



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 30 281 T2** 2007.08.30

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 185 693 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 30 281.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/07882**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 918 364.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/058514**

(86) PCT-Anmeldetag: **24.03.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **05.10.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **13.03.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **23.08.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **30.08.2007**

(30) Unionspriorität:
277016 26.03.1999 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:
Exact Sciences Corp., Marlborough, Mass., US

(72) Erfinder:
**LAPIDUS, N., Stanley, Bedford, NH 03110, US;
SHUBER, P., Anthony, Milford, MA 01757, US**

(74) Vertreter:
Klunker, Schmitt-Nilson, Hirsch, 80797 München

(54) Bezeichnung: **METHODEN ZUR VERBESSERUNG DER SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT VON SCREENINGVERFAHREN FÜR KREBS UND KREBS-VORSTUFEN**

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**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die Erfindung betrifft Untersuchungen zum Nachweisen von Nucleinsäure-Markern von Krebs mit hoher Nachweisspezifität und hoher Nachweisempfindlichkeit.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Man glaubt, dass Krebs von einem vielschrittigen Prozess herrührt, der typischerweise mehrere genetische Mutationen, die zu unkontrolliertem Zellwachstum führen, umfasst. Viele Krebsarten sind heilbar, wenn sie früh in ihrer Entwicklung entdeckt werden. Kolorektale Krebsarten beispielsweise entstehen typischerweise im Kolonepithel und sind während frühen Entwicklungsstadien nicht umfangreich mit Blutgefäßen versorgt (und daher nicht invasiv). Der Übergang zu einem hochgradig mit Blutgefäßen versorgten, invasiven und schließlich metastatischen Krebs dauert üblicherweise 10 Jahre oder länger. Wenn das Vorliegen von Krebs vor der umfangreichen Versorgung mit Blutgefäßen nachgewiesen wird, stellt eine chirurgische Entfernung typischerweise eine wirkungsvolle Heilung dar. Kolorektaler Krebs wird jedoch oft erst beim Auftreten klinischer Symptome, wie Schmerzen und blutiger Stuhl, nachgewiesen. Im Allgemeinen liegen derartige Symptome erst vor, wenn die Krankheit gut ausgebildet ist, und oft nachdem Metastase stattgefunden hat. In ähnlicher Weise sind, mit Ausnahme des Pap-Abstrichs zum Nachweis prämaligener Cervixläsionen, diagnostische Untersuchungsverfahren für andere Arten von Krebs zum Nachweisen einer ausgebildeten Krankheit am besten.

[0003] Die meisten diagnostischen Untersuchungen auf Krebs sind invasiv oder zumindest unangenehm. Invasive Prozeduren reichen von der Durchführung einer Gewebebiopsie bis zum chirurgischen Eingriff. Krebsuntersuchungsverfahren führen häufig zu beträchtlichen Unannehmlichkeiten für den Patienten. Beispielsweise erfordert eine Magnetresonanz-Abbildung eine Beengung des Patienten, und eine Kolonoskopie erfordert eine Sedierung. Die mit typischen invasiven Untersuchungsverfahren verbundene Unannehmlichkeit verringert das Patienten-Einverständnis mit Routine-Untersuchungsverfahren.

[0004] Darüber hinaus führt die Untersuchung zur Früherkennung von Krebs (d.h. vor dem Einsetzen von Symptomen und/oder Metastase) oft zu einem unannehmbaren Anteil an falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen. Die Wahrscheinlichkeit eines falsch-positiven Testergebnisses ist eine Funktion der Spezifität des Tests. Die Spezifität eines Tests (ausgedrückt als ein Prozentsatz) ist die Wahrscheinlichkeit, dass irgendein Individuum, das krankheitsmäßig negativ ist, im Test auf diese Krankheit negativ ist. Andererseits sind falsch-negative Ergebnisse eine Eigenschaft der Empfindlichkeit des Tests. Die Empfindlichkeit (ebenfalls ausgedrückt als ein Prozentsatz) liefert die Wahrscheinlichkeit, dass ein Test auf eine spezifische Krankheit ein Individuum, das die Krankheit hat, als positiv identifiziert. So werden bei Verwendung einer Untersuchung mit einer Spezifität von 95% 5% der Individuen, bei denen bestimmt wurde, dass sie eine Krankheit haben, die Krankheit tatsächlich nicht haben. In ähnlicher Weise wird eine Untersuchung mit einer Empfindlichkeit von 95% ein erkranktes Individuum zu 5% der Zeit fälschlich als krankheitsfrei identifizieren.

[0005] Die Probleme der Empfindlichkeit und der Spezifität sind bei Untersuchungen zur Früherkennung von Krebs stark vergrößert, weil Proben von Patienten, an denen eine derartige Früherkennung durchgeführt wird, typischerweise relativ kleine Mengen an kanzerösem zellulärem Material in Beziehung zu nicht-kanzerösem zellulärem Material enthalten. In vielen Fällen sind Proben von Patienten ein heterogenes Gemisch großer Mengen an normalen Zellen und kleiner Mengen an kanzerösen Zellen. Ein gutes Beispiel für eine derartige heterogene Probe ist Stuhl. Die typische Stuhlprobe enthält Zellen und zelluläre Bruchstücke, die von dem Kolonepithel abgeschilfert wurden, Nebenprodukte der Verdauung und Bakterien. Man geht davon aus, dass kolorektaler Krebs in seinen frühen Stadien nur etwa 1% der Kolonepithelzellen befällt. Jeglicher Versuch, Nucleinsäuren von den 1% befallenen Zellen vor dem heterogenen Hintergrund der Stuhlprobe nachzuweisen, könnte Anlass zu sehr niedrigen Empfindlichkeiten geben. Versuche, das Vorliegen der Indizien für Krebs in anderen heterogenen Proben, wie Sputum, Eiter, Urin, Brustwarzenaspirat, etc., zu identifizieren, werfen ähnliche Probleme auf.

[0006] Kürzlich wurde eine Anzahl genetischer Mutationen mit Krebs in Verbindung gebracht. Beispielsweise glaubt man, dass Veränderungen in dem Gen p53, dem Onkogen Kras und dem Tumorsuppressorgen apc Beiliegte an dem vielschrittigen Weg sind, der zu Krebs führt. Es wurde vorgeschlagen, dass Mutationen in jenen Genen eine Basis für molekulare Untersuchungen auf die frühen Stadien bestimmter Arten von Krebs darstellen könnten. Siehe z.B. Sidransky et al., Science, 256: 102–105 (1992). Es wurden Versuche gemacht, Nucleinsäure-Marker, die ein Anzeichen für Krebs sind, zu identifizieren und zu verwenden. Selbst wenn solche Mar-

ker gefunden werden, hat sich ihre Verwendung zur Untersuchung von Proben für Patienten, insbesondere heterogener Proben, jedoch entweder wegen einer Unmöglichkeit, ausreichend Probenmaterial zu bekommen, oder wegen der niedrigen Empfindlichkeit, die sich aus der Messung nur eines einzigen Markers ergibt, als nicht erfolgreich erwiesen. Beispielsweise hat es sich als schwierig erwiesen, einfach passende menschliche DNA aus einer Art von heterogener Probe (Stuhl) zu erhalten. Siehe Villa et al., Gastroenterol., 110: 1346–1353 (1996) (die berichten, dass nur 44,7% aller Stuhlproben und nur 32,6% der Stühle von gesunden Individuen ausreichend DNA für eine Mutationsanalyse erzeugten). Andere Berichte, bei denen passende DNA erhalten wurde, haben eine geringe Empfindlichkeit beim Identifizieren des Krankheitsstatus eines Patienten auf der Basis einer einzigen, mit Krebs in Verbindung stehenden Mutation berichtet. Siehe Eguchi et al., Cancer, 77: 1707–1710 (1996) (unter Verwendung einer p53-Mutation als ein Marker für Krebs).

[0007] Sidransky et al. (Science 278, 7. November 1997, 1054–1058) offenbart Marker auf Nucleinsäure-Basis zur Verwendung beim Nachweis von Krebs, sowie Einschränkungen ihrer klinischen Verwendung.

[0008] Dementsprechend gibt es in der Technik ein Bedürfnis nach hochempfindlichen, hochspezifischen Untersuchungen zum Nachweisen molekularer Indizien bzw. Anzeichen für Krebs, insbesondere in heterogenen Proben.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0009] Verfahren der Erfindung lösen das Problem, genaue (hochempfindliche und hochspezifische) Ergebnisse in einer Untersuchung bzw. einem Assay hinsichtlich Indizien für Krebs oder eine Krebsvorstufe in einer heterogenen Probe zu erhalten.

[0010] Die vorliegende Erfindung stellt Untersuchungen, die an Proben durchgeführt werden, die von Körperausscheidungen und Körperflüssigkeiten erhalten wurden, auf Krebs oder eine Krebsvorstufe bereit, wobei die Untersuchungen eine hohe Empfindlichkeit zum Nachweis von Krebs oder einer Krebsvorstufe, wenn er (sie) in einer Patienten-Probe vorhanden ist, und eine hohe Spezifität gegen falsch-positive Ergebnisse haben. In einer bevorzugten Ausführungsform ergeben Verfahren der Erfindung die Vorteile einer hohen Empfindlichkeit und einer hohen Spezifität bei einer Untersuchung zum Nachweisen einer kleinen Menge eines Krebs-Markers (z.B. einer Nucleinsäure) in einer heterogenen Probe mit vorwiegend nicht-kanzerösen Zellen und zellulären Bruchstücken. Dementsprechend sind solche Verfahren insbesondere nützlich zur Früherkennung von Krebs oder einer Krebsvorstufe. Verfahren der Erfindung erhöhen stark die Genauigkeit molekularer Durchmusterungsuntersuchungen und diagnostischer Untersuchungen zur Früherkennung von Krebs oder einer Krebsvorstufe.

