

(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
3. September 2009 (03.09.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/106065 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 33/574 (2006.01)

(74) Anwalt: SIMANDI, Claus; Höhenstrasse 26, 53773
Hennef (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2009/000275

(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, 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.

(22) Internationales Anmeldedatum:
2. März 2009 (02.03.2009)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2008 011 850.8
29. Februar 2008 (29.02.2008) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: MEYER, Helmut E. [DE/DE]; Franzstrasse
15, 45661 Recklinghausen (DE). GRZENDOWSKI, Mi-
chael [DE/DE]; Stormstrasse 91, 47445 Moers (DE).
STÜHLER, Kai [DE/DE]; Neusser Str. 360, 50733 Köln
(DE). REIFENBERGER, Guido [DE/DE]; Nöggeratweg
120, 40591 Düsseldorf (DE). WOLTER, Marietta [DE/
DE]; Auf'm Rott 48 a (DE). RIEMENSCHNEIDER,
Markus [DE/DE]; Witzelstrasse 50, 40225 Düsseldorf
(DE).

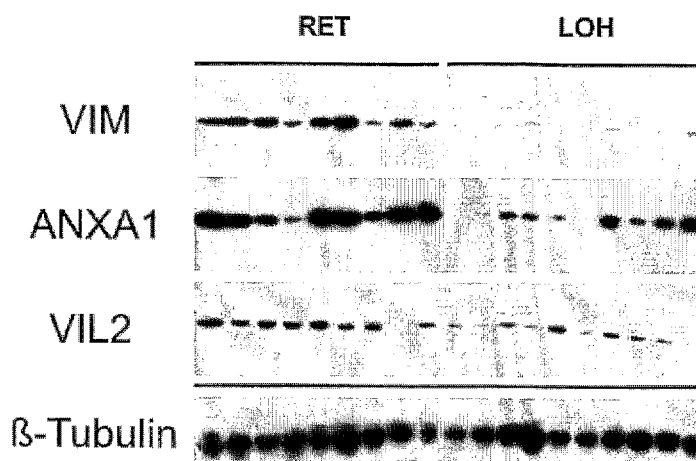
(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT,
LU, LV, MC, MK, 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).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: BIOMARKER FOR THE DIAGNOSIS OF A BRAIN TUMOR

(54) Bezeichnung: BIOMARKER FÜR DIE DIAGNOSE VON HIRNTUMOR

Abbildung 2:



(57) Abstract: The invention relates to a method for the diagnosis and risk stratification of brain tumors, particularly gliomas, me-
ningeomas, and pituitary adenomas, a determination being carried out by way of select biomarkers. The invention further relates to
suitable combinations of biomarkers, particularly for in-vitro diagnostics.

(57) Zusammenfassung:

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2009/106065 A2



Veröffentlicht:

- *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)*
- *mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)*

Titel: Biomarker für die Diagnose von Hirntumor**Beschreibung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose und
5 Risikostratifizierung von Hirntumoren, insbesondere Gliome, Meningeome und Hypophysenadenome, wobei eine Bestimmung mittels ausgewählten Biomarkern erfolgt. Ferner betrifft die Erfindung hierzu geeignete Kombinationen von Biomarkern, insbesondere zur in-vitro Diagnostik.

10

Primäre Hirntumore, wie Gliome, Meningeome und Hypophysenadenome, gehen von Neuroepithel, Ganglienzellen, Meningen, Nervenscheiden, allgemeinem Nervenstützgewebe bzw. Neuroglia und Hypophyse oder ektopen intrakraniellen Geweben
15 (Keimzell- od. Fehlbildungstumoren) aus und deren Ursache sind vor allem in genetischen und hormonalen Faktoren, onkogene Viren und exogene Karzinogene zu sehen. Die WHO-Gradeinteilung erfolgt entsprechend der Dignität: Grad I (gutartig / benigne), Grad II (semibenigne; postoperative Überlebenszeit
20 3-5 Jahre), Grad III (semimaligne; postoperative Überlebenszeit 2-3 Jahre), Grad IV (maligne; postoperative Überlebenszeit 6-15 Mon.); Häufigkeit: Anteil der gesamten bzw. primären Hirntumoren an allen Tumorerkrankungen: 7-9 % (Kleihues, P., Louis, D. N., Scheithauer, B. W., Rorke, L. B.,
25 Reifenberger, G., Burger, P. C., and Cavenee, W. K. (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 3, 215-225).
Ein Gliom wird histologisch in (Riesenzell-) (Oligo-)Astrozytomen, Oligodendrogliom, Mischgliome, Glioblastom

multiforme charakterisiert und differenziert je nach Wachstum, wie isomorph, anaplastisch, pilozystisch u.a..

Ferner können Untergruppen von Gliomen anhand des Verlustes der Heterozygotie (loss of heterozygosity (im Folgenden LOH))

5 prognostiziert werden, z.B. zu den humanen Chromosomen(-Loci) 1p und 19q (Reifenberger, G., and Louis, D. N. (2003)

Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 62, 111-126,

Louis, D. N. (2006) Molecular Pathology of Malignant Gliomas.

10 Annu. Rev. Path. Mech. Dis. 1, 97-117, Smith, J. S., and Jenkins, R. B. (2000) Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. Front Biosci. 5, 213-231), die zum Verlust von Tumorsuppressorgenen führen (Felsberg, J., Erkwow, A., Sabel,

15 M., Kirsch, L., Fimmers, R., Blaschke, B., Schlegel, U., Schramm, J., Wiestler, O. D., and Reifenberger, G. (2004)

Allelic losses on 1 p and 19q in oligodendroglial tumors: Refinement of candidate tumor suppressor regions on 1p and correlation with survival data. Brain Pathol 14, 121-130,

20 Tews, B., Felsberg, J., Hartmann, C., Kunitz, A., Hahn, M., Toedt, G., Neben, K., Hummerich, L., von Deimling, A.,

Reifenberger, G., and Lichter, P. (2006) Identification of novel oligodendroglioma-associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression

25 profiling. Int J Cancer. 119, 792-800).

Allerdings ist die Identifizierung von Tumorsuppressorgenen für die Diagnose und Risikostratifizierung von Patienten nicht ausreichend und es besteht ein Bedarf zur Identifizierung von

Biomarkern zur geeigneten Diagnose und Risikostratifizierung von Patienten.

Zwecks einer geeigneten Therapie von Hirntumoren, insbesondere von Gliomen, bedarf es einer frühen Diagnose und Differenzierung in Verbindung mit der Notwendigkeit klinische Entscheidungen zu treffen.

Eine der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe besteht daher darin, ein Verfahren zur Diagnose von Hirntumoren, insbesondere Gliomen zu entwickeln, das eine verbesserte frühzeitige Diagnose sowie verbesserte Erfassung von Risikopatienten ermöglicht und den Therapieerfolg verbessert.

Die Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Diagnose und / oder Risikostratifizierung von Hirntumoren, insbesondere Gliomen gelöst, wobei eine Bestimmung mindestens eines der Polypeptide / Proteine ausgewählt aus der Gruppe

Aldose reductase (SEQ ID No. 1, Acc. No. IPI00413641.6),

Alpha crystallin B chain (SEQ ID No. 2, Acc. No. IPI00021369.1),

Alpha-enolase (SEQ ID No. 3, Acc. No. IPI00465248.4),

Annexin A1, kurz ANXA1 (SEQ ID No. 4, Acc. No. IPI00218918.4),

Annexin A5 (SEQ ID No. 5, Acc. No. IPI00329801.11),

Chloride Intracellular channel protein 1, kurz CLIC1 (SEQ ID No. 6, Acc. No. IPI00010896.2),

DnaJ homolog subfamily B member 1 (SEQ ID No. 7, Acc. No. IPI00015947.4),

- Gelsolin precursor (SEQ ID No. 8, Acc. No. IPI00026314.1),
Glial fibrillary acidic protein (SEQ ID No. 9, Acc. No. IPI00025362.1),
Glial fibrillary acidic protein (SEQ ID No. 10, Acc. No. IPI00443478.1),
5 Glial fibrillary acidic protein (SEQ ID No. 11, Acc. No. IPI00383815.4),
Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (SEQ ID No. 12, Acc. No. IPI00219018.6),
10 Heterogenous nuclear ribonucleoprotein (SEQ ID No. 13, Acc. No. IPI00477522.1),
Nucleosidediphosphate-linked moiety X motif 16 (SEQ ID No. 14, Acc. No. IPI00411732.4),
Peroxiredoxin-1, kurz PRDX1 (SEQ ID No. 15, Acc. No. IPI00641244.1),
15 Peroxiredoxin-1, kurz PRDX1 (SEQ ID No. 16, Acc. No. IPI00640741.1),
Peroxiredoxin-6 (SEQ ID No. 17, Acc. No. IPI00220301.4),
Sorbitoldehydrogenase (SEQ ID No. 18, Acc. No. IPI00216057.4),
20 Villin-2, kurz VIL2 (SEQ ID No. 19, Acc. No. IPI00479359.5),
Vimentin, kurz VIM (SEQ ID No. 20, Acc. No. IPI00418471.5),
Vimentin, kurz VIM (SEQ ID No. 21, Acc. No. IPI00552689.1),
und
Peroxiredoxin-5 mitochondrialprecursor (SEQ ID No. 22, Acc. No. IPI00024915.2),
25 Platelet-activating factor acetylhydrolase IB alpha unit (SEQ ID No. 23, Acc. No. IPI00218728.2),
Syntaxin-binding protein-1 (SEQ ID No. 24, Acc. No.

