

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
24. November 2011 (24.11.2011)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2011/144390 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G01N 21/29 (2006.01) A61B 5/103 (2006.01)
G01N 21/49 (2006.01) G02B 21/26 (2006.01)
A61B 5/00 (2006.01) G02B 21/34 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2011/055730

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. April 2011 (12.04.2011)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2010 021 534.1 19. Mai 2010 (19.05.2010) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TU-
BINGEN UNIVERSITÄTSKLINIKUM [DE/DE];
Geissweg 3, 72076 Tuebingen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MOEHRLE, Matthi-
as [DE/DE]; Rappenberghalde 51/6, 72070 Tuebingen
(DE).

(74) Anwalt: WITTE, WELLER & PARTNER; Postfach 10
54 62, 70047 Stuttgart (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN,
KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG,
NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS,
IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

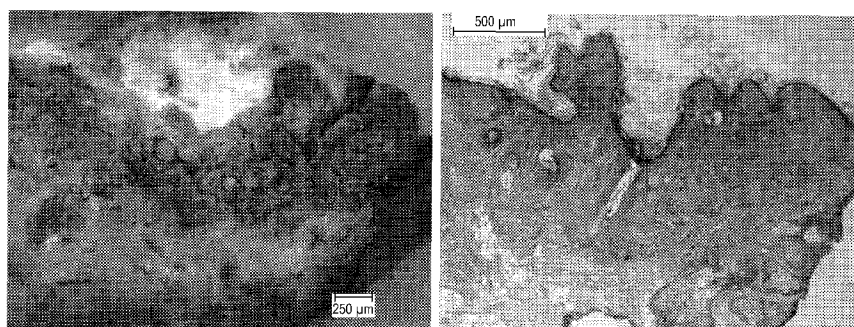
Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)

(54) Title: DIRECT EXAMINATION OF BIOLOGICAL MATERIAL *EX VIVO*

(54) Bezeichnung : DIREKTUNTERSUCHUNG VON BIOLOGISCHEM MATERIAL EX VIVO

Fig. 1A



(57) Abstract: The invention relates to a method for the visual examination of biological material *ex vivo* and to a device for the spatial orientation of biological material which device can be used in said method.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur visuellen Untersuchung von biologischem Material *ex vivo* sowie eine in diesem Verfahren einsetzbare Vorrichtung zum räumlichen Orientieren von biologischem Material.

WO 2011/144390 A1

Direktuntersuchung von biologischem Material *ex vivo*

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur visuellen Untersuchung von biologischem Material *ex vivo* sowie eine in diesem Verfahren einsetzbare Vorrichtung zum räumlichen Orientieren von biologischem Material.

[0002] Die visuelle Untersuchung von biologischem Material spielt eine zentrale Rolle in der Erkennung von pathologischen Veränderungen. Im Bereich der Dermatochirurgie wird bspw. routinemäßig überprüft, ob bei chirurgisch entnommenem Gewebematerial die Schnittränder *in sano*, das heißt im gesunden Gewebe, erfolgt sind, um sicherzustellen, dass das Tumormaterial vollständig entfernt wurde. Diese histologische Kontrolle der dreidimensionalen Exzidatschnittränder, die auch

als 3D-Histologie bezeichnet wird, verringert nachweislich das Risiko von Lokalreziden und ist deshalb bei vielen Tumoren der Haut die Vorgehensweise der Wahl.

[0003] Die visuelle Untersuchung der Schnittländer im Rahmen der 3D-Histologie erfolgt bislang an Schnittpräparaten, die von dem entnommenen biologischen Material zuvor angefertigt werden.

[0004] In den USA und teilweise auch in Europa erfolgt die Schnittrandkontrolle an Gefrier- bzw. Schnellschnitten. Dieses Verfahren wird nach seinem Begründer Frederic E. Mohs auch als "Mohs' Surgery" bezeichnet. Bei diesem Verfahren wird das entnommene biologische Material tiefgefroren. Von dem gefrorenen Gewebe werden Schnitte mit einer Dicke von etwa 5 bis 10 µm angefertigt. Die Schnitte werden anschließend in der Durchlichtmikroskopie visuell untersucht. Untersuchungsergebnisse liegen innerhalb von 30 bis 45 Minuten vor. Allerdings ist das Gefrier- bzw. Schnellschnittverfahren ungenau und nur bei soliden, nodulären Basalzellkarzinomen sicher einsetzbar.

[0005] Genauere Ergebnisse lassen sich in dem so genannten Paraffinschnittverfahren erzielen. Dabei wird das entnommene biologische Material in Paraffin eingebettet. Anschließend werden Gewebeschnitte angefertigt und gleichermaßen durchlichtmikroskopisch untersucht. Untersuchungsergebnisse stehen wegen der aufwändigen Probenaufbereitung jedoch erst ca. 20 Stunden nach der Entnahme des biologischen Materials zur Verfügung. Es ist deshalb bspw. nicht möglich, innerhalb der gleichen Operation bei im Schnittrand nachgewiesenen Tumorausläufern gezielt nachzuschneiden. Deshalb werden die Schnittbereiche bzw. Wunden häufig so lange offen gehalten, bis das Ergebnis vorliegt, was für den Patienten eine hohe Belastung und ein hohes Infektionsrisiko bedeutet.

[0006] Ein weiterer entscheidender Nachteil der vorstehend genannten Schnittverfahren besteht darin, dass das untersuchte biologische Material sozusagen "verbraucht" wird und für weitere, beispielsweise histologische oder molekularbiolo-

gische Untersuchungen oder andere Behandlungen nicht mehr zur Verfügung steht. Sollten derartige weitere Untersuchungen erforderlich sein, muss dem betroffenen Patienten erneut biologisches Material entnommen werden, was gegebenenfalls erneute Narkosen und andere operative Risiken bedeutet.

[0007] Die konfokale Laserscanningmikroskopie stellt ein Verfahren dar, bei dem sog. optische Schnitte angefertigt werden und so eine histopathologische Beurteilung von biologischem Material ermöglicht. Die Eindringtiefe beträgt etwa 0,3 mm, so dass Tumorexzidate von der Schnitttrandseite von außen mikroskopisch beurteilt werden können. Die konfokale Laserscanningmikroskopie ist jedoch technisch aufwändig, und die diagnostische Sicherheit ist unzureichend.

[0008] Vor diesem Hintergrund ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur visuellen Untersuchung von biologischem Material *ex vivo* bereitzustellen, mit dem die Nachteile der derzeit angewandten Verfahren vermieden werden. Insbesondere soll ein solches Verfahren bereitgestellt werden, das innerhalb kürzester Zeit Untersuchungsergebnisse liefert und dabei das entnommene biologische Material nicht verbraucht.

[0009] Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren zur visuellen Untersuchung von biologischem Material *ex vivo* gelöst, das folgende Schritte aufweist: 1. Bereitstellen von biologischem Material, 2. Markieren des biologischen Materials, 3. Ausschalten von Reflexionen an der Oberfläche des biologischen Materials, und 4. Auflichtmikroskopisches Untersuchen des biologischen Materials, wobei das bereitgestellte biologische Material vitales biologisches Material ist, das weder histologisch noch optisch geschnitten wird.

[0010] Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe wird mit diesem Verfahren vollkommen gelöst.

[0011] Mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens kann jegliches biologisches Material *ex vivo* untersucht werden, wie beispielsweise Gewebe beliebiger Organe. Wichtige Organe betreffen die Haut, Bindegewebe, Nervengewebe, innere Organe, Muskel, Blutgefäße etc.

[0012] Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere zur Schnittrandkontrolle im Rahmen der Dermatochirurgie.

[0013] Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass das entnommene biologische Material vor einer Untersuchung weder histologisch oder optisch geschnitten werden muss.

[0014] Unter histologischem Schneiden wird erfindungsgemäß die Anfertigung von Schnitten an bzw. von biologischem Material mittels einer Schneidevorrichtung, wie eines Messers oder eines Mikrotoms, verstanden, mit Schnittdicken, die üblicherweise zwischen 5 und 10 µm bzw. 20 µm liegen.

[0015] Unter optischem Schneiden wird erfindungsgemäß die aufwändige Anfertigung von optischen Schnitten mittels konfokaler Mikroskopie, wie beispielsweise der konfokalen Laserscanningmikroskopie oder der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie, verstanden.

