(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. Februar 2009 (05.02.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/015799 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2008/005965

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. Juli 2008 (21.07.2008)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2007 036 404.2 27. Juli 2007 (27.07.2007) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN** [DE/DE]; Universitätsklinikum, Geissweg 3, 72076 Tübingen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **BONIN, Michael** [DE/DE]; Hoelderlinstr. 4, 72145 Hirrlingen (DE). **HOFFMANN, Jessica** [DE/DE]; Quenstedtstr. 36, 72076 Tübingen (DE). **WALTER, Michael** [DE/DE]; Herrlinger Str. 12, 89134 Blaustein (DE). **RIESS, Olaf** [DE/DE]; Paul-Löffler Weg 8, 72070 Tübingen (DE). **NEUBAUER, Hans** [DE/DE]; Gechtstrasse 31, 72074 Tübingen (DE). **FEHM, Tanja** [DE/DE]; Quenntstr. 34, 72076 Tübingen (DE). **SOLOMAYER, Erich** [DE/DE]; Gruener Weg 53, 72766 Reutlingen (DE). **WALLWIENER, Diethelm** [DE/DE]; Im Rotbad 13/2, 72076 Tübingen (DE). **SOTLAR, Karl** [DE/DE]; Charlottenstr. 7, 72070 Tübingen (DE).

(74) Anwälte: **FINDEISEN, Marco** usw.; Witte, Weller & Partner, Postfach 105462, 70047 Stuttgart (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

(54) **Title:** DETECTION OF PLATINUM RESISTANCE

(54) **Bezeichnung:** NACHWEIS DER PLATINRESISTENZ

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for classifying a patient as platinum-sensitive or platinum-resistant, the use of the expression profile of a subgroup of genes for classifying a patient as platinum-sensitive or platinum-resistant, and a method for identifying informative genes in order to be able to classify a patient as platinum-sensitive or platinum-resistant.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Klassifizierung eines Patienten als platinsensitiv oder platinresistent, die Verwendung des Expressionsprofils einer Untergruppe von Genen zur Klassifizierung eines Patienten als platinsensitiv oder platinresistent sowie ein Verfahren zur Identifizierung von informativen Genen, um einen Patienten als platinsensitiv oder platinresistent klassifizieren zu können.

WO 2009/015799 A2

Nachweis der Platinresistenz

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Klassifizierung eines Patienten als platinsensitiv oder platinresistent, die Verwendung des Expressionsprofils einer Untergruppe von Genen zur Klassifizierung eines Patienten als platinsensitiv oder platinresistent sowie ein Verfahren zur Identifizierung von informativen Genen, um einen Patienten als platinsensitiv oder platinresistent klassifizieren zu können.

Die zielgerichtete medikamentöse Behandlung von Tumorerkrankungen stellt trotz intensiver Forschungsaktivitäten nach wie vor eine der größten Herausforderungen an die moderne Arzneimittelforschung dar. So stellen die wichtigste Gruppe der therapeutisch genutzten antitumoralen Substanzen nach wie vor die so genannten

BESTÄTIGUNGSKOPIE

Cytostatika dar, die auf unterschiedliche Art und Weise toxisch auf körpereigene Zellen wirken und so Zellwachstum und -teilung hemmen. Wichtige Cytostatika basieren auf dem Inhaltsstoff Platin, wie bspw. das Cisplatin®, Eloxatin® (Oxaliplatin) oder Carboplat® (Carboplatin).

Die Hauptanwendungsgebiete für platinbasierende Cytostatika sind das Ovarialkarzinom, das Hoden-, Bronchial-, Harnblasen- und Cervixkarzinom und Plattenepitelkarzinome im Kopf-/Halsbereich. Platinbasierende Cytostatika werden in der Regel als Infusion verabreicht und häufig in Kombination mit anderen Chemotherapeutika eingesetzt.

Das Ovarialkarzinom bzw. Eierstockkrebs zählt zu den häufigsten Malignomerkrankungen der Frau. Die Inzidenz beträgt derzeit 23 pro Einhunderttausend. Im Jahr 2000 wurde in Deutschland bei etwa 9.671 Frauen erstmals ein Ovarialkarzinom festgestellt; Quelle: Robert-Koch-Institut Berlin. In den USA wurden im Jahre 2006 ca. 20.000 Neuerkrankungen, das heißt ca. 3 % aller Tumorerkrankungen bei Frauen, und ca. 15.300 Todesfälle erwartet; Quelle: American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2006, Atlanta, GA: American Cancer Society 2006.

Ca. 65 % der Ovarialkarzinome werden erst in den fortgeschrittenen Stadien erkannt, was zu einer schlechten Prognose führt.

Die operative Standardbehandlung des Ovarialkarzinoms besteht in der Hysterektomie mit Adnexektomie sowie Omentektomie und pelvine sowie paraaortale Lymphonodektomie.

Mit wenigen Ausnahmen erhalten alle Patientinnen eine platinhaltige Chemotherapie, z.B. mit Carboplatin und einem weiteren nicht platinbasierendem Chemotherapeutikum, wie z.B. Paclitaxel (Taxol®).

Trotz dieser Behandlung kommt es bei 20 bis 30 % der Patientinnen aufgrund einer Platinresistenz zu keinerlei klinischer Remission und der Großteil der behandelten Frauen erleidet einen Rückfall.

Bis dato gibt es keine histopathologischen Parameter, die eine Platinresistenz anzeigen. Der einzige Test, mit dem eine solche Platinresistenz vorhergesagt werden kann, ist der ATP-Chemosensitivitätsassay. Für die Durchführung dieses Tests ist aber eine Mindestanzahl von Tumorzellen nötig, die bei kleinen Tumoren oft nicht gewonnen werden kann. Der ATP-Chemosensitivitätsassay ist sehr aufwändig in der Durchführung und in die Routinediagnostik nur schwer zu integrieren. Ferner ist dieser Assay wenig spezifisch, die Spezifität liegt bei ca. 40 %.

Vor diesem Hintergrund ist die Bereitstellung eines Verfahrens, mit dem eine Platinresistenz nachgewiesen werden kann, von großem Interesse. So führt nämlich die Verabreichung von platinhaltigen Chemotherapeutika zu einer Vielzahl von Nebenwirkungen, die den Körper belasten. Zu erwähnen sind hier eine dosislimitierende Nierenschädigung, die sich etwas 2 Wochen nach Therapiebeginn zeigt. Häufig kommt es zu Hörschädigungen in Bezug auf höhere Frequenzen, besonders bei Kindern. Ferner werden bei wiederholter Verabreichung periphere Neuropathien mit Parästhesien, Krämpfen und dem Verlust von motorischen Funktionen beobachtet. Vereinzelt wird auch das Auftreten von anaphylaktoiden Reaktionen festgestellt.

Bei einer zuverlässigen Vorhersage einer Platinresistenz könnten diese Belastungen des Organismus vermieden werden und frühzeitig bspw. platinfreie Chemotherapeutika verabreicht werden.

De Smet *et al.* (2006), Predicting the clinical behavior of ovarian cancer from gene expression profiles, Int. J. Gynecol. Cancer 16 (Suppl. 1), Seiten 147-151, beschreiben, dass platinresistente und platinsensitive Patientinnen, die an einem Ovarialkarzinom leiden, ein unterschiedliches Genexpressionsmuster aufweisen. Konkret wurden von den Autoren 500 verschiedene Gene identifiziert, die in platinresistenten

Frauen anders exprimiert werden als in platinsensitiven Frauen. Die Autoren etablierten zwei Referenzgruppen, nämlich eine solche, die die Genexpression in platinresistenten Frauen repräsentiert, und eine Referenzgruppe, die die Genexpression in platinsensitiven Frauen repräsentiert. Es wird die Möglichkeit in Erwägung gezogen, Patientinnen aufgrund von Ähnlichkeiten zu der einen oder der anderen Referenzgruppe vor Beginn einer Chemotherapie als platinresistent bzw. platinsensitiv zu klassifizieren. Nachteilig bei dem von De Smet *et al.* vorgeschlagenen Ansatz ist, dass die Vorhersagesicherheit einer Platinresistenz sehr niedrig ist. Die Autoren sind nämlich bei der Zusammenstellung der Referenzgruppen ungenau vorgegangen. So wurden bspw. bei der Evaluierung der Referenzgruppen zwei Tumorproben herangezogen, die aus Patientinnen gewonnen wurden, welche anstelle einer Kombination aus einem platinhaltigen Cytostatikum und Paclitaxel mit dem Alkylanz Cyclophosphamid und einem platinhaltigen Cytostatikum behandelt wurden. Die Gruppe der Tumorproben, die zur Evaluierung der Referenzgruppe der platinresistenten Frauen verwendet wurden, enthielten zwei Proben, die noch während der Chemotherapie entnommen wurden. Dadurch war jedoch nicht genau absehbar, ob diese beiden Patientinnen nicht doch noch zumindest teilweise sensitiv gegenüber einer platinhaltigen Chemotherapie waren. Hinzu kommt, dass die Autoren lediglich 500 differenziell exprimierte Gene bereitstellen, wobei diese nach eigenen Angaben falsch positive Gene enthalten können und falsch negative Gene in dieser Liste fehlen. Die Liste stellt somit kein echtes "Predictor-Set" dar, d.h. eine kleinere Anzahl von Genen, die eine zuverlässige Vorhersage ermöglicht. Diese Nachteile führen zu einer Klassifizierungsgenauigkeit von lediglich 76,92 %.