IPI00641244.1),

oder jeweils Fragmente oder Teilpeptide davon an oder von einem zu untersuchenden Patienten erfolgt (nachstehend erfindungsgemäßes Verfahren mittels erfindungsgemäßer

5 (Bio)marker).

Die genannten erfindungsgemäßen Proteine sind in Abhängigkeit des LOH-Status anhand der humanen Chromosomen (-Loci) 1p und 19q charakteristisch hoch- oder runter-geregelt (exprimiert).

10 Hochgeregelt sind: SEQ ID No. 1 - 21, runtergeregelt: SEQ ID No.22-24.

Die erfindungsgemäßen Proteine konnten mittels einer differentiellen Proteomanalyse von Tumorgewebe identifiziert werden. Hierzu wurden von erkrankten Patienten entsprechende

15 Tumorproben entnommen. Die Proben wurden in einem

Handhomogenisator mit Lysispuffer homogenisiert und von DNA und sonstigem Zellmaterial befreit, um ein Proteinkonzentrat zu erhalten. Die Proteine wurden mit einem Farbstoff markiert und einer 2D-Gelelektrophorese unterworfen mit einer

20 isoelektrischen Fokussierung in der ersten und einer SDS-Gelelektrophorese in der zweiten Dimension.

Die differentielle Darstellung (LOH/ohne LOH (=Retention, kurz RET) ist in der Tabelle 1 und Beispielen und Abbildungen

25 dargelegt und zeigen unterschiedliche charakteristische Expression in Abhängigkeit mit dem LOH-Status (hoch- (up-) und runter- (down-) reguliert, ausgelesen anhand der Spots).

Tabelle 1:

N o.	t-Test	FC	IPI	Protein	Chromosom	pI-Seq	Mr-Seq.	pI-2D	Mr-2D	Peptide count	Seq. Coverage	Profound-Score	Mascot-Score
Hochreguliert in Proben mit RET													
1	0,011	9,7	00383815.4	Splice Isoform 2 of Glial fibrillary acidic protein, astrocyte	17q21	5,4	50,3	5,22	17,6	11(1)	27,2	2,3	84,6
2	0,014	7,7	00025363.1	Splice Isoform 1 Glial fibrillary acidic protein, astrocyte*	17q21	5,4	50,3	5,03	58,9	30(0)	46,9	2,3	214
3	0,012	6,7	00418471.5	Vimentin	10p13	4,9	53,5	5,14	61,9	39	71,8	2,3	300
4	0,047	6,6	00418471.5	Vimentin	10p13	4,9	53,5	5,1	61,9	30	61,7	2,3	229
5	0,017	6,4	00218918.4	Annexin A1	9q12-q21.2	6,7	38,6	6,68	44	15	56,8	2,4	204
6	0,01	5,7	00383815.4	Splice Isoform 2 of Glial fibrillary acidic protein, astrocyte	17q21	5,4	50,3	5,07	58,8	26(1)	50,7	2,2	242
7	0,0059	4,8	00418471.5	Vimentin	10p13	4,9	53,5	5,55	63,1	18	61,9	2,4	220
8	0,038	4,8	00418471.5	Vimentin	10p13	4,9	53,5	4,94	50,7	34	56,1	2,3	270
9	0,043	4,5	00443478.1	Splice Isoform 3 of Glial fibrillary acidic protein, astrocyte*	17q21	5,4	50,3	5,76	54,9	40(0)	44,1	2,4	362
10	0,032	4,2	00220301.4	Peroxiredoxin-6	1q25.1	6	24,9	6,56	26,8	21	70,4	2,4	205
11	0,0041	4,1	00418471.5	Vimentin	10p13	4,9	53,5	5,18	61,8	26	58,3	2,4	233
12	0,011	4	00443478.1	Splice Isoform 3 of Glial fibrillary acidic protein, astrocyte*	17q21	5,4	50,3	5,19	20,3	7(0)	15,8	1,8	75,4
13	0,0041	3,8	00443478.1	Splice Isoform 3 of Glial fibrillary acidic protein, astrocyte*	17q21	5,4	50,3	5,19	19,7	12(0)	24,4	2,2	93
14	0,037	3,5	00220301.4	Peroxiredoxin-6	1q25.1	6	24,9	6,48	26,8	13	68,2	2,3	172
15	0,049	3,4	00383815.4	Splice Isoform 1 of Glial fibrillary acidic protein, astrocyte	17q21	5,4	50,3	5,11	18,3	23(1)	44	2,2	150
16	0,0045	3,3	00216057.4	Sorbitol dehydrogenase	15q15.3	9,3	38,1	7,48	46,3	15	43,8	2,2	86,3
17	0,018	3,3	00479359.5	Villin2	6q25.2-q26	5,9	69,2	6,55	90,2	35	55,7	2,4	272
18	0,017	3,3	00552689.1	Vimentin	10p13	4,7	20	4,81	48,6	7	32,4	1,3	86,9
19	0,025	3,2	00383815.4	Splice Isoform 2 of Glial fibrillary acidic protein, astrocyte	17q21	5,4	50,3	4,9	50,8	15(1)	33,6	2,1	130

20	0,015	3,2	00413641.6	Aldose reductase	7q33	6,6	35,7	6,18	26,9	7	18,7	2,3	72,8
21	0,039	3	00025363.1	Splice Isoform 1 of Glial fibrillary acidic protein, astrocyte	17q21	5,4	50,3	5,08	20,8	30(1)	63	2,4	276
22	0,014	3	00443478.1	Splice Isoform 3 of Glial fibrillary acidic protein, astrocyte	17q21	5,4	50,3	6,49	58,7	11(1)	20,6	1,6	61,1
23	0,037	3	00443478.1	Splice Isoform 3 of Glial fibrillary acidic protein, astrocyte*	17q21	5,4	50,3	5,16	35,1	31(0)	59,2	2,3	267
24	0,032	2,9	00220301.4	Peroxiredoxin-6	1q25.1	6	24,9	6,51	90,7	12	59,6	2,4	150
25	0,004 1	2,7	00479359.5	Villin2	6q25.2-q26	5,9	69,2	6,13	60,5	32	49,1	2,4	261
26	0,058	2,6	00383815.4	Splice Isoform 2 of Glial fibrillary acidic protein, astrocyte*	17q21	5,4	50,3	5,51	66,3	9(0)	17,4	2	71,8
27	0,045	2,5	00418471.5	Vimentin	10p13	4,9	53,5	6,17	28,3	20	41,9	1,7	117
28	0,037	2,5	00010896.2	Chloride intracellular channel protein 1	6p22.1-p21.2	4,9	26,8	5,4	65,7	7	35	1,5	90,3
29	0,009 6	2,5	00418471.5	Vimentin	10p13	5	49,6	5,4	65,7	21	49,4	1,8	168
30	0,034	2,5	00418471.5	Vimentin	10p13	5	49,6	5,47	67,4	28	60,1	2,4	274
31	0,003 6	2,5	00329801.1 1	Annexin A5	4q28-q32	4,8	35,8	5,23	35,4	9	29,2	2,4	114
32	0,03	2,4	00021369.1	Alpha crystallin B chain	11q22.3-q23.1	6,9	20,1	7,27	21,5	9	34,9	2,3	92,1
33	0,033	2,3	00443478.1	Splice Isoform 3 of Glial fibrillary acidic protein, astrocyte*	17q21	5,4	50,3	6,31	58,5	30(0)	56,8	2,4	278
34	0,043	2,3	00411732.4	Nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 16	3q22.1	6,4	21,3	6,84	20,5	11	50,3	2,3	102
35	0,034	2,2	00383815.4	Splice Isoform 2 of Glial fibrillary acidic protein, astrocyte	17q21	5,4	50,3	5,5	43,7	20(1)	41,3	2,4	194
36	0,035	2,1	00026314.1	Isoform 1 of Gelsolin precursor*	9q33	5,9	85,6	6,15	95,5	28(0)	38,6	2,1	155
37	0,029	2	00443478.1	Splice Isoform 3 of Glial fibrillary acidic protein, astrocyte	17q21	5,4	50,3	6,36	58,9	33	70,8	1,6	239
38	0,01	2	00641244.1	11 kDa protein	1p34.1	9,6	10,7	7,12	21,7	4	43,3	1,2	71,5
39	0,042	2	00640741.1	19 kDa protein	1p34.1	6,5	19	7,43	21,7	5	28,1	1,1	73,9
40	0,023	2	00477522.1	Splice Isoform A2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	7p15	9,1	36	7	43,4	6(0)	26,7	2,2	73,9