[0016] Eine aufwändige Probenaufbereitung bzw. -behandlung zum Zwecke des histologischen Schneidens oder der Anfertigung optischer Schnitte ist erfindungsgemäß jedoch nicht erforderlich. Das erfindungsgemäße Verfahren liefert vielmehr Ergebnisse in wenigen Minuten nach der Bereitstellung des biologischen Materials. Das erfindungsgemäße Verfahren liefert damit nicht nur bedeutend schneller Ergebnisse als das Paraffinschnittverfahren und die konfokale Laserscanningmikroskopie, sondern auch als das Gefrier- bzw. Schnellschnittverfahren ("Mohs' Surgery"). Darüber hinaus führt es auch zu genaueren Ergebnissen als die Mohs' Surgery oder auch die konfokale Laserscanningmikroskopie. Deshalb ist es

bspw. im Rahmen der Schnitttrandkontrolle möglich noch in der gleichen Operationssitzung unmittelbar nachzuschneiden, sollte der zunächst vorgenommene Schnitt nicht *in sano* sein.

[0017] Ferner wird das biologische Material nicht durch eine Probenaufbereitung, -einfrierung oder -einbettung "verbraucht" sondern steht für weitere Untersuchungen und Behandlungen zur Verfügung. Das erfindungsgemäß bereitgestellte biologische Material ist noch "vital", da es frisch entnommen wird, und weist nach wie vor Stoffwechselaktivität auf.

[0018] Die Dicke des erfindungsgemäß bereitgestellten Materials liegt über der eines Dünnschnittes, ist also $> 10\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise $> 20\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise $> 50\text{ }\mu\text{m}$, weiter bevorzugt $> 100\text{ }\mu\text{m}$. Das erfindungsgemäß bereitgestellte biologische Material stellt bspw. ein mittels chirurgischer Exzision entnommenes Gewebe der Haut dar, mit Dicken, die bei ca. 0,2 mm bis ca. 30 mm liegen.

[0019] Die auflichtmikroskopische Untersuchung wird erfindungsgemäß beispielsweise mittels eines Stereomikroskops oder eines digitalen Mikroskops durchgeführt.

[0020] Unter einer Markierung des biologischen Materials wird eine Behandlung des biologischen Materials derart verstanden, dass dieses visuell verbessert untersucht werden kann, wie beispielsweise eine Färbung mittels histologischer Farbstoffe oder Immunfärbung.

[0021] Da das bereitgestellte biologische Material i.d.R. frisch entnommen wird, weist es Feuchtigkeit auf. An der Grenzfläche zwischen dem feuchten biologischen Material und der Luftoberfläche können Lichtreflexe auftauchen, die eine auflichtmikroskopische Untersuchung erschweren. Derartige Reflexionen an der Oberfläche des biologischen Materials werden erfindungsgemäß mittels dem Fachmann bekannter Methoden ausgeschaltet.

[0022] Wie der Erfinder im Rahmen einer Studie an einer Vielzahl von Präparaten aus Patienten mit klinischem Verdacht auf Basalzellkarzinomen nachweisen konnte, liefert das erfindungsgemäße Verfahren diagnostisch zuverlässige Ergebnisse. Es zeigte sich eine exzellente Korrelation zwischen dem erfindungsgemäßen Verfahren und dem Paraffinschnittverfahren aus dem Stand der Technik.

[0023] Nach einer bevorzugten Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst Schritt 1 folgenden Schritt: 1.1 Befeuchten des biologischen Materials.

[0024] Diese Maßnahme hat den Vorteil, dass auch gegebenenfalls unzureichend feuchtes oder sogar trockenes bereitgestelltes biologisches Material zuverlässig visuell untersucht werden kann. Die Befeuchtung kann mit üblichen hierfür geeigneten Lösungen erfolgen, wie beispielsweise Wasser, Kochsalzlösung, biologische Puffer etc.

[0025] Nach einer bevorzugten Weiterbildung umfasst Schritt 1.1 des erfindungsgemäßen Verfahrens folgenden Schritt: 1.1.1 Fixieren des biologischen Materials.

[0026] Diese Maßnahme hat den Vorteil, dass eine noch bessere visuelle Untersuchung des biologischen Materials ermöglicht wird. Das Fixieren erfolgt in üblichen Fixierungslösungen, wie beispielsweise 10 % Essigsäure oder 4,5 % Formalin. Vorzugsweise erfolgt die Fixierung minimal, das heißt innerhalb von nur wenigen Sekunden, < 1, 2, 3, oder vorzugsweise < 10 Sekunden. Das biologische Material wird dabei nicht "verbraucht" sondern steht weiteren Untersuchungen oder Behandlungen uneingeschränkt zur Verfügung. Wie der Erfinder nachweisen konnte, bleibt durch eine solche Minimalfixierung die Qualität anschließend angefertigter klassischer Paraffinschnitte unverändert.

[0027] Nach einer Weiterentwicklung des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt das Ausschalten von Reflexionen an dem biologischen Material durch Verwendung eines transparenten Mediums und eines Glasträgers, wobei das transparente Medium im Wesentlichen ohne Einschluss von Luft oder Gas zwischen das biologische Material und den Glasträger und in direkten Kontakt mit Letzteren gebracht wird.

[0028] Diese Maßnahme hat den Vorteil, dass auf einfache und wirksame Art und Weise Reflexionen an der Oberfläche des biologischen Materials ausgeschaltet werden. Bei dem transparenten Medium kann es sich um eine Flüssigkeit, wie beispielsweise Wasser oder Kochsalzlösung, oder um ein Gel, wie beispielsweise Ultraschallgel handeln. Als Glasträger eignet sich beispielsweise ein handelsüblicher Objektträger oder Deckglas für die Mikroskopie.

[0029] Nach einer bevorzugten Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt das Ausschalten von Reflexionen an dem biologischen Material durch Verwendung von polarisiertem Licht in der auflichtmikroskopischen Untersuchung (Polarisationsmikroskopie).

[0030] Diese Maßnahme hat den Vorteil, dass auf die Verwendung eines Glasträgers verzichtet werden kann, welcher die dreidimensionale Betrachtung der biologischen Probe ggf. erschweren kann. Die Verwendung von polarisiertem Licht kann bspw. durch Einsatz eines Polarisationsmikroskops erfolgen, das zwei Polarisationsfilter aufweist. Der erste Polarisationsfilter, auch Polarisator oder Primärfilter genannt, polarisiert das Licht der Lichtquelle des Mikroskops linear, lässt also nur Licht durch, das in einer Schwingungsebene schwingt. Ein zweiter Polarisationsfilter, der als Analysator oder Sekundärfilter bezeichnet wird, ist gegenüber dem ersten um 90° gedreht. Die Schwingungsrichtung des vorher linear polarisierten Lichtes ist dadurch genauso orientiert, dass es vom Analysator vollständig geblockt wird. Reflexionen an dem biologischen Material bei der auflichtmikroskopischen Untersuchung werden dadurch aufgehoben.

[0031] Nach einer bevorzugten Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst das Markieren des biologischen Materials eine Farbreaktion an dem Letzteren.

[0032] Diese Maßnahme hat den Vorteil, dass der Kontrast in dem biologischen Material erhöht wird und die visuelle Untersuchung dadurch erleichtert wird. Die Farbreaktion kann eine Schnellfärbung mit typischen histologischen Farbstoffen darstellen, wie mit Hämalalaun, Toluidinblau, Hämatoxilin, Picrofuchsin, Eosin etc. Wie der Erfinder feststellen konnte, beeinträchtigt auch eine solche Farbreaktion das biologische Gewebe nicht, welches nach wie vor für weitere Untersuchungen zur Verfügung steht.

[0033] Nach einer Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst das Markieren des biologischen Materials eine spezifische Immunreaktion an dem Letzteren, die vorzugsweise folgende Schritte aufweist: 2.1 Inkontaktbringen des biologischen Materials mit einem Primärantikörper zur Bindung des Letzteren an das biologische Material, 2.2 Entfernen des nicht gebundenen Primärantikörpers von dem biologischen Material, und 2.3 Nachweisen einer spezifischen Bindung des Primärantikörpers an das biologische Material, welcher vorzugsweise folgende weitere Schritte umfasst: 2.3.1 Inkontaktbringen des biologischen Materials mit einem Sekundärantikörper zur Bindung des Letzteren an den Primärantikörper, 2.3.2 Nachweisen einer spezifischen Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper.

