



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 35 196 T2 2008.02.21**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 198 585 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/00 (2006.01)**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 35 196.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/17846**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 944 977.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/025473**

(86) PCT-Anmeldetag: **28.06.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **12.04.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.04.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **13.06.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **21.02.2008**

(30) Unionspriorität:

| | | |
|-----------------|-------------------|-----------|
| 141542 P | 28.06.1999 | US |
| 195522 P | 07.04.2000 | US |

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Source Precision Medicine, Inc., Boulder, Col., US

(72) Erfinder:

**TRYON, Victor, Loveland, CO 80537, US;
BEVILACQUA, Michael P., Boulder, CO 80301, US;
BANKAITIS-DAVIS, Danute M., Longmont, CO
80503, US; CHERONIS, John, Conifer, CO 80433,
US**

(74) Vertreter:

Klunker, Schmitt-Nilson, Hirsch, 80797 München

(54) Bezeichnung: **Verfahren zum Charakterisieren von biologischen Bedingungen, die kalibrierte Genexpressionsprofile verwenden**

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

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

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Es wird ein Verfahren zum Identifizieren reproduzierbarer Genexpressions-Variationsmuster, die mittels des Variationsgrads, der in einem kalibrierten Datensatz beobachtet wird, informativ sind, bereitgestellt. Die Variationen können mit anderen nicht-genetischen Anzeichen wie klinischen Indikatoren (für Menschen) einer traditionellen Natur korreliert sein, müssen aber nicht per se kausal sein.

Technischer Hintergrund

[0002] Es gab beträchtliche Diskussionen einschließlich Kongressanhörungen bezüglich medizinischer Irrtümer. Zu einer Quelle für medizinische Irrtümer gehören Irrtümer bei Arzneimittel-Verabreichungen. Es ist dokumentiert, dass mehr als 98.000 stationär aufgenommene Patienten jährlich Opfer von Irrtümern bei der Arzneimittel-Verabreichung sind (Feststellung der amerikanischen pharmazeutischen Vereinigung in der Unterausschussanhörung des Senats-Haushaltsausschuss für Arbeit, Gesundheit und Erziehung zu medizinischen Irrtümern am 13. Dezember 1999). Zu diesen Irrtümern gehören Probleme, die sich aus Arzneimittel-Wechselwirkungen für einen bestimmten Patienten, der mehr als ein Arzneimittel nimmt, ergeben, Probleme bezüglich des Ansprechens eines Individuums auf ein bestimmtes Arzneimittel und falsche Arzneimittel-Verabreichung bzw. Medikation für einen bestimmten Zustand. Medizinische Irrtümer ergeben sich ferner als ein Ergebnis von Fehldiagnosen. Dies kann als ein Ergebnis unempfindlicher Diagnostiktechniken oder eines breiten Bereichs interpersoneller Abweichungen bei der Art, auf die sich ein klinischer Zustand manifestiert, auftreten. Gegenwärtig stehen wenige Hilfsmittel zur Optimierung der Prognose, der Diagnose und der Behandlung eines medizinischen Zustands unter Berücksichtigung des bestimmten Phänotyps und Genotyps eines Individuums zur Verfügung.

[0003] Es gab ein wachsendes Interesse an pflanzlichen Arzneimitteln oder Nutrazeutika. Diese werden oft in Entwicklungsländern angebaut und unterliegen einer geringen oder keiner Qualitätskontrolle. Es ist häufig der Fall, dass eine Charge eines Nutrazeutikums wirksam sein kann, wobei es keine Sicherheit gibt, dass eine zweite Charge wirksam sein wird. Darüber hinaus ist die Analyse von Nutrazeutika problematisch, weil diese Arzneimittel komplexe Gemische sind, bei denen wenig bezüglich des Wirkstoffs bekannt ist.

[0004] Alle neuen therapeutischen Mittel erfordern irgendeine Form von klinischer Erprobung. Es ist bekannt, dass ein Arzneimittel zur Tumorbehandlung, das bei einer klinischen Erprobung unter Verwen-

dung von Standard-Anwerbungstechniken für Patienten getestet wird, tatsächlich nur begrenzte Wirksamkeit zeigen kann. Wenn die vorteilhafte Wirkung, die in einer klinischen Population beobachtet wird, zu klein ist, erhält das Arzneimittel nicht die Zulassung durch die Nahrungs- und Arzneimittelbehörde zur Verwendung bei der Bevölkerung insgesamt. Die beobachtete kleine vorteilhafte Wirkung kann jedoch tatsächlich ein Artefakt der Gestaltung der klinischen Erprobung oder der klinische Endpunkt bei der Patienten-Population sein. Es wäre wünschenswert, Kriterien zum Durchmustern von Patienten zu haben, wenn sie in eine klinische Erprobung eintreten, um sicherzustellen, dass die vorteilhafte Wirkung eines Arzneimittels, falls sie existiert, nachgewiesen und quantifiziert werden kann.

[0005] WO 98/24935 A1 offenbart Verfahren zum Identifizieren spezifischer Krankheitszustands-Marker, die in peripheren Lymphozyten von Patienten als Reaktion auf einen Krankheitszustand in einem unterschiedlichen Ausmaß exprimiert werden als derartige Marker im Peripherblut eines normalen Individuums exprimiert werden. Die Verwendung von relativer quantitativer RT-PCR (reverse Transkriptase-PCR) wird offenbart zur Identifizierung alternativ gespleißter Formen von IL-8 mRNA, die zwischen normalen Individuen und Individuen mit metastasierendem Prostatakrebs unterschiedlich exprimiert werden. Derartige alternativ gespleißte Formen von IL-8 mRNA können als diagnostische Biomarker verwendet werden. In einigen Ausführungsformen kann die Messung von Serum-IL-8-Genprodukt mit anderen Markern von Prostata-Erkrankung, wie PSA, PAP, HK2, PSP₉₄ und PS-MA_x, kombiniert werden.

[0006] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren bereitgestellt zur Beurteilung eines biologischen Zustands eines Subjekts bzw. eines Testobjekts auf der Basis einer ersten Probe, die von dem Subjekt erhalten wird, wobei die Probe eine Quelle von RNAs bereitstellt, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren aufweist:

(a) Ableiten aus der ersten Probe eines ersten Profildatensatzes, wobei der erste Profildatensatz drei oder mehr Elemente umfasst, wobei jedes Element ein relatives quantitatives Maß für die Menge in der ersten Probe eines gesonderten bzw. einzelnen transkribierten RNA-Bestandteils in einer Gruppe von Bestandteilen ist, die derart ausgewählt werden, dass die Messung der Bestandteile die Beurteilung des biologischen Zustands ermöglicht, wobei die relative Quantifizierung von mRNA in der Probe bestimmt wird, indem eine quantitative PCR mit RNA, welche aus der Probe extrahiert wird, mit einer definierten Amplifikationseffizienz für die Targettranskripte durchgeführt wird und der Unterschied bei Grenzwertzyklen (ΔC_T) zwischen einem Größemarker und den Targettranskripten von Interesse

bestimmt wird; und

(b) Erzeugen eines kalibrierten Profildatensatzes für die Gruppe, wobei jedes Element des kalibrierten Profildatensatzes eine Funktion eines entsprechenden Elements des ersten Profildatensatzes und eines entsprechenden Elements eines Grundlinien-Profildatensatzes für die Gruppe ist; wobei der kalibrierte Profildatensatz einen Satz von Werten darstellt, bei welchem ein Variationsmuster in einer reproduzierbaren Weise mit einem bestimmten Zustand korreliert.

[0007] Messung des biologischen Zustands; und Erzeugen eines kalibrierten Profildatensatzes für die Gruppe, wobei jedes Element des kalibrierten Profildatensatzes eine Funktion eines entsprechenden Elements des ersten Profildatensatzes und eines entsprechenden Elements eines Grundlinien-Profildatensatzes für die Gruppe ist, wobei der kalibrierte Profildatensatz ein Maß für den biologischen Zustand des Subjekts bereitstellt.

[0008] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Verfahren bereitgestellt zur Beurteilung eines biologischen Zustands, der von einem Mittel beeinflusst wird, wobei das Verfahren umfasst: Erhalten einer Probe, die RNAs und/oder Proteine enthält, von einer Zielpopulation von Zellen, denen das Mittel verabreicht wurde; Ableiten eines ersten Profildatensatzes aus der Probe, wobei der erste Profildatensatz eine Mehrzahl von Elementen umfasst, wobei jedes Element ein quantitatives Maß für die Menge eines unterschiedlichen RNA- oder Protein-Bestandteils in einer Gruppe von Bestandteilen, die so ausgewählt werden, dass eine Messung der Bestandteile eine Beurteilung des biologischen Zustands ermöglicht, ist; und Erzeugen eines kalibrierten Profildatensatzes für die Gruppe, wobei jedes Element des kalibrierten Profildatensatzes eine Funktion eines entsprechenden Elements des ersten Profildatensatzes und eines entsprechenden Elements eines Grundlinien-Profildatensatzes für die Gruppe ist, wobei der kalibrierte Profildatensatz ein Maß für den biologischen Zustand, wie er durch das Mittel beeinflusst wird, bereitstellt.

[0009] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Verfahren bereitgestellt zur Beurteilung der Wirkung eines ersten Mittels auf einen biologischen Zustand in Beziehung zur Wirkung eines zweiten Mittels, umfassend: Erhalten einer ersten bzw. einer zweiten Probe von einer ersten und einer zweiten Zielpopulation von Zellen, denen das erste bzw. das zweite Mittel verabreicht wurde, wobei jede Probe RNAs und/oder Proteine enthält; Ableiten eines ersten Profildatensatzes von der ersten Probe und eines zweiten Profildatensatzes von der zweiten Probe, wobei die Profildatensätze jeweils eine Mehrzahl von Elementen umfassen, wobei jedes Element ein quantitatives Maß für die Menge eines unterschiedlichen

RNA- oder Protein-Bestandteils in einer Gruppe von Bestandteilen ist, die so ausgewählt werden, dass eine Messung der Bestandteile eine Messung des biologischen Zustands ermöglicht; und Erzeugen eines ersten kalibrierten Profildatensatzes und eines zweiten Profildatensatzes für die Gruppe, wobei (i) jedes Element des ersten kalibrierten Profildatensatzes eine Funktion eines entsprechenden Elements des ersten Profildatensatzes und eines entsprechenden Elements eines ersten Grundlinien-Profildatensatzes für die Gruppe ist, und (ii) jedes Element des zweiten kalibrierten Profildatensatzes eine Funktion eines entsprechenden Elements des zweiten Profildatensatzes und eines entsprechenden Elements eines zweiten Grundlinien-Profildatensatzes für die Gruppe ist, wobei die kalibrierten Profildatensätze ein Maß für die Wirkung des ersten Mittels auf den biologischen Zustand in Beziehung zur Wirkung des zweiten Mittels liefern.

[0010] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Verfahren zur Durchführung einer klinischen Erprobung eines Mittels bereitgestellt, umfassend: Veranlassen der Blindverabreichung nach Wahl eines Placebos oder des Mittels an jeden Kandidaten aus einem Pool von Subjekten bzw. Testpersonen; und Verwenden von quantitativer Genexpression zur Überwachung einer Wirkung einer derartigen Verabreichung.

[0011] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein digitales Speichermedium bereitgestellt, auf dem ein Computer-lesbarer kalibrierter Profildatensatz gespeichert wird, wobei: der kalibrierte Profildatensatz eine Probe mit RNAs und/oder Proteinen, die von einer Ziel-Zellpopulation abgeleitet sind, an die ein Mittel verabreicht wurde, betrifft; der kalibrierte Profildatensatz eine erste Mehrzahl von Elementen umfasst, wobei jedes Element ein quantitatives Maß einer Veränderung in einer Menge eines unterschiedlichen RNA- oder Protein-Bestandteils in einer Gruppe von Bestandteilen, die so ausgewählt sind, dass eine Messung der Bestandteile eine Messung eines biologischen Zustands, wie er durch eine Verabreichung des Mittels beeinflusst wurde, ermöglicht, ist.

[0012] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein digitales Speichermedium bereitgestellt, auf dem eine Mehrzahl von Aufzeichnungen bzw. Verzeichnissen R_i , die eine Population von Subjekten bzw. Testobjekten betreffen, gespeichert wird, wobei jedes Verzeichnis R_i einem gesonderten Fall P_i eines Computer-lesbaren Profildatensatzes P entspricht, worin: jeder Fall P_i des Profildatensatzes P einer von einem Subjekt abgeleiteten, unterschiedlichen Probe entspricht, wobei die Probe RNAs und/oder Proteine enthält; der Profildatensatz P eine Mehrzahl von Elementen M_j umfasst, wobei jedes Element M_j ein quantitatives Maß der Menge eines unterschiedlichen RNA- oder Protein-Bestandteils in einer Gruppe

von Bestandteilen, die so ausgewählt sind, dass eine Messung der Bestandteile eine Messung eines biologischen Zustands ermöglicht, ist; jedes Verzeichnis R_i für jedes Element M_{ij} eines entsprechenden gesonderten Falls P_i des Profildatensatzes P einen Wert umfasst, der dem Wert des Elements M_{ij} entspricht; und jedes Verzeichnis R_i auch einen Hinweis auf eine charakteristische Eigenschaft des Subjekts bezüglich des Verzeichnisses umfasst, wobei die charakteristische Eigenschaft mindestens eine der Eigenschaften Altersgruppe, Geschlecht, Ethnizität, geografische Lokalisierung, Ernährung, medizinische Störung, klinischer Indikator, Medikation, physische Aktivität, Körpermasse und Umwelt-Exposition ist.

[0013] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein digitales Speichermedium bereitgestellt, auf dem eine große Anzahl Computer-lesbarer Profildatensätze gespeichert wird, worin jeder Profildatensatz eine Probe betrifft, die von einer Ziel-Zellpopulation, an die ein Mittel verabreicht wurde, abgeleitet ist, wobei die Probe RNAs und/oder Proteine enthält; jeder Profildatensatz eine Mehrzahl von Elementen umfasst, wobei jedes Element ein quantitatives Maß für die Menge eines unterschiedlichen RNA- oder Protein-Bestandteils in einer Gruppe von Bestandteilen, die so ausgewählt sind, dass eine Messung der Bestandteile eine Messung eines biologischen Zustands ermöglicht, ist; und die Gruppe für alle Profildatensätze dieselbe ist.

[0014] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein Verfahren zur Beurteilung eines biologischen Zustands eines Subjekts auf der Basis einer Probe von dem Subjekt, wobei die Probe RNAs und/oder Proteine enthält, bereitgestellt, wobei das Verfahren umfasst; Ableiten eines ersten Falls eines Profildatensatzes aus der Probe, wobei der Profildatensatz eine Mehrzahl von Elementen umfasst, wobei jedes Element ein quantitatives Maß für die Menge eines unterschiedlichen RNA- oder Protein-Bestandteils in einer Gruppe von Bestandteilen, die so ausgewählt werden, dass eine Messung der Bestandteile eine Messung des biologischen Zustands ermöglicht, ist; und Erzeugen eines ersten Falls eines kalibrierten Profildatensatzes für die Gruppe, worin jedes Element eines Falls des kalibrierten Profildatensatzes eine Funktion eines entsprechenden Elements eines Falls des Profildatensatzes und eines entsprechenden Elements eines Falls eines Grundlinien-Profildatensatzes für die Gruppe ist, wobei der kalibrierte Profildatensatz ein Maß für den biologischen Zustand des Subjekts liefert; Zugreifen auf Daten in einer Zustands-Datenbank, wobei die Zustands-Datenbank eine Mehrzahl von Verzeichnissen, die sich auf eine Population von Subjekten beziehen, hat, wobei jedes Verzeichnis einem gesonderten Fall des kalibrierten Profildatensatzes entspricht; und Beurteilen des ersten Falls des kalibrierten Profildatensatzes in Beziehung zu Daten in der

Zustands-Datenbank.

[0015] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein Verfahren zum Anzeigen quantitativer Genexpressions-Analysedaten im Zusammenhang mit der Messung eines biologischen Zustands bereitgestellt, wobei das Verfahren umfasst: Identifizieren eines ersten Profildatensatzes, der für die Genexpressions-Analysedaten relevant ist, wobei der erste Profildatensatz eine Mehrzahl von Elementen umfasst, wobei jedes Element ein quantitatives Maß für die Menge eines unterschiedlichen RNA- oder Protein-Bestandteils in einer Gruppe von Bestandteilen, die so ausgewählt werden, dass eine Messung der Bestandteile eine Messung des biologischen Zustands ermöglicht, ist; Erzeugen eines kalibrierten Profildatensatzes für die Gruppe, wobei jedes Element des kalibrierten Profildatensatzes eine Funktion eines entsprechenden Elements des ersten Profildatensatzes und eines entsprechenden Elements eines Grundlinien-Profildatensatzes für die Gruppe ist, wobei der kalibrierte Profildatensatz ein Maß für den biologischen Zustand des Subjekts liefert; und Anzeigen des kalibrierten Profildatensatzes in einem grafischen Format.

[0016] Eine bevorzugte Ausführungsform betrifft ein beschreibendes Verzeichnis einer Veränderung bei einem biologischen Zustand, das umfasst: einen ersten Satz numerischer Genexpressionswerte für eine Gruppe von Genorten, wobei jeder Wert in dem Satz einem einzelnen Genort in einer Gruppe von Genorten entspricht, wobei der Satz von Werten einen Profildatensatz für eine Population von Zellen, die einem ersten biologischen Zustand unterliegen, bildet; einen zweiten Satz numerischer Genexpressionswerte für die Gruppe von Genorten, wobei jeder Wert in dem Satz einem einzelnen Genort entspricht, wobei der Satz von Werten einen Grundlinien-Profildatensatz für eine zweite Population von Zellen, die einem zweiten biologischen Zustand unterliegen, bildet, wobei der zweite Satz von Werten optional ein Durchschnitt für mehrere Genexpressionswerte von mehreren Populationen von Zellen für jeden Ort in der Gruppe ist; und einen dritten Satz von Zahlen, der dem Verhältnis des ersten Satzes von Werten und des zweiten Satzes von Werten bezüglich jedes Genortes in der Gruppe entspricht, wobei der dritte Satz ein kalibrierter Profildatensatz ist; wobei der Profildatensatz und der kalibrierte Profildatensatz für den ersten biologischen Zustand bezüglich des zweiten biologischen Zustands beschreibend sind.

[0017] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Verfahren zum Diagnostizieren eines biologischen Zustands eines Subjekts bereitgestellt, das umfasst: Erhalten einer Probe von einem Subjekt; Aussetzen einer Population von Zellen der Probe und Bestimmen des Vorliegens eines ersten biologischen Zustands im Hinblick auf einen zweiten biologischen

Zustand nach einem der obigen Ansprüche.

[0018] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Verfahren zum Diagnostizieren einer Anfälligkeit für einen biologischen Zustand bei einem Subjekt bereitgestellt, das ein Erhalten einer Probe von dem Subjekt; Schaffen eines beschreibenden Verzeichnisses, gemäß dem Obigen, worin der Grundliniensatz von Werten ein Durchschnitt von zweiten Werten, die in einer Bibliothek beschreibender Verzeichnisse für den zweiten biologischen Zustand enthalten sind, ist; wobei die Bibliothek eine Mehrzahl beschreibender Verzeichnisse enthält, die entsprechend einem vorbestimmten biologischen Zustand gruppiert sind; Vergleichen des kalibrierten Profildatensatzes des Subjekts mit der Bibliothek kalibrierter Profildatensätze und Diagnostizieren der Anfälligkeit des Subjekts, umfasst.

[0019] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Verfahren zum Überwachen des Verlaufs eines biologischen Zustands bereitgestellt, das umfasst: Schaffen einer Mehrzahl beschreibender Verzeichnisse gemäß dem Obigen; wobei jeder Satz von ersten Werten bei vorgewählten Zeitintervallen bezüglich des ersten Verzeichnisses bestimmt wird; Vergleichen jedes kalibrierten Profildatensatzes mit einer Bibliothek kalibrierter Profildatensätze, wobei die Mehrzahl kalibrierter Profildatensätze gemäß einem vorbestimmten biologischen Zustand gruppiert wird; und Bestimmen des Verlaufs des biologischen Zustands im Hinblick auf Genexpression.

[0020] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Verfahren zum Nachweisen der biologischen Aktivität einer Zusammensetzung bereitgestellt, das umfasst: Auswählen einer Population von Zellen; Aussetzen der Zellen der Zusammensetzung; und Bestimmen des Verzeichnisses gemäß der obigen Beschreibung unter Verwendung eines standardisierten Grundlinien-Profildatensatzes für den biologischen Zustand.

[0021] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Verfahren zur Bestimmung, welches therapeutische Mittel aus einer Auswahl aus einer Mehrzahl therapeutischer Mittel einem Subjekt zu verabreichen ist, um einen biologischen Zustand in einem Subjekt von einem ersten biologischen Zustand zu einem zweiten biologischen Zustand zu verändern, bereitgestellt, das umfasst: Aussetzen einer Probe von dem Subjekt jedem von einer Mehrzahl therapeutischer Mittel; Bestimmen eines beschreibenden Verzeichnisses für jede der Proben nach einem der oben beschriebenen Verfahren, Vergleichen jedes der kalibrierten Profildatensätze mit einer Bibliothek kalibrierter Profildatensätze, wobei die Bibliothek kalibrierter Profildatensätze gemäß einem vorbestimmten biologischen Zustand gruppiert ist; und Bestimmen, welches der therapeutischen Mittel in der Lage ist, den

ersten biologischen Zustand in einem Subjekt zu dem zweiten biologischen Zustand in dem Subjekt zu verändern.

[0022] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Verfahren zum Charakterisieren der biologischen Wirksamkeit einer einzelnen Charge einer mittels eines Herstellungsprozesses erzeugten Zusammensetzung bereitgestellt, das aufweist: Bereitstellen eines Fingerabdruck- oder Signaturprofils nach irgendeinem der obigen Verfahren; und Markieren der Charge der Zusammensetzung durch Anbringen des Fingerabdrucks (Signaturprofils) auf jedem Behälter in der Charge.

[0023] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Verfahren zum Zugreifen auf biologische Information auf einem digitalen Speichermedium wie oben beschrieben bereitgestellt, das aufweist: Verfügbarmachen der Information für einen Verwender.

[0024] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Verfahren zur Verbraucherbeurteilung eines Produkts bereitgestellt, wobei die Verbraucherbeurteilung auf ein Signaturprofil angewiesen ist, das umfasst: Identifizieren des Produkts unter Verwendung des Signaturprofils.

[0025] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Computerprogramm-Produkt zur Beurteilung eines biologischen Zustands eines Subjekts oder zur Beurteilung eines biologischen Zustands, der sich aus der Verwendung eines Mittels ergibt, das ein Computer-verwendbares Medium mit einem Computer-lesbaren Programmcode darauf umfasst, bereitgestellt, wobei der Computer-Programmcode umfasst:

einen Programmcode zum Klassifizieren einer Probe von dem Subjekt oder des Mittels für ein identifizierbares Verzeichnis; einen Programmcode zum Ableiten eines ersten Datensatzes, wobei der erste Profildatensatz eine Mehrzahl von Elementen umfasst, wobei jedes Element ein quantitatives Maß für die Menge eines unterschiedlichen RNA- oder Protein-Bestandteils in einer Gruppe von Bestandteilen, die so ausgewählt sind, dass eine Messung der Bestandteile eine Messung des biologischen Zustands ermöglicht, ist; wobei der Profildatensatz in dem Verzeichnis gespeichert wird; und einen Programmcode zum optional Erzeugen eines kalibrierten Profildatensatzes für die Gruppe zur Speicherung in dem Verzeichnis, wobei jedes Element des kalibrierten Profildatensatzes eine Funktion eines entsprechenden Elements des ersten Profildatensatzes und eines entsprechenden Elements eines Grundlinien-Profildatensatzes für die Gruppe ist, wobei der kalibrierte Profildatensatz ein Maß für den biologischen Zustand des Subjekts bereitstellt.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0026] Die vorstehenden Merkmale der Erfindung werden besser verstanden durch Bezugnahme auf die folgende genaue Beschreibung, unter Bezugnahme auf die folgenden Zeichnungen genommen, in denen:

[0027] **Fig. 1** ein Diagramm ist, das den Informationsfluss von Daten, die in der molekularen Pharmakologie und Toxikologie, bei klinischen Tests gewonnen wurden, und die Verwendung der Daten für die Anwendung auf die individualisierte Medizin zeigt.

[0028] **Fig. 2** ein Diagramm ist, das den Arzneimittel-Erforschungsweg neuer Verbindungen von frühen Indizien bis zu wahrscheinlichen Arzneimittel-Kandidaten zeigt. Wenn auch kalibrierte Profildatensätze beim vorklinischen Schritt angegeben sind, können doch Genexpressionsdaten gewonnen werden, und das ist in jedem beliebigen der gezeigten Stadien nützlich. IND bezieht sich auf investigative new drug (neues Forschungsarzneimittel) und betrifft ein frühes Stadium bei der behördlichen Überprüfung.

[0029] **Fig. 3** ein Diagramm ist, das einen Vergleich von in vivo- und in vitro-Protokollen zur Erstellung kalibrierter Profildatensätze zum schnellen Einschätzen von Produktkandidaten-Toxizität und -Wirksamkeit gemäß mehreren Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung darstellt.

[0030] **Fig. 4** ein Diagramm ist, das die Anwendung von Genexpressions-Profilierung als ein Leitfaden für präklinische und klinische Studien gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zeigt.

[0031] **Fig. 5** ein Diagramm ist, das ein Verfahren gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zum Erhalten von Profildaten in Abwesenheit eines Stimulus und in Anwesenheit eines Stimulus zeigt.

[0032] **Fig. 6** ein Diagramm ist, das die Schaffung einer Bibliothek von Profildaten, die einer Mehrzahl von Subjekten zugeordnet sind, gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zeigt.

[0033] **Fig. 7** ein Diagramm ist, das den Aufbau eines Profildaten-Verzeichnisses gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung veranschaulicht.

[0034] **Fig. 8** ein Diagramm ist, das einen Dateneingangsschirm für ein Datenverzeichnis des in **Fig. 7** gezeigten Typs und typische Zusammenhänge, in denen Datenverzeichnisse kompiliert werden können, gemäß Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung veranschaulicht.

[0035] **Fig. 9** eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zeigt, bei der Profildaten, entweder in Rohform oder in kalibrierter Form, unter Verwendung von Daten aus einer Datenbank, auf die aus der Ferne über ein Netzwerk zugegriffen wird, geprüft werden.

[0036] **Fig. 10** ein Schema einer klinischen Erprobung in Phase zwei, die Genexpressions-Profilierung verwendet (a), zeigt. Das rechte Feld (b) zeigt an, dass dieselbe Information in Phase IV oder in Studien nach der Vermarktung verwendet werden kann, um die Wirksamkeit bereits zugelassener und vermarktetter Arzneimittel zu vergleichen oder um die Vermarktung derartiger Therapien zu lenken; um die Wahl der Therapie für ein individuelles Subjekt oder eine Population aus einer Klasse geeigneter Verbindungen zu lenken.

[0037] **Fig. 11** eine Balkengrafik ist, die eine grafische Darstellung in der Form eines Histogramms zeigt, das kalibrierte Profildatensätze auf der Basis von quantitativer Expression von RNA in Zellen einer Vollblutprobe unter Verwendung einer Gruppe von zwölf Bestandteilen, wobei jeder Bestandteil einem einzigartigen Genort entspricht, darstellt. (a) Die Blutprobe wird ex vivo mit durch Hitze abgetöteten Staphylokokken stimuliert und weiter H7-TPCK, H9-UT-77 oder H16-Dex, wie angegeben, ausgesetzt. Der Grundlinien-Profildatensatz ist eine Blutprobe, die ex vivo (in vitro) mit durch Hitze abgetöteten Staphylokokken stimuliert wurde. (b) Die Blutprobe wird ex vivo mit Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert, und wird dann weiter den Verbindungen H7-TPCK, H9-UT-77 oder H16-Dex, wie angegeben, ausgesetzt.

[0038] **Fig. 12** eine Balkengrafik mit einer logarithmischen Achse ist, die eine grafische Darstellung kalibrierter Profildatensätze für ex vivo mit Lipopolysaccharid (LPS) stimuliertes Vollblut zeigt, wobei eine Gruppe von neun Bestandteilen verwendet wird, wobei jeder Bestandteil einem Genort entspricht, der die angegebenen Genprodukte codiert, wobei das Blut außerdem entzündungshemmenden Mitteln: Methotrexat, Meclofenamat und Methylprednisolon ausgesetzt wird. Der Grundlinien-Profildatensatz wird von LPS-stimulierten (aber ansonsten unbehandelten) Zellen abgeleitet.

[0039] **Fig. 13** Balkengrafiken mit logarithmischer Achse sind, die eine grafische Darstellung kalibrierter Profildatensätze für zwei verschiedene Proben von Vollblut (a) 991116 und (b) 991028, die den biologischen Zustand der Zellen widerspiegeln, zeigen, wobei eine Gruppe von 24 Elementen verwendet wird, wobei jedes Element einem Genort entspricht, wobei der Grundlinien-Profildatensatz von unbehandelten Zellen abgeleitet ist. Die kalibrierten Datensätze für Zellen, die 6 h lang drei eine Entzündung induzieren

den Mitteln (Lipopolysaccharid, durch Hitze abgetötete Staphylokokken und Phytohämagglutinin) ausgesetzt wurden, werden für jede Probe verglichen. (c) zeigt einen direkten Vergleich von LPS-stimulierten 991116 bezüglich 991028 als der Grundlinien-Profil-datensatz. (d) zeigt einen direkten Vergleich zwischen unstimulierten 991116 und 991028.

[0040] [Fig. 14](#) eine Balkengrafik mit einer logarithmischen Achse ist, die eine grafische Darstellung kalibrierter Profildatensätze unter Verwendung einer Gruppe von 22 Bestandteilen zeigt, wobei jeder Bestandteil einem Genort entspricht, wobei der Grundlinien-Profil-datensatz von unbehandelten Zellen abgeleitet ist. Vollblut wird 6 h lang ex vivo drei eine Entzündung induzierenden Mitteln (Lipopolysaccharid, durch Hitze abgetötete Staphylokokken und Phytohämagglutinin) ausgesetzt, die dann mit einem einzigen entzündungshemmenden Mittel (Methylprednisolon) behandelt werden, um Ähnlichkeiten und Unterschiede bei der Wirkung eines einzigen Mittels auf Zellpopulationen, die sich in ihrem biologischen Zustand unterscheiden, erkennen zu lassen.

[0041] [Fig. 15](#) eine Balkengrafik mit einer logarithmischen Achse ist, die eine grafische Darstellung kalibrierter Profildatensätze für Vollblut zeigt, wobei sich ein kalibrierter Datensatz auf ein Subjekt (Subjekt 2) bezieht, das in vivo mit einem Corticosteroid (Dexamethason) behandelt wurde, sich ein zweiter Datensatz auf die Behandlung einer Blutprobe von demselben Subjekt vor der in vivo-Behandlung bezieht, wobei jene Probe ex vivo (in vitro) behandelt wurde, und sich der dritte Datensatz auf ein zweites Subjekt bezieht, das in vivo mit Dexamethason behandelt wurde (Subjekt 1). Die Datensätze demonstrieren die Reproduzierbarkeit und Vorhersagbarkeit einer ex vivo (in vitro)-Behandlung von Blut im Vergleich zu einer in vivo-Behandlung mit demselben Mittel. Die Figur zeigt auch eine geringfügige Variation zwischen Proben von verschiedenen Subjekten, was eine interpersonelle Variabilität widerspiegelt. Es wird eine Gruppe von vierzehn Bestandteilen bereitgestellt. Der Grundlinien-Profil-datensatz ist von unbehandeltem Vollblut von dem Subjekt gleicher Abstammung abgeleitet.

[0042] [Fig. 16](#) eine Balkengrafik mit einer logarithmischen Y-Achse ist, die eine grafische Darstellung kalibrierter Profildatensätze für Vollblut zeigt, wobei sich ein kalibrierter Datensatz auf (a) 2 Subjekte bezieht, die in vivo drei Tage lang mit einem inaktiven bzw. wirkungslosen Placebo und (b) 3 Tage lang mit aktivem bzw. wirksamem Prednisolon bei 100 mg/Tag behandelt wurden. Der Datensatz zeigt eine gewisse Variation zwischen Proben von unterschiedlichen Subjekten, die mit demselben Arzneimittel behandelt wurden. Die Datensätze demonstrieren eine Ähnlichkeit der Reaktionen über dieselben Genorte sowie eine quantitative Variation an anderen Orten,

was eine quantifizierbare interpersonelle Variation nahelegt. Es wird eine Gruppe von acht Elementen bereitgestellt. Der Grundlinien-Profil-datensatz ist von unbehandeltem Vollblut abgeleitet.

[0043] [Fig. 17](#) eine Balkengrafik mit logarithmischer Y-Achse ist, die eine grafische Darstellung kalibrierter Präzisionsprofildatensätze für zwei Proben zeigt, die von einem einzigen Subjekt innerhalb einer Periode von 19 Tagen genommen wurden, wobei eine Gruppe (z.B. eine Entzündungsgruppe) von 24 Elementen verwendet wurde, wobei jedes Element einem einzigartigen Genort entspricht. Der Grundlinien-Profil-datensatz bezieht sich auf Peripherblut, das von dem Subjekt vor der Behandlung genommen wurde.,

[0044] [Fig. 18](#) (a bis e) Balkengrafiken mit einer logarithmischen Achse sind, die eine grafische Darstellung kalibrierter Profildatensätze für jeweils 5 Subjekte, von denen eine Blutprobe genommen wurde, zeigen. Jede der Blutproben wurde für eine Dauer von 4 h ex vivo (in vitro) dem Entzündungsmittel Phytohämagglutinin (PHA) oder einem therapeutischen Mittel (entzündungshemmenden Mittel) in unterschiedlichen Konzentrationen: 0,1 μM , 0,3 μM , 1 μM , 3 μM und 5 μM ausgesetzt, um die optimale Dosis zur Behandlung des Subjekts zu bestimmen. Es wurde eine Gruppe von 6 Bestandteilen, die 6 Genorten entsprechen, verwendet. Der Grundlinien-Profil-datensatz war die von dem Donor gleicher Abstammung erhaltene unbehandelte Probe.

[0045] [Fig. 19](#) eine Balkengrafik mit einer logarithmischen Achse ist, die eine grafische Darstellung kalibrierter Profildatensätze für 3 verschiedene Subjekte mit verschiedenen biologischen Zuständen zeigt, wobei eine Gruppe mit 24 Bestandteilen verwendet wird. Die Profildatensätze zeigen Variabilität gemäß den Zuständen, wobei sie die Basis für eine diagnostische Signaturgruppe liefern. (a) zeigt einen kalibrierten Profildatensatz für einen Raucher gegen eine Grundlinie für einen Nichtraucher. (b) zeigt einen kalibrierten Profildatensatz für ein Subjekt mit chronischer obstruktiver Lungenerkrankung gegen eine Grundlinie für ein Subjekt ohne diese Erkrankung. Der Grundlinien-Profil-datensatz ist von einem Subjekt abgeleitet, das bezüglich dieser Zustände „normal“ ist.

[0046] [Fig. 20](#) veranschaulicht, dass individuelle Reaktionen von einer ähnlich behandelten Population unterschieden werden können. Es wird ein Vergleich der Reaktion eines einzelnen Tiers, verglichen mit seiner experimentellen Kohorte (n = 5 Tiere), bezüglich eines einzigen Orts (GST-P) bereitgestellt. Der Grundlinien-Datensatz ist der Kohortendurchschnitt. Die Figur zeigt, dass dieses Tier in den ersten zwei Tagen der Studie signifikant von dem täglichen Populationsdurchschnitt abwich, aber im Verlauf der Zeit nach der Behandlung mit Acetaminophen dem

Kohortendurchschnitt ähnlicher wurde.

[0047] **Fig. 21** eine Balkengrafik mit einer logarithmischen Achse ist, die eine grafische Darstellung kalibrierter Profildatensätze für Blutproben, die ex vivo mit LPS oder mit LPS und einem von drei entzündungshemmenden pflanzlichen Mitteln (Echinacea, Arnica oder sibirischer Ginseng) in einer Konzentration von 200 µg/ml behandelt wurden, zeigt. Es wird eine Gruppe von 24 Bestandteilen verwendet. Der Grundlinien-Profildatensatz ist von LPS-stimulierten Zellen ohne eine pflanzliche Behandlung abgeleitet. Die Figur veranschaulicht die Wirksamkeit der Verwendung des kalibrierten Präzisionsprofils zur Untersuchung der Gesamtwirkungen komplexer Verbindungen wie Nutrazeutika, deren biologische Wirkung eine Aufsummierung von mehr als einer Aktivität ist. In diesem Fall wird jedes der Pflanzenmittel als ein Immunostimulans konsumiert, die kalibrierten Präzisionsprofile offenbaren jedoch ein einzigartiges Muster, das eine Mischung von sowohl immunstimulierenden als auch entzündungshemmenden Wirkungen zeigt.

[0048] **Fig. 22** eine Balkengrafik mit einer logarithmischen Achse ist, die eine grafische Darstellung kalibrierter Profildatensätze für Blutproben, die ex vivo mit LPS oder mit LPS und Methylprednisolon oder mit LPS und Arnika behandelt wurden, zeigt. Der Grundlinien-Profildatensatz ist eine LPS-behandelte Blutprobe.