Helleman *et al.*, (2006), Molecular profiling of platinum resistant ovarian cancer, Int. J. Cancer 118, Seiten 193-1971, beschreiben ein Verfahren zur Klassifizierung von Patientinnen, die an einem Ovarialkarzinom leiden, in eine platinresistente und eine platinsensitive Gruppe. Diese Klassifizierung soll anhand der unterschiedlichen Expression eines "predictor sets" bestehend aus neun identifizierten Genen erfolgen. Die Autoren haben unterschiedliche Referenzgruppen etabliert, wobei eine Patientin aufgrund ihres Expressionsprofiles der neun identifizierten Gene in die eine oder andere dieser Referenzgruppen klassifiziert und damit als platinsensitiv oder platinre-

sistent eingestuft wird. Die Autoren haben jedoch die Referenzgruppen ungenau und entgegen anerkannter Leitlinien, bspw. der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V., zusammengestellt. Bei der Etablierung der Referenzgruppen wurde die Antwort der Tumoren auf eine platinhaltige Chemotherapie anhand einer Methode klassifiziert, die die so genannte klinische Antwort bestimmt. Je nach Größe der Tumorherde nach der Therapie, bestimmt durch bildgebende Verfahren wie Ultraschall, werden die Antwortraten in vollständige Sensitivität ("complete response"), teilweise Sensitivität ("partial response"), stabile Krankheit ("stable disease") und Fortschreiten der Krankheit ("progression") eingeteilt. In der Referenzgruppe der platinresistenten Frauen ("non-responder") fassen die Autoren schließlich 13 Patientinnen mit Krankheitsfortschritt ("progression") und eine Patientin, die drei Monate nach der operativen Entfernung einen Rückfall erlitt, zusammen. Die restlichen Patientinnen sind platinsensitiv ("responder"; n=82), obwohl sie unterschiedlich auf die Platintherapie ansprechen. Die Autoren schreiben selbst, dass unter den Tumoren, die aus Patientinnen mit einer teilweisen Sensitivität ("partial response") gewonnen wurden, eine resistente Subpopulation vorhanden sein könnte. Bei Patientinnen ohne Krankheitsfortschritt ("no progression") werden unterschiedliche Zeitintervalle gemessen. Mit anderen Worten, die Etablierung der Referenzgruppen wurde von den Autoren nicht stringent vorgenommen und allgemein anerkannte Leitlinien zur Klassifizierung von Platinresistenz und Platinsensitivität wurden nicht beachtet. Die Sensitivität des aus Helleman *et al.* bekannten Verfahrens beträgt deshalb lediglich 89 % und die Spezifität beträgt lediglich 59 %.

Vor diesem Hintergrund ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Klassifizierung eines Patienten als platinsensitiv oder platinresistent bereitzustellen, das die Nachteile aus dem Stand der Technik weitgehend vermeidet. Insbesondere soll ein solches Klassifizierungsverfahren bereitgestellt werden, das eine hohe Genauigkeit aufweist.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, das folgende Schritte aufweist:

1. Bereitstellung einer biologischen Probe eines Patienten,
2. Ermittlung des Genexpressionsprofils einer Untergruppe von Genen aus der biologischen Probe,
3. Vergleich des in Schritt (2) ermittelten Genexpressionsprofils
   a) mit einem ersten Referenzgenexpressionsprofil der Untergruppe von Genen, wobei das erste Referenzgenexpressionsprofil aus platinsensitiven Patienten gewonnen wurde, und
   b) mit einem zweiten Referenzgenexpressionsprofil der Untergruppe von Genen, wobei das zweite Referenzgenexpressionsprofil aus platinsresistenten Patienten gewonnen wurde,
4. Klassifizierung des Patienten
   a) als platinsensitiv, wenn das Genexpressionsprofil des Patienten größere Ähnlichkeiten mit dem ersten Referenzgenexpressionsprofil aufweist, oder
   b) als platinresistent, wenn das Genexpressionsprofil des Patienten größere Ähnlichkeiten mit dem zweiten Referenzgenexpressionsprofil aufweist,

wobei die Untergruppe von Genen aus zumindest einem Gen besteht, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: PPADPC1A (NM_001030059.1), EGFR (NM_005228.3), NKD2 (NM_033120.2), GPM6B (NM_001001994.1), AMMECR1 (NM_001025580.1), LTB4R (NM_181657.1), BX112399; TUSC1 (NM_001004125.1), MUC15 (NM_145650.2), HMFN0839 (NM_032717.3), SCAP1 (NM_003726.2), XM_498568, CARD4 (NM_006092.1), FTCD (NM_206965.1), XM_371586, LOC400464 (NM_001013670.1), COMP (NM_000095.2), LOC440686 (NM_001025303.1), COL5A1 (NM_000093.2), HIST1H2BD (NM_138720.1), F2R (NM_001992.2), KIAA1875 (NM_032529.1), HLA-DMB (NM_002118.3), FOXP1 (AK025793), APOC1 (NM_001645.3), WBSCR27 (NM_152559.2), CATSPER1 (NM_053054.2), JOSD2 (NM_138334.1), BCAR3 (BX106566), BGN (NM_001711.3), HOXB7 (NM_004502.2), FXYD3 (NM_005971.2), NIPA1 (NM_144599.3), GSR (NM_000637.2), CST1 (NM_001898.2), LAT2 (NM_022040.2), HLA-DQB1

(NM_002123.2), LSAMP (NM_002338.2), LOC652670 (XM_942247.1), LOC642412 (XM_925931.1), NEK8 (NM_178170.2), CD40 (NM_001250.3), SAMD11 (NM_152486.2), MSC (NM_005098.2), CR607098, PLCXD1 (NM_018390.1), RASL11A (NM_206827.1), COL3A1 (NM_000090.2), FLJ13391 (NM_032181.1), COL1A1 (NM_000088.2), ZNF539 (NM_203282.1), REM1 (NM_014012.4), EDG3 (NM_005226.2), CSPG2 (NM_004385.2), TYRP1 (NM_000550.1).

"Platinsensitiv" bedeutet erfindungsgemäß in Übereinstimmung mit den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V., dass ein Tumorpatient bzw. eine Tumorpatientin derart mit einer platinhaltigen Substanz, bspw. einem Cytostatikum wie Cisplatin oder Carboplatin, therapierbar ist, dass es innerhalb von sechs Monaten nach Abschluss der Therapie zu keinem Rückfall (Rezidiv) kommt. "Platinresistent" hingegen bedeutet erfindungsgemäß, dass eine Patientin mit einer platinhaltigen Substanz nicht entsprechend therapierbar ist und es innerhalb von sechs Monaten nach Abschluss der Chemotherapie zu einem Rezidiv kommt.

Eine biologische Probe eines Patienten enthält erfindungsgemäß repräsentatives genetisches Material des zu klassifizierenden Patienten biologisches Gewebe, bspw. in Form von DNA und/oder RNA, das die Ermittlung eines Genexpressionsprofils erlaubt. Eine biologische Probe umfasst deshalb eine biologische Zelle, ein Gewebe oder Gewebeteil, ein Organ oder Organteil, wobei die Probe in flüssiger oder fester Form, auch in kryokonservierter Form, bereitgestellt werden kann. Typisches biologisches Material entstammt einem Tumor, wie einem Ovarialkarzinom, das mittels eines chirurgischen Eingriffs in die zu klassifizierende Patientin gewonnen werden kann.