[0011] Die vorliegende Erfindung betrachtet es als einen Grund, dass nicht-invasive Verfahren des Stands der Technik (d.h. Verfahren, die an Proben durchgeführt wurden, die nicht-invasiv oder minimal-invasiv erhalten wurden) zum Nachweisen molekularer Indizien (insbesondere Nucleinsäure-Mutationen) für Krebs dabei versagt haben, zufriedenstellende Ergebnisse zu liefern, dass derartige Verfahren sich nicht der Aufrechterhaltung einer hohen Spezifität und/oder einer hohen Empfindlichkeit bei der Untersuchung gewidmet haben. Derartige Verfahren versagen auch dabei, die Vorteile der Verbindung der Merkmale hoher Empfindlichkeit und hoher Spezifität in einer Untersuchung zum Nachweisen früher Indizien für Krebs, insbesondere wenn der Nachweis in einer heterogenen Probe durchgeführt wird, zu erkennen. Die vorliegende Erfindung erkennt, dass Durchmusterungsuntersuchungen auf Indizien für Krebs, insbesondere Krebs im Frühstadium (z.B. wenn Krebsindizien etwa 1% der Zellen und der zellulären Bruchstücke in einer geeigneten Probe darstellen, wie unten diskutiert), durch Erhöhen der Spezifität und/oder der Empfindlichkeit des Assay verbessert werden. Wie unten beschrieben, kann die Spezifität und die Empfindlichkeit molekularer Untersuchungen auf mehrere Arten verbessert werden.

[0012] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Nachweisen von Krebs oder einer Krebsvorstufe bereitgestellt, aufweisend das Durchmustern bzw. Untersuchen einer Probe eines Patienten, die nicht-invasiv oder minimal-invasiv erhalten wurde, auf das Vorliegen eines oder mehrerer Nucleinsäure-Indizien, die auf Krebs oder eine Krebsvorstufe hinweisen, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleinsäure-Indizien ausgewählt werden aus (a) der Länge der Nucleinsäuren in der Probe; und (b) dem Verhältnis von Nucleinsäuren mit einer Länge von mehr als etwa 200 bp zu Nucleinsäuren mit einer Länge von weniger als etwa 200 bp in der Probe; wobei sich die Länge und das Verhältnis bei Patienten mit Krebs oder einer Krebsvorstufe und Patienten, die keinen Krebs oder keine Krebsvorstufe haben, unterscheiden, und wobei die Probe von Körperausscheidungen oder von Körperflüssigkeiten erhalten wird.

[0013] In einer bevorzugten Ausführungsform analysieren Durchmusterungsuntersuchungen der Erfindung mindestens zwei, und bevorzugt zwischen etwa drei und etwa zwanzig, Marker (z.B. Mutationen, Verlust an Heterozygotität, Sequenzlängenvariationen, Nucleinsäure-Molekulargewichtsvariationen, Variationen der Mengen an amplifizierbarer Nucleinsäure) in Patienten-Proben, um die Empfindlichkeit und Spezifität des Nachweises zu verbessern. Derartige „Mehrfachziel“-Untersuchungen erlauben eine verbesserte Empfindlichkeit, weil die erhöhte Anzahl an Markern, die analysiert werden, die Wahrscheinlichkeit verringert, dass ein Patient, der Indizien für Krebs oder eine Krebsvorstufe aufweist, fälschlich als negativ (d.h. als krebsfrei) diagnostiziert wird.

[0014] Verfahren der Erfindung umfassen auch das Kombinieren eines Nachweises einer Mutation, die dafür bekannt ist oder von der vermutet wird, dass sie mit Krebs oder einer Krebsvorstufe in Verbindung steht, mit dem Nachweis eines Verlusts an Heterozygotität an einem relevanten genomischen Locus. Die Kombination des Analysierens sowohl von Mutationen bei Krebs-assoziierten Nucleinsäuren, als auch eines Verlusts an Heterozygotität erhöht die Spezifität und die Empfindlichkeit einer beliebigen Durchmusterungsuntersuchung für Krebs oder eine Krebsvorstufe. In einer bevorzugten Ausführungsform beträgt die Empfindlichkeit der Untersuchung mindestens 50%, und die Spezifität der Untersuchung beträgt mindestens 85%.

[0015] Verfahren der Erfindung umfassen das Kombinieren von zwei oder mehr Untersuchungen auf molekulare Indizien für Krebs oder eine Krebsvorstufe, um ein gewünschtes Informationswert-Niveau zu erreichen. Beispielsweise umfassen in einer bevorzugten Ausführungsform Verfahren der Erfindung das Kombinieren von zwei oder mehr Untersuchungen, die aus quantitativer PCR, multipler Mutationsanalyse, dem Nachweis eines Verlusts an Heterozygotität und einer Hybridisierungsbindung eines oder mehrerer mutierter Nucleinsäure-Marker ausgewählt werden. Dementsprechend wird eine erhöhte Empfindlichkeit und eine erhöhte Spezifität beobachtet, wenn eine Untersuchung auf der Basis der Menge an amplifizierbarer DNA mit einer Untersuchung hinsichtlich einer bestimmten Krebs-assoziierten Mutation kombiniert wird. Beispiele für diese „Kombinationsassays“ und ihre sich ergebenden Empfindlichkeiten und Spezifitäten sind in der genauen Beschreibung angegeben. Derartige Verfahren sind insbesondere nützlich, wenn sie auf eine heterogene Probe angewendet werden, in der die nachzuweisende Nucleinsäure relativ zu anderen Nucleinsäuren (sowie anderen Molekülen) in der Probe in einer sehr kleinen Menge vorliegt.

[0016] Verfahren der Erfindung machen auch vom „Informationswert“ von hierin verwendeten Markern Gebrauch. Der Informationswert eines Nucleinsäure-Markers betrifft die Wahrscheinlichkeit, den Marker in einer positiven Probe zu finden. So bedeutet es, wenn eine bestimmte Mutation, beispielsweise eine Mutation im Codon 12 von Kras, einen Informationswert für Krebs von 56% hat, dass 56% der positiven Patienten-Proben (d.h. jenen, die von Patienten genommen wurden, die Krebs haben) die Kras-Mutation haben. Verfahren der Erfindung kombinieren die Verwendung von informativen Markern (z.B. Mutationen) und von Untersuchungen hoher Empfindlichkeit/Spezifität, um verlässliche Durchmusterungsuntersuchungen zur Frühdiagnose von Krebs oder einer Krebsvorstufe, insbesondere in heterogenen Proben, bereitzustellen. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung ist eine Mutation eine Deletion, eine Addition, eine Substitution, eine Umordnung oder eine Translokation bei einer Nucleinsäure. Ein Verlust an Heterozygotität ist eine Mutationsform, bei der ein ganzes Allel oder ein Teil eines Allels weggelassen wird. Ebenfalls für die Zwecke der vorliegenden Erfindung umfassen die Begriffe „Marker“, „Ziele“ und „Mutationen“ Nucleinsäure (insbesondere DNA)-Mutationen (Substitutionen, Additionen, Umordnungen, Translokationen, Deletionen, etc.) sowie andere Nucleinsäure-Indizien, die bei Verfahren der Erfindung brauchbar sind. Derartige Indizien umfassen die Menge an amplifizierbarer Nucleinsäure in einer Probe, die Länge der Nucleinsäuren in einer Probe, das Verhältnis von langen Nucleinsäuren (mehr als etwa 200 bp) zu kurzen Nucleinsäuren (weniger als etwa 200 bp) und irgendwelche anderen Nucleinsäure-Variationen, die sich bei Patienten mit Krebs und krankheitsfreien Patienten unterscheiden. Ebenfalls für die Zwecke der vorliegenden Erfindung sollen die Begriffe „gesund“ oder „krankheitsfrei“ einen Patienten bedeuten, der keinen Krebs oder keine Krebsvorstufe hat.

[0017] Stuhl ist ein gutes Beispiel für eine heterogene Probe, bei der Verfahren der Erfindung besonders brauchbar sind. Eine typische Stuhlprobe enthält Patienten-Nucleinsäuren, enthält aber auch heterologe Nucleinsäuren, Proteine und andere zelluläre Bruchstücke, die mit der lytischen Funktion der verschiedenen Nucleasen, Proteinasen, etc., die im Kolon zu finden sind, vereinbar sind. Stuhl wird (unter normalen Umständen) fest, wenn er sich vom proximalen Kolon zum distalen Kolon bewegt. Wenn der sich verfestigende Stuhl durch das Kolon hindurch geht, werden Kolon-Epithelzellen auf den Stuhl abgeschilfert. Wenn ein Patient einen sich entwickelnden Tumor oder ein Adenom hat, werden Zellen des Tumors oder des Adenoms ebenfalls auf den Stuhl abgeschilfert, und sie (oder ihre Bruchstücke) enthalten molekulare Krankheitsindizien (z.B. Mutationen oder Verlust an Heterozygotität). In den frühen Entwicklungsstadien macht Nucleinsäure, die ein Adenom oder einen Tumor anzeigt, nur etwa 1% der Nucleinsäure in einem entleerten Stuhl aus. Wenn ein Patient unbehan-

delt bleibt, findet man im Lauf der Zeit proportional mehr mit der Krankheit im Zusammenhang stehende Nucleinsäuren. Verfahren der Erfindung sind nützlich zum Nachweisen von Läsionen im Frühstadium in heterogenen Proben wie Stuhl. Verfahren der Erfindung führen zu einem hohen Grad an Empfindlichkeit und Spezifität zum Nachweis einer Krankheit im Frühstadium. Verfahren der Erfindung sind insbesondere nützlich zum Nachweisen von, beispielsweise, Adenomen im Kolon. Adenome sind nicht-metastatische Läsionen, die oft das Potenzial zur Metastase haben. Wenn alle Adenome in einem Patienten nachgewiesen und entfernt werden, ist die Wahrscheinlichkeit einer völligen Heilung praktisch sicher.