[0049] **Fig. 23** eine Balkengrafik mit einer logarithmischen Achse ist, die eine grafische Darstellung kalibrierter Profildatensätze für Proben von THP-1-Zellen, die mit LPS oder mit LPS und Arnika in drei unterschiedlichen Konzentrationen behandelt wurden, wobei eine Gruppe von 22 Bestandteilen verwendet wurde, zeigt. Der Grundlinien-Profildatensatz ist unbehandelte THP-1-Zellen. Die Figur veranschaulicht eine Konzentrationsantwort bezüglich der Genexpression über das kalibrierte Profil.

[0050] **Fig. 24** eine Balkengrafik mit einer logarithmischen Achse ist, die eine grafische Darstellung kalibrierter Profildatensätze für Proben von THP-1-Zellen, die ex vivo mit vier verschiedenen Handelsmarken von Echinacea behandelt wurden, wobei eine Gruppe von 8 Bestandteilen verwendet wurde, zeigt. Der Grundlinien-Profildatensatz ist unbehandelte THP-1-Zellen.

[0051] **Fig. 25** die Verwendung des kalibrierten Profils zum Vergleichen der relativen Wirksamkeit über die Marken oder unterschiedlicher Formulierungen veranschaulicht. Kalibrierte Profildatensätze für pflanzliche Präparate von unterschiedlichen Herstellerquellen bezüglich einer Indikator-Monozyten-Zelllinie (THP-1) sind grafisch gezeigt, wobei der Grundlinien-Profildatensatz THP-1-Zellen ohne das pflanzli-

che Mittel sind. (a) Drei kommerzielle Echinacea-Pflanzenpräparate mit 250 (µg/ml); (b) Drei Pflanzenpräparate mit unterschiedlichen Konzentrationen (250 µg/ml, 50 µg/ml und 3–10 µg/ml); (c) vier kommerzielle Echinacea-Marken mit 250 µg/ml).

Genauere Beschreibung spezifischer Ausführungsformen

[0052] Die folgenden Begriffe, wie sie in dieser Beschreibung und den begleitenden Ansprüchen verwendet werden, sollen die angegebenen Bedeutungen haben, es sei denn, der Zusammenhang erfordert etwas anderes:

Eine „Sammlung von Zellen“ ist ein Satz von Zellen, wobei der Satz mindestens einen Bestandteil hat.

[0053] Eine „Population von Zellen“ umfasst eine oder mehrere Zellen. Eine Population von Zellen kann sich auf Zellen in vivo oder auf in vitro-Kulturen beziehen. In vitro-Kulturen können Organkulturen oder Zellkulturen umfassen, wobei Zellkulturen primäre Zellkulturen oder Fortsetzungs-Zellkulturen eukaryotischer oder prokaryotischer Zellen sein können. Zelllinien können Primärkulturen oder Zellproben, z.B. von einem Tumor, aus Blut oder einer Blutfraktion, oder Biopsie-Explantate von einem Organ sein, oder sie können geschaffene Zelllinien oder mikrobielle Stämme sein.

[0054] Eine „Region des Subjekts“, aus der Proteine erhalten werden, kann (muss aber nicht) derselbe Teil des Subjekts sein, woraus eine Sammlung von Zellen oder eine Population von Zellen erhalten wurde. Die Zellen und die Proteine können beispielsweise beide aus Blut des Subjekts erhalten werden. Alternativ können beispielsweise die Zellen aus Blut erhalten werden, und die Proteine können durch Abschaben von Gewebe erhalten werden, oder umgekehrt. In ähnlicher Weise können die Proteine beispielsweise aus dem Urin des Subjekts erhalten werden, während die Zellen von woanders erhalten werden können, wie beispielsweise aus Blut.

[0055] Eine „Gruppe“ von Genen ist ein Satz von Genen, der mindestens zwei Bestandteile enthält.

[0056] Ein „normativer“ Zustand eines Subjekts, dem eine Zusammensetzung verabreicht werden soll, bedeutet den Zustand eines Subjekts vor der Verabreichung, selbst wenn es sich ergibt, dass das Subjekt unter einer Krankheit leidet.

[0057] Eine „Expression“ eines Gens umfasst das Genprodukt, ob Boten-RNA oder Protein, das sich aus der Translation der Boten-RNA ergibt.

[0058] Eine „große Anzahl“ von Datensätzen auf der Basis einer gemeinsamen Gruppe von Genen ist eine Anzahl von Datensätzen, die ausreichend groß

ist, um zu erlauben, dass eine statistisch signifikante Schlussfolgerung bezüglich eines Falls eines Datensatzes auf der Basis derselben Gruppe gezogen werden kann.

[0059] Ein „biologischer Zustand“ eines Subjekts ist der Zustand des Subjekts in einem einschlägigen Bereich, der sich unter Beobachtung befindet, und ein derartiger Bereich kann irgendeinen Aspekt des Subjekts, der hinsichtlich einer Zustandsveränderung überwacht werden kann, umfassen, wie Gesundheit, Krankheit einschließlich Krebs; Trauma; Alterung; Infektion; Gewebedegeneration; Entwicklungsschritte; physische Fitness; Fettsucht oder Stimmung. Wie zu sehen ist, können die Zustände chronisch oder akut oder einfach vorübergehend sein. Darüber hinaus kann ein angepeilter biologischer Zustand überall in dem Organismus oder der Population von Zellen manifest sein, oder er kann auf ein spezifisches Organ (wie Haut, Herz, Auge oder Blut) beschränkt sein. Der Begriff „biologischer Zustand“ umfasst einen „physiologischen Zustand“.

[0060] Die „Blindverabreichung“ eines Mittels, das aus einer Zusammensetzung oder einem Placebo ausgewählt wird, an ein Subjekt bei einer klinischen Erprobung umfasst die Verabreichung der Zusammensetzung oder des Placebos an das Subjekt nach einem Protokoll, wonach das Subjekt nicht weiß, ob die verabreichte Substanz die Zusammensetzung oder ein Placebo ist.

[0061] Ein „Organismus“ ist eine beliebige lebende Zelle einschließlich Mikroorganismen, Tieren und Pflanzen. Ein Tier ist in diesem Zusammenhang gewöhnlich ein Säugetier, kann aber auch ein Wirbeltier, das kein Säugetier ist, wie z.B. ein Zebrafisch, oder ein wirbelloses Tier, wie z.B. *Caenorhabditis elegans*, sein.

[0062] Ein „Mittel“ ist eine Zusammensetzung oder ein Stimulus. Ein „Stimulus“ bzw. „Stimulans“ kann beispielsweise Ultraviolett A oder B, oder Lichttherapie für jahreszeitlich bedingte Depression, oder eine Behandlung von Psoriasis mit Psoralen oder eine Behandlung von Melanomen mit eingebettetem radioaktivem Seed, andere Strahlungsexposition, etc., umfassen. Eine „Zusammensetzung“ umfasst eine chemische Verbindung, ein Nahrungsmittel, eine Kombination von Verbindungen oder ein komplexes Gemisch.

[0063] Ein „klinischer Indikator“ ist irgendein physiologisches Datenelement, das alleine oder in Verbindung mit anderen Daten zur Beurteilung des physiologischen Zustands einer Sammlung von Zellen oder eines Organismus verwendet wird. Dieser Begriff umfasst vorklinische Indikatoren.

[0064] Eine „Signaturgruppe“ ist irgendeine Gruppe,

die eine Unterklasse von Bestandteilen repräsentiert, wobei die Unterklasse von Bestandteilen entsprechend dem relativ hohen Informationsniveau bezüglich eines biologischen Zustands, das von jedem Element des Datensatzes vermittelt wird, ausgewählt wird.

[0065] Ein „verschiedener RNA- oder Protein-Bestandteil“ bzw. „gesonderter RNA- oder Protein-Bestandteil“ in einer Gruppe von Bestandteilen ist eine Gruppe, die RNA und/oder Protein umfasst, und jeder Bestandteil der Gruppe ist verschieden.

[0066] Die vorliegende Erfindung umfasst die Erstellung kalibrierter Datensätze, die einen biologischen Zustand oder eine Wirkung eines Mittels auf einen biologischen Zustand beschreiben. Ein kalibrierter Datensatz repräsentiert einen Satz von Werten, die Variationen in der Genexpression entsprechen, wobei die Variationen informativ sind. Dieser Weg erfordert nicht eine umfassende Analyse der gesamten Genexpression in Zielzellen, die mit einem bestimmten Zustand in Zusammenhang steht. Ebenso wenig ist irgendein einzelner Genort notwendigerweise von besonderer Signifikanz. Vielmehr wird nach einem Variationsmuster (einem Profil) gesucht, das in einer reproduzierbaren Weise mit einem bestimmten Zustand korreliert. Es kann sein, dass es kein apriori-Wissen von einer Korrelation gibt, sondern vielmehr kann eine Korrelation geschaffen werden durch Auswerten einer Gruppe von Bestandteilen vernünftiger Größe (beispielsweise bis zu 100 Bestandteilen) und wiederholtes Testen der Genexpressionsprofile für verschiedene Subjekte oder für dasselbe Subjekt, von denen die informativsten Orte für einen bestimmten Zustand ausgewählt werden können. Es kann eine informative Untergruppe von Bestandteilen in einer Gruppe, die für einen bestimmten Zustand übereinstimmend variieren, ausgewählt werden, und diese Untergruppe kann dann die Signaturgruppe werden, wobei die Signaturgruppe zu einem Signaturprofil führt.

[0067] In weiteren Ausführungsformen der Erfindung kann irgendein beliebiger kalibrierter Datensatz für ein Individuum, der mehr Elemente hat als eine einzige Signaturgruppe widerspiegelt, hinsichtlich kalibrierter Profile, die zusätzlichen Signaturgruppen entsprechen, durchforstet werden, wodurch möglicherweise neue Einsichten in Wirkungsmechanismen eines biologischen Zustands auf Gegensätze bereitgestellt werden. Die Messung von Veränderungen in transkribierter RNA in einer Zelle als ein Ergebnis einer Umweltveränderung oder von Altern ist ein äußerst empfindliches Maß für die Reaktion einer Zelle. Heute verfügbare Techniken zum Quantifizieren transkribierter RNA in einer Zelle vergrößern die Empfindlichkeit des Wegs. Die bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung, die auf Veränderungsmuster in Mengen an transkribierter RNA gerichtet sind, stellen

ein Mittel zum Fokussieren auf und Interpretieren von dieser reichhaltigen Information bereit.

[0068] Im Gegensatz zu dem obigen Weg wurde im Stand der Technik der Sequenzierung des menschlichen Genoms und der Identifizierung aller darin codierten Gene viel Aufmerksamkeit gewidmet. In Begleitung der wachsenden Menge an Sequenzdaten schaffen Mikroarrays ein Mittel zur Untersuchung tausender Gensequenzen auf Mutationen. Mikroarrays werden verwendet, um DNA-Profile bereitzustellen, die Mutationen bei einem Individuum identifizieren, und jene Mutationen werden mit Vorhersagen bezüglich einer Krankheit bei jenen Individuen in Zusammenhang gebracht. Nun sind Transkriptomik und Proteomik der Brennpunkt wachsender Aufmerksamkeit. Diese Studien sind auf die Analyse des gesamten Körpers von RNA und Protein, die von lebenden Zellen erzeugt werden, gerichtet. Mikroarrays stellen ein Verfahren zum Analysieren vieler tausend unterschiedlicher menschlicher RNAs dar, ob sie exprimiert werden und von welchen Zellen, bereit. Beispielsweise hat ein Projekt, das von dem nationalen Krebsinstitut und anderen unternommen wurde, um von verschiedenen Arten von Krebszellen erzeugte mRNAs zu untersuchen, 50.000 Gene offenbart, die bei einer oder bei mehreren Krebsarten aktiv sind. Das Ziel dieser Studien ist, neue Krebs-Arzneimittel zu identifizieren, die auf das Ausschalten oder auf die Steigerung der Produktion bestimmter Proteine gerichtet sind (Kathryn Brown, *The Human Genome Business Today*, *Scientific American*, July 2000, S. 50; Julia Karow, *The „Other“ Genomes*, *Scientific American*, July 2000, S. 53; Ken Howard, *„The Bioinformatics Gold Rush“*, *Scientific American*, July 2000, S. 58; Carol Ezzell, *Beyond the Human Genome*, *Scientific American*, July 2000, S. 64; alle durch Bezugnahme aufgenommen). Größere Bemühungen zur Korrelierung der genetischen Variation von Individuen und der funktionellen Wechselbeziehungen von Genen bei Gesundheit und Krankheit werden in einer Vielfalt von Konsortien, einschließlich dem Single Nucleotide Polymorphism Consortium (Einzelnucleotid-polymorphismus-Konsortium) und dem Human Epigenome Consortium (menschliches Epigenom-Konsortium) (Beck et al. *Nature Biotechnology* 17 (1999) S. 1144) durchgeführt. Das Epigenom-Konsortium plant, Sätze von Genom-Fragmenten sowohl von gesunden als auch von erkrankten Individuen in den 500 unterschiedlichen menschlichen Geweben zu analysieren (Bioworld International: 22. Dezember, 1999). Dieser Weg trachtet danach, die absolute Expression von Genen, die mit einem bestimmten Zustand verbunden ist, mit dem Vorliegen jenes Zustands zu korrelieren. Beispiele für Stand der Technik, der danach trachtet, Genexpression in absoluten Mengen zu messen, einschließlich durch subtraktive Verfahren oder durch Bestimmung der Mengen im Hinblick auf Haushaltsgene oder durch Anpeilen eines einzigen Genexpressionssys-

tems sind US 5 643 765; US 5 811 231; US 5 846 720; US 5 866 330; US 5 968 784; US 5 994 076; WO 97/41261; WO 98/24935; WO 99/11822; WO 99/44063; WO 99/46403; WO 99/57130; WO 00/22172 und WO 00/11208.

[0069] Wir haben einen unterschiedlichen und neuen Weg zu dem Obigen eingeschlagen, indem wir reproduzierbare Variationsmuster der Genexpression, die vermittels des Variationsgrads zwischen einer Probe und einer Grundlinie, beispielsweise einem Subjekt mit dem Zustand und dem Subjekt ohne den Zustand, informativ sind, identifizieren. Die Variationen können mit anderen nicht-genetischen Anzeichen, wie klinischen Indikatoren (für Menschen) einer traditionellen Natur korreliert sein, müssen aber nicht per se ursächlich sein. Dementsprechend wird die Menge an Genexpressionsprodukt (beispielsweise RNA-Transkript), die von einem Genort in einer Zelle unter bestimmten Umständen produziert wird, gemessen und dann als ein Wert in einem ersten Profildatensatz gespeichert. Dieser Wert wird kalibriert bezüglich eines zweiten Werts (eines Grundlinien-Profildatensatzes), um ein Element eines kalibrierten Profildatensatzes bereitzustellen. Die für den Profildatensatz aufgezeichneten Werte, die sich auf einen bestimmten Grundlinien-Datensatz stützen, um einen kalibrierten Datensatz zu erzeugen, werden Teil des beschreibenden Verzeichnisses, wobei irgendeiner oder alle in einer Datenbank gespeichert werden können, auf die über ein globales Netzwerk zugegriffen werden kann, so dass irgendwelche beliebigen neuen Daten in der Form eines Profildatensatzes oder eines kalibrierten Profildatensatzes, die an irgendeinem globalen Standort gemessen werden, direkt mit einem Archiv beschreibender Verzeichnisse, wozu kalibrierte Profildatensätze und Grundlinien-Datensätze gehören, verglichen werden können, um die gespeicherte Bibliothek von Profilen zu erweitern und Vorhersagedaten oder diagnostische Daten über einen bestimmten biologischen Zustand oder ein bestimmtes biologisches Mittel bereitzustellen.

[0070] Wir haben die Verwendung ausgewählter Gruppen von Bestandteilen, die Genorten entsprechen, von denen eine quantitative Genexpression gemessen wird, indem beispielsweise die transkribierte RNA in einer Probe eines Subjekts quantitativ gemessen wird, beispielhaft für Anwendungen veranschaulicht, die umfassen: (a) Messung der therapeutischen Wirksamkeit natürlicher oder synthetischer Zusammensetzungen oder Stimulantien, die einzeln oder in Kombinationen oder Gemischen für einen Bereich angepeilter physiologischer Zustände formuliert werden können; (b) Vorhersagen toxikologischer Wirkungen und der Dosis-Wirksamkeit einer Zusammensetzung oder eines Gemisches von Zusammensetzungen für ein Individuum oder in einer Population; (c) Bestimmung, wie zwei unterschiedliche Mittel, die in einer einzigen Behandlung verabreicht werden,

miteinander Wechselwirken könnten, um irgendeine synergistische, additive, negative, neutrale oder toxische Aktivität festzustellen; (d) Durchführung vorklinischer und klinischer Erprobung bzw. Versuche durch Bereitstellung neuer Kriterien zur Vorauswahl von Subjekten gemäß informativer Profildatensätze zur Offenbarung des Krankheits-Status, und Durchführung vorangehender Dosisstudien für diese Patienten vor der Durchführung von Versuchen der Phase 1 oder 2. Genexpressions-Profilierung kann verwendet werden, um die Kosten klinischer Versuche der Phase 3 zu verringern, und kann über Versuche der Phase 3 hinaus verwendet werden; (e) Indizierung für zugelassene Arzneimittel; (f) Auswahl einer geeigneten Medikation in einer Klasse von Medikationen für einen bestimmten Patienten, die auf ihre einzigartige Physiologie gerichtet ist; (g) Diagnostizieren oder Bestimmen einer Prognose für einen medizinischen Zustand oder eine Infektion, die dem Einsetzen von Symptomen vorangehen kann, oder alternativ Diagnostizieren schädigender Nebenwirkungen, die mit der Verabreichung eines therapeutischen Mittels verbunden sind; (h) Bewerkstelligen der Gesundheitsfürsorge für einen Patienten; und (e) Qualitätskontrolle für verschiedene Chargen eines Mittels oder eines Gemisches von Mitteln.

Das Subjekt

[0071] Die Verfahren hierin können auf ein Subjekt angewendet werden, das einen beliebigen lebenden Organismus umfasst, wobei ein lebender Organismus einen Prokarioten wie ein Bacterium oder einen Eukarioten einschließlich einzelliger eukariotischer Organismen an einem Ende des Spektrums und Menschen am anderen Ende und alles, einschließlich Pflanzen, dazwischen umfasst. Die Figuren betreffen kalibrierte Profildatensätze, die von Menschen und Säugetieren erhalten werden. Dennoch können die hier offenbarten Verfahren ohne das Erfordernis unangemessener Experimente von einem Durchschnittsfachmann auf Zellen anderer Organismen angewendet werden, weil alle Zellen RNA transkribieren und es in der Technik bekannt ist, wie RNA aus allen Arten von Zellen zu extrahieren ist.

[0072] Eine Gewebeprobe könnte eine einzige Zelle oder mehrere Zellen oder Fragmente von Zellen enthalten. Körperflüssigkeit umfasst Blut, Urin, Spinatflüssigkeit, Lymphe, Schleimhaut-Absonderungen, Hämolymphe oder irgendeine andere in der Technik für ein Subjekt bekannte Körperflüssigkeit. Für ein tierisches Subjekt kann eine Gewebe- oder Flüssigkeitsprobe mittels eines Biopsienadel-Aspirats, einer Spülungsprobe, Ausschabungen und chirurgischer Eröffnungen oder anderer in der Technik bekannter Mittel erhalten werden.

Gruppen

[0073] Schritte beim Auswählen von Bestandteilen in einer Gruppe umfassen das Durchsuchen öffentlich zugänglicher medizinischer Literatur hinsichtlich RNA oder Proteinen oder Sätzen von RNAs oder Proteinen, die direkt oder indirekt mit einem bestimmten biologischen Zustand variieren. Es kann eine Gruppe ausgewählt werden, die bis zu 100 Bestandteilen enthält. Gemäß dem zu untersuchenden Zustand mag nur ein kleiner Untersatz der Gruppenbestandteile informativ sein. Bei der Bestimmung der Zugehörigkeit der Gruppe von Genen ist es nicht notwendig, dass die Gruppe eine erschöpfende Auswahl ist. Vielmehr ist es erwünscht, von der Gruppe ein Expressionsprofil zu erhalten, das übereinstimmend bezüglich des angepeilten physiologischen oder biologischen Zustands unterscheidet. Darüber hinaus wird eine Gruppe nicht notwendigerweise entsprechend einem erwarteten Genexpressionsprofil in Zellen, die auf eine biologische Wirkung direkt ansprechen, ausgewählt. Beispielsweise kann eine mit dem Lebermetabolismus zusammenhängende Genexpression in einer Blutprobe analysiert werden. Die [Fig. 20](#) und [Fig. 22](#) stellen kalibrierte Profile von Vollblut, das mit pflanzlichen Mitteln unter Verwendung von Markern für den Lebermetabolismus behandelt wurde, bereit.

[0074] Die Anzahl an Bestandteilen in einer Gruppe kann variieren. Gemäß den unten angegebenen Beispielen werden Gruppen von bis zu 24 Genen zur Beurteilung von Expressionsstärken ausgewählt. Obwohl eine Gruppe 100 Bestandteile groß sein kann, ist es für eine bestimmte Gruppe wünschenswert, nicht mehr als 24 Bestandteile, genauer weniger als 12 Bestandteile, zu haben. Beispielsweise wurden Untersätze von nicht mehr als 8 Genen verwendet, die von einer größeren Gruppe abgeleitet werden können, die aber ausreichend informativ sind, um eine Unterscheidung zu bewirken. Die Anzahl an Bestandteilen in einer Gruppe, für die eine Expression überwacht wird, kann in Abhängigkeit von dem Zusammenhang in breitem Umfang variieren. Beispielsweise beschreibt [Fig. 1](#) eine Datengewinnung aus in vitro-Zellkultur- und aus Tiertoikologie-Studien, die die Expression von etwa 25 bis 100 oder mehr Genen umfasst. Im Gegensatz dazu umfasst die Auswahl von Markern oder Surrogat-Markern beispielsweise 3 bis 100 Gene, bevorzugt 5 bis 50 oder 5 bis 25 Gene, die zu analysieren sind, aus in klinischen Studien erhaltenen Proben. Auf diese Weise können Marker oder Surrogat-Marker mit Vorhersagewert für einen medizinischen Zustand, wie eine genetische Prädisponierung, eine Reaktion auf ein therapeutisches Mittel, einen entzündlichen Zustand oder eine Infektion, etc., identifiziert werden, und es können kumulativ größere Populationen erhalten werden, um die Korrelationen zu verfeinern. Dann kann für ein individuelles Subjekt unter Verwendung einer kleinvolu-

migen Blutprobe ein Gesundheitsprofil erstellt werden. Die Blutprobe kann hinsichtlich Expressionsprofilaten von etwa 100 bis 500 Genen, die Marker oder Surrogat-Marker für eine Anzahl medizinischer Zustände aufweisen ([Fig. 1](#): rechtes Feld) analysiert werden. Gruppen variierender Größen können verwendet werden, wie erforderlich, und nachfolgende Verfeinerungen in der Methodik können zu einer Auswahl von Untersätzen mit Gruppen von bis zu 15 Genen oder 12 Genen oder nur 6, 5, 4 oder 3 Genen führen.

[0075] Es ist beabsichtigt, dass ein beliebiger einzelner biologischer Zustand durch eine Signaturgruppe mit einer kleinen Anzahl hochgradig informativer Bestandteile, die ein kalibriertes Signaturprofil (auch als ein Fingerabdruck bezeichnet) bereitstellen, beschrieben werden kann. Das Vorliegen hochgradig informativer Orte wird in mehreren der begleitenden Figuren demonstriert. Beispielsweise schien in [Fig. 11\(a\)](#) II-2, II-4 und II-5 hochgradig informativ zu sein. Hochgradig informative Bestandteile in [Fig. 21](#) umfassen die Interleukine. Die Signaturgruppe kann ein Signaturprofil oder einen Fingerabdruck, der ausreichend unempfindlich ist, um als ein Standard beim Beschreiben eines bestimmten biologischen Zustands oder einer Wirkung eines bestimmten Mittels auf einen biologischen Zustand zu dienen, bereitstellen.

[0076] Zu Zwecken der Veranschaulichung einer Signaturgruppe wurden Bestandteile einer Gruppe zur Messung von Entzündung bereitgestellt, die bezüglich eines bestimmten biologischen Zustand informativ sind. Beispielsweise haben wir eine Gruppe für Entzündungen, die 6 Bestandteile – II-1a, II-6, II-8, II-18, GM-CSF und IFN-g in [Fig. 18\(a\)](#) bis (e) hat, verwendet, um die Reaktion von 5 Subjekten auf variierende Konzentrationen an Arzneimitteln zu bestimmen. Diese Gruppe von Bestandteilen ist ein Untersatz einer größeren Gruppe von entzündungsbezogenen Genorten, wie in [Fig. 19a](#) und [Fig. 19b](#) gezeigt, wo die entzündliche Gruppe II-a, II-b, II-2, II-3, II-4, II-6, II-7, II-8, II-10, II-12p40, II-15, II-18, GM-CSF, Ifn-gamma, TGF-b, cox-2, ICE, MMP-9, ICAM, TNF-a und TNF-b umfasst. Der Untersatz von Bestandteilen wurde auf der Basis der bezüglich des biologischen Zustands gesuchten Information ausgewählt.

[0077] Ausführungsformen der Erfindung stellen Beispiele für mindestens vier unterschiedliche Gruppen, die getrennt oder zusammen verwendet werden können, bereit. Diese Gruppen sind eine Entzündungsgruppe (TNF-a, II-1b, ICAM, II-8, II-10, II-12p40, ICE, cox-2, cox-1 und mmp-3), eine Zellwachstums- und Zelldifferenzierungs-Gruppe (c-fos, c-jun und STAT3), eine Toxizitätsgruppe (SOD-1, TACE, GR, HSP70, GST, c-fos, c-jun, INOS) und eine Lebermetabolismus-Gruppe (INOS, cyp-a und u-pa).

Andere Gruppen umfassen Hautreaktions- oder Prostatakrebs- oder endotheliale/cardiovaskuläre Reaktions-Gruppen oder Zellwachstums- oder Zelldifferenzierungs- oder Lebermetabolismus-Gruppen. Die obigen Gruppen sollen nicht beschränkend sein, wenn sie auch als Beispiele angegeben werden.

Genexpression

[0078] Zur Messung der Menge einer bestimmten RNA in einer Probe wird transkribierte RNA aus einer Probe extrahiert und bezüglich eines Bestandteils einer Gruppe quantifiziert. RNA wird aus einer Probe wie Gewebe, Körperflüssigkeit, oder Kulturmedium, worin eine Population eines Subjekts wachsen könnte, extrahiert. Beispielsweise können Zellen aufgelöst und RNA in eine geeignete Lösung, in der eine DNAse Reaktion auszuführen ist, eluiert werden. Dann kann unter Verwendung einer reversen Transkriptase eine Erststrang-Synthese durchgeführt werden. Dann kann eine Gen-Amplifikation, spezieller quantitative PCR-Assays, durchgeführt und das Gen von interessierender Größe gegen einen Marker wie 18SrRNA (Hirayama et al., Blood 92, 1998: 46–52) kalibriert werden. Proben werden in mehreren Kopien, beispielsweise vier Replikaten, gemessen. Die relative Quantifizierung der mRNA wird durch den Unterschied in Grenzwertzyklen zwischen dem Größenmarker und dem Gen von Interesse bestimmt. In einer Ausführungsform der Erfindung wird quantitative PCR unter Verwendung von Amplifikation, Reportermitteln und Geräten wie denen, die von PE Biosystems (Foster City, CA) kommerziell geliefert werden, durchgeführt. Bei einer gegebenen definierten Amplifikationseffizienz von Targettranskripten kann der Punkt (z.B. die Zykluszahl), an dem ein Signal von der amplifizierten Targetmatrize nachweisbar ist, direkt zu der Menge an spezifischem Botschaftstranskript in der gemessenen Probe in Beziehung gesetzt werden. In ähnlicher Weise können andere quantifizierbare Signale wie Fluoreszenz, Enzymaktivität, Zersetzen pro Minute, Extinktion, etc., wenn sie mit einer bekannten Konzentration von Targetmatrizen korrelieren (z.B. einer Referenz-Standardkurve) oder auf einen Standard mit begrenzter Variabilität normiert sind, verwendet werden, um die Menge an Targetmatrizen in einer unbekannt Probe zu quantifizieren.

[0079] Quantitative Genexpressionstechniken können, obwohl sie nicht auf Amplifikationsverfahren beschränkt sind, Amplifikation des Targettranskripts verwenden. Amplifikation der Targetmatrize kann durch isotherme Genamplifikations-Strategien oder durch Genamplifikation durch zyklische Temperaturwechsel wie PCR durchgeführt werden. Es ist wünschenswert, eine definierbare und reproduzierbare Korrelation zwischen dem amplifizierten Target bzw. Ziel oder Reporter und der Konzentration der Ausgangsmatrizen zu erhalten.

[0080] Es ist in Auge gefasst, dass Techniken auf dem Gebiet, die beispielsweise Mikrofluidik und hochgradig empfindliche Marker verwenden, ermöglichen, dass eine Quantifizierung von RNA direkt aus einer einzigen Zelle oder einer aufgelösten Zelle stattfindet. Die Menge an für irgendeinen bestimmten Ort gemessenem Transkript ist ein Datenpunkt oder Element des ersten Profildatensatzes für eine bestimmte Gruppe.

[0081] Gemäß Ausführungsformen der Erfindung wird ein erster Profildatensatz von der Probe abgeleitet, wobei der erste Profildatensatz eine Mehrzahl von Elementen enthält, wobei jedes Element ein quantitatives Maß für die Menge einer RNA ist, die von einem Genort transkribiert wird, wobei der Genort ein Bestandteil in einer Gruppe von Bestandteilen ist. Ein erster Profildatensatz kann aus einem quantitativen Messen der Menge einer einzelnen RNA oder eines einzelnen Proteins, das einem Genort entspricht, erhalten werden. Die hier angegebenen Figuren betreffen RNA. Das Verfahren könnte jedoch unter Verwendung von Proteinen angewendet werden, wenn empfindliche quantitative Techniken zur Messung der Menge eines einzelnen Proteins in einer Zelle verfügbar sind.

Grundlinien-Profildatensätze

[0082] Die Analysen von Proben von einzelnen Individuen und von großen Gruppen von Individuen liefern eine Bibliothek von Profildatensätzen, die eine bestimmte Gruppe oder eine Reihe von Gruppen betreffen. Diese Profildatensätze können als Verzeichnisse in einer Bibliothek zur Verwendung als Grundlinien-Profildatensätze gespeichert werden. Wie der Begriff „Grundlinie“ nahelegt, dienen die gespeicherten Grundlinien-Profildatensätze als Vergleichswerte zur Schaffung eines kalibrierten Profildatensatzes, der bezüglich eines biologischen Zustands oder Mittels informativ ist. Es ist beabsichtigt, dass viele Grundlinien-Profildatensätze in Bibliotheken gespeichert und auf eine Anzahl von Querverweisarten klassifiziert werden. Eine Form der Klassifizierung könnte sich auf die charakteristischen Eigenschaften der Gruppen, von denen die Datensätze abgeleitet sind, stützen. Eine andere Form der Klassifizierung könnte die Verwendung eines bestimmten biologischen Zustands sein. Das Konzept des biologischen Zustands umfasst einen beliebigen Zustand, in dem sich eine Zelle oder eine Population von Zellen zu irgendeiner Zeit befinden könnte. Dieser Zustand könnte die Geografie von Proben, das Geschlecht der Subjekte oder irgendein anderes Unterscheidungskriterium widerspiegeln. Einige der Unterscheidungskriterien können sich überlappen. Auf die Bibliotheken könnte auch hinsichtlich Verzeichnissen, die mit einem einzelnen Subjekt oder mit einer bestimmten klinischen Erprobung im Zusammenhang stehen, zugegriffen werden. Die Klassifizierung von Grundli-

nien-Profildatensätzen kann außerdem mit medizinischer Information über ein bestimmtes Subjekt, einen medizinischen Zustand, ein bestimmtes Mittel, etc., kommentiert werden.

[0083] Die Wahl eines Grundlinien-Profildatensatzes zur Erzeugung eines kalibrierten Profildatensatzes steht in Beziehung zu dem biologischen Zustand, der beurteilt, überwacht oder vorhergesagt werden soll, sowie zu der beabsichtigten Verwendung der kalibrierten Gruppe, z.B. zur Überwachung von Arzneimittel-Entwicklung, Qualitätskontrolle oder anderen Verwendungen. Es könnte wünschenswert sein, auf Grundlinien-Profildatensätze von demselben Subjekt, für das ein erster Profildatensatz erhalten wurde, oder von einem unterschiedlichen Subjekt zu variierenden Zeiten, Stimulans-Expositionen, Arzneimittel- oder komplexe Verbindungen-Expositionen, zuzugreifen; oder sie können von ähnlichen oder unähnlichen Populationen abgeleitet sein.

[0084] Der Profildatensatz kann von demselben Subjekt stammen, für das der erste Datensatz erhalten wurde, wobei die Probe zu einer getrennten oder ähnlichen Zeit, an einer unterschiedlichen oder ähnlichen Stelle oder in einem unterschiedlichen oder ähnlichen physiologischen Zustand genommen wird. **Fig. 5** beispielsweise gibt ein Protokoll an, in dem die Probe vor einer Stimulierung oder nach einer Stimulierung genommen wird. Der von der unstimulierten Probe erhaltene Profildatensatz kann als ein Grundlinien-Profildatensatz für die nach der Stimulierung genommene Probe dienen. Der Grundlinien-Datensatz kann auch von einer Bibliothek abgeleitet sein, die Profildatensätze einer Population von Subjekten, die irgendeine abgrenzende charakteristische Eigenschaft oder einen abgrenzenden biologischen Zustand haben, enthält. Der Grundlinien-Profildatensatz kann auch irgendwelchen ex vivo- oder in vitro-Eigenschaften, die mit einer in vitro-Zellkultur verknüpft sind, entsprechen. Die sich ergebenden kalibrierten Profildatensätze können dann als ein Verzeichnis in einer Datenbank oder Bibliothek (**Fig. 6**) zusammen mit oder getrennt von der Grundlinien-Profildatenbank und optional dem ersten Profildatensatz gespeichert werden, wenn auch der erste Profildatensatz normalerweise in einen Grundlinien-Profildatensatz unter geeigneten Klassifizierungskriterien inkorporiert würde.

[0085] Ausgewählte Grundlinien-Profildatensätze können auch als ein Standard verwendet werden, nach dem Fabrikationspartien hinsichtlich Wirksamkeit, Toxizität, etc., zu beurteilen sind. Wenn die Wirkung eines therapeutischen Mittel gemessen wird, könnte der Grundlinien-Datensatz Genexpressionsprofilen, die vor der Verabreichung des Mittels genommen wurden, entsprechen. Wenn eine Qualitätskontrolle für ein neu hergestelltes Produkt festgelegt wird, könnte der Grundlinien-Datensatz dem Gold-

standard für das Produkt entsprechen. Es können jedoch beliebige geeignete Normierungstechniken verwendet werden. Beispielsweise wird ein Durchschnitts-Grundlinien-Profil Datensatz aus authentischem Material eines natürlich gewachsenen pflanzlichen Nutrazeutikums erhalten und im Verlauf der Zeit und über unterschiedliche Partien verglichen, um in Partien von Verbindungen, die zur Abgabe hergestellt wurden, Gleichmäßigkeit oder fehlende Gleichmäßigkeit zu demonstrieren.

Kalibrierte Daten

[0086] Ein kalibrierter Profildatensatz kann als eine Funktion eines Elements eines ersten Profildatensatzes und eines entsprechenden Elements eines Grundlinien-Profil Datensatzes für einen gegebenen Genort in einer Gruppe beschrieben werden. Beispielsweise können kalibrierte Profildatensätze abgeleitet werden durch Berechnen eines Verhältnisses der Menge an RNA, die für einen Gruppenbestandteil in einer Zellprobe in einer Umwelt, die einen Eingriff wie eine therapeutische Behandlung umfasst, oder zu einer bestimmten Zeit transkribiert wird (erster Profildatensatz), bezüglich der Menge an RNA, die für denselben Gruppenbestandteil in einer Zelle, die sich in irgendeiner Weise von der Probe unterscheidet, transkribiert wird (Grundlinien-Profil Datensatz) ([Fig. 5](#) und [Fig. 6](#)). Wir haben gefunden, dass kalibrierte Profildatensätze in Proben, die wiederholt getestet werden, reproduzierbar sind ([Fig. 17](#)). Wir haben auch gefunden, dass kalibrierte Profildatensätze, die erhalten wurden, wenn Proben von einem Subjekt ex vivo einer Verbindung ausgesetzt werden, kalibrierten Profildaten von einer Probe, die einer Probe in vivo ausgesetzt wurde, vergleichbar sind ([Fig. 14](#) und [Fig. 16\(a\), \(b\)](#)). Wir haben auch gefunden, dass eine mit einem Mittel behandelte Indikator-Zelllinie kalibrierte Profildatensätze bereitstellen kann, die mit denjenigen vergleichbar sind, die von in vivo- oder ex vivo-Populationen von Zellen erhalten wurden ([Fig. 15](#)). Darüber hinaus haben wir gefunden, dass die Verabreichung einer Probe von einem Subjekt an Indikatorzellen bezüglich des biologischen Zustands des Subjekts, einschließlich der Gesundheit, des Krankheitszustands, therapeutischer Eingriffe, Alterung oder Umweltreiz- oder Toxin-Exposition des Subjekts, informative kalibrierte Profildatensätze liefern kann ([Fig. 25](#)).

