



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 19 809 T2** 2008.01.17

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 431 762 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 19 809.7**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 102 814.7**

(96) Europäischer Anmeldetag: **18.12.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.06.2004**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **25.04.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.01.2008**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **G01N 33/48** (2006.01)

**C12N 9/22** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

(73) Patentinhaber:

**Coy, Johannes F., Dr., 64853 Otzberg, DE**

(74) Vertreter:

**Rudolph, U., Dipl.-Biol. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,  
69198 Schriesheim**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**Coy, Johannes, 69221 Dossenheim, DE**

(54) Bezeichnung: **Verbindungen und Verfahren zur Nachweiss von Karzinomen und deren 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**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen und Verfahren zur Erkennung und Behandlung von Karzinomen und deren Vorstufen. Die Erfindung stellt DNase-X-Nukleinsäuren und Polypeptide bereit, die für die Erkennung und Behandlung von Karzinomen und deren Vorstufen geeignet sind. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Erkennung von Karzinomen und deren Vorstufen, welches die Detektion der Menge und/oder der subzellulären Lokalisierung eines oder mehrerer DNase-X-Moleküle in biologischen Proben umfasst. Darüber hinaus stellt die vorliegende Erfindung Verfahren zur Frühdiagnose, Prognose und Überwachung des Krankheitsverlaufs von Karzinomen und deren Vorstufen sowie für die Behandlung dieser Vorstufen bereit.

**[0002]** Bei den meisten Tumoren gibt es eine starke Korrelation zwischen dem Erfolg beim Patienten nach einer Anfangstherapie und dem Stadium, in dem die Krankheit diagnostiziert wird. Je früher deshalb der Krebs entdeckt werden könnte, desto besser sind die Überlebenschancen für den Patienten. Es werden daher empfindliche Testverfahren benötigt, um die Tumore in frühen Stadien oder sogar in Vorstufen-Stadien des Krebses festzustellen, beispielsweise vorkarzinogene Stadien oder die Vorläufer maligner karzinogener Stadien.

**[0003]** Die aussichtsreichsten Verfahren zur Frühdiagnose von Tumoren sind solche, die Molekularmarker umfassen, welche für Tumore oder für Vorläuferstadien von Tumoren charakteristisch sind.

**[0004]** Da Krebs eine recht heterogene Krankheit ist, können an der Entstehung von Krebs mehrere Regulatoren des Zellwachstums beteiligt sein. Diese regulatorischen Elemente des Zellzyklus können entweder positive Regulatoren sein, sogenannte Onkogene falls mutiert, so dass ein transformierter Zustand erreicht wird, oder negative Regulatoren, sogenannte Tumorsuppressorgene. Die Anzahl der Faktoren, von denen bekannt ist, dass sie an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind und möglicherweise kausative Mittel bei der Entwicklung von Krebs darstellen, ist bislang höher als 100 und steigt noch immer.

**[0005]** Die Moleküle, die an dem Auftreten des karzinogenen Zustands einer Zelle beteiligt sind, verwendet werden, um zwischen Krebszellen und normalem Gewebe zu unterscheiden. Karzinogenes Gewebe kann somit festgestellt werden, indem für die Krebszellen charakteristische Moleküle festgestellt werden. Aufgrund der großen Zahl an Molekülen, die potenziell an der Verursachung von Krebs beteiligt sind, erweist sich dies als ausgeklügelt.

**[0006]** Für eine verbesserte Diagnose von Tumoren besteht ein Bedarf an neuen Markermolekülen zur Verwendung bei der Diagnose von Karzinomen und deren Vorstufen, welche eine spezifische Früherkennung erlauben und die Möglichkeit eröffnen, die Krankheiten in einem Frühstadium zu behandeln.

**[0007]** Von Tsutsumi et al. in Cancer Letters 159 (2000) 109-112 ist bereits bekannt, dass DNase-I-Polymorphismus mit Magenkarzinom und Kolorektalkarzinom assoziiert ist. Darüber hinaus schlagen die Autoren die Verwendung der DNase-I Phänotyp 2 vor, um Patienten zu identifizieren, bei denen ein Risiko besteht, dass sie ein Kolorektalkarzinom aufweisen oder entwickeln.

**[0008]** Economidou-Karaoglou et al. beschreiben in Eur. J. Cancer Clin. Oncol. Band 24, Nr. 8, S. 1337-1343, 1988, dass Variationen der Serumaktivität von alkalischer DNase ein geeignetes Mittel zur Überwachung der Reaktion von Lungenkrebs auf eine Therapie und zur Tumorprognose sind.

**[0009]** EP 1 249495 A1 beschreibt eine DNA-Sequenz, die für eine murine DNase-X kodiert, das murine DNase-X-Protein und Anti-DNase-X-Antikörper. Das Dokument betrifft außerdem Medikamente, welche die oben genannten Verbindungen enthalten, und welche vorzugsweise zur Prävention und/oder zum Behandeln von Krankheiten verwendet werden, bei denen Apoptose eine Rolle spielt, sowie diagnostische Verfahren und Kits auf der Basis dieser Verbindungen. Die Autoren dieses Dokuments postulieren außerdem, dass Krebszellen dadurch gekennzeichnet sind, dass sie eine signifikant geringere Menge an DNase-X enthalten als vergleichbare gesunde Zellen. Im Verlauf der Experimente, die zu der vorliegenden Erfindung führten, wurde jedoch festgestellt und konnte gezeigt werden, dass Tumorkrankheiten mit einer erhöhten Menge an DNase-X in den Tumorzellen assoziiert sind.

**[0010]** Die vorliegende Erfindung stellt DNase-X-Nukleinsäuren und Polypeptide zur Verwendung für die Erkennung von Karzinomen und deren Vorstufen bereit. Gemäß vorliegender Erfindung können diese Moleküle als Molekularmarker verwendet werden, welche eine umfassende Erkennung von Karzinomen und deren Vorstufen zulassen, z. B. Läsionen im Magendarmtrakt, Läsionen in den Atemwegen, etc., selbst in frühen Stadien. Darüber hinaus ist ein Verfahren für die Erkennung von Karzinomen und deren Vorstufen bereit gestellt.

**[0011]** Im Verlauf der Experimente, die zur vorliegenden Erfindung führten, konnte gezeigt werden, dass DNase-X-Moleküle als Molekularmarker für die Erkennung von Karzinomen und deren Vorstufen dienen können. Der diagnostische Wert von DNase-X-Nukleinsäuren und Polypeptiden für die Erkennung

nung von Karzinomen und deren Vorstufen ist bislang nicht veröffentlicht worden.

**[0012]** Veröffentlichungen, die die Mutation von DNase in Tumoren betreffen, können aufgefunden werden. Hingegen gibt es keinen Hinweis auf die Verwendung von DNase-X-Molekülen für die Erkennung und Diagnose von Karzinomen und deren Vorstufen.

**[0013]** Untersuchungen zur Expression von DNase-X in Karzinomen und deren Vorstufen und in verschiedenen Tumorstadien hoben ihre Nützlichkeit für Diagnose- und Prognosezwecke hervor. Die vorliegende Erfindung beruht daher auf den in den unten angegebenen Beispielen gezeigten Befunden der Erfinder, dass es die Höhe der Expression von DNase-X-Nukleinsäuren sowie der von diesen DNase-X-Nukleinsäuren kodierten Polypeptiden in Proben zulässt, Karzinome und ihre Vorstufen zu diagnostizieren und einzustufen, wie z. B. Läsionen im Magendarmtrakt, Läsionen in den Atemwegen, um den Verlauf der Krankheit vorherzusagen und die Krankheit nach der Anfangstherapie weiter zu verfolgen.

**[0014]** Die Erfinder konnten zeigen, dass DNase-X bei immunchemischen Verfahren speziell in bestimmten subzellulären Regionen wie beispielsweise im Zellkern nachweisbar sein kann. Im Falle von DNase-X konnte gezeigt werden, dass Differenzialfärbungsmuster in immunhistochemischen Verfahren von den in den Experimenten jeweils verwendeten Bindungsmitteln abhängen können. Es konnte gezeigt werden, dass DNase-X in gleichem Ausmaß im Western-Blot oder in ELISA-Assays von Tumor- und von normalen Geweben festgestellt werden kann. Im Unterscheid dazu liefern die gleichen Gewebe spezifische Kernfärbemuster von DNase-X im Fall von Tumormustern und keine Färbung bei normalen Kontrollproben. Darüber hinaus stellten die Erfinder fest, dass der Nachweis von DNase-X-Aktivität in Körperflüssigkeiten für die Identifizierung von Individuen mit Krebs oder Krebsvorläufern verwendet werden kann.

**[0015]** Dies könnte auf eine Maskierung des Epitops zurückzuführen sein, das von dem verwendeten Antikörper in Normalgewebe erkannt wird. In Tumorgewebe ist das Epitop unmaskiert, vor allem im Zellkern.

**[0016]** Die vorliegende Erfindung stellt Verfahren für die Erkennung von Karzinomen und deren Vorstufen bereit, welche den Nachweis eines oder mehrerer DNase-X-Moleküle in einer biologischen Probe umfassen. Der Nachweis von DNase-X-Molekülen im Verlauf des Verfahrens gemäß vorliegender Erfindung kann die Feststellung der Menge von DNase-X-Molekülen in biologischen Proben, die Feststellung der Anwesenheit oder Abwesenheit von DNase-X-Molekülen in biologischen Proben oder die Be-

stimmung der Lokalisierung von DNase-X-Molekülen z. B. in Zellen umfassen.

**[0017]** In einem Aspekt ist das Verfahren gemäß vorliegender Erfindung besonders für die Früherkennung von Krankheiten in Verbindung mit anomaler Zellproliferation, wie beispielsweise Kolorektalläsionen, und für die Erkennung disseminierter Tumorzellen bei der Diagnose einer minimalen Resterkrankung geeignet. Das Verfahren zur Erkennung solcher Karzinome und deren Vorstufen kann die Feststellung der (subzellulären) Lokalisierung von DNase-X-Molekülen, die Feststellung der Anwesenheit oder Abwesenheit und/oder der Menge von DNase-X-Molekülen oder die Feststellung der Zugänglichkeit (Nachweisbarkeit) spezifischer Epitope von DNase-X-Molekülen in biologischen Proben umfassen. Dieses Verfahren kann beispielsweise minimal invasive oder nicht-invasive Verfahren zum Erhalten der Probe anwenden.

**[0018]** In einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung können die oben erwähnten Nachweisverfahren von DNase-X-Polypeptiden und/oder DNase-X-Nukleinsäuren als Molekularmarker im Verlauf der Stadienklassifizierung (des Staging), der Beurteilung der Prognose, der Überwachung und dem Design einer Strategie für eine Tumorthherapie verwendet werden.

**[0019]** Die vorliegende Erfindung stellt außerdem DNase-X-Nukleinsäuren und -Polypeptide bereit zur Verwendung bei der Erkennung von Karzinomen und deren Vorstufen, wie z. B. Kolorektalläsionen, Magenkrebs, Speiseröhrenkrebs, Brustkrebs, Gebärmutterhalskrebs, etc.

**[0020]** Die vorliegende Erfindung stellt ferner Kits bereit, beispielsweise diagnostische Kits oder Forschungskits, für den Nachweis der DNase-X-Polynukleotide oder DNase-X-Polypeptide, oder umfassend DNase-X-Polynukleotide, DNase-X-Polypeptide oder spezifisch an DNase-X-Polypeptide oder -Polynukleotide bindende Agentien zur Verwendung bei der Erkennung von Karzinomen und deren Vorstufen.

**[0021]** Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren für die Therapie von Erkrankungen in Verbindung mit anomaler Zellproliferation. In diesem Aspekt können die erfindungsgemäßen DNase-X-Polypeptide und/oder -Polynukleotide im Rahmen einer Immuntherapie oder Gentherapie an Individuen verabreicht werden, die an den besagten Erkrankungen leiden. Für die Therapie von Karzinomen und deren Vorstufen können eine oder mehrere DNase-Nukleinsäuren und/oder -Polypeptide alleine oder in Kombination mit anderen Molekülen verwendet werden.

**[0022]** Noch ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung sind pharmazeutische Zusammensetzungen

gen, die hierin beschriebene DNase-X-Polypeptide und/oder DNase-X-Polynukleotide alleine oder in Kombination mit einem oder mehreren anderen therapeutischen oder diagnostischen Mitteln und/oder Trägerstoffen oder Hilfssubstanzen enthalten.

**[0023]** Es ist ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung, Verfahren zur Identifizierung von Molekülen bereit zu stellen, die an die Nukleinsäuren und Polypeptide der vorliegenden Erfindung sowie an Aktivatoren und Inhibitoren der Expression der Gene der vorliegenden Erfindung binden. Es ist außerdem ein Verfahren für die Identifizierung von Wirkstoffkandidaten für die Therapie von Karzinomen und deren Vorstufen bereit gestellt.

**[0024]** DNase-X-Moleküle, wie sie im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung verwendet werden, können Nukleinsäuren, Polynukleotide, Proteine, Polypeptide oder Peptide umfassen. Auf der Ebene der Nukleinsäuren kann es sich bei den Markermolekülen um DNA oder RNA, umfassend genomische DNA, cDNA und RNA wie beispielsweise mRNA oder hnRNA, handeln.

**[0025]** Allgemeine Zugänglichkeit, wie hierin verwendet, kann die Lokalisierung einer bestimmten Region (dem Epitop) eines Makromoleküls auf einer Oberfläche umfassen, so dass zweite oder dritte Moleküle in Kontakt mit dieser Region kommen oder mit ihr in Wechselwirkung treten. In den Verfahren gemäß vorliegender Erfindung kann jedes Verfahren zur Bestimmung der Zugänglichkeit einer bestimmten Region von Makromolekülen verwendet werden. Solche Verfahren können z. B. physikalische Verfahren wie beispielsweise Spektroskopie, Kristallographie, etc., chemische Verfahren wie beispielsweise Derivatisierung funktioneller Gruppen in den Makromolekülen, Vernetzung benachbarter Regionen in Makromolekülen etc., oder die Anwendung von Bindungsmitteln z. B. in immunchemischen Verfahren umfassen.

**[0026]** In bestimmten Ausführungsformen kann die Zugänglichkeit eines Epitops eines Moleküls durch Verfahren bestimmt werden, bei denen z. B. Bindungsmittel verwendet werden. In bestimmten Aspekten der vorliegenden Erfindung gilt ein Epitop als zugänglich, wenn Bindungsmittel, die spezifisch gegen das Epitop gerichtet sind, an das Epitop in einer Probe binden und es erkennen können. Umgekehrt gilt das Epitop als markiert oder nicht zugänglich, wenn spezifische Bindungsmittel nicht an das Epitop binden.

**[0027]** Expression, in der Verwendung gemäß vorliegender Erfindung kann beispielsweise die Expression von Proteinen umfassen. Die Transkription zu RNA und damit die Menge an mRNA können auch als Expression gemäß vorliegender Erfindung ver-

standen werden.

**[0028]** Die Expression einer Verbindung gilt gemäß vorliegender Erfindung als signifikant verändert, wenn die Stärke der Expression um mehr als 30% abweicht. Die Änderung der Expression kann beispielsweise eine erhöhte Expression oder verringerte Expression der Verbindung umfassen. Ein anderer Aspekt der veränderten Expression kann eine Veränderung der Art umfassen, dass die Verbindung unter Nicht-Wildtyp-Bedingungen exprimiert wird. Dies kann umfassen, dass die Verbindung beispielsweise in Situationen exprimiert wird, welche die Expression natürlicherweise unterdrücken, oder dass sie in Situationen, welche die Expression der Verbindung natürlicherweise induzieren, nicht exprimiert wird. Eine Veränderung der Expression, wie hierin verwendet, kann auch eine Veränderung des Transkriptionsmusters eines Gens umfassen, z. B. kann die Veränderung des Transkriptionsmusters alternatives Splicing des Gens umfassen.

**[0029]** Die Veränderungen der Transkriptionsmuster können die aus den veränderten Transkripten translatierten Polypeptide beeinflussen oder können auf untranslatierte Regionen beschränkt sein. Die Veränderungen der Transkriptionsmuster eines Gens können die Verwendung neuartiger Exons in den Transkripten, Deletionen von Exons in den Transkripten oder die Variation des Verhältnisses verschiedener Splicingvarianten in Zellen umfassen. Veränderungen der Transkriptionsmuster von Genen wie hierin verwendet können somit die Produktion von Nukleinsäuren umfassen wie beispielsweise mRNA, cDNA, etc., die im Vergleich zu Wildtyp-Nukleinsäuren, wie sie in Kontrollgewebe vorhanden sind, zusätzliche Bereiche von Nukleinsäuresequenzen enthalten.

**[0030]** Alternativ können den durch alternative Splicingmuster produzierten Nukleinsäuren Bereiche von Nukleinsäuresequenzen fehlen, die in Wildtyp-Polynukleotiden vorhanden sind. Das Vorhandensein zusätzlicher Bereiche kann gleichzeitig mit dem Fehler ursprünglicher Sequenzbereiche in einzelnen Transkripten auftreten. Veränderungen der Expression von Genen, wie im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung verwendet, können auch eine Veränderung der Stärke der Expression von Splicingvarianten von Genen umfassen. Dies kann erhöhte oder verminderte Expression von besonderen Splicingvarianten sowie eine Expression von Varianten umfassen, die in Wildtypgewebe nicht vorhanden sind, oder das Fehlen einer Expression von Splicingvarianten, die in Wildtypgewebe vorhanden sind. In einer Ausführungsform kann die Veränderung der Expression der Splicingvarianten die Veränderung der Verhältnisse verschiedener Splicingvarianten in dem Gewebe umfassen.

**[0031]** Nukleinsäuren, wie im Zusammenhang der

vorliegenden Erfindung verwendet, sind vorzugsweise Polynukleotide oder Fragmente davon. Bevorzugte Polynukleotide weisen mindestens 20 aufeinander folgende Nukleotide auf, vorzugsweise mindestens 30 aufeinander folgende Nukleotide und besonders bevorzugt mindestens 45 aufeinander folgende Nukleotide, die identisch sind, Sequenzhomologie aufweisen oder identische oder homologe Polypeptide im Vergleich zu den hierin beschriebenen mit den proliferativen Erkrankungen assoziierten Polypeptiden kodieren. Die Nukleinsäuren gemäß vorliegender Erfindung können auch zu einem der Polynukleotide komplementär sein. Polynukleotide können beispielsweise einzelsträngige (Sense oder Antisense) oder doppelsträngige Moleküle aufweisen, und es kann sich dabei um DNA (genomische, cDNA oder synthetische) oder RNA handeln. RNA-Moleküle umfassen sowohl hnRNA (mit Introns) als auch mRNA (ohne Introns). Gemäß vorliegender Erfindung können die Polynukleotide auch mit anderen Molekülen verknüpft sein, wie beispielsweise Stützmaterialien oder Nachweis-Markermolekülen, und können, jedoch nicht zwingend, zusätzliche kodierende oder nicht-kodierende Sequenzen enthalten.

**[0032]** Die DNase-X-Polynukleotide zur Verwendung in einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung können native Sequenzen oder Varianten davon sein. Die Varianten können eine oder mehrere Substitutionen, Additionen, Deletionen und/oder Insertionen enthalten, so dass die Immunogenität des kodierten Polypeptids relativ zu den entsprechenden nativen DNase-X-Proteinen nicht vermindert wird. Die Varianten zeigen vorzugsweise 65-70%, mehr bevorzugt mindestens 80% und am meisten bevorzugt mindestens 90% Sequenzidentität mit den nativen Nukleinsäuremolekülen, die in den Verfahren gemäß vorliegender Erfindung verwendet werden. In einer Ausführungsform der Erfindung zeigen die Varianten Sequenzidentität mit den nativen DNase-X-Nukleinsäuren von mindestens 65% bis 99%, oder einen beliebigen Wert dazwischen. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung zeigen die Varianten Sequenzhomologien von etwa 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 oder sogar 100%. Verfahren für die Bestimmung einer Sequenzähnlichkeit sind einem Fachmann bekannt.

**[0033]** In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann eine Variante von DNase-X-Molekülen verwendet werden, die so verändert ist, dass eine Wechselwirkung mit natürlichen Liganden oder Bindungspartnern beeinträchtigt ist.

**[0034]** Beispielsweise kann die Bestimmung der Ähnlichkeit von Sequenzen mithilfe der FastA- und/oder BlastN-Bioinformatiksoftware erfolgen, die auf dem HUSAR-Server des DKFZ Heidelberg verfügbar ist.

**[0035]** Darüber hinaus sind DNase-X-Nukleinsäuren zur Verwendung in den Verfahren gemäß vorliegender Erfindung alle Polynukleotide, die unter stringenten Bedingungen an Sonden hybridisieren, welche für die hierin beschriebenen Sequenzen spezifisch sind. Stringente Bedingungen, die bei der Hybridisierungsreaktion verwendet werden, sind dem Durchschnittsfachmann bekannt und können wie beschrieben in Sambrook et al. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, 1989, eingesetzt werden.

**[0036]** Die vorliegende Erfindung verwendet außerdem Polynukleotide, die aufgrund der Degeneration des genetischen Codes die DNase-X-Polypeptide kodieren, die nativ von den beschriebenen DNase-X-Nukleinsäuren kodiert werden, aber innerhalb der Nukleinsäure nicht die prozentuale Sequenzhomologie, wie sie oben beschrieben ist, aufweisen. Solche Nukleinsäuren können entstehen, indem die in den beschriebenen Sequenzen vorhandenen Codons zu degenerierten Codons verändert werden und so eine synthetische Nukleinsäure hergestellt wird. In bestimmten speziellen Ausführungsformen können die Codons an die gängige Codonverwendung eines geeigneten transgenen Wirtsorganismus, z. B. Hefen, Mäusen, Ratten etc., angepasst werden.

**[0037]** Die gemäß vorliegender Erfindung verwendeten DNase-X-Nukleotidsequenzen können mithilfe der bekannten DNA-Rekombinationstechniken mit verschiedenen anderen Nukleinsäuresequenzen verknüpft werden. Die Sequenzen können beispielsweise in jeden beliebigen einer Vielzahl von Klonierungsvektoren kloniert werden, wie beispielsweise in Plasmide, Phagemid, Lambda-Phage-Derivate und Kosmide. Darüber hinaus können Vektoren, wie beispielsweise Expressionsvektoren, Replikationsvektoren, Sondengenerationsvektoren und Sequenzierungsvektoren mit den hierin beschriebenen Sequenzen verknüpft werden. Sequenzen von besonderer Relevanz, die in die Nukleinsäuren gemäß vorliegender Erfindung kloniert werden können, sind beispielsweise nicht-kodierende Sequenzen und regulatorische Sequenzen, einschließlich Promotoren, Enhancer und Terminatoren.

**[0038]** In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können eine oder mehrere der Nukleinsäuresequenzen, die DNase-X-Polypeptide kodieren, verbunden werden. Dies könnte insbesondere für therapeutische Zwecke oder für die Expression rekombinanter Proteine nützlich sein. In diesen Ausführungsformen können 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder noch mehr verschiedene oder sogar identische DNase-Nukleinsäuren in einem Nukleinsäuremolekül miteinander verknüpft werden.

**[0039]** In einer bevorzugten Ausführungsform können DNase-X-Polynukleotide derart formuliert sein,

dass sie in der Lage sind, in Säugerzellen zu gelangen und in diesen Zellen exprimiert zu werden. Solche Formulierungen sind besonders für therapeutische Zwecke nützlich. Die Expression von Nukleinsäuresequenzen in Zielzellen kann durch jedes dem Fachmann bekannte Verfahren erreicht werden. Die Nukleinsäuren können beispielsweise mit Elementen verknüpft werden, die geeignet sind, ihre Expression in einer Wirtszelle zu ermöglichen. Solche Elemente können Promotoren oder Enhancer, wie beispielsweise CMV-, SV40-, RSV-, Metallothionein-1- oder Polyhedrin-Promotoren bzw. CMV- oder SV40-Enhancer umfassen. Mögliche Verfahren für die Expression sind beispielsweise der Einbau der Polynukleotide in einen viralen Vektor, einschließlich Adenovirus, adenoassoziiertes Virus, Retrovirus, Vakzinavirus oder Pockenvirus. Virale Vektoren für den Zweck der Expression von Nukleinsäuren in Säugerzellen können pcDNAJ, pMSX, pKCR, pEFBOS, cDM8, pCEV4 etc. umfassen. Diese Techniken sind einem Fachmann bekannt.

**[0040]** Andere Formulierungen zur Verabreichung bei Therapie Zwecken umfassen kolloidale Dispersionssysteme wie beispielsweise Makromolekülkomplexe, Mikrokügelchen, Kügelchen, Mizellen und Liposomen.

**[0041]** Es ist mithilfe konventioneller molekularbiologischer Verfahren generell möglich (siehe z. B. Sambrook et al., oben), verschiedene Mutationen in die Nukleinsäuremoleküle der Erfindung einzuführen. Als Ergebnis werden die erfindungsgemäßen tumorassoziierten DNase-X-Polypeptide oder damit verwandte Polypeptide mit ggf. modifizierten biologischen Eigenschaften synthetisiert. Eine Möglichkeit ist die Produktion von Deletionsmutanten, in denen Nukleinsäuremoleküle durch fortlaufende Deletionen vom 5'- oder 3'-Ende der DNA-Kodierungssequenz aus produziert werden, was zur Synthese von DNase-X-Polypeptiden führt, die entsprechend gekürzt sind. Eine weitere Möglichkeit ist die Einführung einer Punktmutation an Positionen, an denen eine Modifikation der Aminosäuresequenz beispielsweise die proliferationspezifischen Eigenschaften beeinflusst. Mit diesem Verfahren können beispielsweise Muteine produziert werden, die einen modifizierten Km-Wert besitzen und nicht länger den Regulationsmechanismen unterliegen, die in der Zelle normalerweise existieren, z. B. was die allosterische Regulierung oder kovalente Modifikation anbelangt, oder veränderten Eindungs-, Dimerisierungs-, inter- oder intramolekulare Wechselwirkungseigenschaften. Solche Muteine können auch wertvolle therapeutisch nützliche Agonisten oder Antagonisten der in den Verfahren gemäß vorliegender Erfindung verwendeten DNase-X-Molekülen sein.