[0018] In einer bevorzugten Ausführungsform werden Nucleinsäuren oder Nucleinsäure-Mutationen mit einem hohen Grad an Informationswert ausgewählt. Es wird (werden) eine oder mehrere Untersuchung(en) durchgeführt, um eine oder mehrere informative Nucleinsäuren zuverlässig nachzuweisen, und eine Diagnose wird auf der Basis des Vorliegens irgendeiner der informativen Nucleinsäuren in einer Patientenprobe erstellt. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Nucleinsäuren auf der Basis ihrer Länge und/oder Sequenz-Charakteristiken als Ziele zur Analyse in Verfahren der Erfindung ausgewählt. Beispielsweise wurde nun herausgefunden, dass die Menge und/oder Länge von Nucleinsäuren in Stuhl (einer prototypischen heterogenen Probe) einen hohen Grad an Informationswert bezüglich des Krankheits-Status eines Patienten aufweist. Patienten, die beispielsweise ein Adenom haben, erzeugen Stuhlproben, die mehr und längere DNA enthalten als Proben, die von gesunden Patienten erzeugt wurden. Darüber hinaus ist eine Anzahl hochgradig informativer DNA-Mutationen in Verfahren der Erfindung nützlich. Dazu gehören Mutationen in dem Onkogen, Kras (insbesondere Mutationen in den Codonen 12 und 13); Mutationen in dem Zellzyklus-Regulator, p53; Mutationen in dem Gen *apc*; Mutationen in dem Segment *bat-26* des Fehlpaarungs-Reparaturgens *MSH2*; und Verlust an Heterozygotie (typischerweise durch einen massiven Verlust an DNA in einem Allel, aber nicht dem anderen, angezeigt). Schließlich sorgen Verfahren der Erfindung dafür, dass der Informationswert einer Untersuchung erhöht wird, indem sie mehrere Mutationen gleichzeitig oder in Folge durchmustern, oder indem sie unterschiedliche Untersuchungen kombinieren.

[0019] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform stellen Verfahren der Erfindung informative molekulare Untersuchungen auf Krebs oder eine Krebsvorstufe bereit, indem sie Proben zur Analyse liefern, die ausreichend amplifizierbare Nucleinsäure haben. So umfassen Verfahren der Erfindung, in einer Ausführungsform, das Durchmustern von Proben auf amplifizierbare DNA; das Klassifizieren von Proben auf der Basis der Menge an DNA, die aus ihnen amplifiziert werden kann; und das weitere Durchmustern der Proben mit einer vorbestimmten Schwelle an amplifizierter oder amplifizierbarer DNA hinsichtlich des Vorliegens einer Mutation, die Krebs oder eine Krebsvorstufe anzeigt.

[0020] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform umfassen Verfahren der Erfindung das Auswählen eines oder mehrerer Mutationsereignisse, die Krebs oder eine Krebsvorstufe anzeigen, so dass der vereinigte Informationswert des einen Ereignisses oder der mehreren Ereignisse einem vorbestimmten oder gewünschten Informationswert-Niveau entspricht oder es überschreitet. Der Informationswert irgendeiner Mutation oder einer Kombination von Mutationen kann durch eine akzeptierte invasive Durchmusterungstechnik bestätigt werden. Beispielsweise kann in Verfahren zum Nachweisen von kolorektalem Krebs der Informationswert einer molekularen Untersuchung durch Identifizieren einer Läsion unter Verwendung einer Kolonoskopie bestimmt werden.

[0021] Eine genaue Beschreibung bestimmter bevorzugter Ausführungsformen der Erfindung ist unten angegeben. Andere Ausführungsformen der Erfindung werden bei der Durchsicht der genauen Beschreibung, die folgt, offenkundig.

GENAUE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0022] [Fig. 1](#) ist ein Polyacrylamidgel, das beispielhaft Amplifizierungen „A“, „B“, „C“ und „F“ zur Verwendung in Untersuchungen zur Bestimmung einer Menge an amplifizierbarer Nucleinsäure in einer Probe zeigt. Die Bahnen 1, 4, 5, 6 und 7 zeigen eine Amplifizierung „A“, Bahn 2 zeigt eine Amplifizierung „C“, Bahn 3 zeigt eine Amplifizierung „B“, und Bahn 8 zeigt eine Amplifizierung „F“ (keine amplifizierbare DNA).

GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0023] Verfahren der Erfindung stellen nicht-invasive oder minimal-invasive Untersuchungen zum Nachweis von Krebs oder einer Krebsvorstufe in frühen Stadien der Krankheit bereit. Verfahren der Erfindung sind insbesondere nützlich zum Nachweisen von Krebs oder einer Krebsvorstufe in heterogenen biologischen Proben. Bevorzugte Verfahren umfassen das Identifizieren einer oder mehrerer Nucleinsäure-Mutation(en), die eine

hohe Empfindlichkeit und eine hohe Spezifität zum Nachweis der Anzeichen für Krebs oder eine Krebsvorstufe ergibt (ergeben), in einer Patienten-Probe. Verfahren der Erfindung können das Identifizieren von Mutationen mit einem bekannten Informationswert für Krebs oder eine Krebsvorstufe aufweisen, oder sie können auf einer Bestätigung ausgewählter Mutationen oder Untersuchungen zu ihrem Nachweis hinsichtlich einer Standarduntersuchung auf Krebs basieren. Durch Verwendung von Krebs- oder Krebsvorstufen-Markern mit einer hohen Empfindlichkeit/Spezifität zum Nachweis des Vorliegens von Krebs oder einer Krebsvorstufe schaffen Verfahren der Erfindung Verbesserungen in nicht-invasiven oder minimal-invasiven molekularen Durchmusterungsuntersuchungen. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung bedeutet nicht-invasiv oder minimal-invasiv, dass Proben zur Analyse entweder von Körperausscheidungen (z.B. Stuhl, Eiter, Sputum) oder von Körperflüssigkeiten wie Blutaspirat oder Lymphe erhalten werden.

[0024] Die Erfindung wird beispielhaft mit Experimenten zum Nachweisen des Vorliegens von Indizien für kolorektalen Krebs oder eine kolorektale Krebsvorstufe in Proben, die aus Patienten-Stuhlproben hergestellt wurden, veranschaulicht. Der Fachmann erkennt jedoch, dass Verfahren der Erfindung unter Verwendung einer Vielfalt unterschiedlicher Proben ausgeführt werden können, um eine Vielfalt von Krebsarten nachzuweisen.

[0025] Ein Grund, dass der Nachweis von kolorektalem Krebs oder einer kolorektalen Krebsvorstufe (z.B. eines Adenoms) beispielhaft veranschaulicht wird, ist, dass eine Stuhlprobe ein gutes Beispiel für eine heterogene Umgebung ist, in der Verfahren der Erfindung insbesondere nützlich sind (siehe oben). Darüber hinaus ist die Kolonoskopie (und die Sigmoidoskopie, eine verwandte Technik) ein wohlbekannter invasiver Standard, der eine hohe Empfindlichkeit und eine hohe Spezifität (wenn auch hohe Kosten und geringe Zustimmung der Patienten) hat, womit Verfahren der Erfindung verglichen und bestätigt werden können.

[0026] Verfahren der Erfindung umfassen das Durchmustern einer Probe, wie einer, die aus einer Stuhlprobe hergestellt wurde, hinsichtlich des Vorliegens eines Markers oder mehrerer Marker für Krebs oder eine Krebsvorstufe (z.B. einen kolorektalen Tumor oder ein Adenom), so dass die Nachweisempfindlichkeit zwischen etwa 50% und etwa 100% liegt und die Nachweisspezifität zwischen etwa 85% und etwa 100% liegt. In einer bevorzugten Ausführungsform kombinieren Verfahren der Erfindung verschiedene Arten von Untersuchungen, um insgesamt eine Erhöhung der Empfindlichkeit und der Spezifität zu erzielen. So umfassen Verfahren der Erfindung das Durchführen einer Untersuchung auf eine Mutation, von der bekannt ist, dass sie mit Krebs oder einer Krebsvorstufe in Verbindung steht, und einer Untersuchung hinsichtlich der Menge und/oder der Länge an DNA, von der erwartet wird, dass sie bei Krebs oder einer Krebsvorstufe auftritt, um die kombinierten Vorteile und die Empfindlichkeit und Spezifität beider Untersuchungen zu erhalten. Darüber hinaus ist in dem Konzept der Verwendung multipler Nucleinsäure-Analysen zum Nachweisen von Krebs oder einer Krebsvorstufe die Verwendung multipler genomischer Ziele in jeder Untersuchung, um weitere Erhöhungen der Empfindlichkeit und der Spezifität zu schaffen, eingebettet. Jedoch ist zur Ausführung der Erfindung, wie unten gezeigt, eine Einzelmarker-Untersuchung ausreichend, wenn ihre Empfindlichkeit und Spezifität innerhalb der hierin gelehrt Bereiche sind.

[0027] Die gemäß der Erfindung verwendeten genomischen Ziele und Untersuchungsverfahren können in Abhängigkeit von dem gewünschten Grad an Empfindlichkeit und Spezifität, sowie von der Art des Krebses oder der Krebsvorstufe, dessen (deren) Nachweis erwünscht ist, variieren. Genomische Ziele (z.B. Mutationen) werden auf der Basis ihrer bekannten Empfindlichkeit oder Spezifität oder durch Bestimmen einer Grundlinien-Empfindlichkeit und -Spezifität ausgewählt. In bevorzugten Ausführungsformen umfassen Verfahren der Erfindung den Nachweis einer Mutation an einem einzigen, informativen Locus. In anderen Ausführungsformen werden Untersuchungen hinsichtlich informativer Loci kombiniert, um eine verbesserte Empfindlichkeit und Spezifität des Nachweises, bezogen auf invasive Techniken, zu erzielen. Dementsprechend erwägen Verfahren der Erfindung eine Kombination von Untersuchungen, die ausgewählt werden aus multiplem Mutationsnachweis, quantitativer Polymerasekettenreaktion (d.h. zur Bestimmung der Menge an amplifizierbarer DNA in einer Probe), sequenzspezifischer Hybridisierungsbindung, Oligo-Ligation, Amplifikation Refractory Mutation System, Nachweis von Einzelstrang-Konformationspolymorphismus, Sequenzieren, Fehlpaarungs-Nachweis und Einzelbasen-Extension. Zielorte umfassen die Chromosome 1, 5, 8, 17 und 18, insbesondere Chromosom 5q, Chromosom 17p, Chromosom 8p, Chromosom 1q und Chromosom 18q. Bevorzugte Orte bzw. Loci zur Verwendung bei Verfahren der Erfindung umfassen p53, apc, bat-26 und andere, von denen vermutet wird, dass sie auf Krebs oder eine Krebsvorstufe schließen lassen.