Unter Genexpressionsprofil wird erfindungsgemäß die Gesamtheit der Transkriptionsaktivität einer Vielzahl von Genen eines Individuums, bspw. des zu klassifizierenden Patienten, verstanden. Genexpressionsprofile lassen sich mittels dem Fachmann bekannter Techniken ermitteln, bspw. unter Zuhilfenahme von DNA-Mikroarrays, die mit einer repräsentativen Anzahl unterschiedlicher cDNA-Moleküle bestückt sind, an die das genetisches Material des Individuums, bspw. mit einem

Marker versehene mRNA-Moleküle bzw. daraus generierte cDNA-Moleküle, hybridisieren können. Die Hybridisierungsaktivität zeigt an, welche Gene in dem Individuum exprimiert werden. Ferner ist eine Aussage über die Stärke der Expression möglich. Die Zusammenstellung der Hybridisierungsaktivitäten sämtlicher untersuchter Moleküle bzw. Transkripte ermöglicht die Erstellung eines Genexpressionsprofil des Patienten.

"Ähnlichkeit" mit einem Referenzgenexpressionsprofil bedeutet erfindungsgemäß, dass die Transkriptionsaktivität eines oder mehrerer Gene aus der angegebenen Untergruppe stärker der Transkriptionsaktivität des entsprechenden Gens oder der entsprechenden Gene aus der einen Referenzgruppe entspricht als der Transkriptionsaktivität des entsprechenden Gens oder der entsprechenden Gene aus der anderen Referenzgruppe. Diese erfindungsgemäße Ähnlichkeit lässt sich mittels Stand der Technik bekannter mathematischer Verfahren bestimmen. Dies erfolgt bspw. über so genannte "support vector machines" (SVM). Eine SVM passt in einen mathematischen Raum eine mehrdimensionale Hyperebene ein, die als Trennebene zwischen zwei verschiedenen Gruppen oder Klassen dient. Das für einen Patienten ermittelte Genexpressionsprofil kann dabei durch einen mathematischen Vektor repräsentiert werden, der in dem mathematischen Raum eine bestimmte Position einnimmt. Je nach der Lage des Vektors in dem mehrdimensionalen Raum bezogen auf die Hyperebene der SVM, das heißt, je nach dem, ob der einem Patienten zuzurechnende Vektor auf der einen oder anderen Seite der Hyperebene liegt, ist das Genexpressionsprofil des Patienten entweder ähnlich zu dem Referenzgenexpressionsprofil aus den platinsensitiven Patienten (1. Klasse) oder zu dem Referenzgenexpressionsprofil aus den platinresistenten Patienten (2. Klasse). Eine Übersicht über die Verwendung von SVM findet sich bspw. in Burges C.J.C. (1998), A tutorial on support vector machines for pattern recognition, Data Mining and Knowledge Discovery 2 (2): Seiten 121-167, und in Perez-Diez *et al.* (2005), Microarrays for cancer Diagnosis and Classification, Microarray Technology and Cancer Gene Profiling, Seiten 1-12. Der Inhalt der vorstehend genannten Publikationen ist durch Inbezugnahme Bestandteil der vorliegenden Beschreibung.

Die Gene, die Bestandteil der Untergruppe sind, werden erfindungsgemäß durch das internationale Gensymbol des HUGO Gene Nomenclatur Committee (HGNC), sofern bekannt, und der Zugriffsnummer ("accession number") der GenBank identifiziert. Der Zugriff auf die GenBank ist bspw. über den Internetauftritt des "National Center for Biotechnology Information (NCBI)" unter http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ möglich.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird hiermit vollkommen gelöst. Die Erfinder haben jeweils zwölf platinsensitive und platinresistente Ovarialkarzinomproben analysiert und konnten dabei 102 verschiedene Gene bzw. Transkripte ermitteln, die in platinsensitiven Patienten ein anderes Expressionsprofil zeigen als in platinresistenten Patientinnen. Aus diesen Genen wiederum konnten die Erfinder 55 verschiedene Gene ermitteln, die sich für eine Klassifizierung eines zu untersuchenden Patienten, bspw. einer Patientin, die an einem Ovarialkarzinom erkrankt ist, als platinsensitiv oder platinresistent besonders eignen. Diese Gruppe von Genen wird auch als "gene predictor set" bezeichnet. Die Erfinder haben das erfindungsgemäße Verfahren an 18 verschiedenen kryokonservierten Tumorproben aus Patientinnen überprüft, für die im Vorfeld bereits über klassische klinischen Parameter eine Klassifizierung in platinsensitiv und platinresistent vorgenommen wurde, so dass bereits bekannt war, ob eine Platinresistenz oder eine Platinsensitivität vorliegt. Dabei ergab sich eine 100 % richtige Vorhersage der Platinresistenz der Proben. Das erfindungsgemäße Verfahren ist deshalb besonders zuverlässig.

Vor diesem Hintergrund ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Verwendung des Genexpressionsprofils einer Untergruppe von Genen zur Klassifizierung eines Patienten als platinsensitiv oder platinresistent, wobei die Untergruppe von Genen aus zumindest einem Gen besteht, das aus der oben beschriebenen Gruppe von Genen ausgewählt ist.

Dabei ist es bei dem erfindungsgemäßen Klassifizierungsverfahren und der erfindungsgemäßen Verwendung bevorzugt, wenn die Untergruppe von Genen aus zumindest 5, vorzugsweise aus zumindest 10, weiter bevorzugt aus zumindest 20,

mehr bevorzugt aus zumindest 30, mehr bevorzugt aus zumindest 40, mehr bevorzugt aus zumindest 50 und höchst bevorzugt aus allen 55 Genen besteht, die aus der vorstehend identifizierten Gruppe ausgewählt sind.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, dass die Genauigkeit der Klassifizierung eines Patienten in platinsensitiv oder platinresistent nochmals erhöht wird. So wird bereits eine höchst zuverlässige Klassifizierung ermöglicht, wenn das Genexpressionsprofil von zumindest 5 Genen analysiert und mit den Referenzexpressionsprofilen verglichen wird, wobei jedoch die Zuverlässigkeit weiter erhöht wird, je mehr Gene aus der Untergruppe untersucht werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Klassifizierungsverfahren ist es bevorzugt, wenn das erste Referenzgenexpressionsprofil aus solchen Patienten gewonnen wurde, die sechs Monate nach Abschluss einer platinbasierenden Chemotherapie kein Rezidiv erleiden (platinsensitive Patienten), bzw. wenn das zweite Referenzexpressionsprofil aus solchen Patienten gewonnen wurde, die innerhalb von sechs Monaten nach Abschluss einer platinbasierenden Chemotherapie ein Rezidiv erleiden (platinresistente Patienten).

Diese Maßnahme hat den Vorteil, dass Referenzgenexpressionsprofile etabliert werden, die sich an allgemein anerkannten Leitlinien orientieren, wie diese bspw. von der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. zur Beurteilung, ob eine Patientin platinsensitiv oder platinresistent ist, herausgegeben werden. Durch diese Maßnahme wird zusätzlich sichergestellt, dass eine korrekte Klassifizierung des zu untersuchenden Patienten erfolgt.

Dabei ist es bei dem erfindungsgemäßen Klassifizierungsverfahren bevorzugt, wenn die Anzahl der platinsensitiven Patienten im Wesentlichen der Anzahl der platinresistenten Patienten entspricht.

Durch diese Maßnahme wird sichergestellt, dass aussagekräftige und vor allem vergleichbare Referenzgenexpressionsprofile etabliert werden können. Die Klassifizierung des zu untersuchenden Patienten wird in ihrer Genauigkeit damit nochmals erhöht. Im Gegensatz hierzu ist bspw. das von Helleman *et al.* (a.a.O.) verwendete Referenzexpressionsprofil nicht ausgewogen und die damit verbundene Klassifizierungsmethode ungenau. Die dortigen Autoren haben 19 platinsensitive Patientinnen untersucht, jedoch lediglich 5 platinresistente Patientinnen.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es bevorzugt, wenn die biologische Probe Tumorgewebe, vorzugsweise aus einem Ovarialkarzinom stammend, aufweist.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, dass das erfindungsgemäße Klassifizierungsverfahren die Voraussetzungen für eine zielgerichtete Therapie eines Krebspatienten, vorzugsweise einer an einem Ovarialkarzinom erkrankten Patientin ermöglicht. Bei frühzeitiger Ermittlung einer Platinresistenz kann somit die Verabreichung von toxischem Platin und die damit verbundene Belastung der Patientin vermieden und eine Entscheidung für einer alternative Therapie getroffen werden.