				s A2/B1*									
41	0,012	1,8	00219018.6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	12p13	9,3	35,9	7,69	44,2	7	24,6	1,9	74,3
42	0,00091	1,8	00383815.4	Splice Isoform 2 of Glial fibrillary acidic protein, astrocyte*	17q21	5,4	50,3	5,25	21,2	10(0)	23,3	2,3	116
43	0,069	1,8	00025363.1	Splice Isoform 1 of Glial fibrillary acidic protein, astrocyte	17q21	5,4	50,3	4,71	55,7	18(1)	39,5	2,4	108
44	0,032	1,8	00465248.4	Alpha-enolase	1p36.3-p36.2	7,7	47	6,85	58,3	12	33,3	2,3	107
45	0,00064	1,8	00015947.4	DnaJ homolog subfamily B member 1	19p13.2	9,4	37,9	7,38	46,2	8	24,2	2,3	78,8

Runterregulierte Proben mit RET

46	0,038	-1,8	IPI00218728.2	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB alpha subunit	17p13.3	7,2	46,5	7,44	62,1	11	30,8	2,3	106
47	0,0034	-1,8	IPI00024915.2	Peroxisomal protein 5, mitochondrial precursor	11q13	9,9	22	6,88	13,1	6(3)	36,9	2,2	95,6
48	0,026	-1,8	IPI00084828.1	Splice Isoform 1 of Syntaxin-binding protein 1*	9q34.1	6,5	67,5	6,73	69,5	11(0)	18,5	2,3	106

FC = Fold Change, Seq.= Sequenz, Mr= rel. Molekulargewicht, pI= isoelektrischer Punkt, RET = Retention

- 5 Die Auswertung erfolgte mit Hilfe MALDI-TOF/TOF MS (Matrix gestützte Laser Desorption Ionisation - Flugzeit - Massenspektrometrie. Selbstverständlich können hierbei auch andere geeignete massenspektrometrische Verfahren angewandt werden, beispielsweise von LC-ESI-MS(/MS).

10

Daher betrifft die Erfindung auch solche Aminosäure-Sequenzen (Polypeptide, Proteine), die eine Sequenzidentität oder Homologie von 70% und mehr, vorzugsweise von 80% und mehr,

besonders bevorzugt von 90-95% und mehr mit SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 24 aufweisen. Ebenfalls mit eingeschlossen sind ebenfalls solche analoge Aminosäure-Sequenzen, die aufgrund des Austausches von einer oder mehreren Aminosäure(n) in diesen Sequenzen, dennoch die gewünschte Funktion eines Biomarkers zur Diagnose von Hirntumoren gewährleisten. Erfindungsgemäß ausdrücklich eingeschlossen sind insbesondere Teilpeptide oder Fragmente von SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 24.

- 10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind Kombinationen (Unterkombination aus der obigen Gesamtheit aller erfindungsgemäßen Biomarker) der erfindungsgemäßen Biomarker zur Diagnose von Hirntumoren, insbesondere Gliomen vorteilhaft, insbesondere eine Kombination enthaltend Vimentin
15 (VIM), Villin2 (VIL2) und / oder Annexin 1 (ANXA1).

Der Begriff „Hirntumor“ umfasst erfindungsgemäß primäre Hirntumore, wie Gliome, Meningeome und Hypophysenadenome, ausgehend von Neuroepithel, Ganglienzellen, Meningen,

- 20 Nervenscheiden, allgemeinem Nervenstützgewebe bzw. Neuroglia und Hypophyse oder ektopen intrakraniellen Geweben (Keimzell- od. Fehlbildungstumoren) und deren Ursache vor allem in genetischen und hormonalen Faktoren, onkogene Viren und exogene Karzinogene zu sehen sind.

- 25 Eine bevorzugte erfindungsgemäße Ausführungsform ist jedoch die Diagnose und Risikostratifizierung von Gliomen.

Die Erfindung betrifft ebenfalls die Identifizierung von

Patienten mit erhöhtem Risiko oder/und einer ungünstigen Prognose von Hirntumoren, insbesondere Gliomen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht daher klinische Entscheidungen, die zu einem schnellen Therapieerfolg und zur Vermeidung von Todesfällen führen. Solche klinische Entscheidungen umfassen ebenfalls weiterführende Behandlung mittels Arzneimitteln zur Behandlung oder Therapie von Hirntumoren, insbesondere Gliomen.

10

Daher betrifft die Erfindung ebenfalls ein Verfahren zur Diagnose von Patienten mit Hirntumoren, insbesondere Gliomen zur Durchführung von klinischen Entscheidungen, wie weiterführende Behandlung und Therapie mittels Arzneimitteln oder einer Chemotherapie.

15

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Diagnose zur Prognose, zur differentialdiagnostischen Früherkennung und Erkennung, zur Beurteilung des Schweregrades und zur therapiebegleitenden Verlaufsbeurteilung.

20

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Diagnose und zwar zur Früh- oder Differentialdiagnose oder Prognose von Hirntumoren, insbesondere Gliomen, wobei eine Bestimmung der erfindungsgemäßen Biomarkern an oder von einem zu untersuchenden Patienten durchgeführt wird.

25

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird dem zu untersuchenden Patienten Gewebeproben (Biopsie) oder Körperflüssigkeit (Blut, Plasma) entnommen, und die Diagnose erfolgt in vitro/ex vivo, d.h. außerhalb des menschlichen oder tierischen Körpers. Aufgrund der Bestimmung der erfindungsgemäßen Marker wird eine hohe Signifikanz für Hirntumoren, insbesondere Gliomen erzielt und anhand der vorhandenen Menge oder deren Veränderung (Levelierung: Erhöhung / Erniedrigung) in mindestens einer Patientenprobe kann die Diagnose erfolgen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann das erfindungsgemäße Verfahren im Rahmen einer in-vitro Diagnose mittels parallelen oder simultanen Bestimmungen der erfindungsgemäßen Marker durchgeführt werden (z.B. Multititerplatten mit 96 und mehr Kavitäten), wobei die Bestimmungen an mindestens einer Patientenprobe durchgeführt werden.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann das erfindungsgemäße Verfahren mit Hilfe einer 2D-Elektrophorese erfolgen, wobei in der ersten Dimension eine isoelektrische Fokussierung, in der zweiten Dimension eine Gelelektrophorese durchgeführt wird (im weitesten Sinne ist hierzu die Proteomforschung („Proteomics“) anzuwenden).

In einer weiteren Ausführungsform kann das erfindungsgemäße

Verfahren und dessen Bestimmungen mittels einem Schnelltest durchgeführt werden (z.B. lateral-flow Test), sei es in Einzel- oder Multiparameterbestimmung.

- 5 In einer weiteren Ausführungsform kann das erfindungsgemäße Verfahren in-vivo durchgeführt werden, wobei die erfindungsgemäßen Biomarker mit einer Sonde, insbesondere ein Antikörper, die ein Kontrastmittel aufweisen markiert und mit einem in der Bildgebung geeigneten Detektor („Molecular
10 Imaging“) nachgewiesen werden (Ralph Weissleder, Molecular Imaging in Cancer, Science, Vol. 312, 1168 (2006)).