[0028] Von anderen Genen ist bekannt, dass sie mit kolorektalem Krebs in Verbindung stehen, und ihre Empfindlichkeit und Spezifität werden, wenn sie nicht in der Literatur bekannt sind, durch Bestimmen des Prozentsatzes der Tumore, die die Mutation tragen, und des Prozentsatzes gesunder Proben, die die Mutation tragen, aus einer ausreichend großen und mannigfaltigen Population bestimmt. Dies kann empirisch oder mathema-

tisch unter Verwendung von Algorithmen, die die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver und falsch-negativer Durchmusterungsergebnisse auf der Basis von Daten, die das Vorliegen einer Mutation mit dem Vorliegen von Krebs oder einer Krebsvorstufe in Verbindung bringen, vorhersagen, gemacht werden. Die Bestätigung des klinischen Status eines Patienten kann durch einen Standardtest wie eine Kolonoskopie im Falle von kolorektalem Krebs (die eine typische Empfindlichkeit von 95% und eine typische Spezifität von 100% hat) bewerkstelligt werden.

[0029] Für die Analyse von Stuhlproben umfassen bevorzugte Verfahren der Erfindung das Erhalten mindestens eines Querschnitts- oder Umfangs-Bereichs eines entleerten Stuhls, wie in dem US-Patent Nr. 5 741 650 gelehrt. Ein Querschnitts- oder Umfangs-Bereich von Stuhl ist zwar wünschenswert, aber hierin angegebene Verfahren werden an von entleertem Stuhl erhaltenen Zufallsstichproben, wozu Abstriche oder Abschabesel gehören, durchgeführt. Sobald die Stuhlprobe erhalten wird, wird sie homogenisiert. Ein bevorzugter Puffer zur Homogenisierung ist einer, der mindestens 16 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) enthält. Es wurde jedoch herausgefunden, dass die Verwendung von mindestens 150 mM EDTA die Ausbeute an Nucleinsäure aus Stuhl stark verbessert. So weist ein bevorzugter Puffer zur Stuhlhomogenisierung phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 20–100 mM NaCl oder KCl, mindestens 150 mM EDTA, und gewünschtenfalls ein Detergens (wie SDS) und eine Proteinase (z.B. Proteinase K) auf.

[0030] Nach der Homogenisierung wird Nucleinsäure bevorzugt aus der Stuhlprobe isoliert. Eine Isolierung oder Extraktion von Nucleinsäure ist nicht bei allen Verfahren der Erfindung erforderlich, da bestimmte Nachweistechniken im homogenisierten Stuhl ohne Isolierung von Nucleinsäuren angemessen durchgeführt werden können. In einer bevorzugten Ausführungsform wird homogenisierter Stuhl jedoch geschleudert, um einen Überstand zu erzeugen, der Nucleinsäuren, Proteine, Lipide und andere zelluläre Bruchstücke enthält. Der Überstand wird mit einem Detergens und Proteinase behandelt, um Protein abzubauen, und die Nucleinsäure wird mit Phenol-Chloroform extrahiert. Die extrahierten Nucleinsäuren werden dann mit Alkohol ausgefällt. Es können andere Techniken verwendet werden, um Nucleinsäure aus der Probe zu isolieren. Zu derartigen Techniken gehören Hybridisierungsbindung und Amplifizierung direkt aus dem homogenisierten Stuhl. Nucleinsäuren können in dem Ausmaß, das für die zu verwendende Durchmusterungsuntersuchung erforderlich ist, gereinigt und/oder isoliert werden.

[0031] Zu analysierende Nucleinsäuren werden ausgewählt auf der Basis bekannter oder vermuteter Beziehungen zwischen spezifischen Mutationen und Krebs oder einer Krebsvorstufe. Gewünschtenfalls wird eine sequenzspezifische Hybridisierungsbindung verwendet, um spezifische Nucleinsäuren aus der Probe zu isolieren. Ziel-Nucleinsäuren können nach irgendeinem Verfahren des Stands der Technik analysiert werden. Zu Beispielen für bevorzugte Verfahren gehören die enumerative Analyse des Verlusts an Heterozygotität, wie in dem US-Patent Nr. 5 670 325 gelehrt. Enumerative Verfahren erfordern keine Kenntnis der Sequenz einer mutierten Nucleinsäure. Vielmehr bestimmen derartige Verfahren, dass es eine Veränderung (Deletion, Substitution, Addition, Umordnung oder eine andere Mutation) bei einer Nucleinsäure vom Wildtyp gegeben hat. Die untersuchten Loci werden ausgewählt auf der Basis der Wahrscheinlichkeit einer Veränderung, die mit Krebs oder einer Krebsvorstufe in Verbindung steht. Enumerative Verfahren vergleichen die Anzahl einer Nucleinsäure vom Wildtyp, von der bekannt ist, dass sie bei Krebs oder einer Krebsvorstufe nicht verändert wird, mit der Anzahl einer Nucleinsäure vom Wildtyp, von der bekannt ist oder vermutet wird, dass sie bei Krebs oder einer Krebsvorstufe verändert wird, in einer Probe. Ein statistisch signifikanter Unterschied in den zwei Anzahlen zeigt ein positives Ergebnis an.

[0032] Mutationen in Ziel-Nucleinsäuren können auch durch Einzelbasen-Extensionstechniken gemessen werden, um eine einzelne Nucleotid-Variante, die Krebs oder eine Krebsvorstufe anzeigt, zu identifizieren. Bevorzugt werden Einzelbasen-Extensionsuntersuchungen einem Zyklus unterzogen. Kurz gesagt, Einzelbasen-nextensions-Zyklusreaktionen umfassen ein Binden bzw. Annealing eines Nucleinsäure-Primers unmittelbar 5' an einen Bereich, der eine nachzuweisende Einzelbase enthält. Die nachzuweisende Einzelbase stellt einen Mutations-Marker dar. Die Mutation kann eine Einzelpunktmutation sein oder kann eine größere Mutation, für die die Einzelbase ein Marker ist, sein. Es werden zwei getrennte Reaktionen durchgeführt. Bei der ersten Reaktion wird Primer an das Ziel bzw. Target gebunden, und markierte (bevorzugt ³²P) Nucleinsäuren, die an der nachzuweisenden Einzelbase komplementär zu Nicht-Wildtyp (z.B. Mutanten, die eine Krankheit anzeigen)-Varianten sind, und unmarkierte Dideoxy-Nucleinsäuren, die zu der Wildtyp-Base komplementär sind, werden vereinigt. Die Primerextension wird das erste Mal gestoppt, wenn eine Wildtyp (Dideoxy)-Base zu dem Primer zugegeben wird. Das Vorliegen einer Markierung in dem verlängerten Primer zeigt das Vorliegen einer Mutation an. Ein zweites Röhrchen, die positive Kontrolle, enthält markierte, zu der Wildtyp-Base komplementäre Nucleinsäure in Anwesenheit des Primers. Eine DNA-Polymerase, wie Sequenase™ (Amersham), wird zur Primerextension verwendet. In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine thermisch stabile Polymera-

se, wie Taq oder thermische Sequenase, verwendet, um eine effizientere Zyklusreaktion zu erlauben. Wenn eine Extensionsreaktion vollendet ist, wird die an Ziel-Nucleinsäuren gebundene erste und zweite Sonde durch Erhitzen des Reaktionsgemisches auf über die Schmelztemperatur der Hybride dissoziiert. Das Reaktionsgemisch wird dann unter die Schmelztemperatur der Hybride abgekühlt, und in einer weiteren Runde von Extensionsreaktionen lässt man zusätzlichen Primer sich mit Ziel-Nucleinsäuren verbinden. In einer bevorzugten Ausführungsform werden 10 bis 50 Zyklen von Extensionsreaktionen durchgeführt. In einer am meisten bevorzugten Ausführungsform werden 30 Zyklen von Extensionsreaktionen durchgeführt. Nach Vollendung aller Zyklen werden die Extensionsprodukte isoliert und nachgewiesen. In alternativen Ausführungsformen können andere Kettenbeendungsverfahren als Dideoxy-Nucleotide verwendet werden. Beispielsweise tritt eine Kettenbeendigung auf, wenn keine zusätzlichen Basen zum Einbau an dem nächsten verfügbaren Nucleotid auf dem Primer verfügbar sind.

[0033] Verfahren der Erfindung sind auch nützlich zum Durchmustern von Populationen von Patienten, um charakteristische Eigenschaften in Populationsproben zu identifizieren, die Krebs oder ein Adenom anzeigen. Beispielsweise umfassen Verfahren der Erfindung ein hochempfindliches, hochspezifisches Durchmustern von Populationen von Patienten, um Nucleinsäure-Mutationen, die in einer Untergruppe von Patientenproben vorliegen, mit dem Vorliegen einer Krankheit bei jenen Patienten zu korrelieren. So umfassen Verfahren der Erfindung das Nachweisen genomischer Variationen in Patientenproben, das Korrelieren jener Variationen mit einer bestätigten Krankheit, und das Verwenden der mit einer bestätigten Krankheit im Zusammenhang stehenden Variationen als ein diagnostisches Muster für die Krankheit in nachfolgenden Patientenproben. Derartige Verfahren werden bevorzugt an Proben aus einem Pool, wie Stuhlproben, von identifizierten Patienten-Populationen (z.B. erkrankt, gesund) durchgeführt. Derartige Verfahren basieren bevorzugt auf Variationen in polymorphen Einzelnucleotid-Loci. Die Empfindlichkeit und Spezifität des Nachweises von Varianten in jenen Loci als eine Funktion einer Krankheit wird bestimmt. Jene Loci, die eine Krankheit in vordefinierten Ausmaßen an Empfindlichkeit und Spezifität vorhersagen, werden zur Verwendung in Durchmusterungsuntersuchungen für unbekannte Patientenproben ausgewählt.

[0034] Die folgenden Beispiele liefern eine spezifische beispielhafte Veranschaulichung der oben diskutierten Konzepte. Die Beispiele benutzen eine Untergruppe von Mutationsereignissen, von denen gezeigt wird, dass sie auf eine Krankheit schließen lassen. Bei anderen Mutationen wird davon ausgegangen, dass sie in Untersuchungen der Erfindung als diagnostische oder Durchmusterungs-Marker hoher Empfindlichkeit und hoher Spezifität wirken. Darüber hinaus sind die unten beispielhaft veranschaulichten Untersuchungen lediglich zu Illustrationszwecken. Die Erfindung betrachtet eine Vielfalt von Untersuchungen als brauchbar zur Durchmusterung von Patientenproben hinsichtlich Krebs oder einer Krebsvorstufe, solange die Untersuchungen ein vorbestimmtes Niveau an Empfindlichkeit und Spezifität von mindestens etwa 44% bzw. mindestens etwa 85% liefern.