Dabei ist es bei dem erfindungsgemäßen Klassifizierungsverfahren bevorzugt, wenn die biologische Probe zumindest 50 % Tumorgewebe aufweist.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, dass eine besonders gute und zuverlässige Klassifizierung des zu untersuchenden Patienten sichergestellt wird. So wird gerade im Tumorgewebe eine Genexpressionsaktivität festgestellt, die eine Unterscheidung von platinsensitiven Patienten und platinresistenten Patienten ermöglicht.

Dabei ist es bei dem erfindungsgemäßen Klassifizierungsverfahren bevorzugt, wenn das Tumorgewebe in kryokonservierter Form bereitgestellt wird.

Mit dieser Maßnahme wird das erfindungsgemäße Verfahren derart modifiziert, dass dessen Durchführung nicht unmittelbar nach der Entnahme der biologischen Probe

zu erfolgen hat. Vielmehr kann die entnommene biologische Probe tiefgefroren und damit konserviert werden und die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens in einem hierfür ausgestatteten Speziallabor erfolgen, zu dem die konservierte Probe überführt wird. Die Erfinder konnten feststellen, dass kryokonserviertes Gewebe für eine Klassifizierung genauso geeignet ist, wie unmittelbar vor der Durchführung entnommenes „frisches" biologisches Gewebe.

Bei dem erfindungsgemäßen Klassifizierungsverfahren ist es bevorzugt, wenn Schritt (3) und (4) unter Verwendung einer "support vector machine" (SVM) erfolgt.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, dass der Vergleich des ermittelten Genexpressionsprofils der biologischen Probe mit den Referenzgenexpressionsprofilen und die Klassifizierung des Patienten mittels eines etablierten und genauen mathematischen Verfahrens erfolgt. Dabei stellt eine „support vector machine" (SVM) ein Klassifikator dar. Eine SVM unterteilt eine Menge von Objekten, bspw. zu untersuchende Gene oder Patienten, so in zwei Klassen, dass um die Klassengrenze herum ein möglichst breiter Bereich frei von Objekten bleibt. Bei den SVM handelt es sich um ein mathematisches Verfahren der Mustererkennung, das in Computerprogrammen umgesetzt wird. Ausgangsbasis für den Bau einer SVM ist eine Menge von Trainingsobjekten, für die jeweils bekannt ist, welcher Klasse sie zugehören, bspw. eine Menge von Patientinnen, die an einem Ovarialkarzinom leiden, und für die bekannt ist, ob diese platinresistent oder platinsensitiv sind. Jedes Objekt wird durch einen Vektor in einem Vektorraum repräsentiert. Aufgabe der SVM ist es, in diesen Raum eine mehrdimensionale Hyperebene einzupassen, die als Trennfläche fungiert und die Trainingsobjekte in zwei Klassen teilt. Der Abstand derjenigen Vektoren, die der Hyperebene am nächsten liegen, zur Hyperebene wird dabei maximiert. Dieser breite, leere Raum soll später dafür sorgen, dass auch Objekte, die nicht genau den Trainingsobjekten entsprechen, möglichst zuverlässig klassifiziert werden. Mittels der SVM lässt sich dann anhand des Expressionsprofils von zumindest einem der von den Erfindern identifizierten 55 Genen eine Klassenvorhersage ("class prediction") vornehmen, durch die ein Vektor, der das Genexpressionsprofil eines untersuchten Patienten darstellt, auf der einen oder anderen Seite der Hyperebene angeordnet wird, je nach

dem, zu welchem Referenzgenexpressionsprofil größere Ähnlichkeiten vorhanden sind. Dadurch wird die Klassifizierung eines Patienten in platinsensitiv oder platinresistent ermöglicht. Das mathematische Verfahren der SVM wird bspw. beschrieben in Burges C.J.C. (a.a.O.) und Perez-Diaz *et al.* (a.a.O.). Der Inhalt dieser Publikationen ist durch Inbezugnahme Bestandteil der Beschreibung.

Dabei ist es bevorzugt, wenn Schritt (2) des erfindungsgemäßen Klassifizierungsverfahrens folgende Schritte umfasst:

2.1 Isolierung der Gesamt-RNA,
2.2 Umschreibung der RNA in komplementäre DNA (cDNA),
2.3 *In-vitro*-Transkription der cDNA zum Erhalt von RNA-Transkripten,
2.4 Hybridisierung der RNA-Transkripte an einen Biochip, der zumindest solche Nucleinsäuremoleküle aufweist, die mit RNA-Transkripten der Gene der Untergruppe hybridisierbar sind, und
2.5 Ermittlung des Expressionsprofils anhand der Hybridisierungsaktivität der RNA-Transkripte der Gene der Untergruppe an den Biochip.

Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass Maßnahmen, die für sich genommen zur Routine eines Molekularbiologen gehören, ergriffen werden, in molekularbiologischen Laboratorien ohne großen Aufwand durchgeführt werden können und eine zuverlässige Ermittlung des Genexpressionsprofils der biologischen Probe gewährleisten. Eine korrekte Klassifizierung des Patienten wird damit sichergestellt.

Ein bevorzugter Biochip ist dabei erfindungsgemäß der "Human-6 v2 Expression BeadChip" der Firma Illumina.

Damit findet ein Biochip Verwendung, mit dem die Expression von mehr als 48.000 Transkripten bzw. Genen des Menschen untersucht werden kann. Der Chip zeichnet sich durch seine hohe Sensitivität, Selektivität und Messpräzision aus. Ferner sind lediglich geringe Mengen von biologischem Material bzw. daraus isolierter Gesamt-

RNA erforderlich, um eine Genexpressionsanalyse vorzunehmen. Es versteht sich, dass auch andere Biochips geeignet sind, die solche Nucleinsäuremoleküle aufweisen, mit denen die Transkripte von zumindest einem Gen, vorzugsweise von allen 55 identifizierten Genen der Untergruppe, hybridisierbar sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von informativen Genen, um einen Patienten als platinsensitiv oder platinresistent klassifizieren zu können, das folgende Schritte aufweist:

1. Bereitstellung von biologischen Proben
   a) aus platinsensitiven Patienten und
   b) aus platinresistenten Patienten,
2. Ermittlung der Genexpressionsprofile
   a) aus der biologischen Probe aus den platinsensitiven Patienten und
   b) aus der biologischen Probe aus den platinresistenten Patienten,
3. Identifizierung von Genen, die in den platinsensitiven Patienten unterschiedlich exprimiert werden als in den platinresistenten Patienten, zum Erhalt von informativen Genen („gene predictor set"),

wobei

- die biologische Probe aus solchen platinsensitiven Patienten gewonnen wurde, die 6 Monate nach Abschluss einer platinbasierenden Chemotherapie kein Rezidiv erlitten, und
- die biologische Probe aus solchen platinresistenten Patienten gewonnen wurde, die innerhalb von 6 Monaten nach Abschluss einer platinbasierenden Chemotherapie ein Rezidiv erlitten.

Dieses Verfahren unterscheidet sich von den im Stand der Technik bekannten Identifizierungsverfahren dadurch, dass zum Erhalt von informativen Genen ausschließlich solche Patienten herangezogen wurden, die gemäß allgemein anerkannter Leitlinien als platinsensitiv oder platinresistent zu klassifizieren sind. Eine entsprechende Klassifizierung wird bspw. auch von der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. in Form einer "Handlungsempfehlung zur Diagnostik und

Therapie maligner Ovarialtumoren", Stand September 2006, vorgenommen; vgl. den Internetauftritt unter http://www.dggg.de/leitlinien2006/pdf-2006/2-onko-gyn/2/2-5a-ovarialkarzinom-kurz-pdf.