**[0042]** Für die Manipulation in prokaryotischen Zellen durch gentechnische Veränderung können die

DNase-X-Nukleinsäuremoleküle der Erfindung oder Teile dieser Moleküle in Plasmide eingeführt werden, was eine Mutagenese oder eine Modifikation einer Sequenz durch Rekombination von DNA-Sequenzen erlaubt. Mithilfe konventioneller Verfahren (vgl. Sambrook et al., oben) können Basen vertauscht und natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Zur Verknüpfung der DNA-Fragmente miteinander können den Fragmenten Adapter oder Linker hinzugefügt werden. Darüber hinaus können Manipulationen vorgenommen werden, die geeignete Spaltstellen liefern oder die überflüssige DNA oder Spaltstellen entfernen. Wenn Insertionen, Deletionen oder Substitutionen möglich sind, können In-vitro-Mutagenese, Primerreparatur, Restriktion oder Ligation durchgeführt werden. Als Analyseverfahren werden in der Regel Sequenzanalyse, Restriktionsanalyse und andere biochemische oder molekularbiologische Verfahren verwendet.

**[0043]** Die von den verschiedenen Varianten der DNase-X-Nukleinsäuremoleküle der Erfindung kodierten DNase-X-Polypeptide weisen bestimmte gemeinsame Kennzeichen auf, wie beispielsweise Molekulargewicht, immunologische Reaktivität oder Konformation, oder physikalische Eigenschaften wie beispielsweise die elektrophoretische Mobilität, das Chromatographieverhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität, pH-Optimum, Temperaturoptimum.

**[0044]** Die Erfindung verwendet des Weiteren Vektoren, welche die erfindungsgemäßen tumorassoziierten DNase-X-Nukleinsäuremoleküle enthalten. Vorzugsweise handelt es sich dabei um Plasmide, Kosmide, Viren, Bakteriophagen und andere Vektoren, die in der Regel auf dem Gebiet der gentechnischen Manipulationen verwendet werden. Vektoren, die für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, umfassen, jedoch nicht ausschließlich, die T7-basierten dualen Expressionsvektoren (Expression in Prokaryoten und in Eukaryoten) zur Expression in Säugerzellen und von Bakulovirus abstammende Vektoren zur Expression in Insektenzellen. Vorzugsweise ist das DNase-X-Nukleinsäuremolekül zur Verwendung in den erfindungsgemäßen Verfahren operativ mit den regulatorischen Elementen in dem rekombinanten Vektor der Erfindung verknüpft, welche die Transkription und Synthese einer translatierbaren mRNA in prokaryotischen und/oder eukaryotischen Zellen garantieren. Die zu transkribierende Nukleotidsequenz kann operativ mit einem Promotor wie einem T7-, Metallothionein-I oder Polyhedrinpromotor verknüpft sein.

**[0045]** In einer weiteren Ausführungsform verwendet die vorliegende Erfindung rekombinante Wirtszellen, die DNase-X-Nukleinsäuremoleküle transient oder stabil enthalten. Eine Wirtszelle ist als Organismus zu verstehen, der in der Lage ist, rekombinante

DNA in vitro aufzunehmen und im gegebenen Fall das von den Nukleinsäuremolekülen der Erfindung kodierte Polypeptid zu synthetisieren. Vorzugsweise handelt es sich bei diesen Zellen um prokaryotische oder eukaryotische Zellen, beispielsweise um Säugetierzellen, Bakterienzellen, Pflanzenzellen, Insektenzellen oder Hefezellen. Die Wirtszellen zur Verwendung in der Erfindung sind vorzugsweise durch die Tatsache gekennzeichnet, dass das eingeführte DNase-X-Nukleinsäuremolekül entweder bezogen auf die transformierte Zelle heterolog ist, d. h. es kommt in diesen Zellen natürlicherweise nicht vor, oder es befindet sich an einem Platz im Genom, der sich von dem der entsprechenden natürlicherweise vorkommenden DNase-X-Sequenz unterscheidet.

**[0046]** Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung eines Polypeptids, das eine biologische Eigenschaft von DNasen X aufweist und von den bekannten DNase-X-Nukleinsäuremolekülen kodiert wird. Diese Proteine oder Polypeptide können durch jedes geeignete Verfahren hergestellt werden, einschließlich Verfahren, bei denen z. B. eine Wirtszelle unter Bedingungen kultiviert wird, welche die Synthese des DNase-X-Polypeptids zulassen, und das DNase-X-Polypeptid wird anschließend aus den kultivierten Zellen und/oder dem Kulturmedium isoliert.

**[0047]** Isolierung und Reinigung des rekombinant hergestellten Polypeptids können mithilfe konventioneller Mittel erfolgen, einschließlich durch präparative Chromatographie und Affinitäts- und immunologische Trennungen unter Verwendung beispielsweise eines Antikörpers, der gegen die erfindungsgemäßen tumorassoziierten Markerproteine gerichtet ist, oder es kann z. B. im Wesentlichen mithilfe des einstufigen Verfahrens, das in Smith and Johnson, Gene 67; 31-40 (1988), beschrieben ist, gereinigt werden.

**[0048]** Die Polypeptide zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung umfassen jedoch nicht nur rekombinant produzierte DNase-X-Polypeptide, sondern umfassen auch isolierte natürlich vorkommende DNase-X-Polypeptide, synthetisch produzierte DNase-X-Polypeptide oder Polypeptide, die durch eine Kombination dieser Verfahren produziert sind. Mittel zum Herstellen solcher Polypeptide oder verwandter Polypeptide sind aus dem Stand der Technik gut bekannt. Diese Polypeptide liegen vorzugsweise in einer im Wesentlichen gereinigten Form vor.

**[0049]** Die Produktion eines DNase-X-Polypeptids zur Verwendung in einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung kann beispielsweise in einem zellfreien In-vitro-Transkriptions- und/oder Translationsystem erfolgen. Solche Systeme sind dem Durchschnittsfachmann bekannt. Ein Beispiel kann ein In-vitro-Translationssystem umfassen, wie es vom Rapid Translation System von Roche Molecular Bio-

chemicals bereit gestellt wird.

**[0050]** DNase-X-(Poly-)Peptide wie in den Verfahren gemäß vorliegender Erfindung verwendet, können Aminosäureketten beliebiger Länge aufweisen, einschließlich Vollängenproteine, wobei die Aminosäurereste durch kovalente Peptidbindungen verknüpft sind.

**[0051]** DNase-X-Peptide zur Verwendung beim Nachweis oder bei der Behandlung von Karzinomen und deren Vorstufen, wie im Kontext der vorliegenden Erfindung beschrieben, umfassen Polypeptide einer Länge von mindestens 4 Aminosäuren. Diese DNase-X-Peptide können beispielsweise 4 bis 50 Aminosäuren oder eine beliebige Anzahl von Aminosäuren dazwischen umfassen. In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können die Peptide Polypeptide mit mehr als 50 Aminosäuren umfassen. Diese DNase-X-Polypeptide zur Verwendung in den Verfahren der vorliegenden Erfindung können beispielsweise 50, 100, 500, 750, 1000 Aminosäuren oder eine beliebige Anzahl von Aminosäuren dazwischen umfassen und können Proteine oder Fragmente davon umfassen und/oder Fusions- oder chimäre Proteine, die eine oder mehrere zusätzliche heterologe Sequenzen aufweisen. Die zusätzlichen Sequenzen können von den nativen DNase-X-Proteinen abgeleitet oder heterolog sein, und solche Sequenzen können (müssen aber nicht) immunreaktiv und/oder antigen sein. Wie unten ausführlich erläutert können solche Polypeptide aus Tumorgewebe isoliert oder mithilfe synthetischer oder rekombinanter Mittel hergestellt sein. Wie hierin verwendet, ist ein Polypeptid für die Anwendung in den hierin beschriebenen Verfahren, das biologische Eigenschaften von DNase-X-Peptiden aufweist, als ein Polypeptid mit mindestens im Wesentlichen denselben immunogenen Eigenschaften zu verstehen, d. h. es ist noch fähig zur Bindung an einen Antikörper, der gegen ein DNase-X-Polypeptid gerichtet ist, z. B. umfasst mindestens ein immunogenes Epitop eines DNase-X-Polypeptids.

**[0052]** Peptide zur Verwendung in einem Verfahren wie hierin beschrieben können z. B. immunogene Polypeptide sein. Dies erfordert, dass die Polypeptide Immunreaktionen in Wirtsorganismen stimulieren, entweder in der Form, welche die Polypeptide in ihrer natürlichen Umgebung annehmen und/oder insbesondere in der Form, welche die Polypeptide nach Prozessierung durch die zelluläre Antigenprozessierungs- und -präsentationsmaschinerie annehmen.

**[0053]** Ein immunogener Anteil, wie oben verwendet, ist ein Anteil eines Proteins, der von einem Antigenrezeptor auf der Oberfläche einer B-Zelle und/oder einer T-Zelle erkannt wird. Die immunogenen Anteile umfassen mindestens 4 Aminosäurereste, mindestens 10 Aminosäurereste oder mindestens

15 Aminosäurereste des hierin beschriebenen Proteins. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wurden bestimmte Domänen des Proteins, wie beispielsweise Transmembrandomänen oder N-terminale Leadersequenzen, deletiert.

**[0054]** Die immunogenen Anteile gemäß vorliegender Erfindung reagieren mit Antiserum oder spezifischen Antikörpern mit der gleichen oder fast der gleichen Intensität wie die nativen Vollängenproteine. Die immunogenen Anteile werden generell mithilfe der aus dem Stand der Technik bekannten Techniken identifiziert. Mögliche Techniken sind beispielsweise das Screening der Polypeptide hinsichtlich der Fähigkeit, mit antigen-spezifischen Antikörpern, Antisera und/oder T-Zelllinien oder -Klonen zu reagieren.

**[0055]** Geeignete immunogene Anteile für DNase-X können z. B. folgende Peptide aufweisen:

71-90: RELNRFDGSGPYSTLSSPQL  
 207-224: HWVIADGEDTIVRASTHC  
 187-206: CASLTKKRLDKLELRTEPGF  
 225-241: TYDRVVLHGERCRSLH  
 254-269: LTEEEALNISDHYPVE  
 110-126: VLSSYVYNDEDDVFARE

**[0056]** Diese immunogenen Sequenzen für DNase-X sollen Beispiele für immunogene Regionen sein und sollen den Umfang der vorliegenden Erfindung nicht einschränken. Für alle DNasen-X können die immunogenen Regionen zur Verwendung in einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung durch ein beliebiges geeignetes Verfahren bestimmt werden. Die Verfahren zur Bestimmung der entsprechenden immunogenen Regionen in den jeweiligen DNase-X-Molekülen sind einem Fachmann bekannt.

**[0057]** In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können DNase-X-Polypeptide Fusions- oder chimäre Polypeptide aufweisen, die hierin beschriebenen Sequenzen enthalten. Fusionsproteine umfassen die Polypeptide gemäß vorliegender Erfindung zusammen mit beliebigen zweiten und weiteren Polypeptiden, wie beispielsweise einem oder mehreren Polypeptiden mit derselben Sequenz oder einer anderen Sequenz. Heterologe Polypeptide können z. B. Enzyme, Rezeptormoleküle, Antigene, antigene oder immunogene Epitope oder Fragmente, Antikörper oder Fragmente davon, Signal-Polypeptide oder signalübertragende Polypeptide, markierte Polypeptide etc. umfassen. Das immunogene Protein kann beispielsweise in der Lage sein, eine Erinnerungsreaktion auszulösen. Beispiele solcher Proteine umfassen Tetanus-, Tuberkulose- und Hepatitisproteine (vgl. beispielsweise Stoute et al. New Engl. J. Med., 336: 86-91 (1997)). Für die Verwendung in pharmazeutischen Zusammensetzungen können Fusionsproteine, die Serumalbumin oder Fragmente davon aufweisen, in bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung geeignet

sein.

**[0058]** In einer Ausführungsform der Erfindung können die Fusionspeptide für eine verstärkte Erkennung oder Reinigung der Polypeptide oder von Komplexen der DNase-X-Polypeptide mit den entsprechenden immunologischen Einheiten gemäß vorliegender Erfindung konstruiert sein. Für Reinigungszwecke können den Polypeptiden beispielsweise His-Marker, myc-Marker etc. hinzugefügt werden. Für Nachweiszwecke können antigene Anteile, Enzyme, chromogene Sequenzen etc. mit den Polypeptiden fusioniert werden. Die Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung können (müssen aber nicht) ein Linkerpeptid zwischen dem ersten und zweiten Polypeptid aufweisen.

**[0059]** Eine Peptidlinkersequenz kann dazu verwendet werden, um das erste und zweite Polypeptid mit einem Abstand voneinander zu trennen, um sicherzustellen, dass sich jedes Polypeptid in seine Sekundär- und Tertiärstruktur faltet. Solch eine Peptidlinkersequenz wird in das Fusionsprotein mittels aus dem Stand der Technik gut bekannten Standardtechniken eingebaut. Geeignete Peptidlinkersequenzen können auf Basis folgender Faktoren gewählt werden:

(1) ihrer Fähigkeit, eine flexible verlängerte Konformation einzunehmen; (2) ihrer Unfähigkeit, eine Sekundärstruktur einzunehmen, die mit funktionellen Epitopen auf dem ersten und zweiten Polypeptid Wechselwirken könnte; und (3) dem Fehlen hydrophober oder geladener Reste, die mit den funktionellen Epitopen der Polypeptide reagieren könnten. Bevorzugte Peptidlinkersequenzen enthalten Gly-, Asn- und Ser-Reste. Es können auch andere, fast neutrale Aminosäuren, wie beispielsweise Thr und Ala, in der Linkersequenz verwendet werden. Aminosäuresequenzen, die geeigneterweise als Linker verwendet werden können, umfassen die in Maratea et al., Gene 40: 39-46, 1985; Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8258-8262, 1986; US-Patent Nr. 4,935,233 und US-Patent Nr. 4,751,180 beschriebenen. Die Linkersequenz kann eine Länge von 1 bis etwa 50 Aminosäuren aufweisen. Peptidsequenzen sind nicht erforderlich, wenn das erste und zweite Polypeptid nicht-essenzielle N-terminale Aminosäureregionen aufweist, die verwendet werden können, um die funktionellen Domänen zu trennen und sterische Wechselwirkungen zu verhindern.

**[0060]** Die DNase-Polypeptide zur Verwendung in einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung umfassen außerdem Varianten der nativen DNase-Proteine. Diese Varianten können sich von dem nativen Protein hinsichtlich einer oder mehrerer Veränderungen unterscheiden, wie beispielsweise Substitutionen, Deletionen, Additionen und/oder Insertionen. Die Immunreaktivität der Varianten gemäß vorliegender Erfindung ist im Vergleich zu den nativen DNase-



se-X-Proteinen nicht wesentlich verringert. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Immunreaktivität gegenüber den nativen Polypeptiden um weniger als 50% reduziert, in einer mehr bevorzugten Ausführungsform ist die Immunreaktivität um weniger als 20% reduziert. In einer Ausführungsform ist die Immunreaktivität um weniger als 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% oder einem beliebigen Wert dazwischen reduziert. In bestimmten Ausführungsformen ist die Immunreaktivität der Varianten sogar um mehr als 50% reduziert.

**[0061]** In einer Ausführungsform können DNase-X-Varianten in einem oder mehreren Anteilen defizient sein, wie beispielsweise N-terminalen Leadersequenzen, Transmembrandomänen oder kurzen N- und/oder C-terminale Sequenzen. Die Varianten zeigen 60%, 65% oder 70%, mehr bevorzugt wenigstens 75%, 80%, 85% oder 90% und am meisten bevorzugt wenigstens 92,5%, 95%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99% oder 99,5% Identität mit den DNase-X-Polypeptiden, die gemäß vorliegender Erfindung offenbart sind.

**[0062]** Die Varianten der vorliegenden Erfindung sind vorzugsweise konservative Substitutionen, so dass die veränderten Aminosäuren durch Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften ersetzt werden. Zu den betroffenen Eigenschaften gehören Polarität, Ladung, Löslichkeit, Hydrophobizität, Hydrophilie und/oder die amphipathische Art der Aminosäurereste. Die hierin beschriebenen Varianten können auch weitere terminale Leadersequenzen, Linker oder Sequenzen aufweisen, die eine Synthese, Reinigung oder Stabilität der Polypeptide auf einfachere oder praktischere Art ermöglichen.

**[0063]** Die DNase-X-(Poly)Peptide zur Verwendung in einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung können nach einem beliebigen, einem Fachmann bekannten Verfahren hergestellt werden. Beispielsweise können die Polypeptide aus Zellen oder Organismen isoliert werden, die die Polypeptide exprimieren, können rekombinant in rekombinanten Wirtszellen produziert werden oder können chemisch mithilfe der Verfahren synthetisiert werden, die generell für die Synthese von Polypeptiden verwendet werden.

**[0064]** Der Begriff „Bindungsmittel“ wie hierin verwendet, umfasst verschiedene Substanzen wie beispielsweise Oligopeptide, Antikörper, peptidomimetische Moleküle, die antigenbindende Oligopeptide, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate, organische Verbindungen, etc. umfassen. Antikörper gemäß vorliegender Erfindung bezieht sich vorzugsweise auf Antikörper, die im Wesentlichen aus gepoolten monoklonalen Antikörpern mit verschiedenen Epitopspezifitäten bestehen, sowie aus distinkten Zubereitungen monoklonaler Antikörper. Monoklonale Antikörper werden mithilfe von Verfahren, die einem Fachmann gut be-

kannt sind (vgl. z. B., Köhler et al., Nature 256 (1975), 495), aus einem Antigen, das Fragmente der Polypeptide der Erfindung enthält, hergestellt. Wie hierin verwendet, soll der Begriff „Antikörper“ (Ab) oder „monoklonaler Antikörper“ (Mab) intakte Moleküle sowie Antikörperfragmente (wie beispielsweise Fab und F(ab')<sub>2</sub>-Fragment) umfassen, die spezifisch an Protein binden können. Fab- und F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten fehlt das Fc-Fragment intakter Antikörper, sie werden rascher aus dem Kreislauf entfernt und weisen unter Umständen weniger unspezifische Gewebefindung auf als ein intakter Antikörper. (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24: 3 16-325 (1983)). Diese Fragmente sind daher bevorzugt, sowie die Produkte einer Fab- oder einer anderen Immunglobulin-exprimierenden Bibliothek. Darüber hinaus umfassen Antikörper der vorliegenden Erfindung chimäre, einzelkettige und humanisierte Antikörper.

**[0065]** Gemäß vorliegender Erfindung verwendete Bindungsmittel können beispielsweise für die Hemmung der Aktivität der erfindungsgemäßen DNase-X-Polypeptide verwendet werden. In dieser Hinsicht bedeutet der Begriff „Bindungsmittel“ Mittel, die spezifisch an die DNase-X-Polypeptide binden, welche von den neuartigen tumorassoziierten Nukleinsäuren exprimiert werden, und so die Aktivität des Polypeptids hemmen. Solche Bindungsmittel können beispielsweise Nukleinsäuren (DNA, RNA, PNA etc.), Polypeptide (Antikörper, Rezeptoren, antigene Fragmente, Oligopeptide), Kohlenhydrate, Lipide, organische oder anorganische Verbindungen (Metallionen, Schwefelverbindungen, Borane, Silikate, Reduktionsmittel, Oxidierungsmittel) umfassen. Die Bindungsmittel können vorzugsweise mit dem Polypeptid Wechselwirken, indem sie an Epitope bindet, die für die biologische Aktivität wesentlich sind. Die Wechselwirkung kann reversibel oder irreversibel sein. Bei der Bindung kann es sich um eine nicht-kovalente oder sogar um eine kovalente Bindung an das Polypeptid handeln. Darüber hinaus kann das Bindungsmittel Veränderungen in das DNase-X-Polypeptid einführen, welche die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen DNase-X-Polypeptids verändern oder reduzieren.

**[0066]** Für bestimmte Zwecke, z. B. diagnostische Verfahren, kann der Antikörper oder das Bindungsmittel der vorliegenden Erfindung erkennbar markiert sein, beispielsweise mit einem radioaktiven Isotop, einer biolumineszenten Verbindung, einer chemilumineszenten Verbindung, einer fluoreszenten Verbindung, einem Metallchelat, einer biologisch relevanten Bindungsstruktur wie beispielsweise Biotin oder Digoxigenin oder einem Enzym. Darüber hinaus kann jedes Verfahren verwendet werden, das für die Erkennung der intermolekularen Wechselwirkung geeignet ist.

**[0067]** Der Antikörper oder das Antigenbindungs-

mittel reagiert spezifisch, wenn es in detektierbarem Umfang mit einem DNase-X-Protein reagiert, wie es in einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung verwendet wird, und wenn es mit anderen Proteinen nicht signifikant reagiert. Der Antikörper gemäß vorliegender Erfindung kann ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper sein. Weitere Moleküle, die zu einer spezifischen Bindung fähig sind, sind beispielsweise antigenbindende Fragment von Antikörpern, wie beispielsweise Fab-Fragmente, RNA-Moleküle oder Polypeptide. Gemäß vorliegender Erfindung können Bindungsmittel isoliert oder in Kombination verwendet werden. Mittels Kombination ist es möglich, einen höheren Empfindlichkeitsgrad zu erreichen.

**[0068]** In bestimmten Ausführungsformen können Bindungsmittel selektive Spezifitäten für die verschiedenen DNase-X-Polypeptide aufweisen, die in den Verfahren gemäß vorliegender Erfindung verwendet werden. Diese Bindungsmittel können z. B. durch Epitopspezifität definiert sein. Die Spezifität kann z. B. so gewählt sein, dass sichergestellt ist, dass nur ein Polypeptidprodukt des DNase-X-Gens von dem jeweiligen Bindungsmittel erkannt wird.

**[0069]** Die Antikörper oder Bindungsmittel, die für die Verfahren gemäß vorliegender Erfindung geeignet sind, können weitere Bindungsstellen entweder für therapeutische Mittel oder andere Polypeptide aufweisen oder können an die therapeutischen Mittel oder Polypeptide gekoppelt sein. Therapeutische Mittel können Wirkstoffe, Toxine, Radionuklide und Derivate davon umfassen. Die Mittel können entweder direkt oder indirekt, beispielsweise durch eine Linker- oder Trägergruppe, an das Bindungsmittel gekoppelt sein. Die Linkergruppe kann beispielsweise die Funktion haben, die Kopplungsreaktion zwischen Bindungsmittel und therapeutischen oder einem anderen Mittel zu ermöglichen, oder der Linker kann als Abstandshalter zwischen den distinkten Teilen des Fusionsmoleküls wirken. Der Linker kann unter bestimmten Umständen auch spaltbar sein, um das gebundene Mittel unter den Bedingungen freizusetzen. Die therapeutischen Mittel können kovalent direkt oder über eine Linkergruppe an Trägergruppen gekoppelt sein. Das Mittel kann auch nicht-kovalent an den Träger gebunden sein. Träger, die gemäß vorliegender Erfindung verwendet werden können, sind beispielsweise Albumine, Polypeptide, Polysaccharide oder Liposomen.

**[0070]** Die gemäß vorliegender Erfindung verwendeten Antikörper können an eines oder mehrere Mittel gekoppelt sein. Die mehreren an einen Antikörper gekoppelten Mittel können alle derselben Art angehören, oder es kann sich um mehrere verschiedene Mittel handeln, die an einen Antikörper gebunden sind.

**[0071]** Die Erfindung verwendet transgene, nicht-menschliche Tiere wie beispielsweise transgene Mäuse, Ratten, Hamster, Hunde, Affen, Kaninchen, Schweine, *C. elegans* und Fische, wie beispielsweise Zitterrochen, die ein DNase-X-Nukleinsäuremolekül oder einen Vektor der Erfindung aufweisen, wobei vorzugsweise das DNase-X-Nukleinsäuremolekül oder der Vektor stabil in das Genom des nicht-menschlichen Tieres integriert sind, vorzugsweise derart, dass das Vorhandensein des DNase-X-Nukleinsäuremoleküls oder Vektors zur Expression des DNase-X-Polypeptids (oder eines verwandten Polypeptids) führt, oder auf andere Weise in dem nicht-menschlichen Tier transient exprimiert wird. Das Tier kann eine oder mehrere Kopien desselben oder verschiedener Nukleinsäuremoleküle aufweisen, die eine oder mehrere Formen des DNase-X-Polypeptids oder mutante Formen davon kodieren. Dieses Tier hat zahlreiche Nutzungsmöglichkeiten, einschließlich als Forschungsmodell für die Regulierung der Zellproliferation und -differenzierung und stellt daher ein neuartiges und wertvolles Tier bei der Entwicklung von Therapien, Behandlungen, etc. für Krankheiten dar, die durch einen Mangel oder ein Versagen des an der Entwicklung von Zellproliferationserkrankungen wie z. B. Tumoren beteiligten DNase-X-Proteins verursacht werden. Entsprechend ist das nicht menschliche Tier in diesem Fall vorzugsweise ein Labortier wie beispielsweise eine Maus oder Ratte.

**[0072]** In bestimmten Ausführungsformen umfasst das transgene, nicht-menschliche Tier des Weiteren wenigstens ein inaktiviertes Wildtypallel des entsprechenden Gens, welches das erfindungsgemäße DNase-X-Polypeptid kodiert. Diese Ausführungsform erlaubt beispielsweise die Untersuchung der Wechselwirkungen verschiedener mutanten Formen des DNase-X-Polypeptids. Alle Anwendungen, die zuvor hierin in Bezug auf ein transgenes Tier erörtert worden sind, können auch bei Tieren verwendet werden, die zwei, drei oder mehr Transgene tragen.

**[0073]** In den Verfahren gemäß vorliegender Erfindung kann es auch wünschenswert sein, Proteinexpression oder -funktion in einem bestimmten Stadium der Entwicklung und/oder des Lebens des transgenen Tiers zu inaktivieren. Dies kann erreicht werden, indem beispielsweise gewebespezifische, entwicklungs- und/oder zellregulierte und/oder induzierbare Promotoren verwendet werden, welche die Expression z. B. eines Antisensemoleküls oder Ribozyms antreiben, das gegen das RNA-Transkript gerichtet ist, welches die erfindungsgemäße DNase-X-kodierende mRNA kodiert; siehe auch oben. Ein geeignetes induzierbares System ist beispielsweise tetracyclinregulierte Genexpression, wie beschrieben z. B. von Gossen und Bujard (Proc. Natl. Acad. Sci. 89 USA (1992), 5547-5551) und Gossen et al. (Trends Biotech. 12 (1994), 58-62). Entsprechend kann durch

solche regulatorischen Elemente die Expression des mutanten erfindungsgemäßen tumorassoziierten Proteins gesteuert werden.

