(19) Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2005 013 261 A1** 2006.09.28

(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2005 013 261.8**
(22) Anmeldetag: **22.03.2005**
(43) Offenlegungstag: **28.09.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 1/00*** (2006.01)

(71) Anmelder:
AdnaGen AG, 30853 Langenhagen, DE

(74) Vertreter:
PFENNING MEINIG & PARTNER GbR, 80339 München

(72) Erfinder:
Zieglschmid, Veit, Dr., 30519 Hannover, DE;
Böcher, Oliver, Dr., 30853 Langenhagen, DE

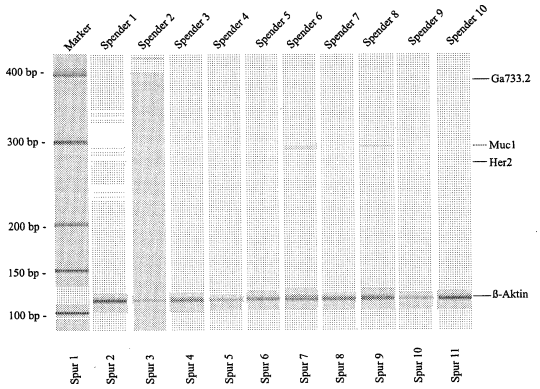
(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
Internet-Recherche am 13.09.2005: http://www.cyto.purdue.edu/hmarchiv/2004/1302.htm,
Re: RNA extraction and cell sorting, Collin Butter 23.07.04;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Reagenz und Verfahren zur Verhinderung der zeitabhängigen Expression in biologischen Zellen**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Reagenz zur Verhinderung der zeitabhängigen, induzierten Expression in biologischen Zellen in einer Probe. Sie betrifft gleichermaßen ein Verfahren hierzu sowie derart behandelte Zellpräparate, wobei das Reagenz zur Verhinderung der zeitabhängig induzierten Expression in biologischen Zellen in einer Probe ex vivo einen Formaldehyddonor enthält.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Reagenz zur Verhinderung der zeitabhängigen, induzierten Expression in biologischen Zellen in einer Probe. Sie betrifft gleichermaßen ein Verfahren hierzu sowie derart behandelte Zellpräparate.

[0002] Derartige Reagenzien und derartige Verfahren werden insbesondere im Bereich der molekular-biologischen Analyse und der medizinischen Diagnostik, insbesondere der Tumordiagnostik, benötigt.

Stand der Technik

[0003] Viele Nachweisverfahren zielen darauf, die Genexpression auf mRNA-Ebene zu analysieren. Dabei können exprimierte Gene als Nachweis spezieller Zellen gewertet werden. Es kann aber auch das Expressionsmuster aller untersuchten Gene genutzt werden, um Rückschlüsse über den Zustand einer Zelle zu ziehen oder um im Vergleich von zwei biologischen Proben deren Unterschiede zu charakterisieren.

[0004] Es wurde beschrieben, dass es zwischen der Probennahme und der Probeanalyse zum Abbau transkribierter mRNA in der Probe aufgrund von Änderungen in den Umgebungsbedingungen der Probe im Anschluss an die Probeentnahme kommen kann (Becker S. et al., 2004 Clin Chem 50 (4), 785-786).

[0005] Überraschenderweise tritt aber ein anderes schwerwiegendes Problem bei den in der Anmeldung beschriebenen Verfahren zum Nachweis von zellassoziierter mRNA auf, und zwar eine zeitabhängige illegitime Expression von mRNA ex vivo (ex vivo = außerhalb des menschlichen oder tierischen Körpers). Es kann nach der Probennahme die Expression neuer mRNA induziert werden. Diese zeitabhängig induzierte Expression verfälscht das Analyseergebnis. Die vorliegende Erfindung beschäftigt sich mit diesem Problem.

[0006] Eine derartige illegitime, zeitabhängig induzierte Expression wird bereits in einer Vielzahl von Publikationen beschrieben, beispielsweise in Baechler et al., Genes Immun. Band 5, Seite 347 bis 353 (2004).

[0007] Neuerdings sind hochsensitive Analyseverfahren entwickelt worden, beispielsweise wie in der EP 02 732 726 A1 beschrieben. Der Nachweis von Tumorzellen im menschlichen Blut nach dem Verfahren der EP 02 732 726 ist abhängig davon, dass der Expressionsstatus zum Zeitpunkt der Blutentnahme bis zur Analyse aufrechterhalten bleibt. Mit dem in der EP 02 732 726 beschriebenen Verfahren werden Tumorzellen über mindestens zwei Antikörper immunomagnetisch angereichert, deren mRNA wird isoliert und die Expression von mindestens zwei tumorassoziierten mRNA-Markern wird untersucht. Bereits nach wenigen Stunden (24 h-Wert gezeigt in **Fig.** 3) werden jedoch ohne spezielle Behandlung der Blutproben Transkripte nachgewiesen, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme nicht vorhanden waren. Diese illegitime Transkription führt zu einem falsch-positiven Ergebnis.

[0008] Beschriebene Verfahren, die darauf abzielen, lediglich den Abbau vorhandener mRNA zu verhindern sowie die Morphologie und Antigenstruktur von Zellen zu stabilisieren, sind nicht geeignet, um mit dem Verfahren der EP 02 732 726 kombiniert zu werden. Getestet wurden beispielsweise die Reagenzien CellSave® (Immunicon Corporation, Huntingdon Valley, PA, USA) und Cyto-Chex® (Streck Laboratories, Omaha, NE, USA), mit denen Proben nach Herstellerangaben gegen den Abbau von mRNA stabilisiert wurden. Dabei hat sich jedoch gezeigt, dass damit der Nachweis von Tumorzellen nach dem Verfahren der EP 02 732 726 nicht mehr möglich ist, da keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt werden können (siehe **Fig.** 5). Das Problem der zeitabhängig induzierten Expression ist demnach mit den bekannten Verfahren nicht gelöst.

Aufgabenstellung

[0009] Die vorliegende Erfindung macht es sich also zur Aufgabe, ein Reagenz sowie ein Verfahren zur Verhinderung und Reduzierung der zeitabhängig induzierten Expression in biologischen Zellen in einer Probe sowie deren behandelte Zellpräparate zur Verfügung zu stellen.

[0010] Diese Aufgabe wird durch das Reagenz nach Anspruch 1, das Zellpräparat nach Anspruch 9 sowie das Verfahren nach Anspruch 15 gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen des Reagenzes, des Zellpräparates sowie des Verfahrens zur Verhinderung der zeitabhängig induzierten Expression werden in den jeweiligen abhängigen Ansprüchen gegeben.

[0011] Die vorliegende Erfindung beschäftigt sich also erstmals erfolgreich mit der Unterbindung der

mRNA-Neusynthese (zeitabhängige, induzierte Expression). Diese besitzt bei Einsatz hochsensitiver, moderner Analysemethoden eine mindestens ebenso große Bedeutung wie die bisher betrachtete Stabilisierung der Oberflächenantigene oder der mRNS der Zielzellen. Nur so ist es möglich, die Zielzellen anhand ihrer mRNA-Expression unzweideutig zu charakterisieren.

