



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 36 536 T2** 2008.06.19

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 147 421 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 36 536.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CA00/00060**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 901 009.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/043789**

(86) PCT-Anmeldetag: **24.01.2000**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **27.07.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.10.2001**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **26.09.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.06.2008**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **G01N 33/574** (2006.01)  
*G01N 33/68* (2006.01)

(30) Unionspriorität:  
**117031 P 25.01.1999 US**

(73) Patentinhaber:  
**Siemens Medical Solutions Diagnostics,  
Tarrytown, N.Y., US**

(74) Vertreter:  
**Maier, D., Dipl.-Ing. Univ., Pat.-Anw., 85221 Dachau**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:  
**GAGNE, Danièle, Montreal, Quebec H1Y 2K7, CA;  
GOSSELIN, Diane, Pointe Calumet, Quebec J0N  
1G2, CA; HUGO, Patrice, Sainte Dorothee/Laval,  
Quebec H7X 3T3, CA; MIRON, Pierre, Laval,  
Quebec H7L 4W7, CA**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR DIAGNOSE VON ENDOMETRIOSE**

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****HINTERGRUND DER ERFINDUNG****(a) Gebiet der Erfindung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose von Endometriose unter Verwendung von Blut- und endometrialen Leukozytenmarkern.

**(b) Beschreibung des Standes der Technik**

**[0002]** Endometriose ist eine der häufigsten gynäkologischen Erkrankungen, die bis zu 15 % der Frauen im fortpflanzungsfähigen Alter betrifft. Sie ist eng assoziiert mit schweren Beckenschmerzen, Dysmenorrhoe, Dyspareunie, Unfruchtbarkeit und mehreren anderen Symptomen, wie z.B. intraperitonealer Blutung, Rückenschmerzen, Verstopfung und/oder Diarrhoe. Sie ist eine große Bedrohung für die physische, psychologische und soziale Integrität der Patientinnen.

**[0003]** Endometriose ist durch die Implantation und das Wachstum von endometrialen Zellen (welche normalerweise die Auskleidung des Uterus bilden) an extra-uterinen Orten, wie z.B. der Peritonealhöhle, gekennzeichnet. Obgleich die Ätiologie und Pathogenese der Endometriose in der Hauptsache unklar bleibt, ist die Theorie der retrograden Menstruation die am weitestgehenden akzeptierte zum Erklären des Vorhandenseins ektopischer endometrialer Zellen in der Peritonealhöhle. Jedoch tritt dieses Phänomen bei den meisten Frauen auf, und es müssen folglich mehrere andere Faktoren beteiligt sein, um die Implantation von endometrialen Zellen und die nachfolgende Entwicklung von endometriotischen Läsionen zu erklären. Im Allgemeinen wird angenommen, dass die Initiierung von Endometriose eine komplexe Kaskade von Ereignissen, erfordernd mehrere essentielle Merkmale, impliziert. Retrograd ausgestreute endometriale Zellen müssen lebensfähig bleiben, fähig sein zum Adhären an das Mesothel und zur Proliferation. Es wird auch angenommen, dass eine lokale Degradation der extrazellulären Matrix, sowie eine extensive Vaskularisierung eine wesentliche Rolle bei der Förderung der Invasion der Peritonealhöhle durch endometriale Zellen spielen. Ferner müssen, sobald sie implantiert sind, ektopische endometriale Zellen die Fähigkeit aufweisen, der zytolytischen Wirkung des Immunsystems entgegen zu wirken. Dies wird tatsächlich unterstützt durch die Beobachtung mehrerer immunologischer Abnormalitäten bei Patientinnen mit Endometriose.

**[0004]** Gegenwärtig ist die direkte Visualisierung der endometriotischen Läsionen unter chirurgischen Vorgehensweisen (Laparoskopie oder Laparotomie) der Goldstandard ("golden standard") und die einzige zuverlässige Methode, die zum Diagnostizieren von Endometriose verfügbar ist. Jedoch ist diese Methode hochgradig invasiv (d.h. Operation unter Vollnarkose), kostenaufwändig (d.h. direkte Kosten und indirekte Kosten aufgrund der Konvaleszenz) und erfordert einen gut ausgebildeten Chirurgen, der dazu fähig ist, endometriotische Läsionen mit einer Vielzahl von Erscheinungsbildern zu identifizieren. Der Läsionstyp, ihre Größe und ihre Lokalisierung wird das Stadium der Krankheit (Stadium I minimal, Stadium II gering, Stadium III mäßig, Stadium IV schwer) festlegen. Jedoch gibt es noch keinen eindeutigen Konsens darüber, wie diese Parameter mit dem Stadium der Krankheit und der Prognose von Endometriose korrelieren. Weiterhin kann frühe oder minimale Endometriose (die mit Mikroläsionen zusammenhängen kann) kaum durch chirurgische Verfahren diagnostiziert werden, da es unwahrscheinlich ist, dass sie durch direkte Visualisierung detektiert werden. In der Tat haben mehrere Studien mikroskopische endometriotische Läsionen beschrieben, die nicht mittels Laparoskopie detektiert wurden. Da die Diagnose von Endometriose durch chirurgische Verfahrensweisen schwierig, kostenintensiv und invasiv ist, neigen, in einigen Fällen, etliche Ärzte und Patienten dazu, dies zu vermeiden oder wenigstens beträchtlich hinauszuzögern. Folglich kann die Zeitdauer zwischen dem Beginn der Symptome und der Diagnose bis zu 8 bis 12 Jahre betragen. Die Möglichkeit, Endometriose in einem frühen Stadium zu diagnostizieren, würde die Wirksamkeit der Behandlungen sicherlich verbessern und die Zahl der Jahre, während derer Patientinnen akute oder chronische Schmerzen ertragen, dramatisch verringern.

**[0005]** Bildgebungsverfahren, wie z.B. transvaginale Ultraschall- und magnetische Resonanzbildgebung sind für die Diagnose von Endometriose entwickelt worden. Jedoch können diese Techniken nur für die Detektion von großen (> 1 cm Durchmesser) Endometriumläsionen, die nur bei einem sehr kleinen Anteil von Patientinnen mit Endometriose detektiert werden, verlässlich sein. Darüber hinaus haben die hohen Kosten dieser Techniken ihre Verwendung zur Diagnose von Endometriose beschränkt.

**[0006]** Serumproteine, wie z.B. CA-125 und Placentaprotein-14, sind als diagnostische Marker für Endometriose vorgeschlagen worden. Erhöhte Level bzw. Spiegel von CA-125 sind in Serum, Menstruationsausfluss

und Peritonealflüssigkeit von Patientinnen mit Endometriose beobachtet worden. Jedoch sind diese Marker, wenn sie alleine verwendet werden, von sehr beschränktem Wert für einen diagnostischen Test. Tatsächlich sind diese Marker nicht für Screening- oder Diagnosezwecke geeignet, da sie eine schlechte Sensitivität bereitstellen. Ferner variieren die Level von CA-125 und Placentaprotein-14 in Abhängigkeit von mehreren Faktoren, wie z.B. dem Assay, dem Stadium der Erkrankung und dem Menstruationszyklus. Schließlich sind diese Marker dafür bekannt, durch andere Zustände bzw. Bedingungen als Endometriose moduliert zu werden.

**[0007]** Hohe Konzentrationen von Antikörpern gegen endometriale Antigene wurden im Serum von Patientinnen mit Endometriose gefunden und wurden folglich als Marker für einen diagnostischen Test vorgeschlagen (Veröffentlichungen der Internationalen Patentanmeldungen WO 94/28021 und WO 92/18535). Jedoch bleiben die Level an Spezifität und Sensibilität bei diesen Tests sehr niedrig. In den meisten Fällen sind die durch diese Antikörper erkannten Antigene schlecht charakterisiert oder noch vollständig unbekannt.

**[0008]** Im US-Patent Nr. 5,478,725 werden niedrige Level der  $\alpha\beta 3$ -Integrin-Expression in endometrialen Proben während der sekretorischen Phase des Menstruationszyklus als ein Prädiktor für Endometriose in unfruchtbaren, aber nicht in fruchtbaren Patientinnen mit Endometriose beschrieben. Diese Beobachtung war nur mit einer geringeren bzw. sanfteren Form von Endometriose (Stadien I und II) assoziiert und ist folglich nicht zum Detektieren fortgeschrittener Stadien der Krankheit verwendbar. Darüber hinaus ergab dieses Verfahren eine Spezifität von 91 %, aber eine sehr niedrige Sensitivität (38 %).

**[0009]** Unter Berücksichtigung, dass eine Zahl immunologischer Abnormalitäten bei Patientinnen mit Endometriose beschrieben worden ist, ist es denkbar, dass der Anteil bzw. das Verhältnis von Leukozytenpopulationen und/oder ihr Aktivierungsstatus während des Verlaufs der Krankheit moduliert werden kann und folglich einigen diagnostischen Wert bereitstellen kann. Frühere Durchflusszytometriestudien haben gezeigt, dass einige T-Lymphozyten-Subpopulationen (CD8+, CD45+/HLADR+, CD45+/CD3+/HLADR+ oder CD3+/CD25+) in der Peritonealflüssigkeit von Subjekten mit Endometriose, im Vergleich zu normalen Kontrollen, leicht moduliert sein können (Oosterlynck D.J., et al., Am. J. Reprod. Immunol., 31: 25–31, 1994; Becker J.L., et al., Am. J. Reprod. Immunol., 34: 179–187, 1995; Wu M.Y., et al., Am. J. Reprod. Immunol. 35: 510–516, 1996). Jedoch haben diese Beobachtungen einen beschränkten Wert für die Diagnose von Endometriose, da die Sammlung von Peritonealflüssigkeit eine invasive, nicht-herkömmliche Verfahrensweise ist. Anteile von Leukozytenpopulationen sind auch im peripheren Blut und Endometrium von Patientinnen mit Endometriose studiert worden. Wu et al., (supra) haben eine bescheidene, aber signifikante Abnahme des Anteils von CD3+-T-Lymphozyten, die entweder den CD69- oder CD25-Aktivierungsmarker exprimieren, im Blut von Patientinnen mit fortgeschrittener Endometriose, aber nicht in Patientinnen mit einem geringen Stadium der Endometriose oder normalen Kontrollen beschrieben. Dieser Unterschied wurde nur in fortgeschrittenen Fällen von Endometriose beobachtet und er war zu bescheiden, um als diagnostischer Marker verwendet zu werden. Im Gegensatz dazu berichteten Oosterlynck et al., (Oosterlynck D.J., et al., Am. J. Reprod. Immunol., 31: 25–31, 1994) und Ho et al. (Ho H.N., et al., Hum. Reprod., 97: 2528–2533, 1997) keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich T-Lymphozyten-Subpopulationen beim Vergleichen von Endometriose-Subjekten mit normalen Kontrollen. Diese inkonsistenten Ergebnisse können durch die sehr geringe Zahl von Proben, die in diesen Studien untersucht wurden, erklärt werden.

**[0010]** Mehrere Studien haben untersucht, ob Leukozyten auch im eutopischen Endometrium aus Patientinnen mit Endometriose moduliert sind. Ergebnisse aus diesen Studien sind widersprüchlich, wahrscheinlich aufgrund der Tatsache, dass in den meisten Fällen die verwendeten Methoden nur semi-quantitative waren und die Zahl untersuchter Proben sehr gering war. Beispielsweise haben Ota et al. (Ota H., et al., Am. J. Reprod. Immunol., 35: 477–482, 1996) mittels Immunhistochemie beschrieben, dass die Zahl von CD3+-, CD4+- oder CD8+-T-Lymphozyten, Zellen, die Adhäsionsmoleküle (d.h. ICAM-1, LFA-1, CD2) tragen oder CD68+-Zellen, im Endometrium von Patientinnen mit Endometriose, verglichen mit unfruchtbaren Kontrollen, hochreguliert waren. Im Gegensatz dazu haben mehrere andere Studien unter Verwendung ähnlicher Techniken keinen Unterschied im Anteil von T-Lymphozyten-Teilungen beschrieben (Klentzeris L.D., et al., Eur. J. Obstet. gynecol. Reprod. Biol., 63: 41–47, 1995; Jones R.K., et al., Fertil Steril, 66: 81–89, 1996). Zusätzlich ist eine Abnahme CD3-positiver T-Zellen mittels Durchflusszytometrieanalyse, aber kein Unterschied im Anteil von stromalen CD4+-, CD8+-Leukozyten im Endometrium von Patientinnen mit Endometriose, verglichen mit fruchtbaren Kontrollen, gezeigt worden. Wenn diese Beobachtungen versuchs halber in einem diagnostischen Test verwendet werden, ergeben sie nur geringe Level der Sensibilität und Spezifität aufgrund einer signifikanten Überlappung zwischen den Gruppen.

**[0011]** Deshalb lösen die in der Literatur dargestellten Diagnoseverfahren die Probleme, die bei der Diagnose von Endometriose mittels chirurgischer Verfahrensweisen angetroffen werden, insoweit nicht. Es bleibt somit

zwingend nötig, ein weniger invasives, günstigeres und verlässlicheres Verfahren bereitzustellen, das die Detektion von Frauen, die an Endometriose leiden, so früh wie möglich ermöglichen könnte.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0012]** Ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, ein weniger invasives, günstigeres und verlässlicheres Verfahren bereitzustellen, das die Detektion von Frauen, die an Endometriose leiden, so früh wie möglich ermöglichen könnte.

**[0013]** Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeit von Endometriose in einer Probe von eutopischen uterinen endometrialen Geweben oder einer Blutprobe eines weiblichen Subjekts bereitgestellt, dadurch gekennzeichnet, dass es die Stufen:

- a) Messen, in der Probe, eines quantitativen Levels von wenigstens zwei verschiedenen selektierten Oberflächenantigenen aus Blutleukozyten und/oder eutopischen endometrialen Leukozyten, wie in Anspruch 1 definiert;
- b) Etablieren eines Grenzwertes ("cutoff value") für jeden Leukozytenmarker in der Kombination;
- c) Vergleichen des in Stufe b) für jeden Leukozytenmarker erhaltenen Anteils mit einem vorher festgelegten Grenzwert, wobei ein positives Ergebnis eine Bewertung von 1 gibt, während ein negatives Ergebnis eine Bewertung von 0 ergibt;
- d) Erhalten eines diagnostischen Werts durch Addieren der Bewertungen aller Marker der Kombination und Umwandeln in eine Prozentzahl; und
- e) Vergleichen des diagnostischen Endwerts mit einem etablierten Schwellenwert ("threshold value"), wobei eine positive Diagnose der Endometriose vorliegt, wenn der diagnostische Endwert den für die Kombination von Leukozytenmarkern etablierten Schwellenwert überschreitet, während eine negative Diagnose der Endometriose vorliegt, wenn der diagnostische Endwert niedriger als der für die Kombination von Leukozytenmarker etablierte Schwellenwert ist, umfasst.

**[0014]** Ferner wird gemäß der vorliegenden Erfindung auch ein Verfahren zur Feststellung von Endometriose in einer Probe von eutopischen uterinen endometrialen Geweben oder einer Blutprobe eines weiblichen Subjekts bereitgestellt, umfassend:

- a) Messen, in der Probe, eines quantitativen Levels von wenigstens zwei verschiedenen selektierten Oberflächenantigenen aus Blutleukozyten und/oder eutopischen endometrialen Leukozyten, wie in Anspruch 3 definiert;
- b) Etablieren des Vorhersagemodells für Endometriose durch Einschließen jedes Markers der Kombination in eine logistische Regressionsgleichung, wie in Anspruch 3 definiert;
- c) Vergleichen der Wahrscheinlichkeit dafür, Endometriose zu haben, mit einem Schwellenwert, wobei eine positive Diagnose der Endometriose vorliegt, wenn der Wahrscheinlichkeitswert für das Haben von Endometriose den für die Kombination von Markern etablierten Schwellenwert überschreitet, während eine negative Diagnose der Endometriose vorliegt, wenn der Wahrscheinlichkeitswert für das Haben von Endometriose niedriger ist, als der für die Kombination von Markern etablierte Schwellenwert.

**[0015]** Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung soll das folgende Symbol "/" ein Verhältnis zwischen einem Ausdruck vor dem Symbol und einem weiteren Ausdruck nach dem Symbol bedeuten.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUR

**[0016]** [Fig. 1](#) erläutert einen Vorhersagealgorithmus für die Diagnose von Endometriose.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0017]** Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein verlässlicher diagnostischer Test für Endometriose bereitgestellt, der weniger invasiv und weniger kostenaufwändig ist als die gegenwärtige chirurgische Verfahrensweise, die als der "Goldstandard" akzeptiert ist. Eine ausgedehnte Studie wurde mittels Durchflusszytometrieanalyse unternommen, in der der Anteil von mehreren Blut- und endometrialen Leukozytenteilmengen in Patientinnen mit Endometriose und normalen Kontrollen verglichen wurde.