**[0074]** Darüber hinaus verwendet die Erfindung in bestimmten Ausführungsformen eine transgene Säugerzelle, welche (vorzugsweise stabil in ihr Genom integriert oder transient eingeführt) ein DNase-X-Nukleinsäuremolekül oder einen Teil davon enthält, wobei die Transkription und/oder Expression des Nukleinsäuremoleküls oder Teils davon zur Reduzierung der Synthese eines nativen DNase-X-Moleküls führt. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Reduzierung durch ein Antisense-Molekül, Sense-Molekül, Ribozym, durch Cosuppression und/oder einen dominanten mutanten Effekt erzielt. „Antisense-Molekül“ und „Antisense-Nukleotide“ bedeutet DNA- oder RNA-Konstrukte, welche die Expression des natürlicherweise vorkommenden Genproduktes blockieren. In einer anderen Ausführungsform kann die native Nukleinsäuresequenz, die für das DNase-X-Polypeptid kodiert, durch eine Variante der Nukleinsäuresequenz verändert oder substituiert werden, z. B. mithilfe von Rekombination, wodurch die Funktion des DNase-X-Gens ausgeschaltet wird. Ein Organismus, dem die DNase-X-Aktivität fehlt, kann somit nach Knock-Out-Experimenten hergestellt werden.

**[0075]** In bestimmten Ausführungsformen können transgene nicht-menschliche Tiere mit einer verringerten Menge an DNase-X-Protein nützlich sein. Techniken, um dies zu erreichen, sind einem Fachmann gut bekannt. Dazu gehören beispielsweise die Expression von Antisense-RNA, Ribozyme oder Moleküle, die Antisense- und Ribozym-Funktion kombinieren, und/oder Moleküle, die einen Kosuppressionseffekt liefern. Bei Verwendung der Antisense-Strategie zur Verringerung der Menge der erfindungsgemäßen tumorassoziierten Markerproteine in Zellen ist das Nukleinsäuremolekül, welches die Antisense-RNA kodiert, vorzugsweise homologen Ursprungs, was die für die Transformation verwendete Tierart anbelangt. Es ist jedoch auch möglich, Nukleinsäuremoleküle zu verwenden, die einen hohen Grad an Homologie zu endogen vorhandenen Nukleinsäuremolekülen aufweisen, die ein DNase-X-Protein kodieren. In diesem Fall ist die Homologie vorzugsweise höher als 75%, 80% oder 85%, insbesondere höher als 90%, 91%, 92%, 93% oder 94% und noch mehr bevorzugt höher als 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99% oder 99,5%. Die Reduzierung der Synthese eines DNase-X-Polypeptids zur Verwendung in einem erfindungsgemäßen Verfahren in den transgenen Säugerzellen kann zu einer Veränderung beispielsweise dem Abbau endogener Proteine führen. In transgenen Tieren, die solche Zellen aufweisen, kann dies zu verschiedenen physiologischen Veränderungen, Entwicklungsveränderungen und/oder morphologischen Veränderungen führen.

ren.

**[0076]** Die vorliegende Erfindung nutzt also transgene nicht-menschliche Tiere, welche die oben beschriebenen transgenen Zellen aufweisen. Diese können beispielsweise infolge des stabilen oder transienten Vorhandenseins einer Fremd-DNA im Vergleich zum Wildtypieren ein Defizit bei der Regulierung der Zellproliferation und/oder -differenzierung aufweisen, was zu mindestens einem der folgenden Merkmale führt:

- (a) Unterbrechung eines oder mehrere endogener Gene, das bzw. die eine DNase-X kodiert bzw. kodieren;
- (b) Expression wenigstens einer Antisense-RNA und/oder eines Ribozyms gegen ein Transkript, das eine DNase- Nukleinsäure aufweist;
- (c) Expression einer Sense-mRNA und/oder einer nicht- translatierbaren mRNA einer DNase-X-Nukleinsäure;
- (d) Expression eines Antikörpers, der gegen ein DNase-X- Polypeptid gerichtet ist;
- (e) Einbau einer funktionellen oder nicht-funktionellen Kopie der regulatorischen Sequenz einer DNase-X; oder
- (f) Einbau eines rekombinanten DNase-X-Moleküls oder eines Vektors, der eine DNase-X-Nukleinsäure enthält.

**[0077]** Verfahren für die Herstellung eines transgenen nicht-menschlichen Tieres zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung, vorzugsweise einer transgenen Maus, sind einem Fachmann gut bekannt. Solche Verfahren umfassen z. B. die Einführung eines Nukleinsäuremoleküls oder eines Vektors in eine Keimzelle, eine Embryonalzelle, eine Stammzelle oder ein Ei oder in eine davon abstammende Zelle. Das nicht-menschliche Tier kann gemäß eines hierin beschriebenen Testverfahrens verwendet werden und kann ein nicht-transgenes gesundes Tier sein oder kann eine Krankheit aufweisen, vorzugsweise eine Krankheit, die durch wenigstens eine Mutation in einem DNase-X-Protein und/oder -Gen hervorgerufen wird.

**[0078]** Solche transgenen Tiere sind beispielsweise für pharmakologische Studien in Verbindung mit mutanten Formen des oben beschriebenen erfindungsgemäßen tumorassoziierten Markerpolypeptids gut geeignet. Die Herstellung transgener Embryos und deren Testung kann beispielsweise wie von A. L. Joyner Hrsg., Gene Targeting, A Practical Approach (1993), Oxford University Press, beschrieben erfolgen. Die DNA der Embryonalmembran von Embryonen kann beispielsweise mithilfe von Southern-Blots mit einer geeigneten Sonde, Amplifizierungstechniken auf Basis von Nukleinsäuren (z. B. PCR) etc. analysiert werden; siehe oben.

**[0079]** Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung.

ung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Verwendung bei der Behandlung von Karzinomen und deren Vorstufen. Die gemäß vorliegender Erfindung verwendeten DNase-X-Polypeptide, DNase-X-Polynukleotide und DNase-X-Bindungsmittel (vor allem Antikörper) können in pharmazeutischen oder immunogenen Zusammensetzungen vorhanden sein.

**[0080]** Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können auf jede geeignete, einem Fachmann bekannte Weise verabreicht werden. Die Verabreichung kann beispielsweise eine Injektion, wie beispielsweise eine intrakutane, intramuskuläre, intravenöse oder subkutane Injektion, intranasale Verabreichung, beispielsweise durch Aspiration, oder orale Verabreichung umfassen. Eine zur Sicherstellung des pharmazeutischen Nutzens der Behandlung geeignete Dosis sollte nach den Parametern wie beispielsweise Alter, Geschlecht, Körpergewicht etc. des Patienten gewählt werden, die einem Fachmann bekannt sind.

**[0081]** Die pharmazeutischen Zusammensetzungen umfassen die Verbindungen und einen physiologisch annehmbaren Träger. Die Art des in den pharmazeutischen Zusammensetzungen dieser Erfindung anzuwendenden Trägers variiert je nach Art der Verabreichung. Für eine parenterale Verabreichung, wie beispielsweise subkutane Injektion, umfasst der Träger vorzugsweise Wasser, Salzlösung, Alkohol, ein Lipid, ein Wachs und/oder einen Puffer. Für die orale Verabreichung kann einer der obigen Träger oder ein fester Träger, wie beispielsweise Mannitol, Laktose, Stärke, Magnesiumstearat, Natriumsaccharin, Talk, Zellulose, Glukose, Saccharose und/oder Magnesiumcarbonat verwendet werden. Als Träger für die pharmazeutischen Zusammensetzungen dieser Erfindung können auch biologisch abbaubare Mikrokügelchen (z. B. Polymilchsäureglykolid) verwendet werden. Geeignete biologisch abbaubare Mikrokügelchen sind beispielsweise beschrieben in US-Patent Nr. 4,897,268 und 5,075,109.

**[0082]** Eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Verwendung in einem erfindungsgemäßen Verfahren kann beispielsweise DNA enthalten, die für eines oder mehrere DNase-X-Polypeptide kodiert. Die DNA kann so verabreicht werden, dass das Polypeptid in situ erzeugt werden kann. Geeignete Expressionssysteme sind einem Fachmann bekannt. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung können die DNase-X-Nukleinsäuren beispielsweise Antisense-Konstrukte sein. Pharmazeutische Zusammensetzungen können auch DNase-X-Nukleinsäuremoleküle aufweisen, die in einem Säugerwirtssystem oder menschlichen Wirtssystem exprimierbar sind, umfassend ein virales oder anderes Expressionssystem, beispielsweise ein adenovirales Vektorsystem.

**[0083]** Die DNase-X-Nukleinsäure kann auch als

nackte Nukleinsäure verabreicht werden. In diesem Fall werden geeignete physikalische Verabreichungssysteme verwendet, welche die Aufnahme von Nukleinsäure verstärken, wie beispielsweise Beschichten der Nukleinsäure auf biologisch abbaubare Kügelchen, die effizient in die Zellen transportiert werden. Die Verabreichung nackter Nukleinsäuren kann beispielsweise für den Zweck einer transienten Expression in einem Wirt oder einer Wirtszelle nützlich sein.

**[0084]** Alternativ können die pharmazeutischen Zusammensetzungen ein oder mehrere Polypeptide aufweisen. Die in pharmazeutischen Zusammensetzungen enthaltenen Polypeptide können DNase-X-Polypeptide sein. Optional können die DNase-X-Polypeptide in Kombination mit einem oder mehreren anderen bekannten Polypeptiden verabreicht werden, wie beispielsweise Enzymen, Antikörpern, regulatorischen Faktoren wie beispielsweise Cyclinen, cyclin-abhängigen Kinasen oder CKIs oder Toxinen.

**[0085]** In der vorliegenden Erfindung verwendete DNase-X-Polypeptide oder Fragmente davon, die einen immunogenen Anteil aufweisen, können in pharmazeutischen Zusammensetzungen verwendet werden, wobei das Polypeptid beispielsweise eine Reaktion stimuliert, die spezifisch gegen Tumorzellen in dem Patienten gerichtet ist. Ein Patient kann von einer Krankheit betroffen sein oder kann eine nicht-nachweisbare Krankheit aufweisen. Entsprechend können die DNase-X-Verbindungen verwendet werden, um Krebs zu behandeln oder die Entwicklung von Krebs zu hemmen. Die Verbindungen können entweder vor oder nach einer herkömmlichen Tumorbehandlung wie beispielsweise der chirurgischen Entfernung von Primärtumoren, Behandlung durch Strahlentherapieverabreichung, herkömmlichen Chemotherapieverfahren oder einem beliebigen anderen Modus der Behandlung der jeweiligen Krebserkrankung oder ihrer Vorläufer verabreicht werden.

**[0086]** Immunogene Zusammensetzungen können ein oder mehrere Polypeptide und unspezifische Verstärker der Immunreaktion umfassen, wobei der unspezifische Verstärker der Immunreaktion eine Immunreaktion gegen ein exogenes Antigen hervorruft oder verstärken kann. In den erfindungsgemäßen Impfstoffen kann jeder geeignete Verstärker der Immunreaktion verwendet werden. Beispielsweise kann ein Adjuvans enthalten sein. Die meisten Adjuvanzen enthalten eine Substanz, die so angelegt ist, dass sie das Antigen vor einem schnellen Katabolismus schützt, wie beispielsweise Aluminiumhydroxid oder Mineralöl, und einen unspezifischen Stimulator der Immunreaktion, wie beispielsweise Lipid A, Bordetella pertussis oder Mycobacterium tuberculosis. Solche Adjuvanzen sind im Handel erhältlich, beispiels-

weise als Freund's Incomplete Adjuvant und Complete Adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) und Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J., USA).

**[0087]** Pharmazeutische Zusammensetzungen und Impfstoffe können auch andere Epitope von Tumorantigenen enthalten, entweder eingebaut in einem Fusionsprotein, wie oben beschrieben (d. h. ein einzelnes Polypeptid, das mehrere Epitope enthält), oder innerhalb eines gesonderten Polypeptids.

**[0088]** Die vorliegende Erfindung stellt des Weiteren Kits zur Verwendung beispielsweise in Forschungs- oder diagnostischen Verfahren bereit. Solche Kits können zwei oder mehr Komponenten zur Durchführung eines wissenschaftlichen oder diagnostischen Tests enthalten. Bei den Komponenten kann es sich um Verbindungen, Reagenzien, Behälter und/oder Ausrüstung handeln. Eine Komponente kann ein Antikörper oder ein Fragment davon sein, der bzw. das spezifisch an ein DNase-X-Polypeptid bindet. Darüber hinaus kann das Kit Reagenzien, Puffer und andere Stoffe enthalten, die aus dem Stand der Technik als zur Durchführung des diagnostischen Tests erforderlich bekannt sind. Alternativ kann das Forschungskit bzw. das diagnostische Kit Nukleotidsonden oder Primer für den Nachweis von DNase-X-DNA oder -RNA enthalten. Solch ein Kit sollte geeignete zusätzliche Reagenzien und Puffer enthalten, die aus dem Stand der Technik bekannt sind.

**[0089]** Ein Kit gemäß vorliegender Erfindung umfasst:

- a) Reagenzien für die Erkennung der DNase-X-Markermoleküle;
- b) die Reagenzien und Puffer, die gängigerweise für die Durchführung der Erkennungsreaktion verwendet werden, wie beispielsweise Puffer, Nachweismarker, Trägersubstanzen und sonstige;
- d) eine DNase-X-Markerprobe zur Durchführung einer positiven Kontrollreaktion.

**[0090]** Das Reagens für die Erkennung des DNase-X-Markers umfasst jedes Mittel, das an das Markermolekül binden kann. Solche Reagenzien können Protein, Polypeptide, Nukleinsäuren, Glykoproteine, Proteoglykane, Polysaccharide oder Lipide umfassen.

**[0091]** Die Probe zur Durchführung einer Positivkontrolle kann beispielsweise DNase-X-Nukleinsäure in anwendbarer Form wie beispielsweise als Lösung oder Salz, DNase-X-Peptide in anwendbarer Form, Gewebeschnittproben oder positive Zellen, welche die DNase-X-Moleküle exprimieren, umfassen.

**[0092]** In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Erkennung der Markermoleküle auf der Ebene der Polypeptide durchgeführt. In dieser

Ausführungsform können die Bindungsmittel beispielsweise Antikörper sein, die für DNase-X oder deren Fragmente spezifisch sind.

**[0093]** In einer anderen Ausführungsform des Testkits wird die Erkennung von DNase-X auf Ebene der Nukleinsäure durchgeführt. In dieser Ausführungsform der Erfindung kann es sich bei den Reagenzien für die Erkennung beispielsweise um Nukleinsäuresonden oder -Primer handeln, die zu den DNase-X-Nukleinsäuren komplementär sind.

**[0094]** Karzinome und deren Vorstufen gemäß vorliegender Erfindung sind Krankheiten, die durch anomalen Wachstumseigenschaften von Zellen oder Geweben im Vergleich zu den Wachstumseigenschaften normaler Kontrollzellen oder -geweben gekennzeichnet sind. Das Wachstum der Zellen oder Gewebe kann beispielsweise anomal beschleunigt sein oder kann anomal reguliert sein. Anomale Regulierung, wie oben verwendet, kann jede Form des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins von nicht-wildtypgemäßen Reaktionen der Zellen oder Gewebe auf natürlicherweise stattfindende wachstumsregulierende Einflüsse umfassen. Die Anomalien des Wachstums der Zellen oder Gewebe können beispielsweise neoplastisch oder hyperplastisch sein. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die Tumore karzinogene oder vorkarzinogene Zustände der Atemwege.

**[0095]** Erkrankungen, die von anomaler Zellproliferation gekennzeichnet sind, wie im Kontext vorliegender Erfindung verwendet, können beispielsweise Neoplasien wie beispielsweise benigne und maligne Tumore, Karzinome, Sarkome, Leukämien, Lymphome oder Dysplasien umfassen. Tumore können Tumore des Kopfes und des Halses, Tumore der Atemwege, Tumore im Magendarmtrakt, Tumore der Harnwege, Tumore des Fortpflanzungssystems, Tumore des endokrinen Systems, Tumore des zentralen und peripheren Nervensystems, Tumore der Haut und deren Anhangsgebilde, Tumore der Weichgewebe und Knochen, Tumore des lymphopoietischen und hämatopoietischen Systems, Brustkrebs, Prostatakrebs, Magendarmkrebs, Kolorektalkrebs, Anogenitalkrebs, etc. umfassen.

**[0096]** In bestimmten Ausführungsformen sind die Krankheiten beispielsweise Adenome oder Adenokarzinome des Kolons, Krankheiten der Atemwege wie beispielsweise squamöses Lungenzellkarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom, Adenokarzinom der Lunge, großzelliges Lungenkarzinom, adenosquamoses Lungenkarzinom, ein karzinoider Tumor der Lunge, Bronchialdrüsentumor oder (malignes) Mesotheliom, Anogenitalkrebs wie beispielsweise Gebärmutterhalskrebs, Vulvakrebs, Vaginalkrebs, Rektalkrebs, Anuskarzinom und Peniskarzinom.

**[0097]** Eine Probe gemäß den Verfahren vorliegender Erfindung ist jede Probe, die Zellen, Gewebe oder Körperflüssigkeiten enthalten kann. Des Weiteren kann jede Probe, die potenziell die nachzuweisenden Markermoleküle enthält, eine Probe gemäß vorliegender Erfindung sein. Solche Proben sind z. B. Blut, Plasma, Serum, Liquor, Knochenmark, Abstriche, Waschungen, Sekretionen, Transsudate, Exsudate, Sputum, Stuhl, Urin, Samen, Zell- und Gewebeproben, Punktate oder Biopsien.

**[0098]** Biopsien wie im Kontext vorliegender Erfindung verwendet können z. B. Resektionsproben von Tumoren, endoskopisch erhaltene Gewebeproben oder Nadelbiopsien umfassen. Darüber hinaus kann jede Probe, die potenziell die nachzuweisenden Markermoleküle enthält, eine Probe gemäß vorliegender Erfindung sein.

**[0099]** In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfassen Proben Zellen des Anogenitaltraktes, der Atemwege, des Magendarmtraktes (insbesondere des Kolorektaltraktes) oder der Haut und deren Anhangsgebilde. In bestimmten Ausführungsformen können die Zellen Zellen des Gebärmutterhalses, der Vagina, der Vulva, des Penis, des Anus, des Rektums, der Bronchialäste, der Lunge, des Peritoneums, des Peritonealraumes, des Nasenrachenraumes, der Mundhöhle, des Colon ascendens, des Colon transversum, des Colon descendens, des Colon sigmoidum, der Bauchspeicheldrüse, des Dünndarms, des Zwölffingerdarms, des Jejunums, des Ileums, des Zökums, der Speiseröhre, des Magens, der Gallengänge, der Leber oder der Haut sein.

**[0100]** In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann die Probe eine histologische Probe, eine Biopsie oder eine zytologische Probe sein, wie beispielsweise ein Ausstrich, ein Abstrich, eine Instillation, eine Zellen enthaltende Körperflüssigkeit (Sputum, ein Sekret, Speichel, etc.). In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können Proben Zellen aufweisen, die mit Papillomavirus infiziert sind. Die Proben können in bestimmten Ausführungsformen Gebärmutterhalsabstriche, Bronchioalveolarlavagen, Stuhl, endoskopisch, wie beispielsweise mittels Gastroskopie, Kolonoskopie, Bronchioskopie, etc., erhaltene Proben umfassen.

**[0101]** Die Herstellung einer Probe kann beispielsweise die Gewinnung einer Probe aus einem Gewebe, einer Körperflüssigkeit, von Zellen eines Patienten umfassen. Gemäß vorliegender Erfindung kann die Herstellung der Probe auch mehrere Schritte von Weiterverarbeitungen der Probe umfassen, wie beispielsweise die Herstellung von Dissektionen, die Herstellung von Zellsuspensionen, das Ausbreiten oder Auftragen der zu untersuchenden Zellen auf Mikroskopobjektträger, die Herstellung von Gewebean-

ordnungen, Isolierung von Polypeptiden oder Nukleinsäuren, Herstellung von Festphasen-fixierten Peptiden oder Nukleinsäuren oder Herstellung von Kügelchen, Membranen oder Objektträgern, an welche die zu bestimmenden Moleküle kovalent oder nicht-kovalent gekoppelt werden.

**[0102]** Eine Probe zur Verwendung in den Verfahren der vorliegenden Erfindung kann mit jeder geeigneten Methode erhalten und präpariert werden. Die Proben können beispielsweise beliebige Proben des Inhalts des Magendarmtraktes (z. B. des Magens, der Speiseröhre oder des Darms), der Atemwege (z. B. des Nasenrachenraums, der Bronchien oder der Bronchiolen), des Anogenitaltraktes (z. B. der Vagina), des Urogenitaltraktes (z. B. der Blase oder der Harnröhre), des Gefäßsystems etc. umfassen. Die Probe kann durch aktive Exkretion des Materials von einem Individuum erhalten werden oder kann im Verlauf eines chirurgischen, invasiven oder minimal invasiven medizinischen Verfahren erhalten werden. Beispielsweise kann eine Stuhlprobe, wie im Kontext vorliegender Erfindung verwendet, eine Probe von im Lumen des Kolons enthaltenen Material sein, das durch Klistiere, durch Kolonoskopie, mit dem Finger aus dem Rektum erhalten wurde, oder es kann aus dem von einem Patienten abgegebenen Stuhl erhalten werden. Eine Stuhlprobe gemäß vorliegender Erfindung kann, muß jedoch nicht zwingend, Zellen oder Zelltrümmer kolorektalen Ursprungs enthalten. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den für den Nachweis der Kolorektalläsionen verwendeten Polypeptiden um sezernierte Proteine, die unabhängig von dem Vorhandensein von Zellen oder Zelltrümmern aus einer Kolorektalläsion in der Probe in Stuhlproben entdeckt werden können. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann die Probe Blut, Lymphe, Lymphknoten, Knochenmark etc. aufweisen. In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann die Probe Brustgewebe, Brustzellen, Brustwarzenaspirate, Duktallavagen oder eine beliebige Probe aufweisen, die Zellen oder Zelltrümmer aus der Brust enthält.

**[0103]** In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann sich „Probe“ auf das entsprechende Material im Körper eines Individuums beziehen, wie beispielsweise den Harn, den Stuhl, das Sputum etc. Eine Probe in diesem Kontext kann z. B. der Inhalt des Darms eines Individuums in vivo sein. In dieser Ausführungsform muss die (Stuhl-, Harn-, Sputum-, Exudat-, Samen-, Sekretions-)Probe nicht von dem Patienten getrennt werden, um den hierin beschriebenen Verfahren unterzogen zu werden.

**[0104]** Die Verfahren zur Präparation der Probe können jedes Verfahren umfassen, das zur Sicherstellung einer genauen Feststellung des Vorhan-

denseins oder Nichtvorhandenseins von Läsionen in Verbindung mit anomalen Wachstumseigenschaften geeignet ist. In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann die Präparation der Proben z. B. Auswählen eines beliebigen Anteils einer Gesamtprobe (wie beispielsweise abgegebener Stuhl, ausgeschiedener Harn, erhaltener Abstrich, erhaltene Waschung, Sputum) mit einem beliebigen geeigneten Mittel wie beispielsweise einem Spatel, einer Bürste, einem Löffel, einer Spitze, einem Tuch, einer Membran, einer Kapillare, einer Spritze, einer Kanüle oder Nadel oder dergleichen umfassen. Beispielsweise kann das Probenpräparat Blotting eines Anteils der Probe (z. B. die Oberfläche von Stuhl) auf eine Membran, eine Folie, einen Kunststofffilm oder ein Tuch, das Aufnehmen eines Anteils des Stuhls mit einer Nadel, Spritze, Kapillare, einem Spatel, Löffel oder dergleichen umfassen. Ein Probenpräparat kann in bestimmten Ausführungsformen Abstriche von der Oberfläche fester oder visköser Proben (wie beispielsweise von abgegebenem Stuhl, bestimmtem Sekret, etc.) umfassen, die mit einem geeigneten Mittel wie beispielsweise einem Spatel, einer Bürste, einem Tampon, einem Tuch, einer porösen oder textilen Vorrichtung (aus Baumwolle, Zellulose, derivatisierte Zellulose, etc.) oder Spitze oder mit einem beliebigen anderen geeigneten Mittel erhalten werden.

**[0105]** In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung kann jede zufällige Fraktion einer Probe zur Durchführung des hierin beschriebenen Nachweisverfahrens geeignet sein. In bestimmten anderen Ausführungsformen der Erfindung kann eine Probe derart präpariert werden, um das Vorhandensein eines repräsentativen Anteils der Gesamtprobe sicherzustellen. Solche repräsentativen Anteile können z. B. für Stuhlproben mithilfe der in US 6,303,304 beschriebenen Verfahren erhalten werden, die hierin durch Bezugnahme enthalten sind.

**[0106]** In bestimmten speziellen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann die Probe als ein Einzelschicht- oder als ein Dünnschichtpräparat eines zytologischen Präparats präpariert werden. Die entsprechenden Verfahren zur Präparation eines Einzelschicht- oder eines Dünnschichtpräparats in der Zytologie sind einem Fachmann bekannt. In einer Ausführungsform kann das Präparat z. B. die Thin-Prep™-Technologie umfassen. Andere Verfahren umfassen konventionelle Abstriche oder Verfahren, die Suspensionen von Zellen zur Präparation des zytologischen Präparates umfassen.

**[0107]** In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann ein Verfahren zum Anreichern oder Reinigen der relevanten Polypeptide und/oder Polynukleotide verwendet werden. Gegebenenfalls kann die Identifizierung von Nukleinsäuren, Proteinen oder Peptiden in komplexen Proben, die mehrere Nukleinsäuren, Proteine oder Peptide

aufweisen, durch ein Trennungsverfahren für bestimmte Moleküllarten, die in der Probe vorhanden sind, verstärkt werden. Diese Reinigungsprozesse können Reinigung im Sinne von Separieren aller Nukleinsäure-, Protein- oder Peptidkomponenten der Probe von anderen Komponenten wie beispielsweise Lipiden, Nukleinsäuren etc. beinhalten. In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung kann die Reinigung auch die Trennung von Nukleinsäuren und/oder Proteinen oder Peptide mit bestimmten Eigenschaften von anderen Protein- oder Peptidkomponenten in dem Gemisch beinhalten.

