



österreichisches
patentamt

(10) AT 009 142 U1 2007-05-15

(12)

Gebrauchsmusterschrift

- (21) Anmeldenummer: GM 8018/04 (51) Int. Cl.⁷: C12Q 1/68
(22) Anmeldetag: 2000-05-08
(42) Beginn der Schutzdauer: 2007-03-15
Längste mögliche Dauer: 2010-05-31
(45) Ausgabetag: 2007-05-15 (67) Umwandlung aus Patentanmeldung:
1550/2003
(62) Ausscheidung aus Anmeldung Nr.:
799/2000

(30) Priorität:
02.05.2000 AT A 766/00 beansprucht.

(73) Gebrauchsmusterinhaber:
VIENNALAB LABORDIAGNOSTIKA
GMBH
A-1110 WIEN (AT).

(54) **VERFAHREN ZUR GENETISCHEN DIAGNOSE VON HÄMOCHROMATOSE SOWIE
SONDEN ZUR GENETISCHEN DIAGNOSE VON HÄMOCHROMATOSE**

(57) Erfindungsgemäß wird bei einem Verfahren zur Diagnose von Hämochromatose eine biologische Probe auf Vorliegen einer C → G Mutation am Nukleotid 750 des TFR2-Gens untersucht. Erfindungsgemäße Sonden sind fähig mit dem TFR2-Gen im Bereich des Nukleotids 750 bei Vorliegen einer C → G Mutation zw. mit den entsprechenden Bereichen der transkribierten RNA zu hybridisieren.

AT 009 142 U1 2007-05-15

DVR 0078018

Die Erfindung betrifft Verfahren zur genetischen Diagnose von Hämochromatose sowie Sonden zur genetischen Diagnose von Hämochromatose.

Hämochromatose ist durch eine Störung im Eisenstoffwechsel des menschlichen Körpers gekennzeichnet, die zu einer Eisenüberladung führt. Das überschüssige Eisen lagert sich in einer Vielzahl von Organen ab und verursacht irreversible Schäden und daraus resultierende Krankheiten. Da die klinischen Symptome der Hämochromatose oft erst im Alter von 40, 50 oder mehr Jahren auftreten, dann aber schon irreversible Organschäden vorliegen können, gibt es viele Befürworter einer präsymptomatischen Diagnostik. Umso mehr als durch regelmäßigen Aderlass das übermäßig aufgenommene Eisen einfach entfernt werden kann.

Für die genetische Diagnose von Hämochromatose wurde bisher im HFE-Gen auf zwei Mutationen untersucht, nämlich C282Y und H63D.

Die H63D Mutation ist eine C → G Mutation im Codon 63 und verwandelt die Aminosäure 63 von Histidin in Asparaginsäure. Da die Häufigkeit dieser Mutation bei der allgemeinen Bevölkerung hoch ist, ist ihre Rolle in Bezug auf die Diagnose von Hämochromatose unsicher.

Ein weitaus besseres Kriterium für die Diagnose von Hämochromatose ist die C282Y Mutation, die in 65 bis 95% der Betroffenen gefunden wird. Sie ist eine G → A Mutation am Nukleotid 845 des open reading frame des HFE-Gens, die die Aminosäure 282 von Cystein in Tyrosin verwandelt. Der Anteil jener Hämochromatose-Patienten, welche keine C282Y Mutation tragen, variiert und ist z.B. in Italien höher als in nordeuropäischen Ländern. Es ist daher wichtig, neben den bekannten Mutationen jene genetischen weiteren Ursachen im HFE-Gen und in anderen Genen zu finden, welche in Patienten zur Eisenüberladung führen können.

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, weitere Möglichkeiten zu finden, genetische Ursachen für Hämochromatose zu diagnostizieren.