BEISPIEL 1: Multiplex-Durchmusterung von Stuhlproben

[0035] Es wurde ein Experiment durchgeführt, um die Wirkungen einer multiplen Mutationsanalyse alleine auf die Empfindlichkeit und Spezifität des Nachweises von Krebs oder einer Krebsvorstufe in den oben beschriebenen Stuhlproben zu bestimmen. 15 Mutationen, die alle dafür bekannt sind oder von denen vermutet wird, dass sie bei kolorektalem Krebs oder einer Vorstufe von kolorektalem Krebs auftreten, wurden verwendet, um die 40 Patientenproben durchzumustern. Die folgende Tabelle listet die Mutationen, die untersucht wurden, auf.

TABELLE 1

Gen	Mutation
Kras, Codon 13	Position 2, G bis A
Kras, Codon 12	Position 1, G bis A
Kras, Codon 12	Position 2, G bis A
Apc, Codon 1450	Position 1, C bis T
Apc, Codon 1378	Position 1, C bis T
Apc, Codon 1367	Position 1, C bis T
Apc, Codon 1309	Deletion von 5 Basenpaaren
P53, Codon 175	Position 2, G bis A
P53, Codon 273	Position 1, C bis T
P53, Codon 273	Position 2, G bis A
P53, Codon 282	Position 1, C bis T
P53, Codon 245	Position 1, G bis A
P53, Codon 245	Position 2, G bis A
P53, Codon 248	Position 1, C bis T
P53, Codon 248	Position 2, G bis A

[0036] Gemäß Verfahren der Erfindung ist eine multiple Mutationsanalyse ein bevorzugtes Mittel zur Erhöhung der Empfindlichkeit und Spezifität des Nachweises von Krebs oder einer Krebsvorstufe. Beispielsweise gibt es kumulative Vorteile des Kombinierens des Informationswerts (siehe oben) einer Mutation an einem Allel (z.B. Kras, Codon 13, Position 2) mit dem Informationswert eines zweiten Allels (z.B. Kras, Codon 12, Position 1, oder apc, Codon 1450, Position 1), um die Gesamt-Empfindlichkeit und -Spezifität der Untersuchung zu erhöhen. Dementsprechend werden die Vorteile eines Aspekts der Erfindung unten angegeben.

[0037] Von 40 Individuen, die sich in der Mayo-Klinik (Rochester, MN) mit Symptomen oder einer Geschichte vorstellten, die anzeigte, dass eine Kolonoskopie durchgeführt werden sollte, wurden Stuhlproben gesammelt. Jede Stuhlprobe wurde eingefroren. Unmittelbar nach dem Liefern einer Stuhlprobe wurde an allen Individuen eine Kolonoskopie durchgeführt, um ihren Krankheits-Status zu bestimmen. Kolonoskopie, ein invasiver Test, der eine Sedierung des Patienten erfordert, hat eine Empfindlichkeit nahe an 95% und eine Spezifität von nahe an 100% für die Diagnose von Kolonneoplasie. Auf der Basis der Kolonoskopie-Ergebnisse und der nachfolgenden histologischen Analyse von Biopsieproben, die während der Kolonoskopie genommen wurden, wurden die Individuen einer von drei Gruppen zugeordnet: normal, Krebs und Adenom. Ein Adenom oder Polyp wird als klinisch relevant betrachtet, wenn es (er) einen Durchmesser von 1 cm oder größer hat. So hatten alle Individuen in der Adenomgruppe einen Polypen von mindestens 1 cm Durchmesser. Patienten in der Krebsgruppe hatten als Krebs diagnostizierte Tumore, und die krankheitsfreien Individuen waren jene, für die die Kolonoskopie kein Anzeichen für Krebs oder ein Adenom zeigte. Auf der Basis der Kolonoskopie-Ergebnisse wurden 21 Patienten mit Krebs diagnostiziert, 9 Patienten wurden mit einem Adenom von größer als 1 cm diagnostiziert, und 10 Patienten waren frei von Krebs oder einem Adenom.

[0038] Dann wurde an jeder Probe eine multiple Mutationsanalyse auf Blindbasis (d.h. die Wissenschaftler, die die Untersuchungen durchführten, kannten die Ergebnisse der Kolonoskopie oder Histologie nicht) durchgeführt. Jede gefrorene Stuhlprobe, mit einem Gewicht von 7 bis 33 g, wurde aufgetaut, in einem Verhältnis von Volumen zu Masse von etwa 3:1 in 500 mM m Tris, 16 mM EDTA und 10 mM NaCl, pH 9,0, homogenisiert. Die Proben wurden dann in demselben Puffer auf ein endgültiges Volumen-zu-Masse-Verhältnis von 20:1 erneut homogenisiert und in Glas-Makrokügelchen bei 2356 × g geschleudert. Der Überstand wurde gesammelt und mit SDS und Proteinase k behandelt. Die DNA wurde dann mit Phenol-Chloroform extrahiert und mit Alkohol ausgefällt. Die Ausfällung wurde in 10 mM Tris und 1 mM EDTA (1 × TE), pH 7,4, suspendiert. Schließlich wurde die DNA mit Rnase behandelt.

[0039] Menschliche DNA wurde aus der Ausfällung durch sequenzspezifische Hybridisierungsbindung isoliert. Biotinylierte Sonden gegen Abschnitte der Gene p53, K-ras und apc wurden verwendet. Die K-ras-Sonde war 5'GTGGAGTATTTGATAGTGATTAACTTATGTGTGAC 3' (SEQ ID NO: 1). Es gab zwei apc-Sonden:

apc-1309 war 5'TTCCAGCAGTGTACAGCACCCCTAGAACCAAATCCAG 3' (SEQ ID NO: 2), und apc-1378 war 5'CAGATAGCCCTGGACAAACAATGCCACGAAGCAGAAG 3' (SEQ ID NO: 3). Es gab vier Sonden gegen p53, die erste (die an einen Abschnitt von Exon 5 hybridisierte) war 5'TACTCCCCTGCCCTCAACAA-GATGTTTTGCCAACTGG 3' (SEQ ID NO: 4), die zweite (die an einen Abschnitt von Exon 7 hybridisierte) war 5'ATTTCTTCCATACTACTACCCATCGACCTCTCATC 3' (SEQ ID NO: 5), die dritte, die ebenfalls an einen Abschnitt von Exon 7 hybridisierte, war 5'ATGAGGCCAGTGCCTTGGGGAGACCTGTGGCAAGC 3' (SEQ ID NO: 6); und schließlich hatte eine Sonde gegen Exon 8 die Sequenz 5'GAAAGGACAAGGGTGGTTGGGAG-TAGATGGAGCCTGG 3' (SEQ ID NO: 7). Eine aliquote Teilmenge von 10 µl jeder Sonde (20 pMol/Bindung) wurde einer Suspension, die 300 µl DNA in Anwesenheit von 310 µl 6 M GITC-Puffer enthielt, für 2 h bei Raumtemperatur zugegeben. Hybridisierungskomplexe wurden unter Verwendung von Streptavidin-beschichteten Kügelchen (Dyna) isoliert. Nach dem Waschen wurden Sonde-Kügelchen-Komplexe bei 25°C 1 h lang in 0,1 × TE-Puffer, pH 7,4, suspendiert. Die Suspension wurde dann 4 min lang bei 85°C erhitzt, und die Kügelchen wurden entfernt.

[0040] Gebundene DNA wurde dann unter Verwendung von PCR amplifiziert, im Wesentlichen wie in dem US-Patent Nr. 4 683 202 beschrieben. Sieben getrennte PCRs wurden unter Verwendung von Primern, die gegen Kras, apc und p53 gerichtet waren, doppelt durchgeführt. Es wurden die unten aufgelisteten Primer verwendet:

PCR-A-FOR	Kras	5' GCG GTC CCA AAA GGG TCA GTC CTG CTG AAA ATG ACT GAA 3' (SEQ ID NO: 8)	39
PCR-A-REV		5' (Biotin)GCG GTC CCA AAA GGG TCA GTC ATG AAA ATG GTC AGA GAA A 3' (SEQ ID NO: 9)	40
PCR-B-FOR	APC-1309	5' GCG GTC GCT TTT GGG TCA GTT GTA GTT CAT TAT CAT CTT T 3' (SEQ ID NO: 10)	40
PCR-B-REV		5' (Biotin)GCG GTC GCT TTT GGG TCA GTC TTC GCT CAG AGG ATC TTC A 3' (SEQ ID NO: 11)	40
PCR-C-FOR	APC-1378	5' GCG GTC GCA AAA GGG ACA GTA GGC ACA AAG CTG TTG AAT 3' (SEQ ID NO: 12)	39
PCR-C-REV		5' (Biotin)GCG GTC GCA AAA GGG ACA GTT ATC AAG TGA ACT GAC AGA A 3' (SEQ ID NO: 13)	41
PCR-D-FOR	APC-1450	5' GCG GTC CCA AAA GGG TCA GTC ACC TCC ACC ACC TCC TCA A 3' (SEQ ID NO: 14)	40
PCR-D-REV		5' (Biotin)GCG GTC CCA AAA GGG TCA GTG TAT CAG CAT CTG GAA GAA 3' (SEQ ID NO: 15)	39
PCR-E-FOR	p53 Exon 5	5' GCG GTC CCA AAA GGG TCA GTC CAT CTA CAA GCA GTC A 3' (SEQ ID NO: 16)	37
PCR-E-REV		5' (Biotin)GCG GTC CCA AAA GGG TCA GTC AGA CCT AAG AGC AAT CA 3' (SEQ ID NO: 17)	38
PCR-F-FOR	p53 Exon 7	5' GCG GTC CCA AAA GGG TCA GAT ACC ACC ATC CAC TAC AA 3' (SEQ ID NO: 18)	38
PCR-F-REV		5' (Biotin)GCG GTC CCA AAA GGG TCA GAG TAT GGA AGA AAT CGG TAA 3' (SEQ ID NO: 19)	39
PCR-G-FOR	p53 Exon 8	5' GCG GTC CCT TTT GGG TCA CTC TGC CTC TTG CTT CTC TTT T 3' (SEQ ID NO: 20)	40
PCR-G-REV		5' (Biotin)GCG GTC CCT TTT GGG TCA CTC TTG TCC TGC TTG CTT ACC T 3' (SEQ ID NO: 21)	40

[0041] Die Proben wurden 5 min lang auf 94°C erhitzt, und dann wurden 40 Zyklen zwischen 94°C, 60°C und 72°C (jeweils 1 min) durchgeführt, gefolgt von einem Zyklus bei 72°C für 5 min.

