

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-500044
(P2005-500044A)

(43) 公表日 平成17年1月6日(2005.1.6)

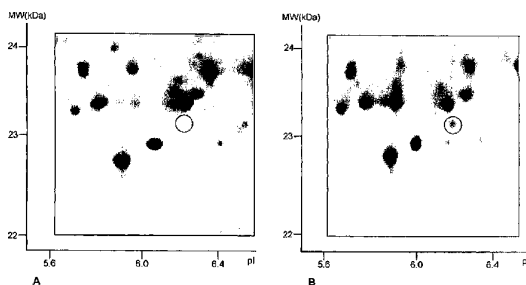
(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/42	C 1 2 Q 1/42 Z N A	4 B 0 5 0
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 D	4 B 0 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 P	4 C 0 8 4
A 6 1 P 5/22	A 6 1 P 5/22	4 C 0 8 5
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-510960 (P2003-510960)	(71) 出願人	501154389 ペー・エル・アー・ハー・エム・エス・アクティエンゲゼルシャフト ドイツ・D-16761・ヘーニッヒストルフ・ノイエンドルフシュトラッセ・25
(86) (22) 出願日	平成14年6月17日 (2002.6.17)	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月26日 (2003.12.26)	(74) 代理人	100108578 弁理士 高橋 詔男
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/006660	(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆
(87) 国際公開番号	W02003/005035	(74) 代理人	100101465 弁理士 青山 正和
(87) 国際公開日	平成15年1月16日 (2003.1.16)	(74) 代理人	100094400 弁理士 鈴木 三義
(31) 優先権主張番号	101 31 922.3		
(32) 優先日	平成13年7月2日 (2001.7.2)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), JP, US		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 炎症性疾患及び敗血症の診断及び治療のための、カルシニューリンB様タンパク質 (CHP) の使用

(57) 【要約】

炎症及び感染の診断、予後、及び経過のモニターのためのマーカーペプチドとしての、及び/または炎症及び/または感染の経過に治療上影響するための標的としての、体液または身体組織から得たカルシニューリンB様タンパク質 (CHP) の使用。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

炎症及び感染の診断、予後、及び経過のモニターのためのマーカーペプチドとしての、及び/または炎症及び/または感染の経過に治療上影響するための標的としての、体液または身体組織から得たカルシニューリン B 様タンパク質 (C H P) の使用。

【請求項 2】

患者の生物学的液体または組織サンプル中の C H P の存在及び/または量を測定することによる、敗血症及び重篤な感染、特に敗血症様の全身性の感染の、予後、重篤さの評価、及び経過の治療に随伴する評価のための、示差的な早期の診断及び診断における請求項 1 に記載の C H P の使用。

10

【請求項 3】

患者の生物学的液体または組織サンプル中の C H P の存在及び/または量を測定し、敗血症または感染の存在、予測される経過、重篤さ、または治療の成功に関する結論を、特異的な断片の存在及び/または量から導くことを特徴とする、敗血症及び重篤な感染、特に敗血症様の感染の、示差的な早期の診断及び診断、予後、重篤さの評価、及び経過の治療に随伴する評価のための方法。

【請求項 4】

免疫診断的測定方法であることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

予防または治療の目的で、敗血症を含む炎症性疾患及び感染の経過に影響するための試薬としての、請求項 1 に記載の C H P の使用。

20

【請求項 6】

C H P、またはその機能的な部分ペプチド、及び製薬学的に許容可能なキャリアーを含むことを特徴とする、全身性の炎症を含む炎症の治療のための製薬組成物。

【請求項 7】

C H P または C H P 断片または加工された C H P、特に特定の形態にリン酸化された C H P に対して生産され、適切な製薬学的キャリアーと共に患者に投与するように調製された抗体を含むことを特徴とする、炎症及び身体の他のストレス反応を治療するための製薬組成物。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】**【0001】**

本発明は、炎症性疾患及び敗血症の医学的診断及び治療のための、カルシニューリン B 様タンパク質 (C H P) と称されるものの新規な使用に関する。本発明は、敗血症または全身性炎症が毒素の投与によって実験的に引き起こされた霊長類の肝組織における C H P の著しく増大した濃度の初めての検出に基づく。

【0002】

本発明は、炎症及び感染、特に感染性の病因の炎症及び敗血症の診断及び治療の更なる改良に関する、本出願人の過度の研究作業に由来する。

【背景技術】

40

【0003】

炎症は、各種の外的な作用、例えば傷害、火傷、アレルギー、細菌及び真菌及びウイルスのような微生物による感染に対する、拒絶反応を誘導する外来組織に対する、または身体の特定の炎症性の疾患、例えば自己免疫疾患及びガンに対する、生物の特定の生理学的反応によって非常に一般的に定義される。炎症は、身体の無害で局在的な反応として生じるが、個々の組織、器官、器官の一部、及び組織の一部の数多くの重大で慢性及び急性の疾患の典型的な特徴でもある。

【0004】

局所的な炎症は一般的に、有害な作用に対する身体の健全な免疫反応の一部であり、それ故身体の自己保存防御機構の一部である。しかしながら、炎症が、例えば自己免疫疾患の

50

ような特定の内因性のプロセスに対する身体の誤った反応の一部であるならば、及び/または慢性の性質を有するならば、あるいはそれらが全身性炎症反応症候群（SIRS）の場合、または感染によって引き起こされる重篤な敗血症の場合のような、全身性の度合いに到達するのであれば、炎症反応の典型的な生理学的プロセスは制御不能となり、急性で、しばしば生命を脅かす病理学的プロセスとなる。

【0005】

炎症プロセスの起源と経過は、主にタンパク質またはペプチドの性質を有するかなりの数の物質によって制御され、または多かれ少なかれ制限された時間についての特定の生体分子の出現によって達成されることが知られている。炎症反応に関与する内因性物質は、特にサイトカイン、メディエーター、血管作用性物質及び早期タンパク質、及び/またはホルモン調節因子から由来するものを含む。炎症反応は、炎症プロセスを活性化する内因性物質と、脱活性化物質（例えばインターロイキン-10）の両者が関与する複雑な生理学的反応である。

10

【0006】

敗血症または敗血症性ショックの場合のような全身性の炎症では、炎症特異的反応カスケードは、全身に亘り非制御的な態様で広がり、過度の免疫反応の意味で生命を脅かすようになる。内因性炎症特異的物質の個々の群の出現と考え得る役割についての現在の知見に関しては、例えばA. Beishuizen等、"Endogenous Mediators in Sepsis and Septic Shock", *Advances in Clinical Chemistry*, vol. 33, 1999, 55-131; 及びC. Gabay等、"Acute Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation", *The New England Journal of Medicine*, vol. 340, No. 6, 1999, 448-454を参照。敗血症及び関連する全身性炎症性疾患の理解、及び故に認識されている定義は、数年で変化しているため、K. Reinhart等、"Sepsis und septischer Schock" [Sepsis and septic shock], *Intensivmedizin*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2001, 756-760が参照され、ここでは敗血症の最近の定義が与えられている。本願の文脈においては、使用される用語、敗血症及び炎症性疾患は、述べられた3種の参考文献で与えられた定義に基づく。

20

【0007】

少なくともヨーロッパでは、陽性の血液培養長によって検出可能な全身性の細菌感染は、用語、敗血症を特徴付ける一方で、敗血症は現在では、感染によって引き起こされる全身性の炎症であると主に理解されているが、病理的なプロセスとして、他の原因によって誘導される全身性の炎症と非常に類似性を有している。前記敗血症の理解の変遷は、診断的アプローチにおける変化を引き起こしている。かくして、細菌病原体の直接的検出は、生理学的パラメーターの複雑なモニタリングによって置換または補足され、より最近では、特に敗血症プロセスまたは炎症プロセスに関与する特定の内因性物質、即ち特異的「バイオマーカー」の検出によって置換または補足されている。

30

【0008】

炎症プロセスに関与していることが知られている数多くのメディエーター及び早期タンパク質の中で、診断目的に適しているものは、特に炎症性疾患に非常に特異的な出現、または炎症性疾患の特定の時期に非常に特異的な出現を有するものであり、その濃度は有意な態様で劇的且つ特徴的に変化し、さらに通常の測定に必要とされる安定性を有し、高濃度の値に到達するものである。診断目的のために、病理学的なプロセス（炎症、敗血症）と、それぞれのバイオマーカーとの信頼できる相関関係が、第一義的な重要性を有し、炎症プロセスに関与する内因性物質の複雑なカスケードにおける役割を知る必要性は存在しない。

40

【0009】

敗血症のバイオマーカーとして特に適している内因性物質はプロカルシトニンである。プロカルシトニンは、感染性の病因（敗血症）の全身性の炎症の条件の下で、非常に高い値に到達する血清濃度を有するプロホルモンである一方で、健康なヒトでは実際に検出できない濃度を有する。高い値のプロカルシトニンはさらに、敗血症の比較的早期でも到達し、そのためプロカルシトニンの測定は、敗血症の早期の診断に適しており、感染によって

50

引き起こされる敗血症を、他の原因を有する重篤な炎症から容易に区別するのもにも適している。敗血症マーカーとしてのプロカルシトニンの測定は、M. Assicot等, "High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection", *The Lancet*, Vol. 341, No. 8844, 1993, 515-518; 及び特許DE 42 27 454 C2及びEP 0 656 121 B1及びUS 5,639,617の文献の主題である。本記載を補う目的で、前記特許、及び前記文献に挙げられている早期の参考文献が参照される。近年では、プロカルシトニンの主題に関する文献の数は非常に増加している。それ故さらに、W. Karzai等, "Procalcitonin - A New Indicator of the Systemic Response to Severe Infection", *Infection*, Vol. 25, 1997, 329-334; 及びM. Oczenski等, "Procalcitonin: a new parameter for the diagnosis of bacterial infection in the peri-operative period", *European Journal of Anaesthesiology*, 1998, 15, 202-209; 及びさらに、H. Redl等, "Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin", *Crit Care Med* 2000, Vol. 28, No. 11, 3659-3663; 及びH. Redl等, "Non-Human Primate Models of Sepsis", *Sepsis* 1998; 2: 243-253; 及び、最近印刷されたレビューのようなこれらで引用されている更なる文献が参照される。

10

【非特許文献 1】

A. Beishuizen等, "Endogenous Mediators in Sepsis and Septic Shock", *Advances in Clinical Chemistry*, vol. 33, 1999, 55-131

【非特許文献 2】

C. Gabay等, "Acute Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation", *The New England Journal of Medicine*, vol. 340, No. 6, 1999, 448-454

20

【非特許文献 3】

K. Reinhart等, "Sepsis und septischer Schock" [Sepsis and septic shock], *Intensivmedizin*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2001, 756-760

【非特許文献 4】

M. Assicot等, "High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection", *The Lancet*, Vol. 341, No. 8844, 1993, 515-518

【特許文献 1】

DE 42 27 454 C2

【特許文献 2】

EP 0 656 121 B1

30

【特許文献 3】

US 5,639,617

【非特許文献 5】

W. Karzai等, "Procalcitonin - A New Indicator of the Systemic Response to Severe Infection", *Infection*, Vol. 25, 1997, 329-334

【非特許文献 6】

M. Oczenski等, "Procalcitonin: a new parameter for the diagnosis of bacterial infection in the peri-operative period", *European Journal of Anaesthesiology*, 1998, 15, 202-209

