиента 370226 *№ заказа 993913510*

Расчеты вторичной структуры

Наименьшая свободная энергия фолдинга (ккал/моль): -0,52 при 25 °C
Наибольшая Tm фолдинга: 33,4 °C

Типы оснований олигонуклеотидов	Количество
Основания ДНК	22
Модификации и услуги	Количество
Стандартное обессоливание	1

Отказ от прав

См. примечания на обратной стороне страницы (I) (II) и (III) в отношении использования, лицензирования метки и гарантий на продукты