Die im Folgenden angeführten Nukleotidpositionen entsprechen der Nomenklatur von Feder et al (1996) A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis, Nature Genet. 13, 399-408.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, dass eine biologische Probe auf Vorliegen einer C → G Mutation am Nukleotid 750 des open reading frame des TFR2 (Transferrin Receptor 2)-Gens untersucht wird. Diese Mutation bewirkt die Umwandlung der Aminosäure Tyrosin in ein Stopcodon.

Als biologische Probe kann dabei Blut, Gewebs-Biopsie, Mundhöhlenabstrich, Fruchtwasser etc. verwendet werden, wobei die biologische Probe, je nach Auswahl des an sich bekannten Untersuchungsverfahrens, ebenfalls bekannten Vorbehandlungen unterworfen wird.

Um zu unterscheiden, ob die Mutation heterozygot oder homozygot vorliegt, wird vorzugsweise die biologische Probe auch auf Vorliegen von Nukleinsäuren untersucht, deren TFR2-Gen die genannte Mutation nicht aufweist.

Die Untersuchung kann in an sich bekannter Weise durch Sequenzierung der aus der biologischen Probe erhaltenen Nukleinsäure durchgeführt werden oder die biologische Probe wird mit mindestens einer Sonde, die fähig ist, mit dem TFR2-Gen im Bereich des Nukleotids 750 bei Vorliegen der C → G Mutation bzw. mit den entsprechenden Bereichen der transkribierten RNA zu hybridisieren, in Kontakt gebracht und es wird überprüft, ob entsprechende Hybridisierungsprodukte vorliegen. Um zu unterscheiden, ob die Mutation heterozygot oder homozygot vorliegt, wird vorzugsweise die biologische Probe mit mindestens einer weiteren Sonde in Kontakt gebracht, die fähig ist, mit dem gleichen Bereich zu hybridisieren, wenn keine Mutation vorliegt.

Alternativ kann die biologische Probe mittels Antikörper auf Vorliegen eines verkürzten TFR2-Proteins untersucht werden, wobei dieses verkürzte Protein durch Abbruch der Translation durch das Stopcodon entsprechend der C → G Mutation am Nukleotid 750 des TFR2-Gens gebildet wird. Eine Untersuchung mittels Antikörper auf Vorliegen eines TFR2-Proteins herkömmlicher Länge gibt Aufschluss, ob die Mutation heterozygot oder homozygot vorliegt.

Derzeit werden eine Vielzahl von Verfahren zur Analyse von Mutationen verwendet, unter anderem RFLP (restriction fragment length polymorphism), PCR-SSP (PCR with sequence-specific primers), Allelespezifische Oligonukleotidhybridisierung, SSCP (single-strand conformation polymorphism), DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), OLA (oligonucleotide ligation assay), Echtzeit-Fluoreszenz-PCR und DNA Sequenzierung. Wenn RNA untersucht wird, kann das z.B. mittels sog. "NASBA" erfolgen oder es kann auch RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben werden, dann mit PCR amplifiziert und anschließend charakterisiert werden. All diese bekannten Analyseverfahren können für das erfindungsgemäße Diagnoseverfahren herangezogen werden.

Die erfindungsgemäße Sonde zur Diagnose von Hämochromatose anhand einer Mutation im TFR2-Gen ist fähig mit dem TFR2-Gen im Bereich des Nukleotids 750, bei Vorliegen einer C → G Mutation bzw. mit den entsprechenden Bereichen der transkribierten RNA zu hybridisieren.