40

【非特許文献 7】

H. Redl等, "Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin", *Crit Care Med* 2000, Vol. 28, No. 11, 3659-3663

【非特許文献 8】

H. Redl等, "Non-Human Primate Models of Sepsis", *Sepsis* 1998; 2: 243-253

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

敗血症マーカーであるプロカルシトニンの利用可能性は、敗血症の研究に所定のかなりの

50

刺激を有しており、プロカルシトニンの測定を補うことができ、及び/または細かい診断若しくは各種の診断の目的のための更なる情報を提供できる更なるバイオマーカーを見出すことに、過度の努力が現在なされている。しかしながら、潜在的な新規な敗血症バイオマーカーについての研究は、炎症または敗血症プロセスに關与する特定の内因性物質の出現についての正確な機能または正確な理由に關して、しばしばほとんど全くまたは全然知られていないという事実によって面倒になっている。

【0011】

更なる潜在的な敗血症マーカーの測定に対する実りある純粋に仮説的なアプローチの実験的試験の結果は、DE 198 47 690 A1及びWO 00/22439に見出すことができる。そこでは、敗血症の場合に、プロホルモンプロカルシトニンの濃度が増大するだけでなく、ペプチドプロホルモンの中に含まれるであろう他の物質についても、有意に増大した濃度が観察されることが示されている。記載された現象は十分に報告されている一方、敗血症におけるプロホルモンの濃度の増大の原因は、依然として実質的に説明できるものではない。

10

【0012】

本願では、更なる炎症または敗血症特異的バイオマーカーについての探索における別の純粋に実験的なアプローチの結果が報告される。これらの実験的な調査はさらに、感染性の病因の全身的な炎症反応に關連するプロカルシトニンの測定で開始する。かくして、非常に早期の段階で、プロカルシトニンは、ホルモンカルシトニンの前駆体である場合と敗血症において同様な態様では明らかに形成されないことが観察されている。かくして、高いプロカルシトニン濃度はまた、甲状腺が除去されている患者でも観察された。それ故甲状腺は、プロカルシトニンが敗血症の間で形成または分泌される器官であるはずはない。H. Redl等, "Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin", Crit Care Med 2000, Vol. 28. No. 11, 3659-3663; 及びH. Redl等, "Non-Human Primate Models of Sepsis", Sepsis 1998; 2: 243-253による文献では、敗血症におけるプロカルシトニンの形成を説明することを企図すると称される実験的調査の結果が報告されている。前記作業では、人工的な敗血症が、霊長類(ヒヒ)にエンドトキシン投与によって生産され、血液中の最高のプロカルシトニン濃度が到達される実験的に生産された状態が測定されている。前記作業において記載された実験動物モデルの更なる開発は、ペプシン性またはタンパク質の性質の新規な内因性敗血症特異的バイオマーカーを測定するために、本願の文脈において機能し、当該バイオマーカーの出現は、敗血症または特定の形態の敗血症に特徴的であり、それ故敗血症の特異的診断を許容する。霊長類モデルは、霊長類とヒトの生理学の非常に顕著な類似性、及び多くの治療上及び診断上のヒトの試薬との高い交差反応性のために選択された。

20

30

【0013】

炎症の間で形成される内因性物質は、身体の複雑な反応カスケードの一部であるため、そのような物質は診断上興味を有するだけでなく、例えば敗血症の間で広がりが観察されている炎症の全身性の広がりをできるだけ早期に停止させるために、このタイプの個々の物質の形成及び/または濃度に影響することによって、炎症プロセスに治療上介入するための試みが、過度の努力で現在実施されている。この文脈では、炎症プロセスに關与することが示されている内因性物質はまた、潜在的な治療上の標的として考慮される。炎症プロセスの特定のメディエーターに基づき、前記プロセスに陽性の治療上の影響を有することが企図される試みは、例えばE.A. Panacek, "Anti-TNF strategies", Journal fur Anasthesie und Intensivbehandlung"; No. 2, 2001, 4-5; T. Calandra等, "Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor", Nature Medicine, Vol. 6, No. 2, 2000, 164-170; またはK. Garber, "Protein C May be sepsis solution", Nature Biotechnology, Vol. 18, 2000, 917-918に記載されている。これらの治療上のアプローチは、炎症促進性物質の濃度を低下すること、またはそのような物質の形成を阻害すること、及び特に特異的抗体(TNF- またはMIFに対する; E. A. Panacek, "Anti-TNF strategies", Journal fur Anasthesie und Intensivbehandlung; No. 2, 2001, 4-5; T. Calandra等, "Protection from septic shock by neutralizati

40

50

on of macrophage migration inhibitory factor", Nature Medicine, Vol. 6, No. 2, 2000, 164-170参照)の使用によりそれを実施すること、または炎症カスケードに阻害効果を有する内因性物質(プロテインC; K. Garber, "Protein C May be sepsis solution", Nature Biotechnology, Vol. 18, 2000, 917-918)の濃度を増加することを企図している。最後に挙げられた文献は、選択された内因性標的分子に影響することによって、炎症プロセスに対する治療上の影響を有するそのような試みの概略を与え、その試みは、不幸にも一般的に今日までほとんど成功を収めていない。今日までむしろ失望を感じさせる治療上のアプローチに鑑み、できるだけ炎症または敗血症に特異的であり、治療上の標的として、炎症と格闘する点で成功に対する新たな予測を開く更なる内因性生体分子を同定することに大きな興味を持たれている。

10

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は、カルシニューリンB様タンパク質(CHP)と称されるものが、感染によって引き起こされる炎症を有する霊長類及びヒトにおいてかなりの濃度で検出できる一方、健康な被験者では、それは見いだせないかまたは検出の分析的限界での濃度でのみ見いだせるという事実に基づくものであり、このことは、このタンパク質CHPを、炎症診断/敗血症診断の両者について、及び新規な治療上の標的として適切なものとする。

【0015】

炎症または敗血症の実験的シミュレーションの最初の時点でのCHPの検出される出現のため生じる診断及び治療での使用が、請求項1に一般的な形態で記載されている。

20

【0016】

請求項2から4は、診断的な使用または方法に関する。

【0017】

請求項5は、特に敗血症を含む炎症及び感染の治療の領域における、新規な潜在的治療上の使用に一般的な形態に関連し、請求項6及び7は、生理学的なCHP濃度に影響する目的を有する治療上の応用のために企図される製薬組成物に関連する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

実験の部分で以下に詳細に記載されるように、本発明は、エンドトキシン投与(Salmonella Typhimurinから得たLPS)によってヒヒにおいて人工的な敗血症の実験的な誘導と、2次元ゲル電気泳動による処理動物の肝組織の精密検査の後に、処理動物においてのみ同定可能であるペプチドまたはタンパク質産物としてCHPを見出すことが可能であったという事実に基づく。その同定のため、処理動物の場合でのみ見出され、ゲル電気泳動によって22900±700ダルトンの分子量と、約6.2の等電点を有することが見出された新規なタンパク質スポットが、電気泳動ゲルから単離され、トリプシン切断により断片に分離され、それを本質的に既知の態様でマスペクトロメトリーによって分析し、既知のトリプシン処理タンパク質と比較することによって同定した。

30

【0019】

新規なタンパク質スポットのトリプシン切断のマス分析において、以下のマス(m/z)を有する断片が見出された: 1169.52; 1469.50; 1550.56; 1569.7; 1645.6; 1920.81; 2386.78。7のマス(1169.52及び1920.81)は、既知のトリプシン処理タンパク質のいずれのマスとも合致できなかった。残りの5のマスについては、分析に引き続き、CHPの既知の配列と合致が生じた(配列番号6参照; データベースSWISS-PROT: Entry Ca22_Human: Accession number Q99653; Lin X., Barber D.L. "A calcineurin homologous protein inhibits GTPase-stimulated Na-H exchange", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 12636 (1996))。

40

【0020】

マス1469.50は、配列L-Y-S-R-F-T-S-L-D-K(配列番号1)に対応する。アミノ酸S(セリン、二度出現する)及びT(トレオニン)では、配列は各々の場合でリン酸基によって修飾されている。この断片の理論的な分子量は1469.49

50

9である。CHPのアミノ酸配列(前述のLin X.によってさらに言及されるメチオニン残基を有さない)では、この配列は31-40位で見出される。

【0021】

マス1550.56は、配列K-E-T-G-F-S-H-S-Q-I-T(配列番号2)に対応し、2のリン酸基によって補われている。この断片の理論的分子量は1550.564である。CHPのアミノ酸配列(前述のLin X.によってさらに言及されるメチオニン残基を有さない)では、この配列は19-30位で見出される。

【0022】

マス1569.7は、配列T-L-A-H-F-R-P-I-E-D-N-E-K(配列番号3)に対応する。この断片の理論的分子量は1569.7である。CHPのアミノ酸配列(前述のLin X.によってさらに言及されるメチオニン残基を有さない)では、この配列は86-98位で見出される。

【0023】

マス1645.6は、配列A-S-T-L-L-R-D-E-E-I-K(配列番号4)に対応する。この断片の理論的分子量は1645.597である。CHPのアミノ酸配列(前述のLin X.によってさらに言及されるメチオニン残基を有さない)では、この配列は5-18位で見出される。

【0024】

マス2386.78は、配列I-I-N-A-F-F-P-E-G-E-D-Q-V-N-F-R-G-F-M-R(配列番号5)に対応する。この断片の理論的分子量は2386.78である。CHPのアミノ酸配列(前述のLin X.によってさらに言及されるメチオニン残基を有さない)では、この配列は66-85位で見出される。

【0025】

解釈の認識されている原理によれば、そのような一致は、タンパク質スポットから得た産物のCHPとしての信頼できる同定が考慮される。CHP(194アミノ酸)の分子量は22325ダルトンである。

【0026】

肝臓における敗血症の間のCHPの出現の同定は、かなりの科学的、診断上、及び治療上の興味を有する。

【0027】

ヒトタンパク質CHPは、1996年に最初に記載され(X. Lin及びD.L. Barber, A calcineurin homologous protein inhibits GTPase-stimulated Na-H exchange, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 12631-12636, 1996)、同じ年のわずかに事前にCa²⁺結合タンパク質として記載されたラットタンパク質p22と実質的に同一であることが分かった(M.R. Barroso等, A Navel Ca²⁺-binding protein, p22, Is Required for Constitutive Membrane Traffic, J. Biol. Chem., 271: 10183-101878, 1996)。カルシニューリンB様タンパク質(CHP)の名称は、カルシニューリンの調節Bサブユニットに対するこのタンパク質の高い類似性を示す(65%)。さらに、CHPと更なるCa²⁺結合タンパク質カルモジュリンとの間で高い類似性が存在する。

【0028】

CHPは多くのヒト組織で発現されており、偏在して発現されるNa⁺/H⁺エキスチェンジャーであるNHE1の調節のための必須の補因子であることが分かっており、NHE1は活性化されると、細胞内pHを増大し、細胞増殖、細胞分化、及び新形成性トランスフォーメーションの活性化を引き起こす。CHPのリン酸化の度合いは、細胞分裂の間のNHE1調節にとって重要である。さらに、CHPの一過的過剰発現が、血清及びGTPase刺激的NHE1活性を阻害することが見出されている。