[0012] Überraschenderweise wurde gefunden, dass die Zugabe eines Formaldehyddonors in sehr geringer Konzentration zu einer biologischen Probe, nämlich in einer Konzentration ≤ 0,075 % (w/v), vorteilhafterweise < 0,045 % (w/v), vorteilhafterweise 0,025 ≤ % (w/v) zu einer Verhinderung der zeitabhängigen illegitimen Expression führt. Als Formaldehyddonor kann dabei Imidazolidinyl-Harnstoff (IDU), Diazolidinyl-Harnstoff, Dimethylol-5,5-Dimethylhydantoin, Dimethylol-Harnstoff, 2-Brom-2-Nitropropan-1,3-Diol, 1,3-bis(hydroxymethyl)-5,5-dimethylimidazolidine-2,4-dione (DMDM-Hydantoin), N5-Methyl-Tetrahydrofolsäure, N10-Methyl-Tetrahydrofolsäure oder eine Mischung hiervon eingesetzt werden.

[0013] Mit dem erfindungsgemäßen Reagenz sowie dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es daher erstmals möglich, die zeitabhängig induzierte Expression in biologischen Zellen in einer Probe ex vivo zu verhindern sowie eine Konservierung disseminierter Tumorzellen in Blutproben von Krebspatienten zu ermöglichen.

[0014] Hierzu wird nach Blutabnahme das Reagenz, gegebenenfalls gelöst in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), sowie unter Zugabe des Gerinnungshemmers EDTA in der angegebenen Endkonzentration sofort mit dem Blut gemischt. Die Probe kann dann über einen Zeitraum von mehreren Tagen, beispielsweise bis zu mindestens 72 h bei 4 °C gelagert werden, ohne dass illegitime Expression innerhalb der Probe auftritt. Weiterhin können der Probe weitere zellstabilisierende Substanzen, wie z.B. Polyethylenglycol (PEG) und/oder Proteaseinhibitoren zugesetzt werden.

[0015] Um die erfindungsgemäße Wirkung zu demonstrieren, wurde in den folgenden Beispielen der Effekt der erfindungsgemäßen Zusätze auf die Spezifität eines Tumorzellennachweises mittels Analyse von Blutproben gesunder Spender sowie von Tumorpatienten untersucht. Außerdem wurde der Effekt der erfindungsgemäßen Zusätze auf die Sensitivität des Tumorzellnachweises mittels Analyse an Blutproben gesunder Spender mit inokulierten Tumorzellen untersucht. Die Analyse erfolgt dabei mittels vorgeschalteter Zellselektionierung und anschließender Expressionsprofilanalyse, wie sie in der europäischen Patentanmeldung EP 02 732 726 beschrieben sind. Diese europäische Patentanmeldung wird bezüglich des dort offenbarten Analyseverfahrens vollumfänglich in die vorliegende Anmeldung aufgenommen.

[0016] Desweiteren wurde die klinische Sensitivität mittels Analyse stabilisierter Blutproben von Brust- und Colorektal-Krebspatienten ermittelt. Alle untersuchten Patienten befanden sich in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium (M1) und wurden mit palliativer Therapie behandelt. Die erfindungsgemäßen Zusätze wurden unmittelbar nach Abnahme der Blutproben mit den Blutproben vermischt und sofort, nach 24 h, 48 h und nach 72 h Lagerung bei 4 °C analysiert.

Ausführungsbeispiel

[0017] Es ist dabei zu erwähnen, dass sich die folgenden Beispiele sämtlich zwar auf Blutproben beziehen, jedoch das erfindungsgemäße Verfahren auch geeignet ist, um andere Zellsuspensionen oder Gewebsproben zu untersuchen. Zellsuspensionen können dabei Körperflüssigkeiten oder auch in Suspension gebrachte Gewebezellen, z.B. Gewebestücke, Gewebeschnitte und dergleichen, sein.

[0018] Es zeigen

[0019] Fig. 1 den Nachweis zeitabhängig induzierter Transkription in IDU behandelten Blutproben 24 h nach Abnehmen;

[0020] Fig. 2 den Nachweis zeitabhängig induzierter Transkription in IDU behandelten Blutproben 48 h nach Abnahme;

[0021] Fig. 3 den Nachweis zeitabhängig induzierter Transkription in nicht-behandelten Blutproben;

[0022] Fig. 4 die Erfassung von 2 Brusttumorzellen in mit IDU behandelten Blutproben;

[0023] Fig. 5 die Erfassung von Brusttumorzellen in mit verschiedenen Systemen behandelten Blutproben;

[0024] Fig. 6 typische Beispiele für den Nachweis disseminierter Tumorzellen in IDU behandelten Blutproben von Brustkrebspatientinnen.

[0025] Bei sämtlichen im Folgenden dargestellten Beispielen wurde eine Analyse, wie sie in der EP 02 732 726 beschrieben ist, durchgeführt. Dabei wurden zur Zellselektion Antikörper an Magnetpartikel gekoppelt. Als Antikörper wurden dabei die im folgenden in Tabelle 1 dargestellten Antikörper verwendet.

Tabelle 1

Antigen	Klon	Firma
Epitheliales Membran Antigen	GP1.4	Novocastra
Epitheliales Antigen	Ber-EP4	DAKO
Muc 1	HMPV	Pharmingen

[0026] Die Magnetpartikel wurden dabei in einer Konzentration von 4×10^8 Beads/ml (CELLection™ Pan Mouse IgG Kit, Firma Dynal) verwendet. Die Verhältnisse zwischen der Antikörperkonzentration und den daran gekoppelten Antikörpern sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2

Klon	Antikörperkonzentration	µl Antkörper/25µl Partikel
BerEP4	0,32 mg/ml	4 µl
HMPV	0,5 mg/ml	4 µl
GP1.4	0,2 mg/ml	0,3 µl

[0027] Die so vorbereiteten Magnetpartikel wurden zu gleichen Teilen gemischt und in 100 µl PBS je 5 ml Probe dem Blut (EDTA) zugegeben.

[0028] Nach 30 min Inkubation im Überkopfschüttler wurden die Magnetpartikel, die gegebenenfalls als Zell-Antikörper-Magnetpartikelkomplexe vorlagen, mittels eines Magnetpartikelkonzentrators (MPC®-S, Firma Dynal) 3mal mit PBS gewaschen und die anhaftenden Zellen anschließend entsprechend des im folgenden beschriebenen mRNS-Isolierungsprotokolls behandelt.

[0029] Die mRNS-Isolierung erfolgte mittels Oligo(dT)gekoppelter Magnetpartikel, Dynabeads® mRNA Direct™ Micro Kit (Firma Dynal). Diese Isolierung erfolgte entsprechend der in dem Kit angegebenen Herstellerangaben.

