

(19)



österreichisches  
patentamt

(10)

AT 504 232 A1 2008-04-15

(12)

## Österreichische Patentanmeldung

(21) Anmeldenummer: **A 1652/2006**

(22) Anmeldetag: **03.10.2006**

(43) Veröffentlicht am: **15.04.2008**

(51) Int. Cl.<sup>8</sup>: **C12Q 1/00** (2006.01),  
**G01N 33/48** (2006.01)

(73) Patentanmelder:

LOIBNER HANS DR.  
A-1230 WIEN (AT)  
STOIBER WOLFGANG DR.  
D-82031 GRÜNWALD (DE)

(72) Erfinder:

LOIBNER HANS DR.  
WIEN (AT)

### (54) PROGNOTISCHE PARAMETER

- (57) Ein Verfahren zur Feststellung der Prognose eines erhöhten klinischen Nutzens für ein Individuum, das an einem Tumor erkrankt ist, ist beschrieben, welches Verfahren umfasst:
- Bereitstellen einer Blutprobe des Individuums
  - (a1) Bestimmen der Anzahl der Lymphozyten im Blut des Individuums, und/oder
  - (a2) Bestimmen der Anzahl der Neutrophilen im Blut des Individuums, und
  - (b1) Identifizieren als ein Individuum mit guter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Lymphozyten höher als ein Lymphozyten-Grundlinien-Level von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere höher als  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut ist; oder
  - (b2) Identifizieren als ein Individuum mit guter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Neutrophilen niedriger oder gleich einem Neutrophilen-Grundlinien-Level von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $5,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut ist; oder
  - (b3) Identifizieren als ein Individuum mit schlechter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Lymphozyten niedriger oder gleich einem Lymphozyten-Grundlinien-Level von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut ist und die Anzahl der Neutrophilen höher als ein Neutrophilen-Grundlinien-Level von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere höher als  $5,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut ist.

AT 504 232 A1 2008-04-15

## Zusammenfassung:

Ein Verfahren zur Feststellung der Prognose eines erhöhten klinischen Nutzens für ein Individuum, das an einem Tumor erkrankt ist, ist beschrieben, welches Verfahren umfasst:

- Bereitstellen einer Blutprobe des Individuums
- (a1) Bestimmen der Anzahl der Lymphozyten im Blut des Individuums, und/oder
- (a2) Bestimmen der Anzahl der Neutrophilen im Blut des Individuums, und
- (b1) Identifizieren als ein Individuum mit guter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Lymphozyten höher als ein Lymphozyten-Grundlinien-Level von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere höher als  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut ist; oder
- (b2) Identifizieren als ein Individuum mit guter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Neutrophilen niedriger oder gleich einem Neutrophilen-Grundlinien-Level von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $5,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut ist; oder
- (b3) Identifizieren als ein Individuum mit schlechter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Lymphozyten niedriger oder gleich einem Lymphozyten-Grundlinien-Level von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut ist und die Anzahl der Neutrophilen höher als ein Neutrophilen-Grundlinien-Level von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere höher als  $5,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut ist.

(keine Figur)

NACHGEREICHT

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Bestimmung von Parametern, die eine Prognose eines klinischen Nutzens für einen Tumorpatienten erlauben.

Es gibt zunehmend Beweise dafür, dass das Immunsystem schon bei der Kontrolle früher Geschehnisse in der Erkennung und Zerstörung erster bösartiger Zellen eine entscheidende Rolle spielt, jedoch ist auch in späteren Stadien der Erkrankung ein richtiges Funktionieren zur Kontrolle und Stabilisierung des Fortschreitens der Erkrankung äußerst wichtig (zumindest über einen gewissen Zeitraum). Es ist aber bekannt, dass das Immunsystem von Krebspatienten oft infolge der Erkrankung und auch infolge von immunsuppressiven Therapien geschwächt ist. Krebsimmuntherapien, wie solche, die Krebsvakzine beinhalten, stützen sich auf das richtige Funktionieren des Immunsystems als eine der wichtigsten Voraussetzungen für eine mögliche klinische Wirksamkeit.

Im Verlauf einer Krebstherapie wird immer als ein Parameter für den Status des Immunsystems die Anzahl der weißen Blutkörperchen gemessen, wobei verschiedene Typen dieser weißen Blutkörperchen aufgelistet werden. Daher wird immer bei Tumorpatienten, die in klinische Studien eingeschlossen werden, die Anzahl der Neutrophilen oder die Anzahl der Lymphozyten bestimmt. Diese Daten wurden von einigen Gruppen mit dem Erfolg der Krebstherapie und der Prognose bei einigen Krebsindikationen korreliert.

Zum Beispiel berichteten Fumagalli et al. (J Immunother. 2003 Sep-Oct;26(5):394-402), dass durch die Lymphozytenzahl als Biomarker für eine IL-2-Immuntherapie alleine schon das Gesamtüberleben bei Patienten mit fortgeschrittenem Krebs vorausgesagt werden konnte. In dieser Studie wurde retrospektiv erhoben, ob durch eine Lymphozytose zusätzlich zur klinischen Charakteristik an der Grundlinie („at baseline“, Zeitpunkt vor Beginn der Therapie) und zur objektiven Tumorantwort ein Gesamtüberleben bei metastatischen Nierenzellkrebspatienten, die IL-2 subkutan (s.c.) erhielten, voraussagbar wäre. Das Gesamtüberleben, die klinischen Charakteristika, Tumorantwort und Gesamtanzahl der Lymphozyten an der Grundlinie und während des ersten Behandlungszyklus wurden unter Verwendung der Cox-Multivariaten-Analyse bei 266 fortgeschrittenen Nierenzellkrebspatienten, die mit 1 von 4 verschiedenen „first-line“ s.c. IL-2 basierten Protokollen behandelt wurden, untersucht. Eine Zwei-Stufen-Vorgangsweise („boot-straping procedure“) bestätigte eine solche voraussagende Funktion.

**NACHGEREICHT**

Die Überwachung der Lymphozytenzahl wurde als einen Biomarker der Antwort des Wirts auf subkutane IL-2-Behandlung darstellend angesehen, der für eine multimodale klinische Beurteilung nützlich ist, da er das Gesamtüberleben bei fortgeschrittenen Krebspatienten unabhängig von der Tumorantwort und von der klinischen Grundcharakteristik voraussagt.

Ownby et al. (Cancer. 1983 Jul 1;52(1):126-30) publizierten, dass die Anzahl von peripheren Lymphozyten und Eosinophilen als Indikatoren für die Prognose bei primärem Brustkrebs angewandt werden kann. Als Teil einer großen Studie über pathophysiologische Hinweise auf ein erneutes Auftreten bei humanem Brustkrebs wurden vor der Operation die Anzahl der Eosinophilen und der Lymphozyten bei 419 bzw. 581 Patienten mit primärem Brustkrebs bestimmt. Patienten mit Lymphozytenzahlen kleiner oder gleich  $1500/\text{mm}^3$  und/oder einer Anzahl von Eosinophilen kleiner als  $55/\text{mm}^3$  hatten ein signifikant höheres Risiko eines Wiederauftretens der Erkrankung als solche Patienten, die normale oder hohe Zahlen an Eosinophilen und/oder Lymphozyten hatten. Es wurde berichtet, dass diese Ergebnisse möglicherweise darauf hinweisen, dass die immunologischen Aktivitäten von Eosinophilen und Lymphozyten die Fähigkeit der Patienten erhöhen, gegen eine Krankheit zu reagieren.

Das Ziel der Studie von Atzpodien et al. (Br J Cancer. 2003 Feb 10;88(3):348-53) war es, ein umfassendes prognostisches System für klinische Parameter vor der Behandlung bei 425 Patienten (pts) mit metastatischem Nierenzellkarzinom, die mit verschiedenen subkutanen (s.c.) rekombinanten, auf Zytokin-Basis beruhenden Therapien, die zu Hause anwendbar sind, in fortlaufenden Versuchen behandelt wurden, zu identifizieren. Die Behandlungen setzten sich zusammen aus (A) s.c. Interferon-alpha 2a (INF-alpha), s.c. Interleukin-2 (IL-2) (n=102 pts), (B) s.c. IFN-alpha 2a, s.c. IL-2 und i.v. 5-Fluorouracil (5-FU) (n=235 pts) oder (C) s.c. IFN-alpha 2a, s.c. IL-2 und i.v. 5-FU kombiniert mit p.o. 13-cis-Retinolsäure (13cRA) (n=88 pts). Es wurden die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse, log-rank-Statistik und Cox-Regressionsanalyse angewandt, um die Risikofaktoren zu bestimmen und ein Modell für multiple Risikofaktoren zu etablieren. Die folgenden Risikofaktoren vor der Behandlung wurden mittels Univariate-Analyse festgelegt: (1) drei und mehr Stellen mit Metastasen, (2) Vorhandensein von Leber-, Lymphknoten- oder Knochen-

metastasen, (3) Anzahl der Neutrophilen  $>$  oder  $=$  6500 Zellen pro Mikroliter (-1), (4) Serumlactatdehydrogenase-Menge (LDH)  $>$  oder  $=$  220 E pro Liter (-1) und (5) Serum C-reaktive Protein-Menge (CRP)  $>$  oder  $=$  11 mg pro Liter (-1). Durch die Cox-Regressionsanalyse mit schrittweise variabler Vorwärts-Selektion („forward stepwise variable selection“) wurde die Anzahl der Neutrophilen als prognostischer Hauptfaktor (Gefahrenrate („hazard ratio“)  $=$  1,9,  $P < 0,001$ ) identifiziert, während hingegen die Serum-Werte von LDH und CRP, die Zeit zwischen Diagnose des Tumors und dem Einsetzen der Metastasenbildung durch die Erkrankung, die Anzahl der metastatisch befallenen Stellen und die Knochenmetastasen zwar signifikant, aber etwas weniger wichtige prognostische Variable innerhalb des Modells der multiplen Risikofaktoren (Gefahrenrate  $<$  oder  $=$  1,5) waren.

Die Gesamtzahlen der Leukozyten und die Zahlen der verschiedenen Leukozytentypen wurden von Luc et al. (Sysmex J Int 8:38-40, 1998) bei 81 Patienten mit frisch diagnostiziertem Frühstadium von Brustkrebs, klassifiziert nach klinischem Stadium 0, I oder II, bestimmt und mit denselben Zahlen bei 39 altersmäßig dazu passenden gesunden Frauen und 67 Patienten mit gutartigen Brusterkrankungen verglichen. Keiner der für diese Studie ausgewählten Patienten hatte irgendwelche andere Erkrankungen, die diese Zellzahlen beeinflussen können. Im Vergleich mit der gesunden, altersmäßig dazu passenden Kontrollgruppe wurden bei Patienten mit Brustkrebs im Frühstadium signifikant niedrigere Zahlen von Lymphozyten, Basophilen und Eosinophilen gefunden. Die Anzahl der Neutrophilen war signifikant höher bei Patienten mit einer gutartigen oder bösartigen Erkrankung der Brust im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Es gab keine signifikanten Veränderungen in der Gesamtleukozytenzahl in allen drei Gruppen.

Zahorec (Bratisl Lek Listy 2001; 102 (1) : 5,14) untersuchte das Verhältnis der Zahl der Neutrophilen zur Zahl der Lymphozyten als einen raschen und einfachen Parameter für systemische Entzündungen und Stress bei Schwerkranken. Rasche, serielle Veränderungen in der Verteilung der weißen Blutkörperchen wurden bei 90 onkologischen Patienten auf der Intensivstation (ICU, „intensive care unit“) beobachtet als Antwort des Immunsystems auf Belastung bei Operationen, systemische Entzündungen oder Sepsis. Vorläufige Ergebnisse zeigten eine Korrelation zwischen der Schwere des klinischen Verlaufs und dem Grad an Neutrophilie und

Lymphozytopenie. Das Verhältnis der Anzahl der Neutrophilen zur Anzahl der Lymphozyten (in absoluten und/oder relativen %-Werten) wurde als leicht messbarer Parameter vorgeschlagen, der die Schwere der Krankheit ausdrücken könnte. Es wurde vorgeschlagen, das Verhältnis der Anzahl der Neutrophilen zur Anzahl der Lymphozyten (Neutrophilen-Lymphozyten-Stress-Faktor) in der klinischen ICU-Praxis routinemäßig in Intervallen von 6-12 und 24 Stunden zu verwenden. Es wurde vorgeschlagen, den prognostischen Wert des Neutrophilen-Lymphozyten-Stress-Faktors in weiteren Studien zu evaluieren.