[0042] Das Vorliegen der in Tabelle 1 oben aufgelisteten 15 Mutationen wurde durch Zyklus-Einzelbasenextension (Zyklus-SBE), im Wesentlichen wie oben beschrieben, bestimmt. In Kürze, es wurden zwei Reaktionen durchgeführt. In der ersten Reaktion wurde Primer der nachzuweisenden Einzelbase benachbart hybridisiert. Zu der erwarteten mutierten Base komplementäres ³²P-markiertes Nucleotid und zu der Wildtyp-Base komplementäres unmarkiertes Dideoxynucleotid wurden zugegeben. Der Primer wurde verlängert, und das Vorliegen von markiertem Produkt zeigte an, dass in der Probe eine Mutation vorlag. Eine zweite Reaktion wurde als eine positive Kontrolle, in der nur markiertes Wildtyp-Komplement zu dem Reaktionsgemisch zugegeben wurde, durchgeführt. Die Primerextension unter Einbau der markierten Base stellte sicher, dass die Reaktion richtig ablief.

[0043] Bei der SBE verwendete Primer waren wie folgt:

Name Stelle Codon/Position Sequenz

Name	Site	Codon/Position	Sequence
SBE-A1	Kras	k12p.1	5' AAC TTG TGG TAG TTG GAG CT 3' (SEQ ID NO: 22)
SBE-A2	Kras	k12p.2	5' ACT TGT GGT AGT TGG AGC TG 3' (SEQ ID NO: 23)
SBE-A3	Kras	k13p.2	5' TGT GGT AGT TGG AGC TGG TG 3' (SEQ ID NO: 24)
SBE-B1	APC-I309	1309 (5)	5' AAA TAG CAG AAA TAA AA 3' (SEQ ID NO: 25)
SBE-C1	APC-I378	1367	5' CTC CCT CCA AAA GTG GTG CT 3' (SEQ ID NO: 26)
SBE-C2	APC-I378	1378	5' GTC CAC CTG TAC ACT ATG TT 3' (SEQ ID NO: 27)
SBE-D1	APC-I450	1450	5' CTC AAA CAG CAC AAA CCA AG 3' (SEQ ID NO: 28)
SBE-E1	p53 Exon 5	175p.2	5' CAT GAC GGA GGT TGT GAG GC 3' (SEQ ID NO: 29)
SBE-F1	p53 Exon 7	245p.1	5' GTA ACA GTT CCT GCA TGG GC 3' (SEQ ID NO: 30)
SBE-F2	p53 Exon 7	245p.2	5' TAA CAG TTC CTG CAT GGG CG 3' (SEQ ID NO: 31)
SBE-F3	p53 Exon 7	248p.1	5' CCT GCA TGG GCG GCA TGA AC 3' (SEQ ID NO: 32)
SBE-F4	p53 Exon 7	248p.2	5' CTG CAT GGG CGG CAT GAA CC 3' (SEQ ID NO: 33)
SBE-G1	p53 Exon 8	273p.1	5' GAC GGA ACA GCT TTG AGG TG 3' (SEQ ID NO: 34)
SBE-G2	p53 Exon 8	273p.2	5' ACG GAA CAG CTT TGA GGT GC 3' (SEQ ID NO: 35)
SBE-G3	p53 Exon 8	282p.1	5' GTG CCT ATC CTG GGA GAG AC 3' (SEQ ID NO: 36)

[0044] Die Reaktionen wurden durchgeführt unter Standard-Denaturierung, Bindung, Extension, wobei ein Zyklus von 30 Zyklen durchgeführt wurde, und auf einem 15%igen denaturierenden Polyacrylamidgel sichtbar gemacht. Anzahlen pro Minute (CPM) von jeder Zyklusreaktion wurden in einen Packard Instant-Abbilder (Draht-Raumzähler) eingegeben. Prozent Allel-Heterogenität wurde bestimmt als:

cpm-Mutante/cpm-Wildtyp

cpm 1% Mutante ctrl/cpm 1% Wildtyp ctrl

[0045] Eine positive Probe wurde definiert als eine, in der mindestens eine der zwei Kopien eine Mutation mit 1% Heterogenität für mindestens eine der Einzelbasen, die analysiert wurde, besaß. Jede Probe, in der mindestens eines der analysierten Gene eine Mutation doppelt zeigte, wurde als positiv betrachtet. Die Ergebnisse sind unten in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Gesamtzahlen an Patienten in der Krebs/Adenom- und der normalen Gruppe sind unter der Spalte „Patientenstatus“ gezeigt.

TABELLE 2

Patientenstatus durch Kolono-	durch SBE	Empfind-	Spezifität
skopie nachge-	nachgewiese-	lichkeit	der
wiesene Läsionen	ne Läsionen	der SBE	SBE
Krebs/Adenom 21/9 (30)	11/4	52%/44%	100%/100%
normal (10)	0	0	

[0046] Wie in Tabelle 2 gezeigt ist, identifizierte die multiple Mutationsanalyse unter Verwendung von SBE korrekt 11 von 21 kanzerösen Läsionen, die durch Kolonoskopie identifiziert wurden, für eine Empfindlichkeit von 52%. Die multiple Mutationsanalyse offenbarte 4 von 9 Adenomen für eine Empfindlichkeit von 44%. In beiden Fällen identifizierte die multiple Mutationsanalyse unter Verwendung von SBE korrekt alle krankheitsfreien Individuen, was zu keinen falsch-positiven Ergebnissen führte (Spezifität von 100%).

[0047] Ein Test auf fäkales okkultes Blut wurde an allen Proben von Patienten, bei denen ein Adenom diagnostiziert wurde, parallel mit dem SBE-Test durchgeführt. Das Testen auf fäkales okkultes Blut versagte dabei, irgendeine der 9 Adenom-positiven Proben zu diagnostizieren, und hatte so eine Empfindlichkeit von 0%. Dementsprechend hatte die multiple Mutationsanalyse eine weit größere Empfindlichkeit und Spezifität als die üblichste nicht-invasive Technik, die gegenwärtig verfügbar ist (fäkales okkultes Blut).

Beispiel 2 – Quantitative DNA-Analyse

[0048] In diesem Experiment wurden dieselben 40 Proben, die in Beispiel 1 beschrieben sind, unabhängig von einander hinsichtlich ihres Gesamtgehalts an DNA analysiert, um zu bestimmen, ob die Menge an ampli-

fizierbarer DNA in Stühlen, die von Individuen mit Krebs oder einer Krebsvorstufe erzeugt wurden, von der Menge an amplifizierbarer DNA, die in Stühlen von krebsfreien Individuen erzeugt wurde, verschieden war. Die Proben wurden "blind" analysiert und später wie unten beschrieben mit Koloskopie-Ergebnissen korreliert.

[0049] Aliquote Mengen der DNA, die von den oben in Beispiel 1 beschriebenen 40 Patienten erhalten wurde, wurden unter Verwendung der oben beschriebenen Primer amplifiziert. Jede Probe wurde durch 7 Loci doppelt amplifiziert (für insgesamt 14 Amplifikationen für jeden Locus). Die Produkte der PCR wurden auf ein 4%iges Nusieve (FMC Biochemical)-Gel (3% Nusieve, 1% Agarose) gebracht und mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) gefärbt. Die sich ergebende amplifizierte DNA wurde auf der Basis der relativen Intensität der gefärbten Gele eingestuft. Eine "A"-Amplifizierung ergab die größte kumulative Intensität (und daher die größte Menge an DNA) nach 40 Zyklen PCR, "B"- und "C"-Amplifizierungen ergeben proportional weniger Gelintensität; und "F"-Amplifizierungen ergeben keine oder wenig Intensität. [Fig. 1](#) zeigt beispielhaft A-, B-, C- und F-Amplifizierungen. Es gibt eine ausreichende Reproduzierbarkeit bei der PCR, um es dem Fachmann zu erlauben, eine Menge an amplifizierbarer Nucleinsäure auf der Basis von Standards für gesunde Populationen und Krebspopulationen oder auf der Basis der Betrachtung der Gelfotografie in [Fig. 1](#) zu klassifizieren. Die Untersuchung erfordert lediglich, dass man "A"-Amplifizierungen von jeglicher der "B"-, "C"- und "F"-Amplifizierungen unterscheidet. Eine "A"-Amplifizierung ist eine, die eine Bandenintensität derjenigen in Bahn 1 von [Fig. 1](#), oder einer anderen Gelbande ähnlicher Intensität (z.B. Bahnen 4, 5, 6 oder 7 von [Fig. 1](#)) hat. Die Marker an der rechten Seite von [Fig. 1](#) zeigen beispielhafte Mengen an DNA, die zu A-, B- und C-Amplifizierungen führen. So ergeben 200 pg DNA (Bahn 12 in der Figur) eine "A"-Amplifizierung, und 100 pg (Bahn 13 in der Figur) ergeben eine "B"-Amplifizierung, und 50 pg (Bahn 14 in der Figur) ergeben eine "C"-Amplifizierung.