【0029】

CHPの生理学的役割に関する更なる調査は、NHE調節についてのその重要性を確認した(T. Pang等, Calcineurin Homologous Protein as an Essential Cofactor for Na⁺/H⁺ Exchangers, J. Biol. Chem., 276: 17367-17372, 2001)。それらはまた、CHPがカル

10

20

30

40

50

シニユーリン活性を阻害することを示した(X. Lin等, Inhibition of Calcineurin Phosphatase Activity by a Calcineurin B Homologous Protein, J. Biol. Chem., 274: 36125-36131, 1999)。とりわけカルシニユーリンは、T細胞活性化、かくして免疫応答の誘導において重要な役割を演じているため、この発見はかなり興味深い。このため、カルシニユーリンはまた、免疫抑制製薬学的活性物質シクロスポリンA及びFK506の標的でもある。これらの結果に照らして、タンパク質CHPは、カルシニユーリン活性、及び免疫系の活性化の以前に未認識の内因性インヒビターであると分かっている。

【0030】

CHPの生理学的濃度が、いずれかの疾患において有意に変化し、それ故CHP濃度の測定は、診断の観点から興味を有するといえることは、今まで知られていなかった。同様に、規定された治療上の目的を達成するための生理学的なCHP濃度に影響するための提案はほとんど存在しなかった。

10

【0031】

本発明によれば、人工的な敗血症が毒素投与によって誘導された霊長類の肝臓における比較的高いCHP濃度の検出は有意に高く、同時にコントロール動物のそれ以外完全に同一の処理サンプルにおけるCHPの検出は不可能である。この出現は、処理動物において、毒素投与による敗血症の誘導の後に比較的短時間でのみ観察されているため、この事実をCHPの測定による有望な敗血症、感染、及び炎症の診断に当てはめるために利用することが可能である。特に興味深いことは、敗血症の予後マーカーとしてのCHPの明白な適合性である。

20

【0032】

CHPは、いずれかの適切な検出方法によって測定できるが、適切に選択された抗体を使用する免疫診断法による、患者の体液における測定が、実際上の観点から最も有利であろう。

【0033】

実験的に誘導された敗血症においてCHPの増大した出現を検出を初めて検出できたという事実に基づいて、炎症及び敗血症に関連する診断及び/又は治療目的のためCHPを利用する可能性がかくして開かれている。この目的のため、CHPまたはその適切な部分ペプチドは、合成的に、または従来技術の一部である方法を使用する遺伝学的操作によって、標的化された態様で任意に調製できる。CHP部分ペプチドは任意に市販形態で存在し、免疫診断測定のための特定のアッセイフォーマットのために、カリブレター、トレーサー、及びコンペティターとして必要とされて良く、説明されている態様でこの目的のために調製されて良い。

30

【0034】

さらに、CHP断片またはその適切な部分配列は、患者の体液中のCHPの診断的測定の目的として、及び/または潜在的な治療薬として適切である特異的なポリクローナル、及び特にモノクローナル抗体を生産するために、近年の従来技術の既知の方法によって使用できる。既知の部分ペプチド配列に対する適切なモノクローナル抗体の生産は、一般的な従来技術の一部であり、特に記載する必要はない。さらに、対応するDNAに対する直接的な遺伝学的免疫化の方法を使用する抗体生産もまた、特に言及すべきではない。それ故、そのような免疫化方法の使用で、得ることができる抗体の標本を拡大できることが過去において見出されているため、例えば免疫化のためにCHPまたはCHP断片のcDNAを使用することは、本発明の範囲内にある。しかしながら、第三者から入手可能なCHPに対する既知の抗体もまた使用されて良い。

40

【0035】

CHPの免疫学的測定では、例えば選択的なプロカルシトニン測定について記載されているように進行することが特に可能である。P.P. Ghillani等, "Monoclonal antipeptide antibodies as tools to dissect closely related gene products", The Journal of Immunology, Vol. 141, No. 9, 1988, 3156-3163; 及びP.P. Ghillani等, "Identification and Measurement of Calcitonin Precursors in Serum of Patients with Malignant Disease

50

ases", Cancer Research, Vol. 49, No. 23, 1989, 6845-6851参照。記載された方法の変形例、及び/または更なる免疫化方法は、標準的な作業及び文献から当業者に利用可能であり、文脈で適用できる。

【0036】

CHP、または配列番号1、配列番号2、配列番号4、及び/または配列番号5に係る部分配列、またはその部分ペプチドを有するCHP断片は、利用可能な結果に基づいて、炎症及び感染(特に敗血症タイプの全身性の感染)の経過の診断及びモニタリングのための特異的なマーカーペプチド(バイオマーカー)として機能できる。プロカルシトニンの測定と同様に、CHPの測定は、早期の示差的な診断、及び診断、及び診断の準備のため、敗血症及び感染の経過のひどさの評価、及びその治療に随伴する評価のために効果的であり得、そのような方法では、CHPの含量は、患者の生物学的液体または組織のサンプル中で測定され、炎症、重篤な感染、または敗血症の存在は、CHPの確立された存在及び/または量から結論付けられ、得られた結果は、敗血症のひどさと相関し、治療及び/または治療の予測のための可能性が見積もられる。

10

【0037】

しかしながら、CHP(または任意にそれをコードするDNA部分)は、炎症、特に感染性の病因の全身性の炎症および敗血症の予防薬または治療において使用できる。

【0038】

CHPは免疫抑制効果を有するため、敗血症の場合におけるCHPの増大した濃度は、敗血症の場合で観察された身体の過度の全身性の免疫反応に対して、身体のカウンター調節として解釈できる。それ故、外的なCHP投与によるこのカウンター反応のサポートは、ここに報告されている、敗血症における増大したCHP濃度の診断上の発見が、新規な治療上の可能性を示すように、身体の敗血症反応を制御する意味で機能することができるはずである。

20

【0039】

生理学的CHP濃度が、外的なストレス反応-毒素の効果の結果としての前述の動物モデルにおいて-の関数として非常に可变的であるという観察は、内因性免疫抑制性CHPの濃度のそのような変化が、例えば完全な生物の防御を弱化する局所的炎症の場合において、免疫防御の非所望の弱化を導くことが知られている生理学的状況で生じるが、オーバーワークによる外的なストレスの場合、または感情的ストレスの場合では生じないという事実の更なる指標である。これらの場合では、CHPによって生産される免疫抑制は非所望である。治療上の効果は、免疫防御を再生するために生理学的CHP濃度を低下する目的で、そのような場合に生じる。そのような場合では、CHPの濃度は、結合抗体の投与によって、またはアフィニティー吸着による血液の洗浄または血漿搬出によるCHPの外挿的除去によって減少できる。そのような目的のため、実際の活性物質として、CHPまたはCHP断片に対して生産され、適切な製薬学的キャリアーと共に患者に投与するよう調製された抗体を含む薬剤を提供することも可能である。

30

【0040】

かくしてCHPは、敗血症及び同様な重篤な炎症の治療のための、潜在的な有望な治療活性物質となるであろう。

40

【0041】

もしCHP活性が、治療上の目的のため増大するのであれば、各種の翻訳後修飾形態、例えばグリコシル化またはリン酸化形態で、あるいは製薬学的賦形剤、例えばポリエチレングリコール残基によって置換された形態で、CHPを含む分子もまた、治療上有用なCHP物質として考慮される。

【0042】

CHPの発見及び同定は以下により詳細に記載され、添付した配列表及びその一部が参照される。図面は、図面の簡単な説明に示された内容を示す。

【実施例】

【0043】

50

1. 動物モデル(ヒヒ)におけるエンドトキシン投与による感染刺激

エンドトキシン注射によるプロカルシトニン分泌の刺激のためのヒヒで実施された実験に基づいて(H. Redl等, "Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin", Crit Care Med 2000, Vol. 28, No. 11, 3659-3663; H. Redl等, "Non-Human Primate Models of Sepsis", in: Sepsis 1998; 2: 243-253参照)、ヒヒ(オス、約2年齢、27-29kgの体重)を、体重のkg当たり100 μ gのLPS(Salmonella Typhimurium由来のリポ多糖、Sigma供給)をそれぞれ静脈内に投与した。注射後5から5.5時間後、10mlのドレタールの静脈内投与によって動物を殺傷した。死から60分以内で、全ての器官/組織を切除し、液体窒素中での凍結によって安定化した。

10

【0044】

更なる加工の間で、1.5mlのバッファーA(50mM トリス/HCl、pH7.1、100mM KCl、20%グリセロール)を窒素で冷却しながら個々の凍結組織(1g)のサンプルに加え、サンプルを磁気製乳鉢で微粉化し、パウダーを得た(J. Klose, "Fractionated Extraction of Total Tissue Proteins from Mouse and Human for 2-D Electrophoresis", in: Methods in Molecular Biology, Vol. 112: 2-D Proteome Analysis Protocols, Humana Press Inc., Totowa, NJ)。引き続き4で100,000gで1時間の遠心分離処理の後、得られた上清を回収し、更なる加工のため必要とされるまで-80で貯蔵した。

【0045】

この態様で得られた組織抽出物を使用して、観察された組織のどの部分が、最大量の既知の敗血症バイオマーカーであるプロカルシトニンをエンドトキシン投与によって生産できるかを測定するために、最初の調査を実施した。次いで、最高レベルのプロカルシトニン形成を有する測定された組織において、エンドトキシン投与の後のみ生じる更なる以前に未同定のタンパク質産物を、ディフュゼンシャルプロテオーム分析によって求めた。この目的のため、非処理ヒヒの組織サンプルをコントロール組織サンプルとして使用し、サンプルの殺傷と取得を、処理動物の場合のものと同じの条件下で実施した。

20

【0046】

2. エンドトキシン注射の後のサイクレベルのプロカルシトニン形成を有するヒヒ組織の測定

30

個々の組織のサンプルを、一方でポリスチレンチューブに固定化されたヒヒカルシトニンに対する抗体で、他方でアクリジニウムエステルでマークされ、ヒヒプロカルシトニンのN末端に対して向けられたモノクローナル抗体で実施する免疫蛍光試験(ヒトプロカルシトニンの測定のために開発された、本出願人のLU-Mitest(登録商標)PCTと類似する)の補助の下で調査した。この試験の目的では、個々のサンプル中のヒヒプロカルシトニンの含量を、組換えヒトプロカルシトニンを使用する試験の較正の後に測定した。

【0047】

この実験により、肝組織が最大量のプロカルシトニンを与えることが示された。それ故、初めに記載された態様で得られたヒヒ肝臓から得たタンパク質抽出物が、新規な敗血症特異的バイオマーカーの探索のために使用された。

40

【0048】

3. ヒヒの細胞質肝細胞タンパク質を使用するプロテオーム分析

一方で健康なヒヒ(コントロール)の、他方でLPSで注射されているヒヒの細胞質肝細胞タンパク質抽出物が、プロテオーム分析で使用された。最初の分析的2次元ゲル電気泳動では、100 μ gのタンパク質を含む肝抽出物が、9Mウレア、70mM DTT、2%アンフォライト、pH2-4に安定化され、次いでJ. Klose等, "Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome", Electrophoresis 1995, 16, 1034-1059に記載されたような分析的2次元ゲル電気泳動によって分離された。2次元電気泳動ゲルにおけるタンパク質の視覚化は、銀染色によって実施された(J. Heukeshoven等, "Improved silver staining

50

procedure for fast staining in Phast-System Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl gels", *Electrophoresis* 1988, 9, 28-32参照)。