[0034] Diese Maßnahme hat den Vorteil, dass durch die Verwendung von hochspezifischen und -selektiven Antikörpern innerhalb von wenigen Minuten, gegebenenfalls noch im Operationssaal, das bereitgestellte biologische Material auf das Vorhandensein bestimmter Strukturen, wie beispielsweise Tumormarkern, untersucht werden kann. Eine diagnostische Untersuchung wird dadurch nochmals verbessert möglich. Auch diese spezifische Immunreaktion verbraucht nach Erkenntnissen des Erfinders das biologische Material nicht.

[0035] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft eine Vorrichtung zum räumlichen Orientieren von biologischem Material, die zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzt werden kann, und Folgendes aufweist, nämlich:

- ein Aufnahmeelement zur Aufnahme eines Trägers für das biologische Material,
- ein Halteelement, mit dem das Aufnahmeelement drehbar verbunden ist, und
- ein Basiselement, mit dem das Halteelement drehbar verbunden ist.

[0036] Die erfindungsgemäße Vorrichtung ermöglicht es auf besonders vorteilhafte Art und Weise, das bereitgestellte biologische Material, welches auf dem Träger angeordnet ist, von allen Seiten, also räumlich bzw. dreidimensional, zu betrachten. Damit können bspw. Hautexzidate hinsichtlich ihrer Schnittländer entsprechend der 3D-Histologie untersucht werden.

[0037] Erfindungsgemäß bedeutet "drehbar verbunden", dass die jeweiligen Elemente vorzugsweise bis zu 360°, also vollständig bzw. grenzenlos, relativ zueinander verdreht werden können.

[0038] Bei dem Träger für das biologische Material kann es sich erfindungsgemäß um einen Glasträger, beispielsweise um einen klassischen Objektträger aus der Mikroskopie, handeln.

[0039] Dabei ist es erfindungsgemäß bevorzugt, wenn das Aufnahmeelement ein Befestigungselement, vorzugsweise einen Saugnapf, zur Befestigung des Trägers für das biologische Material aufweist.

[0040] Diese Maßnahme hat den Vorteil, dass auf einfache Art und Weise beispielsweise handelsübliche Mikroskopieobjektträger an das Aufnahmeelement befestigt und von diesem wieder entfernt werden können.

[0041] Ferner ist es bevorzugt, wenn bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung das Halteelement mit dem Aufnahmeelement über eine erste Drehachse drehbar verbunden ist, und/oder wenn das Basiselement mit dem Halteelement über eine zweite Drehachse drehbar verbunden ist.

[0042] Diese Maßnahmen haben den Vorteil, dass auf einfache Art und Weise eine Drehverbindung zwischen den jeweiligen Elementen realisiert wird.

[0043] Nach einer bevorzugten Weiterentwicklung der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist das Basiselement mit einem Fußelement zur Positionierung der Vorrichtung auf einer horizontalen Ebene, vorzugsweise über eine dritte Drehachse, drehbar verbunden.

[0044] Diese Maßnahme hat den Vorteil, dass die Vorrichtung einfacher handhabbar wird und beispielsweise noch im Operationssaal unter dem Objektiv des Mikroskops auf der Arbeitsfläche positioniert werden kann. Durch die Drehbarkeit wird vermieden, dass, alternativ, die gesamte Vorrichtung auf einer horizontalen Ebene verdreht werden muss, um das biologische Material dreidimensional zu untersuchen.

[0045] Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist vorzugsweise zur Verwendung in einem Verfahren zur visuellen Untersuchung von biologischem Material *ex vivo* ausgebildet, wobei es sich weiter vorzugsweise um das oben beschriebene erfindungsgemäße Verfahren handelt.

[0046] Es versteht sich, dass die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in der jeweils angegebenen Kombi-

nation, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

[0047] Die vorliegende Erfindung wird nun anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert, die rein illustrativen Charakter haben und die Reichweite der Erfindung nicht einschränken. Dabei wird Bezug genommen auf die beigelegten Figuren, in denen Folgendes dargestellt ist:

- Fig. 1 zeigt einen Vergleich der Untersuchungsergebnisse erzielt mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens (links) und mittels des klassischen Paraffinschnittverfahrens nach HE-Färbung (rechts) am Beispiel des Plattenepithelkarzinoms (A, B), des soliden Basalzellkarzinoms (C) und des gemischten Basalzellkarzinoms ("mixed type") (D);
- Fig. 2 zeigt das Ergebnis einer immunhistologischen Untersuchung mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens an fibrosierenden Basalzellkarzinomen in verschiedenen Vergrößerungsstufen (A bis C) unter Verwendung eines Anti-BerEp4-Antikörpers, und
- Fig. 3 zeigt die schematische Darstellung einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Vergleich des erfindungsgemäßen Verfahrens mit dem Paraffinschnittverfahren Paraffinschnitten nach HE-Färbung

[0048] Das erfindungsgemäße Verfahren wurde an verschiedenen Hautkrebspräparaten, nämlich solchen mit einem Plattenepithelkarzinom (SCC) sowie verschiedenen Formen von Basalzellkarzinomen (BCC) untersucht. Als Kontrolle diente tumorfreies Hautgewebe. Hierzu wurden Gewebestreifen aus so genannten Brotlaibsnitten oder aus lateralen Resektionsrändern und so genannten "Muffin"-Präparationen gewonnen.

[0049] Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgte die Probenaufbereitung gemäß nachfolgendem Protokoll:

Fixieren	10%ige Essigsäure ("Eisessig", Merck, Darmstadt, Deutschland)	40 sec
Spülen	Leitungswasser	10 sec
Färben	0,2 % Toluidin-Blau (Merck, Darmstadt, Deutschland)	40 sec
Spülen	Leitungswasser	5 sec
Insgesamt		95 sec

[0050] Anschließend wurden hierzu von sämtlichen untersuchten Proben HE-Paraffinschnitte nach Standardvorgehensweise angefertigt.

[0051] Die nachfolgende Tabelle 1 zeigt die Anzahl der untersuchten Proben im Rahmen einer "klassischen" histologischen Analyse mittels des Paraffinschnittverfahrens unter Verwendung einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung). Verwendet wurde sowohl ein Stereomikroskop (Leica M205 FA) als auch

ein Digitalmikroskops (Keyence VHX-600K). Alle 129 Proben wurden mit dem Digitalmikroskop, 78 Proben davon auch mit dem Stereomikroskop untersucht. Danach wurden alle 129 Proben mit dem HE-Paraffinschnittverfahren aufgearbeitet.

	Gewebestreifen		"Muffins"		Total	
HE-Färbung (Paraffinschnitte)	Stereo- mikroskop	Digitales Mikroskop	Stereo- mikroskop	Digitales Mikroskop	Stereo- mikroskop	Digitales Mikroskop
Tumorfrei	18	27	5	15	23	42
Solides BCC	32	57	2	5	34	62
Fibrosierendes BCC	3	5	0	0	3	5
Superfizielles BCC	10	10	0	1	10	11
Gemischtes BCC	1	1	0	0	1	1
Plattenepithelkarzinom (SCC)	7	8	0	0	7	8
Total	71	108	7	21	78	129

Tabelle 1: Untersuchte Proben

[0052] Die Ergebnisse, die mittels des klassischen Paraffinschnittverfahrens erzielt wurden, wurden hinsichtlich Sensitivität, Spezifität, dem positiven Vorhersagewert (PPV) und dem negativen Vorhersagewert (NPV) mit denen aus dem erfindungsgemäßen Verfahren unter Verwendung eines Digitalmikroskops und eines Stereomikroskops verglichen. Proben, die in den HE-gefärbten Schnitten ein Plattenepithelzellkarzinom enthielten, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

[0053] Das qualitative Ergebnis dieses Vergleiches ist in der Fig. 1 und das quantitative Ergebnis in der nachfolgenden Tabelle 2 dargestellt:

	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
Insgesamt (n=121)	91 %	90 %	93 %	88 %
Gewebestreifen (n=100)	92 %	89 %	86 %	94 %
"Muffins" (n=21)	83 %	93 %	83 %	93 %

