



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 00 248 T2 2005.01.27**

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 388 734 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 00 248.6**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 017 313.4**

(96) Europäischer Anmeldetag: **01.08.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.02.2004**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **03.03.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **27.01.2005**

(51) Int Cl.7: **G01N 33/574**  
**G01N 33/53**

(73) Patentinhaber:

**MTM Laboratories AG, 69120 Heidelberg, DE**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR**

(72) Erfinder:

**Ridder, Rüdiger, 69198 Schriesheim, DE; Rudy,  
Wolfgang, 75015 Bretten, DE; Herkert, Matthias,  
69120 Heidelberg, DE; Trunk-Gehmacher, Marcus,  
97896 Freudenberg/Main, DE; Reichert, Anja,  
69226 Nussloch, DE; von Knebel Doeberitz,  
Magnus, 69118 Heidelberg Ziegelhausen, DE**

(54) Bezeichnung: **Verfahren für Lösung-basierte Diagnose**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

### Beschreibung

**[0001]** Diese Erfindung liefert ein Verfahren für verbesserte Diagnosen von medizinisch relevanten Zuständen durch lösungsbasierende biochemische Testverfahren mit Probenlösungen. Die Erfindung liefert ein Verfahren, die morphologische Zellinformation, die in den zytologischen und/oder histologischen Daten der Probe enthalten sind, durch die aus der Lösung, worin die originale Probe aufgelöst wird, erhältliche molekulare Information zu ersetzen, und ermöglicht so eine akkurate und reproduzierbare Bemessung von medizinisch relevanten Diagnosen aufgelöster Proben. Das Verfahren gemäß der Erfindung umfasst die Schritte des Bestimmens des Level eines oder mehrerer Marker in Verbindung mit dem zu diagnostizierenden Zustand, des Bestimmens des Level eines Sets von Normalisierungsmarkern, die sich dafür eignen, die Information, bezogen auf morphologische Aspekte der Probe, welche die Diagnosen in einem zellbasierenden Testsystem ermöglicht oder unterstützt zu ersetzen, sowie die Schritte des Vergleichens und/oder Kombinierens der Daten bezüglich der Level der besagten Marker und die Diagnostizierung medizinisch relevanter Zustände.

**[0002]** Die Diagnose einer großen Anzahl von medizinisch relevanten Zuständen wird heutzutage unter Verwendung von molekularen Markern durchgeführt. Die molekularen Hilfsmittel werden im Allgemeinen für einen Aspekt in einer komplexen Untersuchung unter Berücksichtigung einer Reihe verschiedener, für die zu untersuchenden Proben charakteristischer Parameter verwendet.

**[0003]** In medizinisch relevanten Analysen wird die morphologische Untersuchung von Proben mit zytologischen oder histologischen Mitteln häufig verwendet. Solche Methoden, basierend auf morphologischer Charakterisierung von Zellproben, sind zum Beispiel für Analysen von klinischen Proben wie Körperflüssigkeiten, Blut, chirurgischen Resektionen, Sekreten, Abstrichen oder Spülungen anwendbar.

**[0004]** Beim Screening von Gebärmutterhalskrebs zum Beispiel, werden Abstriche zur Erkennung von neoplastischen Läsionen des Gebärmutterhalses verwendet. Bei dem Screeningvorgang müssen Läsionen verschiedenen Ursprungs unterschieden werden. Ursachen für Läsionen können zum Beispiel Entzündungen (aufgrund von Infektionserregern oder physikalischer bzw. chemischer Schaden) oder präneoplastische und neoplastische Veränderungen sein. Bei morphologischen Untersuchungen sind Läsionen verschiedener Charaktermerkmale schwer zu unterscheiden. So müssen Zytologen und Pathologen für die Untersuchung von Abstrichen besonders geschult sein, und sogar erfahrene Fachleute verzeichnen eine hohe inter- und intra-Untersuchungsabweichung bei einer Diagnostizierung, die auf zytologischen Proben beruht. Im Allgemeinen basieren die Ergebnisse der Untersuchung auf der subjektiven Interpretation von diagnostischen Kriterien des untersuchenden Pathologen/Zytologen. Demzufolge bleibt der Anteil von falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen bei Screeningtests unbefriedigend hoch. Deswegen werden in vielen Fällen diese zytologischen oder histologischen Untersuchungen durch den Einsatz von molekularen Markern unterstützt. Solche Marker werden oft in immuno-histochemischen Färbereaktionen verwendet oder im Verlauf von in-situ Hybridisierungsreaktionen. Nach dem Stand der Technik können Kombinationen von morphologischen Untersuchungen und immuno-histochemischen Färbereaktionen basierend auf Markermolekülen, die charakteristisch für verschiedene medizinisch relevante Zustände des Gewebes oder der Zellen sind, zu verbesserten Ergebnissen führen. Die morphologische Untersuchung bleibt mühsam und zeitaufwendig und deswegen teuer, sogar wenn sie durch die molekularen Verfahren unterstützt wird, welche die Ergebnisse zuverlässiger machen. Außerdem ist die Diagnose auf einer morphologisch zellbasierenden Ebene, auch wenn sie durch molekulare Parameter unterstützt wird, abhängig von individueller Wahrnehmung der Morphologie einzelner Untersucher. Deswegen ist die Diagnose von der Person abhängig, welche die Untersuchung durchführt.

**[0005]** Nur in sehr wenigen Fällen können molekulare Marker ohne weitere Unterstützung von morphologischen Zelluntersuchungen als Hilfsmittel zur Diagnostizierung verwendet werden.

**[0006]** Dies ist besonders der Fall, wenn Marker in einem Umfeld eingesetzt werden sollen, wo sie nur unter exakt definierten Bedingungen vorkommen. So sind die Methoden zur Diagnose von Zuständen auf ausschließlich molekularer Ebene ohne die Unterstützung von Zellinformationen auf Fälle beschränkt, wo es geeignete Marker gibt, die eindeutig spezifisch für den zu charakterisierenden Zustand sind. Zum Beispiel kann der Nachweis von Virusinfektionen in Lösungen von Proben geführt werden, da die Marker, die charakteristisch für die Präsenz der Viren im Gewebe sind, nicht in gesunden menschlichen Geweben vorkommen.

**[0007]** So kann die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch den Gebrauch von unterstützenden Molekülen verbessert werden. Jedoch kann das Problem der Konservierung und der Präparation der Proben nicht einfach durch den zusätzlichen Gebrauch von molekularen Markern überwunden werden.

**[0008]** Aber besonders wenn man molekulare Hilfsmittel in zytologischen und histologischen Untersuchungen verwendet, müssen strenge Vorsichtsmaßnahmen bei der Konservierung der Proben eingehalten werden, um Artefakte und ungenaue Ergebnisse der Tests zu verhindern. Dies ist teilweise auf die Instabilität der zellbasierenden morphologischen Information und teilweise auf die Instabilität der molekularen Marker, die in den Tests eingesetzt werden sollen, zurückzuführen. Wenn die Proben nicht sachgemäß präpariert, transportiert und gelagert werden, kann die zellbasierende Information oder sogar die molekulare Information verloren gehen oder verändert werden. Also kann die Diagnose unmöglich sein oder zu Artefakten neigen. Zum Beispiel ist die Interpretation von Biopsien oder zytologischen Präparationen häufig durch (physikalisch oder biochemisch) zerstörte Zellen schwierig oder unmöglich. Außerdem scheint in Bezug auf Gewebeproben oder Biopsien die Konservierung von molekularen Probenbestandteilen, die durch hohe Umsatzraten gekennzeichnet sind, kompliziert aufgrund des Zeitraumes, der bis zur Durchdringung der gesamten Probe durch geeignete Konservierungssubstanzen verstreicht.

**[0009]** Im Gegenzug gibt es eine Anzahl stabiler, schneller und einfacher Möglichkeiten um molekulare Proben zu konservieren, wobei die morphologische Information der Proben verloren geht. Proben können zum Beispiel in einer reproduzierbaren und leicht zu lagernden und transportierbaren Form präpariert werden, indem man die Zellkomponenten der Rohprobe in einem geeigneten Lösungsmittel sofort nach oder sogar während der Probennahme auflöst. Körperflüssigkeiten können direkt vom menschlichen Körper in eine Lösung transferiert werden, die geeignete Detergenzien und Konservierungssubstanzen enthält. Außerdem können Gewebeproben sofort denaturierenden Lösungsbedingungen unterworfen (eventuell unterstützt durch physikalische Kräfte) und so konserviert werden.

**[0010]** Wenn man geeignete Inhaltsstoffe im Lösungsmittel verwendet, können die molekularen Bestandteile der Ausgangsprobe konserviert werden und es kann kein Abbau stattfinden. Der Abbau durch enzymatische Aktivität kann zum Beispiel durch Enzyminhibitoren minimiert werden. Auf diese Weise kann eine Probenlösung einfach die molekularen Eigenschaften der Probe im Moment der Auflösung repräsentieren, ohne zusätzliche Vorsichtsmaßnahmen zur Konservierung zu erfordern.

**[0011]** Als Folge der Auflösung der Probe gehen alle morphologischen zellbasierten Informationen, die die Probe charakterisieren, verloren. Deswegen kann die Diagnose von Zuständen nicht auf diese Daten gestützt werden.

**[0012]** Die morphologisch unterstützten Diagnostikverfahren, die routinemäßig in der Technik durchgeführt werden, haben zwei große Nachteile. Erstens sind die Verfahren stark von der individuellen Wahrnehmung der Ausführenden abhängig. Zweitens ist die morphologische Information sehr anfällig für Zerfallsprozesse und so für die Generierung von Artefakten nach der Präparation der Proben. Beide Aspekte tragen zu einer nicht angemessenen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei.

**[0013]** Für eine verbesserte Diagnose von medizinisch relevanten Zuständen wären Verfahren, die nicht von morphologischer Zellinformation abhängig sind, wünschenswert.

**[0014]** Eine Methode, medizinisch relevante Zustände auf der Basis von molekularen Markern, welche die Proben kennzeichnen zu diagnostizieren, ohne von morphologischer, zellbasierter Information abhängig zu sein, wird durch die vorliegende Erfindung geliefert.

**[0015]** Die vorliegende Erfindung basiert auf den Beobachtungen der Erfinder, die in den Beispielen 1–4 aufgezeigt werden, dass die Diagnose von Zuständen, die normalerweise (in zellbasierenden diagnostischen Systemen) durch histologische und/oder zytologische Untersuchungsverfahren ermöglicht und/oder unterstützt werden, in Lösungen von Rohproben, die viele Zelltypen verschiedener Charaktermerkmale enthalten, durch ein Verfahren durchgeführt werden kann, das die Schritte der Gewinnung einer Rohprobe, des Auflöserns der Probe in einem geeigneten Lösungsmittel, der Bestimmung des Levels eines oder mehrerer Marker, die in Zusammenhang mit dem zu diagnostizierenden Zustand stehen und zusätzlich eines oder mehrerer Normalisierungsmarker innerhalb der Probenlösung, der Normalisierung der Daten, die mit den Markern, welche mit dem besagten Zustand assoziiert sind, korrelieren, im Verhältnis zu den Daten, die mit den Normalisierungsmarkern korrelieren, sowie der Diagnosestellung über das Vorliegen oder Nichtvorliegen eines Zustands in der Probe, umfasst.

**[0016]** Das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung kann zum Beispiel als primärer Screeningtest in Fällen angewandt werden, wo eine zytologische, histologische oder pathologische Untersuchung stattfindet. Unter Anwendung der vorliegenden Erfindung kann eine Unterscheidung getroffen werden, ob der zu diagnosti-

zierende Zustand in der Probe vorhanden sein kann. Wenn die lösungsbasierende Diagnose ein negatives Ergebnis bezüglich eines bestimmten Zustandes ergibt, kann auf eine weitere Untersuchung verzichtet werden. Im Falle von positiven Ergebnissen kann die Bestätigung durch klassisch angewandte Verfahren folgen. Auf diese Weise können zeitintensive mikroskopische oder andere Untersuchungen durch einen günstigen und schnellen primären Screeningtest vermieden werden.

**[0017]** Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur verbesserten Diagnose von medizinisch relevanten Zuständen, wobei die Diagnosestellung mit Lösungen aus lysierten Roh-Gewebe- oder Zellproben durchgeführt wird. Das gemäß der vorliegenden Erfindung offenbarte Diagnoseverfahren ist nicht auf morphologische Parameter gestützt, sondern ermöglicht eine Diagnose mittels einer biochemischen Analyse.