【0049】

評価のため、非処理動物のサンプルのタンパク質スポットパターンを、処理動物の肝組織サンプルから生じたタンパク質スポットパターンと比較した。コントロールサンプルでは存在しないが、全ての処理動物で付加的に存在する物質を、更なる分析的調査のために選択した。図1は、コントロールサンプル(A)及び処理動物のサンプル(B)についての2次元電気泳動ゲルの比較を示し、(B)における付加的なタンパク質スポットが新規なタンパク質に対応し、その位置は矢印と円によって強調されている。

【0050】

次いで、分析的2次元ゲル電気泳動のタンパク質スポットパターンで同定された新規な特異的タンパク質を、350 µgのタンパク質を使用する調製的2次元ゲル電気泳動によって調製した(再度(10)を参照)。調製的2次元ゲル電気泳動では、染色はクマシーブリリアントブルーG250で実施した(V. Neuhoff等, "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250", *Electrophoresis* 1988, 9, 255-262参照)。

【0051】

更なる分析のために事前に選択されたタンパク質スポットを、A. Otto等, "Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis using an effective sample preparation for mass spectrometry", *Electrophoresis* 1996, 17, 1643-1650に記載された方法を使用してゲルから切り出し、トリプシン切断し、次いで特にG. Neubauer等, "Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex", in: *nature genetics* vol. 20, 1998, 46-50; J. Linger等, "Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase", in: *Science*, Vol. 276, 1997, 561-567; M. Mann等, "Use of mass spectrometry-derived data to annotate nucleotide and protein sequence databases", in: *TRENDS in Biochemical Sciences*, Vol. 26, 1, 2001, 54-61に記載されたようなマスペクトル測定調査の使用で、マスペクトル測定によって分析した。ESI(エレクトロスプレーイオン化)の後、トリプシン切断サンプルをタンデムマスペクトロメトリーにかけた。Micromass, UK社製のナノフロー-Z-スプレーイオンソースと称されるものを有するQ-TOFマスペクトロメーターを使用した。この方法は、装置の製造者の作用説明書に対応した。

【0052】

4. CHPの同定

図1(A)及び1(B)に示されているように、LPS注射を投与されているヒヒの肝細胞抽出物はとりわけ、約22,900 ± 700ドルトンの分子量が、既知の分子量のマーカー物質と比較してゲル電気泳動に基づいて見積もられ、第一次元のタンパク質の相対的位置から、6.1から6.3の等電点が測定されるタンパク質のスポットを含んだ。

【0053】

新規なタンパク質スポットのトリプシン切断のマス分析において、以下のマス(m/z)を有する断片が見出された: 1169.52; 1469.50; 1550.56; 1569.7; 1645.6; 1920.81; 2386.78。7のマス(1169.52及び1920.81)は、既知のトリプシン処理タンパク質のいずれのマスとも合致できなかった。残りの5のマスについては、分析に引き続き、CHPの既知の配列と合致が生じた(配列番号6参照; データベースSWISS-PROT: Entry Ca22_Human: Accession number Q99653; Lin X., Barber D.L. "A calcineurin homologous protein inhibits GTPase-stimulated Na-H exchange", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 12636 (1996))。

【0054】

マス1469.50は、配列L-Y-S-R-F-T-S-L-D-K(配列番号1)に

10

20

30

40

50

対応する。アミノ酸 S (セリン、二度出現する) 及び T (トレオニン) では、配列は各々の場合でリン酸基によって修飾されている。この断片の理論的な分子量は 1469.499 である。CHP のアミノ酸配列 (前述の Lin X. によってさらに言及されるメチオニン残基を有さない) では、この配列は 31 - 40 位で見出される。

【0055】

マス 1550.56 は、配列 K - E - T - G - F - S - H - S - Q - I - T (配列番号 2) に対応し、2 のリン酸基によって補われている。この断片の理論的分子量は 1550.564 である。CHP のアミノ酸配列 (前述の Lin X. によってさらに言及されるメチオニン残基を有さない) では、この配列は 19 - 30 位で見出される。

【0056】

マス 1569.7 は、配列 T - L - A - H - F - R - P - I - E - D - N - E - K (配列番号 3) に対応する。この断片の理論的分子量は 1569.7 である。CHP のアミノ酸配列 (前述の Lin X. によってさらに言及されるメチオニン残基を有さない) では、この配列は 86 - 98 位で見出される。

【0057】

マス 1645.6 は、配列 A - S - T - L - L - R - D - E - E - I - K (配列番号 4) に対応する。この断片の理論的分子量は 1645.597 である。CHP のアミノ酸配列 (前述の Lin X. によってさらに言及されるメチオニン残基を有さない) では、この配列は 5 - 18 位で見出される。

【0058】

マス 2386.78 は、配列 I - I - N - A - F - F - P - E - G - E - D - Q - V - N - F - R - G - F - M - R (配列番号 5) に対応する。この断片の理論的分子量は 2386.78 である。CHP のアミノ酸配列 (前述の Lin X. によってさらに言及されるメチオニン残基を有さない) では、この配列は 66 - 85 位で見出される。

【0059】

解釈の認識されている原理によれば、そのような一致は、タンパク質スポットから得た産物の CHP としての信頼できる同定が考慮される。CHP (194 アミノ酸) の分子量は 22325 ドルトンである。

【0060】

初めて見出された増大した CHP 濃度は、敗血症及び炎症、特に感染性の炎症のための新規なバイオマーカーとしてのその使用を可能にする。

【0061】

同じ発見は、特に CHP の投与による身体の敗血症の反応に対する阻害効果を有する活性物質として、CHP の治療上の使用を初めて示唆する。従って本発明は、適切な製薬学的キャリアーと共に、実際の活性物質として CHP を含む製薬組成物、または特定の病理学的プロセスにおいて生理学的 CHP 濃度を低下する目的を有する製薬組成物、例えば CHP または CHP 断片または加工された CHP、例えば特定の形態にリン酸化された CHP に対する抗体を、実際の活性物質として含む製薬組成物に関し、そのような抗体は好ましくは、例えば患者への投与のためヒト化されて調製され、さらに適切な製薬学的キャリアーと共に存在する。

【図面の簡単な説明】

【0062】

【図 1】図 1 は、健康なヒヒの細胞質肝細胞タンパク質 (A) と、LPS 投与によって誘導された敗血症の 5 時間後のヒヒの肝細胞タンパク質 (B) の、スポットパターンの比較を可能にする 2 次元電気泳動ゲルの写真を示す図である。矢印は、円によって図面 (B) で識別される本発明にかかる敗血症特異的産物、CHP の位置を示す。

【図 2】図 2 は、2 次元ゲル電気泳動のゲルから単離されたトリプシン切断産物のマスペクトルを示す図である。

10

20

30

40

【国際公開パンフレット】

(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
16. Januar 2003 (16.01.2003)

PCT

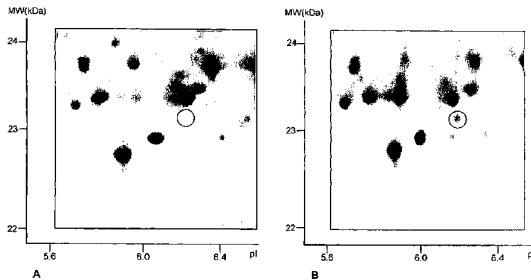
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/005035 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation: G01N 33/68, 33/569, A61P 29/00 (72) Erfinder: und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERGMANN, Andreas [DE/DE]; Baumlaiferweg 47, 12351 Berlin (DE).
STRUCK, Joachim [DE/DE]; Holsteinische Strasse 28, 12161 Berlin (DE). ÜHLEIN, Monika [DE/DE]; Hufelandstrasse 15, 10407 Berlin (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/06660 (74) Anwälte: ANDRAE, Steffen usw.; Andrae Flach Haug, Balanstrasse 55, 81541 München (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 17. Juni 2002 (17.06.2002) (81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (30) Angaben zur Priorität: 101 31 922.3 2. Juli 2001 (02.07.2001) DE (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): B.R.A.H.M.S. AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Neuenдорferstrasse 25, 16761 Henningsdorf (DE). Veröffentlichlich: mit internationalem Recherchenbericht

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: CHP FOR USE AS MARKER FOR SEPSIS-TYPE INFLAMMATORY DISEASES

(54) Bezeichnung: CHP ALS MARKER FÜR SEPSISÄHNLICHE ENTZÜNDUNGSKRANKHEITEN



(57) Abstract: The invention relates to the use of the calcineurin B homologous protein (CHP) from body fluids or body tissues as marker peptide in diagnostic identification, progression prognosis and progression control of inflammations and infections and/or as a target for therapeutically influencing the progression of inflammations and/or infections.

(57) Zusammenfassung: Verwendung des Calcineurin B Homologen Proteins (CHP) aus Körperflüssigkeiten oder Körpergeweben als Markerpeptid zum diagnostischen Nachweis, für die Verlaufsprognose und für die Verlaufskontrolle von Entzündungen und Infektionen und/oder als Target für die therapeutische Beeinflussung des Verlaufs von Entzündungen und/oder Infektionen.

WO 03/005035 A1

WO 03/005035 A1 

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

WO 03/005035

1

PCT/EP02/06660

CHP ALS MARKER FÜR SEPSISÄHNLICHE ENTZÜNDUNGSKRANKHEITEN

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Verwendungen des sogenannten Calcineurin B Homologen Proteins (CHP) für die medizinischen Diagnostik und Therapie von Entzündungserkrankungen und Sepsis. Sie beruht auf dem erstmaligen Nachweis stark erhöhter Konzentrationen von CHP in Lebergewebe von Primaten, bei denen experimentell durch Toxinverabreichung eine Sepsis bzw. systemische Entzündung hervorgerufen wurde.

Die vorliegende Erfindung hat ihren Ursprung in intensiven Forschungsarbeiten der Anmelderin im Zusammenhang mit weiteren Verbesserungen der Diagnose und Therapie von Entzündungen und Infektionen, insbesondere von Entzündungen infektiöser Ätiologie und Sepsis.

Als Entzündungen (Inflammationen) werden ganz allgemein bestimmte physiologische Reaktionen eines Organismus auf verschiedenartige äußere Einwirkungen wie z.B. Verletzungen, Verbrennungen, Allergene, Infektionen durch Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze und Viren, auf Fremdgewebe, die

Abstoßungsreaktionen auslösen, oder auf bestimmte entzündungsauslösende endogene Zustände des Körpers, z.B. bei Autoimmunerkrankungen und Krebs, bezeichnet. Entzündungen können als harmlose, lokal begrenzte Reaktionen des Körpers auftreten, sind jedoch auch typische Merkmale zahlreicher ernster chronischer und akuter Erkrankungen von einzelnen Geweben, Organen, Organ- und Gewebsteilen.

Lokale Entzündungen sind dabei meist Teil der gesunden Immunreaktion des Körpers auf schädliche Einwirkungen, und damit Teil des lebenserhaltenden Abwehrmechanismus des Organismus. Wenn Entzündungen jedoch Teil einer fehlgeleiteten Reaktion des Körpers auf bestimmte endogene Vorgänge wie z.B. bei Autoimmunerkrankungen sind und/oder chronischer Natur sind, oder wenn sie systemische Ausmaße erreichen, wie beim systemischen Inflammationssyndrom (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS) oder bei einer auf infektiöse Ursachen zurückzuführenden schweren Sepsis, geraten die für Entzündungsreaktionen typischen physiologischen Vorgänge außer Kontrolle und werden zum eigentlichen, häufig lebensbedrohlichen Krankheitsgeschehen.