**[0018]** Die vorliegende Erfindung identifiziert eine Reihe von Leukozytenteilmengen, die als Marker in einem diagnostischen Test für Endometriose verwendet werden können. Diese Leukozytenteilmengen sind gemäß der Expression von Zelloberflächenantigenen definiert. Mehrere Zelloberflächenantigene können die gleiche Population von Zellen definieren und sie sind folglich in die vorliegende Erfindung eingeschlossen.

**[0019]** Beliebige andere Antikörper oder Moleküle, die das gleiche Antigen oder ein(e) unterschiedliche(s) Epitop, Isoform, Untereinheit, Kette, Glycosylierungs- oder Phosphorylierungsform oder eine allelische Variante des gleichen Antigens, ein Mitglied des gleichen Komplexes oder ein Antigen bei der gleichen Zellverteilung erkennen, sind auch in die vorliegende Erfindung eingeschlossen.

**[0020]** Ferner werden gemäß der vorliegenden Erfindung Beispiele bereitgestellt, die zeigen, wie wenigstens zwei verschiedene Oberflächenantigene aus Blut- und/oder endometrialen Leukozyten in Kombinationen in einem diagnostischen Test für Endometriose verwendet werden können (Tabellen 1 und 2).

## TABELLE

Level der Sensibilität und Spezifität, bereitgestellt durch mehrere Beispiele von endometrialen und/oder Blutmarkerkombinationen, verwendet als Diagnoseverfahren für Endometriose

Markerkombination	Schwellenwert <sup>1</sup>	Spezifität	Sensibilität
Endometriale Leukozytenmarker			
1.			
CD4+ (<17%) <sup>2</sup>	>67%	90%	67%
CD8+CD69– (<21%)			
CD13+CD45RO– (<17,5%)			
2.			
CD4+ (<15,5%)	>60%	89%	65%
CD8+CD69– (<21%)			
CD56+CD122– (>19%)			
CD3+CD45RA– (<35%)			
CD13+CD45RO– (<17,5%)			
3.			
CD4+ (<17%)	>67%	88%	65%
CD8+CD69– (<21%)			
CD13–CD122+ (>28%)			
CD13+CD45RO– (<17,5%)			
4.			
CD4+ (<17%)	>67%	89%	63%
CD8+CD69– (<21%)			
CD14+CD13–CD16b– (>14,5%)			
5.			
CD3+CD16– (<40%)	>55%	84%	62%
CD13+CD45RO– (<13,5%)			
CD3+ (<40%)			
CD8+ (<20%)			
CD3+CD69+ (<15%)			
6.			
CD3+ (<40%)	>65%	84%	63%
CD3+CD8+ (<16%)			
CD13+CD45RO– (<17,5%) CD3–CD20– (>56%)			
7.			
CD3+CD8+ (<16%)	>65%	81%	65%
CD13+CD45RO– (<17,5%)			
CD3+CD5+ (<37%)			
CD3+CD122– (<42,5%)			
CD3–CD20– (>56%)			
CD3+CD45RO– (<30%)			

Markerkombination	Schwellenwert 1 <sup>1</sup>	Spezifität	Sensibilität
8.			
CD3+CD8+ (<18%)	>60%	82%	64%
CD13+CD45RO- (<17,5%)			
CD3+CD5+ (<37%)			
CD3+CD122- (<42,5%)			
9.			
CD3+CD20-CD5- (>7,7%)	>60%	81%	66%
CD4+CD13- (<20,5%)			
CD56-CD122- (<47%)			
10.			
CD3+CD8+ (<16%)	>60%	80%	65%
CD13+CD45RO- (<17,5%)			
CD4+CD45RA- (<16%)			
CD3+CD45RO- (<30%)			
11.			
CD3+ (<40%)	>35%	79%	67%
CD8+CD69- (<18%)			
CD3-CD4-CD45RO+ (>56%)			
Verhältnis CD13+/CD3+ (>0,675%)			
CD13+CD45RO- (<21%)			
12.			
CD3+CD8+ (<16%)	>70%	81%	61%
CD13+CD45RO- (<17,5%)			
CD3-CD5- (>54%)			
CD20-CD5+ (<44%)			
13.			
CD8+ (<20%) <sup>2</sup>	>51%	81%	60%
CD5+ (<37%)			
CD3-CD20- (>58%)			
CD3-HLADR- (>54,5%)			
14.			
CD3+CD8+ (<16%)	>60%	81%	60%
CD13+CD45RO- (<17,5%)			
CD5+ (<40%)			
15.			
CD4+ (<17%)	>50%	76%	71%
CD13-CD122+ (>28%)			
CD8+CD69- (<19,5%)			
CD3+CD45RA- (<37%)			

Markerkombination	Schwellenwert <sup>1</sup>	Spezifität	Sensibilität
16.			
CD4+ (<15,5%)	>35%	71%	78%
CD8+CD69- (<21%)			
CD13-CD122+ (>28%)			
CD3+CD45RA- (<35%)			
CD13+CD45RO- (<17,5%)			
17.			
CD4+ (<15,5%)	>40%	70%	78%
CD8+CD69- (<21%)			
CD56-CD122- (<47%)			
CD3+CD45RA- (<35%)			
CD13+CD45RO- (<17,5%)			
18.			
CD3+ (<40%)	>35%	72%	76%
CD4+ (<17%)			
CD3+CD8+ (<16%)			
CD13+CD45RO- (<21%)			
CD3+CD5+ (<37%)			
19.			
CD3+ (<40%)	>40%	74%	74%
CD4+ (<17%)			
CD3+CD8+ (<16%)			
CD13+CD45RO- (<21%)			
20.			
CD3+ (<40%)	>40%	75%	73%
CD3+CD8+ (<16%)			
CD13+CD45RO- (<21%)			
21.			
CD3+ (<40%)	>25%	71%	69%
CD5+ (<40%)			
CD3+CD5+ (<37%)			
CD69+ (<33%)			
CD4-CD69+ (<35%)			
22.			
CD3+ (<40%)	>30%	68%	83%
CD3+CD8+ (<13,5%)			
CD13+CD45RO- (<17,5%)			
23.			
CD3+ (<40%)	>30%	61%	86%
CD3+CD8+ (<16%)			
CD13+CD45RO- (<17,5%)			



Markerkombination	Schwellenwert <sup>1</sup>	Spezifität	Sensibilität
24.			
CD3+ (<40%)	>22%	62%	80%
CD3+CD8+ (<16%)			
CD13+CD45RO- (<17,5%)			
CD3-CD20- (>58%)			
CD56-CD16- (<46%)			
25.			
CD3+CD16- (<47,5%)	>45%	66%	79%
CD3-CD4-CD45RO+ (>31,5%)			
CD3+ (<40%)			
CD8+ (<20%)			
CD3+CD69+ (<15%)			
CD13+CD45RO- (<17,5%)			
26.			
CD3+ (<40%)	>40%	66%	75%
CD3-CD45RO+ (>15%)			
Verhältnis CD13+/CD3+ (>0,675%)			
CD3+CD8+ (<16%)			
CD8+CD69- (<21%)			
27.			
CD3+CD20-CD5- (>7,7%)	>45%	61%	80%
CD4+CD13- (<20,5%)			
CD56-CD122- (<47%)			
CD4+CD45RO- (<16%)			
28.			
CD3+ (<40%)	>20%	61%	86%
CD3+CD8+ (<16%)			
CD13+CD45RO- (<17,5%)			
CD3-CD20- (>58%)			
29.			
CD13+CD45RO- (<17,5%)	>70%	90%	54%
CD4+CD45RA- (<16%)			
CD3+CD122- (42,5%)			
CD8+CD69- (<21%)			
30.			
CD3+CD8+ (<16%)	>70%	84%	60%
CD13+CD45RO- (<17,5%)			
CD4+CD45RA- (<16%)			
CD3+CD45RO- (<30%)			
CD3-CD5- (>54%)			

Markerkombination	Schwellenwert <sup>1</sup>	Spezifität	Sensibilität
Blutleukozytenmarker			
31.			
CD3–CD5+ (>14,5%)	>55%	66%	60%
CD3–CD45RA– (>14,5%)			
CD3–CD44+ (>13%)			
CD13+ (>17,5%)			
CD3–CD57–CD44– (<41,3%)			
32.			
CD3–CD45RA– (>17%)	>22%	61%	64%
CD20–CD44+ (>17%)			
CD20–HLADR+ (>20%)			
CD3–CD4–CD44+ (>40,5%)			
CD36–HLADR+ (<5,6%)			
33.			
CD3–CD45RA– (>14,5%)	>40%	62%	64%
CD3–CD45RO+ (>19%)			
CD20–HLADR+ (>14,5%)			
Blut- (in Kursivschrift) und endometriale Leukozyten- marker			
34.			
CD57+ (>10%)	>50%	76%	72%
CD14+ (>10%)			
CD3–CD69+ (>17,5%)			
CD3+ (<40%)			
CD4+ (<15,5%)			
CD3+CD8+HLADR– (<35%)			
35.			
CD3–CD69+ (>17,5%)	>33%	70%	79%
CD3+ (<40%)			
CD4+ (<15,5%)			
CD3+CD8+HLADR– (<35%)			

Markerkombination	Schwellenwert <sup>1</sup>	Spezifität	Sensibilität
36.			
CD4–CD36+ (>14,4%)	>43%	70%	74%
CD3–CD69+ (>17,5%)			
CD8+ (<20%)			
CD13+ (>29%)			
CD3+ (<40%)			
CD16+ (>27%)			
CD69+ (<33%)			
CD5+ (<40%)			
37.			
CD3–CD45RA– (>14,5%)	>50%	73%	71%
CD3–CD45RO+ (>19%)			
CD20–HLADR+ (>14,5%)			
CD14+CD44+ (>15%)			
CD8+ (<20%)			
CD5+ (<37%)			
CD3–CD20– (>58%)			
CD3–HLADR– (>54,5%)			

<sup>1</sup> Wert, über dem eine Diagnose der Endometriose vorliegt.

<sup>2</sup> Grenzpunkt ("cutoff point"), etabliert für jeden einzelnen Marker.

[0021]

TABELLE 2

Beispiele logistischer Regressionsmodelle, bereitgestellt durch endometriale oder Blutleukozytenmarker, zur Identifizierung von Patientinnen mit Endometriose

Markerkombination	B-Wert	Schwellenwert <sup>1</sup>	Spezifität	Sensibilität	Zahl unter suchter Proben
Endometriale Leukozytenmarker					
Kombination Nr. 1					
1. CD3+ (<40%) <sup>2</sup>	–7,49747	>0,55	83%	79%	41
2. CD3–CD5– (>60%)	7,2921				
3. D13+CD45RO– (<17,5%)	–0,1410				
4. CD3–CD20– (>58%)	9,5142				
Wechselwirkung von 1 bis 4 Konstante = 2,0516					

Markerkombination	B-Wert	Schwellenwert <sup>1</sup>	Spezifität	Sensibilität	Zahl unter suchter Proben
Kombination Nr. 2					
1. CD3+ (<40%) <sup>2</sup>	-6,7753	> 0,55	74%	73%	67
2. CD3-CD5- (>60%)	5,8240				
3. D13+CD45RO-	-1,9298				
(<17,5%)	-0,0262				
Wechselwirkung von 1 bis 4 Konstante = 2,7910	2,8385				
Kombination Nr. 3					
1. CD3+CD8+ (<16%)	-0,1308	> 0,50	84%	72%	51
2. CD13+CD45RO-	-2,6688				
(<17,5%)	-1,1778				
3. CD3+CD5+ (<37%)					
Konstante = 3,1417					
Kombination Nr. 4					
1. CD3+ (<40%)	-1,6965	> 0,50	78%	75%	81
2. Länge der Menstruation	-1,8160				
(> 7 Tage)	-1,9556				
3. CD13+CD20- (<21%)	10,3064				
4. Beckenschmerzen <sup>3</sup>					
Konstante = 3,1984					
Blutleukozytenmarker					
Kombination Nr. 1					
1. CD14+CD44+ (>15%)	0,9298	> 0,55	80%	70%	140
2. CD57+ (>10%)	0,7423				
3. CD3-CD45RA- (>12%)	-0,8147				
4. CD14+ (>10%)	0,8629				
Kombination Nr. 2					
1. CD14+ (>10%)	10,5891	> 0,50	65%	71%	125
2. CD57+ (>10%)	0,7326				
3. CD3+CD69+ (>17,5%)	0,6899				
4. CD3+HLADR+ (<4%)	1,2004				
5. CD3-CD45RA- (>12%)	-0,1137				
Konstante = -1,2062					

Markerkombination	B-Wert	Schwellenwert <sup>1</sup>	Spezifität	Sensibilität	Zahl untersuchter Proben
Kombination Nr. 3					
1. CD14+ (>10%)	1,1994	> 0,55	76%	75%	142
2. CD57+ (>10%)	0,8080				
3. CD3+HLADR- (<4%)	1,3593				
4. CD3-CD45RA- (>12%)	-0,63				
5. Beckenschmerzen	2,1506				
6. Länge der Menstruation (> 7 Tg.)	0,7489				
Konstante = -1,771					
Kombination Nr. 4					
1. CD14+ (>10%)	0,9729	> 0,50	71%	78%	141
2. CD57+ (>10%)	0,4489				
3. CD3+CD69+	0,8129				
(>17,5%)	1,3368				
4. CD3+HLADR- (<4%)	-0,8805				
5. CD3-CD45RA- (>12%)	2,1574				
6. Beckenschmerzen	1,5164				
7. Alter (> 40)					
Konstante = -1,7686					

<sup>1</sup> Wert, über dem eine Diagnose der Endometriose vorliegt.

<sup>2</sup> Grenzpunkt, etabliert für jeden einzelnen Marker.

<sup>3</sup> Vorliegen von Schmerz zu jeder beliebigen Zeit, außer der Menstruation und dem Geschlechtsverkehr

**[0022]** Die Vorhersagemodelle für Endometriose wurden gemäß der nachstehenden Gleichung etabliert:

$$P(r) = \frac{e^{c + B_1(\text{Marker } 1) + B_2(\text{Marker } 2) + \dots + B_n(\text{Marker } n)}}{1 + e^{c + B_1(\text{Marker } 1) + B_2(\text{Marker } 2) + \dots + B_n(\text{Marker } n)}}$$

worin

P(r) = Wahrscheinlichkeit dafür, Endometriose zu haben;

c = Konstante, etabliert für eine bestimmte Kombination;

B = Regressionskoeffizient; und

n = Gesamtzahl der Marker in der Kombination.

**[0023]** In der vorliegenden Erfindung wurde eine Reihe von endometrialen und peripheren Blutleukozyten-Subpopulationen, deren Anteile in Patientinnen mit Endometriose (Stadium I-IV; I-II oder III-IV), verglichen mit jenen von normalen Kontrollen, moduliert waren, identifiziert. Die Neuheit der vorliegenden Erfindung ist es, diese Leukozyten-Subpopulationen in Kombination als Marker für die Diagnose von Endometriose zu verwenden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Risikofaktoren für Endometriose, identifiziert unter persönlichen Informationen und Merkmalen der Menstruation, von signifikantem Wert sind, wenn sie in Kombination mit Blut- oder endometrialen Leukozytenteilmengen in einem Vorhersagetest für Endometriose verwendet werden.

**[0024]** Zwei Verfahren wurden für die Kombination von Marker verwendet.

#### Verfahren 1

**[0025]** Ein Grenzpunkt ("cutoff point") wird für den Anteil von jeder Kombination von Leukozytenmarkern etabliert, um die beste Unterscheidung zwischen Patientinnen mit Endometriose und Kontrollen zu erhalten. Der Anteil, erhalten für jeden Marker, wird mit dem Grenzpunkt verglichen. Ein positives Testergebnis ergibt eine

Bewertung von 1, während ein negatives Testergebnis eine Bewertung von 0 ergibt. Der diagnostische Wert wird erhalten durch Addieren der Bewertungen aller Marker einer bestimmten Kombination und Umwandeln in eine Prozentzahl. Der diagnostische Endwert wird dann mit einem Schwellenwert verglichen, der etabliert wurde, um die besten Sensibilitäts- und Spezifitätslevel bereitzustellen. Eine positive Diagnose der Endometriose liegt vor, wenn der diagnostische Endwert den Schwellenwert, der für eine bestimmte Kombination von Marker etabliert wurde, überschreitet. Andererseits liegt eine negative Diagnose der Endometriose vor, wenn der diagnostische Endwert niedriger ist als der Schwellenwert (siehe [Fig. 1](#)).

