

(12) **GEBRAUCHSMUSTERSCHRIFT**

(21) Anmeldenummer: GM 8075/02

(51) Int.Cl.<sup>7</sup> : **G01N 33/574**

(22) Anmeldetag: 12.10.2000

(42) Beginn der Schutzdauer: 15.10.2003

Längste mögliche Dauer: 31.10.2010

(45) Ausgabetag: 25.11.2003

(67) Umwandlung aus Patentanmeldung: 1742/2000

(73) Gebrauchsmusterinhaber:

BATTISTUTTI WALTER MAG.  
A-1140 WIEN (AT).

(54) **VERFAHREN ZUR DIAGNOSE MENSCHLICHER MAMMAKARZINOMZELLEN**

(57) Bei einem Verfahren zur Diagnose menschlicher Mammakarzinomzellen, durch Untersuchung von Gewebeschnitten, wobei ein Gewebeschnitt mit einer auf das Protein Maspin selektiv reagierenden Markiersubstanz behandelt wird, wird vorgeschlagen, dass als Markiersubstanz ein mit Hämatoxylin-Eosin färbbarer Maspin-Antikörper verwendet wird.

**AT 006 512 U1**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose menschlicher Mammakarzinomzellen durch Untersuchung von Gewebeschnitten, wobei ein Gewebeschnitt mit einer auf das Protein Maspin selektiv reagierenden Markiersubstanz behandelt wird.

Gemäss bisherigem Stand der Technik erfolgt die Beurteilung, ob ein Gewebeschnitt maligne Zellen, insbesondere des Mammakarzinoms, enthält, anhand einer rein morphologischen Beurteilung. Der Pathologe benötigt dafür viel Erfahrung, um lediglich aus dem Aussehen der Zellen die Unterscheidung zwischen malignen und nicht malignen Zellen treffen zu können. Eine rasche dezentrale Diagnose außerhalb spezialisierter Labors ist damit unmöglich.

Eine Aufgabe der Erfindung ist es, mit einer kostenmäßig akzeptablen Diagnosemethode sicher und rasch zwischen malignen und nicht malignen menschlichen Zellen unterscheiden zu können.

Das Zellprotein Maspin wurde im Jahre 1994 entdeckt. Die Literatur dazu legt nahe, dass in malignen Zellen ein niedriger Gehalt dieses Zellproteins vorliegt. Andere Literaturstellen sprechen davon, dass das Maspin einen Tumorsuppressor darstellt, wobei in malignen Zellen die Expression dieses Proteins herabgesetzt ist. Andere Literaturstellen verweisen auf einen erhöhten Gehalt in malignen Zellen.

Der vorliegenden Erfindung liegt die gesicherte Erkenntnis zu Grunde, dass gesunde Zellen einen gut nachweisbaren Gehalt dieses Zellproteins Maspin aufweisen und dass bei malignen Zellen der Gehalt an Maspin deutlich herabgesetzt ist. Weiters wurde entdeckt, dass die Zugabe von Maspin mittels einer Lösung (Beimpfen) das maligne Verhalten von Tumorzellen erheblich verändert, sodass die Teilungsrate stark herabgesetzt wird.

Das gegenständliche Verfahren zur Diagnose menschlicher maligner Zellen und Gewebe, nämlich Mammakarzinomzellen, ist dadurch gekennzeichnet, dass als Markiersubstanz ein mit Hämatoxylin-Eosin färbbarer Maspin-Antikörper verwendet wird.

Weitere vorteilhafte Merkmale<sup>e</sup> sind den Ansprüchen und der nachfolgenden Beschreibung zu entnehmen.

Die Erfindung erlaubt eine rasch und sicher vorzunehmende Diagnose. Das Vorhandensein von Maspin kann mit hoher Empfindlichkeit durch gefärbte oder färbbare Antikörper zu Maspin nachgewiesen werden. Die Färbungsintensität steht in Korrelation zum Maspingehalt in der Zelle. Der Vorteil liegt unter anderem, auch darin, dass das Maspin ein Protein ist, welches in gesundem Gewebe vorkommt, vor allem in den Myoepithelien, und im malignen Gewebe fehlt. Dies steht im Gegensatz zu anderen bekannten Proteinen, die in gesunden Geweben fehlen und nur von malignen Zellen erzeugt werden.