Es ist heute bekannt, dass die Entstehung und der Verlauf von entzündlichen Prozessen von einer beträchtlichen Anzahl von Substanzen, die überwiegend proteinischer bzw. peptidischer Natur sind, gesteuert werden bzw. von einem mehr oder weniger zeitlich begrenzten Auftreten bestimmter Biomoleküle begleitet sind. Zu den an Entzündungsreaktionen beteiligten endogenen Substanzen gehören insbesondere solche, die zu den Cytokinen, Mediatoren, vasoaktiven Substanzen, Akutphasenproteinen und/oder hormonellen Regulatoren gezählt werden können. Die Entzündungsreaktion stellt eine komplexe physiologische Reaktion dar, an der sowohl das Entzündungsgeschehen aktivierende endogene Substanzen (z.B. TNF- α) als auch desaktivierende Substanzen (z.B. Interleukin-10) beteiligt sind.

WO 03/005035

PCT/EP02/06660

3

Bei systemischen Entzündungen wie im Falle einer Sepsis bzw. des septischen Schocks weiten sich die entzündungsspezifischen Reaktionskaskaden unkontrolliert auf den gesamten Körper aus und werden dabei, im Sinne einer überschießenden Immunantwort, lebensbedrohlich. Zu den gegenwärtigen Kenntnissen über das Auftreten und die möglichen Rolle einzelner Gruppen endogener entzündungsspezifischer Substanzen wird beispielsweise verwiesen auf A.Beishuizen, et al., "Endogenous Mediators in Sepsis and Septic Shock", *Advances in Clinical Chemistry*, Vol.33, 1999, 55-131; und C.Gabay, et al., "Acute Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation", *The New England Journal of Medicine*, Vol.340, No.6, 1999, 448-454. Da sich das Verständnis von Sepsis und verwandten systemischen entzündlichen Erkrankungen, und damit auch die anerkannten Definitionen, in den letzten Jahren gewandelt haben, wird außerdem verwiesen auf K.Reinhart, et al., "Sepsis und septischer Schock", in: *Intensivmedizin*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.New York, 2001, 756-760; wo eine moderne Definition des Sepsis-Begriffes gegeben wird. Im Rahmen der vorliegenden Anmeldung werden die Begriffe Sepsis bzw. entzündliche Erkrankungen in Anlehnung an die Definitionen verwendet, wie sie den genannten drei Literaturstellen entnommen werden können.

Während wenigstens im europäischen Raum die durch eine positive Blutkultur nachweisbare systemische bakterielle Infektion lange den Sepsisbegriff prägte, wird die Sepsis heute in erster Linie als systemische Entzündung verstanden, die infektiöse Ursachen hat, als Krankheitsgeschehen jedoch große Ähnlichkeiten mit systemischen Entzündungen aufweist, die durch andere Ursachen ausgelöst werden. Dem genannten Wandel des Sepsis-Verständnisses entsprechen Veränderungen der diagnostischen Ansätze. So wurde der direkte Nachweis bakterieller Erreger durch komplexe Überwachungen physiologischer Parameter und in jüngerer Zeit insbesondere auch durch den Nachweis bestimmter am Sepsisgeschehen bzw. am Entzündungsgeschehen beteiligter endogener Substanzen, d.h.

WO 03/005035

PCT/EP02/06660

4

spezifischer "Biomarker", ersetzt bzw. ergänzt.

Von der großen Zahl von Mediatoren und Akutphasenproteinen, von denen man weiß, dass sie an einem Entzündungsgeschehen beteiligt sind, eignen sich dabei für diagnostische Zwecke insbesondere solche, deren Auftreten sehr spezifisch für entzündliche Erkrankungen bzw. bestimmte Phasen entzündlicher Erkrankungen ist, deren Konzentrationen sich drastisch und diagnostisch signifikant verändern und die außerdem die für Routinebestimmungen erforderlichen Stabilitäten aufweisen und hohe Konzentrationswerte erreichen. Für diagnostische Zwecke steht dabei die zuverlässige Korrelation von Krankheitsgeschehen (Entzündung, Sepsis) mit dem jeweiligen Biomarker im Vordergrund, ohne dass dessen Rolle in der komplexen Kaskade der an Entzündungsgeschehen beteiligten endogenen Substanzen bekannt sein muss.

Eine bekannte, als Sepsis-Biomarker besonders geeignete endogene Substanz ist Procalcitonin. Procalcitonin ist ein Prohormon, dessen Serum-Konzentrationen unter den Bedingungen einer systemischen Entzündung infektiöser Ätiologie (Sepsis) sehr hohe Werte erreichen, während es bei Gesunden so gut wie nicht nachweisbar ist. Hohe Werte an Procalcitonin werden außerdem in einem relativ frühen Stadium einer Sepsis erreicht, so dass sich die Bestimmung von Procalcitonin auch zur Früherkennung einer Sepsis und zur frühen Unterscheidung einer infektiös bedingten Sepsis von schweren Entzündungen, die auf anderen Ursachen beruhen, eignet. Die Bestimmung von Procalcitonin als Sepsismarker ist Gegenstand der Veröffentlichung M.Assicot, et al., "High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection", The Lancet, vol.341, No.8844, 1993, 515-518; und der Patente DE 42 27 454 C2 bzw. EP 0 656 121 B1 bzw. US 5,639,617. Auf die genannten Patente und in der genannten Veröffentlichung angeführten frühen Literaturstellen wird zur Ergänzung der vorliegenden Beschreibung ausdrücklich Bezug genommen. In den letzten Jahren ist die Zahl der

WO 03/005035

5

PCT/EP02/06660

Veröffentlichungen zum Thema Procalcitonin stark angestiegen. Stellvertretend für zusammenfassende Veröffentlichungen aus jüngerer Zeit wird daher noch verwiesen auf W.Karzaï et al., "Procalcitonin - A New Indicator of the Systemic Response to Severe infection", *Infection*, Vol. 25, 1997, 329-334; und M.Oczenski et al., "Procalcitonin: a new parameter for the diagnosis of bacterial infection in the peri-operative period", *European Journal of Anaesthesiology* 1998, 15, 202-209; sowie ferner H.Redl, et al., "Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin", *Crit Care Med* 2000, Vol.28. No.11, 3659-3663; und H.Redl, et al., "Non-Human Primate Models of Sepsis", in: *Sepsis* 1998; 2:243-253; und die darin zitierten weiteren Literaturstellen.

Die Verfügbarkeit des Sepsismarkers Procalcitonin hat der Sepsisforschung starke Impulse gegeben, und es werden gegenwärtig intensive Anstrengungen unternommen, weitere Biomarker zu finden, die die Procalcitonin-Bestimmung ergänzen können und/oder zusätzliche Informationen für Zwecke der Feindiagnostik bzw. Differentialdiagnostik zu liefern vermögen. Erschwert wird die Suche nach potentiellen neuen Sepsis-Biomarkern allerdings dadurch, dass häufig noch sehr wenig oder nichts über die genaue Funktion bzw. über die genauen Gründe für das Auftreten bestimmter endogener Substanzen, die am Entzündungs- oder Sepsisgeschehen beteiligt sind, bekannt ist.

Die Ergebnisse der experimentellen Überprüfung eines fruchtbaren rein hypothetischen Ansatzes zur Ermittlung weiterer potentieller Sepsismarker finden sich in DE 198 47 690 A1 bzw. WO 00/22439. Dort wird gezeigt, dass bei Sepsis nicht nur die Konzentration des Prohormons Procalcitonin erhöht ist, sondern auch für andere Substanzen, die zu den Peptid-Prohormonen gerechnet werden können, signifikant erhöhte Konzentrationen beobachtet werden können. Während das beschriebene Phänomen gut dokumentiert ist, sind die Ursachen

WO 03/005035

PCT/EP02/06660

6

für den Anstieg der Konzentrationen von Prohormonen bei Sepsis weiterhin weitgehend ungeklärt.

In der vorliegenden Anmeldung wird nunmehr Ergebnisse eines anderen, rein experimentellen Ansatzes für die Suche nach weiteren entzündungs- bzw. sepsisspezifischen Biomolekülen berichtet. Auch diese experimentellen Untersuchungen nehmen ihren Ausgang bei der Bestimmung von Procalcitonin im Zusammenhang mit systemischen entzündlichen Reaktionen infektiöser Ätiologie. So war sehr früh beobachtet worden, dass bei Sepsis das Procalcitonin offensichtlich nicht auf die gleiche Weise gebildet wird, wie dann, wenn es Vorläufer für das Hormon Calcitonin ist. So wurden hohe Procalcitoninspiegel auch bei Patienten beobachtet, denen die Schilddrüse entfernt worden war. Deshalb kann die Schilddrüse nicht dasjenige Organ sein, in dem Procalcitonin bei Sepsis gebildet bzw. ausgeschüttet wird. In den Veröffentlichungen H.Redl, et al., "Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin", Crit Care Med 2000, Vol.28. No.11, 3659-3663; und H.Redl, et al., "Non-Human Primate Models of Sepsis", Sepsis 1998; 2:243-253; werden die Ergebnissen von experimentellen Untersuchungen berichtet, die der Klärung der Bildung von Procalcitonin bei Sepsis dienen sollten. In den genannten Arbeiten wird durch Endotoxinverabreichung an Primaten (Paviane) eine künstliche Sepsis erzeugt, und es wird bestimmt, bei welchen experimentell erzeugten Zuständen die höchsten Procalcitoninkonzentrationen im Blut erreicht werden. Eine Weiterentwicklung des in den genannten Arbeiten beschriebene Versuchstiermodells dient im Rahmen der vorliegenden Anmeldung dazu, neue endogene sepsisspezifische Biomarker von peptischer bzw. proteinischer Natur zu ermitteln, deren Auftreten für Sepsis oder bestimmte Formen von Sepsis charakteristisch ist und die daher eine spezifische Sepsisdiagnose ermöglichen. Das Primatenmodell wurde dabei aufgrund der sehr großen Ähnlichkeit der Physiologie von Primaten und Menschen und der hohen Kreuzreaktivität mit

vielen therapeutischen und diagnostischen humanen Reagenzien gewählt.