[0087] Eine bevorzugte Verwendung eines kalibrierten Profildatensatzes ist, einen biologischen Zustand eines Subjekts zu beurteilen. Dies kann zu Zwecken der Diagnose oder der Prognose einer klinischen Störung sein. Es ist wünschenswert, einen kalibrierten Datensatz zu erhalten, der einen Gesundheitszustand oder alternativ einen Alters- oder Körpermasse-Zustand oder irgendeinen Zustand, in dem sich ein einzelnes Subjekt befinden könnte, beschreibt. Beispielsweise könnte sich der biologische Zustand

auf die physische Aktivität, die Kondition oder den Trainingszustand, den Geisteszustand, einen Umweltfaktor wie Medikation, Ernährung oder Geografie oder eine Exposition beziehen, wobei die Exposition Strahlung oder Umweltverschmutzung oder ein infektiöses Mittel, ein biologisches Toxin oder ein Umwelttoxin betrifft. Wenn die Gesundheit oder umgekehrt eine klinische Störung beurteilt wird, können kalibrierte Profildatensätze verwendet werden, um eine Veränderung im Gesundheitszustand durch periodischen oder regelmäßigen Vergleich von Profilen zu überwachen; die Störung kann ein komplexer Krankheitsprozess sein, an dem möglicherweise mehrere Gene beteiligt sind, wozu Entzündung, Autoimmunkrankheit, degenerative Krankheit, Allergie, Gefäßkrankheit, Ischämie, Entwicklungskrankheit, Hormonstörungen und Infektionskrankheiten gehören. Die klinische Störung kann außerdem Arthritis, Asthma, multiple Sklerose und Veränderungen im Bereich der Menopause umfassen. Der biologische Zustand kann ein System eines Subjekts beeinflussen, wozu ein Atmungs-, Gefäß-, Nerven-, Stoffwechsel-, Harn-, Fortpflanzungs-, Struktur- und Immunsystem oder ein anderer Stoffwechselzustand gehören. Die obigen Beispiele für einen biologischen Zustand sind zur Veranschaulichung angegeben und sollen nicht beschränkend sein.

[0088] In ähnlicher Weise können kalibrierte Profildatensätze verwendet werden, um die Reaktion eines Wirts auf ein infektiöses Mittel zu Zwecken der Identifizierung des infektiösen Mittels, der Beurteilung der Dauer der Infektion, des Ausmaßes der Exposition, oder um therapeutische Entscheidungen zu treffen, zu messen, zu überwachen oder vorherzusagen.

[0089] Die Beurteilung der Aktivität eines Mittels kann eine Reihe von kalibrierten Profilen erfordern. Es wird hier gezeigt, dass kalibrierte Profildatensätze verwendet werden können, um die biologische Aktivität eines Mittels, das eine einzige Verbindung oder eine komplexe Verbindung wie ein Nutrazeutikum oder ein pflanzliches Mittel sein kann, zu beschreiben. Das Mittel kann unter Verwendung von Indikatorzellen, ex vivo-Zellpopulationen oder durch in vivo-Verabreichung getestet werden. Diese Tests können sich auf eine Reihe von Signaturgruppen oder erweiterten Gruppen für unterschiedliche biologische Zustände stützen. Die sich ergebenden kalibrierten Profile können dann verwendet werden, um von der in vitro-Studie auf die wahrscheinliche in vivo-Aktivität zu schließen. Einsichten in die Toxizität und in Wirkungsmechanismen können auch aus Kalibrierungs-Profil Datensätzen abgeleitet werden. Beispielsweise glaubt man, dass die Pflanze Echinacea sowohl immunstimulierende als auch entzündungshemmende Eigenschaften hat, obwohl keine systematisch gemessen wurde. Wir haben einen systematischen Weg bereitgestellt, um die biologischen Akti-

vitäten dieser und anderer Pflanzen bzw. Kräuter zu untersuchen. Wir untersuchten die angeblichen immunstimulierenden Eigenschaften der Pflanzen durch Vergleichen der Wirkung einer Behandlung der Indikator-Zelllinie THP-1 oder von Peripherblutzellen mit dem Mittel mit unbehandelten Zellen. Unbehandelte Zellen umfassen mit LPS stimulierte unbehandelte Zellen. Unbehandelte Zellen wurden als ein Grundlinien-Profil Datensatz verwendet, um den Unterschied bei der Genexpression zwischen einem Grundlinien-Profil Datensatz und der experimentellen Behandlung mit der Verbindung zu messen. Grundlinien-Profil Datensätze umfassten eine einzige Probe oder einen Durchschnittswert von einer Reihe von Experimenten. Die sich ergebenden kalibrierten Profildatensätze konnten dann mit einer Bibliothek kalibrierter Profildatensätze für eine bestimmte Pflanze oder/und Bibliotheken, die zu unterschiedlichen Mitteln oder Bedingungen gehörten, verglichen werden.

[0090] Aus der Information, die über ein vorher unbeschriebenes Mittel erhalten wurde, kann eine Signaturgruppe, optional zusammen mit einem Signaturprofil, abgeleitet werden, um als ein Goldstandard zum Testen anderer Chargen desselben Mittels zu dienen.

Berechnung kalibrierter Profildatensätze und Computerhilfen

[0091] Die Funktion betreffend die Basislinien- und Profildatensätze ist in einer bevorzugten Ausführungsform ein als ein Logarithmus ausgedrücktes Verhältnis. Der kalibrierte Profildatensatz kann in einem Arbeitsblatt ausgedrückt werden oder grafisch, beispielsweise in einem Säulendiagramm oder in tabellarischer Form, dargestellt werden, kann aber auch in einer dreidimensionalen Darstellung ausgedrückt werden. Bevorzugt wird der Bestandteil auf der X-Achse angeführt, und die logarithmische Skala ist auf der Y-Achse. Elemente eines kalibrierten Datensatzes können, bezogen auf die Grundlinie, als ein positiver Wert, der eine relative Steigerung der Genexpression repräsentiert, oder als ein negativer Wert, der eine relative Verringerung der Genexpression repräsentiert, ausgedrückt werden.

[0092] Jedes Element des kalibrierten Profildatensatzes sollte innerhalb eines Bereichs bezüglich ähnlicher Proben, die von dem Subjekt unter ähnlichen Bedingungen genommen wurden, reproduzierbar sein. Beispielsweise können die kalibrierten Profildatensätze bezüglich ähnlicher Proben, die von dem Subjekt unter ähnlichen Bedingungen genommen wurden, innerhalb einer Größenordnung reproduzierbar sein. Insbesondere können die Elemente innerhalb von 50% reproduzierbar sein, insbesondere innerhalb von 20% reproduzierbar sein. Jedes Element des kalibrierten Profildatensatzes hat eine biologische Signifikanz, wenn es einen um mehr als einen

Betrag D abweichenden Wert hat, wobei $D = F(1,1) - F(0,9)$, und wobei F eine zweite Funktion ist.

[0093] Es ist das Muster von zunehmender, abnehmender und keiner Veränderung in der Genexpression der Mehrzahl der untersuchten Genorte in der Gruppe, das verwendet wird, um einen kalibrierten Profildatensatz herzustellen, der informativ ist hinsichtlich eines biologischen Zustands, einer biologischen Wirksamkeit von Behandlungsbedingungen mit einem Mittel, oder zum Vergleich mit Populationen, und der verwendet werden kann, um wahrscheinliche Kandidaten für eine Arzneimittel-Erprobung zu identifizieren, in Kombination mit anderen klinischen Indikatoren verwendet werden kann, um diagnostisch oder prognostisch bezüglich eines biologischen Zustands zu sein, oder verwendet werden kann, um die Entwicklung eines Pharmazeutikums oder Nutrazeutikums durch Herstellung, Test und Vermarktung zu lenken.

[0094] Die aus einer quantitativen Genexpression erhaltenen numerischen Daten und numerische Daten aus einer kalibrierten Genexpression bezogen auf einen Grundlinien-Profil Datensatz können in Datenbanken oder digitalen Speichermedien gespeichert werden und können für Zwecke, wozu ein Management der Patienten-Gesundheitsfürsorge gehört, oder zur Durchführung klinischer Erprobungen oder zur Charakterisierung eines Arzneimittels zurückgewonnen werden. Die Daten können beispielsweise durch das World Wide Web, durch Email oder durch Internet-Zugangsseiten oder durch Hardcopy in Netzwerke übertragen werden, um von entfernten geografischen Standorten aus gesammelt und zu einem Pool vereint zu werden ([Fig. 8](#)).

[0095] In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein beschreibendes Verzeichnis in einer einzigen oder mehreren Datenbanken gespeichert, wobei die gespeicherten Daten die Roh-Genexpressionsdaten (erster Profildatensatz) vor der Transformation durch Verwendung eines Grundlinien-Profil Datensatzes umfassen, sowie ein Verzeichnis des Grundlinien-Profil Datensatzes, der zur Erzeugung des kalibrierten Profildatensatzes verwendet wird, einschließlich, beispielsweise, Anmerkungen dazu, ob der Grundlinien-Profil Datensatz von einer bestimmten Signaturgruppe abgeleitet ist, und einer beliebigen anderen Anmerkung, die die Interpretation und Verwendung der Daten erleichtert.

[0096] Weil sich die Daten in einem universellen Format befinden, kann die Handhabung der Daten leicht mit einem Computer bewerkstelligt werden. Die Daten werden so organisiert, dass sie eine Ausgabe liefern, die optional einer grafischen Darstellung eines kalibrierten Datensatzes entspricht. Beispielsweise kann eine von einem Subjekt abgeleitete, bestimmte Probe, die RNA und/oder Protein ist, als P₁

bezeichnet werden. Der erste Profildatensatz besteht aus M_j , wobei M_j ein quantitatives Maß für einen bestimmten RNA- oder Protein-Bestandteil ist. Das Verzeichnis R_i ist ein Verhältnis von M und P und kann mit zusätzlichen Daten zu dem Subjekt, die sich beispielsweise auf Alter, Ernährung, Ethnizität, Geschlecht, geografischen Standort, medizinische Störung, geistige Störung, Medikation, physische Aktivität, Körpermasse und Umwelt-Exposition beziehen, kommentiert werden. Darüber hinaus kann die Datenhandhabung außerdem ein Zugreifen auf Daten von einer zweiten Zustands-Datenbank, die zusätzliche medizinische Daten enthalten kann, die gegenwärtig nicht in den kalibrierten Profildatensätzen enthalten sind, umfassen. In diesem Zusammenhang kann der Daten-Zugriff über ein Computernetzwerk erfolgen.

[0097] Die oben beschriebene Datenspeicherung auf einem Computer kann die Information in einer Form bereitstellen, in der von einem Verwender darauf zugegriffen werden kann. Dementsprechend kann der Verwender die Information auf einen zweiten Zugriffs-Standort laden, einschließlich Herunterladen der Information. Der Zugriff kann jedoch auf Verwender beschränkt werden, die ein Passwort oder eine andere Sicherheitseinrichtung haben, um die darin enthaltenen medizinischen Verzeichnisse zu schützen. Ein Merkmal dieser Ausführungsform der Erfindung ist die Fähigkeit eines Verwenders, dem Datensatz neue oder kommentierte Verzeichnisse hinzuzufügen, so dass die Verzeichnisse Teil der biologischen Information werden.

[0098] Die grafische Darstellung kalibrierter Profildatensätze, die ein Produkt wie ein Arzneimittel betreffen, schafft eine Möglichkeit zur Standardisierung eines Produkts mittels des kalibrierten Profils, genauer eines Signaturprofils. Das Profil kann als ein Merkmal, mit dem das Arzneimittel beworben werden kann, verwendet werden.

[0099] Die verschiedenen Ausführungsformen der Erfindung können auch als ein Computerprogramm-Produkt zur Verwendung mit einem Computersystem ausgeführt werden. Das Produkt kann einen Programmcode zum Ableiten eines ersten Profildatensatzes und zur Erstellung kalibrierter Profile umfassen. Eine derartige Ausführung kann eine Reihe von Computeranweisungen umfassen, die entweder auf einem greifbaren Medium, wie einem Computer-lesbaren Medium (beispielsweise einer Diskette, CD-ROM, ROM oder Festplatte), festgelegt sind oder über ein Modem oder eine andere Interface-Einrichtung, wie einen Verbindungsadapter, der über ein Medium mit einem Netzwerk verbunden ist, an ein Computersystem übertragbar sind. Das Medium kann entweder ein greifbares Medium (beispielsweise optische oder analoge Verbindungsleitungen) oder ein Medium, das mit drahtlosen Techniken ausgerüstet ist (beispielsweise Mikrowellen-, Infrarot-

oder andere Übertragungstechniken), sein. Die Reihe von Computeranweisungen verkörpert bevorzugt die gesamte oder einen Teil der Funktionalität, die vorher bezüglich des Systems hierin beschrieben wurde. Fachleute sollten sich bewusst sein, dass derartige Computeranweisungen in einer Anzahl von Programmiersprachen zur Verwendung mit vielen Computerbauarten oder Computerbetriebssystemen geschrieben werden können. Außerdem können solche Anweisungen in irgendeiner Speichervorrichtung, wie Halbleiter-, magnetischen, optischen oder anderen Speichervorrichtungen, gespeichert werden und können unter Verwendung irgendeiner Kommunikationstechnologie, wie optischen, Infrarot-, Mikrowellen- oder anderen Übertragungstechnologien, übertragen werden. Es wird erwartet, dass ein solches Computerprogramm-Produkt als ein entnehmbares Medium mit begleitender gedruckter oder elektronischer Dokumentation (beispielsweise eingeschweißte Software) verteilt werden kann, vorab auf ein Computersystem (beispielsweise auf System-ROM oder Festplatte) geladen werden oder von einem Server oder einem elektronischen schwarzen Brett über das Netzwerk (beispielsweise das Internet oder World Wide Web) verteilt werden kann. Zusätzlich wird außerdem ein Computersystem, das Abzweigungsmodule zum Ableiten eines ersten Datensatzes und eines Kalibrierungs-Profildatensatzes umfasst, bereitgestellt.

Klinische Versuche

[0100] Die Verwendung kalibrierter Profildatensätze zur Durchführung klinischer Versuche ist in **Fig. 10** veranschaulicht, wobei die oben beschriebenen Verfahren und Vorgehensweisen zur Ausführung einer klinischen Erprobung oder zur Bewerkestilligung von Patientenfürsorge verwendet werden. Darüber hinaus kann eine Vereinheitlichung zwischen den Laborkliniken erreicht werden, indem eine bestimmte Indikator-Zelllinie wie THP-1 verwendet wird, die mittels eines bekannten Stimulators wie Lipopolysaccharid stimuliert wird, so dass das sich ergebende Profil als ein Maßstab wirkt, dass das Labor das Protokoll korrekt durchführt.

[0101] Beispiele dafür, wie Ausführungsformen der Erfindung verwendet werden können, um klinische Versuche zu verbessern, umfassen die Bereitstellung neuer Verfahren zur Patientenauswahl. Klinische Versuche, bei denen Kandidaten-Subjekte gemäß einem vorbestimmten optimalen kalibrierten Profil für einen gegebenen biologischen Zustand einbezogen oder ausgeschlossen werden, können zu einer präziseren Überwachung führen als sie ansonsten möglich wäre. Es kann auch zu einer größeren Effizienz bei der Gestaltung der klinischen Erprobung führen, weil ungeeignete Patienten, die beispielsweise komplizierende Faktoren oder Zustände haben, ausgemustert werden können. Die kalibrierten Profildaten

verbessern auch das „Signal zu Rausch“ durch Entfernung von Nicht-Ansprechern aus Doppelblind-Placebostudien. Der grundlegende Aufbau der Gestaltung einer klinischen Erprobung unter Verwendung von Genexpressions-Profilierung könnte irgendeinem von mehreren Formaten folgen. Diese umfassen ein Testen von Körperflüssigkeit von einem Kandidaten-Patienten bei der Erprobung ex vivo gegen ein neues therapeutisches Mittel und ein Analysieren der kalibrierten Profile bezüglich einer mit dem Mittel behandelten Probe und einer mit Placebo behandelten Probe unter Verwendung einer vorbestimmten Gruppe, und eine Beurteilung, ob der Kandidaten-Patient wahrscheinlich ohne Nebenwirkungen auf die Zusammensetzung, die getestet wird, reagieren würde. Bei ausgewählten Indikationen können von in vitro-Zellkulturen oder Organkulturen erhaltene Profildaten wünschenswert sein, wobei die Zelle von einem Targetsujet oder von einem anderen Subjekt oder von einer geschaffenen Zelllinie, oder von Zellproben, die von dem Targetsujet entfernt wurden, stammt, wobei die Zellproben von irgendeiner Körperflüssigkeit einschließlich Blut, Urin, Samen, einer amniotischen oder einer cerebrospinalen Flüssigkeitsprobe, oder von einem Abstrich von Schleimhäuten wie von der Wangenhöhle, dem Auge, der Nase, der Vagina, oder mittels einer Biopsie einschließlich einer epithelialen, einer Leber-, Brustbeinmark, testikulären Biopsie, oder aus Tumorgewebe, das chirurgisch aus einem Tumor aus irgendeiner Stelle entfernt wurde, erhalten werden können. Die oben beschriebenen Quellen für Proben sind auf eine beliebige medizinische Verwendung, bei der kalibrierte Profildatensätze erwünscht sind, anwendbar.

[0102] In vitro-Dosierungs- und Toxizitäts-Studien unter Verwendung kalibrierter Profildatensätze, die von Indikator-Zelllinien oder von Proben des Patienten, die ex vivo getestet wurden, erhalten wurden, können vor Beginn der klinischen Erprobung nützliche Information bereitstellen, und können die Kosten und die Zeit einer klinischen Erprobung signifikant verringern, während sie die Wahrscheinlichkeit, das Vorliegen einer vorteilhaften Wirkung zu identifizieren, erhöhen. Insbesondere kann die Dosis auf individualisierter Basis optimiert werden, um den Einfluss auf das therapeutische Ergebnis zu maximieren. Beispielsweise zeigt **Fig. 12**, wie ex vivo Blutzellen auf die stimulierende Wirkung von LPS und die nachfolgende Behandlung mit einem entzündungshemmenden Arzneimittel (Methotrexat, Meclofenamat oder Methylprednisolon) ansprechen. Die Daten zeigen, wie die Wirkung von Methotrexat und Meclofenamat ähnliche kalibrierte Profildatensätze erzeugt, wobei die Grundlinie LPS-behandeltes Blut ist. Im Gegensatz dazu hat das Methylprednisolon eine von den anderen zwei Verbindungen wesentlich unterschiedliche Wirkung. Eine ähnliche Art von Analyse kann mit komplexen Gemischen durchgeführt

werden, wie in **Fig. 21** veranschaulicht, in der die kalibrierten Profile, die erhalten wurden, wenn auf LPS-stimuliertes Blut ex vivo Echinacea, Arnica und sibirischer Ginseng angewendet wurden, verglichen werden. In diesem Beispiel scheinen alle drei Mittel bezüglich einer Probe von einem einzigen Subjekt voneinander unterschiedlich zu reagieren. Ähnliche Analysen können verwendet werden, um Verbindungen mit unbekanntem Targets oder Aktivitäten oder Stoffwechsellustern mit Verbindungen, komplex oder einfach, mit bekannten oder vorbestimmten Profilen zu vergleichen.

[0103] Die obigen Verfahren und Vorgehensweisen können bei der Gestaltung und Durchführung klinischer Versuche oder als ein ergänzendes Hilfsmittel verwendet werden. Darüber hinaus können die obigen Verfahren und Vorgehensweisen verwendet werden, um die Gesundheit der Patienten sowie das Ansprechen der Patienten auf ein Mittel vor, während und nach der klinischen Erprobung zu überwachen. Dies umfasst eine Überwachung, ob mehrere Mittel miteinander Wechselwirkungen, synergistisch oder additiv wirken, oder bezüglich zueinander toxisch oder neutral sind. Diese Art von Information ist sehr wichtig, da die Einzelnen eine steigende Anzahl von Arzneimitteln einnehmen.

[0104] In ähnlicher Weise können die oben beschriebenen Verfahren und Vorgehensweisen verwendet werden, um die Patienten-Fürsorge für einen Einzelnen oder eine Population zu bewerkstelligen. Derartige Verfahren und Vorgehensweisen können auch verwendet werden, um ein regionales oder globales Forschungsnetzwerk zu entwickeln, das kalibrierte Profildatensätze und die sich ergebenden Datenbanken nutzt, um Forschung oder Versuche durchzuführen.

[0105] Sowohl die Kalibrierungs-Profilatensätze in grafischer Form als auch die zugehörigen Datenbanken zusammen mit aus beiden gewonnener Information sind Waren, die zusammen oder getrennt für eine Vielfalt von Zwecken verkauft werden können. Beispielsweise können grafische Darstellungen von Kalibrierungs-Profilatensätzen eine Beschreibung eines Produkts bezüglich seiner Aktivität bereitstellen, die verwendet werden kann, um für das Produkt zu werben. Alternativ stellen die grafische Form der kalibrierten Profildatensätze und der Zugang zu Grundlinien-Profilatensätzen ein Mittel für Hersteller bereit, um einzelne Produktchargen gegen einen Goldstandard zu testen.

[0106] Die Daten können strategisch zur Gestaltung klinischer Versuche verwendet werden. Sie können auch für Ärzte, die an abgelegenen Standorten praktizieren, nützlich sein, um einem Patienten eine personalisierte Gesundheitsfürsorge anzubieten. Dementsprechend könnte der Arzt personalisierte Daten-

banken für kalibrierte Profildatensätze vor und nach der Behandlung eines bestimmten Zustands erstellen. Neue Daten zu dem Subjekt könnten der personalisierten Datenbank bei jedem Besuch beim Arzt hinzugefügt werden. Die Daten könnten an abgelegenen Standorten durch die Verwendung von Kits, die es einem Arzt erlauben, einen ersten Profildatensatz an einer Probe von einem Patienten zu erhalten, erzeugt werden. Damit entfernt befindliche Benutzer Zugriff auf die Seite erhalten, wird ins Auge gefasst, dass ein gesicherter Zugang zu dem globalen Netzwerk, das Bibliotheken von Grundlinien-Profildatensätzen und kalibrierten Profildatensätzen enthält, die nach bestimmten Kriterien klassifiziert sind und Daten von größeren Populationen als einem einzigen Individuum repräsentieren, notwendig wäre. Der Zugang zu der globalen Datenbank kann Passwort-gesichert sein, wodurch die Datenbank vor verfälschten Verzeichnissen geschützt wird und persönliche medizinische Daten gesichert werden. Die durch die kalibrierten Datensätze bereitgestellte grafische Form kann verwendet werden, um in einem Arzneibuch Kataloge von Verbindungen, komplett mit toxischen Wirkungen, die sich für bestimmte Individuen ergeben könnten, sowie anderen Arten von Arzneimittel-Wechselwirkungen, zu schaffen.

[0107] Der Zugang zu der globalen Datenbank kann die Option umfassen, ausgewählte Daten auf einen zweiten Zugangsstandort zu laden. Dieser Prozess könnte das Herunterladen der Information auf einen beliebigen von dem Verwender gewünschten Standort umfassen und könnte das Sichern von Hardcopies von Informationen umfassen. Es ist wünschenswert, zu kontrollieren, wie und welche Daten heruntergeladen oder kopiert werden, um die Integrität der Datenbank aufrecht zu erhalten. Es wird ins Auge gefasst, dass, während ein globales Netzwerk klinischer Daten eine Informationsquelle wäre, es Anwendbarkeit bei der Durchführung von Forschungen hätte, die epidemiologische Studien und Studien, die den Wirkungsmechanismus eines Mittels betreffen, und Studien, die die Art von interpersoneller Variabilität, wie bestimmt durch kalibrierte Profildatensätze, umfassen könnten.

Beispiele für medizinische Anwendungen

(a) Früher Nachweis infektiöser Krankheiten. Marker oder Surrogat-Marker von Mäusen können erhalten werden, um eine Genexpression bei Menschen zu messen, die eine frühe oder sofortige Reaktion auf eine Infektion anzeigt, beispielsweise auf ein Virus wie das Hepatitis-Virus, oder auf ein Bacterium, wie *Mycobacterium tuberculosis* (das Gram-positive ätiologische Mittel von Tuberkulose) (siehe [Fig. 4](#)). Kandidaten-Gene werden identifiziert, und Veränderungen in der Expression jener Gene beim Vorliegen einer Provokation liefern einen Satz von Markern. Der Satz von Mar-

kern kann Marker, die von dem Genom des Subjekts codiert werden, und einen oder mehrere unterscheidende Marker, die von dem Genom des infektiösen Mittels codiert werden, vereinen. Beispielsweise können Veränderungen in der Expression eines sofortigen frühen Gens eines Virus, z.B. eines Gens, das ein Enzym der viralen Replikation codiert, und eines Wirtsgens wie dem Gen für irgendeine oder alle von II-2, II-4 und II-5, Marker oder Surrogat-Marker für einen medizinischen Zustand, die in der Lage sind, den Zustand vor dem Einsetzen medizinischer Symptome nachzuweisen, aufweisen. Dieses Verfahren leistet einen früheren Nachweis einer Infektion als er unter Verwendung gegenwärtiger diagnostischer Techniken möglich ist.

(b) Toxizitätsprofile und mechanistische Profile, die von einem in vitro-Test und in vivo-Tests erhalten wurden. Toxizitätsinformation und mechanistische Information, die sich aus der Verabreichung einer Verbindung an eine Population von Zellen ergibt, kann unter Verwendung kalibrierter Profildatensätze überwacht werden. Das Folgende ist ein Beispiel für ein experimentelles Protokoll zur Erhaltung dieser Information. Zuerst werden experimentelle Gruppen aufgestellt: (1) Kontrollzellen, ohne therapeutisches Mittel und ohne Stimulans gehalten; (2) mit therapeutischem Mittel behandelte Zellen, aber ohne Stimulans; (3) Zellen ohne therapeutisches Mittel, aber mit Stimulans; (4) Probe mit therapeutischem Mittel und mit Stimulans. Die Population von Zellen kann aus Primärzellkulturen, die in Kulturplatten unter Verwendung von in der Technik wohlbekannten Verfahren hergestellt wurden; oder einem voll entwickelten, differenzierten Zellpräparat aus Vollblut oder isolierten Monozyten aus dem Zielorganismus, der in diesem Beispiel eine Maus ist, ausgewählt werden.

[0108] Die Zellen werden durch eine Vorbehandlung mit aus einem Gram-negativen Bacterium (eine Vielfalt von LPS-Präparaten von pathogenen Bakterien, beispielsweise von *Salmonella typhimurium* und von *Escherichia coli* O1157:H7, sind von Sigma, St. Louis, MO erhältlich) in reiner Form gewonnenem LPS stimuliert, um einen angepeilten physiologischen Zustand zu bieten. Das den Zellproben in diesem Beispiel verabreichte therapeutische Mittel ist ein Inhibitor eines Enzyms, das als Schlüssel in der Krankheits-Ätiologie bekannt ist, nämlich ein Inhibitor einer Protease oder einer Nucleinsäure-Polymerase. Nach einer Behandlung durch Hinzufügung des therapeutischen Mittels und weiterer Inkubation für 4 bis 6 Stunden werden die Proben der Zellen geerntet und hinsichtlich Genexpression analysiert. Nucleinsäure, speziell RNA, kann aus der Probe mittels Verfahren, die einem Durchschnittsfachmann bekannt sind, hergestellt werden (siehe beispielsweise das Lyse-N-Go™-Reagens, Pierce Chem. Co., Rockford,

IL). Die Proben werden durch QPCR nach einem quantitativen replikativen Verfahren (quantitatives Polymerasekettenreaktions-Verfahren (QPCR)) analysiert (siehe beispielsweise Gibson, U. 1996, *Genome Res.* 6:995 bis 1001, und darin zitierte Literaturstellen). Die Gesamt-RNA wurde unter Verwendung universeller Primer untersucht. Die Toxizität des Mittels für Zellen kann in unbehandelten Zellen durch Vitalfärbungsaufnahme, Geschwindigkeit der DNA-Synthese (Autoradiografie markierter Kerne im Vergleich zu gefärbten Zellen), Färbung durch DNA-spezifische Farbstoffe (Hoechst), etc., gemessen werden. Mechanistische Profile können bestimmt werden durch Analyse der Identitäten von de novo nach oben oder nach unten regulierten Genen. Außerdem werden in Anwesenheit eines therapeutischen Mittels manche Gene nicht exprimiert, was eine mögliche Wirksamkeit des therapeutischen Mittels bei der Unterdrückung der Wirkungen der Stimulierung durch das LPS anzeigt. Beispielsweise werden in [Fig. 21](#) die Spiegel von ICE, die in Anwesenheit von LPS plus Echinacea etwas stimuliert werden, durch LPS + Arnica relativ zu LPS-stimulierten Zellen ohne Mittel wesentlich abgesenkt. Die Spiegel von HSP 70, die in Anwesenheit von LPS + Echinacea gesenkt werden, werden in Anwesenheit von LPS + Arnica und von LPS + sibirischem Ginseng relativ zu LPS-stimulierten Zellen ohne die Zugabe eines Mittels wesentlich stimuliert. Die Spiegel von IL-12p40, die in Anwesenheit von LPS + Echinacea leicht erhöht werden, werden in Anwesenheit von LPS + Arnica und von LPS + sibirischem Ginseng relativ zur LPS-Stimulierung wesentlich abgesenkt. Im Gegensatz zu der obigen Verwendung von Nutrazeutika zeigt [Fig. 16](#) eine stark gesteigerte Verringerung der Genexpression in Vollblut für IL-1a, IL-1 b, IL-7, IL-10, IL-IL-15, IFN-g, TGF-b, TNF-b cox-2 und ICAM in Anwesenheit von Prednisolon + LPS, wenn man vergleicht mit Arnica + LPS oder nichts + LPS.

(c) Quantifizierung der Genexpression in einer Blutzelle zur Vorhersage der Toxizität in einem anderen Gewebe oder Organ.

[0109] Leukozyten können aus einer Blutprobe eines Subjekts zum Zweck der Untersuchung des Auftretens eines pathologischen Zustands in einem anderen Organ, beispielsweise der Leber, erhalten werden. Ein Profildatensatz wird von in den Leukozyten exprimierten Genen, beispielsweise Genen, die einen Satz von Lymphokinen und Zytokinen codieren, erhalten. Der Datensatz wird mit dem der Datenbank verglichen, um Korrelationen beispielsweise mit anderen Subjekten und mit dem Subjekt vor der Verabreichung eines therapeutischen Mittels zu untersuchen.

[0110] Durch dieses Verfahren kann eine Korrelation bzw. Wechselbeziehung aufgestellt werden zwischen, beispielsweise, der Verabreichung von Acetaminophen (Tylenol) und der Empfindlichkeit für die-

ses therapeutische Mittel und der Manifestation durch Leberschädigung. Eine frühe Vorhersage der Empfindlichkeit gegen das therapeutische Mittel, nachgewiesen vor dem Einsetzen der tatsächlichen Schädigung der Leber, kann klinisch zur Verfügung stehen, so dass das Subjekt keine weitere Verabreichung von Acetaminophen erhält. Der Erfolg der Datenbank ist die Fähigkeit, eine Korrelation oder Korrelationen vor dem Einsetzen traditioneller medizinischer Untersuchungen, wie einer Erhöhung des Bilirubin-Spiegels oder eines anderen Hinweises auf einen pathologischen Leberbefund, nachzuweisen.

(d) Kalibrierte Profile aus Blutzellen zur Prognose der Schwere und zur Vorhersage unerwarteter, schädigender Nebenwirkungen bei der Behandlung einer Autoimmunkrankheit.

[0111] Die Wahrscheinlichkeit und das Timing des Einsetzens von Symptomen einer Autoimmunkrankheit, beispielsweise rheumatoider Arthritis, kann durch das Auftreten der Expression von Markern oder Surrogat-Markern, wie durch die Verfahren der Genexpressions-Profilierung von Markern oder Surrogat-Markern bestimmt, und Vergleich mit einer Profildatenbank, wie oben beschrieben, überwacht werden. So kann ein Hinweis auf das nahe bevorstehende Einsetzen erhalten werden, und ein vorverlegtes Management durch Anwendung von Vorsorgemaßnahmen, um dem Einsetzen zuvorzukommen, kann unternommen werden. Außerdem kann der Verwender einen Satz potenzieller therapeutischer Mittel wählen und für ein gegebenes Mittel die Wahrscheinlichkeit, dass ein Subjekt eine unerwartete schädigende Nebenwirkung zeigen wird, wenn es den vollständigen Behandlungsablauf erhält, vor jenem vollständigen Ablauf untersuchen. Beispielsweise kann unter Verwendung von Ausführungsformen der Erfindung einem Subjekt, das Arthritis hat und ein therapeutisches Mittel braucht, eine einzige Dosis des Mittels Methotrexat verabreicht werden. Wenn der Genexpressions-Profilatensatz des Subjekts als Reaktion auf eine einzige Dosis Methotrexat mit Datensätzen von Subjekten, die unerwartete schädigende Nebenwirkungen bei diesem Mittel haben, korreliert, dann ist die Verabreichung eines vollständigen Ablaufs mit Methotrexat gegenindiziert. Wenn dagegen der Genexpressions-Profilatensatz mit jenen von Subjekten, die auf die Verabreichung eines Methotrexat-Behandlungsablaufs positiv reagiert haben, korreliert, dann kann dieses therapeutische Mittel dem Subjekt mit einer viel geringeren Wahrscheinlichkeit einer unerwarteten Nebenwirkung verabreicht werden.

Diskussion der Figuren

[0112] Die [Fig. 1](#) bis [Fig. 4](#) veranschaulichen einige der Anwendungen kalibrierter Profildatensätze. In [Fig. 1](#) sind drei mögliche Szenarien angegeben. Zuerst kann ein therapeutisches Kandidatenmittel ge-

testet werden, um seine molekulare Pharmakologie- und Toxikologie-Profile zu bestimmen. Der Test könnte das ERhalten von kalibrierten Profildatensätzen für eine Reihe von Gruppen, die auf der Basis der Aktivität, die für das Arzneimittel vorhergesagt wird, ausgewählt wurden, umfassen. Die Population von Zellen, die dem Mittel ausgesetzt wird, kann das Ergebnis einer in vivo-Verabreichung, wie durch die Maus veranschaulicht, oder einer direkten Exposition in vitro sein, wobei die Zellen eine Indikator-Zelllinie oder eine ex vivo-Probe von dem Subjekt sein können. Das Ergebnis der Durchmusterung ist die Identifizierung wirksamerer Arzneimittel-Kandidaten für Tests an menschlichen Subjekten.

[0113] Das zweite Szenario in [Fig. 1](#) ist die Verwendung kalibrierter Profildatensätze zur Identifizierung einer geeigneten klinischen Population zur Durchmusterung eines potenziellen therapeutischen Mittels. Sowohl der Beweis fehlender Toxizität als auch der Beweis der klinischen Wirksamkeit erfordern bestimmte Annahmen über die klinische Population. Die kalibrierten Profildatensätze schaffen ein Mittel, jene Annahmen bezüglich des biologischen Zustands der für die klinischen Versuche ausgewählten Individuen zu beweisen.

[0114] Das dritte Szenario in [Fig. 1](#) ist die Möglichkeit, eine individualisierte Medizin zu praktizieren, die die Erzeugung eines Archivs kalibrierter Profildatensätze zu dem Individuum in einem Zustand der Gesundheit umfassen kann, so dass Veränderungen unter Verwendung von Signaturgruppen identifiziert werden können, um eine Prognose oder Diagnose eines bestimmten Zustands zu erlauben. Darüber hinaus erlaubt es gespeicherte Information über den Patienten in der Form kalibrierter Profildatensätze, ein therapeutisches Mittel aus einer Gruppe möglicher therapeutischer Mittel, das für den Patienten am wahrscheinlichsten wirksam ist, auszuwählen, die Dosierung des Arzneimittels zu optimieren und unerwartete schädigende Nebenwirkungen, die durch Arzneimittel-Wechselwirkungen auftreten könnten, vor dem Auftreten von Symptomen festzustellen. Das Ergebnis der Verwendung kalibrierter Profildatensätze ist, ein effizienteres und kostengünstigeres Management der Gesundheitsfürsorge bereitzustellen.

[0115] Der oben beschriebene neue Weg zur Beurteilung eines biologischen Zustands eines Subjekts kann auf einen ex vivo- oder einen in vitro-Test zur Messung der Wirkung eines Mittels auf einen biologischen Zustand angewendet werden, wie in den [Fig. 2](#) bis [Fig. 4](#) veranschaulicht. Eine Probe von dem Patienten kann unmittelbar ex vivo gemessen werden oder ex vivo gegen ein Mittel getestet werden, um eine Wirkung bei dem Patienten vorherzusagen. Dies schafft eine schnelle und wirksame Art, festzustellen, welches aus einer einzigen Klasse von Arzneimitteln, die alle zur Behandlung eines be-

stimmten Zustands verwendet werden können, ausgewählte Arzneimittel für ein gegebenes Subjekt das wirksamste sein mag. Alternativ kann ein Mittel an einer Indikator-Zelllinie getestet werden, die ein quantitatives Maß der therapeutischen Leistungsfähigkeit in einer Klasse von Individuen liefern kann.