In einem typischen Beispiel wurde der vermutlich erkrankten Stelle der weiblichen Brust eine Gewebeprobe entnommen und davon in bekannter Weise ein Schnittpräparat auf einem Glasträger hergestellt. Das Präparat wurde gemäss Erfindung mit einer Maspin-Antikörper-Lösung 15781A der Firma PharMingen International mit einem Gehalt von 0,1 mg Antikörper in 100 ml Lösung überschichtet. Nach einer Einwirkzeit von etwa 10 bis 40 Minuten wurde das Präparat an der Luft getrocknet und unter dem Mikroskop betrachtet. Maligne Zellen sind schwach oder nicht gefärbt, während gesunde Zellen stark gefärbt sind.

In einer vorteilhaften Ausführungsvariante wird von dem zu untersuchenden Gewebe ein sogenannter HE-Schnitt in bekannter Weise hergestellt, wie er bisher für die rein morphologische Beurteilung verwendet wird. HE steht für Hämatoxylin-Eosin. Durch einfaches Überschichten mit der Maspin-Antikörper-Lösung wird die Unterscheidung zwischen malignen und nicht malignen Zellen stark erleichtert.

Die Überschichtung erfolgt bevorzugt mit einer Lösung und einem Antikörpergehalt größer  $1 \text{ mg Antikörper}/250 \text{ ml} = 0,004 \text{ mg/ml}$  bei dem die Anfärbung allerdings schwach ist. Bei einer Konzentration von  $0,005 \text{ mg/ml}$  ist die Färbung stärker und bei  $0,01 \text{ mg/ml}$  entsprechend einer Verdünnung 1:100 des käuflichen Präparates sehr stark mit etwa optimalem Kontrast zu ungefärbten malignen Zellen. Das käufliche Präparat hatte einen Gehalt von 0,1 mg Antikörper pro 1 ml Lösung in PBS (Pufferlösung) mit 0.09 % Natriumazid.

Zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens kann eine Diagnosevorrichtung (Diagnosekit) vorgesehen werden, die eine Lösung des färbbaren oder gefärbten Maspin-Antikörpers enthält.

Das Diagnoseverfahren eignet sich auch gut für veterinärmedizinische Untersuchungen, da es schnell abläuft und vom Arzt ohne spezialisiertes Laboratorium durchgeführt werden kann.

Ansprüche:

1. Verfahren zur Diagnose menschlicher Mammakarzinomzellen, durch Untersuchung von Gewebeschnitten, wobei ein Gewebeschnitt mit einer auf das Protein Maspin selektiv reagierenden Markiersubstanz behandelt wird, dadurch gekennzeichnet, dass als Markiersubstanz ein mit Hämatoxylin-Eosin färbbarer Maspin-Antikörper verwendet wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Gewebeschnitt vor dem Auftragen der Maspin-Antikörper-Lösung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) eingefärbt wird.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass Maspin-Antikörper in einer physiologischen Lösung in einer Konzentration von größer 0,004 mg/ml gelöst und auf den Gewebeschnitt aufgeschichtet wird.



## ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

Recherchenbericht zu GM 8075/2002

Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC: <b>G 01 N 33/574</b>		
Recherchierte Prüfsubstanz (Klassifikation): <b>G 01 N</b>		
Konsultierte Online-Datenbank: <b>CAPLUS Datenbank, STN International, MEDLINE, WPI Datenbank, Derwent Publications, Ltd.;</b>		
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am <b>20.01.2003</b> eingereichten Ansprüchen erstellt. Die in der Gebrauchsmusterschrift veröffentlichten Ansprüche könnten im Verfahren geändert worden sein (§ 19 Abs. 4 GMG), sodass die Angaben im Recherchenbericht, wie Bezugnahme auf bestimmte Ansprüche, Angabe von Kategorien (X, Y, A), nicht mehr zutreffend sein müssen. In die dem Recherchenbericht zugrundeliegende Fassung der Ansprüche kann beim Österreichischen Patentamt während der Amtsstunden Einsicht genommen werden.		
Kategorie*)	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode <sup>*)</sup> , Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
X	US 5 801 001 A (R. SAGER et al.) siehe das gesamte Dokument, insbesondere Spalten 4-9, 10, 11, 13 und 14 und die Ansprüche  siehe das gesamte Dokument, insbesondere Spalten 4-9, 10, 11, 13 und 14 und die Ansprüche	1-3
X	S. M. LELE et al., "Immunohistochemical Detection of Maspin is a useful adjunct in distinguishing radial sclerosing lesion from tubular carcinoma of the breast", Applied Immunohistochemistry & Morphology 8 (1), März 2000, Seiten 32-36 siehe das gesamte Dokument;	1-3
X	"Purified mouse anti-human Maspin monoclonal antibody", BD PharMingen Technisches Datenblatt, datiert 19. Mai 2000, erhalten über das Internet, URL < <a href="http://www.bdbeurope.com/bv/bd.dll/bd/common/product.jsp?ProductID=330437&amp;ChannelID=243611&amp;ProgramID=362229&amp;BV_UseBVCookie=yes&amp;BD_SID=UWtSQzpNQT09&amp;PrevPage=PRODUCT">http://www.bdbeurope.com/bv/bd.dll/bd/common/product.jsp?ProductID=330437&amp;ChannelID=243611&amp;ProgramID=362229&amp;BV_UseBVCookie=yes&amp;BD_SID=UWtSQzpNQT09&amp;PrevPage=PRODUCT</a> >, siehe Datenblatt	1-3
Datum der Beendigung der Recherche: <b>23. Jänner 2003</b>		Prüfer(in): <b>Dr. WENIGER</b>
*) Bitte beachten Sie die Hinweise auf dem Erläuterungsblatt!		
<input type="checkbox"/> Fortsetzung siehe Folgeblatt		



# ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

## Erläuterungen zum Recherchenbericht

Die **Kategorien** der angeführten Dokumente dienen in Anlehnung an die Kategorien der Entgegenhaltungen bei EP- bzw. PCT-Recherchenberichten nur zur raschen Einordnung des ermittelten Stands der Technik. Sie stellen keine Beurteilung der Erfindungseigenschaft dar:

**"A"** Veröffentlichung, die den **allgemeinen Stand der Technik** definiert.

**"Y"** Veröffentlichung von **Bedeutung**: der Anmeldungsgegenstand 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.

**"X"** Veröffentlichung von **besonderer Bedeutung**: der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden.

**"P"** Dokument, das von **besonderer Bedeutung** ist (Kategorie „X“), jedoch **nach dem Prioritätstag** der Anmeldung veröffentlicht wurde.

**"&"** Veröffentlichung, die Mitglied derselben **Patentfamilie** ist.

### Ländercodes:

**AT** = Österreich; **AU** = Australien; **CA** = Kanada; **CH** = Schweiz; **DD** = ehem. DDR; **DE** = Deutschland; **EP** = Europäisches Patentamt; **FR** = Frankreich; **GB** = Vereinigtes Königreich (UK); **JP** = Japan; **RU** = Russische Föderation; **SU** = Ehem. Sowjetunion; **US** = Vereinigte Staaten von Amerika (USA); **WO** = Veröffentlichung gem. PCT (WIPO/OMPI); weitere Codes siehe **WIPO ST. 3**.

Die genannten Druckschriften können in der Bibliothek des Österreichischen Patentamtes während der Öffnungszeiten (Montag bis Freitag von 8 bis 12 Uhr 30, Dienstag von 8 bis 15 Uhr) **unentgeltlich eingesehen** werden. Bei der von der Teilrechtsfähigkeit des Österreichischen Patentamts betriebenen Kopierstelle können **Kopien** der ermittelten Veröffentlichungen bestellt werden.

Auf Bestellung gibt die von der Teilrechtsfähigkeit des Österreichischen Patentamts betriebene Serviceabteilung gegen Entgelt zu den im Recherchenbericht genannten Patentdokumenten allfällige veröffentlichte **"Patentfamilien"** (den selben Gegenstand betreffende Patentveröffentlichungen in anderen Ländern, die über eine gemeinsame Prioritätsanmeldung zusammenhängen) bekannt.

**Auskünfte und Bestellmöglichkeit** zu diesen Serviceleistungen erhalten Sie unter der Telefonnummer

**01 / 534 24 - 738 bzw. 739;**

**Schriftliche Bestellungen:**

per FAX Nr. 01 / 534 24 – 737 oder per E-Mail an [Kopierstelle@patent.bmvit.gv.at](mailto:Kopierstelle@patent.bmvit.gv.at)