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Biomarker zur Diagnose und / oder Prognose
15 und/oder zur Früh- oder Differentialdiagnose von Hirntumoren, insbesondere Gliomen.

Eine weitere Aufgabe ist die Bereitstellung einer entsprechenden diagnostischen Vorrichtung zur Durchführung der
20 erfindungsgemäßen Verfahren.

Im Rahmen dieser Erfindung wird unter einer solchen diagnostischen Vorrichtung, insbesondere ein Array oder Assay verstanden (z.B. Immunoassay, ELISA etc.), insbesondere ein
25 Proteinbiochip (US6346413B1. US20050014292) im weitesten Sinne eine Vorrichtung zur Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren.

Die Erfindung betrifft zudem ein Kit zur Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren, insbesondere enthaltend Nachweisreagenzien und weitere Hilfsmittel. Solche Nachweisreagenzien umfassen z.B. Antikörper etc.

5

Der Nachweis und die Quantifizierung der erfindungsgemäßen Biomarker kann ebenfalls mit Hilfe weiterer, dem Fachmann geläufiger Protein-Diagnoseverfahren durchgeführt werden, insbesondere unter Verwendung radioaktiv oder

10

fluoreszenzmarkierter Antikörper. Zu nennen sind hier insbesondere dazu geeignete bioanalytische Verfahren, wie zum Beispiel Immunhistochemie, Antikörperarrays, Luminex, ELISA, Immunfluoreszenz, Radioimmunoassays sowie weiteren geeigneten bioanalytischen Verfahren, wie zum Beispiel

15

massenspektrometrische Verfahren, z.B. MRM (Multi reaction monitoring) oder AQUA (absolute Quantification), mit deren Hilfe die Biomarker quantitativ gemessen werden können, durchgeführt werden.

20

Nachfolgende Beispiele und Abbildungen dienen zur näheren Erläuterung der Erfindung, jedoch ohne die Erfindung auf diese Beispiele und Abbildungen zu beschränken.

Beispiele und Abbildungen:

25

Tumorproben:

Die Tumorproben wurden aus der Tumorbank des Institutes für Neuropathologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

erhalten. Die Proben wurden nach den Kriterien der WHO Klassifikation für Tumore des Nervensystems (Kleihues et al., 2002 (supra)) eingeordnet und ein Tumorzellgehalt von mindestens 80% als zusätzliches Kriterium festgelegt.

- 5 In der Proteomanalyse wurden neun Tumorproben aus primären humanen Gliomen verwendet (5 x RET, 4 x LOH) und zur Validierung von Kandidatenproteinen weitere 51 der WHO-Grade II und III.

10 Bestimmung des 1p/19q LOH Status:

Der LOH Status aller eingeschlossenen Tumorproben wurde mit bis zu 30 Microsatelliten auf Chromosom 1p und bis zu 5 auf dem Chromosomenarm 19q untersucht (Felsberg et al., 2004 (supra)).

15

Probenvorbereitung und Proteinmarkierung für die 2D-DIGE Analyse:

- Zur Zell-Lyse von solidem Tumormaterial wurde eine entsprechende Menge Tumor mit Lyse Puffer versetzt und
- 20 zunächst manuell mit einem Pistill und anschließend in einem Ultraschallbad lysiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt zur Entfernung unlöslicher Zelltrümmer. Der Proteingehalt wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München, Germany) bestimmt. Zur differentiellen Analyse
- 25 wurden je 50µg Protein mit 1µl Fluoreszenzfarbstoff nach Herstellerangaben markiert. Tumorproben mit LOH wurden mit Cy3, solche ohne LOH mit Cy5 markiert. Ein interner Standard, bestehend aus gleichen Teilen aller Proben der Analyse wurde

mit Cy2 markiert. Für eine Identifizierung differentiell regulierter Proteine mittels MALDI-MS wurde ein präparatives Gel mit 400µg Protein erstellt. Die Gele wurden anschließend nachgefärbt und zur Dokumentation getrocknet (Nesterenko, M. V., Tilley, M., and Upton, S. J. (1994) A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. J. Biochem. Biophys. Methods 28, 239-242).

10 Großgel-Elektrophorese:

Die Analyse wurde mit modifizierter Carrier Ampholyte basierter isoelektrischen Fokussierung in selbst gegossenen 40cm Röhrchengelen mit einem Durchmesser von 1,5 mm durchgeführt (Klose, J. (1999) Large-gel 2-D electrophoresis. Methods Mol. Biol. 112, 147-172). Anschließend wurden die Gele ausgestoßen, äquilibriert und danach auf selbst hergestellte (40x30cm) 2D-Gele (SDS-PAGE) gelegt und dort mit Agarose fixiert.

20 Bildakquisition und -analyse:

Für die Bildakquisition mit einem Typhoon Trio™ Fluorescence Imager (GE Healthcare) bleiben die Gele zwischen den Glasplatten. Die Anregungswellenlänge und die Emissionsfilter wurden spezifisch für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe gemäß dem Handbuch ausgewählt. Die generierten Bilder wurden vor der Bildanalyse mit der ImageQuant TL™ software (Version 2003.02, GE Healthcare) zugeschnitten. Intra-gel Spotdetektion und inter-gel Vergleich wurden mit den Modulen Differential

In-gel Analysis (DIA) und Biological Variation Analysis (BVA) der DeCyder 6.0™ software (GE Healthcare) durchgeführt. Zur Standardisierung und Normalisierung der Spotintensitäten wurde der interne Standard benutzt. Differentiell regulierte Proteine wurden durch Student's t test bestimmt, und alle Proteine mit einem p-Wert ≤ 0.05 wurden für eine Identifikation mit MALDI-MS ausgewählt.

Proteinidentifizierung mit MALDI-TOF/TOF MS:

Die erfindungsgemäßen Proteine wurden manuell aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend im Gel mit Trypsin (Promega, Madison, WI) verdaut und für die Massenspektrometrie extrahiert (Marcus K, Immler D, Sternberger J, et al. Identification of platelet proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis and analyzed by matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry and detection of tyrosine-phosphorylated proteins. Electrophoresis, 2000;21,2622-2636). Die tryptischen Peptide eines jeden Proteins wurden mittels MALDI-TOF MS an einer UltraFlex II™ (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) analysiert. Zur Präparation eines MALDI AnchorChip™ target (Bruker, Bremen, Deutschland) wurde nach Herstellerempfehlung α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure verwendet. Die Spektren wurde im Positivmodus mit einer Target Spannung von 20kV samt einer gepulsten Ionen Extraktion von 17,25 kV. Die Reflektorspannung wurde auf 21 kV und die Detektorspannung auf 1,7 kV gesetzt. Die erhaltenen PMF (Peptide Mass Fingerprint) Spektren wurden mit einem Peptidmix kalibriert (Monoisotopisch Massen Bradykinin(1-7) m/z 757.399, Angiotensin I m/z 1296.685,

Bombesin m/z 1619.822, ACTH clip(1-17) 2093.086 m/z and Somatostatin 3147.471 m/z). Die PMF Spektren wurden mit der FlexAnalysis™ software (Version 2.4, Bruker, Bremen, Deutschland) prozessiert. Uninterpretierte Spektren wurden mit
5 der humanen IPI database (Version v3.15), unter Verwendung des Mascot (Matrix Science, London, UK) Algorithmus in ProteinScape™ (Bruker, Bremen, Deutschland) interpretiert. Die Datenbanksuchen wurden unter Annahme folgender Parameter durchgeführt: Feste Cystein Modifikation mit Propionamid,
10 variable Modifikation als Folge von Methionin Oxidation, eine verfehlte Schnittstelle im Fall von nicht kompletter Trypsin Hydrolyse, einen Massentoleranz von 50ppm und ohne genaue Beschreibung des Molekulargewichts und des isoelektrischen Punktes der aus der 2D-PAGE erhaltenen Proteine.
15 Identifizierte erfindungsgemäße Proteine wurden akzeptiert, wenn sie einen Mascot Wert von mindestens 67 aufwiesen.