Paesmans et al. (J Clin Oncol. 1995 May;13(5):1221-30 und Cancer. 2000 Aug 1;89(3): 523-33) beschrieben prognostische Faktoren für das Überleben bei fortgeschrittenem nicht-kleinzelligem Lungenkrebs. Es wurde versucht, den prognostischen Wert für das Überleben bei Patienten mit verschiedenen Charakteristiken vor der Behandlung mit nicht-operierbarem nicht-kleinzelligem Lungenkrebs im Zusammenhang mit einer mehr als zehnjährigen Erfahrung einer europäischen Arbeitsgruppe („European Cooperative Group“) zu bestimmen. Es wurden 23 Variable voraussichtlich erhoben und mit univariaten und variaten Methoden analysiert. Die Langzeitprognose in Verbindung mit kleinzelligem Lungenkarzinom ist jedoch schlecht. Die bekannten prognostischen Werte von Krankheits-Ausmaß und Karnofsky-Performance-Status wurden bestätigt, aber die Autoren identifizierten auch Alter und Geschlecht (was eher umstritten ist) als unabhängige Charakteristika, zusätzlich zu dem Hinweis auf die Funktion der vollständigen Antwort bei der Erreichung eines Langzeitüberlebens. Es wurde berichtet, dass die von den Autoren beobachtete unabhängige Rolle der Neutrophilen durch weitere Studien zu überprüfen sei.

Es wird immer klarer, dass Entzündungen eine grundlegende Rolle bei der Entwicklung von Krebs spielen. Entzündungen sind eine wesentliche Komponente für das Fortschreiten des Tumors. Viele Tumoren entstehen aus Infektionsherden, aus chronischen Reizungen und Entzündungen. Es wird nun klar, dass die Mikroumgebung von Tumoren, die weitgehend von Zellen aus einem Entzündungsherd bestimmt wird, ein unabdingbarer Teilnehmer am neoplastischen Geschehen ist, indem sie die Proliferation, das Überleben und die Migration fördert. Zusätzlich haben Tumorzellen einige signalgebende Moleküle des angeborenen Immunsystems, wie Selektine, Chemokine und deren Rezeptoren für eine Invasion, Mi-

gration und Metastasierung kooptiert. Dieses Verständnis fördert neue anti-inflammatorische therapeutische Ansätze bezüglich der Entstehung von Krebs (Coussens et al. (Nature 240 (2002))).

McMillan et al. (Nutr Cancer. 2001;41(1-2):64-9) berichteten, dass die Messung der systemischen entzündlichen Reaktion krebs-spezifisches und nicht-krebsbezogenes Überleben bei Patienten mit Krebs voraussagt. Es wurden Patienten mit diagnostiziertem Kolorektal- (n=182), Magen- (n=87), Brust- (n=99) oder Bronchial- (n=404) Krebs und gemessenen Werten von C-reaktivem Protein und Albumin identifiziert. Das mittlere Überleben vom Zeitpunkt der Probennahme an lag im Rahmen von 478 Tagen bei den Patienten mit Kolorektalkrebs bis zu 60 Tagen bei Patienten mit Bronchialkrebs. Bei Anwendung der univariaten Analyse gab es bei jedem Tumortyp einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Dauer des Überlebens und sowohl dem log10 des C-reaktiven Proteins als auch der Albuminkonzentration ( $P < \text{oder} = 0,0002$ ). Bei Anwendung der multivariaten Analyse verblieb in jedem Tumortyp der log10 des C-reaktiven Proteins ein signifikanter unabhängiger Prognoseparameter für das Überleben ( $P < \text{oder} = 0,0002$ ). Bei der Analyse aller vier Gruppen der Krebspatienten (n=772) war die Gefahrenrate für einen 10-fachen Anstieg der C-reaktiven Protein-Konzentration bei krebspezifischem Überleben 2,21 (95% Konfidenz-Intervall = 1,92-2,56,  $P < 0,0001$ ) und die entsprechende Gefahrenrate für das nicht-krebsbezogene Überleben 5,48 (95% Konfidenz-Intervall = 3,55-8,46,  $P < 0,0001$ ). Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass bei fortgeschrittenen Krebspatienten das Vorhandensein einer systemischen entzündlichen Reaktion und die Stärke dieser Reaktion die Dauer des krebspezifischen und des nicht-krebsbezogenen Überlebens voraussagten.

Nozoe et al. (American Journal of Clinical Oncology. 23(3): 263-266, June 2000) beschrieben die Bedeutung einer präoperativen Erhöhung des Serum C-reaktiven Proteins (CRP) als Indikator für das bösartige Potential und die Prognose bei Kolorektalkrebs. Es wird berichtet, dass die Reduktion von zirkulierenden Lymphozyten den immunsuppressiven Zustand von Patienten mit Neoplasien widerspiegelt. Es wurde gezeigt, dass eine präoperative Erhöhung des Serum-CRP signifikant im Zusammenhang mit der Reduktion des prozentuellen Lymphozytenanteils im peripheren Blut steht, und dass dies ein Indikator für eine geschwächte Funktionsfähigkeit des Immunsystems bei Patienten mit Kolorektalkrebs sein könnte.

Schmidt et al. (Brit.J.Cancer 93 (2005), 273-278) berichten, dass erhöhte Neutrophilen- und Monozytenzahlen im peripheren Blut mit geringem Überleben bei Patienten mit metastatischem Melanom, die eine auf IL-2 basierende Immuntherapie erhielten, im Zusammenhang stehen.

Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, objektive immunologische Parameter vorzusehen, die an der Grundlinie (= bei klinischen Studien: vorzugsweise vor der ersten Behandlung der ausgewählten Patienten) gemessen werden, die einen prognostischen Einfluss auf den gesamten klinischen Nutzen, den ein Patient erfahren könnte, haben, insbesondere einen prognostischen Parameter für das Gesamtüberleben („overall survival“, OS). Diese Parameter sollen einfach zu bestimmen und leicht handhabbar sein.

Daher sieht die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Identifizieren der Prognose eines erhöhten klinischen Nutzens für ein Individuum, das an einem Tumor erkrankt ist, vor, welches Verfahren umfasst:

- Bereitstellen einer Blutprobe des Individuums,
- (a1) Bestimmen der Anzahl der Lymphozyten im Blut des Individuums, und/oder
- (a2) Bestimmen der Anzahl der Neutrophilen im Blut des Individuums, und
- (b1) Identifizieren als ein Individuum mit guter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Lymphozyten höher als ein Lymphozyten-Grundlinien-Level von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere höher als  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut ist; oder
- (b2) Identifizieren als ein Individuum mit guter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Neutrophilen niedriger oder gleich einem Neutrophilen-Grundlinien-Level von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $5,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut ist; oder
- (b3) Identifizieren als ein Individuum mit schlechter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Lymphozyten niedriger oder gleich einem Lymphozyten-Grundlinien-Level von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut ist und die Anzahl der Neutrophilen höher als ein Grundlinien-Level von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere hö-

her als  $5,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut ist.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wurde überraschenderweise festgestellt, dass die Anzahl der Neutrophilen und der Lymphozyten bei Individuen aussagekräftige prognostische Parameter für den klinischen Nutzen bei Tumorpatienten sein können, wenn Grundlinien in Betracht gezogen wurden, die üblicherweise innerhalb der „Normal“-Werte von Individuen liegen. Es ist klar, dass Tumorpatienten, die schon eine Lymphozyten- oder Neutrophilenanzahl innerhalb eines pathologischen Bereichs haben, allgemein eine schlechte Prognose haben. Die vorliegende Erfindung macht aber von einem signifikanten Unterschied in der Prognose innerhalb des physiologischen Bereichs der Anzahl der Neutrophilen und Lymphozyten oder der Kombinationen dieser Zahlen (insbesondere der Differenz zwischen Lymphozyten und Neutrophilen) Gebrauch.

Üblicherweise gelten Neutrophilenzahlen zwischen  $1,7$  und  $7,5 \times 10^9$  pro Liter Blut, Lymphozytenzahlen zwischen  $1,2$  und  $4,5 \times 10^9$  pro Liter Blut oder Leukozytenzahlen zwischen  $4,0$  und  $10 \times 10^9$  pro Liter Blut als physiologisch („normal“). Pathologische Werte sind von Quelle zu Quelle verschieden, z.B. Neutropenie ist Berichten zufolge mit weniger als  $1 \times 10^9$  Neutrophilen pro Liter Blut verbunden, schwere Neutropenie mit weniger als  $0,5 \times 10^9$  Neutrophilen. Lymphopenie ist mit weniger als  $1 \times 10^9$  Lymphozyten pro Liter Blut verbunden; Leukopenie mit weniger als  $4 \times 10^9$  Leukozyten pro Liter Blut. Entsprechend der vorliegenden Erfindung werden Individuen mit einer Anzahl von Lymphozyten oder Neutrophilen innerhalb des physiologischen Bereichs in Erwägung gezogen, d.h. mit mindestens  $0,5 \times 10^9$  Lymphozyten oder Neutrophilen pro Liter Blut, vorzugsweise mit mindestens  $1 \times 10^9$  Lymphozyten oder Neutrophilen pro Liter Blut. Dies schließt nicht aus, dass vorübergehend artifiziell verminderte Anzahlen von Lymphozyten oder Neutrophilen innerhalb des Verlaufs der vorliegenden Erfindung von den bevorzugten Ausführungsformen dieser Erfindung ausgenommen sind.

In der vorliegenden Erfindung werden gewisse wichtige Grundlinien für die Zahl der Lymphozyten oder Neutrophilen (die innerhalb des physiologischen Bereichs sind) in Erwägung gezogen, z.B. um eine niedrige Anzahl von Neutrophilen oder eine hohe Anzahl von Lymphozyten oder eine Kombination dieser Werte, wie zum Beispiel die Differenz zwischen Neutrophilen- und Lymphozytenzahl (Neutrophile minus Lymphozyten; NML) oder Neutrophilen-

NACHGEREICHT

oder Lymphozyten low high (NOL-LH), zu definieren.

Speziell der Parameter NOL-LH (low neutrophils or high lymphocytes für eine gute Prognose) ist ein überraschendes Ergebnis, da, obwohl es im Prinzip von Vorteil ist, eine hohe Anzahl von Lymphozyten zu haben, eine gute Prognose sogar bei niedriger Lymphozytenzahl möglich ist, wenn die Anzahl der Neutrophilen niedrig ist. Andererseits ist es von Vorteil, eine niedrige Anzahl von Neutrophilen zu haben, aber auch dann, wenn die Anzahl der Neutrophilen hoch ist, ist die Prognose immer noch gut, wenn die Anzahl der Lymphozyten hoch ist. Nur, wenn die Lymphozytenzahl niedrig und die Neutrophilenzahl hoch ist, ist eine sehr schlechte Prognose gegeben. Da die Neutrophilen üblicherweise rund 70% der gesamten Leukozyten repräsentieren, betrifft der Gegenstand der vorliegenden Erfindung auch Verfahren, wie hierin geoffenbart, bei denen statt der Neutrophilen die Gesamtzahl der Leukozyten in Erwägung gezogen wird, wahlweise mit einem Korrekturfaktor von (ungefähr) 70%, z.B. statt 4,0 bis 6,0, insbesondere 5,0 x 10<sup>9</sup> Neutrophile pro Liter Blut kann man ebenso 6,5 bis 8,5, insbesondere 7,5 x 10<sup>9</sup> Leukozyten pro Liter Blut verwenden. Jedoch besteht die Wahrscheinlichkeit eines gewissen Verlusts an Signifikanz, wenn man sich auf die Gesamtleukozytenzahl anstelle der Anzahl der Neutrophilen stützt.

Die vorliegende Erfindung erlaubt eine statistisch signifikante Voraussage des Fortschreitens der Tumorerkrankung. Der klinische Nutzen gemäß der vorliegenden Erfindung kann auf verschiedene in der Tumormedizin etablierte Arten definiert werden. Zum Beispiel ist eine Definition geeignet, die auf Zeit-Ereignis-Messungen basiert (verglichen mit einer Kontrollgruppe):

- Verbesserung des Gesamtüberlebens (voll akzeptiert von allen Onkologen und Kontrollbehörden)
- Verbesserung des rückfallsfreien Überlebens (wenn keine klinisch erfassbare Tumormasse vorhanden ist; d.h. nach Operation; = adjuvantes Setting)
- Verbesserung des Überlebens ohne Progression (= Zeitspanne, bis die Krankheit weiter fortschreitet, basierend auf definierter messbarer Zunahme der Tumormasse).