[0116] [Fig. 2](#) veranschaulicht, wie kalibrierte Profildatensätze beim Durchmustern einer Bibliothek von Kandidaten-Verbindungen helfen können, Kandidaten-Arzneimittel aufzufinden. Beginnend mit, beispielsweise, 500 Kandidaten-Arzneimitteln können diese in Indikator-Zellen oder in ex vivo-Körperflüssigkeit oder Geweben gegen Signaturgruppen hinsichtlich in vitro-Toxikologie oder Stoffwechsel-Indikatoren getestet werden. Die Figur veranschaulicht die große Anzahl von Verbindungen, die in Spätstadien in den Entwicklungsprozess eintraten, nur um am Ende aufgrund schädigender biologischer Wechselwirkung verworfen zu werden. Es wird erwartet, dass eine frühe Übernahme der Verwendung kalibrierter Profildatensätze wahrscheinlich erfolgreiche Kandidaten leichter identifizieren wird und dadurch die Kosten und widrigen Wirkungen des Experimentierens mit Tieren und Menschen hinsichtlich Verbindungen, von denen vorhergesagt hätte werden können, dass sie versagen, verringert.

[0117] [Fig. 3](#) beschreibt mehrere Durchmusterungen, bei denen eine Verbindung einem Versuchstier wie einer Maus oder einer Indikator-Zelllinie verabreicht werden könnte. Die in vivo- oder ex vivo- oder Indikatorzellprobe könnte außerdem mit einem Stimulans behandelt werden. Das Ergebnis von sowohl der Verbindung als auch dem Stimulans könnte dann unter Verwendung von Signaturprofilen für die Toxizität oder für den Mechanismus nachgewiesen werden, um die Wirkung von kein Arzneimittel +/- Stimulans oder +/- Arzneimittel und kein Stimulans zu vergleichen. Sowohl in vitro (linkes Feld) als auch in vivo- (rechtes Feld) Studien können verwendet werden, um die Wirkung einer Verbindung (Arzneimittel, Nutrazeutikum, Umwelt-Stimulantien etc.) zu beurteilen. Das rechte Feld veranschaulicht auch die spezifische Ausführungsform einer „klinischen Erprobung in vitro“, d.h. Behandlung von Zellen, die von einem Subjekt erhalten wurden und mit einer Verbindung (mit oder ohne ein Stimulans) in vitro (oder ex vivo) behandelt wurden, um das Ergebnis einer ähnlichen Behandlung des Subjekts in vivo vorherzusagen (siehe [Fig. 15](#) für ein spezifisches Beispiel). Die Ausgabe aus beiden Feldern wird als Toxizitäts-Profil und mechanistisches Profil beschrieben. Jeder experimentelle Verlauf kann verwendet werden, um sowohl eine potenzielle Toxizität zu beurteilen, z.B. unter Verwendung der Toxizitätsgruppe oder der Lebermetabolismusgruppe, als auch wahrscheinliche Wirkungsmechanismen durch eine kritische Auswahl einer Gengruppe (von Gengruppen), die molekulare Wirkungsmechanismen veranschaulichen und unter-

scheiden, zu bestimmen oder zu bestätigen (siehe **Fig. 12** für ein spezifisches Beispiel).

[0118] **Fig. 4** veranschaulicht einen Bioassay, bei dem Zellen aus dem Subjekt entnommen und ex vivo unter Zusatz einer Verbindung und auch eines Provokationsmittels oder eines Stimulans getestet werden. Die ex vivo-Wirkung von Stimulans und dann Arzneimittel auf Vollblut, das von einem menschlichen Subjekt genommen wurde, ist in **Fig. 12** gezeigt, in der das Stimulans Lipopolysaccharid (ein Entzündungsmittel) ist, während das Arzneimittel eines der Mittel Methotrexat, Meclophenamat oder Methylprednisolon ist, wobei eine Signaturgruppe für Entzündungen verwendet wird. Methylprednisolon, ein allgemein bei der Behandlung einer akuten Verschlimmerung von COPD sowie bei der chronischen Behandlung dieser Erkrankung verwendetes Arzneimittel, wird als ein wirkungsvolles unspezifisches entzündungshemmendes Mittel betrachtet. Seine Wirkungen auf die Genexpression sind jedoch, wie in **Fig. 22** demonstriert, von dem Stimulans abhängig. Während es über diese drei Stimulantien allgemeine qualitative Ähnlichkeiten zwischen den Wirkungen auf die Genexpression gibt, gibt es sowohl quantitative als auch qualitative Unterschiede, die wichtig sein können, zu verstehen, wann ein Glucocorticoid-Eingreifen gerechtfertigt ist.

[0119] Gemäß Ausführungsformen der Erfindung wird eine Indikator-Zellpopulation zur Messung der quantitativen Genexpression verwendet, wobei die Wirkung eines Mittels oder einer biologischen Probe die Wahl, welche Indikator-Zelllinie am informativsten sein wird, beeinflussen kann. Beispielsweise kann eine geklonte Zelllinie wie THP-1 oder eine primäre Zellpopulation (periphere einkernige Zellen) Information liefern, die mit derjenigen vergleichbar ist, die unmittelbar von einer Körperprobe erhalten wird (siehe **Fig. 15**). Der Normalzustand der Genexpression kann von null oder wenigen Transkripten bis 10^5 oder mehr Transkripten reichen.

[0120] In ähnlicher Weise kann ein Mittel hinsichtlich seiner Wirkung auf irgendeine Population von Zellen, entweder in vivo, ex vivo oder in vitro, durch Verabreichen des Mittels und dann Bestimmen eines kalibrierten Profildatensatzes für jene Zellen unter den gewählten Bedingungen beurteilt werden. Beispiele für diesen Weg sind in den **Fig. 10 bis 16** und **18** angegeben. **Fig. 18** gibt außerdem kalibrierte Profildatensätze für verschiedene Konzentrationen eines einzigen Mittels an, die zeigen, dass die Transkription ausgewählter Bestandteile mit der Dosis, und daher die voraussichtliche Wirkung bezüglich des biologischen Zustands variieren.

[0121] Die obige Beschreibung der Bestimmung eines biologischen Zustands wird wie folgt beispielhaft veranschaulicht. Die Wirkung eines Pharmazeuti-

kums oder Nutrazeutikums wird bezüglich seiner entzündungshemmenden Eigenschaften gemessen. Die Messung der Wirkung kann unter Verwendung einer Gruppe von Bestandteils-Genorten, beispielsweise einer Entzündungsgruppe, wozu Interleukin 1 alpha (IL-1 α) oder Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) gehören, durchgeführt werden. Die entzündungshemmende Wirkung kann zuerst durch Behandeln von Indikatorzellen oder Probenzellen ex vivo mit bekannten Entzündungs-Induzierungsmitteln (beispielsweise Lipopolysaccharid oder anderen Mitogenen), gefolgt von Behandeln mit dem experimentellen Mittel oder dem Zustand, von dem erwartet wird, dass er die Expression von den passenden Genorten unterdrückt oder verringert, festgestellt werden. Nach dem Grundlinien-Profildatensatz ist das delta die Veränderung der Genexpression für eine bestimmte Gruppe von Bestandteilen. Der Zusatz eines potenziellen entzündungshemmenden Mittels führt zu einer zweiten delta-Veränderung, die einer ersten delta-Veränderung überlagert wird. Dies wird beispielsweise in **Fig. 12** veranschaulicht. Methylprednisolon hat eine wesentlich nach unten regulierende Wirkung auf IL-2 in Blutzellen, die ex vivo mit LPS stimuliert wurden, wobei der Grundlinien-Datensatz LPS-stimulierte Zellen sind. In diesem Fall gibt es ein negatives delta. Im Gegensatz dazu scheint IL-2 in Vollblut, das nicht vorher LPS ausgesetzt wurde, nach oben reguliert zu werden, wobei der Grundlinien-Datensatz nicht-stimulierte Zellen sind (**Fig. 16b**). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass Methylprednisolon die IL-2-Erzeugung stimuliert.

[0122] Die Bestimmung des biologischen Zustands eines Subjekts kann das Messen und Speichern zusätzlicher Daten über das Subjekt umfassen. Wenn beispielsweise das Subjekt ein menschlicher Patient oder ein Säugetier-Patient ist, können zusätzliche klinische Indikatoren aus der Blutchemie, durch Urinalanalyse, Röntgenstrahlen, andere chemische Tests und physische oder soziologische Befunde bestimmt werden.

[0123] **Fig. 7** veranschaulicht, wie die Ansammlung kalibrierter Profildatensätze die Vorhersagekraft der Datenbank verbessern und dadurch ihren Wert erhöhen kann, indem sie Information hinsichtlich eines biologischen Zustands oder Mittels erzeugt. Die Figur gibt die Verwendung der Datenbank hinsichtlich ihrer Vorhersagekraft an, um, beispielsweise, den Verlauf einer therapeutischen Maßnahme vorherzusagen, dem Verlauf bei einem einzelnen Subjekt im Vergleich zu einer Population zu folgen, zur Vorhersage eines wahrscheinlichen Stoffwechselmechanismus oder molekularen Wirkungsmechanismus oder einer umfassenden Datenbank, die einen Vergleich eines einzigen Profils mit einer Sammlung kalibrierter Signatur-Präzisionsprofile erlaubt.

[0124] Bevorzugte Ausführungsformen dafür, wie

die Datenbank verwendet werden kann, sind in [Fig. 8](#) angegeben. [Fig. 8](#) veranschaulicht eine Anzeige eines Datenprofilsatzes von der Quellen-Datenbank. Eintragungen für eine Eingabe umfassen einen Namen, einen experimentellen Typ und ob der Eintrag ein neuer Fall ist; Zellen/Gewebe/Spezies und ob diese neu sind; therapeutisches Mittel (Verbindung), Dosis und zusätzliche Parameter und ob das therapeutische Mittel neu ist. Die Beobachtungen werden aufgezeichnet entsprechend der Identität eines Gens (neues Gen) und eines Proteins (neues Protein). Der Stimulus bzw. das Stimulans oder eine andere Behandlung, falls vorhanden, und die Dosis werden eingetragen. Gen- (und/oder Protein-) Expression, Expressionswert, Expressionseinheiten, falls zutreffend, und Expressionszeit sind gezeigt. Die Figur veranschaulicht speziell den Bereich von in Frage kommenden Forschungsgebieten von komplexen Naturprodukten bis hin zu klinischen Versuchen an Menschen, Verbindung zu traditionellen Formen von Messung und Beurteilung wie Literaturzitate, klinischen Indikatoren und traditionellen pharmakokinetischen Messungen. Eine Expertenanalyse der Präzisionsprofilaten, die in der Datenbank enthalten sind, kann dann verwendet werden, um Entwicklung und Vermarktung eines Produkts zu lenken, oder verwendet werden, um die klinische Entscheidungsfindung bezüglich der Gesundheit eines einzelnen Individuums oder einer Population von Individuen zu verbessern.

[0125] Es wird erwartet, dass eine Form von Verzeichnis Information über ein Subjekt oder Mittel bezüglich Identität, medizinischer Geschichte einschließlich traditionellen pharmazeutischen/medizinischen Daten, klinischen Indikationen, wie sie aus Literaturdaten bestimmt wurden, Verweise auf zusätzliche Arten von Analyse in der Datenbank, etc., bereitstellen könnte.

[0126] [Fig. 9](#) zeigt eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, bei der Profildaten unter Verwendung von Daten aus einer Datenbank, auf die aus der Ferne über ein Netzwerk zugegriffen wird, beurteilt werden. Die Figur veranschaulicht, dass erwartet wird, dass Daten von einem oder mehreren Standorten stammen, unter Verwendung einer zentralen Datenbank verglichen und erhaltene Information verwendet wird, um, beispielsweise, den Behandlungsverlauf eines Individuums oder einer Population zu beeinflussen. Die Zwei-Wege-Natur von **1109** veranschaulicht den sich wiederholenden Prozess, wobei die Datenbank den Behandlungsverlauf oder Entwicklungsverlauf beeinflusst, und das Ergebnis oder die Reaktion auf eine derartige Maßnahme wiederum Teil der Datenbank wird. An einem ersten Standort, wie in [Fig. 5](#), werden von einer in Kästchen **1101** beschafften Gewebeprobe mehrere RNA-Spezies gemäß Kästchen **1102** abgeleitet, und dann werden in Kästchen **1103** Profildaten quantifiziert, um einen

Profildatensatz herzustellen, der sich auf die in Kästchen **1101** erhaltene Gewebeprobe bezieht. Zur Beurteilung des Profildatensatzes wird in Kästchen **1104** Information aus der Datenbank **1108**, die sich an einem zweiten Standort befindet, zurückgewonnen. Tatsächlich kann sich die Datenbank in Verbindung mit einer großen Anzahl von Standorten befinden, von denen jeder Profildaten erzeugt, die beurteilt werden müssen. Die Rückgewinnung von Information aus der Datenbank wird über ein Netzwerk **1109**, das das Internet umfassen kann, auf eine in der Technik bekannte Weise bewerkstelligt. Sobald Information aus der Datenbank **1108** erhalten worden ist, wird die Information zur Beurteilung der quantifizierten Profildaten in Kästchen **1105** verwendet, mit dem Ergebnis in Kästchen **1106**, dass der medizinische Zustand des Subjekts bewertet werden kann. Die Datenbank **1108** wird in Kästchen **1107** über das Netzwerk **1109** aktualisiert, um die Profildaten, die in Kästchen **1103** quantifiziert wurden, widerzuspiegeln. Auf diese Weise kann die Datenbank **1108** aktualisiert werden, um die von allen Standorten erhaltenen Profildaten widerzuspiegeln, und jeder Standort profitiert von den Daten, die von all den Standorten erhalten wurden.

BEISPIELE

Beispiel 1.

(a) Verwendung von Vollblut zur ex vivo-Untersuchung eines durch ein Mittel beeinflussten biologischen Zustands

[0127] Menschliches Blut wird durch Venenpunktion erhalten und zum Test durch Aufteilen in Proben für Grundlinie, ohne Stimulans, und Stimulans, mit ausreichend Volumen für mindestens drei Zeitpunkte vorbereitet. Typische Stimuli umfassen Lipopolysaccharid (LPS), Phytohämagglutinin (PHA) und durch Wärme abgetötete Staphylokokken (HKS) oder Caragen, und sie können einzeln (typischerweise) oder in Kombination verwendet werden. Die Aliquoten von heparinisiertem Vollblut werden ohne Stimulans gemischt und 30 min lang bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ gehalten. Stimulans wird in variierenden Konzentrationen zugesetzt, gemischt und 30 min lang locker verschlossen bei 37°C gehalten. An diesem Punkt können zusätzliche Testverbindungen gegeben und für variierende Zeiten, abhängig von der erwarteten Pharmakokinetik der Testverbindung, gehalten werden. Zu definierten Zeiten werden die Zellen durch Zentrifugieren gesammelt, das Plasma entfernt und die RNA durch verschiedene Standardmittel extrahiert.

(b) Herstellung von RNA zur Messung der Genexpression

[0128] Nucleinsäuren, RNA und oder DNA werden

in reiner Form aus Zellen, Geweben oder Flüssigkeiten der Testpopulation oder von Indikator-Zelllinien gewonnen. RNA wird bevorzugt aus dem Nucleinsäure-Gemisch unter Verwendung einer Vielfalt von Standardprozeduren (oder RNA-Isolierungsstrategien, Seiten 55 bis 104, in *RNA Methodologies, A Laboratory Guide for Isolation and Characterization*, 2. Ausgabe, 1998, Robert E. Farrell, Jr., Ed., Academic Press) erhalten; bei der vorliegenden Verwendung unter Verwendung eines RNA-Isolierungssystems auf Filterbasis von Ambion (RNAqueous™, Phenol-free Total RNA Isolation Kit, Katalog #1912, Version 9908, Austin, Texas). Spezifische RNAs werden unter Verwendung von Botschafts-spezifischen Primern oder willkürlichen Primern amplifiziert. Die spezifischen Primer werden aus Daten, die von öffentlichen Datenbanken (z.B. Unigene, National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Bethesda, MD), die Information von Genom- und cDNA-Bibliotheken, die von Menschen und anderen Tieren erhalten wurden, enthalten, erhalten wurden, synthetisiert. Die Primer werden so ausgewählt, dass sie bevorzugt von spezifischen RNAs, die von den Testproben oder Indikatorproben erhalten wurden, amplifizieren, siehe beispielsweise RT-PCR, Kapitel 15 in *RNA Methodologies, A Laboratory Guide for Isolation and Characterization*, 2. Ausgabe, 1998, Robert E. Farrell, Jr., Ed., Academic Press; oder Kapitel 22 Seiten 143–151, *RNA Isolation and Characterization Protocols, Methods in Molecular Biology*, Volume 86, 1998, R. Rapley and D.L. Manning Eds., Humana Press, oder 14 in *Statistical refinement of Primer design Parameters*, Kapitel 5, Seiten 55–72, *PCR Applications: Protocols for Functional Genomics*, M.A. Innis, D.H. Gelfand and J.J. Sninsky, Eds., 1999, Academic Press). Die Amplifikationen werden entweder unter isothermen Bedingungen oder unter Verwendung eines zyklischen Temperaturwechslers (beispielsweise eines ABI 9600 oder 9700 oder 7700, erhalten von PE Biosystems, Foster City, CA; siehe *Nucleic Acid Detection Methods*, Seiten 1–24, in *Molecular Methods for Virus Detection*, D.L. Wiedbrauk and D.H. Farkas, Eds., 1995, Academic Press) durchgeführt. Amplifizierte Nucleinsäuren werden unter Verwendung fluoreszierend markierter Nachweisprimer (siehe beispielsweise Taqman™ PCR Reagent Kit, Protocol, Part number 402823 revision A, 1996, PE Applied Biosystems, Foster City CA), die aus öffentlich bekannten Datenbanken identifiziert und synthetisiert werden, wie für die Amplifikationsprimer beschrieben, nachgewiesen. Im vorliegenden Fall wird amplifizierte DNA unter Verwendung des ABI Prism 7700 Sequence Detection System, erhalten von PE Biosystems (Foster City, CA), nachgewiesen und quantifiziert. Die Mengen an spezifischen RNAs, die in der Testprobe enthalten sind oder von den Indikator-Zelllinien erhalten werden, können zu der relativen Menge an beobachteter Fluoreszenz in Beziehung gesetzt werden (siehe beispielsweise *Advances in Quantitative PCR Technolo-*

gy: 5' Nuclease Assays, Y.S. Lie and C.J. Petropoulos, *Current Opinion in Biotechnology*, 1998, 9:43–48, oder *Rapid Thermal Cycling and PCR Kinetics*, Seiten 211–229, Kapitel 14 in *PCR Applications: Protocols for Functional Genomics*, M.A. Innis, D.H. Gelfand and J.J. Sninsky, Eds., 1999, Academic Press.

Beispiel 2.

Unterschiedliche Entzündungs-Stimulantien führen zu unterschiedlichen Grundlinien-Profilatensätzen, so dass die kalibrierten Präzisionsprofile für unterschiedliche Mittel in derselben Klasse von Entzündungshemmstoffen zu unterschiedlichen Signaturprofilen führen.

[0129] Fig. 11 dokumentiert die Brauchbarkeit unterschiedlicher Entzündungs-Stimulantien, um zu unterschiedlichen Grundlinien-Profilatensätzen zu führen, so dass die kalibrierten Präzisions-Profilatensätze für die drei getesteten Entzündungshemmstoffe zu unterschiedlichen Signaturprofilen führen. Die unterschiedlichen Profile spiegeln den Unterschied in den molekularen Zielen und Wirkungsmechanismen der drei von einer einzigen Klasse therapeutischer entzündungshemmender Mittel abgeleiteten Mittel wider. Die Figur veranschaulicht auch den außergewöhnlichen Nachweisbereich (Y-Achse) von weniger als dem zehnfachen Unterschied zu dem kalibrierten Profil bis zu einer plus oder minus $10E13$ Zunahme oder Abnahme der Genexpression im Vergleich zum Kalibrator. Ein Vergleich mit dem Kalibrator führt zu Genexpressionsprofilen, die erhöht, gesenkt oder ohne Abweichung von dem kalibrierten Satz sind.

[0130] Fig. 11(a) zeigt die relative Genexpression (mRNA-Synthese) in mit durch Wärme abgetöteten Staphylokokken (HKS) stimulierten Zellen, und die Wirkung von drei unterschiedlichen Verbindungen (TPCK, UT-77 und "Dex" oder Dexamethason). Die Verbindung TPCK bewirkte eine zehnfache Verringerung der relativen IFN- γ -Expression und eine 100.000-fache Verringerung der IL-4- und IL-5-Expression. Außerdem bewirkt die Verbindung UT-77 eine noch größere Größenordnung von Steigerung der relativen Expression des IL-5 codierenden Gens und eine mäßigere Steigerung der Expression von IL-1 (mehr als 10-fach) und IFN- γ . Derartige Effekte können bei Krankheits-Ätiologie und -folgen hochgradig signifikant sein und haben Vorhersagewert bezüglich der Brauchbarkeit dieser Verbindungen oder ähnlicher chemischer Gebilde oder Chemikalien, die ähnlich wirken, als therapeutische Mittel. HKS-Zellen sind ein in vitro-Modell für eine Gram-positive Bakterieninfektion.

[0131] Fig. 11(b) zeigt Analysen der Expression der 12 Gene in Lipopolysaccharid (LPS)-behandelten Zellen, ein in vitro-Modell einer Gram-negativen Bakterieninfektion. Diese Daten enthalten mehrere ein-

drucksvolle Kontraste zu den Daten in **Fig. 11(a)**. So bewirkte eine Behandlung mit dem therapeutischen Mittel Dex eine eindrucksvolle Verringerung der Expression des IL-2-Gens in LPS-behandelten Zellen, und eine eindrucksvolle Steigerung der IL-2-Expression in HKS-behandelten Zellen. Bemerkenswert große Unterschiede in der Genexpression in den unterschiedlich stimulierten Zellen sind für die IL-4- und IL-5-Gene zu sehen. Im Gegensatz dazu reagierte die Expression des Gens für IFN in Zellen, die entweder mit einem der Stimulantien oder mit irgendeinem der therapeutischen Mittel behandelt waren, ähnlich.

[0132] Durch diese Kriterien wurde beobachtet, dass die Expression der Gene für IL-2, IL-4 und IL-5 Kandidaten-Marker oder Surrogat-Marker in Zellmodell-Systemen waren, um Reaktionen der Zellen auf Gram-positive und Gram-negative Bakterieninfektionen zu unterscheiden.

Beispiel 3.

Ein einzelnes therapeutisches Mittel zur Behandlung eines bestimmten Zustands kann von einem zweiten therapeutischen Mittel, das den bestimmten Zustand ebenfalls behandelt, durch ein Signaturprofil für eine gegebene Gruppe von Genorten unterschieden werden.

[0133] **Fig. 12** zeigt einen kalibrierten Profildatensatz für eine Gruppe mit 8 Bestandteilen, die auf einen biologischen Zustand, der eine Entzündung beinhaltet, hinweisen. Die Profile sind für drei verschiedene entzündungshemmende Mittel – Methotrexat, Meclofenamat und Methylprednisolon – gezeigt. Die kalibrierten Profildatensätze für jedes Mittel, wie gezeigt, repräsentieren ein Signaturprofil für das Mittel. Dieses Signaturprofil kann als eine Einrichtung zum Einrichten einer Qualitätskontrolle für eine Charge des Mittels dienen. Tatsächlich ist ins Auge gefasst, dass Verbindungen oder Klassen von Verbindungen am Markt oder in Entwicklung durch ein Signaturprofil charakterisiert werden können. Das Signaturprofil kann in einem grafischen Format dargestellt werden, genauer als eine Balkengrafik, wie in **Fig. 12** angegeben. Für **Fig. 12** wurde eine ex vivo-Probe getestet. Eine Blutprobe wurde von dem Subjekt genommen. Aliquoten der Probe wurden ex vivo Lipopolysaccharid (LPS) unterzogen. Nach 30 min wurde das entzündungshemmende Mittel, wie angegeben, zu einer Aliquote der Blutprobe zugegeben, und nach etwa weiteren 4 h wurde die Expression der Gruppe von Genen (IL-1a, IL-2, IL-8, IL-10, IL-12p35, IL-12p40, IL-15, IFN-Gamma und TNF-a) bestimmt. Zwar waren die kalibrierten Profile von Methotrexat und Meclofenamat ähnlich, aber das kalibrierte Profil von Methylprednisolon war wesentlich unterschiedlich. Unterschiede können die Unterschiede der Wirkungsmechanismen oder Target(s) dieses Mittels innerhalb der allgemeinen Klasse entzündungshemmender

Verbindungen widerspiegeln. Die Grundlinie ist der Profildatensatz für Lipopolysaccharid in Abwesenheit irgendwelcher zusätzlicher Mittel.

Beispiel 4.

Es gibt eine relativ geringe Variabilität bezüglich des Profils bei einem einzelnen Individuum im Verlauf der Zeit, wenn das kalibrierte Präzisionsprofil aus der Messung der Genexpression über viele Genorte, die passend stimuliert wurden, bestimmt wird.

[0134] **Fig. 13(a)(b)** und **(c)** zeigt eine grafische Darstellung kalibrierter Präzisions-Profilatensätze für zwei unterschiedliche Vollblut-Proben. Heparinisiertes Vollblut wurde bei zwei getrennten Gelegenheiten, die mehr als 2 Wochen auseinander lagen, von einem einzigen Freiwilligen mit normaler Gesundheit gesammelt. **Fig. 13a** spiegelt für Probe 991116 und **Fig. 13b** für Probe 991028 den biologischen Zustand der getesteten Zellen von dem einzigen Spender unter Verwendung einer Gruppe (d.h. der Entzündungsgruppe) von 24 Elementen als Reaktion auf eine Stimulierung mit einem von drei unterschiedlichen Mitteln wider. Die Grundlinie ist in diesem Beispiel von unbehandelten Zellen, die von demselben Individuum erhalten wurden, abgeleitet. Die kalibrierten Profile sind für Zellen gezeigt, die 4 bis 6 h lang Lipopolysaccharid (LPS), durch Wärme abgetöteten Staphylokokken (HKS) und Phytohämagglutinin (PHA) ausgesetzt waren. **Fig. 13c** zeigt einen direkten Vergleich der LPS-stimulierten Blutprobe 99116 bezüglich der Blutprobe 991028, d.h. 991028 wird als der Kalibrator oder der Grundlinien-Profilatensatz verwendet. Die am 28.10.99 gemessenen Boten-RNA-Spiegel wurden verwendet, um die am 16.11.99 gemessenen Boten-RNA-Spiegel zu vergleichen. Eine perfekte Identität der RNA-Spiegel würde durch eine gerade Linie bei eins repräsentiert werden. Diese Daten zeigen deutlich, dass es bei einer Grundlinien-Genexpression einen bis zu 8-fachen Unterschied (c-jun) in den Boten-RNA-Spiegeln geben kann. Für die meisten der gemessenen Gene sind jedoch die an einem Tag gemessenen Boten-RNA-Spiegel innerhalb des 2- bis 3-fachen der an einem unterschiedlichen Tag gemessenen Spiegel. **13(d)** ist ähnlich **13(c)** mit der Ausnahme, dass die Zellen nicht mit LPS stimuliert waren.

[0135] Die Figur dokumentiert die relativ geringe Variabilität bezüglich des Profils bei einem einzigen Individuum im Verlauf der Zeit, wenn das kalibrierte Präzisionsprofil aus der Messung der Genexpression über viele Genorte, die passend stimuliert wurden, bestimmt wird. Die Figur veranschaulicht (1) die klassenspezifischen Wirkungen (allgemein entzündlich, wie bestimmt durch die Wirkung auf Pro-Entzündungs-Genorte, z.B. TNF-alpha, IL-1 alpha und IL-1 beta), (2) die Mittelspezifischen Wirkungen, quantita-

tive Unterschiede zwischen jedem der Mittel an denselben Genorten (z.B. IL-2) und (3) reproduzierbare und daher vorhersagbare Wirkungen auf die betreffende Population, TK ([Fig. 13c](#)).

Beispiel 5.

Ähnlichkeiten und Unterschiede in der Wirkung eines einzigen Mittels auf Zellpopulationen, die sich in ihrem biologischen Zustand unterscheiden.

[0136] Eine ex vivo-Genexpressionsanalyse kann durchgeführt werden durch Gewinnung des Bluts eines Subjekts, beispielsweise durch Ziehen des Bluts in ein Vacutainer-Rohr mit Natriumheparin als einem Antikoagulans. Ein Entzündungshemmstoff wie 3-Methylprednisolon wurde zu dem Blut in einem Polypropylen-Rohr in einer 10 mikromolaren Endkonzentration zugegeben, 30 min lang bei 37°C in 5° CO₂ inkubiert. Nach 30 min wurde ein Stimulans wie LPS bei 10 ng/ml oder durch Wärme abgetötete Staphylokokken (HKS) bei einer Verdünnung von 1:100 zu dem mit Arzneimittel behandelten Vollblut zugegeben. Die Inkubation ging bei 37°C in 5% CO₂ 6 h lang weiter, wenn nichts anderes angegeben ist. Erythrozyten wurden in RBC-Lyselösung (Ambion) aufgelöst, und verbleibende Zellen wurden gemäß dem Ambion RNAaqueous-Blond module (Katalog #1913) aufgelöst. RNA wurde in Ambion-Elutionslösung eluiert. RNA wurde 30 min lang mit einer Einheit DNase I (Ambion #2222) in 1x DNase-Puffer bei 37°C DNase-behandelt. Eine Erststrang-Synthese wurde unter Verwendung des Perkin-Elmer TaqMan Reverse Transcriptase-Kits mit MultiScribe reverser Transkriptase (Katalog #N808-0234) durchgeführt. Eine Qualitätsprüfung der RT-Reaktionen wurde mit Taqman PCR-Chemie unter Verwendung der 18S rRNA vorentwickelten Testreagentien (PDAR) von PE Biosystems (Teil #4310893E) durchgeführt. Der PCR-Versuch wurde an 6 bis 24 Genen in vier Wiederholungen an dem PE Biosystems 7700 durchgeführt. Die PCR-Versuche wurden entsprechend den Angaben durchgeführt, die bei dem PDAR-Produkt erläutert sind. Die relative Quantifizierung des Gens von Interesse wurde gegen die 18S rRNA-Expression kalibriert, wie beschrieben in dem PE-Produkt-Benutzermitteilungsblatt 2 (1997) und ausgearbeitet in Hirayama et al (Blond 92, 1998:46–52) unter Verwendung von 18S anstelle von GAPDH.

[0137] Eine relative Quantifizierung der mRNA wurde mittels des Unterschieds in den Schwellenzyklen zwischen 18S und dem Gen von Interesse gemessen. Dieses delta C_T wurde dann in einem ex vivo-Test mit dem Normierungszustand verglichen, entweder dem Subjekt vor der Behandlung oder Stimulus ohne Arzneimittel, um die in den Balkengrafiken repräsentierte „Faltungsinduktion“ zu messen ([Fig. 14](#)). In der obigen Grafik sind beispielsweise die IFN-Spiegel am dritten Tag 1/50 weniger als vor der

Behandlung.

Beispiel 6.

In vivo- und ex vivo-Proben liefern vergleichbare Signaturprofile.

[0138] [Fig. 15](#) zeigt die kalibrierten Profildatensätze für zwei Subjekte (Subjekt 1 und Subjekt 2, die über eine Dauer von drei Tagen mit einer Standarddosis des Corticosteroids Dexamethason behandelt wurden. 72 h später wurde Blut von jedem der Subjekte genommen, und es wurde ein quantitatives Maß für die den Gruppenbestandteilen entsprechende Menge an RNA bestimmt. Wenn auch der kalibrierte Profildatensatz für jedes Subjekt für die meisten Genorte ähnlich war, wurden doch auch einige merkliche Unterschiede festgestellt, beispielsweise für IL-2, IL-10, IL-6 und GM-CSF. Ein kalibrierter Profildatensatz ist auch zum Vergleich für eine ex vivo-Probe von Blut aus Probe 1 vor der Behandlung mit Corticosteroid gezeigt, wobei die ex vivo-Probe einer äquivalenten Menge an Corticosteroid in vitro unterzogen wird, wie sie als der Plasma-Spiegel bei dem Subjekt berechnet wird. Die Ähnlichkeit in dem kalibrierten Profildatensatz für ex vivo-Proben im Vergleich zu in vivo-Proben liefert eine Stütze für einen in vitro-Test, der die in vivo-Wirkung der Verbindung voraussagt. Wir haben eine ähnliche vergleichbare Wirkung zwischen in vivo- und ex vivo-Proben, die mit einem infektiösen Mittel infiziert wurden, genauer mit einem bakteriellen oder viralen Mittel, beobachtet. Wir haben daher beschlossen, dass die ex vivo-Proben ein wirksames Verfahren zur Bestimmung der Wirkung einer einzigen Verbindung oder mehrerer Verbindungen auf einen Patienten liefern, wobei die mehreren Verbindungen entweder in Kombination, parallel, oder in Folge verwendet werden können, um die Wahl eines Mittels für einen biologischen Zustand für das Subjekt zu optimieren.

Beispiel 7.

Demonstration der Reproduzierbarkeit einer in vitro-Reaktion mit einem zugelassenen Entzündungshemmstoff an 5 verschiedenen Spendersubjekten.

[0139] Der Vergleich und die Analyse der [Fig. 18a](#) bis [Fig. 18e](#) demonstriert die Übereinstimmung der Wirkung der Stimulus-Behandlung und der in vitro-Behandlung mit einem zugelassenen Entzündungshemmstoff an 5 verschiedenen Spendern (wobei jede Figur einen einzigartigen Spender repräsentiert). Die Verwendung eines bekannten und getesteten Stimulans führt zu einer hochgradig reproduzierbaren Gen-Antwort in vitro, die mit einer vorhersagbaren in vivo-Antwort korreliert werden kann. Die [Fig. 18a](#) bis [Fig. 18e](#) liefern die Analyseergebnisse von 5 Spendern, von denen eine Blutprobe genommen wurde. Die Blutproben wurden einem therapeu-

tischen Mittel in verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 0,1 µM bis 5 µM, genauer 0,1 µM, 0,3 µM, 1 µM, 3 µM und 5 µM, für eine Dauer von 4 h ausgesetzt. Unterschiedliche Konzentrationen des Arzneimittels führten zu einem kalibrierten Profildatensatz für eine Entzündungsgruppe bei jeder Konzentration, der von dem nächsten qualitativ verschieden war. [Fig. 18a](#) entspricht Spender 1, [Fig. 18b](#) entspricht Spender 2, [Fig. 18c](#) entspricht Spender 3, [Fig. 18d](#) entspricht Spender 4, und [Fig. 18e](#) entspricht Spender 5. Jedes Individuum wich von dem anderen ab und lieferte auch für eine unterschiedliche Konzentration ein variables Profil. Dieser Satz von Figuren veranschaulicht das hohe Informationsniveau, das durch die kalibrierten Profildatensätze erhältlich ist.

Beispiel B.

Ein kalibrierter Profildatensatz kann ein Signaturprofil für ein komplexes Gemisch von Verbindungen liefern.

[0140] [Fig. 21](#) veranschaulicht die Wirkung von drei verschiedenen entzündungshemmenden Pflanzen bzw. Kräutern auf eine Gruppe von Bestandteilen, wozu Bestandteile einer Entzündungsgruppe (TNF-α, IL-1b, ICAM, IL-8, IL-10, IL-12p40, ICE, COX-2, COX-1 und MMP-3), einer Zellwachstums- und Differenzierungs-Gruppe (c-fos, c-jun und STAT3), einer Toxizitätsgruppe (SOD-1, TACE, GR, HSP70, GST, c-fos, c-jun, INOS) und einer Leberstoffwechselgruppe (INOS, cyp-a und u-pa) gehören. Die in [Fig. 21](#) getesteten Zellen sind Aliquoten von Blut eines Subjekts, die ex vivo Lipopolysaccharid und Echinacea (SPM9910214), Arnica (SPM9910076) und sibirischem Ginseng (SPM9910074) ausgesetzt werden, wobei jedes der Nutrazeutika in derselben Konzentration von 200 µg/ml auf die Blutprobe angewendet wird. Die Grundlinie ist eine Zellprobe mit Lipopolysaccharid in Abwesenheit eines Nutrazeutikums. Jedes (aus einem komplexen Gemisch gebildete) Nutrazeutikum hat ein charakteristisches Signaturprofil, wie es auch die pharmazeutischen Einzelverbindungs-Entzündungshemmstoffe hatten. Das Signaturprofil kann in einer grafischen Form bereitgestellt werden, die zur Identifizierung eines pflanzlichen Mittels verwendet werden kann, während es Information bezüglich seiner Eigenschaften und seiner Wirksamkeit für ein einziges Subjekt oder für eine Durchschnittspopulation von Subjekten bereitstellt.

Beispiel 9.

Ein Qualitätskontrolltest für Echinacea-Marken unter Verwendung kalibrierter Profildatensätze.