Bei dem erfindungsgemäßen Identifizierungsverfahren ist es bevorzugt, wenn die Anzahl der platinsensitiven Patienten im Wesentlichen der Anzahl der platinresistenten Patienten entspricht.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, dass die Genexpressionsprofile aus den platinsensitiven Patienten und aus den platinresistenten Patienten ausgewogen und repräsentativ sind und die zuverlässige Identifizierung von „echten" informativen Genen ermöglicht wird. Hierzu im Gegensatz wurden bei dem von Helleman *et al.* (a.a.O.) beschriebenen Verfahren eine nicht ausgewogene Auswahl von platinresistenten bzw. platinsensitiven Patienten vorgenommen. Dort wurden vielmehr 5 platinresistente und 19 platinsensitive Patienten ausgewählt und die Genexpressionsprofile ermittelt. Die dabei identifizierten 9 informativen Gene sind möglicherweise für eine zuverlässige Klassifizierung von Patienten nicht geeignet.

Bei dem erfindungsgemäßen Identifizierungsverfahren ist es bevorzugt, wenn die biologischen Proben Tumorgewebe, vorzugsweise aus einem Ovarialkarzinom stammend aufweisen.

Die Erfinder haben festgestellt, dass das erfindungsgemäße Identifizierungsverfahren besonders gut solche informativen Gene identifizieren kann, die eine Unterscheidung von platinsensitiven Ovarialkarzinompatientinnen und platinresistenten Ovarialkarzinompatientinnen ermöglicht. Das erfindungsgemäße Identifizierungsverfahren ist deshalb für eine Klassifizierung von Tumorpatienten besonders geeignet.

Dabei ist es bevorzugt, wenn die biologischen Proben mindestens 50 % Tumorgewebe aufweisen, das vorzugsweise auch in kryokonservierter Form bereitgestellt werden kann.

Mit dieser Maßnahme wird sichergestellt, dass zuverlässige informative Gene identifizierbar sind. So eignen sich gerade solche Gene als "gene predictors", die in Tumoren platinsensitiver und platinresistenter Patienten unterschiedlich exprimiert werden. Eine Heranziehung lediglich solcher biologischer Proben, die zumindest 50 % Tumorgewebe aufweisen, führt deshalb zuverlässig zur Identifizierung von informativen Genen.

Die Erfinder haben festgestellt, dass nicht nur "frisches" Tumorgewebe für die Identifizierung von informativen Genen mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet sind, sondern gleichermaßen kryokonserviertes Gewebe. Das Verfahren kann deshalb in jedem molekularbiologischen Labor durchgeführt werden, das nicht zwingend in räumlicher Nähe zu einer Klinik liegt, in der dem zu untersuchenden Patienten die Gewebeprobe entnommen wird. Diese kann vielmehr tiefgefroren und konserviert werden und dem Untersuchungslabor zugesandt werden.

Dabei ist es bevorzugt, wenn Schritt (3) unter Verwendung einer "support vector machine (SVM)" erfolgt.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, dass eine etablierte und zuverlässige mathematische Methode Verwendung findet, mittels derer informative Gene erhalten werden können. Auf die obigen Ausführungen zu SVM im Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Klassifizierungsverfahren wird verwiesen, die hier gleichermaßen gelten.

Bei dem erfindungsgemäßen Identifizierungsverfahren ist es bevorzugt, wenn Schritt (2) folgende Schritte umfasst:

2.1 Isolierung der Gesamt-RNA
- aus der biologischen Probe aus den platinsensitiven Patienten und
- aus der biologischen Probe aus den platinresistenten Patienten,

2.2 Umschreibung der isolierten RNA in komplementäre DNA (cDNA),

2.3 *In-vitro*-Transkription der cDNA zum Erhalt von RNA-Transkripten,

2.4 Hybridisierung der RNA-Transkripte an einen Biochip, der das humane Genom repräsentierende hybridisierbare Nucleinsäuremoleküle aufweist, und

2.5 Ermittlung der Expressionsprofile der biologischen Proben anhand der Hybridisierungsaktivität der RNA-Transkripte an den Biochip.

Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass die Maßnahmen durchgeführt werden, die zuverlässig und unter Anwendung von etablierten molekularbiologischen Methoden eine Ermittlung der Genexpressionsprofile aus den biologischen Proben ermöglichen. Auf die obigen Ausführungen im Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Klassifizierungsverfahren wird verwiesen, die hier gleichermaßen gelten.

Dabei ist es bevorzugt, wenn als Biochip der "Human-6 v2 Expression BeadChip" der Firma Illumina verwendet wird.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, dass ein solcher Biochip Verwendung findet, mit dem die Expression von mehr als 48.000 Transkripten untersucht werden kann. Der Chip zeichnet sich durch seine hohe Sensitivität, Selektivität und Messpräzision aus. Ferner sind lediglich geringe Mengen von biologischem Material bzw. daraus isolierter Gesamt-RNA erforderlich, um eine Genexpressionsanalyse vorzunehmen. Es versteht sich, dass auch andere vergleichbare Biochips geeignet sind.

Es versteht sich, dass die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in der jeweils angegebenen Kombination, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Die vorliegende Erfindung wird nun anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert, die rein illustrativ sind und die Reichweite der vorliegenden Erfindung nicht begrenzen. Dabei wird Bezug genommen auf die beigefügten Abbildungen, auf denen Folgendes zu sehen ist:

Fig. 1 zeigt die RNA-Expressionsprofile von Cisplatin-resistenten und -sensitiven Ovarialkarzinomen in einer Microarray-Analyse auf dem "Human-6 v2 Expression BeadChip" (Illumina);

Fig. 2 zeigt das Ergebnis einer "principle component"-Analyse (PCA) der Genespressionsdaten mit dem Gesamtdatensatz (A) und den Daten des "gene predictor sets" bestehend aus 55 Genen (B). Jeder Punkt entspricht einem Datensatz (Array). Resistente Proben sind weiß, sensitive schwarz dargestellt.

Ausführungsbeispiele

1. Identifizierung von 55 informativen Genen

12 Ovarialkarzinompatientinnen, die 6 Monate nach Beendigung einer platinbasierenden Chemotherapie kein Rezidiv erlitten (platinsensitive Patienten) und 12 Ovarialkarzinompatientinnen, die innerhalb von 6 Monaten nach Beendigung einer platinbasierenden Chemotherapie ein Rezidiv erlitten (platinresistente Patientinnen) wurde von einem erfahrenen Chirurgen Gewebeproben des Ovarialkarzinoms entnommen. Die Gewebeproben wurden mit einer Ischämiezeit von unter 10 Minuten kryokonserviert.

Von den kryokonservierten Geweben wurden Schnitte von je 10 µm angefertigt. Diese wurden histopathologisch derart charakterisiert, dass lediglich solche Proben ausgewählt wurden, die einen Tumorflächenanteil von > 50 % enthielten.

Aus den Gewebeschnitten wurde die Gesamt-RNA isoliert, in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA wurde *in vitro* transkribiert, dabei wurden die RNA-Transkripte mit einem detektierbaren Fluoreszenzmarker markiert.

Die RNA-Transkripte wurden mit einem "Human-6 v2 Expression BeadChip" der Firma Illumina hybridisiert. Das Ergebnis der anschließenden Mikroarrayanalyse ist in Fig. 1 dargestellt.

Durch Signifikanzanalysen konnten 102 Transkripte identifiziert werden, die in Cisplatin-resistenten und Cisplatin-sensitiven Ovarialkarzinomen differenziell exprimiert sind. Die dargestellte hierarchische Clusteranalyse erlaubt bereits eine sehr gute Trennung der Cisplatin-resistenten (weiß) von den Cisplatin-sensitiven Proben (schwarz). Jede Reihe entspricht einem Gen bzw. Transkript, jede Spalte einem Array. Der Grauton gibt den Expressionswert wieder. Im nächsten Schritt erfolgt eine "class prediction"-Analyse (CPA) über "support vector-machines" (SVM). Aus den 102 differenziell exprimierten Transkripten konnte durch Kreuzvalidierung ("leave-one-out") ein "gene predictor set" aus 55 Genen bestimmt werden. Diese 55 informativen Gene sind in der nachfolgenden Tabelle 1 dargestellt.

