

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: **A 149/2005**

(22) Anmeldetag: **31.01.2005**

(43) Veröffentlicht am: **15.08.2006**

(51) Int. Cl.⁸: **G01N 33/53 (2006.01),**

G01N 33/536 (2006.01),

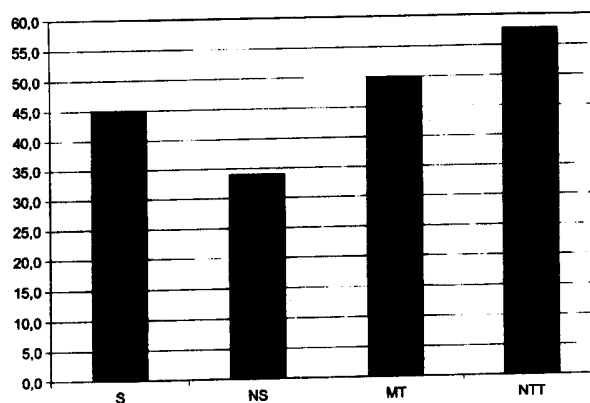
G01N 33/68 (2006.01)

(73) Patentanmelder:

VITATEQ BIOTECHNOLOGY GMBH
A-6020 INNSBRUCK (AT)

(54) **VERFAHREN ZUR TUMORDIAGNOSE**

(57) Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Diagnostizierung von Tumoren der Fortpflanzungsorgane, welches gekennzeichnet ist durch Bestimmen des Afamin- Gehalts in einer Probe einer Körperflüssigkeit oder in einer Gewebeprobe, wobei ein Tumor diagnostiziert wird, wenn der Afamin- Gehalt in der Probe im Vergleich zum Afamin- Gehalt in einer Probe von einer Person ohne einen Tumor der Fortpflanzungsorgane verringert ist.



000154

- 17 -

Zusammenfassung:

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Diagnostizierung von Tumoren der Fortpflanzungsorgane, welches gekennzeichnet ist durch Bestimmen des Afamin-Gehalts in einer Probe einer Körperflüssigkeit oder in einer Gewebeprobe, wobei ein Tumor diagnostiziert wird, wenn der Afamin-Gehalt in der Probe im Vergleich zum Afamin-Gehalt in einer Probe von einer Person ohne einen Tumor der Fortpflanzungsorgane verringert ist.

[keine Fig.]

NACHGEREICHT

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnostizierung von Tumoren der Fortpflanzungsorgane.

Tumoren in den Fortpflanzungsorganen, insbesondere Eierstock- und Hodentumoren, betreffen insbesondere junge Menschen (auch eine große Gruppe von Menschen zwischen 30 und 50). Bei den meisten dieser Tumoren ist eine frühe Diagnose für das Überleben vorrangig. Das Fortpflanzungssystem inkludiert die Gonaden - männliche Hoden und weibliche Eierstöcke und andere zugehörige Gänge und Drüsen (gonos = Samen). Diese sehen die Mittel für die Fortpflanzung, die Fortsetzung der Spezies, vor und das Weitergeben genetischen Materials an die nächste Generation.

Eierstock-Tumoren sind Blastome des Eierstocks. Jeder dritte Eierstocktumor ist ein Karzinom oder entwickelt sich zu einem solchen. Eierstockkrebs ist der fünft-häufigste Krebs bei Frauen und ist für 5% aller Krebsarten und 6% aller Krebstodesfälle bei Frauen verantwortlich. 1 von 55 Frauen wird irgendwann in ihrem Leben Eierstockkrebs bekommen. Er ist ein wesentliches Problem in der Routine-Medizin, weil die Symptome von Eierstockkrebs ähnlich jenen nicht-kanzeröser Zysten oder Tumoren sind. Eierstock-Tumoren werden üblicherweise durch bimanuelle Untersuchung, Ultraschall-Untersuchung, Computer-Tomographie, Laparoskopie und exploratorische Laparotomie diagnostiziert.

Der am besten bekannte und gut beschriebene Serum-Marker für Eierstock-Krebs ist das CA125-Antigen (Whitehouse et al., Gynecol. Oncol. 88, S152, 2003). Da das CA125-Antigen nicht nur an Eierstock-Tumorzellen exprimiert wird, sondern auch von einer Reihe anderer Zelltypen, reicht seine Spezifität und Sensivität nicht aus, um frühen Eierstockkrebs nachzuweisen, wenn es alleine verwendet wird. Verbesserungen bei der frühen Diagnose und weniger falsch-positive Ergebnisse können erreicht werden, wenn die CA125-Serum-Menge in Kombination mit anderen Markern verwendet wird.

Hodenkrebs (testicular cancer, TC) ist für etwa 1% der Neoplasmen bei Männern verantwortlich und kann Männer vom Kindesalter bis zum Greisenalter betreffen. TC ist bei Männern im Alter zwischen 15 und 35 Jahren die häufigste Malignität, der zweit-häufigste Krebs bei Männern im Alter von 35 bis 39 Jahren, und die dritt-häufigste Malignität bei Männern im Alter von 15 bis 19 Jahren. Das Auftreten von TC ist derzeit im Ansteigen mit etwa 7.000 neuen Fällen pro Jahr. In einer zwischen 1988 und

1996 durchgeführten Studie von Mitgliedern des Militärs im aktiven Dienst wurde eine 78% Steigerung an TC während dieser neunjährigen Periode beobachtet.

Hoden-Neoplasmen werden in zwei histologische Hauptgruppen klassifiziert: Keimzelltumoren (95% aller Hoden-Tumoren) und Nicht-Keimzelltumoren (4% bis 5%). Die Keimzelltumoren werden in Seminome (S), die etwa 40% aller Keimzelltumoren ausmachen, und Nicht-Seminome (NS), die für etwa 60% aller Keimzelltumoren stehen, unterteilt. Die Nicht-Seminome werden in vier Kategorien weiter unterteilt: Embryonal (15% bis 20%), Teratom- (20% bis 25%), Dottersack- (10%) und Chorio-Karzinom (1%) (für einen neuesten Überblick, vgl. MacVicar et al., 2004, Curr. Opin. Oncol. 16:253-256; und Parker et al., 1996, CA Cancer J. Clin. 46:5-27). Seminome breiten sich typischerweise über regionale Lymphknoten zu supraklavikulären, mediastinalen und retroperitonealen Knoten aus. Nicht-Seminome metastasieren vorzugsweise in die Leber und Lunge über die Lymph- und hematogenösen Bahnen. Während die Überlebensrate für TC im Allgemeinen generell eine gute ist, ist die Überlebensfähigkeit und Heilbarkeit bei TC extrem abhängig von einer Früherkennung (Parker et al., 1996). Sobald sich der Krebs über die lokalen Knoten hinaus ausgebreitet hat (Stadium III), sinkt die Überlebensrate dramatisch ab, wogegen die Fünfjahres-Überlebensrate für Hodenkrebs der Stadien I und II über 95% liegt. Folglich ist eine Diagnose in einem früheren Stadium mit einer besseren Langzeit-Prognose verbunden, wogegen eine verspätete Diagnose mit einer erhöhten Patientensterblichkeit verbunden ist. Dies ist wegen der geringeren Ansprechrate auf die etablierte Behandlung, wenn die Tumorentwicklung schon fortgeschritten ist.

Da nicht jeder abnormale Befund in Bezug auf die Hoden ein Hoden-Neoplasma ist, sollte man sich sehr bemühen, zwischen Tumoren und anderen Hoden-Erkrankungen, wie Epididymitis, zu unterscheiden. Da die Feinnadel-biopsie, eine häufig verwendete Methode zur Bestätigung der Krebsdiagnose, im Fall eines TC wegen des erhöhten Risikos einer metastatischen Ausbreitung kontraindiziert ist, ist die radikale chirurgische Entfernung des betroffenen Hodens nicht nur der erste Schritt bei den meisten Behandlungsschematas, sondern wird oft auch für eine definitive Diagnose vorgenommen.

Ganz eindeutig sind bessere diagnostische Hilfsmittel mit

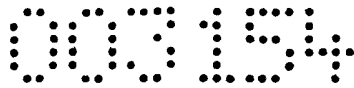
einer höheren Spezifität und einer höheren Empfindlichkeit dringend notwendig. In dieser Hinsicht wären Serum-Marker nicht nur hilfreiche Indikatoren für Krebserkrankungen des Fortpflanzungssystems, insbesondere TC und Eierstockkrebs, sondern könnten auch für die Diagnostizierung, Tumorstadieneinteilung („staging“) und Nachbeobachtung („follow up“) dieser Tumorformen verwendet werden.