Man spricht auch oft von einem Nutzen im Fall einer verbesserten Antwortrate (basierend auf einem definierten Schrumpfen einer Tumormasse innerhalb einer bestimmten Zeit). Jedoch verbessert eine klinische Reaktion im Sinn einer Tumorschrumpfung nicht

notwendigerweise die Überlebensparameter. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist der verbesserte klinische Nutzen eine verbesserte Gesamtüberlebenszeit.

Wie schon oben erwähnt, wird das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung vorzugsweise nur bei Individuen angewandt, die eine Anzahl von Neutrophilen oder Lymphozyten innerhalb eines „normalen“ Bereichs haben, d.h. üblicherweise über  $1,0 \times 10^9$  von jedem Zelltyp pro Liter Blut. Vorzugsweise ist die Anzahl der Lymphozyten für eine gute Prognose von mehr als  $1,6 \times 10^9$  bis  $5,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere von  $1,6 \times 10^9$  bis  $4,5 \times 10^9$  pro Liter Blut. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist die Anzahl der Neutrophilen für eine gute Prognose  $1,0 \times 10^9$  bis  $5,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere  $1,7 \times 10^9$  bis  $5,0 \times 10^9$  pro Liter Blut.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Feststellung der Prognose eines erhöhten klinischen Nutzens für ein Individuum, das an einem Tumor erkrankt ist, welches Verfahren umfasst:

- Bereitstellen einer Blutprobe des Individuums,
- (a1) Bestimmen der Anzahl der Lymphozyten im Blut des Individuums, und/oder
- (a2) Bestimmen der Anzahl der Neutrophilen im Blut des Individuums, und
- (b1) Identifizieren als ein Individuum mit guter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Lymphozyten höher als ein Lymphozyten-Grundlinien-Level von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere höher als  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut ist; oder
- (b2) Identifizieren als ein Individuum mit guter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Neutrophilen niedriger oder gleich einem Neutrophilen-Grundlinien-Level von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $5,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut ist; oder
- (b3) Identifizieren als ein Individuum mit schlechter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Lymphozyten niedriger oder gleich einem Lymphozyten-Grundlinien-Level von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut ist und die Anzahl der Neutrophilen höher als ein Neutrophilen-

Grundlinien-Level von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere höher als  $5,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut ist.

Die Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung sind grundsätzlich anwendbar für alle Typen von Tumorpatienten, besonders für Tumorpatienten, die eine Tumorthherapie machen. Die vorliegende Erfindung ist daher speziell geeignet für solide Tumoren, besonders für Tumoren des Kolorektalsystems. Das vorliegende Verfahren ist überraschenderweise geeignet für Tumoren, die nicht immunogen sind (das sind Tumoren mit einer geringen Häufigkeit von Spontanremissionen; im Gegensatz zu immunogenen Tumoren, wie Melanom oder Nierenzellkarzinom). Bevorzugte Tumoren für das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung sind Tumoren, die nicht immunogen sind (und daher nicht in direktem Zusammenhang mit den weißen Blutkörperchen stehen), insbesondere epitheliale Tumoren. Diese bevorzugten Tumoren haben eine extrem niedrige Wahrscheinlichkeit für Spontanremissionen, hauptsächlich, weil diese Tumoren für das Immunsystem „verborgen“ sind. Beispiele für bevorzugte Tumoren gemäß der vorliegenden Erfindung sind Brustkrebs, Lungenkrebs, Magenkrebs, Pankreaskarzinom, Prostatakrebs, Ovarialkarzinom und Kolorektalkrebs. Das vorliegende Verfahren wird bevorzugt bei Patienten mit Kolorektalkrebs angewandt.

Vorzugsweise wird die Prognose bei einem Tumorpatienten in Stadium III oder IV des Tumors erstellt, klassifiziert gemäß dem American Joint Committee on Cancer Manual for Staging Cancer, 6th Edition (2002), insbesondere bei einem Tumorpatienten in Stadium IV.

Die Anzahl der Neutrophilen oder Lymphozyten kann ebenso auf einen Wert für eine gute Prognose eingestellt werden, wenn der ursprüngliche Wert des Individuums auf keine gute Prognose hinweist. Deshalb ist das Krebspatient-Individuum ein Individuum, das eine Behandlung zur Reduktion der Neutrophilen erhalten hat, vorzugsweise ausgewählt aus einem oder mehreren von Neutrophilen-reduzierender Apherese, Bestrahlungstherapie oder Verabreichung von Neutrophilen-reduzierenden Mitteln, insbesondere chemotherapeutischen Medikamenten, monoklonalen Antikörpern gegen Neutrophilenmarker, immun-modulierenden Medikamenten, Zytokinen oder Mischungen davon. Mit solchen geeigneten Verfahren ist es möglich, die Werte der Neutrophilen im peripheren Blut zu modulieren, z.B. auf niedriger bzw. gleich  $5,0 \times 10^9$  pro Liter Blut. Eine solche vorübergehende Modulation der Anzahl der weißen

Blutkörperchen („white blood cells“, WBCs) bei Krebspatienten könnte z.B. unmittelbar vor dem Beginn einer Krebstherapie, insbesondere vor einer Krebs-Immuntherapie (entgegen allem üblichen Verständnis der durch ein beschädigtes Immunsystem hervorgerufenen Probleme für Krebsimpfungen) durchgeführt werden und könnte dann zu einem Überlebensvorteil führen. Wie oben angeführt, könnte dies durch mehrere Mittel erreicht werden:

- Apheresetechniken, um vorübergehend die Anzahl der Neutrophilen zu verringern
- Bestrahlungstechniken, um vorübergehend die Anzahl der Neutrophilen zu verringern
- Vorbehandlung mit Mitteln, die die Anzahl der Neutrophilen verringern, wie chemotherapeutische Medikamente, monoklonale Antikörper gegen Lymphozytenmarker (z.B. OKT-3, anti-CD25 MAks), immun-modulierende Medikamente, Zytokine oder Mischungen davon in einer Menge, die die Anzahl der Neutrophilen effektiv auf den gewünschten Wert für eine gute Prognose bringt.

Alternativ dazu kann die Zellzahl, insbesondere die der Lymphozyten, durch geeignete Methoden erhöht werden. Das kann daher bevorzugt sein, wenn das Individuum ein Individuum ist, das eine Behandlung zur Steigerung der Lymphozytenzahl erhalten hat, vorzugsweise eine Gabe von IL-2 oder eine Verabreichung von Lymphozyten.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Feststellung der Prognose eines erhöhten klinischen Nutzens für ein Individuum, das an einem Tumor erkrankt ist, vorgesehen, welches Verfahren umfasst:

- Bereitstellen einer Blutprobe des Individuums,
- (a1) Bestimmen der Anzahl der Lymphozyten im Blut des Individuums, und
- (a2) Bestimmen der Anzahl der Neutrophilen im Blut des Individuums, und
- (b1) Identifizieren als ein Individuum mit guter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Lymphozyten höher als ein Lymphozyten-Grundlinien-Level von  $1,4 \text{ bis } 1,8 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere höher als  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut ist (auch, wenn die Anzahl der Neutrophilen über  $4,0 \text{ bis } 6,0 \times 10^9$  pro Liter Blut liegt, insbesondere über  $5,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut); oder

- (b2) Identifizieren als ein Individuum mit guter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Neutrophilen niedriger oder gleich einem Neutrophilen-Grundlinien-Level von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $5,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut ist (auch, wenn die Anzahl der Lymphozyten niedriger oder gleich  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  pro Liter Blut ist, insbesondere niedriger oder gleich  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut); oder
- (b3) Identifizieren als ein Individuum mit schlechter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Lymphozyten niedriger oder gleich einem Lymphozyten-Grundlinien-Level von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut ist und die Anzahl der Neutrophilen höher als ein Neutrophilen-Grundlinien-Level von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere höher als  $5,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut ist.

Ein bevorzugter Parameter im Bereich der vorliegenden Erfindung ist ein zusammengesetzter Parameter, der auf der Differenz der Anzahl der Neutrophilen und der Lymphozyten basiert. Dieser Parameter hat sich als sehr wirksam für eine gute Aussagekraft bezüglich der Prognose erwiesen. Demzufolge ist es bevorzugt, dass die Differenz der Anzahl der Neutrophilen und der Lymphozyten (neutrophils minus lymphocytes; NML) bestimmt wird, und:

- (b4) das Individuum als ein Individuum mit guter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen definiert wird, wenn NML niedriger oder gleich einem NML-Grundlinien-Level von  $2,4$  bis  $4,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut ist, insbesondere niedriger oder gleich  $3,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut ist; oder
- (b5) das Individuum als ein Individuum mit schlechter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen identifiziert wird, wenn NML höher als ein NML-Grundlinien-Level von  $2,4$  bis  $4,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut ist, insbesondere höher als  $3,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut.

Das vorliegende Verfahren ist spezifisch geeignet für das Entwerfen und die Beurteilung von klinischen Studien, um die Wirksamkeit einer gegebenen Tumor-Behandlung zu beweisen, indem Individuen in spezifische Gruppen eingeteilt werden, die nach den Parametern an der Grundlinie gemäß der vorliegenden Erfindung selektiert und bestimmt werden. Das ergibt eine effiziente Ein-

teilung, die nicht auf einem unbekannten und daher unberücksichtigten Prognose-Faktor einer Gruppe basiert, was eine angemessene Beurteilung der Krebsbehandlung schwierig machen würde. Diese Einteilung in Gruppen kann auch im Nachhinein gemacht werden, weil die Zahl der Lymphozyten und Neutrophilen routinemäßig in allen klinischen Studien, in die Tumorpatienten eingebunden sind, gemessen werden. Die Ergebnisse kontrollierter klinischer Studien können bei möglichen Unausgewogenheiten korrigiert werden unter Beachtung der hier beschriebenen Prognose-Faktoren unter Verwendung von statistischen Methoden, wie der Cox-Regressionsanalyse. Gemäß einem spezifischen Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Durchführung klinischer Studien für eine Tumor-Behandlung, umfassend das Einteilen von Individuen in eine Gruppe mit einer Lymphozytenanzahl über einem Lymphozyten-Grundlinien-Level und eine Gruppe mit einer Lymphozytenzahl unter oder gleich einem Lymphozyten-Grundlinien-Level, welcher Lymphozyten-Grundlinien-Level ein Wert von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  Lymphozyten pro Liter Blut, insbesondere  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut ist.

Infolgedessen betrifft die vorliegenden Erfindung auch ein Verfahren zur Durchführung klinischer Studien für eine Tumor-Behandlung, umfassend das Einteilen von Individuen in eine Gruppe mit einer Neutrophilenzahl über einem Neutrophilen-Grundlinien-Level und eine Gruppe mit einer Neutrophilenzahl unter oder gleich einem Neutrophilen-Grundlinien-Level, welcher Neutrophilen-Grundlinien-Level ein Wert von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut, insbesondere  $5,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut ist.

Die Erfindung erwägt auch ein Verfahren zur Durchführung klinischer Studien für eine Tumor-Behandlung, umfassend das Einteilen von Individuen in eine Gruppe mit einer Lymphozytenzahl über einem Lymphozyten-Grundlinien-Level, welcher Lymphozyten-Grundlinien-Level ein Wert von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  Lymphozyten pro Liter Blut, insbesondere  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut ist, und mit einer Neutrophilenzahl niedriger oder gleich einem Neutrophilen-Grundlinien-Level, welcher Neutrophilen-Grundlinien-Level ein Wert von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  Neutrophilen pro Liter Blut, insbesondere  $5,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, ist.