Nr.	Identifikator	Vorhersagekraft	Gensymbol (HGNC)	Zugriffsnummer (GenBank)
1	ILMN_19499	0,965	PPAPDC1A	NM_001030059.1
2	ILMN_15615	0,904	EGFR	NM_005228.3
3	ILMN_23021	0,887	NKD2	NM_033120.2
4	ILMN_550	0,809	GPM6B	NM_001001994.1
5	ILMN_17238	0,807	AMMECR1	NM_001025580.1
6	ILMN_4224	0,796	LTB4R	NM_181657.1
7	ILMN_72772	0,784		BX112399
8	ILMN_18540	0,774	TUSC1	NM_001004125.1
9	ILMN_3252	0,748	MUC15	NM_145650.2
10	ILMN_14413	0,713	HMFN0839	NM_032717.3
11	ILMN_23763	0,697	SCAP1	NM_003726.2
12	ILMN_86232	0,691		XM_498568
13	ILMN_10741	0,684	CARD4	NM_006092.1
14	ILMN_8918	0,675	FTCD	NM_206965.1
15	ILMN_99087	0,651		XM_371586

16	ILMN_15604	0,64	LOC400464	NM_001013670.1
17	ILMN_15049	0,638	COMP	NM_000095.2
18	ILMN_23073	0,637	LOC440686	NM_001025303.1
19	ILMN_139036	0,633	COL5A1	NM_000093.2
20	ILMN_17622	0,63	HIST1H2BD	NM_138720.1
21	ILMN_25961	0,616	F2R	NM_001992.2
22	ILMN_5826	0,615	KIAA1875	NM_032529.1
23	ILMN_2252	0,615	HLA-DMB	NM_002118.3
24	ILMN_110121	0,612	FOXP1	AK025793
25	ILMN_14337	0,61	APOC1	NM_001645.3
26	ILMN_2170	0,61	WBSCR27	NM_152559.2
27	ILMN_5805	0,61	CATSPER1	NM_053054.2
28	ILMN_10267	0,607	JOSD2	NM_138334.1
29	ILMN_78403	0,604	BCAR3	BX106566
30	ILMN_6146	0,601	BGN	NM_001711.3
31	ILMN_137246	0,6	HOXB7	NM_004502.2
32	ILMN_25095	0,6	FXYD3	NM_005971.2
33	ILMN_8853	0,599	NIPA1	NM_144599.3
34	ILMN_14467	0,596	GSR	NM_000637.2
35	ILMN_14080	0,585	CST1	NM_001898.2
36	ILMN_137018	0,581	LAT2	NM_022040.2
37	ILMN_29988	0,579	HLA-DQB1	NM_002123.2
38	ILMN_861	0,576	LSAMP	NM_002338.2
39	ILMN_31291	0,576	LOC652670	XM_942247.1
40	ILMN_41694	0,573	LOC642412	XM_925931.1
41	ILMN_26729	0,572	NEK8	NM_178170.2
42	ILMN_22820	0,572	CD40	NM_001250.3
43	ILMN_17141	0,57	SAMD11	NM_152486.2
44	ILMN_14655	0,57	MSC	NM_005098.2
45	ILMN_72111	0,567		CR607098
46	ILMN_8273	0,567	PLCXD1	NM_018390.1
47	ILMN_17784	0,56	RASL11A	NM_206827.1
48	ILMN_26128	0,558	COL3A1	NM_000090.2
49	ILMN_20864	0,555	FLJ13391	NM_032181.1

50	ILMN_11548	0,553	COL1A1	NM_000088.2
51	ILMN_14608	0,55	ZNF539	NM_203282.1
52	ILMN_5270	0,55	REM1	NM_014012.4
53	ILMN_18256	0,54	EDG3	NM_005226.2
54	ILMN_25778	0,533	CSPG2	NM_004385.2
55	ILMN_21174	0,529	TYRP1	NM_000550.1

Tabelle 1: Informative Gene ("gene predictor set")

2. Verifizierung des die 55 Gene enthaltenden "gene predictor sets"

Die Vorhersagekraft des "gene predictor sets" wurde anhand von 18 Proben verifiziert, die aus cisplatinresistenten Ovarialkarzinompatientinnen stammten. Das Ergebnis ist in Tabelle 2 dargestellt.

Probe	Richtiger Wert	Vorhersage	sensitiv Margin	resistent Margin
1674120081_A	1	1	0,344	-0,344
1674120081_B	1	1	0,879	-0,879
1674120081_C	1	1	1,024	-1,024
1674120081_D	0	0	-0,444	0,444
1674120081_E	0	0	-0,446	0,446
1674120081_F	0	0	-1,227	1,227
1674120096_A	1	1	0,039	-0,039
1674120096_B	1	1	0,662	-0,662
1674120096_C	1	1	0,74	-0,74
1674120096_D	0	0	-1,098	1,098
1674120096_E	0	0	-0,238	0,238
1674120096_F	0	0	-0,807	0,807
1674120164_A	1	1	1,157	-1,157
1674120164_B	1	1	0,775	-0,775
1674120164_C	1	1	1,247	-1,247
1674120164_D	0	0	-0,47	0,47
1674120164_E	0	0	-1,279	1,279
1674120164_F	0	0	-0,159	0,159

Tabelle 2: Vorhersagekraft des "gene predictor sets"; Klassifizierungsgenauigkeit; 1: Cisplatin sensitive, 0: Cisplatin resistent

Aus der Tabelle 2 ergibt sich, dass das "gene predictor set" aus den 55 Genen eine hundertprozentig richtige Vorhersage einer Cisplatinresistenz bzw. Cisplatinsensitivität ermöglicht.

In Fig. 2 ist das Ergebnis einer Hauptkomponentenanalyse ("Principle-Component-Analyse", PCA) der Genexpressionsdaten mit dem Gesamtdaten-

satz (A) und den Daten des "gene predictor sets" aus den 55 identifizierten Genen dargestellt (B). Jeder Punkt entspricht einem Datensatz (Array). Resistente Proben sind weiß, sensitive schwarz dargestellt. Die PCA mit dem ungefilterten Datensatz lässt keine klare Unterscheidung von cisplatinsensitiven und -resistenten Patienten zu, wohingegen mit den 55 Genen des "gene predictor sets" eine klare Trennung der beiden Patentengruppen möglich ist; vgl. Teilabbildung (B).

3. Schlussfolgerung

Die Erfinder stellen erstmals ein Verfahren bereit, mit dem zuverlässig eine Klassifizierung von Patienten in platinsensitiv und platinresistent vorgenommen werden kann. Kernstück dieses Verfahrens ist die Bereitstellung eines "gene predictor sets", bestehend aus 55 differenziell exprimierten Genen. Mit Hilfe dieses Verfahrens können bspw. Ovarialkarzinompatientinnen identifiziert werden, die von einer platinhaltigen Therapie profitieren. Andererseits können platinresistente Patientinnen ausgeschlossen und sofort eine alternative Chemotherapie gewählt werden, um unnötige Toxizitäten zu vermeiden. Die Erfinder stellen auch erstmals ein zuverlässiges Verfahren bereit, um informative Gene zu identifizieren, mittels denen eine Klassifizierung von Patienten in platinsensitiv und platinresistent ermöglicht wird.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Klassifizierung eines Patienten als platinsensitiv oder platinresistent, das folgende Schritte aufweist:

   1. Bereitstellung einer biologischen Probe eines Patienten,
   2. Ermittlung des Genexpressionsprofils einer Untergruppe von Genen aus der biologischen Probe,
   3. Vergleich des in Schritt (2) ermittelten Genexpressionsprofils
      a) mit einem ersten Referenzgenexpressionsprofil der Untergruppe von Genen, wobei das erste Referenzgenexpressionsprofil aus platinsensitiven Patienten gewonnen wurde, und
      b) mit einem zweiten Referenzgenexpressionsprofil der Untergruppe von Genen, wobei das zweite Referenzgenexpressionsprofil aus platinsresistenten Patienten gewonnen wurde,
   4. Klassifizierung des Patienten
      a) als platinsensitiv, wenn das Genexpressionsprofil des Patienten größere Ähnlichkeiten mit dem ersten Referenzgenexpressionsprofil aufweist, oder
      b) als platinresistent, wenn das Genexpressionsprofil des Patienten größere Ähnlichkeiten mit dem zweiten Referenzgenexpressionsprofil aufweist,

   dadurch gekennzeichnet, dass die Untergruppe von Genen aus zumindest einem Gen besteht, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: PPAPDC1A (NM_001030059.1), EGFR (NM_005228.3), NKD2 (NM_033120.2), GPM6B (NM_001001994.1), AMMECR1 (NM_001025580.1), LTB4R (NM_181657.1), BX112399; TUSC1 (NM_001004125.1), MUC15