Tabelle 2: Digitalmikroskopische Untersuchung

[0054] Der vorstehende Vergleich wurde entsprechend unter Verwendung eines Stereomikroskops durchgeführt. Das quantitative Ergebnis dieses Vergleichs ist in nachfolgender Tabelle 3 dargestellt:

	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
Insgesamt (n=71)	95 %	94 %	95 %	94 %
Gewebestreifen (n=64)	95 %	93 %	95 %	93 %
"Muffins" (n=7)	100 %	100 %	100 %	100 %

Tabelle 3: Stereomikroskopische Untersuchung

[0055] Hierbei zeigt sich auf beeindruckende Art und Weise, dass die Ergebnisse der Untersuchung mit dem erfindungsgemäßen Verfahren in sehr hohem Maße mit dem klassischen Standardverfahren (HE-gefärbte Paraffinschnitte) korrelieren. Das Verfahren weist daher eine sehr große Genauigkeit und Sicherheit auf. Ein mikroskopisch existierender Tumor, bspw. ein Basalzellkarzinom, kann folglich mit dem erfindungsgemäßen Verfahren mit einer sehr hohen Treffsicherheit diagnostiziert werden. Wenn ein Tumor mit dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht nachgewiesen wird, kann dann das mikroskopische Vorhandensein eines Tumors mit einer großen Treffsicherheit ausgeschlossen werden.

Beispiel 2: Immunhistologische Markierung im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens

[0056] Patienten mit Basalzellkarzinomen wurden Gewebeproben entnommen und im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens einer Immunfärbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen das epitheliale spezifische Antigen (ESA) bzw. das epitheliale zelluläre Adhäsionsmolekül (Ep-CAM) mit der Bezeichnung BerEp4 zugeführt. Das Protokoll der Probenbehandlung lautete wie folgt:

Fixieren	4,5 % Formalin ¹	30 sec
Spülen	Leitungswasser	10 sec
Blockierung der endogenen Peroxidase	H ₂ O ₂ 3 % ²	30 sec
Primärantikörper	BerEp4 1:50 ³	90 sec
Spülen	TBS ⁴	10 sec
Sekundärantikörper	EnVision ⁵	90 sec
Spülen	TBS ⁴	10 sec
Färben	DAB+Chromogen ⁶	90 sec
Spülen	Leitungswasser	10 sec
Spülen	Aqua dest	3 sec
Gegenfärben	Hämatoxylin ⁷	10 sec
Spülen	Aqua dest	3 sec
Spülen	Leitungswasser	10 sec

Insgesamt ca. 7 min

[0057] Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Fig. 2 dargestellt. Hier zeigt sich, dass sich mit der extrem schnellen immunhistologischen Markierung im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens eine hochspezifische Markierung mit monoklonalen Primärantikörpern und deren Nachweis mit Sekundärantikörpern erzielen lässt. Dies wurde am Beispiel von Gewebe aus Basalzellkarzinomen und dem

¹ 4,5 % Formalinlösung, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

² H₂O₂ 3 %, Fischar, Saarbrücken, Germany

³ Monoklonal-Maus-anti-humanes epitheliales Antigen, Klon BerEp4 M0804, Dako REAL Antikörper-Verdünnungsmittel S2002, DAKO, Hamburg, Deutschland

⁴ Dako Waschpuffer S3006, DAKO Hamburg, Deutschland

⁵ Dako REAL EnVision HRP Kaninchen/Maus K5007, DAKO Hamburg, Deutschland

⁶ Dako REAL Substratpuffer, DAB+Chromogen, DAKO Hamburg, Deutschland

⁷ Dako REAL Hämatoxylin S2020, DAKO Hamburg, Deutschland

Einsatz von monoklonalen-Maus-anti-humanes-epitheliales-Antigen(Klon BerEp4)-Antikörpern demonstriert. Durch die Verwendung der hochspezifischen Immunmarkierung kann die diagnostische Sicherheit des erfindungsgemäßen Verfahrens so gesteigert werden, dass sie die diagnostische Sicherheit des unspezifischen und wesentlich zeitaufwändigeren Standardverfahrens (HE-gefärbte Paraffinschnitte) übertrifft.

Beispiel 3: Erfindungsgemäße Vorrichtung

[0058] In der Fig. 3 ist ein Beispiel der erfindungsgemäßen Vorrichtung zum räumlichen bzw. dreidimensionalen Orientieren von biologischem Material mit der Bezugsziffer 10 dargestellt.

[0059] Die Vorrichtung 10 weist ein Aufnahmeelement 12 zur Aufnahme eines Trägers 14 für das biologische Material, bspw. ein Mikroskopierobjektträger, auf. Das Aufnahmeelement 12 weist an seinem ersten Ende einen Drehgriff 16 und an seinem zweiten Ende ein Befestigungselement 18, bspw. in Form eines Saugnapfes, auf, die über eine erste Drehachse miteinander verbunden sind. Die erste Drehachse ist drehbar in einem Halteelement 20 gelagert, so dass das Aufnahmeelement 12 über Betätigung des Drehgriffes 16 gegenüber dem Halteelement 20 um 360° verdreht werden kann. Dies ist durch die Bewegungspfeile a angedeutet.

[0060] Die Vorrichtung 10 ist weiter mit einem Basiselement 22 versehen. Das Basiselement 22 ist mit dem Halteelement 20 über eine zweite Achse drehbar verbunden, die rechtwinklig zu der ersten Achse des Aufnahmeelementes 12 angeordnet ist. Das Aufnahmeelement 12 lässt sich dadurch gegenüber dem Basiselement 22 um 360° drehen, was durch den Bewegungspfeil b angedeutet ist.

[0061] Das Basiselement 22 ist mit einem Fußelement 24 zur Positionierung der Vorrichtung auf einer horizontalen Ebene, bspw. dem Arbeits- bzw. Mikroskopierplatz verbunden. Dabei erfolgt die Verbindung über eine dritte Achse, die im

rechten Winkel zur zweiten Achse angeordnet ist, und über die das Basiselement 22 gegenüber dem Fußelement 24 um 360° gedreht werden kann. Dies ist durch den Bewegungspfeil c angedeutet. Alternativ kann auf eine Verdrehbarkeit von Basiselement 22 gegenüber Fußelement 24 verzichtet werden. Zur dreidimensionalen Betrachtung des biologischen Materials ist es dann erforderlich, die gesamte Vorrichtung 10 gegenüber einer horizontalen Ebene zu verdrehen; vgl. Bewegungspfeil c.

[0062] Das Aufnahmeelement 12 kann aus Messing gefertigt sein, wobei der Drehknopf 16 aus Kunststoff gebildet werden kann. Der Drehgriff 16 kann einen Durchmesser von 30 mm haben. Der Saugnapf 18 besteht aus einem elastischen Material, das geeignet ist, um den Träger 14 für das biologische Material zu befestigen..

[0063] Das Halteelement 20 kann aus Messing gefertigt sein und die Dimensionen 15 mm Höhe, 15 mm Breite, 25 mm Länge aufweisen.

[0064] Das Basiselement 22 kann Aluminium und die Dimensionen 10 mm Breite, 10 mm Tiefe, 56 mm Höhe aufweisen.

[0065] Das Fußelement 24 kann die Dimensionen 100 mm Breite, 100 mm Tiefe, 12 mm Dicke aufweisen.

[0066] Mittels der erfindungsgemäßen Vorrichtung lässt sich ein auf dem Träger 14 angebrachtes biologisches Material räumlich, das heißt dreidimensional, orientieren und auflichtmikroskopisch optimal visuell untersuchen. Das biologische Material haftet üblicherweise sehr gut an der Oberfläche des Trägers 14 gut an und rutscht auch in einer steilen Position nicht ab. Gegebenenfalls kann das biologische Material mit einem doppelseitigen Klebeband an dem Träger 14 befestigt werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur visuellen Untersuchung von biologischem Material *ex vivo*, das folgende Schritte aufweist:
 1. Bereitstellen von biologischem Material,
 2. Markieren des biologischen Materials,
 3. Ausschalten von Reflexionen an der Oberfläche des biologischen Materials, und
 4. Auflichtmikroskopisches Untersuchen des biologischen Materials,wobei das bereitgestellte biologische Material vitales biologisches Material ist, das weder histologisch noch optisch geschnitten wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt 1 folgenden Schritt umfasst:
 - 1.1 Befeuchten des biologischen Materials.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt 1.1 folgenden Schritt umfasst:
 - 1.1.1 Fixieren des biologischen Materials.
4. Verfahren nach einem der vorherigen Schritte, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt 3 durch Verwendung eines transparenten Mediums und eines Glas-trägers erfolgt, wobei das transparente Medium im Wesentlichen ohne Einschluss von Luft und/oder Gas zwischen die biologische Probe und den Glas-träger und in direkten Kontakt mit Letzteren gebracht wird.