**[0018]** Ein zweiter Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren, um eine komplexe Probe in Lösung mittels molekularer Marker, die für die relevanten Parameter kennzeichnend sind, zu charakterisieren und so Information zu ersetzen, die andernfalls von zytologischen oder histologischen Untersuchungen erhältlich sein könnte.

**[0019]** Ein dritter Aspekt der vorliegenden Erfindung ist es, eine geeignete Kombinationen von Markern für die Diagnose von bestimmten Zuständen medizinischer Relevanz in komplexen Proben zur Verfügung zu stellen. Die Marker zur Normalisierung werden so ausgesucht, dass Parameter, welche in den Rohproben enthalten sind, die die Diagnose ermöglichen oder unterstützen und bei der Auflösung der Probe verloren gehen, ersetzt werden können.

**[0020]** Ein vierter Aspekt der vorliegenden Erfindung sind Test-Kits zur Durchführung diagnostischer oder wissenschaftlicher Untersuchungen gemäß der vorliegenden Erfindung.

**[0021]** Die vorliegende Erfindung ermöglicht einen schnellen und einfachen Assay für die Diagnose von Zuständen in Rohproben wie Körperflüssigkeiten, Abstrichen, Lavagen, Nadel-Aspiraten oder komplexen Zell- oder Gewebeproben. Im Allgemeinen ist die Anwesenheit einer Anzahl verschiedener Zelltypen innerhalb der Probe und zusätzlich die Anwesenheit von bestimmten Mikroorganismen und extrazellulären Substanzen ein Problem, das Rohmaterialien mit sich bringen. So enthält das Rohmaterial eine Mischung aus Zellen und Verbindungen, die falsche Ergebnisse und Artefakte unterstützt. Die Präsenz verschiedener Zelltypen mit verschiedenen proliferativen Eigenschaften, von Organismen und Substanzen innerhalb der Rohprobe führt zu vielen Faktoren, die zu dem bestimmten Level eines Markermoleküls beitragen können. Wenn man nur das Level eines einzigen Marker-Moleküls ermittelt, kann dies nur zu einer diagnostisch verwertbaren Information führen, wenn weitere (morphologische) Parameter hinsichtlich der Rohproben zur Verfügung gestellt werden. Alle morphologischen Daten, die von den Rohmaterialien erhältlich sind, gehen durch die Lyse in der Lösung verloren. Dennoch sind passende molekulare Marker entsprechend bestimmter morphologischer oder anderer, durch histologische, zytologische Methoden erhältliche Parameter verfügbar.

**[0022]** Zum Beispiel kann die Information über die einzelnen Komponenten in der Rohprobe ganz klassisch durch eine mikroskopische Untersuchung beschafft werden. Die morphologische Untersuchung gibt Hinweise über die Differenzierung, den Ursprung der Zellen, sowie über das Umfeld, in dem die Zellen vorkommen. In zytologischen Präparationen von zervikalen Abstrichen zum Beispiel können die bestimmten Zellen als Epithelzellen identifiziert und weiter z. B. als endozervikale oder ektozervikale Epithelzellen kategorisiert werden. Sogar die Anwesenheit von nicht-zervikalen Zellen wie endometrialen Zellen kann einfach durch eine mikroskopische Untersuchung bestimmt werden.

**[0023]** Gemäß der vorliegenden Erfindung können Rohmaterialien direkt in einem geeigneten Lösungsmittel aufgelöst werden ohne weitere Präparation oder Charakterisierung, unabhängig von dem homogenen oder heterogenen Charakter des Probenmaterials. Daten, die durch Lyse des Materials verloren gehen, sind innerhalb der Probenlösung enthalten, die durch die Lyse einer Serie von Markermolekülen entschlüsselt werden und so rekonstruiert werden können, indem man besagte Molekulardaten zur Normalisierung der jeweiligen morphologischen Eigenschaften verwendet. Dies kann erreicht werden, indem man ein geeignetes Set molekularer Marker für jeden der charakteristischen Parameter, die man für eindeutige Diagnosen benötigt, einsetzt. Durch Ermittlung einer geeigneten Reihe von Markern können die relevanten Parameter, die das Rohmaterial charakterisieren, festgelegt werden und so der Nachteil eines Informationsverlusts durch Lyse der Probe überwunden werden.

**[0024]** Das Testverfahren gemäß der vorliegenden Erfindung beinhaltet das Bestimmen der Level von Markern, die charakteristisch für besagte Zellzustände sind, und von Markern zur Normalisierung der Daten im Hin-

blick auf Parameter, welche das bestimmte Umfeld in der Probe kennzeichnen. Die Marker, die für die vorliegende Erfindung geeignet sind, können verschiedenen Ursprungs sein. Das Expressionsmuster eines Markers, der für die Bestimmung von besagten Zuständen geeignet ist, kann vom proliferativen Status der Zellen, vom Differenzierungsstatus, vom Zelltyp oder vom Organismus abhängig sein. Beispiele für geeignete Marker sind im Folgenden dargelegt.

**[0025]** Diagnosen von medizinisch relevanten Zuständen, wie sie hier dargelegt werden, können die Untersuchung jeglichen Zustandes umfassen, der auf zytologischer, histologischer, biochemischer oder molekularbiologischer Ebene bestimmbar und nützlich hinsichtlich der menschlichen Gesundheit und/oder des Körpers ist. Solche Untersuchungen können z. B. medizinisch diagnostische Verfahren und Forschungsstudien in Biowissenschaften umfassen. In einer Ausführungsform der Erfindung wird das Verfahren für die Diagnose von medizinisch relevanten Zuständen wie z. B. Krankheiten verwendet. Solche Krankheiten können zum Beispiel Störungen sein, die durch abnormale Proliferation von Zellen oder Geweben gekennzeichnet sind.

**[0026]** Eine Ausführungsform der Erfindung betrifft die Diagnose von Krebs und dessen Vorstufen, das Überwachen des Krankheitsverlaufs von Krebs, die Prognosenstellung bezüglich der Krebserkrankung und die Erkennung von z. B. disseminierten Tumorzellen im Verlauf von „minimal residual disease“ Diagnosen. Das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung kann zum Beispiel im Verlauf von klinischen oder pathologischen Diagnosen von Krebs und dessen Vorstufen eingesetzt werden oder in Routine-Screeningtests, die für spezielle Krebsarten wie zur Untersuchung von Abstrichen beispielsweise in Screeningtests bei zervikalen Läsionen, für bronchiale Spülungen bei Lungenkrebs oder für Stuhluntersuchungen bei Läsionen des Magen-Darmtrakts, wie z. B. kolorektale Läsionen eingesetzt werden.

**[0027]** Das Verfahren der vorliegenden Erfindung ist auf alle medizinisch relevanten Zustände anwendbar.

**[0028]** Medizinisch relevante Zustände gemäß der vorliegenden Erfindung können zum Beispiel die Zusammensetzung von Geweben, Körperflüssigkeiten, Sekreten, Spülungen oder Abstrichen sein. Solche Zustände können beispielsweise die zelluläre Zusammensetzung von Körperflüssigkeiten, wie die Zusammensetzung von Blut, Liquor und Sperma umfassen. In diesem Zusammenhang soll sich Zusammensetzungen beispielsweise auf die An- oder Abwesenheit bestimmter Zelltypen (z. B. Pathogene wie Viren etc., preneoplastische, neoplastische und/oder dysplastische Zellen etc.), die An- oder Abwesenheit von Differenzierungsmustern bestimmter Zelltypen, die Gesamtanzahl von bestimmten Zelltypen (z. B. Erythrozyten, Leukozyten, Spermien etc.), die Gesamtanzahl aller Zellen eines beliebigen Zelltyps oder die Zellfraktion bestimmter anderer Eigenschaften, die in der Probe vorhanden oder nicht vorhanden sind, beziehen.

**[0029]** Außerdem können medizinisch relevante Zustände auch Krankheiten von Zellen oder Geweben sein. Die zu diagnostizierenden Zustände können Parameter im Bezug auf Zellen in zytologischen oder histologischen Gewebeproben beinhalten. Die Zustände können ein Differenzierungsmuster von Zellen in einer Gewebeprobe, wie chirurgische Resektionsproben, Biopsien, Abstrichen, Spülungen, etc. umfassen. Solche Zustände können auch angeborene Störungen, Entzündungen, mechanische Störungen, traumatische Störungen, Gefäßstörungen, degenerative Störungen, Wachstumsstörungen, gutartige oder bösartige Neoplasien beinhalten.

**[0030]** Ein weiterer Aspekt der Zustände gemäß der vorliegenden Erfindung können Zustände sein, die durch die An- oder Abwesenheit von proliferativen Eigenschaften gekennzeichnet sind. Zustände, die durch die An- oder Abwesenheit proliferativer Eigenschaften gekennzeichnet sind, können beispielsweise proliferative Störungen sein.

**[0031]** Zellproliferative Störungen gemäß der vorliegenden Erfindung beinhalten Krankheiten, die durch krankhaftes Zell- oder Gewebewachstum verglichen mit dem Wachstum von normal gesteuerten Zellen oder Gewebe gekennzeichnet sind. Das Wachstum der Zellen oder des Gewebes kann zum Beispiel krankhaft beschleunigt oder verlangsamt, oder krankhaft reguliert sein. Krankhafte Regulierung in diesem Sinn kann jegliche Form von An- oder Abwesenheit abnormaler Reaktionen der Zellen oder des Gewebes auf natürlich vorkommende, wachstumsregulierende Einflüsse umfassen. Die Wachstumsanomalien der Zellen oder des Gewebes können beispielsweise neoplastisch oder hyperplastisch sein.

**[0032]** In einer Ausführungsform sind die proliferativen Störungen Tumore. Tumore können Tumore des Kopfes oder des Halses, Tumore des Respirationstraktes, Tumore des Magen-Darmtrakts, Tumore des Harnapparats, Tumore des Fortpflanzungsapparats, Tumore des endokrinen Systems, Tumore des zentralen und peripheren Nervensystem, Tumore der Haut und deren Anhangsgebilde, Tumore der Weichteile und der Kno-

chen, Tumore des lymphopoietischen und haematopoietischen Systems etc. sein. Tumore können zum Beispiel Neoplasmen wie gutartige und bösartige Tumore, Karzinome, Sarkome, Leukämien, Lymphome oder Dysplasien umfassen. In einer spezifischen Ausführungsform ist der Tumor beispielsweise Krebs des Kopfes oder des Halses, Krebs des Respirationstraktes, Krebs des Magen-Darmtrakts, Krebs der Haut und deren Anhangsgebilde, Krebs des zentralen und peripheren Nervensystems, Krebs des Harnapparats, Krebs des Fortpflanzungssystems, Krebs des endokrinen Systems, Krebs der Weichteile und Knochen, oder Krebs des lymphopoietischen und haematopoietischen Systems. Eine Ausführungsform des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung betrifft die Erkennung von disseminierten Tumorzellen oder Metastasen.

**[0033]** In einer Ausführungsform der Erfindung ist das Karzinom zum Beispiel Gebärmutterhalskrebs, Darmkrebs, Magenkrebs, Brustkrebs, Blasenkrebs, Lungenkrebs etc.