[0030] An die Isolierung der mRNS schließt sich eine reverse Transkription an, bei der die mRNS in cDNS umgeschrieben wird.

Tabelle 3: Komponenten der cDNS-Synthese Die cDNS-Synthese erfolgt in einem 20 µl-Reaktionsansatz

Komponenten	Volumen
mRNS	29,5 µl
10 x RT-Puffer	4 µl
dNTP-Mix	4 µl
RNase-Inhibitor (RNAsin, Promega)	0,5 µl
Reverse Transkriptase	2 µl

[0031] Die cDNS-Synthese (Tabelle 3) erfolgte bei 37 °C für eine Stunde mit nachfolgender Inaktivierung der reversen Transkriptase durch Erhitzen für 5 Minuten bei 95 °C und anschließender Abkühlung auf Eis. Hierzu wurde ein Sensiskript Reverse Transkriptase Kit, Firma Qiagen, Hilden nach dort angegebenen Protokollen verwendet.

[0032] Anschließend an die Umschreibung der mRNS in cDNS erfolgte eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit β-Aktin als interner Kontrolle.

[0033] Dabei wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Oligonukleotide als PCR-Primer zur Amplifikation von cDNS verwendet.

Tabelle 4: Liste der PCR-Primer

Primername	Sequenz 5'->3'	PCR-Produkt
Tumormarker		
GA733.2 sense	AATCGTCAATGCCAGTGTACTTCA	383 bp
GA733.2 sense	TAACGCGTTGTGATCTCCTTCTGA	
CA15-3 sense	TCAGCTTCTACTCTGGTGCACAAC	293 bp
CA-15-3 antisense	TGGTAGTAGTCGGTGCTGGGATCT	
Her-2 sense	CCCAGTGTGTCAACTGCAGCCAGT	270 bp
Her-2 antisense	CAGATGGGCATGTAGGAGAGGTCA	
Interne Kontrolle		
Aktin sense	CTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCT	114 bp
Aktin antisense	ACAGGACTCCATGCCCAGGAAGGA	

[0034] Die PCR wurde mit dem in Tabelle 5 angegebenen Ansatz durchgeführt.

Tabelle 5: PCR-Ansatz Die PCR-Synthese erfolgte in einem 50 µl-Reaktionsansatz

Komponenten	Volumen
cDNS	8 µl
Primer	4 µl
HotStarTaq	25 µl
H_2O	13 µl

[0035] Die PCR-Bedingungen (Zyklenzahl, Zyklenführung etc.) sind in der Tabelle 6 gegeben; Temperaturänderungen erfolgten mit 2 °C/s.

Tabelle 6: PCR-Bedingungen

Vorabdenaturierung	95 °C 15 min	
Zyklus		
1. Denaturierung	94 °C 1 min	35 Zyklen
2. Annealing	60 °C 1 min	
3. Extension	72 °C 1 min	
Finale Extension	72 °C 10 min	
	4 °C Pause	

[0036] Die so erzeugten Amplifikate der cDNS wurden elektrophoretisch aufgetrennt mittels eines Bioanalyzer 2100 (Firma Agilent). Hierzu wurde 1 µl des PCR-Produktes in dem Bioanalyzer auf einem DNS-Chip 1000 aufgetrennt und das Trennergebnis elektronisch dokumentiert. Das Analyseergebnis wird für positiv befunden, wenn die Bandenintensität mindestens eines Tumormarkers > 6,7 ist. Der Bandenintensität entspricht die Einheit „Peakhöhe" des Agilents. Peaks mit einer Höhe von < 4,0 werden negativ bewertet. Peaks, deren Höhe von 4,0 bis 6,7 liegt, können weder als positiv noch als negativ bewertet werden. Auf diese Weise wurden die Fig. 1 bis Fig. 6 erzeugt und ausgewertet.

[0037] Fig. 1 zeigt den Nachweis zeitabhängig induzierter Transkription in mit IDU behandelten Blutproben.

[0038] Spur 1 zeigt dabei eine Leiter mit Größenmarkern, Spuren 2 bis 11 zeigen die bei zehn verschiedenen gesunden Spendern nachzuweisenden amplifizierten DNS-Fragmente der tumorassoziierten Transkripte und einer internen Kontrolle von β-Aktin. Die Position der jeweiligen Banden für β-Aktin (Actin) und die drei tumorassoziierten Transkripte GR733-2 (384 bp), MUC-1 (292 bp) und Her-2 (265 bp) sind in Fig. 1 bezeichnet.

[0039] Die Proben der zehn gesunden Spender wurden dabei mit 0,045 % (w/v) IDU versetzt und anschließend bei 4 °C für 24 h gelagert. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden nach Analyse der Blutproben mittels Hochspannungskapillar-Gelelektrophorese in einem Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) nachgewiesen. Es ist zu erkennen, dass die Analyse bei allen zehn gesunden Spendern (Spender 1 bis Spender 10 in Spuren 2 bis 11) negativ ausgefallen ist (Peakhöhen unter Schwellenwert). D.h. es kann keinerlei illegitime zeitabhängig induzierte Expression nachgewiesen werden.

[0040] Fig. 2 zeigt dieselbe Untersuchung, nun jedoch nach Lagerung der Proben der zehn gesunden Spender für 48 h. Auch hier konnte noch immer keine zeitabhängige Expression tumorassoziierter Transkripte nachgewiesen werden.

[0041] Fig. 3 zeigt demgegenüber dieselben Blutproben wie in Fig. 1 und in Fig. 2, jedoch ohne Zugabe von 0,025 % (w/v) IDU. Es ist zu erkennen, dass bei diesen nicht behandelten Blutproben illegitime Expression der tumorassoziierten Transkripte auftrat.

[0042] Mit den Untersuchungen gemäß den Fig. 1 bis Fig. 3 wurde eindeutig nachgewiesen, dass mit den angegebenen Konzentrationen eines Formaldehyddonors wirksam die illegitime zeitabhängig induzierte Expression in Zellen innerhalb eines Zellpräparats unterdrückt werden kann. Die erfindungsgemäßen Zusätze erhalten eine hohe Spezifität.

[0043] Fig. 4 zeigt demgegenüber die Erfassung von Brusttumorzellen in mit 0,045 % (w/v) IDU behandelten Blutproben zehn gesunder Spender (Spuren 2 bis 10). In diese Proben wurden je 5 ml Blut zwei Brustkrebszellen (MCF7) inokuliert. Die dargestellte Untersuchung auf das Expressionsmuster der tumorassoziierten Transkripte Her-2, MUC-1 und GA733.2 wurde nach einer Lagerung der Blutproben bei 4 °C über 48 h durchgeführt. Alle weiteren Analyseparameter entsprechen denjenigen in Fig. 1 bis Fig. 3. Es ist zu erkennen, dass die tumorassoziierten Transkripte Her-2, MUC-1 und GA733.2, die über die Inokulierung von MCF7-Brustkrebszellen in die Blutproben eingebracht wurden, eindeutig nachgewiesen werden. Fig. 4 zeigt damit eindeu-

tig, dass auch so geringe Zellzahlen, wie 2 Zellen/5 ml Blut noch nach 48 h nachgewiesen werden können, wenn die Blutprobe erfindungsgemäß behandelt wurde, ohne den Nachweis durch illegitime zeitabhängig induzierte Expression zu behindern. Ein Verlust an Sensitivität des angestrebten Tumorzellennachweises wird also durch das erfindungsgemäße Verfahren ebenfalls verhindert.