Gemäß der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zur Durchführung klinischer Studien für eine Tumor-Behandlung vorgesehen, welches das Einteilen von Individuen in eine Gruppe mit

einem NML niedriger oder gleich einem NML-Grundlinien-Level von  $2,4$  bis  $4,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $3,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut, und eine Gruppe mit einem NML höher als ein NML-Grundlinien-Level von  $2,4$  bis  $4,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut, insbesondere höher als  $3,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut, umfasst.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Durchführung klinischer Studien für eine Tumor-Behandlung, umfassend das Einteilen von Individuen in eine Gruppe mit einer Lymphozytenzahl niedriger oder gleich einem Lymphozyten-Grundlinien-Level von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut, und mit einer Neutrophilenzahl höher als ein Neutrophilen-Grundlinien-Level von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere höher als  $5,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Reanalyse der Ergebnisse klinischer Studien für eine Tumor-Behandlung, umfassend das Einteilen von Individuen in eine Gruppe mit einer Lymphozytenzahl niedriger oder gleich einem Lymphozyten-Grundlinien-Level, und eine Gruppe mit einer Lymphozytenzahl über einem Lymphozyten-Grundlinien-Level, welcher Lymphozyten-Grundlinien-Level ein Wert von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  Lymphozyten pro Liter Blut, insbesondere  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut ist, und die Reevaluierung der Wirksamkeit der klinischen Studie auf Basis dieser Gruppierung aufgrund der Lymphozytenzahlen.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Reanalyse der Ergebnisse klinischer Studien für eine Tumor-Behandlung, umfassend das Einteilen von Individuen in eine Gruppe mit einer Neutrophilenzahl höher als ein Neutrophilen-Grundlinien-Level und eine Gruppe mit einer Neutrophilenzahl niedriger oder gleich einem Neutrophilen-Grundlinien-Level, welcher Neutrophilen-Grundlinien-Level ein Wert von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut, insbesondere  $5,0 \times 10^9$  pro Liter Blut ist, und die Reevaluierung der Wirksamkeit der klinischen Studie auf Basis dieser Gruppierung aufgrund der Neutrophilenzahl.

Ein spezifisches Verfahren zum Reanalysieren der Ergebnisse klinischer Studien für eine Tumor-Behandlung gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst das Einteilen von Individuen in eine Gruppe mit einem NML niedriger oder gleich einem NML-Grundlinien-

Level von  $2,4$  bis  $4,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $3,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut, und eine Gruppe mit einem NML höher als ein NML-Grundlinien-Level von  $2,4$  bis  $4,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut, insbesondere höher als  $3,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut.

Ein weiteres spezifisches Verfahren zum Reanalysieren der Ergebnisse klinischer Studien für eine Tumor-Behandlung gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst das Einteilen von Individuen in eine Gruppe mit einer Lymphozytenzahl niedriger oder gleich einem Lymphozyten-Grundlinien-Level von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut, und mit einer Neutrophilenzahl höher als ein Neutrophilen-Grundlinien-Level von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere höher als  $5,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut.

Diese Verfahren zur Durchführung oder zur Reanalyse klinischer Studien erwiesen sich als effektiv bei Kolorektalkrebsstudien, sind aber prinzipiell für alle Krebsstudien anwendbar, speziell für solche Krebsarten, die primär nicht das Immunsystem selbst einbinden (bösartige Erkrankungen des blutbildenden Systems, wie z.B. Leukämie). Vorzugsweise sind die Tumorpatienten menschliche Tumorpatienten in Stadium III oder IV eines dieser Tumoren, klassifiziert gemäß dem American Joint Committee on Cancer Manual for Staging Cancer, 6th Edition (2002), insbesondere ein Tumorpatient in Stadium IV.

Die Durchführung oder Reanalyse klinischer Studien wird oft mit Unterstützung professioneller Firmen unternommen, die ihren Kunden elektronische Datenbanken oder Systeme für solche klinische Studien anbieten. Beispiele für solche Datenbanken oder Systeme sind z.B. in US 2002/0143577 A1, US 6,820,235 B1, US 6,904,434 B1, und vielen darin zitierten Dokumenten geoffenbart. Die vorliegende Erfindung betrifft also auch solche Datenspeichermittel, die in Verbindung mit klinischen Studien verwendet oder angeboten werden, bei denen Patienten wie gemäß der vorliegenden Erfindung definiert in Gruppen eingeteilt werden (sowie auf die Computer, auf denen diese Datenspeichersysteme laufen oder betreibbar sind).

Gemäß einem anderen Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung eines Individuums, das an einem Tumor erkrankt ist, als Individuum mit einer guten Prognose für eine verbesserte Gesamtüberlebenszeit, umfassend

- Bereitstellen einer Blutprobe des Individuums,
- Bestimmen der Anzahl der Neutrophilen und der Anzahl der Lymphozyten im Blut des Individuums, und
- Identifizieren als ein Individuum mit guter Prognose für eine verbesserte Gesamtüberlebenszeit, wenn die Differenz der Anzahl der Neutrophilen und der Anzahl der Lymphozyten niedriger oder gleich einem Neutrophilen-minus-Lymphozyten-Grundlinien-Level von  $3,0$  bis  $4,0 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $3,4 \times 10^9$  pro Liter Blut ist.

Wie schon oben erwähnt, ist dieses Verfahren bei Patienten mit Kolorektalkrebs bevorzugt. Dieses Verfahren ist spezifisch geeignet für Patienten in späteren Stadien der Erkrankung, z.B. Tumorpatienten in Stadium III oder IV des Tumors, klassifiziert gemäß dem American Joint Committee on Cancer Manual for Staging Cancer, 6th Edition (2002), insbesondere für einen Tumorpatienten in Stadium IV.

Die vorliegende Erfindung ist weiters in den folgenden Beispielen und Figuren beschrieben, ohne jedoch darauf eingeschränkt zu sein.

Fig. 1 zeigt den Einfluss der Grundlinien-Neutrophilen-Zahl auf das Gesamtüberleben aller Plazebopatienten;

Fig. 2 zeigt den Einfluss der Grundlinien-Neutrophilen-Zahl auf das Gesamtüberleben aller Plazebopatienten in Stadium IV;

Fig. 3 zeigt den Einfluss der Grundlinien-Neutrophilen-Zahl auf das Gesamtüberleben aller Plazebopatienten in Stadium IV mit Kolorektalkarzinom;

Fig. 4 zeigt den Einfluss der Grundlinien-Lymphozyten-Zahl auf das Gesamtüberleben aller Plazebopatienten;

Fig. 5 zeigt den Einfluss der Grundlinien-Lymphozyten-Zahl auf das Gesamtüberleben aller Plazebopatienten in Stadium IV;

Fig. 6 zeigt den Einfluss der Grundlinien-Lymphozyten-Zahl auf das Gesamtüberleben aller Plazebopatienten in Stadium IV mit Kolorektalkarzinom;

Fig. 7 zeigt den Einfluss der Grundlinien-Neutrophilen-minus-Lymphozyten-Zahl auf das Gesamtüberleben aller Plazebopatienten;

Fig. 8 zeigt den Einfluss der Grundlinien-Neutrophilen-minus-Lymphozyten-Zahl auf das Gesamtüberleben aller Plazebopatienten in Stadium IV;

**NACHGEREICHT**

Fig. 9 zeigt den Einfluss der Grundlinien-Neutrophilen-minus-Lymphozyten-Zahl auf das Gesamtüberleben aller Placebopatienten in Stadium IV mit Kolorektalkarzinom;

Fig. 10 zeigt den Einfluss der Grundlinien-Neutrophilen- oder Lymphozyten-Zahl auf das Gesamtüberleben aller Placebopatienten;

Fig. 11 zeigt den Einfluss der Grundlinien-Neutrophilen- oder Lymphozyten-Zahl auf das Gesamtüberleben aller Placebopatienten in Stadium IV;

Fig. 12 zeigt den Einfluss der Grundlinien-Neutrophilen- oder Lymphozyten-Zahl auf das Gesamtüberleben aller Placebopatienten in Stadium IV mit Kolorektalkarzinom;

### **Beispiele:**

Die vorliegenden Untersuchungen basieren auf einem Datensatz im Zusammenhang mit einer abgeschlossenen und daher geöffneten, doppelt-blinden Placebo-kontrollierten Phase IIb-Studie mit dem Krebsimpfstoff IGN101 (Himmeler et al., Proceedings ASCO 2005, Abstract # 2555, „A randomized placebo-controlled phase II study with the cancer vaccine candidate IGN101 in patients with epithelial cancers“) bei Patienten mit epithelialen Krebsarten. Für die vorliegenden Analysen wurden nur Daten von Patienten, die auf Placebo randomisiert wurden, verwendet, um einen möglichen Einfluss des getesteten Impfstoffes IGN101 auf den weiteren Krankheitsverlauf auszuschließen. Daher ist anzunehmen, dass die Ergebnisse repräsentativ sind. Da für die Auslösung einer Immunantwort weiße Blutkörperchen von entscheidender Bedeutung sind, werden bei den in diesem Beispiel beschriebenen Untersuchungen standardgemäße weiße Blutbilder verwendet, insbesondere die Anzahl von Lymphozyten und Neutrophilen.

### **Methoden:**

Um in dieser Placebo-kontrollierten Phase IIb-Studie Wirksamkeit, Sicherheit, Verträglichkeit und Immunogenität mehrerer Dosen von IGN101 zu evaluieren, wurden die vorliegenden Werte für Leukozyten-, Neutrophilen- und Lymphozytenzahlen analysiert. Grundsätzlich basieren die Analysen auf der Intention To Treat (ITT) - Population. Die tatsächlich verwendete Anzahl von Patienten ist immer in dem entsprechenden Abschnitt angeführt. Diese Zahlen können zu einem geringen Grad von der ITT-Gruppe, wie diese im offiziellen Studienbericht definiert ist, abweichen, da (sehr wenige) Patienten mit fehlenden Grundlinien-Parametern oder das

Todesdatum betreffenden Informationen ausgelassen werden mussten.

Zu den Berechnungen und Darstellungen der Figuren wurden folgende Software-Programme angewandt:

- Tabellen: MS Excel
- Kaplan-Meier-Überlebenskurven: GraphPad Prism 4
- Cox-Regressionsanalyse: Internet:  
<http://members.aol.com/johnp71/prophaz2.html>

### Ergebnisse:

Analyse der Parameter mit möglichem prognostischem Wert für das Gesamtüberleben (OS; overall survival)

1. Alle Plazebo-Patienten: Neutrophilen-Anzahl an der Grundlinie

Der Hauptanteil der Leukozyten im peripheren Blut sind Neutrophile. Die Patienten wurden in zwei Gruppen geteilt mit einem Schwellenwert („threshold“) von  $5,0 \times 10^9$  Neutrophilen pro Liter, an der Grundlinie gemessen. Die entsprechenden Kaplan-Meier-Ergebnisse für alle Plazebopatienten sind in Fig. 1 dargestellt.

Der beobachtete Unterschied der Überlebenskurven ist hoch statistisch signifikant ( $P = 0,0018$  log-rank; mittleres Überleben 253 versus 717 Tage). Patienten in Stadium III (die generell ein höheres OS als Stadium IV-Patienten haben) sind vorwiegend in der Gruppe mit den niedrigeren Neutrophilenzahlen. Die Verteilung der Patienten in den beiden analysierten Gruppen ist folgende:

|              | < 5 |        | > 5 |        |
|--------------|-----|--------|-----|--------|
| Stadium III: | 43  | 36,4 % | 11  | 9,3 %  |
| Kolon:       | 18  |        | 5   |        |
| Rektum:      | 12  |        | 1   |        |
| NSCLC:       | 5   |        | 5   |        |
| Magen:       | 6   |        | 0   |        |
| andere:      | 2   |        | 0   |        |
| Stadium IV:  | 30  | 25,4 % | 34  | 28,8 % |
| Kolon:       | 17  |        | 8   |        |
| Rektum:      | 8   |        | 13  |        |
| NSCLC:       | 1   |        | 8   |        |
| Magen:       | 3   |        | 4   |        |
| andere:      | 1   |        | 1   |        |

In der Cox-Regressionsanalyse mit Karnofsky Performance Status (KPS), Neutrophilen-Anzahl an der Grundlinie und Stadium (III oder IV) als Parameter ist die Anzahl der Neutrophilen ein statistisch signifikanter unabhängiger Prädiktor für das OS. Niedrigere Neutrophilen-Zahlen an der Grundlinie sind mit einem verbesserten Überleben verbunden:

| Var         | Koeff.  | StdErr | p      | Lo95%   | Hi95%   |
|-------------|---------|--------|--------|---------|---------|
| Neutrophile | 0,1133  | 0,0514 | 0,0276 | 0,0130  | 0,2135  |
| KPS         | -0,0887 | 0,0232 | 0,0001 | -0,1340 | -0,0433 |
| Stadium     | 1,3042  | 0,3056 | 0,0000 | 0,7083  | 1,9002  |

## 2. Plazebopatienten in Stadium IV: Anzahl der Neutrophilen an der Grundlinie

Als nächstes wurde der Einfluss der Anzahl der Neutrophilen an der Grundlinie auf das OS nur bei Patienten in Stadium IV evaluiert, wobei dieselben Grundlagen wie in 1. beschrieben verwendet wurden. Die Kaplan-Meier-Ergebnisse sind in Fig. 2 dargestellt.