**[0034]** Eine Rohprobe gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung umfasst jegliche Probe, die Zellen oder Zelltrümmer enthält. Die Zellen können beispielsweise prokaryotische oder eukaryotische Zellen sein. Des weiteren können Proben klinische Proben, wie z. B. Sekrete, Abstriche, Spülungen, Körperflüssigkeiten, Blut, Urin, Sperma, Stuhl, Galle, Liquor, Knochenmark, Biopsien, Zell- und Gewebeproben umfassen. Biopsien im Sinne der vorliegenden Erfindung können zum Beispiel Resektionsproben von Tumoren, endoskopisch präparierte Gewebeproben, oder Nadelbiopsien von Organen umfassen. Überdies kann jede Probe, die potentiell die zu bestimmenden Markermoleküle enthält, eine Probe im Sinne der vorliegenden Erfindung sein. In einer Ausführungsform der Erfindung umfasst die Probe zervikale Abstrichen, bronchiale Spülungen, Stuhl etc. Rohproben im Sinne der vorliegenden Erfindung können fixierte oder konservierte Zell- oder Gewebeproben beinhalten. Zum Beispiel können Zellen, die in geeigneten Lösungen konserviert wurden (Alkohole etc.), oder fixierte Gewebeproben als Rohproben in den Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

**[0035]** Gemäß der vorliegenden Erfindung werden die Rohproben in einem geeigneten Lösungsmittel aufgelöst. Solche Lösungsmittel können zum Beispiel wässrige Lösungen von chaotropen Agenzien wie z. B. Harnstoff, GuaSCN, Formamid, von Detergenzien wie anionischen Detergenzien (z. B. SDS, N-Lauryl-Sarcosine, Natriumdeoxycholate, Alkyl-Aryl-Sulfonate, langkettige (Fettsäure-) Alkoholsulfate, Olefinsulfate und -sulfonate, Alfa-Olefinsulfate und -sulfonate, sulfathaltige Monoglyceride, sulfathaltige Äther, Sulphosuccinate, Alkan-sulfonate, Phosphat-Ether, Alkylisothionate, Saccharoseester), kationische Detergenzien (z. B. Zetyltrimethylammoniumchloride), nicht-ionische Detergenzien (z. B. Tween 20, Nonidet P-40, Triton X-100, NP-40, Igepal CA-630, N-Octyl-Glucosid) oder amphotere Detergenzien (z. B. CHAPS, 3-Dodecyl-Dimethylammonio-Propan-1-Sulfonate, Lauryldimethylaminoxide) und/oder von Alkalihydroxiden wie NaOH oder KOH sein. Das Lösungsmittel ist so bestimmt, dass Zellen, Zelltrümmer, Nukleinsäuren, Polypeptide, Lipide und andere Biomoleküle, die potentiell in der Rohprobe vorhanden sind, gelöst werden. Die Lösung, in der die Rohprobe gemäß der vorliegenden Erfindung aufgelöst wird, kann zudem ein oder mehrere Agenzien, welche den Abbau der Bestandteile in der Rohprobe verhindern, enthalten. Solche Bestandteile können beispielsweise Enzyminhibitoren wie Proteinaseinhibitoren, RNase-Inhibitoren, DNase-Inhibitoren etc. umfassen. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Probe direkt in der Form aufgelöst, wie sie von den einzelnen Test-Individuen gewonnen werden kann. In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann die Probe weiter aufbereitet werden, bevor sie aufgelöst wird. Solche Aufbereitungsvorgänge können zum Beispiel das Wegspülen von Fremdkörpern wie Schleim oder Ähnlichem, die Auftrennung oder Konzentration von Zellbestandteilen, der Zellerhalt und Zelltransport umfassen. Auf diese Weise sind die Zellbestandteile der Rohproben in einer einzigen Probenlösung enthalten.

**[0036]** Die Präparation der Probe zur Anwendung in einem Verfahren, wie es hier offenbart wird, kann auch mehrere Schritte weiterer Präparationen der Probe umfassen, wie die Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen, Isolierung von Polypeptiden oder Nukleinsäuren, die Präparation von Festphasenfixierten Peptiden oder Nukleinsäuren oder die Präparation von Beads, Membranen oder Objektträgern, an die die zu bestimmenden Moleküle kovalent oder nicht-kovalent gekoppelt sind.

**[0037]** Gemäß der vorliegenden Erfindung kann der Nachweis der Markermoleküle direkt aus dieser Lösung erfolgen. Der Nachweis kann in Lösung oder unter Verwendung von Reagenzien, die Festphasen-fixiert sind, erfolgen. Der Nachweis eines oder mehrerer molekularer Marker kann in einem einzigen Reaktionsgemisch oder in zwei oder mehreren separaten Reaktionsgemischen erfolgen. Die Nachweisreaktionen für mehrere Markermoleküle können zum Beispiel gleichzeitig in Mikrotiter-Reaktionsgefäßen durchgeführt werden. Die Marker, die die proliferativen Störungen charakterisieren, können unter Einsatz von Reagenzien nachgewiesen werden, welche diese Moleküle spezifisch erkennen. Gleichzeitig können die Normalisierungsmarker unter Verwendung von Reagenzien nachgewiesen werden, welche diese spezifisch erkennen. Die Nachweisreaktion für jede Markerklasse kann eine oder mehrere Reaktionen mit Nachweisagenzien umfassen, die entweder

die ursprünglichen Markermoleküle erkennen, oder vorzugsweise die vorherigen Moleküle (z. B. Primär-Antikörper), die eingesetzt wurden, um die ursprünglichen Marker zu erkennen. Die Nachweisreaktion kann weiterhin eine Reporterreaktion umfassen, welche den Level der Marker anzeigt, die charakteristisch für proliferative Störungen oder für die Normalisierungsmarker sind.

**[0038]** Eine Sonde für den Nachweis der Markermoleküle im Sinne der vorliegenden Erfindung soll jegliches Molekül sein, das spezifisch an besagtes Markermolekül bindet. Die Probe kann zum Beispiel ein Antigen-Bindeagens wie Antikörper (monoklonal oder polyklonal), Antikörperfragmente oder künstliche Moleküle, die Antigen-bindende Epitope enthalten, sowie DNA- oder RNA-Bindemoleküle wie Proteine oder Nukleinsäuren sein. Nukleinsäuren, die andere Nukleinsäuren binden, können zum Beispiel Oligonukleotide für Nachweiszwecke oder Primer sein.

**[0039]** Der Ausdruck „ein Molekül erkennt ein anderes Molekül“ soll bedeuten, dass das erste Molekül spezifisch mit dem anderen Molekül interagiert. Spezifische Interaktion kann zum Beispiel spezifische Bindung des anderen Moleküls oder an das andere Molekül sein.

**[0040]** Die Reporterreaktion kann zum Beispiel eine Reaktion sein, die eine farbige Verbindung produziert. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung entwickeln die den einzelnen Markern zugeordneten Reportersubstanzen verschiedene Farben. In einer weiteren Ausführungsform kann der dem Normalisierungsmarker zugeordnete Reporter ein Molekül sein, welches das Signal des dem Marker, der charakteristisch für den medizinisch relevanten Zustand ist, zugeordneten Reportermoleküls in Abhängigkeit vom Level des Normalisierungsmarkers in der Probe abfängt. In noch einer weiteren Ausführungsform können die Reporterreaktionen Fluoreszenz-Farbstoffe mit unterschiedlichen Wellenlängeneigenschaften produzieren. In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann die Reporterreaktion lichtabgebende Reaktionen mit verschiedenen Wellenlängeneigenschaften für die den jeweiligen zu bestimmenden Markern zugeordneten Reportersubstanzen umfassen. In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann die Reporterreaktion die Emission radioaktiver Strahlung und zusätzliche Verfahren zur Sichtbarmachung und Messung der Strahlung umfassen. In einer Ausführungsform können die verschiedenen Markermoleküle durch Agenzien erkannt werden, die Radionuklide unterschiedlicher Strahlungsenergie tragen, sodass die Signale in Bezug auf die Markermoleküle unterschieden werden könnten.

**[0041]** Geeignete Formate für die Nachweisreaktion im Sinne der vorliegenden Erfindung können Blot-Techniken, wie Western-Blot, Southern-Blot oder Northern-Blot sein. Die Blot-Techniken sind in der Technik dem Durchschnittsfachmann bekannt und können zum Beispiel als Elektro-Blot, Semdry-Blot, Vakuum-Blot oder Dot-Blot durchgeführt werden. Des Weiteren können immunologische Verfahren zur Bestimmung von Molekülen eingesetzt werden, wie zum Beispiel Immunpräzipitation oder immunologische Assays wie ELISA, RIA, Lateralflow-Assays oder Immunchromatografische Strips, etc.

**[0042]** Das Verfahren zur Bestimmung des Levels von Markermolekülen ist in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ein Verfahren, welches sich beispielsweise eignet, um auch sehr kleine Mengen von spezifischen Molekülen in biologischen Proben nachzuweisen. Darüber hinaus kann jedes Verfahren zum Nachweis von Markermolekülen ungeachtet der Empfindlichkeit angewandt werden. Die Nachweisreaktion gemäß der vorliegenden Erfindung kann beispielsweise Nachweisreaktionen auf der Ebene von Nukleinsäuren und/oder Nachweisreaktionen auf der Ebene von Polypeptiden umfassen. In einer Ausführungsform der Erfindung kann der Nachweis von Markermolekülen den Nachweis von bestimmten Splicevarianten beinhalten. In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann das Nachweisverfahren den Nachweis von Modifikationen der Markermoleküle, wie die Phosphorylierung oder die Glycosylierung etc. von Polypeptiden oder die Methylierung von Nukleinsäuremoleküle in Proben umfassen.

**[0043]** In einer Ausführungsform der Erfindung wird die Bestimmung des Levels von Markermolekülen durch die Bestimmung des Levels von Nukleinsäuren, die die Markermoleküle oder Fragmente, welche in der Probe vorhanden sind, codieren, durchgeführt.

**[0044]** Die Mittel zum Nachweis von Nukleinsäuremolekülen sind dem Fachmann bekannt. Das Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren kann beispielsweise durch eine Bindereaktion des nachzuweisenden Moleküls an komplementäre Nukleinsäuresonden, Proteine mit Bindeeigenschaft für die Nukleinsäuren oder an jegliche andere Gebilde, die spezifisch besagte Nukleinsäure erkennen oder binden, durchgeführt werden. Dieses Verfahren kann sowohl in vitro als auch direkt in-situ zum Beispiel im Verlauf einer nachweisenden Färbereaktion durchgeführt werden. Eine andere Möglichkeit zum Nachweis der Markermoleküle in einer Probe auf der Ebene von Nukleinsäuren, die im Verfahren der vorliegenden Erfindung durchgeführt wird, ist eine Nukleinsäu-

re-Amplifikations-Reaktion, die quantitativ ausgeführt werden kann, wie zum Beispiel die Polymerase-Kettenreaktion. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zum Beispiel kann RealTime-RT PCR eingesetzt werden, um den Level von Marker-RNA in Proben von proliferativen Störungen zu messen.

**[0045]** In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Bestimmung des Levels von Markermolekülen durch die Bestimmung des Expressionslevels eines Proteins durchgeführt. Die Bestimmung der Markermoleküle auf der Proteinebene kann z. B. in einer Reaktion durchgeführt werden, die ein Bindeagens beinhaltet, das für den Nachweis der Markermoleküle spezifisch ist. Diese Bindeagenzien können beispielsweise aus Antikörper- und Antigen-Bindeteilen, bifunktionalen Hybridantikörpern und Peptidomimetics, die minimale antigenbindende Epitope enthalten etc., bestehen. Die Bindeagenzien können in vielen verschiedenen Nachweistechniken eingesetzt werden, zum Beispiel bei Western-Blots, ELISA, Lateralflow-Assays, Latexagglutinations-Assays, immunochromatografischen Strips oder bei Immunopräzipitationen. Im Allgemeinen können Bestimmungen, die auf Bindeagenzien basieren, sowohl in-vitro als auch direkt in-situ zum Beispiel im Verlauf einer immunozytochemischen Färbereaktion durchgeführt werden. Jedes andere Verfahren, das sich zum Nachweis der Menge von bestimmten Polypeptiden in Lösungen von biologischen Proben eignet, kann gemäß der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden.

**[0046]** Verfahren zum Nachweis der veränderten Zustände von Nukleinsäuremolekülen und/oder Polypeptiden sind dem Durchschnittsfachmann bekannt.

**[0047]** Verfahren zum Nachweis von Methylierung von Nukleinsäuren sind dem Fachmann bekannt und können beispielsweise Verfahren umfassen, bei denen eine chemische Vorbehandlung von Nukleinsäuren mit z. B. Natriumbisulfit, Permanganat oder Hydrazin, angewandt wird, sowie den darauffolgenden Nachweis der Veränderung mittels spezifischer Restriktionsendonukleasen oder mittels spezifischer Sonden, beispielsweise im Verlauf einer Amplifikations-Reaktion. Der Nachweis von Methylierung kann außerdem unter Verwendung von methylierungsspezifischen Restriktionsendonukleasen durchgeführt werden. Verfahren zum Nachweis von Methylierungszuständen in Nukleinsäuren sind zum Beispiel in den Patentanmeldungen EP02010272.9, US5856094, WO0031294, US6331393 etc. offen gelegt. Die genannten Dokumente sollen hier im Wege der Verweisung enthalten sein.

**[0048]** Der Nachweis von Modifikationen von Polypeptiden kann zum Beispiel Bindeagenzien beinhalten, die speziell veränderte oder unveränderte Zustände von Polypeptiden erkennen. Alternativ dazu können Enzyme wie Phosphatasen oder Glykosylasen eingesetzt werden, um Veränderungen in Molekülen zu entfernen. Das Vorliegen oder Nichtvorliegen von Modifikationen kann so durch die Bestimmung der Masse und Menge der Moleküle mittels Elektrophorese, Chromatographie, Massenspektrometrie etc. vor und nach der Inkubation mit einem entsprechenden Enzym nachgewiesen werden.