[0044] Fig. 5 zeigt Vergleichsversuche mit der marktüblichen Stabilisierungslösung „CellSave" von Immunicon. Hierzu wurden in je 5 ml Blut gesunder Spender jeweils 5 Brustkrebszellen (HCC1954) inokuliert. Zwei der Proben wurden mit 0,025 % (w/v) IDU erfindungsgemäß behandelt und bei 4 °C gelagert (Spuren 2 und 3). Zwei weitere Proben wurden in entsprechender Weise behandelt, jedoch bei 25 °C gelagert (Spuren 6 und 7). Zwei weitere Proben wurden gemäß den Herstellerangaben mit dem Produkt CellSave stabilisiert und bei 4 °C gelagert (Spuren 4 und 5). Die letzten beiden Proben in Fig. 5 (Spuren 8 und 9) wurden ebenfalls gemäß den Herstellerangaben mit CellSave stabilisiert und bei 25 °C gelagert.

[0045] Wie zu erkennen ist, wird die Expression der Tumormarker Her-2, MUC-1 und GA733.2 in den inokulierten Brustkrebszellen sowie des Markers β-Aktin in den erfindungsgemäß behandelten Proben (Spuren 2, 3, 6, 7) erfasst. Mit der käuflichen Stabilisierungslösung CellSave stabilisierte Proben (Spuren 4, 5, 8, 9) war ein sensitiver Nachweis weder des Markers β-Aktin noch der Tumormarker Her-2, MUC-1 und Ga733.2 möglich.

[0046] Dies zeigt, dass im Vergleich zum Stand der Technik durch die vorliegende erfindungsgemäße Behandlung eine sehr effektive Erhaltung des Expressionsmusters in einer biologischen Probe erzielt wird, die erlaubt, die nachgeschaltete Analyse hoch selektiv und sensitiv durchzuführen.

[0047] Fig. 6 zeigt die Analyse von Blutproben von Brustkrebspatienten unmittelbar nach der Blutprobenentnahme, nach 24 h sowie nach 48 h. Sämtliche dieser Proben wurden unmittelbar nach Blutabnahme mit 0,025 % (w/v) IDU versetzt und bei 4 °C gelagert.

[0048] Fig. 6 zeigt in den Spuren 2 bis 4 die Untersuchungsergebnisse der Blutprobe eines Patienten unmittelbar nach der Blutentnahme, nach 24 h und 48 h nach der Blutentnahme: Es zeigt sich, dass das Expressionsmuster über die Zeit weitgehend gleich bleibt und folglich die IDU-Zugabe zu einer Bewahrung des Expressionsmusters führt. Entscheidend ist dabei, dass auch keinerlei illegitime zeitabhängig induzierte Expression auftritt. Dies ist auch bei der Probe des zweiten Patienten, die in den Spuren 5 bis 7 über die Zeit verfolgt wurde, der Fall. Dieser weist offensichtlich keine zirkulierenden Tumorzellen in der Blutprobe auf. Eine zeitabhängig induzierte Expression wurde ebenfalls nicht festgestellt. Auch die Probe des Patienten 3 in den Spuren 8 bis 10 zeigt, dass mit der Behandlung durch 0,025 % (w/v) IDU eine Bewahrung des Expressionsmusters über 48 h erzielt werden konnte.

[0049] Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Tumorzellennachweis in mit 0,025 % (w/v) IDU behandelten Blutproben von Brustkrebspatientinnen sofort nach Abnahme, nach 24 h und nach 48 h einheitliche Ergebnisse zeigt, d.h. Blutproben, in denen zum Zeitpunkt der Abnahme Tumorzellen nachgewiesen werden konnten, zeigen auch nach 24 h und 48 h einen positiven Tumorzellennachweis, während Proben ohne Tumorzellen auch nach 24 und 48 h negativ blieben, d.h. keine falsch-positiven Resultate entstehen, die durch eine zeitabhängige Expression ex vivo erzeugt sein könnten. Die untersuchten Blutproben zeigen also über einen Zeitraum von 48 h hinweg ein konstantes Expressionsmuster, d.h. Proben, die anfangs negativ waren, blieben negativ und positive Proben blieben positiv.

[0050] Die oben dargestellten Versuchsergebnisse zeigen eindeutig sowohl eine hohe Effektivität als auch Verlässlichkeit des erfindungsgemäßen Reagenzes und des erfindungsgemäßen Verfahrens bei der Behandlung von Zellpräparaten, insbesondere von disseminierten Tumorzellen im Blut von Brustkrebspatientinnen. Bei Colorektal-Krebspatienten wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt.

[0051] Die vorliegenden Versuchsergebnisse zeigen also, dass eine Verhinderung einer zeitabhängig induzierten Expression in biologischen Zellen in einer Probe ex vivo erzielt wird. Weiterhin konnten disseminierte Tumorzellen in peripherem Blut von Brust- und Colorektal-Krebspatienten durch die Zugabe der erfindungsgemäßen Reagenzien nachgewiesen werden. Es wurde keine zeitabhängig induzierte Transkription über 48 h nachgewiesen. In nicht-behandelten Blutproben wurde jedoch eine sehr starke zeitabhängig induzierte Expression schon nach 24 h beobachtet.

[0052] Die erfindungsgemäßen Reagenzien und das erfindungsgemäße Verfahren ermöglichen also eine Verhinderung einer zeitabhängig induzierten Expression in biologischen Zellen in einer Probe (insbesondere

ex vivo) und gleichzeitig eine Aufbewahrung disseminierter Tumorzellen in peripherem Blut von Krebspatienten. Sie besitzen daher einen hohen logistischen und diagnostischen Wert, da hiermit auch ein längerer Transport und ein größerer zeitlicher Abstand zwischen Probenentnahme und Probenanalyse ermöglicht wird. Die erfindungsgemäßen Reagenzien und das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich daher zum Einsatz in Blutabnahmesystemen.

Patentansprüche

1. Reagenz zur Verhinderung der zeitabhängig induzierten Expression in biologischen Zellen in einer Probe ex vivo, **dadurch gekennzeichnet**, dass es einen Formaldehyddonor enthält.

2. Reagenz nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Menge und/oder Konzentration des Formaldehyddonors in dem Reagenz derart eingestellt ist, dass eine Mischung des Reagenzes mit der Probe den Formaldehyddonor in einer Konzentration ≤ 0,075 % (w/v) enthält.