Derzeit werden beispielsweise mehrere Serum-Marker zur Diagnostizierung von Neoplasmen des Hodens verwendet:

(1) Das humane Chorion-Gonadotropin, β -Untereinheit (β -HCG) ist in 30% bis 35% der nicht-seminomatösen Keimzelltumoren und in 10% bis 25% bei Patienten mit Seminom erhöht. Dies ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass einige Tumoren reichliche Mengen an β -HCG sezernieren können. (2) Man weiß, dass die Mengen an alpha-Fetoprotein (AFP) bei etwa 55% der Fälle von nicht-seminomatösen Keimzelltumoren erhöht sind, jedoch nicht bei Seminomen. (3) Die Laktat-Dehydrogenase (LDH) ist bei etwa 50% aller Patienten mit Hoden-Neoplasmen erhöht. LDH ist üblicherweise proportional zum Tumor-Volumen erhöht und nicht für irgendeine Tumor-Kategorie spezifisch. Da LDH in mehreren Geweben exprimiert wird, spiegeln abnorme Mengen an LDH oft andere Krankheits-Entitäten wider. Trotz der Tatsache, dass HCG-, AFP- und LDH-Mengen bei allen Patienten in Betracht gezogen werden sollten, bevor eine radikale chirurgische Entfernung des betroffenen Hodens (Orchiektomie) vorgenommen wird, ist der sehr beschränkte Vorhersage-Wert aller drei Serum-Marker offensichtlich wegen der großen Gruppe von Patienten, die für diese klassischen Marker negativ sind. Somit können Kliniker in den meisten Fällen die Entscheidung, ob sie eine Orchiektomie durchführen sollen oder nicht, nicht auf diesen drei diagnostischen Markern aufbauen. Weiters bleibt auch nach der Orchiektomie der Vorhersage-Wert der HCG-, AFP- und LDH-Serum-Mengen kritisch, wenn man die Behandlung der jeweiligen Krebserkrankungen überwacht. Somit werden neue Tumor-Marker für Hoden-Neoplasmen dringend benötigt, entweder als alleinstehende Marker sowie auch als Marker, die mit bestehenden diagnostischen Hilfsmitteln kombiniert werden sollen. (Leider wird LDH in mehreren Geweben exprimiert, und daher spiegeln erhöhte LDH-Konzentrationen oft andere Krankheits-Entitäten wider.) ?

Mehrere andere neue Tumor-Marker (einschließlich epidermaler

NACHGEREICHT



Wachstumsfaktor, NES-1 und i(12p)) wurden berichtet (Hellerstedt et al., 2002, Curr. Opin. Oncol. 14:260-264).

Abnorme Marker-Ergebnisse sind gewöhnlich ein Anzeichen für eine Krankheit bei Patienten mit Hodenkrebs. Falsch positive Marker (z.B. erbliche AFP-Produktion) sind selten, können aber zu einer signifikanten Überbehandlung (Chemotherapie, Operation) führen. Andererseits ist die Behandlungsüberwachung durch Tumor-Marker nur bei nicht-seminomatösen Keimzelltumoren (nonseminomatous germ cell tumours, NSGCT) möglich, wogegen bei Seminom-Patienten die Behandlungs-Reaktion durch die Ergebnisse bildgebender Verfahren (CT-Scan, PET-Scan), die offensichtlich ihre Grenzen haben, beurteilt werden muss.

Eine Suche nach neuen Tumor-Markern für Tumoren des Fortpflanzungssystems, insbesondere Hoden- und Eierstockkrebserkrankungen, speziell in der oben berichteten ziemlich großen Marker-negativen Gruppe (1/3 der NSGCT und die meisten Seminome) ist daher dringend nötig.

Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, neue Strategien für die Diagnose von Tumoren des Fortpflanzungssystems, insbesondere für Eierstock- und Hodentumoren, vorzusehen.

Daher sieht die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Diagnostizierung von Tumoren der Fortpflanzungsorgane (d.h., des Fortpflanzungssystems) vor, welches Verfahren gekennzeichnet ist durch Bestimmen des Afamin-Gehalts in einer Probe einer Körperflüssigkeit oder in einer Gewebeprobe, wobei ein Tumor diagnostiziert wird, wenn der Afamin-Gehalt in der Probe im Vergleich zum Afamin-Gehalt in einer Probe von einer Person ohne einen Tumor der Fortpflanzungsorgane verringert ist.

Afamin ist ein 87 kDa-Protein, das zur Albumin-Gruppe gehört und mit den Proteinen dieser Gruppe, wie z.B. mit dem humanen Serum-Albumin (HSA), humanen [alpha]-Fetoprotein (AFP) oder humanen Vitamin-D-Bindungsprotein strukturell und hinsichtlich der Biochemie vieles gemeinsam hat. Afamin wurde bereits kloniert und sequenziert und ist somit in rekombinanter Form erhältlich (WO 95/27059). Afamin ist ein Glykoprotein das hauptsächlich aus der Leber stammt und wird in den Blutkreislauf sezerniert. Es zeigte sich, dass Afamin im Plasma und in anderen Körperflüssigkeiten, wie Follikel-Flüssigkeit, Zerebrospinal-Flüssigkeit und Samenflüssigkeit, reichlich vorhanden ist. Abgesehen von seinen Sequenz-Homologien mit Albumin ist wenig über die Funktion von

Afamin bekannt. Es wurde die Möglichkeit diskutiert, dass Afamin Sterol-Bindungsstellen hat, doch vermutlich nicht Aktin bindet. Infolge der bestehenden, jedoch nicht überwältigenden Ähnlichkeit zwischen Afamin und Albumin wird bezweifelt, dass diese Proteine die selben Liganden binden (Lichenstein et al., The Journal of Biological Chemistry, 269 (27) (1994), S. 18149-18154). Es zeigte sich auch, dass es in vitro und in vivo Vitamin-E-Bindungseigenschaften hat (Voegele et al., 2002, Biochemistry 41:14532-14538). Mäuse, bei welchen das Afamin-Gen durch gezieltes Zerreißen ausgeschaltet war, wiesen (unter anderen Phänotypen) Hoden mit einer signifikant verringerten mittleren Organgröße auf, und in einigen Fällen Hodenkrebs. Einige weibliche Mäuse hatten stark vergrößerte Fortpflanzungsorgane (Uterus und Eierstock), was auf Tumoren auch in diesen Organen hindeutet. Die Verwendung von Afamin zum Bestimmen der Fertilität von Säugern ist in der WO 01/01148 A1 beschrieben.

Für die vorliegende Erfindung wurde die Rolle für Afamin bei der Entstehung von Hodenkrebs auch bei Menschen untersucht (in einem Fall-/Kontrollen- sowie Überwachungs-Muster nach Heilbehandlung) bei Patienten mit Tumoren im Fortpflanzungssystem. Afamin wurde überraschenderweise als bemerkenswert signifikanter Tumor-Marker für diese Tumoren identifiziert. Dies wurde weiters für verschiedene Formen männlicher Keimzelltumoren klinisch nachgewiesen.

Vorzugsweise werden Hoden- oder Eierstocktumoren gemäß der vorliegenden Erfindung diagnostiziert. Insbesondere ist die vorliegende Erfindung speziell für Keimzelltumoren geeignet.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist der gemäß der vorliegenden Erfindung diagnostizierte Tumor ausgewählt aus Seminomen, Nicht-Seminomen, embryonalem Hodentumor, Teratom, Dottersack- oder Chorionkarzinom und Mischformen der oben erwähnten Tumoren.

Bevorzugt durch das vorliegende Verfahren zu diagnostizierende Eierstocktumoren sind ausgewählt aus primären epithelialen Eierstocktumoren, insbesondere Cystadenom, Cystadenomakarzinom oder Brenner-Tumor, primären mesenchymalen Eierstocktumoren und Mischtumoren, insbesondere Eierstock-Fibrom oder -Adenofibrom, Keimstrang-Tumoren, insbesondere Granulosa-zelltumor, Thekazelltumor, Androblastom oder Gynandroblastom, Keimzellentumoren, insbesondere Dysgerminom, Teratom, Dermoid,

NACHGEREICHT

Struma ovarii, embryonales Karzinom, Polyembryom, endodermaler Sinus-Tumor oder malignes Chorionepitheliom oder metastatisch generierte sekundäre Eierstocktumoren, insbesondere von Mamma-karzinom, Magen-Darm-Karzinomen oder Corpuskarzinom, und Mischungen der oben erwähnten Tumoren.