Western Blot Analyse:

Zusätzlich zu den Proben aus solidem Tumorgewebe aus dem 2D-DIGE Ansatz, wurden Proteinfractionen, die während der
20 Mikrosatellitenanalyse (DNA Gewinnung mittels Ultrazentrifugation in einem Guanidinhydrochlorid-Gradienten) angefallen sind (van den Boom, J., Wolter, M., Kuick, R., Misek, D. E., Youkilis, A.S., Wechsler, D. S., Sommer, C.,
25 Reifenberger, G., and Hanash, S. M. (2003) Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Am J Pathol.,

2003;163, 1033-1043), verwendet. Ein Überschuß an Guanidinhydrochlorid wurde entfernt und mit Lösemittel aus Probenpuffer mit Hilfe von Microcons™ (Millipore, 3kDa Cut-off) ersetzt. Die Proteine wurden auf vorgefertigten NuPAGE™
5 Novex 4-12% Bis-Tris Midi Gelen (Invitrogen Karlsruhe, Germany), 20 Taschen und 1,0 mm Dicke, aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit einem NovaBlot™ Blot Modul (GE Healthcare) auf eine Amersham Hybond™-PVDF Membran (GE Healthcare) übertragen. Unspezifische Bindungen und
10 Wechselwirkungen der Membran wurden mit 3% (w/v) Milchpulver, 1% BSA und 0.1% (v/v) Tween 20 in Tris gepufferter Salzlösung, pH 8,5, für 1 Stunde bei Raumtemperatur abgeblockt. Die Immunoblots wurden dann über Nacht bei 4°C mit den primären Antikörpern in den entsprechenden Konzentrationen inkubiert
15 und zwar ein Vilin2 Antikörper (Kaninchen, anti-human, 1:5000) von Biomol (Hamburg, Germany), ein Vimentin Antikörper (Maus, anti-human, 1:5000) von Acris Antibodies (Hiddenhausen, Germany), ein Annexin1 Antikörper (Maus, anti-human, 1:1000) (BD Transduction Laboratories (Heidelberg, Germany)) und ein
20 Beta-Tubulin Antikörper zur Ladungskontrolle (Maus, anti-human, 1:2000) wurde bei Sigma (Seelze, Germany) verwendet. Die Membranen wurden 3x15min. gewaschen, für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit den entsprechenden sekundären Antikörpern versehen und danach noch einmal 3x10min gewaschen. Die
25 Immunkomplexe wurden mit dem Amersham ECL Plus™ Western Blotting Detection System (GE Healthcare) sichtbar gemacht.

Immunhistochemie und statistische Analyse:

Für die immunhistochemische Analyse wurden 43 in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Schnitte verwendet. 2,5µm Dicke Schnitte wurden auf poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht und über Nacht bei 37°C getrocknet.

- 5 Nach der Deparaffinisierung, Rehydrierung und Zerstörung endogener Peroxidasen wurde die Antigen-Demaskierung in Natriumcitrat Puffer (pH6, 10mmol/l) für 15 bis 20 min. in der Mikrowelle durchgeführt. Die primären Antikörper gegen Annexin1 (1:100) und gegen Vilin2 (1:150) entsprachen denen
- 10 der Western Blot Analyse. Der Vimentin Antikörper (1:200) wurde von BioGenex (San Ramon, USA) bezogen und der GFAP Antikörper (1:8000) von DAKO (Hamburg, Germany). Die Immunreaktivität wurde mit dem DAKO EnVision™ Detection System, HRP (DAKO, Hamburg, Germany) unter Verwendung von
- 15 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) als Chromogen durchgeführt. Zuletzt wurden alle Schnitte mit Hematoxylin leicht gegengefärbt. Jeder einzelne immunhistochemische Assay wurde mit entsprechenden Negativ- und externen Positivkontrollen durchgeführt.
- 20 Die Expressionsniveaus der einzelnen Proteine wurden in einen numerischen Wert, basierend auf dem Anteil der gefärbten Tumorzellen, umgewandelt. Dieser Index wurde in 5 Gruppen eingeteilt: 0 (keine oder minimale Reaktivität, weniger als 1% gefärbter Tumorzellen), 1 (kleiner 10% positiver Tumorzellen),
- 25 2 (10-50% positive Tumorzellen), 3 (50-90% positive Tumorzellen) und 4 (mehr als 90% gefärbte Tumorzellen. Die Schnitte wurden blind von 2 Personen unabhängig bewertet. Zur Illustration der Ergebnisse wurden Box-Whisker Plots erstellt

und um einen statistisch signifikanten Unterschied der Expressionsunterschiede basierend auf dem LOH Status zu belegen wurde ein Mann-Whitney-U-Test benutzt (Statistica Software Version 7.1, Statsoft, Tulsa, USA). p-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen. Als Maß für die diagnostische Genauigkeit des Assays in der Vorhersage von Fällen mit und ohne LOH anzugeben wurde für jeden einzelnen immunhistochemischen Assay eine Receiver operation characteristics („ROC“) Kurve erstellt. Um die diagnostische Genauigkeit zu quantifizieren wurde für jedes Protein die Fläche unter der Kurve („AUC“) berechnet.

Einfluss der erfindungsgemäßen Biomarker auf die Chemoresistenz von Glioblastomzelllinien

Alle erfindungsgemäßen Biomarker (SEQ ID No. 1 - 24), die in den differentiellen Untersuchungen identifiziert wurden, sind potentiell in der Lage an der Vermittlung der Chemosensitivität dieser Gliome beteiligt zu sein. Durch den Einsatz ausgewählter Zytostatika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen kann überprüft werden, ob die erfindungsgemäßen Biomarker (SEQ ID No. 1 - 24) direkt mit dem Reaktionsmechanismus der in der Therapie üblichen Zytostatika wechselwirken. Hierzu wurden stabile Zelllinien hergestellt und die erfindungsgemäßen Biomarker verstärkt exprimiert (Überexpression) und vermindert (knock-down) exprimiert (siehe J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA oder Ausubel,

"Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)). Eingesetzte Zytostatika: Carmustin und Vincristin, zwei Substanzen aus dem in der Therapie üblichen PCV Polychemotherapieschema, und

5 Temozolomid, einem in der Therapie niedrig maligner Gliome neueren Wirkstoff. Zur Auswertung eines Effekts wurden Dosis-Wirkungs-Kurven und deren Lage zueinander und der korrespondierende EC₅₀ Wert (Effektkonzentration; EC-50-Wert besagt, dass bei dieser Konzentration des Stoffes die Hälfte

10 der Versuchsorganismen Wirkungen zeigt) berechnet.

Behandlung der humanen Glioblastomzelllinie A172 mit Carmustin

Tabelle 1: Chemosensitivität der humanen Glioblastomzelllinie A172 nach modifizierter Expression von ANXA1 (SEQ ID No. 4),

15 CLIC1 (SEQ ID No. 6), PRDX1 (SEQ ID No. 15 oder 16) und VIL2 (SEQ ID No. 9), gegenüber einer Behandlung mit Carmustin. n.b., nicht bestimmt. KI, Konfidenzintervall.

A172 Überexpression	EC₅₀ (µM)	95 % KI (µM)	p-Wert
Kontrolle	7,87	7,31-8,48	
ANXA1	88,29	84,45-92,31	< 0.0001
CLIC1	105,2	88,39-125,30	< 0.0001
PRDX1	35,69	23,89-53,33	< 0.0001
VIL2	106,1	93,29-120,70	< 0.0001
A172 Knock-Down	EC₅₀ (µM)	95 % KI (µM)	p-Wert
Kontrolle	94,4	87,8-101,5	
ANXA1	95,6	91,9-99,4	0,7573
CLIC1	170,6	152,9-190,4	< 0.0001
PRDX1	106,6	96,3-118,0	n.b.
VIL2	90,8	80,9-101,9	0,5701

p < 0,0001 ist signifikant

Behandlung der humanen Glioblastomzelllinie A172 mit

Temozolomid

Tabelle 2: Chemosensitivität der humanen Glioblastomzelllinie A172 nach modifizierter Expression von ANXA1 (SEQ ID No. 4), CLIC1 (SEQ ID No. 6), PRDX1 (SEQ ID No. 15 oder 16) und VIL2 (SEQ ID No. 9), gegenüber einer Behandlung mit Temozolomid. KI, Konfidenzintervall.