3. Reagenz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration des Formaldehyddonors in der Mischung des Reagenzes mit der Probe ≤ 0,045 % (w/v), vorteilhafterweise ≤ 0,025 % (w/v) beträgt.

4. Reagenz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es den Formaldehyddonor in einer Konzentration von ≤ 5 % (w/v), vorteilhafterweise ≤ 2 % (w/v), vorteilhafterweise ≤ 1 % (w/v), vorteilhafterweise ≤ 0,05 % (w/v) enthält.

5. Reagenz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Formaldehyddonor, Imidazolidinyl-Harnstoff, Diazolidinyl-Harnstoff, Dimethylol-5,5-Dimethylhydantoin, Dimethylol-Harnstoff, 2-Brom-2-Nitropropan-1,3-Diol, 1,3-bis(hydroxymethyl)-5,5-dimethylimidazolidine-2,4-dione (DMDM-Hydantoin), N5-Methyl-Tetrahydrofolsäure, N10-Methyl-Tetrahydrofolsäure oder eine Mischung hiervon enthält oder daraus besteht.

6. Reagenz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es in fester Form vorliegt.

7. Reagenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es in einem Lösungsmittel gelöst vorliegt.

8. Reagenz nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass das Lösungsmittel ein Puffer, physiologische Kochsalzlösung oder dergleichen ist.

9. Zellpräparat enthaltend biologische Zellen einer biologischen Probe, ein Reagenz nach einem der vorhergehenden Ansprüche und gegebenenfalls eine Flüssigkeit, dadurch gekennzeichnet, dass es einen Formaldehyddonor enthält.

10. Zellpräparat nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration des Formaldehyddonors in dem Zellpräparat ≤ 0,075 % (w/v) beträgt.

11. Zellpräparat nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration des Formaldehyddonors in dem Zellpräparat ≤ 0,045 % (w/v), vorteilhafterweise ≤ 0,025 % (w/v) beträgt.

12. Zellpräparat nach einem der drei vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration des Formaldehyddonors in der Zellpräparat ≥ 0,001 % (v/v), vorteilhafterweise ≥ 0,01% (v/v), vorteilhafterweise ≥ 0,025 % (w/v) beträgt.

13. Zellsuspension nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe eine Zellsuspension in einer Körperflüssigkeit, Blut, Liquor, Aszites oder Urin, ein Gewebestück, eine Stanzbiopsie, ein Schnittpräparat oder Suspension hiervon enthält oder ist.

14. Zellpräparat nach einem der Ansprüche 9 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Flüssigkeit ein Puffer, physiologische Kochsalzlösung oder dergleichen ist.

15. Verfahren zur Verhinderung der zeitabhängigen Expression in biologischen Zellen in einer Probe ex vi-

vo, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe mit einem Reagenz, das einen Formaldehyddonor enthält, sowie gegebenenfalls einer Flüssigkeit vermischt wird.

16. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Mischung des Reagenzes mit der Probe den Formaldehyddonor in einer Konzentration ≤ 0,075 % (w/v) enthält.

17. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration des Formaldehyddonors in der Mischung des Reagenzes mit der Probe ≤ 0,045 % (w/v), vorteilhafterweise ≤ 0, 025 % (w/v) beträgt.

18. Verfahren nach einem der drei vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Formaldehyddonor, Imidazolidinyl-Harnstoff, Diazolidinyl-Harnstoff, Dimethylol-5,5-Dimethylhydan-toin, Dimethylol-Harnstoff, 2-Brom-2-Nitropro-pan-1,3-Diol, 1,3-bis(hydroxymethyl)-5,5-dime-thylimidazolidine-2,4-dione (DMDM-Hydantoin), N5-Methyl-Tetrahydrofolsäure, N10-Methyl-Tetrahydrofolsäure oder eine Mischung hiervon enthält oder daraus besteht.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Flüssigkeit ein Puffer, physiologische Kochsalzlösung oder dergleichen ist.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die damit behandelten biologischen Zellen antikörpervermittelt oder über andere gebräuchliche Verfahren separiert werden.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass ein Reagenz nach einem der Ansprüche 1 bis 8 eingesetzt wird und/oder ein Zellpräparat nach einem der Ansprüche 9 bis 14 hergestellt wird.

22. Verwendung eines Reagenzes, eines Zellpräparats und/oder eines Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche, um die zeitabhängige Induktion der Expression in einer Probe mit biologischen Zellen zu verhindern, insbesondere in einer Körperflüssigkeit, Blut, Liquor, Aszites, Urin oder in einem Gewebestück oder einer Suspension, die Zellen aus Gewebeproben enthält, insbesondere zum Nachweis von hierin enthaltenen Tumorzellen.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1

