

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. März 2003 (20.03.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/023059 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68
Wedemark (DE). **KREHAN, Alf-Andreas** [DE/DE];
Schönefelderstrasse 5, 30853 Langenhagen (DE). **STE-**
FAN, Monica [DE/DE]; An der Tiefenriede 55, 30173
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/09983 Hannover (DE). **WASCHÜTZA, Stefanie** [DE/DE];
Wiesenstrasse 46a, 30169 Hannover (DE).
(22) Internationales Anmeldedatum:
6. September 2002 (06.09.2002)
(25) Einreichungssprache: Deutsch
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
(30) Angaben zur Priorität:
101 43 775.7 6. September 2001 (06.09.2001) DE
PCT/EP02/05489 17. Mai 2002 (17.05.2002) EP
(74) **Anwalt: PFENNING, MEINIG & PARTNER GBR;**
Mozartstrasse 17, 80336 München (DE).
(81) **Bestimmungsstaaten (national):** JP, US.
(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).
(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von**
US): ADNAGEN AG [DE/DE]; Ostpassage 7, 30853 Han-
nover-Langenhagen (DE). **Veröffentlicht:**
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
(72) **Erfinder; und**
(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): ALBERT, Winfried**
[DE/DE]; Krottenkopfstrasse 28A, 82362 Weilheim
(DE). **STEFFENS, Pia** [DE/DE]; Bäckkamp 29, 30900
Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Title:** METHOD AND KIT FOR THE DIAGNOSIS OR TREATMENT CONTROL OF INTESTINAL CARCINOMA

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN UND KIT ZUR DIAGNOSTIK ODER BEHANDLUNGSKONTROLLE VON DARMKREBS

(57) **Abstract:** The invention relates to a diagnosis kit and to a method for the diagnosis or treatment control of intestinal carcinoma in a human being. According to the invention, the presence or absence of at least two different messenger-RNAs coding for several of the tumour marker proteins CK20, EGF-R, CEA, GA733.2, PDGF- β and/or stanniocalcin is detected in a human blood sample. The presence of intestinal tumour cells in the blood sample is then deduced therefrom, as is possible metastatic spread.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Diagnose-Kit sowie ein Verfahren zur Diagnostik oder Behandlungskontrolle von Darmkrebs bei einem Menschen. Hierzu wird in einer Blutprobe des Menschen das Vorhandensein oder Fehlen von mindestens zwei verschiedenen mRNS erfaßt, die für verschiedene der Tumormarkerproteine CK20, EGF-R, CEA, GA733.2, PDGF- β und/oder Stanniocalcin kodieren. Daraus wird dann auf das Vorhandensein von Darmtumorzellen in der Blutprobe und damit auf mögliche Metastasierungen geschlossen.



WO 03/023059 A2

Verfahren und Kit zur Diagnostik oder Behandlungskontrolle von Darmkrebs

5 Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und ein Kit zur Diagnostik oder Behandlungskontrolle von Darmkrebs bei einem Menschen

10 Bei der Krebsnachsorge ist es von Relevanz, ein Rezidiv maligner Tumore anhand des Auftretens metastasierender Tumorzellen im Blut frühzeitig nachweisen zu können. Bei den derzeit angewandten Untersuchungsmethoden werden bei Krebspatienten sogenannte „Tumormarker“ auf Proteinebene (immunologisch bzw. enzymatisch) quantitativ im Blut oder in anderen Körperflüssigkeiten ermittelt.

15

Diese Nachweisverfahren sind für die Tumordiagnostik bzw. Behandlungskontrolle/Nachsorge nur bedingt geeignet, da erhöhte Tumormarkerwerte auch durch nicht-

20

Tumorerkrankungen (z.B. Entzündungen des Magen-Darm-Traktes, Leberzirrhose, Virusinfekte), starkes Rauchen oder durch eine Schwangerschaft hervorgerufen werden können.

5

Die Tumorprogression nach der Resektion eines kolorektalen Primärtumors ist in erster Linie auf residuale Tumorzellen zurückzuführen. Diese Zellen werden prä- oder intraoperativ aus dem primären Tumor abgelöst und erhalten die Möglichkeit zur Verstreuung im ganzen Organismus.

10

Neben der Ersterkennung eines kolorektalen Karzinoms ist daher insbesondere der frühest mögliche Nachweis metastasierender Zellen für eine erfolgreiche Behandlung von entscheidender Bedeutung. Ebenso kann im klinischen Stadium I ein definitiver Negativnachweis hilfreich sein, wenn zu entscheiden ist, ob der Patient mit einer Chemotherapie oder einer Operation belastet werden muß.

20

Die derzeit verwendeten diagnostischen Methoden sind ungenau, wenn es um die Beurteilung der malignen Potenz von Resttumoren nach durchgeführter Chemotherapie in den metastasierenden Stadien geht. Einige klinische Studien weisen auf eine prognostische Bedeutung von disseminierten Tumorzellen hin. Dennoch sind zahlreiche methodische Aspekte kritisch und bisher nicht hinreichend standardisiert. Somit müssen weiterhin Nachweise für eine okkulte oder restliche Metastasierung gefunden werden, die eine rechtzeitige Einordnung in die vielfältigen primär kurativen therapeutischen Optionen zulassen.

25

30

Dem Bestreben nach Verbesserung der Heilungschancen wird heute einerseits über Suche und Verwendung neuer

35

Tumormarker, andererseits über Sensitivitätssteigerung bei den verwendeten Methoden nachgekommen.

5 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren und ein Kit zur Verfügung zu stellen, mit dem auf einfache, sichere und wiederholbare Weise eine Diagnostik oder Behandlungskontrolle von Darmkrebs möglich ist.

10 Diese Aufgabe wird durch das Verfahren nach Patentanspruch 1 sowie das Kit nach Patentanspruch 33 und den Mikroarray nach Patentanspruch 56 gelöst. Vorteilhafte Weiterbildung des Verfahrens, des Kits und des Mikroarrays werden in den jeweiligen abhängigen Ansprüchen gegeben.

15 Erfindungsgemäß wird mittels des erfindungsgemäßen Kits bzw. des erfindungsgemäßen Verfahrens in einer Blutprobe eines Menschen das Vorhandensein oder Fehlen von mRNS mindestens zweier der Tumormarkerproteine CK20, EGF-R, CEA, GA733.2, PDGF- β und/oder Stanniocalcin erfaßt.

20 Da im Blut Gesunder die RNAs der beschriebenen Marker normalerweise nicht exprimiert vorliegen, zeigt sich eine direkte Korrelation zwischen einem positiven RT-PCR-Nachweis dieser Tumormarker und zirkulierenden Tumorzellen im Blut, die zu einer Metastasierung führen können.

25 Da einzelne Marker in therapieabhängiger Weise unterschiedlich exprimiert werden können, ist es vorteilhaft, eine Kombination von zwei, drei, vier oder mehr Tumormarkern zu untersuchen, um alle im Blut zirkulierende Tumorzellen zu erfassen. Hierdurch lassen sich Tumorzellen auch dann erkennen, wenn die Ex-

30

35

pression eines bestimmten Markers bei einem Patienten bzw. in einem Krankheitsstadium relativ gering ist, was sonst zu einem vermeintlich negativen Ergebnis führen könnte. Die Verwendung weiterer Marker stößt jedoch meist deswegen auf Grenzen, wenn mononukleäre Blutzellen eine Hintergrundexpression („illegitime Transkription“) aufweisen, die eine exakte Analyse behindern.

Für die Erkennung von Darmtumorzellen wird daher erfindungsgemäß eine der folgenden Kombinationen aus Markern als besonders vorteilhafte Markerkombination vorgeschlagen, mit denen die genannten Probleme dennoch vermieden werden können, vorgeschlagen:

CK20, EGF-R, CEA und Stanniocalcin,
CK20, EGFR, GA733.2, CEA und Stanniocalcin;
EGFR, CEA und GA733.2;
GA733.2, CEA und EGF-R;
GA733.2, CK20 und EGF-R;
GA733.2, PDGF- β und EGF-R; oder
GA733.2, PDGF- β , CEA und EGF-R;

oder

mindestens zwei der Marker ausgewählt aus
CK20, EGF-R und CEA;

oder

mindestens zwei der Marker ausgewählt aus
EGF-R, CEA und GA733.2.

Im folgenden werden die entsprechenden Marker erläutert.

Gen bzw. Genprodukt	Gen	Alternativbezeichn..
Human carcinoma-associated antigen GA733-2 gene	GA733-2	GA733.2
Human epidermal growth factor receptor (EGFR) gene	EGFR	EGFR
Human carcinoembryonic antigen (CEA) gene	CEA	CEA
Homo sapiens gene for cytokeratin 20	CK20	CK20
Homo sapiens stanniocalcin 1 (STC1) gene	Stanniocalcin 1 (STC1)	Stannio- calcin
Platelet derived growth factor- β	PDGF- β	PDGF- β

5 Bei der Anwendung von RT-PCR-Systemen zum Nachweis von Tumorzellen ist aufgrund der sehr hohen Amplifikationsrate die Spezifität ein kritischer Punkt. Geringste Kontaminationen, etwa durch Fremd-RNA oder illegitimer Transkription, können hierbei das Ergebnis verfälschen.

10 Durch die Verwendung der Immunzytochemie mit monoklonalen Antikörpern gegen Tumorzellantigene kann eine Steigerung der Spezifität durch Anreicherung der Tumorzellen gegenüber Blutzellen und gleichzeitig eine Steigerung der Sensitivität des Tumorzell-Nachweises
15 erzielt werden (Nachweisquote von 1 Tumorzelle auf 10^7 mononukleären Blutzellen). Die Tumorzellen werden dabei mittels spezifischer Antikörper bzw. einer Antikörpermischung von mononukleären Blutzellen getrennt. Die Trennung kann mittels Magnetpartikel
20 (Dynal), an die die Antikörper gebunden werden, erfolgen. Dies wird im folgenden detaillierter beschrieben.

25 Eukaryontische Zellen tragen eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle an ihrer Zelloberfläche. Entsprechend des Ursprungs und der Funktion der einzel-

nen Zelle unterscheidet sich die Kombination der exprimierten Oberflächenmoleküle, so daß zelltyp-spezifische Muster entstehen. Zur Erkennung dieser zelltyp-spezifischen Muster werden Antikörper genutzt. Antikörper binden mit hoher Spezifität an ihr Antigen, hier an ausgewählte Oberflächenmoleküle. Diese Eigenschaft wird genutzt, um Zellen mittels spezifischer Antikörperbindung anhand ihrer Zelltyp-spezifischen Muster zu erkennen und voneinander zu unterscheiden.

Die Expression spezieller Oberflächenproteine unterscheidet Tumorzellen von nichttransformierten Zellen dieses Zelltyps. Da sich dieses spezielle Muster der Oberflächen-Antigene bei Tumorzellen auch von den Blutzell-typischen Mustern unterscheidet, können Tumorzellen im Blut unterschieden werden. Um Tumorzellen zu identifizieren, werden Antikörper, die diese speziellen Oberflächenproteine spezifisch erkennen, als Werkzeuge genutzt. Die spezifische Antikörperbindung wird für verschiedene Analyse- und Separations-Methoden nutzbar gemacht.

Aufgrund der intensiven Bindung von speziell dafür selektionierten Immunglobulinen ist neben der Erkennung von Zellen über deren Oberflächenepitope auch eine Separierung der erkannten Zellen von nicht erkannten möglich.