[0141] [Fig. 24](#) zeigt eine grafische Darstellung der kalibrierten Profildatensätze für vier verschiedene Handelsmarken von Echinacea-Marken unter Ver-

wendung einer Entzündungsgruppe. Wie erwartet, ergaben SPM007 und SPM003 die den authentischen Echinacea-Proben SPM010 und SPM016 ähnlichen kalibrierten Signaturprofile, wobei sie, obwohl als Echinacea etikettiert und verkauft, beim Test unter Verwendung des in [Fig. 14](#) beschriebenen Systems zu kalibrierten Signaturprofilen führten, die dem mit Lipopolysaccharid allein erhaltenen Profil im Wesentlichen ähnlich waren. Von den Echinacea-Proben SPM010 und SPM016 wurde gefunden, dass sie erhöhte, hochgradig biologisch aktive Spiegel an Endotoxin hatten, während die LPS-Spiegel in SP007 und SP003 nicht nachweisbar waren. Ein gespeichertes Signaturprofil für aktive Echinacea, erhalten von einer zum Testen der Wirksamkeit und der Wirkungsweise ausgelegten Gruppe, z.B. der Entzündungsgruppe, erlaubt die Beurteilung neuer Echinacea-Chargen, die Unterscheidung existierender oder neuer Marken von Echinacea, lenkt die Isolierung und Entwicklung neuer Verbindungen mit verschiedenen oder ähnlichen Wirkungen aus einem komplexen Verbindungsgemisch wie Echinacea, oder kann in der Entwicklung der Qualitätssicherung in Produktion, Analyse und beim Verkauf neuer oder vorher vermarkteter Verbindungen verwendet werden. In dem zitierten Beispiel führen zwei der Echinacea-Marken SP010 und SP016 zu kalibrierten Profilen, die für authentische Echinacea charakteristisch sind.

Beispiel 10.

Vergleich von drei pflanzlichen Präparaten unter Verwendung einer Indikator-Zelllinie.

[0142] Die [Fig. 25\(a\)](#) bis (c) liefern kalibrierte Profildatensätze für drei pflanzliche Präparate bezüglich einer Indikator-Zelllinie (THP-1) anstatt einer Blutprobe von einem Subjekt. In [Fig. 25\(a\)](#) ist die Grundlinie der Profildatensatz für THP-1-Zellen ohne das pflanzliche Mittel, während die Histogramme die kalibrierten Profildatensätze für dasselbe pflanzliche Mittel von drei unterschiedlichen Herstellungsquellen derselben Pflanze bei 250 µg/ml repräsentieren. Die Genexpressionsergebnisse sind auf einer Log-Skala gezeigt. Ähnlich der Beobachtung in [Fig. 14](#) demonstrieren diese, dass ähnlich bezeichnete Verbindungen, die aus unterschiedlichen Quellen erhalten wurden, unter Verwendung einer spezifischen Gruppe, z.B. der Entzündungsgruppe, die dazu ausgelegt ist, Information über die Expression von mit Entzündung und Infektion in Beziehung stehenden Genprodukten zu erhalten, beweisbare und quantifizierbare Unterschiede in den kalibrierten Profilen aufweisen. Dies legt nahe, dass die Verbindungen wahrscheinlich verschiedene Wirksamkeiten haben, wenn sie für spezielle Zwecke verwendet werden.

[0143] [Fig. 25\(b\)](#) liefert einen Vergleich des kalibrierten Profils einer einzigen Pflanze bei drei Konzen-

trationen unter Verwendung der Indikator-Zelllinie THP-1. Der Grundlinien-Profil Datensatz sind unbehandelte THP-1-Zellen. Die Analyse der Daten legt eine konzentrationsabhängige Reaktion bei den Indikator-Zelllinien nahe, die, obwohl hier demonstriert, ein Hinweis auf eine ähnliche Reaktion bei Subjekten sein kann.

[0144] Fig. 25(c) liefert einen Vergleich von vier kommerziellen Echinacea-Marken, die bei derselben Konzentration verwendet wurden und unter Verwendung einer THP-1-Zelllinie als eine Indikator-Zellpopulation gegen eine Gruppe von Bestandteilen getestet wurden. Eine unterschiedliche Expression, wie sie durch Unterschiede in den kalibrierten Profilen offenbart wird, erlaubt, dass direkte Vergleiche der komplexen Verbindungen gemacht werden. Beispielsweise könnte die Analyse der Unterschiede in den kalibrierten Profilen dazu verwendet werden, die Isolierung und Entwicklung von Verbindungen zu lenken, Produkte auf dem Markt zu unterscheiden, oder von dem Verbraucher oder Gesundheitsfachmann verwendet werden, um die individualisierte Wahl einer einzigen Verbindung aus einer Klasse ähnlicher Verbindungen, die für einen bestimmten biologischen Zustand geeignet sein mag, zu lenken.

Patentansprüche

1. Ein Verfahren zur Beurteilung eines biologischen Zustands eines Testobjekts auf der Basis einer ersten Probe, die von dem Testobjekt erhalten wird, wobei die Probe eine Quelle von RNAs bereitstellt, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Verfahren umfasst:

(a) Ableiten aus der ersten Probe eines ersten Profildatensatzes, wobei der erste Profildatensatz 3 oder mehr Elemente umfasst, wobei jedes Element ein relatives quantitatives Maß für die Menge in der ersten Probe eines gesonderten transkribierten RNA-Bestandteils in einer Gruppe von Bestandteilen ist, die derart ausgewählt werden, dass die Messung der Bestandteile die Beurteilung des biologischen Zustands ermöglicht, wobei die relative Quantifizierung der mRNA in der Probe bestimmt wird, indem eine quantitative PCR mit RNA, welche aus der Probe extrahiert wird, mit einer definierten Amplifikationseffizienz für die Targettranskripte durchgeführt wird und der Unterschied bei Grenzwertzyklen (ΔC_T) zwischen einem Größenmarker und den Targettranskripten von Interesse bestimmt wird; und

(b) Erzeugen eines kalibrierten Profildatensatzes für die Gruppe, wobei jedes Element des kalibrierten Profildatensatzes eine Funktion eines entsprechenden Elements des ersten Profildatensatzes und eines entsprechenden Elements eines Grundlinienprofildatensatzes für die Gruppe ist; wobei der kalibrierte Profildatensatz einen Satz von Werten darstellt, bei welchem ein Variationsmuster in einer reproduzierbaren Weise mit einem bestimmten Zustand korreliert.

2. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei dieses weiterhin das Unterscheiden zwischen zwei biologischen Zuständen durch ein Ausführen von (a) und (b) für jeden der zwei biologischen Zustände umfasst.

3. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Funktion ein Verhältnis solcher Elemente einschließt.

4. Ein Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei die Funktion einen Logarithmus des Verhältnisses einschließt.

5. Ein Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der biologische Zustand ein komplexer Krankheitsprozess ist, an dem mehrere Gene beteiligt sind, wobei die Krankheit zu einem Typ gehört, an dem wenigstens ein Element von Entzündung, Autoimmunkrankheit, degenerativer Krankheit, Allergie, Gefäßkrankheit, Ischämie, Krebs, Entwicklungskrankheit, Hormonstörung, Alterung und Infektionskrankheit beteiligt ist.

6. Ein Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei der Zustand durch eine Entzündung gekennzeichnet ist und die Gruppe wenigstens einen von Il-1 alpha, Il-1 beta, Il-2, Il-4, Il-5, Il-6, Il-8, Il-10, Il2p40, Il-18, GMCSF, IFN-gamma, TGF-b, cox-1, cox-2, ICE, mmp-3, mmp-9, ICAM, TNF-a und TNF-b beinhaltet.

7. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Probe eine Blutprobe ist.

8. Ein Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Zustand über den Lebermetabolismus charakterisiert wird und die Gruppe von Bestandteilen eine Lebermetabolismusgruppe ist.

9. Ein Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der biologische Zustand eine Toxizität ist und die Gruppe von Bestandteilen eine Toxizitätsgruppe ist.

10. Ein Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei die Toxizität eine Nebenreaktion auf ein Arzneimittel ist.

Es folgen 37 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

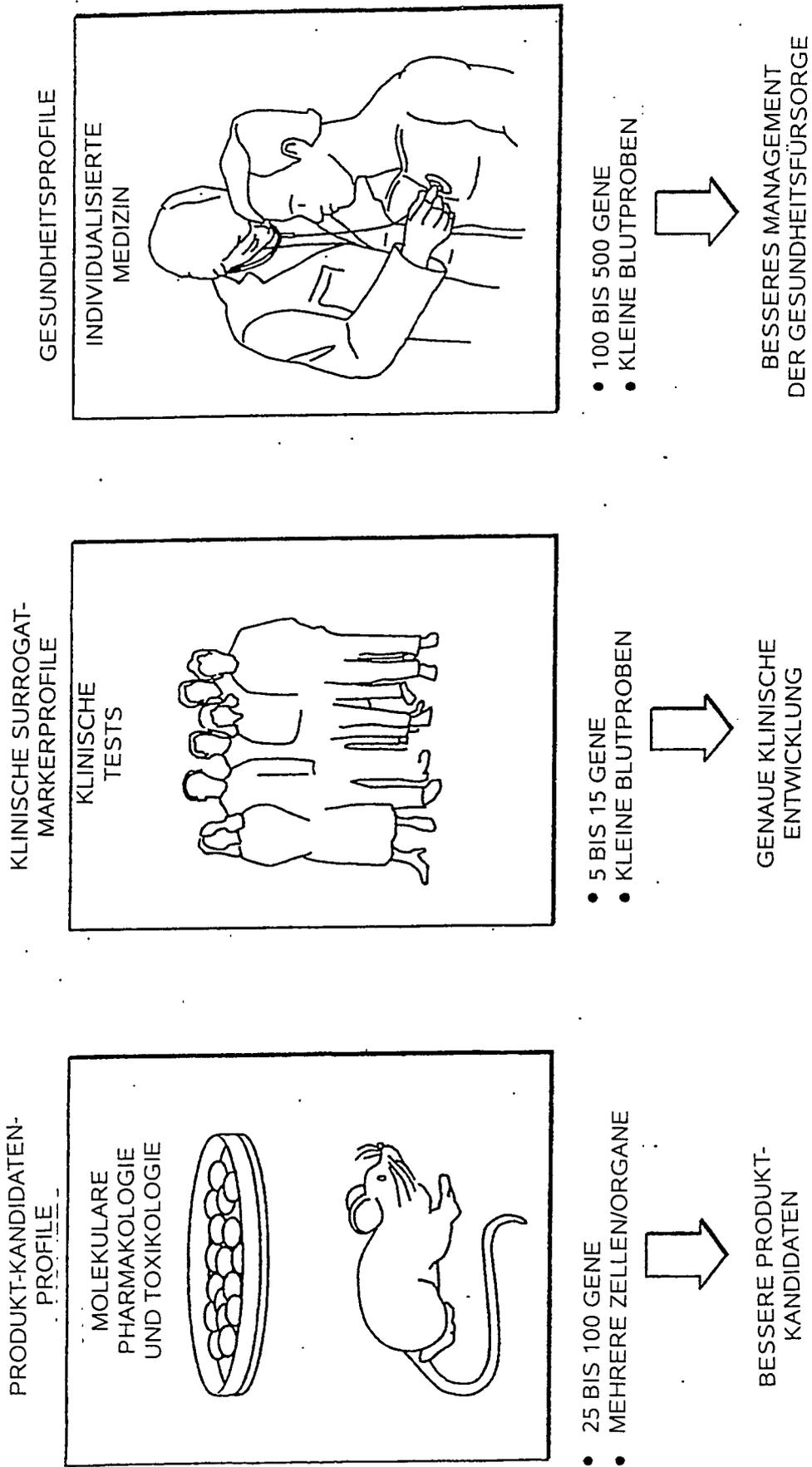


FIG. 1

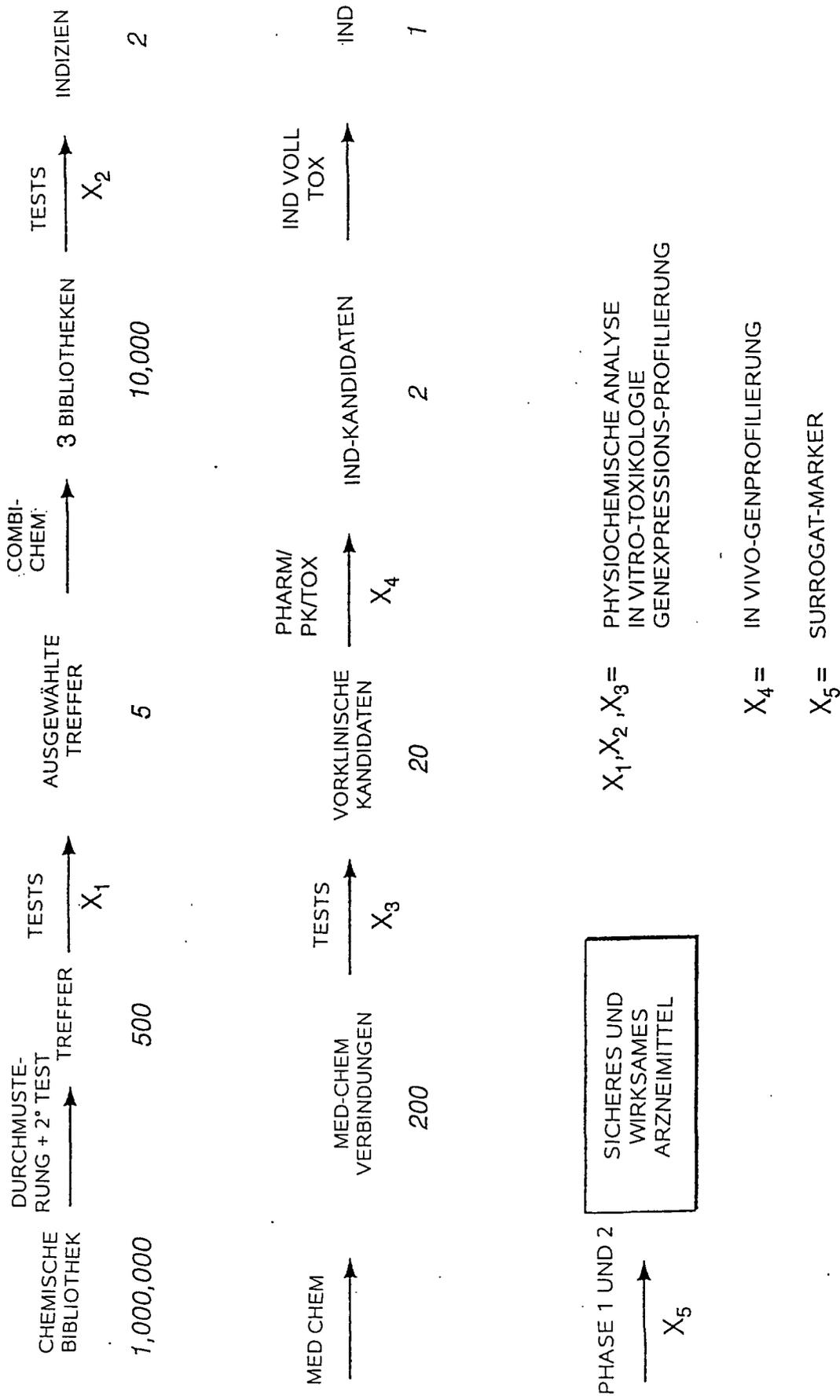


FIG. 2

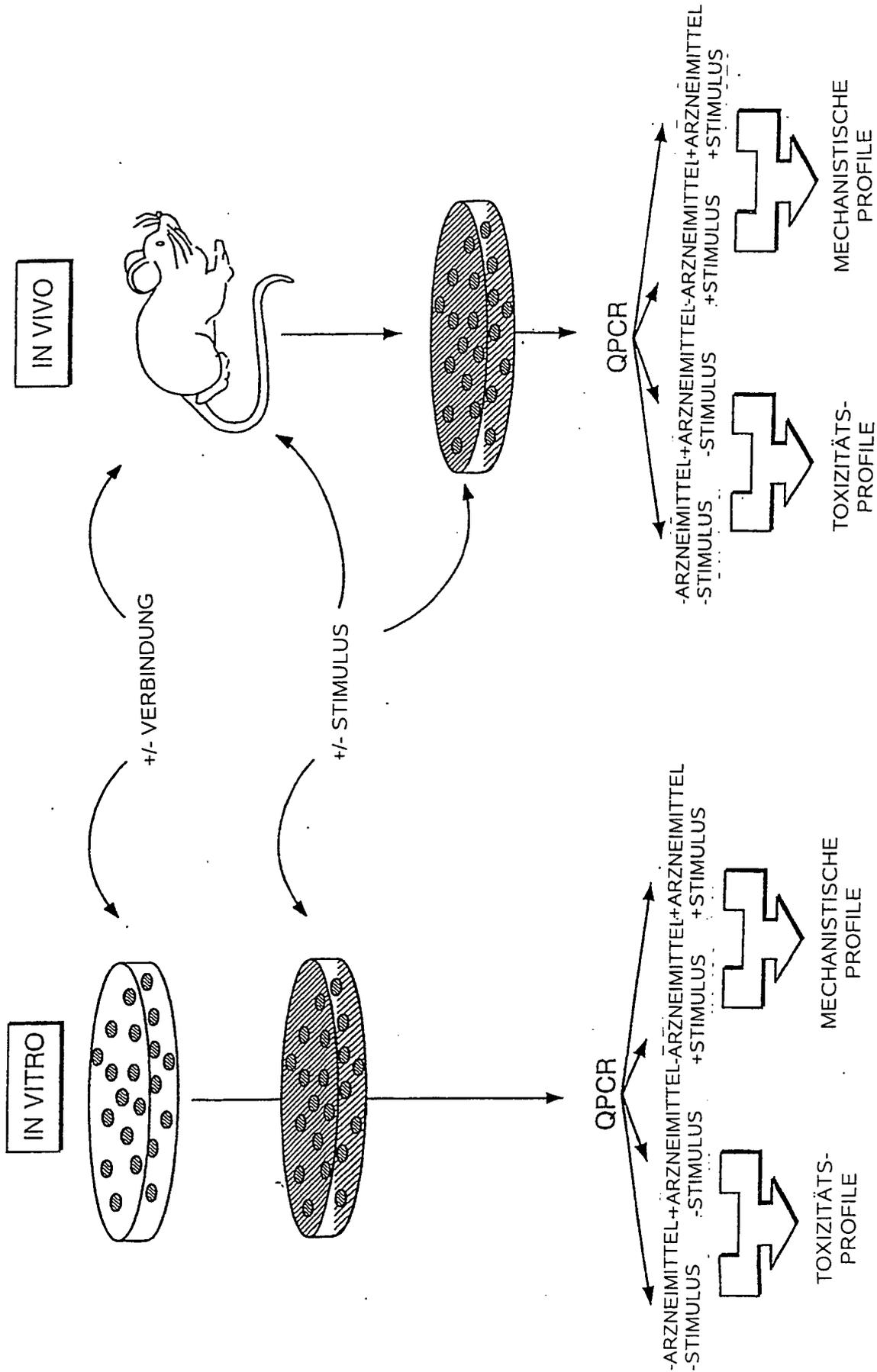


FIG. 3

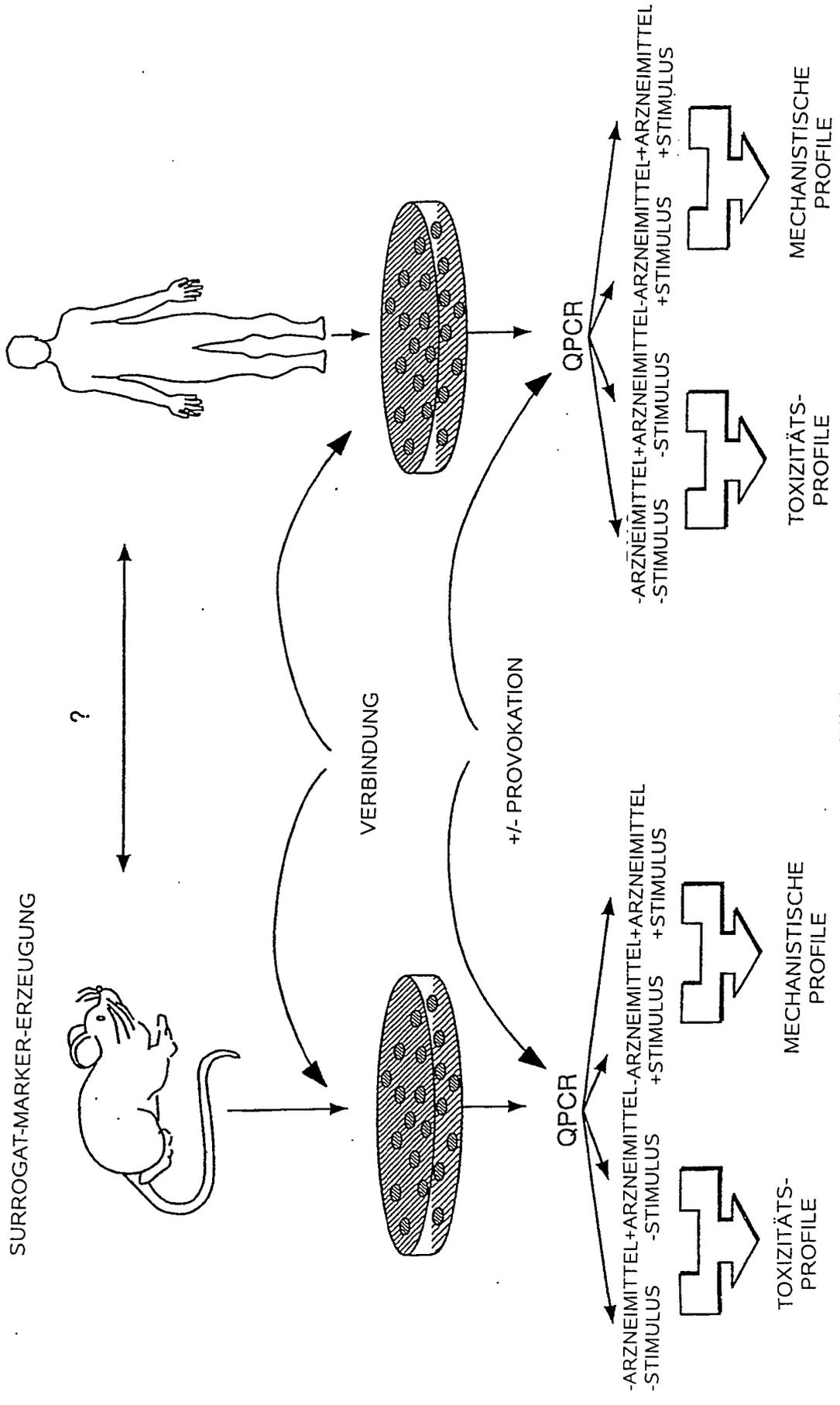


FIG. 4

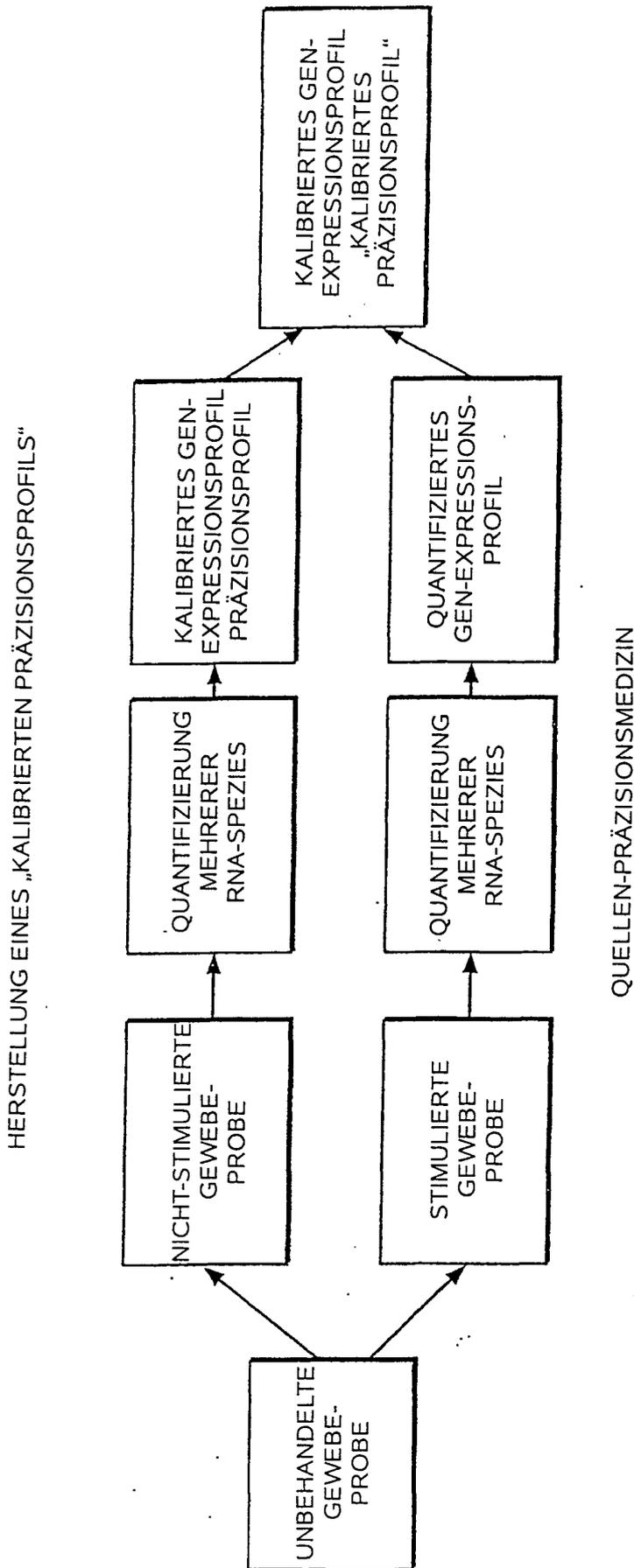
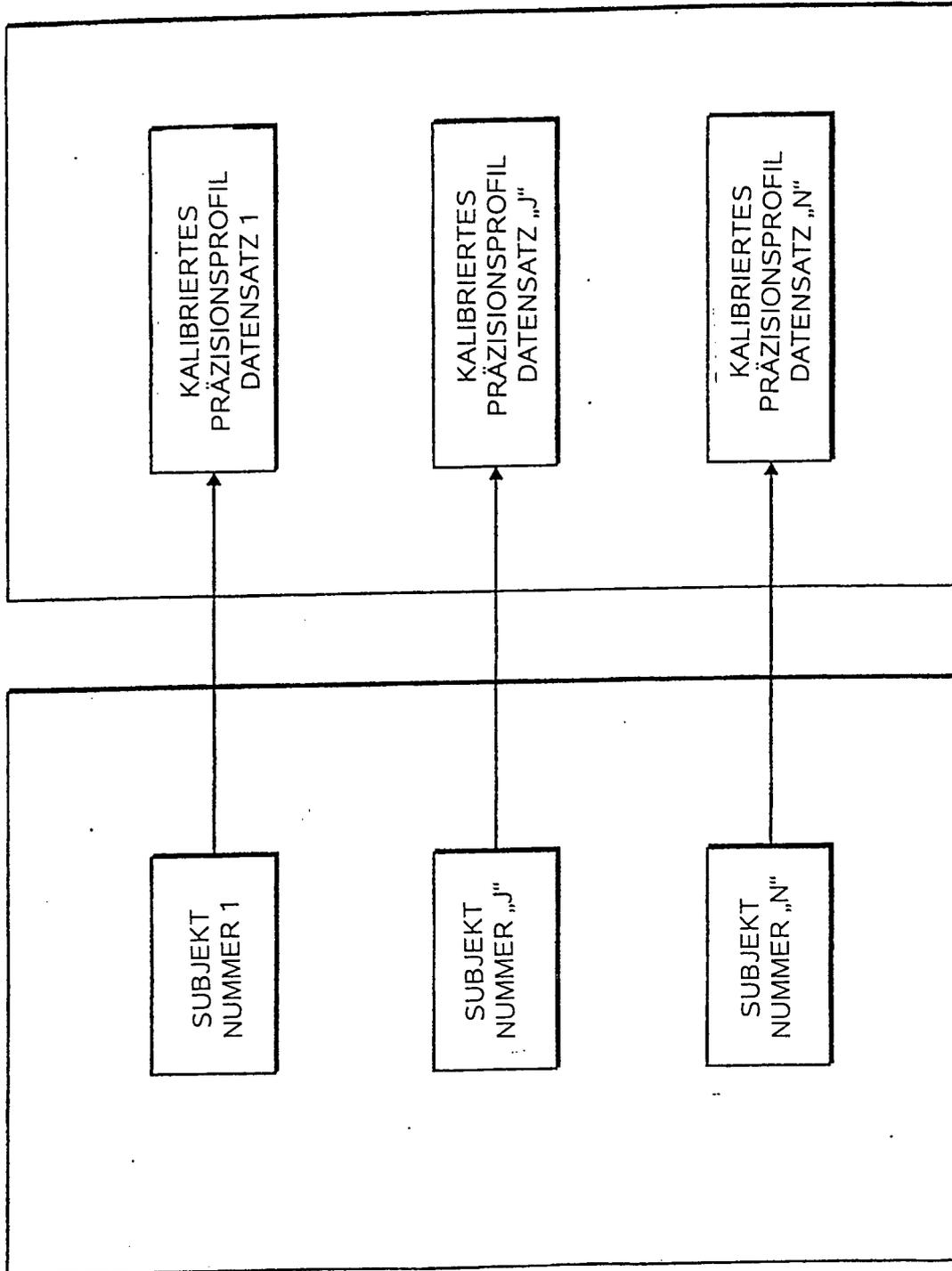