**[0026]** Deshalb wird, gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung, ein Verfahren zur Feststellung von Endometriose in einer Probe von eutopischen uterinen endometrialen Geweben oder einer Blutprobe eines weiblichen Subjekts bereitgestellt, umfassend:

- a) Messen, in der Probe, eines quantitativen Levels von wenigstens zwei verschiedenen Oberflächenantigenen aus Blutleukozyten und/oder eutopischen endometrialen Leukozyten, wobei die Oberflächenantigene aus Blutleukozyten und/oder eutopischen endometrialen Leukozyten aus den in der nachstehenden Tabelle definierten Leukozytenmarkerkombinanten ausgewählt werden:

**[0027]**

Leukozytenmarkerkombinationen
Endometriale leukozytenmarker
<p>CD4+, CD8+CD69–, und CD13+CD45RO–  CD4+, CD8+CD69–, CD56+CD122–, CD3+CD45RA–, und CD13+CD45RO–,  CD4+, CD8+CD69–, CD13–CD122+, und CD13+CD45RO–  CD4+ CD8+CD69–, und D14+CD13–CD16b–  CD3+CD16–, CD13+CD45RO–, CD3+, CD8+, und CD3+CD69+  CD3+, CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, und CD3–CD20  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD3+CD5+, CD3+CD122–, CD3–CD20–, und CD3+CD45RO–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD3+CD5+, und CD3+CD122–  CD3+CD20–CD5–, CD4+CD13–, und CD56–CD122–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD4+CD45RA–, und CD3+CD45RO–  CD3+, CD8+CD69–, CD3–CD4–CD45RO+, Verhältnis CD13+/CD3+, und CD13+CD45RO–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD3–CD5–, und CD20–CD5+  CD8+, CD5+, CD3–CD20–, und CD3–HLADR–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, und CD5+  CD4+, CD13–CD122+, CD8+CD69–, und CD3+CD45RA–  CD4+, CD8+CD69–, CD13–CD122+, CD3+CD45RA–, und CD13+CD45RO–  CD4+, CD8+CD69–, CD56–CD122–, CD3+CD45RA–, CD13+CD45RO–  CD3+, CD4+, CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, und CD3+CD5+  CD3+, CD4+, CD3+CD8+, und CD13+CD45RO–  CD3+, CD3+CD8+, und CD13+CD45RO–  CD3+, CD5+, CD3+CD5+, CD69+, und CD4–CD69+  CD3+, CD3+CD8+, und CD13+CD45RO–  CD3+, CD3+CD8+, und CD13+CD45RO–  CD3+, CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD3–CD20–, und CD56–CD16–  CD3+CD16–, CD3–CD4–CD45RO+, CD3+, CD8+, CD3+CD69+, und CD13+CD45RO–  CD3+, CD3–CD45RO+, Verhältnis CD13+/CD3+, CD3+CD8+, und CD8+CD69–  CD3+CD20–CD5–, CD4+CD13–, CD56–CD122–, und CD4+CD45RO–  CD3+, CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, und CD3–CD20–  CD13+CD45RO–, CD4+CD45RA–, CD3+CD122–, und CD8+CD69–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD4+CD45RA–, CD3+CD45RO–, und CD3–CD5–  CD3+, CD3–CD5–, CD13+CD45RO–, und CD3–CD20–  CD3+, CD3–CD5–, und CD13+CD45RO–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, und CD3+CD5+  CD3+ und CD13+CD20.</p>
Blutleukozytenmarker
<p>CD3–CD5+, CD3–CD45RA–, CD3–CD44+, CD13+, und CD3–CD57–CD44–  CD3–CD45RA–, CD20–CD44+, CD20–HLADR+, CD3–CD4–CD44+, und CD36–HLADR+  CD3–CD45RA–, CD3–CD45RO+, und CD20–HLADR+  CD14+CD44+, CD57+, CD3–CD45RA, und CD14+  CD14+, CD57+, CD3+CD69+, CD3+HLADR+, und CD3–CD45RA–  CD14+, CD57+, CD3+HLADR– und CD3–CD45RA–  CD14+, CD57+, CD3+CD69+, CD3+HLADR–, CD3–CD45RA–</p>
Blut- (in Kursivschrift) und endometriale Leukozytemmarker
<p>CD57+, CD14+, CD3–CD69+, CD3+, CD4+, und CD3+CD8+HLADR–  CD3–CD69+, CD3+, CD4+, und CD3+CD8+HLADR–  CD4–CD36+, CD3–CD69+, CD8+, CD13+, CD3+, CD16+, CD69+, und CD5+  CD3–CD45RA–, CD3–CD45RO+, CD20–HLADR+, CD14+CD44+, CD8+, CD5+, CD3– CD20–, und  CD3–HLADR–</p>

wobei die Messung des quantitativen Levels der Kombination der endometrialen Leukozytenmarker CD3+, CD13+CD20 mit der Länge der Menstruation (> 7 Tage) und Beckenschmerzen zu jeder beliebigen Zeit, außer der Menstruation und dem Geschlechtsverkehr, assoziiert ist; die Messung des quantitativen Levels der Kombination der Blutleukozytenmarker CD14+, CD57+, CD3+HLADR–, CD3–CD45RA– mit Beckenschmerzen zu

jeder beliebigen Zeit, außer der Menstruation und dem Geschlechtsverkehr, und der Länge der Menstruation (> 7 Tage) assoziiert ist; und die Messung des quantitativen Levels der Kombination der Blutleukozytenmarker CD14+, CD57+, CD3+CD69+, CD3+HLADR–, CD3–CD45RA– mit Beckenschmerzen zu jeder beliebigen Zeit, außer der Menstruation und dem Geschlechtsverkehr, und Alter > 40 assoziiert ist,

- b) Etablieren eines Grenzwertes für den Anteil jedes Leukozytenmarkers in der Kombination,
- c) Vergleichen des in Stufe (b) für jeden Leukozytenmarker erhaltenen Anteils mit einem vorher festgelegten Grenzwert, wobei ein positives Ergebnis eine Bewertung von 1 ergibt, während ein negatives Ergebnis eine Bewertung von 0 ergibt,
- d) Erhalten eines diagnostischen Werts durch Addieren der Bewertungen aller Marker der Kombination und Umwandeln in eine Prozentzahl,
- e) Vergleichen des diagnostischen Endwertes mit einem etablierten Schwellenwert, wobei eine positive Diagnose der Endometriose vorliegt, wenn der diagnostische Endwert den für die Kombination von Leukozytenmarkern etablierten Schwellenwert überschreitet, während eine negative Diagnose der Endometriose vorliegt, wenn der diagnostische Endwert niedriger als der für die Kombination von Leukozytenmarkern etablierte Schwellenwert ist.

## Verfahren 2

**[0028]** Ein Vorhersagemodell für Endometriose wird durch Einschließen jedes Markers einer bestimmten Kombination in die nachstehende logistische Regressionsgleichung etabliert:

$$P(r) = \frac{e^{c + B1*(\text{Marker } 1) + B2 (\text{Marker } 2) + \dots Bn (\text{Marker } n)}}{1 + e^{c + B1*(\text{Marker } 1) + B2 (\text{Marker } 2) + \dots Bn (\text{Marker } n)}}$$

worin

- P(r) = Wahrscheinlichkeit dafür, Endometriose zu haben;
- c = Konstante, etabliert für eine bestimmte Kombination;
- B = Regressionskoeffizient; und
- n = Gesamtzahl der Marker in der Kombination.

**[0029]** Die Wahrscheinlichkeit dafür, Endometriose zu haben, (P(r)) wird dann mit einem Schwellenwert verglichen, der den besten Unterscheidungswert bereitstellt. Eine positive Diagnose der Endometriose liegt vor, wenn der P(r)-Wert den Schwellenwert, der für eine bestimmte Kombination von Markern etabliert wurde, überschreitet. Alternativ liegt eine negative Diagnose der Endometriose vor, wenn der P(r)-Wert niedriger ist als der Schwellenwert.

**[0030]** Deshalb wird, gemäß einer zweiten Ausführungsform der Erfindung, ein Verfahren zur Feststellung von Endometriose in einer Probe von eutopischen uterinen endometrialen Geweben oder eine Blutprobe eines weiblichen Subjekts bereitgestellt, umfassend:

- a) Messen, in der Probe, eines quantitativen Levels von wenigstens zwei verschiedenen Oberflächenantigenen aus Blutleukozyten und/oder eutopischen endometrialen Leukozyten, wobei die Oberflächenantigene aus Blutleukozyten und/oder eutopischen endometrialen Leukozyten aus den in der nachstehenden Tabelle definierten Leukozytenmarkerkombinationen ausgewählt werden:

**[0031]**



Leukozytenmarkerkombinationen
Endometriale Leukozytenmarker
<p>CD4+, CD8+CD69–, und CD13+CD45RO–  CD4+, CD8+CD69–, CD56+CD122–, CD3+CD45RA–, und CD13+CD45RO–,  CD4+, CD8+CD69–, CD13–CD122+, und CD13+CD45RO–  CD4+ CD8+CD69–, und D14+CD13–CD16b–  CD3+CD16–, CD13+CD45RO–, CD3+, CD8+, und CD3+CD69+  CD3+, CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, und CD3–CD20–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD3+CD5+, CD3+CD122–, CD3–CD20–, und CD3+CD45RO–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD3+CD5+, und CD3+CD122–  CD3+CD20–CD5–, CD4+CD13–, und CD56–CD122–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD4+CD45RA–, und CD3+CD45RO–  CD3+, CD8+CD69–, CD3–CD4–CD45RO+, Verhältnis CD13+/CD3+, und CD13+CD45RO–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD3–CD5–, und CD20–CD5+  CD8+, CD5+, CD3–CD20–, und CD3–HLADR–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, und CD5+  CD4+, CD13–CD122+, CD8+CD69–, und CD3+CD45RA–  CD4+, CD8+CD69–, CD13–CD122+, CD3+CD45RA–, und CD13+CD45RO–  CD4+, CD8+CD69–, CD56–CD122–, CD3+CD45RA–, CD13+CD45RO–  CD3+, CD4+, CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, und CD3+CD5+  CD3+, CD4+, CD3+CD8+, und CD13+CD45RO–  CD3+, CD3+CD8+, und CD13+CD45RO–  CD3+, CD5+, CD3+CD5+, CD69+, und CD4–CD69+  CD3+, CD3+CD8+, und CD13+CD45RO–  CD3+, CD3+CD8+, und CD13+CD45RO–  CD3+, CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD3–CD20–, und CD56–CD16–  CD3+CD16–, CD3–CD4–CD45RO+, CD3+, CD8+, CD3+CD69+, und CD13+CD45RO–  CD3+, CD3–CD45RO+, Verhältnis CD13+/CD3+, CD3+CD8+, und CD8+CD69–  CD3+CD20–CD5–, CD4+CD13–, CD56–CD122–, und CD4+CD45RO–  CD3+, CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, und CD3–CD20–  CD13+CD45RO–, CD4+CD45RA–, CD3+CD122–, und CD8+CD69–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD4+CD45RA–, CD3+CD45RO–, und CD3–CD5–  CD3+, CD3–CD5–, CD13+CD45RO–, und CD3–CD20–  CD3+, CD3–CD5–, und CD13+CD45RO–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, und CD3+CD5+  CD3+ und CD13+CD20.</p>
Blutleukozytenmarker
<p>CD3–CD5+, CD3–CD45RA–, CD3–CD44+, CD13+, und CD3–CD57–CD44–  CD3–CD45RA–, CD20–CD44+, CD20–HLADR+, CD3–CD4–CD44+, und CD36HLADR+  CD3–CD45RA–, CD3–CD45RO+, und CD20–HLADR+  CD14+CD44+, CD57+, CD3–CD45RA, und CD14+  CD14+, CD57+, CD3+CD69+, CD3+HLADR+, und CD3–CD45RA–  CD14+, CD57+, CD3+HLADR–, CD3–CD45RA–  CD14+, CD57+, CD3+CD69+, CD3+HLADR–, CD3–CD45RA–</p>
Blut– (in Kursivschrift) und endometriale Leukozytenmarker
<p>CD57+, CD14+, CD3–CD69+, CD3+, CD4+, und CD3+CD8+HLADR–  CD3–CD69+, CD3+, CD4+, und CD3+CD8+HLADR–  CD4–CD36+, CD3–CD69+, CD8+, CD13+, CD3+, CD16+, CD69+, und CD5+  CD3–CD45RA–, CD3–CD45RO+, CD20–HLADR+, CD14+CD44+, CD8+, CD5+, CD3–CD20–, und  CD3–HLADR–</p>

wobei die Messung des quantitativen Levels der Kombination der endometrialen Leukozytenmarker CD3+, CD13+CD20 mit der Länge der Menstruation (> 7 Tage) und Beckenschmerzen zu jeder beliebigen Zeit, außer der Menstruation und dem Geschlechtsverkehr, assoziiert ist; die Messung des quantitativen Levels der Kombination der Blutleukozytenmarker CD14+, CD57+, CD3+HLADR–, CD3–CD45RA– mit Beckenschmerzen zu

jeder beliebigen Zeit, außer der Menstruation und dem Geschlechtsverkehr, und der Länge der Menstruation (> 7 Tage) assoziiert ist; und die Messung des quantitativen Levels der Kombination der Blutleukozytenmarker CD14+, CD57+, CD3+CD69+, CD3+HLADR-, CD3-CD45RA- mit Beckenschmerzen zu jeder beliebigen Zeit, außer der Menstruation und dem Geschlechtsverkehr, und Alter > 40 assoziiert ist,

b) Etablieren eines Vorhersagemodells für Endometriose durch Einschließen jedes Markers der Kombination in die nachstehende logistische Regressionsgleichung:

$$P(r) = \frac{e^{c+B1*(Marker1)+B2*(Marker2)+...Bn*(Marker n)}}{1 + e^{c+B1*(Marker1)+B2*(Marker2)+...Bn*(Marker n)}}$$

worin:

P(r)	= Wahrscheinlichkeit dafür, Endometriose zu haben;
c	= Konstante, etabliert für eine bestimmte Kombination;
B	= Regressionskoeffizient;
n	= Gesamtzahl der Marker in der Kombination,

c) Vergleichen der Wahrscheinlichkeit dafür, Endometriose zu haben (P(r)) mit einem Schwellenwert, wobei eine positive Diagnose der Endometriose vorliegt, wenn der P(r)-Wert den für die Kombination der Marker etablierten Schwellenwert überschreitet, während eine negative Diagnose der Endometriose vorliegt, wenn der P(r)-Wert niedriger ist, als der für die Kombination der Marker etablierte Schwellenwert.

**[0032]** In der vorliegenden Erfindung wird eine Reihe von 101 endometrialen CD45+-Leukozytenpopulationen und 96 mononukleären CD45+-Blutleukozytenpopulationen beschrieben, für die mittels Durchflusszytometrieanalyse gezeigt wurde, dass in Patientinnen mit Endometriose (Stadium I, II, III oder IV), verglichen mit normalen Kontrollen, moduliert sind. Sie sind somit gute Kandidatenmarker für die Diagnose der Endometriose (Tabellen 3, 4, 5 und 6). Das innovative Merkmal der vorliegenden Erfindung ist es, diese Marker in Kombination zu verwenden, um ihren Sensibilitäts- und Spezifitätslevel in dem diagnostischen Test zu erhöhen.

TABELLE 3

Endometriale Leukozytenpopulationen, vorgeschlagen als gute Vorhersagemarker für die Identifizierung von Patientinnen mit Endometriose

Leukozyten-Teilmenigen	mittlerer Anteil (% $\pm$ s.d.) der Leukozyten-Teilmenigen		Zahl der untersuchten Proben		Fläche unter der ROC-Kurve <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	Grenzwert	Spezifität	Sensitivität	Chancenverhältnis	(CI) <sup>4</sup>
	Kontrollen	Endo Stadium I-IV	Kontrolle	Endo							
CD3+	47,7 $\pm$ 12,3	38,7 $\pm$ 12,6	58	88	0,703	3,3x10 <sup>-5</sup>	<40	84	55	6,5	(2,9-14,9)
CD4+	18,3 $\pm$ 5,6	15,7 $\pm$ 5,9	55	88	0,632	0,008	<17 <15,5	63 72	63 52	3,0 2,9	(1,5-6,2) (1,4-6,0)
CD5+	45,1 $\pm$ 11,6	36,3 $\pm$ 12,3	46	74	0,702	0,0002	<37 <40	80 73	53 58	4,2 3,9	(1,8-9,7) (1,7-8,8)
CD8+	24,3 $\pm$ 8,5	18,5 $\pm$ 8,6	54	87	0,688	0,00019	<20	74	62	4,8	(2,3-10,2)
CD3+CD4+	17,2 $\pm$ 5,5	14,4 $\pm$ 5,7	55	88	0,641	0,004	<15	67	57	2,7	(1,3-5,5)
CD3+CD4-	29,9 $\pm$ 9,6	23,6 $\pm$ 9,1	55	88	0,687	0,00017	<24	80	52	4,4	(2,0-9,6)
CD3-CD4-	51,1 $\pm$ 14,2	60,8 $\pm$ 12,6	55	88	0,698	6,9x10 <sup>-5</sup>	<61	83	50	5,1	(2,2-11,7)
CD3+CD8+	18,9 $\pm$ 7,5	13,7 $\pm$ 7,7	54	84	0,714	2,3x10 <sup>-5</sup>	<16 <13,5	70 81	70 54	5,6 5,3	(2,6-11,8) (2,3-11,9)
CD3+CD8-	26,1 $\pm$ 7,8	23,1 $\pm$ 7,1	54	84	0,609		<23,5	68	51	2,2	(1,1-4,7)
CD3-CD8-	49,6 $\pm$ 12,0	58,2 $\pm$ 13,0	54	84	0,688	1,9x10 <sup>-4</sup>	>53,5	70	63	4,0	(1,9-8,5)
CD3+CD69+	20,4 $\pm$ 9,6	15,5 $\pm$ 8,0	44	76	0,642	0,010	<15	67	53	2,4	(1,1-5,2)
CD3+CD122-	41,4 $\pm$ 10,0	34,4 $\pm$ 12,4	29	53	0,669	0,012	<42,5	64	76	2,9	(1,1-7,5)
CD3+HLADR-	38,1 $\pm$ 10,3	30,6 $\pm$ 12,3	51	80	0,681	0,0005	<35	72	63	4,0	(1,8-8,5)
CD3+HLADR+	46,4 $\pm$ 13,0	55,6 $\pm$ 13,5	51	80	0,693	0,0002	>54,5	80	51	4,1	(1,8-9,3)

Leukozyten- Teilmenen	mittlerer Anteil (% $\pm$ s.d.) der Leukozyten- Teilmenen		Zahl der untersuchten Proben		Fläche unter der ROC- Kurve <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	Grenzpunkt	Spezifität	Sensitivität	Chancen- verhältnis	(CI) <sup>4</sup>
	Kontrollen	Endo Stadium I-IV	Kontrolle	Endo							
CD3+CD45RA+	7,4 $\pm$ 4,7	5,7 $\pm$ 3,0	56	85	0,608	0,030	<4,9	77	40	2,2	(1,0-4,7)
CD3+CD45RA-	40,3 $\pm$ 11,2	32,7 $\pm$ 12,0	56	85	0,684	0,0002	<37	69	66	4,7	(2,2-9,7)
CD3-CD45RA-	31,4 $\pm$ 12,7	39,6 $\pm$ 13,4	56	85	0,667	8,2x10 <sup>-4</sup>	<35	73	60	4,1	(1,9-8,5)
CD3+CD45RO-	31,0 $\pm$ 11,1	25,0 $\pm$ 9,8	50	73	0,661	0,002	>32	51	69	2,3	(1,1-4,6)
CD3+CD16-	45,5 $\pm$ 12,1	37,2 $\pm$ 13,1	57	83	0,680	0,0003	<28	65	62	3,1	(1,4-6,6)
CD3+CD56-	46,5 $\pm$ 12,2	38,5 $\pm$ 12,8	56	83	0,674	0,00053	<30	55	70	2,7	(1,3-5,7)
CD3+CD5+	41,9 $\pm$ 11,4	33,3 $\pm$ 12,3	45	74	0,695	0,00036	<38	80	49	4,5	(2,0-9,9)
CD3-CD5-	50,6 $\pm$ 12,0	59,0 $\pm$ 12,9	45	74	0,690	0,00052	<40	75	58	4,2	(2,0-8,9)
CD4+CD69-	16,4 $\pm$ 4,8	13,8 $\pm$ 5,1	37	72	0,648	0,012	<47,5	40	80	2,6	(1,2-5,6)
CD4+CD45RA-	16,7 $\pm$ 5,3	14,2 $\pm$ 5,7	54	85	0,632	0,009	<40	78	55	4,6	(2,1-9,9)
CD8+CD69-	24,0 $\pm$ 7,9	18,9 $\pm$ 8,3	30	59	0,687	0,004	<37	77	61	4,7	(2,1-10,9)
CD8+HLADR-	23,3 $\pm$ 7,7	18,1 $\pm$ 8,5	49	79	0,673	0,001	>60	82	51	4,6	(1,9-11,2)
CD8-HLADR-	61,6 $\pm$ 9,5	68,1 $\pm$ 9,5	49	79	0,675	0,0009	>54	66	66	4,3	(1,9-9,6)
CD13-CD122+	27,0 $\pm$ 9,8	33,6 $\pm$ 18,7	32	58	0,605		<14	78	53	4,1	(1,6-10,1)
							<16	62	66	3,3	(1,6-6,7)
							<18	83	53	5,9	(1,9-17,6)
							<19,5	76	59	5,1	(1,9-13,9)
							<21	65	68	4,2	(1,6-10,7)
							<18	77	54	4,1	(1,8-9,2)
							>61,5	52	77	3,8	(1,7-8,3)
							>28	64	59	2,5	(1,0-6,2)

Leukozyten-Teilnahmen	mittlerer Anteil (% $\pm$ s.d.) der Leukozyten-Teilnahmen		Zahl der untersuchten Proben		Fläche unter der ROC-Kurve <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	Grenzwert	Spezifität	Sensitivität	Chancenverhältnis	(CI) <sup>4</sup>
	Kontrollen	Endo Stadium I-IV	Kontrolle	Endo							
CD13-CD122-	47,1 $\pm$ 14,4	40,4 $\pm$ 15,0	32	58	0,635	0,035	<46	58	64	2,6	(1,1-6,2)
CD20-CD5+	44,6 $\pm$ 12,0	36,4 $\pm$ 12,6	41	66	0,681	0,002	<41	60	62	2,6	(1,2-5,7)
							<44	57	71	3,5	(1,5-7,9)
CD20-CD5-	52,0 $\pm$ 12,8	60,9 $\pm$ 12,9	41	66	0,692	0,0009	>60	77	50	3,6	(1,5-8,6)
CD56-CD16+	22,0 $\pm$ 12,2	27,0 $\pm$ 16,6	56	84	0,571						
CD56-CD16-	51,6 $\pm$ 12,2	42,8 $\pm$ 13,5	56	84	0,687	1,8x10 <sup>-4</sup>	<46	71	57	3,3	(1,6-6,7)
Verhältnis CD3/CD45RO CD14+CD13-	1,5 $\pm$ 1,0	1,2 $\pm$ 0,7	51	80	0,626	0,015					
	1,4 $\pm$ 0,9	2,3 $\pm$ 1,8	21	36	0,639						
CD3+CD20-	44,4 $\pm$ 11,2	36,9 $\pm$ 13,5	24	45	0,667	0,023	<40	78	58	4,1	(1,4-12,3)
CD3-CD20-	52,3 $\pm$ 11,5	61,0 $\pm$ 14,9	24	45	0,669	0,022	>58	83	53	6,2	(1,8-21,2)
							>56	70	60	4,5	(1,4-13,5)
CD3-CD4-CD45RA+	40,1 $\pm$ 13,7	34,9 $\pm$ 15,1	51	79	0,618	0,023					
CD3-CD4-CD45RA-	57,9 $\pm$ 14,1	63,3 $\pm$ 15,2	51	79	0,620	0,021					
CD3+CD8+CD69-	40,4 $\pm$ 10,2	35,1 $\pm$ 11,7	29	56	0,635	0,042	<34,5	75	52	3,4	(1,2-9,2)
CD3+CD8+HLADR-	39,5 $\pm$ 9,2	33,6 $\pm$ 11,5	48	74	0,665	0,002	<35	72	55	3,5	(1,6-7,7)
CD3+CD8-HLADR-	43,1 $\pm$ 7,5	46,3 $\pm$ 10,9	48	74	0,603		>47	69	50	2,2	(1,0-4,7)
CD3-CD8-HLADR-	76,7 $\pm$ 8,9	80,3 $\pm$ 7,9	48	74	0,597						
CD14+CD13-CD16b-	19,8 $\pm$ 16,4	33,4 $\pm$ 22,9	19	36	0,703	0,014	>23	68	69	4,9	(1,4-16,3)
							>14,5	53	83	4,6	(1,4-15,6)

Leukozyten- Teilmen- gen	mittlerer Anteil (% $\pm$ s.d.) der Leukozyten- Teilmen- gen			Zahl der untersuchten Proben		Fläche unter der ROC- Kurve <sup>2</sup>	$P^3$	Grenzpunkt	Spezifität	Sensitivität	Chancen- verhältnis	(CI) <sup>4</sup>
	Kontrollen	Endo	Stadium I-IV	Kontrolle	Endo							
CD4+CD14-	20,7 $\pm$ 7,8	14,8 $\pm$ 5,8	0,014	14	23	0,738	0,017	<16,6	79	65	6,9	(1,5-32,0)
CD4-CD14-	75,7 $\pm$ 8,1	81,0 $\pm$ 5,7	0,025	14	23	0,711	0,033	>76	57	83	6,3	(1,4-28,7)
CD4+HLADR-	16,0 $\pm$ 5,7	12,3 $\pm$ 4,1	0,018	14	30	0,715	0,023	<17	57	87	8,7	(1,9-38,6)
CD13-CD69+	54,2 $\pm$ 14,3	42,3 $\pm$ 18,2	0,039	14	30	0,705	0,030	<51	71	70	5,8	(1,4-23,6)
CD13+CD45RO-	22,1 $\pm$ 8,8	15,5 $\pm$ 10,7	0,009	25	54	0,746	4,6 $\times 10^{-4}$	<17,5 <21	76 52	70 80	7,5 4,2	(2,5-22,3) (1,5-11,8)
CD56-CD122-	49,0 $\pm$ 12,2	42,8 $\pm$ 15,8		29	51	0,631		<47	65	69	3,6	(1,4-9,3)
CD3+CD69-	26,4 $\pm$ 7,0	23,3 $\pm$ 8,4	0,036	44	76	0,612	0,041	<27	57	67	2,2	(1,0-4,8)
CD4+CD45RO-	14,9 $\pm$ 5,3	13,0 $\pm$ 6,2		47	74	0,615	0,034	<16	51	72	2,6	(1,2-5,6)
CD56+CD122+	3,5 $\pm$ 2,2	2,6 $\pm$ 1,7		29	51	0,651	0,025	<3,0	55	73	3,3	(1,3-8,5)
CD3-CD56+CD16+	8,2 $\pm$ 3,8	6,8 $\pm$ 4,0	0,049	53	78	0,615	0,026	<6,5	72	55	3,0	(1,4-6,2)
CD3-CD56+CD122+	3,6 $\pm$ 2,0	2,6 $\pm$ 1,8	0,033	27	49	0,638	0,048	<2,7	63	65	3,2	(1,2-8,5)
CD14+CD13+	3,8 $\pm$ 1,9	3,0 $\pm$ 2,6		21	36	0,672	0,032	<2,3	81	53	4,8	(1,3-16,9)
CD3+CD20-CD5+	93,0 $\pm$ 2,7	88,0 $\pm$ 13,8		24	40	0,659	0,034	<91,5	79	55	4,6	(1,4-14,9)
CD4-CD13+CD16+	31,0 $\pm$ 14,0	22,4 $\pm$ 18,9		16	36	0,699	0,023					
CD69+	41,8 $\pm$ 12,9	38,8 $\pm$ 17,8		43	78	0,557		<33	81	41	3,0	(1,2-7,4)
Verhältnis CD13/CD3	0,56 $\pm$ 0,54	0,78 $\pm$ 0,71		46	78	0,596		>0,68	80	40	2,6	(1,1-6,1)

Leukozyten- Teilmenen	mittlerer Anteil (% $\pm$ s.d.) der Leukozyten- Teilmenen		Zahl der untersuchten Proben		Fläche unter der ROC- Kurve <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	Grenzpunkt	Spezifität	Sensitivität	Chancen- verhältnis	(CI) <sup>4</sup>
	Kontrollen	Endo Stadium I-IV	P <sup>1</sup>	Kontrolle	Endo						
CD3-CD20-CD5-	88,0 $\pm$ 6,9	90,7 $\pm$ 5,2		24	40		>84	37	90	5,4	(1,4-20,3)
CD3+CD20-CD5-	5,1 $\pm$ 2,3	9,5 $\pm$ 13,6		24	40	0,015	>7,7	87	50	9,9	(2,1-48,1)
CD4+CD13-	17,5 $\pm$ 6,9	15,8 $\pm$ 5,4		36	63		<20,5	42	86	4,3	(1,6-11,3)
CD3+CD44-	41,7 $\pm$ 12,0	38,3 $\pm$ 13,6		31	56		<37,8	74	50	2,9	(1,1-7,5)
CD56+	26,2 $\pm$ 12,5	30,2 $\pm$ 17,2		57	87		>32	81	41	2,9	(1,3-6,5)
CD13-CD45RO+	21,4 $\pm$ 8,7	26,3 $\pm$ 11,3		25	54		>28	80	45	3,2	(1,0-9,8)
CD56+CD69-	19,6 $\pm$ 12,9	24,3 $\pm$ 14,3		33	53		>26	85	40	3,4	(1,1-10,2)
CD13-CD16+	8,0 $\pm$ 7,5	6,7 $\pm$ 3,3		39	71		<6	72	51	2,6	(1,1-6,1)
CD56+CD122-	21,8 $\pm$ 11,8	28,7 $\pm$ 17,3		29	51		>19	59	71	3,1	(1,2-7,9)
CD3+CD4-CD69+	37,2 $\pm$ 10,0	34,0 $\pm$ 13,8		34	66		>18	55	72	3,3	(1,3-8,5)
CD4-CD13-CD16+	8,5 $\pm$ 3,6	8,7 $\pm$ 10,8		16	36		<33,5	73	49	2,6	(1,1-6,4)
CD4-CD13-CD16-	54,5 $\pm$ 13,0	62,2 $\pm$ 21,4		16	36		<7,1	75	58	4,2	(1,1-15,6)
							<65	81	56	5,4	(1,3-22,3)

Leukozyten-Teilmen- gen	mittlerer Anteil (% $\pm$ s.d.) der Leukozyten- Teilmen- gen		Zahl der untersuchten Proben		Fläche unter der ROC- Kurve <sup>2</sup>	$P^3$	Grenzkpunkt	Spezifität	Sensitivität	Chancen- verhältnis	(CI) <sup>4</sup>
	Kontrollen	Endo Stadium I-IV	Kontrolle	Endo							
CD14+CD13+CD16b+	11,0 $\pm$ 12,5	6,5 $\pm$ 6,2	19	36	0,616		<16	32	94	7,8	(1,4-43,9)
CD56-CD122-	49,0 $\pm$ 12,2	42,8 $\pm$ 15,8	29	51	0,631		<47	65	68	3,6	(1,4-9,3)
CD4-CD69-	40,7 $\pm$ 12,9	46,4 $\pm$ 18,6	37	72	0,593		>47	76	47	2,8	(1,2-6,7)
CD3-CD45RO+	23,0 $\pm$ 12,5	27,1 $\pm$ 16,3	50	73	0,556		>15	34	80	2,0	(0,9-4,5)
CD4-CD69+	39,3 $\pm$ 11,8	37,7 $\pm$ 18,0	37	72	0,462		<35	68	46	1,6	(0,7-3,5)
CD3-CD4-CD45RO+	41,3 $\pm$ 18,1	43,4 $\pm$ 20,9	43	72	0,530		>31,5	33	71	1,2	(0,5-2,7)
							>56	81	28	1,6	(0,6-4,0)

<sup>1</sup>  $P$ -Wert (wenn  $\leq 0,05$ ), erhalten in einem Student- $t$ -Test, als der mittlere Anteil, der in Patientinnen mit Endometriose im Stadium I-IV gefunden wurde, mit normalen Kontrollen verglichen wurde.

<sup>2</sup> Unterscheidungswert für jeden Marker, etabliert durch die Fläche unter der ROC-Kurve.

<sup>3</sup>  $P$ -Wert (wenn  $\leq 0,05$ ), Signifikanz der Fläche unter der ROC-Kurve.

<sup>4</sup> Konfidenzintervall für das Chancenverhältnis.



**TABELLE 4**  
**Periphere Blutleukozytenpopulationen, vorgeschlagen als gute Vorhersagemarker für die Identifizierung von Patientinnen mit Endometriose**

Leukozyten- Teilmenngen	mittlerer Anteil (% $\pm$ s.d.) der Leukozyten- Teilmenngen			Zahl der untersuchten Proben		Fläche unter der Kurve <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	Grenzpunkt	Spezifität	Sensitivität	Chancen- verhältnis	(CI) <sup>4</sup>
	Kontrollen	Endo Stadium I- IV	P <sup>1</sup>	Kontrolle	Endo Stadium I-IV							
CD3+	66,6 $\pm$ 8,5	64,5 $\pm$ 8,7	0,032	132	172	0,570	0,037					
CD8+	17,3 $\pm$ 5,2	16,4 $\pm$ 4,8		129	172	0,549						
CD13+	16,0 $\pm$ 6,0	17,6 $\pm$ 6,5	0,039	122	155	0,575	0,032	>17,5	63	51	1,8	(1,1-2,9)
CD14+	11,8 $\pm$ 4,9	13,4 $\pm$ 6,0	0,020	124	167	0,575	0,029	>10	45	71	2,0	(1,3-3,3)
CD20+	5,7 $\pm$ 3,1	4,8 $\pm$ 2,3	0,006	124	162	0,582	0,017	<6	39	74	1,8	(1,1-3,0)
CD36+	15,7 $\pm$ 6,8	17,2 $\pm$ 7,3		112	140	0,560		>19	77	37	2,1	(1,2-3,6)
CD44+	17,1 $\pm$ 5,6	19,1 $\pm$ 6,5	0,009	113	148	0,585	0,018	>18,5	61	51	1,7	(1,0-2,7)
CD57+	8,0 $\pm$ 3,9	9,2 $\pm$ 4,9	0,023	114	148	0,569		>10	75	39	1,8	(1,1-3,1)
CD69+	19,4 $\pm$ 8,2	21,0 $\pm$ 7,1		109	144	0,590	0,014	>21,5	71	45	2,0	(1,2-3,4)
CD122+	29,2 $\pm$ 8,4	31,2 $\pm$ 11,7		122	166	0,567		>34	74	42	2,1	(1,2-3,4)
CD3+CD5+	66,6 $\pm$ 8,5	63,7 $\pm$ 10,4	0,017	115	146	0,586	0,017	<69	44	70	1,8	(1,1-2,9)
CD3+CD45RA-	39,3 $\pm$ 9,5	37,2 $\pm$ 8,3	0,044	124	168	0,583	0,015	<42	40	72	1,7	(1,1-2,8)
CD3+CD56-	65,3 $\pm$ 8,8	63,2 $\pm$ 8,6	0,035	126	169	0,571	0,037	<68	42	71	1,8	(1,1-2,9)
CD3+CD57-	63,7 $\pm$ 8,3	60,7 $\pm$ 9,7	0,009	113	146	0,592	0,011	<67	40	77	2,3	(1,3-3,9)
CD3+CD69-	60,1 $\pm$ 9,6	57,9 $\pm$ 9,2		107	141	0,584	0,023					
CD3+CD122-	62,2 $\pm$ 8,4	59,6 $\pm$ 9,8	0,021	121	164	0,578	0,024	<58	69	42	1,6	(1,0-2,7)
CD3+HLADR+	3,9 $\pm$ 1,4	3,5 $\pm$ 1,2	0,006	121	154	0,601	0,004	<4	40	77	2,2	(1,3-3,7)
CD3-CD5+	15,5 $\pm$ 5,3	18,3 $\pm$ 8,4	0,003	115	146	0,619	0,001	>14,5	50	72	2,5	(1,5-4,2)
CD3-CD16+	23,3 $\pm$ 7,9	25,4 $\pm$ 8,7	0,036	123	166	0,572	0,037					
CD3-CD44+	13,1 $\pm$ 5,3	15,6 $\pm$ 6,3	0,001	111	143	0,615	0,002	>11,5	44	73	2,2	(1,4-3,7)
CD3-CD57+	4,2 $\pm$ 2,5	5,0 $\pm$ 3,1	0,023	113	146	0,573	0,044					
CD3-CD69+	14,2 $\pm$ 5,6	16,4 $\pm$ 6,5	0,006	107	141	0,602	0,006	>17,5	75	41	2,1	(1,2-3,6)
CD3-CD45RO+	16,0 $\pm$ 5,6	18,1 $\pm$ 6,8	0,006	117	148	0,595	0,008	>19	77	44	2,6	(1,5-4,5)
CD3-CD4-	31,1 $\pm$ 9,5	33,3 $\pm$ 9,0	0,043	132	171	0,566	0,050					
CD3-CD8-	33,4 $\pm$ 9,2	35,5 $\pm$ 10,0		122	166	0,568	0,050	>14,5	61	60	2,3	(1,4-3,7)
CD3-CD45RA-	14,2 $\pm$ 5,2	16,2 $\pm$ 6,2	0,004	124	168	0,595	0,006	>25	73	39	1,7	(1,0-2,8)
CD3-CD56-	21,6 $\pm$ 6,3	23,1 $\pm$ 7,0		126	169	0,562		>16,5	69	51	2,4	(1,4-4,1)
CD4-CD13+	14,5 $\pm$ 6,0	16,3 $\pm$ 6,8	0,030	108	131	0,586	0,023					
CD4-CD36+	13,8 $\pm$ 7,4	19,0 $\pm$ 6,2	0,037	13	21	0,771	0,009	>19	92	62	19,5	(2,1-179,9)

Leukozyten- Teilmen	mittlerer Anteil (% ± s.d.) der Leukozyten- Teilmen		P <sup>1</sup>	Zahl der untersuchten Proben		Fläche unter der Kurve <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	Grenzpunkt	Spezifität	Sensitivität	Chancen- verhältnis	(CI) <sup>4</sup>
	Kontrollen	Endo Stadium I-IV		Kontrolle	Endo Stadium I-IV							
CD4-CD69+	16,0 ± 6,1	18,1 ± 6,5	0,021	94	120	0,603	0,009	>19	75	45	2,4	(1,3-4,3)
CD4-CD45RO+	23,4 ± 6,7	27,0 ± 7,7	0,043	27	50	0,620						
CD4-CD45RA-	22,7 ± 6,5	24,4 ± 8,3		125	168	0,562						
CD8-CD44+	16,8 ± 5,5	18,9 ± 6,7	0,017	88	119	0,588	0,030					
CD8-CD44-	66,4 ± 7,0	64,4 ± 6,6	0,039	88	119	0,584	0,040	<68	48	70	2,1	(1,2-3,7)
CD13+CD44+	13,3 ± 5,3	15,4 ± 5,9	0,006	96	121	0,605	0,008	>11	38	76	1,9	(1,1-3,4)
CD13+HLADR+	13,0 ± 5,3	14,7 ± 6,1	0,024	108	135	0,581	0,031	>15,5	71	42	1,8	(1,1-3,1)
CD13+CD16-	1,4 ± 0,9	3,7 ± 4,6	0,005	21	37	0,727	0,004	>2	76	57	4,2	(1,3-13,9)
CD13+HLADR+	8,2 ± 3,2	7,0 ± 3,0	0,005	108	135	0,619	0,001	<8	50	70	2,4	(1,4-4,0)
CD13-CD44-	79,9 ± 6,2	76,9 ± 8,6	0,004	96	121	0,606	0,007	<82	39	76	2,0	(1,1-3,6)
CD14+HLADR+	11,0 ± 4,6	12,7 ± 5,9	0,009	110	147	0,587	0,017	>9,5	48	70	2,2	(1,3-3,6)
CD14+CD44+	10,7 ± 4,9	12,9 ± 5,7	0,003	85	123	0,612	0,006	>15	85	33	2,7	(1,3-5,4)
CD14+CD45RO+	12,2 ± 4,4	14,3 ± 6,1	0,004	102	118	0,586	0,028					
CD14+CD16-	0,7 ± 0,8	2,7 ± 5,4	0,023	23	41	0,603						
CD14+CD122-	0,4 ± 0,3	2,4 ± 5,2	0,029	14	34	0,648		>0,7	86	47	5,3	(1,0-27,5)
CD14+HLADR+	10,3 ± 3,3	9,1 ± 2,7	0,001	109	147	0,611	0,002	<8,5	69	47	2,0	(1,2-3,3)
CD14-CD44-	83,5 ± 5,3	81,6 ± 6,3	0,023	85	123	0,588	0,032	<80	79	37	2,2	(1,2-4,2)
CD20+HLADR+	5,2 ± 2,9	4,3 ± 2,1	0,005	106	141	0,596	0,010	<5,5	39	75	1,9	(1,1-3,3)
CD20+CD44-	5,0 ± 2,8	4,2 ± 2,2	0,033	95	126	0,571		<4	62	55	2,0	(1,2-3,4)
CD20-CD44+	14,4 ± 5,1	17,3 ± 6,2	0,0004	95	126	0,636	0,001	>17	74	47	2,5	(1,4-4,4)
CD20-CD69+	16,4 ± 4,3	21,0 ± 6,2	0,016	14	29	0,719	0,021	>16	57	76	4,2	(1,1-16,3)
CD20+HLADR+	15,4 ± 4,9	17,6 ± 6,9	0,004	106	141	0,591	0,014	>14,5	49	70	2,2	(1,3-3,7)
CD20-CD44-	79,5 ± 5,1	77,5 ± 6,1	0,008	95	126	0,590	0,022					
CD20-CD69-	79,4 ± 6,7	75,3 ± 6,5	0,065	14	29	0,711	0,027	<75,6	71	52	11,6	(2,3-57,0)
CD36+HLADR+	7,8 ± 3,2	6,4 ± 2,0	0,0005	95	121	0,629	0,001	<5,6	77	40	2,2	(1,2-4,0)
CD56-CD69+	18,1 ± 4,2	21,8 ± 6,7	0,083	13	23	0,667		>20,5	85	52	6,0	(1,1-33,3)
CD56-CD122+	19,5 ± 5,7	21,4 ± 8,6	0,028	113	154	0,578	0,030	>23	74	40	2,0	(1,2-3,3)
CD56-CD69-	67,9 ± 5,3	62,7 ± 9,4	0,075	13	23	0,671	0,093					
CD56-CD122-	67,7 ± 8,3	64,7 ± 11,5	0,014	113	154	0,586	0,017	<64,5	67	51	2,1	(1,3-3,5)
CD57-CD44-	74,3 ± 6,9	71,7 ± 7,7	0,015	84	117	0,602	0,014	<76	44	71	1,9	(1,1-3,5)
CD3+CD57+HLADR+	4,3 ± 1,5	4,0 ± 1,4		96	118	0,584	0,034	<3,7	72	43	1,9	(1,1-3,5)
CD3-CD4-CD44+	34,4 ± 11,0	38,1 ± 12,6	0,032	88	112	0,577		>40,5	69	45	1,8	(1,0-3,3)
CD3-CD4-CD44-	58,3 ± 12,2	54,9 ± 12,7		88	112	0,572						
CD3-CD56+CD16-	1,2 ± 0,6	1,4 ± 1,0	0,023	121	163	0,553						
CD3-CD56-CD122-	23,4 ± 11,1	21,2 ± 11,4		113	148	0,581	0,024					

Leukozyten-Teilmenge	mittlerer Anteil (% $\pm$ s.d.) der Leukozyten-Teilmenge		Zahl der untersuchten Proben		Fläche unter der Kurve <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	Grenzwert	Spezifität	Sensitivität	Chancenverhältnis	(CI) <sup>4</sup>
	Kontrollen	Endo Stadium I-IV	P <sup>1</sup>	Kontrolle	Endo Stadium I-IV						
CD3-CD57-CD44-	48,7 $\pm$ 10,1	44,5 $\pm$ 10,3	0,004	84	114	0,008	<41,3	80	41	2,8	(1,4-5,3)
CD14+CD20+CD44-	0,2 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	0,036	65	75	0,037					
CD14+CD20-CD44+	91,8 $\pm$ 4,6	93,5 $\pm$ 3,5	0,016	65	75	0,021	>95	75	43	2,3	(1,1-4,7)
CD14+CD20-CD44-	5,9 $\pm$ 4,5	4,6 $\pm$ 3,3	0,037	65	75	0,035	<3	75	43	2,3	(1,1-4,7)
CD14-CD13-HLADR+	8,7 $\pm$ 3,5	7,6 $\pm$ 2,6	0,021	77	82	0,029	<7	71	45	2,1	(1,1-4,0)
Verhältnis CD13/CD3	0,25 $\pm$ 0,12	0,29 $\pm$ 0,14	0,025	121	153	0,018	>0,30	71	43	1,8	(1,1-3,0)
Verhältnis CD13/CD8	1,04 $\pm$ 0,55	1,20 $\pm$ 0,69	0,039	114	153	0,039					
Verhältnis CD14/CD3	0,19 $\pm$ 0,10	0,22 $\pm$ 0,12	0,011	123	165	0,028	>0,14	40	74	1,9	(1,1-3,1)
Verhältnis CD14/CD8	0,78 $\pm$ 0,47	0,91 $\pm$ 0,55	0,040	116	164	0,036					

<sup>1</sup> P-Wert (wenn  $\leq 0,05$ ), erhalten in einem Student-“t“-Test, als der mittlere Anteil, der in Patientinnen mit Endometriose (im Stadium I-IV) gefunden wurde, mit normalen Kontrollen verglichen wurde.

<sup>2</sup> Unterscheidungswert für jeden Marker, etabliert durch die Fläche unter der ROC-Kurve.

<sup>3</sup> P-Wert (wenn  $\leq 0,05$ ), Signifikanz der Fläche unter der ROC-Kurve.

<sup>4</sup> Konfidenzintervall für das Chancenverhältnis.

**TABELLE 5**  
**Endometriale Leukozytenpopulationen, verwendet als Marker zum Unterscheiden zwischen Patientinnen mit Endometriose im Stadium I-II oder Stadium III-IV und normalen Subjekten**

Leukozyten-Teilungen	mittlerer Anteil (% $\pm$ s.d.) der Leukozyten-Teilungen				Zahl der untersuchten Proben			Fläche unter der ROC-Kurve	P	Grenzpunkt	Spezifität	Sensitivität	Chancenverhältnis	(CI) <sup>a</sup>
	Kontrollen	Endo Stadium I-II	P <sup>1</sup>	Endo Stadium III-IV	P <sup>2</sup>	Kontrolle	Endo I-II	Endo III-IV						
CD3-CD44-	50,0 $\pm$ 12,9	50,5 $\pm$ 11,9		61,8 $\pm$ 16,6	0,015	31	43	13	0,766	0,007	>48	52	12,9	(1,4-113,8)
CD3+HLADR+	8,3 $\pm$ 5,7	6,1 $\pm$ 2,6	0,013	7,6 $\pm$ 3,3		51	57	23	0,587		<5,5	67	48,3	
CD3+CD45RO+	14,9 $\pm$ 8,4	12,0 $\pm$ 5,6	0,043	13,2 $\pm$ 9,5		50	50	23	0,565		>15	37,3	71	
CD4+CD13+	2,3 $\pm$ 1,9	2,2 $\pm$ 1,7		1,4 $\pm$ 1,1	0,025	36	44	19	0,658		<1,7	50	79	3,8 (1,0-13,8)
CD13+HLADR+	5,7 $\pm$ 2,7	5,3 $\pm$ 2,3		3,6 $\pm$ 1,3	0,017	27	37	12	0,740	0,021	<5	54	92	13 (1,4-117,2)
CD14+HLADR+	14,7 $\pm$ 7,5	10,2 $\pm$ 3,9	0,049	10,8 $\pm$ 5,1		14	24	4	0,679		<13	57	75	
CD56+HLADR+	2,8 $\pm$ 1,7	1,5 $\pm$ 0,7	0,011	4,6 $\pm$ 3,3		16	17	5	0,741	0,018	<1,7	75	71	7,2 (1,5-33,6)
CD56-CD44-	63,5 $\pm$ 13,0	63,5 $\pm$ 13,4		51,1 $\pm$ 20,4	0,023	30	41	12	0,708	0,041	<65	58	83	6,8 (1,2-37,5)
CD3-CD4+CD45RA-	1,5 $\pm$ 0,9	1,5 $\pm$ 0,9		1,0 $\pm$ 0,7	0,022	51	54	25	0,668	0,021	<0,7	84	40	3,4 (1,1-10,7)
CD3+CD8+HLADR+	15,9 $\pm$ 8,1	15,8 $\pm$ 8,6		23,6 $\pm$ 12,1	0,011	48	52	22	0,701	0,009	>14,8	55	73	3,3 (1,1-10,1)
CD3-CD8+HLADR-	9,5 $\pm$ 6,5	8,6 $\pm$ 6,1		6,1 $\pm$ 5,2	0,036	48	52	22	0,691	0,013	<5	78	59	5,0 (1,6-15,4)
CD3+CD56+CD16+	3,0 $\pm$ 3,4	2,9 $\pm$ 3,2		6,0 $\pm$ 5,7	0,027	53	56	22	0,670	0,024	>1,8	49	77	3,5 (1,0-10,3)
CD3+CD56-CD16+	6,6 $\pm$ 7,5	7,0 $\pm$ 6,2		11,0 $\pm$ 9,1	0,350	53	56	22	0,698	0,009	>9	84	50	5,4 (1,7-17,3)
CD3+CD56-CD16-	87,0 $\pm$ 8,1	87,2 $\pm$ 7,1		79,5 $\pm$ 12,9	0,016	53	56	22	0,695	0,010	>83	81	50	4,1 (1,4-12,5)

Leukozyten-Teilmenge	mittlerer Anteil (% $\pm$ s.d.) der Leukozyten-Teilmenge				Zahl der untersuchten Proben			Fläche unter der ROC-Kurve	P	Grenzpunkt	Spezifität	Sensitivität	Chancenverhältnis	(CI) <sup>4</sup>
	Kontrollen	Endo Stadium I-II	P <sup>1</sup>	Endo Stadium III-IV	P <sup>2</sup>	Kontrolle	Endo Stadium I-II	Endo Stadium III-IV						
CD3+CD56-CD44+	7,0 $\pm$ 6,1	6,1 $\pm$ 4,8		13,2 $\pm$ 10,5	0,025	28	38	12	0,034	<5	42	92		
CD3+CD56-CD44-	87,1 $\pm$ 6,1	88,5 $\pm$ 6,2		78,0 $\pm$ 13,9	0,049	28	38	12		>81	83	58	7,0	(1,5-33,7)
CD3-CD56-HLADR-	29,7 $\pm$ 15,6	42,7 $\pm$ 19,6	0,050	29,3 $\pm$ 21,3		15	17	6	0,047	<36	73	59		
CD3+CD56-CD122+	12,1 $\pm$ 7,5	11,9 $\pm$ 6,3		21,7 $\pm$ 14,0	0,005	27	33	16	0,024	>20	87	50	6,7	(1,4-31,7)
CD3+CD56-CD122-	81,9 $\pm$ 8,2	83,0 $\pm$ 6,8		68,0 $\pm$ 21,7	0,024	27	33	16	0,024	>76,5	71	63	4,0	(1,1-15,5)
CD4-CD16-	51,5 $\pm$ 12,9	59,1 $\pm$ 12,7	0,033	49,3 $\pm$ 21,4		24	31	11	0,045	<58	76	47		
CD14+CD13+CD16b-	62,7 $\pm$ 20,7	56,2 $\pm$ 25,8		38,2 $\pm$ 26,4	0,011	19	26	10	0,035	>61	69	80	8,8	(1,3-57,4)
CD16+	27,4 $\pm$ 12,4	30,0 $\pm$ 16,2		35,4 $\pm$ 19,5		58	62	23		>39	85	39	3,5	(1,2-10,5)
CD45RA+	28,3 $\pm$ 9,1	27,6 $\pm$ 9,0		27,9 $\pm$ 16,0		56	60	25		>27	50	51		
CD45RO+	38,4 $\pm$ 13,6	38,0 $\pm$ 15,5		44,6 $\pm$ 18,1		50	54	24		<23,5	75	48	2,8	(1,0-7,5)
CD13+	24,8 $\pm$ 12,7	25,5 $\pm$ 14,7		31,3 $\pm$ 20,3		47	57	22		>52	88	43	4,4	(1,3-14,4)
										>29	68	34		

<sup>1</sup> P-Wert, erhalten in einem Student-“t“-Test, als die mittleren % an Leukozyten-Teilmenge, gefunden in Patientinnen mit Endometriose im Stadium I-II, mit normalen Kontrollen verglichen wurden.

<sup>2</sup> P-Wert, erhalten in einem Student-“t“-Test, als die mittleren % an Leukozyten-Teilmenge, gefunden in Patientinnen mit Endometriose im Stadium III-IV, mit normalen Kontrollen verglichen wurden.

TABELLE 6

Periphere Blutleukozytenpopulationen, verwendet als Marker zum Unterscheiden zwischen Patientinnen mit Endometriose im Stadium I-II oder Stadium III-IV und normalen Subjekten

Leukozyten- Teilungen	mittlerer Anteil (% $\pm$ s.d.) der Leukozyten-Teilungen			Zahl der untersuchten Proben			Fläche unter der ROC- Kurve	P	Grenz- punkt	Spezifi- tät	Sensiti- vität	Chancen- verhältnis	(CI) <sup>4</sup>
	Kontrollen	Endo Stadium I- II	P <sup>1</sup>	Endo Stadium III- IV	P <sup>2</sup>	Kontrolle	Endo I-II	Endo III-IV					
CD3-CD57+CD44-	12,5 $\pm$ 6,2	14,9 $\pm$ 7,5	0,030	12,2 $\pm$ 6,9		84	81	33	>15,6	74	43	2,1	(1,1-4,1)
CD14-CD13-HLADR-	85,6 $\pm$ 5,0	87,6 $\pm$ 3,9	0,016	85,9 $\pm$ 3,3		77	54	28	>88,3	74	47	2,6	(1,1-5,3)
CD14-CD20+CD44- HLADR+	5,7 $\pm$ 2,9	4,7 $\pm$ 2,6	0,043	5,6 $\pm$ 2,7		65	50	23	<4,5	66	53	2,2	(1,0-4,7)
CD3+CD8-	21,6 $\pm$ 6,0	21,7 $\pm$ 6,6		23,8 $\pm$ 6,7	0,037	120	102	52	>24,5	73	45	2,2	(1,1-4,5)
CD3+CD44-	49,9 $\pm$ 8,5	49,0 $\pm$ 9,2		46,3 $\pm$ 8,8	0,012	122	113	53	<51,5	48	85	5,2	(2,2-12,1)
CD3+HLADR-	60,2 $\pm$ 8,6	59,2 $\pm$ 8,8		57,2 $\pm$ 8,0	0,047	111	98	45	<61,2	51	73	2,8	(1,3-6,1)
CD3+ALADR+	63,3 $\pm$ 8,7	63,0 $\pm$ 9,1		59,6 $\pm$ 7,9	0,009	121	102	52	<63,5	55	73	3,2	(1,5-6,6)
CD3+CD16+	18,1 $\pm$ 5,8	18,7 $\pm$ 6,5		20,8 $\pm$ 6,9	0,010	121	102	52	>21,5	73	45	2,3	(1,1-4,6)
CD3-CD57-	9,3 $\pm$ 13,3	8,4 $\pm$ 12,1		6,0 $\pm$ 4,3	0,016	123	113	53	>3,7	31	81		
CD4-HLADR+	28,3 $\pm$ 6,9	29,0 $\pm$ 7,2		32,3 $\pm$ 9,5	0,004	113	101	45	>28	53	71	2,7	(1,2-5,7)
CD4+CD45RA-	19,8 $\pm$ 6,0	19,8 $\pm$ 6,2		22,0 $\pm$ 6,6	0,036	112	96	49	>19,3	48	67		
CD4+CD45RO+	31,4 $\pm$ 8,1	29,7 $\pm$ 7,2		27,7 $\pm$ 8,5	0,006	125	114	54	<29,5	60	60	2,3	(1,2-4,5)
CD13-CD16+	19,5 $\pm$ 5,6	20,5 $\pm$ 6,4		16,2 $\pm$ 4,3	0,029	27	31	19	<19,8	50	90	8,5	(1,6-44,5)
	18,9 $\pm$ 8,2	16,8 $\pm$ 8,7		14,3 $\pm$ 3,1	0,035	21	28	9	<13	86	56	7,5	(1,2-45,1)

Leukozyten-Teilmenge	mittlerer Anteil (% $\pm$ s.d.) der Leukozyten-Teilmenge				Zahl der untersuchten Proben			Fläche unter der ROC-Kurve	P	Grenzwert	Spezifität	Sensitivität	Chancenverhältnis	(CI) <sup>4</sup>
	Kontrollen	Endo Stadium I-II	P <sup>1</sup>	Endo Stadium III-IV	P <sup>2</sup>	Kontrolle	Endo I-II	Endo III-IV						
CD14-CD69-	81,0 $\pm$ 6,1	77,4 $\pm$ 9,1		76,0 $\pm$ 6,7	0,031	20	32	14	0,729	0,025	50	86	6,0	(1,1-34,0)
CD20-HLADR-	79,3 $\pm$ 5,2	78,5 $\pm$ 7,0		77,1 $\pm$ 6,6	0,025	106	97	44	0,573		41	72		
CD57-CD44+	17,2 $\pm$ 5,5	18,3 $\pm$ 6,4		19,7 $\pm$ 7,7	0,046	84	82	35	0,573		80	40	2,7	(1,1-6,7)
CD3-CD4+CD45RA-	6,9 $\pm$ 4,4	6,4 $\pm$ 4,0		5,4 $\pm$ 3,5	0,043	122	109	50	0,587		59	61	2,3	(1,1-4,5)
CD3-CD8-CD44+	37,2 $\pm$ 11,9	37,2 $\pm$ 12,7		43,2 $\pm$ 12,6	0,019	87	80	32	0,588		54	63		
CD3-CD57-CD44+	38,5 $\pm$ 12,1	40,3 $\pm$ 12,5		44,0 $\pm$ 12,7	0,029	84	81	33	0,575		63	58		
CD14+CD20+CD44+	2,1 $\pm$ 1,3	2,1 $\pm$ 1,5		1,4 $\pm$ 0,7	0,001	65	52	23	0,647		39	91	6,4	(1,3-30,9)

<sup>1</sup> P-Wert, erhalten in einem Student- $t^*$ -Test, als der mittlere Anteil, gefunden in Patientinnen mit Endometriose im Stadium I-II, mit normalen Kontrollen verglichen wurde.

<sup>2</sup> P-Wert, erhalten in einem Student- $t^*$ -Test, als die % Leukozyten-Teilmenge, gefunden in Patientinnen mit Endometriose im Stadium III-IV, mit normalen Kontrollen verglichen wurden.

**[0033]** Grenzpunkte, etabliert für jeden einzelnen Marker, sind in Tabelle 3, 4, 5, 6 dargestellt, und Schwellenwerte, etabliert für eine bestimmte Markerkombination, sind in Tabelle 1 dargestellt. Beliebige andere Grenzpunkte oder Schwellenwerte, die einen nützlichen diagnostischen Test für Endometriose bereitstellen, sollen in die vorliegende Anmeldung eingeschlossen sein.

**[0034]** Gemäß der vorliegenden Erfindung wird eine Reihe von 34 verschiedenen Kombinationen von endometrialen Leukozytenmarkern (Tabellen 1 und 2), 7 Kombinationen von Blutleukozytenmarkern (Tabelle 1) und 4 Kombinationen von endometrialen und Blutleukozytenmarkern bereitgestellt, wodurch ein diagnostischer Test mit Sensibilitäts- und Spezifitätsleveln von bis zu 89 bzw. 90 % bereitgestellt wird. Die verschiedenen Markerkombinationen der vorliegenden Erfindung können mehreren wichtigen klinischen Bedürfnissen dienen. Diese Marker könnten folglich in der normalen Bevölkerung verwendet werden, um den Risikofaktor für die Entwicklung von Endometriose zu evaluieren oder um Frauen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit dafür, an der Krankheit zu leiden, zu identifizieren. In Patientinnen mit Endometriose könnten diese Marker darüber hinaus dazu dienen, die Krankheit zu überwachen oder eine Prognose abzugeben.

#### Studiensubjekte und -proben

**[0035]** Uterine endometriale Gewebe wurden von 146 Subjekten, die sich einer Laparoskopie oder Laparotomie unterzogen, erhalten. Die Versuchsgruppe wurde aus 88 Subjekten mit Endometriose im Stadium I–IV, bestätigt durch Laparoskopie oder Laparotomie, gebildet und die Kontrollgruppe bestand aus 58 gesunden Subjekten, die sich einer Operation zur Eileiterligatur (oder Reanastomose) unterzogen und weder klinische Anzeichen für noch eine familiäre Vorgeschichte von Endometriose hatten. Tabelle 7 gibt Details betreffend das Alter, den Menstruationszyklus und die Indikation der Laparoskopie oder Laparotomie für die Subjekte, die in die Versuchs- und Kontrollgruppen eingeschlossen waren, an.

TABELLE 7

Beschreibung der Versuchsgruppen, verwendet in der Analyse von endometrialen Leukozytenpopulationen

Versuchsgruppen	Zahl der Subjekte	mittleres Alter $\pm$ s.d.	Menstruationszyklus		Ligatur oder Reanastomose	prozentualer Anteil an Patientinnen* Indikation der Laparoskopie		andere**
			ES <sup>1</sup>	LS <sup>2</sup>		Hysterektomie und/oder Ovariektomie	diagnostische Laparoskopie	
Kontrollen	58	34,2 $\pm$ 5,3	54,5%	45,5%	100%			
Endometriose I–IV	88	34,4 $\pm$ 6,8	47,0%	53,0%	21,6%	22,7%	52,3%	3,4%
Stadium I–II	63	34,4 $\pm$ 7,3	50,9%	49,1%	28,6%	22,2%	47,7%	1,5%
Stadium III–IV	25	34,4 $\pm$ 5,4	36,4%	63,6%	4,0%	24,0%	64,0%	8,0%

<sup>1</sup> Früh-sekretorisch (Tage 14–21)

<sup>2</sup> Spät-sekretorisch (Tage 22–28)

\* % Patientinnen innerhalb der Kontroll- oder Endometriosegruppen

**[0036]** Endometriale Biopsien wurden mit einer Pipettenkürette (Milex) entnommen (näherungsweise 0,5 g Gewebe). Alle Proben wurden in der sekretorischen Phase (Tag 14–28) des Menstruationszyklus geerntet, wie durch histologische Bewertung bestätigt. Die Proben wurden in steriles RPMI-1640-Medium (Gibco), supplementiert mit 2 % Hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (Bio-Media) und 1 % Penicillin-Streptomycin, gemischt und bis zur Zellisolation bei 4°C gehalten.



**[0037]** Blutproben wurden aus 172 Subjekten mit Endometriose (Stadium I–IV), bestätigt durch Laparoskopie oder Laparotomie, und aus 132 gesunden Subjekten ohne Anzeichen für Endometriose bei einer Operation und ohne eine familiäre Vorgeschichte von Endometriose erhalten. Die Blutproben (30 ml) wurden in Heparin-Röhrchen (Vacutainer™, Becton Dickinson) gesammelt und bis zur Abtrennung mononukleärer Zellen bei 20°C gehalten. Das Alter, die Menstruationsdatierung und die Indikation für die Laparoskopie der Subjekte, die in der Studie eingeschlossen waren, sind in Tabelle 8 angegeben.

TABELLE 8

Beschreibung der Subjekte, eingeschlossen in die Studie von peripheren mononukleären Blutleukozyten

Versuchsgruppen	Zahl der Subjekte	mittleres Alter $\pm$ s.d.	Menstruationszyklus		Ligatur oder Reanastomose	prozentualer Anteil an Patientinnen** Indikation der Laparoskopie		andere**
			proliferativ*	sekretorisch*		Hysterektomie und/oder Ovariektomie	diagnostische Laparoskopie	
Kontrollen	132	34,30 $\pm$ 5,5	43,8%	56,2%	100%			
Endometriose I–IV	172	36,40*	42,8%	57,2%	22,1%	33,7%	38,9%	5,3%
Stadium I–II	116	35,96 $\pm$ 6,39	41,0%	59,0%	31,1%	30,2%	37,1%	1,6%
Stadium III–IV	56	34,30 $\pm$ 5,5	46,2%	53,8%	3,6%	41,1%	42,9%	12,4%

\* P versus normal = 0,002

\*\* % der Patientinnen innerhalb der Kontroll- oder Endometriosegruppen

#### Stromazellpräparation aus endometrialen Proben

**[0038]** Endometriale Gewebeproben wurden mechanisch mit einer Broeck-Gewebemahlvorrichtung aus Pyrex™-Glas (Fisher) aufgebrochen bzw. aufgeschlossen, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Die Stromazellfraktion wurde mittels Filtration durch ein 250  $\mu$ m-Edelstahlsieb (Millipore) zum Zurückhalten der glandulären Fraktion isoliert und zweimal mit 10 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) (Sigma), enthaltend 1 % BSA (Boehringer Mannheim), 0,1 % Natriumazid (Fisher), (hiernach als PBS-Waschpuffer bezeichnet) gewaschen.

#### Isolation mononuklearer Zellen aus periphärem Blut

**[0039]** Blutproben wurden 1:1 mit Hank's ausgeglichener Salzlösung (HBSS) (Gibco) verdünnt, einem gleichen Volumen an Ficoll-Paque™ (Pharmacia Biotech) überschichtet und bei 1500 U/min für 40 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Leukozyten wurden an der Grenzfläche von Ficoll und HBSS isoliert, und sie wurden in 50 ml HBSS gewaschen. Kontaminierende rote Blutzellen wurden mit 6 ml Ammoniumchloridlösung (0,15 M) lysiert (6 Minuten bei Raumtemperatur). Die peripheren mononukleären Blutzellen wurden dann zweimal in 10 ml PBS gewaschen und in PBS-Waschpuffer resuspendiert.

#### Färbung der Oberflächenantigene von endometrialen und peripheren Blutleukozyten

**[0040]** Endometriale Stromazellen oder periphere mononukleäre Blutzellen wurden in 5 ml-Röhrchen (1 bis  $1,5 \times 10^6$  Zellen/Röhrchen) bzw. in 96-Well-Platten ( $5 \times 10^5$  Zellen/Well) verteilt und in Gegenwart von 1  $\mu$ g humanem  $\gamma$ -Globulin für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden dann 30 Minuten im Dunklen (bei Raumtemperatur für endometriale Zellen und bei 4°C für periphere mononukleäre Blutzellen) mit

einem Panel von 4 verschiedenen monoklonalen Maus-Antikörpern (MAbs) in einem Gesamtvolumen von 100 µl inkubiert. Die Zellproben wurden mit Maus-Anti-Human-CD45-MAbs, konjugiert mit Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), und mit mehreren Sätzen von drei unterschiedlichen Maus-MAbs, markiert mit verschiedenen Fluorochromen (Fluoresceinisothiocyanat-FITC-, Phycoerythrin-PE oder mit Phycoerythrin-Texasrot-ECD-), gerichtet gegen Zelloberflächenmarker für spezifische Zellpopulationen, wie z.B. T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen, Makrophagen und/oder Aktivierungsmarker (Tabelle 9), gefärbt.

TABELLE 9

Beschreibung von monoklonalen Maus-Antikörpern, verwendet zur Immunphänotypisierung

Spezifität	Klon	Isotyp	Lieferant	Fluorochrom
CD3	HIT3A	Maus-IgG2a	Beckman/Coulter	ECD
CD4	SK3	Maus-IgG1	Becton Dickinson	PE
CD5	BL1A	Maus-IgG2a	Beckman/Coulter	FITC
CD8	SK1	Maus-IgG1	Becton Dickinson	PE
CD13	SJ1D1	Maus-IgG1	Beckman/Coulter	RPE
CD14	RM052	Maus-IgG2a	Beckman/Coulter	PE
CD16	NKP15	Maus-IgG1	Becton Dickinson	FITC
CD16B	Id3	Maus-IgM	Beckman/Coulter	FITC
CD20	H299	Maus-IgG2a	Beckman/Coulter	RDI
CD36	SMf	Maus-IgM	Sigma	RPE
CD44	L178	Maus-IgG1	Becton Dickinson	FITC
CD45	2DI	Maus-IgG1	Becton Dickinson	PerCP
CD45-RA	ALB11	Maus-IgG1	Beckman/Coulter	FITC
CD45-RO	UCHL1	Maus-IgG2a	Beckman/Coulter	FITC
CD56	N901(NKH-1)	Maus-IgG1	Beckman-Coulter	PE
CD57	VC1.1	Maus-IgM	Sigma	RPE
CD69	L78	Maus-IgG1	Becton Dickinson	FITC
CD122	2RB	Maus-IgG1	Beckman/Coulter	FITC
HLA-DR	L243	Maus-IgG2a	Becton Dickinson	FITC

**[0041]** Die unten stehende Tabelle 10 listet die Verteilung der in Tabelle 9 aufgelisteten Antigene auf.

TABELLE 10

## Hauptverteilung von Antigenen

Antigen	Hauptzellverteilung
CD3	Exprimiert auf allen reifen T-Zellen, assoziiert mit dem TCR-Komplex ( $\alpha/\beta$ , $\gamma/\delta$ ).
CD4	Exprimiert auf T-Helfer-Lymphozyten. Es kann auch auf Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie exprimiert sein.
CD5	Gefunden auf allen reifen T-Lymphozyten und einer Teilmenge von B-Lymphozyten.
CD8	Gefunden auf einer Teilmenge von T-Lymphozyten, bezeichnet als Suppressor-/zytotoxische T-Zellen.
CD13	Detektiert auf den meisten Zellen myeloiden Ursprungs, polymorphonukleären Zellen oder Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie. Mitglied der Metalloproteinasefamilie.
CD14	Stark exprimiert auf der Oberfläche von Monozyten. Gefunden auf den meisten Gewebsmakrophagen. Schwach exprimiert auf der Oberfläche von Granulozyten und B-Lymphozyten. Rezeptor für Lipopolysaccharid (LPS) und LPS-Bindungsprotein
CD16	Hauptsächlich exprimiert auf NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen und polymorphonukleären Leukozyten. Rezeptor niedriger Affinität für IgG.
CD16b	Gefunden auf Granulozyten, einschließlich polymorphonukleärer Zellen (PMN).
CD20	Auf allen B-Lymphozyten vorhanden.
CD36	Exprimiert auf Blutplättchen, Monozyten oder Makrophagen, mikrovaskulären Endothelzellen, Brustdrüsenendothelzellen, während Stadien der Entwicklung erythroider Zellen.
CD44	Weithin exprimiert auf der Oberfläche der meisten Zelltypen. Einschließlich der meisten Leukozyten und Epithelzellen. Familie des "Core/Link"-Peptidoglycans.
CD45	Auf der Oberfläche aller Leukozyten vorhanden.
CD45RA	Isoformen von CD45. Gefunden auf naiven/ruhenden T-Zellen. Auch auf B-Lymphozyten und Monozyten exprimiert.
CD45RO	Isoformen von CD45, exprimiert auf Gedächtnis-/aktivierten T-Zellen, auch auf Monozyten exprimiert.
CD56	Marker für NK-Zellen. Kann auch auf einer Population von T-Lymphozyten gefunden werden.
CD57	Gefunden auf einer Teilmenge von Zellen mit natürlicher Killer-Aktivität.
CD69	Exprimiert auf aktivierten Leukozyten, einschließlich T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Neutrophilen, Eosinophilen und Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie. Aktivierungsmarker, früh nach einer Zellaktivierung detektiert.
CD122	Exprimiert auf NK-Zellen, B-, T-Lymphozyten oder Monozyten/Makrophagen. Komponente des IL-15-Rezeptors.
HLADR+	HLA-Klasse II-Molekül. Gefunden auf Antigen-präsentierenden Zellen oder auf anderen Zellen nach Aktivierung, wie z.B. T-Zellen.

**[0042]** Blutzellen wurden zweimal mit 0,15 ml PBS-Waschpuffer gewaschen.

**[0043]** Endometriale Zellenproben wurden mit einer rote Blutzellenlysisierenden Lösung (FACS™-Lysierlösung, Becton Dickinson) für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und mit 3 ml PBS-Waschpuffer gewaschen. Endometriale und Blutzellen wurden in 1 % Paraformaldehyd (verdünnt in PBS) bei einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml fixiert und bei 4°C im Dunkeln gehalten, bis die Immunfluoreszenzreakti-

vität mittels Durchflusszytometrie bestimmt wurde.

#### Durchflusszytometrieanalyse

**[0044]** Die Immunfluoreszenzreaktivität wurde auf einem Coulter EPICS XL™-Durchflusszytometer (Coulter Corporation, Hialeah, FL), ausgestattet mit einem Argonlaser, der bei 488 nm, 15 mW arbeitet, und Detektoren bei 525, 575, 610 und 675 nm, durchgeführt. Die Kalibrierung der Durchflusszytometer-Parameter für Vorwärtsstreuung, Seitwärtsstreuung und Fluoreszenz waren für alle Proben die gleichen. Zellen, die CD45-pan-Leukozyten-Antigen exprimieren, wurden unter Verwendung der Coulter-System II-Software eingegrenzt ("gated"). Der Prozentsatz an Zellen, die Marker für T-, B-Lymphozyten, Makrophagen oder NK-Zellen und/oder Aktivierungsmarker tragen, wurde nur innerhalb der CD45-positiven Populationen ausgewertet. Für jede Probe wurde ein Minimum von 6000 CD45+-Zellen analysiert.

**[0045]** Verwendung von Leukozytenmarkern in einem diagnostischen Test für Endometriose Ein Grenzpunkt wurde für den Anteil der endometrialen oder Blutleukozyten-Subpopulationen, identifiziert als diagnostische Marker, etabliert. Der für jeden Marker erhaltene Wert wird mit dem Grenzpunkt verglichen ([Fig. 1](#)). Ein positives Ergebnis lag vor, wenn der Anteil einer bestimmten Leukozytenteilmenge die durch den Grenzpunkt etablierte Bedingung erfüllt (z.B. < 40 % für CD3+-Zellen). Wenn diese Marker in Kombination verwendet werden, ergibt ein positives Ergebnis für jeden Marker eine Bewertung von 1, während ein negatives Ergebnis eine Bewertung von 0 ergibt. Eine Diagnose der Endometriose liegt vor, wenn der diagnostische Endwert, erhalten aus dem Addieren der Ergebnisse aller Marker einer bestimmten Kombination, höher ist als ein vorher festgelegter Schwellenwert. Die Sensibilitäts- und/oder Spezifitätslevel, gemessen für die Markerkombination, geben die Zahl positiver Testergebnisse, erhalten unter Patientinnen mit bereits bestätigter Endometriose, bzw. die Zahl negativer Testergebnisse unter den Subjekten innerhalb der Kontrollgruppe wieder.

**[0046]** Endometriale und Blutleukozytenmarker können in Kombinationen im logistischen Regressionsmodell verwendet werden.

$$P(r) = \frac{e^{c+B1*(Marker\ 1)+B2*(Marker\ 2)+...Bn*(Marker\ n)}}{1 + e^{c+B1*(Marker\ 1)+B2*(Marker\ 2)+...Bn*(Marker\ n)}}$$

worin:

P(r) = Wahrscheinlichkeit dafür, Endometriose zu haben;  
 c = Konstante, etabliert für eine bestimmte Kombination;  
 B = Regressionskoeffizient;  
 n = Gesamtzahl der Marker in der Kombination

**[0047]** Die Wahrscheinlichkeit dafür, Endometriose zu haben, (P(r)) wird dann mit einem Schwellenwert verglichen, der den besten Unterscheidungswert bereitstellt. Eine positive Diagnose der Endometriose liegt vor, wenn der P(r)-Wert den für eine bestimmte Kombination von Marker etablierten Schwellenwert überschreitet. Alternativ liegt eine negative Diagnose der Endometriose vor, wenn der P(r)-Wert niedriger ist als der Schwellenwert.

#### Ergebnisse

**[0048]** Endometriale und Blutleukozyten-Teilmenen, definiert als gute potentielle Marker für die Diagnose der Endometriose, sind in den Tabellen 3 bzw. 4 angegeben. Die Selektion dieser Marker erfolgte auf der Basis eines bedeutsamen Unterschiedes im mittleren Anteil von Leukozyten-Teilmenen zwischen Patientinnen mit Endometriose (Stadium I–IV) und Kontrollgruppen. Zusätzlich wurden auch mehrere endometriale und Blutmarker gemäß der Fläche unter der ROC-Kurve, eine Angabe des Unterscheidungswerts der Marker, selektiert. Die ROC-Kurve ermöglichte die Bestimmung von einem oder mehreren Grenzteilen ("cutoff proportion"), die am besten zwischen Patientinnen mit Endometriose (Stadium I–IV) und normalen Kontrollen unterscheiden. In einem Ansatz, diese Unterschiede zum Identifizieren von Patientinnen mit Endometriose zu verwenden, lag ein positives Testergebnis vor, wenn der für eine bestimmte Leukozytenteilmenge gemessene Anteil die durch den Grenzpunkt etablierte Bedingung (z.B. <40 % für CD3+-Zellen) erfüllt. Die Spezifitäts- und Sensibilitätslevel wurden für jeden Marker, der alleine zur Diagnose von Endometriose verwendet wurde, berechnet und sind in Tabelle 3 (für endometriale Leukozytenmarker) und Tabelle 4 (für Blutleukozytenmarker) angegeben. Darüber hinaus gab ein signifikantes Chancenverhältnis ("odds ratio"), berechnet mit einem bestimmten Grenzpunkt, einen weiteren Hinweis darauf, dass die Leukozytenmarker, selektiert in den Tabellen 3

und 4, mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Endometriose assoziiert sind und folglich zum Identifizieren von Frauen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit dafür, an Endometriose zu leiden, verwendet werden können. Es wurde gefunden, dass der mittlere Anteil einiger endometrialer (Tabelle 5) und Blut- (Tabelle 6) Leukozyten-Teilmenge nur in Patientinnen mit Endometriose im Stadium I-II oder mit Endometriose im Stadium III-IV signifikant moduliert war, wenn mit normalen Kontrollen verglichen wurde. Trotzdem bleiben diese Marker gute Kandidaten für einen diagnostischen Test für Endometriose, aber ihre Verwendung kann auf ein spezifisches Stadium der Krankheit beschränkt sein.

**[0049]** Es wurde gefunden, dass mehrere der endometrialen und Blutleukozytenmarker als diagnostische Marker sogar noch verlässlicher sind, wenn sie in Kombination mit anderen Marker analysiert werden. Tabelle 1 gibt eine Reihe von 33 Kombinationen an, in denen endometriale oder Blutleukozytenmarker in einem diagnostischen Test für Endometriose verwendet werden. Für jeden Marker ergibt ein positives Testergebnis (wie oben beschrieben) eine Bewertung von 1, während ein negatives Testergebnis eine Bewertung von 0 ergibt. Der diagnostische Endwert, erhalten durch Addieren der Bewertungen aller Marker einer bestimmten Kombination, wird dann mit einem Schwellenwert verglichen, der in Tabelle 1 angegeben ist.

**[0050]** Eine Diagnose der Endometriose liegt vor, wenn der diagnostische Wert den Schwellenwert überschreitet, der für jeden Satz von Kombinationsmarkern etabliert wurde. Die Verwendung von Leukozytenmarker-Teilmenge in Kombination in diesem neuen Verfahren verbessert die Sensibilitäts- und/oder Spezifitätslevel für das Diagnostizieren von Endometriose klar. Tabelle 1 stellt auch vier Beispiele bereit, die zeigen, dass Blutleukozytenmarker, wenn sie in Kombination mit endometrialen Marker verwendet werden, auch den Vorhersagewert des diagnostischen Tests erhöhen können.

**[0051]** Die vorliegende Erfindung demonstriert auch, dass logistische Regressionsmodelle verwendet werden können, um endometriale, wie auch Blutleukozytenmarker für die Entwicklung eines Vorhersagemodells für Endometriose zu kombinieren (Tabelle 2). In manchen Fällen ist es nötig, diese Modelle mit Risikofaktoren, die mit Endometriose assoziiert sind, wie z.B. die Länge des Menstruationszyklus, die Dauer der Menstruation, Schmerzen während Geschlechtsverkehr und Alter, anzupassen. In manchen Fällen wurde gezeigt, dass diese Faktoren den Vorhersagewert des Modells erhöhen.