**[0108]** Generell können die hierin erwähnten Verfahren zur Reinigung von Nukleinsäuren und Polypeptiden im Verlauf jedes Nachweisverfahrens angewandt werden, das für die Erkennung der DNase-X-Moleküle der vorliegenden Erfindung geeignet ist. Gegebenenfalls kann jedes Nachweisverfahren für die Erkennung der hierin beschriebenen Markermoleküle alleine oder in Kombination mit anderen Markermolekülen Reinigungsverfahren für Nukleinsäuren und/oder Polypeptide wie unten erwähnt umfassen. Der Reinigungsprozess kann in jeder Stufe im Verlauf des Gesamtverfahrens erfolgen, z. B. vor einer Nachweis- oder Amplifizierungsreaktion, im Anschluss an eine Nachweis- oder Amplifizierungsreaktion, in einer Einzelschrittreaktion gleichzeitig mit einer Nachweis- oder Amplifizierungsreaktion, etc.

**[0109]** Trennung von Proteinen und/oder Nukleinsäuren kann unter Verwendung ihrer physikalischen, chemischen oder biologischen Eigenschaften durchgeführt werden. Für die Trennung verwendete physikalische Parameter können Ladung, Hydrophobizität, Masse, Volumen, Form oder ein beliebiger anderer physikalischer Parameter sein, der für die Trennung unterschiedlicher Protein- oder Peptidarten geeignet ist. Chemische Parameter, die bei der Trennung von Proteinen zur Anwendung kommen, umfassen die Verwendung reaktiver Gruppen wie beispielsweise Hydroxyl-, Sulfhydryl- oder beliebiger anderer reaktiver oder nicht-reaktiver Strukturen, die für die Trennung von Proteinen/Peptiden geeignet sind. Biologische Parameter, die zur Trennung von Proteinen verwendet werden können, umfassen enzymatische Aktivität, molekulare Wechselwirkungen wie beispielsweise Bindung von biologischen Bindungseinheiten wie z. B. Liganden oder Rezeptoren, Immunogenität oder eine beliebige andere biologische Eigenschaft, die für die Trennung unterschiedlicher Protein- oder Peptidarten geeignet ist. Was Nukleinsäuren betrifft, beziehen sich biologische Parameter insbesondere auf Hybridisierungseigenschaften.

**[0110]** Alle oben erwähnten Parameter können unabhängig oder in jeder beliebigen Kombination verwendet werden, die für die Trennung und Reinigung von Nukleinsäuren, Proteinen und/oder Peptiden geeignet ist. In einer Ausführungsform kann eine kom-

plexe Probe durch Elektrophorese-Verfahren wie beispielsweise Agarosegelelektrophorese, PAGE, SDS-PAGE, frei strömende Elektrophorese, Kapillarelektrophorese, 2D-Elektrophorese oder jedes andere Elektrophoreseverfahren getrennt werden, das für die Trennung von Nukleinsäuren, Proteinen oder Peptiden geeignet ist. In bestimmten Ausführungsformen kann eine 2D-Elektrophorese derart verwendet werden, dass die Trennung in der ersten Dimension auf der Ladung basiert (z. B. in einem Polyacrylamidgel unter Bedingungen hoher Spannung) und die resultierenden getrennten Proteine oder Peptide nach ihrer Masse getrennt werden (z. B. in einem Natriumdodecylsulfatpolyacrylamidgel in einer senkrechten Richtung zur ersten Dimension). Alternativ kann die erste Dimension der Trennung von Proteinen oder Peptiden durch isoelektrische Fokussierung der Moleküle in einem pH-Gradienten unter hoher Spannung erzielt werden. In bestimmten Ausführungsformen kann für die Trennung der DNase-X-Moleküle gemäß vorliegender Erfindung eine Pulsfeld-Gelelektrophorese angewandt werden.

**[0111]** In bestimmten weiteren Ausführungsformen kann für die Trennung komplexer Gemische Kapillarelektrophorese verwendet werden. Beispielsweise kann eine Kapillare mit einem geeigneten Trennmedium wie beispielsweise Polyacrylamid gefüllt werden und die Probe wird auf ein Ende der Kapillare gegeben (je nach Positionierung der Kapillare z. B. auf das obere Ende). Je nach Puffer- und Gelbedingungen können die Proteine und/oder Peptide in der Probe nach Masse bzw. Ladung getrennt werden.

**[0112]** Darüber hinaus kann zur Trennung von Nukleinsäuren, Proteinen und/oder Peptiden Flüssigchromatographie verwendet werden. Makromoleküle, wie beispielsweise Nukleinsäuren, Peptide und/oder Proteine, können nach ihrem physikalischen bzw. chemischen Verhalten bzw. biologischen Verhalten bzw. Kombinationen davon getrennt werden, je nach dem Chromatographiemedium bzw. den für die Chromatographie verwendeten Lösungsmitteln. In einer Ausführungsform kann das komplexe Gemisch von Proteinen und/oder Peptiden entsprechend deren Ladung an eine Festphase gebunden und separat durch steigende Salzkonzentrationen eluiert werden. In einer Ausführungsform wird das komplexe Gemisch mithilfe einer Festphase entsprechend deren Masse getrennt, indem eine Festphase mit einer definierten Porengrößenverteilung verwendet wird, wobei Proteine bzw. Peptide ihre Strömungsrate durch Diffusion in die Poren entsprechend ihrer Masse beschleunigen.

**[0113]** In einer Ausführungsform wird das komplexe Gemisch von Proteinen bzw. Peptiden mittels einer Festphase nach ihrer Form getrennt, indem eine Festphase mit einer definierten Porenform und/oder Porengrößenverteilung verwendet wird, worin Protei-

ne bzw. Peptide entsprechend ihrer Form ihre Fließgeschwindigkeit bei der Diffusion in die Poren beschleunigen. In einer Ausführungsform ist das komplexe Gemisch von Proteinen bzw. Peptiden entsprechend deren Hydrophobizität an eine Festphase gebunden und separat eluiert, indem ein Gradient aus hydrophoben Lösungsmitteln verwendet wird. In einer Ausführungsform werden eines oder alle oben erwähnten Chromatographieverfahren auf eine Weise kombiniert, die zur Trennung komplexer Gemische von Proteinen und/oder Peptiden geeignet sind.

**[0114]** In bestimmten Ausführungsformen kann zur Trennung von Nukleinsäuren, Proteinen und/oder Peptiden eine zweidimensionale HPLC verwendet werden. Beispielsweise kann eine Trennung mithilfe von Ionenaustauschsäulen in Kombination mit einer Umkehrphasensäule angewandt werden. Die Ionenaustauschsäule kann beispielsweise eine Anionen- oder Kationenaustauschsäule geeigneter Stärke zur Verwendung in den hierin beschriebenen Verfahren sein. Materialien zur Verwendung in diesen HPLC-Verfahren sind dem Durchschnittsfachmann bekannt. In bestimmten Ausführungsformen können die Eluate aus der ersten Säule (z. B. mit ansteigenden Salzgradienten eluiert) auf die Umkehrphasensäule geladen werden. Die Umkehrphasensäule kann z. B. durch einen steigenden Gradienten eines geeigneten Lösungsmittels (z. B. Acetonitril) eluiert werden.

**[0115]** In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können die getrennten Makromoleküle wie z. B. Proteine oder Polypeptide vor der Nachweisreaktion vorbehandelt werden. Solche Behandlungsmethoden können beispielsweise Reduktion oder Oxidation von Proteinen oder Peptiden, proteolytische Spaltung, Modifikation der Proteine oder Peptide, Derivatisierung oder Anwendung von Schutzgruppen beinhalten, um reaktive Teile der Peptide von unerwünschten Reaktionen abzuhalten. Beispielsweise können in bestimmten Ausführungsformen Sulfhydrylgruppen vor Oxidation geschützt werden. Generell kann ein Proteinextrakt zur Verwendung in den Verfahren gemäß vorliegender Erfindung, muss jedoch nicht zwingend, mit geeigneten Enzymen wie beispielsweise Trypsin oder einer beliebigen anderen Protease verdaut werden, um für den Nachweis geeignete Peptide herzustellen.

**[0116]** In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können ein oder mehrere Fragmente vorhanden sein, ohne die Probe einem Schritt der Probenpräparation zu unterziehen. Dies kann an der Aktivität von proteolytischen (Verdauungs-)Enzymen in der Probe liegen, wie beispielsweise in Stuhl, in Flüssigkeiten des Magendarmtraktes oder in Magendarmsekret. Die Fragmente können durch jedes hierin beschriebene Mittel festgestellt werden. In einer Ausführungsform können Fragmente im Verlauf



einer massenspektrometrischen Analyse festgestellt werden. Die Feststellung der jeweiligen Fragmentspitzen, die mit den von DNase-X abgeleiteten Peptiden korrespondieren, kann besonders für den Nachweis des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins und/oder der Menge an DNase-X-Proteine in Proben nützlich sein.

**[0117]** In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können Nukleinsäuren, muss jedoch nicht zwingend, vor einer anschließenden Feststellungs- oder Amplifizierungsreaktion einem Reinigungsprozess unterzogen werden. Dies kann beispielsweise wünschenswert sein, um das Signal/Rausch-Verhältnis weiter zu erhöhen. Darüber hinaus kann eine Reinigung von Nukleinsäuren gegebenenfalls auch einer Amplifizierungsreaktion nachfolgend durchgeführt werden.

**[0118]** Reinigungstechniken für den Zweck der Reinigung von Nukleinsäuren sind dem Durchschnittsfachmann bekannt und umfassen beispielsweise Gelelektrophorese, Chromatographie, Ausfällen, Ultrazentrifugation, etc. Die Nukleinsäuren können beispielsweise in einem geeigneten festen, viskosen oder flüssigen Medium elektrophoretisch gereinigt werden, wie beispielsweise in einem Gel, das aus einem Fachmann bekannten Substanzen (Agarose, Polyacrylamid, Stärke etc.) hergestellt ist.

**[0119]** Alternativ können Nukleinsäuren in Affinitätschromatographieverfahren oder anderen geeigneten Erfassungsformaten durch Hybridisierung der Nukleinsäuren an komplementäre oder umgekehrt komplementäre Nukleinsäuresonden (z. B. an eine Festphase wie beispielsweise Kügelchen, Membranen, Objektträger etc. fixiert) gereinigt werden. Darüber hinaus können Ausfällungsverfahren für das Ausfällen von Nukleinsäuren (z. B. unter Verwendung von Ethanol, Isopropanol oder anderem Alkohol in geeigneter Konzentration, Trichloressigsäure oder anderen geeigneten Säuren oder einem beliebigen anderen Mittel, das für das Ausfällen von Nukleinsäuren aus Lösungen geeignet ist) sowie chromatographische Verfahren, wie beispielsweise Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie etc., für die Reinigung eingesetzt werden. Gemäß vorliegender Erfindung können Nukleinsäuren mithilfe von Ultrazentrifugationstechniken wie beispielsweise Dichtegradientenzentrifugation z. B. in isokinetischer oder isopyknischer Art und Weise, oder mit anderen geeigneten Zentrifugationstechniken gereinigt werden.

**[0120]** Generell ist ein Verfahren für die Erkennung der Menge der Markermoleküle zur Verwendung in den Verfahren gemäß vorliegender Erfindung jedes Verfahren, das für die Erkennung und Identifizierung biologischer Makromoleküle wie beispielsweise Nukleinsäuren, Peptiden und Proteinmolekülen in Proben geeignet ist. In bestimmten Ausführungsformen

der Erfindung können diese Verfahren hohe Empfindlichkeit aufweisen, so dass selbst kleine Molekülmengen nachgewiesen werden können. In weiteren Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können Standardnachweisverfahren, die geeignete Empfindlichkeiten aufweisen, angewandt werden. Es kann jedes beliebige Verfahren verwendet werden, wie beispielsweise solche, die Nachweisreaktionen in Lösungen einschließen, Verfahren, in denen festphasenadsorbierte oder gekoppelte Mittel verwendet werden, etc. Die Verfahren können In-vitro-Verfahren sein oder Verfahren, die in vivo angewandt werden, z. B. bei In-vivo-Bildgebungsverfahren.

**[0121]** In bestimmten Ausführungsformen wird in einem Nachweisverfahren mehr als ein von DNase-X-Polypeptiden und/oder -Polynukleotiden abgeleitetes Peptid festgestellt. Bei der Feststellung der Menge des Markerpolypeptids oder dessen Fragmente gemäß vorliegender Erfindung kann es sich um die Feststellung der Menge einzelner Markermoleküle in getrennten Reaktionsgemischen sowie um die gleichzeitige Feststellung einer Kombination von Markern handeln.

**[0122]** Darüber hinaus kann der Nachweis der DNase-X-Nukleinsäuren, -Polypeptide und/oder -Polynukleotide wie hierin beschrieben in Kombination mit einer oder mehreren weiteren Nachweisreaktionen durchgeführt werden. Bei diesen Nachweisreaktionen kann es sich beispielsweise um eine Reaktion zur Feststellung des Vorhandenseins weiterer geeigneter Markernukleinsäuren und/oder -polypeptide oder von einem oder mehrerer Nukleinsäure-Markermoleküle in den Proben handeln. Weitere Markermoleküle, die für die Erkennung proliferativer Erkrankungen im Verlauf eines Verfahrens wie hierin beschrieben geeignet sind, können z. B. Cycline (Cyclin A, Cyclin B, Cyclin E), Inhibitoren cyclinabhängiger Kinasen (p13.5, p14, p15, p16, p18, p19, p21, p27 etc.), cyclinabhängige Kinasen (cdk2, cdk4, cdk6 etc.), zellzyklusregulatorische Proteine (p14ARF, pRb, mdm2, p53), Proliferationsmarkermoleküle (mcm2, mcm3, mcm4, mcm5, mcm6, mcm7, cdc2, cdc6, Ki67, Ki-S2, PCNA, DNA-Polymerase delta, rF Kappa B, etc.), Marker für Virusinfektion (wie beispielsweise HBV, HPV (vor allem Hochrisiko-HPV: 16, 18, 31, 33, 38, 44, 45, 58, 68, etc.), HIV etc.) oder andere Tumormarkerproteine oder Nukleinsäuren (z. B. her2neu, CEA, PSA etc.) umfassen.

**[0123]** Die Feststellung eines oder mehrerer molekularer Marker kann in einem Einzelreaktionsgemisch oder in zwei oder separaten Reaktionsgemischen durchgeführt werden. Die Nachweisreaktionen für mehrere Markermoleküle können beispielsweise gleichzeitig in Reaktionsgefäßen mit mehreren Vertiefungen durchgeführt werden. Die hierin beschriebenen DNase-X-Nukleinsäuren und/oder -Polypeptide können mithilfe von Verfahren und/oder Reagen-

zien festgestellt werden, die diese Moleküle spezifisch erkennen. Gleichzeitig können einer oder mehrere weitere Marker mithilfe von Verfahren und/oder Reagenzien festgestellt werden, die von diesen spezifisch erkannt werden. Das Nachweisverfahren für jeden einzelnen Marker kann einen oder mehrere Schritte umfassen. In bestimmten Ausführungsformen kann das Nachweisverfahren die Erkennung der Markermoleküle durch einen primären Erkennungsschritt, gefolgt von einem sekundären Erkennungsschritt, umfassen, wodurch die Ergebnisse des Verfahrens für die quantitative und/oder qualitative Analyse verfügbar gemacht werden. Beispiele für Nachweisverfahren, die mehrere Schritte beinhalten, umfassen z. B. die Verwendung primärer und sekundärer und weiterer Bindungsmittel.

**[0124]** In bestimmten Ausführungsformen kann das Nachweisverfahren des Weiteren eine Reporterreaktion umfassen, welche die Menge der erfindungsgemäßen DNase-X-Polypeptide und/oder -Nukleinsäuren angibt. Die Reporterreaktion kann beispielsweise eine Reaktion sein, die eine farbige Verbindung produziert, eine biolumineszente oder chemilumineszente Reaktion, eine Fluoreszenzreaktion, allgemein eine Strahlung abgebende Reaktion oder eine Reaktion, an der eine chemische Bindungsreaktion beteiligt ist, wie beispielsweise Biotinbindung oder Metallchelatbindung.

**[0125]** In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können bei den Verfahren für die Nachweisreaktion gemäß vorliegender Erfindung beispielsweise beliebige immunologische Verfahren für den Nachweis von Molekülen eingesetzt werden, wie beispielsweise Western Blot, Dotblot, Immunpräzipitation oder immunologische Assays wie beispielsweise ELISA, RIA, Assays mit Lateralströmung (Lateral Flow Assays) etc.

**[0126]** In diesen Ausführungsformen kann die Feststellung der (DNase)-X-Markernukleinsäuren und/oder -polypeptide beispielsweise in einer Reaktion erfolgen, welche ein für den Nachweis des Markermoleküls spezifisches Bindungsmittel aufweist. Diese Bindungsmittel können beispielsweise Nukleinsäuresonden, Antikörper und antigenbindende Fragmente, bifunktionelle Hybridantikörper, Peptidomimetika mit minimalen antigenbindenden Epitopen etc. umfassen. Das Bindungsmittel kann in vielen verschiedenen Nachweistechiken verwendet werden, beispielsweise in Southern-, Northern-, Western-Blot, ELISA, Assays mit Lateralströmung (Lateral Flow Assays), (Hybrid-)Captureassay, Latexagglutination, Immunchromatographiestreifen oder Immunpräzipitation. Generell kann ein bindungsmittelbasierter Nachweis sowohl in vitro als auch direkt in situ durchgeführt werden, beispielsweise im Verlauf einer immunzytochemischen Färbereaktion. Alle anderen Verfahren, die für die Bestimmung der Menge

bestimmter Polypeptide in Lösungen biologischer Proben geeignet sind, wie beispielsweise biochemische, chemische, physikalische oder physikalisch-chemische Verfahren, können gemäß vorliegender Erfindung verwendet werden.

**[0127]** Verfahren für den Nachweis einer Methylierung von Nukleinsäuren sind dem Fachmann bekannt und können beispielsweise Verfahren umfassen, bei denen eine chemische Vorbehandlung von Nukleinsäuren z. B. mit Natriumbisulfit, Permanganat oder Hydrazin, und der anschließende Nachweis der Modifizierung mittels spezifischer Restriktionsendonukleasen oder mittels spezifischer Sonden, z. B. bei einer Amplifizierungsreaktion, eingesetzt wird. Der Nachweis einer Methylierung kann des Weiteren mittels methylierungsspezifischer Restriktionsendonukleasen erfolgen.

**[0128]** In einer Ausführungsform der Erfindung erfolgt der Nachweis der Menge von Markermolekülen durch Erkennung der Menge von Nukleinsäuren, welche für die in der Probe vorhandenen Markermoleküle oder Fragmente davon kodieren. Die Mittel zur Erkennung von Nukleinsäuremolekülen sind einem Fachmann bekannt. Die Vorgehensweise für den Nachweis von Nukleinsäuren kann beispielsweise durch eine Bindungsreaktion des nachzuweisenden Moleküls an komplementäre Nukleinsäuresonden, Proteine mit Bindungsspezifität für die Nukleinsäuren oder beliebige andere Einheiten, die die Nukleinsäuren spezifisch erkennen und an sie binden, erfolgen. Dieses Verfahren kann sowohl in vitro als auch direkt in situ durchgeführt werden, beispielsweise während einer Färbenachweisreaktion. Eine andere Möglichkeit für den Nachweis der Markermoleküle in einer Probe auf der Ebene der Nukleinsäuren, die in den Verfahren der vorliegenden Erfindung angewandt wird, ist eine Amplifizierungsreaktion von Nukleinsäuren, die in quantitativer Weise durchgeführt werden kann, wie beispielsweise PCR, LCR oder NASBA.

**[0129]** In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann eine Amplifizierung von Ribonukleinsäuren oder von Desoxyribonukleinsäuren angewandt werden, um kleine Mengen von DNase-X-Markermolekülen oder kleine Mengen von Zellen, die DNase-X-Markermoleküle exprimieren, in Proben zu erkennen. Dies kann besonders für den Nachweis dispergierter Tumorzellen in Proben oder für den Nachweis von DNase-X-Molekülen geeignet sein, die aus Tumorzellen, welche diese DNase-X-Moleküle exprimierten, in Körperflüssigkeiten verteilt worden sind. Generell kann die Erkennung von Metastasen, minimaler Resterkrankung oder disseminierten Tumorzellen in Körperproben eine Nukleinsäureamplifizierungsreaktion wie oben erwähnt umfassen.

**[0130]** Im Verlauf der Detektion einer minimalen Resterkrankung kann generell die Feststellung von DNase-X-Molekülen wie beispielsweise Peptiden, Proteinen, DNA oder mRNA in Blutproben oder der Nachweis disseminierter Zellen geeignet sein. Im Verlauf der Feststellung von DNase-X-Molekülen kann eine Amplifizierungsreaktion (z. B. PCR, LCR, NASBA) eingesetzt werden. Im Verlauf der Feststellung eines disseminierten Tumors können Zellen aus einer Körperflüssigkeit getrennt werden, und nach Lysierung der Zellen können DNase-X-Moleküle im Lysat nachgewiesen werden. In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann der Nachweis der dispergierten Tumorzellen in Lymphknotenproben oder in Knochenmarkproben durchgeführt werden, um Metastasen oder disseminierte Tumorzellen festzustellen, die in die entsprechenden Proben gestreut haben. Es versteht sich von selbst, dass im Verlauf eines Nachweises disseminierter Tumorzellen alle Proben, die von einem Individuum erhalten werden können, geeignet sind.

**[0131]** In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann die Erkennung eines Karzinoms oder dessen Vorstufen oder die Erkennung von Metastasen oder einer minimalen Resterkrankung in einem Individuum die Feststellung der Zugänglichkeit einer bestimmten Region eines DNase-X-Moleküls in Proben umfassen. Dies kann z. B. die Feststellung der Fähigkeit eines positionsspezifischen Bindungsmittels umfassen, mit DNase-X in einer Probe zu reagieren. Darüber hinaus kann die Erkennung von Karzinomen und deren Vorstufen sowie die Erkennung einer minimalen Resterkrankung oder von Metastasen die Bestimmung der subzellulären Lokalisierung von DNase-X in Zellen umfassen.

**[0132]** Alternativ kann für den Zweck der Erkennung disseminierter Tumorzellen, Metastasen oder einer minimalen Resterkrankung eine massenspektrometrische Bestimmung von Nukleinsäuren im Anschluss an die Amplifizierung oder ohne Amplifizierungsreaktion erfolgen.

**[0133]** In einer anderen Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Feststellung der Menge von Markermolekülen durch Feststellung des Expressionsgrades eines Proteins. Die Feststellung der Markermoleküle auf Proteinebene kann beispielsweise in einer Reaktion erfolgen, welche ein Bindungsmittel aufweist, das für die Erkennung der Markermoleküle spezifisch ist. Diese Bindungsmittel können beispielsweise Antikörper und antigenbindende Fragmente, bifunktionelle Hybridantikörper, Peptidomimetika mit minimalen Antigenbindungsepitopen etc. umfassen. Das Bindungsmittel kann in vielen verschiedenen Nachweistechiken verwendet werden, beispielsweise in Western-Blot, ELISA, Lateral Flow Assay, Latexagglutination, Immunchromatographiestreifen oder Immunpräzipitation. Generell kann ein

bindungsmittelbasierter Nachweis sowohl in vitro als auch direkt in situ durchgeführt werden, beispielsweise im Verlauf einer immunzytochemischen Färbereaktion. Alle anderen Verfahren, die für die Bestimmung der Menge bestimmter Polypeptide in Lösungen biologischer Proben geeignet sind, wie beispielsweise biochemische, chemische, physikalische oder physikalisch-chemische Verfahren, können gemäß vorliegender Erfindung verwendet werden.

**[0134]** In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann Massenspektrometrie für den Nachweis der DNase-X-Markernukleinsäuren und/oder -Polypeptide verwendet werden. Generell kann jede Art von Massenspektrometrie in den Verfahren gemäß vorliegender Erfindung verwendet werden. Die zu analysierenden Moleküle können mit jedem geeigneten Verfahren ionisiert werden. In einer Ausführungsform kann es sich bei dem Ionisationsverfahren im Verlauf einer Massenspektrometrie um eine matrixunterstützte Laserdesorptionsionisation, Fast-Atom-Bombardment-Ionisation, Elektronenspray-Ionisation oder ein beliebiges anderes geeignetes Verfahren handeln. In den Verfahren der vorliegenden Erfindung kann jede aus dem Stand der Technik für massenspektrometrische Auftrennung und zum Nachweis der erzeugten Ionen bekannte Technik verwendet werden. Die massenspektrometrische Analyse kann beispielsweise mit einem Time-of-Flight-Analysegerät erfolgen, es können eine Ionenfalle, ein Quadrupol, eine Sektorfeldanalysevorrichtung, ein Zyklotron etc. verwendet werden.