Der Unterschied der Überlebenskurven ist nahezu statistisch signifikant ( $P = 0,0851$  log-rank; mittleres Überleben 227 versus 365 Tage). In der Cox-Regressionsanalyse jedoch, mit KPS und Anzahl der Neutrophilen an der Grundlinie als Parameter, um den Einfluss des KPS auf das OS zu korrigieren, stellt sich die Anzahl der Neutrophilen als ein hoch statistisch unabhängiger Prädiktor für das OS heraus. Eine niedrigere Anzahl von Neutrophilen an der Grundlinie ist mit einem verbesserten Überleben verbunden.

| Var         | Koeff.  | StdErr | p      | Lo95%   | Hi95%   |
|-------------|---------|--------|--------|---------|---------|
| Neutrophile | 0,1599  | 0,0586 | 0,0064 | 0,0456  | 0,2742  |
| KPS         | -0,0783 | 0,0265 | 0,0032 | -0,1300 | -0,0266 |

## 3. Plazebopatienten mit Kolorektalkrebs (CRC) in Stadium IV: Anzahl der Neutrophilen an der Grundlinie

Der Einfluss der Anzahl der Neutrophilen an der Grundlinie auf das OS der Patienten mit Kolorektalkrebs in Stadium IV wurde ebenfalls evaluiert, wobei dieselben Grundlagen wie in 1. beschrieben verwendet wurden. Die jeweiligen Kaplan-Meier-Ergebnisse sind in Fig. 3 dargestellt.

Gemäß dieser Kaplan-Meier-Analyse sind die beobachteten kleinen Unterschiede in den Überlebenskurven nicht signifikant. Wenn jedoch die Daten im Hinblick auf einen möglichen Einfluss

des KPS auf das OS durch die Cox-Regressionsanalyse mit den Neutrophilen-Zahlen an der Grundlinie und KPS als Deskriptoren korrigiert werden, erscheint die Anzahl der Neutrophilen wiederum als ein signifikanter unabhängiger Prädiktor für das OS. Niedrigere Neutrophilen-Zahlen stehen in Zusammenhang mit einem verbesserten Überleben:

| Var         | Koeff.  | StdErr | p      | Lo95%   | Hi95%   |
|-------------|---------|--------|--------|---------|---------|
| Neutrophile | 0,1961  | 0,0799 | 0,0141 | 0,0403  | 0,3520  |
| KPS         | -0,0644 | 0,0298 | 0,0307 | -0,1225 | -0,0063 |

#### 4. Alle Placebopatienten: Anzahl der Lymphozyten an der Grundlinie

Die Leukozyten des peripheren Bluts bestehen im Allgemeinen aus Neutrophilen (üblicherweise die größte Fraktion), Monozyten und Lymphozyten. Da die Lymphozyten (insbesondere die B- und T-Zellen) besonders wichtig für die Entstehung einer Immunantwort und das Aufrechterhalten der Immunität sind, wurde auch eine Reihe von Analysen mit der Anzahl der Lymphozyten an der Grundlinie durchgeführt, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben. Dazu wurden die Patienten in zwei Gruppen geteilt mit einem Schwellenwert von  $1,6 \times 10^9$  Lymphozyten pro Liter, an der Grundlinie gemessen. Die entsprechenden Kaplan-Meier-Ergebnisse für alle Placebo-Patienten sind in Fig. 4 dargestellt.

Der Unterschied in den Überlebenskurven ist fast statistisch signifikant. Im Gegensatz zu den mit Neutrophilen und Leukozyten erhaltenen Ergebnissen, wo niedrigere Zellzahlen an der Grundlinie mit einem längeren OS verbunden waren, haben Patienten gemäß dieser Analyse offensichtlich ein längeres OS, wenn eine höhere Anzahl an Lymphozyten an der Grundlinie festgestellt werden kann. Die Verteilung der Patienten in den beiden analysierten Gruppen ist folgende:

|              | < 1,6 |        | > 1,6 |        |
|--------------|-------|--------|-------|--------|
| Stadium III: | 18    | 15,3 % | 36    | 30,5 % |
| Kolon:       | 7     |        | 16    |        |
| Rektum:      | 6     |        | 7     |        |
| NSCLC:       | 3     |        | 7     |        |
| Magen:       | 2     |        | 4     |        |
| andere:      | 0     |        | 2     |        |

|             |    |        |    |        |
|-------------|----|--------|----|--------|
| Stadium IV: | 27 | 22,9 % | 37 | 31,4 % |
| Kolon:      | 5  |        | 20 |        |
| Rektum:     | 12 |        | 9  |        |
| NSCLC:      | 6  |        | 3  |        |
| Magen:      | 4  |        | 3  |        |
| andere:     | 0  |        | 2  |        |

In der Cox-Regressionsanalyse jedoch mit KPS und Anzahl der Lymphozyten an der Grundlinie und dem Stadium (III oder IV) als Parameter scheint die Anzahl der Lymphozyten kein signifikanter unabhängiger Prädiktor für das OS zu sein, nur KPS und das Stadium sind unabhängige Prädiktoren. Wahrscheinlich ist eine niedrigere Anzahl von Lymphozyten mit einem niedrigeren KPS verbunden:

| Var         | Koeff.  | StdErr | p      | Lo95%   | Hi95%   |
|-------------|---------|--------|--------|---------|---------|
| Lymphozyten | -0,1267 | 0,1662 | 0,4457 | -0,4508 | 0,1973  |
| KPS         | -0,0922 | 0,0233 | 0,0001 | -0,1377 | -0,0468 |
| Stadium     | 1,3371  | 0,3061 | 0,0000 | 0,7402  | 1,9340  |

5. Plazebopatienten in Stadium IV: Anzahl der Lymphozyten an der Grundlinie

Eine ähnliche Analyse wurde in der homogeneren Gruppe aller Stadium IV-Patienten der Plazebo-Gruppe durchgeführt. Die Kaplan-Meier-Ergebnisse sind in Fig. 5 dargestellt.

Die beobachteten Unterschiede in den Überlebenskurven sind signifikant. Jedoch in der Cox-Regressionsanalyse mit KPS und Anzahl der Lymphozyten an der Grundlinie als Parameter scheint die Anzahl der Lymphozyten kein signifikanter unabhängiger Prädiktor für das OS zu sein, eine Tendenz ist jedoch zu sehen. Offensichtlich stehen KPS und die Anzahl der Lymphozyten in einem Zusammenhang:

| Var | Koeff.  | StdErr | p      | Lo95%   | Hi95%   |
|-----|---------|--------|--------|---------|---------|
| 1   | -0,0809 | 0,0264 | 0,0022 | -0,1324 | -0,0294 |
| 2   | -0,2702 | 0,1967 | 0,1695 | -0,6537 | 0,1134  |

6. Plazebopatienten mit Kolorektalkrebs in Stadium IV: Anzahl der Lymphozyten an der Grundlinie

Die Kaplan-Meier-Ergebnisse dieser Analyse von CRC IV-Patienten als die einheitlichste Gruppe sind in Fig. 6 dargestellt.

Der beobachtete Unterschied in den Überlebenskurven ist nicht signifikant. Auch in der Cox-Regressionsanalyse mit KPS und

Anzahl der Lymphozyten an der Grundlinie als Parameter scheint die Anzahl der Lymphozyten kein signifikanter unabhängiger Prädiktor für das OS zu sein, eine Tendenz ist jedoch zu sehen.

| Var    | Koeff.  | StdErr | p      | Lo95%   | Hi95%   |
|--------|---------|--------|--------|---------|---------|
| KPS    | -0,0656 | 0,0311 | 0,0350 | -0,1263 | -0,0049 |
| Lympho | -0,3323 | 0,2358 | 0,1589 | -0,7922 | 0,1276  |

7. Alle Plazebopatienten: Grundlinien-Neutrophilen-Zahl minus Lymphozyten-Zahl

Gemäß den bisher beschriebenen Ergebnissen hat sowohl die Anzahl der Neutrophilen als auch die Anzahl der Lymphozyten einen gewissen prognostischen Wert, niedrigere Zahlen von Neutrophilen und höhere Zahlen von Lymphozyten sind mit einem erhöhten OS verbunden. Eine ebenfalls beobachtete prognostische Bedeutung der Gesamtleukozytenzahl (niedrigere Leukozytenzahlen sind mit einem verbesserten OS verbunden) wird daher hauptsächlich durch die Anzahl der Neutrophilen bestimmt.

Um die Lymphozyten- und Neutrophilen-Ergebnisse optimal in einem einzigen Parameter anzuwenden, wird die Differenz zwischen der Anzahl der Neutrophilen und der Anzahl der Lymphozyten als neuer Parameter eingeführt (Abkürzung NML für Neutrophile minus Lymphozyten). Obwohl NML vermutlich keine direkte biologische Korrelation hat, sollte dieser Faktor das prognostische Potential verstärken, da niedrige Werte für Neutrophile und hohe Werte für Lymphozyten für ein besseres OS benötigt werden. Der für NML verwendete Schwellenwert von  $3,4 \times 10^9$  pro Liter wurde aus den für die Einzelanalysen verwendeten Schwellenwerten  $[(5,0-1,6) \times 10^9$  pro Liter] abgeleitet.

Die Kaplan-Meier-Ergebnisse für alle Plazebopatienten unter Anwendung von Grundlinien-NML als prognostischer Parameter sind in Fig. 7 dargestellt.

Wie erwartet führte dieser Parameter zu deutlichen Unterschieden im OS. In ähnlicher Weise wurde auch eine hohe Signifikanz in der Cox-Regressionsanalyse gefunden. Niedrigere NML-Werte sind eng verbunden mit verbessertem OS.

| Var     | Koeff.  | StdErr | p      | Lo95%   | Hi95%   |
|---------|---------|--------|--------|---------|---------|
| KPS     | -0,0861 | 0,0234 | 0,0002 | -0,1317 | -0,0404 |
| NML     | 0,1245  | 0,0516 | 0,0158 | 0,0239  | 0,2250  |
| Stadium | 1,2894  | 0,3059 | 0,0000 | 0,6930  | 1,8859  |

#### 8. Plazebopatienten in Stadium IV: NML-Werte an der Grundlinie

Eine ähnliche Analyse wie in Punkt 7. beschrieben wurde auch für Stadium IV-Patienten der Plazebogruppe durchgeführt. Die Kaplan-Meier-Ergebnisse sind in Fig. 8 dargestellt.

Die Ergebnisse sind hoch signifikant. In ähnlicher Weise wurde in der Cox-Regressionsanalyse, mit KPS und NML als Prädiktoren, NML als ein signifikanter unabhängiger prognostischer Parameter beibehalten. Niedrigere Werte sind mit höherem Überleben verbunden:

| Var | Koeff.  | StdErr | p      | Lo95%   | Hi95%   |
|-----|---------|--------|--------|---------|---------|
| KPS | -0,0756 | 0,0268 | 0,0048 | -0,1278 | -0,0233 |
| NML | 0,1715  | 0,0568 | 0,0025 | 0,0608  | 0,2823  |

#### 9. Plazebopatienten mit Kolorektalkrebs in Stadium IV: NML-Werte an der Grundlinie

Unter Beachtung des prognostischen Werts von NML führte die Analyse der CRC IV-Patienten der Plazebo-Gruppe zu sehr ähnlichen Ergebnissen wie oben beschrieben. Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven sind in Fig. 9 dargestellt.

Die Ergebnisse sind wieder hoch signifikant. In der Gruppe mit niedrigerem NML ist die mittlere Überlebenszeit mehr als verdoppelt (395 versus 188 Tage, Gefahrenverhältnis 0,4162). Auch das Ein-Jahres-Überleben ist mehr als doppelt so hoch: 55,2% versus 17,6%. Der Anstieg der beiden Überlebenskurven ist unterschiedlich (wie man auch in den Fig. 7 und 8 sehen kann), was einen höheren Anteil der Langzeit-Überlebenden in der Gruppe mit niedrigerem NML anzeigt.