5. Verfahren nach einem der vorherigen Schritte, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt 3 durch Verwendung von polarisiertem Licht in der auflichtmikroskopischen Untersuchung (Polarisationsmikroskopie) erfolgt.
6. Verfahren nach einem der vorherigen Schritte, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt 2 eine Farbreaktion an dem biologischen Material umfasst.
7. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt 2 eine spezifische Immunreaktion an dem biologischen Material umfasst.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die spezifische Immunreaktion folgende Schritte umfasst:
 - 2.1 Inkontaktbringen des biologischen Materials mit einem Primärantikörper zur Bindung des Letzteren an das biologische Material,
 - 2.2 Entfernen des nicht gebundenen Primärantikörpers von dem biologischen Material, und
 - 2.3 Nachweis einer spezifischen Bindung des Primärantikörpers an das biologische Material.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt 2.3 folgende Schritte umfasst:
 - 2.3.1 Inkontaktbringen des biologischen Materials mit einem Sekundärantikörper zur Bindung des Letzteren an den Primärantikörper, und
 - 2.3.2 Nachweis einer spezifischen Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper.

10. Vorrichtung (10) zum räumlichen Orientieren von biologischem Material, aufweisend
 - ein Aufnahmeelement (12) zur Aufnahme eines Trägers (14) für das biologische Material,
 - ein Halteelement (20), mit dem das Aufnahmeelement (12) drehbar verbunden ist, und
 - ein Basiselement (22), mit dem das Halteelement (20) drehbar verbunden ist.
11. Vorrichtung (10) nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Aufnahmeelement (12) ein Befestigungselement (18) zur Befestigung des Trägers (14) für das biologische Material aufweist.
12. Vorrichtung (10) nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Befestigungselement einen Saugnapf (18) aufweist.
13. Vorrichtung (10) nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Halteelement (20) mit dem Aufnahmeelement (12) über eine erste Drehachse drehbar verbunden ist.
14. Vorrichtung (10) nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Basiselement (22) mit dem Halteelement (20) über eine zweite Drehachse drehbar verbunden ist.
15. Vorrichtung (10) nach einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Basiselement (22) mit einem Fußelement (24) zur Positionierung der Vorrichtung auf einer horizontalen Ebene drehbar verbunden ist.

16. Vorrichtung (10) nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Basiselement (22) mit einem Fußelement (24) zur Positionierung der Vorrichtung (10) auf einer horizontalen Fläche über eine dritte Drehachse drehbar verbunden ist.
17. Vorrichtung (10) nach einem der Ansprüche 10 bis 16, ausgestaltet zur Verwendung in einem Verfahren zur visuellen Untersuchung von biologischem Material *ex vivo*.
18. Vorrichtung (10) nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 ist.

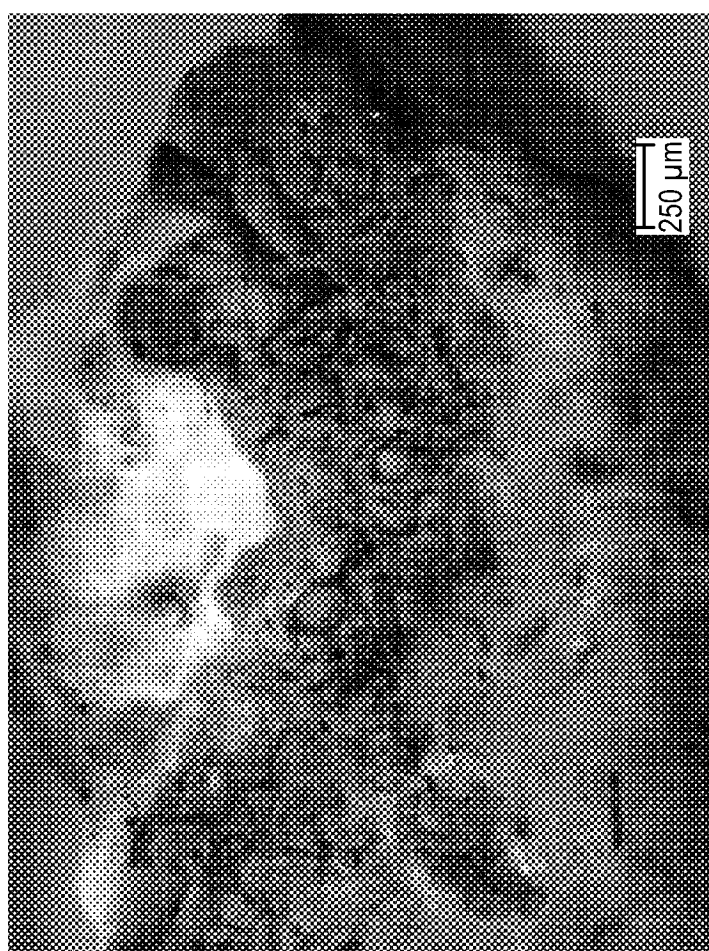
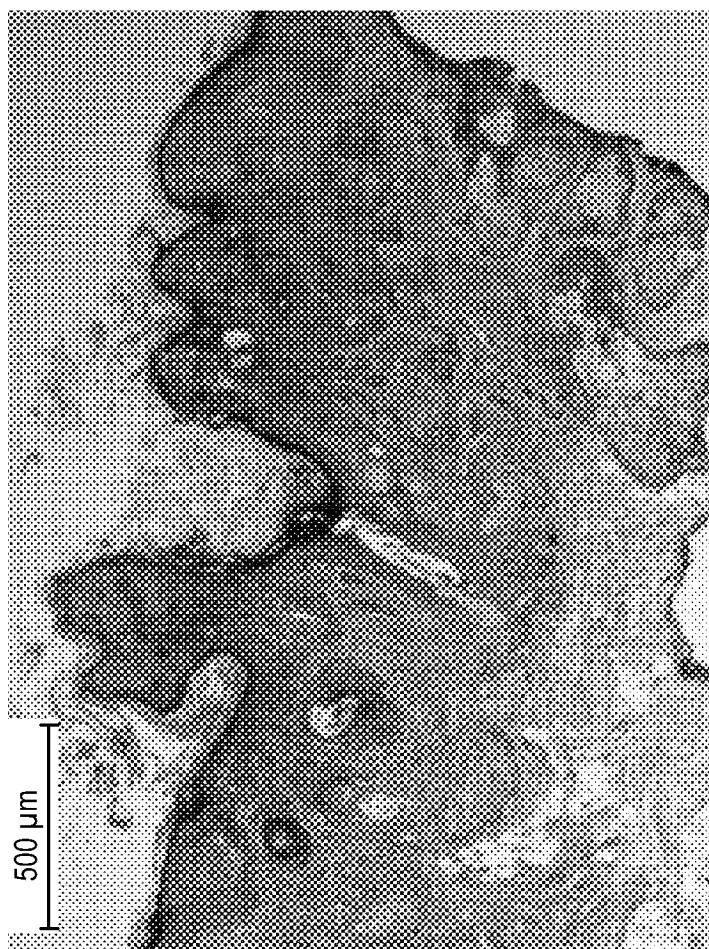