**[0135]** Die vollständige Analyse, 2D-HPLC und massenspektrometrische Identifikation kann beispielsweise auf der ProteomeX-Workstation (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) erfolgen. Das System enthält ein HPLC-System, das zwei HPLC-Pumpen und einen automatischen Probengeber aufweist, welche verbunden sind, um Lösungsmittel unabhängig zu einer starken Kationenaustauschssäule und einer Umkehssäule zu liefern. Im ersten Schritt wird der tryptische Verdau auf die starke Ionenaustauschssäule geladen und mit einem geeigneten Lösungsmittel gewaschen, um etwaige Verunreinigungen zu entfernen, die nicht für die Weiteranalyse geeignet sind. Durch eine Erhöhung der Salzkonzentration, beginnend mit 1 mM Ammoniumchlorid und endend bei 900 mM Ammoniumchlorid, werden Fraktionen der proteolytischen Peptide aus der starken Kationenaustauschssäule eluiert und auf die Umkehrphasensäule geladen. Unter Verwendung der zweiten HPLC-Pumpe werden die Peptide auf der Umkehrphasensäule mit einem steigenden Acetonitrilgradienten von 5% bis 80% Acetonitril in Wasser eluiert, nachdem die gebundenen Peptide gewaschen wurden, um überschüssiges Salz zu entfernen und die Peptide für die anschließende Massenspektrometrieanalyse zu konditionieren. Die aus der Umkehrphasensäule eluierenden Peptide werden nacheinander

durch Verwendung eines Elektronensprayionisations-Ionenfallen-Massenspektrometers (DECA LCQ, ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) gemessen, welches die direkte Analyse und Fragmentierung eluierter Peptide ermöglicht. Jeder Umkehrphasenlauf wird kontinuierlich durch die ESI-MS- und ESI-MS/MS-Spektren überwacht und zur anschließenden Proteinidentifikation mit dem SEQUEST-Softwarepaket gespeichert. SEQUEST verwendet Peptidfragmentierungs-Massenspektren, die während des datenabhängigen MS/MS-Vorgangs abgerufen werden, welcher Fragmentmassenspektren eluierter Peptide erzeugt. Der SEQUEST-Algorithmus verknüpft experimentell erhaltene Fragmentenspektren mit in silico (mit Hilfe von Computerprogrammen) erzeugten Fragmentenspektren aus Datenbanken und ermöglicht die Korrelation des experimentell erhaltenen Spektrums mit dem entsprechenden Datenbankeintrag, der das zu diesem Eintrag passende Peptid identifiziert.

**[0136]** Die bei der MS-Analyse festgestellten Fragmente können durch Vergleich dieser Fragmente mit den aus einer Datenbank erhaltenen Daten identifiziert werden. Mithilfe geeigneter Algorithmen können Proteine in Übereinstimmung mit den aus der MS-Analyse erhaltenen Fragmentdaten identifiziert werden.

**[0137]** In einer Ausführungsform können Peptidfragmente, die durch proteolytische Spaltung von DNase-X-Proteinen erhalten werden können, für die Detektion von DNase-X-Proteinen in Proben besonders nützlich sein. Die Detektion des Vorhandenseins oder der Menge an DNase-X-Proteinen in Proben kann in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Feststellung des Vorhandenseins bzw. Nichtvorhandenseins und/oder der Menge eines oder mehrerer proteolytischer Fragmentpeptide umfassen, die von DNase-X-Proteinen in einer Probe abstammen. In einer Ausführungsform kann die Detektion das Feststellen der entsprechenden Fragmentspitzen in einem Massenspektrum oder in einem komplexen Muster verschiedener Peptidfragmentsignale umfassen, die durch ein geeignetes Analyseverfahren erhalten werden können.

**[0138]** In bestimmten Ausführungsformen können die Trennung der Proteine, die anschließende Analyse der Proteine und Peptide und die abschließende Identifizierung der Proteine in Übereinstimmung mit den festgestellten Massenspektren in einem zusammengesetzten Prozess durchgeführt werden.

**[0139]** Eine weitere zur Identifizierung von Peptiden in komplexen Proben geeignete Technik verwendet 2D-Elektrophorese anstelle einer 2D-Flüssigchromatographie. Mit Coomassie-Brilliantblau gefärbte Gelflecken können aus dem Gel geschnitten und mit Trypsin verdaut werden. Die anschließende Identifi-

zierung sowohl von Einzelpeptiden als auch des „Massen-Fingerabdrucks“ des verdauten Proteins kann mithilfe von matrixgestützter Laserdesorption und Ionisationsmassenspektrometrie oder Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie erfolgen.

**[0140]** Zur Detektion von Nukleinsäuren in der Massenspektrometrie können gereinigte Nukleinsäuren Amplifizierungsreaktionen unterzogen werden. Geeignete Amplifizierungsreaktionen sind dem Durchschnittsfachmann bekannt und können DNA-basierte Amplifizierung sowie RNA-basierte Amplifizierung umfassen. Amplifizierungsreaktionen gemäß vorliegender Erfindung können PCR, LCR, NASBA, etc. umfassen. Die Amplifizierungsreaktion kann unter Verwendung von einem oder mehreren spezifischen Primern durchgeführt werden. In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform umfasst eine Amplifizierungsreaktion die Amplifizierung einer einzelnen Nukleinsäure. In einer anderen erfindungsgemäßen Ausführungsform wird die Amplifizierung als Multiplex-Amplifizierungsreaktion durchgeführt, in der gleichzeitig ein Satz aus mehreren Nukleinsäuren amplifiziert wird.

**[0141]** In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können die amplifizierten Nukleinsäuren für eine anschließende Primerverlängerungsreaktion (Primer-Extensionsreaktion) verwendet werden, mit oder ohne vorherige Reinigung, was zur Bildung von Nukleinsäurefragmenten mit einer Länge von 10 bis etwa 50 bp führt.

**[0142]** In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können immunologische Einheiten festgestellt werden, die gegen DNase-X gerichtet sind. Diese Nachweisreaktion kann im Verlauf des Nachweises von Erkrankungen in Verbindung mit der Expression von DNase-X-Molekülen oder im Verlauf einer Immuntherapie zur Bestimmung des Immunstatus eines Individuums oder zur Überwachung der Wirkung einer Immunisierung oder einer Impfung erfolgen.

**[0143]** In einer Ausführungsform der Erfindung wird die Feststellung der Menge an immunologischen Einheiten, die für DNase-X-Peptide spezifisch sind, auf der Ebene der Antikörper durchgeführt. Die Verfahren zur Erkennung von Krankheiten gemäß vorliegender Erfindung können daher die Feststellung immunologischer Einheiten verwenden, die gegen ein Einzelpeptid gerichtet sind, oder die Feststellung eines Satzes immunologischer Einheiten. Die Verwendung einer Vielzahl möglicher Peptide erhöht die Wahrscheinlichkeit, das Vorhandensein einer bestimmten Erkrankung zu erkennen, und könnte darüber hinaus zusätzliche Informationen liefern, die zur Stratifizierung einer Erkrankung, bei der Überwachung des Krankheitsverlaufs oder bei der Beurteilung der Prognose im Hinblick auf den Krankheitsver-

lauf geeignet sind.

**[0144]** Immunologische Einheiten, wie im Kontext vorliegender Erfindung verwendet, können beliebige Komponenten des Säugerimmunsystems umfassen, die in der Lage sind, spezifisch mit einem antigenen Epitop zu reagieren. Solche immunologischen Einheiten können beispielsweise Antikörper, alle Immunglobuline wie beispielsweise z. B. IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, spezifische CD8+-T-Zellen oder spezifische T-Helferzellen umfassen.

**[0145]** In dieser Ausführungsform kann der Nachweis z. B. anhand der spezifischen Wechselwirkung zwischen den jeweiligen DNase-X-Peptiden mit dem Antikörper erfolgen. Die Feststellung des Vorhandenseins bzw. Nichtvorhandenseins und/oder der Menge an Antikörper, die gegen DNase-X-Peptide in einem Individuum gerichtet sind, kann beispielsweise mit rekombinant produzierten DNase-X-Peptiden erfolgen. Die Peptide können in vielen verschiedenen Nachweistechiken verwendet werden, beispielsweise im Western-Blot, ELISA oder bei der Immunpräzipitation. In einer Ausführungsform wird der Nachweis von Antikörpern als Antikörper-Capture-Assay durchgeführt (Antibodies A laboratory Manual, Harlow, Ed. et al., Cold Spring Harbor Laboratory 1988).

**[0146]** In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird der Nachweis der spezifischen Antikörper mithilfe monoklonaler oder polyklonaler Antikörper durchgeführt, welche das antigenbindende Epitop des ersten Antikörpers spezifisch erkennen. Zu diesem Zweck können die oben erwähnten immunologischen Nachweisverfahren verwendet werden. In einer weiteren Ausführungsform können chimäre Antigene in der Nachweisreaktion verwendet werden. Solche chimären Antigene können beispielsweise Fusionsproteine umfassen, bei denen das antigene Epitop eines tumorassoziierten Polypeptids, das von dem fraglichen Antikörper erkannt wird, mit einem anderen Antigen fusioniert ist, das von einem Nachweisantikörper erkannt werden kann. Die jeweiligen Antigene in dem chimären Polypeptid können durch einen Linker oder eine Abstandshalterregion getrennt sein.

**[0147]** Gemäß vorliegender Erfindung können beliebige andere Verfahren zur Feststellung der Menge bestimmter Antikörper oder Immunglobuline in biologischen Proben verwendet werden.

**[0148]** Der Nachweis der Antikörper gemäß vorliegender Erfindung kann generell sowohl in vitro als auch direkt in situ erfolgen, beispielsweise im Verlauf einer immunhistochemischen oder immunzytochemischen Färbereaktion.

**[0149]** In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können die immunologischen Einheiten,

die gegen DNase-X-Moleküle gerichtet sind, in einem Hauttest festgestellt werden. In diesem Testformat können Peptide von DNase-X in vivo intradermal in die Haut von Individuen eingeführt werden. Das Testformat ist einem Fachmann von dem so genannten TINE-Test oder dem SERO-Teststempel von Sero-Merieux bekannt. In diesem Test wird das Vorhandensein immunologischer Einheiten, die gegen DNase-X-Moleküle gerichtet sind, durch eine sichtbare Reaktion des Individuums diagnostiziert, z. B. als Entzündung der Haut an der jeweiligen Injektionsstelle des Peptids. Die Beurteilung beruht demnach auf einer Rötung der Haut und z. B. der Bildung rötlicher Papeln etc. auf der Haut. Das Testergebnis kann z. B. vom Durchmesser der Rötung bzw. der Papeln abhängen, die nach Auftragung der Antigene erkennbar sind. Das Testergebnis kann beispielsweise durch Fotodokumentation dokumentiert werden.

**[0150]** Die Peptide (in diesem Zusammenhang auch als „Antigen“ bezeichnet), die für die Feststellung immunologischer Einheiten in Individuen verwendet werden können, können durch ein beliebiges, dem Durchschnittsfachmann bekanntes Verfahren hergestellt werden und können beispielsweise die chemische Synthese der Polypeptide (fmoc-Synthese oder Äquivalent) umfassen oder können in jedem geeigneten Wirt rekombinant hergestellt werden. Es ist allerdings zu beachten, dass die Peptide frei von solchen immunogenen Komponenten sind, bei denen es sich nicht um Peptide handelt, welche von der entsprechenden DNase-X abstammen.

**[0151]** Die Peptidmenge, die in diesem Testformat aufzutragen ist, um eine sichtbare Immunreaktion zu ergeben, liegt im Bereich zwischen 0,1 µg und 10 µg des gereinigten Peptids. In bestimmten Ausführungsformen können je Anwendung 0,05 µg, 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg oder 5 µg des Antigens oder ein beliebiger Wert dazwischen verwendet werden. Die Antigene (Peptide) werden vorzugsweise als Lösung aufgetragen (wobei gemäß vorliegender Erfindung auch jedes beliebige andere geeignete Auftragsformat, wie beispielsweise Pulver, Aerosol oder dergleichen verwendet werden kann). Das Lösungsmittel kann jede medizinisch annehmbare Lösung sein, die steril und pyrogenfrei ist und die keine entzündliche oder immunogene Reaktion verursacht, wenn sie in einem Testformat, wie in dem vorliegenden Hauttest verwendet, aufgetragen wird.

**[0152]** Zellen, die Spezifität für ein DNase-X-Antigen aufweisen, können durch alle für diesen Zweck geeigneten Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind, festgestellt werden. Als Verfahren kommen beispielsweise Proliferationsassays, Zytokin-ELISAs, ELISpot-Assays, intrazelluläre FACS-Färbung, PCR-vermittelte Identifizierung von Zellen, die ein peptidspezifisches Zytokin (oder Ähnliches) exprimieren, Tetramerfärbung, Zytotoxizitäts-

assays und DTH-Reaktionen (Reaktionen vom Typ verzögerte Überempfindlichkeit) in Betracht.

**[0153]** Im Falle von Proliferationsassays kann die Einführung einer peptidspezifischen T-Zellproliferation durch dem Fachmann bekannte Verfahren gemessen werden. Dies kann durch einfaches Zählen von Zellen, durch Messen des Einbaus markierter Nukleotide in zelluläre DNA oder durch Messen der Menge und/oder der Aktivität eines oder mehrerer zellulärer Proteine erreicht werden. Zytokin-ELISA kann die Identifizierung von Zellen, die peptidspezifische Zytokine sezernieren, umfassen, indem die Zytokinmenge im Überstand gemessen wird. Bei einem ELISpot-Assay wird die Anzahl von Zellen in einer Probe, die ein peptidspezifisches Zytokin (d. h. IFN- $\gamma$ ) sezernieren, bestimmt. Entsprechend identifiziert die intrazelluläre FACS-Färbung zytokinexprimierende Zellen auf Proteinebene. Eine (Echtzeit-)PCR kann dagegen für die Identifizierung von Zellen, die ein peptidspezifisches Zytokin (oder Ähnliches) sezernieren, auf Transkriptebeve verwendet werden. Bei einem Tetramer-Färbungsassay handelt es sich bei dem Marker um ein Tetramermolekül rekombinanter MHC-Klasse-I-Moleküle, die mit einem spezifischen Peptid beladen und mit einem Farbstoff gekoppelt sind. Das Tetramer bindet an den T-Zellrezeptor. Zytotoxizitätsassays sind Verfahren zur Identifizierung von Zellen, die Zielzellen in peptidspezifischer Weise erkennen und töten können. Eine DTH-Reaktion (Reaktion vom Typ verzögerte Überempfindlichkeit) beruht auf der Messung einer Hautreaktion bei geimpften Personen nach intradermaler (oder ähnlicher) Auftragung eines oder mehrere Peptide.

**[0154]** Das Verfahren für die Feststellung immunologischer Einheiten, wie hierin beschrieben, kann für den Zweck der Überwachung bei immuntherapeutischen Behandlungen von Individuen durchgeführt werden. In dieser Hinsicht wird das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein und/oder die Menge an Antikörper bestimmt, die in einem Individuum gegen ein erfindungsgemäßes Peptid vorhanden sind. Die Bestimmung der Menge kann mithilfe der vorstehend erläuterten Verfahren erfolgen. Die Bestimmung kann zu mehreren aufeinander folgenden Zeitpunkten erfolgen, um die zeitliche Veränderung der Menge der immunologischen Einheiten zu überwachen. Die Bestimmung kann beispielsweise täglich, wöchentlich, monatlich, einmal jährlich oder einmal in einem Jahrzehnt oder in einem beliebigen Intervall dazwischen erfolgen.

**[0155]** In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Menge an Markern im Vergleich zu einer nicht-tumorösen Testprobe signifikant erhöht. In diesem Fall ist der Marker in der Probe überexprimiert. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Menge des

Markers im Vergleich zu einer nicht-tumorösen Testprobe erniedrigt. In einer dritten Ausführungsform liegt im Vergleich zu einer Kontrollprobe gar keine feststellbare Expression des Markers in der Testprobe vor. In einer weiteren Ausführungsform liegt eine feststellbare Menge von Markermolekülen vor, die nicht vom Wildtyp sind. Markermoleküle, die nicht vom Wildtyp sind, können alle Markermoleküle umfassen, die in Sequenz oder Struktur von der Struktur oder Sequenz abweichen, die in Wildtypgewebe, das nicht von einer Zellproliferationskrankheit betroffen ist, funktionell ist. Wildtypsequenzen oder Strukturen sind die Sequenzen oder Strukturen, die in normalen Zellen oder Geweben überwiegend vorhanden sind. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Menge bestimmter Splicingvarianten des Markergens in den Testproben im Vergleich zum Wildtypgewebe verändert. Dies kann zu einer veränderten Menge an Splicingvarianten, neuen Splicingvarianten, Neo-Peptiden, veränderten Verhältnissen unterschiedlicher Splicingvarianten von Genen führen.

**[0156]** Das Nachweisverfahren gemäß vorliegender Erfindung kann des Weiteren ein zytochemisches Färbeverfahren umfassen, das eine chromogene oder fluoreszente Färbung von Zellen oder Zellkompartimenten ergibt. Solche Färbeverfahren sind einem Fachmann bekannt und können beispielsweise das Färben von azidophilen oder basophilen Strukturen, von subzellulären Regionen (z. B. des Zellkerns, der Mitochondrien, des Golgi-Apparates, des Zytoplasmas, etc.), spezifischer Moleküle (von Chromosomen, Lipiden, Glykoproteinen, Polysacchariden, etc.) in den zytologischen Proben umfassen. Es können Fluoreszenzfarbstoffe wie beispielsweise DAPI, Quinacrin, Chromomycin, etc. verwendet werden. Darüber hinaus können chromogene Farbstoffe wie beispielsweise Azan, Acridinorange, Hämatoxylin, Eosin, Sudanrot, Thiazin-Farbstoffe (Toluidinblau, Thionin) verwendet werden. In anderen Ausführungsformen können bei einem Verfahren wie hierin beschrieben Färbeverfahren wie beispielsweise Pap-Färbung, Giemsa-Färbung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung, van-Gieson-Färbung, Schiff-Färbung (unter Verwendung des Schiffschens Reagens), Feulgen-Färbung, Färbeverfahren, welche die Präzipitation von Metallen (wie beispielsweise von Silber in Färbeverfahren mit Silbernitrat) oder unlösliche Farbstoffe wie beispielsweise Turnbells-Blau (oder andere unlösliche Metallzyanide) verwenden, etc. verwendet werden. Es versteht sich von selbst, dass die genannten Farbstoffe und Färbeverfahren Beispiele für die anwendbaren Verfahren sind und dass jedes andere aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren bei einem Verfahren wie hierin beschrieben verwendet werden kann.

**[0157]** Die Färbeverfahren können chromogene Färbungen zur lichtmikroskopischen Betrachtung oder fluoreszente Färbungen für die Betrachtung un-

ter fluoreszenzmikroskopischen Bedingungen produzieren. In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können Strahlung abgebende Verfahren, Verfahren unter Einsatz von Substanzen, welche die Transmission von Strahlung beeinträchtigen, oder anderer Kontrastmedien zur Bildgebung der zytologischen Bedingungen in einer Probe (z. B. die Erzeugung eines optischen Eindruckes durch Mittel wie beispielsweise (Mikro-)Autoradiographie oder (mikro-)autoradiographische Bilderzeugung) für ein Verfahren gemäß vorliegender Erfindung verwendet werden.

**[0158]** Alle Färbungs- und Bildgebungsverfahren können nicht nur zur Analyse in mikroskopischen Verfahren, sondern auch bei automatisierten Analyseverfahren wie beispielsweise Durchflusszytometrie, automatisierte mikroskopische Analyse (mit einem Rechner oder rechnergestützt) oder einem beliebigen anderen Verfahren für die Analyse gefärbter zytologischer Proben verwendet werden.

**[0159]** Die Analyse der Färbungs- oder Bildgebungsergebnisse der verschiedenen Verfahren kann in einem einzelnen Analyseschritt oder in verschiedenen aufeinander folgenden Schritten erfolgen. Beispielsweise kann die lichtmikroskopische Betrachtung eines Präparats vor oder nach einer fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung des Präparates erfolgen. Bei der Fluoreszenzmikroskopie kann es sich bei der Analyse verschiedener Färbungen mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen um gleichzeitige oder aufeinander folgende Analysen handeln. Andere Bildgebungsverfahren können gleichzeitig mit oder im Anschluss an die genannten Verfahren erfolgen.

**[0160]** Es kann verschiedene Umstände geben, unter denen Kombinationen verschiedener Färbeverfahren geeignet sind. Beispielsweise kann in Fällen, in denen mittels immunchemischer Färbung keine zufrieden stellenden zytologischen Färbeergebnisse erzielt werden können, die zusätzliche Anwendung allgemeiner zytologischer Färbetechniken geeignet sein.

**[0161]** In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann das Verfahren zum Nachweis der Markermoleküle in Proben auf automatisierte Weise durchgeführt werden. Die Automatisierung des Verfahrens kann durch automatische Färbung und Analyse histologischer oder zytologischer Präparate auf einer festen Fläche durch mikroskopische Mittel erreicht werden. In einer anderen Ausführungsform umfasst die Automatisierung eine durchflusszytometrische Analyse der Färbung von Zellen in Lösung.

**[0162]** In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Feststellung von Geweben, die DNase-X-Gen-

produkte exprimieren, in Form von molekularen Bildgebungsverfahren durchgeführt. Die entsprechenden Verfahren sind dem Durchschnittsfachmann bekannt. Bildgebungsverfahren zur Verwendung gemäß vorliegender Erfindung können beispielsweise MRT, SPECT, PET und andere für die Bildgebung in vivo geeignete Verfahren umfassen.

**[0163]** In einer Ausführungsform kann das Verfahren auf der enzymatischen Umwandlung inerter oder markierter Verbindungen zu Molekülen beruhen, welche von den Markermolekülen bei molekularen Bildgebungsverfahren erkannt werden können. In einer anderen Ausführungsform kann das molekulare Bildgebungsverfahren auf der Verwendung von Verbindungen basieren, welche eine geeignete Markierung für die molekulare Bildgebung in vivo tragen, wie beispielsweise radioaktive Isotope, Metallionen, etc., die in vivo spezifisch an Markermoleküle binden.

**[0164]** In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei diesen Verbindungen um nicht-toxische Verbindungen, die aus dem Blutkreislauf eines Organismus, beispielsweise des Menschen, in einem Zeitraum entfernt werden können, der die Durchführung des Nachweises von Markierungen erlaubt, die sich in Tumorgewebe angesammelt haben, welches das DNase-X-Markergen überexprimiert. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Verbindungen für die molekulare Bildgebung verwendet, bei denen die Entfernung aus dem Blutkreislauf für die Durchführung der molekularen Bildgebungsreaktion irrelevant ist. Dies kann beispielsweise auf einen niedrigen Hintergrund zurückzuführen sein, der von den zirkulierenden Molekülen produziert wird, etc. Die Verbindungen zur Verwendung bei molekularen Bildgebungsverfahren werden in pharmazeutisch akzeptabler Form in Zusammensetzungen verabreicht, die zusätzlich beliebige andere geeignete Substanzen aufweisen können, wie beispielsweise andere diagnostisch nützliche Substanzen, therapeutisch nützliche Substanzen, Trägersubstanzen oder dergleichen.

**[0165]** Die gemäß vorliegender Erfindung beschriebenen DNase-X-Moleküle können für die Diagnose, Überwachung des Krankheitsverlaufs und die Prognose bei Zellproliferationserkrankungen wie beispielsweise bei Tumoren verwendet werden.

**[0166]** Alle Verfahren für die Detektion von DNase-X-Molekülen, der Zugänglichkeit von Regionen auf DNase-X-Molekülen oder von gegen DNase-X-Moleküle gerichteten immunologischen Einheiten gemäß vorliegender Erfindung können z. B. beim Verlauf der Diagnose von Karzinomen und deren Vorstufen geeignet sein. Darüber hinaus können diese Verfahren zur Erkennung von DNase-X-Molekülen oder von gegen DNase-X-Moleküle gerichtete immu-

nologischen Einheiten für die Bestimmung eines Immunstatus von Individuen verwendet werden, z. B. bei einer Immuntherapie oder bei Impfverfahren.

**[0167]** Die Diagnose von Karzinomen und deren Vorstufen wie hierin verwendet kann beispielsweise den Nachweis von Zellen oder Geweben umfassen, die von anomalem Wachstum betroffen sind. In einer bevorzugten Ausführungsform bedeutet Diagnose die primäre Erkennung einer Krankheit in einem Organismus oder in einer Probe.

**[0168]** Gemäß vorliegender Erfindung kann das Verfahren zur Diagnose von Karzinomen und deren Vorstufen in Routinescreeningtests für präventive Aspekte angewandt werden, um die besagte Krankheit in einem Frühstadium der Manifestation der Krankheit zu entdecken. Für den Zweck der Früherkennung können z. B. Proben verwendet werden, die durch minimal invasive Verfahren erhalten werden, wie beispielsweise Blutproben, Stuhlproben, Sputumproben Brustwarzenaspirat, oder Proben, die durch Verfahren erhalten werden, die Kolonoskopie, Bronchioskopie, Bronchioalveolarlavage, Duktallavage, etc. umfassen. Die Verfahren gemäß vorliegender Erfindung können bei der Detektion von Frühstadien von Tumoren und von Vorstufen von Tumoren oder Krebs verwendet werden.

**[0169]** In einer anderen bevorzugten Ausführungsform kann das diagnostische Verfahren verwendet werden, um die minimale Resterkrankung an einem Tumor nach Primärtherapie festzustellen. Diesbezüglich kann das erfindungsgemäße Verfahren angewandt werden, um Zellen in Körperproben zu bestimmen, die anomale Expression von für Tumoren charakteristischen Markermolekülen gemäß vorliegender Erfindung aufweisen. So kann eine Streuung betroffener Zellen in Körperflüssigkeiten erkannt werden.

**[0170]** In einer Ausführungsform der Erfindung können die hierin beschriebenen Verfahren für die Detektion und Identifizierung von Metastasen verwendet werden. Das Verfahren kann entweder für den Nachweis von Metastasen in Körpergeweben oder Organen mithilfe der hierin beschriebenen Nachweisverfahren angewandt werden, oder die Metastasen können in Bezug auf die Prognose und Vorhersage des Krankheitsverlaufs diagnostiziert werden.

**[0171]** Die Überwachung des Krankheitsverlaufs kann die Bestimmung der Menge von Markermolekülen zu verschiedenen Zeitpunkten, Vergleich der Mengen an den verschiedenen Zeitpunkten und Bestimmung einer Diagnose hinsichtlich des Fortschreitens der Krankheit über den abgedeckten Zeitraum umfassen. Eine Überwachung kann daher das Stellen einer Prognose und/oder die Entwicklung einer angemessenen Therapie für einen bestimmten Pati-

enten ermöglichen.

**[0172]** Überwachung oder Diagnose, wie im Kontext vorliegender Erfindung verwendet, können auch die Bestimmung eines Immunstatus von Individuen im Verlauf einer Immuntherapie oder Impfstherapie umfassen.