Bevorzugt gemäß der vorliegenden Erfindung zu diagnostizierende Hoden-(Keimzellen-)Tumoren sind ausgewählt aus von Keimzellen stammende Hodentumoren, insbesondere Seminom, Orchio-blastom, Teratokarzinom, Chorionkarzinom oder Mischtumoren mit partiellem Seminom, oder nicht von Keimzellen stammende Hoden-tumoren, insbesondere Tumoren des Hoden-Stromas, Leydig-Zellen-Tumor, Sertolizelltumor oder Granulosazelltumor und Mischungen der oben erwähnten Tumoren.

Das vorliegende Verfahren kann mit jedem anderen Verfahren zur Diagnostizierung von Tumoren im Fortpflanzungssystem kombiniert werden, z.B. manuelle Untersuchung, histologische Untersuchung oder Tumor-Marker-Diagnose. Es ist besonders bevorzugt, das vorliegende Verfahren mit zusätzlichen Tests für andere Tumor-Marker, insbesondere für Tumoren des Fortpflanzungssystems, in der Probe zu verbinden. Bevorzugte zusätzliche Marker für Hodentumoren sind alpha-Fetoprotein, beta-Untereinheit von humanem Choriongonadotropin, Lactatdehydrogenase, epidermaler Wachstumsfaktor, NES-1 oder i(12p). Bevorzugte zusätzliche Marker für Eierstocktumoren sind CA125, Lysophosphatidylsäure (LPA), CA130 oder alpha-Folat-Rezeptor.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird der Afamin-Gehalt der Probe mit einem geeigneten Afamin-Bestimmungsverfahren bestimmt und - auf Grund eines Vergleichs mit einer Afamin-Referenz - analysiert, ob das Afamin in der Probe verringert ist oder nicht. Dies kann z.B. durch Vergleichen des Afamin-Gehalts in der Probe mit einem Afamin-Standard erfolgen, einem solchen Afamin-Referenzwert von einem gesunden Individuum oder von einem Individuum, das keinen Tumor des Fortpflanzungssystems hat. Alternativ (oder zusätzlich) wird ein Referenz-Wert von einem Patienten mit einem Tumor im Fortpflanzungssystem vorgesehen. Der Referenzwert kann beispielsweise in Form einer oder mehrerer Referenz-Proben, Referenz-Tabellen, Referenz-Kurven oder analoger Mittel, sowie Kombinationen davon, vorgesehen werden. Bei der Analyse, ob die Menge in der Probe verringert ist, hat der Fachmann eine Reihe von Möglichkeiten. Beispielsweise ein direk-

NACHGEHEBEN

ter Vergleich mit veröffentlichten Referenzwerten von Afamin in der Körperflüssigkeit oder im Gewebe. Jedenfalls sieht das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung keine endgültige medizinische Diagnose vor, es sieht einen Afamin-Wert für eine Probe eines unbekanntes Tumor-Status oder von einer Person vor, für die eine Gefahr besteht oder von der vermutet wird, dass sie einen Tumor im Fortpflanzungssystem hat, im Vergleich zu einem Afamin-Wert einer gegebenen oder virtuellen Probe, die keinen Tumor im Fortpflanzungssystem, insbesondere einen Hoden- oder Eierstocktumor, hat. Die endgültige medizinische Diagnose wird dann - unabhängig vom in vitro-Diagnostizierungs- oder Analyse-Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung - durch die individuelle medizinisch ausgebildete Person, die zu einer solchen Diagnose berechtigt ist, erstellt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der Afamin-Gehalt in der Probe als verringert angesehen, wenn er um mindestens 10% niedriger, vorzugsweise um mindestens 30% niedriger, insbesondere um mindestens 50% niedriger ist als der Afamin-Gehalt in einer Probe von einer Person ohne einen Tumor der Fortpflanzungsorgane.

Alternativ wird der Afamin-Gehalt in der Probe als verringert gemäß der vorliegenden Erfindung angesehen, wenn er um mindestens 20% niedriger, vorzugsweise um mindestens 40% niedriger, insbesondere um mindestens 60% niedriger ist als der Afamin-Gehalt in einer Probe von einer Person ohne einen Tumor der Fortpflanzungsorgane.

Vorzugsweise ist die Person ohne Tumor der Fortpflanzungsorgane eine gesunde Person mit einem Afamin-Gehalt von 50 bis 70 mg, insbesondere 60 mg Afamin pro Liter Blutserum. Die oben erwähnten %-Werte werden dann entweder aus dem 60 mg-Wert oder aus der 50 mg-Untergrenze (auch je nach den Vergleichswerten für die spezifische Körperflüssigkeit (z.B. Plasma oder Serum) oder Afamin-Bestimmungssystem) berechnet.

Die bevorzugten Körperflüssigkeiten oder Gewebeproben sind ausgewählt aus Blut, Serum, Plasma, Zerebrospinal-Flüssigkeit, Spermaflüssigkeit, Follikelflüssigkeit, Eierstock, Hoden oder Epididymis.

Obwohl alle Verfahren zur Bestimmung von Afamin für die vorliegende Erfindung geeignet sind, welche eine Unterscheidung zwischen einem normalen und einem verringerten Afamin-Wert

ermöglichen, wird der Afamin-Gehalt vorzugsweise mit anti-Afamin-Antikörpern, insbesondere monoklonalen Antikörpern, bestimmt. Solche Antikörper können einen Detektions-Marker, vorzugsweise einen chromogenen, fluorogenen oder radioaktiven Marker, aufweisen.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Sets zum Bestimmen der Menge an Afamin in einer Probe einer Körperflüssigkeit oder in einer Gewebeprobe, umfassend Afamin-Detektionsmittel und eine Afamin-Referenz zur Diagnostizierung von Tumoren der Fortpflanzungsorgane. Sets zur Bestimmung von Afamin sind auf dem Gebiet bekannt (z.B. WO 01/01148 oder WO 95/27059). Vorzugsweise wird die Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung in die Praxis umgesetzt, indem ein Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung wie oben beschrieben angewendet wird.

Unter den üblichen Komponenten eines solchen Afamin-Bestimmungs-Sets ist der Afamin-Standard spezifisch bevorzugt (z.B. als Standard-Vertiefung in einem Mikrotiter-ELISA oder als Standard-Punkt oder -Fläche auf einem Gen-Chip oder Protein-(Antikörper)-Microarray-Chip.

Die vorliegende Erfindung ist in den folgenden Beispielen und Zeichnungsfiguren weiter beschrieben, ohne jedoch auf diese eingeschränkt zu sein.

Fig. 1 zeigt die mittlere Konzentration von Afamin in S = Seminom, NS = Nicht-Seminom, MT = Misch tumor, NTT = nicht-testikulärem Tumor;

Fig. 2 zeigt die mittlere Konzentration von AFP bei S = Seminom, NS = Nicht-Seminom, MT = Misch tumor, NTT = nicht-testikulärem Tumor;

Fig. 3 zeigt die mittlere Konzentration von HCG bei S = Seminom, NS = Nicht-Seminom, MT = Misch tumor, NTT = nicht-testikulärem Tumor;

Fig. 4 zeigt die Entwicklung der Afamin-Serum-Konzentration und hCG-Serum-Konzentration während der Zeit (in Tagen) von einem repräsentativen Patienten mit einem Seminom. Der Zeitpunkt 0 zeigt den Serum-Wert der Probe an, die am Tag vor der Tumor-Operation genommen wurde; andere Zeitpunkte reichen bis zu 70 Tage postoperativ und zeigen einen Anstieg der Afamin-Werte auf normale Werte innerhalb der ersten 2 Wochen nach der Operation. Die zweite Kurve zeigt entsprechende Werte für Serum-hCG-Kon-

zentrationen.

Fig. 5 zeigt die Entwicklung der Afamin-Serum-Konzentration und hCG-Serum-Konzentration während der Zeit (in Tagen) von einem repräsentativen Patienten mit einem Seminom. Der Zeitpunkt 0 zeigt den Serum-Wert von einer Probe an, die am Tag vor der Tumor-Operation genommen wurde; andere Zeitpunkte reichen bis zu 135 Tage postoperativ und zeigen einen Anstieg der Afamin-Werte auf normale Werte innerhalb der ersten 2 Wochen nach der Operation. Die zweite Kurve zeigt entsprechende Werte für Serum-hCG-Konzentrationen.

Fig. 6 zeigt die Entwicklung der Afamin-Serum-Konzentration und AFP-Serum-Konzentration während der Zeit (in Monaten) von einem repräsentativen Patienten mit einem Nicht-Seminom. Der Zeitpunkt 0 zeigt den Serum-Wert von einer Probe an, die am Tag vor der Tumor-Operation genommen wurde; andere Zeitpunkte reichen bis zu 34 Monate postoperativ und zeigen einen Anstieg der Afamin-Werte auf normale Werte innerhalb der ersten 2 Wochen nach der Operation. Die zweite Kurve zeigt entsprechende Werte für Serum-hCG-Konzentrationen.

Beispiele:

Patienten und Methodik

Von Jänner 2004 bis Jänner 2005 wurden 16 Hodenkrebs-Patienten (Seminom, n=11, NSCGT, n=1, Mischtumoren, n=4) diagnostiziert und an der Abteilung für Urologie behandelt. Hodentumoren wurden auf Grund der Histologie nach inguinaler Orchiektomie klassifiziert. 4 Patienten waren auf Grund erhöhter AFP- oder hCG-Mengen falsch positiv diagnostiziert worden, 2 davon waren histologisch mit Blasenkrebs diagnostiziert worden.

Immunometrische hCG- und AFP-Analysen vom Serum wurden unter Verwendung des ADVIA® Centaur Immunoassay-Systems (Bayer Diagnostics, Deutschland) mit direkter Chemolumineszenz-Technologie durchgeführt. Ein Wert >10 ng/ml und >10mIE/ml wurde als pathologisch für AFP bzw. hCG angesehen. Das gesamte Protein wurde mit einem kolorimetrischen Test (Folin-Cieucalteau, Merck-Chemicals, Darmstadt, Deutschland) gemessen.

Die Serum-Konzentrationen von Afamin wurden mit einem kürzlich beschriebenen Sandwich-ELISA (Voegele et al., 2002) bestimmt, wobei ein Affinitäts-gereinigter polyklonaler anti-Human-Afamin-Kaninchen-Antikörper zur Beschichtung von Mikrotiter-Platten und der POX-konjugierte monoklonale anti-Human-

Maus-Antikörper N13 zur Detektion verwendet wurden. Afamin, das aus humanem Plasma gereinigt und mittels Aminosäure-Zusammensetzungs-Analyse quantifiziert worden war, diente zum Kalibrieren einer sekundären Plasma-Probe.

AFP und HCG wurden zur Zeit der Diagnose und vor Orchiektomie, häufig (mindestens zweiwöchentlich) während einer nachfolgenden Therapie (Chemotherapie, retroperitoneale Operation) und mindestens dreimonatlich in der Nachbeobachtung analysiert. Afamin wurde von gefrorenen Proben am Ende des Zeitraums der Studie gemessen.

Ergebnisse

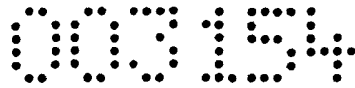
Afamin war bei Patienten mit allen 3 untersuchten Formen von Hodenkrebs im Vergleich zu einer Kontrollgruppe auf Basis einer randomisierten Population signifikant verringert (Tabelle 1, detaillierte Daten in den Tabellen 2 und 3 und in den Figuren). Die Werte stiegen innerhalb von ein paar Wochen auf normale Höhen an, sehr vergleichbar der Normalisierung der HCG/AFP-Mengen. Die gesamten Protein-Plasma-Mengen waren bei den Patienten normal und veränderten sich während der Behandlung und Beobachtung nicht. Höchst interessanterweise fand man normale Afamin-Mengen bei 4 Patienten, die entweder erhöhte HCG- oder AFP-Mengen hatten, aber keine Anzeichen eines Hodentumors bei der histologischen Untersuchung zeigten. Zwei von ihnen hatten jedoch eine positive Diagnose für Blasenkrebs.

Tabelle 1

| Histologie | AFP | HCG | Afamin |
|-------------------|------------|------------|---------------|
| Seminom | normal | erhöht | verringert |
| Nicht-Seminom | erhöht | erhöht | verringert |
| Mischtumor | erhöht | erhöht | verringert |
| kein Hodentumor | erhöht | erhöht | normal |

Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse sind der erste Bericht von einem neuen Tumormarker aus Humanplasma, der Hodentumor unabhängig von seinem Subtyp (S, NS, MT) identifiziert, durch signifikant verringerte Plasmaspiegel und einen Anstieg auf Normalwerte nach chirurgischer Entfernung des Tumors. Bei der vorliegenden kleinen Untersuchungsgruppe sieht er, im Gegensatz zu routinemä-



Big verwendeten Tumor-Markern, einen verlässlichen Marker für alle Gruppen von Krebs vor.

Vier Patienten, die keine Abnormitäten der routinemäßig verwendeten Parameter zeigten, wurden durch verringerte Afamin-Mengen ausfindig gemacht (womit die falsch negativen Ergebnisse reduziert wurden). Vier Fälle wurden entdeckt, bei welchen die Afamin-Mengen normal waren und die HCG und/oder AFP-Werte erhöht waren. Diese Feststellungen halfen, falsch positive und negative Ergebnisse infolge Unspezifität dieser klassischen Marker zu verringern.

Insgesamt erhöht die Diagnostizierung von Afamin bei Hoden-Patienten als repräsentative Form von Tumoren des Fortpflanzungssystems die Nachweis-Spezifität im Vergleich zu spezifischen Markern, die auf dem Gebiet bekannt sind und angewendet werden. Der zweite wichtige Punkt ist das allgemeine Zutreffen verringerter Afamin-Werte auf alle Formen von Hodenkrebs. Die vorliegende Langzeitbeobachtung der Normalisierung von Werten nach einer Heilbehandlung bestätigt deutlich die Signifikanz von Afamin als wertvoller Tumor-Marker für Hodenkrebs.

Pathologische Faktoren, die im Hodentumor exprimiert werden, könnten die Afamin-Produktion und -Sekretion in der Leber unterdrücken. Alternativ könnte der wachsende Tumor dem Plasma zunehmend Liganden entziehen, die von Afamin getragen werden. Vitamin E, das der bisher einzige bekannte physiologische Ligand von Afamin ist (Voegele et al., 2002 Biochemistry 41:14532-14538) wurden mehrere Rollen bei der Karzinogenese zugeschrieben (Sigounas et al., 1997 Nutr. Cancer 28:30-35).

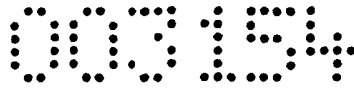


Tabelle 2

| ID | AFA | | | | AFP | | | | HCG | | | | |
|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | S | NS | MT | NTT | CG | S | NS | MT | NTT | S | NS | MT | NTT |
| 1 | 32 | | | | | 6,7 | | | | 2 | | | |
| 2 | 51 | | | | | 12,7 | | | | 2 | | | |
| 3 | 63 | | | | | 1,3 | | | | 2 | | | |
| 4 | | | | 52 | | | | | 34,7 | | | | 2 |
| 5 | | | | 58 | | | | | 3,7 | | | | 34,0 |
| 6 | | 34 | | | | | 97,5 | | | | 18,5 | | |
| 7 | 34 | | | | | 3,3 | | | | 2 | | | |
| 8 | | | 39 | | | | | 98,3 | | | | 33,7 | |
| 9 | | | 54 | | | | | 32,3 | | | | 17,6 | |
| 10 | 83 | | | | | 3,6 | | | | 2 | | | |
| 11 | 30 | | | | | 3,4 | | | | 56,8 | | | |
| 12 | | | | 69 | | | | | 12,9 | | | | 2 |
| 13 | 14 | | | | | 6,9 | | | | 51 | | | |
| 14 | | | | 52 | | | | | 11,6 | | | | 2 |
| 15 | | | 63 | | | | | 44,1 | | | | 9,5 | |
| 16 | 49 | | | | | 2,8 | | | | 27,7 | | | |
| 17 | 50 | | | | | 3,3 | | | | 2 | | | |
| 18 | 43 | | | | | 4,3 | | | | 2 | | | |
| 19 | 46 | | | | | 8,6 | | | | 1,1 | | | |
| 20 | | | 44 | | | | | 3,1 | | | | 27,8 | |
| Mittel | 45,0 | 34,0 | 50,0 | 57,8 | 62,6 | 5,2 | 97,5 | 58,2 | 15,7 | 13,7 | 18,5 | 20,3 | 10,1 |
| SA | 18,2 | 0 | 10,7 | 8,1 | 15,1 | | | | | | | | |