Fig. 1A

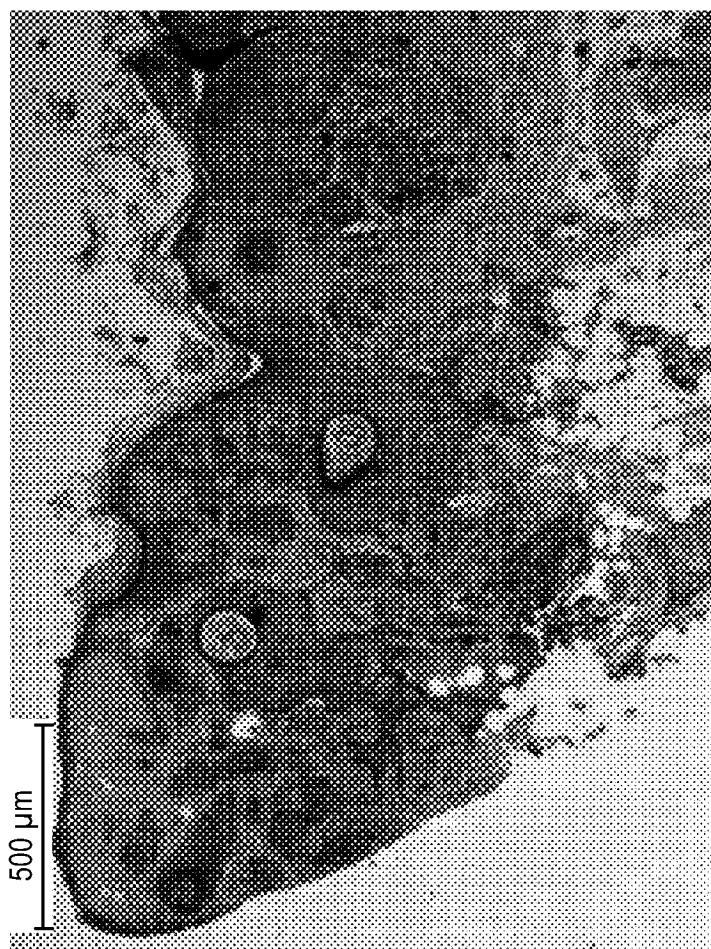


Fig. 1B



Fig. 1C

4/8

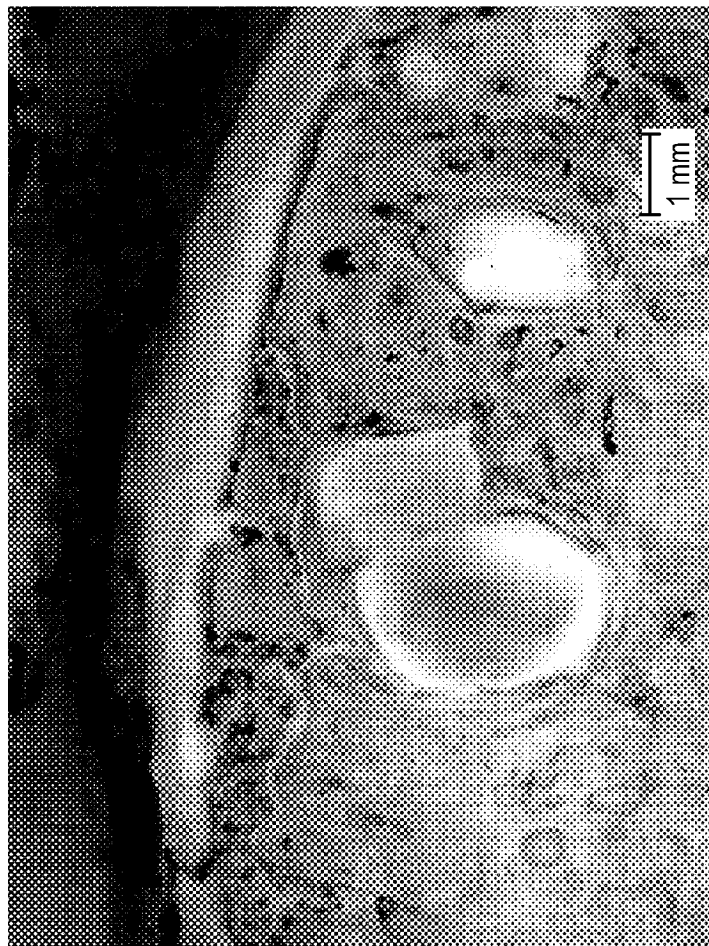


Fig. 1D

Fig. 2A



Fig. 2B

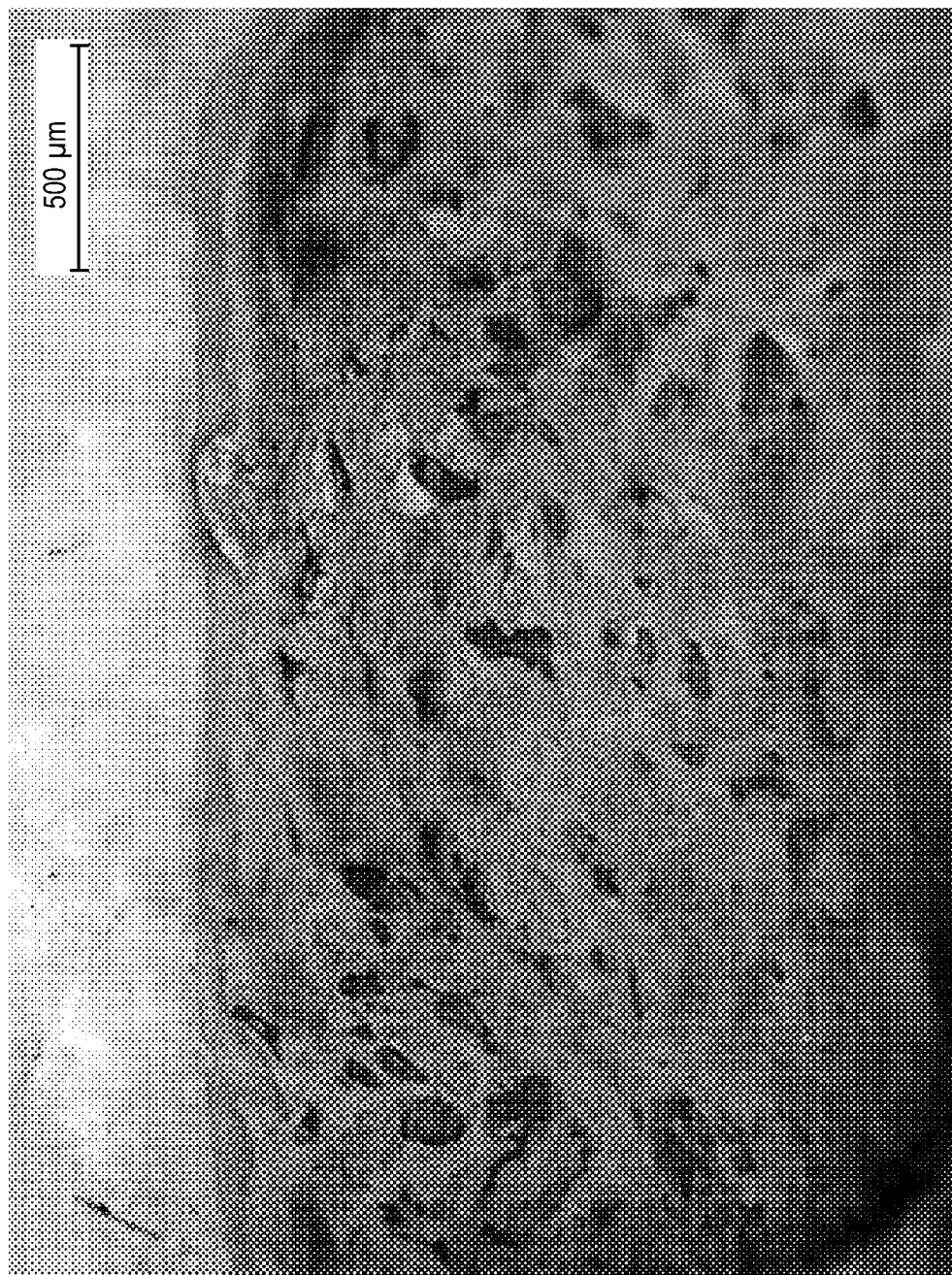


Fig. 2C

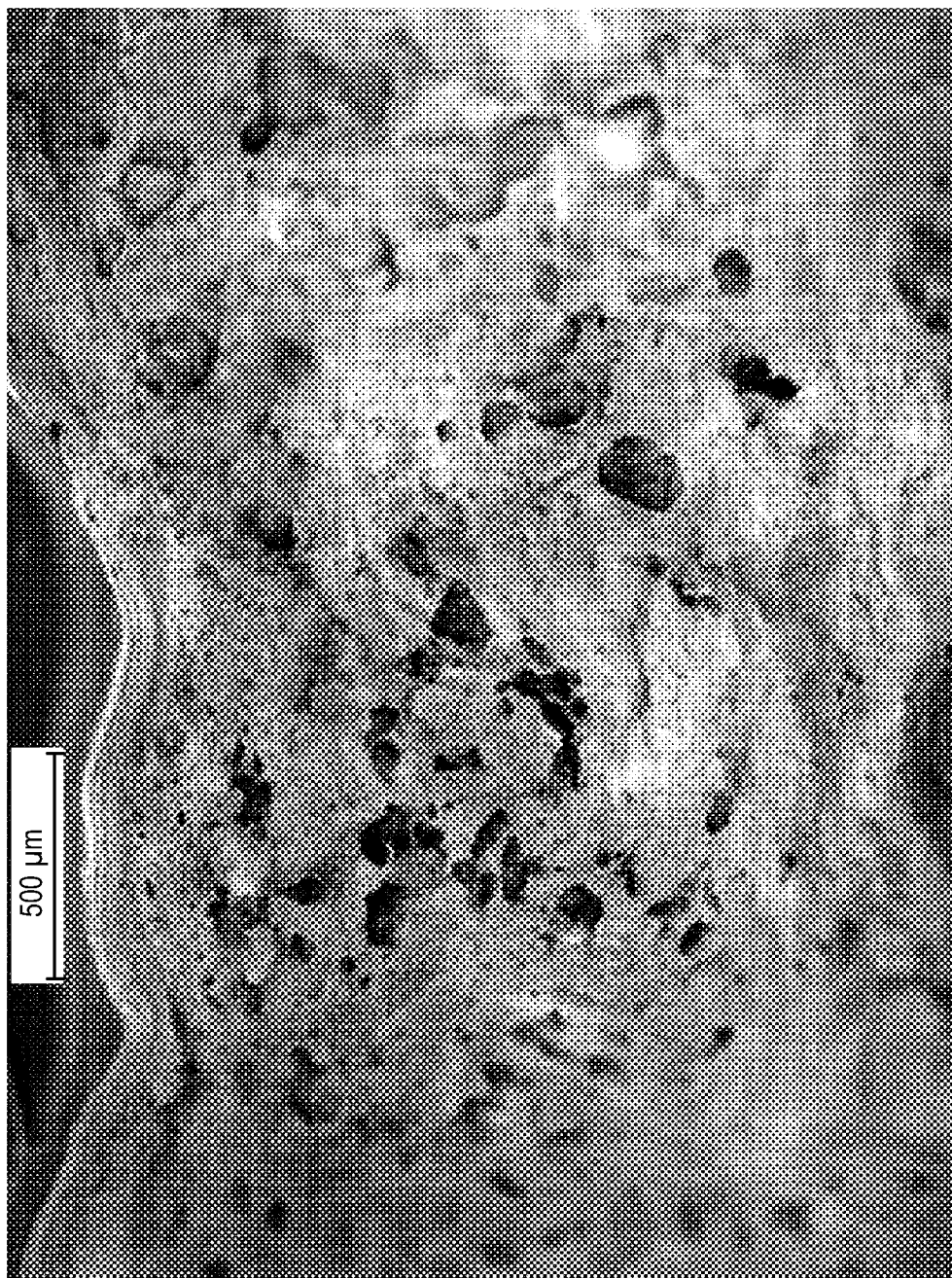
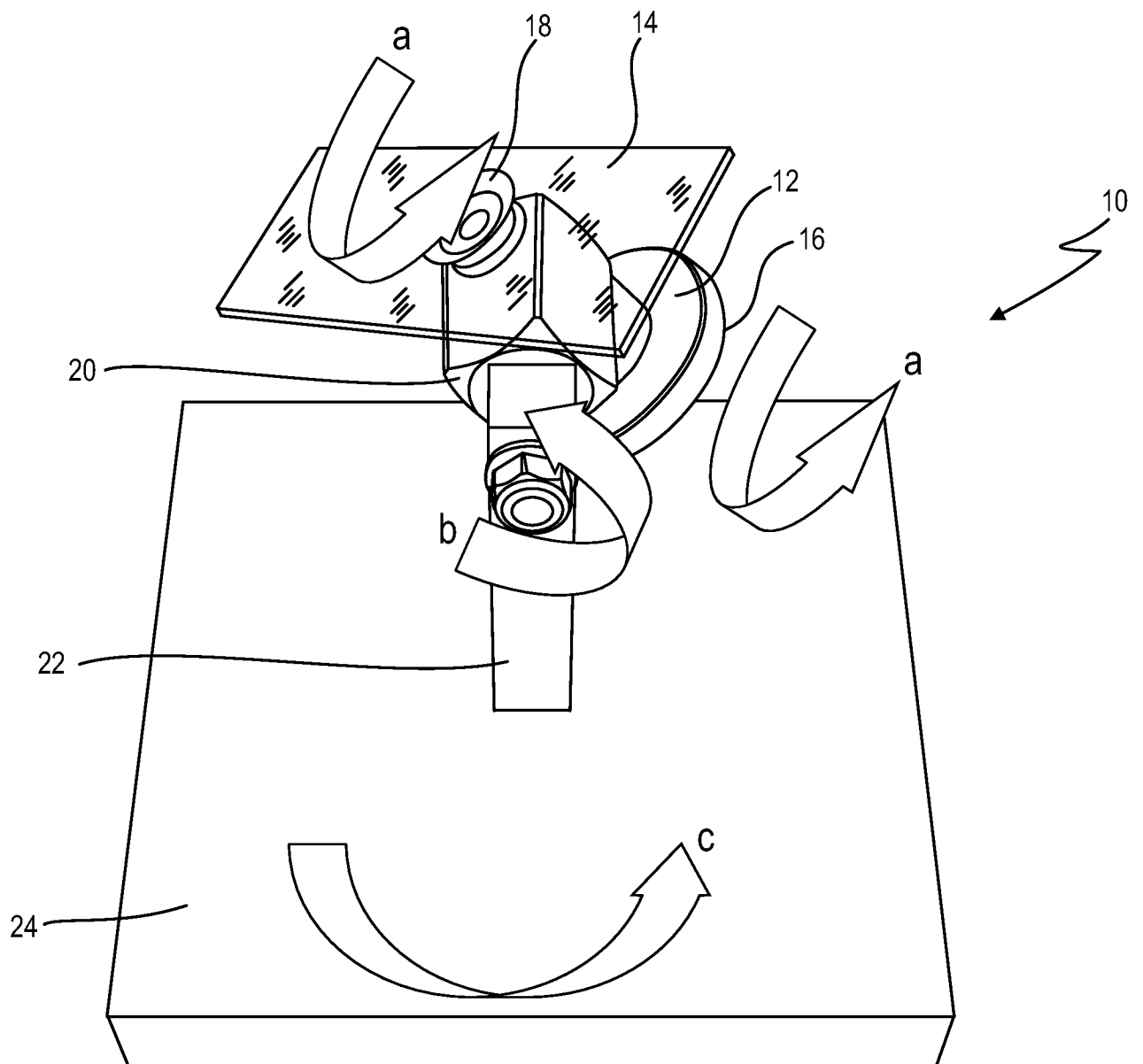


Fig. 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/055730

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N21/29 G01N21/49 A61B5/00 A61B5/103 G02B21/26
G02B21/34

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N A61B G02B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, INSPEC, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SALOMATINA ELENA ET AL: "Multimodal optical imaging and spectroscopy for the intraoperative mapping of nonmelanoma skin cancer", JOURNAL OF APPLIED PHYSICS, AMERICAN INSTITUTE OF PHYSICS. NEW YORK, US, vol. 105, no. 10, 19 May 2009 (2009-05-19), pages 102010-102010, XP012125270, ISSN: 0021-8979, DOI: DOI:10.1063/1.3115646	1-3,5,6
Y	abstract page 105 - page 106 figures 1,2 ----- -/--	4,7-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 September 2011