**[0173]** Die Prognose des Krankheitsverlaufs bei einer Zellproliferationserkrankung wie beispielsweise Tumor gemäß vorliegender Erfindung kann die Bestimmung des Expressionsgrades eines oder mehrerer Markermoleküle, den Vergleich des Grades mit Daten aus anschließenden Studien in einer Datenbank und Prognostizieren des Krankheitsverlaufs infolge des Vergleichs umfassen. In einer bevorzugten Ausführungsform kann das Verfahren die Bestimmung der Menge eines Satzes von Markermolekülen umfassen, deren distinkte Menge distinkte Stadien im Verlauf der Krankheit charakterisieren können. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann die Kombination der Mengen einer Kombination von Markern ein Indikator für die Prognose des weiteren Krankheitsverlaufs sein und kann die Basis für die Entwicklung einer angemessenen Therapie sein.

**[0174]** Es ist ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren für Therapie und/oder Impfung bereit zu stellen. Gemäß vorliegender Erfindung kann eine Therapie von Zellproliferationserkrankungen unter Verwendung der erfindungsgemäßen DNase-X-Polypeptide und/oder -Polynukleotide durchgeführt werden. Die Therapie kann beispielsweise eine Immuntherapie oder eine somatische Gentherapie sein.

**[0175]** Die erfindungsgemäßen DNase-X-Polypeptide und/oder -Polynukleotide können gemäß vorliegender Erfindung für die Impfung gegen Zellproliferationserkrankungen verwendet werden. Impfung gemäß vorliegender Erfindung kann das Verabreichen einer immunogenen Verbindung an ein Individuum für den Zweck der Stimulierung einer Immunreaktion gegen die immunogene Verbindung und damit das Immunisieren des Individuums gegen die immunogene Verbindung umfassen. Eine Stimulierung einer Immunreaktion kann das Auslösen der Produktion von Antikörpern gegen die Verbindung sowie die Stimulation zytotoxischer T-Zellen umfassen. Für Impfzwecke können die Polypeptide, Nukleinsäuren und Bindungsmittel gemäß vorliegender Erfindung in einer physiologisch akzeptablen Form verabreicht werden. Die an Individuen zu verabreichende Zusammensetzung kann eine oder mehrere antigene Komponenten, physiologisch annehmbare Trägersubstanzen oder Pufferlösungen, Immunstimulanzien und/oder Adjuvanzen umfassen. Adjuvanzen können beispielsweise Freund's Incomplete Adjuvant oder Freund's Complete Adjuvant oder andere einem Fachmann bekannte Adjuvanzen umfassen.



**[0176]** Die Zusammensetzung kann in jeder angemessenen Weise verabreicht werden, z. B. intravenös, subkutan, intramuskulär etc. Die Dosis der Zusammensetzung richtet sich nach dem jeweiligen Fall und dem Zweck der Impfung. Sie muss an Parameter des behandelten Individuums angepasst werden, wie beispielsweise Alter, Gewicht, Geschlecht, etc. Darüber hinaus muss die Art der hervorzurufenden Immunreaktion in Betracht gezogen werden. Es könnte generell bevorzugt sein, wenn ein Individuum 100 µg-1 g eines Polypeptids gemäß vorliegender Erfindung oder  $10^6$ - $10^{12}$  MOI einer rekombinanten Nukleinsäure erhält, die eine Nukleinsäure gemäß vorliegender Erfindung in einer Form enthält, die in situ exprimiert werden kann.

**[0177]** Individuen für den Zweck einer Impfung können alle Organismen sein, welche die erfindungsgemäßen tumorassoziierten Polypeptide und/oder Polynukleotide enthalten und von Zellproliferationsstörungen betroffen sein können.

**[0178]** Impfung von Individuen kann vorteilhaft sein, z. B. im Falle veränderter Nicht-Wildtyp-Sequenzen oder bei einer Struktur von Markermolekülen, die mit Zellproliferationsstörungen assoziiert ist. In einer Ausführungsform der Erfindung kann eine Impfung in Fällen angewandt werden, bei denen quaternäre Nicht-Wildtypstrukturen von DNase-X in Karzinomen und deren Vorstufen auftreten, die in Wildtypgewebe nicht vorhanden sind.

**[0179]** Hierin beschriebene Polypeptide können auch bei einer adoptiven Immuntherapie für die Behandlung von Krebs angewandt werden. Adoptive Immuntherapie kann im weitesten Sinn in aktive oder passive Immuntherapie klassifiziert werden. Bei einer aktiven Immuntherapie beruht die Behandlung auf der Stimulation des endogenen Wirtssystems in vivo zur Reaktion gegen Tumore durch die Verabreichung von die Immunreaktion modifizierenden Stoffen (beispielsweise Tumorimpfstoffe, bakterielle Adjuvantien und/oder Zytokinen).

**[0180]** Bei einer passiven Immuntherapie beinhaltet die Behandlung die Verabreichung biologischer Reagenzien mit etablierter Tumorimmunreaktivität (wie beispielsweise Effektorzellen oder Antikörper), die direkt oder indirekt Antitumoreffekte vermitteln können und nicht notwendigerweise von einem intakten Wirtsimmunsystem abhängen. Beispiele von Effektorzellen umfassen T-Lymphozyten (beispielsweise CD8+-zytotoxische T-Lymphozyten, CD4+-T-Helferzellen, tumorinfiltrierende Lymphozyten), Killerzellen (wie beispielsweise natürliche Killerzellen, lymphokinaktivierte Killerzellen), B-Zellen oder antigenpräsentierende Zellen (wie beispielsweise dendritische Zellen und Makrophagen), welche die beschriebenen Antigene exprimieren. Die hierin beschriebenen Polypeptide können auch verwendet werden, um Anti-

körper oder anti-idiotypische Antikörper (wie in US-Patent Nr. 4,918,164) für eine passive Immuntherapie zu erzeugen.

**[0181]** Das hauptsächliche Verfahren zur Bereitstellung angemessener Zahlen von T-Zellen für eine adoptive Immuntherapie ist die Züchtung von T-Immunzellen in vitro. Kulturbedingungen zur Expansion einzelner antigenspezifischer T-Zellen auf eine Anzahl von mehreren Milliarden unter Beibehaltung der Antigenerkennung in vivo sind aus dem Stand der Technik gut bekannt. Diese In-vitro-Kulturbedingungen umfassen typischerweise intermittierende Stimulation mit Antigen, häufig in Gegenwart von Zytokinen, wie beispielsweise IL-2, und nicht-teilenden Nährzellen (Feederzellen). Wie oben erwähnt können die hierin beschriebenen immunreaktiven Polypeptide verwendet werden, um antigenspezifische T-Zellkulturen schnell zu expandieren, um ausreichende Zahlen von Zellen für eine Immuntherapie zu erzeugen. Insbesondere können antigenpräsentierende Zellen, wie beispielsweise dendritische Zellen, Makrophagen oder B-Zellen, durch aus dem Stand der Technik gut bekannte Standardtechniken mit immunreaktiven Polypeptiden gepulst werden oder mit einer oder mehreren Nukleinsäuresequenzen transfiziert werden, wobei die Sequenz eine Promotorregion enthält, die für die Steigerung der Expression geeignet und als Teil eines rekombinanten Virus oder eines anderen Expressionssystems exprimiert werden kann. Damit kultivierte T-Zellen in einer Therapie effektiv sein können, müssen die kultivierten T-Zellen wachsen und sich weit verteilen können und langfristig in vivo überleben. Studien haben gezeigt, dass kultivierte T-Zellen durch wiederholte Stimulation mit Antigen, supplementiert mit IL-2, induziert werden können, um in vivo zu wachsen und lange Zeit in beträchtlicher Anzahl zu überleben (siehe beispielsweise, Cheever, M. et al., „Therapy With Cultured T Cells: Principles Revisited“, Immunological Reviews. 157: 177, 1997).

**[0182]** Die hierin verwendeten DNase-X-Peptide können auch verwendet werden, um tumorreaktive T-Zellen zu erzeugen und/oder zu isolieren, die dann dem Patienten verabreicht werden können. In einer Technik können antigenspezifische T-Zelllinien durch Immunisierung in vivo mit kurzen Peptiden, die immunogenen Anteilen der beschriebenen Polypeptide entsprechen, erzeugt werden. Die resultierenden antigenspezifischen CD8+-CTL-Klone können aus dem Patienten isoliert, mithilfe von Gewebekulturstandardtechniken expandiert und wieder in den Patienten zurückgebracht werden.

**[0183]** Alternativ können Peptide, die immunogenen Anteilen der erfindungsgemäß verwendeten DNase-X-Polypeptide entsprechen, verwendet werden, um durch selektive Stimulation und Expansion autologer T-Zellen in vitro tumorreaktive T-Zelluntergrup-

pen zu erzeugen, um antigenspezifische T-Zellen bereitzustellen, die anschließend in den Patienten überführt werden können, wie von Chang et al. beschrieben (Crit. Rev. Oncol. Hematol., 22(3), 213, 1996). Zellen des Immunsystems, beispielsweise T-Zellen, können aus dem peripheren Blut eines Patienten isoliert werden, indem ein kommerziell verfügbares Zelltrennungssystem verwendet wird, beispielsweise das CEPRATE™-System von CellPro Incorporated (Rothell, Wash., USA) (siehe US-Patent Nr. 5,240,856; US-Patent Nr. 5,215,926; WO 89/06280; WO 91/16116 und WO 92/07243). Um antigenspezifische T-Zellen bereit zu stellen, werden separierte Zellen mit einem oder mehreren der immunreaktiven Polypeptide stimuliert, welche in einem Verabreichungsvehikel enthalten sind, beispielsweise einem Mikrokügelchen. Die Population von tumorantigenspezifischen T-Zellen wird dann mithilfe von Standardtechniken expandiert, und die Zellen werden dem Patienten zurück verabreicht.

**[0184]** In einer anderen Ausführungsform können für die Polypeptide spezifische T-Zell- und/oder Antikörperrezeptoren zur Verwendung bei einer adoptiven Immuntherapie kloniert, expandiert und in andere Vektoren oder Effektorzellen übertragen werden.

**[0185]** In einer weiteren Ausführungsform können syngene oder autologe dendritische Zellen mit Peptiden gepulst werden, die wenigstens einem immunogenen Anteil eines hierin beschriebenen Polypeptids entsprechen. Die resultierenden antigenspezifischen dendritischen Zellen können entweder in einen Patienten übertragen oder dazu verwendet werden, um T-Zellen zu stimulieren, damit antigenspezifische T-Zellen bereitgestellt werden, die dann wiederum einem Patienten verabreicht werden können. Die Verwendung peptidgepulster dendritischer Zellen zur Erzeugung antigenspezifischer T-Zellen und die anschließende Verwendung solcher antigenspezifischer T-Zellen zum Auslösen von Tumoren in einem Mausmodell wurde von Cheever et al., Immunological Reviews, 157: 177, 1997, gezeigt.

**[0186]** Diese Karzinome und ihre Vorstufen gemäß vorliegender Erfindung umfassen Zustände, die von anomalen Wachstumseigenschaften von Zellen oder Geweben im Vergleich zu den Wachstumseigenschaften normaler Kontrollzellen oder -geweben gekennzeichnet sind. Das Wachstum der Zellen oder Gewebe kann beispielsweise anomal beschleunigt sein oder kann anomal reguliert sein. Anomale Regulierung, wie oben verwendet, kann jede Form des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins von Nicht-Wildtyp-Reaktionen der Zellen oder Gewebe auf natürlich vorkommende wachstumsregulierende Einflüsse umfassen. Die Anomalien des Wachstums der Zellen oder Gewebe kann beispielsweise neoplastisch oder hyperplastisch sein.

**[0187]** Krankheiten, die von anomaler Zellproliferation gekennzeichnet sind, wie im Kontext vorliegender Erfindung verwendet, können beispielsweise Neoplasien wie benigne und maligne Tumore, Karzinome, Sarkome, Leukämien, Lymphome oder Dysplasien umfassen. Tumore können Tumore von Kopf und Hals, Tumore der Atemwege, Tumore des Magen-darmtraktes, Tumore der Harnwege, Tumore des Fortpflanzungssystems, Tumor des endokrinen Systems, Tumor des zentralen und peripheren Nervensystems, Tumore der Haut und ihrer Anhanggebilde, Tumore der Weichgewebe und Knochen, Tumore des lymphopoietischen und hämatopoietischen Systems, Brustkrebs, Kolorektalkrebs, Magendarmkrebs, Anogenitalkrebs, etc. umfassen

**[0188]** In bestimmten Ausführungsformen sind die Erkrankungen beispielsweise Adenome oder Adenokarzinome des Kolons, Erkrankungen der Atemwege, wie beispielsweise squamöses Lungenzellkarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom, Adenokarzinom der Lunge, großzelliges Lungenkarzinom, adenosquamöses Lungenkarzinom, karzinoider Tumor der Lunge, Bronchialdrüsentumpr oder (malignes) Mesotheliom, Anogenitalkrebs wie beispielsweise Gebärmutterhalskrebs, Vulvakrebs, Vaginalkrebs, Krebs des Rektums, Krebs des Anus und Krebs des Penis. In einer Ausführungsform kann es sich bei den Erkrankungen um Brustkrebs handeln.

**[0189]** Darüber hinaus können Vektoren, die DNase-X-Nukleinsäuren exprimieren, in Stammzellen eingeführt werden, die dem Patienten entnommen und als autologes Transplantat zurück in denselben Patienten in vitro klonal propagiert wurden.

**[0190]** Monoklonale Antikörper, die gegen DNase-X-Moleküle gerichtet sind, können als therapeutische Verbindungen verwendet werden, um Tumore in einem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung zu verkleinern oder zu beseitigen. Die Antikörper können selbst verwendet werden (beispielsweise zur Hemmung von Metastasen) oder an ein oder mehrere therapeutische Mittel gekoppelt werden. Diesbezüglich geeignete Mittel umfassen radioaktive Nuklide, Differenzierungs-induzierende Stoffe, Wirkstoffe, Toxine und deren Derivate. Bevorzugte radioaktive Nuklide umfassen  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$  und  $^{212}\text{Bi}$ . Bevorzugte Wirkstoffe umfassen Methotrexat und Pyrimidin- und Purinanaloga. Bevorzugte Differenzierungs-induzierende Stoffe umfassen Phorbol-ester und Buttersäure. Bevorzugte Toxine umfassen Ricin, Abrin, Diphtherietoxin, Cholera-toxin, Gelonin, Pseudomonas-Exotoxin, Shigellatoxin und antivirales Pokeweed-Protein.

**[0191]** In einer Ausführungsform der Erfindung kann die Therapie von Karzinomen und deren Vorstufen die Verabreichung von Antisense-Konstrukten oder Ribozymen umfassen. Die Verfahren zur Verabrei-

chung von Ribozymen oder Antisense-Konstrukten sind dem Fachmann bekannt. Die Verabreichung kann als Verabreichung nackter Nukleinsäuren oder als Verabreichung von Nukleinsäuren erfolgen, die für die Expression der relevanten aktiven Produkte in situ geeignet sind.

**[0192]** In einer anderen Ausführungsform der Erfindung kann die Behandlung von Karzinomen und deren Vorstufen die Verabreichung von Bindungsmitteln umfassen, die gegen die DNase-X-Polypeptide gerichtet sind. Diese Bindungsmittel können beispielsweise an andere Verbindungen wie beispielsweise Toxine, Enzyme, radioaktive Isotope, etc. gekoppelt sein.

**[0193]** In einer anderen Ausführungsform der Erfindung kann die Therapie von Karzinomen und deren Vorstufen die Verabreichung von Antagonisten oder Agonisten von DNase-X-Polypeptiden, von Bindungspartnern der DNase-X-Polypeptide, von Inhibitoren oder Verstärkern (Enhancern) der Expression der DNase-X-Polypeptide oder von Wirkstoffen umfassen, die durch Assays identifizierbar sind, welche die Messung der Aktivität der DNase-X-Polypeptide beinhalten. Die Verfahren zur Identifizierung dieser Substanzen sind einem Fachmann bekannt.

**[0194]** Ein Beispiel für ein Verfahren zur Identifizierung eines Bindungspartners eines DNase-X-Polypeptids (oder eines verwandten Polypeptids) und/oder -Polynukleotids kann folgende Schritte umfassen:

- (a) In-Kontakt-bringen des erfindungsgemäßen DNase-X-Polypeptids der Erfindung mit einer zu screenenden Verbindung; und
- (b) Feststellen, ob die Verbindung eine Aktivität des Polypeptids bewirkt.

**[0195]** Das DNase-X-Polypeptid kann verwendet werden, um auf Proteine oder andere Verbindungen zu screenen, die an die erfindungsgemäßen mit einer Kolorektalläsion assoziierten Polypeptide binden, oder auf Proteine oder andere Verbindungen, an welche das erfindungsgemäße mit einer Kolorektalläsion assoziierte Polypeptid bindet. Die Bindung des DNase-X-Polypeptids und des Moleküls kann die Aktivität des DNase-X-Polypeptids bzw. des gebundenen Moleküls aktivieren (Agonist), steigern, hemmen (Antagonist) oder verringern. Beispiele solcher Moleküle umfassen Antikörper, Oligonukleotide, Proteine (z. B. Rezeptoren) oder kleine Moleküle.

**[0196]** In einer Ausführungsform ist das Molekül eng mit dem natürlichen Liganden des DNase-X-Polypeptids verwandt, z. B. ein Fragment des Liganden, oder ein natürliches Substrat, ein Ligand, ein strukturelles oder funktionelles Mimetikum; siehe z. B., Coligan, Current Protocols in Immunology 1(2) (1991); Kapitel 5. Das Molekül kann auch mit einem natürli-

chen Rezeptor, an den die DNase gegebenenfalls bindet, oder zumindest mit einem Fragment des Rezeptors, das von dem DNase-X-Polypeptid (z. B. aktives Zentrum) gebunden werden kann, eng verwandt sein. In jedem Fall kann das Molekül rational mithilfe bekannter Techniken ausgearbeitet werden.

**[0197]** Vorzugsweise umfasst das Screening hinsichtlich dieser Moleküle das Herstellen geeigneter Zellen, welche das DNase-X-Polypeptid exprimieren, entweder als sezerniertes Protein oder auf der Zellmembran. Bevorzugte Zellen umfassen Zellen von Säugern, Hefen, Drosophila oder E. coli. Zellen, die das erfindungsgemäße mit einer Kolorektalläsion assoziierte Polypeptid exprimieren (oder Zellmembranen, welche das exprimierte Polypeptid enthalten), werden dann vorzugsweise mit einer potenziell das Molekül enthaltenden Testverbindung in Kontakt gebracht, um Bindung, Stimulation oder Inhibition der Aktivität des DNase-X-Polypeptids zu beobachten.

**[0198]** Der Assay kann lediglich die Bindung einer Kandidatenverbindung an das DNase-X-Polypeptid testen, wobei die Bindung durch einen Marker festgestellt wird oder in einem Assay, der den Wettbewerb (Kompetition) mit einem markierten Konkurrenten (Kompetitor) umfasst. Darüber hinaus kann der Assay testen, ob die Kandidatenverbindung dazu führt, dass durch die Bindung an das DNase-X-Polypeptid ein Signal erzeugt wird.

**[0199]** Alternativ kann der Assay mithilfe zellfreier Zubereitungen, einem an einen festen Träger befestigten Polypeptid/Molekül, chemischen Bibliotheken oder natürlichen Produktgemischen durchgeführt werden. Der Test kann auch lediglich die Schritte des Mischens einer Kandidatenverbindung mit einer Lösung, welche die DNase-X enthält, umfassen, wobei die Aktivität oder Bindung des DNase-X-Polypeptids/-Moleküls gemessen und die Aktivität bzw. Bindung des DNase-X-Polypeptids/-Moleküls mit einem Standard verglichen wird.

**[0200]** Vorzugsweise kann ein ELISA-Assay die DNase-X-Menge oder -Aktivität in einer Probe (z. B. einer biologischen Probe) mithilfe eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers messen. Der Antikörper kann die Menge oder Aktivität des DNase-X-Polypeptids messen, indem er direkt oder indirekt an das DNase-X-Polypeptid bindet oder mit dem DNase-X-Polypeptid um ein Substrat konkurriert. Alle obigen Assays können verwendet werden, um auf diagnostische oder prognostische Marker und auf therapeutische Mittel zu screenen. Die mithilfe dieser Assays aufgefundenen Moleküle können verwendet werden, um eine Krankheit zu behandeln oder um bei einem Patienten ein bestimmtes Ergebnis herbeizuführen (z. B. Beseitigung eines epithelialen Tumors oder Aufhalten des Fortschreitens des Tumorstadiums), indem die DNase-X-Polypeptidmoleküle akti-

viert oder gehemmt werden. Darüber hinaus können die Assays Mittel aufdecken, welche die Produktion der DNase-X-Polypeptide aus geeignet manipulierten Zellen oder Geweben hemmen oder verstärken. Die Erfindung beinhaltet daher ein Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen, die an DNase-X-Polypeptide binden, für die Verwendung bei der Behandlung von Karzinomen und deren Vorstufen, welches folgende Schritte umfasst: (a) Inkubieren einer Kandidaten bindenden Verbindung mit einem DNase-X-Polypeptid; und (b) Feststellen, ob eine Bindung stattgefunden hat.

**[0201]** Darüber hinaus umfasst die Erfindung ein Verfahren zum Identifizieren von Aktivatoren/Agonisten oder Inhibitoren/Antagonisten des erfindungsgemäßen mit einer Kolorektalläsion assoziierten Polypeptids zur Verwendung bei der Behandlung von Erkrankungen, die von anomaler Zellproliferation gekennzeichnet sind; welches folgende Schritte umfasst: (a) Inkubieren einer Kandidatenverbindung mit einem DNase-X-Polypeptid; b) Testen einer biologischen Aktivität der DNase-X (enzymatische Aktivität oder andere) und (c) Feststellen, ob eine biologische Aktivität des DNase-X-Polypeptids verändert worden ist.

**[0202]** In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung und zur Gewinnung eines Wirkstoffkandidaten für die Therapie von Karzinomen und deren Vorstufen, welches die folgenden Schritte umfasst:

- a. In-Kontakt-bringen einer DNase oder einer Zelle, welche das DNase-X-Polypeptid exprimiert, mit dem zu testenden Wirkstoffkandidaten in Gegenwart von Komponenten, die ein detektierbares Signal als Antwort
  - auf eine veränderte Regulierung der Zellproliferation
  - auf eine veränderte Aktivität eines DNase-X-Polypeptids
  - auf eine veränderte Zelldifferenzierung, liefern können, und unter Bedingungen, die einen Proteinstoffabbau erlauben, und
- b. Feststellen des Vorhandenseins bzw. Nichtvorhandenseins eines Signals oder eines Anstiegs des Signals, das durch die Aktivität des DNase-X-Polypeptids, eine Zellproliferation oder eine Zelldifferenzierung erzeugt wird, wobei das Vorhandensein bzw. der Anstieg des Signals einen putativen Wirkstoff anzeigt.

**[0203]** Experimente unter Einsatz von Tieren oder isolierten Zellen oder Zelllinien können verwendet werden, um das proliferative Verhalten von Zellen oder Geweben in Abhängigkeit von der Wirkung des DNase-X-Polypeptids zu untersuchen. Dieselben Verfahren können für die Untersuchung der Zelldifferenzierung angewandt werden.

**[0204]** Bei dem Wirkstoffkandidaten kann es sich um eine einzelne Verbindung oder mehrere Verbindungen handeln. Der Begriff „mehrere Verbindungen“ in einem erfindungsgemäßen Verfahren ist zu verstehen als mehrere Substanzen, die identisch oder nicht identisch sein können.

**[0205]** Die Verbindung oder Mehrzahl von Verbindungen können chemisch synthetisiert oder mikrobiologisch produziert sein und/oder beispielsweise in Proben, z. B. in Zellextrakten von beispielsweise Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen enthalten sein. Darüber hinaus kann/können die Verbindung/Verbindungen aus dem Stand der Technik bekannt sein, bislang jedoch nicht ihre Eignung zur Unterdrückung oder Aktivierung eines DNase-X-Polypeptids. Das Reaktionsgemisch kann ein zellfreier Extrakt sein, oder eine Zell- oder Gewebekultur umfassen. Geeignete Anordnungen für die erfindungsgemäßen Verfahren sind dem Fachmann bekannt und sind beispielsweise allgemein beschrieben in Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, Dritte Auflage (1994) und in den angehängten Beispielen. Die mehreren Verbindungen können z. B. dem Reaktionsgemisch, dem Kulturmedium zugegeben, in eine Zelle injiziert oder auf andere Art an dem transgenen Tier angewandt werden. Bei der Zelle oder dem Gewebe, die bzw. das in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden kann, handelt es sich vorzugsweise um eine Wirtszelle, eine Sängierzelle oder ein nicht-menschliches transgenes Tier der Erfindung, das in den obigen Ausführungsformen beschrieben ist.

**[0206]** Wenn eine Probe, die eine Verbindung oder mehrere Verbindungen enthält, in dem erfindungsgemäßen Verfahren identifiziert wird, ist es entweder möglich, die Verbindung aus der ursprünglichen Probe, die dahingehend identifiziert wurde, dass sie als die zur Unterdrückung oder Aktivierung eines DNase-X-Polypeptids befähigte Verbindung enthält, zu isolieren, oder die ursprüngliche Probe kann weiter unterteilt werden, beispielsweise wenn sie aus mehreren verschiedenen Verbindungen besteht, um die Anzahl unterschiedlicher Substanzen je Probe zu verringern und das Verfahren mit den Unterteilungen der ursprünglichen Probe zu wiederholen. Je nach Komplexität der Proben können die oben beschriebenen Schritte mehrere Male durchgeführt werden, vorzugsweise solange bis die in Übereinstimmung mit dem erfindungsgemäßen Verfahren identifizierte Probe nur eine begrenzte Anzahl von Substanzen oder nur eine Substanz aufweist. Die Probe umfasst vorzugsweise Substanzen mit ähnlichen chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften und am meisten bevorzugt identische Substanzen.

**[0207]** Einem Fachmann sind mehrere Verfahren zum Herstellen und Durchsuchen großer Bibliotheken bekannt, um Verbindungen mit spezifischer Affi-

nität für ein Ziel zu identifizieren. Diese Verfahren umfassen die Phagen-Display-Verfahren, bei denen randomisierte Peptide von einem Phagen präsentiert und durch Affinitätschromatographie an einen immobilisierten Rezeptor gescreent werden; siehe z. B. WO 91/17271, WO 92/01047, US-A5,223,409. In einem anderen Ansatz werden kombinatorische Bibliotheken von auf einem Chip immobilisierten Polymeren mithilfe von Photolithographie synthetisiert; siehe z. B. US5,143,854, WO 90/15070 und WO 92/10092. Die immobilisierten Polymere werden mit einem markierten Rezeptor in Kontakt gebracht und hinsichtlich eines Markers gescannt, um an den Rezeptor bindende Polymere zu identifizieren.