In der Cox-Regressionsanalyse mit KPS und NML als Prädiktoren bleibt auch bei den CRC IV-Patienten NML als hoch signifikanter unabhängiger prognostischer Parameter erhalten. Niedrigere Werte sind mit verbessertem Überleben verbunden:

| Var | Koeff.  | StdErr | p      | Lo95%   | Hi95%   |
|-----|---------|--------|--------|---------|---------|
| KPS | -0,0625 | 0,0302 | 0,0386 | -0,1214 | -0,0036 |
| NML | 0,2048  | 0,0762 | 0,0072 | 0,0563  | 0,3533  |

#### 10. Alle Plazebopatienten: Kombination einer niedrigen Anzahl von Neutrophilen oder einer hohen Anzahl von Lymphozyten an der Grundlinie

Eine weitere Möglichkeit, die prognostischen Werte von nied-

**NACHGEREICHT**

riger Neutrophilen- und hoher Lymphozytenzahl an der Grundlinie zu kombinieren, ist folgende: Placebopatienten werden in Gruppen gemäß einer Anzahl von Lymphozyten an der Grundlinie von  $> 1,6 \times 10^9$  pro Liter oder einer Anzahl von Neutrophilen an der Grundlinie von  $< 5,0 \times 10^9$  pro Liter aufgeteilt. Folglich haben die übrigen Patienten eine Anzahl von Lymphozyten an der Grundlinie von  $< 1,6 \times 10^9$  pro Liter und eine Anzahl von Neutrophilen an der Grundlinie von  $> 5,0 \times 10^9$  pro Liter. Dieser neuartige zusammengesetzte Parameter wird NOL-LH (Neutrophile oder Lymphozyten-Low High) bezeichnet.

Das entsprechende Kaplan-Meier-Ergebnis basierend auf NOL-LH ist in Fig. 10 dargestellt.

Der Unterschied in den Überlebenskurven ist hoch signifikant. Bemerkenswert ist, dass sich mehr als 80% der Patienten in der Gruppe mit dem verbesserten Überleben befinden. Die Anwendung von NOL-LH scheint zu einer präzisen Auswahl von Patienten mit einer beträchtlich schlechteren Prognose zu führen. Die Verteilung der Patienten ist folgendermaßen:

|              | $\leq 5$ oder $> 1,6$ |        | $> 5$ und $\leq 1,6$ |        |
|--------------|-----------------------|--------|----------------------|--------|
| Stadium III: | 51                    | 43,2 % | 3                    | 2,9 %  |
| Kolon:       | 22                    |        | 1                    |        |
| Rektum:      | 13                    |        | 0                    |        |
| NSCLC:       | 8                     |        | 2                    |        |
| Magen:       | 6                     |        | 0                    |        |
| andere:      | 2                     |        | 0                    |        |
| Stadium IV:  | 46                    | 39,0 % | 18                   | 15,3 % |
| Kolon:       | 23                    |        | 2                    |        |
| Rektum:      | 13                    |        | 8                    |        |
| NSCLC:       | 4                     |        | 5                    |        |
| Magen:       | 4                     |        | 3                    |        |
| andere:      | 2                     |        | 0                    |        |

Im Stadium III gehören 51 von 54 Patienten (94,4%) zu der Gruppe mit guter Prognose. Das ist eine Übereinstimmung mit der generell besseren Prognose von Stadium III-Patienten und zeigt die Aussagekraft des zusammengesetzten Parameters NOL-LH, zwischen Patienten mit guter und schlechter Prognose zu unterscheiden.

den und sogar Tumorstadien mit günstiger Prognose zu „erkennen“, und zwar lediglich auf Basis der Informationen eines bestimmten Musters des weißen Blutbildes im Hinblick auf Neutrophile und Lymphozyten.

11. Plazebopatienten in Stadium IV: Kombination von einer niedrigen Anzahl von Neutrophilen oder einer hohen Anzahl von Lymphozyten an der Grundlinie

Eine ähnliche Analyse wie in Punkt 10 beschrieben wurde auch für Stadium IV-Plazebopatienten alleine durchgeführt. Die Kaplan-Meier-Ergebnisse sind in Fig. 11 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen einen hoch signifikanten Unterschied im Überleben und sind den in Punkt 10 beschriebenen sehr ähnlich. Mehr als 70% der Patienten befinden sich in der Gruppe mit besserer Prognose, was wieder die Fähigkeit des NOL-LH zur Selektion von Patienten mit schlechter Prognose zeigt.

12. Plazebopatienten mit Kolorektalkrebs in Stadium IV: Kombination von einer niedrigen Anzahl von Neutrophilen oder einer hohen Anzahl von Lymphozyten an der Grundlinie

Zum Schluss wurde diese Art der Analyse für die Plazebo-CRC IV-Patienten angewandt. Die Kaplan-Meier-Ergebnisse sind in Fig. 12 dargestellt: die Anwendung des zusammengesetzten Parameters NOL-LH zur Selektion von CRC IV-Patienten führt wieder zu einem hoch signifikanten Unterschied der Überlebenskurven. In der Gruppe mit verbesserter Prognose ist das mittlere Überleben doppelt so hoch (365 versus 184 Tage), und das Ein-Jahres-Überleben ist fünfmal höher (50% versus 10%). Mehr als 75% aller CRC IV-Patienten befinden sich in der Gruppe mit verbessertem Überleben, was wieder die Fähigkeit von NOL-LH zur präzisen Identifizierung von CRC IV-Patienten mit schlechter Prognose zeigt.

13. Zusammenfassung der Ergebnisse prognostische Parameter betreffend

Die folgende Tabelle fasst die P-Werte (Kaplan-Meier-Kurven; log-rank) zusammen, die durch die Leukozyten-, Neutrophilen-, Lymphozyten-, NML- und NOL-LH-Zählungen an der Grundlinie erhalten wurden im Hinblick auf ihre Fähigkeit, Patientengruppen mit verschiedenen Gesamtüberlebenszeiten zu definieren.

NACHGEREICHT

| Schwellenwert (x10E9/L) |                   | P-Werte                               |                                  |                              |
|-------------------------|-------------------|---------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
|                         |                   | alle Plazebo-<br>Patienten<br>(n=118) | Plazebo-<br>Stadium IV<br>(n=64) | Plazebo-<br>CRC IV<br>(n=46) |
| Leukozyten              | 7,5               | 0,0311                                | 0,1297                           | 0,5694                       |
| Neutrophile             | 5                 | 0,0018                                | 0,0851                           | 0,4008                       |
| Lymphozyten             | 1,6               | 0,0561                                | 0,0377                           | 0,247                        |
| <b>NML</b>              | <b>3,4</b>        | <b>&lt;0,0001</b>                     | <b>0,0007</b>                    | <b>0,0057</b>                |
| <b>NOL-LH</b>           | <b>5 oder 1,6</b> | <b>&lt;0,0001</b>                     | <b>&lt;0,0001</b>                | <b>0,0032</b>                |

NOL-LH ist der beste Parameter, um vorausblickend Patienten-  
gruppen mit beträchtlichen Unterschieden in der Prognose für das  
Gesamtüberleben zu definieren, mit hoher statistischer Signifi-  
kanz in allen untersuchten Patientengruppen, eng gefolgt von NML.  
NOL-LH und NML sind beides zusammengesetzte Parameter, die die  
Anzahl von Neutrophilen und Lymphozyten berücksichtigen, was die  
Ergebnisse widerspiegelt, die jeweils mit den einzelnen Parame-  
tern (niedrigere Anzahl von Neutrophilen und höhere Anzahl von  
Lymphozyten korrelieren mit höherem OS) erhalten wurden.

**Patentansprüche:**

1. Verfahren zur Feststellung der Prognose eines erhöhten klinischen Nutzens für ein Individuum, das an einem Tumor erkrankt ist, welches Verfahren umfasst:

- Bereitstellen einer Blutprobe des Individuums
- (a1) Bestimmen der Anzahl der Lymphozyten im Blut des Individuums und/oder
- (a2) Bestimmen der Anzahl der Neutrophilen im Blut des Individuums, und
- (b1) Identifizieren als ein Individuum mit guter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Lymphozyten höher als ein Lymphozyten-Grundlinien-Level von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere höher als  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut ist; oder
- (b2) Identifizieren als ein Individuum mit guter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Neutrophilen niedriger oder gleich einem Neutrophilen-Grundlinien-Level von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $5,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut ist; oder
- (b3) Identifizieren als ein Individuum mit schlechter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Lymphozyten niedriger oder gleich einem Lymphozyten-Grundlinien-Level von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut ist und die Anzahl der Neutrophilen höher als ein Neutrophilen-Grundlinien-Level von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere höher als  $5,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der erhöhte klinische Nutzen eine verbesserte Gesamtüberlebenszeit ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Anzahl der Lymphozyten  $1,6 \times 10^9$  bis  $5,0 \times 10^9$  pro Liter Blut beträgt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Anzahl der Lymphozyten  $1,6 \times 10^9$  bis  $4,5 \times 10^9$  pro Liter Blut beträgt.

**NACHGEREICHT**

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Anzahl der Neutrophilen  $1,0 \times 10^9$  bis  $5,0 \times 10^9$  pro Liter Blut beträgt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Anzahl der Neutrophilen  $1,7 \times 10^9$  bis  $5,0 \times 10^9$  pro Liter Blut beträgt.

7. Verfahren zur Feststellung der Prognose eines erhöhten klinischen Nutzens für ein Individuum, das an einem Tumor erkrankt ist, welches Verfahren umfasst:

- Bereitstellen einer Blutprobe des Individuums
- (a1) Bestimmen der Anzahl der Lymphozyten im Blut des Individuums und/oder
- (a2) Bestimmen der Anzahl der Neutrophilen im Blut des Individuums, und
- (b1) Identifizieren als ein Individuum mit guter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Lymphozyten höher als ein Lymphozyten-Grundlinien-Level von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere höher als  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut ist; oder
- (b2) Identifizieren als ein Individuum mit guter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Neutrophilen niedriger oder gleich einem Neutrophilen-Grundlinien-Level von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $5,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut ist; oder
- (b3) Identifizieren als ein Individuum mit schlechter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn die Anzahl der Lymphozyten niedriger oder gleich einem Lymphozyten-Grundlinien-Level von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut ist und die Anzahl der Neutrophilen höher als ein Neutrophilen-Grundlinien-Level von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere höher als  $5,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ein epithelialer Tumor, vorzugsweise Brustkrebs, Lungenkrebs, Magenkrebs, Pankreaskarzinom, Prostatakrebs, Ovarialkarzinom oder Kolorektalkrebs, insbesondere Kolo-

**NACHGEREICHT**

rektalkrebs ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Individuum ein Tumorpatient in Stadium III oder IV des Tumors ist, klassifiziert gemäß dem American Joint Committee on Cancer Manual for Staging Cancer, 6th Edition (2002), insbesondere ein Tumorpatient in Stadium IV.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Individuum ein Individuum ist, das eine Behandlung zur Reduktion der Neutrophilen erhalten hat, vorzugsweise ausgewählt aus einem oder mehreren von Neutrophilen-reduzierender Apherese, Bestrahlungstherapie oder Verabreichung von Neutrophilen-reduzierenden Mitteln, insbesondere chemotherapeutischen Medikamenten, monoklonalen Antikörpern gegen Neutrophilenmarker, immunmodulierenden Medikamenten, Cytokinen oder Mischungen davon.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Individuum ein Individuum ist, das eine Behandlung zur Steigerung der Anzahl der Lymphozyten, vorzugsweise eine Verabreichung von IL-2 oder eine Verabreichung von Lymphozyten, erhalten hat.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Differenz der Anzahl der Neutrophilen und der Anzahl der Lymphozyten (Neutrophile minus Lymphozyten; NML) bestimmt wird und

- (b4) Identifizieren als ein Individuum mit guter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn NML niedriger oder gleich einem NML-Grundlinien-Level von  $2,4$  bis  $4,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $3,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut ist; oder
- (b5) Identifizieren als ein Individuum mit schlechter Prognose für einen erhöhten klinischen Nutzen, wenn NML höher als ein NML-Grundlinien-Level von  $2,4$  bis  $4,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut, insbesondere höher als  $3,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut ist.

13. Verfahren zur Durchführung klinischer Studien für eine Tumor-

**NACHGEREICHT**

Behandlung, umfassend das Einteilen von Individuen in eine Gruppe mit einer Lymphozytenanzahl über einem Lymphozyten-Grundlinien-Level und eine Gruppe mit einer Lymphozytenanzahl unter oder gleich einem Lymphozyten-Grundlinien-Level, welcher Lymphozyten-Grundlinien-Level ein Wert von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  Lymphozyten pro Liter Blut, insbesondere  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut ist.