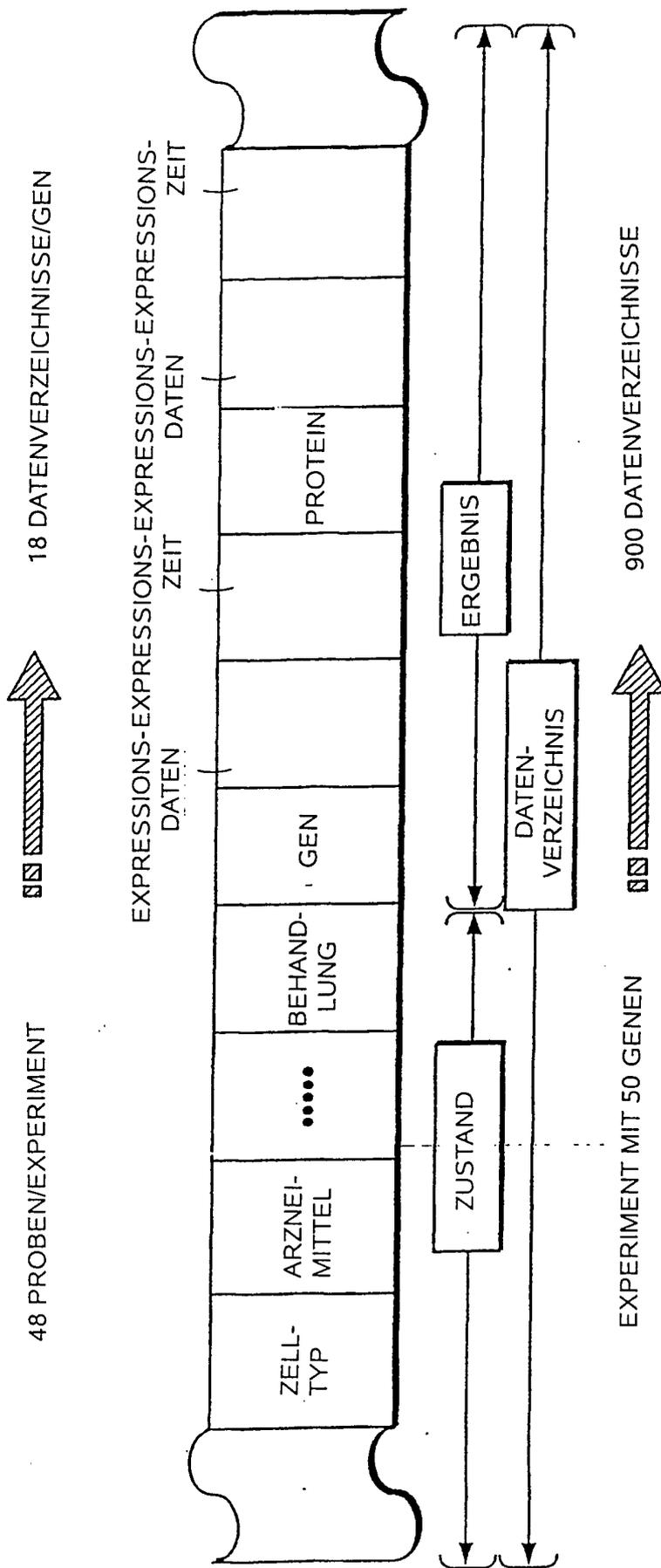
FIG. 5



BIBLIOTHEK ODER DATENBANK

POPULATION

FIG. 6



JEDES NEUE VERZEICHNIS VERBESSERT DIE VORHERSAGEKRAFT DER DATENBANK UND ERHÖHT IHREN WERT

FIG. 7

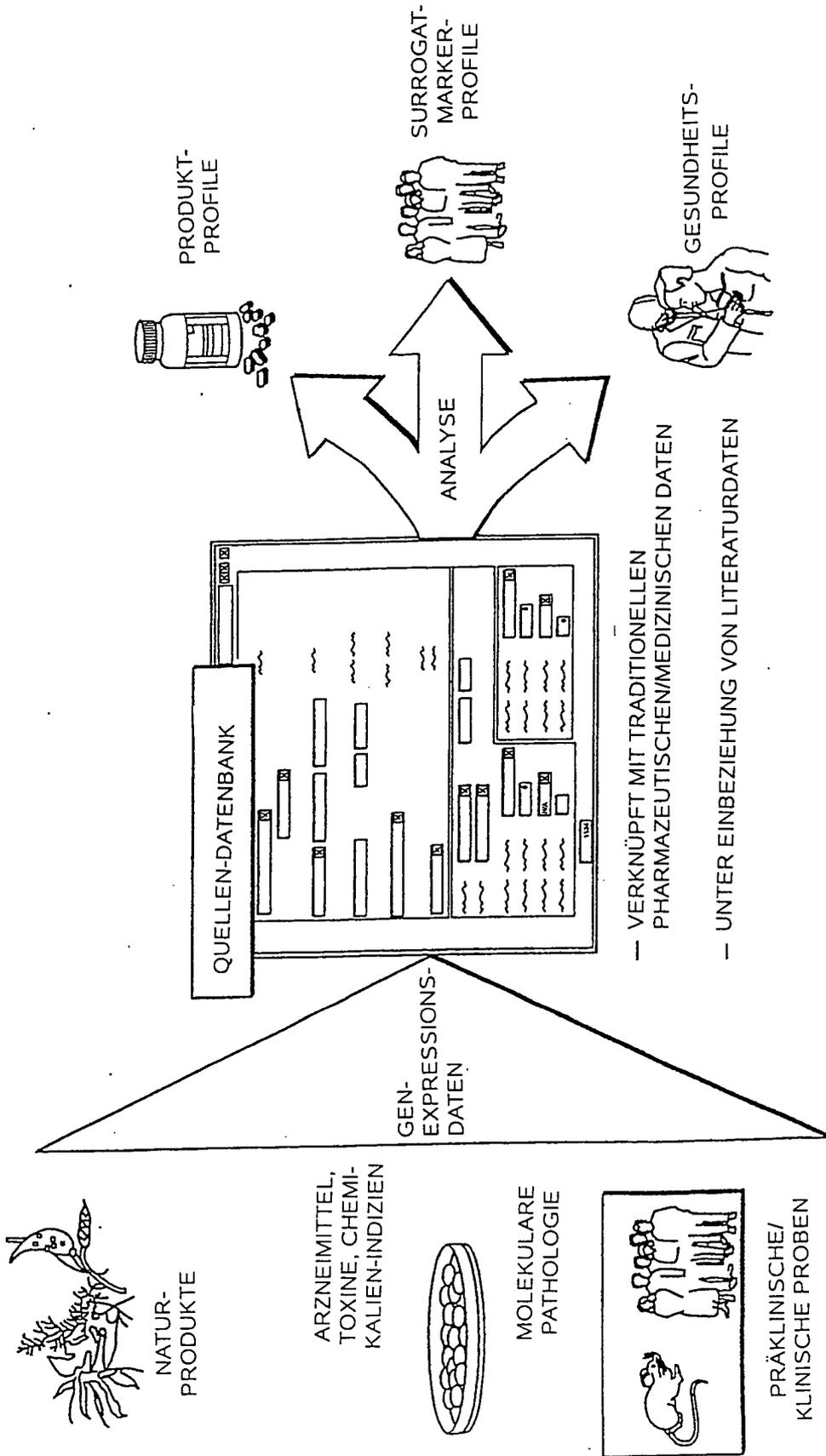


FIG. 8

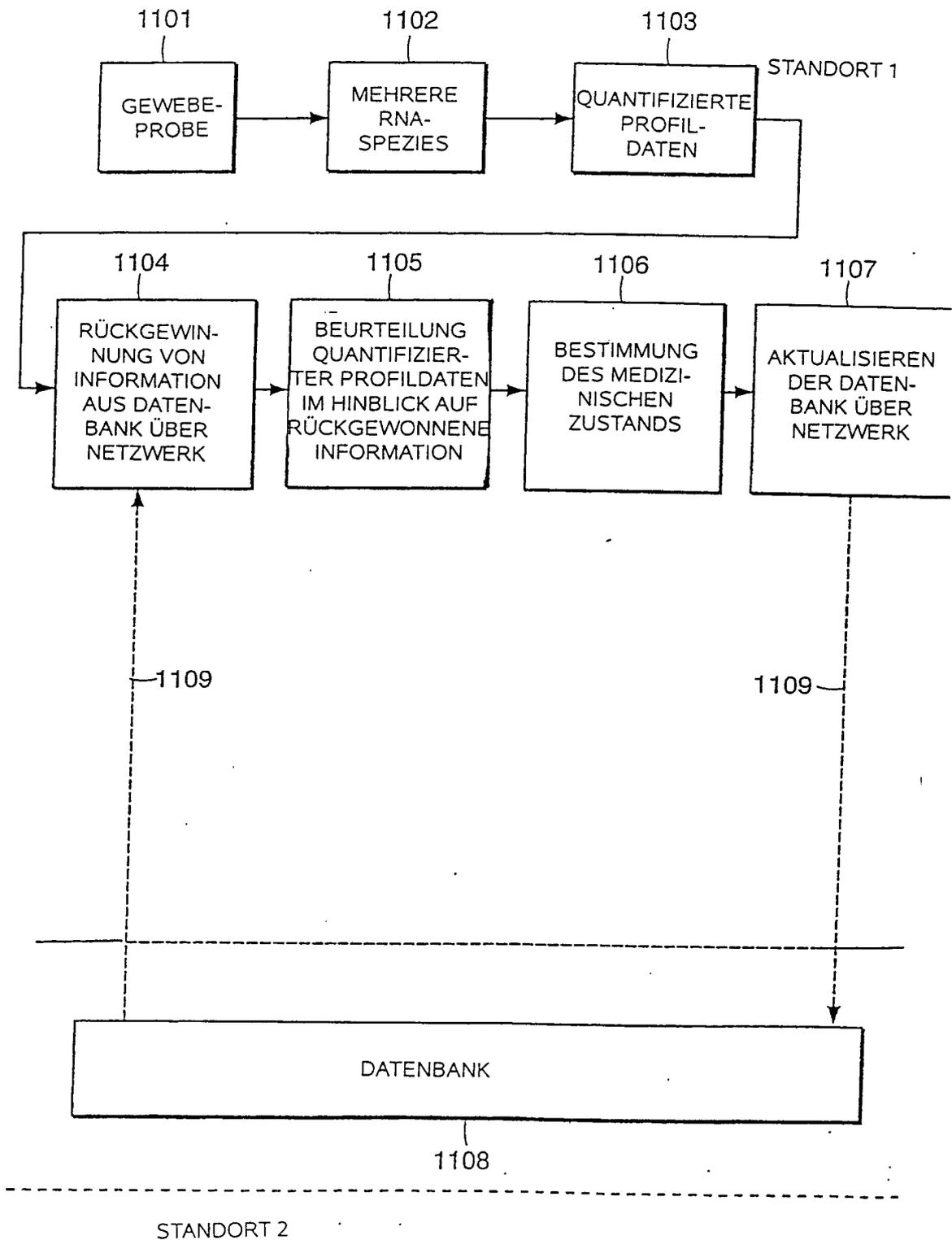
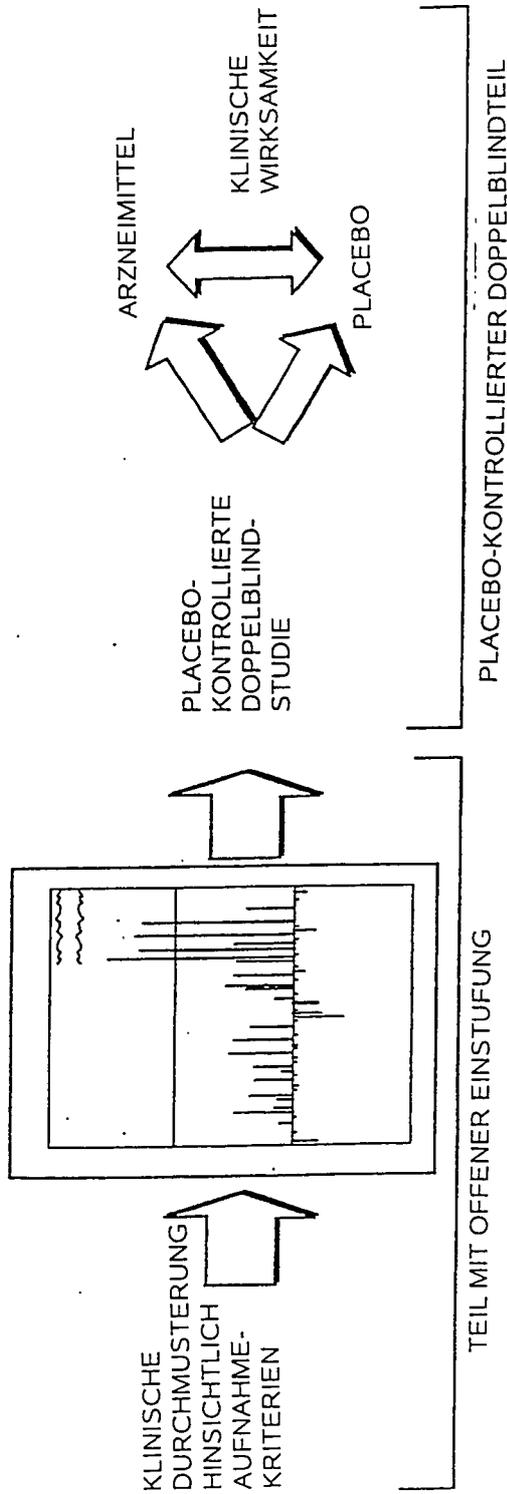


FIG. 9

GESTALTUNG DER KLINISCHEN ERPROBUNG IN PHASE 2
UNTER VERWENDUNG VON PRÄZISIONSPROFILIERUNG



- DIE KLINISCHE ZIELPOPULATION KANN DURCH KONZENTRIEREN AUF ARZNEIMITTELREAKTION-GENPROFILIERUNG HINSICHTLICH ANSPRECHEN AUF EINE THERAPIE BEURTEILT WERDEN
- „SIGNAL/RAUSCH“ KANN DURCH ENTFERNEN VON NICHT-ANSPRECHERN AUS DEM ZWEITEN TEIL DER STUDIE VERBESSERT WERDEN
- DIE DOSIS KANN AUF INDIVIDUELLER BASIS OPTIMIERT WERDEN, UM DIE AUSWIRKUNG AUF DAS THERAPEUTISCHE ERGEBNIS ZU MAXIMIEREN

- KLINISCHES ANSPRECHEN/NICHT-ANSPRECHEN KANN KORRELIERT WERDEN MIT KRANKHEITS-REAKTION-GENPROFILIERUNG
- KLINISCHE WIRKSAMKEIT KANN MIT GRÖßERER PRÄZISION GEMESSEN WERDEN
- KÜNFTIGE STUDIEN KÖNNEN MIT GRÖßERER GEWISSHEIT UND STATISTISCHER AUSSAGE-KRAFT GEPLANT WERDEN
- VERGLEICH MIT KLINISCHEN DATENBANKEN KANN WICHTIGE INFORMATION BEZÜGLICH KOMPETITIVER POSITIONIERUNG IN BEZIEHUNG ZU BESTEHENDEN THERAPIEN BEREITSTELLEN

FIG. 10a

FIG. 10b

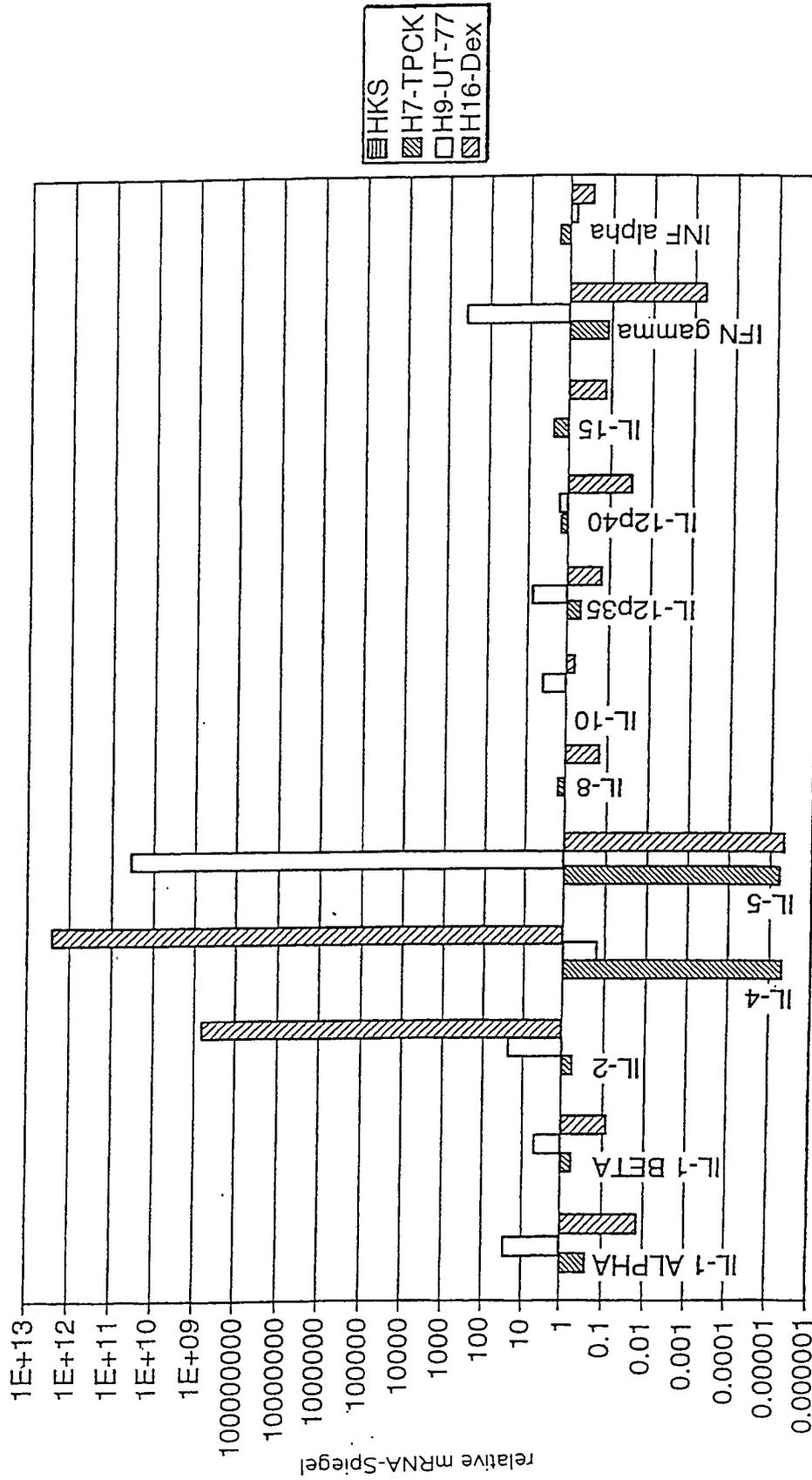


FIG. 11a

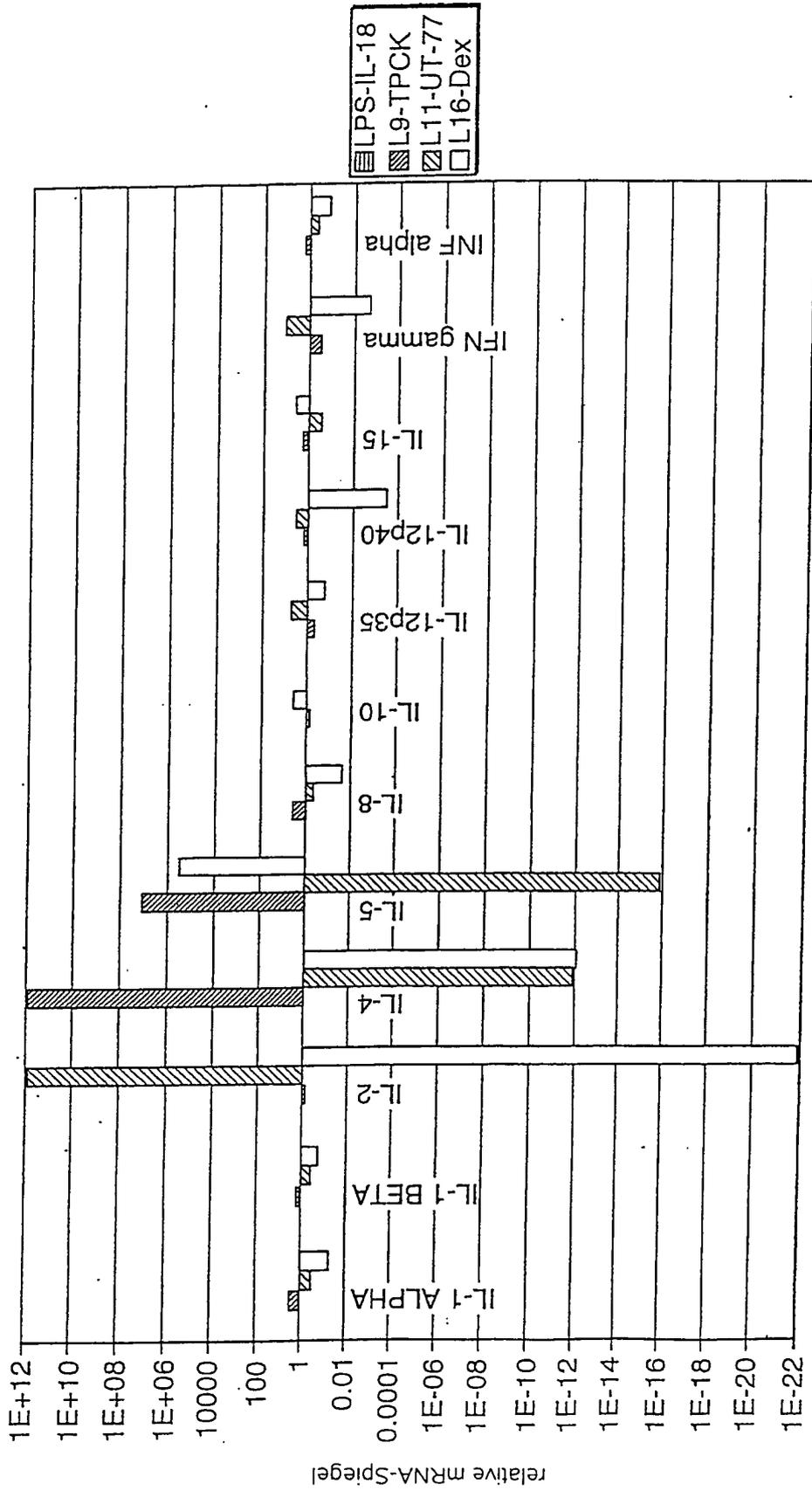


FIG. 11b

VERGLEICHENDE ARZNEIMITTELPROFILIERUNG ZEIGT UNTERSCHIEDE
 ZWISCHEN ENTZÜNDUNGSHEMMENDEN ARZNEIMITTELN MIT UNTER-
 SCHIEDLICHEN WIRKUNGSMECHANISMEN