A172 Überexpression	EC₅₀ (µM)	95 % KI (µM)	p-Wert
Kontrolle	164,8	148,6-182,7	
ANXA1	123,4	115,4-132,0	<0,0001
CLIC1	82,6	64,3-106,2	<0,0001
PRDX1	26,4	17,6-39,6	<0,0001
VIL2	83,1	69,9-98,7	<0,0001
A172 Knock-Down	EC₅₀ (µM)	95 % KI (µM)	p-Wert
Kontrolle	41,0	24,8-68,1	
ANXA1	113,0	70,7-180,5	0,0076
CLIC1	150,0	124,1-181,2	< 0.0001
PRDX1	117,8	104,5-132,7	< 0.0001
VIL2	114,9	97,4-135,5	< 0.0001

p < 0,0001 ist signifikant

10 Behandlung der humanen Glioblastomzelllinie A172 mit
Vincristin

Tabelle 3: Chemosensitivität der humanen Glioblastomzelllinie A172 nach modifizierter Expression von ANXA1 (SEQ ID No. 4), CLIC1 (SEQ ID No. 6), PRDX1 (SEQ ID No. 15 oder 16) und VIL2 (SEQ ID No. 9), gegenüber einer Behandlung mit Vincristin. n.b, nicht bestimmt. KI, Konfidenzintervall.

A172 Überexpression	EC₅₀ (nM)	95 % KI (nM)	p-Wert
Kontrolle	15,2	12,8-18,0	
ANXA1	15,3	11,4-20,5	0,9761
CLIC1	19,3	16,5-22,6	0,0375
PRDX1	12,7	10,1-15,8	0,1821
VIL2	3,3	3,0-3,5	< 0.0001
A172 Knock-Down	EC₅₀ (nM)	95 % KI (nM)	p-Wert
Kontrolle	32,2	26,6-39,1	
ANXA1	37,0	24,1-57,0	0,6242
CLIC1	64,2	58,6-70,3	n.b.
PRDX1	52,7	47,2-58,8	0,0042
VIL2	20,2	15,5-26,3	0,0070

p < 0,0001 ist signifikant

Behandlung der humanen Glioblastomzelllinie T98G mit Carmustin

5 Tabelle 4: Chemosensitivität der humanen Glioblastomzelllinie T98G nach modifizierter Expression von ANXA1 (SEQ ID No. 4), CLIC1 (SEQ ID No. 6), PRDX1 (SEQ ID No. 15 oder 16) und VIL2 (SEQ ID No. 9), gegenüber einer Behandlung mit Carmustin. n.b, nicht bestimmt. KI, Konfidenzintervall.

T98G Überexpression	EC₅₀ (µM)	95 % KI (µM)	p-Wert
Kontrolle	64,8	49,4-85,2	
ANXA1	206,7	192,1-222,4	< 0.0001
CLIC1	346,3	n.b.	< 0.0001
PRDX1	158,5	142,2-176,6	< 0.0001
VIL2	223,1	210,7-236,1	< 0.0001
T98G knock-Down	EC₅₀ (µM)	95 % KI (µM)	p-Wert
Kontrolle	151,6	138,6-165,8	
ANXA1	121	104,7-139,8	0,0069
CLIC1	85,5	66,2-110,5	< 0.0001
PRDX1	118,2	97,9-142,6	0,0207
VIL2	159,4	147,6-172,2	0,4151

10 p < 0,0001 ist signifikant

Behandlung der humanen Glioblastomzelllinie T98G mit

Temozolomid

Tabelle 5: Chemosensitivität der humanen Glioblastomzelllinie T98G nach modifizierter Expression von ANXA1 (SEQ ID No. 4), CLIC1 (SEQ ID No. 6), PRDX1 (SEQ ID No. 15 oder 16) und VIL2 (SEQ ID No. 9), gegenüber einer Behandlung mit Temozolomid.

5 KI, Konfidenzintervall.

T98G Überexpression	EC₅₀ (µM)	95 % KI (µM)	p-Wert
Kontrolle	394,5	383,2-406,0	
ANXA1	408,7	319,2-523,1	0,6967
CLIC1	333,8	295,8-376,9	0,0289
PRDX1	321,1	282,0-365,6	0,0476
VIL2	395,7	359,4-435,7	0,9484
T98G knock-Down	EC₅₀ (µM)	95 % KI (µM)	p-Wert
Kontrolle	326,7	310,9-343,2	
ANXA1	386,5	375,7-397,5	0,0012
CLIC1	334,7	321,4-348,6	0,4104
PRDX1	382,7	368,5-397,5	0,0525
VIL2	347,6	331,4-364,6	0,1185

p < 0,0001 ist signifikant

Behandlung der humanen Glioblastomzelllinie T98G mit

10 Vincristin

Tabelle 6: Chemosensitivität der humanen Glioblastomzelllinie T98G nach modifizierter Expression von ANXA1 (SEQ ID No. 4), CLIC1 (SEQ ID No. 6), PRDX1 (SEQ ID No. 15 oder 16) und VIL2 (SEQ ID No. 9), gegenüber einer Behandlung mit Vincristin. KI,

15 Konfidenzintervall.

T98G Überexpression	EC₅₀ (nM)	95 % KI (nM)	p-Wert
Kontrolle	32,4	27,3-38,4	
ANXA1	4,2	3,5-5,0	< 0.0001
CLIC1	3,7	2,9-4,7	< 0.0001
PRDX1	9,6	8,4-10,9	< 0.0001
VIL2	24,1	19,0-30,8	0,0475
T98G knock-Down	EC₅₀ (nM)	95 % KI (nM)	p-Wert
Kontrolle	10,0	7,6-13,3	
ANXA1	19,1	15,5-23,7	0,0009
CLIC1	26,9	22,4-32,3	< 0.0001
PRDX1	20,6	17,2-24,8	< 0.0001
VIL2	35,8	30,1-42,5	< 0.0001

p < 0,0001 ist signifikant

Reaktion von Glioblastomzelllinien auf die Behandlung mit
5 verschiedenen Zytostatika: Vergleich der verwendeten
Zelllinien aus A172 und T98G

Eine veränderte Reaktion auf eine Behandlung mit Carmustin wurde in allen stabilen Zelllinien aus A172 sowie aus T98G beobachtet. Wurden die erfindungsgemäßen Biomarker

10 überexprimiert, so wurde eine erhöhte EC₅₀ Werte gemessen. Nach *knock-down* der erfindungsgemäßen Biomarker wurden verminderte EC₅₀ Werte berechnet.

Nach einer Behandlung mit Temozolomid konnte bei einer Überexpression erfindungsgemäßen Biomarker in den stabilen
15 Zelllinien aus A172 und T98G eine erhöhte Sensitivität gemessen werden. Nach Behandlung der *knock-down* Zelllinien wurde ein umgekehrter Effekt beobachtet.

Einen ähnlichen Effekt zeigte die Behandlung der Zelllinien mit Vincristin. In den Zelllinien, die die erfindungsgemäßen
20 Biomarker überexprimierten, kam es zu einer Verschiebung zu niedrigeren Konzentrationen. Bei einem *knock-down* der

erfindungsgemäßen Biomarker waren im Gegensatz dazu höhere Konzentrationen notwendig. Dieses Verhalten wurde ebenfalls in den beiden Zelllinien beobachtet.

- 5 Diese Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass die erfindungsgemäßen Biomarker zur Durchführung von klinischen Entscheidungen und Therapiesteuerung geeignet sind.

Abbildungen:

- 10 Abbildung 1A beschreibt ein repräsentatives großes (40x30cm) 2D-Gel mit ca. 3500 Proteinspots. Die Pfeile beziehen sich auf die entsprechenden identifizierten Proteine und erfindungsgemäßen Marker aus Tabelle 1.
- Abbildung 1B beschreibt repräsentative Expressionsprofile von
- 15 4 differentiell regulierten Proteinen.

Abbildung 2 beschreibt die Ergebnisse der Western Blot Analyse für die Proteine Vimentin, Annexin1 und Villin2. Als Ladungskontrolle wurde β -Tubulin benutzt.

20

- Abbildung 3 beschreibt repräsentative immunhistochemische Färbungen von Vimentin (VIM), Annexin1 (ANXA1) und Villin2 (VIL2) von Tumorgewebe (Paraffin eingebettet) in 40-facher Vergrößerung. Die Ergebnisse der Färbungen von 43 Tumorproben
- 25 werden mittels BOX-Whisker-Plots beschrieben.