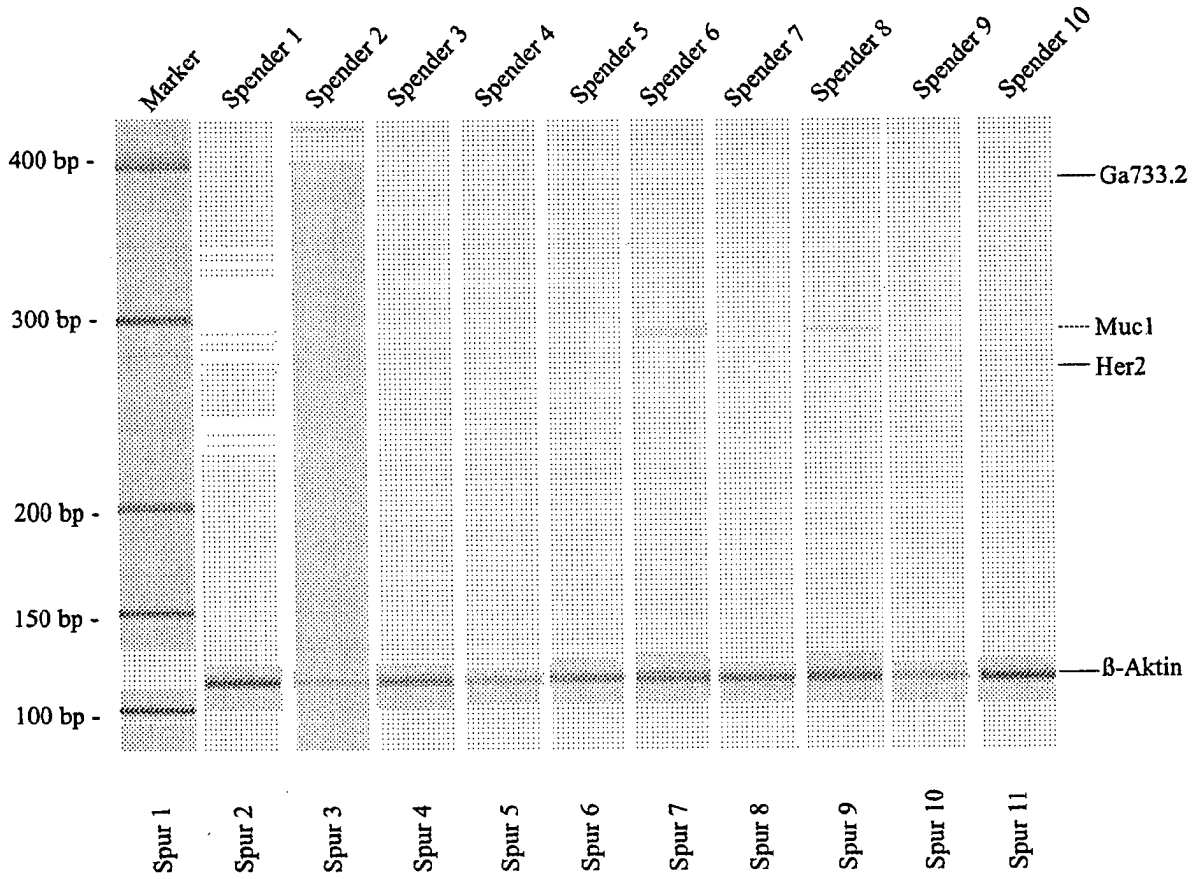


Fig. 2

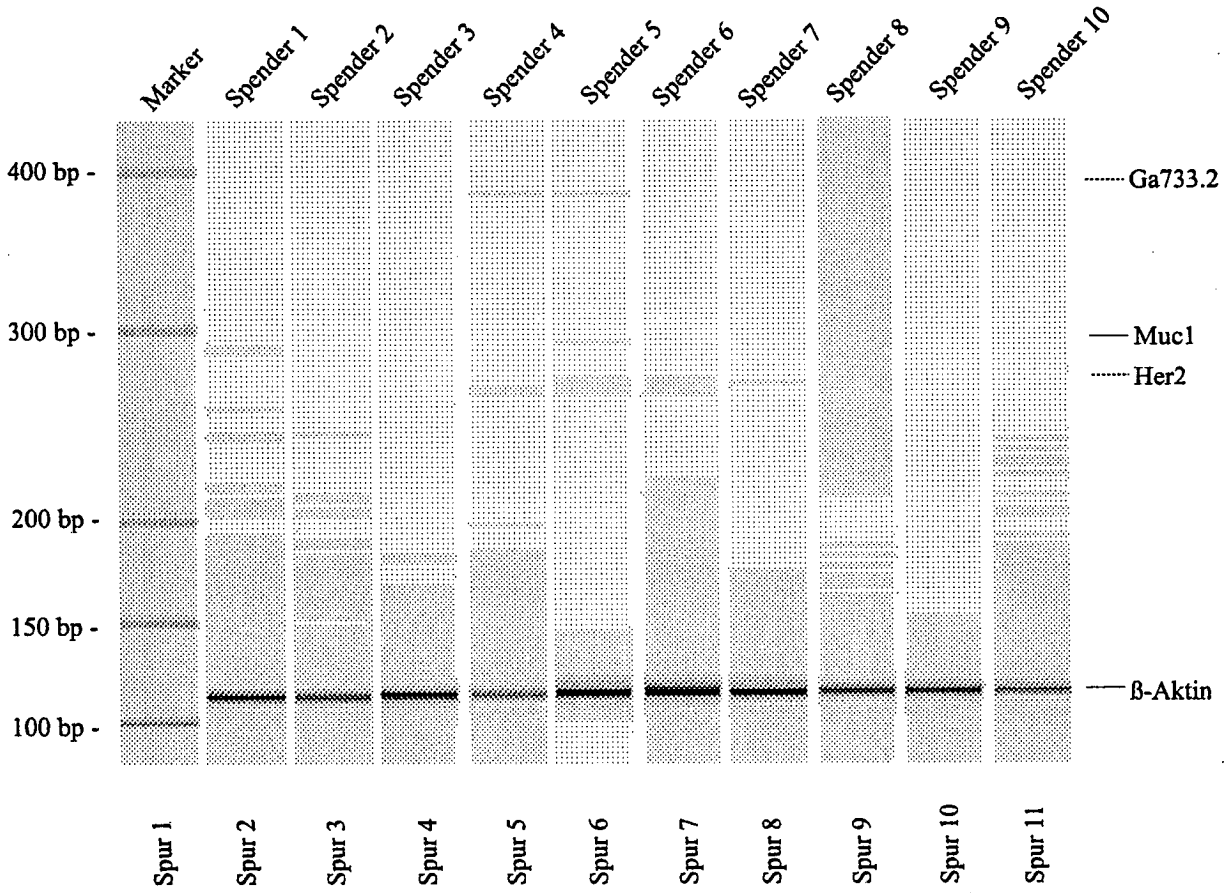

Marker
Spender 1
Spender 2
Spender 3
Spender 4
Spender 5
Spender 6
Spender 7
Spender 8
Spender 9
Spender 10
400 bp -
300 bp -
200 bp -
150 bp -
100 bp -
Ga733.2
Muc1
Her2
ß-Aktin
Spur 1
Spur 2
Spur 3
Spur 4
Spur 5
Spur 6
Spur 7
Spur 8
Spur 9
Spur 10
Spur 11