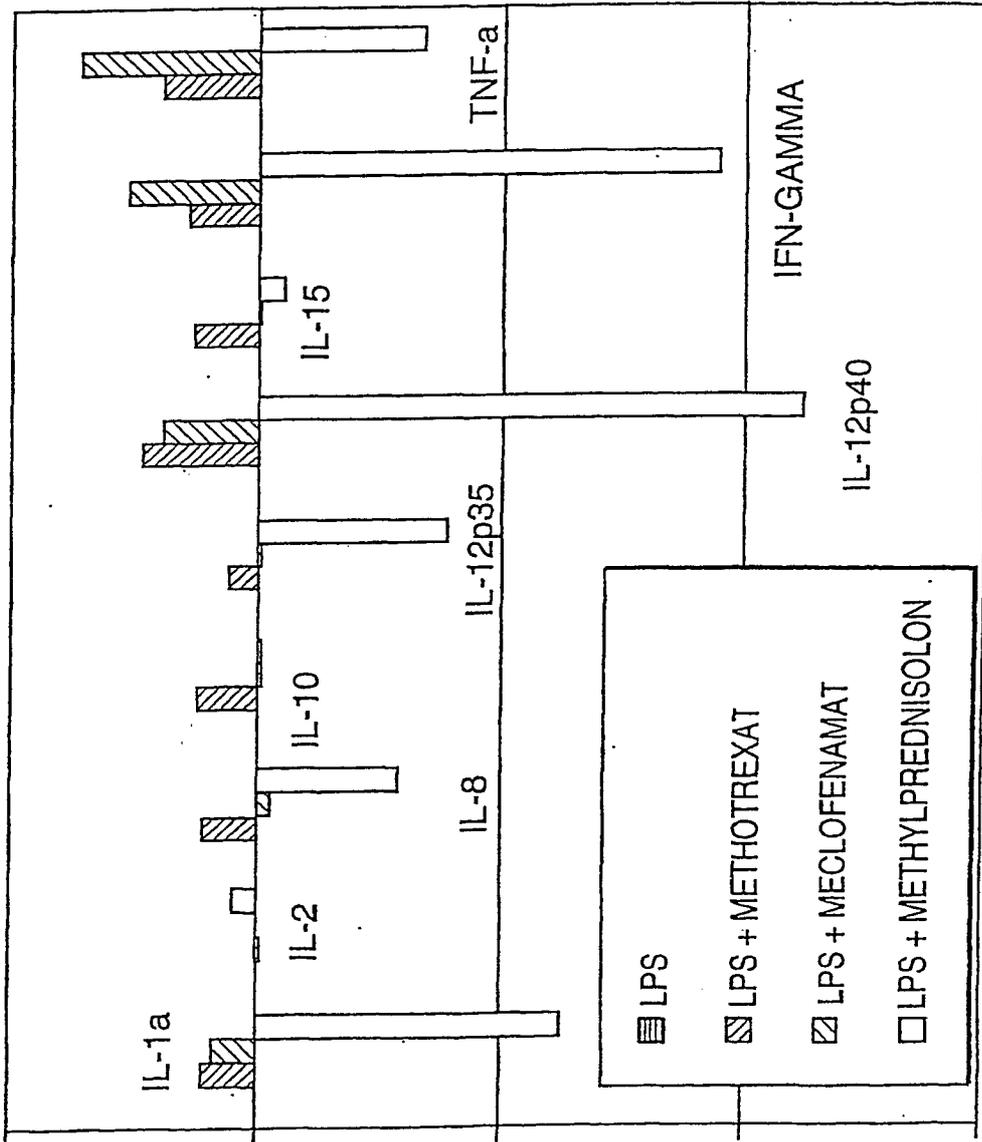


FIG. 12a

991116 LPS, HKS, PHA VERGLEICHENDE STIMULIERUNG VON WB
BEI 6 STUNDEN

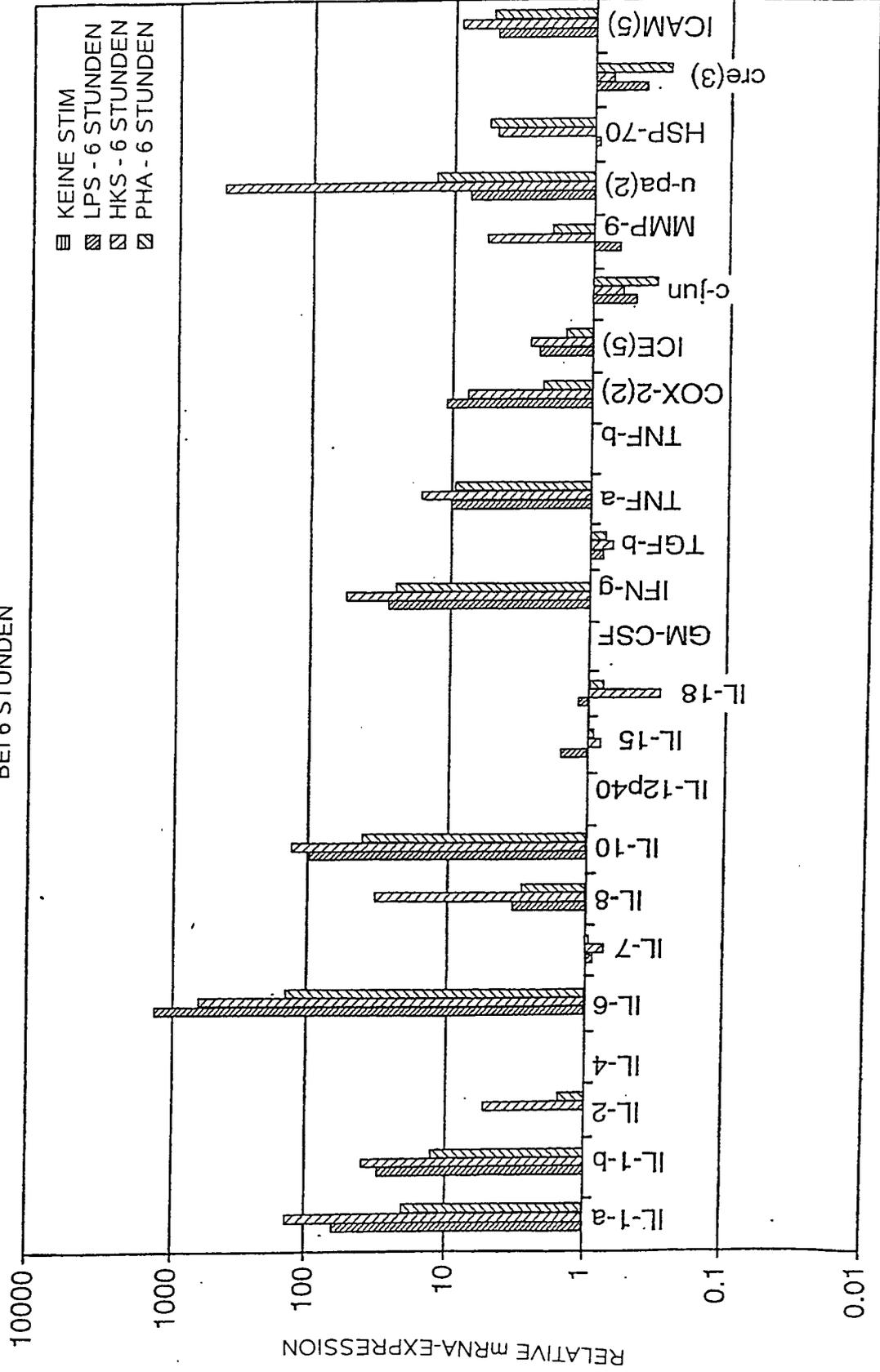


FIG. 13a

991028 LPS, HKS, PHA VERGLEICHENDE STIMULIERUNG VON WB -
6 STUNDEN

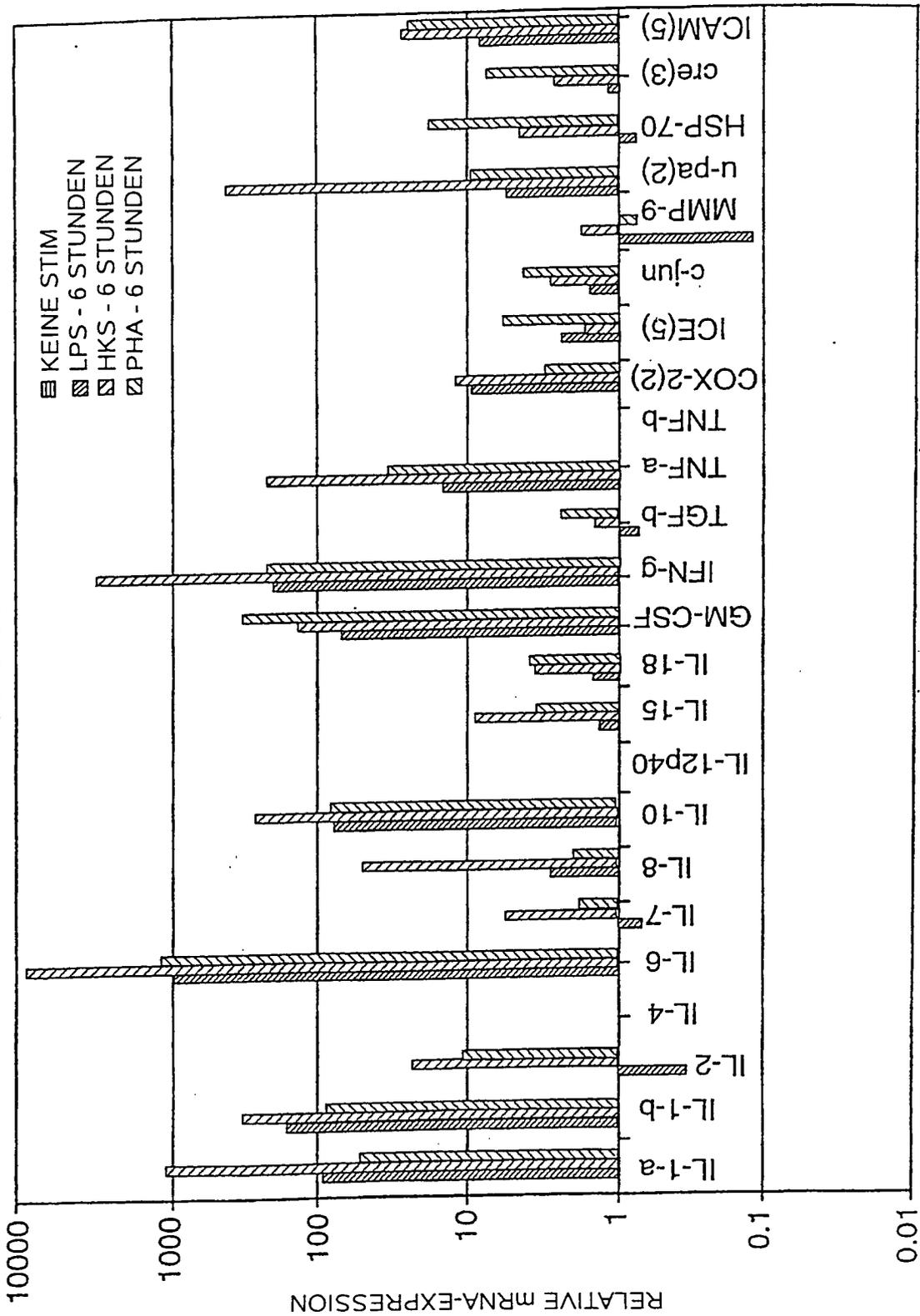


FIG. 13b

INDIVIDUELLER VERGLEICH DER LPS-STIMULIERUNG
991026 VS 991116 DONOR: TK

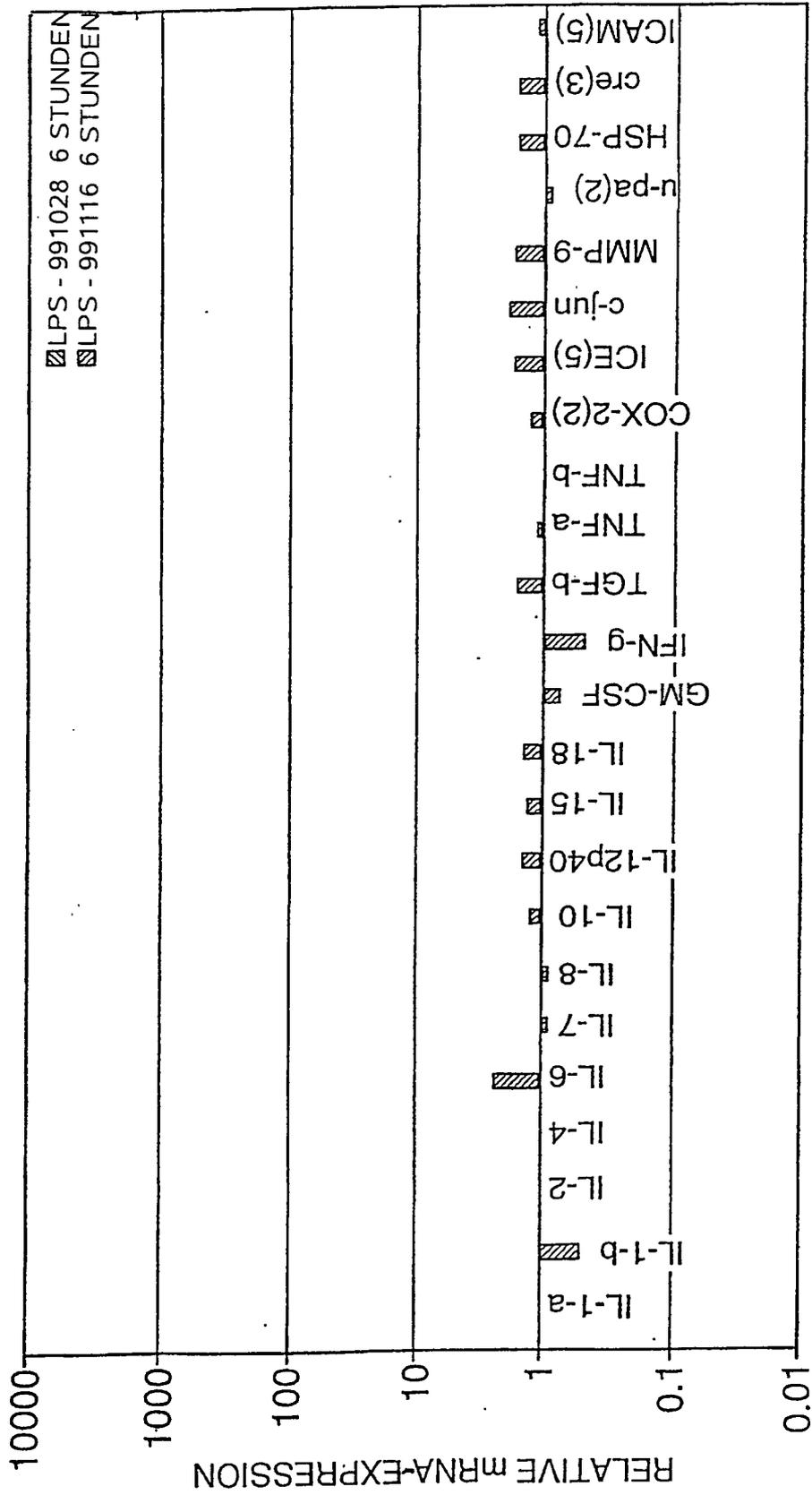


FIG. 13C

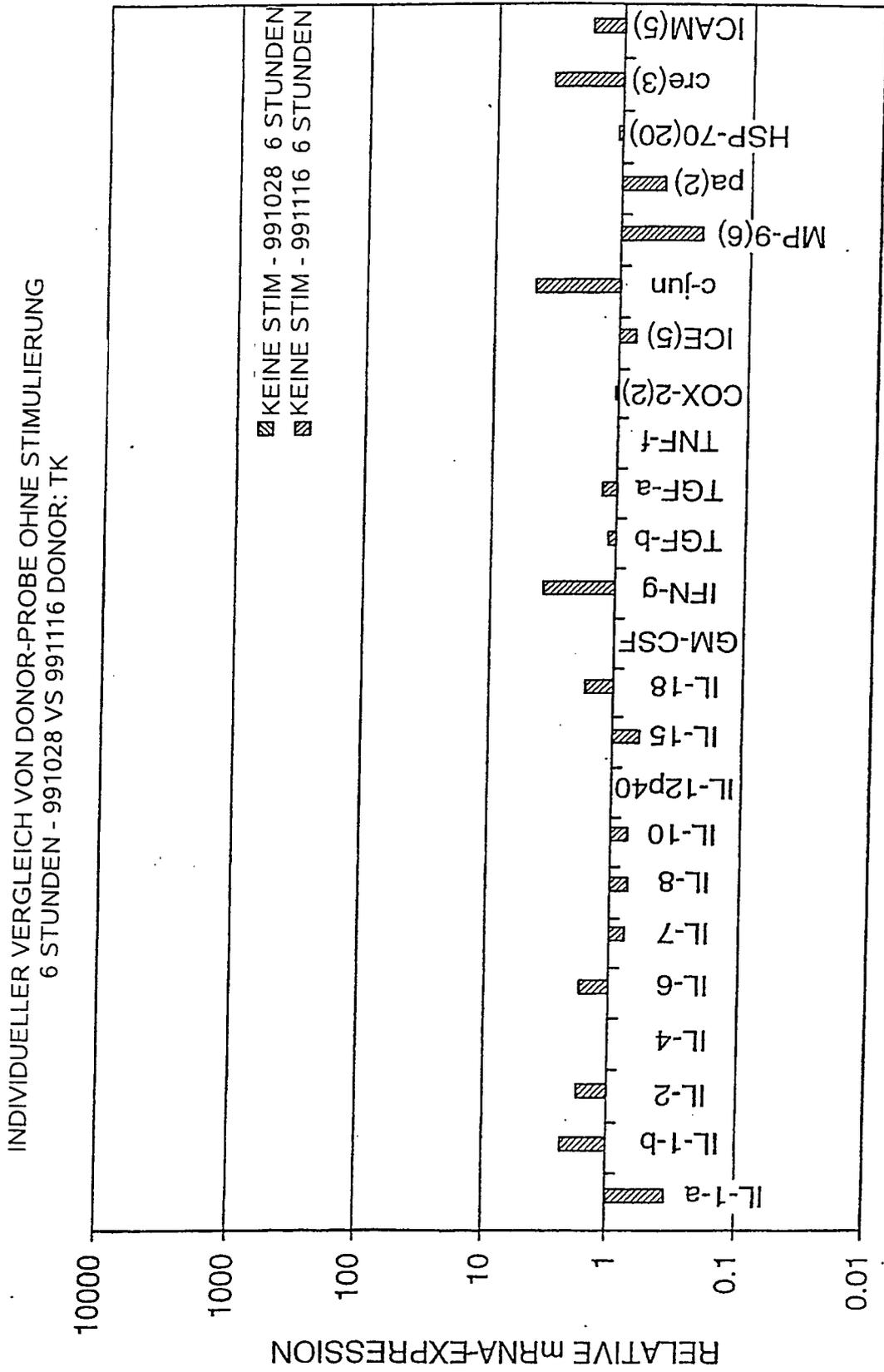


FIG. 13d

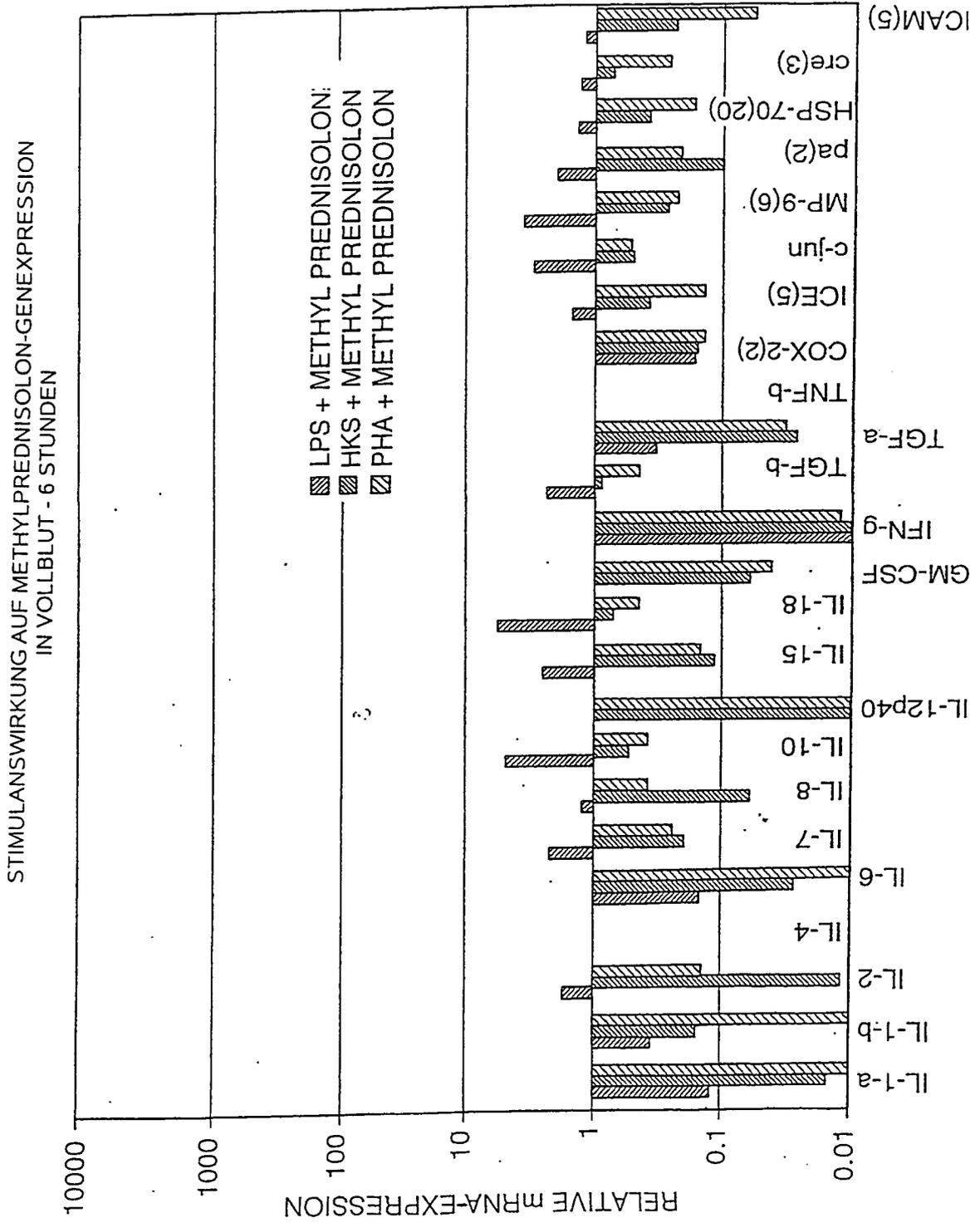


FIG. 14

VERGLEICH VON IN VITRO- UND IN VIVO-GENEXPRESSION
ALS REAKTION AUF CORTICOSTEROID-BEHANDLUNG

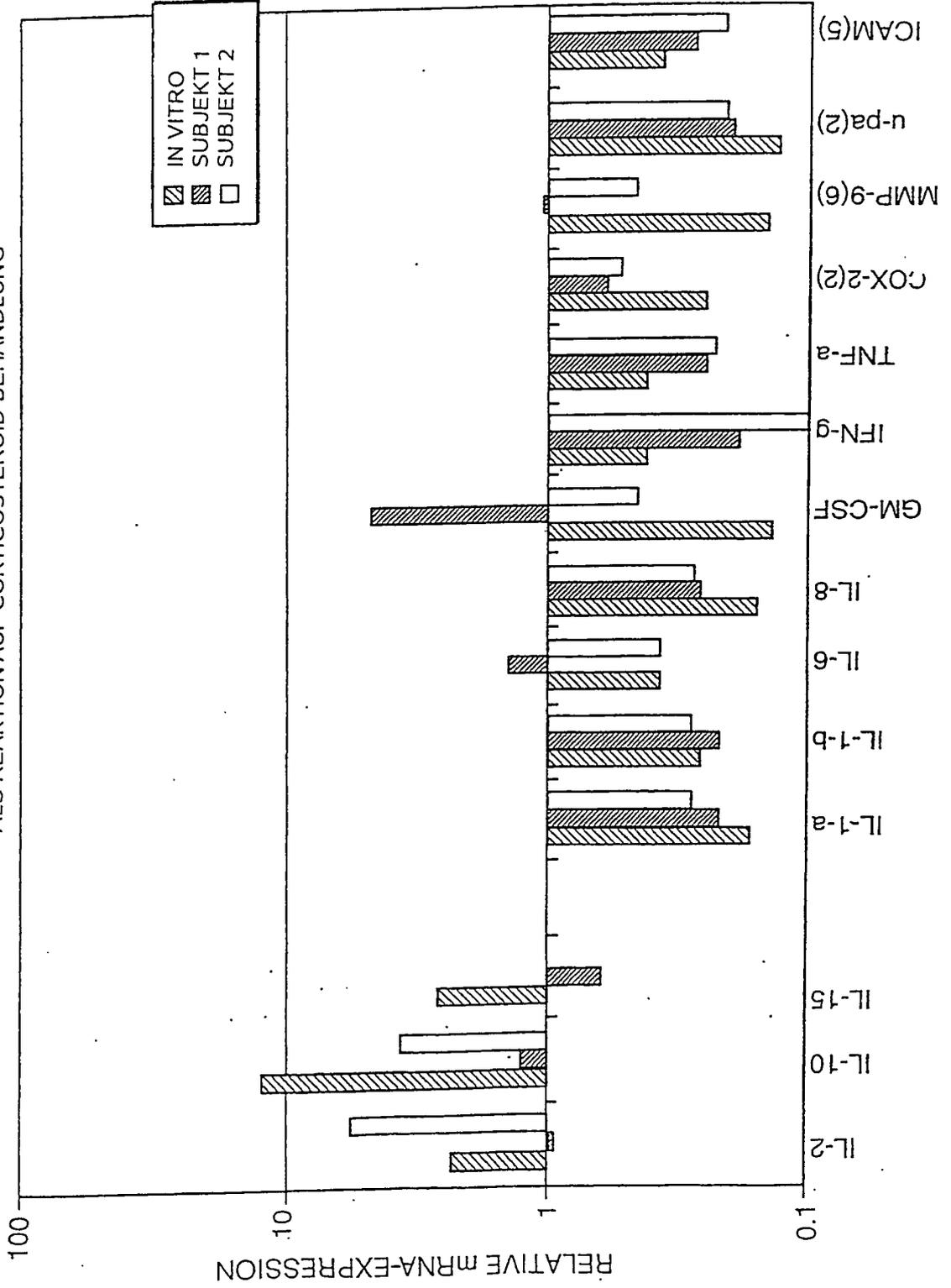


FIG. 15

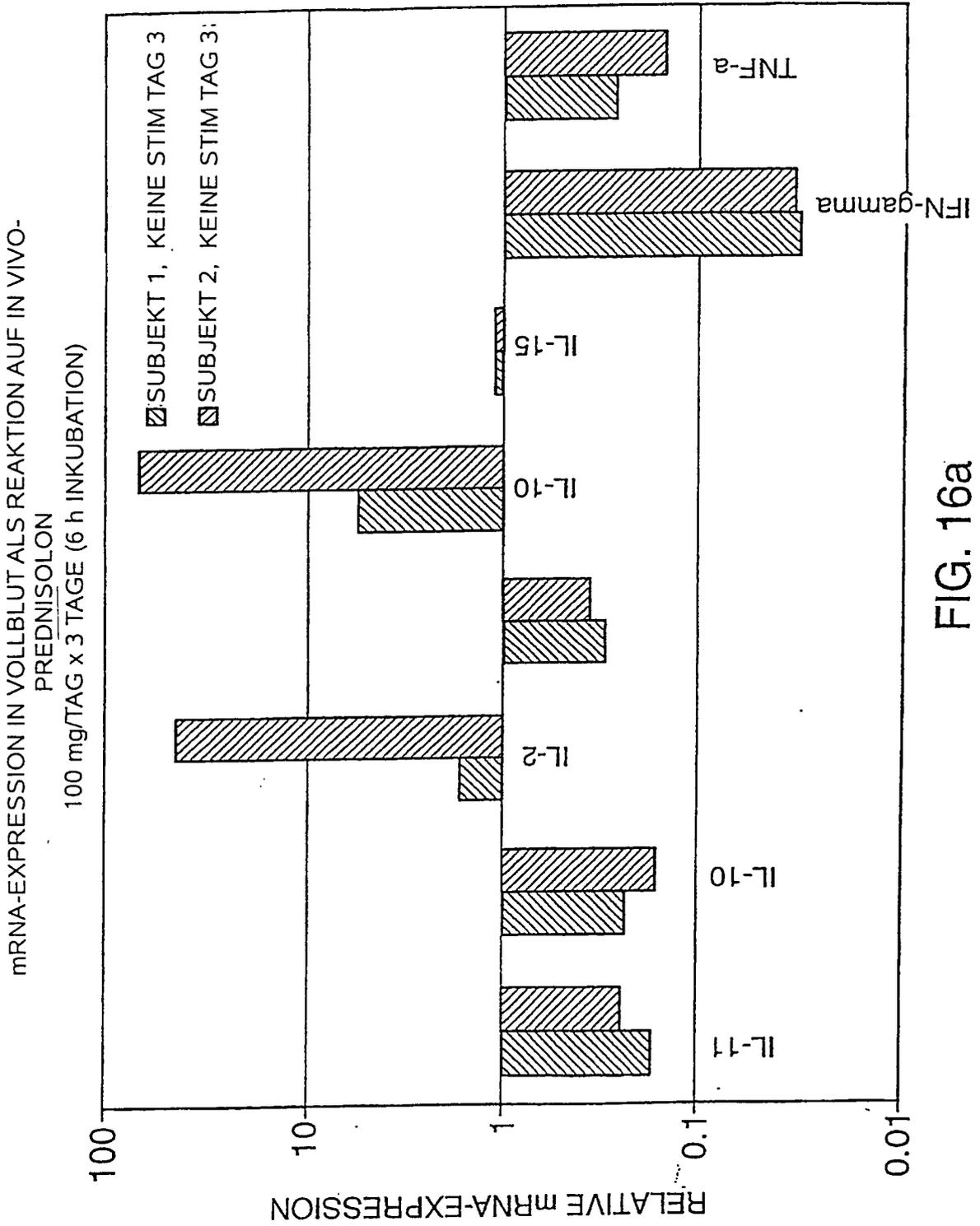


FIG. 16a

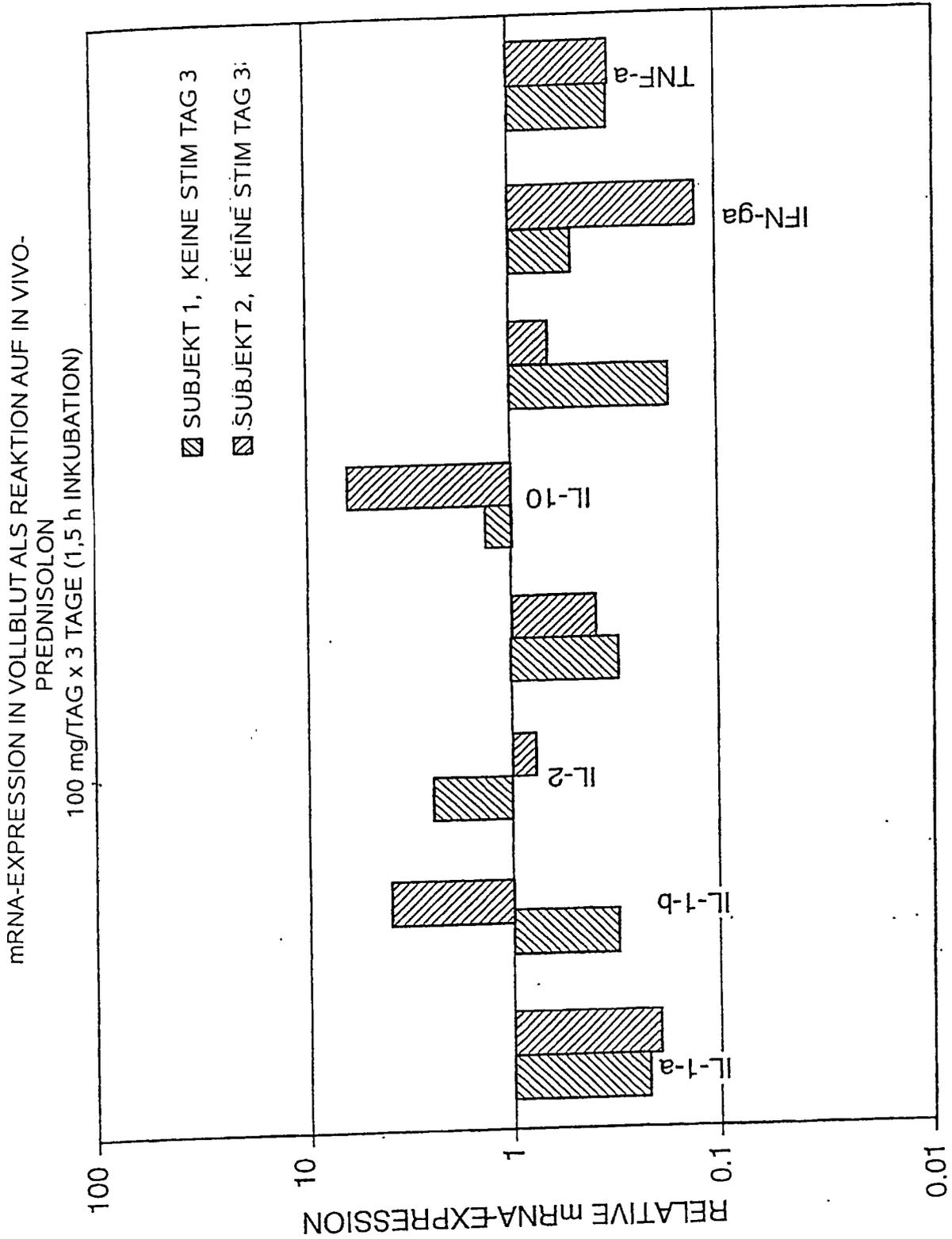


FIG. 16b

INDIVIDUELLER VERGLEICH - 991028 VS 991116
DONOR: TK

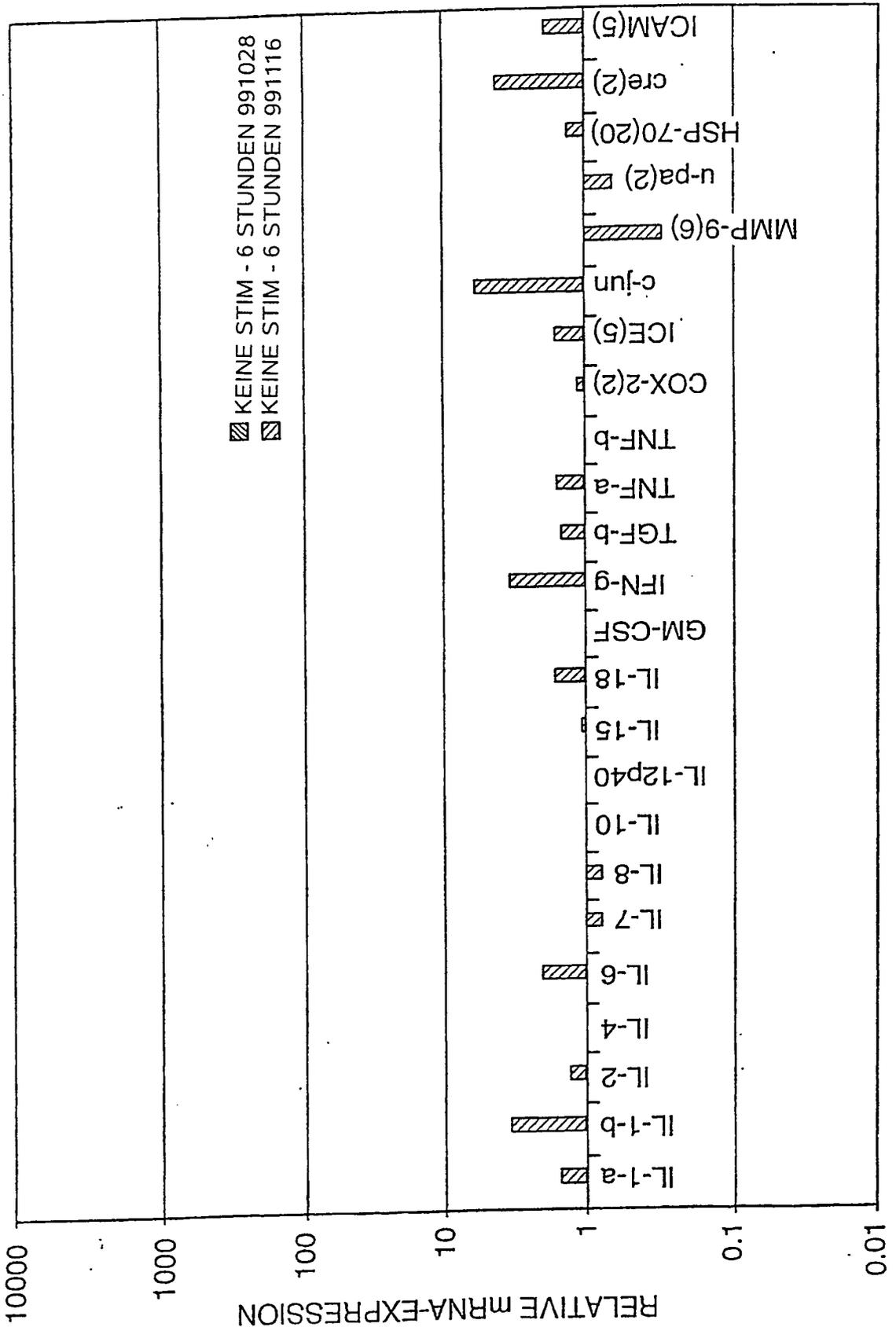


FIG. 17

PB001 STUDIE 2, STADIUM 3
WIRKUNGEN VON ARZNEIMITTEL AUF VOLLBLUT
DONOR 1

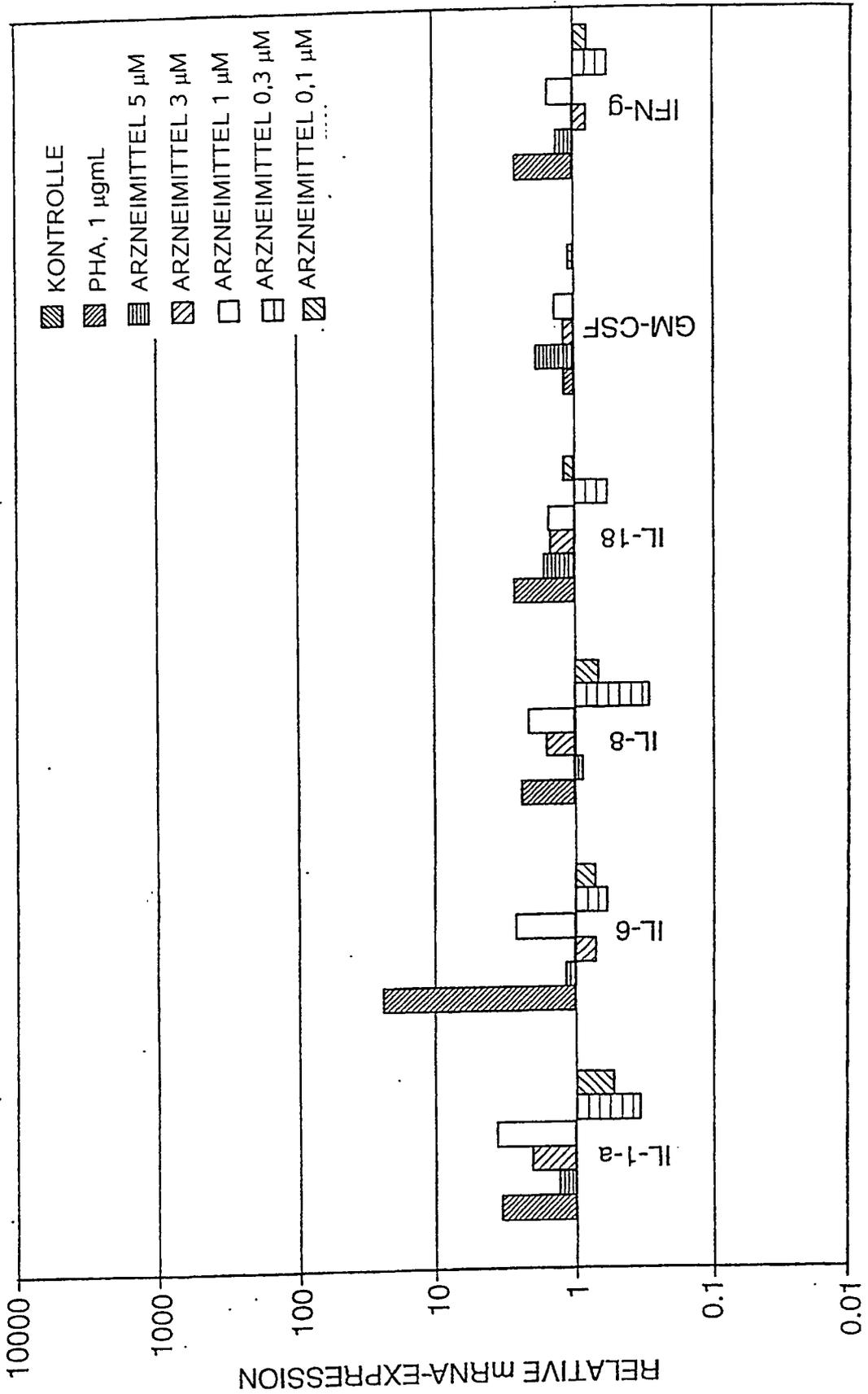


FIG. 18a

PB001 STUDIE 2, STADIUM 3
 AUSWIRKUNGEN VON ARZNEIMITTEL AUF VOLLBLUT
 DONOR 2

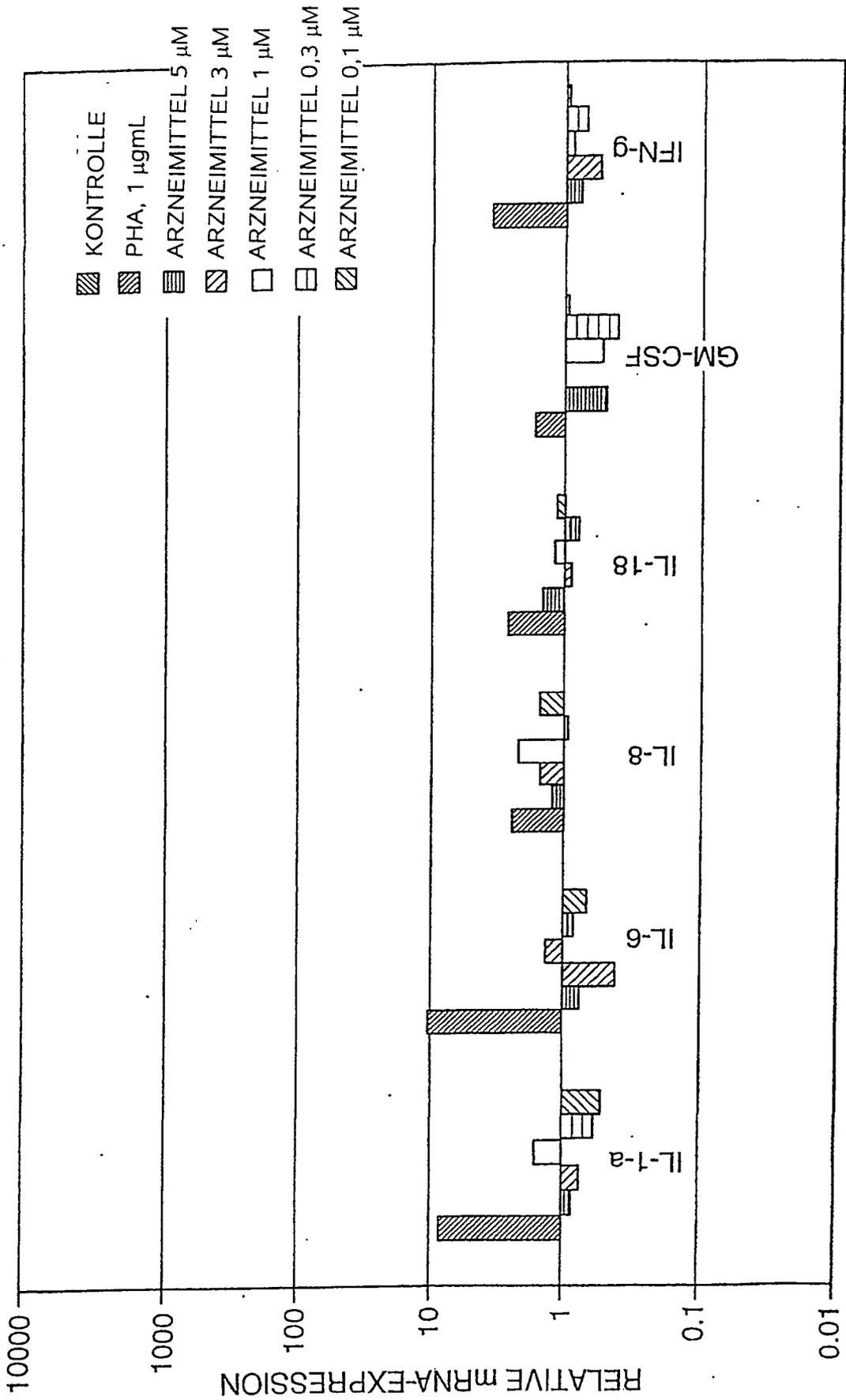


FIG. 18b

PB001 STUDIE 2, STADIUM 3
 AUSWIRKUNGEN VON ARZNEIMITTEL AUF VOLLBLUT
 DONOR 3

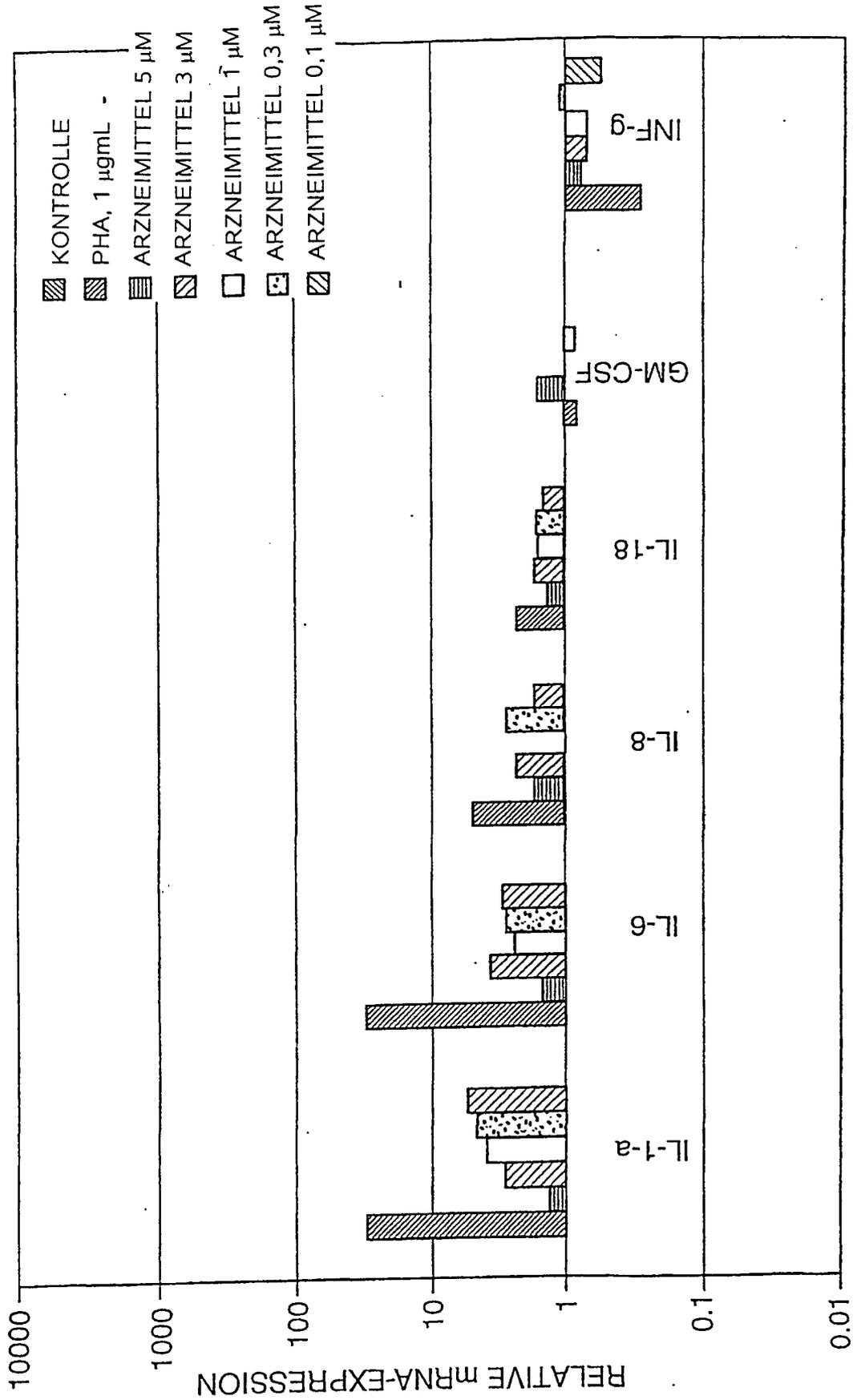


FIG. 18C

PB001 STUDIE 2, STADIUM 3
 AUSWIRKUNGEN VON ARZNEIMITTEL AUF VOLLBLUT
 DONOR 4

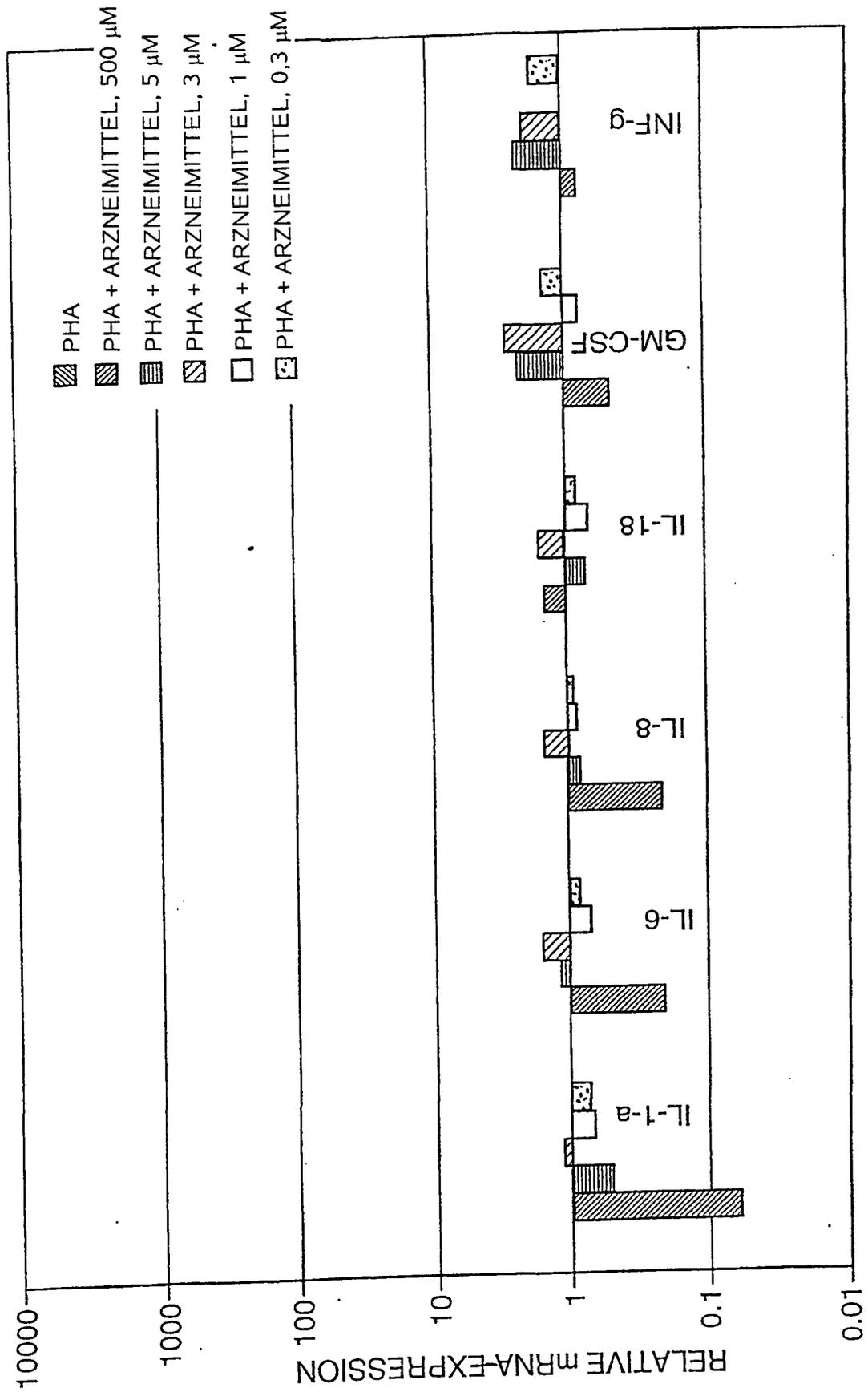