**[0208]** Die Synthese und das Durchsuchen von Peptidbibliotheken auf durchgehenden zellulosemembranträgern, die zur Identifizierung von Bindungsliganden des DNase-X-Polypeptids und damit möglichen Inhibitoren und Aktivatoren verwendet werden können, sind beispielsweise in Kramer, *Methods Mol. Biol.* 87 (1998), 25-39, beschrieben. Dieses Verfahren kann beispielsweise auch zur Feststellung der Bindungsstellen und der Erkennungsmotive in dem DNase-X-Polypeptid verwendet werden. In ähnlicher Weise wurden die Substratspezifität des Chaperons DnaK und die Berührungsstellen zwischen humanem Interleukin-6 und seinem Rezeptor bestimmt; siehe Rudiger, *EMBO J.* 16 (1997), 1501-1507 bzw. Weiergraber, *FERS Lett.* 379 (1996), 122-126.

**[0209]** Darüber hinaus können die oben erwähnten Verfahren für die Konstruktion von aus dem erfindungsgemäßen Polypeptid abgeleiteten Bindungssupertopen verwendet werden. Ein ähnlicher Ansatz wurde erfolgreich für Peptidantigene des monoklonalen Anti-p24(HIV-1)-Antikörpers beschrieben; siehe Kramer, *Cell* 91 (1997), 799-809. Ein allgemeiner Weg zu Fingerabdruckanalysen von Peptid-Antikörper-Wechselwirkungen anhand der „clustered“ Aminosäurepeptidbibliothek wurde in Kramer, *Mol. Immunol.* 32 (1995), 459-465, beschrieben. Darüber hinaus können gemäß den in Doring, *Mol. Immunol.* 31 (1994), 1059-1067, beschriebenen Verfahren Antagonisten der DNase-X aus monoklonalen Antikörpern abgeleitet und identifiziert werden, die spezifisch mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid reagieren.

**[0210]** Vor kurzem beschrieb WO 98/25146 weitere Verfahren zum Durchsuchen von Bibliotheken von Komplexen nach Verbindungen mit einer gewünschten Eigenschaft, insbesondere der Fähigkeit als Agonist oder Antagonist eines DNase-X-Polypeptids oder seines zellulären Rezeptors zu wirken oder an ein DNase-X-Polypeptid oder seinen zellulären Rezeptor zu binden. Die Komplexe in solchen Bibliotheken umfassen eine zu testende Verbindung, einen Marker, der mindestens einen Schritt in der Synthese

der Verbindung aufzeichnet, und eine „Halteleine“, die anfällig für eine Modifikation durch ein Rezeptormolekül ist. Die Modifizierung der Halteleine wird verwendet um anzuzeigen, dass ein Komplex eine Verbindung mit einer gewünschten Eigenschaft enthält. Der Marker kann dekodiert werden, um wenigstens einen Schritt in der Synthese einer solchen Verbindung aufzuklären. Andere Verfahren für die Identifizierung von Verbindungen, die mit dem DNase-X-Polypeptid oder mit DNase-X-Nukleinsäuremolekülen, die solche Moleküle kodieren, Wechselwirken, sind beispielsweise das In-vitro-Screening mit dem Phagen-Display-System sowie Filterbindungsassays oder „Echtzeit“-Messung der Wechselwirkung mithilfe beispielsweise der Vorrichtung BIAcore (Pharmacia).

**[0211]** All diese Verfahren können gemäß vorliegender Erfindung verwendet werden, um Aktivatoren/Agonisten und Inhibitoren/Antagonisten des DNase-X-Polypeptids oder eines verwandten Polypeptids für die Verwendung in einem Verfahren der vorliegenden Erfindung zu identifizieren.

**[0212]** Verschiedene Quellen können für die Basisstruktur eines solchen Aktivators oder Inhibitors verwendet werden und umfassen beispielsweise mimetische Analoga des erfindungsgemäßen Polypeptids. Mimetische Analoga des erfindungsgemäßen DNase-X-Polypeptids oder biologisch aktive Fragmente davon können beispielsweise durch Substitution der Aminosäuren erzeugt werden, die als essenziell für die biologische Aktivität mit beispielsweise Stereoisomeren angesehen werden, d. h. D-Aminosäuren; siehe z. B. Tsukida, *J. Med. Chem.* 40 (1997), 3534-3541. Falls Fragmente für das Design biologisch aktiver Analoga verwendet werden, können darüber hinaus promimetische Komponenten in ein Peptid eingebaut werden, um wenigstens einige der Konformationseigenschaften, die bei Entfernung eines Teils des ursprünglichen Polypeptids verloren gegangen sein könnten, wieder herzustellen; siehe z. B., Nachman, *Regul. Pept.* 57 (1995), 359-370.

**[0213]** Darüber hinaus kann das DNase-X-Polypeptid verwendet werden, um synthetische chemische Peptidomimetika zu identifizieren, die so effektiv wie das natürliche Polypeptid an einen Liganden, ein Substrat, einen Bindungspartner oder den Rezeptor des erfindungsgemäßen Polypeptids binden oder als solche wirken können; siehe z. B., Engleman, *J. Clin. Invest.* 99 (1997), 2284-2292. Beispielsweise können mithilfe geeigneter Rechnerprogramme Faltungssimulationen und ein Rechner-Neudesign von Strukturmotiven des erfindungsgemäßen Polypeptids durchgeführt werden (Olszewski, *Proteins* 25 (1996), 286-299; Hoffman, *Comput. Appl. Biosci.* 11 (1995), 675-679). Für die Konformationsanalyse und die energetische Analyse ausführlicher Peptid- und Proteinmodelle kann eine Rechnermodellierung der Prote-

infaltung verwendet werden (Monge, J. Mol. Biol. 247 (1995), 995-1012; Renouf, Adv. Exp. Med. Biol. 376 (1995), 37-45). Insbesondere können die entsprechenden Programme für die Identifizierung interaktiver Stellen der DNase-X-Polypeptide und deren möglichen Liganden oder anderen interagierenden Proteinen durch rechnergestützte Suche nach komplementären Peptidsequenzen verwendet werden (Fassina, Immunomethods 5 (1994), 114-120). Weitere geeignete Rechnersysteme für das Design von Protein und Peptiden sind im Stand der Technik beschrieben, beispielsweise in Beny, Biochem. Soc. Trans. 22 (1994), 1033-1036; Wodak, Ann. N. Y. Acad. Sci. 501 (1987), 1-13; Paba, Biochemistry 25 (1986), 5987-5991.

**[0214]** Die aus der oben beschriebenen Rechneranalyse erhaltenen Ergebnisse können z. B. für die Herstellung von Peptidomimetika des DNase-X-Proteins oder Fragmenten davon verwendet werden. Solche Pseudopeptidanaloga der natürlichen Aminosäuresequenz des Proteins können das Ursprungprotein sehr effizient nachahmen (Benkirane, J. Biol. Chem. 271 (1996), 33218-33224). Beispielsweise führt der Einbau leicht verfügbarer achiraler Aminosäurereste in ein erfindungsgemäßes Protein oder ein Fragment davon zur Substitution der Amidbindungen durch Polymethyleinheiten einer aliphatischen Kette, was eine praktische Strategie zur Konstruktion eines Peptidomimetikums liefert (Banerjee, Biopolymers 39 (1996), 769-777).

**[0215]** Im Stand der Technik sind in anderen Systemen superaktive peptidomimetische Analoga kleiner Peptidhormone beschrieben (Zhang, Biochem. Biophys. Res. Commun. 224 (1996), 327-331). Geeignete Peptidomimetika des erfindungsgemäßen Proteins können auch durch die Synthese von peptidomimetischen kombinatorischen Bibliotheken durch aufeinander folgende Amidalkylierung und Testung der resultierenden Verbindungen, z. B. hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften und immunologischen Eigenschaften, identifiziert werden. Verfahren für die Erzeugung und Verwendung peptidomimetischer kombinatorischer Bibliotheken sind im Stand der Technik beschrieben, beispielsweise in Ostresh, Methods in Enzymology 267 (1996), 220-234, und Dömer, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 709-715.

**[0216]** Darüber hinaus kann eine dreidimensionale und/oder kristallographische Struktur des DNase-X-Polypeptids für das Design von peptidomimetischen Inhibitoren der biologischen Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids verwendet werden (Rose, Biochemistry 35 (1996), 12933-12944; Rutenber, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 1545-1558).

**[0217]** Das strukturbasierte Design und die Synthese niedermolekularer synthetische Moleküle, welche die Aktivität des nativen biologischen Polypeptids

nachahmen, wird weiter beschrieben, z. B. in Dowd, Nature Biotechnol. 16 (1998), 190-195; Kieber-Emmons, Current Opinion Biotechnol. 8 (1997), 435-441; Moore, Proc. West Pharmacol. Soc. 40 (1997), 115-119; Mathews, Proc. West Pharmacol. Soc. 40 (1997), 1211-125; Mukhija, European J. Biochem. 254 (1998), 433-438.

**[0218]** Einem Fachmann ist außerdem gut bekannt, dass es möglich ist, Mimetika kleiner organischer Verbindungen zu entwickeln, synthetisieren und evaluieren, die beispielsweise als Substrat oder Ligand für das in der Erfindung verwendete DNase-X-Polypeptid oder das verwandte Polypeptid wirken können. Beispielsweise wurde beschrieben, dass D-Glukose-Mimetika von Hapalosin als Antagonisten eines mit der Multidrug-Resistenz-Assistenz assoziierten Proteins ähnliche Effizienz wie Hapalosin bei Zytotoxizität aufweisen; siehe Dinh, J. Med. Chem. 41 (1998), 981-987.

**[0219]** Das DNase-X-Nukleinsäuremolekül kann auch als Ziel für Aktivatoren und Inhibitoren dienen. Aktivatoren können beispielsweise Proteine umfassen, die an die mRNA eines Gens binden, das ein DNase-X-Polypeptid kodiert und dadurch die native Konformation der mRNA stabilisieren und die Transkription und/oder Translation vereinfachen, z. B. in der Weise, wie das Tat-Protein auf HIV-RNA wirkt. Darüber hinaus sind in der Literatur Verfahren zur Identifizierung von Nukleinsäuremolekülen, beispielsweise eines RNA-Fragmentes beschrieben, welches die Struktur eines definierten oder undefinierten RNA-Zielmoleküls nachahmt, an das im Inneren einer Zelle eine Verbindung bindet, was zur Verzögerung des Zellwachstums oder zu Zelltod führt; siehe z. B., WO 98/18947 und darin genannte Literaturnachweise. Diese Nukleinsäuremoleküle können verwendet werden, um unbekannte Verbindungen von pharmazeutischer und/oder landwirtschaftlicher Relevanz zu identifizieren und um unbekannte RNA-Targets für die Verwendung beim Behandeln einer Krankheit zu identifizieren. Diese Verfahren und Zusammensetzungen können bei der Suche nach neuartigen Antibiotika, Bakteriostatika oder Modifikationen davon verwendet werden oder zum Identifizieren von Verbindungen, die geeignet sind, den Expressionsgrad von Proteinen, welche von einem Nukleinsäuremolekül kodiert werden, zu verändern.

**[0220]** Alternativ kann beispielsweise die Konformationsstruktur des RNA-Fragmentes, welches die Bindungsstelle nachahmt, beim rationalen Wirkstoffdesign verwendet werden, um bekannte Antibiotika zu modifizieren, damit sie besser an das Ziel binden. Ein solches Verfahren ist die Kernmagnetresonanz (NMR), die geeignet ist, um Konformationsstrukturen von Wirkstoffen und von RNA zu identifizieren. Weitere Verfahren sind beispielsweise die Wirkstoffdesignverfahren wie in WO 95/35367, US-A-5,322,933

beschrieben, bei denen die Kristallstruktur des RNA-Fragmentes abgeleitet und Rechnerprogramme verwendet werden, um neuartige Bindungsverbindungen zu entwickeln, die als Antibiotika wirken können.

**[0221]** Manche genetischen Veränderungen führen zu veränderten Proteinkonformationszuständen. Beispielsweise können manche Mutanten der erfindungsgemäßen mit Kolorektalläsionen assoziierten Polypeptide eine Tertiärstruktur besitzen, die deren Fähigkeit zum Proteinabbau stark verringert. Wiederherstellung der normalen oder regulierten Konformation mutierter Proteine ist das eleganteste und spezifischste Mittel zur Korrektur dieser molekularen Defekte, obgleich es schwierig sein kann. Diesbezüglich von besonderer Relevanz ist die Konsensusdomäne des erfindungsgemäßen mit Kolorektalläsionen assoziierten Polypeptids.

**[0222]** Die Verbindungen, die gemäß einem erfindungsgemäßen Verfahren getestet und identifiziert werden können, können Expressionsbibliotheken, z. B. cDNA-Expressionsbibliotheken, Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Antikörper, kleine organische Verbindungen, Hormone, Peptidomimetika, PNAs oder dergleichen sein (Milner, *Nature Medicine* 1 (1995), 879-880; Hupp, *Cell* 83 (1995), 237-245; Gibbs, *Cell* 79 (1994), 193-198, und oben genannte Bezugsverweise). Darüber hinaus können Gene, die einen putativen Regulator des DNase-X-Polypeptids kodieren und/oder die ihre Wirkung stromauf- oder abwärts des DNase-X-Polypeptids ausüben, beispielsweise durch Anwendung von Insertionsmutagenese unter Verwendung von beispielsweise aus dem Stand der Technik bekannten Gen-Targeting-Vektoren identifiziert werden. Solche Verbindungen können auch funktionelle Derivate oder Analoge bekannter Inhibitoren oder Aktivatoren sein. Solche geeigneten Verbindungen können beispielsweise trans-wirkende Faktoren sein, die an das erfindungsgemäße tumorassozierte Polypeptid oder an regulatorische Sequenzen des Gens, das es kodiert, binden. Die Identifizierung von Faktoren kann mithilfe von Standardverfahren aus dem Stand der Technik erfolgen (siehe z. B., Sambrook, oben, und Ausubel, oben).

**[0223]** Um zu bestimmen, ob ein Protein an das DNase-X-Protein selbst oder an regulatorische Sequenzen bindet, können standardmäßige native Gelverschiebungs (Gelshift)-Analysen durchgeführt werden. Zur Identifizierung eines trans-wirkenden Faktors, der an das Protein oder eine regulatorische Sequenz bindet, kann das Protein oder die regulatorische Sequenz als Affinitätsreagens in Standardverfahren zur Proteinreinigung oder als Sonde zum Durchsuchen einer Expressionsbibliothek verwendet werden.

**[0224]** Die Identifizierung von Nukleinsäuremolekü-

len, die Polypeptide kodieren, welche mit der oben beschriebenen erfindungsgemäßen DNase Wechselwirken, kann auch durch Verwendung des so genannten Hefe-„Zwei-Hybrid“-Systems erreicht werden, wie beispielsweise in Scofield (*Science* 274 (1996), 2063-2065) beschrieben. In diesem System ist das von einem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül kodierte Polypeptid oder ein kleinerer Teil davon mit der DNA-bindenden Domäne des GAL4-Transfusionsfaktors verknüpft. Ein Hefestamm, der dieses Fusionspolypeptid exprimiert und ein lacZ-Reportergen aufweist, welches von einem geeigneten Promotor angetrieben ist, der von dem GAL4-Transfusionsfaktor erkannt wird, wird mit einer Bibliothek von cDNAs transformiert, die Pflanzenproteine oder Peptide davon in Fusion mit einer Aktivierungsdomäne exprimieren. Wenn daher ein von einer der cDNAs kodierte Peptid mit dem Fusionspeptid, das ein Peptid eines erfindungsgemäßen DNase-X-Polypeptids umfasst, Wechselwirken kann, ist der Komplex in der Lage, die Expression des Reportergens zu steuern. Auf diese Weise können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle und das kodierte Peptid verwendet werden, um Peptide und Proteine zu identifizieren, die mit dem DNase-X-Protein Wechselwirken. Für einen Fachmann ist es offensichtlich, dass dieses und ähnliche Systeme dann weiter für die Identifizierung von Inhibitoren der Bindung der DNase-X-Proteine eingesetzt werden können.

**[0225]** Wenn der trans-wirkende Faktor identifiziert ist, kann die Modulierung seiner Bindung an DNase-X-Polypeptide oder die Regulierung der Expression der DNase-X-Polypeptide verfolgt werden, beginnend beispielsweise mit dem Screening auf Inhibitoren gegen die Bindung des Transkriptionsfaktors an das DNase-X-Protein der vorliegenden Erfindung. Anschließend könnte dann eine Aktivierung oder Repression der erfindungsgemäßen DNase-X-Proteine in Tieren erfolgen, indem der trans-wirkende Faktor (oder sein Inhibitor) oder das Gen, das ihn kodiert, angewandt werden, z. B. in einem Expressionsvektor. Wenn darüber hinaus die aktive Form des trans-wirkenden Faktors ein Dimer ist, könnten dominant-negative Mutanten des trans-wirkenden Faktors hergestellt werden, um seine Aktivität zu hemmen.

**[0226]** Darüber hinaus könnten bei der Identifizierung des trans-wirkenden Faktors weitere Komponenten des Weges identifiziert werden, der zur Aktivierung (z. B. Signaltransduktion) oder Repression eines Gens führt, das an der Steuerung des erfindungsgemäßen tumorassozierten Polypeptids beteiligt ist. Anschließend kann die Modulierung der Aktivität dieser Verbindungen erfolgen, um weitere Wirkstoffe und Verfahren zur Modulierung des Metabolismus des Proteinabbaus in Tieren zu entwickeln. Die vorliegende Erfindung betrifft daher die Verwendung des Zwei-Hybrid-Systems wie oben definiert für



die Identifizierung des erfindungsgemäßen tumorassoziierten Polypeptids oder von Aktivatoren oder Inhibitoren des erfindungsgemäßen DNase-X-Polypeptids.

**[0227]** Die durch die obigen Verfahren isolierten Verbindungen dienen auch als Leitverbindungen für die Entwicklung analoger Verbindungen. Die Analoga sollten eine stabilisierte elektronische Konfiguration und molekulare Konformation aufweisen, die es gestatten, dass wichtige funktionelle Gruppen dem DNase-X-Polypeptid oder seinem möglichen Rezeptor auf im Wesentlichen dieselbe Weise wie die Leitverbindung präsentiert werden. Insbesondere haben die analogen Verbindungen räumliche elektronische Eigenschaften, die mit der Bindungsregion vergleichbar sind, können aber kleinere Moleküle als die Leitverbindung sein, häufig mit einem Molekulargewicht unter etwa 2 kD und vorzugsweise unter etwa 1 kD.

**[0228]** Die Identifizierung analoger Verbindungen kann durch Verwendung von Techniken wie beispielsweise Self-Consistent-Field-Analyse (SCF-Analyse), Konfigurationsinteraktionsanalyse (KI-Analyse) und Analyse der Dynamik im Normalmodus (Normal Mode Dynamics-Analyse) erfolgen. Es stehen Rechnerprogramme für die Anwendung dieser Techniken zur Verfügung, z. B., Rein, Computer-Assisted Modeling of Receptor-Ligand Interactions (Alan Liss, New York, 1989). Verfahren für die Herstellung chemischer Derivate und Analoga sind dem Fachmann gut bekannt und beispielsweise in Beilstein, Handbook of Organic Chemistry, Springer Edition New York Inc., 175 Fifth Avenue, New York, N.Y. 10010 U.S.A. und in Organic Synthesis, Wiley, New York, USA, beschrieben. Darüber hinaus können die Derivate und Analoga hinsichtlich ihrer Effekte gemäß im Stand der Technik bekannter Verfahren getestet werden, siehe auch oben. Des Weiteren können Peptidomimetika und/oder rechnergestütztes Design geeigneter Derivate und Analoga verwendet werden, beispielsweise gemäß den oben beschriebenen Verfahren.

**[0229]** In einer bevorzugten Ausführungsform der oben beschriebenen Verfahren der Erfindung ist die Zelle eine Zelle eines oben beschriebenen transgenen, nicht-menschlichen Tieres oder ist durch ein erfindungsgemäßes Verfahren erhalten oder in dem oben beschriebenen transgenen nicht-menschlichen Tier enthalten.

**[0230]** Wenn die beschriebene Verbindung identifiziert und erhalten worden ist, wird sie vorzugsweise in einer therapeutisch akzeptablen Form bereitgestellt.

**[0231]** Es versteht sich von selbst, dass die Verbindungen und Verfahren, wie sie in diesem Text beschrieben sind, auf jedes Säugerindividuum angewend-

bar sind. Die Verbindungen und Verfahren können daher auf Tiere wie auch auf Menschen angewandt werden und sind als solche zu veterinärmedizinischen wie auch zu medizinischen Zwecken geeignet. Tiere, die in Bezug auf die vorliegende Erfindung von besonderer Relevanz sind, sind Haustiere wie beispielsweise Katzen, Hunde, etc., Tiere von landwirtschaftlicher Relevanz wie beispielsweise Kühe, Schweine, Pferde, Labortiere wie beispielsweise Ratten, Mäuse, Hamster, Kaninchen, etc. und alle anderen Tiere, die von einer Krankheit betroffen sein können, welche von einem anomalen Zellwachstum gekennzeichnet ist.

**[0232]** Die vorliegende Erfindung stellt Verbindungen und Verfahren bereit, die für die Erkennung und Behandlung von Karzinomen und deren Vorstufen geeignet sind. Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens für die Detektion von Karzinomen und deren Vorstufen basierend auf der Bestimmung des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins und/oder des Expressionsgrades von DNase-X-Molekülen in biologischen Proben. Dieses Erkennungsverfahren kann z. B. bei der Früherkennung von Neoplasien und Vorstufen von Tumoren eingesetzt werden. Ein zweiter Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zum Behandeln von Karzinomen und deren Vorstufen durch Modulierung von DNase-X-Genprodukten als therapeutisch aktive Mittel. Die Erfindung stellt auch therapeutische Verfahren basierend auf der Modulierung der Aktivität von DNase-X-Polypeptiden bereit. Es ist ein Aspekt der Erfindung, ein Verfahren für rationales Tumormanagement basierend auf dem Nachweis von DNase-X-Genprodukten in Patientenproben und das Abstimmen einer Therapie in Korrelation zu der festgestellten Überexpression der DNase-X-Genprodukte bereitzustellen. Darüber hinaus stellt die vorliegende Erfindung einen Forschungs- oder -diagnostischen Testkit bereit zum Durchführen derjenigen Reaktionen, die mit der Detektion des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins und/oder des Grades der Überexpression von DNase-X-Genen verbunden sind.

**[0233]** Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen, die bei der Behandlung von Karzinomen und deren Vorstufen angewendet werden können und DNase-X-Verbindungen, wie hierin beschrieben, aufweisen.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen:

**[0234]** **Fig. 1:** Immunhistologisches Präparat, das mit einem gegen DNase-X gerichteten Antikörper gefärbt ist; A: Kolonkarzinom; B: entsprechendes Normalgewebe; das Kolonkarzinompräparat sowie das Normalgewebe wurden einer immunchemischen Färbereaktion unterzogen, bei der ein gegen DNase-X gerichteter primärer Antikörper verwendet wurde; die



Figur zeigt positive Kernfärbung für DNase-X in den Tumorzellen; im Normalgewebe zeigen intraepitheliale endokrine Zellen Immunreaktivität hinsichtlich DNase-X im Zytoplasma; hinsichtlich experimenteller Einzelheiten siehe Beispiel 1.

**[0235] Fig. 2:** Immunhistologisches Präparat, das mit einem gegen DNase-X gerichteten Antikörper gefärbt ist; A: Magenkarzinom; B: entsprechendes Normalgewebe; ein Magenkarzinompräparat sowie Normalgewebe wurden einer immunchemischen Färbereaktion unterzogen, bei der ein gegen DNase-X gerichteter primärer Antikörper verwendet wurde; die Figur zeigt positive Kernfärbung für DNase-X in den Tumorzellen; im Normalgewebe zeigen glanduläre endokrine Zellen Immunreaktivität hinsichtlich DNase-X im Zytoplasma; hinsichtlich experimenteller Einzelheiten siehe Beispiel 1.

**[0236] Fig. 3:** Immunhistologisches Präparat, das mit einem gegen DNase-X gerichteten Antikörper gefärbt ist; ein Lungenkarzinompräparat wurde einer immunchemischen Färbereaktion unterzogen, bei der ein gegen DNase-X gerichteter primärer Antikörper verwendet wurde; die Figur zeigt positive Kernfärbung für DNase-X in den Tumorzellen; hinsichtlich experimenteller Einzelheiten siehe Beispiel 1.

**[0237] Fig. 4:** Immunhistologisches Präparat, das mit einem gegen DNase-X gerichteten Antikörper gefärbt ist; A: Adenokarzinom an der Übergangsstelle von Speiseröhre zu Magen; B: entsprechendes Normalgewebe aus der Speiseröhre; ein Ösophaguskarzinompräparat sowie entsprechendes Normalgewebe wurden einer immunchemischen Färbereaktion unterzogen, bei der ein gegen DNase-X gerichteter primärer Antikörper verwendet wurde; die Figur zeigt positive Kernfärbung für DNase-X in den Tumorzellen; im Normalgewebe ist keine Färbung sichtbar; hinsichtlich experimenteller Einzelheiten siehe Beispiel 1.

**[0238] Fig. 5:** Immunhistologisches Präparat, das mit einem gegen DNase-X gerichteten Antikörper gefärbt ist; ein Gebärmutterhalsdysplasiepräparat (CINIII) wurde einer immunchemischen Färbereaktion unterzogen, bei der ein gegen DNase-X gerichteter primärer Antikörper verwendet wurde; die Figur zeigt positive Kernfärbung für DNase-X in den Tumorzellen; hinsichtlich experimenteller Einzelheiten siehe Beispiel 1.