**[0052]** Die vorliegende Erfindung identifiziert mehrere Beispiele für Markerkombinationen, die zu Diagnoseverfahren (ihnen, die verbesserte Sensibilitäts- und Spezifitätslevel ergeben. Tatsächlich können die verschiedenen Markerkombinationen der vorliegenden Erfindung verschiedenen klinischen Anwendungen, einschließlich Screening, Diagnose, Überwachung und Prognose der Endometriose, dienen.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Feststellung von Endometriose in einer Probe von eutopischen uterinen endometrialen Geweben oder einer Blutprobe eines weiblichen Subjekts, umfassend:

a) Messen eines quantitativen Levels von wenigstens zwei verschiedenen Oberflächenantigenen aus Blutleukozyten und/oder eutopischen endometrialen Leukozyten in der Probe, wobei die Oberflächenantigene aus Blutleukozyten und/oder eutopischen endometrialen Leukozyten aus den in der nachstehenden Tabelle definierten Leukozytenmarkerkombinationen ausgewählt werden:

Leukozytenmarkerkombinationen
Endometriale leukozytenmarker
<p>CD4+, CD8+CD69–, und CD13+CD45RO–  CD4+, CD8+CD69–, CD56+CD122–, CD3+CD45RA–, und CD13+CD45RO–,  CD4+, CD8+CD69–, CD13–CD122+, und CD13+CD45RO–  CD4+ CD8+CD69–, und D14+CD13–CD16b–  CD3+CD16–, CD13+CD45RO–, CD3+, CD8+, und CD3+CD69+  CD3+, CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, und CD3–CD20–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD3+CD5+, CD3+CD122–, CD3–CD20–, und CD3+CD45RO–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD3+CD5+, und CD3+CD122–  CD3+CD20–CD5–, CD4+CD13–, und CD56–CD122–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD4+CD45RA–, und CD3+CD45RO–  CD3+, CD8+CD69–, CD3–CD4–CD45RO+, Verhältnis CD13+/CD3+, und CD13+CD45RO–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD3–CD5–, und CD20–CD5+  CD8+, CD5+, CD3–CD20–, und CD3–HLADR–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, and CD5+  CD4+, CD13–CD122+, CD8+CD69–, und CD3+CD45RA–  CD4+, CD8+CD69–, CD13–CD122+, CD3+CD45RA–, und CD13+CD45RO–  CD4+, CD8+CD69–, CD56–CD122–, CD3+CD45RA–, CD13+CD45RO–  CD3+, CD4+, CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, und CD3+CD5+  CD3+, CD4+, CD3+CD8+, und CD13+CD45RO–  CD3+, CD3+CD8+, und CD13+CD45RO–  CD3+, CD5+, CD3+CD5+, CD69+, und CD4–CD69+  CD3+, CD3+CD8+, und CD13+CD45RO–  CD3+, CD3+CD8+, und CD13+CD45RO–  CD3+, CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD3–CD20–, und CD56–CD16–  CD3+CD16–, CD3–CD4–CD45RO+, CD3+, CD8+, CD3+CD69+, und CD13+CD45RO–  CD3+, CD3–CD45RO+, Verhältnis CD13+/CD3+, CD3+CD8+, und CD8+CD69–  CD3+CD20–CD5–, CD4+CD13–, CD56–CD122–, und CD4+CD45RO–  CD3+, CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, und CD3–CD20–  CD13+CD45RO–, CD4+CD45RA–, CD3+CD122–, und CD8+CD69–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD4+CD45RA–, CD3+CD45RO–, und CD3–CD5–  CD3+, CD3–CD5–, CD13+CD45RO–, und CD3–CD20–  CD3+, CD3–CD5–, und CD13+CD45RO–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, und CD3+CD5+  CD3+ und CD13+CD20.</p>
Blutleukozytenmarker
<p>CD3–CD5+, CD3–CD45RA–, CD3–CD44+, CD13+, und CD3–CD57–CD44–  CD3–CD45RA–, CD20–CD44+, CD20–HLADR+, CD3–CD4–CD44+, und CD36–HLADR+  CD3–CD45RA–, CD3–CD45RO+, und CD20–HLADR+  CD14+CD44+, CD57+, CD3–CD45RA, und CD14+  CD14+, CD57+, CD3+CD69+, CD3+HLADR+, and CD3–CD45RA–  CD14+, CD57+, CD3+HLADR– und CD3–CD45RA–  CD14+, CD57+, CD3+CD69+, CD3+HLADR–, CD3–CD45RA–</p>
Blut- (in Kursivschrift) und endometriale leukozytenmarker
<p>CD57+, CD14+, CD3–CD69+, CD3+, CD4+, und CD3+CD8+HLADR–  CD3–CD69+, CD3+, CD4+, und CD3+CD8+HLADR–  CD4–CD36+, CD3–CD69+, CD8+, CD13+, CD3+, CD16+, CD69+, und CD5+  CD3–CD45RA–, CD3–CD45RO+, CD20–HLADR+, CD14+CD44+, CD8+, CD5+, CD3–CD20–, und  CD3–HLADR–</p>

wobei die Messung des quantitativen Levels der Kombination der endometriale Leukozytenmarker CD3+, CD13+CD20 mit der Länge der Menstruation (> 7 Tage) und Beckenschmerzen zu jeder beliebigen Zeit, außer der Menstruation und dem Geschlechtsverkehr, assoziiert ist; die Messung des quantitativen Levels der Kombination der Blutleukozytenmarker CD14+, CD57+, CD3+HLADR–, CD3–CD45RA– mit Beckenschmerzen zu jeder beliebigen Zeit, außer der Menstruation und dem Geschlechtsverkehr, und der Länge der Menstruation

(> 7 Tage) assoziiert ist; und die Messung des quantitativen Levels der Kombination der Blutleukozytenmarker CD14+, CD57+, CD3+CD69+, CD3+HLADR-, CD3-CD45RA- mit Beckenschmerzen zu jeder beliebigen Zeit, außer der Menstruation und dem Geschlechtsverkehr, und Alter > 40 assoziiert ist,

b) Etablieren eines Grenzwertes für den Anteil jedes Leukozytenmarkers in der Kombination,

c) Vergleichen des in Stufe (b) für jeden Leukozytenmarker erhaltenen Anteils mit einem vorher festgelegten Grenzwert, wobei ein positives Ergebnis eine Bewertung von 1 ergibt, während ein negatives Ergebnis eine Bewertung von 0 ergibt,

d) Erhalten eines diagnostischen Werts durch Addieren der Bewertungen aller Marker der Kombination und Umwandeln in eine Prozentzahl,

e) Vergleichen des diagnostischen Endwertes mit einem etablierten Schwellenwert, wobei eine positive Diagnose der Endometriose vorliegt, wenn der diagnostische Endwert den für die Kombination von Leukozytenmarkern etablierten Schwellenwert überschreitet, während eine negative Diagnose der Endometriose vorliegt, wenn der diagnostische Endwert niedriger als der für die Kombination von Leukozytenmarkern etablierte Schwellenwert ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Anteil an Leukozytenmarker bestimmt wird, indem wenigstens ein Antikörper, der für die wenigstens eine spezifische Population von Leukozyten spezifisch ist, verwendet wird.

3. Verfahren zur Feststellung von Endometriose in einer Probe von eutopischen uterinen endometrialen Geweben oder einer Blutprobe eines weiblichen Subjekts, umfassend:

a) Messen eines quantitativen Levels von wenigstens zwei verschiedenen Oberflächenantigenen aus Blutleukozyten und/oder eutopischen endometrialen Leukozyten in der Probe, wobei die Oberflächenantigene aus Blutleukozyten und/oder eutopischen endometrialen Leukozyten aus den in der nachstehenden Tabelle definierten Leukozytenmarkerkombinationen ausgewählt werden:

Leukozytenmarkerkombinationen
Endometriale leukozytenmarker
<p>CD4+, CD8+CD69–, und CD13+CD45RO–  CD4+, CD8+CD69–, CD56+CD122–, CD3+CD45RA–, und CD13+CD45RO–,  CD4+, CD8+CD69–, CD13–CD122+, und CD13+CD45RO–  CD4+ CD8+CD69–, und D14+CD13–CD16b–  CD3+CD16–, CD13+CD45RO–, CD3+, CD8+, und CD3+CD69+  CD3+, CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, und CD3–CD20–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD3+CD5+, CD3+CD122–, CD3–CD20–, und CD3+CD45RO–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD3+CD5+, und CD3+CD122–  CD3+CD20–CD5–, CD4+CD13–, und CD56–CD122–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD4+CD45RA–, und CD3+CD45RO–  CD3+, CD8+CD69–, CD3–CD4–CD45RO+, Verhältnis CD13+/CD3+, und CD13+CD45RO–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD3–CD5–, und CD20–CD5+  CD8+, CD5+, CD3–CD20–, und CD3–HLADR–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, und CD5+  CD4+, CD13–CD122+, CD8+CD69–, und CD3+CD45RA–  CD4+, CD8+CD69–, CD13–CD122+, CD3+CD45RA–, und CD13+CD45RO–  CD4+, CD8+CD69–, CD56–CD122–, CD3+CD45RA–, CD13+CD45RO–  CD3+, CD4+, CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, und CD3+CD5+  CD3+, CD4+, CD3+CD8+, und CD13+CD45RO–  CD3+, CD3+CD8+, und CD13+CD45RO–  CD3+, CD5+, CD3+CD5+, CD69+, und CD4–CD69+  CD3+, CD3+CD8+, und CD13+CD45RO–  CD3+, CD3+CD8+, und CD13+CD45RO–  CD3+, CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD3–CD20–, und CD56–CD16–  CD3+CD16–, CD3–CD4–CD45RO+, CD3+, CD8+, CD3+CD69+, und CD13+CD45RO–  CD3+, CD3–CD45RO+, Verhältnis CD13+/CD3+, CD3+CD8+, und CD8+CD69–  CD3+CD20–CD5–, CD4+CD13–, CD56–CD122–, und CD4+CD45RO–  CD3+, CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, und CD3–CD20–  CD13+CD45RO–, CD4+CD45RA–, CD3+CD122–, und CD8+CD69–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, CD4+CD45RA–, CD3+CD45RO–, und CD3–CD5–  CD3+, CD3–CD5–, CD13+CD45RO–, und CD3–CD20–  CD3+, CD3–CD5–, und CD13+CD45RO–  CD3+CD8+, CD13+CD45RO–, und CD3+CD5+  CD3+ und CD13+CD20</p>
Blutleukozytenmarker
<p>CD3–CD5+, CD3–CD45RA–, CD3–CD44+, CD13+, und CD3–CD57–CD44–  CD3–CD45RA–, CD20–CD44+, CD20–HLADR+, CD3–CD4–CD44+, und CD36–HLADR+  CD3–CD45RA–, CD3–CD45RO+, und CD20–HLADR+  CD14+CD44+, CD57+, CD3–CD45RA, und CD14+  CD14+, CD57+, CD3+CD69+, CD3+HLADR+, und CD3–CD45RA–  CD14+, CD57+, CD3+HLADR–, CD3–CD45RA–  CD14+, CD57+, CD3+CD69+, CD3+HLADR–, CD3–CD45RA–</p>
Blut- (in Kursivschrift) und endometriale Leukozytenmarker
<p>CD57+, CD14+, CD3–CD69+, CD3+, CD4+, und CD3+CD8+HLADR–  CD3–CD69+, CD3+, CD4+, und CD3+CD8+HLADR–  CD4–CD36+, CD3–CD69+, CD8+, CD13+, CD3+, CD16+, CD69+, und CD5+  CD3–CD45RA–, CD3–CD45RO+, CD20–HLADR+, CD14+CD44+, CD8+, CD5+, CD3– CD20–, und  CD3–HLADR–</p>

wobei die Messung des quantitativen Levels der Kombination der endometrialen Leukozytenmarker CD3+, CD13+CD20 mit der Länge der Menstruation (> 7 Tage) und Beckenschmerzen zu jeder beliebigen Zeit, außer der Menstruation und dem Geschlechtsverkehr, assoziiert ist; die Messung des quantitativen Levels der Kombination der Blutleukozytenmarker CD14+, CD57+, CD3+HLADR–, CD3– CD45RA– mit Beckenschmerzen zu



jeder beliebigen Zeit, außer der Menstruation und dem Geschlechtsverkehr, und der Länge der Menstruation (> 7 Tage) assoziiert ist; und die Messung des quantitativen Levels der Kombination der Blutleukozytenmarker CD14+, CD57+, CD3+CD69+, CD3+HLADR–, CD3–CD45RA– mit Beckenschmerzen zu jeder beliebigen Zeit, außer der Menstruation und dem Geschlechtsverkehr, und Alter > 40 assoziiert ist, Etablieren eines Vorhersagemodells für Endometriose durch Einschließen jedes Markers der Kombination in die nachstehende logistische Regressionsgleichung:

$$P(r) = \frac{e^{c+B1*(Marker\ 1)+B2*(Marker\ 2)+...Bn*(Marker\ n)}}{1 + e^{c+B1*(Marker\ 1)+B2*(Marker\ 2)+...Bn*(Marker\ n)}}$$

worin:

P (r) = Wahrscheinlichkeit dafür, Endometriose zu haben;

c = Konstante, etabliert für eine bestimmte Kombination;

B = Regressionskoeffizient;

n = Gesamtzahl der Marker in der Kombination,

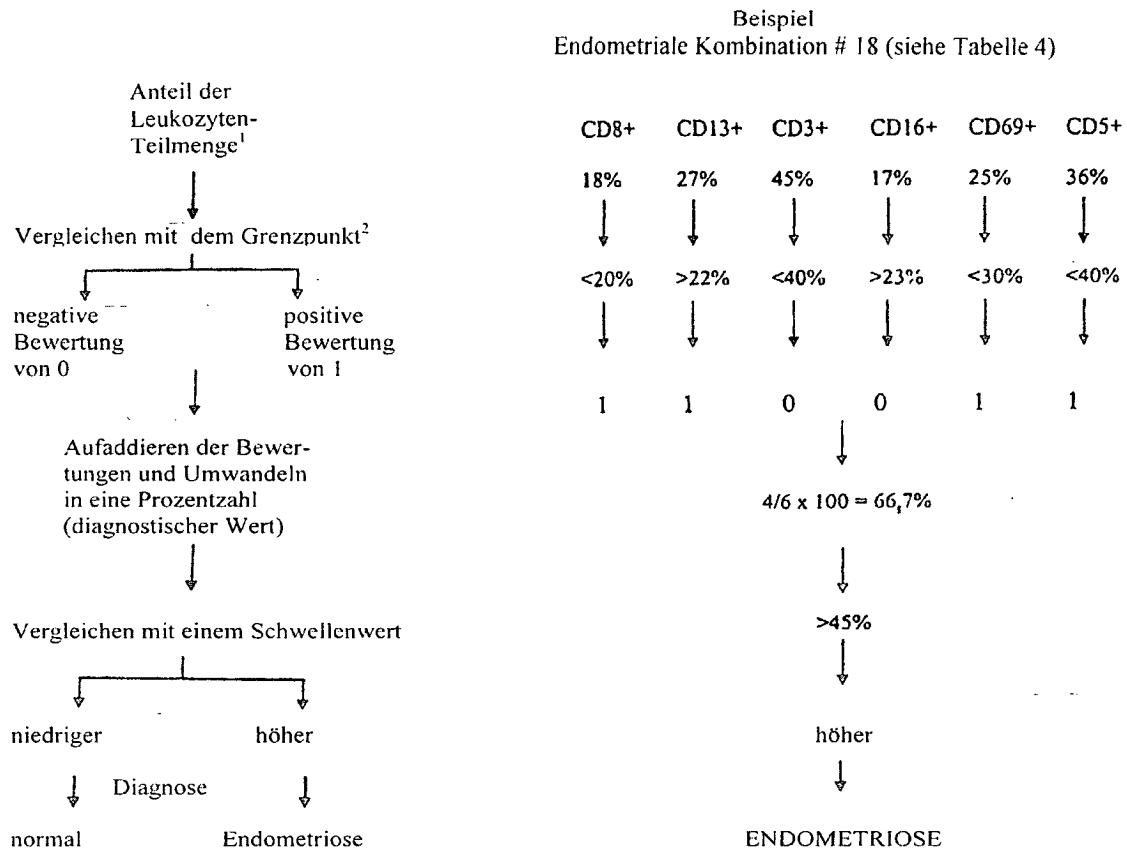
Vergleichen der Wahrscheinlichkeit dafür, Endometriose zu haben (P(r)) mit einem Schwellenwert, wobei eine positive Diagnose der Endometriose vorliegt, wenn der P (r)-Wert den für die Kombination der Marker etablierten Schwellenwert überschreitet, während eine negative Diagnose der Endometriose vorliegt, wenn der P(r)-Wert niedriger ist, als der für die Kombination der Marker etablierte Schwellenwert.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der quantitative Level gemessen wird, indem wenigstens ein Antikörper, der gegen die spezifischen Populationen von Leukozyten gerichtet ist, verwendet wird.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

## VORHERSAGEALGORITHMUS FÜR DIE DIAGNOSE VON ENDOMETRIOSE



<sup>1</sup> Anteil der Zellen, die einen spezifischen Marker exprimieren, oder einer gegebenen Teilmenge, definiert durch Marker, innerhalb der Leukozytenpopulation (CD45+) im peripheren Blut oder der stromalen Fraktion des Endometriums.

<sup>2</sup> Ein positives Testergebnis liegt vor, wenn der Anteil einer Leukozytenteilmenge die durch den Grenzpunkt etablierte Bedingung erfüllt.