(NM_145650.2), HMFN0839 (NM_032717.3), SCAP1 (NM_003726.2), XM_498568, CARD4 (NM_006092.1), FTCD (NM_206965.1), XM_371586, LOC400464 (NM_001013670.1), COMP (NM_000095.2), LOC440686 (NM_001025303.1), COL5A1 (NM_000093.2), HIST1H2BD (NM_138720.1), F2R (NM_001992.2), KIAA1875 (NM_032529.1), HLA-DMB (NM_002118.3), FOXP1 (AK025793), APOC1 (NM_001645.3), WBSCR27 (NM_152559.2), CATSPER1 (NM_053054.2), JOSD2 (NM_138334.1), BCAR3 (BX106566), BGN (NM_001711.3), HOXB7 (NM_004502.2), FXYD3 (NM_005971.2), NIPA1 (NM_144599.3), GSR (NM_000637.2), CST1 (NM_001898.2), LAT2 (NM_022040.2), HLA-DQB1 (NM_002123.2), LSAMP (NM_002338.2), LOC652670 (XM_942247.1), LOC642412 (XM_925931.1), NEK8 (NM_178170.2), CD40 (NM_001250.3), SAMD11 (NM_152486.2), MSC (NM_005098.2), CR607098, PLCXD1 (NM_018390.1), RASL11A (NM_206827.1), COL3A1 (NM_000090.2), FLJ13391 (NM_032181.1), COL1A1 (NM_000088.2), ZNF539 (NM_203282.1), REM1 (NM_014012.4), EDG3 (NM_005226.2), CSPG2 (NM_004385.2), TYRP1 (NM_000550.1).

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Untergruppe von Genen aus zumindest 5, vorzugsweise aus zumindest 10, weiter bevorzugt aus zumindest 20, mehr bevorzugt aus zumindest 30, mehr bevorzugt aus zumindest 40, mehr bevorzugt aus zumindest 50 und höchst bevorzugt aus allen 55 Genen besteht, die ausgewählt sind aus der in Anspruch 1 identifizierten Gruppe.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das erste Referenzgenexpressionsprofil aus solchen Patienten gewonnen wurde, die 6 Monate nach Abschluss einer platinbasierenden Chemotherapie kein Rezidiv erleiden (platinsensitive Patienten).

4. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das zweite Referenzgenexpressionsprofil aus solchen Patienten gewonnen

wurde, die innerhalb von 6 Monaten nach Abschluss einer platinbasierenden Chemotherapie ein Rezidiv erleiden (platinresistente Patienten).

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Anzahl der platinsensitiven Patienten im Wesentlichen der Anzahl der platinresistenten Patienten entspricht.

6. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Probe Tumorgewebe, vorzugsweise aus einem Ovarialkarzinom stammend, aufweist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Probe mindestens 50 % Tumorgewebe aufweist.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Tumorgewebe in kryokonservierter Form bereitgestellt wird.

9. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt (3) und (4) unter Verwendung einer "support vector machine (SVM)" erfolgt.

10. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt (2) folgende Schritte umfasst:

2.1 Isolierung der Gesamt-RNA,

2.2 Umschreibung der RNA in komplementäre DNA (cDNA),

2.3 *In-vitro*-Transkription der cDNA zum Erhalt von RNA-Transkripten,

2.4 Hybridisierung der RNA-Transkripte an einen Biochip, der zumindest solche Nucleinsäuremoleküle aufweist, die mit RNA-Transkripten der Gene der Untergruppe hybridisierbar sind, und

2.5 Ermittlung des Expressionsprofils anhand der Hybridisierungsaktivität der RNA-Transkripte der Gene der Untergruppe an den Biochip.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass als Biochip der "Human-6 v2 Expression BeadChip" der Firma Illumina verwendet wird.

12. Verwendung des Genexpressionsprofils einer Untergruppe von Genen zur Klassifizierung eines Patienten als platinsensitiv oder platinresistent, dadurch gekennzeichnet, dass die Untergruppe von Genen aus zumindest einem Gen besteht, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: PPAPDC1A (NM_001030059.1), EGFR (NM_005228.3), NKD2 (NM_033120.2), GPM6B (NM_001001994.1), AMMECR1 (NM_001025580.1), LTB4R (NM_181657.1), BX112399; TUSC1 (NM_001004125.1), MUC15 (NM_145650.2), HMFN0839 (NM_032717.3), SCAP1 (NM_003726.2), XM_498568, CARD4 (NM_006092.1), FTCD (NM_206965.1), XM_371586, LOC400464 (NM_001013670.1), COMP (NM_000095.2), LOC440686 (NM_001025303.1), COL5A1 (NM_000093.2), HIST1H2BD (NM_138720.1), F2R (NM_001992.2), KIAA1875 (NM_032529.1), HLA-DMB (NM_002118.3), FOXP1 (AK025793), APOC1 (NM_001645.3), WBSCR27 (NM_152559.2), CATSPER1 (NM_053054.2), JOSD2 (NM_138334.1), BCAR3 (BX106566), BGN (NM_001711.3), HOXB7 (NM_004502.2), FXYD3 (NM_005971.2), NIPA1 (NM_144599.3), GSR (NM_000637.2), CST1 (NM_001898.2), LAT2 (NM_022040.2), HLA-DQB1 (NM_002123.2), LSAMP (NM_002338.2), LOC652670 (XM_942247.1), LOC642412 (XM_925931.1), NEK8 (NM_178170.2), CD40 (NM_001250.3), SAMD11 (NM_152486.2), MSC (NM_005098.2), CR607098, PLCXD1 (NM_018390.1), RASL11A (NM_206827.1), COL3A1 (NM_000090.2), FLJ13391 (NM_032181.1), COL1A1 (NM_000088.2), ZNF539 (NM_203282.1), REM1 (NM_014012.4), EDG3 (NM_005226.2), CSPG2 (NM_004385.2), TYRP1 (NM_000550.1).

13. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Untergruppe von Genen aus zumindest 5, vorzugsweise aus zumindest 10, weiter bevorzugt aus zumindest 20, mehr bevorzugt aus zumindest 30, mehr bevor-

zugt aus zumindest 40, mehr bevorzugt aus zumindest 50 und höchst bevorzugt aus allen 55 Genen besteht, die ausgewählt sind aus der in Anspruch 12 identifizierten Gruppe.

14. Verfahren zur Identifizierung von informativen Genen, um einen Patienten als platinsensitiv oder platinresistent klassifizieren zu können, das folgende Schritte aufweist:

1. Bereitstellung von biologischen Proben
   a) aus platinsensitiven Patienten und
   b) aus platinresistenten Patienten,
2. Ermittlung der Genexpressionsprofile
   a) aus der biologischen Probe aus den platinsensitiven Patienten und
   b) aus der biologischen Probe aus den platinresistenten Patienten,
3. Identifizierung von Genen, die in den platinsensitiven Patienten unterschiedlich exprimiert werden als in den platinresistenten Patienten, zum Erhalt von informativen Genen ("gene predictor set"),

dadurch gekennzeichnet, dass

- die biologische Probe aus solchen platinsensitiven Patienten gewonnen wurde, die 6 Monate nach Abschluss einer platinbasierenden Chemotherapie kein Rezidiv erlitten, und
- die biologische Probe aus solchen platinresistenten Patienten gewonnen wurde, die innerhalb von 6 Monaten nach Abschluss einer platinbasierenden Chemotherapie ein Rezidiv erlitten.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Anzahl der platinsensitiven Patienten im Wesentlichen der Anzahl der platinresistenten Patienten entspricht.

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Proben Tumorgewebe, vorzugsweise aus einem Ovarialkarzinom stammend, aufweisen.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die biologischen Proben mindestens 50 % Tumorgewebe aufweisen.

18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Tumorgewebe in kryokonservierter Form bereitgestellt werden.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt (3) unter Verwendung einer "support vector machine (SVM)" erfolgt.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt (2) folgende Schritte umfasst:

2.1 Isolierung der Gesamt-RNA
- aus der biologischen Probe aus den platinsensitiven Patienten und
- aus der biologischen Probe aus den platinresistenten Patienten,

2.2 Umschreibung der isolierten RNA in komplementäre DNA (cDNA),

2.3 *In-vitro*-Transkription der cDNA zum Erhalt von RNA-Transkripten,

2.4 Hybridisierung der RNA-Transkripte an einen Biochip, der das humane Genom repräsentierende hybridisierbare Nucleinsäuremoleküle aufweist, und

2.5 Ermittlung der Expressionsprofile der biologischen Proben anhand der Hybridisierungsaktivität der RNA-Transkripte an den Biochip.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass als Biochip der "Human-6 v2 Expression BeadChip" der Firma Illumina verwendet wird.