Da die bei Entzündungen gebildeten endogenen Substanzen Teil der komplexen Reaktionskaskade des Körpers sind, sind derartige Substanzen außerdem nicht nur von diagnostischem Interesse, sondern es wird gegenwärtig auch mit erheblichem Aufwand versucht, durch Beeinflussung der Entstehung und/oder der Konzentration einzelner derartiger Substanzen therapeutisch in das Entzündungsgeschehen einzugreifen, um die zum Beispiel bei Sepsis beobachtete systemische Ausbreitung der Entzündung möglichst frühzeitig zu stoppen. In diesem Sinne sind nachweislich am Entzündungsgeschehen beteiligte endogene Substanzen auch als potentielle therapeutische Targets anzusehen. Versuche, ansetzend an bestimmten Mediatoren des Entzündungsgeschehens dieses positiv therapeutisch zu beeinflussen, sind beschrieben beispielsweise in E.A.Panacek, "Anti-TNF strategies", Journal für Anästhesie und Intensivbehandlung; Nr.2, 2001, 4-5; T.Calandra, et al., "Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor", Nature Medicine, Vol.6, No.2, 2000, 164-170; oder K.Garber, "Protein C may be sepsis solution", Nature Biotechnology, Vol.18, 2000, 917-918. Diese therapeutischen Ansätze laufen darauf hinaus, die Konzentrationen entzündungsfördernder Substanzen zu senken bzw. die Entstehung derartiger Substanzen zu hemmen, und zwar insbesondere unter Verwendung von spezifischen Antikörpern (gegen TNF- α bzw. MIF; vgl. E.A.Panacek, "Anti-TNF strategies", Journal für Anästhesie und Intensivbehandlung; Nr.2, 2001, 4-5; T.Calandra, et al., "Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor", Nature Medicine, Vol.6, No.2, 2000, 164-170) bzw. die Konzentration von hemmend in die Entzündungskaskade eingreifenden endogenen Substanzen (Protein C; K.Garber, "Protein C may be sepsis solution", Nature Biotechnology, Vol.18, 2000, 917-918) zu erhöhen. In der letztgenannten Veröffentlichung findet sich ein Über-

WO 03/005035

8

PCT/EP02/06660

blick über derartige, leider bisher meist wenig erfolgreiche Versuche, das Entzündungsgeschehen unter Beeinflussung ausgewählter endogener Target-Moleküle therapeutisch zu beeinflussen. Angesichts der bisherigen eher enttäuschenden therapeutischen Ansätze besteht ein hohes Interesse daran, weitere möglichst entzündungs- bzw. sepsisspezifische endogene Biomoleküle zu identifizieren, die auch als therapeutische Targets neue Erfolgsaussichten für die Entzündungs- bekämpfung eröffnen.

Die vorliegende Erfindung beruht darauf, dass sich in Primaten und Menschen bei infektiös bedingten Entzündungen das sogenannte Calcineurin B Homologe Protein (CHP) in beträchtlichen Konzentrationen nachweisen lässt, und zwar im Unterschied zu Gesunden, bei denen es nicht oder nur in Konzentrationen an der analytischen Nachweisgrenze gefunden wird, was dieses Protein CHP sowohl für die Entzündungsdiagnostik/Sepsisdiagnostik als auch als neues therapeutisches Target geeignet macht.

Die Verwendungen in Diagnose und Therapie, die sich aufgrund des erstmals nachgewiesenen Auftretens von CHP bei der experimentellen Simulation von Entzündungen bzw. Sepsis ergeben, werden in allgemeiner Form in Anspruch 1 beansprucht.

Die Ansprüche 2 bis 4 betreffen dabei diagnostische Verwendungen bzw. Verfahren.

Anspruch 5 betrifft in allgemeiner Form die neuen therapeutischen Verwendungsmöglichkeiten, insbesondere auf dem Gebiet der Therapie von Entzündungen und Infektionen, einschließlich Sepsis, und die Ansprüche 6 und 7 für therapeutische Anwendungen, die eine Beeinflussung der physiologischen CHP-Konzentrationen zum Ziel haben, bestimmte pharmazeutische Zusammensetzungen.

Wie nachfolgend im experimentellen Teil noch näher ausge-

WO 03/005035

9

PCT/EP02/06660

führt wird, beruht die Erfindung darauf, dass nach experimenteller Auslösung einer künstlichen Sepsis in Pavianen durch Endotoxinverabreichung (LPS aus *Salmonella Typhimurium*) und 2D-gelelektrophoretischer Aufarbeitung von Lebergewebe der behandelten Tiere als eines der nur bei den behandelten Tieren identifizierbares Peptid- bzw. Proteinprodukt CHP gefunden werden konnte. Zu seiner Identifizierung wurde ein neuer Proteinspot, der nur bei den behandelten Tieren gefunden wurde und gemäß Gelelektrophorese ein Molekulargewicht von etwa 22900 ± 700 Dalton und einen isoelektrischen Punkt von ca. 6,2 aufwies, aus dem Elektrophoresegelel isoliert und durch Trypsinverdauung in Bruchstücke zerlegt, die auf an sich bekannte Weise massenspektrometrisch analysiert und durch Vergleich mit bekannten trypsinbehandelten Proteine identifiziert wurden.

Bei der Massenanalyse des tryptischen Verdaus des neuen Proteinspots wurden Bruchstücke mit folgenden Massen (M/Z) gefunden: 1169,52; 1469,50; 1550,56; 1569,7; 1645,6; 1920,81; 2386,78. Zwei der 7 Massen (1169,52 und 1920,81) konnten keinen Massen bekannter trypsinbehandelter Proteine zugeordnet werden. Für die restlichen 5 Massen ergab sich die folgende Analyse und Zuordnung zu der bekannten Sequenz von CHP (vgl. SEQ ID NO:6; Datenbank SWISS-PROT: Entry CA22_Human; Accession number Q99653; Lin X., Barber D.L. "A calcineurin homologous protein inhibits GTPase-stimulated Na-H exchange", Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 93:12636(1996)):

Die Masse 1469,50 entspricht der Sequenz L-Y-S-R-F-T-S-L-D-K (SEQ ID NO:1). An den Aminosäure S (Serin, 2faches Auftreten) und T (Threonin) ist die Sequenz durch jeweils eine Phosphatgruppe modifiziert. Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 1469,499. In der Aminosäuresequenz von CHP (ohne den bei Lin X., supra, zusätzlich aufgeführten Methioninrest) findet sich diese Sequenz an den Positionen 31-40 wieder.

WO 03/005035

10

PCT/EP02/06660

Die Masse 1550,56 entspricht der Sequenz K-E-T-G-F-S-H-S-Q-I-T (SEQ ID NO:2), ergänzt um 2 Phosphatgruppen. Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 1550,564. In der Aminosäuresequenz von CHP (ohne den bei Lin X., supra, zusätzlich aufgeführten Methioninrest) findet sich diese Sequenz an den Positionen 19-30 wieder.

Die Masse 1569,7 entspricht der Sequenz T-L-A-H-F-R-P-I-E-D-N-E-K (SEQ ID NO:3). Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 1569,71. In der Aminosäuresequenz von CHP (ohne den bei Lin X., supra, zusätzlich aufgeführten Methioninrest) findet sich diese Sequenz an den Positionen 86-98 wieder.

Die Masse 1645,6 entspricht der Sequenz A-S-T-L-L-R-D-E-E-I-K (SEQ ID NO:4). Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 1645,597. In der Aminosäuresequenz von CHP (ohne den bei Lin X., supra, zusätzlich aufgeführten Methioninrest) findet sich diese Sequenz an den Positionen 5-18 wieder.

Die Masse 2386,78 entspricht der Sequenz I-I-N-A-F-F-P-E-G-E-D-Q-V-N-F-R-G-F-M-R (SEQ ID NO:5). Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 2386,78. In der Aminosäuresequenz von CHP (ohne den bei Lin X., supra, zusätzlich aufgeführten Methioninrest) findet sich diese Sequenz an den Positionen 66-85 wieder.

Eine solche Übereinstimmung gilt nach anerkannten Interpretationsgrundsätzen als sichere Identifizierung des Produkts aus dem Proteinspot als CHP. Das Molekulargewicht von CHP (194 Aminosäuren) beträgt 22 325 Dalton.

Die Identifizierung des Auftretens von CHP bei Sepsis in der Leber ist von hohem wissenschaftlichen, diagnostischen und therapeutischen Interesse.

Das humane Protein CHP wurde erstmals im Jahr 1996 beschrieben (X.Lin and D.L.Barber, A calcineurin homologous protein inhibits GTPase-stimulated Na-H exchange, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 23:12631-12636, 1996) und erwies sich als im wesentlichen identisch mit dem kurz zuvor im gleichen Jahre als Ca²⁺-bindendes Protein beschriebenen Ratten-Protein p22 (M.R.Barroso et al., A Novel Ca²⁺-bindung Protein, p22, Is Required for Constitutive Membrane Traffic, J.Biol.Chem., 271:10183-10187, 1996). Die Bezeichnung Calcineurin B Homologes Protein (CHP) verweist auf die hohe Ähnlichkeit dieses Proteins mit der regulatorischen B-Untereinheit von Calcineurin (65%). Es besteht außerdem eine hohe Ähnlichkeit von CHP mit einem weiteren Ca²⁺-bindenden Protein, Calmodulin (59%).

CHP wird in vielen humanen Geweben exprimiert und erwies sich als essentieller Cofaktor für die Regulierung von NHE1, einem ubiquitär exprimierten Na⁺/H⁺-Exchanger, der bei seiner Aktivierung den intrazellulären pH-Wert erhöht, was eine Aktivierung der Zellvermehrung, Zelldifferenzierung und neoplastische Transformationen bewirken kann. Für die NHE1-Regulierung während der Zellteilung ist der Phosphorylierungsgrad von CHP wichtig. Es hat sich ferner gezeigt, dass eine transiente Überexpression von CHP die serum- und GTPase-stimulierten NHE1-Aktivitäten inhibiert.

Weitere Untersuchungen zur physiologischen Rolle von CHP bestätigten dessen Bedeutung für die NHE-Regulierung (T.Pang et al., Calcineurin Homologous Protein as an Essential Cofactor for Na⁺/H⁺ Exchangers, J.Biol.Chem., 276:17367-17372, 2001). Sie ergaben ferner, dass CHP die Calcineurin Aktivität inhibiert (X.Lin et al., Inhibition of Calcineurin Phosphatase Activity by a Calcineurin B Homologous Protein, J.Biol.Chem., 274:36125-36131, 1999). Dieser Befund ist von hohem Interesse, weil Calcineurin u.a. eine wichtige Rolle bei der T-Zell-Aktivierung und damit auch bei der Auslösung einer Immunantwort spielt. Calcineurin ist aus diesem Grund

WO 03/005035

12

PCT/EP02/06660

auch Target der immunsuppressiven pharmazeutischen Wirkstoffe Cyclosporin A und FK506. Das Protein CHP erweist sich im Lichte dieser Ergebnisse als vorher nicht erkannter endogener Inhibitor der Calcineurin-Wirkung bzw. der Aktivierung des Immunsystems.

Es ist bisher nicht bekannt, das die physiologischen Konzentrationen von CHP bei irgendwelchen Krankheiten signifikant verändert sind und daher eine Bestimmung der CHP-Konzentrationen unter diagnostischen Gesichtspunkten von Interesse sein könnte. Genausowenig wurden Vorschläge bekannt, die physiologischen CHP-Konzentrationen zur Erreichung definierter therapeutischer Ziele zu beeinflussen.

Der erfindungsgemäße Nachweis von vergleichsweise hohen CHP-Konzentrationen in der Leber von Primaten, bei denen durch Toxinverabreichung eine künstliche Sepsis ausgelöst wurde, bei gleichzeitiger Unmöglichkeit, CHP in ansonsten völlig gleich behandelten Proben von Kontrolltieren zu erkennen, ist hoch signifikant. Da das Auftreten nur bei den behandelten Tieren zu beobachten war, und zwar bereits relativ kurze Zeit nach der Sepsisauslösung durch Toxinverabreichung, ist es möglich, diese Tatsache zur Schaffung eines vielversprechenden diagnostischen Sepsis-, Infektions- und Entzündungsnachweisverfahrens durch Bestimmung von CHP zu nutzen. Von besonderem Interesse ist eine möglich erscheinende Eignung von CHP als Prognosemarker für Sepsis.