1. Trennprinzip beruhend auf Flüssigphase; z. B. Durchflußzytometrie:

Für die durchflußzytometrische Analyse werden Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt. Vereinzelt Zellen werden in einem konstanten Flüssigkeitsstrom einzeln an einer Lichtquelle

(Lasér) vorbeigeleitet. Bei Beleuchtung der Zellen werden die an den Antikörpern gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und strahlen Licht bestimmter Wellenlängen ab. Das abgestrahlte Licht wird detektiert und das gemessene Signal digitalisiert gespeichert. Das Lichtsignal kann einzelnen Zellen zugeordnet werden. Die Antikörper-markierte Zelle wird so erkannt und kann nun von anderen Zellen getrennt werden. Zur Trennung werden die Zellen in kleinsten Tropfen vereinzelt. Nach Erkennung der Antikörper-markierten Zelle wird der entsprechende Tropfen in ein Auffangbehältnis gelenkt.

2. Trennprinzip beruhend auf Festphase; z. B. magnetische Separation:

Für die magnetische Separation werden Antikörper an pseudomagnetische Partikel gekoppelt. Nach Einbringen der pseudomagnetischen Partikel in ein Magnetfeld wandern die Partikel im magnetischen Feld. Bei der Bewegung in diesem magnetischen Feld werden Zellen, an die diese gekoppelten Antikörper gebunden sind, mitgerissen und von anderen Zellen getrennt.

Zur Tumorzellerkennung mittels Magnetpartikel werden folglich an pseudomagnetische Partikel, die eine definierte Anzahl an chemisch aktivierten Stellen auf ihrer Oberfläche besitzen, Antikörper kovalent gekoppelt. Über die Spezifität der Antikörper wird die Spezifität der Trennung bestimmt. Eine Tumorzellen enthaltende Blutprobe wird mit Antikörper-gekoppelte Magnetpartikel versetzt; dann werden Partikel und Blut relativ zueinander bewegt. Jene (Tumor-)Zellen, die von den Festpha-

se-gebundenen Antikörpern erkannt und damit fest gebunden werden, folgen der Bewegung der Partikel. Hierdurch ist es möglich, bei Anlegen eines magnetischen Feldes, die Partikel mit den daran gebundenen Zellen aus dem Blut herauszuziehen (z.B. an die Wand des Trenngefäßes). Das auf diese Weise Tumorzellen-depletierte Blut kann gegen andere Lösungen ausgetauscht werden, wobei die über Magnetpartikel separierten Zellen bis zum Abschalten/Entfernen des Magnetfeldes vor Ort verbleiben und für weitere Anwendungen zur Verfügung stehen.

Vorteilhafterweise können für die Erkennung der Tumorzellen spezifische Antikörper-Mischungen verwendet werden, die entweder allgemein auf Tumorzellen oder auch spezifisch für Darmtumorzellen-Erkennung optimiert sind. Beispielsweise eignet sich zur Erkennung von Tumorzellen im Blut eine Kombination der Antikörper MOC-31 und Ber-EP4.

Derartige Antikörpermischungen zeigen im Vergleich zu den jeweils separat eingesetzten Antikörpern bei der Zellerkennung und Zelltrennung unabhängig von der angewandten Methode eine erhöhte Sensitivität.

Im folgenden sollen einige Beispiele erfindungsgemäßer Nachweise für Darmtumorzellen in Blutproben beschrieben werden.

Es zeigen:

Fig. 1 einen Nachweis von PCR-Produkten mit Elektrophorese;

Fig. 2 einen weiteren Nachweis von PCR-Produkten

mit Elektrophorese;

Figuren 3A

bis 3D einem Tumormarkernachweis mittels Light Cy-
5 cler;

Fig. 4 den Nachweis einer Zelltrennung mittels An-
tikörper-markierter Magnetpartikel,

10 Fig. 5

bis 7 den Nachweis von Darmtumorzellen durch ver-
schiedene Markerkombinationen.

15 In einem ersten Beispiel erfolgte eine RNA-Aufar-
beitung aus 1 ml EDTA-Vollblut mit dem QIAamp RNA
Blood Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden). Kontaminationen
mit genomischer DNA wurden durch einen zusätzlichen
DNA-Verdau auf der Säule mittels RNase-free DNase
Set, Fa. Qiagen, Hilden) vermieden.

20 Die RNA-Aufarbeitung aus 1 ml EDTA-Vollblut wurde fo-
tometrisch über den Quotienten 260 : 280 nm verifi-
ziert. Zur Qualitäts- und Quantitätsbestimmung kann
dabei 1 µl des Ansatzes durch elektrophoretische
25 Trennung auf einem RNA 6000 Chip über den Agilent
Bioanalyzer 2100 analysiert werden.

30 Die isolierte RNA wurde in einem entsprechenden Volu-
men zusammen mit Oligo(dT)15-Primern (Fa. Promega,
Mannheim) für 5 Minuten bei 65°C denaturiert und an-
schließend direkt auf Eis inkubiert. Die cDNA-
Synthese erfolgte mittels des Sensiscript™ Reverse
Transkriptase Kit, (Fa. Qiagen, Hilden) in einem
20 µl Reaktionsansatz gemäß Tabelle 1 bei 37°C für
35 1 Stunde mit nachfolgender Inaktivierung der reversen
Transkriptase für 5 Minuten bei 95°C und anschließen-

der Abkühlung auf Eis.

Tabelle 1: Komponenten der cDNA-Synthese

5

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
RNA	X μ l	5 ng/ μ l
10xRT-Puffer	2 μ l	1x
dNTP-Mix (je 5 mM)	2 μ l	jeweils 0,5 mM
Oligo(dT)-Primer(10 μ M)	2 μ l	1 μ M
RNase-Inhibitor	1 μ l	0,5 Units/ μ l
Reverse Transkriptase	1 μ l	4 U
RNase-freies Wasser	ad 20 μ l	

Mit der so erzeugten cDNA wurde für jeden der gewählten Tumormarker Stanniocalcin, EGF-R, CK 20, CEA sowie als interne Kontrolle für β -Aktin eine Multiplex-PCR durchgeführt. Der PCR-Ansatz ist in der folgenden

10

Tabelle 2: PCR-Ansatz

15

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
cDNA	8 μ l	
10x PCR.Puffer*	5 μ l	1x
dNTP-Mix	1 μ l	jeweils 200 μ M
Primer	(s. Tabelle 3)	
DMSO-Zusatz ***	1,0 μ l	
Taq-DNA Polymerase **	0,5 μ l	2,5 U
H ₂ O	ad 50 μ l	

(*enthält 15 mM MgCl₂; für Stanniocalcin 20 mM MgCl₂;
 **HotStarTaqTM DNA Polymerase; Fa. Qiagen, Hilden;
 ***DMSO-Zusatz bei Stanniocalcin).

Für jeden Tumormarker wurde dabei ein Primerpaar eingesetzt, das aus der nachfolgenden Tabelle 3 hervorgeht.

5

Tabelle 3: Liste der PCR-Primer

Primernamen	Sequenz 5'→3'	PCR-Produkt
Tumormarker		
Stanniocalcin sense	AACCCATGAGGCGGAGCAGAATGA	254 bp
Stanniocalcin antisense	CGTTGGCGATGCATTTAAGCTCT	
EGF-R sense	AGTCGGGCTCTGGAGGAAAAGAAA	163 bp
EGF-R antisense	GATCATAATTCCTCTGCACATAGG	
CK20 sense	ATCTCCAAGGCCTGAATAAGGTCT	336 bp
CK20 antisense	CCTCAGTTCCTTTAATTCTTCAGT	
CEA sense	AGAAATGACGCAAGAGCCTATGTA	231 bp
CEA antisense	AACTTGTGTGTGTTGCTGCGGTAT	
GA733.2 sense	AATCGTCAATGCCAGTGTACTTCA	395bp
GA733.2 antisense	TAACGCGTTGTGATCTCCTTCTGA	
PDGF-β sense	TCTCTCTGCTGCTACCTGCGTCTG	
PDGF-β antisense	GTTGGCGTTGGTGCGGTCTATGAG	
interne Kontrolle		
β-Aktin sense	CTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCT	116 bp
β-Aktin antisense	ACAGGACTCCATGCCAGGAAGGA	

Die für die Tumormarkereinzelnachweise eingesetzten Primerkombinationen und -mengen sind in der folgenden Tabelle 4 aufgeführt.

5

Tabelle 4: Auflistung der Primermengen und Primerkombinationen

Marker Primer	Stannio- calcin	EGF-R	CK20	CEA
Stanniocalcin sense	25 pmol			
Stanniocalcin antisense	25 pmol			
EGF-R sense		25 pmol		
EGF-R antisense		25 pmol		
CK20 sense			25 pmol	
CK20 antisense			25 pmol	
CEA sense				25 pmol
CEA antisense				25 pmol
β -Aktin sense	1 pmol	1 pmol	1 pmol	1 pmol
β -Aktin anti- sense	1 pmol	1 pmol	1 pmol	1 pmol

10

Die PCR wurde unter den in Tabelle 5 angegebenen PCR-Bedingungen und mit den in Tabelle 6 angegebenen Marker-spezifischen Schmelz-Temperaturen und Zyklenzahlen durchgeführt.

Tabelle 5: PCR-Bedingungen

Vorabdenaturierung		95°C	15 min	
Zyklus				
	1. Denaturierung	94°C	1 min	
	2. Annealing	x°C	1 min	(s. Tabelle 6)
	3. Extension	72°C	1 min	
Finale Extension		72°C	10 min	
		4°C	Pause	

5

Tabelle 6: Marker-spezifische Annealing-Temperatur und Zyklenzahl

Marker	Stannio-calcin	EGF-R	CK20	CEA
Annealing-Temperatur	58°C	64°C	58°C	60°C
Zyklenzahl	45	40	35	40

10

1 µl des so erzeugten PCR-Produktes wurde in einem Agilent Bioanalyzer 2100 auf einem DNA-Chip (500) aufgetrennt und das Trennergebnis elektronisch dokumentiert. Die Ergebnisse zeigen die Figuren 1 und 2. In diesen Figuren zeigt jeweils Spur 1 eine 100 kb-Leiter sowie die Spuren 2-9 die Ergebnisse der entsprechenden Proben. Wie zu erkennen ist, zeigt Spur 5 ein PCR-Produkt für den Tumormarker CK20 und Spur 9 ein PCR-Produkt für den Tumormarker CEA, während sämtliche Proben mit biologischem Material (Spuren 4, 5, 8, 9) PCR-Produkte für die interne Kontrolle β-Aktin enthalten.

15

20

In Fig. 2 zeigen die Spuren 5 und 9 PCR-Produkte der Marker Stanniocalcin bzw. EGF-R, während wiederum die biologisches Material enthaltenden Proben gemäß Spuren 4, 5, 8, 9 PCR-Produkte von β -Aktin als internem Marker enthalten.

5

Die Spuren 2, 3, 6, 7 enthalten kein biologisches Material, so daß dort auch keine entsprechenden PCR-Produkte auftreten. Die sogenannte cDNA-Kontrolle ist ein Ansatz ganz ohne RNA, die sogenannte PCR-Kontrolle ist ein Ansatz ohne cDNA und die Negativ-Kontrolle ist ein Ansatz mit RNA einer gesunden Kontrollperson in Fig. 1 und in Fig. 2. CEA steht für Carcinoembryonic Antigen, CK20 für Cytokeratin 20, STC für Stanniocalcin und EGF-R für Epidermal Growth Factor Receptor in den Figuren 1 und 2.