14. Verfahren zur Durchführung klinischer Studien für eine Tumor-Behandlung umfassend das Einteilen von Individuen in eine Gruppe mit einer Neutrophilenanzahl über einem Neutrophilen-Grundlinien-Level und eine Gruppe mit einer Neutrophilenanzahl unter oder gleich einem Neutrophilen-Grundlinien-Level, welcher Neutrophilen-Grundlinien-Level ein Wert von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  Neutrophilen pro Liter Blut, insbesondere  $5,0 \times 10^9$  pro Liter Blut ist.

15. Verfahren zur Durchführung klinischer Studien für eine Tumor-Behandlung, umfassend das Einteilen von Individuen in eine Gruppe mit einer Lymphozytenanzahl über einem Lymphozyten-Grundlinien-Level, welcher Lymphozyten-Grundlinien-Level ein Wert von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  Lymphozyten pro Liter Blut, insbesondere  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut ist, und mit einer Neutrophilenzahl niedriger oder gleich einem Neutrophilen-Grundlinien-Level, welcher Neutrophilen-Grundlinien-Level ein Wert von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut, insbesondere  $5,0 \times 10^9$  pro Liter Blut ist.

16. Verfahren zur Durchführung klinischer Studien für eine Tumor-Behandlung, umfassend das Einteilen von Individuen in eine Gruppe mit einem NML niedriger oder gleich einem NML-Grundlinien-Level von  $2,4$  bis  $4,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $3,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut, und eine Gruppe mit einem NML höher als ein NML-Grundlinien-Level von  $2,4$  bis  $4,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut, insbesondere höher als  $3,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut.

17. Verfahren zur Durchführung klinischer Studien für eine Tumor-Behandlung, umfassend das Einteilen von Individuen in eine Gruppe mit einer Lymphozytenanzahl niedriger oder gleich einem Lymphozyten-Grundlinien-Level von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut, und mit einer Neutrophilenanzahl höher als ein Neutrophili-

NACHGEREICHT

len-Grundlinien-Level von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere höher als  $5,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut.

18. Verfahren zur Reanalyse von Ergebnissen klinischer Studien für eine Tumor-Behandlung, umfassend das Einteilen von Individuen in eine Gruppe mit einer Lymphozytenanzahl niedriger oder gleich einem Lymphozyten-Grundlinien-Level und eine Gruppe mit einer Lymphozytenanzahl höher als ein Lymphozyten-Grundlinien-Level, welcher Lymphozyten-Grundlinien-Level ein Wert von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  Lymphozyten pro Liter Blut, insbesondere  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut ist, und Reevaluieren der Wirksamkeit der klinischen Studie auf Basis dieser Einteilung aufgrund der Lymphozytenanzahl.

19. Verfahren zur Reanalyse von Ergebnissen klinischer Studien für eine Tumor-Behandlung, umfassend das Einteilen von Individuen in eine Gruppe mit einer Neutrophilenanzahl höher als ein Neutrophilen-Grundlinien-Level und eine Gruppe mit einer Neutrophilenanzahl niedriger oder gleich einem Neutrophilen-Grundlinien-Level, welcher Neutrophilen-Grundlinien-Level ein Wert von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut, insbesondere  $5,0 \times 10^9$  pro Liter Blut ist, und Reevaluieren der Wirksamkeit der klinischen Studie auf Basis dieser Einteilung aufgrund der Neutrophilenanzahl.

20. Verfahren zur Reanalyse von Ergebnissen klinischer Studien für eine Tumor-Behandlung, umfassend das Einteilen von Individuen in eine Gruppe mit einem NML niedriger oder gleich einem NML-Grundlinien-Level von  $2,4$  bis  $4,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $3,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut, und eine Gruppe mit einem NML höher als ein NML-Grundlinien-Level von  $2,4$  bis  $4,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut, insbesondere höher als  $3,4 \times 10^9$  Zellen pro Liter Blut.

21. Verfahren zur Reanalyse von Ergebnissen klinischer Studien für eine Tumor-Behandlung, umfassend das Einteilen von Individuen in eine Gruppe mit einer Lymphozytenanzahl niedriger oder gleich einem Lymphozyten-Grundlinien-Level von  $1,4$  bis  $1,8 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $1,6 \times 10^9$  pro Liter Blut, und mit einer Neutrophilenanzahl höher als ein Neutrophilen-Grundlinien-Level von  $4,0$  bis  $6,0 \times 10^9$  pro Liter Blut,

NACHGEREICHT

insbesondere höher als  $5,0 \times 10^9$  Neutrophile pro Liter Blut.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ein epithelialer Tumor, vorzugsweise Brustkrebs, Lungenkrebs, Magenkrebs, Pankreaskarzinom, Prostatakrebs, Ovarialkarzinom oder Kolorektalkrebs, insbesondere Kolorektalkrebs ist.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Patienten Tumorpatienten in Stadium III oder IV des Tumors sind, klassifiziert gemäß dem American Joint Committee on Cancer Manual for Staging Cancer, 6th Edition (2002), insbesondere ein Tumorpatient in Stadium IV.

24. Datenspeichermittel, umfassend eine Einteilung von Individuen in Gruppen, wie in einem der Ansprüche 13 bis 23 definiert.

25. Verfahren zum Identifizieren eines Individuums, das an einem Tumor erkrankt ist, als Individuum mit einer guten Prognose für eine verbesserte Gesamtüberlebenszeit, welches Verfahren umfasst:

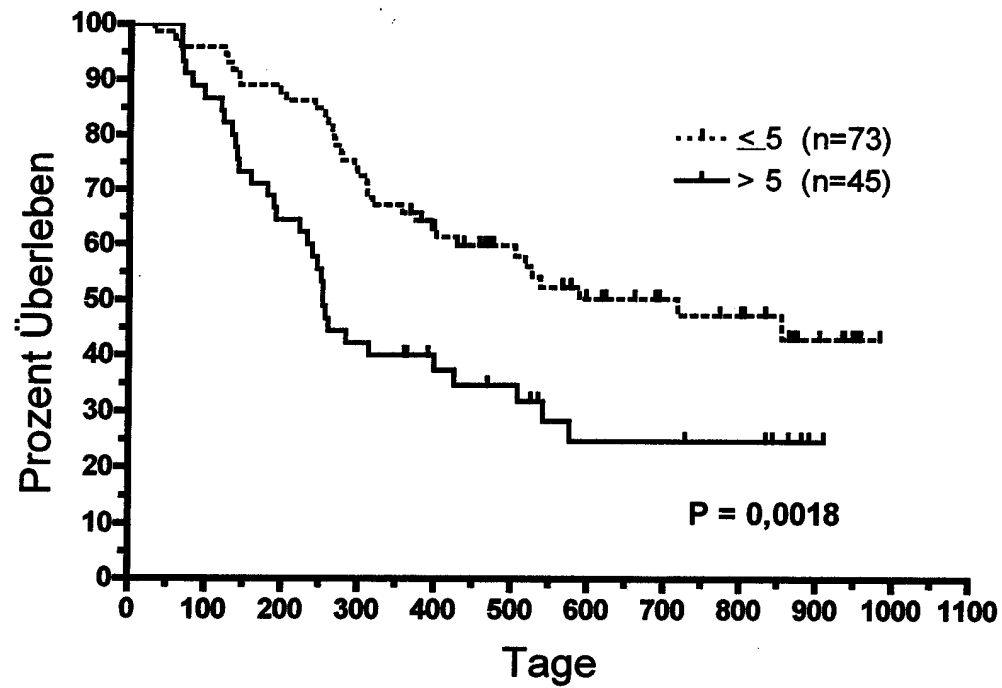
- Bereitstellen einer Blutprobe des Individuums,
- Bestimmen der Anzahl der Neutrophilen und der Anzahl der Lymphozyten im Blut des Individuums und
- Identifizieren als ein Individuum mit guter Prognose für eine verbesserte Gesamtüberlebenszeit, wenn die Differenz der Anzahl der Neutrophilen und der Anzahl der Lymphozyten niedriger oder gleich einem Neutrophilen-minus-Lymphozyten-Grundlinien-Level von  $3,0$  bis  $4,0 \times 10^9$  pro Liter Blut, insbesondere niedriger oder gleich  $3,4 \times 10^9$  pro Liter Blut ist.

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor Kolorektalkrebs ist.

27. Verfahren nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Patienten Tumorpatienten im Stadium III oder IV des Tumors sind, klassifiziert gemäß dem American Joint Committee on Cancer Manual for Staging Cancer, 6th Edition (2002), insbesondere ein Tumorpatient in Stadium IV.

Fig. 1

Alle Patienten, Plazebo (n=118):  
Einfluss der Grundlinien-Neutrophilen-Zahlen auf Gesamtüberleben  
Schwellenwert  $5,0 \times 10^9/L$



1/12

NACHGEREICHT

000001

3

# NACHGEREICHT

A 10x10 grid of dots where the number 8 is formed by black dots. The number 8 is composed of a top loop, a middle horizontal bar, and a bottom loop, all constructed from the dots in the grid.



**P = 0,0851**

# NACHGEREICHT



**P = 0,4008**

# NACHGEREICHT

A 10x10 grid of dots where the number 8888 is formed by removing dots from a full grid. The first four columns contain the digit 8, and the last four columns contain the digit 8.



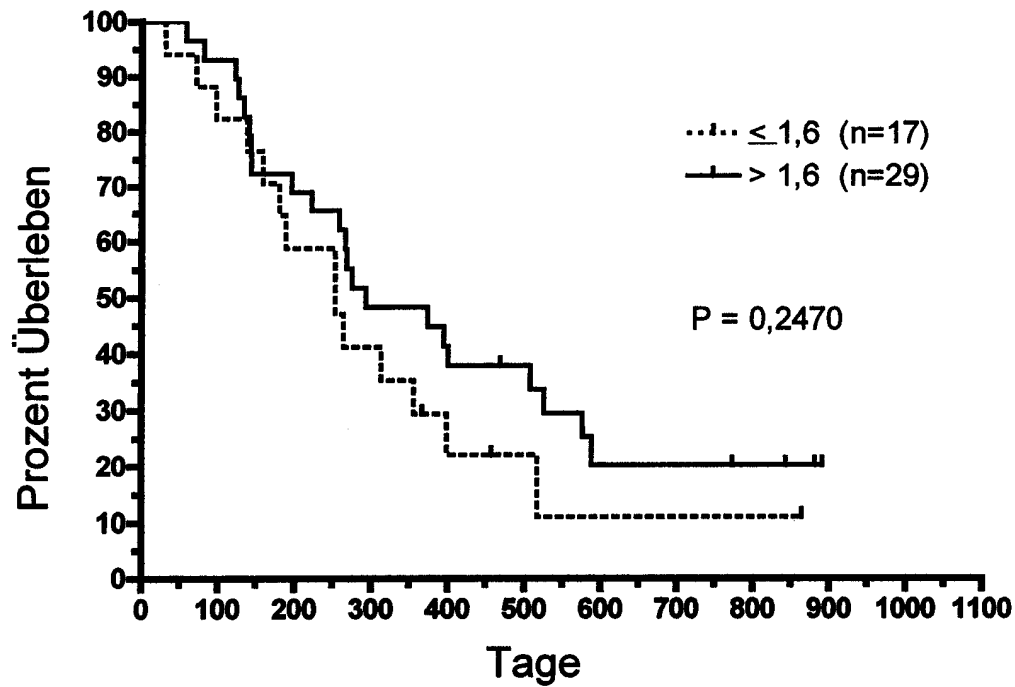
## NACHGEREICHT

A 10x10 grid of dots forming the number 5. The dots are arranged in a pattern that resembles a digital display of the digit 5.