Fig. 3

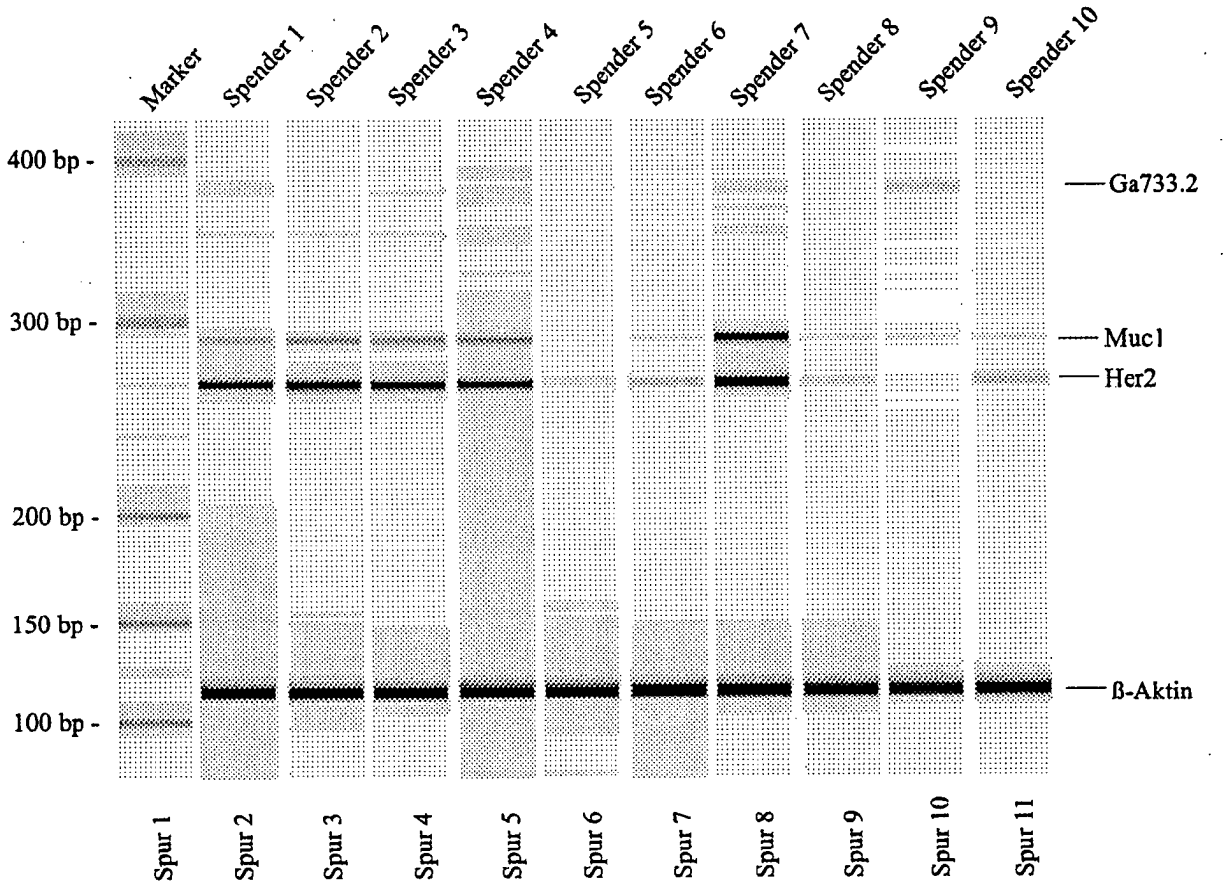

Marker
Spender 1
Spender 2
Spender 3
Spender 4
Spender 5
Spender 6
Spender 7
Spender 8
Spender 9
Spender 10
400 bp -
300 bp -
200 bp -
150 bp -
100 bp -
Ga733.2
Muc1
Her2
ß-Aktin
Spur 1
Spur 2
Spur 3
Spur 4
Spur 5
Spur 6
Spur 7
Spur 8
Spur 9
Spur 10
Spur 11

Fig. 4

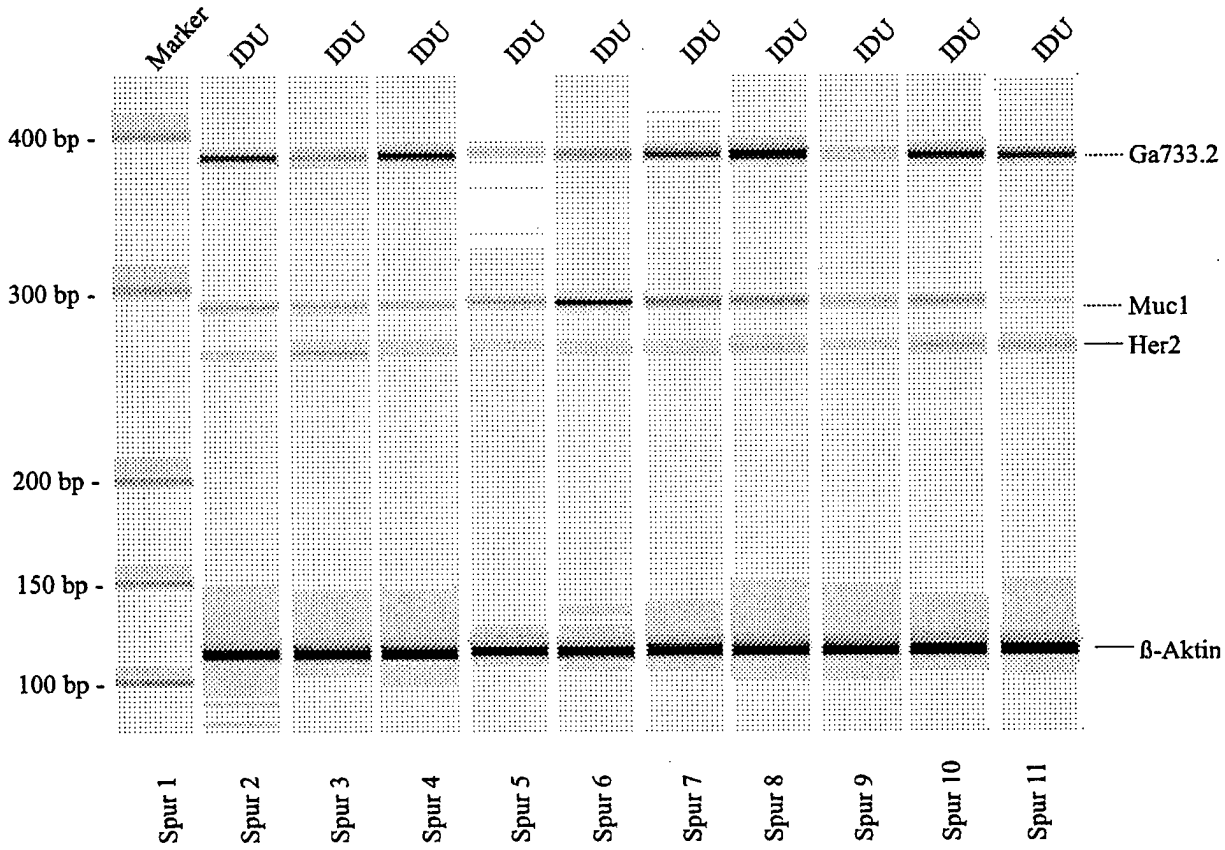

Marker
IDU
IDU
IDU
IDU
IDU
IDU
IDU
IDU
IDU
IDU
400 bp -
300 bp -
200 bp -
150 bp -
100 bp -
Ga733.2
Muc1
Her2
ß-Aktin
Spur 1
Spur 2
Spur 3
Spur 4
Spur 5
Spur 6
Spur 7
Spur 8
Spur 9
Spur 10
Spur 11

Fig. 5

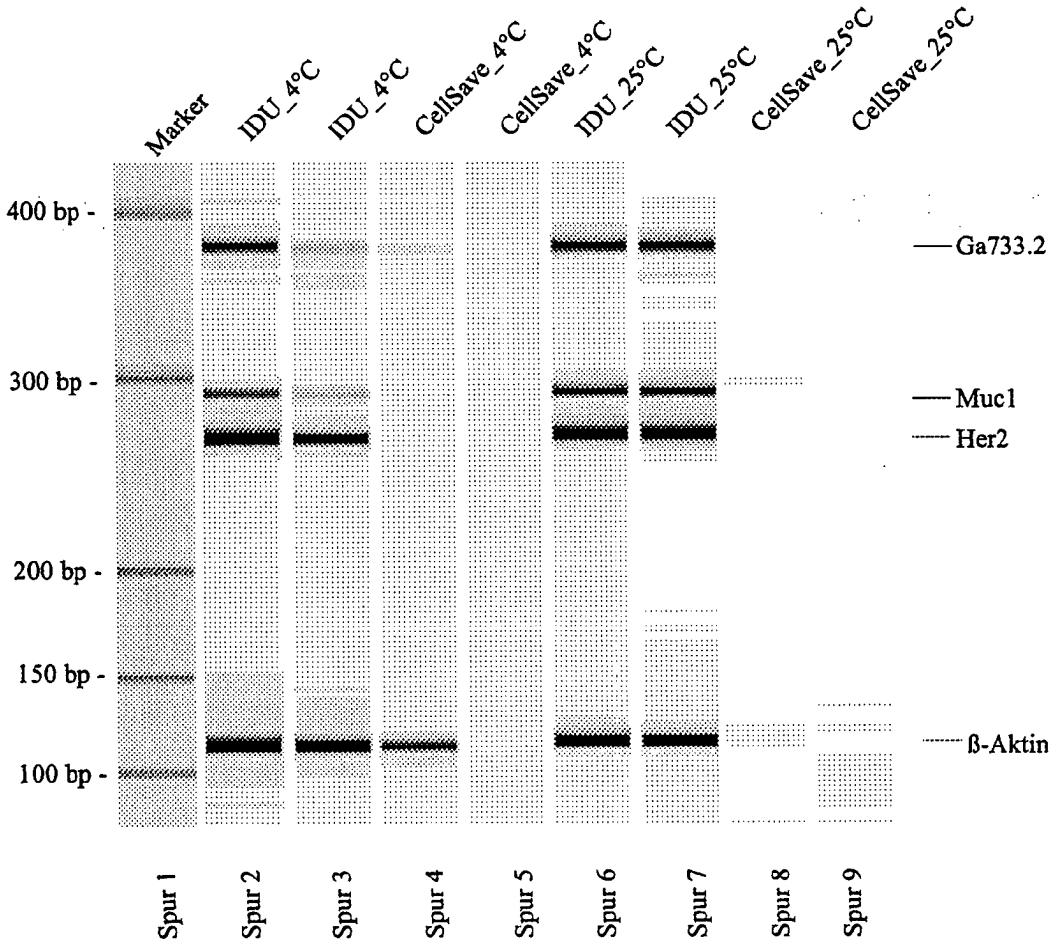
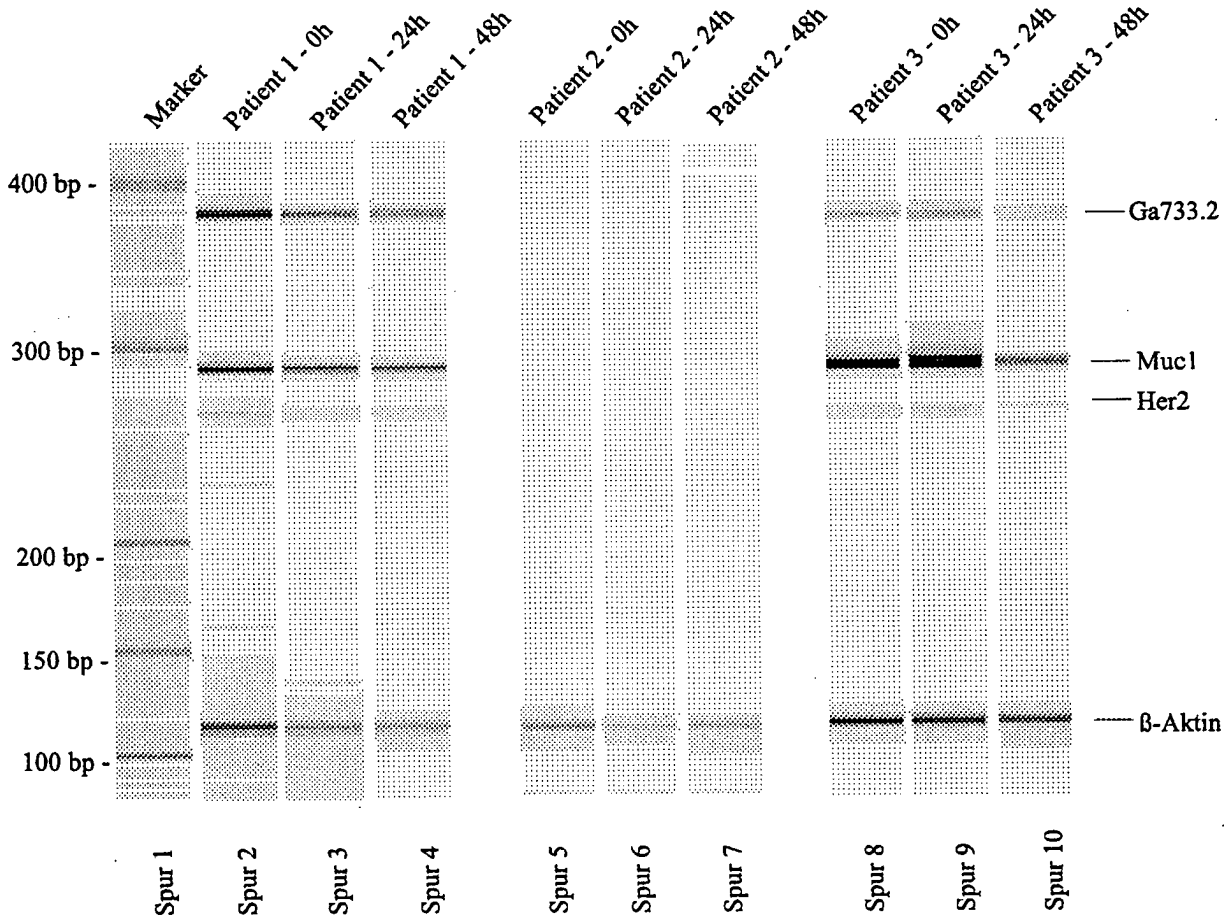

Marker
IDU_4°C
IDU_4°C
CellSave_4°C
CellSave_4°C
IDU_25°C
IDU_25°C
CellSave_25°C
CellSave_25°C
400 bp -
300 bp -
200 bp -
150 bp -
100 bp -
Ga733.2
Muc1
Her2
ß-Aktin
Spur 1
Spur 2
Spur 3
Spur 4
Spur 5
Spur 6
Spur 7
Spur 8
Spur 9

Fig. 6


Marker
Patient 1 - 0h
Patient 1 - 24h
Patient 1 - 48h
Patient 2 - 0h
Patient 2 - 24h
Patient 2 - 48h
Patient 3 - 0h
Patient 3 - 24h
Patient 3 - 48h
400 bp -
300 bp -
200 bp -
150 bp -
100 bp -
Ga733.2
Muc1
Her2
ß-Aktin
Spur 1
Spur 2
Spur 3
Spur 4
Spur 5
Spur 6
Spur 7
Spur 8
Spur 9
Spur 10