**[0049]** In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der Nachweis einer Serie von Markermolekülen auf der Ebene von Polypeptiden durchgeführt und gleichzeitig wird der Nachweis einer weiteren Serie von Markermolekülen und/oder von allen oder manchen der gleichen Markermoleküle auf der Ebene von Nukleinsäuren durchgeführt.

**[0050]** Marker, die mit medizinisch relevanten Zellzuständen in Verbindung stehen, können z. B. Moleküle sein, die die Proliferation und/oder Differenzierungseigenschaften von Zellen und/oder Geweben beeinflussen und/oder widerspiegeln. Solche Moleküle können zum Beispiel Zellzyklusregulatorproteine, DNA-Replikations-assoziierte Proteine, Transmembranproteine, Rezeptorproteine, signalumwandelnde Proteine, Kalzium-bindende Proteine, Proteine, die DNA-bindende Domänen enthalten, Metalloproteinasen, Kinasen, Kinaseinhibitoren, Chaperone, Embryogeneseproteine, Hitzeschock-Proteine oder Enzyme, die andere Proteine posttranslational verändern und so ihre Aktivität regulieren, oder Nukleinsäuren, die die besagten Proteine kodieren, umfassen. Auch mRNAs, die für die genannten Proteine kodieren, können Markermoleküle sein, die für die vorliegende Erfindung eingesetzt werden können. In einer Ausführungsform kann der Marker im Zusammenhang mit der proliferativen Störung zum Beispiel nur in Zellen, die von der Funktionsstörung betroffen sind, exprimiert werden, kann in besagten Zellen nicht exprimiert werden oder in besagten Zellen überexprimiert werden.

**[0051]** Markermoleküle zum Einsatz gemäß der vorliegenden Erfindung können einen oder mehrere Marker umfassen, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus p13.5, p14, p15, p16, p19, p21, p27, p53, pRb, p14ARF, Zyklin A, Zyklin B, Zyklin E, MDM-2, MCM2, MCM5, MCM6, CDC2, CDC6, Id1, Osteopontin, GRP, renale Dipeptidase, her2/neu, TGFβII-Rezeptor, HPV verbundene Marker z. B., die aus den HPV Genen L1, L2, E1, E2, E4, E5, E6 oder E7 abgeleitet sind. Eine Auswahl von Markern, die in einer Ausführungsform der



vorliegenden Erfindung für die Erkennung von medizinisch relevanten Zuständen brauchbar sind, ist nachfolgend in Tabelle 1 aufgeführt.

**[0052]** In einer Ausführungsform kann der Marker für einen medizinisch relevanten Zustand ein Marker für Tumoren (Tumormarker) sein. Die Markermoleküle, die charakteristisch für Tumore sind, können beispielsweise Proteine sein, die in Tumoren im Vergleich zu normal gesteuertem Gewebe auf Nicht-Wildtyp Weise exprimiert werden. Nicht-Wildtyp Expression, im vorliegenden Sinn, kann gesteigerte oder gesenkte Level der Expression oder Wegfall der Expression oder die Expression von Nicht-Wildtyp Arten des entsprechenden Moleküls umfassen. Expression von Nicht-Wildtyp Arten eines Proteins kann die Expression von mutierten Proteinarten, die durch Insertion, Deletion, Substitution oder Frameshift-Mutationen oder alle anderen bekannten Arten von Mutationen umfassen, die in Proteinen oder Nukleinsäuren auftreten. In allen Fällen der Expression von Nicht-Wildtyp Proteinen oder Nicht-Wildtyp Proteinlevels können die Proteine, Polypeptide oder deren Fragmente, oder Nukleinsäuren, die diese Proteine oder Polypeptide kodieren oder Fragmente dieser Nukleinsäuren, als molekulare Marker in Verbindung mit Tumoren eingesetzt werden und können so unter der Bezeichnung „Tumormarker“ im Sinne der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Proteine, die Nicht-Wildtyp Expression in Verbindung mit Tumoren aufweisen, sind beispielsweise in den Dokumenten WO 9904265A2, WO 0149716A2, WO 0055633A2 und WO 0142792A2 offen gelegt und sollen hier im Wege der Verweisung als Bestandteil der Anmeldung gelten.

**[0053]** In einer Ausführungsform der Erfindung kann der Marker, der kennzeichnend für den medizinisch relevanten Zustand ist, ein Zellzyklusregulatorprotein wie zum Beispiel eine zyklinabhängige Kinase oder ein zyklinabhängiger Kinaseinhibitor sein. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann der Marker, der charakteristisch für den medizinisch relevanten Zustand ist, ein Marker in Verbindung mit einer transienten oder persistenten Virusinfektion sein. Die Virusinfektion kann eine Infektion ausgelöst durch ein menschliches Papillomavirus (HPV) wie high risk HPV oder low risk HPV sein. Das HPV mit hohem Risiko kann HPV-Subtypen wie beispielsweise HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 und 58 umfassen. Die Marker für eine HPV-Infektion können beispielsweise HPV-Expressionsprodukte von HPV-Genen L1, L2, E2, E4, E5, E6 oder E7 beinhalten. In einer dritten Ausführungsform der Erfindung kann ein Marker, der kennzeichnend für eine Virusinfektion ist, in Kombination mit jedem anderen Marker für einen medizinisch relevanten Zustand wie z. B. in Kombination mit einem Zellzyklusregulatorprotein, eingesetzt werden. Kombinationen von Markermolekülen, welche besonders interessant im Hinblick auf das HPV sind, sind z. B. in WO0208764 offen gelegt, die hier als Verweis gelten sollen.

**[0054]** In einer Ausführungsform können Zellzyklusregulatorproteine zum Einsatz in Kombination mit HPV-Markern beispielsweise aus einer Gruppe umfassend pRb, p53, p14 ARF und zyklinabhängigen Kinaseinhibitoren ausgewählt werden. In einer besonderen Ausführungsform kann zum Beispiel p16<sup>INK4a</sup> in Kombination mit Markern für HPV-Infektionen (z. B. L1, L2, E2, E4, E5, E6 oder E7) verwendet werden.

**[0055]** Normalisierungsmarker gemäß der vorliegenden Erfindung können zum Beispiel housekeeping Gene wie Aktin, GAPDH, Histonproteine, Phospholipasen,  $\beta$ 2-Microglobulin, Proteine in Verbindung mit aktiver Zellproliferation wie z. B. Ki67, PCNA oder Statin, oder Proteine, die charakteristisch für bestimmte Zelltypen wie zum Beispiel CK20 in Epithelzellen oder jegliche zellspezifischen Oberflächenantigene umfassen. Darüber hinaus können auch Kohlenhydratstrukturen, die in Glykoproteinen und Proteoglykanen vorkommen, Lektinrezeptoren wie Concanavalin A-Rezeptor, Mucine und Enzyme, die in der Biosynthese dieser Moleküle involviert sind wie z. B. in GalNac-Transferasen und Oligosaccharyltransferasen, als Normalisierungsmarker dienen. Die Art des Markerproteins muss in Abhängigkeit von der Information ausgesucht werden, die der Marker liefern soll. Prinzipiell können die Marker, die für bestimmte medizinisch relevante Zustände verwertbar sind, unter bestimmten Umständen als Normalisierungsmarker eingesetzt werden. Eine Auswahl von Markern, die für die Durchführung der Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung brauchbar sind, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**[0056]** Sowohl was Marker für medizinisch relevante Zustände als auch Normalisierungsmarker betrifft, können veränderte Molekülzustände (wie Polypeptide und Nukleinsäuren) als Marker im Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden. Zum Beispiel phosphorylierte, glykosylierte oder anderweitig veränderte Polypeptide oder methylierte Nukleinsäuren können als Marker im Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung behandelt werden.

**[0057]** Normalisierung, wie sie gemäß der vorliegenden Erfindung eingesetzt wird, soll jedes Verfahren beinhalten, das sich dazu eignet, die festgestellten Levels der Marken mit den Parametern, die für die Diagnosestellung nützlich sind, in Verbindung zu bringen.

**[0058]** Ein Aspekt dieser Normalisierung kann eine Rekonstruktion der relevanten zytologischen und histologischen Informationen sein, die in der Rohprobe enthalten sind mittels geeigneter Molekularmarker, die in den Probenlösungen nachweisbar sind. Normalisierung kann beispielsweise den Nachweis der Gesamtanzahl der Zellen, die in der Probe vorhanden sind, der An- oder Abwesenheit eines bestimmten Zelltyps in einer Probe, der An- oder Abwesenheit eines Organismus oder von Zellen eines Organismus in einer Probe, der Anzahl der Zellen eines bestimmten Zelltyps oder eines Organismus, die in der Probe vorhanden sind, der proliferativen Eigenschaften der Zellen, die in der Probe vorhanden sind oder des Differenzierungsmusters der Zelle, das in der Probe vorhanden ist, umfassen.

Tabelle 1:

Marker für	Zelltyp	Antigen	Antikörper	Anbieter	Literatur
Zelltyp	Epithelzellen	menschliches epitheliales Oberflächenglykoprotein	HEA125 IgG1 (W, IHC, ICC, IF)	Research Diagnostics Inc.	Kommos et al. 2000
		Menschliches Epithelproliferation 40 kD Protein (von LoVo)	AUA-1 IgG1 (Elisa)	Research Diagnostics Inc.	Gottschalk et al 1992
		Menschliches Epithelantigen (34+39 kD)	Ber-EP4, IgG1 (IHC, Elisa)	Dako	Latzka U et al., 1990 43, 213-9
		Menschliches epithelproliferatives Antigen(40 kD)	AUA-1 (Elisa, W, IHC)	Research Diagnostics Inc.	Epenetos, A et al., 1982, 2, 1004-6
	Endozervix/ Zylinder- epithelzellen	Zytokeratin 18 (45 kD)	RGE 53, IgG1 (W, IHC, IF)	Research Diagnostics Inc.	Smedts F et al., 1990, 136, 657-68
		Zytokeratin 18 (45 kD)	RCK 106 (W, IHC, IHC)	Research Diagnostics Inc.	Smedts F et al., 1990, 136, 657-68
		Zytokeratin 8 (52.5 kD)	CAM 5.2 (W, IHC)	BD PharMingen	Smedts F et al., 1990, 136, 657-68
	Endozervikale Zylinder- epithelzellen	Mucinantigene (Tn, STn, MUC1, MUC2)	DF3	Centocor	Tashiro et al., 1994
	Endozervikale Zylinder- epithelzellen	Concanavalin A Rezeptor			Herckenrode et al., 1988, Koch et al., 1986
	Endozervix	GalNacTransferase Oligosaccharyltransferase			Chilton et l., 1988
	Endozervix/Ectozervix	Lektine (ConA, WGA, PNA, UEA I, DBA, SBA, SNA)			Di Loretto et al., 1987 Versura et al., 1988
	Ectozervix/ platteneitheliale Zellen	Plakophilin (80.5 kD)	PP1-5C2, IgG1 (W, Elisa, IHC, IF)	Research Diagnostics Inc.	Heid, HW, 1994, 58, 113-31
	Endometriale Zellen	Vimentin	VIM 3B4, IgG1, (W, ELISA, IF, IHC)	Research Diagnostics Inc.	Smedts F et al., 1990, 136, 657-68
Erythrozyten	Haemoglobin	RDI-CBL63, IgM (RIA,EIA)	Research Diagnostics Inc.	Smith et al., J. Histochem. Cytochem. 1998	
Entzündung	Neutrophile Granulozyten NK-Zellen Makrophagen	CD16(NK, Macro, Gran)	DJ130-c, IgG1 (IHC)	DIANOVA	Grundhoefer D und Patterson BK, Cytometry 2001;46:340-344
		CD56(NK)	Klon Ki-M6		Hermann et al., J. Clin. Immunol. 1990
		CD68(Macro)	(antiCD68)		Cavayal et al., Eur. J. Immunol: 1998(6):1991-2002 (CD56)
	B-Zellen	CD19 (CD20)	Klon AE 1, FACS	DIANOVA	Harrada et al., Blood 1993;81:2658-63 (CD19) Mason et al., Am J. Pathol1990;136:1215-22(CD20)
T-Zellen	CD3 (panTcell) (CD4); (CD8)	Klon CRIS-7 (antiCD3); IF, IHC,WB	DIANOVA	Jones et al., J Immunol 1993; 150:5429-35	
Tumorzelle	dysplastische und neoplastische Zervikalzellen	p16 <sup>INK4a</sup>	E6H4, D7D7	MTM	Klaes R., et al. 2001
	Verschiedene Krebszelltypen	P53 (Mutationen)			Mendoza-Rodriguez CA, et al., Rev Invest Clin 2001 May-Jun;53(3):266-73
	adeno-Karzinomzellen	CEA			Mistretta et al., Experientia,1974 Rogers et al., Eur. J. Cancre Clin. Oncol. 1984
	Blasenkrebszellen	NMP22, BTA			van der Poel HG et al., Curr Opin Urol,11:503-509, 2001
	Lungenkrebszellen	PreproGRP			Hamid et al., Cancer, 63, 266-271, 1989, Pagani et al., Int. J. Cancer 47, 371- 375, 1991
Proliferation	alle proliferierenden Zellen	PCNA Ki67	Pc10, IgG2a	Zymed	Waseem NH, Lane DP, J Cell Sci 1990;96:121 (PCNA) Cattoretti et al., J Pathol 1992: 168:357-63(Ki67)
Infektionsagens	HPV 16	E6	BF 7, IgG1 (IHC und in diagnostischen Kits für zervikale Abstriche)	Research Diagnostics Inc.	Ifner et al., J. Virol., 1988
		L1	CamVir-1, IgG2a (IP, W, IF, IHC)	Research Diagnostics Inc.	Browne L et al., 1988, 69, 1263-9
	HPV 18	L1	RDI-HPV18-5A3, IgG1 (W, IHC)	Research Diagnostics Inc.	Ifner et al., J. Virol., 1988
	HPV 6,11,18		RDI-HPVX-4C4	Research Diagnostics Inc.	Ifner et al., J. Virol., 1988 Gouillou et al., Am. J. Surg. Pathol., 1991

**[0059]** Gemäß der vorliegenden Erfindung kann die Normalisierung die Bestimmung der Anwesenheit einer Anzahl von (menschlichen) Zellen in einer Probe beinhalten. Dies ist ein äußerst wichtiger Aspekt der Erfindung. In bestimmten Ausführungsformen können falsche (besonders falsch negative) Testergebnisse nur dann vermieden werden, wenn das Testverfahren bestätigt, dass die Probe die Materialien (z. B. Zellen, Gewebe, Organismen etc.) enthält, die für die Durchführung des bestimmten Tests notwendig sind. In verschiedenen Tests wird dies die Sicherstellung, dass die Probe Zellen enthält umfassen. In einer großen Anzahl von Ausführungsformen der Erfindung wird der Nachweis der Adäquatheit der Probe nicht nur die Sicherstellung der Anwesenheit von Zellen, sondern auch den Nachweis der Anwesenheit von Zellen bestimmten Ursprungs oder eines bestimmten Zelltyps beinhalten.

**[0060]** Auf diese Weise kann die Normalisierung auch den Nachweis von Zellen eines bestimmten Ursprungs wie z. B. Zellen eines bestimmten Organs oder einer bestimmten histologischen Lokalisierung umfassen, wie beispielsweise den Nachweis von Zellen bestimmter Bereiche von Epithelien oder von Bindegewebszellen, von Zellen der Basallamina eines Gewebes oder von Zellen heterologen Ursprungs, wie metastatischen Zellen. Dies kann in bestimmten Fällen notwendig sein, da Zellen vorhanden sein könnten, die unter bestimmten Umständen einen Marker unter bestimmten normalen Umständen exprimieren, der zur Erkennung eines medizinisch relevanten Zustands wie beispielsweise Neoplasie oder Dysplasie eingesetzt werden könnte. Normalisierung gemäß der vorliegenden Erfindung, kann den Nachweis der An- oder Abwesenheit und/oder des Levels beliebiger Zelltypen beinhalten, die möglicherweise zum Gesamtlevel eines bestimmten Marker beitragen, der ausgewählt wurde, um einen medizinisch relevanten Zustand zu diagnostizieren.

**[0061]** In einer Ausführungsform kann das Verfahren zur Erkennung von Krebsarten wie z. B. von zervikalen Läsionen angewandt werden. Marker und deren Kombinationen, die zum Zweck der Detektion geeignet sind, sind zum Beispiel in WO 0208764 und EP 1217377 offen gelegt und sollen im Wege der Verweisung als Bestandteil der Anmeldung gelten. In dieser Ausführungsform kann der Test unter Verwendung jeder geeigneten Probe zervikalen Ursprungs durchgeführt werden. Die Probe kann zum Beispiel Biopsien oder Mikrobiopsien des Gebärmutterhalses oder Abstriche enthalten, die vom zervikalen Bereich entnommen wurden. Gebärmutterhalsabstriche, wie sie hier verwendet werden, sind Proben, die beispielsweise durch ein geeignetes Hilfsmittel wie eine Bürste, ein Tampon, einen Spatel oder ähnliches, das mit dem Gebärmutterhals während der Probenentnahme in Kontakt kommt, erlangt werden können. Das Hilfsmittel zur Probenentnahme kann jedes geeignete Hilfsmittel sein, das ein Arzt für herkömmliche Testverfahren verwendet oder eine Vorrichtung zur Selbstanwendung bei der Probenentnahme.

**[0062]** Vielversprechende molekulare Marker zur Verbesserung der Auswertung von zervikalen Abstrichen sind z. B. p16<sup>INK4a</sup>, p14ARF, Zyklin E, Zyklin A, Zyklin B, MN, her2/neu, mdm-2, bcl-2, der EGF-Rezeptor, Markern, die kennzeichnend für die humane Papilloma-Virusinfektion sind, pRb, p53, etc., welche zum Nachweis von dysplastischen und neoplastischen Zellen eingesetzt werden könnten. Normalisierung gemäß der vorliegenden Erfindung zur Analyse von zervikalen Abstrichen kann den Nachweis der Anwesenheit menschlicher Zellen, den Nachweis von Zellen des zervikalen Epitheliums, den Nachweis der Anwesenheit von endozervikalen und ectozervikalen Zellen und den Nachweis von Zellen endometrialen Ursprungs beinhalten. Es ist ein äußerst wichtiger Schritt die Anwesenheit von ecto- und endozervikalen Zellen in der Probe zu gewährleisten um sicherzustellen, dass die Probe von der Transformationszone, wo die meisten Dysplasien und Neoplasien vorkommen, entnommen wurde. Wenn keine derartigen Zellen vorhanden sind, ist die Probe für das Testverfahren nicht adäquat, da es anfällig für das Auftreten falsch negativer Ergebnisse ist. Da p16<sup>INK4a</sup> in normalen endometrialen Zellen exprimiert werden kann, könnte die Normalisierung des p16<sup>INK4a</sup>-Expressionslevel im Hinblick auf die Anzahl der endometrialen Zellen notwendig sein.

**[0063]** Um eine zuverlässige Diagnose zu ermöglichen kann die Normalisierung außerdem den Nachweis der An- oder Abwesenheit der genannten Zellkomponenten in der Probe und zusätzlich die Bestimmung des Gesamtlevels eines bestimmten Zelltyps oder der Fraktion, die ein bestimmter Zelltyp zur Gesamtzahl von Zellen in der Probe beiträgt, umfassen.

**[0064]** So kann in einer Ausführungsform der nachgewiesene Level des p16<sup>INK4a</sup>-Proteins in Hinblick auf die zytologischen Bedingungen normalisiert werden, die in der jeweiligen Probe repräsentiert werden, so dass eine Aussage dahingehend ermöglicht wird, ob das nachgewiesene Level des p16<sup>INK4a</sup>-Proteins kennzeichnend für zervikale Zellen ist, die p16<sup>INK4a</sup> überexprimieren, oder ob eine sehr große Anzahl endometrialer Zellen in der Probe vorhanden ist, die auf diese Weise die Überexpression des p16<sup>INK4a</sup> nachahmt.

**[0065]** In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann das Verfahren, welches hier offen gelegt wird, für die Erkennung von Fehlfunktionen des Atemtrakts eingesetzt werden. Bei der Diagnose von kleinzelligem

Lungenkrebs ist der Nachweis von neuronenspezifischer Enolase (NSE) einer der eingesetzten Marker. Tumorphoben werden bei Bronchoskopien durch Sammlung von Zellen mittels Pinseln oder bronchoalveolaren Spülungen geliefert. Da NSE auch in einigen normalen Zellen in der Lunge exprimiert wird, muss das Level der NSE-Expression, das in der aufgelösten Probe nachgewiesen wird, in Relation zu dem Normalisierungsmarker (z. B. Aktin) zum Nachweis der vorhandenen Anzahl von Zellen in der Probe gesetzt werden.

**[0066]** Eine dritte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst die Erkennung von Läsionen des Magen-Darmtrakts, z. B. kolorektaler Läsionen aus Stuhlproben. In diesem Fall kann der Ursprung kennzeichnender Nukleinsäuren und/oder Polypeptide, die in Stuhlproben erkennbar sind, entscheidend zur Diagnosestellung sein. Gemäß der vorliegenden Erfindung ist es möglich, den Ursprung (Zelltypen/Organismen) des verwendeten Markermoleküls zu bestimmen. Auf diese Weise können falsche Resultate, die z. B. auf dem Nachweis von Markermolekülen basieren, die eher von der Nahrungsaufnahme von Personen als von Läsionen der Schleimhaut des Magen-Darmtrakts stammen, ausgeschlossen werden. Des Weiteren können Artefakte, die durch die Anwesenheit von Spuren der Marker von der Blutzirkulation produziert werden oder von verschlucktem Sputum stammen etc., durch Verfahren, wie sie hier offen gelegt werden, ausgeschlossen werden.

**[0067]** Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung umfasst ein Testkit zur Durchführung des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung. Das Kit kann zum Beispiel ein diagnostisches Kit, ein analytisches Kit oder ein Forschungskit sein.

**[0068]** Ein Kit gemäß der vorliegenden Erfindung kann Folgendes beinhalten:

- a) Reagenzien zum Nachweis von Markermolekülen;
- b) die Reagenzien und Puffer, die üblicherweise zur Durchführung der Nachweisreaktion verwendet werden, wie Puffer, Detektionsmarker, Trägersubstanzen und andere;
- c) einen oder mehrere Marker und/oder Proben, die für medizinisch relevante Zustände, die zur Durchführung von Positiv- und/oder Kontrollreaktionen diagnostiziert werden, repräsentativ sind;
- d) eine oder mehrere Normalisierungsmarker-Proben zur Durchführung einer Positiv- und/oder Kontrollreaktion.

**[0069]** Das Reagenz zum Nachweis von Markermolekülen kann jedes Agens enthalten, welches das Markermolekül binden kann. Solche Reagenzien können Proteine, (Poly)Peptide, Nukleinsäuren, Peptid-Nukleinsäuren, Glykoproteine, Proteoglycane, Polysaccharide, oder Lipide beinhalten.

**[0070]** Die für die medizinisch relevanten Zustände charakteristischen Marker und/oder Normalisierungsmarker-Proben zur Durchführung von positiven und/oder negativen Kontrollen können zum Beispiel Nukleinsäuren in geeigneter Form wie in Lösung oder Salz, Peptide in geeigneter Form, Gewebesektionsproben, Mikroorganismen oder positive bzw. negative Zelllinien beinhalten.

**[0071]** In einer Ausführungsform der Erfindung wird der Nachweis von Markermolekülen auf der Ebene von Polypeptiden durchgeführt. In dieser Ausführungsform kann das Bindeagens zum Beispiel ein Antikörper sein, der spezifisch für die Markermoleküle oder deren Fragmente ist. Des Weiteren können Bindeagenzien Antigen-bindende Fragmente wie Fab-Fragmente, Einzelketten-Antikörper, bifunktionale Hybridantikörper, Peptidomimetics, die minimale Antigen-bindende Epitope enthalten etc. umfassen. Darüber hinaus könnte das Bindeagens ein Lektin sein, das an eine spezifische Kohlenhydratstruktur auf dem Markermolekül bindet.

**[0072]** In einer weiteren Ausführungsform des Testkits, wird der Nachweis der Markermoleküle auf der Ebene von Nukleinsäuren durchgeführt. In dieser Ausführungsform der Erfindung kann das Reagenz zum Nachweis zum Beispiel eine Nukleinsäuresonde sein oder ein Primer, der reverskomplementär zu der besagen Markernukleinsäure ist.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0073]** **Abb. 1:** Spezifische immunohistochemische Färbung von endozervikalen und ectozervikalen Epithelzellen in zervikalen Schnitten. Wenn man in einem immunohistochemischen Färbeverfahren einen Antikörper einsetzt, der gegen Cytokeratin 18 (CK18) gerichtet ist, kann eine positive Reaktion im Zylinderepithel der Endozervix (A) nachgewiesen werden, wohingegen das Plattenepithel der Ectozervix keine spezifische Reaktion aufweist (B). Immunohistochemische Färbung mit einem Antikörper, der gegen Zytokeratin 10/13 (CK 10/13) gerichtet ist, weist keine Färbung im Zylinderepithel der Endozervix (C) auf, wohingegen eine starke Färbung des Plattenepithels der Ectozervix (D) zu erkennen ist. Also kann CK18 als ein spezifischer Marker für Plattenepithelzellen der Endozervix und CK10/13 als spezifischer Marker für Plattenepithelzellen der Ectozervix ein-

gesetzt werden. Für Details des Experimentes siehe Beispiel 1.

**[0074] Abb. 2:** Western-Blot-Analyse von aufgelösten Proben zervikaler Abstriche.

**[0075]** Die Nummern **1** bis **4** beziehen sich auf Proben (zervikale Abstriche), die von einzelnen Patientinnen stammen. Die Immunoblot-Bestimmung wurde unter Verwendung von spezifischen Antikörpern, die gegen Zytokeratin **8** (CK8) gerichtet und solchen, die gegen p16<sup>INK4a</sup> gerichtet waren, durchgeführt. Die Proben von Patientin **1**, **2** und **3** weisen kein Anzeichen für die Anwesenheit von p16<sup>INK4a</sup> auf. Dies zeigt, dass keine dysplastischen zervikalen Zellen in diesen Proben vorhanden waren. Die oberen Streifen weisen die spezifischen Anzeichen für die Anwesenheit von Zytokeratin **8** auf. In Probe **1**, **3** und **4** kann Zytokeratin **8** nachgewiesen werden, wohingegen in Probe **2** kein Anzeichen zu erkennen ist. Dies zeigt, dass endozervikale Zylinderepithelzellen in den Proben **1**, **3** und **4** vorhanden und in Probe **2** nicht vorhanden waren. Da die Anwesenheit von endozervikalen Zylinderepithelzellen einer der Parameter für die Adäquatheit von zervikalen Abstrichen ist, wird Probe **2** als inadäquat betrachtet, und es können keine diagnostischen Schlussfolgerungen von dem negativen Ergebnis des p16<sup>INK4a</sup>-Nachweises gezogen werden. Proben **1**, **3**, **4** werden als adäquat betrachtet. Also könnte basierend aus dem negativen Signal für p16<sup>INK4a</sup> in der Probe **1** und **3** geschlossen werden, dass diese Patientinnen keine zervikale Dysplasie hatten. Probe **4** wies ein positives Signal für das Vorhandensein von p16<sup>INK4a</sup> auf und zeigt somit die Anwesenheit einer dysplastischen zervikalen Läsion bei dieser Patientin. Für Versuchsdetails siehe Beispiel 2.

**[0076] Abb. 3:** Western-Blot- und ELISA-Analyse zur Demonstration der Probenadäquatheit.

**[0077]** Proben von vier Patientinnen mit hochgradigen zervikalen Dysplasien (siehe Diagnosen) wurden anhand der Western-Blot-Analyse (oberes Feld der Abbildung) analysiert. Bei dem linken Blot wurden für den Immunoblot-Nachweis Antikörper verwendet, die spezifisch für  $\beta$ -Aktin und p16<sup>INK4a</sup> sind, bei dem mittleren Blot Antikörper, die spezifisch für Zytokeratin 10/13 sind und bei dem rechten Blot Antikörper, die spezifisch für Zytokeratin **18** sind.  $\beta$ -Aktin, CK18 und CK10/13 wurden als Marker zur Demonstration der Adäquatheit der Probe eingesetzt.  $\beta$ -Aktin zeigt die Anwesenheit beliebiger Zellen an, CK10/13 die Anwesenheit von ectozervikalen Plattenepithelzellen und CK18 die Anwesenheit von endozervikalen Zylinderepithelzellen. Bei den Proben der Patientinnen **1** und **2** weisen die Immunoblot-Nachweise positive Anzeichen für alle eingesetzten Adäquatheitsmarker (CK10/13, CK18,  $\beta$ -Aktin) und für den Marker (p16<sup>INK4a</sup>), der kennzeichnend für dysplastische Zellen ist, auf. Bei den Proben der Patientinnen **3** und **4** weisen die Immunoblot-Nachweise nur sehr schwache (Patientin **3**) oder keine (Patientin **4**) Anzeichen für den Adäquatheitsmarker auf. Deswegen unterstützt das negative p16<sup>INK4a</sup>-Signal keine diagnostischen Schlussfolgerungen. Für Versuchsdetails siehe Beispiel 3. Das untere Feld der Abbildung zeigt die Ergebnisse der ELISA-Analyse. Positive Signale für den Adäquatheitsmarker (CK10/13, CK18) wurden bei den Proben von Patientin **1** und **2** nachgewiesen, wohingegen bei den Proben von Patientin **3** und **4** keine Anzeichen für CK10/13 und CK18 vorhanden waren. Also gleichen die Ergebnisse der ELISA-Analyse den Ergebnissen der Western-Blot-Analyse und es können die gleichen Schlussfolgerungen gezogen werden. Für Versuchsdetails siehe Beispiel 3.

**[0078]** Die folgenden Beispiele dienen ausschließlich der Veranschaulichung und sollen nicht den Umfang der hier offen gelegten Erfindung einschränken.

Beispiel 1: Spezifischer immunohistochemischer Nachweis von endozervikalen und ectozervikalen Epithelzellen in zervikalen Schnittpräparationen

**[0079]** Um die Marker, welche die Adäquatheit von zervikalen Abstrichen angeben auszuwerten, wurden zervikale Schnitte (fixiert in 4% Formaldehydlösung und paraffineingebettet) mit Antikörpern eingefärbt, die gegen Zytokeratin **18** (Marker für endozervikale Zylinderepithelien) und Zytokeratin 10/13 (Marker für ectozervikale Plattenepithelien) gerichtet waren. **Abb. 1** zeigt eine spezifische Färbung von endozervikalen Epithelien mit einem anti-Zytokeratin 18-Antikörper und eine spezifische Färbung von ectozervikalen Epithelien mit einem anti-Zytokeratin 10/13 Antikörper. Diese Untersuchung wurde wie folgt durchgeführt:

**[0080]** Formalinfixierte, paraffineingebettete Schnitte wurden 5 Minuten in einem Xylolbad deparaffiniert (dieser Schritt wurde einmal wiederholt), überschüssige Flüssigkeit wurde abgezapft und die Objektträger wurden 3 ( $\pm$ 1) Minuten in 95–96% Ethanol, 3 ( $\pm$ 1) Minuten in 70% Ethanol (dieser Schritt wurde einmal wiederholt) und zum Schluss für mindestens 30 Sekunden in destilliertes Wasser gesetzt. Zur Epitoprückgewinnung wurden Objektträger in ein Coplin-Gefäß gesetzt und 40 Minuten bei 95–99°C in 10mM Zitratpuffer pH 6.0 gekocht. Die Objektträger durften 20 Minuten ( $\pm$ 1) bei RT in diesem Puffer abkühlen. Die Objektträger wurden mit peroxidaseblockendem Reagenz (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; NaN<sub>3</sub> 15 mM) bedeckt und 5 Minuten ( $\pm$ 1) bei RT inkubiert. Nach 5-minü-

tigem Waschen in Waschpuffer wurden die Objektträger 30 Minuten mit primären Antikörpern (CK 10/13: DE-K13, 1:50, DAKO; CK 18: K18.7, 1 µg/ml, Dianova) inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger 5 Minuten bei RT mit Waschpuffer gespült und in Waschpuffer gewaschen. Nach 30 Minuten Inkubation mit EnVision (bereit zum Gebrauch des anti-Mouse-Horseradish-Peroxidasekomplex, DAKO), wurden die Objektträger 3×5 Minuten gewaschen und 10 Minuten in DAB-Substrat inkubiert, mit Hematoxylin gegengefärbt und mit Faramount Eindeck Medium eingedeckt.

#### Beispiel 2: Western-Blot-Analyse von aufgelösten Proben zervikaler Abstriche

**[0081]** Um auszuwerten, ob die Western-Blot-Analyse aufgelöster Proben Diagnosestellungen von zervikalen Läsionen erlaubt, wurden klinische Proben mit bekannter Diagnose nach der Auflösung des Probenmaterials auf der Ebene von Markermolekülen einer immunochemischen Analyse unterzogen.

**[0082]** Das klinische Probenmaterial (zervikale Abstriche) wurde durch die Standard-Western-Analyse wie folgt analysiert.

**[0083]** Kurz dargestellt wurde das klinische Material vor der Ultraschallbehandlung zuerst durch Kochen (5 Minuten, 95°C) in Lämmli-Proteinproben-Puffer (100 mM Tris pH.6.8, 2% SDS, 200mM DTT, 0.05% BpB) aufgelöst. Anschließend wurden Proteinproben auf einer SDS-PAGE (12 % Acrylamid) aufgelöst und danach durch Tankblotting (Towbin et al., 1979, Proc Natl Acad Sci;76:4350–4354). auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. In einem weiteren Schritt wurden die Membranen blockiert, um unspezifische Antikörperbindung (10% fettarmes Milchpulver in PBS) zu verhindern und danach mit dem spezifischen monoklonalen Mausantikörper (CK 8: 35βH11, 1:100, DAKO; p16<sup>INK4a</sup>: D7D7, 1:140, mtm laboratories) inkubiert. Die Bindung des spezifischen Antikörpers wurde durch Meerrettich-Peroxidase konjugierte Sekundärreagenzien (die an den markerspezifischen Antikörper binden) sichtbar gemacht, die photonabgebende Substanzen katalysieren.

**[0084]** Zytokeratin 8 (CK8) wurde als Endozervikalzell-spezifischer Marker eingesetzt, der die Adäquatheit der Probensammlung in dem vorliegenden Versuch angibt. Der zyklinabhängige Kinaseinhibitor p16<sup>INK4a</sup> wurde als spezifischer krankheitsbezogener Marker eingesetzt.

**[0085]** Die Ergebnisse des vorliegenden Versuchs sind in **Abb. 2** dargestellt.

**[0086]** Die Nummern 1 bis 4 beziehen sich auf Proben einzelner Patientinnen. Die parallel durchgeführte zytologische Analyse der Abstriche wies auf eine normale Zellstruktur bei den Frauen 1 und 3 hin. Bei Frau 4 wurde eine hochgradige Dysplasie diagnostiziert. Man beachte, dass sich die obere Bande (CK8) auf den endozervikalen zellspezifischen Normalisierungsmarker Zytokeratin 8 bezieht, der die Adäquatheit der Probenahme angibt. Die untere Bande zeigt den spezifischen krankheitsbezogenen Marker p16<sup>INK4a</sup> an. Der Blot weist bei Patientin 4 ein positives Signal für p16<sup>INK4a</sup> auf und somit eine hochgradige zervikale Dysplasie. Die Proben von Patientin 1 und 3 zeigen nur die CK8-spezifische Banden, die auf eine angemessene Probensammlung hindeutet, jedoch keinen krankheitsbezogenen Marker (p16<sup>INK4a</sup>) und somit ein normales, gesundes zervikales Epithel. Die Probe von Patientin 2 weist entsprechend der geringen Anzahl von Zellen in dieser Probe kein Anzeichen für CK8 auf, und deswegen kann keine diagnostische Schlussfolgerung aus dem negativen Anzeichen für p16<sup>INK4a</sup> gezogen werden.

#### Beispiel 3: Western-Blot- und ELISA-Analyse zur Demonstration der Probenadäquatheit

**[0087]** Um zu beurteilen, ob aufgrund von Unadäquatheit der Proben die Ergebnisse von lösungsbasierenden Analysen von Probendiagnosen abweichen, wurde die Western-Blot-Analyse zervikaler Abstriche von vier verschiedenen Patientinnen mit bekannter Diagnose (hochgradige zervikale intraepitheliale Neoplasie gemäß der zytologischen Diagnose von Pap IVa und Pap IVb) durchgeführt. Ein Antikörper gegen p16<sup>INK4a</sup> wurde eingesetzt, um die Anwesenheit von dysplastischen Zellen anzuzeigen, während Antikörper gegen CK18 und CK10/13 eingesetzt wurden, um die Adäquatheit der Probe darzulegen. Wie in **Abb. 3** zu sehen ist wiesen die Proben der Patientinnen 1 und 2 Western-Blot-Anzeichen für p16<sup>INK4a</sup> sowie CK10/13 und CK18 auf (was auf die Adäquatheit der Probe hinweist). In den Proben 3 und 4 waren keine p16<sup>INK4a</sup>-Banden im Western-Blot. Jedoch zeigten in diesen Fällen der β-Actin- und die zwei Zytokeratinmarker ein extrem schwaches (Patientin 3 β-Actin) oder negatives Signal (Patientin 4 alle Marker, Patientin 3 CK-Marker) in der Western-Blot-Analyse an. Daher kann keine diagnostische Schlussfolgerung aus dem negativen Signal für p16<sup>INK4a</sup> gezogen werden. Die Western-Blot-Analyse wurde wie folgt durchgeführt:

**[0088]** Proben von Patientinnen wurden mit einer zervikalen Bürste entnommen und direkt 5 Minuten bei

95°C ( $1 \times 10^7$  Zellen/ml) in Laemmli-Proben-Puffer (2% SDS, 60mM Tris pH.6.8, 0.01%, 100 mM DTT) mit anschließender Ultraschallbehandlung (5×5 Sek. Impulse, maximale Stärke) aufgelöst. Die Lysate wurden 12 Minuten bei 16,600×g in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert und die Überstände wurden in ein neues Gefäß gegeben. Vorgefertigte 4–20%-ige linear abfallende Acrylamidgele (Criterion System, Bio Rad) wurden mit 10µl (105 cells) Zellextrakten beladen und die Proteine wurden 45 Minuten bei 25mA konstantem Gleichstrom aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Standard-Tankblotting mit dem Bio Rad Criterion Blotter (15 Minuten bei konstanten 100 Volt und anschließend 45 Minuten bei konstanten 50 Volt) vom Gel auf Hybond ECL Nitrozellulosemembran (Amersham) transferiert. Die Nitrozellulosemembran wurde 5 Minuten in Ponceau S-Lösung gefärbt, um den Proteintransfer zu überprüfen. Die Ponceau S-Lösung wurde durch 2×10-minütiges Waschen in PBS entfernt. Zum Immunnachweis wurden die Blots über Nacht in Blockpuffer (10% Milchpulver in PBS mit 0.1% Tween-20) geblockt. Primär-Antikörper wurden bei Verdünnung gemäß Herstellerangaben 1 Stunde bei RT unter Schütteln (CK18: MAB 3236, 1:1000, CHEMICON; CK 10/13: DE-K13, 1:500, DAKO, p16<sup>INK4a</sup>: D7D7, 1:140, mtm laboratories) in Blockpuffer inkubiert. Nach 6 mal 10-minütigem Waschen mit PBS/0.1% Tween-20 wurden die Blots mit Rabbit-Anti-Mouse-HRP (DAKO, verdünnt 1:5,000 in Blockpuffer) 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach 6 mal 10-minütigem Waschen mit PBS/0.1% Tween-20, wurden die Membranen 5 Minuten in Substratlösung (Super Signal West Femto Maximum Substrate, Pierce) inkubiert, in Plastikfolie eingewickelt und 1–5 Minuten einem Röntgenfilm exponiert. Zum Schluss wurden die Röntgenfilme entwickelt, fixiert, getrocknet und mit einem Imaging-System (Bio-Rad) dokumentiert.

**[0089]** Die gleichen Proben wurden zur Durchführung einer ELISA-Analyse für p16<sup>INK4a</sup>, CK 10/13 und CK18 verwendet. Die festgestellten Signale und Ergebnisse waren ähnlich wie bei der Western-Blot-Analyse und es wurden die gleichen Schlussfolgerungen gezogen.

**[0090]** Die ELISA-Analyse wurde wie folgt durchgeführt: Flat-Bottom 96-Mikrotiterplatten (MaxiSorb; Nunc) wurden mit einem Fangantikörper (p16<sup>INK4a</sup>: MTM-E6H4, 2µg/ml in PBS, mtm laboratories; CK10: MS481P1ABX, 2µg/ml, Dianova; CK18: K18.7, 2µg/ml, Dianova; 50µl/well) über Nacht bei 4°C beschichtet. Die Platten wurden 6× mit PBS/0.1% Tween-20 gewaschen und mit Superblock-Puffer (Pierce) geblockt. Aufgelöstes Proteinextrakt von zervikalen Abstrichen wurde in Inkubationspuffer (PBS, 3% Superblock, 0,1% Tween-20) aufgelöst und dreifach zu jeder Mikrotiterplatte hinzugefügt. Nach einstündiger Inkubation bei RT wurden die Platten 6× mit PBS/0.1% Tween-20 gewaschen und 1 Stunde bei RT mit einem biotinylierten Detektionsantikörper (p16<sup>INK4a</sup>: MTM-D7D7 (0.2 µg/ml, mtm laboratories, CK10: MS481-BO, 200 µg/ml, Dianova; CK18: MS142-BO, 200 µg/ml, Dianova; in Inkubationspuffer) inkubiert. Es folgten 6 Waschungen mit PBS/0.1% Tween-20 TMB, und 50 µl streptavidinkonjugierte alkalische Phosphatase (1:1000 Verdünnung; Dianova) wurden für 30 Minuten hinzugefügt. Anschließend wurden die Platten 6× mit PBS/0.1% Tween-20 gewaschen, und 100 µl P-Nitrophenylphosphatsubstrat (PnPP, aufgelöst in Diethanolaminpuffer) wurden zu jeder Mikrotiterplatte hinzugefügt. OD 405 nm (620 nm Referenzwellenlänge) wurde mit einem ELISA-Reader (Tecan) nach 30 Minuten, 1 und 2 Stunden gemessen. Das vorliegende Beispiel zeigt, dass das Sandwich-ELISA-Format eine Sensitivität aufweist, die sich für den Einsatz für Verfahren gemäß vorliegender Erfindung eignet. Zum Einsatz bei dem hier offen gelegten Verfahren kann das Sandwich-ELISA-Format, wie es in diesem Beispiel beschrieben wird, auf mehrere Markermoleküle wie auf Marker zur Normalisierung/Adäquatheit und auf Marker, die charakteristisch für einen medizinisch relevanten Zustand sind, angewandt werden.

#### Beispiel 4: Western-Blot-Analyse verschiedener Proben pulmonalen Ursprungs

**[0091]** Um zu beurteilen, ob es die Western-Blot-Analyse aufgelöster Proben erlaubt Diagnosen von pulmonaler Läsionen zu stellen, wurden klinische Proben mit bekannter Diagnose aufgelöst und einer immunochemischen Analyse auf der Basis von Marker- und Normalisierungsmolekülen unterzogen.

**[0092]** Die klinischen Proben (Zellen, die durch Bürsten-Abstrich oder bronchoalveolare Spülung gesammelt wurden) wurden durch die Standard-Western-Analyse folgendermaßen analysiert. Zellen von bronchoalveolarer Spülung wurden durch Zentrifugieren (5 Minuten, 1000 rpm) niedergeschlagen und der Niederschlag wurde in Lämmli-Proteinprobenpuffer (100 mM Tris pH.6.8, 2% SDS, 200mM DTT, 0.05% BpB) aufgelöst. Zellen, die durch Bürsten-Abstrich erlangt wurden, wurden direkt in Lämmli-Proteinprobenpuffer (100 mM Tris pH.6.8, 2% SDS, 200mM DTT, 0.05% BpB) aufgelöst. Das Material wurde vor der Ultraschallbehandlung gekocht (5 Minuten, 95°C). In einem zweiten Schritt wurden Aliquots der Proteinprobe auf SDS-PAGE in Duplikaten aufgelöst (12% Acrylamid) und anschließend durch Tank-Blotting auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Towbin et al., 1979, Proc Natl Acad Sci;76:4350–4354). In einem weiteren Schritt wurden die Membranen geblockt, um unspezifische Anitkörperbindung (10% fettarmes Milchpulver in PBS) zu verhindern, und danach wurde eine Membran mit spezifischen monoklonalen Mausantikörpern gegen NSE (DAKO Deutschland, Klon BSS/NC/VI-H14, Maus-monoklonal, Verdünnung 1:1000; ) inkubiert und eine Membran wurde mit dem Norma-

lisierungsmarker Actin (ICN, USA, Klon C4, Maus-monoklonal, Verdünnung 1:400) inkubiert. Das Binden des spezifischen Antikörpers wurde durch Meerrettich-Peroxidase konjugierte Sekundärreagenzien (die den markerspezifischen Antikörper binden), die photonabgebende Substanzen katalysieren, sichtbar gemacht.

**[0093]** Bei den bronchoalveolaren Spülungen der Patienten mit bekanntem Lungenkrebs wurden hohe Level von NSE im Vergleich zu den Expressionslevel von Aktin festgestellt, wohingegen bei Patienten ohne Tumor kaum NSE festgestellt werden konnte. Der Aktinlevel jedoch war mit dem Level der Krebspatienten vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

**[0094]** Die Ergebnisse zeigen, dass eine Normalisierung des lösungsbasierenden Testverfahrens gemäß der hier vorgestellten Methode eine Diagnosestellung von Krankheiten erlaubt, ohne auf die morphologische Information angewiesen zu sein.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Diagnose von medizinisch relevanten Zuständen in Rohproben umfassend
  - Herstellung einer Probenlösung aus den Rohproben
  - Bestimmung des Levels von einem oder mehreren Markern, die für besagten medizinisch relevanten Zustand charakteristisch sind, in der besagten Probenlösung
  - Bestimmung des Levels von einem oder mehreren Normalisierungsmarkern, die für mindestens einen der folgenden Parameter charakteristisch sind:
    - die Anwesenheit oder Abwesenheit eines bestimmten Zelltyps unter den Zellen, welche in der Probenlösung vertreten sind,
    - die Anwesenheit oder Abwesenheit eines bestimmten Differenzierungsmusters in den Zellen, welche in der Probenlösung vertreten sind,
    - die Anwesenheit oder Abwesenheit von bestimmten Proliferationseigenschaften der Zellen, welche in der Probenlösung vertreten sind;
  - Vergleich der Levels der Marker, die für besagten medizinisch relevanten Zustand charakteristisch sind, mit den in der Probenlösung festgestellten Levels der Normalisierungsmarker, wobei auf diese Weise die festgestellten Level der Marker, die charakteristisch für besagten medizinisch relevanten Zustand sind, im Hinblick auf einen oder mehrere geeignete Parameter normalisiert werden; und
  - Diagnostizieren des medizinisch relevanten Zustandes anhand der normalisierten Levels besagter Marker, die charakteristisch für besagten medizinisch relevanten Zustand sind, in der Probenlösung.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei zusätzlich die Quantität von Zellen, die zu einem oder mehreren Levels von festgestellten Markern beitragen, welche in der Probenlösung vertreten sind, auf der Ebene der molekularen Marker bestimmt wird.
3. Verfahren gemäß einem beliebigen der Ansprüche 1 – 2, wobei der medizinisch relevante Zustand ein Zustand ist, der durch eine Eigenschaft charakterisiert wird, ausgewählt aus einer Gruppe enthaltend die Anwesenheit oder Abwesenheit von bestimmten Zelltypen in einer Probe, die Anwesenheit oder Abwesenheit eines bestimmten Differenzierungsmusters bezüglich der Zellen in der Probe und die Anwesenheit oder Abwesenheit von Proliferationseigenschaften von Zellen in der Probe.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei der medizinisch relevante Zustand eine Krankheit ist.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, wobei die Krankheit eine proliferative Störung, Krebs oder eine Vorstufe davon ist.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei der Krebs ein Krebs des Kopfes und Halses, Krebs des Respirationstraktes, Krebs des Magen-Darmtraktes, Krebs der Haut und deren Anhangsgebilde, Krebs des zentralen- und peripheren Nervensystems, Krebs des Harnapparats, Krebs des Fortpflanzungsapparates, anogenital Krebs, Krebs des endokrinen Systems, Krebs der Weichteile und Knochen, Krebs des lymphopoietischen und haematopoietischen Systems ist.
7. Verfahren gemäß einem beliebigen der Ansprüche 1 – 6, wobei das Rohmaterial eine beliebige Probe ist, die Zellen oder Zelltrümmer enthält.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, wobei die Zellen Zellen eines eukaryonten oder prokaryonten Organismus sind.



9. Verfahren gemäß Anspruch 8, wobei die Probe ausgewählt ist aus einer Gruppe umfassend: Blut, Sekrete, Abstriche, Sputum, Speichel, Stuhl, Galle, Zell- oder Gewebeproben, Biopsien oder Körperflüssigkeiten.
10. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 – 9, wobei mindestens ein Marker, der charakteristisch für einen medizinisch relevanten Zustand ist, ausgewählt ist aus einer Gruppe umfassend Zellzyklusregulatorproteine, Metalloproteinasen, Transmembranproteine, Kalzium-bindende Proteine, Wachstumsfaktoren, Markermoleküle charakteristisch für Virusinfektionen, Zellproliferationsmarker und DNA-Replikation-assoziierte Marker oder entsprechende Nukleinsäuren, welche für die jeweiligen Proteine kodieren.
11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1–10, wobei mindestens ein Marker ein Tumormarkerprotein oder eine dafür kodierende Nukleinsäure ist.
12. Verfahren gemäß Anspruch 10, wobei mindestens ein Tumormarker ausgewählt ist aus einer Gruppe enthaltend p53, pRb, p14ARF, Zyklin E, Zyklin A, Zyklin B, MN, her2/neu, mdm-2, bcl-2, EGF-Rezeptor, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, MCM7, CDC2, CDC6, CDC7 Proteinkinase, CDC14 Proteinphosphatase, Dbf4, PCNA, Ki67, KiS1, Id1, Osteopontin, GRP, renale Dipeptidase, TGFβII Rezeptor und zyklinabhängige Kinaseinhibitoren.
13. Verfahren gemäß Anspruch 12, wobei der zyklinabhängige Kinaseinhibitor ausgewählt ist aus einer Gruppe enthaltend p13.5, p14, p15, p16, p19, p21, p27.
14. Verfahren gemäß Anspruch 10, wobei mindestens ein Marker ein virales Protein oder eine virale Nukleinsäure ist.
15. Verfahren gemäß Anspruch 14, wobei mindestens ein virales Protein ein HPV Protein oder eine Nukleinsäure abgeleitet von einem HPV Gen ausgewählt aus einer Gruppe enthaltend HPV L1, HPV L2, HPV E1, HPV E2, HPV E4, HPV E5, HPV E6 und HPV E7 ist.
16. Verfahren gemäß einem beliebigen der Ansprüche 1 – 15, wobei mindestens ein Normalisierungsmarker ausgewählt ist aus einer Gruppe enthaltend Housekeeping Gene, Zelloberflächenproteine, Rezeptorproteine, Glykoproteine und/oder Proteoglykane, Glykoprotein- und/oder Proteoglykan-spezifische Kohlenhydratstrukturen, Zellzyklusregulatorproteine, Metalloproteinasen, Transmembranproteine, Kalzium bindende Proteine, Wachstumsfaktoren, Zelldifferenzierungsmarker und DNA-Replikations-assoziierte Proteine.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, wobei mindestens ein Normalisierungsmarker ein epitheliales Antigen, ein Zytokeratin oder ein CD Antigen ist.
18. Verfahren gemäß Anspruch 16, wobei mindestens ein Normalisierungsmarker ausgewählt ist aus einer Gruppe umfassend Glykoproteine, Proteoglykane und Kohlenhydratstrukturen, welche auf diesen Molekülen vorhanden sind.
19. Verfahren gemäß Anspruch 16, wobei mindestens ein Normalisierungsmarker ein Enzym ist, das an der Biosynthese von Glykoproteinen und/oder Proteoglykanen beteiligt ist.
20. Verfahren gemäß einem beliebigen der Ansprüche 1 – 19, wobei der Nachweis der Markermoleküle unter Verwendung mindestens einer Sonde, die besagte Markermoleküle spezifisch erkennt und an diese bindet, durchgeführt wird.
21. Verfahren gemäß Anspruch 20, wobei mindestens eine Sonde eine nachweisbare Markierung trägt.
22. Verfahren gemäß Anspruch 21, wobei die Markierung ausgewählt ist aus einer Gruppe umfassend Radioisotope, biolumineszierende Verbindungen, chemilumineszierende Verbindungen, fluoreszierende Verbindungen, Metall-Chelate, oder Enzyme, biologisch relevant Bindungsstrukturen wie Biotin oder Digoxigenin.
23. Verfahren gemäß einem beliebigen der Ansprüche 20 – 22, wobei mindestens eine Sonde ein Bindungsagens ist, das spezifisch an ein Markerpolypeptid bindet.
24. Verfahren gemäß Anspruch 23, wobei das Bindungsagens ausgewählt ist aus einer Gruppe enthaltend Antikörper, Miniantikörper und Peptidomimetics, die ein Antigen-bindendes Epitop enthalten.

25. Verfahren gemäß einem beliebigen der Ansprüche 20 – 22, wobei mindestens eine Sonde ein Lektin ist, das eine Kohlenhydratbindungsstelle aufweist, oder ein Kohlenhydrat, das von einem Lektin erkannt wird.

26. Verfahren gemäß einem beliebigen der Ansprüche 20 – 22, wobei mindestens eine Sonde ein Nukleinsäuremolekül ist, das komplementär oder revers-komplementär zu einer Marker-Nukleinsäure ist, das spezifisch an besagte Marker-Nukleinsäure hybridisiert.

27. Verfahren gemäß Anspruch 26, wobei die Nachweisreaktion eine quantitative oder semiquantitative Amplifikationsreaktion umfasst.

28. Verfahren gemäß einem beliebigen der vorgehenden Ansprüche, zur Verwendung im Rahmen der Früherkennung oder von primären Screening-Tests von Läsionen der Zervix, wobei die Probe von zervikalen Abstrichproben abgeleitet wird.

29. Verfahren gemäß Anspruch 28, wobei die Normalisierung eine Abschätzung, ob die Probe für den Zweck des Screenings von Läsionen der Zervix in adaequater Weise genommen worden ist, auf molekularer Ebene umfasst, und wobei der Nachweis von Markern, die spezifisch die Gegenwart von endozervikalen Zellen anzeigen, der Beweis für die Adaequatheit der Probe ist.

30. Verfahren gemäß Anspruch 29, wobei mindestens ein Normalisierungsmarker ausgewählt ist aus einer Gruppe enthaltend CK8, CK18, CK10/13, Vimentin, Concanavalin A Rezeptor und Lectine, und wobei mindestens ein Marker, der charakteristisch für den medizinisch relevanten Zustand ist, ein HPV assoziierter Marker, p16, p19, p21, p27, pRb, p53, p14ARF, Zyklin E, Zyklin A, Zyklin B, MN, her2/neu, mdm-2, bcl-2, EGF-Rezeptor, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, MCM7, CDC2, CDC6, CDC7 Proteinkinase, CDC14 Proteinphosphatase, Dbf4, PCNA, Ki67, KiS1, Id1, Osteopontin, GRP, renale Dipeptidase, und TGFβII Rezeptor ist.

31. Test-Kit zur Ausführung des Verfahrens gemäß einem beliebigen der Ansprüche 1 – 30 umfassend

- a. mindestens ein Festphasen-fixiertes Reagenz zum Nachweis von mindestens einem Markermolekül, das für einen medizinisch relevanten Zustand charakteristisch ist; und
- b. mindestens ein Festphasen-fixiertes Reagenz zum Nachweis von mindestens einem Normalisierungsmarker, der für mindestens einen der folgenden Parameter charakteristisch ist
  - i. die Anwesenheit oder Abwesenheit eines bestimmten Zelltyps oder Differenzierungsmusters unter den Zellen, welche in der Probenlösung vertreten sind,
  - ii. die Anwesenheit oder Abwesenheit von bestimmten Proliferationseigenschaften der Zellen, welche in der Probenlösung vertreten sind.

32. Test-Kit gemäß Anspruch 31 weiterhin umfassend mindestens eine der folgenden Komponenten:

- a. mindestens eine Probe eines Markermoleküls zur Durchführung einer Positiv-Kontrollreaktion, ausgewählt aus einer Gruppe umfassend:
  - i. Proben von Markermolekülen, die für einen medizinisch relevanten Zustand charakteristisch sind;
  - ii. Proben von Normalisierungsmarkermolekülen, die für mindestens einen der folgenden Parameter charakteristisch sind:
    1. die Anwesenheit oder Abwesenheit eines bestimmten Differenzierungsmusters unter den Zellen, welche in der Probenlösung vertreten sind,
    2. die Anwesenheit oder Abwesenheit von bestimmten Proliferationseigenschaften der Zellen, welche in der Probenlösung vertreten sind; und
- b. Reagenzien und Puffer, die üblicherweise zur Durchführung der Nachweisreaktion verwendet werden, wie Puffer, Detektionsmarker und Trägersubstanzen.

33. Test-Kit gemäß den Ansprüchen 31 – 32, wobei die Reagenzien zum Nachweis der Markermoleküle Bindungsagenzien umfassen, die für besagte Markermoleküle spezifisch sind, und/oder Nukleinsäuresonden, welche an Nukleinsäuren, die für besagte Markermoleküle kodieren, hybridisieren.

34. Test-Kit gemäß Anspruch 33, wobei mindestens ein Bindungsagens ein Antikörper, ein Mini-Antikörper oder ein Peptidomimetic, welches eine Antigen-bindendes Epitop enthält, ist.

35. Test-Kit gemäß einem beliebigen der Ansprüche 31 – 34, welches ein Kit ist ausgewählt aus einer Gruppe umfassend Diagnostische Kits, Forschungs-Kits und Analytische Kits.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Abbildung 1:

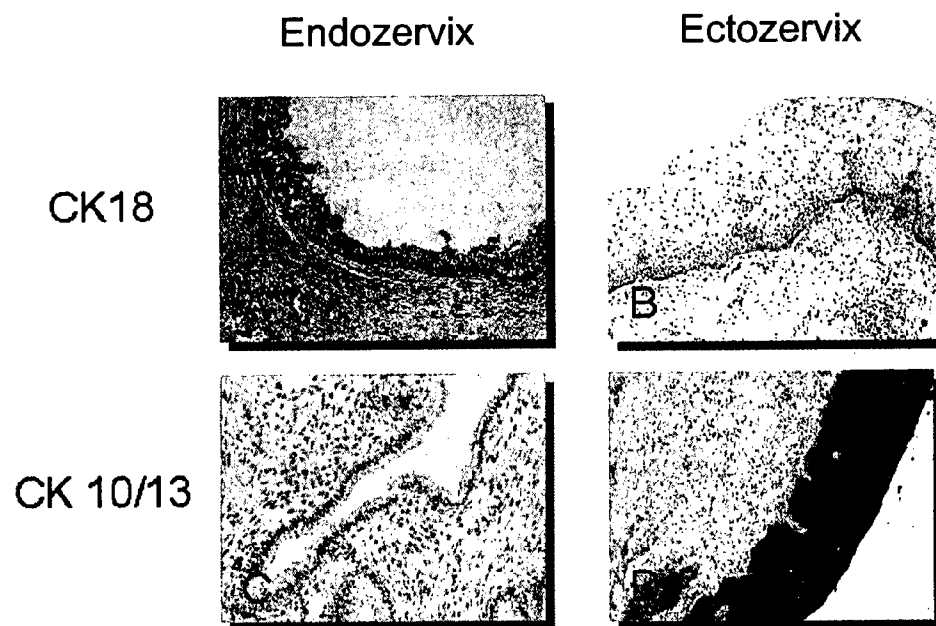


Abbildung 2:

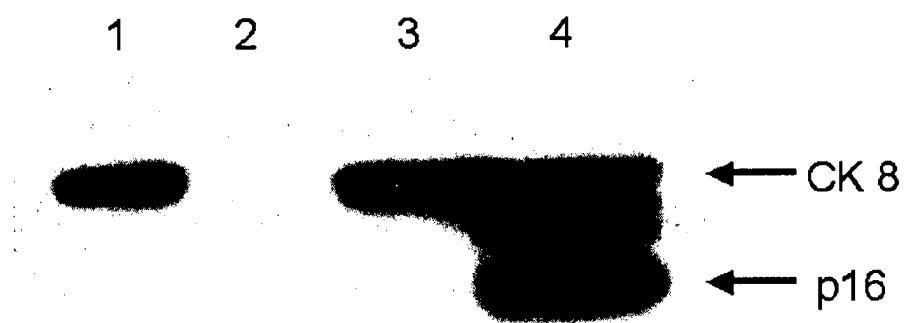


Abbildung 3:

