

Brevet N°

86652

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG

du 10 novembre 1986

Titre délivré 13 JUIN 1988



Monsieur le Ministre  
de l'Économie et des Classes Moyennes  
Service de la Propriété Intellectuelle  
LUXEMBOURG

No. 5.88  
dj. 18.m.

# Demande de Brevet d'Invention

## I. Requête

La soc. dite PROGEN BIOTECHNIK GmbH, Im Neuenheimer Feld 519,  
D - 6900 Heidelberg (2)

représentée par E. Meyers & E.T. Freylinger, Ing. conseils en propr. ind.,  
46 rue du Cimetière, Luxembourg, agissant en qualité de mandataires (3)

dépose(nt) ce dix novembre mil neuf cent quatre vingt six  
à 10<sup>00</sup> heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg: (4)

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant:

"Verfahren zum Auffinden von Gewebsläsionen" (5)

2. la description en langue allemande de l'invention en trois exemplaires;

3. - planches de dessin, en trois exemplaires;

4. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg, le 10 novembre 1986 ;

5. la délégation de pouvoir, datée de Heidelberg le 5 novembre 1986 ;

6. le document d'ayant cause (autorisation);

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont): (6)

1. Dr Gerda BRUDER, Bergheimer Strasse 110A, D - 6900 Heidelberg

2. Prof. Dr Werner Wilhelm FRANKE, Landfriedstrasse 6, D - 6900 Heidelberg

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de  
déposée(s) en (8) (7)

le (9) --

sous le N° (10) --

au nom de (11) --

élit(élisent) domicile pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg  
46 rue du Cimetière, Luxembourg (12)

solicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les annexes susmentionnées,  
avec ajournement de cette délivrance à dix-huit mois. (13)

Le déposant / mandataire: Ernest Meyers (14)

## II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes,  
Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du: 10 novembre 1986

à 10<sup>00</sup> heures

Pr. le Ministre de l'Économie et des Classes Moyennes,

p. d.

Le chef du service de la propriété intellectuelle,



A 68007

EXPLICATIONS RELATIVES AU FORMULAIRE DE DÉPÔT.  
(1) s'il y a lieu "Demande de certificat d'addition au brevet principal, à la demande de brevet principal No ..... du .....". - (2) inscrire les nom, prénom, profession, adresse du demandeur, lorsque celui-ci est un particulier ou les dénomination sociale, forme juridique, adresse du siège social, lorsque le demandeur est une personne morale - (3) inscrire les nom, prénom, adresse du mandataire agréé, conseil en propriété industrielle, muni d'un pouvoir spécial, s'il y a lieu: "représenté par ..... agissant en qualité de mandataire" - (4) date de dépôt en toutes lettres - (5) titre de l'invention - (6) inscrire les noms, prénoms, adresses des inventeurs ou l'indication "(voir) désignation séparée (suivra)", lorsque la désignation se fait ou se fera dans un document séparé, ou encore l'indication "ne pas mentionner", lorsque l'inventeur signe ou signera un document de non-mention à joindre à une désignation séparée présente ou future - (7) brevet, certificat d'addition, modèle d'utilité, brevet européen (CBE), protection internationale (PCT) - (8) Etat dans lequel le premier dépôt a été effectué ou, le cas échéant, Etats désignés dans la demande européenne ou internationale prioritaire - (9) date du premier dépôt - (10) numéro du premier dépôt complété, le cas échéant, par l'indication de l'office récepteur CBE/PCT - (11) nom du titulaire du premier dépôt - (12) adresse du domicile élu - (13) date de l'ajournement de la délivrance - (14) nom et adresse du mandataire agréé.

Brevet N°

86652

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG

du 10 novembre 1986

Titre délivré



Monsieur le Ministre  
de l'Économie et des Classes Moyennes  
Service de la Propriété Intellectuelle  
LUXEMBOURG

No. 5.88  
aj. 18 m.

# Demande de Brevet d'Invention

## I. Requête

La soc. dite *PROGEN BIOTECHNIK GmbH, Im Neuenheimer Feld 519,* (2)  
D - 6900 Heidelberg

représentée par *E. Meyers & E. T. Freylinger, Ing. conseils en propr. ind.,* (3)  
*46 rue du Cimetière, Luxembourg, agissant en qualité de mandataires*

dépose(nt) ce *dix novembre mil neuf cent quatre vingt six* (4)  
à *10<sup>00</sup>* heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg:

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant:

*"Verfahren zum Auffinden von Gewebsläsionen"* (5)

2. la description en langue *allemande* de l'invention en trois exemplaires;

3. *---* planches de dessin, en trois exemplaires;

4. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg, le *10 novembre 1986*;

5. la délégation de pouvoir, datée de *Heidelberg* le *5 novembre 1986*;

6. le document d'ayant cause (autorisation);

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont): (6)

*1. Dr. Gerda BRUDER, Bergheimer Strasse 110A, D - 6900 Heidelberg*

*2. Prof. Dr. Werner Wilhelm FRANKE, Landfriedstrasse 6, D - 6900 Heidelberg*

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de (7)  
déposée(s) en (8)

le (9) *---*

sous le N° (10) *---*

au nom de (11) *---*

élit(élisent) domicile pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg

*46 rue du Cimetière, Luxembourg* (12)

solicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les annexes susmentionnées,

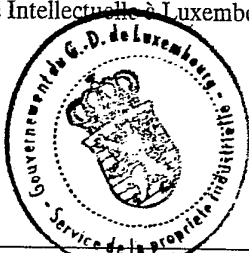
avec ajournement de cette délivrance à *dix-huit* mois. (13)

Le déposant / mandataire: *Ernest Meyers* (14)

## II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes,  
Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du: *10 novembre 1986*

à *10<sup>00</sup>* heures



Pr. le Ministre de l'Économie et des Classes Moyennes,

p. d.

Le chef du service de la propriété intellectuelle,

A 68007

### EXPLICATIONS RELATIVES AU FORMULAIRE DE DÉPÔT

(1) s'il y a lieu "Demande de certificat d'addition au brevet principal, à la demande de brevet principal No. .... du ....." - (2) inscrire les nom, prénom, profession, adresse du demandeur, lorsque celui-ci est un particulier ou les dénomination sociale, forme juridique, adresse du siège social, lorsque le demandeur est une personne morale - (3) inscrire les nom, prénom, adresse du mandataire agréé, conseil en propriété industrielle, muni d'un pouvoir spécial, s'il y a lieu: "représenté par ....." agissant en qualité de mandataire" - (4) date de dépôt en toutes lettres - (5) titre de l'invention - (6) inscrire les noms, prénoms, adresses des inventeurs ou l'indication "(voir) désignation séparée (suivra)". lorsque la désignation se fait ou se fera dans un document séparé, ou encore l'indication "ne pas mentionner". lorsque l'inventeur signe ou signera un document de non-mention à joindre à une désignation séparée présente ou future - (7) brevet, certificat d'addition, modèle d'utilité, brevet européen (CBE), protection internationale (PCT) - (8) Etat dans lequel le premier dépôt a été effectué ou, le cas échéant, Etats désignés dans la demande européenne ou internationale prioritaire - (9) date du premier dépôt - (10) numéro du premier dépôt complété, le cas échéant, par l'indication de l'office récepteur CREPCT - (11) nom du titulaire du brevet déposé

BL-3963/BM

P A T E N T A N M E L D U N G

Verfahren zum Auffinden von Gewebsläsionen

PROGEN BIOTECHNIK GmbH  
Im Neuenheimer Feld 519  
D . 6900 Heidelberg

## VERFAHREN ZUM AUFFINDEN VON GEWEBSLÄSIONEN

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Auffinden von Gewebsläsionen, bei dem Körperflüssigkeit abgezogen und untersucht wird.

Es ist bekannt, Hepatitis durch Nachweis Leber-spezifischer Enzyme im Blutserum aufzufinden. Ebenso lassen sich Myokard-Läsionen durch den Nachweis von Myokard-spezifischen Enzymen und anderen löslichen Proteinen auffinden. Enzyme haben nur eine begrenzte Aktivität und viele Gewebs- beziehungsweise Zelltyp-spezifische Proteine sind nicht in Serum und anderen Körperflüssigkeiten löslich. Dadurch ist die Anwendung dieses Verfahrens begrenzt.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren der eingangs genannten Art so auszugestalten, daß es möglichst weitgehend anwendbar ist.

Die Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, daß lösliche Fragmente von unlöslichen, Antigen-tragenden, intrazellulären und nicht-sezernierten Strukturen und Proteinen, immunologisch dem lädierten Gewebe zuordbaren Cytoskelettproteinen, immunologisch bestimmt und quantifiziert werden.

Eine Weiterbildung der Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, daß die Antigen-tragenden Proteine Intermediärfilamentproteine sind.

Die Erfindung macht sich dabei die folgenden Erkenntnisse aus der Zellbiologie zunutze:

Intermediärfilament(IF)-Proteine, die als Bestandteile des Cytoskeletts zu den unlöslichen Zellbestandteilen gehören,

sind durch hohe Stabilität ausgezeichnete Proteine von großer Zelltypspezifität. Die Zuordnung ergibt sich aus der nachfolgenden Tabelle I.

TABELLE 1

Gewebe	Intermediärfilament- protein
Muskel-	Desmin
Neuronal-	Neurofilamentproteine (NF-L, NF-M, NFH)
Mesenchymal-	Vimentin
Astrozyten	Gliafilament
Epithel-	Cytokeratine

Nach Zell-Läsion werden nicht lösliche Proteine und Strukturen vielfach proteolytisch abgebaut. Aus IF-Proteinen erhält man beispielsweise nach Abbaureaktionen die relativ stabilen alpha-helikalen Mittelstücke, die nun in Körperflüssigkeiten mit immunologischem Verfahren nachgewiesen und bestimmt werden können.

Das Nachweisverfahren geschieht mit Hilfe eines Sandwich-ELISA, der für jeden Filament-Typ aus jeweils zwei spezifischen Antikörpern aufgebaut ist.

Als Körperflüssigkeiten kommen für das Verfahren in Betracht Serum von Blut, Cerebrospinalliquor, Urin, Fruchtwasser und Punktate.

In den Punktaten können Intermediärfilamentproteine in unlöslicher Form untermischt sein. Damit diese auch bei serologischen Untersuchung mit in Betracht gezogen werden, wird

auf das abgezogene Punktat abbauend eingewirkt, bis aus wenigstens einem großen Teil der eventuell im Punktat vorhandenen Intermediärfilamentproteine jeweils das alpha-helikale Mittelstück abgebaut ist. Dann wird die lösliche Fraktion abgetrennt und dann werden die in der löslichen Fraktion enthaltenen alpha-helikalen Mittelstücke in löslicher Phase immunologisch identifiziert.

Um dabei sicherzustellen, daß die alpha-helikalen Mittelstücke beim Abbau nicht so weit mitzerstört werden, daß die Identifikation behindert wird, empfiehlt es sich, daß diese nur so weit abgebaut werden, bis sie zu 60 bis 100 Gewichtsprozent bei einer Temperatur von 0 bis 40°C (Grad Celsius) in physiologischer Kochsalzlösung löslich sind. Das geschieht durch Abstoppen der Aktivität des für den Abbau eingesetzten Enzyms durch geeignete Inhibitoren. Hierbei ist es zweckmäßig, die Intermediärfilamentproteine nur so weit abzubauen, daß bei mindestens 80 Gewichtsprozent das alpha-helikale Mittelstück intakt bleibt.

Es gibt verschiedene Cytokeratine (Nr. 1 - 19), deren Expressionsmuster verschiedenen Epithelgeweben zugeordnet sind. Deshalb wird bei Cytokeratinen vorzugsweise auch die Art des jeweils zugeordneten Epithelgewebes bestimmt und quantifiziert. Auch für diese Zuordnung liegen hinreichende Charakteristika in den alpha-helikalen Mittelstücken vor.

Die zur Quantifizierung erforderliche Standardisierung erfolgt zweckmäßig anhand eines definierten Standards, wobei der Standard gebildet ist aus gereinigten alpha-helikalen Mittelstücken der jeweils zugeordneten Intermediärfilamentproteine.

Die Erfindung gestattet es, die Ergebnisse der Bestimmung und Quantifizierung unverzüglich nach Entnahme des Serums zu

ermitteln. Das ist ein besonderer Vorteil.

Die Erfindung gestattet es weiter, den Verlauf pathologischer oder therapeutischer Prozesse - beispielsweise Bestrahlung, Chemotherapie - zu kontrollieren, bei denen Gewebe zerstört wird, indem zur Verlaufskontrolle einer gewebelädierenden Behandlung die Entnahme der Körperflüssigkeit und die Bestimmung und Quantifizierung mehrfach zeitlich nacheinander während der lädierenden Behandlung und/oder danach erfolgt.

Die Erfindung wird nun anhand der beigefügten Beispiele näher erläutert.

BEISPIEL 1

Nachweis von Läsionen im Epithelgewebe zur Differentialdiagnostik

In 1 ml (Milliliter) Serum von Patientenblut werden die vorhandenen Cytokeratine immunologisch durch einen Sandwich-ELISA bestimmt. Hierzu dient ein erster monoklonaler Antikörper PAN-CI, der sogenannte Fänger-Antikörper, der gegen ein erstes Epitop, das in allen im Serum vorhandenen Cytokeratinfragmentkomplexen vorkommt, gerichtet ist. Es sind weitere monoklonale Antikörper C-401 bis C-419 vorgesehen, sogenannte Detektor-Antikörper, die einzeln gegen zweite Epitope gerichtet sind, die spezifisch den einzelnen bekannten 19 Cytokeratinen zugeordnet sind. Das zweite Epitop ist jeweils vom ersten Epitop unabhängig und verschieden. Die Detektor-Antikörper sind enzymatisch markiert mit Peroxidase.

Zur Standardisierung wird das gereinigte alpha-helikale Mittelstück der 19 verschiedenen Cytokeratine dem gleichen Sandwich-ELISA mit den gleichen Antikörpern unterworfen. Die so erhaltenen 19 verschiedenen Cytokeratinwerte dienen dann als Bezugsgrößen für die quantitative Auswertung der Meßergebnisse.

Auf diese Weise ermittelt man den relativen Anteil der einzelnen Cytokeratine. Das läßt eine genaue Spezifizierung des lädierten Epithelgewebes zu und Rückschlüsse auf das Ausmaß der Lädierung.

Wenn so nur die Cytokeratine 8 und 18 nachgewiesen werden, läßt das auf eine Läsion von Hepatozyten, Nierenepithel beziehungsweise von Acini, des Pankreas und der von diesen Zelltypen abgeleiteten Tumoren schließen und macht andere

Gewebe als Ort der Läsion unwahrscheinlich.

#### BEISPIEL 2

Nachweis von Läsionen im inneren Epithelialbereich

Wie Beispiel 1, jedoch mit der Beschränkung auf den Fänger-Antikörper PAN-CI und diejenigen Detektor-Antikörper C-408, D-418 und C-419, die den Cytokeratinen Nr. 8, Nr. 18 und Nr. 19 zugeordnet sind. Wenn die Cytokeratine Nr. 8, Nr. 18 und Nr. 19 mit hinreichenden Anteilen nachgewiesen werden, läßt das auf eine Läsion im Epithelialbereich des Darmtraktes schließen und läßt anere Organe als Ort der Läsion unwahrscheinlich erscheinen.

#### BEISPIEL 3

Verlaufskontrolle bei der Chemotherapie eines Leberhepatoms

Die Untersuchung und Bestimmung der Cytokeratine 8 und 18 nach Beispiel 1 wird wiederholt an monatlich dem gleichen Patienten entnommenen Blutproben.

#### BEISPIEL 4

Frühdiagnostik bei Verdacht auf Neuralrohrdefekte während der Schwangerschaft

10 ml Fruchtwasserpunktat wird zentrifugiert. Das Sediment wird im 3fachen Volumen, bezogen auf das Feuchtgewicht, einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung ( 10 mM (millimolar) Natriumphosphat pH 7,4, 150 mM Natriumchlorid) mit Hilfe eines Messerhomogenisators bis zur breiartigen Konsistenz zerkleinert. Dem Homogenat wird Chymotrypsin im Verhältnis 1 : 1000, berechnet auf das Feuchtgewicht des Gewebes, zugesetzt. Es folgt ein Inkubationsschritt bei 30° C im Wasserbad, der nach 60 Minuten abgestoppt wird. Das Abstoppen der Enzymaktivität geschieht durch Zusatz von 5 mM 2-

Nitro-4-Carboxyphenyl-N-N-Diphenylcarbamate (NCDC). Anschließend wird das Homogenat 30 Minuten bei  $10^4 g$  ( $g$  = Gravitationskonstante) zentrifugiert.

Unter diesen Bedingungen werden 80 bis 95 Gewichtsprozent der alpha-helikalen Mittelstücke in noch identifizierbarem Zustand aus den IF-Proteinen des Homogenats freigesetzt.

Die beiden gewonnenen, zentrifugierten Überstände werden gesondert, jeder für sich, immunologisch auf ihren Gehalt an Neurofilament und Gliafilamentprotein mit einem Sandwich-ELISA untersucht. Hierzu dient für die beiden Filamenttypen je ein erster monoklonaler Antikörper NF-8 beziehungsweise GL-8, der sogenannte Fänger-Antikörper, der gegen ein jeweils erstes Epitop des alpha-helikalen Mittelstückes der Filamentproteine gerichtet ist. Außerdem dient dazu jeweils ein zweiter monoklonaler Antikörper NF-100 beziehungsweise GL-100, der sogenannte Detektor-Antikörper, der gegen ein zweites Epitop des alpha-helikalen Mittelstückes des zugeordneten Filaments gerichtet ist. Das zweite Epitop ist von dem ersten Epitop unabhängig und verschieden.

Die Detektor-Antikörper NF-100 beziehungsweise GL-100 sind mit Peroxidase gekoppelt und werden bei der Bindung an das alpha-helikale Mittelstück über die Enzymaktivität der Peroxidase nachgewiesen. Die Standardisierung erfolgt entsprechend wie im Beispiel 1 angegeben.

Das Auftreten von Glia- beziehungsweise Neurofilamentfragmenten in Fruchtwasserproben weist auf Neuralrohrdefekte hin und liefert so einen wesentlich verlässlicheren und schnelleren pränataldiagnostischen Test als bisher benutzte bekannte Methoden.

BEISPIEL 5 - 7

Wie Beispiel 1 - 4, wobei jedoch statt den einzelnen Cytokeratinen einzeln zugeordnete Fänger-Antikörper solche Fänger-Antikörper eingesetzt werden, die in Kombination die einzelnen Cytokeratine erkennen. Zum Beispiel die Kombination C-501 und C-504 erkennt das Cytokeratin Nr. X, die Kombination C-501 und C-503 erkennt das Cytokeratin (X+1).

BEISPIEL 8

Gewinnung der Antikörper

Vimentin wird aus Augenlinsen von Rindern gereinigt, als Filament rekonstituiert, mit Chymotrypsin gespalten und das alpha-helikale Mittelstück chromatographisch abgetrennt und eingesetzt zur Herstellung der monoklonalen Antikörper mit Hilfe der Hybridomtechnik. Die Spezifität der Antikörper wird mit Hilfe der gereinigten alpha-helikalen Fragmente festgestellt und Kreuzreaktionen mit den übrigen IF-Proteinen durch Immunreaktionen in nativem (beziehungsweise renaturiertem) und denaturiertem Zustand dieser Proteine ausgeschlossen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Auffinden von Gewebsläsionen, bei dem Körperflüssigkeit abgezogen und untersucht wird, dadurch gekennzeichnet, daß lösliche Fragmente von unlöslichen, Antigen-tragenden, intrazellulären und nicht-sezernierten Strukturen und Proteinen, immunologisch dem lädierten Gewebe zuordbaren Cytoskelettproteinen, immunologisch bestimmt und quantifiziert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Antigen-tragenden Proteine Intermediärfilamentproteine sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die entnommene Körperflüssigkeit Blut ist und die Bestimmung im Blutserum erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die entnommene Körperflüssigkeit Cerebrospinalliquor ist.
5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die entnommene Körperflüssigkeit Urin ist.
6. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die entnommene Körperflüssigkeit Fruchtwasser ist.
7. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die entnommene Körperflüssigkeit durch Punktierung gewonnen wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet,  
daß auf das abgezogene Punktat abbauend eingewirkt wird,  
bis aus wenigstens einem großen Teil der eventuell im Punktat vorhandenen Strukturproteinen lösliche Fragmente entstanden sind,

daß dann die lösliche Fraktion abgetrennt wird und

daß dann die in der löslichen Fraktion enthaltenen Fragmente immunologisch identifiziert werden.

9 Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,

daß bei Cytokeratin in der Körperflüssigkeit die Art des jeweils zugeordneten Epithelgewebes anhand des relativen Anteils der identifizierten Cytokeratine Nr. 1 bis 19 bestimmt und quantifiziert wird.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,

daß die Quantifikation anhand eines definierten Standards erfolgt, wobei der Standard gebildet ist aus gereinigten biochemisch definierten Fragmenten des Cytoskeletts.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, —

daß die Quantifikation anhand eines definierten Standards erfolgt, wobei der Standard gebildet wird aus gereinigten alpha-helikalen Mittelstücken der jeweils zugeordneten Intermediärfilamentproteine.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,

daß zur Verlaufskontrolle einer ärztlichen Behandlung die Entnahme der Körperflüssigkeit und die Bestimmung und Quantifizierung mehrfach zeitlich nacheinander während der Behandlung und/oder danach erfolgt.