FIG. 18d

PB001 STUDIE 2, STADIUM 3
 AUSWIRKUNGEN VON ARZNEIMITTEL AUF VOLLBLUT
 DONOR 5

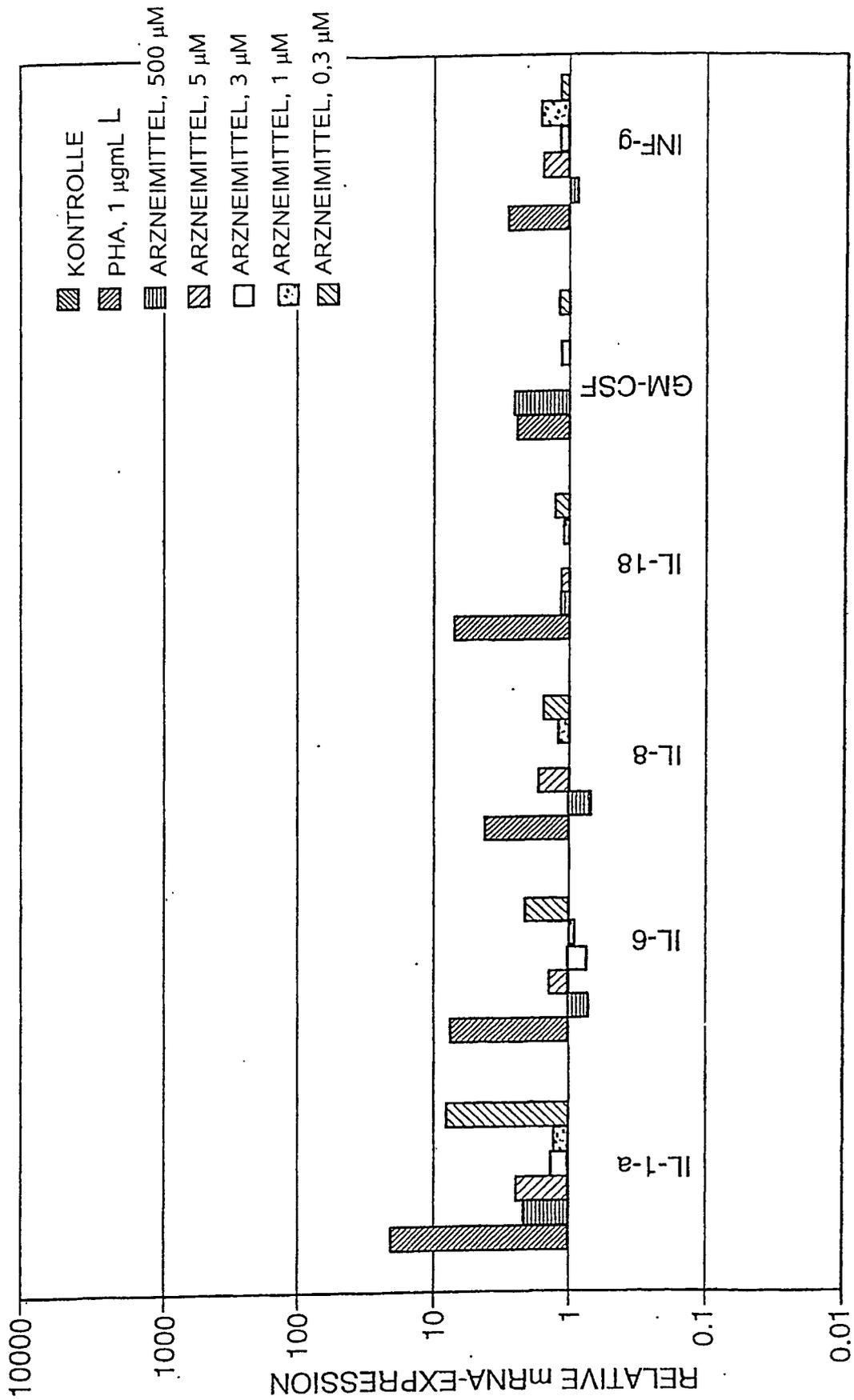


FIG. 18e

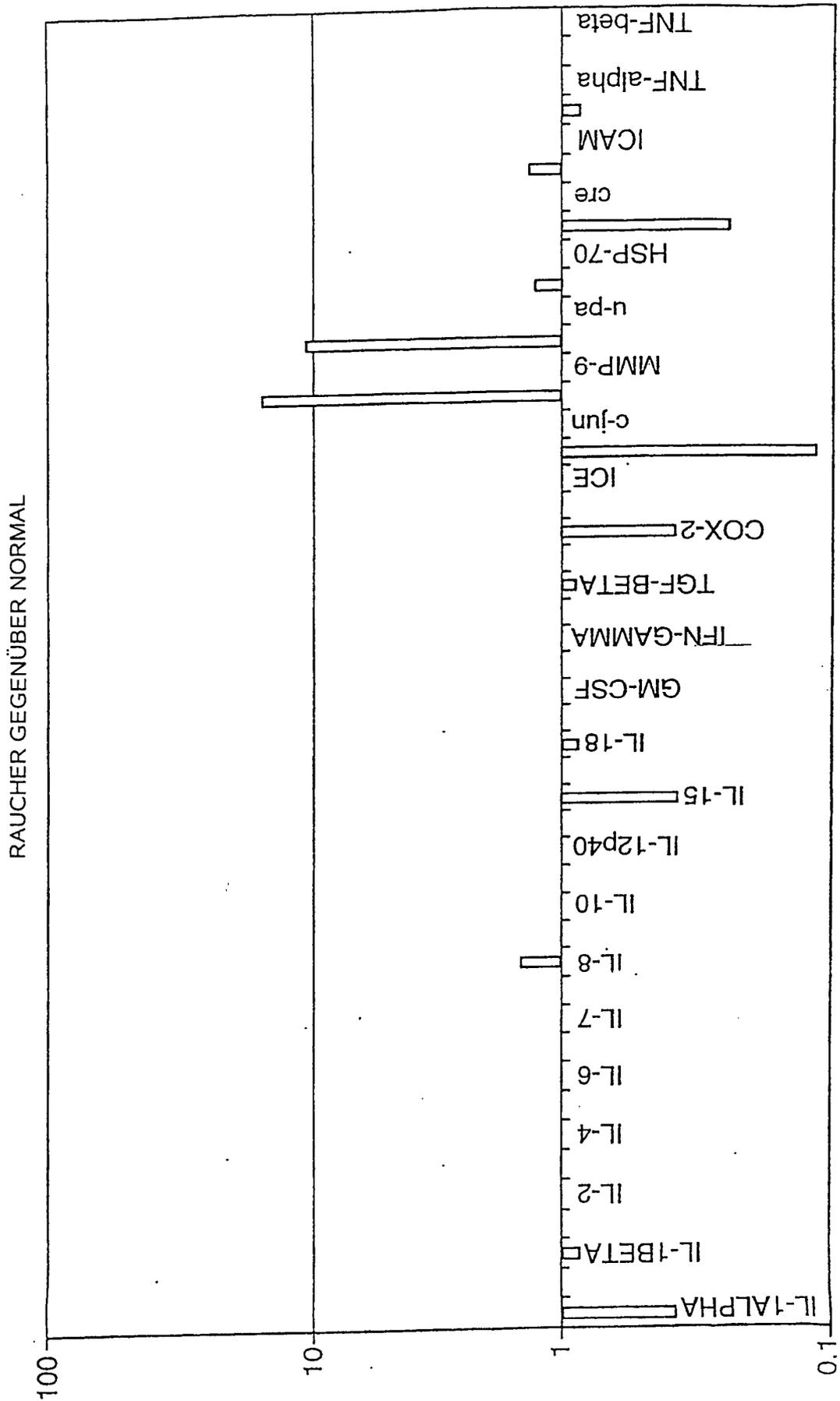


FIG. 19a

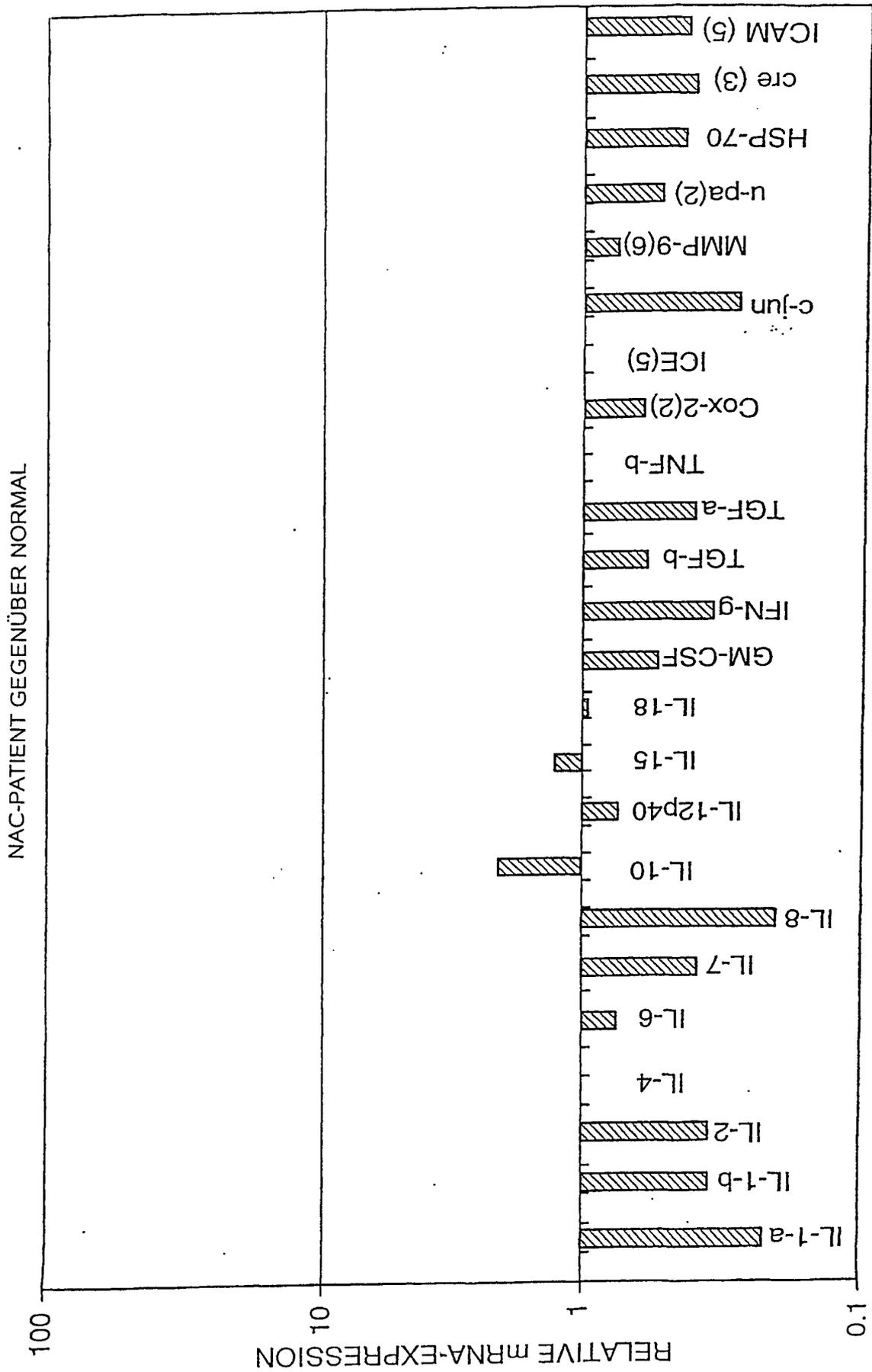


FIG. 19b

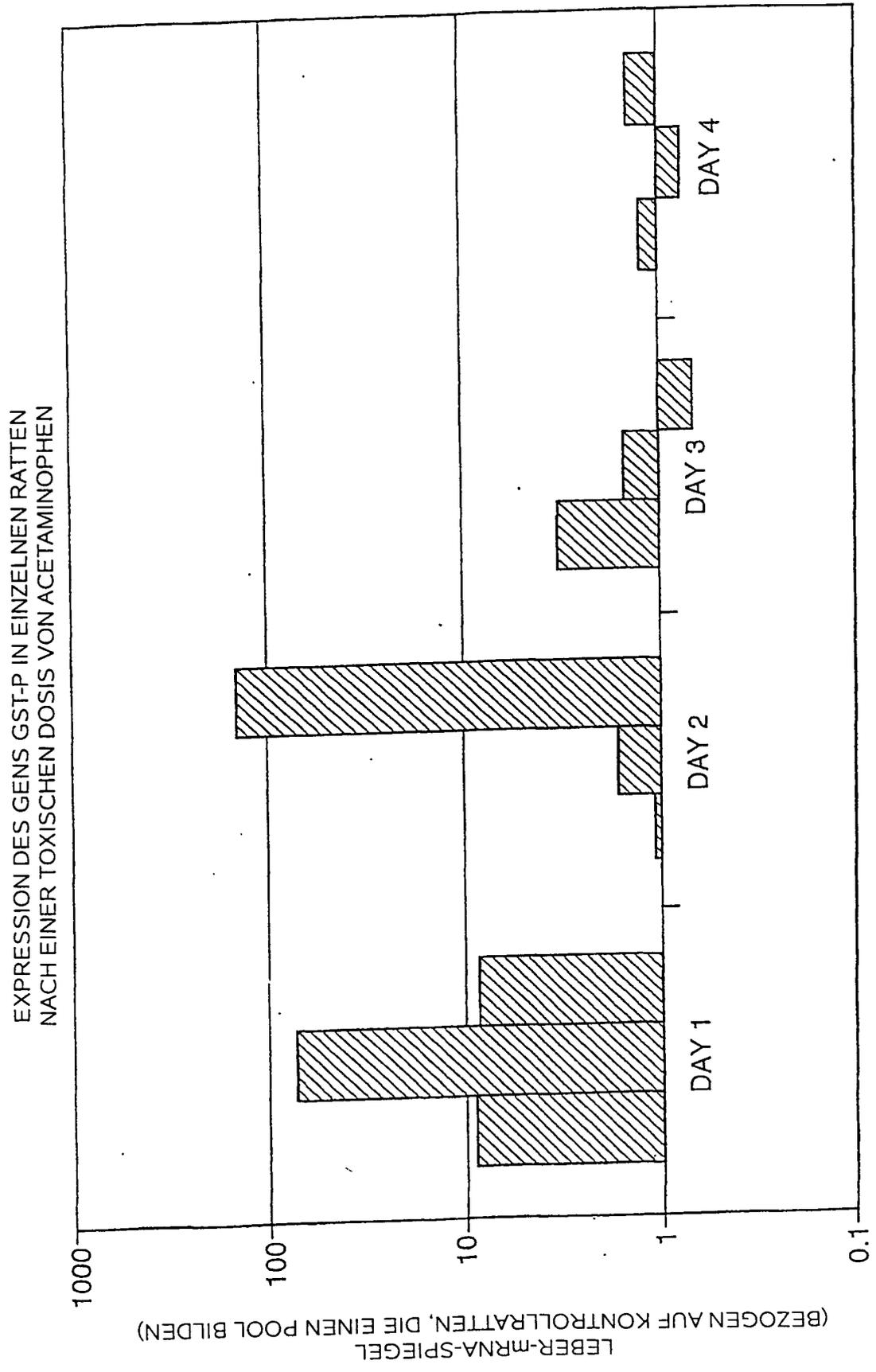


FIG. 20

VERGLEICHENDE PFLANZENPROFILIERUNG ZEIGT UNTERSCHIEDE
 ZWISCHEN ENTZÜNDUNGSHEMMENDEN PFLANZEN
 WIE ECHINACEA, ARNICA UND SIBIRISCHEM GINSENG

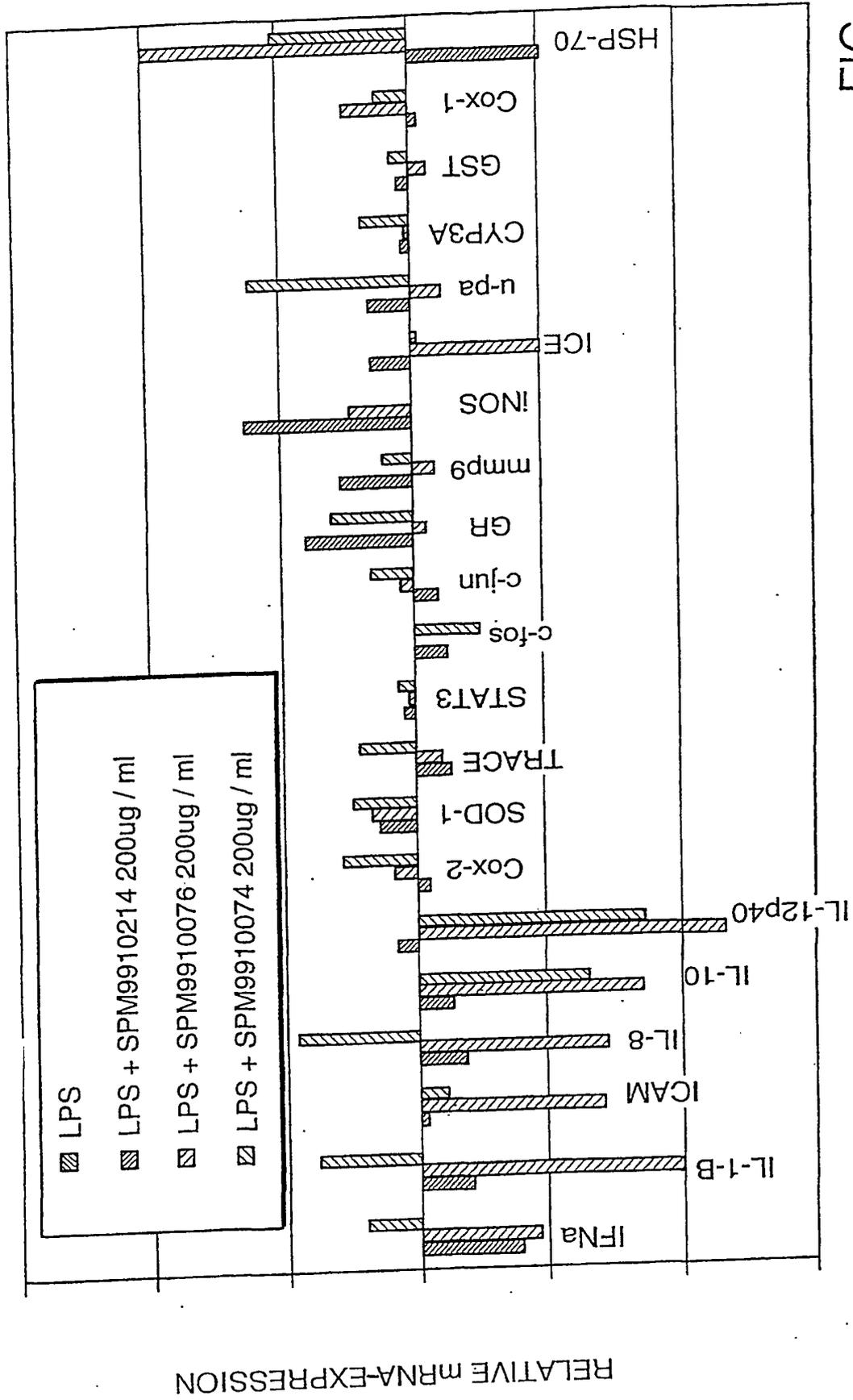


FIG. 21

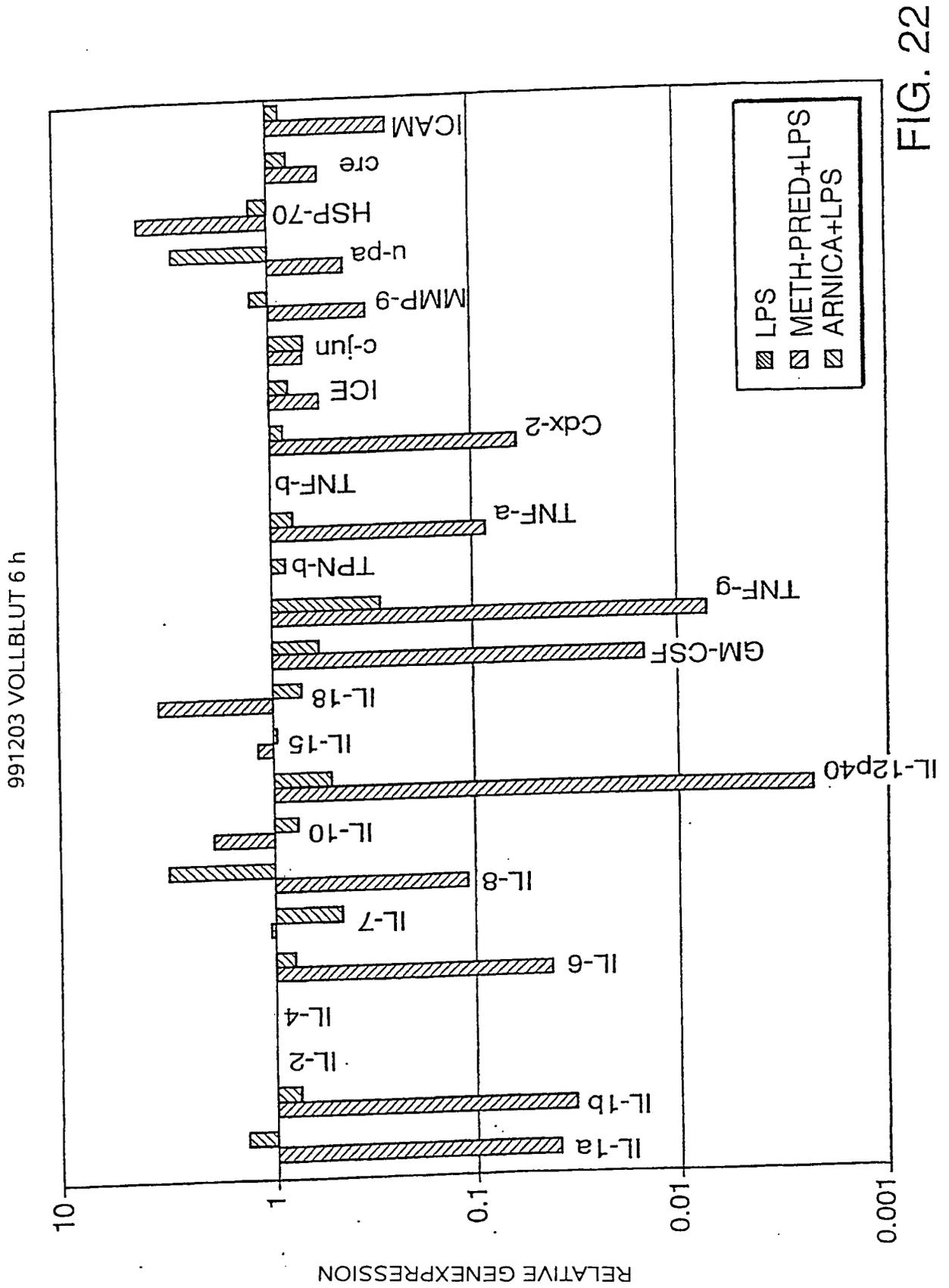


FIG. 22

PRÄZISIONSPROFIE KÖNNEN MIT EINER DOSISANTWORT
FÜR EINE GEBENE PFLANZE KORRELIEREN

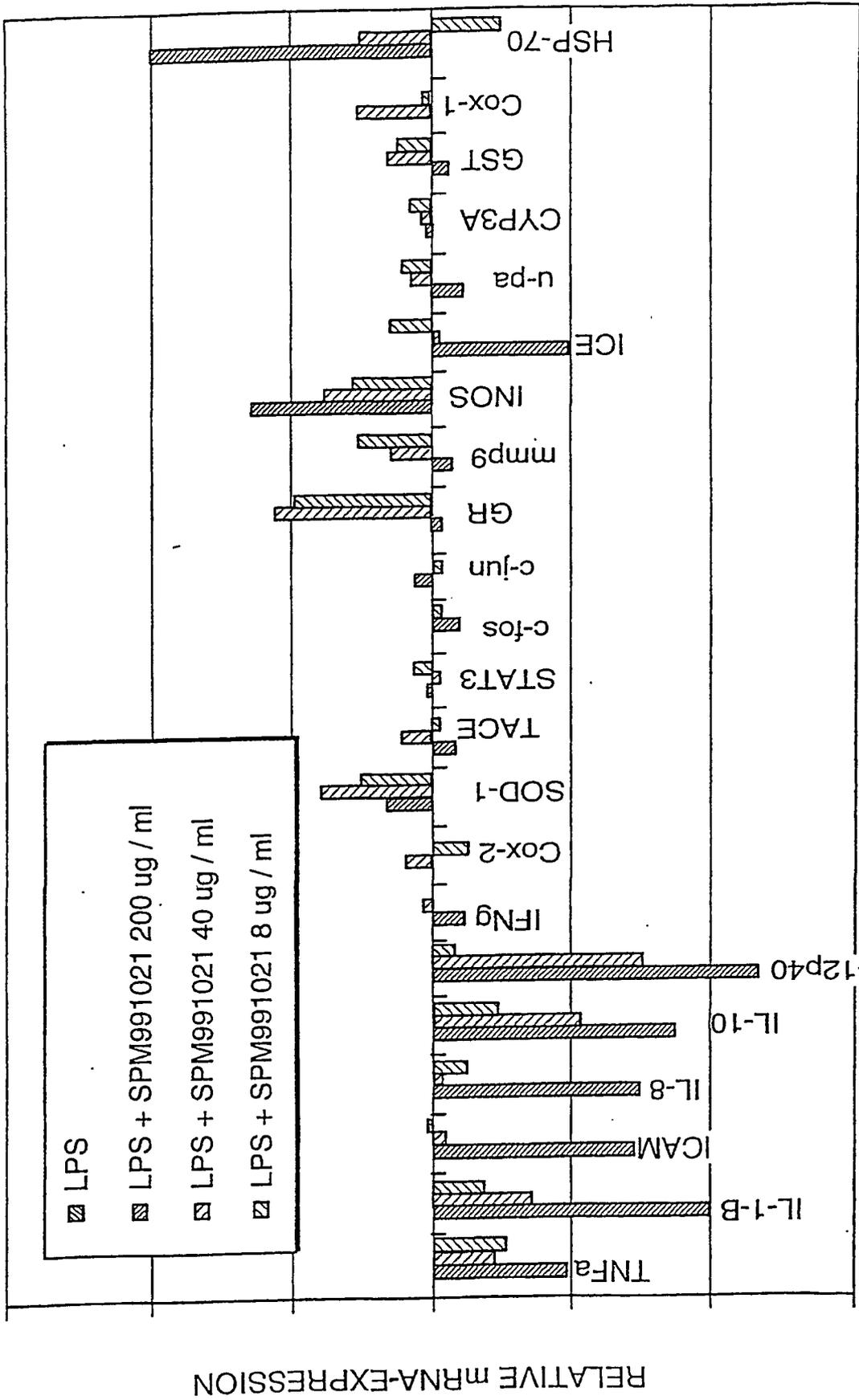


FIG. 23

PRÄZISIONSPROFILE OFFENBAREN EINE KONTAMINIERUNG
 MIT ENDOTOXIN BEI UNTERSCHIEDLICHEN HANDELSMARKEN,
 WIE OFFENBART IN SPM010 UND SPM016

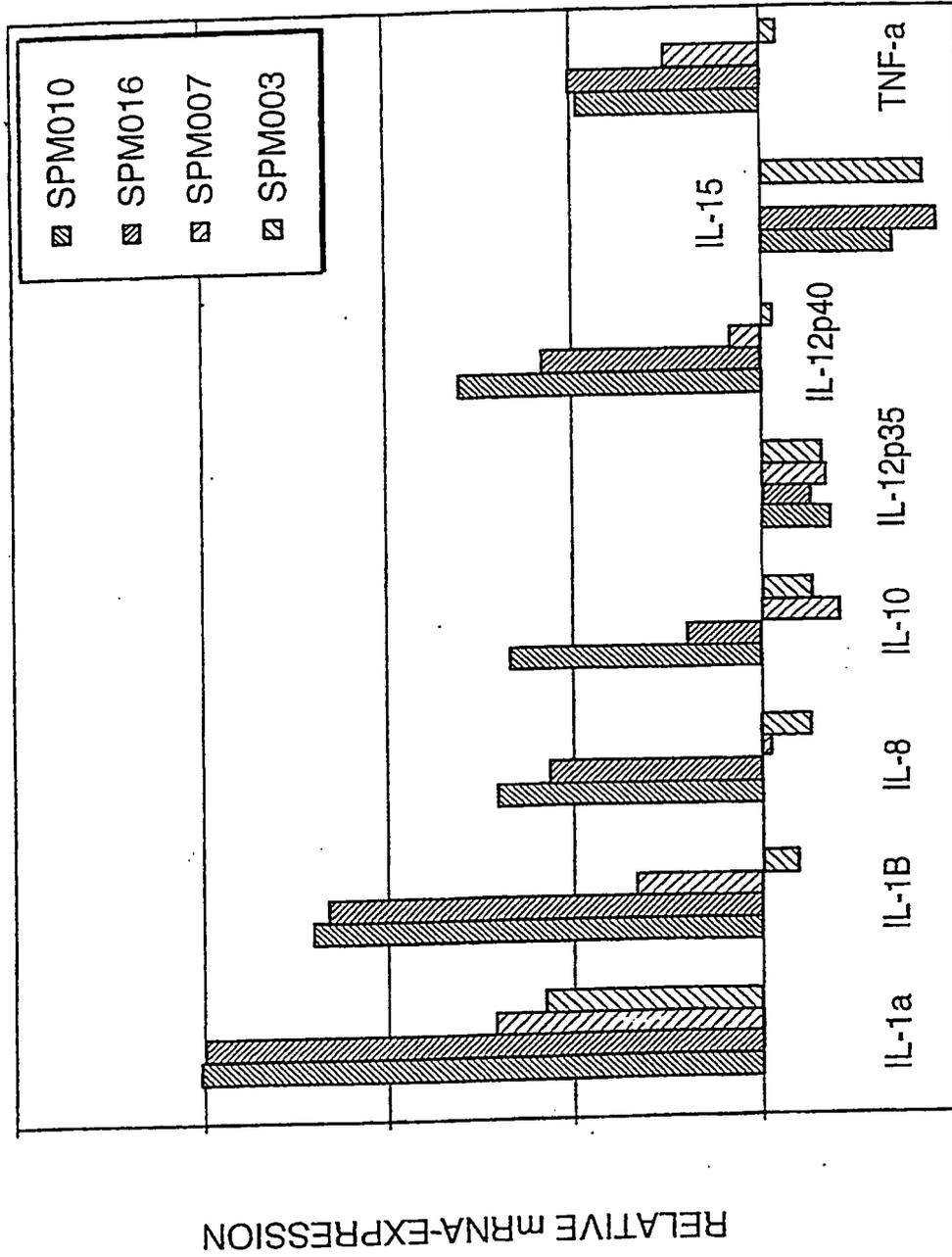


FIG. 24

HOCH DOSIERTER VERGLEICH DER BEHANDLUNG VON NICHT-STIMULIER-
TEN THP-1-ZELLEN MIT DREI PFLANZENPRÄPARATEN
ZEIGT EINE SIGNIFIKANTE VARIATION IN DER WIRKSAMKEIT

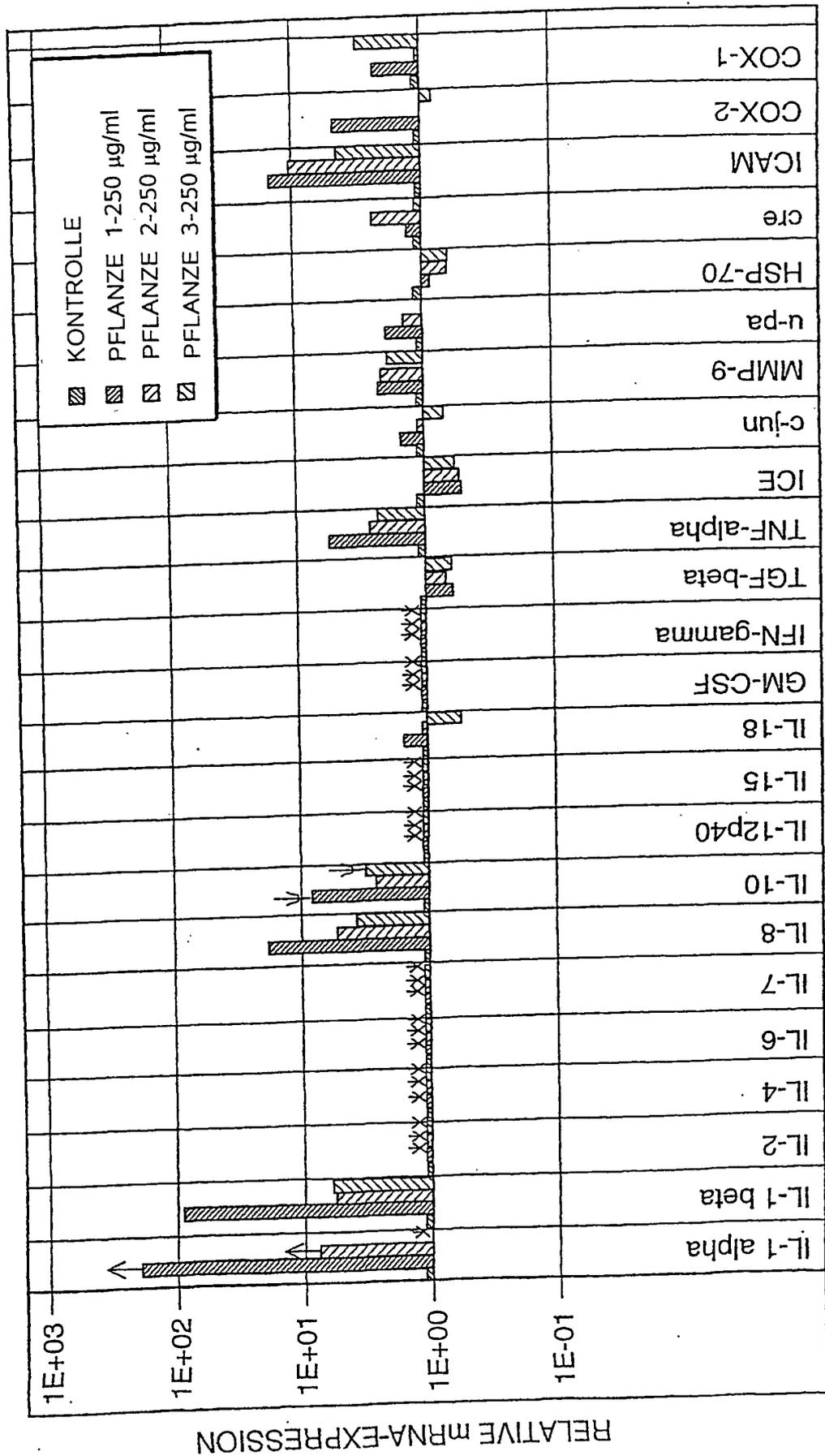


FIG. 25a

BEHANDLUNG NICHT-STIMULIERTER THP-1-ZELLEN MIT EINER EINZIGEN
PFLANZE ZEIGT EINE GENAUE DOSISANTWORT
BEI EINEM UNTERSATZ VON GENEN

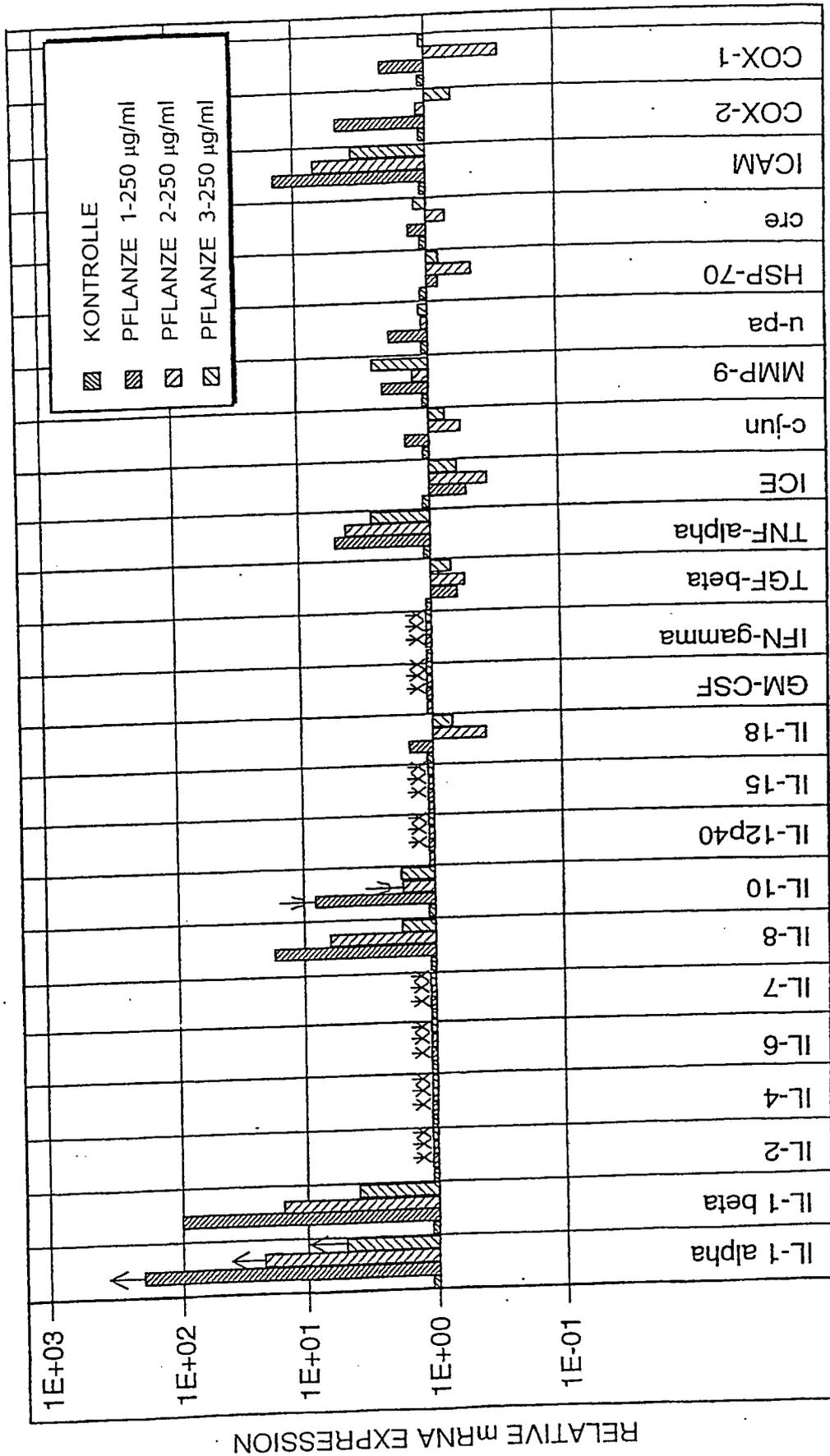


FIG. 25b

PRÄZISIONSPROFILE ERLAUBEN EINEN VERGLEICH KOMMERZIELLER ECHINACEAS (E1-E4)

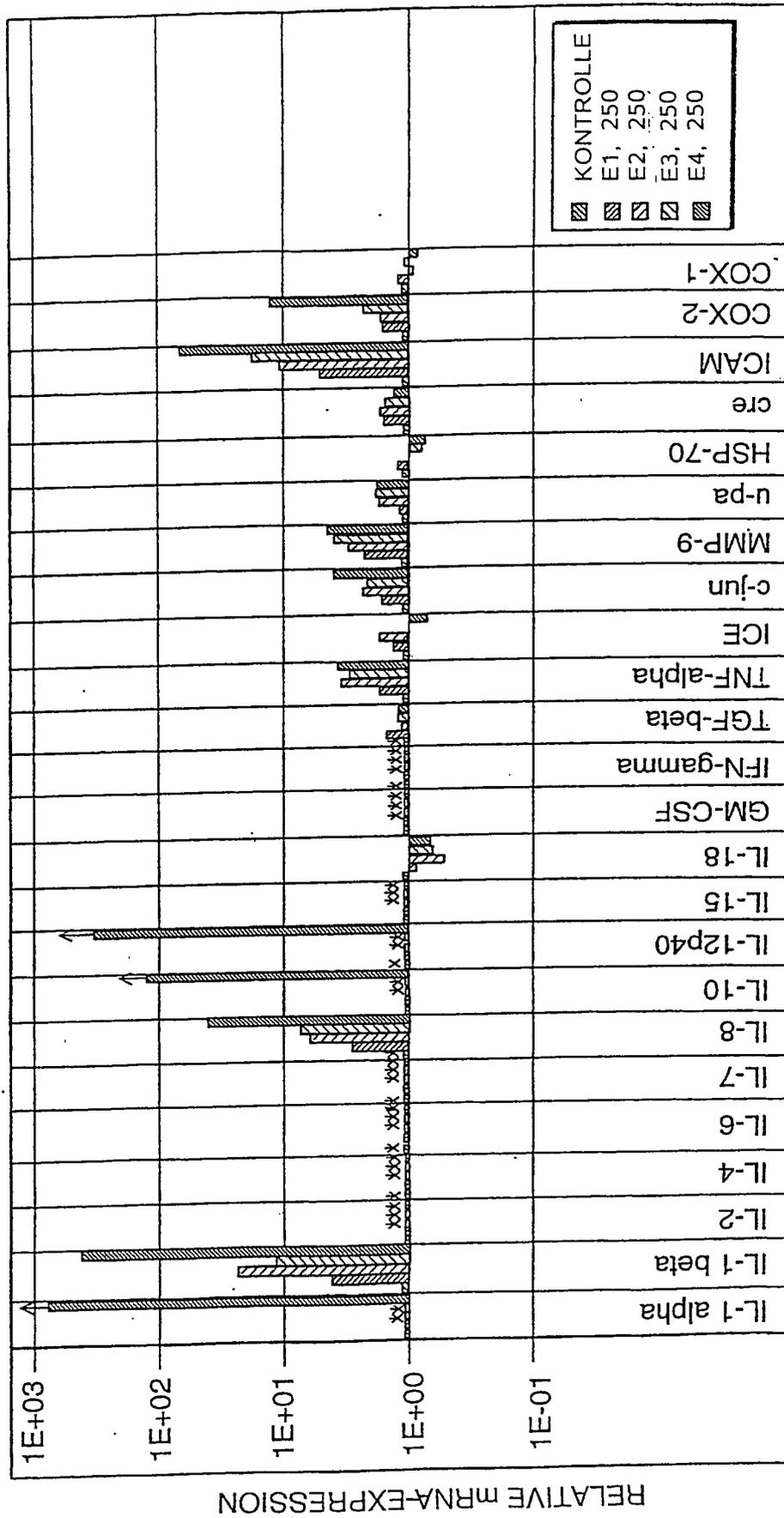


FIG. 25C