Fig. 6

CRC IV-Patienten, Plazebo (n=46):  
Einfluss der Grundlinien-Lymphozyten-Zahlen auf Gesamtüberleben  
Schwellenwert  $1,6 \times 10^9/L$



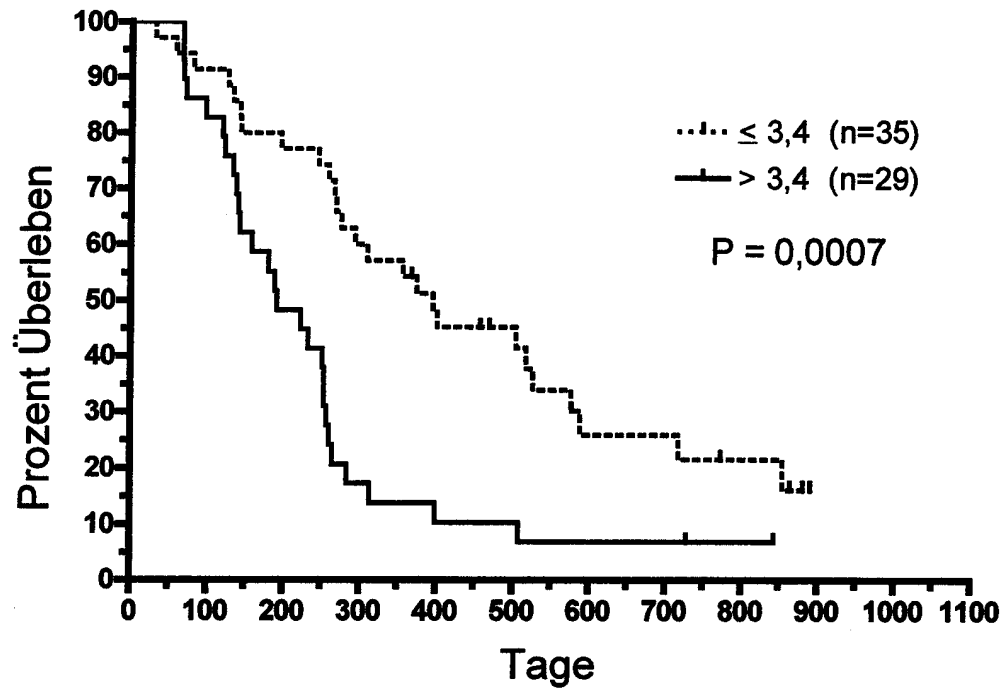
6/12

# NACHGEREICHT



Fig. 8

Stadium IV-Patienten, Plazebo (n=64):  
Einfluss der Grundlinien-Neutrophilen-minus-Lymphozyten-Anzahl auf  
Gesamtüberleben  
Schwellenwert  $3,4 \times 10^9/L$



8/12

NACHGEREICHT

0000000000

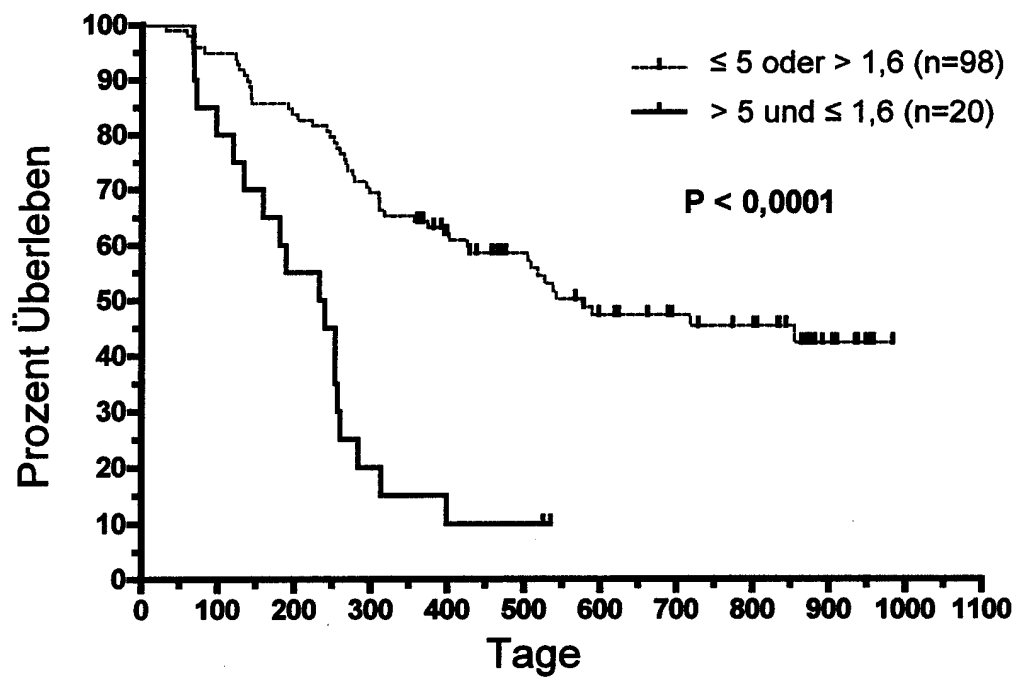
# NACHGEREICHT

A 5x5 grid of dots forming the number 5. The dots are arranged in a pattern that resembles a digital display digit 5.



Fig. 10

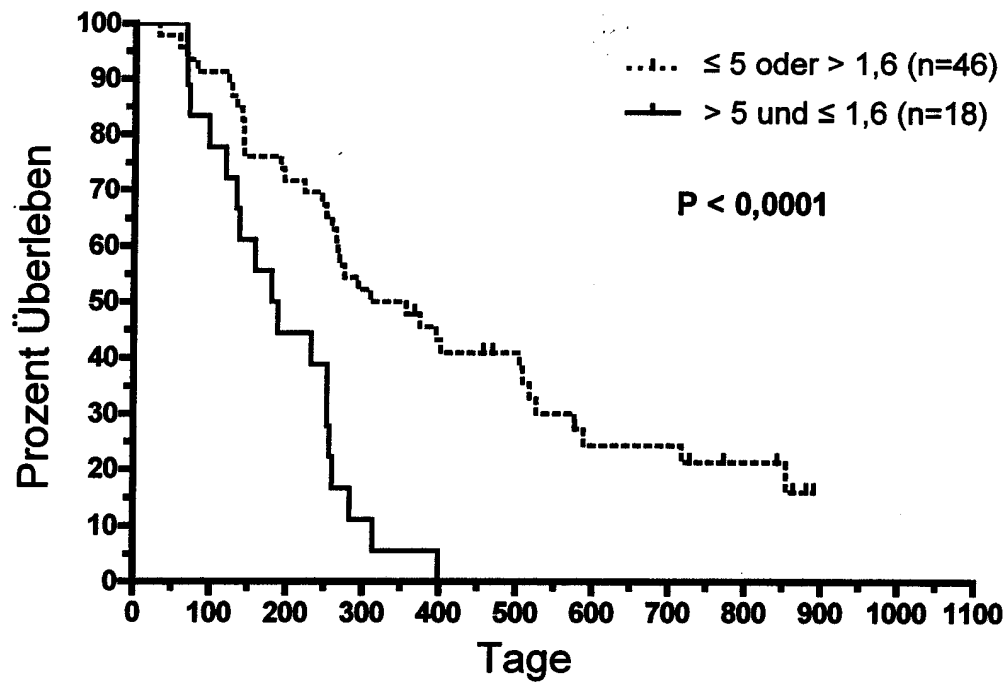
Alle Patienten, Plazebo (n=118):  
Einfluss der Grundlinien-Neutrophilen-Anzahl  $\leq 5,0 \times 10^9/L$   
oder Lymphozyten-Anzahl  $> 1,6 \times 10^9/L$  auf Gesamtüberleben



10/12

Fig. 11

Alle Stadium IV, Plazebo (n=64):  
Einfluss der Grundlinien-Neutrophilen-Anzahl  $\leq 5,0 \times 10^9/L$   
oder Lymphozyten-Anzahl  $> 1,6 \times 10^9/L$  auf Gesamtüberleben



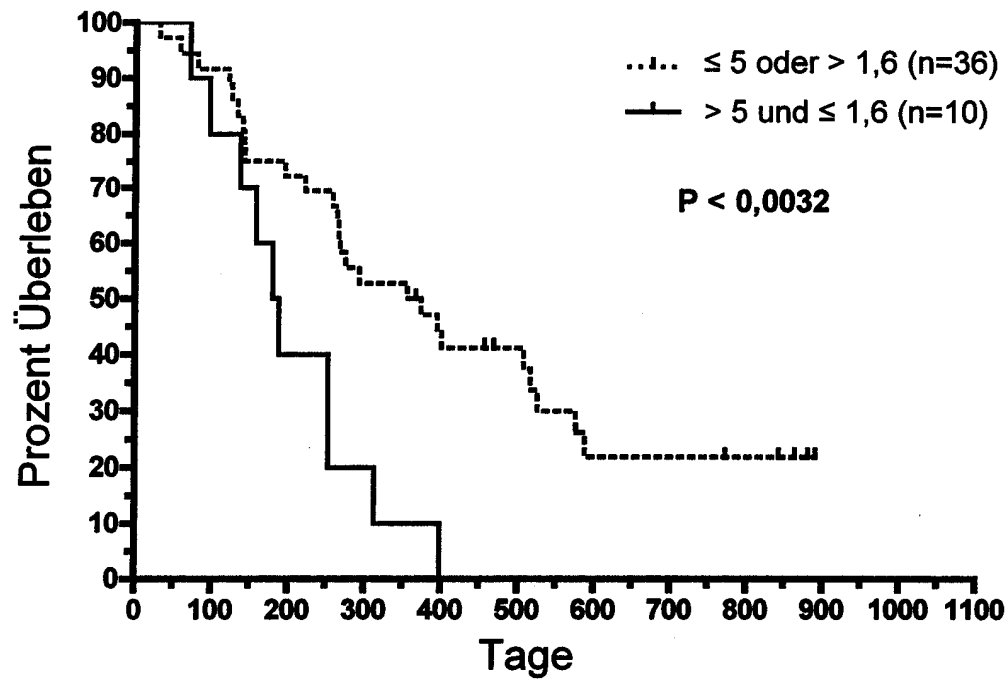
11/12

NACHGEREICHT

0000000000

Fig. 12

CRC IV, Plazebo (n=46):  
Einfluss der Grundlinien-Neutrophilen-Anzahl  $\leq 5,0 \times 10^9/L$   
oder Lymphozyten-Anzahl  $> 1,6 \times 10^9/L$  auf Gesamtüberleben



12/12



|                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC <sup>8</sup> :<br><b>C12Q 1/00 (2006.01); G01N 33/48 (2006.01)</b> |
| Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß ECLA:<br><b>C12Q 1/00, G01N 33/48</b>                                  |
| Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation):<br><b>C12Q, G01N</b>                                                       |
| Konsultierte Online-Datenbank:<br><b>WPI, Medline, Fulltext</b>                                                       |
| Dieser Recherchenbericht wurde zu den am <b>7. März 2007</b> eingereichten Ansprüchen <b>1-27</b> erstellt.           |

| Kategorie <sup>1)</sup> | Bezeichnung der Veröffentlichung:<br>Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum,<br>Textstelle oder Figur soweit erforderlich                       | Betreffend Anspruch |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| X                       | WALSH, S.R. et al. Neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic factor in colorectal cancer. Journal of surgical oncology, 2005, Band 91, Nr. 3, Seiten 181-184.<br><i>das ganze Dokument</i> | 1-27                |
|                         | --                                                                                                                                                                                           |                     |
| X                       | RIESCO, A. et al. Five-year cancer cure: relation to total amount of peripheral lymphocytes and neutrophils. Cancer, 1970, Band 26, Nr. 1, Seiten 135-140.<br><i>das ganze Dokument</i>      | 1-27                |
|                         | --                                                                                                                                                                                           |                     |
| A                       | WO 2002/038189 A1 (MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH) 16. Mai 2002 (16.05.2002)<br><i>Zusammenfassung</i>                                                                   | 1-27                |
|                         | ----                                                                                                                                                                                         |                     |

Datum der Beendigung der Recherche:  
23. Juli 2007

☐ Fortsetzung siehe Folgeblatt

Prüfer(in):  
Mag. MOSSER

<sup>1)</sup> Kategorien der angeführten Dokumente:

- X Veröffentlichung von **besonderer Bedeutung**: der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden.
- Y Veröffentlichung von **Bedeutung**: der Anmeldungsgegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann **nahellegend** ist.

- A Veröffentlichung, die den **allgemeinen Stand der Technik** definiert.
- P Dokument, das von **Bedeutung** ist (Kategorien X oder Y), jedoch **nach dem Prioritätstag** der Anmeldung veröffentlicht wurde.
- E Dokument, das von **besonderer Bedeutung** ist (Kategorie X), aus dem ein **älteres Recht** hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen).
- & Veröffentlichung, die Mitglied der selben **Patentfamilie** ist.