Die Bestimmung von CHP kann dabei nach irgendeinem beliebigen geeigneten Nachweisverfahren erfolgen, wobei jedoch die Bestimmung in einer Körperflüssigkeit eines Patienten auf immundiagnostischem Wege unter Verwendung geeigneter selektiver Antikörper unter praktischen Gesichtspunkten am vorteilhaftesten erscheint.

Aufgrund der Tatsache, dass bei einer experimentellen Sepsisauslösung erstmals das erhöhte Auftreten von CHP nach-

gewiesen werden konnte, wird somit die Möglichkeit geschaffen, CHP für diagnostische und/oder therapeutische Zwecke im Zusammenhang mit Entzündungen und Sepsis zu nutzen. Dafür können CHP oder geeignete Teilpeptide davon ggf. auch nach Verfahren, die inzwischen zum Stand der Technik gehören, synthetisch oder gentechnologisch gezielt hergestellt werden. CHP-Teilpeptide, ggf. in markierter Form, können auch als Kalibratoren, Tracer und Kompetitoren für bestimmte Assayformate für immundiagnostische Bestimmungen benötigt und dafür wie erläutert hergestellt werden.

Ferner können CHP-Fragmente bzw. geeignete Teilsequenzen davon nach bekannten Verfahren des modernen Standes der Technik auch zur Erzeugung spezifischer polyklonaler und insbesondere monoklonaler Antikörper verwendet werden, die als Hilfsmittel für die diagnostische Bestimmung von CHP in Körperflüssigkeiten eines Patienten und/oder auch als potentielle therapeutische Mittel geeignet sind. Die Erzeugung geeigneter monoklonaler Antikörper gegen bekannte Peptid-Teilsequenzen gehört heute zum allgemeinen Stand der Technik und muss nicht besonders beschrieben werden. Ferner ist auch ausdrücklich die Antikörpererzeugung unter Anwendung von Techniken der direkten genetischen Immunisierung mit einer entsprechenden DNA zu erwähnen. Es liegt somit im Rahmen der vorliegenden Erfindung, zur Immunisierung z.B. eine cDNA von CHP oder CHP-Fragmenten zu verwenden, da es sich in der Vergangenheit gezeigt hat, dass bei der Anwendung derartiger Immunisierungstechniken das Spektrum der gewinnbaren Antikörper erweitert werden kann. Es können aber auch bereits bekannte und von dritter Seite erhältliche Antikörper gegen CHP verwendet werden.

Bei der immunologischen Bestimmung von CHP kann dabei grundsätzlich so vorgegangen werden, wie das z.B. für die selektive Procalcitoninbestimmung beschrieben ist in P.P.Ghillani, et al., "Monoclonal antipeptide antibodies as tools to dissect closely related gene products", The Journal of

Immunology, vol. 141, No.9, 1988, 3156-3163; und P.P.Ghillani, et al., "Identification and Measurement of Calcitonin Precursors in Serum of Patients with Malignant Diseases", Cancer research, vol.49, No.23, 1989, 6845-6851. Variationen der beschriebenen Techniken und/oder weitere Immunisierungstechniken kann der Fachmann einschlägigen Standardwerken und Veröffentlichungen entnehmen und sinngemäß anwenden.

CHP oder CHP-Fragmente mit den Teilsequenzen gemäß SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:5 oder Teilpeptide davon, können aufgrund der vorliegenden Ergebnisse als spezifische Markerpeptide (Biomarker) zum diagnostischen Nachweis und zur Verlaufskontrolle von Entzündungen und Infektionen (insbesondere auch von systemischen Infektionen vom Sepsistyp) dienen. Wie die Bestimmung von Procalcitonin kann dabei die Bestimmung von CHP zur differentialdiagnostischen Früherkennung und zur Erkennung sowie für die Erstellung einer Verlaufsprognose, zur Beurteilung des Schweregrads und zur therapiebegleitenden Verlaufsbeurteilung von Sepsis und Infektionen erfolgen, wobei man bei einem derartigen Verfahren in einer Probe einer biologischen Flüssigkeit oder eines Gewebes eines Patienten den Gehalt von CHP bestimmt und aus der festgestellten Anwesenheit und/oder Menge von CHP auf das Vorliegen einer Entzündung, einer schweren Infektion oder einer Sepsis schließt und das erhaltene Ergebnis mit dem Schweregrad der Sepsis korreliert und die Behandlungsmöglichkeiten und/oder die Behandlungsaussichten abschätzt.

CHP (oder ggf. dafür kodierende DNA-Abschnitte) kann jedoch auch in der präventiven Medizin oder Therapie von Entzündungen, insbesondere von systemischen Entzündungen infektiöser Ätiologie und Sepsis, verwendet werden.

Da CHP eine immunsuppressive Wirkung hat, können die erhöhten Konzentrationen von CHP im Falle einer Sepsis als Gegen-

regulation des Körpers gegen die bei Sepsis beobachtete überschießende systemische Immunreaktion des Körpers gedeutet werden. Eine Unterstützung dieser Gegenreaktion durch externe CHP-Verabreichung sollte daher im Sinne einer Kontrolle der septischen Reaktion des Körpers wirken können, so dass der hierin berichtete diagnostische Befund erhöhter CHP-Konzentrationen bei Sepsis auch neue therapeutische Möglichkeiten erkennen lässt.

Die Beobachtung, dass die physiologischen CHP-Konzentrationen in Abhängigkeit von äußeren Stressreaktionen - im o.g. Tiermodell aufgrund von Toxineinwirkung - stark veränderlich sind, lässt ferner vermuten, dass derartige Veränderungen der Konzentrationen des endogenen Immunsuppressivums CHP auch in physiologischen Situationen auftreten, von denen bekannt ist, dass sie zu einer unerwünschten Schwächung der Immunabwehr führen, z.B. bei lokalen Entzündungen, die die Abwehr des gesamten Organismus schwächen, aber auch bei äußeren Stressbelastungen durch Überforderung oder bei seelischem Stress. In diesen Fällen ist die von CHP bewirkte Immunsuppression unerwünscht. Die therapeutische Beeinflussung erfolgt in solchen Fällen mit dem Ziel einer Absenkung der physiologischen CHP-Konzentrationen zur Regenerierung der Immunabwehr. Man kann in solchen Fällen die Konzentration von CHP durch Verabreichung von bindenden Antikörpern, oder durch extrakorporale Entfernung von CHP im Sinne einer Blutwäsche oder Plasmapherese mittels Affinitätsabsorption, vermindern. Für derartige Zwecke können auch Arzneimittel geschaffen werden, die als eigentlichen Wirkstoff gegen CHP oder CHP-Fragmente erzeugte, für eine Verabreichung an Patienten aufbereitete Antikörper zusammen mit einem geeigneten pharmazeutischen Träger enthalten.

CHP wird somit zu einem potentiellen vielversprechenden therapeutischen Wirkstoff für die Therapie von Sepsis und ähnlichen schweren Entzündungen.

Wird zu therapeutischen Zwecken die CHP-Wirkung verstärkt, sollen als therapeutisch verwendbare CHP-Materialien dabei auch solche Moleküle anzusehen sein, die CHP in unterschiedlicher posttranslational modifizierter Form, z.B. in glykosylierter oder phosphorylierter Form, oder auch in einer durch pharmazeutische Hilfsstoffe, z.B. Polyethylenglykolreste, substituierten Form enthalten.

Nachfolgend wird die Auffindung und Identifizierung von CHP in näheren Einzelheiten geschildert, wobei auf das beigegefügte Sequenzprotokoll bezug genommen wird. Die Figuren zeigen:

Fig. 1 Ansichten von 2D-Elektrophoresegelel, die einen Vergleich der Spotmuster von cytoplasmatischen Leberzellprotein eines gesunden Pavians (A) mit den Leberzellproteinen eines Pavians 5h nach einer durch LPS-Verabreichung induzierten Sepsis (B) ermöglichen. Der Pfeil zeigt die Position des erfindungsgemäßen sepsisspezifischen Produkts (CHP) an, das in Darstellung (B) durch einen Kreis hervorgehoben ist;

Fig. 2 das Massenspektrum des aus dem Gel der 2D-Gelelektrophorese isolierten, trypsinverdauten Produkts.

1. Infektionssimulation durch Endotoxinverabreichung im Tiermodell (Paviane).

In Anlehnung an die mit Pavianen durchgeführten Versuche zur Stimulierung der Procalcitonin-Ausschüttung durch Endotoxininjektionen (vgl. H.Redl, et al., "Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin", Crit Care Med 2000, Vol.28, No.11, 3659-3663; H.Redl, et al., "Non-Human Primate Models of Sepsis", in: Sepsis 1998; 2:243-253) wurden Pavianen (männlich, ca. 2 Jahre alt, 27 bis 29 kg schwer) jeweils 100 µg LPS (Lipopolysaccharid aus Salmonella Typhimurium, Be-

WO 03/005035

17

PCT/EP02/06660

zugsquelle: Sigma) pro kg Körpergewicht intravenös verabreicht. 5 bis 5,5 h nach der Injektion wurden die Tiere durch intravenöse Verabreichung von 10 ml Doletal getötet. Innerhalb von 60 min nach ihrem Exitus wurden sämtliche Organe/Gewebe präpariert und durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff stabilisiert.

Bei der weiteren Verarbeitung wurden Proben der einzelnen tiefgefrorenen Gewebe (1g) unter Stickstoffkühlung mit 1,5 ml Puffer A (50mM Tris/HCl, pH 7,1, 100mM KCl, 20% Glycerol) versetzt und in einem Porzellanmörser zu einem Mehl pulverisiert (vgl. J.Klose, "Fractionated Extraction of Total Tissue Proteins from Mouse and Human for 2-D Electrophoresis", in: Methods in Molecular Biology, Vol.112: 2-D Proteome Analysis Protocols, Humana Press Inc., Totowa, NJ). Nach einer anschließenden 1-stündigen Zentrifugation bei 100.000 g und +4°C wurde der erhaltene Überstand gewonnen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Unter Verwendung der auf diese Weise gewonnenen Gewebeextrakte wurde zuerst untersucht, in welchem der untersuchten Gewebe sich durch die Endotoxinverabreichung die höchsten Mengen des bekannten Sepsis-Biomarkers Procalcitonin erzeugen lassen. In dem ermittelten Gewebe mit der höchsten Procalcitoninbildung wurde dann mittels differentieller Proteomanalyse nach weiteren bisher nicht identifizierten proteinischen Produkten gesucht, die nur nach der Endotoxinverabreichung auftraten. Dazu wurden als Kontroll-Gewebeproben Gewebeproben unbehandelter Paviane verwendet, wobei die Tötung und Probengewinnung unter identischen Bedingungen erfolgte wie bei den behandelten Tieren.

2. Ermittlung von Paviangeweben mit der höchsten Procalcitoninbildung nach Endotoxininjektion.

Proben der einzelnen Gewebe wurden mit Hilfe eines Immunoluminometrischen Tests untersucht, der (in Anlehnung an den

zur Bestimmung von humanem Procalcitonin entwickelten LU-Mitest® PCT der Anmelderin) mit einem auf Polystyrolröhrchen immobilisierten Antikörper gegen Pavian-Calcitonin einerseits und einem mit einem Akridiniumester markierten monoklonalen Antikörper, der gegen den N-Terminus des Pavian-Procalcitonins gerichtet ist, arbeitet. Mit Hilfe dieses Tests wurden die Gehalte an Pavian-Procalcitonin in den einzelnen Proben nach Kalibrierung des Tests unter Verwendung von rekombinantem humanem Procalcitonin ermittelt.