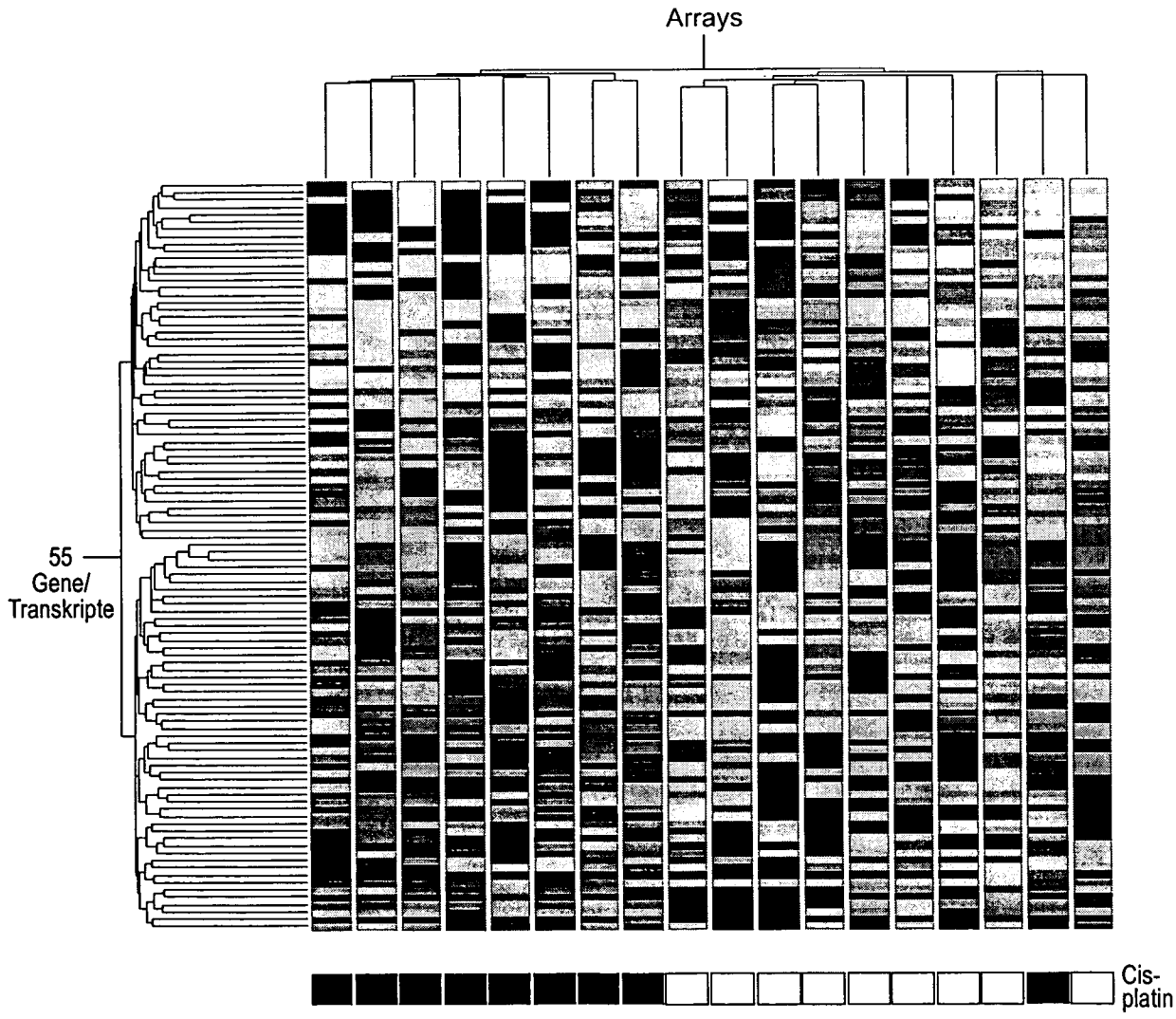
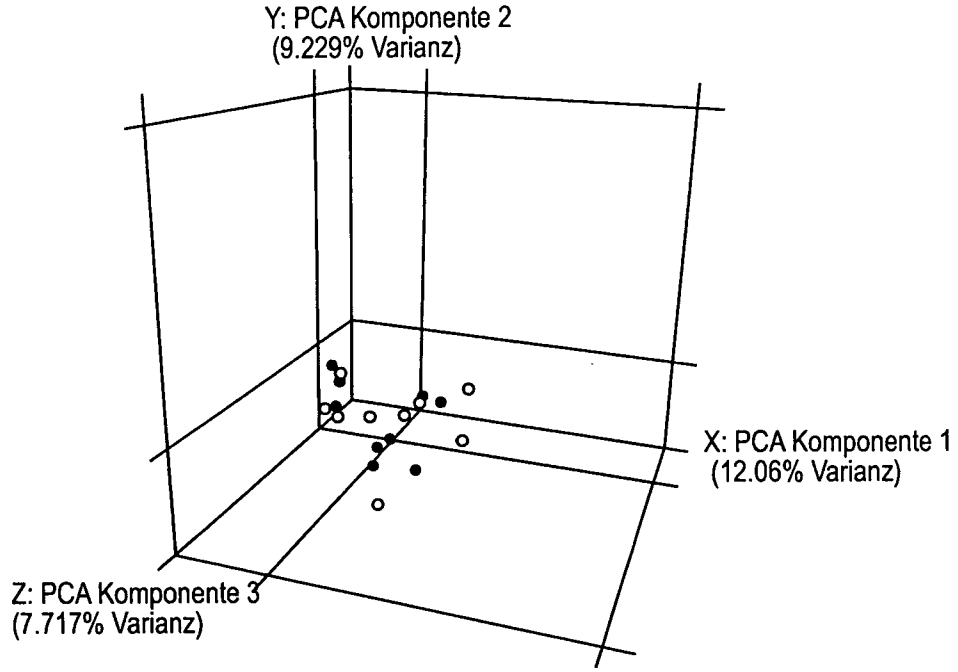


Fig. 1

A


Y: PCA Komponente 2
(9.229% Varianz)
X: PCA Komponente 1
(12.06% Varianz)
Z: PCA Komponente 3
(7.717% Varianz)

B

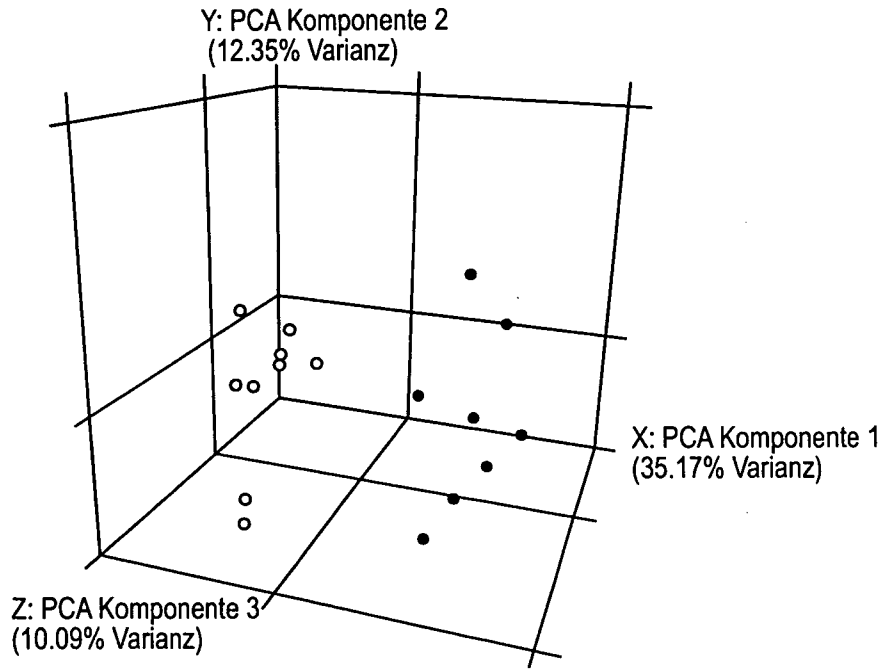

Y: PCA Komponente 2
(12.35% Varianz)
X: PCA Komponente 1
(35.17% Varianz)
Z: PCA Komponente 3
(10.09% Varianz)

Fig. 2