Signifikanz Afamin zwischen Seminom und Kontrollgruppe: $p=0,003$

2x falsch neg. 2x falsch neg.
 8x verr. 1x verr. 1x verr. 4x normal
 1x erhöht
 Normaler AFA-Bereich 50-70 mg/l

AFP: >10ng/ml = pathologisch
 HCG: >10 mIE/ml = pathologisch

Signifikanz Afamin zwischen Nicht-Seminom und Kontrollgruppe: $p = 0,000$

10x falsch neg. 3x falsch pos. 8x falsch neg. 3x falsch neg.
 1x normal
 1x erhöht 1x erhöht 3x erhöht 3x erhöht 1x erhöht 3x erhöht 1x erhöht
 AFA=Afamin, AFP=alpha-Fetoprotein, HCG_humanes Chorion-Gonadotropin
 S= Seminom, NS=Nicht-Seminom, MT=Mischtumor NTT=Nicht-testikulärer Tumor
 CG=Kontrollgruppe, auf Populationsbasis, n=360

NACHGEREICHT

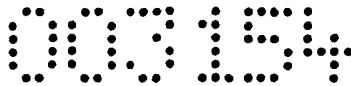
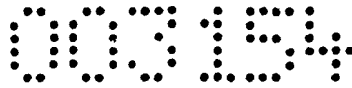


Tabelle 3

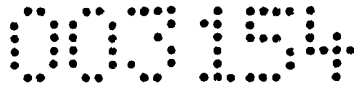
| Zeit | Afamin | HCG | AFP | Zeit | Afamin | AFP | HCG | Afamin | Zeit | Afamin | AFP |
|-------------|---------------|------------|------------|-------------|---------------|------------|------------|---------------|-------------|---------------|------------|
| 0 | 14 | 51 | 6,9 | 0 | 34,5 | 3,4 | 56,8 | 34,5 | 0 | 34,00 | 97,5 |
| 2 | 16,38 | 23,2 | 5,3 | 3 | 28,34 | 2,1 | 36,8 | 28,34 | 1 | 58,00 | 9 |
| 6 | 13,35 | 4,5 | 3,5 | 14 | 40,39 | 4,2 | 2 | 40,39 | 28 | 44,00 | 4,6 |
| 9 | 17,28 | 2 | 3,5 | 27 | 25,06 | 5,6 | 2 | 25,06 | 31 | 47,00 | 5,5 |
| 22 | 30,82 | 2 | 4,1 | 36 | 43,15 | 5,6 | 2 | 43,15 | 34 | 45,00 | 4,6 |
| 28 | 71,45 | 2 | 12,9 | 49 | 33,64 | 4,4 | 2 | 33,64 | | | |
| 36 | 30,95 | 2 | 5,8 | 66 | 52,03 | 8,2 | 2 | 52,03 | | | |
| 42 | 50,53 | 2 | 8,6 | 70 | 25,98 | 4,8 | 2 | 25,98 | | | |
| 49 | 61,19 | 2 | 10,8 | 77 | 36,24 | 8,8 | 2 | 36,24 | | | |
| 63 | 45,74 | 2 | 5,4 | 89 | 31,61 | 12,4 | 2 | 31,61 | | | |
| 70 | 38,37 | 2 | 7,4 | 136 | 59,77 | 6,1 | 2 | 59,77 | | | |
| | | | | 180 | | 4,6 | 2 | | | | |

NACHGEREICHT



Patentansprüche:

1. Verfahren zur Diagnostizierung von Tumoren der Fortpflanzungsorgane, gekennzeichnet durch Bestimmen des Afamin-Gehalts in einer Probe einer Körperflüssigkeit oder in einer Gewebeprobe, wobei ein Tumor diagnostiziert wird, wenn der Afamin-Gehalt in der Probe im Vergleich zum Afamin-Gehalt in einer Probe von einer Person ohne einen Tumor der Fortpflanzungsorgane verringert ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ein Hoden- oder Eierstocktumor ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ein Keimzellentumor ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ausgewählt ist aus Seminomen, Nicht-Seminomen, embryonalem Hodentumor, Teratom, Dottersack- oder Chorionkarzinom und Mischungen der oben erwähnten Tumoren.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ausgewählt ist aus primären epithelialen Eierstocktumoren, insbesondere Cystadenom, Cystadenomakarzinom oder Brenner-Tumor, primären mesenchymalen Eierstocktumoren und Mischtumoren, insbesondere Eierstock-Fibrom oder -Adenofibrom, Keimstrang-Tumoren, insbesondere Granulosa-zelltumor, Thekazelltumor, Androblastom oder Gynandroblastom, Keimzelltumoren, insbesondere Dysgerminom, Teratom, Dermoid, Struma ovarii, embryonales Karzinom, Polyembryom, endodermaler Sinustumor oder malignes Chorionepitheliom oder metastatisch generierte sekundäre Eierstocktumoren, insbesondere von Mamma-karzinom, Magendarm-Karzinomen oder Corpuskarzinom, und Mischformen der oben erwähnten Tumoren.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ausgewählt ist aus von Keimzellen stammenden Hodentumoren, insbesondere Seminom, Orchioblastom, Teratokarzinom, Chorionkarzinom oder Mischtumoren mit partiellem



Seminom, oder nicht von Keimzellen stammenden Hodentumoren, insbesondere Tumoren des Hoden-Stromas, Leydig-Zellen-Tumor, Sertolizelltumor oder Granulosazelltumor und Mischformen der oben erwähnten Tumoren.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzliche Marker für Tumoren, insbesondere für Tumoren des Fortpflanzungssystems, in der Probe bestimmt werden.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der zusätzliche Marker alpha-Fetoprotein, die beta-Untereinheit von humanem Choriongonadotropin, Lactatdehydrogenase, epidermaler Wachstumsfaktor, NES-1 oder i(12p) ist.

9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der zusätzliche Marker CA125, Lysophosphatidylsäure (LPA), CA130 oder alpha-Folat-Rezeptor ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Afamin-Gehalt in der Probe als verringert angesehen wird, wenn er um mindestens 10% niedriger, vorzugsweise um mindestens 30% niedriger, insbesondere um mindestens 50% niedriger ist als der Afamin-Gehalt in einer Probe von einer Person ohne Tumor der Fortpflanzungsorgane.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Afamin-Gehalt in der Probe als verringert angesehen wird, wenn er um mindestens 20% niedriger, vorzugsweise um mindestens 40% niedriger, insbesondere um mindestens 60% niedriger ist als der Afamin-Gehalt in einer Probe von einer Person ohne Tumor der Fortpflanzungsorgane.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Person ohne Tumor der Fortpflanzungsorgane eine gesunde Person mit einem Afamin-Gehalt von 50 bis 70 mg, insbesondere 60 mg Afamin pro Liter Blutserum, ist.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Körperflüssigkeit- oder Gewebeprobe ausgewählt ist aus Blut, Serum, Plasma, Zerebrospinal-Flüssigkeit,

Spermaflüssigkeit, Follikelflüssigkeit, Eierstock, Hoden oder Epididymis.

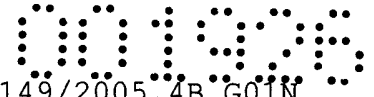
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Afamin-Gehalt mit anti-Afamin-Antikörpern, insbesondere monoklonalen Antikörpern, bestimmt wird.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper einen Detektions-Marker, vorzugsweise einen chromogenen, fluorogenen oder radioaktiven Marker, aufweist.

16. Verwendung eines Sets zum Bestimmen der Menge an Afamin in einer Probe einer Körperflüssigkeit oder in einer Gewebeprobe, umfassend Afamin-Detektionsmittel und eine Afamin-Referenz zur Diagnostizierung von Tumoren der Fortpflanzungsorgane.

17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Set bei einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15 verwendet wird.

18. Verwendung nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Set eine standardisierte Menge an Afamin enthält.



Patentansprüche:

1. Verfahren zur Diagnostizierung von Tumoren der Fortpflanzungsorgane, gekennzeichnet durch Bestimmen der Afamin-Konzentration in einer Probe einer Körperflüssigkeit oder in einer Gewebeprobe, wobei ein Tumor diagnostiziert wird, wenn die Afamin-Konzentration in der Probe im Vergleich zur Afamin-Konzentration in einer Probe von einer Person ohne einen Tumor der Fortpflanzungsorgane verringert ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ein Hoden- oder Eierstocktumor ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ein Keimzellentumor ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ausgewählt ist aus Seminomen, Nicht-Seminomen, embryonalem Hodentumor, Teratom, Dottersack- oder Chorionkarzinom und Mischungen der oben erwähnten Tumoren.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ausgewählt ist aus primären epithelialen Eierstocktumoren, insbesondere Cystadenom, Cystadenomakarzinom oder Brenner-Tumor, primären mesenchymalen Eierstocktumoren und Mischtumoren, insbesondere Eierstock-Fibrom oder -Adenofibrom, Keimstrang-Tumoren, insbesondere Granulosa-zelltumor, Thekazelltumor, Androblastom oder Gynandroblastom, Keimzelltumoren, insbesondere Dysgerminom, Teratom, Dermoid, Struma ovarii, embryonales Karzinom, Polyembryom, endodermaler Sinustumor oder malignes Chorionepitheliom oder metastatisch generierte sekundäre Eierstocktumoren, insbesondere von Mamma-karzinom, Magendarm-Karzinomen oder Corpuskarzinom, und Mischformen der oben erwähnten Tumoren.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ausgewählt ist aus von Keimzellen stammenden Hodentumoren, insbesondere Seminom, Orchioblastom, Teratokarzinom, Chorionkarzinom oder Mischtumoren mit partiellem

NACHGERICHT

Seminom, oder nicht von Keimzellen stammenden Hodentumoren, insbesondere Tumoren des Hoden-Stromas, Leydig-Zellen-Tumor, Sertolizelltumor oder Granulosazelltumor und Mischformen der oben erwähnten Tumoren.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzliche Marker für Tumoren, insbesondere für Tumoren des Fortpflanzungssystems, in der Probe bestimmt werden.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der zusätzliche Marker alpha-Fetoprotein, die beta-Untereinheit von humanem Choriogonadotropin, Lactatdehydrogenase, epidermaler Wachstumsfaktor, das normale epithelialspezifische 1 Kandidatentumor-Suppressorgen (NES-1) oder gesteigertes Chromosom 12-Material (i(12p)) ist.

9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der zusätzliche Marker das Krebs-assoziierte Antigen 125 (CA125), Lysophosphatidylsäure (LPA), das Krebs-assoziierte Antigen 130 (CA130) oder alpha-Folat-Rezeptor ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Afamin-Konzentration in der Probe als verringert angesehen wird, wenn er um mindestens 10% niedriger, vorzugsweise um mindestens 30% niedriger, insbesondere um mindestens 50% niedriger ist als die Afamin-Konzentration in einer Probe von einer Person ohne Tumor der Fortpflanzungsorgane.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Afamin-Konzentration in der Probe als verringert angesehen wird, wenn er um mindestens 20% niedriger, vorzugsweise um mindestens 40% niedriger, insbesondere um mindestens 60% niedriger ist als die Afamin-Konzentration in einer Probe von einer Person ohne Tumor der Fortpflanzungsorgane.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Person ohne Tumor der Fortpflanzungsorgane eine gesunde Person mit einer Afamin-Konzentration von 50

NACHGEREICH

bis 70 mg, insbesondere 60 mg Afamin pro Liter Blutserum, ist.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Körperflüssigkeit- oder Gewebeprobe ausgewählt ist aus Blut, Serum, Plasma, Zerebrospinal-Flüssigkeit, Spermaflüssigkeit, Follikelflüssigkeit, Eierstock, Hoden oder Epididymis.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Afamin-Konzentration mit anti-Afamin-Antikörpern, insbesondere monoklonalen Antikörpern, bestimmt wird.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper einen Detektions-Marker, vorzugsweise einen chromogenen, fluorogenen oder radioaktiven Marker, aufweist.

16. Verwendung eines Sets zum Bestimmen der Menge an Afamin in einer Probe einer Körperflüssigkeit oder in einer Gewebeprobe, umfassend Afamin-Detektionsmittel und eine Afamin-Referenz zur Diagnostizierung von Tumoren der Fortpflanzungsorgane.

17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Set bei einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15 verwendet wird.

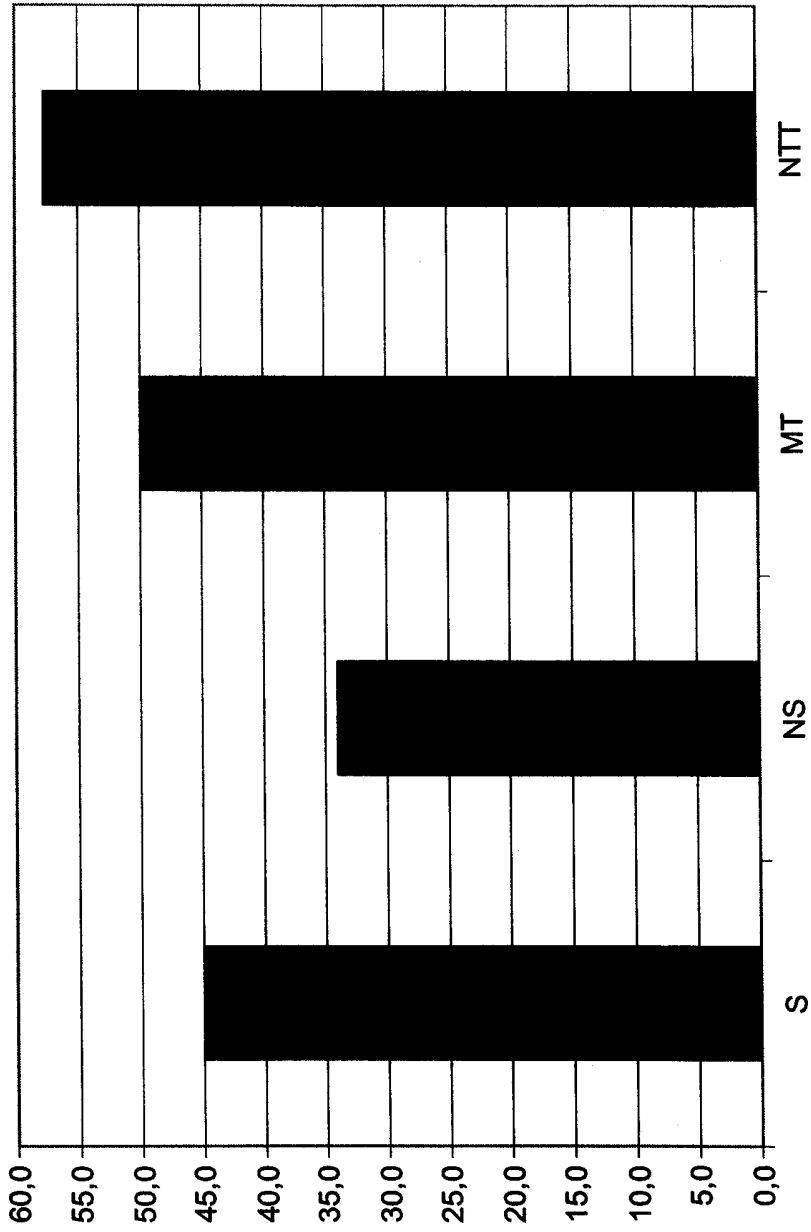
18. Verwendung nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Set eine standardisierte Menge an Afamin enthält.

003154

12

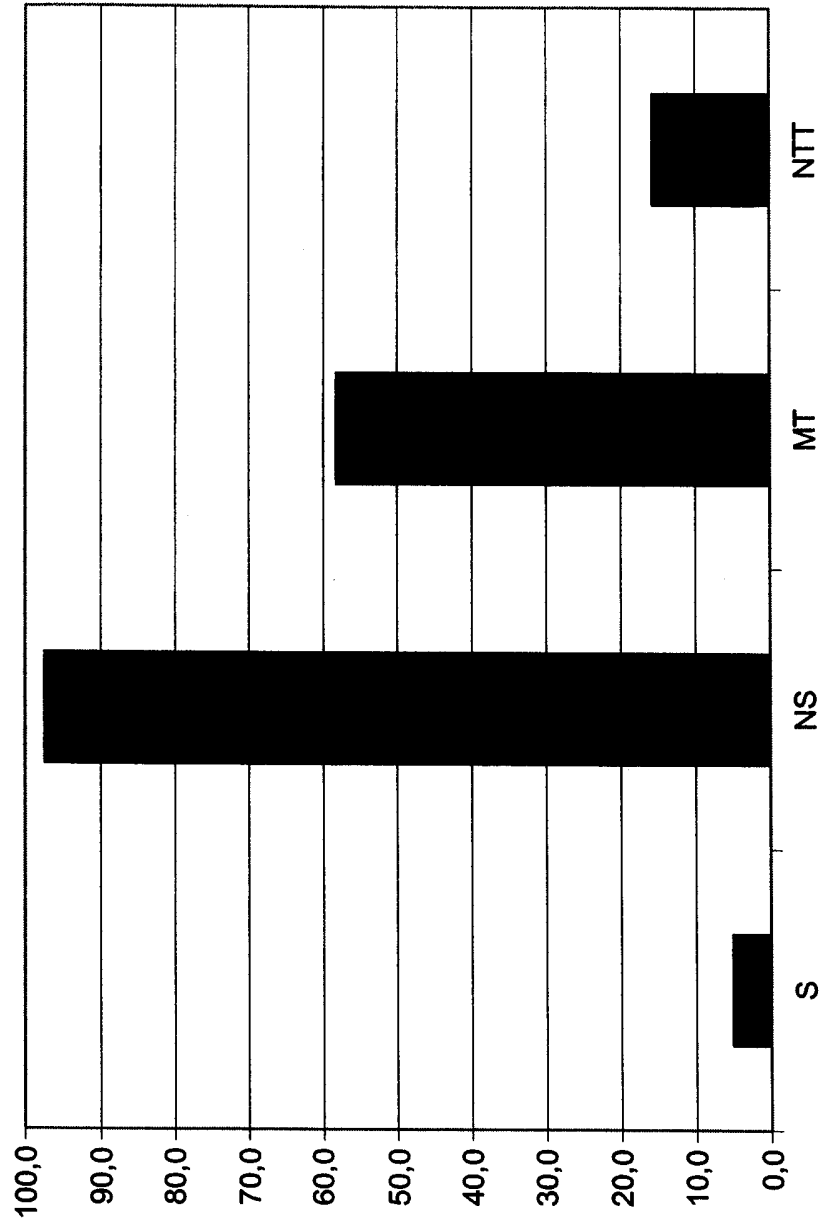
1/6

Fig.1



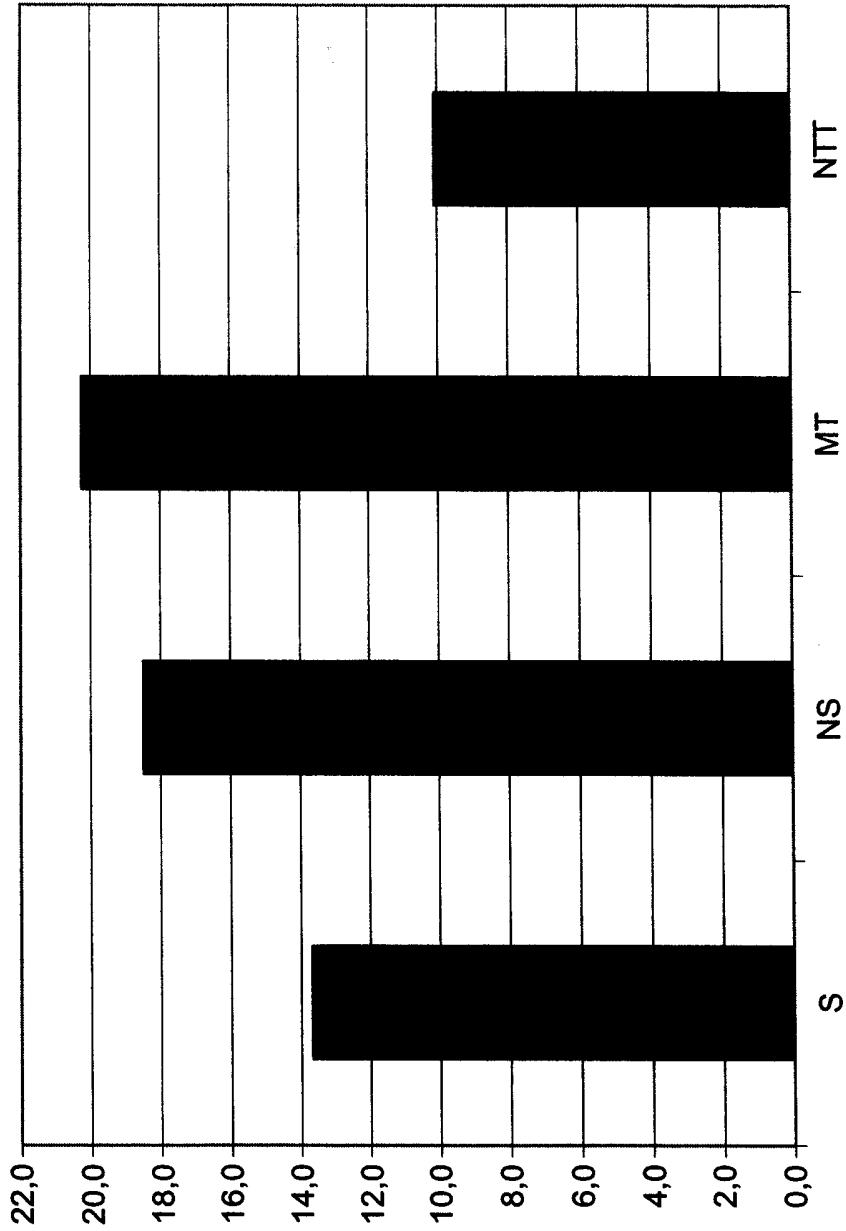
NACHGE...

Fig.2



NACHGEREICHT

Fig.3

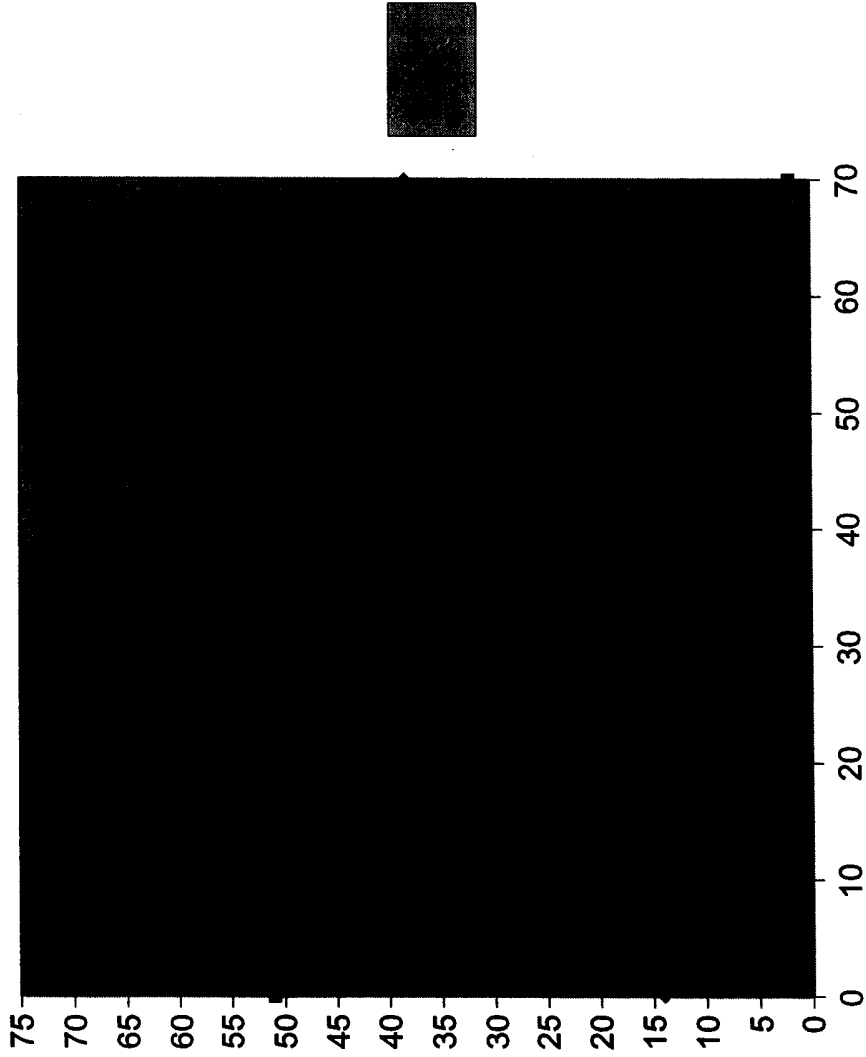


NACHGEREICHT

000194

4/6

Fig.4

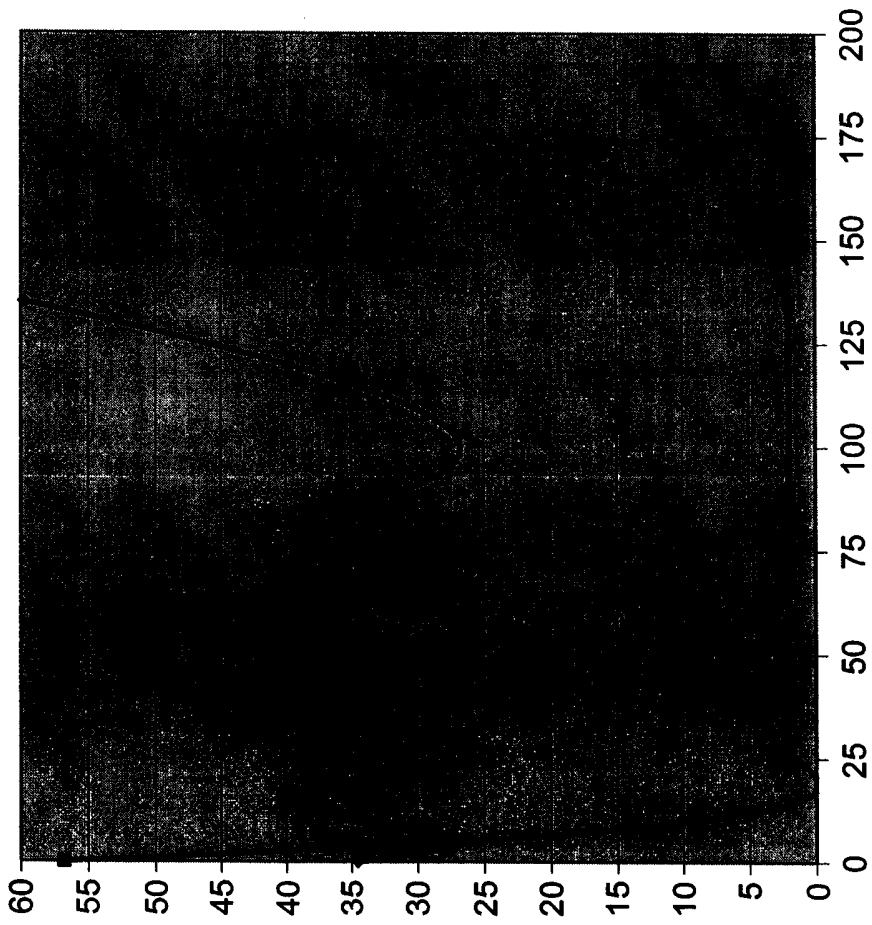


NACHGEREICHT

003194

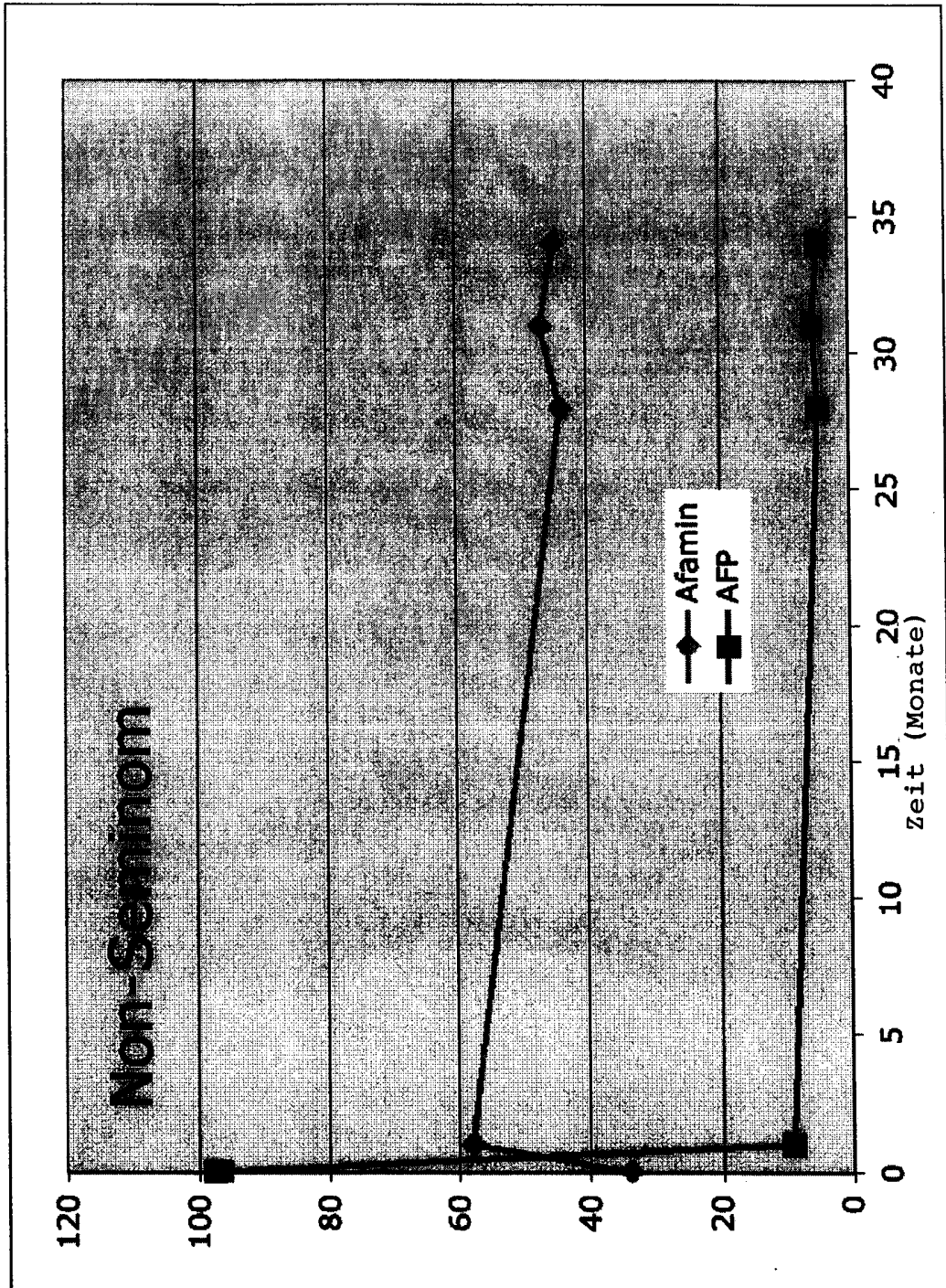
5/6

Fig.5



NACHGEREICHT

Fig.6





| Klassifikation des Anmeldegegenstands gemäß IPC ⁸ : G01N33/53//G01N33/536; G01N33/68 | | |
|---|---|--|
| Recherchiertes Prüfstoff (Klassifikation): G01N, C07K | | |
| Konsultierte Online-Datenbank: Pubmed, Internet, WPI, EPODOC, PAJ | | |
| Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 24. März 2005 eingereichten Ansprüchen 1-4, 6-18 erstellt. | | |
| Kategorie ⁷⁾ | Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich | Betreffend Anspruch |
| A | Lichenstein HS, et al. "Afinin is a new member of the albumin, alpha-fetoprotein, and vitamin D-binding protein gene family." J Biol Chem. 1994 Jul 8;269(27):18149-54. [Retrieved from the internet 29. August 2005 (29.08.2005)] < http://www.jbc.org/cgi/reprint/269/27/18149 > <i>*Ganzes Dokument*</i> | 1-18 |
| | -- | |
| A | Charokopos N, et al. "Increased levels of albumin in bronchial washing fluid of patients with bronchial carcinoma. Could albumin be considered as a tumor marker?" Int J Biol Markers. 2004 Oct-Dec;19(4):316-21. <i>*Ganzes Dokument*</i> | 1-18 |
| | --- | |
| Datum der Beendigung der Recherche: 7. September 2005 | | <input type="checkbox"/> Fortsetzung siehe Folgeblatt Prüfer(in): Dr. GÖRNER |
| ⁷⁾ Kategorien der angeführten Dokumente: X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung : der Anmeldegegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden. Y Veröffentlichung von Bedeutung : der Anmeldegegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist. A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert. P Dokument, das von Bedeutung ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem Prioritätstag der Anmeldung veröffentlicht wurde. E Dokument, das von besonderer Bedeutung ist (Kategorie X), aus dem ein älteres Recht hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen). & Veröffentlichung, die Mitglied der selben Patentfamilie ist. | | |