Ansprüche:

1. Verfahren zur Diagnose von Hämochromatose, *dadurch gekennzeichnet*, dass eine biologische Probe auf Vorliegen einer C → G Mutation am Nukleotid 750 des TFR2-Gens untersucht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, dass die biologische Probe auch auf Vorliegen von Nukleinsäuren untersucht wird, deren TFR2-Gen die genannten Mutationen nicht aufweist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Untersuchung in an sich bekannter Weise durch Sequenzierung der aus der biologischen Probe erhaltenen Nukleinsäure durchgeführt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, dass die biologische Probe mit mindestens einer Sonde, die fähig ist mit dem TFR2-Gen im Bereich des Nukleotids 750 bei Vorliegen der C → G Mutation bzw. mit den entsprechenden Bereichen der transkribierten RNA zu hybridisieren, in Kontakt gebracht wird und dass überprüft wird, ob entsprechende Hybridisierungsprodukte vorliegen.
5. Verfahren nach Anspruch 4, *dadurch gekennzeichnet*, dass die biologische Probe mit mindestens einer weiteren Sonde in Kontakt gebracht wird, die fähig ist, mit dem gleichen Bereich zu hybridisieren, wenn keine Mutation vorliegt.
6. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, dass die biologische Probe mittels Antikörper auf Vorliegen eines verkürzten TFR2-Proteins untersucht wird, wobei dieses verkürzte Protein durch Abbruch der Translation durch das Stopcodon entsprechend der C → G Mutation am Nukleotid 750 des TFR2-Gens gebildet wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, *dadurch gekennzeichnet*, dass die biologische Probe weiters mittels Antikörper auf Vorliegen eines TFR2-Proteins herkömmlicher Länge untersucht wird.

8. Sonde zur Diagnose von Hämochromatose, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Sonde fähig ist mit dem TFR2-Gen im Bereich des Nukleotids 750 bei Vorliegen einer C → G Mutation bzw. mit den entsprechenden Bereichen der transkribierten RNA zu hybridisieren.

5

Keine Zeichnung

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Klassifikation des Anmeldegegenstands gemäß IPC ⁶ : C12Q 1/68 (2006.01)		AT 009 142 U1
Recherchiertes Prüfobjekt (Klassifikation): C12Q 1/68		
Konsultierte Online-Datenbank: WPI, CAS, Medline		
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 30.09.2003 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 ¹⁾	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
X	CAMASCHELLA, C. et al. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. Nature Genetics, 1. Mai 2000, Vol. 25, Seiten 14-15. das ganze Dokument	1-8
¹⁾ 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 in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen). & Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist.		
Datum der Beendigung der Recherche: 15. Feber 2006	<input type="checkbox"/> Fortsetzung siehe Folgeblatt	Prüfer(in): Mag. MOSSER

Hinweis

Die **Kategorien** der angeführten Dokumente dienen in Anlehnung an die Kategorien der Entgegenhaltungen bei EP- bzw. PCT-Recherchenberichten zur raschen Einordnung des ermittelten Stands der Technik.

Bitte beachten Sie, dass nach der **Zahlung der Veröffentlichungsgebühr** die **Registrierung** erfolgt und die **Gebrauchsmusterschrift veröffentlicht** wird, auch wenn die Neuheit bzw. der erforderlich erfinderische Schritt nicht gegeben ist. In diesen Fällen könnte ein allfälliger **Antrag auf Nichtig-erklärung** (kann von jedermann gestellt werden) zur Löschung des Gebrauchsmusters führen. Auf das Risiko allfälliger im Fall eines Nichtigkeitsantrags anfallender Prozesskosten (die gemäß §§ 40 bis 55 Zivilprozessordnung zugesprochen werden) darf hingewiesen werden.

Ländercodes von Patentschriften (Auswahl, weitere Codes siehe **WIPO ST. 3.**)

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);

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 Patentamtes betriebenen Kopierstelle können **Kopien** der ermittelten Veröffentlichungen bestellt werden.

Über den Link <http://at.espacenet.com/> können **Patentveröffentlichungen am Internet** kostenlos eingesehen werden.

Auf Bestellung gibt die von der Teilrechtsfähigkeit des Österreichischen Patentamtes 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 den Serviceleistungen erhalten Sie unter der Telefonnummer

+43 1 534 24 - 738 bzw. 739

Schriftliche Bestellungen:

per FAX Nr. + 43 1 534 24 – 737 oder per E-Mail an Kopierstelle@patentamt.at