[0050] Jegliche DNA-Probe, die 9 "A"-Amplifizierungen aus 14 möglichen ergab, wurde als für Krebs oder Adenom positiv eingestuft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 unten gezeigt:

TABELLE 3

Patienten-status	Anzahl an durch Koloskopie bestimmten Patienten	Anzahl an durch quantitative DNA-Analyse bestimmten Patienten ("A"-Amp.)	Empfindlichkeit der quantitativen DNA-Analyse	Spezifität der quantitativen DNA-Analyse
Krebs/Adenom (30)	21/9	14/5	67%/56%	100%/100%
krebsfrei (10)	0	0		

[0051] Wie in Tabelle 3 gezeigt ist, sagt die Menge an amplifizierbarer DNA im Stuhl den Krankheits-Status eines Patienten hochgradig gut voraus. Diese Ergebnisse passen mit der Idee zusammen, dass Patienten mit Krebs oder einem Adenom im Kolon mehr Zellen (und daher mehr DNA) auf den sich bildenden Stuhl abstoßen. Darüber hinaus ist die von Krebszellen oder Adenomzellen stammende DNA intakter als von normalen Zellen stammende DNA, da Krebszellen und Adenomzellen den apoptotischen Abbau von DNA vermieden haben.

Beispiel 3 – kombinierte multiple Mutationsanalyse und quantitative Analyse

[0052] Die in den Beispielen 1 und 2 oben erhaltenen Ergebnisse wurden kombiniert, um zu bestimmen, ob weitere Erhöhungen der Empfindlichkeit und der Spezifität beobachtet werden würden.

[0053] Eine positive Probe in diesem Experiment war eine, die eine "A"-Amplifizierung ergab und ein positives multiples Mutationsergebnis (unter den in Beispiel 1 beschriebenen Kriterien) ergab. Die Proben wurden auf "blinder" Basis (d.h. ohne a priori die Koloskopieergebnisse zu kennen) wie oben beschrieben hergestellt und analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 unten gezeigt:

TABELLE 4

Patienten- status	Anzahl an durch Kolono- skopie diagnosti- zierten Patienten	Anzahl an durch eine Kombination von quantita- tiver Analyse und multipler Mutation dia- gnostizierten Patienten	Empfindlich-	Spezifität
Krebs/ Adenom	21/9	16/7	76%/78%	100%/100%

[0054] Die Ergebnisse der kombinierten quantitativen Analyse und multiplen Mutationsanalyse zeigen eine Nachweisempfindlichkeit von 76% für Krebs und 78% für Adenome, wobei jede eine Spezifität von 100% hat. Diese Ergebnisse überschreiten jene anderer nicht-invasiver oder minimal-invasiver Techniken (z.B. Testen auf fäkales okkultes Blut, was eine Empfindlichkeit von 0 hat) bei Weitem.

Beispiel 4 – Diagnostische Untersuchung unter Verwendung von Bat-26

[0055] Der Fehlpaarungs-Reparaturort Bat-26 (in SEQ ID NO: 37 gezeigt) wurde als Nächstes verwendet, um dieselben 40 oben beschriebenen Proben zu prüfen. Deletionen in Bat-26 wurden mit kolorektalem Krebs oder Adenomen in Verbindung gebracht. Die Proben wurden hergestellt wie oben beschrieben. Ein Primer wurde an den Abschnitt des Bat-26-Locus unmittelbar stromauf des Poly-A-Gebiets hybridisiert. Unmarkiertes Deoxythymidin, ein Gemisch von markiertem und unmarkiertem Deoxycytosin, und unmarkiertes Dideoxyadenin wurden zusammen mit Polymerase zugegeben. Der Primer wurde durch den Poly-A-Bereich verlängert. Das markierte und unmarkierte Cytosin wurde um die nächsten drei Basen (Nucleotide 222–224, in der intakten Sequenz alles Guanine) so verlängert, dass in jeden verlängerten Primer eine Markierung eingebaut wurde. Nach dem Poly-A-Gebiet und den drei Guaninen gibt es in der intakten Sequenz zwei Thymidine. So beendet das Dideoxyadenosin die Primerextension durch Addition an das Ende eines Primers, der durch den Poly-A-Bereich und den Triguanin-Bereich verlängert wurde. Die Stränge wurden getrennt, und die Länge der Stränge wurde auf einem Polyacrylamidgel betrachtet, um Deletionen in dem Poly-A-Gebiet nachzuweisen. Die Ergebnisse sind unten in Tabelle 5 angegeben:

TABELLE 5

Patienten- status	Diagnose durch Kolono- skopie	Diagnose durch Bat-26- Nachweis	Empfindlich- keit des Bat-26- Nachweises	Spezifität des Bat-26- Nachweises
Krebs/ Adenom	21/9	4/0	19%/0%	100%/0%

[0056] Wie oben gezeigt, lieferte Bat-26 alleine nicht die hohe Empfindlichkeit, die unter Verwendung von multipler Mutation oder Quantifizierung alleine erzielt wurde, zeigte aber eine hohe Empfindlichkeit im Vergleich mit anderen Einzellocus-Nachweisuntersuchungen. Darüber hinaus ergab Bat-26, wie unten gezeigt, in Kombination mit den anderen oben beschriebenen Techniken eine Gesamterhöhung der Empfindlichkeit und der Spezifität.

Beispiel 5 – Kumulative Wirkungen von Kras, multipler Mutation, Quantifizierung und Bat-26

[0057] Die oben für Kras, multiple Mutationsanalyse, Quantifizierung und Bat-26 erhaltenen Ergebnisse wurden kombiniert, um die kumulativen Wirkungen der Verwendung von Kombinationen jener Techniken zu bestimmen, um in einer nicht-invasiven Untersuchung für Krebs oder eine Krebsvorstufe eine erhöhte Empfindlichkeit und Spezifität hervorzubringen. Die Ergebnisse sind unten in Tabelle 6 zusammengefasst:

TABELLE 6

Untersuchungs-Kombination	Kras und Quantifizierung und Bat-26	Quantifizierung und Bat-26	multiple Mutation und Quantifizierung und Bat-26
Empfindlichkeit für den Nachweis von Krebs/Adenom	80%/56%	80%/56%	90%/78%
Spezifität für den Nachweis von Krebs/Adenom	100%	100%	100%

[0058] Wie in der Zusammenfassung oben gezeigt ist, ergab die Kombination von multipler Mutationsanalyse, quantitativer PCR und Bat-26 eine Empfindlichkeit, die sich derjenigen der Kolonoskopie annäherte. Eine Kombination von multipler Mutationsanalyse und Quantifizierung alleine ergibt auch sehr hohe Empfindlichkeiten. Alle Untersuchungen führten zu einer Spezifität von 100% (keine falsch-positiven Ergebnisse), was mit der Kolonoskopie vergleichbar ist.

[0059] Die vorstehenden Experimente zeigen, dass selbst eine einzige hochempfindliche, hochspezifische, nicht-invasive oder minimal-invasive Untersuchung diagnostische Ergebnisse ergibt, die nicht-invasiven/minimal-invasiven Techniken des Stands der Technik überlegen sind, und sich den Ergebnissen, die mit dem anerkannten invasiven diagnostischen Standardverfahren (Kolonoskopie) beobachtet werden, annähern. Darüber hinaus führt eine nicht-invasive Untersuchung, die mehr als eine hochempfindliche/hochspezifische Technik verwendet, zu einer diagnostischen Genauigkeit, die sich 100% nähert. Daher schaffen Verfahren der Erfindung eine signifikante Verbesserung der Fähigkeit, eine genaue nicht-invasive Krebsdiagnose durchzuführen.

[0060] Die im Sequenzprotokoll verwendeten englischen Begriffe haben folgende deutsche Bedeutung:

<120> Methods for improving sensitivity and specificity of screening assays -
Verfahren zur Verbesserung der Empfindlichkeit und Spezifität von
Durchmusterungsuntersuchungen

<213> Artificial sequence - Künstliche Sequenz

<223> K-ras probe - K-ras-Sonde
apc probe apc-1309 - apc-Sonde apc-1309
apc probe apc-1378 - apc-Sonde apc-1378
p53 probe - p53 Sonde

Description of artificial sequence - Beschreibung der künstlichen Sequenz

BAT-26, wherein each "n" corresponds to a nucleotide of unknown identity - BAT-26, worin jedes "n" einem Nucleotid unbekannter Identität entspricht

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Lapidus, Stanley N
Shuber, Anthony P

<120> Methods for improving sensitivity and specificity of
screening assays

<130> EXT-030PC

<140>

<141>

<150> US 09/277,016

<151> 1999-03-26

<160> 37

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(37)

<223> K-ras probe

<400> 1

gtggagtatt tgatagtgtg ttaaccttat gtgtgac

<210> 2

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(37)

<223> apc probe apc-1309

<400> 2

ttccagcagt gtcacagcac cctagaacca aatccag

<210> 3

<211> 37

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(37)

<223> apc probe apc-1378

<400> 3

cagatagccc tggacaaaca atgccacgaa gcagaag

<210> 4

<211> 37

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(37)
<223> p53 probe

<400> 4
tactcccctg ccctcaacaa gatgttttgc caactgg

<210> 5
<211> 35
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(35)
<223> p53 probe

<400> 5
atttctttcca tactactacc catcgacctc tcatc

<210> 6
<211> 37
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(37)
<223> p53 probe

<400> 6
atgaggccag tgcgccttgg ggagacctgt ggcaagc

<210> 7
<211> 37
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(37)
<223> p53 probe

<400> 7
gaaaggacaa ggggtggttgg gagtagatgg agcctgg

<210> 8
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:PCR-A FOR
(K-Ras)

<400> 8

gcggtcccaa aagggtcagt cctgctgaaa atgactgaa

<210> 9

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR-A-REV
(K-Ras)

<400> 9

gcggtcccaa aagggtcagt catgaaaatg gtcagagaaa

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR-B-FOR
(APC-1309)

<400> 10

gcggtcgctt ttgggtcagt tgtagttcat tatcatcttt

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR-B-REV
(APC-1309)

<400> 11

gcggtcgctt ttgggtcagt cttcgctcac aggatcttca

<210> 12

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR-C-FOR
(APC-1378)

<400> 12

gcggtcgcaa aaggacagt aggcacaaag ctgttgaat

<210> 13

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR-C-REV
(APC-1378)

<400> 13

gcggtcgcaa aagggtcagt tatcaagtga actgacagaa

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR-D-FOR
(APC-1450)

<400> 14

gcggtcccaa aagggtcagt cacctccacc acctcctcaa

<210> 15

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR-D-REV
(APC-1450)

<400> 15

gcggtcccaa aagggtcagt gtatcagcat ctggaagaa

<210> 16

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR-E-FOR (p53
Exon 5)