Abbildung 4 beschreibt die ROC (Receiver operation characteristics) Kurven von Vimentin mit einer AUC (Area under

the curve) von 0.91, Annexin1 mit einer AUC von 0.84 und Vilin2 mit einer AUC von 0.82.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Diagnose und / oder Risikostratifizierung
von Hirntumoren, insbesondere Gliomen, wobei eine
5 Bestimmung mindestens eines Biomarkers ausgewählt aus der
Gruppe

Aldose reductase (SEQ ID No. 1, Acc. No. IPI00413641.6),
Alpha crystallin B chain (SEQ ID No. 2, Acc. No.
IPI00021369.1),

10 Alpha-enolase (SEQ ID No. 3, Acc. No. IPI00465248.4),
Annexin A1 (SEQ ID No. 4, Acc. No. IPI00218918.4),
Annexin A5 (SEQ ID No. 5, Acc. No. IPI00329801.11),
Chloride Intracellular channel protein 1 (SEQ ID No. 6,
Acc. No. IPI00010896.2),

15 DnaJ homolog subfamily B member 1 (SEQ ID No. 7, Acc. No.
IPI00015947.4),
Gelsolin precursor (SEQ ID No. 8, Acc. No.
IPI00026314.1),

Glial fibrillary acidic protein (SEQ ID No. 9, Acc. No.
20 IPI00025362.1),

Glial fibrillary acidic protein (SEQ ID No. 10, Acc. No.
IPI00443478.1),

Glial fibrillary acidic protein (SEQ ID No. 11, Acc. No.
IPI00383815.4),

25 Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (SEQ ID No. 12,
Acc. No. IPI00219018.6),

Heterogenous nuclear ribonucleoprotein (SEQ ID No. 13,
Acc. No. IPI00477522.1),

Nucleosidediphosphate-linked moiety X motif 16 (SEQ ID No. 14, Acc. No. IPI00411732.4),
 Peroxiredoxin-1 (SEQ ID No. 15, Acc. No. IPI00641244.1),
 Peroxiredoxin-1 (SEQ ID No. 16, Acc. No. IPI00640741.1),
 5 Peroxiredoxin-6 (SEQ ID No. 17, Acc. No. IPI00220301.4),
 Sorbitoldehydrogenase (SEQ ID No. 18, Acc. No. IPI00216057.4),
 Villin-2 (SEQ ID No. 19, Acc. No. IPI00479359.5),
 Vimentin (SEQ ID No. 20, Acc. No. IPI00418471.5),
 10 Vimentin (SEQ ID No. 21, Acc. No. IPI00552689.1), und
 Peroxiredoxin-5 mitochondrial precursor (SEQ ID No. 22, Acc. No. IPI00024915.2),
 Platelet-activating factor acetylhydrolase IB alpha unit (SEQ ID No. 23, Acc. No. IPI00218728.2),
 15 Syntaxin-binding protein-1 (SEQ ID No. 24, Acc. No. IPI00641244.1),
 oder Fragmenten und Teilpeptiden davon an oder von einem zu untersuchenden Patienten erfolgt.

2. Verfahren zur Diagnose von Hirntumoren, insbesondere
 20 Gliomen, nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Diagnose eine in-vitro Diagnose ist.
3. Verfahren zur Diagnose und / oder Risikostratifizierung von Hirntumoren, insbesondere Gliomen, nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass eine Kombination der
 25 Biomarker nach Anspruch 1 zumindest Vimentin, Villin2 und / oder Annexin 1 enthält/enthalten.

4. Verfahren zur Diagnose und / oder Risikostratifizierung von Hirntumoren, insbesondere Gliomen, nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Durchführung von klinischen Entscheidungen, insbesondere weiterführende Behandlung und Therapie mittels Arzneimitteln oder Chemotherapie.
5
5. Verfahren zur Diagnose und / oder Risikostratifizierung von Hirntumoren, insbesondere Gliomen, nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Diagnose zur Prognose, zur differentialdiagnostischen Früherkennung und Erkennung, zur Beurteilung des Schweregrades und zur therapiebegleitenden Verlaufsbeurteilung erfolgt.
10
6. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,
15 dass parallele oder simultane Bestimmungen der Marker durchgeführt werden.
7. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine 2D-Elektrophorese erfolgt, wobei in der ersten Dimension eine isoelektrische Fokussierung, in der zweiten Dimension eine Gelelektrophorese durchgeführt wird.
20
8. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,
25 dass die Bestimmungen an mindestens einer Patientenprobe durchgeführt werden.

9. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmungen mittels einem Schnelltest, insbesondere in Einzel- oder Multiparameterbestimmungen durchgeführt werden.

5 10. Kit zur Diagnose nach einem der Ansprüche 1-9 enthaltend Nachweisreagenzien und weitere Hilfsmittel.

11.. Diagnostische Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 9, insbesondere ein Proteinbiochip, Array oder Assay.

Abbildung 1:

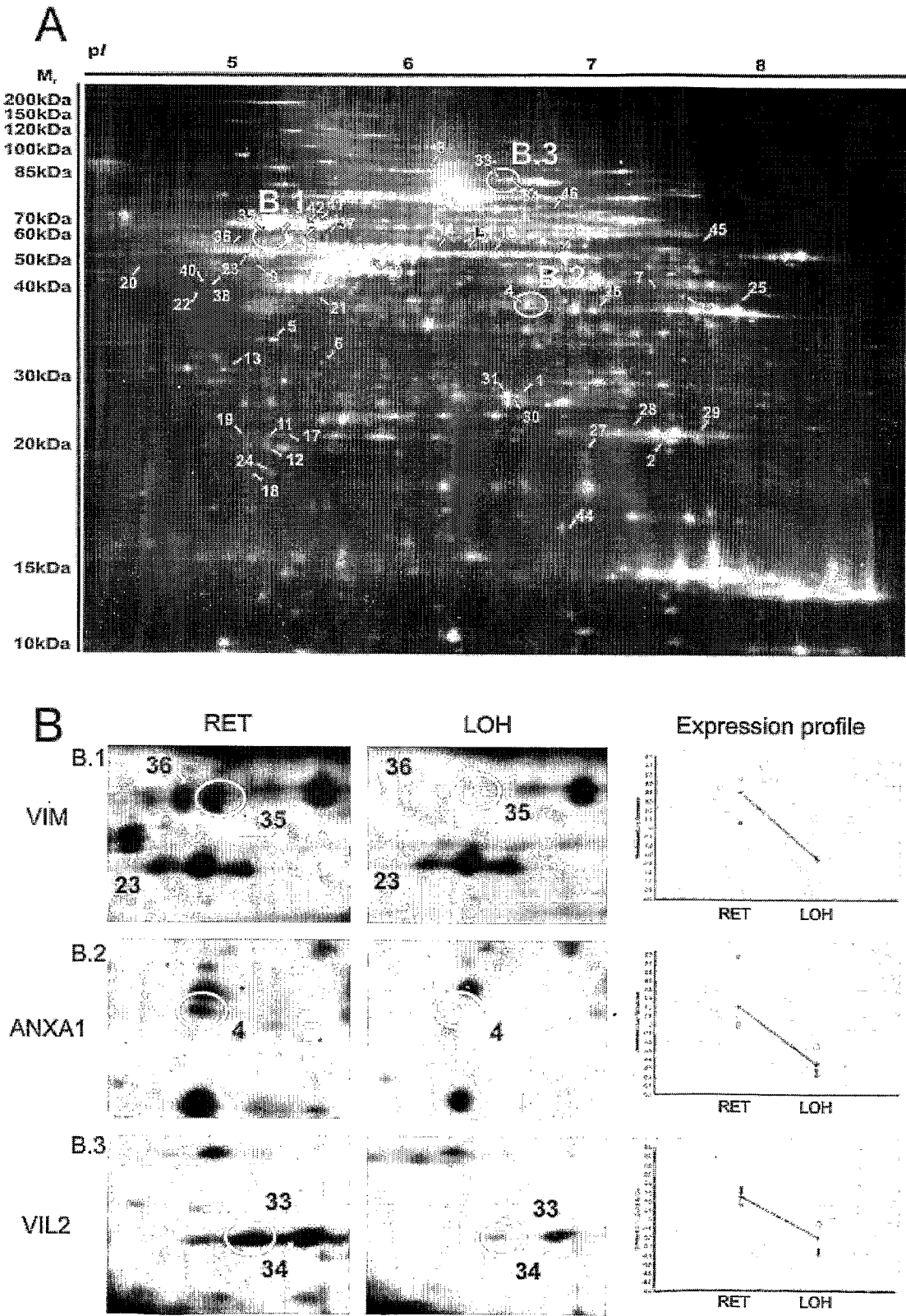


Abbildung 2:

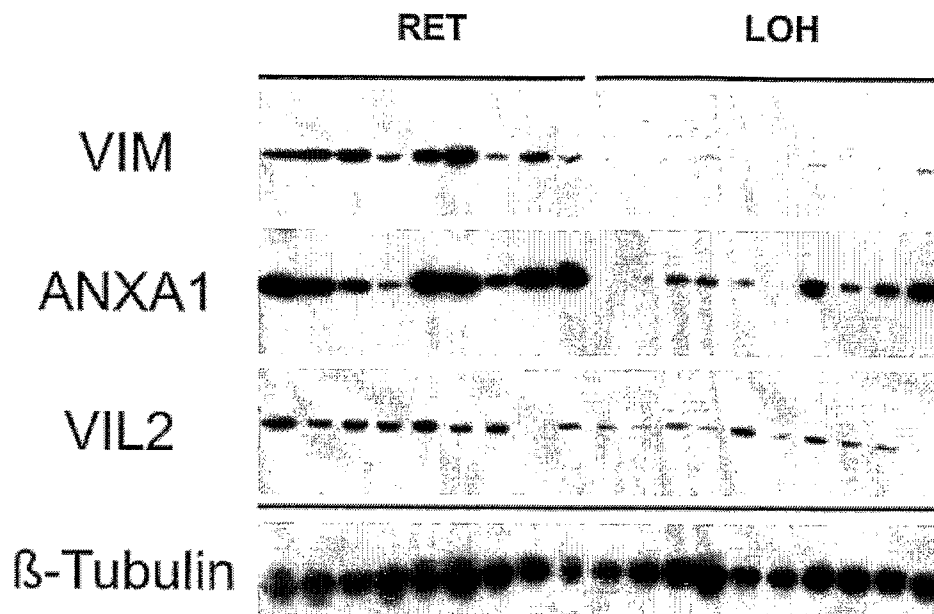


Abbildung 3:

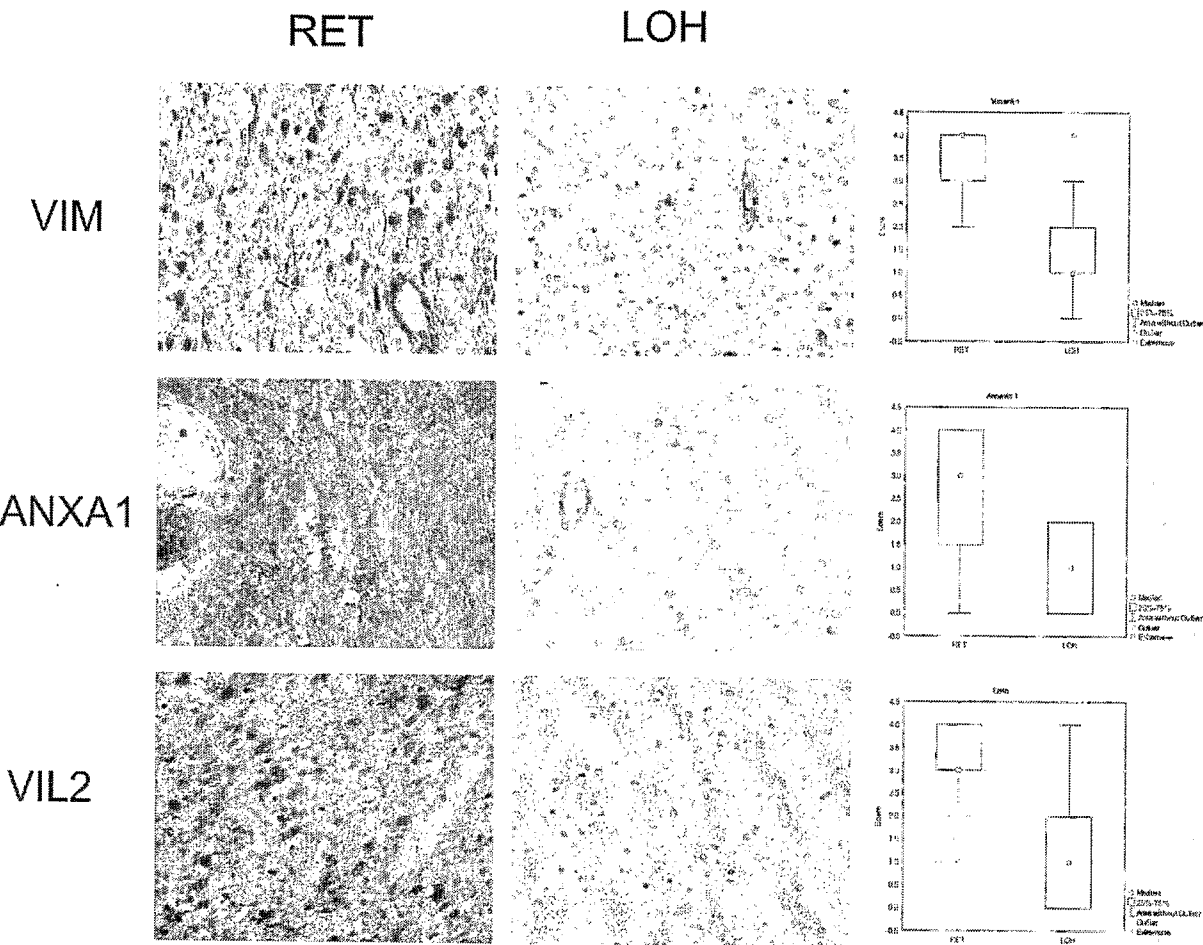
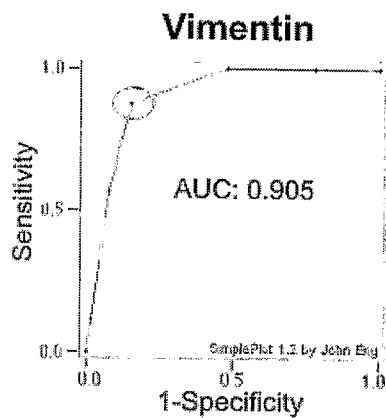
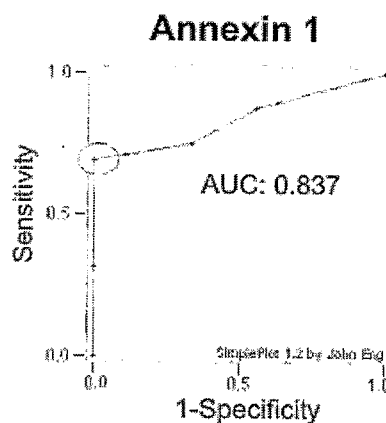


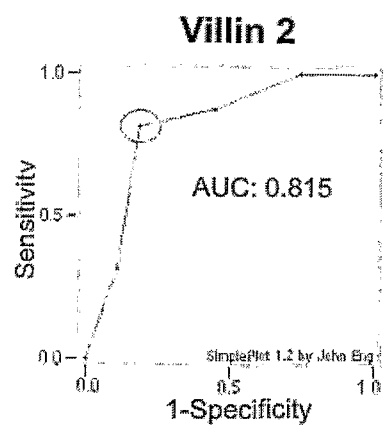
Abbildung 4:



Vimentin						
Original Score IHC		4	3	2	1	0
Cut-Off point	0	5	4	3	2	1
Specificity (%)	0.0	92.6	85.2	51.9	22.2	0.0
Sensitivity (%)	0.0	56.3	87.5	100.0	100.0	100.0
Accuracy (%)	0.0	79.1	86.1	69.8	51.1	37.2



Annexin 1						
Original Score IHC		4	3	2	1	0
Cut-Off point	0	5	4	3	2	1
Specificity (%)	0.0	100.0	100.0	66.7	44.4	0.0
Sensitivity (%)	0.0	31.3	68.8	75	87.5	100.0
Accuracy (%)	0	74.4	83.4	69.8	60.4	37.2



Villin 2						
Original Score IHC		4	3	2	1	0
Cut-Off point	0	5	4	3	2	1
Specificity (%)	0.0	88.9	81.5	55.6	25.9	0.0
Sensitivity (%)	0.0	31.3	81.3	87.5	100.0	100.0
Accuracy (%)	0	67.5	81.4	67.5	53.5	37.2

Specificity = Spezifität, Sensitivity = Sensitivität, Accuracy = Genauigkeit, Fehlerfreiheit, Cut – Off = Schwellenwert