**[0239] Fig. 6:** Immunhistologisches Präparat, das mit einem gegen DNase-X gerichteten Antikörper gefärbt ist; ein duktales Karzinom in situ wurde einer immunchemischen Färbereaktion unterzogen, bei der ein gegen DNase-X gerichteter primärer Antikörper verwendet wurde; die Figur zeigt positive Kernfärbung für DNase-X in den Tumorzellen; das benachbarte Normalgewebe zeigt keine Färbung auf DNase-X; hinsichtlich experimenteller Einzelheiten siehe

Beispiel 1

**[0240]** Die folgenden Beispiele dienen lediglich der Veranschaulichung und sollen den Umfang der hierin beschriebenen Erfindung nicht einschränken.

Beispiel 1: Immunchemischer Nachweis der Überexpression von DNase-X in Gewebeproben von Karzinomen

**[0241]** Schnitte von formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeproben des Kolons wurden immunzytochemisch mit DNase-X-spezifischen Antikörpern gefärbt.

**[0242]** Die Schnitte wurden durch Inkubation in Xylol und Ethanolkonzentrationsstufen rehydriert und in zweimal destilliertes Wasser (Aqua Bidest) überführt. Antigen-Retrieval wurde mit 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) durchgeführt. Dafür wurden die Objektträger in einem Wasserbad bei 95°C für 40 Min. erhitzt. Die Objektträger wurden für 20 Minuten abgekühlt und in Waschpuffer (PBS/0,1% Tween 20) überführt.

**[0243]** Zur Inaktivierung von endogener Peroxidase wurden die Proben für 20 Min. bei RT mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend für 5 bis 10 Minuten in PBS/0,1% Tween 20 gewaschen.

**[0244]** Die Objektträger wurden dann mit dem primären Antikörper, Ratte-Anti-DNase-X (1:25), für 1 Stunde bei RT inkubiert, die Objektträger wurden dann mit Waschpuffer gespült und für 5 Min. in ein frisches Pufferbad gesetzt. Der verwendete Antikörper ist gegen die Peptidsequenz caslttkrldkklrtepgf der humanen DNase-X gerichtet.

**[0245]** Danach wurden die Objektträger mit dem sekundären Antikörper (Ziege-Anti-Ratte (1:500)) inkubiert. Es wurde 3 Mal für 5 Minuten gewaschen. Überschüssiger Puffer wurde abgeklopft, und das Präparat wurde für 30 Minuten bei RT mit 100 µl Visualisierungsreagens überdeckt. Die Objektträger wurden wie zuvor gewaschen und für 10 Min. mit 200 µl Substratchromogenlösung (DAB) überschichtet. Dann wurden die Objektträger wie zuvor gewaschen und für 3 Min. in einem Hämatoxylinbad gegengefärbt. Hämatoxylinreste wurden mit destilliertem Wasser abgespült, und über die Präparate wurden ein wässriges Eindeckmedium sowie Deckgläschen gegeben.

**[0246]** Die mikroskopische Untersuchung der Objektträger ergab, dass mit DNase-X immunreaktive Zellen in Proben gefunden werden, die mikroskopisch als Proben eines Kolorektalkarzinoms identifiziert werden können. In Karzinomen ist die DNase-X-spezifische Färbung im Zellkern konzentriert. In

Kontrollproben sind dagegen sehr wenige Einzelzellen gefärbt. In allen nicht-karzinogenen Zellen ist die Färbung zytoplasmatisch, wohingegen die Färbung in Zellen von Karzinomen und deren Vorstufen im Kern lokalisiert ist. Vor allem in Magendarmgeweben zeigen endokrine Zellen zytoplasmatische Färbung für DNase-X. Es sind keine anderen Zellen im Magendarmtrakt gefärbt. In anderen getesteten Geweben gibt es keine positive Färbung. In diesen Fällen ist die Färbung im Zytoplasma der Zellen lokalisiert.

**[0247]** Das oben beschriebene immunhistochemische Färbeverfahren wurde außerdem an Geweben von Brust-, Lungen-, Gebärmutterhals (CINIII), Magen-, Speiseröhren-, Endometrial-, Ovarialkarzinome angewendet. In allen diesen Fällen konnte in den Krebszellen Kernfärbung für DNase-X beobachtet werden. In Normalgewebe wurde geringfügige bis keine Färbung identifiziert.

**[0248]** Darüber hinaus wurden Metastasen eines Kolorektalkarzinoms, die sich in der Leber befanden, mit immunchemischen Verfahren wie oben beschrieben analysiert. Das Ergebnis zeigte Kernfärbung in den Tumorzellen und keine Färbung in dem umliegenden Normalgewebe.

**[0249]** Immunchemische Analyse von peripherem venösem Blut, von Knochenmark und von Lymphozyten mit den beschriebenen Verfahren ergab keine Immunreaktivität hinsichtlich DNase-X in Proben, die aus gesunden Kontrollindividuen erhalten wurden. Dies deutet darauf hin, dass disseminierte Tumorzellen, die mit DNase-X immunreagieren, in diesen Proben durch spezifische immunchemische Färbung mit gegen DNase-X gerichteten Antikörpern identifiziert werden könnten.

**[0250]** Die Ergebnisse zeigen, dass die Färbung mit für DNase-X spezifischen Reagenzien die Identifizierung von Karzinomen in biologischen Proben gestattet. In Karzinomen und deren Vorstufen gibt es mit dem verwendeten Antikörper Kernfärbung für DNase-X, wohingegen in Normalgewebe nur wenige Zellen im Zytoplasma gefärbt sein können.

Beispiel 2: Erkennung disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Individuen

**[0251]** Es wurden Lymphknotenproben von Patienten verwendet, die bei einer chirurgischen Resektion von Adenokarzinomen des Kolons erhalten wurden, um das Vorhandensein von Zellen zu bestimmen, die Immunreaktivität mit DNase-X-spezifischen Bindungsmitteln zeigen. Insgesamt wurden Proben von 7 Patienten mit Kolonkarzinom verwendet.

**[0252]** Die immunhistochemische Färbung wurde wie in Beispiel 1 erläutert durchgeführt.

**[0253]** Das Experiment zeigt, dass in Proben von Patienten mit Karzinom Färbung mit dem gegen DNase-X gerichteten Antikörper detektiert werden kann.

**[0254]** Eine immunhistochemische Färbung für DNase-X in den Proben könnte die Nachweisbarkeit der disseminierten Tumorzellen in dem Lymphgewebe verbessern.

Beispiel 3: Frühdiagnose eines duktales Karzinomas in situ durch Nachweis von DNase-X in Zellen, die in Duktallavageflüssigkeit vorhanden sind

**[0255]** Diese Studie wurde mit einem Kollektiv von 14 Individuen durchgeführt. Durch mammographische Untersuchung in situ wurden 7 Patienten mit Kalzifizierungen in Brustgängen identifiziert, welche ein duktales Karzinom im Frühstadium anzeigen. Sieben (7) Individuen zeigten keine Anzeichen für eine neoplastische Läsion in der Brust.

**[0256]** Bei allen 14 Individuen wurde eine Duktallavage durchgeführt und aus der Lavageflüssigkeit wurden Zellen isoliert.

**[0257]** Aus den Lavageflüssigkeiten wurden mithilfe der ThinPrep™-Technologie zytologische Präparate hergestellt. Immunchemische Färbung wurde wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

**[0258]** Das Experiment zeigt in den zytologischen Präparaten von 9 Individuen das Vorhandensein von hinsichtlich DNase-X immunreaktiven Zellen. In den Proben aller Patienten mit einer mammographischen Diagnose, die das Vorhandensein eines duktales Karzinoms in situ anzeigt, konnten Zellen identifiziert werden, die hinsichtlich DNase-X immunreaktiv waren.

**[0259]** Das Ergebnis zeigt, dass die konventionellen Verfahren zur Identifizierung von Frühstadien von Neoplasien der Brust durch hierin vorgestellte Verfahren auf Basis der Detektion der DNase-X-Immunreaktivität verbessert werden können.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Diagnose von Karzinomen und deren Vorstufen und/oder zur Vorhersage des Krankheitsverlaufs, umfassend
  - a) das Detektieren des Gehalts und/oder der subzellulären Lokalisation von DNase-X Molekülen in den Zellen einer Gewebeprobe eines Individuums;
  - b) das Vergleichen des Gehalts und/oder der subzellulären Lokalisation von DNase-X Molekülen in der besagten Probe mit den Gehalten in einer entsprechenden Kontrollprobe, die nicht von der zu testenden Krankheit betroffen ist;
  - c) wobei die Diagnose oder Prognose des Krank-

heitsverlaufs dadurch getroffen wird, dass ein im Vergleich zu dem Wildtyp signifikant erhöhter Gehalt an DNase-X Molekülen in der besagten Gewebeprobe und/oder den Zellkernen als Hinweis auf diese Krankheit oder auf die Prognose des Krankheitsverlaufs angesehen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Detektierung der DNase-X Moleküle den Nachweis der Zugänglichkeit bestimmter Regionen der DNase-X Moleküle umfasst.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Probe ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend: Blut, Plasma, Serum, Liquor, Lymphe, Knochenmark, Abstriche, Spülungen, Auswaschungen, Sekreten, Transsudaten, Exsudaten, Sputum, Stuhl, Urin, Samen, Zell- und Gewebeproben, Punktierungen oder Biopsien.

4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Karzinom ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend: Krebs des Kopfes und des Halses, Krebs des Respirationstrakts, Krebs des Gastrointestinaltrakts, Krebs der Haut und ihrer Anhänge, Krebs des zentralen und peripheren Nervensystems, Krebs des Urinsystems, Krebs des Reproduktionssystems, Krebs des endokrinen Systems, Krebs des Weichgewebes und der Knochen, Krebs des lymphopoetischen und hematopoetischen Systems, Brustkrebs, Lungenkrebs, Gebärmutterhalskrebs, Colorektalkrebs oder Anogenitalkrebs.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, wobei die Detektierung des Gehalts an DNase-X Molekülen unter Einsatz wenigstens einer Sonde, die spezifisch an die zu detektierenden Markermoleküle bindet, ausgeführt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Sonde detektierbar markiert ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei der Marker ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einem Radioisotop, einer biolumineszenten Verbindung, einer chemilumineszenten Verbindung, einer fluoreszenten Verbindung, einem Metal-Chelat, einer biologisch relevanten bindenden Struktur wie Biotin oder Digoxigenin oder ein Enzym.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 5-7, wobei wenigstens eine Sonde ein Antikörper, ein Fragment eines Antikörpers, ein ein Antigen-bindendes Epitop umfassendes Peptidomimetikum oder ein Mini-Antikörper ist.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Detektierung ein immunzytochemisches Detektierungsverfahren umfasst.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5-7, wobei für die Detektierung der DNase-X Markermoleküle wenigstens eine Sonde verwendet wird, die eine Nukleinsäure ist, die mit einer Marker-Nukleinsäure hybridisiert.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Detektierungsreaktion eine Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion umfasst.

12. Verwendung der DNase-X für den Nachweis und die Identifizierung von Tumorzellen, dadurch gekennzeichnet, dass eine detektierbare Menge an DNase-X Molekülen in einer Gewebeprobe oder Zellkernen als Anzeiger für Tumorzellen angesehen wird.

13. Verfahren zur Identifizierung und Gewinnung eines Arzneimittel-Kandidaten für die Therapie von Karzinomen und deren Vorstufen, das die folgenden Schritte umfasst:

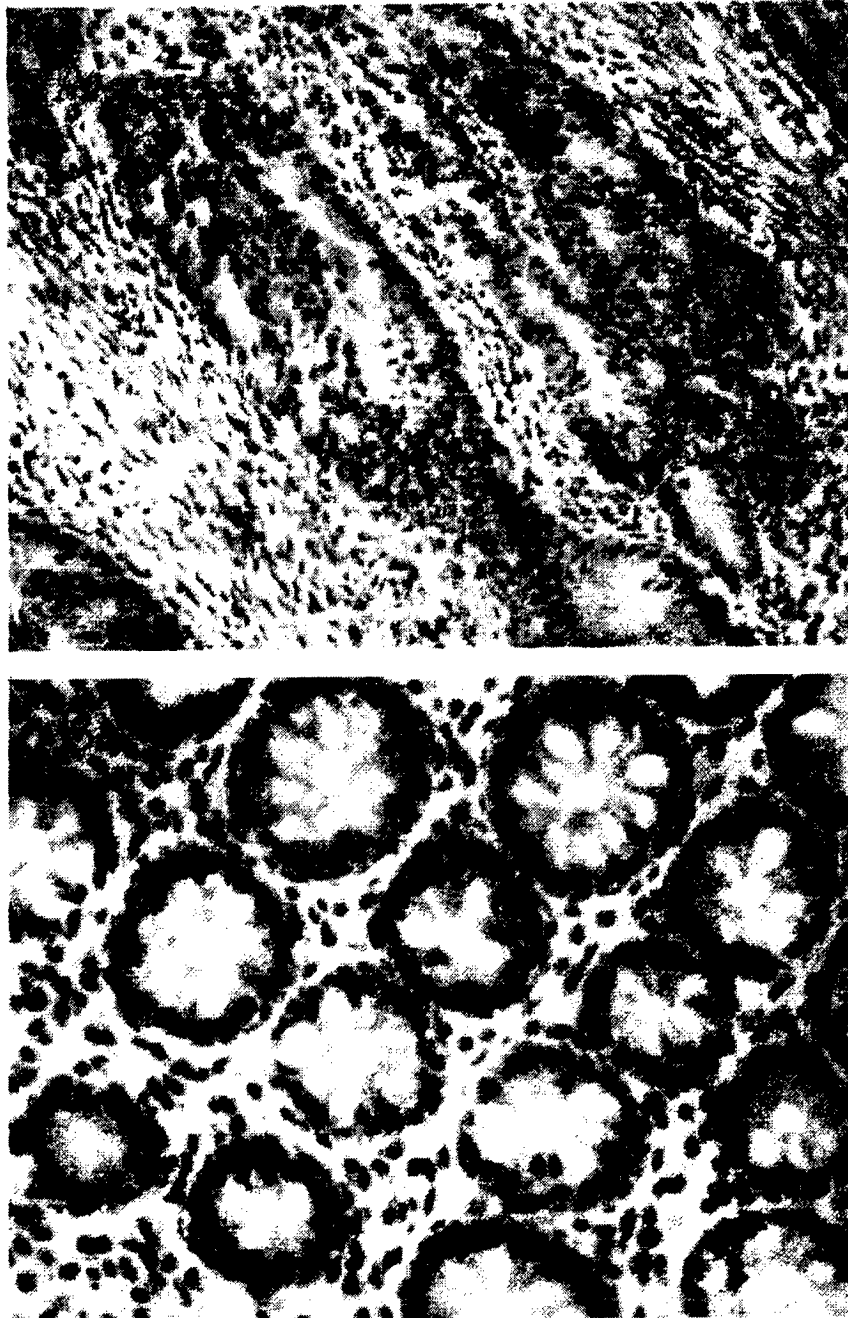
a) das in-Kontakt-bringen eines DNase-X Polypeptids oder einer dieses Polypeptid exprimierenden Zelle mit dem zu testenden Arzneimittel-Kandidat unter Bedingungen, die DNase-X-Aktivität, Zellproliferation oder Änderungen in der Zelldifferenzierung erlauben, und in Gegenwart von Komponenten, die fähig sind, ein detektierbares Signal als Antwort auf DNase-X-Aktivität, Zellproliferation oder Zelldifferenzierung abzugeben, und

b) die Detektierung der Anwesenheit oder Abwesenheit eines Signals oder der Zunahme eines Signals, das durch DNase-X-Aktivität, Zellproliferation oder Zelldifferenzierung hervorgerufen worden ist, wobei die Anwesenheit oder Zunahme des Signals ein putatives Arzneimittel anzeigt.

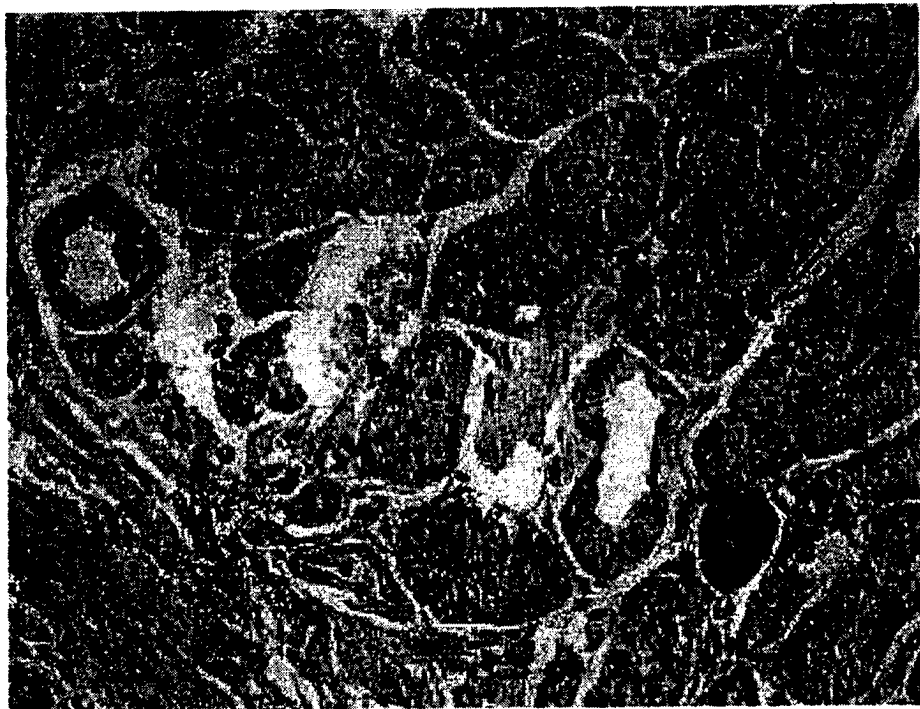
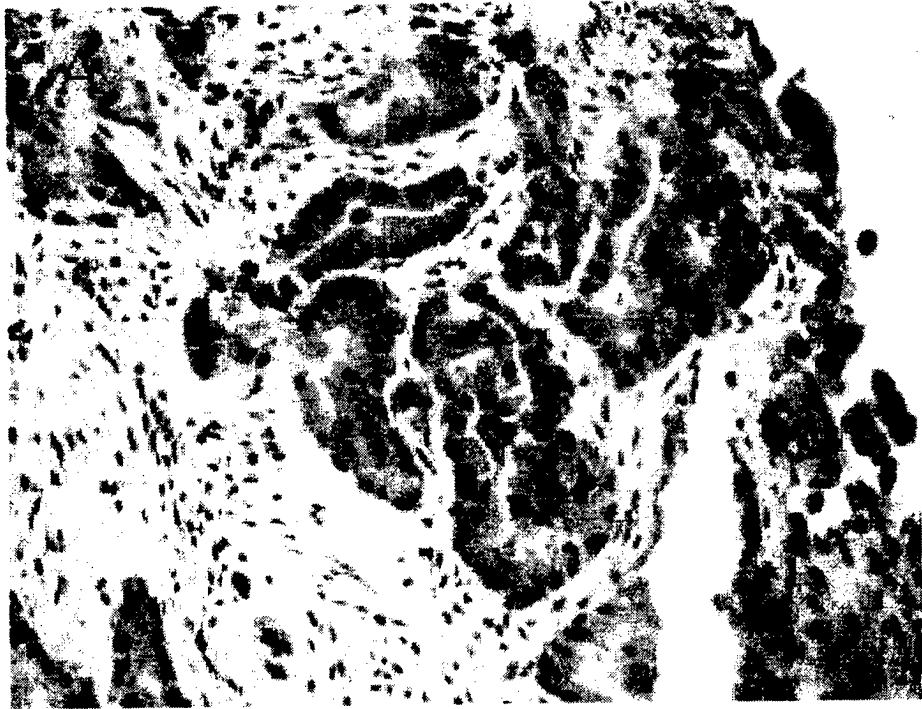
Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

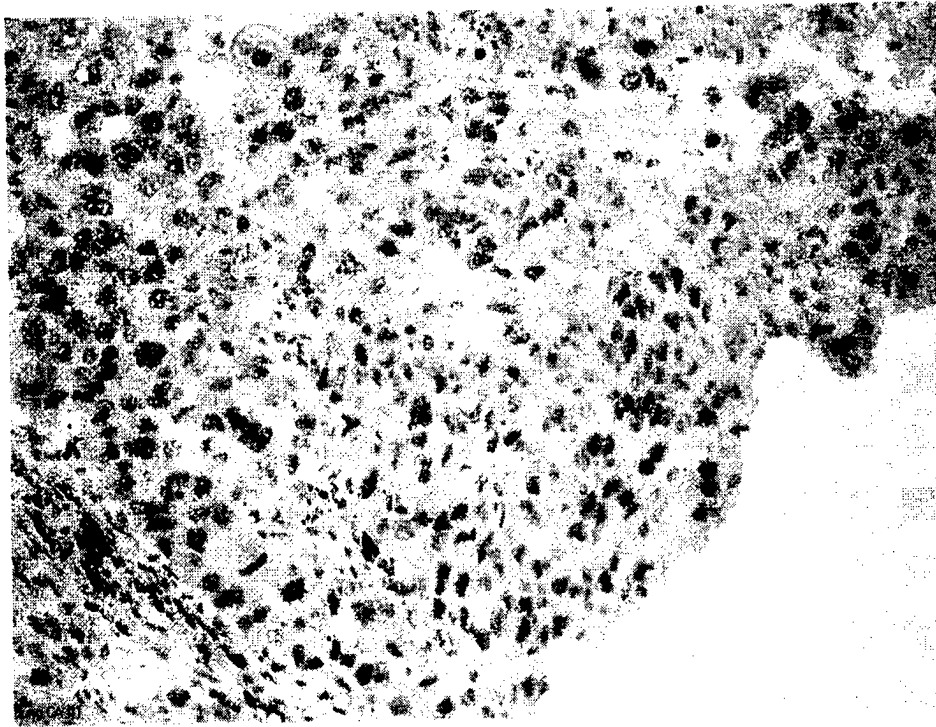
Figur 1:



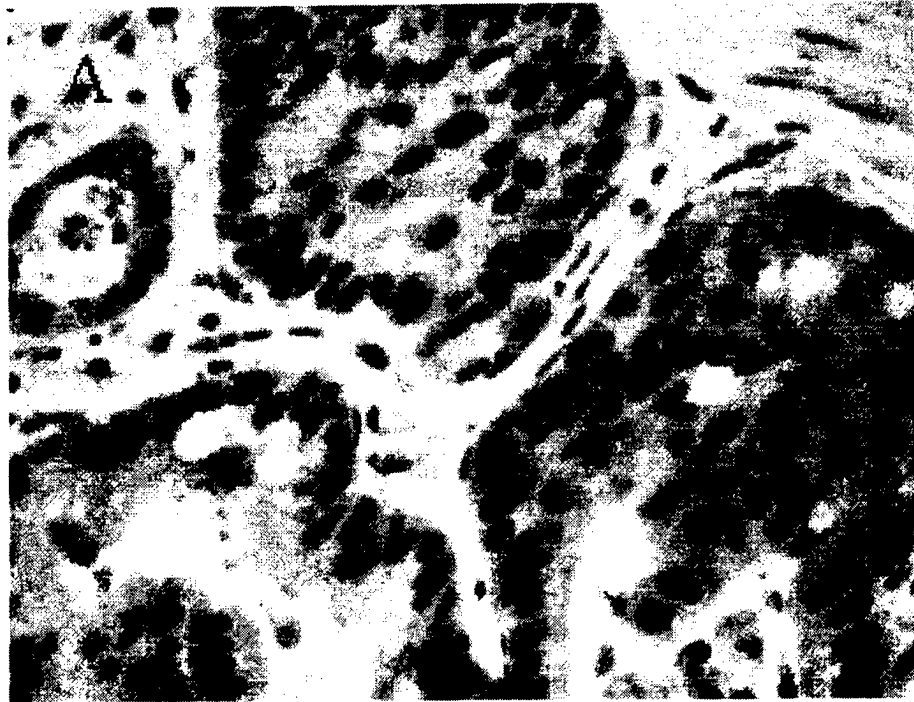
Figur 2:



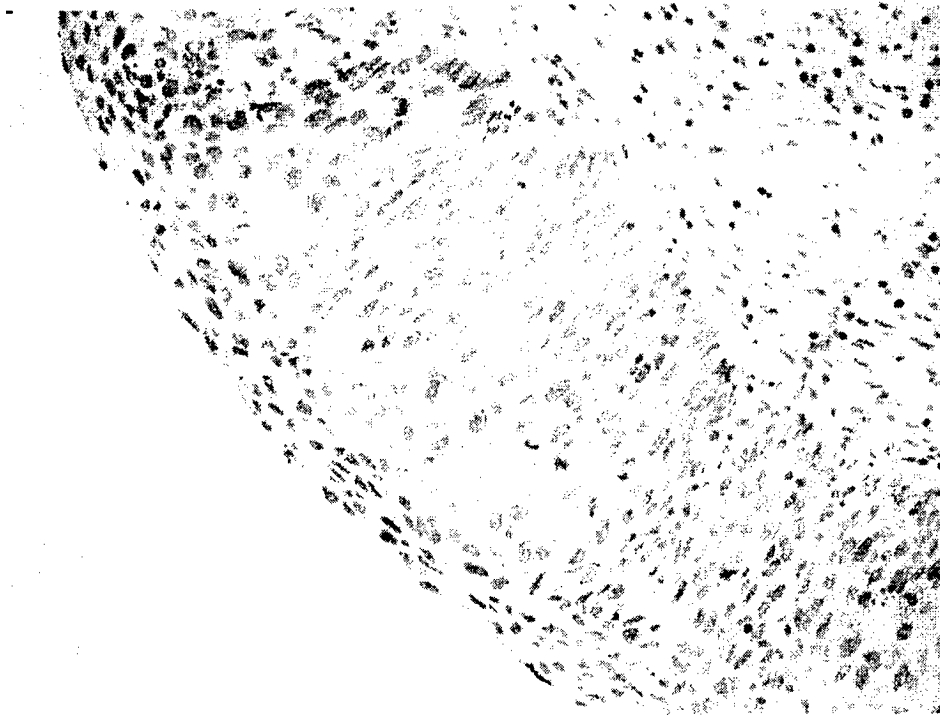
Figur 3:



Figur 4:



Figur 5:





Figur 6:

