



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 14 725 T2 2007.09.06**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 409 723 B1**

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

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 14 725.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US02/05221**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 704 432.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/070750**

(86) PCT-Anmeldetag: **22.02.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **12.09.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.04.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **13.09.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.09.2007**

(30) Unionspriorität:

796807	02.03.2001	US
842111	26.04.2001	US
879217	13.06.2001	US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Response Genetics, Inc., Los Angeles, Calif., US

(72) Erfinder:

**DANENBERG, D., Kathleen, Altadena, CA 91001,
US**

(74) Vertreter:

**Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183
Wiesbaden**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER EXPRESSION DES DIHYDROPYRIMIDINDEHYDROGENA-
SEGENS**

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

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

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft prognostische Verfahren, die in der Medizin, insbesondere in der Chemotherapie bei Krebs, von Nutzen sind. Die Erfindung betrifft auch die Beurteilung der Genexpression in Tumorzellen in einem Patienten. Insbesondere betrifft die Erfindung Oligonukleotide und Verfahren, umfassend deren Verwendung zum Detektieren der Niveaus der Expression von Dihydropyrimidin-Dehydrogenase-(DPD-) mRNA unter Verwendung von RT-PCR.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Krebs entsteht, wenn eine normale Zelle eine neoplastische Transformation durchläuft und zu einer malignen Zelle wird. Transformierte (maligne) Zellen entgehen normalen physiologischen Kontrollen, die den Zellphänotyp spezifizieren und die Zellproliferation beschränken. Transformierte Zellen im Körper eines Individuums vermehren sich in Abwesenheit dieser normalen Kontrollen und bilden so einen Tumor.

[0003] Wenn ein Tumor entdeckt wird, besteht das klinische Ziel darin, maligne Zellen selektiv zu zerstören und gleichzeitig jegliche Schädigung normaler Zellen in dem der Behandlung unterzogenen Individuum zu mindern. Die Chemotherapie basiert auf der Verwendung von Arzneimitteln, die für Krebszellen selektiv toxisch (zytotoxisch) sind. Es wurden verschiedene allgemeine Klassen von chemotherapeutischen Arzneimitteln entwickelt, einschließlich Arzneimitteln, die die Nukleinsäuresynthese, die Proteinsynthese und andere lebenswichtige Stoffwechselprozesse stören.

[0004] 5-Fluoruracil (5-FU) ist ein sehr weitverbreitet verwendetes Arzneimittel zur Behandlung vieler verschiedener Krebsarten, einschließlich bedeutender Krebsarten, wie denjenigen des Gastrointestinaltrakts und der Brust (Moertel, C.G. New Engl. J. Med., 330:1136-1142, 1994). Seit mehr als 40 Jahren bestand die standardmäßige Grundbehandlung bei Kolorektalkrebs in der Verwendung von 5-FU alleine, dieses wurde jedoch als "Pflegestandard" durch die Kombination aus 5-FU und CPT-11 ersetzt (Saltz et al., Irinotecan Study Group. New England Journal of Medicine. 343:905-14, 2000). In jüngerer Zeit führte die Kombination von 5-FU und Oxaliplatin zu hohen Reaktionsraten bei Kolorektalkrebs (Raymond et al., Semin. Oncol., 25:4-12, 1998). Daher ist es wahrscheinlich, daß 5-FU noch viele Jahre bei der Behandlung von Krebs verwendet wird, da es die zentrale Komponente derzeitiger chemotherapeutischer Kuren bleibt. Zusätzlich wird die Therapie mit 5-FU als einzigem Mittel weiterhin für Patienten eingesetzt, bei denen eine Kombinationstherapie mit CPT-11 oder Oxaliplatin wahrscheinlich übermäßig toxisch ist.

[0005] 5-FU ist dahingehend für die meisten Antikrebsmittel typisch, daß nur eine Minderheit der Patienten eine positive Reaktion auf die Therapie erfährt. Großangelegte randomisierte klinische Versuche haben gezeigt, daß die Gesamtreaktionsraten von Tumoren auf 5-FU als einzigem Mittel für Patienten mit metastatischem Kolorektalkrebs im Bereich von 15-20% liegen (Moertel, C.G. New Engl. J. Med., 330:1136-1142, 1994). In Kombination mit den anderen oben genannten Chemotherapeutika stiegen die Reaktionsraten von Tumoren auf Kuren, die auf 5-FU basieren, auf nahezu 40%. Dennoch zieht die Mehrheit der behandelten Patienten keinen konkreten Nutzen aus der Verabreichung einer auf 5-FU basierenden Chemotherapie und ist signifikanten Risiken, Unbequemlichkeiten und Kosten unterworfen. Da es kein zuverlässiges Mittel gab, um die Reaktion des Tumors eines Individuums vor der Behandlung vorherzusagen, sah die standardmäßige klinische Praxis so aus, daß alle Patienten einer auf 5-FU basierenden Behandlung unterzogen wurden, wobei man sich der Tatsache, daß die Mehrheit unter einem unbefriedigenden Ergebnis zu leiden haben würde, vollkommen bewußt war.

[0006] Der Wirkmechanismus und der Stoffwechselweg von 5-FU wurden im Laufe der Jahre intensiv untersucht, um die wichtigsten biochemischen Bestimmungsfaktoren für die Antitumoraktivität des Arzneimittels zu identifizieren. Das Endziel bestand darin, die klinische Wirksamkeit von 5-FU durch a) eine Modulation seines intrazellulären Metabolismus und seiner Biochemie und b) Messen der Bestimmungsfaktoren für die Reaktion von Tumoren in Patienten vor der Therapie zu verbessern, um vorherzusagen, bei welchen Patienten es am wahrscheinlichsten ist, daß sie auf das Arzneimittel reagieren (oder nicht reagieren). Aus diesen Studien ergaben sich zwei Hauptbestimmungsfaktoren: 1) die Identität des Zielenzym von 5-FU, Thymidylatsynthase (TS), und 2) die Identität des 5-FU abbauenden Enzyms, Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD).

[0007] Die ersten Untersuchungen auf dem Gebiet der Vorhersage der Reaktion von Tumoren auf eine auf 5-FU basierende Therapie konzentrierten sich auf das Zielenzym TS in Kolorektalkrebs. Leichman et al. (Leich-

man et al., J. Clin. Oncol. 15:3223-3229, 1997) führten einen potentiellen klinischen Versuch durch, um die Reaktion von Tumoren auf 5-FU mit der TS-Genexpression, bestimmt mittels RT-PCR in Kolorektalkrebs-Biopsien vor der Behandlung, zu korrelieren. Diese Studie zeigte folgendes: 1) einen großen 50-fachen Bereich von TS-Genexpressionsniveaus bei diesen Tumoren und 2) deutlich unterschiedliche Niveaus der TS-Genexpression zwischen reagierenden und nicht-reagierenden Tumoren. Der Bereich der TS-Niveaus der reagierenden Gruppen ($0,5-4,1 \times 10^{-3}$ relativ zu einer internen Kontrolle) war enger als derjenige der nicht-reagierenden Gruppen ($1,6-23,0 \times 10^{-3}$ relativ zu einer internen Kontrolle). Die Forscher bestimmten einen resultierenden "Nichtreaktions-Ausschluß"-Schwellenwert, oberhalb dessen keine Reaktionen mehr beobachtet wurden. Patienten mit einer TS-Expression oberhalb dieses "Nichtreaktions-Ausschluß"-Schwellenwerts konnten daher vor der Therapie positiv als nicht-reagierend identifiziert werden. Die "keine Reaktion"-Klassifizierung beinhaltete alle therapeutischen Reaktionen mit < 50% Schrumpfung des Tumors, fortschreitendem Wachstum, das zu einer > 25%-igen Tumorzunahme führte, sowie nicht-fortschreitende Tumore mit entweder < 50% Schrumpfung, ohne Veränderung oder mit < 25% Zunahme. Diese Tumore wiesen die höchsten TS-Niveaus auf. Ein hohes TS-Expressionsniveau identifizierte somit insbesondere resistente Tumore. TS-Expressionsniveaus oberhalb eines bestimmten Grenzwerts identifizierten einen Teilsatz von Tumoren, die nicht auf 5-FU reagieren, wohingegen TS-Expressionsniveaus unterhalb dieses Werts eine merklich höhere Reaktionsrate vorher sagten, jedoch reagierende Tumore nicht spezifisch identifizierten.

[0008] Anschließende Studien untersuchten die Nützlichkeit von DPD-Expressionsniveaus als Bestimmungsfaktor für die Reaktion von Tumoren auf eine Behandlung mit 5-FU zusammen mit den TS-Expressionsniveaus. DPD ist ein katabolisches Enzym, welches die 5,6-Doppelbindung von 5-FU reduziert und es als zytotoxisches Mittel inaktiviert. Die WO 96/08568 beschreibt die Klonierung und die Expression von cDNA für menschliche DPD. Frühere Studien zeigten, daß DPD-Niveaus in normalen Geweben die Bioverfügbarkeit von 5-FU beeinflussen und dadurch seine Pharmakokinetiken und seine Antitumoraktivität modulieren könnten (Harris et al., Cancer Res., 50:197-201, 1990). Zusätzlich wurden Beweise dafür vorgelegt, daß die DPD-Niveaus in Tumoren mit einer Empfindlichkeit gegenüber 5-FU assoziiert sind (Etienne et al., J. Clin. Oncol., 13:1663-1670, 1995, Beck et al., Eur. J. Cancer, 30:1517-1522, 1994). Salonga et al. (Clin. Cancer Res., 6:1322-1327, 2000) untersuchten die Genexpression von DPD als Bestimmungsfaktor für die Reaktion von Tumoren auf eine Behandlung mit 5-FU/Leucovorin in einem Satz von Tumoren, in denen die TS-Expression bereits bestimmt worden war. Wie bei TS war auch der Bereich der DPD-Expression bei den reagierenden Tumoren ($0,6-2,5 \times 10^{-3}$, 4,2-fach, relativ zu einer internen Kontrolle) im Vergleich zu demjenigen der nicht-reagierenden Tumore ($0,2-16 \times 10^{-3}$, 80-fach, relativ zu einer internen Kontrolle) relativ eng. Es gab keine reagierenden Tumore mit einer DPD-Expression, die größer war als ein Grenzniveau von etwa $2,5 \times 10^{-3}$. Weiterhin zeigten die Expressionsniveaus von DPD und TS keine Korrelation zueinander, was darauf hindeutet, daß es sich um unabhängig voneinander regulierte Gene handelt. Aus der Gruppe von Tumoren, bei denen die Expressionsniveaus sowohl von TS als auch von DPD unterhalb ihres jeweiligen "Nichtreaktions-Ausschluß"-Schwellenwerts lagen, reagierten 92% auf 5-FU/LV. So konnten reagierende Tumore auf Basis niedriger Expressionsniveaus von DPD und TS identifiziert werden.

[0009] DPD ist auch ein wichtiger Marker für die Toxizität von 5-FU. Es wurde beobachtet, daß Patienten mit sehr niedrigen DPD-Niveaus (wie es beispielsweise beim DPD-Mangelsyndrom, d.h. Thyminuracilurie, der Fall ist), die einer auf 5-FU basierenden Therapie unterzogen wurden, unter einer lebensbedrohlichen Toxizität litten (Lyss et al., Cancer Invest., 11:239-240, 1993). Tatsächlich wurde die Bedeutung der DPD-Niveaus bei der Therapie mit 5-FU durch das Auftreten von 19 Todesfällen in Japan aufgrund einer ungünstigen Arzneimittelwechselwirkung zwischen 5-FU und einer antiviralen Verbindung, Sorivudin, auf dramatische Weise veranschaulicht (Diasio et al., Br. J. Clin. Pharmacol., 46, 1-4, 1998). Anschließend wurde entdeckt, daß ein Metabolit von Sorivudin ein potenter Inhibitor für DPD ist. Diese Behandlung führte zu verringerten Niveaus von DPD, wie sie beim DPD-Mangelsyndrom auftreten, welche die Toxizität von 5-FU für die Patienten steigerten (Diasio et al., Br. J. Clin. Pharmacol. 46, 1-4, 1998).

[0010] Aufgrund a) der weitverbreiteten Verwendung von 5-FU-Protokollen bei der Behandlung von Krebs, b) der bedeutenden Rolle der Expression von DPD bei der Vorhersage der Reaktion von Tumoren auf 5-FU und c) der Empfindlichkeit von Individuen mit DPD-Mangelsyndrom gegenüber auf 5-FU basierenden Behandlungen ist klar, daß die genaue Bestimmung der DPD-Expressionsniveaus vor der Chemotherapie für Krebspatienten einen wichtigen Vorteil mit sich bringt.

[0011] Die Messung der DPD-Enzymaktivität erfordert eine bedeutende Menge an frischem Gewebe, welches aktives Enzym enthält. Leider sind die meisten Tumorbiopsien vor der Behandlung nur in Form fixierter, in Paraffin eingebetteter (FPE) Gewebe, insbesondere in Formalin fixierter, in Paraffin eingebetteter Gewebe, erhältlich, die kein aktives Enzym enthalten. Darüber hinaus enthalten Biopsien im allgemeinen nur eine sehr

geringe Menge an heterogenem Gewebe.

[0012] RT-PCR-Primer- und -Sondensequenzen stehen für die Analyse der DPD-Expression in eingefrorenem Gewebe oder frischem Gewebe zur Verfügung. Diese Primer sind jedoch für die Quantifizierung von DPD-mRNA aus fixiertem Gewebe mittels RT-PCR ungeeignet. Bislang lieferten existierende Primer keine oder fehlerhafte Ergebnisse. Es wird angenommen, daß dies auf a) die inhärent geringen Mengen von DPD-mRNA, b) die sehr geringe Menge an in Paraffin eingebettetem Gewebe und c) den Abbau von RNA in dem Paraffin zu kurzen Stücken von < 100 bp Länge zurückzuführen ist. Im Ergebnis unternahm andere Forscher einen gezielten, jedoch bislang erfolglosen Versuch, Sätze von Oligonukleotidprimern zu erhalten, die eine solche Quantifizierung der DPD-Expression in paraffiniertem Gewebe erlauben. Es besteht somit ein Bedarf nach einem Verfahren zum Quantifizieren von DPD-mRNA aus fixiertem Gewebe, um eine frühe Prognose für vorgeschlagene Krebstherapien bereitzustellen. Die WO 02/44423, die nach dem Anmeldedatum der vorliegenden Anmeldung veröffentlicht wurde, beschreibt spezifische Primer zur Bestimmung der DPD-Expression in einer Probe. Da gezeigt wurde, daß die DPD-Enzymaktivität und die korrespondierenden mRNA-Expressionsniveaus sehr gut korrelieren (Ishikawa et al., Clin. Cancer Res., 5:883-889, 1999, Johnson et al., Analyt. Biochem., 278:175-184, 2000), liefert die Messung der DPD-mRNA-Expression in FPE-Proben eine Möglichkeit zur Bestimmung des Status des DPD-Expressionsniveaus von Patienten, ohne die Enzymaktivität in frischen Geweben bestimmen zu müssen. Weiterhin sind FPE-Proben für eine Mikrosektion leicht zugänglich, so daß die DPD-Genexpression in Tumorgewebe, welches nicht durch Stromagewebe kontaminiert ist, bestimmt werden kann.

[0013] Dementsprechend ist es das Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Bestimmung der DPD-Mengen in Geweben bereitzustellen und die wahrscheinliche Resistenz des Tumors eines Patienten gegen eine Behandlung mittels einer Therapie auf Basis von 5-FU vorauszusagen, indem die Menge an DPD-mRNA in den Tumorzellen eines Patienten bestimmt wird und diese Menge mit einem vorbestimmten Grenzwert für das Expressionsniveau verglichen wird.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0014] In einem Aspekt der Erfindung werden Oligonukleotidprimer mit der Sequenz von DPD3b-651F (SEQ ID NO:7) und DPD3b-736R (SEQ ID NO:8) und dazu im wesentlichen identischen Sequenzen bereitgestellt. Die Erfindung liefert auch Oligonukleotidprimer mit einer Sequenz, die unter stringenten Bedingungen mit DPD3b-651F (SEQ ID NO:7), DPD3b-736R (SEQ ID NO:8) oder Komplementen davon hybridisiert.

[0015] Darüber hinaus betrifft diese Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung einer chemotherapeutischen Kur, welches umfaßt, daß man eine mRNA-Probe aus einer Tumorprobe erhält, das DPD-Genexpressionsniveau in der Probe bestimmt, die so bestimmten DPD-Genexpressionsniveaus mit einem vorbestimmten Grenzniveau für dieses Gen vergleicht und auf Basis der Ergebnisse des Vergleichs des vorbestimmten Genexpressionsniveaus mit dem vorbestimmten Grenzniveau eine chemotherapeutische Kur bestimmt.

[0016] Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zum Normalisieren der unkorrigierten Genexpression (UGE) von DPD relativ zu einem internen Kontrollgen in einer Gewebeprobe, die unter Verwendung der Taqman-Technik analysiert wurde, auf zuvor veröffentlichte DPD-Expressionsniveaus relativ zu einer internen Kontrolle.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0017] [Fig. 1](#) ist ein Diagramm, welches einen Vergleich von vier verschiedenen Oligonukleotidprimerpaaren hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Vervielfältigung von DPD-mRNA, die von 10 verschiedenen Formalin-FPE-Gewebeproben abgeleitet ist, zeigt. Die Proben #1-5 und #8-10 sind von Dickdarmtumorbiopsien abgeleitet, #6 ist von bronchoalveolären Tumorbiopsien abgeleitet, und #7 ist von Dünndarmtumorbiopsien abgeleitet. Die Oligonukleotidprimerpaare DPD1 (DPD-70F (SEQ ID NO:3) und DPD-201R (SEQ ID NO:4)), DPD2 (DPD2p-1129F (SEQ ID NO:5) und DPD2p-1208R (SEQ ID NO:6)) sind beim Messen der DPD-mRNA-Niveaus in diesen Proben nicht effektiv. Die Oligonukleotidprimerpaare DPD3A (DPD3a-51F (SEQ ID NO:1) und DPD3a-134R (SEQ ID NO:2)) und DPD3B (DPD3b-651F (SEQ ID NO:7) und DPD3b-736R (SEQ ID NO:8)) sind bei der Bestimmung der DPD-Niveaus in verschiedenen Proben effektiv.

[0018] [Fig. 2](#) ist ein Diagramm, welches einen Vergleich der Effizienz der DPD-mRNA-Vervielfältigung der Oligonukleotidprimerpaare DPD3A (DPD3a-51F (SEQ ID NO:1) und DPD3a-134R (SEQ ID NO:2)) und DPD1 (DPD-70F (SEQ ID NO:3) und DPD-201R (SEQ ID NO:4)) in eingefrorenen Gewebeproben zeigt. Das Dia-

gramm veranschaulicht, daß das Oligonukleotidprimerpaar DPD3A (DPD3a-51F (SEQ ID NO:1) und DPD3a-134R (SEQ ID NO:2)) nicht nur beim Messen der DPD-Expressionsniveaus in eingefrorenen Gewebeproben (sowie auch aus FPE abgeleiteten Proben) effektiv ist, sondern daß es auch effektiver ist als das Oligonukleotidprimerpaar DPD1 (DPD-70F (SEQ ID NO:3) und DPD-201R (SEQ ID NO:4)).

[0019] Fig. 3 ist ein Diagramm, welches zeigt, wie die DPD-Expression relativ zu einem internen Kontrollgen zu berechnen ist. Das Diagramm enthält Daten, die mit zwei Testproben (Unbekannte 1 und 2) erhalten wurden, und veranschaulicht, wie die unkorrigierten Genexpressionsdaten (UGE) UCG zu bestimmen sind. Das Diagramm veranschaulicht auch, wie durch das Taqman-Instrument erzeugte UGE mit zuvor veröffentlichten DPD-Werten zu normalisieren sind. Dies wird bewerkstelligt durch Vervielfältigen von UGE auf einen Korrekturfaktor K_{DPD} . Das interne Kontrollgen in der Figur ist β -Actin und die Kalibrator-RNA ist Universal-PE-RNA, Kat. #4307281, Charge #3617812014 von Applied Biosystems.

[0020] Fig. 4 zeigt Boxplots von relativen korrigierten DPD-Expressionsniveaus für Proben jedes histologischen Typs. Die Kästen zeigen die Bereiche der 25. und 75. Perzentile (Interquartile). Mittelwerte sind als horizontaler Balken innerhalb jedes Kastens gezeigt. Die Whisker zeigen Niveaus außerhalb der 25. und 75. Perzentile, schließen jedoch weit außerhalb liegende Werte, die oberhalb der Kästen gezeigt sind, aus.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0021] Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung offenbaren Oligonukleotidprimer und dazu im wesentlichen identische Oligonukleotidprimer, die eine akkurate Bestimmung der DPD-Expression in Geweben erlauben. Diese Oligonukleotidprimer, DPD3b-651F (SEQ ID NO:7) und DPD3b-736R (SEQ ID NO:8) (die hier auch als das Oligonukleotidprimerpaar DPD3B bezeichnet werden), sind insbesondere dann effektiv, wenn sie zur Messung der DPD-Genexpression in fixierten, in Paraffin eingebetteten (FPE) Tumormproben verwendet werden.

[0022] "Im wesentlichen identisch" bedeutet in dem hier verwendeten Kontext der Nukleinsäuren, daß die Oligonukleotide unter stringenten Bedingungen an ein Ziel hybridisieren und daß die Nukleinsäuresegmente oder deren komplementäre Stränge, wenn man sie vergleicht, mit den geeigneten Nukleotideinfügungen und -deletionen in wenigstens etwa 60% der Nukleotide, typischerweise in wenigstens etwa 70%, typischer in wenigstens etwa 80%, für gewöhnlich in wenigstens etwa 90% und üblicher in wenigstens etwa 95-98% der Nukleotide die gleichen sind, wenn sie richtig ausgerichtet werden. Eine selektive Hybridisierung liegt dann vor, wenn die Hybridisierung selektiver ist als ein völliges Fehlen von Spezifität. Siehe Kanehisa, Nucleic Acids Res., 12:203-213 (1984).

[0023] Diese Erfindung beinhaltet im wesentlichen identische Oligonukleotide, die unter stringenten Bedingungen (wie hier definiert) an die gesamte oder einen Teil der Oligonukleotidprimersequenz DPD3b-651F (SEQ ID NO:7), deren Komplement, DPD3b-736R (SEQ ID NO:8), oder deren Komplement hybridisieren.

[0024] Unter stringenten Hybridisierungsbedingungen hybridisieren nur hochgradig komplementäre, d.h. im wesentlichen identische Nukleinsäuresequenzen. Vorzugsweise verhindern solche Bedingungen die Hybridisierung von Nukleinsäuren mit 4 oder mehr Fehlpaarungen auf 20 zusammenhängende Nukleotide, bevorzugter 2 oder mehr Fehlpaarungen auf 20 zusammenhängende Nukleotide, am meisten bevorzugt eine oder mehrere Fehlpaarungen auf 20 zusammenhängende Nukleotide.

[0025] Der hybridisierende Teil der Nukleinsäuren ist typischerweise wenigstens 10 (z.B. 15) Nukleotide lang. Der hybridisierende Teil der hybridisierenden Nukleinsäure ist zu wenigstens etwa 80%, bevorzugt zu wenigstens etwa 95% oder am meisten bevorzugt zu wenigstens etwa 98% identisch zu der Sequenz eines Teils des oder des gesamten Oligonukleotidprimers DPD3b-651F (SEQ ID NO:7), dessen Komplement, DPD3b-736R (SEQ ID NO:8) oder dessen Komplement.

[0026] Die Hybridisierung des Oligonukleotidprimers an eine Nukleinsäureprobe unter stringenten Bedingungen wird unten definiert. Die Nukleinsäuredoppelstrang- oder Hybridstabilität wird ausgedrückt als eine Schmelztemperatur (T_m), welche die Temperatur ist, bei der die Sonde sich von der Ziel-DNA trennt. Diese Schmelztemperatur wird verwendet, um die erforderlichen Stringenzbedingungen zu definieren. Wenn Sequenzen identifiziert werden sollen, die im wesentlichen identisch statt identisch zu der Sonde sind, ist es nützlich, zuerst die niedrigste Temperatur zu bestimmen, bei der nur eine homologe Hybridisierung mit einer bestimmten Konzentration an Salz (z.B. SSC oder SSPE) stattfindet. Dann wird unter der Annahme, daß 1% an Fehlpaarungen zu einer Verringerung von T_m um 1°C führen, die Temperatur der abschließenden Waschstufe in der Hybridisierungsreaktion entsprechend reduziert (beispielsweise wird, wenn Sequenzen gesucht werden,

die zu > 95% mit der Sonde identisch sind, die Temperatur der abschließenden Waschstufe um 5°C reduziert). In der Praxis kann die Veränderung der T_m pro 1% an Fehlpaarungen zwischen 0,5°C und 1,5°C liegen.

[0027] Stringente Bedingungen umfassen die Hybridisierung bei 68°C in 5× SSC/5× Denhart'scher Lösung/1,0% SDS und Waschen in 0,2× SSC/0,1% SDS bei Raumtemperatur. Gemäßigte stringente Bedingungen umfassen Waschen in 3× SSC bei 42°C. Die Parameter der Salzkonzentration und der Temperatur können variiert werden, um eine optimale Identität zwischen dem Primer und der Ziel-Nukleinsäure zu erzielen. Zusätzliche Anleitungen hinsichtlich solcher Bedingungen sind auf dem Gebiet leicht verfügbar, beispielsweise in Sambrook, Fischer und Maniatis, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2. Aufl.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989), und F.M. Ausubel et al., Hrsg., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons (1994).

[0028] Dieser Aspekt der Erfindung umfaßt die Verwendung eines Verfahrens für die zuverlässige Extraktion von RNA aus einer FPE-Probe und als zweitens die Bestimmung des Gehalts an DPD-mRNA in der Probe unter Verwendung des Oligonukleotidprimer-Oligonukleotidprimer-Paars DPD3B (DPD3b-651F (SEQ ID NO:7) und DPD3b-736R (SEQ ID NO:8)) oder von dazu im wesentlichen identischen Oligonukleotiden, um eine reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion durchzuführen. RNA wird unter Verwendung irgendeines der Verfahren zur Isolierung von mRNA aus solchen Proben, wie sie in der US-Patentanmeldung Nr. 09/469,338, eingereicht am 20. Dezember 1999, mit der Veröffentlichungsnummer WO0146402 beschrieben werden, aus den FPE-Zellen extrahiert.

[0029] Die Oligonukleotidprimer der Erfindung ermöglichen die akkurate Bestimmung der DPD-Expression in einem fixierten, in Paraffin eingebetteten (FPE) Gewebe ([Fig. 1](#)). Zusätzlich sind die Oligonukleotidprimer der vorliegenden Erfindung geeignet für die Bestimmung der DPD-Expressionsniveaus in frischem oder eingefrorenem Gewebe, d.h. sie besitzen eine hohe Spezifität für ihre Ziel-RNA. Die Verfahren der Erfindung sind somit nicht auf die Verwendung von in Paraffin eingebettetem Gewebe beschränkt. Die hier offenbarten Oligonukleotidprimer können die akkurate Bestimmung der DPD-Genexpression in einem fixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebe sowie in eingefrorenem oder frischem Gewebe ermöglichen ([Fig. 2](#)). Dies ist darauf zurückzuführen, daß die von FPE-Proben abgeleitete mRNA in Bezug auf diejenige aus frischem oder eingefrorenem Gewebe fragmentierter und daher schwieriger zu quantifizieren ist. Die vorliegende Erfindung liefert somit Oligonukleotidprimer, die zur Verwendung beim Testen der DPD-Expressionsniveaus in FPE-Gewebe geeignet sind, wofür zuvor kein geeigneter Test existierte. Siehe [Fig. 1](#).

[0030] Die Expression von DPD-mRNA steht mit der klinischen Resistenz gegen eine Chemotherapie auf Basis von 5-FU im Zusammenhang. Insbesondere steht die Expression großer Mengen an DPD-mRNA mit einer Resistenz gegen Chemotherapien auf Basis von 5-FU im Zusammenhang.

[0031] Die Verfahren dieser Erfindung werden über einen breiten Bereich von Tumorarten hinweg angewandt. Dies ermöglicht die Herstellung individueller "Tumorexpressionsprofile", wobei die Expressionsniveaus von DPD in einzelnen Patientenproben bestimmt werden können und die Reaktion auf verschiedene Chemotherapeutika vorhergesagt werden kann. Am meisten bevorzugt werden die Verfahren der vorliegenden Erfindung auf bronchoalveoläre, Dünndarm- oder Dickdarmtumore angewandt. Für die Verwendung einiger Ausführungsformen der Erfindung auf bestimmte Tumorarten ist es bevorzugt, das Verhältnis der Messung zur klinischen Resistenz zu bestätigen, indem ein Datensatz zur Korrelation des bestimmten gemessenen Parameters der DPD-Expression und der klinischen Resistenz gegen eine Chemotherapie auf Basis von 5-FU zusammengestellt wird.

[0032] Die vorliegenden Verfahren können auf jede Art von Gewebe angewandt werden. Beispielsweise ist es für die Untersuchung der Resistenz von Tumorgewebe wünschenswert, das Tumorgewebe zu untersuchen. Bevorzugt ist es wünschenswert, auch einen Teil von normalem Gewebe aus dem Patienten, aus dem der Tumor erhalten wurde, zu untersuchen. Patienten, deren normale Gewebe gegen chemotherapeutische Verbindungen auf Basis von 5-FU resistent sind, von deren Tumoren jedoch erwartet wird, daß sie gegenüber solchen Verbindungen empfindlich sind, können dann mit größeren Mengen der chemotherapeutischen Zusammensetzung behandelt werden.

[0033] Die Verfahren der vorliegenden Erfindung umfassen die Stufe des Erhaltens einer Probe von Zellen aus dem Tumor eines Patienten. Feste oder lymphoide Tumore oder Teile davon werden chirurgisch aus dem Patienten entfernt. Wenn es nicht möglich ist, bald nach der Entnahme RNA aus der Gewebeprobe zu extrahieren, kann die Probe fixiert oder eingefroren werden. Sie wird dann verwendet, um RNA zu erhalten. RNA, die aus eingefrorenen oder frischen Proben von entferntem Gewebe extrahiert oder isoliert wurde, wird unter

Verwendung irgendeines auf dem Gebiet bekannten Verfahrens, siehe beispielsweise Sambrook, Fischer und Maniatis, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2. Aufl.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989), extrahiert. Vorzugsweise wird dafür gesorgt, daß ein Abbau der RNA während des Extraktionsprozesses vermieden wird.

[0034] Alternativ kann von dem Patienten erhaltenes Gewebe fixiert werden, vorzugsweise z.B. durch Behandlung mit Formalin (Formaldehyd) oder Glutaraldehyd. Biologische Proben, die durch Eintauchen in Alkohol fixiert wurden, werden in der vorliegenden Erfindung ebenfalls in Betracht gezogen. Fixierte biologische Proben werden oft dehydratisiert und in Paraffin oder andere feste Träger, wie sie Fachleuten auf dem Gebiet bekannt sind, eingebettet. Es ist vorgesehen, daß solche festen Träger mit organischen Lösungsmitteln entfernt werden können, was die anschließende Rehydratisierung von konserviertem Gewebe ermöglicht. Fixierte und in Paraffin eingebettete (FPE) Gewebeproben, wie sie hier beschrieben werden, beziehen sich auf lagerbare oder archivierte Gewebeproben.

[0035] RNA wird unter Verwendung irgendeines der Verfahren, wie sie in der US-Patentanmeldung Nr. 09/469,338, eingereicht am 20. Dezember 1999, beschrieben werden, aus den FPE-Zellen extrahiert. Am meisten bevorzugt wird RNA aus Tumorzellen aus einer in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeprobe extrahiert.

[0036] In einer Ausführungsform der Erfindung wird RNA aus einer archivierten pathologischen Probe oder Biopsie isoliert, die zunächst entparaffiniert wird. Ein beispielhaftes Verfahren zur Entparaffinierung umfaßt das Waschen der paraffinierten Probe mit einem organischen Lösungsmittel, wie Xylen. Entparaffinierte Proben können mit einer wäßrigen Lösung eines niederen Alkohols rehydratisiert werden. Geeignete niedere Alkohole umfassen beispielsweise Methanol, Ethanol, Propanole und Butanole. Entparaffinierte Proben können mittels nacheinander durchgeführter Waschstufen mit Lösungen mit niederm Alkohol von abnehmender Konzentration rehydratisiert werden. Alternativ wird die Probe gleichzeitig entparaffiniert und rehydratisiert.

[0037] Sobald die Probe rehydratisiert wurde, wird RNA aus dem rehydratisierten Gewebe extrahiert. Entparaffinierte Proben können unter Verwendung mechanischer, Ultraschall- oder anderer Mittel zur Homogenisierung homogenisiert werden. In einer Ausführungsform werden rehydratisierte Proben in einer Lösung, die ein chaotropes Mittel, wie Guanidiniumthiocyanat (auch verkauft als Guanidiniumisothiocyanat), enthält, homogenisiert.

[0038] Eine "wirksame Konzentration an chaotropem Mittel" wird so gewählt, daß RNA aus einer in Paraffin eingebetteten Probe in einer Menge gereinigt wird, die etwa dem 10-fachen der Menge entspricht, die in Abwesenheit eines chaotropen Mittels isoliert wird. Chaotrope Mittel umfassen die folgenden, ohne jedoch hierauf beschränkt zu sein: Guanidiniumverbindungen, Harnstoff, Formamid, Kaliumiodid, Kaliumthiocyanat und ähnliche Verbindungen. Das bevorzugte chaotrope Mittel für die Verfahren der Erfindung ist eine Guanidiniumverbindung, wie Guanidiniumisothiocyanat (auch verkauft als Guanidiniumthiocyanat) und Guanidiniumhydrochlorid. Viele anionische Gegenionen sind geeignet, und ein Fachmann auf dem Gebiet kann mit solchen geeigneten Anionen viele Guanidiniumsalze herstellen. Die wirksame Konzentration an Guanidiniumlösung, wie sie in der Erfindung verwendet wird, ist im allgemeinen eine Konzentration im Bereich von etwa 1 bis etwa 5 M, wobei ein Wert von etwa 4 M bevorzugt ist. Wenn die RNA bereits in Lösung ist, kann die Guanidiniumlösung eine höhere Konzentration haben, so daß die in der Probe erzielte Endkonzentration im Bereich von etwa 1 bis etwa 5 M liegt. Die Guanidiniumlösung ist unter Verwendung eines geeigneten biochemischen Puffers, wie Tris-Cl, vorzugsweise auch auf einen pH-Wert von etwa 3 bis etwa 6, bevorzugter etwa 4, gepuffert. Die chaotrope Lösung kann auch Reduktionsmittel, wie Dithiothreitol (DTT), (β -Mercaptoethanol, BME) und Kombinationen davon, enthalten. Die chaotrope Lösung kann auch RNase-Inhibitoren enthalten.

[0039] Homogenisierte Proben können in einer chaotropen Lösung, die eine wirksame Menge eines chaotropen Mittels, wie eine Guanidiniumverbindung, enthält, auf eine Temperatur im Bereich von etwa 50 bis etwa 100°C erhitzt werden. Ein bevorzugtes chaotropes Mittel ist Guanidiniumthiocyanat.

[0040] Dann wird RNA beispielsweise mittels Phenol-Chloroform-Extraktion, Ionenaustauschchromatographie oder Größenausschlußchromatographie aus der Lösung gewonnen. Die RNA kann dann unter Verwendung der Techniken der Extraktion, Elektroforese, Chromatographie, Präzipitation oder anderer geeigneter Techniken weiter gereinigt werden.

[0041] Die Quantifizierung von DPD-mRNA aus gereinigter Gesamt-RNA aus frischem, eingefrorenem oder fixiertem Gewebe erfolgt z.B. vorzugsweise unter Verwendung von reverse Transkriptase-Polymeraseketten-

reaktion- (RT-PCR-) Verfahren, wie sie auf dem Gebiet bekannt sind. Weitere Verfahren zur Quantifizierung von DPD-mRNA umfassen beispielsweise die Verwendung molekularer Signale und anderer markierter Sonden, die bei Multiplex-PCR von Nutzen sind. Zusätzlich sieht die vorliegende Erfindung die Quantifizierung von DPD-mRNA unter Verwendung eines Systems ohne PCR vor, welches beispielsweise fluoreszierend markierte Sonden ähnlich denjenigen des Invader®-Tests (Third Wave Technologies, Inc.) verwendet. Am meisten bevorzugt erfolgt die Quantifizierung von DPD-cDNA und eines internen Kontroll- oder Haushaltsgens (z.B. β -Actin) unter Verwendung eines fluoreszenzbasierten Echtzeit-Detektionsverfahrens (ABI PRISM 7700 oder 7900 Sequenzdetektionssystem [TaqMan®], Applied Biosystems, Foster City, CA) oder eines ähnlichen Systems, wie es von Heid et al. (Genome Res. 1996, 6:986-994) und Gibson et al. (Genome Res. 1996, 6:995-1001) beschrieben wird. Das Ergebnis des ABI 7700 (TaqMan®-Instrument) wird in Ct oder "Zyklusgrenzwerten" ausgedrückt. Mit dem TaqMan®-System erzeugt ein hochgradig exprimiertes Gen mit einer höheren Anzahl an Zielmolekülen in einer Probe ein Signal mit weniger PCR-Zyklen (niedrigerem Ct) als ein Gen mit einer geringeren relativen Expression mit weniger Zielmolekülen (höherem Ct).

[0042] Die vorliegende Erfindung beruht zum Teil auf der Erkenntnis, daß die relative Menge an DPD-mRNA mit einer Resistenz gegen das chemotherapeutische Mittel 5-FU im Zusammenhang steht. Hier wurde herausgefunden, daß Tumore, die große Mengen an DPD-mRNA exprimieren, wahrscheinlich gegen 5-FU resistent sind. Im Gegensatz dazu ist es wahrscheinlich, daß diejenigen Tumore, die geringe Mengen an DPD-mRNA exprimieren, gegenüber 5-FU empfindlich sind. Die Expression von DPD-mRNA eines Tumors in einem Patienten wird durch Vergleichen mit einem vorbestimmten Expressionsgrenzniveau für die Expression von DPD beurteilt.

[0043] Wie es hierin verwendet wird, umfaßt ein "Haushalts"-Gen oder eine "interne Kontrolle" jedes konstitutiv oder global exprimierte Gen, dessen Vorhandensein eine Bestimmung der DPD-mRNA-Niveaus ermöglicht. Eine solche Festlegung umfaßt die Bestimmung des konstitutiven Gesamtniveaus der Gentranskription und einer Kontrolle für Variationen bei der Gewinnung von RNA. "Haushalts"-Gene oder "interne Kontrollen", können das Cyclophilin, das β -Actin, das Transferrinrezeptorgen, das GAPDH-Gen und dergleichen beinhalten, sind jedoch nicht hierauf beschränkt. Am meisten bevorzugt ist das interne Kontrollgen das β -Actin, wie es von Eads et al., Cancer Research 1999, 59:2302-2306, beschrieben ist.

[0044] Eine Kontrolle für Variationen bei der RNA-Gewinnung erfordert die Verwendung von "Kalibrator-RNA". Die "Kalibrator-RNA" soll irgendeine verfügbare Quelle von genau vorquantifizierter Kontroll-RNA sein. Vorzugsweise wird Universal-PE-RNA, Kat. #4307281, Charge #3617812014, von Applied Biosystems verwendet.

[0045] "Unkorrigierte Genexpression (UGE)", wie sie hier verwendet wird, bezieht sich auf das numerische Ergebnis der DPD-Expression relativ zu einem internen Kontrollgen, das durch das TaqMan®-Instrument erzeugt wurde. Die Gleichung, die zur Bestimmung von UGE verwendet wird, ist in Beispiel 4 gezeigt und mit Musterberechnungen in [Fig. 3](#) veranschaulicht.

[0046] Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung liefert ein Verfahren zum Normalisieren von Werten der unkorrigierten Genexpression (UGE), die von dem TaqMan-Instrument erhalten wurden, mit zuvor veröffentlichten relativen Genexpressionswerten, die ohne die TaqMan®-Technologie erhalten wurden. Vorzugsweise werden die ohne TaqMan® erhaltenen relativen DPD : β -Actin-Expressionswerte, die zuvor von Salonga, et al., Clinical Cancer Research, 6:1322-1327, 2000, welches durch Bezugnahme vollständig hierin aufgenommen ist, veröffentlicht wurden, mit DPG-UGE aus einer Gewebeprobe normalisiert.

[0047] "Korrigierte relative DPG-Expression", wie sie hier verwendet wird, bezieht sich auf die normalisierte DPD-Expression, wobei UGE mit einem für DPD spezifischen Korrekturfaktor (K_{DPD}) multipliziert wird, was einen Wert liefert, der mit einem zuvor veröffentlichten Wertebereich verglichen werden kann. [Fig. 3](#) veranschaulicht diese Berechnungen ausführlich.

[0048] Die "zuvor veröffentlichten" Ergebnisse der relativen Genexpression basieren auf dem Verhältnis des RT-PCR-Signals eines Zielgens zu einem konstitutiv exprimierten Gen (β -Actin). In vor der TaqMan®-Technologie durchgeführten Untersuchungen ließ man PCR-Reaktionen eine festgelegte Anzahl von Zyklen (d.h. 30) durchlaufen und für jede Probe wurden Endpunktwerte aufgezeichnet. Diese Werte wurden dann als ein Verhältnis der DPD-Expression zur β -Actin-Expression berichtet. Siehe Salonga et al., Clinical Cancer Research, 6:1322-1327, 2000, welches durch Bezugnahme vollständig hierin aufgenommen ist.

[0049] Ein "vorbestimmtes Grenzwert"-Niveau der relativen DPD-Expression, wie es hier definiert ist, ist ein

Niveau der DPD-Expression, oberhalb dessen herausgefunden wurde, daß Tumore wahrscheinlich gegen 5-FU resistent sind. Expressionsniveaus unterhalb dieses Grenzwertniveaus sind wahrscheinlich in Tumoren zu finden, die gegenüber 5-FU empfindlich sind. Der Bereich der relativen DPD-Expression bei Tumoren, die auf eine chemotherapeutische Kur auf Basis von 5-FU reagieren, beträgt weniger als etwa $0,6 \times 10^{-3}$ bis etwa $2,5 \times 10^{-3}$ (etwa ein 4,2-facher Bereich). Tumore, die auf eine chemotherapeutische Kur auf Basis von 5-FU nicht reagieren, weisen eine relative DPD-Expression von etwa $0,2 \times 10^{-3}$ bis etwa 16×10^{-3} (etwa ein 80-facher Bereich) auf. Tumore reagieren im allgemeinen nicht auf eine Behandlung mit 5-FU, wenn eine relative DPD-Expression von mehr als etwa $2,0 \times 10^{-3}$, bevorzugt von mehr als etwa $2,5 \times 10^{-3}$, vorliegt. Diese Zahlenwerte ermöglichen die Bestimmung, ob die "korrigierte relative DPD-Expression" einer bestimmten Probe auf einen Wert oberhalb oder unterhalb des "vorbestimmten Grenzwert"-Niveaus fällt. Ein Grenzwertniveau der korrigierten relativen DPD-Expression beträgt etwa $2,0 \times 10^{-3}$ bis etwa $2,5 \times 10^{-3}$.

[0050] Die Verfahren der Erfindung sind auf einen breiten Bereich von Gewebe- und Tumorarten anwendbar und können so zur Festlegung der Behandlung in einem Patienten und als diagnostisches oder prognostisches Werkzeug in einer Reihe von Krebsarten, einschließlich Brust-, Kopf- und Hals-, Lungen-, Speiseröhren-, Kolorektalkrebs und anderen, verwendet werden. Vorzugsweise werden die vorliegenden Verfahren für die Prognose von bronchoalveolärem, Dünndarm- oder Dickdarmkrebs verwendet.

[0051] Aus der Messung der Menge an DPD-mRNA, die in dem Tumor exprimiert wird, kann der erfahrene Arzt eine Prognose betreffend die klinische Resistenz eines Tumors gegen eine Chemotherapie auf Basis von 5-FU ableiten. "Chemotherapie auf Basis von 5-FU" umfaßt die Verabreichung von 5-FU, dessen Derivaten, alleine oder mit anderen Chemotherapeutika, wie Leucovorin, oder mit einem DPD-Inhibitor, wie Uracil, 5-Ethynyluracil, Bromvinyluracil, Thymin, Benzyloxybenzyluracil (BBU) oder 5-Chlor-2,4-dihydroxypyridin. Weiterhin wurde herausgefunden, daß die gleichzeitige Verabreichung eines 5'-Desoxycytidinderivats der Formel (I) mit 5-FU oder einem Derivat davon die selektive Zuführung eines chemotherapeutischen Mittels an Tumorgewebe im Vergleich zu der Kombination aus 5-FU oder einem Derivat davon mit einem DPD-Inhibitor 5-Ethynyluracil deutlich verbessert und eine deutlich gesteigerte Antitumoraktivität in menschlichen Krebs-Heterotransplantat-Modellen zeigt.

[0052] Nachdem die Erfindung so beschrieben wurde, wird nun anhand der unten angegebenen experimentellen Beispiele die Ausführung der Erfindung veranschaulicht. Der erfahrene Arzt erkennt, daß die Materialien und Verfahren, die in den veranschaulichenden Beispielen verwendet werden, auf verschiedene Weisen modifiziert werden können. Solche Modifikationen werden so betrachtet, daß sie in den Schutzbereich der vorliegenden Erfindung fallen.

BEISPIELE

BEISPIEL 1

Isolierung von RNA aus FPE-Gewebe

[0053] RNA wird unter Verwendung des nachfolgenden allgemeinen Verfahrens aus in Paraffin eingebettetem Gewebe extrahiert.

A. Entparaffinierung und Hydratisierung von Abschnitten:

- (1) Ein Teil eines ungefähr 10 µm großen Abschnitts wird in ein 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen aus Kunststoff gegeben.
- (2) 600 µl Xylen werden zugegeben, und das Gemisch wird für etwa 10 Minuten bei Raumtemperatur (ungefähr 20 bis 25°C) kräftig geschüttelt.
- (3) Die Probe wird für etwa 7 Minuten bei Raumtemperatur auf der maximalen Geschwindigkeit der Tischzentrifuge (etwa $10-20.000 \times g$) zentrifugiert.
- (4) Die Stufen 2 und 3 werden wiederholt, bis der größte Teil des Paraffins gelöst wurde. Normalerweise sind zwei oder mehrere Wiederholungen erforderlich, je nach der Menge an Paraffin, die in dem ursprünglichen Probenteil enthalten ist.
- (5) Die Xylenlösung wird durch kräftiges Schütteln mit einem niederen Alkohol, vorzugsweise mit 100%-igem Ethanol (etwa 600 µl), für etwa 3 Minuten entfernt.
- (6) Das Röhrchen wird für etwa 7 Minuten wie in Stufe (3) zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und verworfen. Das Pellet wird weiß.
- (7) Die Stufen 5 und 6 werden nacheinander mit verdünnteren Ethanolösungen wiederholt: zunächst mit

etwa 95%-igem Ethanol, dann mit etwa 80%-igem Ethanol und schließlich mit etwa 70%-igem Ethanol.

(8) Die Probe wird wie in Stufe (3) für 7 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, und man läßt das Pellet bei Raumtemperatur für etwa 5 Minuten trocknen.

B. Isolierung von RNA mit Phenol-Chloroform

(1) 400 µl Guanidinisothiocyanatlösung einschließlich 0,5% Sarcosin und 8 µl Dithiothreitol werden zugegeben.

(2) Die Probe wird dann mit einem Gewebehomogenisator (Ultra-Turrax, IKA-Works, Inc., Wilmington, NC) für etwa 2 bis 3 Minuten homogenisiert, wobei die Geschwindigkeit allmählich von geringer Geschwindigkeit (Geschwindigkeit 1) auf hohe Geschwindigkeit (Geschwindigkeit 5) gesteigert wird.

(3) Die Probe wird dann für etwa 5-20 Minuten auf etwa 95°C erhitzt. Es ist bevorzugt, den Deckel des die Probe enthaltenden Röhrchens vor dem Erhitzen mit einer feinen Nadel zu durchstechen. Alternativ kann der Deckel mittels einer Kunststoffklammer oder mit Laborfilm befestigt werden.

(4) Die Probe wird dann mit 50 µl 2 M Natriumacetat mit einem pH-Wert von 4,0 und 600 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (10 : 1,93 : 0,036), frisch hergestellt durch Mischen von 18 ml Phenol mit 3,6 ml einer Isoamylalkohol:Chloroform-Lösung mit einem Verhältnis von 1:49, extrahiert. Die Lösung wird für etwa 10 Sekunden kräftig geschüttelt und dann für etwa 15 Minuten auf Eis gekühlt.

(5) Die Lösung wird für etwa 7 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die obere (wäßrige) Phase wird in ein neues Röhrchen überführt.

(6) Die RNA wird mit etwa 10 µl Glycogen und 400 µl Isopropanol für 30 Minuten bei -20°C präzipitiert.

(7) Die RNA wird mittels Zentrifugation für etwa 7 Minuten in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert; der Überstand wird dekantiert und verworfen, und das Pellet wird mit ungefähr 500 µl von etwa 70- bis etwa 75%-igem Ethanol gewaschen.

(8) Die Probe wird erneut für 7 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, und das Pellet wird luftgetrocknet. Das Pellet wird dann für weitere Experimente in einem geeigneten Puffer gelöst (z.B. 50 µl 5 mM Tris-Chlorid, pH 8,0).

BEISPIEL 2

Reverse Transkription und PCR von mRNA

[0054] Reverse Transkription: RNA wurde aus mikroseziiertem oder nicht-mikroseziiertem, in Formalin fixiertem, in Paraffin eingebettetem (FPE) Gewebe isoliert, wie es in Beispiel 1 veranschaulicht ist und wie es zuvor in der US-Patentanmeldung Nr. 09/469,338, eingereicht am 20. Dezember 1999, beschrieben wurde. Nach Präzipitation mit Ethanol und Zentrifugation wurde das RNA-Pellet in 50 µl 5 mM Tris/Cl bei einem pH-Wert von 8,0 gelöst. Die resultierende RNA wurde mit zufälligen Hexameren und M-MLV von Life Technologies (KAT#28025-02.) revers transkribiert. Die reverse Transkription wurde durch Mischen von 25 µl der RNA-Lösung mit 25,5 µl "Gemisch für die reverse Transkription" (siehe unten) durchgeführt. Die Reaktion wurde für 8 Min. bei 26°C (um die zufälligen Hexamere an RNA zu binden), 45 Min. bei 42°C (für die enzymatische Reaktion der reversen Transkription von M-MLV) und 5 Min. bei 95°C (für die Hitzeinaktivierung von DNase) in einen Thermozykler gegeben.

[0055] Das "Gemisch für die reverse Transkription" bestand aus 10 µl 5× Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 0,5 µl zufälligen Hexameren (50 OD, gelöst in 550 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5), 5 µl 10 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP und dTTP), 5 µl 0,1 M DTT, 1,25 µl BSA (3 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5), 1,25 µl RNA Guard 24.800 U/ml (RNAse-Inhibitor) (Porcin #27-0816, Amersham Pharmacia) und 2,5 µl MMLV 200 U/µl (Life Tech Kat #28025-02).

[0056] Die Endkonzentrationen der Reaktionskomponenten waren folgende: 50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1,0 mM dNTP, 1,0 mM DTT, 0,00375 mg/ml BSA, 0,62 U/µl RNA Guard und 10 U/µl MMLV.

[0057] PCR-Quantifizierung der mRNA-Expression: Die Quantifizierung von DPD-cDNA und eines internen Kontroll- oder Haushaltgens (d.h. β-Actin, wie es in Eads et al., Cancer Research 1999, 59:2302-2306 beschrieben ist) wurde unter Verwendung eines fluoreszenzbasierten Echtzeit-Detektionsverfahrens (ABI PRISM 7700 oder 7900 Sequenzdetektionssystem [TaqMan[®]], Applied Biosystems, Foster City, CA) durchgeführt, wie es von Heid et al. (Genome Res., 1996, 6:986-994) und Gibson et al. (Genome Res. 1996, 6:995-1001) beschrieben ist. Kurz gefaßt verwendet dieses Verfahren eine doppelt markierte fluorogene Oligonukleotidsonde (die TaqMan[®]-Sonde), die in dem Matrizen-Amplicon, welches die Vorwärts- und Rückwärtsprimer überspannt, spezifisch annealt. Eine Laserstimulation innerhalb der mit Deckeln versehenen Wells, die das Reaktionsge-

misch enthalten, führt zur Emission eines 3'-Löschfarbstoffs (TAMRA), bis die Sonde von der 5'-zu-3'-Nukleaseaktivität der DNA-Polymerase während der PCR-Verlängerung gespalten wird, was zur Freisetzung eines 5'-Reporterfarbstoffs (6FAM) führt. Die Erzeugung eines Amplicons bewirkt daher die Emission eines Fluoreszenzsignals, welches von der TaqMan[®]-CCD- (ladungsgekoppeltes Bauelement) Detektionskamera detektiert wird, und die Größe des in einem Grenzyklus während der ausschließlich exponentiellen Phase der PCR-Reaktion erzeugten Signals, welches die Startkopienzahl der interessierenden Sequenz widerspiegelt. Die TaqMan[®]-Sonde für das Oligonukleotidprimerpaar DPD1 (DPD-70F (SEQ ID NO:3) und DPD-201R (SEQ ID NO:4)) ist DPD-108Tc (SEQ ID NO:9). Die TaqMan[®]-Sonde für das Oligonukleotidprimerpaar DPD2 (DPD2p-1129F (SEQ ID NO:5) und DPD2p-1208R (SEQ ID NO:6)) ist DPD-2p-1154Tc (SEQ ID NO:10). Die TaqMan[®]-Sonde für das Oligonukleotidprimerpaar DPD3A (DPD3a-51F (SEQ ID NO:1) und DPD3a-134R (SEQ ID NO:2)) ist DPD3A-71Tc (SEQ ID NO:11). Die TaqMan[®]-Sonde für das Oligonukleotidprimerpaar DPD3B (DPD3b-651F (SEQ ID NO:7) und DPD3b-736R (SEQ ID NO:8)) ist DPD3b-685Tc (SEQ ID NO:12).

[0058] Die PCR-Reaktion enthielt Oligonukleotidprimer des Paares DPD1 (DPD-70F (SEQ ID NO:3) und DPD-201R (SEQ ID NO:4)), DPD2 (DPD2p-1129F (SEQ ID NO:5) und DPD2p-1208R (SEQ ID NO:6)), DPD3B (DPD3b-651F (SEQ ID NO:7), $T_m = 58^\circ\text{C}$, und DPD3b-736R (SEQ ID NO:8), $T_m = 60^\circ\text{C}$) oder des Oligonukleotidprimerpaares DPD3A (DPD3a-51F (SEQ ID NO:1), $T_m = 59^\circ\text{C}$, und DPD3a-134R (SEQ ID NO:2), $T_m = 59^\circ\text{C}$). Jedes PCR-Reaktionsgemisch bestand aus 0,5 μl der reversen Transkriptionsreaktion, enthaltend die cDNA sowie jeweils 600 nM beider Oligonukleotidprimer von nur einem Paar (DPD1, DPD2, DPD3B oder DPD3A), 200 nM korrespondierender Taq-Man[®]-Sonde (für entweder DPD1, DPD2, DPD3B oder DPD3A), 5 U AmpliTaq Gold Polymerase, jeweils 200 μM dATP, dCTP, dGTP, 400 μM dTTP, 5,5 mM MgCl_2 und 1 \times Taqman-Puffer A, enthaltend einen Referenzfarbstoff, auf ein Endvolumen von weniger als oder gleich 25 μl (alle Reagenzien: Applied Biosystems, Foster City, CA). Die Zyklusbedingungen waren 95°C für 10 Min., gefolgt von 45 Zyklen bei 95°C für 15 Sek. und 60°C für 1 Min.

BEISPIEL 3

PD-Expression in FPE-Tumorproben

[0059] Die Oligonukleotidprimerpaare DPD3A (DPD3a-51F (SEQ ID NO:1) und DPD3a-13R (SEQ ID NO:2)) und DPD3B (DPD3b-651F (SEQ ID NO:7) und DPD3b-736R (SEQ ID NO:8)) ermöglichten eine robuste, reproduzierbare Quantifizierung der DPD-Genexpression mittels RT-PCR unter Verwendung von RNA, die aus in Paraffin eingebettetem Gewebe extrahiert worden war. [Fig. 1](#). Das Oligonukleotidprimerpaar DPD3A (DPD3a-51F (SEQ ID NO:1) und DPD3a-13R (SEQ ID NO:2)) steigerte auch signifikant die Empfindlichkeit der Analyse der DPD-Genexpression mittels RT-PCR in frischem eingefrorenem Gewebe. [Fig. 2](#). RT-PCR wurde unter Verwendung des ABI Prism 7700-Sequenzdetektionssystems (Taqman[®]), wie es in Beispiel 2 oben beschrieben ist, durchgeführt.

[0060] Bei der PCR-Reaktion wurden dreißig Zyklen verwendet. Jeder Zyklus bestand aus Denaturieren bei 96°C für 1 Min., Annealen bei 55°C für 1 Min. und Verlängern bei 72°C für 2 Min. Das unter Verwendung des Oligonukleotidprimerpaares DPD3A (DPD3a-51F (SEQ ID NO:1) und DPD3a-13R (SEQ ID NO:2)) vervielfältigte Produkt war 84 Basenpaare lang. Das vervielfältigte Produkt entsprach der Region der DPD-cDNA, die einen Teil der 5'-untranslatierten Region (UTR) überspannte und in Exon 1 überging. Das unter Verwendung des Oligonukleotidprimerpaares DPD3B (DPD3b-651F (SEQ ID NO:7) und DPD3b-736R (SEQ ID NO:8)) vervielfältigte Produkt war 86 Basenpaare lang. Das vervielfältigte Produkt entsprach einer Region der DPD-cDNA, die Exon 6 entsprach.

[0061] Die Oligonukleotidprimerpaare DPD3A (DPD3a-51F (SEQ ID NO:1) und DPD3a-13R (SEQ ID NO:2)) und DPD3B (DPD3b-651F (SEQ ID NO:7) und DPD3b-736R (SEQ ID NO:8)) wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Vervielfältigung von DPD-mRNA, die aus 10 verschiedenen FPE-Gewebeproben abgeleitet war, mit anderen bestehenden Primersätzen verglichen. Die Proben #1-5 und #8-10 waren von Dickdarntumorbiopsien, #6 war von bronchoalveolären Tumorbiopsien und #7 war von Dünndarntumorbiopsien abgeleitet. Weitere verwendete Oligonukleotidprimerpaare waren DPD1 (DPD-70F (SEQ ID NO:3) und DPD-201R (SEQ ID NO:4)) und DPD2 (DPD2p-1129F (SEQ ID NO:5) und DPD2p-1208R (SEQ ID NO:6)).

[0062] Das Oligonukleotidprimerpaar DPD3A (DPD3a-51F (SEQ ID NO:1) und DPD3a-134R (SEQ ID NO:2)) war bei der genauen Bestimmung der DPD-Niveaus in verschiedenen Proben am wirkungsvollsten. Das Oligonukleotidprimerpaar DPD3B (DPD3b-651F (SEQ ID NO:7) und DPD3b-736R (SEQ ID NO:8)) war ebenfalls wirksam, lieferte jedoch kein so starkes Signal. Die Ergebnisse sind in [Fig. 1](#) veranschaulicht.

BEISPIEL 4

Bestimmung der unkorrigierten Genexpression (UGE) für DPD

[0063] Es werden zwei Paare paralleler Reaktionen durchgeführt: die "Test"-Reaktionen und die "Kalibrations"-Reaktionen. Die DPD-Vervielfältigungsreaktion und die β -Actin-Vervielfältigungsreaktion als interne Kontrolle sind die Testreaktionen. Separate β -Actin- und DPD-Vervielfältigungsreaktionen werden auf der Kalibrator-RNA durchgeführt und als die Kalibrationsreaktionen bezeichnet. Das Taqman-Instrument liefert vier verschiedene Zyklusgrenz- (Ct-) Werte: Ct_{DPD} und $Ct_{\beta-Actin}$ für die Testreaktionen und Ct_{DPD} und $Ct_{\beta-Actin}$ für die Kalibrationsreaktionen.

[0064] Die Unterschiede der Ct-Werte für die beiden Reaktionen werden entsprechend der nachfolgenden Gleichung bestimmt:

$$\Delta Ct_{Test} = Ct_{DPD} - Ct_{\beta-Actin} \text{ (aus der "Test"-Reaktion)}$$

$$\Delta Ct_{Kalibrator} = Ct_{DPD} - Ct_{\beta-Actin} \text{ (aus der "Kalibrations"-Reaktion)}$$

[0065] Die nächste Stufe umfaßt das Erhöhen der Zahl 2 auf den negativen ΔCt gemäß den nachstehenden Gleichungen.

$$2^{-\Delta Ct_{Test}} \text{ (aus der "Test"-Reaktion)}$$

$$2^{-\Delta Ct_{Kalibrator}} \text{ (aus der "Kalibrations"-Reaktion)}$$

[0066] Um dann eine unkorrigierte Genexpression für DPD aus dem Taqman-Instrument zu erhalten, wird die folgende Berechnung durchgeführt:

$$\text{Unkorrigierte Genexpression (UGE) für DPD} = 2^{-\Delta Ct_{Test}} / 2^{-\Delta Ct_{Kalibrator}}$$

Normalisieren von UGE mit zuvor veröffentlichten Werten

[0067] Die Berechnung der Normalisierung bringt eine Multiplikation von UGE mit einem Korrekturfaktor (K_{DPD}), der für DPD spezifisch ist, und einer bestimmten Kalibrator-RNA mit sich. Der Korrekturfaktor K_{DPD} kann unter Verwendung irgendeines internen Kontrollgens und irgendeiner genau vorquantifizierten Kalibrator-RNA bestimmt werden. Vorzugsweise werden das interne Kontrollgen β -Actin und die genau vorquantifizierte Kalibrator-RNA, Universal-PE-RNA, Kat. #4307281, Charge #3617812014 von Applied Biosystems, verwendet.

[0068] Die Normalisierung wird durch Modifikation des ΔCt -Verfahrens, wie es vom Hersteller von Taqman, Applied Biosystems, in Benutzerhandbuch #2 und oben beschrieben wurde, bewerkstelligt. Um dieses Verfahren auszuführen, wird für 6 verschiedene zuvor veröffentlichte Testgewebe UGE hinsichtlich DPD-Expression unter Verwendung des oben beschriebenen Taqman-Verfahrens analysiert. Das interne Kontrollgen β -Actin und die Kalibrator-RNA, Universal-PE-RNA, Kat. #4307281, Charge #3617812014 von Applied Biosystems wurden verwendet.

[0069] Das relative DPD-Expressionsniveau (PV) jeder Probe, wie zuvor beschrieben in Salonga et al., welches durch Bezugnahme vollständig hierin aufgenommen ist, L7, L91, L121, L150, L220 und L164, wurde in die entsprechende von Taqman erhaltene UGE aufgeteilt, wodurch ein nicht gemittelter Korrekturfaktor K erhalten wurde.

$$K_{ungemittelt} = PV/UGE$$

[0070] Als nächstes wurden alle K-Werte gemittelt, um einen einzigen K_{DPD} -Korrekturfaktor zu bestimmen, der für DPD, Universal-PE-RNA, Kat. #4307281, Charge #3617812014, Kalibrator-RNA und β -Actin spezifisch ist.

[0071] Um die korrigierte relative DPD-Expression in einer unbekanntenen Gewebeprobe in einem Maßstab zu bestimmen, der mit zuvor veröffentlichten, vor Taqman durchgeführten DPD-Expressionsstudien konsistent ist, multipliziert man daher nur die unkorrigierten Genexpressionsdaten (UGE), die von dem Taqman-Gerät erhalten wurden, mit dem spezifischen Korrekturfaktor K_{DPD} , wobei das gleiche interne Kontrollgen und die gleiche Kalibrator-RNA verwendet werden.

Korrigierte relative DPD-Expression = $UGE \times K_{DPD}$

[0072] Ein K_{DPD} kann unter Verwendung irgendeiner genau vorquantifizierten Kalibrator-RNA bestimmt werden. Zukünftige Quellen genau vorquantifizierter RNA können auf veröffentlichte Proben kalibriert werden, wie es in dem obigen Verfahren beschrieben ist, oder sie können nun gegen eine zuvor kalibrierte Kalibrator-RNA, wie Universal-PE-RNA, Kat. #4307281, Charge #3617812014, wie oben beschrieben, kalibriert werden.

BEISPIEL 5

DPD-Expression in FPE-Kolorektaltumorproben

[0073] Die oben beschriebenen Verfahren wurden verwendet, um 34 Tumorproben von 34 Patienten mit fortgeschrittenem Kolorektalkrebs zu analysieren. Alle Patienten wurden als Teil eines potentiell europaweiten, in mehreren Zentren durchgeführten 5-FU/CPT11-Behandlungsversuchs, V239, intravenös mit einer Kombinationskur aus 5-FU/LV behandelt. Alle Patienten wurden intravenös mit 425 mg/m^2 5-FU, verabreicht durch eine 15-minütige Infusion für 5 aufeinanderfolgende Tage sowie mit 20 mg/m^2 Leucovorin, welches ebenfalls per Infusion für 5 aufeinanderfolgende Tage verabreicht wurde, behandelt. Diese Kur wurde entweder als erste oder als zweite Palliativtherapie eingesetzt.

[0074] Neun (25,5%) der Patienten reagierten auf 5-FU/LV, wobei eine Reaktion als irgendeine Reaktion, einschließlich vollständiger Reaktionen, teilweiser Reaktionen und minimaler Reaktionen, definiert ist. Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung oder stabiler Erkrankung wurden als nicht-reagierend eingestuft (25 Patienten, 73,5%). Gesamt-mRNA wurde aus vor der Behandlung genommenen, mikroseziierten FPE-Tumorproben isoliert, und die relativen mRNA-Expressionsniveaus von DPD/ β -Actin wurden unter Verwendung von quantitativer PCR gemessen, wie es beschrieben wurde.

[0075] Die mittleren korrigierten DPD: β -Actin-Niveaus für die Gruppen reagierender und nicht-reagierender Patienten betragen $0,87 \times 10^{-3}$ bzw. $2,04 \times 10^{-3}$. Der Mann-Whitney-U-Test, welcher den Rang der Werte innerhalb zweier unabhängiger Probensätze vergleicht, wurde verwendet, um die korrigierten relativen DPD-Expressionsniveaus in den reagierenden und den nicht-reagierenden Patientengruppen zu vergleichen. Die relativen DPD-Niveaus waren in der Gruppe reagierender Patienten im Vergleich zu den nicht-reagierenden Patienten ($P = 0,02$) deutlich niedriger. Der Zusammenhang zwischen der DPD-mRNA-Expression und der Reaktion auf 5-FU/LV in diesen Patienten ist in [Fig. 4](#) gezeigt. Diese Daten zeigen, daß die DPD-Expression ein prognostischer Faktor für die Reaktion auf eine Chemotherapie auf Basis von 5-FU ist.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Danenberg, K.

<120> VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER EXPRESSION DES
DIHYDROPYRIMIDIN-DEHYDROGENASEGENS

<130> 11220/155

<140> 09/796,807

<141> 2001-03-02

<140> 09/842,111

<141> 2001-04-26

<140> 09/879,217

<141> 2001-06-13

<160> 12

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonukleotidprimer

<400> 1

aggacgcaag gagggttg

19

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonukleotidprimer

<400> 2

gtccgccgag tccttactga

20

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonukleotidprimer

<400> 3

tcactggcag actcgagact gt 22

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonukleotidprimer

<400> 4

tggccgaagt ggaacaca

18

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonukleotidprimer

<400> 5

ctgcctttga ctgtgcaaca tc

22

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonukleotidprimer

<400> 6

attaacaaag ccttttctga agacgat

27

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonukleotidprimer

<400> 7

gaagcctatt ctgcaaagat tgc

23

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>	
<223> Oligonukleotidprimer	
<400> 8	
gagtacccca atcgagccaa a	21
<210> 9	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Oligonukleotidprimer	
<400> 9	
ccgccgagtc cttactgagc acagg	25
<210> 10	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Oligonukleotidprimer	
<400> 10	
cacacggcga gctccacaac gtaga	25
<210> 11	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Oligonukleotidprimer	
<400> 11	
cagtgcctac agtctcgagt ctgccagt	29
<210> 12	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Oligonukleotidprimer	
<400> 12	
aaggaagcac aacttatact tgcaggccca g	31

Patentansprüche

1. Oligonukleotid mit der Sequenz von SEQ ID NO:7 oder Oligonukleotidprimer, der zu wenigstens 80%

dazu identisch ist.

2. Oligonukleotid mit der Sequenz von SEQ ID NO:8 oder Oligonukleotidprimer, der zu wenigstens 80% dazu identisch ist.

3. Kit zum Detektieren der Expression eines Dihydropyrimidin-Dehydrogenase- (DPD-) Gens in einem Gewebe, welcher ein Oligonukleotid-Paar mit den Sequenzen von SEQ ID NO:7 und 8 oder ein Oligonukleotidprimer-Paar, das zu wenigstens 80% dazu identisch ist, umfaßt.

4. Kit nach Anspruch 3, welcher weiterhin ein Oligonukleotid-Paar mit den Sequenzen von SEQ ID NO:1 und 2 oder ein Oligonukleotidprimer-Paar, das zu wenigstens 80% dazu identisch ist, umfaßt.

5. Verfahren zum Bestimmen der relativen Menge der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase-(DPD-) Genexpression in einer Gewebeprobe, welches folgendes umfaßt:

(a) Isolieren von mRNA aus einer Gewebeprobe,

(b) Vervielfältigen der mRNA unter Verwendung eines Oligonukleotidprimers mit der Sequenz von SEQ ID NO:7 oder eines Oligonukleotidprimers, der zu wenigstens 80% dazu identisch ist, und eines Oligonukleotids mit der Sequenz SEQ ID NO:8 oder eines Oligonukleotidprimers, der zu wenigstens 80% dazu identisch ist,

(c) Vergleichen der Menge an mRNA aus Stufe (b) mit einer Menge von mRNA aus einer internen Kontrolle.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Gewebeprobe aus einem Tumor erhalten wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Tumorprobe eingefroren ist.

8. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Tumorprobe nach dem Fixieren in Paraffin eingebettet wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die mRNA in Gegenwart einer wirksamen Menge eines chaotropen Mittels isoliert wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei eine Tumorprobe Nicht-Tumorgewebe und Tumorgewebe umfaßt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 10 zum Bestimmen einer chemotherapeutischen Kur auf Basis von 5-Fluoruracil, welches weiterhin folgendes umfaßt:

(d) Bestimmen der Menge von Dihydropyrimidin-Dehydrogenase- (DPD-) mRNA in der vervielfältigten Probe,

(e) Vergleichen der Menge von Dihydropyrimidin-Dehydrogenase- (DPD-) mRNA in der vervielfältigten Probe mit einem vorbestimmten Grenzwert für die DPD-Expression,

(f) Bestimmen einer chemotherapeutischen Kur auf Basis von 5-Fluoruracil für den Patienten, basierend auf dem Unterschied in der Menge an DPD-mRNA in der vervielfältigten Probe und dem Grenzwert für die DPD-Genexpression.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei der vorbestimmte Grenzwert für die DPD-Genexpression etwa das 2,0- bis etwa das 2,5-fache der Menge der Genexpression der internen Kontrolle beträgt.

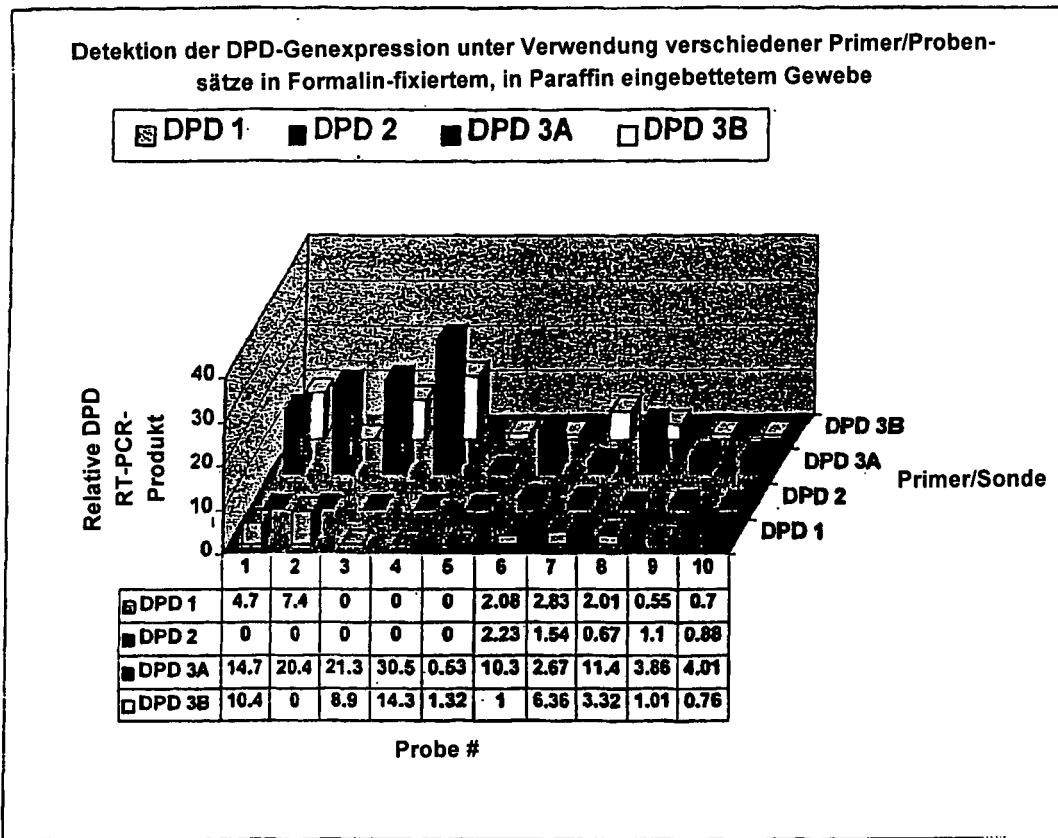
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 oder 12, wobei das Gen der internen Kontrolle β -Actin ist.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 oder 11, wobei die Gewebeprobe bronchoalveoläres Tumorgewebe, Tumorgewebe aus dem Dünndarm und Tumorgewebe aus dem Dickdarm enthält.

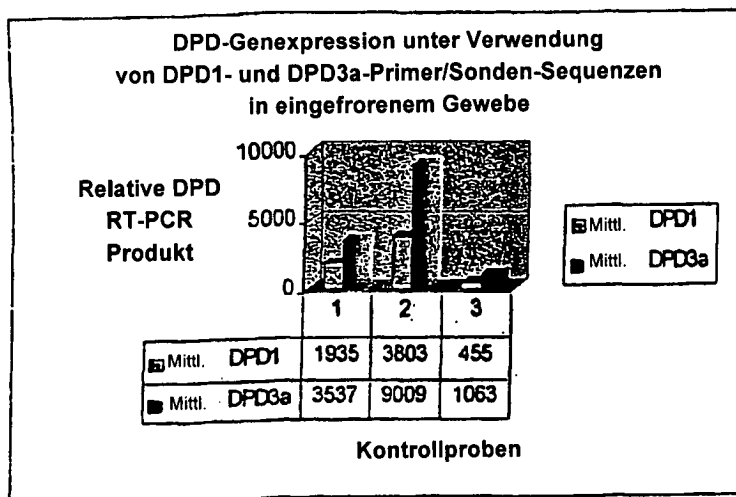
Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1. Vergleich von 4 DPD-Primer/Sondensätzen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Vervielfältigung von DPD-mRNA.



Figur 2. Vergleich der Vervielfältigungseffizienz von Primer/Sonde DPD3A und DPD1 bei der Vervielfältigung von DPD-mRNA aus eingefrorenem Gewebe.



Figur 3. Diagramm, welches zeigt, wie die DPD-Expression relativ zu einem internen Kontrollgen zu berechnen ist.

Experimentid	Aus "Test"-Reaktion			Aus "Kalibrations"-Reaktion			Umformung Gen-Expression (UGE)	Veröffentl. DPD Werte	Ablesung von K _{exp} (Mittelwert K)	Korrig. rel. DPD-Expression
	C _t _{exp}	C _t	ΔC _t	C _t _{exp}	C _t	ΔC _t				
Experimentid	Unbek. 1	25.05	19.84	5.21	-	-	4.47	-	1.08 x 10 ³	4.83 x 10 ⁴
	Unbek. 2	28.18	18.76	9.42	-	-	0.241	-	1.08 x 10 ³	0.2508 x 10 ⁵
	Kalib. RNA	-	-	-	28.82	19.55	7.37	0.0065(0.008±1)	-	-
Aus veröffentlichten Daten	L7	31.04	24.56	6.48	-	-	2.45	2.7 x 10 ³	1.10 x 10 ³	-
	L91	27.85	20.5	7.45	-	-	1.28	1.2 x 10 ³	1.09 x 10 ³	-
	L121	28.88	18.2	7.68	-	-	1.07	1.1 x 10 ³	1.02 x 10 ³	-
	L150	33.32	22.88	10.44	-	-	0.158	0.17 x 10 ³	1.08 x 10 ³	-
	L220	28.88	22.01	4.85	-	-	7.12	7.3 x 10 ³	1.03 x 10 ³	-
	L184	28.44	21.4	4.04	-	-	13.38	16 x 10 ³	1.2 x 10 ³	-
Kalib. RNA	-	-	-	27.88	20.088	7.782	0.0055(0.005 ± 1)	-	-	-

Figur 4. Boxplots der relativen DPD ($\times 10^{-3}$) Expressionsniveaus für Proben jeder histologischen Art