<400> 16

gcggtcccaa aagggtcagt ccatctacaa gcagtca

<210> 17

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR-E-REV (p53
Exon 5)

<400> 17

gcggtcccaa aagggtcagt cagacctaag agcaatca

<210> 18

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR-F-FOR (p53
Exon 7)

<400> 18

gcgggtcccaa aagggtcaga taccaccatc cactacaa

<210> 19

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR-F-REV (p53
Exon 7)

<400> 19

gcgggtcccaa aagggtcaga gtatggaaga aatcggtaa

<210> 20

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR-G-FOR (p53
Exon 8)

<400> 20

gcgggtccctt ttgggtcact ctgcctcttg cttctctttt

<210> 21

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR-G-REV (p53
Exon 8)

<400> 21

gcgggtccctt ttgggtcact cttgtcctgc ttgcttacct

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> SBE-A1

<400> 22

aacttgttgggt agttggagct

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> SBE-A2

<400> 23
acttgtggta gttggagctg

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> SBE-A3

<400> 24
tgtggtagtt ggagctggtg

<210> 25
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(17)
<223> SBE-B1

<400> 25
aaatagcaga aataaaa

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> SBE-C1

<400> 26
ctccctccaa aagtgggtgct

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> SBE-C2

<400> 27
gtccacctgt acactatggt

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> SBE-D1

<400> 28
ctcaaacagc acaaaccaag

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> SBE-E1

<400> 29
catgacggag gttgtgaggc

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> SBE-F1

<400> 30
gtaacagttc ctgcatgggc

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> SBE-F2

<400> 31
taacagttcc tgcattggcg

<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> SBE-F3

<400> 32
cctgcatggg cgcatgaac
```

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> SBE-F4

<400> 33
ctgcatgggc ggcatgaacc

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> SBE-G1

<400> 34
gacggaacag ctttgaggtg

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> SBE-G2

<400> 35
acggaacagc tttgaggtgc

<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> SBE-G3

<400> 36
gtgcctatcc tgggagagac

<210> 37
<211> 314
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc feature

<222> (1)..(314)

<223> BAT-26, wherein each "n" corresponds to a nucleotide of unknown identity

<400> 37

```
ccagtggat agaaatcttc gatttttaaa ttcttaattt taggttcag tttcatcact 60
gtctgcgga atcaagtttt tagaactctt atcagatgat tccaactttg gacagtttga 120
actgactact tttgacttca gccagtatat gaaattggat attgcagcag tcagagccct 180
taaccttttt caggtaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aggggttaaaa atgttgattg 240
gttaannnnn nnngacagat agtgaagaag gcttagaaaag gagctaaaag agttcgacat 300
caatattaga caag                                     314
```

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Krebs oder Krebsvorstufe, aufweisend Untersuchung einer Patientenprobe, welche nicht-invasiv oder minimal invasiv erhalten wurde, bezüglich des Vorhandenseins eines oder mehrerer Nucleinsäure-Indizien, welche auf Krebs oder Krebsvorstufe hinweisen, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Nucleinsäure-Indizien gewählt sind von:

(a) der Länge der Nucleinsäuren in der Probe; und

(b) dem Verhältnis von Nucleinsäuren mit einer Länge von mehr als ca. 200 bp zu Nucleinsäuren mit einer Länge von weniger als ca. 200 bp in der Probe;

wobei sich die Länge und das Verhältnis bei Patienten mit Krebs oder Krebsvorstufe und Patienten, welche keinen Krebs oder Krebsvorstufe haben, unterscheiden und wobei die Probe aus Körperausscheidungen oder von Körperflüssigkeiten erhalten wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem die Probe erhalten wird von der Gruppe bestehend aus Stuhl, einem Homogenat aus Stuhl, Eiter, Sputum, Urin, Blut, Cerebrospinalflüssigkeit, Lymphe, Samen und Aspirat.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, ferner aufweisend den Schritt des Untersuchens der Probe bezüglich einer oder mehrerer weiterer Nucleinsäure-Indizien, welche auf Krebs oder Krebsvorstufe hinweisen, wobei die weiteren Nucleinsäure-Indizien gewählt sind von der Gruppe bestehend aus Nucleinsäuremutationen, Verlust an Heterozygosität, Sequenzlängenvariationen und Variationen der Mengen von amplifizierbaren Nucleinsäuren.

4. Verfahren nach Anspruch 3, aufweisend Untersuchen der Probe bezüglich zwischen drei und zwanzig Nucleinsäure-Indizien, wobei die Nucleinsäure-Indizien gewählt sind von der Gruppe bestehend aus Nucleinsäuremutationen, Verlust an Heterozygosität, Sequenzlängenvariationen und Variationen der Menge an amplifizierbaren Nucleinsäuren.

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, bei welchem das Untersuchen zwei oder mehr der Folgenden umfasst: quantitative PCR, multiple Mutationsanalyse, Nachweis des Verlusts an Heterozygosität, Hybridisierungsbindung eines oder mehrerer mutierter Nukleinsäuremarker, Oligo-Ligation, Amplification Refractory Mutation System, Nachweis von Einzelstrang-Konformationspolymorphismen, Sequenzieren, Nachweis von Mismatch und Einzelbasenextension.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Untersuchen eine quantitative Polymerasekettenreaktion-Untersuchung und eine Untersuchung bezüglich einer Mutation in bat-26 umfasst.

7. Verfahren nach Anspruch 6, bei welchem die Untersuchung bezüglich einer Mutation in bat-26 eine Primer-Extensionsuntersuchung umfasst, um Fragmente von dem bat-26 zu identifizieren.

8. Verfahren nach Anspruch 5, bei welchem das Untersuchen eine Untersuchung zum Nachweis des Verlusts an Heterozygosität in mindestens einem Bereich eines Chromosomenarms umfasst.

9. Verfahren nach Anspruch 8, bei welchem die Untersuchung zum Nachweisen des Verlusts an Heterozygosität gewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Zählen von Verlust an Heterozygosität und Einzelbasenextension.

10. Verfahren nach Anspruch 8, bei welchem der chromosomale Arm gewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Chromosom 17p, Chromosom 5p, Chromosom 8p, Chromosom 1q und Chromosom 18q.

11. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, ferner aufweisend einen oder mehrere der folgenden Schritte:

- (a) Durchführen einer Nucleinsäureamplifikationsuntersuchung mit der Probe zum Nachweis einer Menge an amplifizierbarer Nucleinsäure in der Probe und Identifizieren als positives Ergebnis eine Probe, in welcher die Menge eine vorher bestimmte Schwelle überschreitet;
- (b) Durchführen einer multiplen Mutationsuntersuchung mit der Probe und Identifizieren als positives Ergebnis eine Probe, in welcher mindestens eine Mutation identifiziert wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Mutationsuntersuchung eine Einzelbasenextensionsuntersuchung umfasst.

13. Verfahren nach Anspruch 12, bei welchem die Einzelbasenextensionsuntersuchung die folgenden Schritte aufweist:

- (a) Binden eines Oligonucleotid-Primers an die Probe unter Bedingungen, welche exakte komplementäre Hybridisierung zwischen dem Primer und einem Bereich einer Nucleinsäure in der Probe begünstigen;
- (b) Verlängern des Primers um eine einzelne Base;
- (c) Separieren des um eine Base verlängerten Primers;
- (d) Identifizieren der in den verlängerten Primer inkorporierten Base, um somit die einzelne Base zu identifizieren.

14. Verfahren nach Anspruch 12, bei welchem die Einzelbasenextensionsuntersuchung die folgenden Schritte aufweist:

- (a) Binden eines Oligonucleotid-Primers an die Probe unter Bedingungen, welche die exakte komplementäre Hybridisierung zwischen dem Primer und einem Bereich einer Nucleinsäure in der Probe begünstigen;
- (b) Aussetzen der Probe gegenüber zwei unterschiedlichen Deoxynucleotiden unter Bedingungen, bei welchen Primerextension begünstigt ist;
- (c) Verlängern des Primers, bis der Primer nicht mehr verlängert werden kann;
- (d) Separieren des verlängerten Primers von dem Bereich; und
- (e) Identifizieren der in den verlängerten Primer inkorporierten Base, um somit die Einzelbase zu identifizieren.

15. Verfahren nach Anspruch 14, bei welchem mindestens eines der Deoxynucleotide nachweisbar markiert ist.

16. Verfahren nach Anspruch 12, bei welchem die Einzelbasenextensionsuntersuchung die Identifizierung einzelner Nucleotide in jedem einer Mehrzahl von genomischen Loci aufweist.

17. Verfahren nach Anspruch 16, bei welchem die genomischen Loci gewählt sind aus der Gruppe bestehend aus *apc*, *Kras*, *p53* und *bat-26*.

18. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, bei welchem die Krebsvorstufe ein Adenom ist, oder bei welchem der Krebs Kolorektalkrebs ist.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

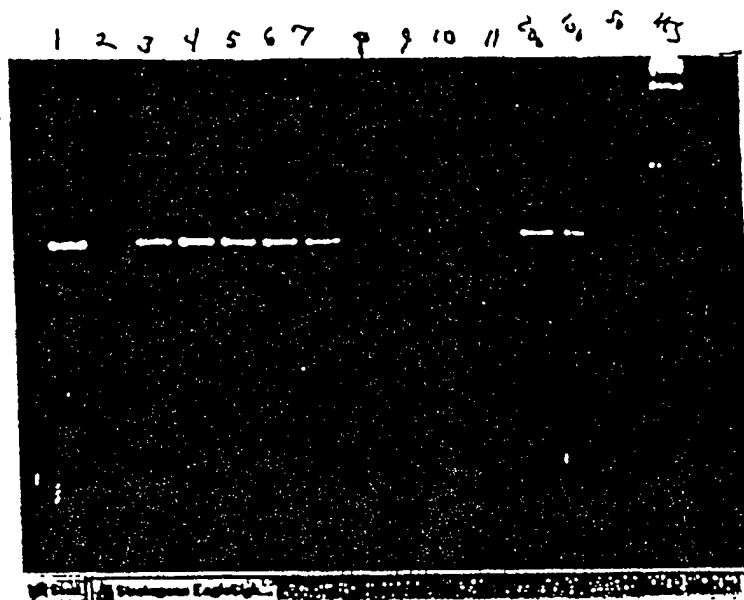


Fig. 1