10

15

Fig. 3 zeigt die alternative Analyse mittels Fluoreszenz-basierender Echtzeit-PCR mittels interkallierender Fluoreszenzfarbstoffe.

20

Dieser Tumormarkernachweis kann alternativ zur Block-PCR auch mittels Light Cycler (Fa. Roche, Basel) erfolgen.

25

Die reverse Transkription der mRNA erfolgt wie oben beschrieben. Anschliessend wurde die PCR mit dem Light Cycler-DNA Master Sybr Green I Kit (Fa. Roche, Basel) nach Herstellerangaben unter den für jeden Tumormarker optimierten Bedingungen durchgeführt. Als Primer wurden dabei die in Tabelle 3 angegebenen Oligonukleotide verwendet. Tabelle 7 und Tabelle 8 zeigen den Ansatz für die PCR bzw. die PCR-Bedingungen im Light Cycler.

30

35

Tabelle 7: PCR-Ansatz LightCycler

Tumormarker	Stannio-calcin	EGF-R	CK20	CEA
Komponenten				
CDNA	3,0 µl	3,0 µl	3,0 µl	2,0 µl
MgCl ₂	3,0 mM	3,5 mM	3,5 mM	2,5 mM
Primer	je 0,5 µM	je 0,5 µM	je 0,5 µM	je 0,5 µ
Light Cycler-DNA Master Sybr Green	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
DMSO	1 µl	-	-	-
H ₂ O	ad 20 µl	ad 20 µl	ad 20 µl	ad 20

5

Tabelle 8: PCR-Bedingungen LightCycler

	Stanniocalcin	EGFR	CK20	CEA
Denaturierung	95°C, 30 Sek 20°C/Sek	95°C, 30 Sek 20°C/Sek	95°C, 30 Sek 20°C/Sek	95°C, 30 Sek 20°C/Sek
Amplifikation	95°C, 5 Sek, 20°C/Sek	95°C, 5 Sek, 20°C/Sek	95°C, 5 Sek, 20°C/Sek	95°C, 5 Sek, 20°C/Sek
	67°C, 10 Sek, 20°C/Sek	60°C, 10 Sek, 20°C/	58°C 10 Sek, 20°C/Sek	60°C, 10 Sek, 20°C/Sek
	73°C, 15 Sek, 5°C/Sek	73°C, 15 Sek, 5°C/Sek	73°C, 20 Sek, 5°C/Sek	73°C, 20 Sek, 5°C/Sek
Melting Curve	95°C, 0 Sek, 20°C/Sek	95°C, 0 Sek, 20°C/Sek	95°C, 0 Sek, 20°C/Sek	95°C, 0 Sek, 20°C/Sek
	70°C, 20 Sek, 20°C/Sek	65°C, 20 Sek, 20°C/Sek	65°C, 15 Sek, 20°C/Sek	65°C, 15 Sek, 20°C/Sek
	95°C, 0 Sek, 0,1°C/Sek	95°C, 0 Sek, 0,1°C/Sek	95°C, 0 Sek, 0,1°C/Sek	95°C, 0 Sek, 0,1°C/Sek
Cooling	30°C, 30 Sek 20°C/Sek	30°C, 30 Sek 20°C/Sek	30°C, 30 Sek 20°C/Sek	30°C, 30 Sek 20°C/Sek

Das Ergebnis dieser PCR und Auswertung durch Light Cycler-Technologie ist in den Figuren 3A bis 3D dargestellt.

10

In sämtlichen Figuren 3A bis 3D ist die Kontrollkurve mit 2 bezeichnet, während die Kurve, die für die Probe aufgenommen wurde, mit 1 bezeichnet ist.

5

Bei dieser Analyse wird die Schmelzkurve der PCR-Produkte durch Sybr Green I Detektion analysiert. Die jeweilige Graphik der Figuren 3A bis 3D stellt dabei die gemessene Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur dar. Die in den Kontrollansätzen auftretenden Fluoreszenzpeaks sind auf Primerdimere zurückzuführen.

10

Fig. 3A stellt dabei die Schmelzkurvenanalyse des Stanniocalcin-PCR-Produktes dar. Der Schmelzpunkt des Hauptproduktes liegt bei $88,7^{\circ}\text{C}$ und der Schmelzpunkt des Nebenproduktes bei $84,6^{\circ}\text{C}$. Derartige Fluoreszenzpeaks sind bei der Kontrollprobe nicht zu erkennen.

15

Fig. 3B zeigt die Schmelzkurvenanalyse des EGFR-PCR-Produktes mit einem Schmelzpunkt bei $84,3^{\circ}\text{C}$.

20

Fig. 3C zeigt eine Schmelzkurvenanalyse des CK20-PCR-Produktes mit einem Schmelzpunkt bei $87,6^{\circ}\text{C}$.

25

Fig. 3D zeigt die Schmelzkurvenanalyse des CEA-PCR-Produktes mit einem Schmelzpunkt bei $89,7^{\circ}\text{C}$.

30

35

Alternativ zu den hier dargestellten Methoden können selbstverständlich auch herkömmliche Analysemethoden wie Agarose-Gelelektrophorese angewandt werden, bei denen beispielsweise $25\ \mu\text{l}$ des oben dargestellten PCR-Produktes über ein 2,5%iges Agarosegel aufgetrennt werden und die DNS-Banden anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt und sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation kann beispielsweise mit Hilfe des

DUO Store Systems der Fa. Intas durchgeführt werden.

Auch eine Fragmentanalyse mittels ABI Prism 310 Genetic Analyser (Fa. PE Applied Biosystems, Weiterstadt) kann zur Auswertung verwendet werden. Hierzu wird eine PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern durchgeführt und anschließend beispielsweise jeweils 1 µl des jeweiligen PCR-Produktes in einer Verdünnung von 1 : 50 eingesetzt.

Als weiterer Nachweis ist ein Nachweis mittels sequenzspezifischer fluoreszenzmarkierter Hybridisierungsproben möglich, die nach jedem Zyklus der PCR die Produktentwicklung verfolgen lassen. Anhand spezieller Standards kann dann auch ein Rückschluß auf die Menge an Ausgangs-RNS gezogen werden.

Zentral für die Qualität der als Nachweisbasis isolierten RNS und der daraus synthetisierten cDNS ist die Anreicherung der hierfür verwendeten Zellfraktion aus der verwendeten Blutprobe. Hierfür stehen vier verschiedene Methoden zur Verfügung:

a) Anreicherung durch wiederholte Zentrifugation nach Erythrozytenlyse:

1 ml EDTA-Blut werden nach Zugabe von 5 Volumina Erythrozyten-Lysepuffer („QIAmp Blood Kit“, Qiagen; Hilden) für 20 Minuten auf Eis lysiert. Nach Abnehmen des Plasmas/Lysates von den pelletierten Zellen und Resuspension erfolgt eine erneute Zentrifugation bei 3000 x g für 20 Minuten. Nach Abnehmen des Überstandes steht die pelletierte Leukozytenfraktion für die RNA-Präparation zur Verfügung.

b) Anreicherung durch Dichtegradienten-Zentrifugation:

5 Mittels eines über Zentrifugation erzeugten Dichtegradienten lassen sich Zellen unterschiedlicher mittlerer Volumendichte voneinander trennen. Mononukleare Blutzellen werden mittels eines Ficoll-Hypaque-Gradienten (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
10 separiert und anschließend zweifach mit PBS/1% FCS gewaschen.

c) Anreicherung von Tumorzellen durch FACS-Durchflußzytometrie:

15 Die mononukleären Zellen aus der unter b) angereicherten Fraktion werden mit fluoreszenzmarkierten mononuklearen Antikörpern gegen tumorspezifische Oberflächenproteine inkubiert. Die markierten Zellen werden zweifach mit PBS gewaschen und im Anschluß werden 10^7 Zellen in 1 ml PBS resuspendiert. Für die Isolierung der Tumorzellen wird ein FACS Vantage SE-Durchflußzytometer (Becton Dickinson) verwendet. Über das CellQuest Programm erfolgen Datenaufnahme, Instrumentenkontrolle und Datenauswertung. Die sortierten Zellen werden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß (gefüllt mit 1 ml PBS) überführt. Die RNS kann dann wie oben beschrieben isoliert werden.

30 Alternativ kann auch die isolierte Fraktion der mononukleären Blutkörperchen, die nach einem der obigen Verfahren isoliert wurden, in Trizol-Reagenz (Gibco BRL, NY, USA) lysiert und mittels
35 Pipette homogenisiert werden. Nach Chloroformextraktion wird die RNA-haltige wäßrige Phase in

Isopropanol bei -80°C gefällt. Nach zweimaligem Waschen in 80%igem Ethanol wird das Pellet an der Luft getrocknet und anschließend in RNase-freiem Wasser resuspendiert.

5

An diese Isolation der RNS schließt sich dann die reverse Transkription sowie der mRNA-Nachweis wie oben beschrieben an.

10

d) Anreicherung von Tumorzellen durch immunomagnetische Separation.

15

Die Expression spezieller Oberflächenproteine unterscheidet Tumorzellen von nichttransformierten Zellen dieses Zelltyps. Da sich dieses spezielle Muster der Oberflächen-Antigene bei Tumorzellen auch von den Blutzell-typischen Mustern unterscheidet, können Tumorzellen im Blut unterschieden werden. Um Tumorzellen zu identifizieren, werden Antikörper, die diese speziellen Oberflächenproteine spezifisch erkennen, als Werkzeuge genutzt. Die spezifische Antikörperbindung wird für das erfindungsgemäße Verfahren nutzbar gemacht. An pseudomagnetische Partikel, die eine definierte Anzahl an chemisch aktivierten Stellen auf ihrer Oberfläche besitzen, werden Antikörper kovalent gekoppelt. Über die Spezifität der Antikörper wird die Spezifität der Trennung bestimmt. Eine Tumorzellen enthaltende Blutprobe wird mit Antikörper gekoppelte Magnetpartikel versetzt; als Antikörper werden in verschiedenen Beispielen zwei verschiedene Mischungen von Antikörpern verwendet; dann werden Partikel und Blut relativ zueinander bewegt, beispielsweise durch "Über-Kopf-Rotierer" in einem geschlossenen Behälter befindlicher Proben oder durch Bewegung der Partikel aufgrund von wechselnden Magnetfeldern. Jene

20

25

30

35

(Tumor-)Zellen, die von den Festphase-gebundenen Antikörpern erkannt und damit fest gebunden werden, folgen der Bewegung der Partikel. Hierdurch ist es möglich, bei Anlegen eines magnetischen Feldes, die Partikel mit den daran gebundenen Zellen aus dem Blut herauszuziehen (z.B. an die Wand des Trenngefäßes). Das auf diese Weise Tumorzellen-depletierte Blut kann gegen andere Lösungen ausgetauscht werden, wobei die über Magnetpartikel separierten Zellen bis zum Abschalten/Entfernen des Magnetfeldes vor Ort verbleiben und für weitere Anwendungen zur Verfügung stehen.

Tabelle 9: Antikörper-Mischung 1

Antigen	Klon	Konzentration
Epith.Rel.Antigen	MOC-31 (Fa. Novocastra)	1,25 µl/10 ⁶ Zellen
Epitheliales Antigen	Ber-EP 4 (Fa. DAKO)	0,924 µg/10 ⁶ Zellen

Mittels der Antikörpermischung in Tabelle 9 werden ganz allgemein Tumorzellen jedoch mit hoher Spezifität erfaßt. Dies beruht auf der selektiven Expression bestimmter Oberflächenproteine, die Krebszellen von anderen Zellen unterscheidet.

Durch den Einsatz der Antikörpermischung wird ganz grundsätzlich im Vergleich zu separat eingesetzten Antikörpern bei der Zelltrennung unabhängig von der angewendeten Methode eine erhöhte Sensitivität nachgewiesen. Dies zeigt sich in Fig. 4, bei der im Teilbild A mit dem Antikörper BER-EP4 belegte magnetische Partikel, in dem Teilbild B mit dem Antikörper MOC-31 belegte magnetische Partikel und in dem Teilbild C ein Mix aus Partikeln die jeweils separat mit einem Antikörper belegt wird, eingesetzt wurden.

Für jeden der Antikörper bzw. der Antikörpermischungen wurden insgesamt vier Messungen durchgeführt, bei denen 0, 10, 100 bzw. 1000 Karzinom-Zellen in 10 ml Blut inokuliert wurden. Die Spuren 1a bis 4a, 1b bis 4b bzw. 1c bis 4c zeigen dann den Nachweis von RNA nach RNA-Präparation und RT-PCR mit Tumormarkerspezifischen Primern wie oben beschrieben für Proben von jeweils 1 µl Volumen. Die Fig. 4 wurde dabei mittels elektrophoretischer Trennung in einem Agilent™ Bioanalyser 2100 gemäß Herstellerangaben ermittelt.

Bei Verwendung von lediglich mit einem Antikörper markierten magnetischen Partikeln wie in den Fign. 4A und 4B wurde lediglich bei einem Gehalt von 1000 Zellen ein Nachweis positiv möglich. Bei Verwendung einer Antikörpermischung wie in Fig. 4C wurde bereits ein Nachweis bei nur 100 Zellen und damit um den Faktor 10 sensitiver erbracht.

Bei diesem Beispiel wurden experimentelle Ergebnisse gezeigt, die nicht die maximal mögliche Sensitivität darstellen, sondern beispielhaft die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erreichbare Sensitivitätserhöhung demonstrieren sollen.

Die Fign. 5 bis 7 zeigen den Nachweis von Markerkombinationen, wobei in den folgenden Tabellen für die Fign. 5 bis 7 die jeweiligen Bedingungen für die drei Multiplexreaktionen angegeben sind.

Multiplex 1 (Fig. 5)

Marker	EGFR	CEA	GA733.2	Aktin
Konz. Primer	750 nM	750 nM	500 nM	200 nM

5 Temperatur: 58 °C
40 Zyklen

Multiplex 2 (Fig. 6)

Marker	EGFR	CK20	GA733.2	Aktin
Konz. Primer	1 µM	500 nM	250 nM	200 nM

10 Temperatur: 58 °C
35 Zyklen

Multiplex 3 (Fig. 7)

Marker	EGFR	CEA	PDGF-β	GA733.2	Aktin
Konz. Primer	1 µM	1 µM	500 nM	250 nM	200 nM

15 Temperatur: 58 °C
35 Zyklen

20
25 Fig. 5 zeigt den Nachweis von Darmkrebszellen, die in Blut inokuliert wurden. Dabei erfolgte die Selektion der Zellen mit den zwei Antikörpern BER-EP4 und MOC-31. Der molekularbiologische Nachweisschritt erfolgte mit den mRNS-Markern GA733.2 (Human carcinoma-associated antigen GA733-2 gen), CEA (Human carcinoembryonic antigen CEA gen) und EGF-R (Human epidermal growth factor receptor gen). Wie zu erken-

nen ist, waren bis herab zu zwei Zellen in 5 ml Blut zu detektieren.

5 Fig. 6 zeigt eine ähnliche Bestimmung mit den Tumormarkern GA733.2, CK20 (Homo sapiens gen for cytokeratin 20) sowie EGF-R. Wie zu erkennen ist, wurden auch hier bis herab zu zwei inokulierten Darmtumorzellen in 5 ml Blut sicher detektiert.

10 Fig. 7 zeigt den Nachweis mittels der parallelen Bestimmung der mRNA der Marker GA733.2, PDGF- β (Platelet derived growth faktor), CEA und EGF-R. Auch hier wurden wiederum bis herab zu 2 inokulierten Zellen pro 5 ml Blut sicher erfaßt.

15 Das erfindungsgemäße Diagnose-Kit und das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht es weiterhin, die sortierten und separierten Zellen anschließend beliebig weiter zu verwenden. Beispielsweise können diese in
20 ein geeignetes Zellkulturmedium eingesetzt und in situ kultiviert werden.

Da die Zellen nach der Trennung intakt sind, bleiben auch die Eigenschaften der Zellmembran und des Zellkerns erhalten. Dies eröffnet die Möglichkeit, mikroskopisch die Expression weiterer Oberflächenmarker untersuchen oder auch Chromosomen-Analysen durchzuführen. Die sortierten Zellen werden dazu auf Objektträger aufgebracht. Der Nachweis weiterer Oberflächenmarker kann cytochemisch oder über Fluoreszenzmikroskopie erfolgen. Ebenso können genetische Analysen durchgeführt werden, wie beispielsweise Chromosomenanalysen mittels FISH (Fluorescence in situ hybridisation) oder Karyogramm-Erstellung.

35

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Diagnostik oder Behandlungskontrolle von Darmkrebs bei einem Menschen, dadurch gekennzeichnet, daß in einer Blutprobe des Menschen das Vorhandensein oder Fehlen von mindestens zwei verschiedener mRNS erfaßt wird, die für verschiedene der Tumormarkerproteine CK20,
10 EGF-R, CEA, GA733.2, PDGF- β und/oder Stanniocalcin kodieren und daraus auf das Vorhandensein von Darmtumorzellen in der Blutprobe und damit auf mögliche Metastasierung geschlossen wird.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die mRNS von mindestens zwei mRNS erfaßt wird, die für verschiedene der Tumormarkerproteine aus der Gruppe bestehend aus CK20, EGF-R, CEA und Stanniocalcin oder der Gruppe bestehend aus EGFR, CEA und GA733.2 kodieren.
20
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Vorhandensein oder Fehlen von mindestens drei mRNS erfaßt wird, die für verschiedene der Tumormarkerproteine CK20, EGF-R CEA, GA733.2, PDGF- β und/oder Stanniocalcin kodieren.
- 30 4. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß das Vorhandensein oder Fehlen von mRNS erfaßt wird, die für GA733.2, CEA und EGF-R kodieren.
- 35 5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Vorhandensein oder Fehlen von mRNS erfaßt wird, die für GA733.2, CK20, EGF-R kodieren.

ren.

- 5 6. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Vorhandensein oder Fehlen von mRNA 5 erfaßt wird, die für GA733.2, PDGF- β , EGF-R kodieren.
- 10 7. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Vorhandensein oder Fehlen von mRNA 10 erfaßt wird, die für GA733.2, PDGF- β , EGF-R, CEA kodieren.
- 15 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß aus der Blut- 15 probe Tumorzellen abgetrennt bzw. angereichert werden und der Nachweis an diesen Tumorzellen erfolgt.
- 20 9. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, da- 20 durch gekennzeichnet, daß die Darmtumorzellen mittels für Tumorzellen allgemein spezifischer Antikörper und/oder mittels für Darmtumorzellen spezifischer Antikörper oder Mischungen derartiger Antikörper abgetrennt bzw. angereichert wer- 25 den.
- 30 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprü- 30 che, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Abtrennung der Colontumorzellen verwendeten Antikörper oder Antikörperderivate Bindungsstellen aufweisen, die an Epitope eines epithelialen Antigens und/oder eines epithelialen Membranantigens binden.

11. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß als Antikörper MOC-31 und/oder Ber-EP4 verwendet werden.
- 5 12. Verfahren nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Darmtumorzellen mittels an Magnetpartikel gebundener Antikörper abgetrennt bzw. angereichert werden.
- 10 13. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Darmtumorzellen mittels fluoreszenzassoziierter Durchflußzytometrie, Dichtegradientenzentrifugation und/oder Zentrifugation nach Erythrozytenlyse abgetrennt bzw. angereichert werden.
- 15 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß eine Zentrifugation der Blutprobe zur Pelletierung der in ihr enthaltenen Leukozyten durchgeführt wird.
- 20 15. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die RNS-haltigen Bestandteile der Probe mittels Lyse der darin enthaltenen Erythrozyten und anschließender Pelletierung der nichtlysierten Leukozyten aufkonzentriert werden.
- 25 16. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die RNS-haltigen Bestandteile durch mindestens eine Dichtegradienten-Zentrifugation der Blutprobe zur Abseparierung und Gewinnung der in ihr enthaltenen mononukleären Blutzellen
- 30

aufkonzentriert werden.

- 5 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die gewonnenen mononukleären Blutzellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert und mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS) von der Probe abgetrennt und gewonnen werden.
- 10 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die mononukleären Zellen der gewonnenen Fraktion lysiert und die mRNA abgetrennt wird.
- 15 19. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die RNS (Gesamt-RNS oder mRNA) in herkömmlicher Weise unmittelbar aus der Vollblutprobe isoliert wird.
- 20 20. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß anschließend an die Isolation der mRNA ein DNS-Verdau durchgeführt wird.
- 25 21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die gewonnene mRNA in cDNA revers transkribiert wird und anschließend das Vorhandensein oder Fehlen der cDNA erfaßt wird, die dem Tumormarkerprotein zugeordnet ist.
- 30 22. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest ein vorbe-

stimmter Abschnitte der cDNS durch Polymerase-Kettenreaktion ("PCR") vervielfältigt wird.

- 5 23. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß zur Vervielfältigung der cDNS eines oder mehrere Oligonukleotid-Paare verwendet werden, die die folgenden Sequenzen aufweisen:
- 10 AACCCATGAGGCGGAGCAGAATGA und CGTTGGCGATGCATTT-TAAGCTCT
und/oder
AGTCGGGCTCTGGAGGAAAAGAAA und GATCATAATTCCTCTGCACATAGG
und/oder
- 15 ATCTCCAAGGCCTGAATAAGGTCT und
CCTCAGTTCCTTTTAATTCTTCAGT
und/oder
AGAAATGACGCAAGAGCCTATGTA und
AACTTGTGTGTGTTGCTGCGGTAT
- 20 und/oder AATCGTCAATGCCAGTGTACTTCA und
TAACGCGTTGTGATCTCCTTCTGA
und/oder
TCTCTCTGCTGOTACCTGCGTCTG und
GTTGGCGTTGGTGCAGTCTATGAG.
- 25
24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als interne Kontrolle die mRNA des Proteins β -Aktin bestimmt wird.
- 30
25. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die mRNA für β -Aktin in cDNS revers transkribiert und ein Abschnitt der cDNS mittels Polymerasekettenreaktion ver-

vielfältigt wird.

- 5 26. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß zur Vervielfältigung der cDNS des β -Aktin ein Oligonukleotid-Paar verwendet wird, wobei die Oligonukleotide des Paares die folgenden Sequenzen aufweisen:
CTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCT und
ACAGGACTCCATGCCCAGGAAGGA.
- 10
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß der vervielfältigte cDNS-Abschnitt durch geeignete Restriktionsenzyme verdaut und anhand der erzeugten cDNS-Bruchstücke das Vorhandensein oder Fehlen der mRNA eines Tumormarkerproteins bestimmt wird.
- 15
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis der amplifizierten cDNS-Abschnitte eine Gelelektrophorese der PCR-Produkte durchgeführt wird.
- 20
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis der amplifizierten cDNS-Abschnitte eine Fragmentanalyse durchgeführt wird.
- 25
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß während des Verlaufs der Polymerasekettenreaktion die von den Produkten erzeugte Fluoreszenz erfaßt und die Produktentwicklung erfaßt wird (fluoreszenzbasierte Echtzeit-PCR).
- 30

- 5 31. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis der mRNA oder cDNA ein Nukleotid-Mikroarray nach einem der Ansprüche 56 oder 57 verwendet wird.
- 10 32. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis der amplifizierten cDNA das PCR-Produkt auf ein Nukleotid-Mikroarray nach einem der Ansprüche 56 oder 57 aufgetragen wird.
- 15 33. Diagnose-Kit zur Diagnostik oder Behandlungskontrolle von Darmkrebs mit mindestens zwei Paaren Oligonukleotide (Reverseprimer, Forwardprimer), wobei die beiden Oligonukleotide jedes Paares als Primer zur Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion jeweils eines der beiden komplementären Stränge eines gesuchten DNA-Abschnittes geeignet sind, und wobei der gesuchte DNA-Abschnitt für jedes der Primerpaare Teil der cDNA zu je einem der Tumormarkerproteine CK20, EGF-R, CEA, GA733.2, PDGF- β und/oder Stanniocalcin ist.
- 20
- 25 34. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens drei Paare Oligonukleotide (Reverseprimer, Forwardprimer) enthält, wobei die beiden Oligonukleotide der jeweiligen Paare als Primer zur Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion jeweils eines der beiden komplementären Stränge verschiedener gesuchter DNA-Abschnitte geeignet sind, und
- 30 wobei die gesuchten DNA-Abschnitt jeweils Teil der c-DNA zu verschiedenen Tumormarkerproteinen
- 35

ausgewählt aus den Tumormarkerproteinen CK20, EGF-R, CEA, GA733.2, PDGF- β und Stanniocalcin sind.

- 5 35. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch,
dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens vier
Paare Oligonukleotide (Reverseprimer, Forward-
primer) enthält, wobei die beiden Oligonukleoti-
10 de der jeweiligen Paare als Primer zur Amplifi-
kation mittels Polymerasekettenreaktion jeweils
eines der beiden komplementären Stränge ver-
schiedener gesuchter DNS-Abschnitte geeignet
sind, und wobei die gesuchten DNS-Abschnitt je-
15 weils Teil der c-DNS zu verschiedenen Tumor-
markerproteinen ausgewählt aus den Tumormarker-
proteinen CK20, EGF-R, CEA, GA733.2, PDGF- β und
Stanniocalcin sind.
- 20 36. Diagnose-Kit nach Anspruch 34, dadurch ge-
kennzeichnet, daß die gesuchten DNS-Abschnitte
jeweils Teil der c-DNS zu den verschiedenen Tu-
mormarkerproteinen GA733.2, CEA und EGF-R sind.
- 25 37. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch,
dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens vier
Paare Oligonukleotide (Reverseprimer, Forward-
primer) enthält, wobei die beiden Oligonukleoti-
de der jeweiligen Paare als Primer zur Amplifi-
30 kation mittels Polymerasekettenreaktion jeweils
eines der beiden komplementären Stränge ver-
schiedener gesuchter DNS-Abschnitte geeignet
sind, und wobei die gesuchten DNS-Abschnitt
jeweils Teil der c-DNS zu verschiedenen Tumor-
markerproteinen ausgewählt aus den Tumormarker-

proteinen CK20, GA733.2, CK20, EGF-R und Stanniocalcin sind.

- 5 38. Diagnose-Kit nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß die gesuchten DNS-Abschnitte jeweils Teil der c-DNS zu den verschiedenen Tumormarkerproteinen PDGF- β , EGF-R, GA733.2 sind.
- 10 39. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens vier Paare Oligonukleotide (Reverseprimer, Forwardprimer) enthält, wobei die beiden Oligonukleotide der jeweiligen Paare als Primer zur Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion jeweils
15 eines der beiden komplementären Stränge verschiedener gesuchter DNS-Abschnitte geeignet sind, und wobei die gesuchten DNS-Abschnitt jeweils Teil der c-DNS zu verschiedenen Tumormarkerproteinen
20 ausgewählt aus den Tumormarkerproteinen GA733.2, PDGF- β , CEA, EGF-R und Stanniocalcin sind.
- 25 40. Diagnose-Kit nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet daß die gesuchten DNS-Abschnitte jeweils Teil der cDNS zu mindestens zwei der verschiedenen Tumormarkerproteine CK20, EGF-F und CEA bzw. EGF-R, CEA und GA733,2 sind.
- 30 41. Diagnose-Kit nach einem der Ansprüche 33 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß es ein weiteres Paar Oligonukleotide enthält, die jeweils als Primer zur Amplifikation zumindest eines Abschnitts eines der beiden komplementären Stränge der cDNS zu dem Protein β -Aktin als interne Kontrolle
35 geeignet sind.

42. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Oligonukleotide eines Paares paarweise die folgenden Sequenzen aufweisen:
- 5 AACCCATGAGGCGGAGCAGAATGA und CGTTGGCGATGCATTT-TAAGCTCT
und/oder
AGTCGGGCTCTGGAGGAAAAGAAA und GATCATAATTCCTCTGCACATAGG
10 und/oder
ATCTCCAAGGCCTGAATAAGGTCT und
CCTCAGTTCCTTTTAATTCTTCAGT
und/oder
15 AGAAATGACGCAAGAGCCTATGTA und
AACTTGTGTGTGTTGCTGCGGTAT
und/oder
AATCGTCAATGCCAGTGTACTTCA und
TAACGCGTTGTGATCTCCTTCTGA
20 und/oder
TCTCTCTGCTGOTACCTGCGTCTG und
GTTGGCGTTGGTGCAGTCTATGAG.
43. Diagnose-Kit nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest jeweils eines der beiden Oligonukleotide eines Paares von Oligonukleotiden mit Fluorophoren markiert ist.
- 25
44. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide
30 verschiedener Paare mit verschiedenen Fluorophoren
35 ren markiert sind.

- 5 45. Diagnose-Kit nach einem der Ansprüche 32 bis 42, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Amplifikation der cDNS zu β -Aktin ein Paar Oligonukleotide mit den folgenden Sequenzen enthält:
CTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCT und
ACAGGACTCCATGCCAGGAAGGA.
- 10 46. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest jeweils eines der beiden Oligonukleotide des Paares zur Amplifikation der cDNS zu β -Aktin mit Fluorophoren markiert ist.
- 15 47. Diagnose-Kit nach einem der Ansprüche 33 bis 46, dadurch gekennzeichnet, daß es die zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion erforderlichen Substanzen enthält.
- 20 48. Diagnose-Kit nach einem der Ansprüche 33 bis 47, dadurch gekennzeichnet, daß es als zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion erforderliche Substanzen eine Pufferlösung, Magnesiumchlorid, Desoxynukleotid-Triphosphate sowie eine
25 hitzestabile Polymerase enthält.
- 30 49. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß es als hitzestabile Polymerase eine Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) enthält.

50. Diagnose-Kit nach einem der Ansprüche 33 bis 49, dadurch gekennzeichnet, daß es als Positivkontrolle eine DNS-Probe mit dem jeweils gesuchten DNS-Abschnitt enthält.
- 5
51. Diagnose-Kit nach einem der Ansprüche 33 bis 50, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Anleitung zur Durchführung der Polymerasekettenreaktion und/oder eine Anleitung zur Durchführung einer Fragmentanalyse enthält.
- 10
52. Diagnose-Kit nach einem der Ansprüche 33 bis 51, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Schema zur Auswertung der erhaltenen Meßergebnisse enthält.
- 15
53. Diagnose-Kit nach einem der Ansprüche 33 bis 52, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Mikroarray (DNS-Chip) enthält, wobei der Array eine Anzahl voneinander getrennter Zellen (Felder) aufweist und in mindestens einer Zelle des Mikroarrays ein Oligonukleotid angeordnet ist, das mit dem gesuchten DNS-Abschnitt hybridisiert.
- 20
54. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens einer weiteren Zelle des Mikroarrays ein weiteres Oligonukleotid angeordnet ist und die Sequenz des Oligonukleotides, das in der mindestens einen Zelle angeordnet ist, sich von der Sequenz des weiteren Oligonukleotides unterscheidet.
- 25
- 30

55. Diagnose-Kit nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens zwei Zellen jeweils ein Oligonukleotid angeordnet ist, wobei die in verschiedenen Zellen angeordneten Oligonukleotide jeweils mit verschiedenen gesuchten DNS-Abschnitten hybridisieren.
56. Mikroarray zur Diagnostik oder Behandlungskontrolle von Darmkrebs, beispielsweise DNS-Chip, mit einer Anordnung von mehreren, voneinander getrennten Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens zwei Zellen jeweils verschiedene Oligonukleotide angeordnet sind, die mit jeweils zwei verschiedenen DNS-Abschnitten hybridisieren, die Teil der cDNS zu einem der Tumormarkerproteine CK20, EGF-R, CEA, GA733.2, PDGF- β oder Stanniocalcin sind.
57. Mikroarray nach Anspruch 54, dadurch gekennzeichnet, daß in drei oder vier Zellen jeweils verschiedene Oligonukleotide angeordnet sind, die mit jeweils drei oder vier verschiedenen DNS-Abschnitten, die Teil der cDNS von jeweils verschiedenen Tumormarkerproteinen ausgewählt aus den Tumormarkerproteinen CK20, EGF-R, CEA, GA733.2, PDGF- β oder Stanniocalcin sind, hybridisieren.
58. Mikroarray nach Anspruch 57, dadurch gekennzeichnet, daß die verschiedenen DNS-Abschnitte Teil der cDNS der Tumormarkerproteine GA733.2, CEA, EGF-R sind.

59. Mikroarray nach Anspruch 57, dadurch gekennzeichnet, daß die verschiedenen DNS-Abschnitte Teil der cDNS der Tumormarkerproteine GA733.2, CK20, EGF-R sind.
- 5
60. Mikroarray nach Anspruch 57, dadurch gekennzeichnet, daß die verschiedenen DNS-Abschnitte Teil der cDNS der Tumormarkerproteine GA733.2, PDGF- β , EGF-R sind.
- 10
61. Mikroarray nach Anspruch 57, dadurch gekennzeichnet, daß die verschiedenen DNS-Abschnitte Teil der cDNS der Tumormarkerproteine GA733.2, PDGF- β , CEA, EGF-R sind.
- 15
62. Mikroarray nach Anspruch 56, dadurch gekennzeichnet, daß zwei der verschiedenen DNS-Abschnitte ausgewählt sind aus CK20, EGF-R und CEA bzw. EGF-R, CEA und GA733.2.
- 20
63. Verwendung eines Diagnose-Kits, eines Mikroarrays und/oder eines Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Diagnose von Erkrankungen oder Metastasierung oder zur Behandlungskontrolle bei Darmkrebs.
- 25

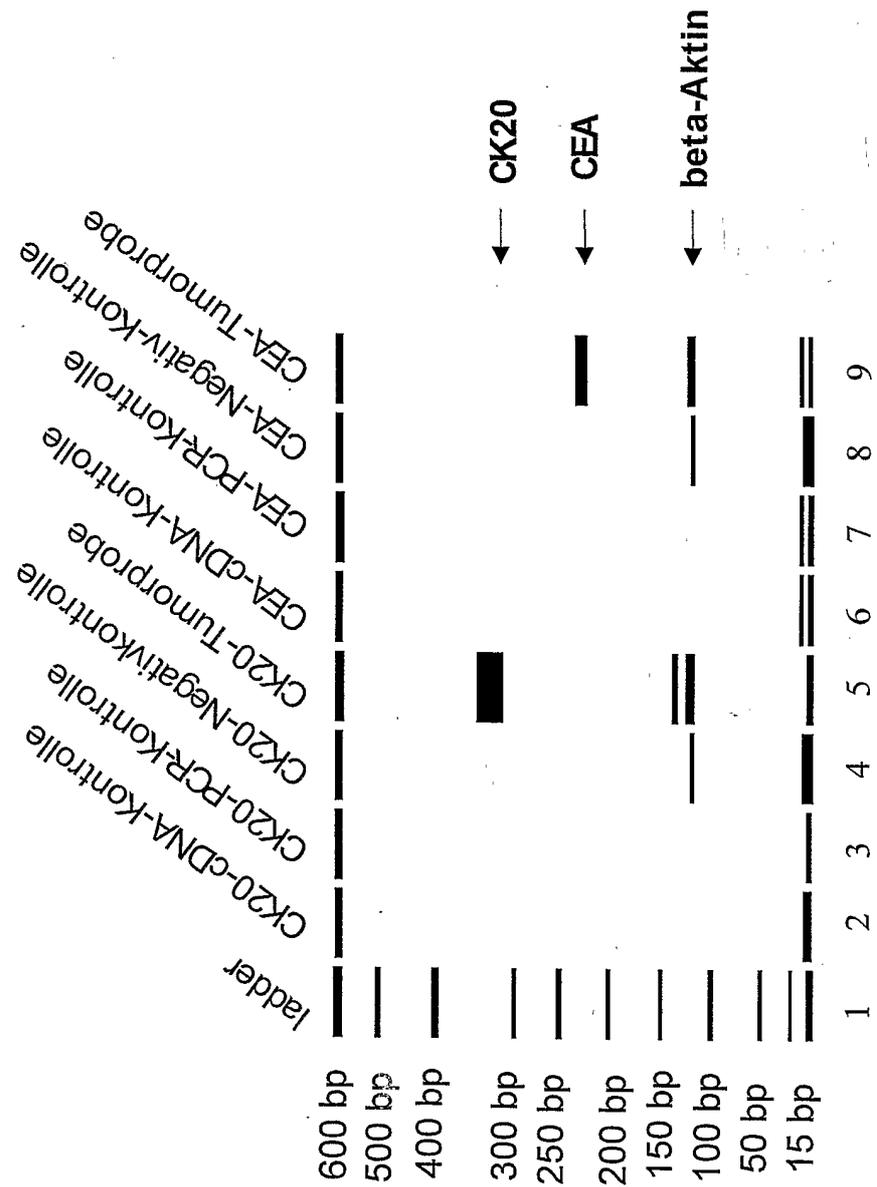


FIG. 1

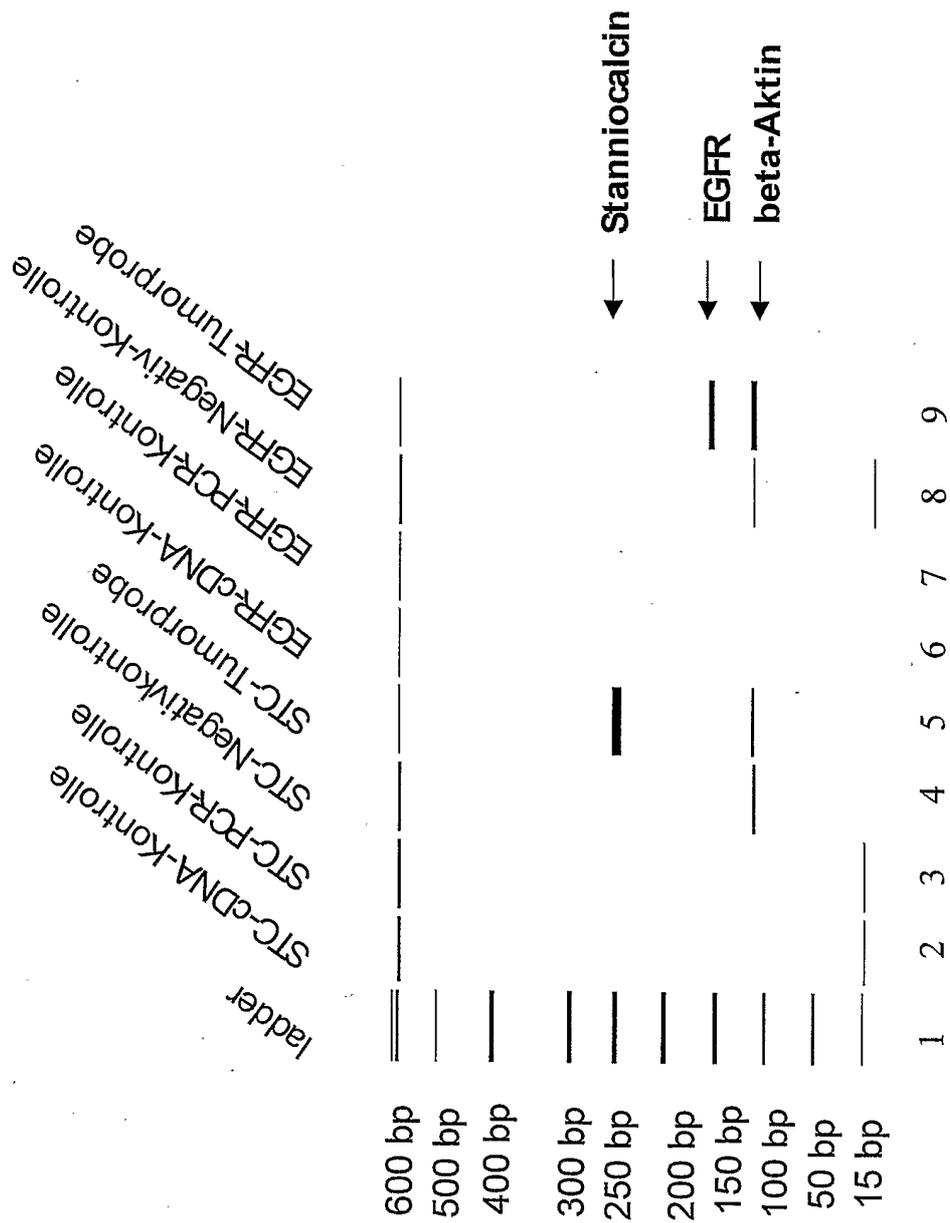
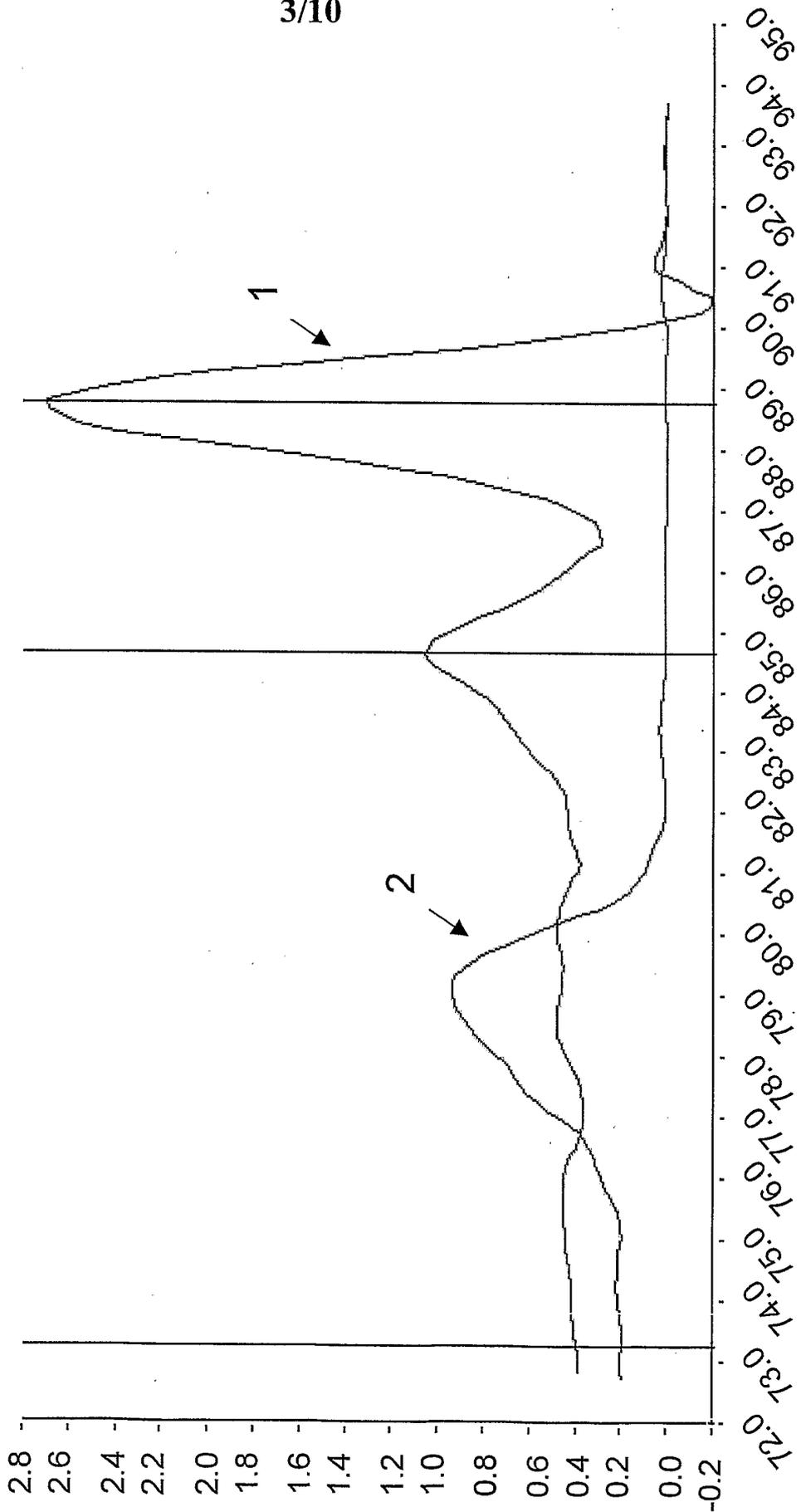


FIG. 2

3/10

A Stanniocalcin

Fluoreszenz



Temperatur [C°]

Fig. 3A

B EGFR

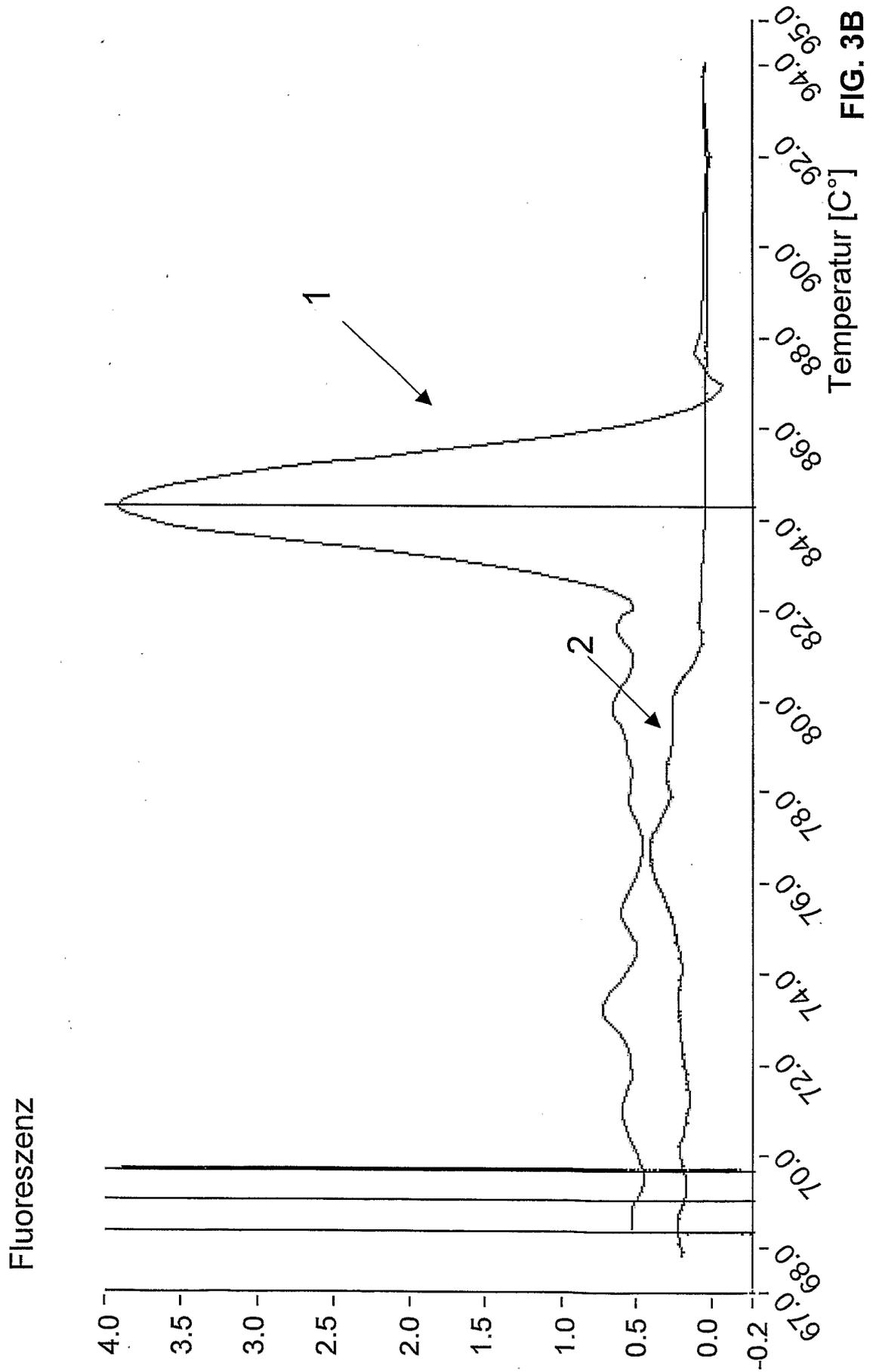


FIG. 3B

C CK20

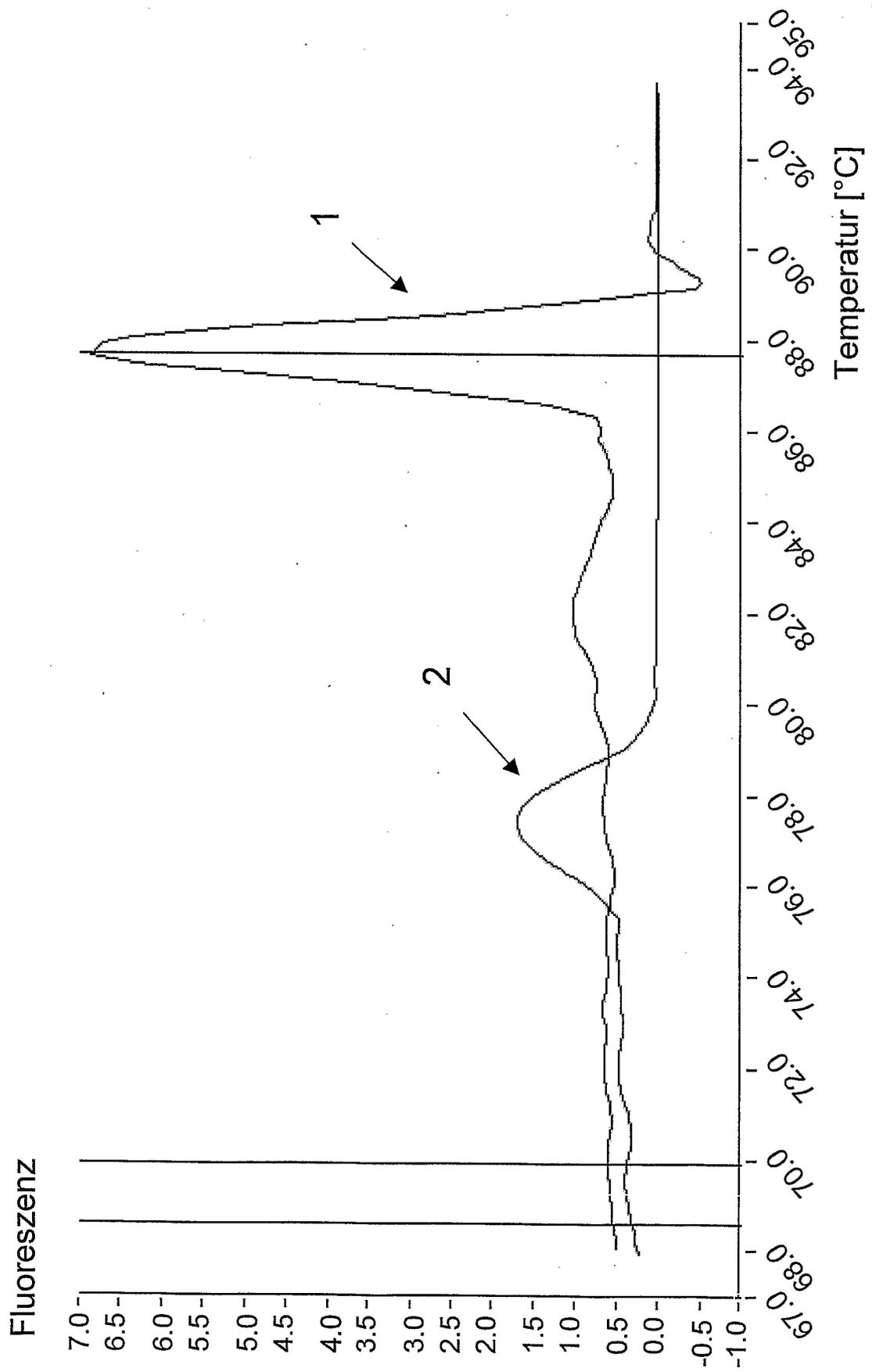


FIG. 3C

D_CEA

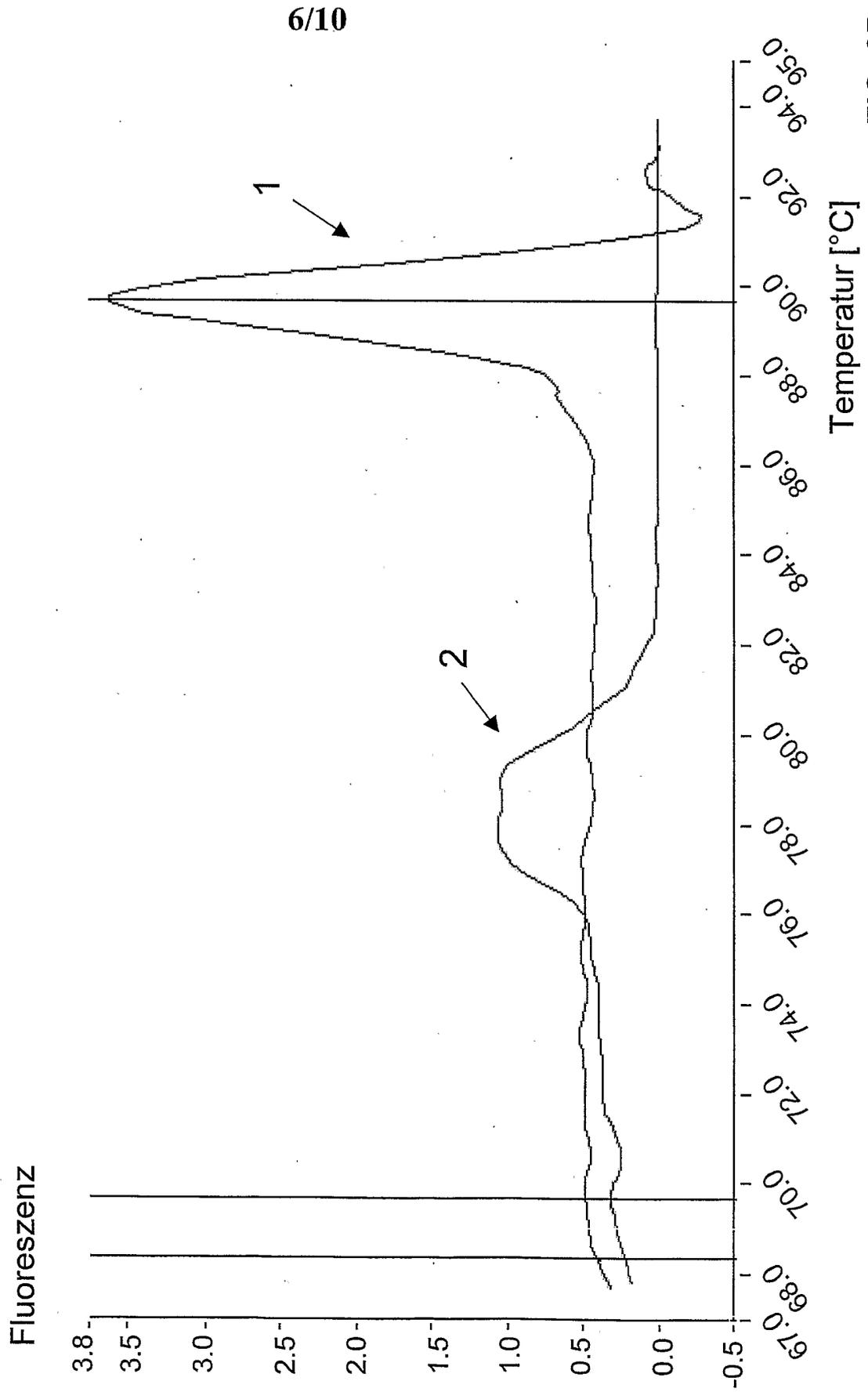


FIG. 3D

7/10

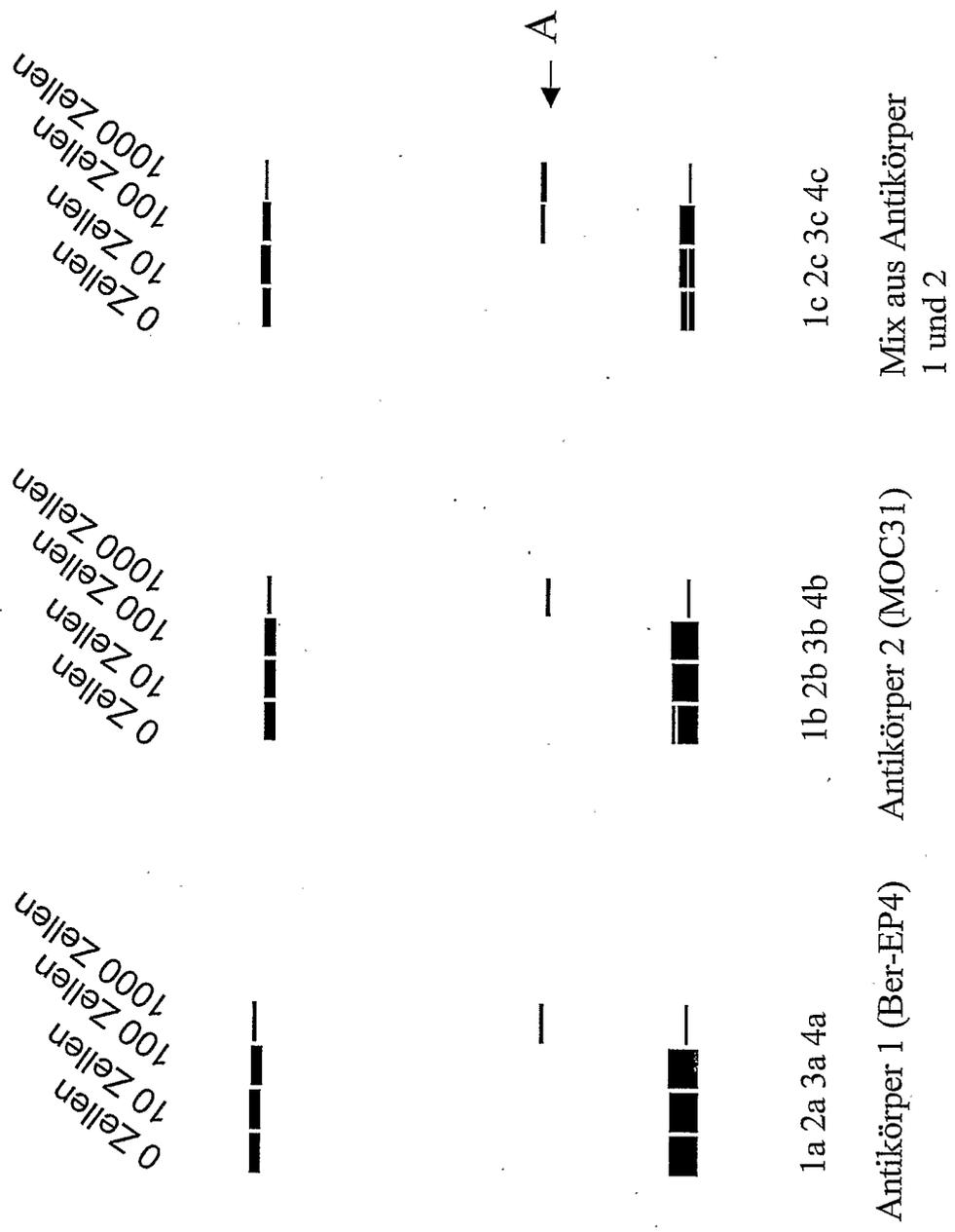


FIG. 4

8/10

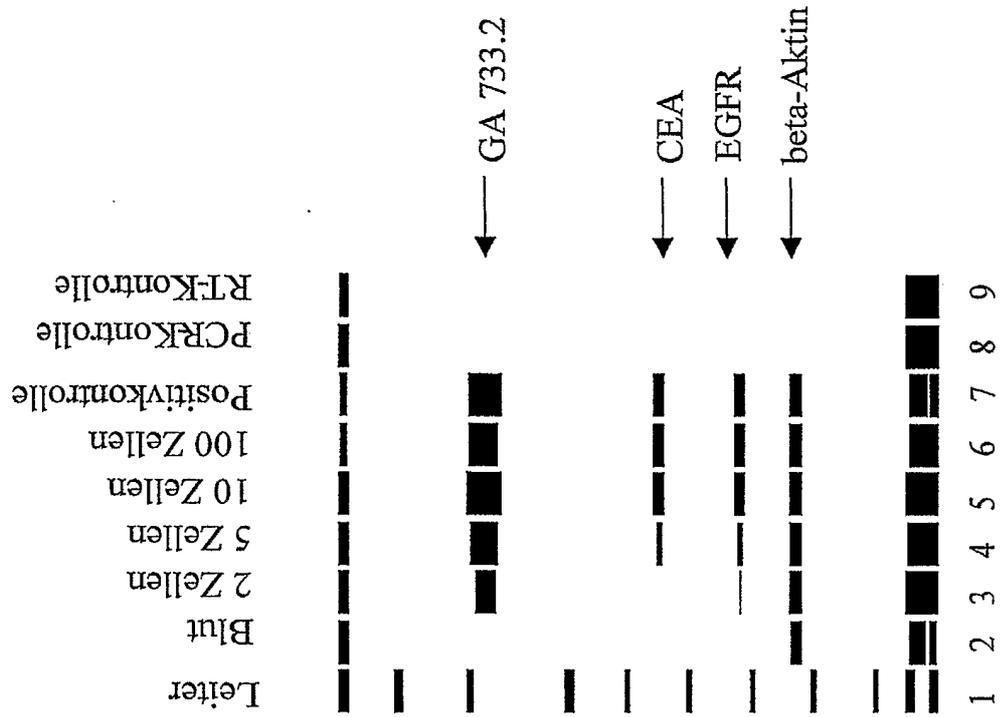


FIG. 5

Multiplex 1

9/10

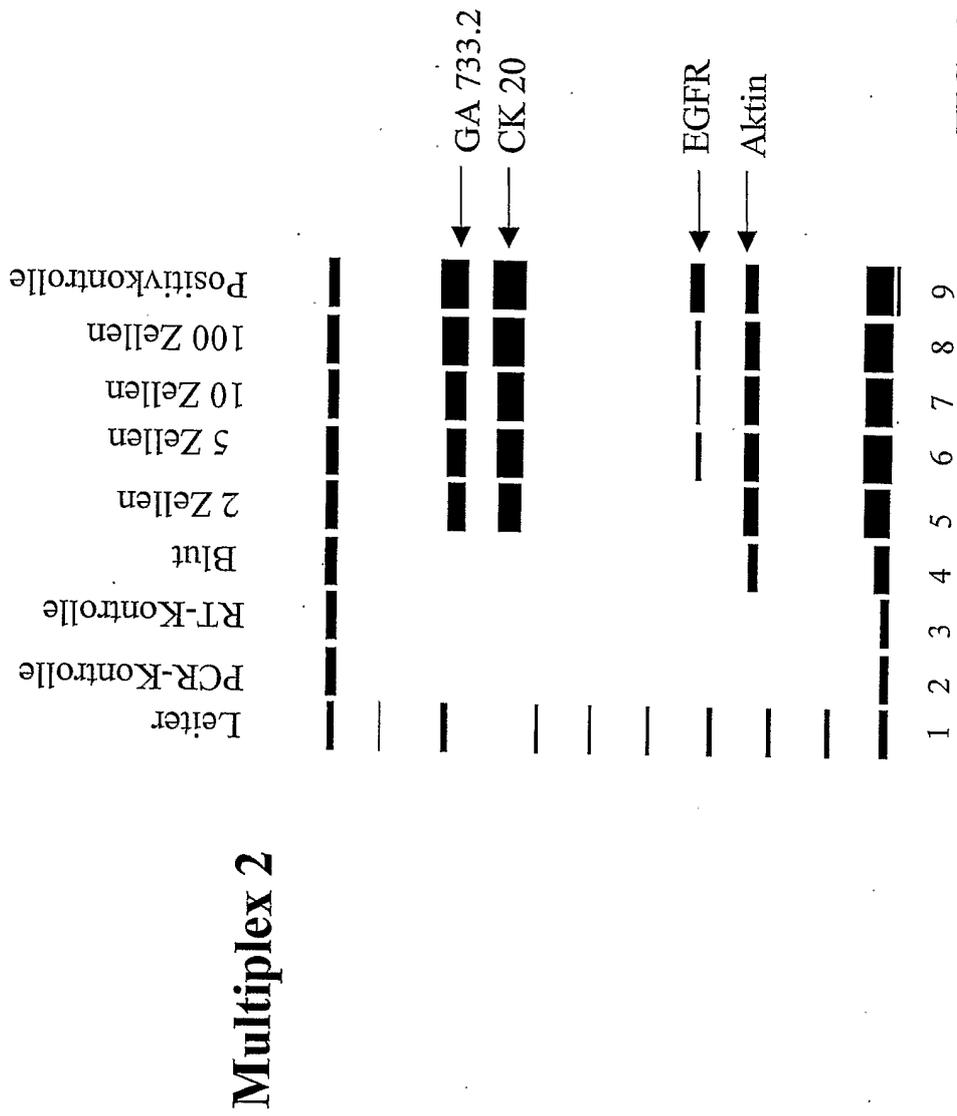
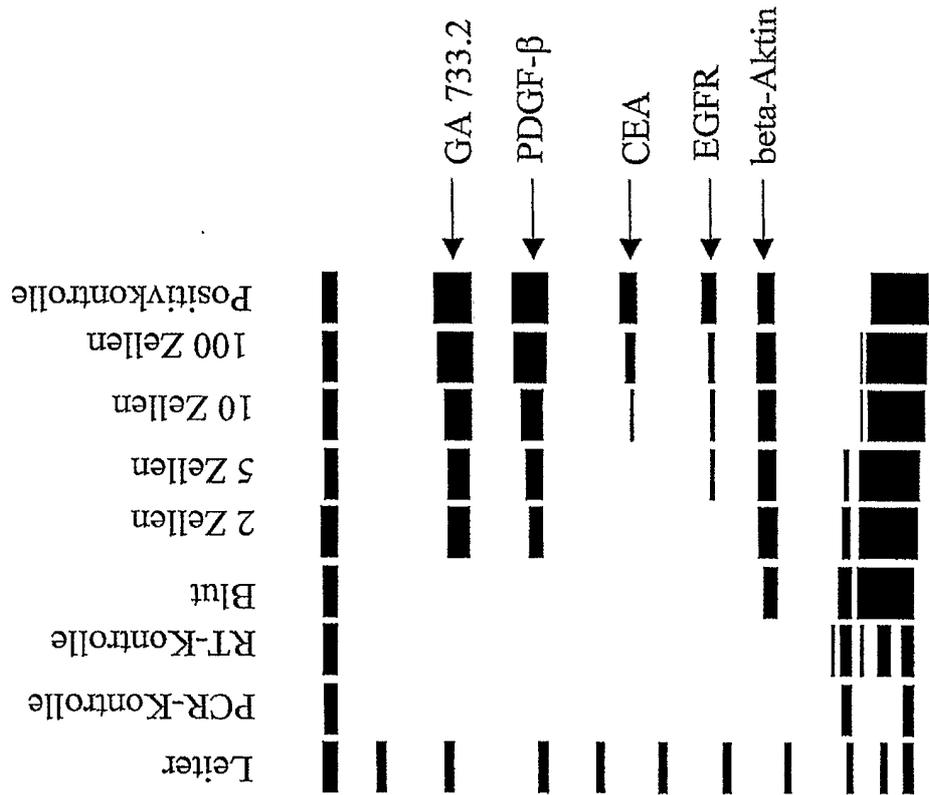


FIG. 6

10/10



Multiplex 3

1 2 3 4 5 6 7 8 9 **FIG. 7**