Date of mailing of the international search report

27/09/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

D'Alessandro, Davide

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/055730

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/091729 A1 (AZURTEC INC [US]) 6 November 2003 (2003-11-06)	1,2,5,6
Y	page 10, line 6 - line 11 figure 28 page 17, line 14 - page 18, line 4 page 24, line 27 - line 29 page 23, line 28 - line 37 page 33, line 10 - line 16 -----	7-9
Y	RAMELLA-ROMAN J C: "Out of plane polarimetric imaging of skin: surface and subsurface effect", PROCEEDINGS OF THE NATO ADVANCED STUDY INSTITUTE ON OPTICAL WAVEGUIDE SENSING AND IMAGING IN MEDICINE, ENVIRONMENT, SECURITY AND DEFENCE SPRINGER NETHERLANDS DORDRECHT, NETHERLANDS, 2008, pages 259-269, XP040199008, page 142 - page 143 -----	4
A	US 2002/007123 A1 (BALAS CONSTANTINOS [GR]) 17 January 2002 (2002-01-17) abstract paragraphs [0020], [0021], [0053], [0068] -----	1-6
Y	US 2004/249274 A1 (YAROSLAVSKY ANNA N [US] ET AL) 9 December 2004 (2004-12-09) paragraph [0006] - paragraph [0012] paragraph [0014] paragraph [0042] paragraph [0074] -----	7-9
Y	LIMIN YU ET AL: "Caveats in BerEP4 staining to differentiate basal and squamous cell carcinoma", JOURNAL OF CUTANEOUS PATHOLOGY, vol. 36, no. 10, 1 October 2009 (2009-10-01), pages 1074-1176, XP55006705, ISSN: 0303-6987, DOI: 10.1111/j.1600-0560.2008.01223.x page 1074, right-hand column, last paragraph - page 1075, right-hand column, paragraph 1 -----	7-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2011/055730

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1 - 9
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-6

Method for the visual examination of biological material, wherein surface reflections are eliminated by specific measures.

2. Claims 7-9

Method for the visual examination of biological material, wherein the biological material is marked by a specific immune reaction.

3. Claims 10-18

Device for the spatial orientation of biological material.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/055730

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03091729	A1	06-11-2003	
		AU 2003234222 A1	10-11-2003
		CA 2483420 A1	06-11-2003
		EP 1502106 A1	02-02-2005
		JP 2005524072 A	11-08-2005

US 2002007123	A1	17-01-2002	
		AT 424757 T	15-03-2009
		DK 1267707 T3	06-07-2009
		EP 2057936 A1	13-05-2009
		ES 2322235 T3	18-06-2009
		GR 20000100102 A	30-11-2001
		HK 1056108 A1	14-08-2009
		JP 2008220977 A	25-09-2008
		US 2009253991 A1	08-10-2009

US 2004249274	A1	09-12-2004	NONE

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES		
INV.	G01N21/29	G01N21/49
	G02B21/34	
ADD.	A61B5/00	A61B5/103
		G02B21/26
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)		
G01N A61B G02B		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
EPO-Internal, INSPEC, BIOSIS		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SALOMATINA ELENA ET AL: "Multimodal optical imaging and spectroscopy for the intraoperative mapping of nonmelanoma skin cancer", JOURNAL OF APPLIED PHYSICS, AMERICAN INSTITUTE OF PHYSICS. NEW YORK, US, Bd. 105, Nr. 10, 19. Mai 2009 (2009-05-19), Seiten 102010-102010, XP012125270, ISSN: 0021-8979, DOI: DOI:10.1063/1.3115646	1-3,5,6
Y	Zusammenfassung Seite 105 - Seite 106 Abbildungen 1,2 ----- -/-	4,7-9
☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
20. September 2011		27/09/2011
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter D'Alessandro, Davide

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 03/091729 A1 (AZURTEC INC [US]) 6. November 2003 (2003-11-06)	1,2,5,6
Y	Seite 10, Zeile 6 - Zeile 11 Abbildung 28 Seite 17, Zeile 14 - Seite 18, Zeile 4 Seite 24, Zeile 27 - Zeile 29 Seite 23, Zeile 28 - Zeile 37 Seite 33, Zeile 10 - Zeile 16 -----	7-9
Y	RAMELLA-ROMAN J C: "Out of plane polarimetric imaging of skin: surface and subsurface effect", PROCEEDINGS OF THE NATO ADVANCED STUDY INSTITUTE ON OPTICAL WAVEGUIDE SENSING AND IMAGING IN MEDICINE, ENVIRONMENT, SECURITY AND DEFENCE SPRINGER NETHERLANDS DORDRECHT, NETHERLANDS, 2008, Seiten 259-269, XP040199008, Seite 142 - Seite 143 -----	4
A	US 2002/007123 A1 (BALAS CONSTANTINOS [GR]) 17. Januar 2002 (2002-01-17) Zusammenfassung Absätze [0020], [0021], [0053], [0068] -----	1-6
Y	US 2004/249274 A1 (YAROSLAVSKY ANNA N [US] ET AL) 9. Dezember 2004 (2004-12-09) Absatz [0006] - Absatz [0012] Absatz [0014] Absatz [0042] Absatz [0074] -----	7-9
Y	LIMIN YU ET AL: "Caveats in BerEP4 staining to differentiate basal and squamous cell carcinoma", JOURNAL OF CUTANEOUS PATHOLOGY, Bd. 36, Nr. 10, 1. Oktober 2009 (2009-10-01), Seiten 1074-1176, XP55006705, ISSN: 0303-6987, DOI: 10.1111/j.1600-0560.2008.01223.x Seite 1074, rechte Spalte, letzter Absatz - Seite 1075, rechte Spalte, Absatz 1 -----	7-9

Feld Nr. II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein internationaler Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche diese Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, dass eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefasst sind.

Feld Nr. III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Diese Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung solcher Gebühren aufgefordert.

3. ☒ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
1-9

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Dieser internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfasst:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Der Anmelder hat die zusätzlichen Recherchegebühren unter Widerspruch entrichtet und die gegebenenfalls erforderliche Widerspruchsgebühr gezahlt.
- ☐ Die zusätzlichen Recherchegebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt, jedoch wurde die entsprechende Widerspruchsgebühr nicht innerhalb der in der Aufforderung angegebenen Frist entrichtet.
- ☒ Die Zahlung der zusätzlichen Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-6

Verfahren zur visuellen Untersuchung von biologischem Material, wobei Oberflächenreflexionen durch bestimmte Maßnahmen ausgeschaltet werden.

2. Ansprüche: 7-9

Verfahren zur visuellen Untersuchung von biologischem Material, wobei das biologische Material durch eine spezifische Immunreaktion markiert wird.

3. Ansprüche: 10-18

Vorrichtung zum räumlichen Orientieren von biologischem Material.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/055730

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 03091729	A1	06-11-2003	AU 2003234222 A1 10-11-2003
		CA 2483420 A1	06-11-2003
		EP 1502106 A1	02-02-2005
		JP 2005524072 A	11-08-2005

US 2002007123	A1	17-01-2002	AT 424757 T 15-03-2009
		DK 1267707 T3	06-07-2009
		EP 2057936 A1	13-05-2009
		ES 2322235 T3	18-06-2009
		GR 20000100102 A	30-11-2001
		HK 1056108 A1	14-08-2009
		JP 2008220977 A	25-09-2008
		US 2009253991 A1	08-10-2009

US 2004249274	A1	09-12-2004	KEINE

专利名称(译)	离体直接检测生物材料		
公开(公告)号	EP2572184A1	公开(公告)日	2013-03-27
申请号	EP2011714037	申请日	2011-04-12
申请(专利权)人(译)	EBERHARD - 卡尔斯安大学蒂宾根UNIVERSITÄTSKLINIKUM		
当前申请(专利权)人(译)	EBERHARD - 卡尔斯安大学蒂宾根UNIVERSITÄTSKLINIKUM		
[标]发明人	MOEHRLE MATTHIAS		
发明人	MOEHRLE, MATTHIAS		
IPC分类号	G01N21/29 G01N21/49 A61B5/00 A61B5/103 G02B21/26 G02B21/34		
CPC分类号	G01N21/29 G01N21/49 A61B5/0059 A61B5/444 G01N1/30 G01N21/17 G01N21/21 G02B21/33 G02B21/34		
代理机构(译)	WITTE , WELLER & PARTNER		
优先权	102010021534 2010-05-19 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于离体目测生物材料的方法和用于生物材料空间取向的装置，该装置可用于所述方法。