Die Versuche ergaben, dass Lebergewebe die größte Procalcitoninmenge liefert. Für die Suche nach neuen sepsisspezifischen Biomarkern wurde daher mit den auf die eingangs beschriebene Weise gewonnenen Proteinextrakten aus Pavianleber gearbeitet.

3. Proteomanalyse unter Verwendung cytoplasmatischer Leberzellproteine von Pavianen.

Cytoplasmatische Leberzellproteinextrakte von einerseits gesunden Pavianen (Kontrolle) und andererseits Pavianen, denen LPS injiziert worden war, wurden im Rahmen einer Proteomanalyse verwendet. Bei der einleitenden analytischen 2D-Gelelektrophorese wurde Leberextrakt, 100 µg Protein enthaltend, auf 9M Harnstoff, 70 mM DTT, 2% Ampholyt pH 2-4 eingestellt und dann mittels analytischer 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt, wie in J.Klose, et al., "Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome", Electrophoresis 1995, 16, 1034-1059; beschrieben ist. Die Sichtbarmachung der Proteine im 2D-Elektrophoresegele erfolgte mittels Silverstaining (vgl. J.Heukeshoven, et al., "Improved silver staining procedure for fast staining in Phast-System Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl gels", Electrophoresis 1988, 9, 28-32).

Zur Auswertung wurden die Proteinspotmuster der Proben

unbehandelter Tieren mit den Proteinspotmustern verglichen, die aus Lebergewebeprobe behandelte Tiere resultierten. Substanzen, die bei keiner Kontrollprobe, aber bei allen behandelten Tieren zusätzlich auftraten, wurden für weitere analytische Untersuchungen selektiert. Fig. 1 zeigt einen Vergleich der 2D-Elektrophoresegele für eine Kontrollprobe (A) und eine Probe eines behandelten Tieres (B), wobei der zusätzliche Proteinspot in (B) einem neuen Protein entspricht, dessen Position durch einen Pfeil und einen Kreis hervorgehoben ist.

Die im Proteinspotmuster der analytischen 2D-Gelelektrophorese identifizierten neuen spezifischen Proteine wurden dann anschließend mittels präparativer 2D-Gelelektrophorese unter Einsatz von 350 µg Protein präpariert (vgl. wiederum (10)). Bei der präparativen 2D-Gelelektrophorese erfolgte die Färbung mittels Coomassie Brilliant Blue G250 (vgl. V.Neu-hoff, et al., "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250", *Electrophoresis* 1988, 9, 255-262).

Die für die weitere Analyse vorselektierten Proteinspots wurden aus dem Gel ausgeschnitten, unter Anwendung der Methode, die in A.Otto, et al., "Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis using an effective sample preparation for mass spectrometry", *Electrophoresis* 1996, 17, 1643-1650; beschrieben ist, trypsinverdaut und anschließend massenspektroskopisch analysiert und zwar unter Anwendung massenspektrometrischer Untersuchungen, wie sie z.B. in G.Neubauer, et al., "Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex", in: *nature genetics* vol. 20, 1998, 46-50; J.Lingner, et al., "Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase", in: *Science*, Vol.276, 1997, 561-567; M.Mann, et al., "Use of mass spectrometry-derived data to annotate nucleoti-

de and protein sequence databases", in: TRENDS in Biochemical Sciences, Vol.26, 1, 2001, 54-61; beschrieben und diskutiert werden. Dabei wurden die trypsinverdauten Proben nach einer ESI (ElectroSprayIonisierung) einer Tandem-Massenspektrometrie unterzogen. Es wurde ein Q-TOF-Massenspektrometer mit einer sog. nanoflow-Z-Spray-Ionenquelle der Firma Micro-mass, UK, verwendet. Dabei wurde entsprechend der Arbeitsanleitung des Geräteherstellers gearbeitet.

4. Identifizierung von CHP

Wie in den Figuren 1(A) und 1(B) gezeigt ist, findet sich in Leberzellextrakten von Pavianen, denen eine LPS-Injektion verabreicht worden war, u.a. ein Spot eines Proteins, für das aufgrund der Gelelektrophoresedaten im Vergleich mit Markersubstanzen mit bekanntem Molekulargewicht ein Molekulargewicht von ca. 22 900 ± 700 Dalton abgeschätzt wurde, während aus der relativen Position des Proteins aus der ersten Dimension ein isoelektrischer Punkt von 6,1 bis 6,3 ermittelt wurde.

Bei der Massenanalyse des tryptischen Verdaus des neuen Proteinspots wurden Bruchstücke mit folgenden Massen (M/Z) gefunden: 1169,52; 1469,50; 1550,56; 1569,7; 1645,6; 1920,81; 2386,78. Zwei der 7 Massen (1169,52 und 1920,81) konnten keinen Massen bekannter trypsinbehandelter Proteine zugeordnet werden. Für die restlichen 5 Massen ergab sich die folgende Analyse und Zuordnung zu der bekannten Sequenz von CHP (vgl. SEQ ID NO:6; Nice Prot View of SWISS-PROT: Entry CA22_Human; Accession number Q99653; Lin X., Barber D.L. "A calcineurin homologous protein inhibits GTPase-stimulated na-H exchange", Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 93:12636(1996)):

Die Masse 1469,50 entspricht der Sequenz L-Y-S-R-F-T-S-L-D-K (SEQ ID NO:1). An den Aminosäure S (Serin, 2faches Auftreten) und T (Threonin) ist die Sequenz durch jeweils eine

WO 03/005035

21

PCT/EP02/06660

Phosphatgruppe modifiziert. Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 1469,499. In der Aminosäuresequenz von CHP (ohne den bei Lin X., supra, zusätzlich aufgeführten Methioninrest) findet sich diese Sequenz an den Positionen 31-40 wieder.

Die Masse 1550,56 entspricht der Sequenz K-E-T-G-F-S-H-S-Q-I-T (SEQ ID NO:2), ergänzt um 2 Phosphatgruppen. Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 1550,564. In der Aminosäuresequenz von CHP (ohne den bei Lin X., supra, zusätzlich aufgeführten Methioninrest) findet sich diese Sequenz an den Positionen 19-30 wieder.

Die Masse 1569,7 entspricht der Sequenz T-L-A-H-F-R-P-I-E-D-N-E-K (SEQ ID NO:3). Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 1569,71. In der Aminosäuresequenz von CHP (ohne den bei Lin X., supra, zusätzlich aufgeführten Methioninrest) findet sich diese Sequenz an den Positionen 86-98 wieder.

Die Masse 1645,6 entspricht der Sequenz A-S-T-L-L-R-D-E-E-I-X (SEQ ID NO:4). Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 1645,597. In der Aminosäuresequenz von CHP (ohne den bei Lin X., supra, zusätzlich aufgeführten Methioninrest) findet sich diese Sequenz an den Positionen 5-18 wieder.

Die Masse 2386,78 entspricht der Sequenz I-I-N-A-F-F-P-E-G-E-D-Q-V-N-F-R-G-F-M-R (SEQ ID NO:5). Das theoretische Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 2386,78. In der Aminosäuresequenz von CHP (ohne den bei Lin X., supra, zusätzlich aufgeführten Methioninrest) findet sich diese Sequenz an den Positionen 66-85 wieder.

Eine solche Übereinstimmung gilt nach anerkannten Interpretationsgrundsätzen als sichere Identifizierung des Produkts aus dem Proteinspot als CHP. Das Molekulargewicht von

CHP (194 Aminosäuren) beträgt 22 325 Dalton.

Die erstmals festgestellten erhöhten CHP-Konzentrationen erlauben dessen Verwendung als neuer Biomarker für Sepsis und Entzündungen, insbesondere infektiöse Entzündungen.

Die gleiche neue Erkenntnis legt erstmals auch eine therapeutische Verwendung von CHP nahe, und zwar als Wirkstoff für eine dämpfende Beeinflussung der septischen Reaktion des Körpers durch Verabreichung von CHP. Die Erfindung umfasst folglich auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die als eigentlichen Wirkstoff CHP zusammen mit einem geeigneten pharmazeutischen Träger enthalten, oder die die Absenkung der physiologischen CHP-Konzentrationen bei bestimmten Krankheitsgeschehen zum Ziel haben, z.B. solche Zusammensetzungen, die als eigentlichen Wirkstoff Antikörper gegen CHP oder CHP-Fragmente oder prozessiertes CHP, z.B. in bestimmter Form phosphoryliertes CHP, enthalten, wobei derartige Antikörper vorzugsweise für eine Verabreichung an Patienten aufbereitet, z.B. humanisiert, sind und außerdem zusammen mit einem geeigneten pharmazeutischen Träger vorliegen.

Patentansprüche

1. Verwendung des Calcineurin B Homologen Proteins (CHP) aus Körperflüssigkeiten oder Körpergeweben als Markerpeptid zum diagnostischen Nachweis, für die Verlaufsprognose und für die Verlaufskontrolle von Entzündungen und Infektionen und/oder als Target für die therapeutische Beeinflussung des Verlaufs von Entzündungen und/oder Infektionen.
2. Verwendung von CHP nach Anspruch 1 im Rahmen der differentialdiagnostischen Früherkennung und Erkennung für die Verlaufsprognose, die Beurteilung des Schweregrads und für die therapiebegleitende Verlaufsbeurteilung von Sepsis und schweren Infektionen, insbesondere sepsisähnlichen systemischen Infektionen, durch Bestimmung des Auftretens und/oder der Menge von CHP in einer biologischen Flüssigkeit oder einer Gewebeprobe eines Patienten.
3. Verfahren zur differentialdiagnostischen Früherkennung und Erkennung, für die Verlaufsprognose und die Beurteilung des Schweregrads und zur therapiebegleitenden Verlaufsbeurteilung von Sepsis und schweren Infektionen, insbesondere sepsisähnlichen systemischen Infektionen, dadurch gekennzeichnet, dass man die Anwesenheit und/oder Menge von CHP in einer biologischen Flüssigkeit oder einer Gewebeprobe eines Patienten bestimmt und aus der Anwesenheit und/oder Menge des bestimmten Fragments Schlüsse hinsichtlich des Vorliegens, des zu erwartenden Verlaufs, des Schweregrads oder den Erfolg einer Therapie der Sepsis oder von Infektion zieht.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass es ein immundiagnostisches Bestimmungsverfahren ist.
5. Verwendung von CHP nach Anspruch 1 als Mittel zur präventiven oder therapeutischen Beeinflussung des Verlaufs von

entzündlichen Erkrankungen und Infektionen, einschließlich Sepsis.

6. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von Entzündungen, einschließlich systemischer Entzündungen, dadurch gekennzeichnet, dass sie CHP oder ein funktionales Teilpeptid davon sowie einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst.

7. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von entzündlichen und anderen Stressreaktionen des Körpers, dadurch gekennzeichnet, dass sie gegen CHP oder CHP-Fragmente oder prozessiertes CHP, insbesondere in bestimmter Form phosphoryliertes CHP, erzeugte und für eine Verabreichung an Patienten aufbereitete Antikörper zusammen mit einem geeigneten pharmazeutischen Träger enthält.

WO 03/005035

1/2

PCT/EP02/06660

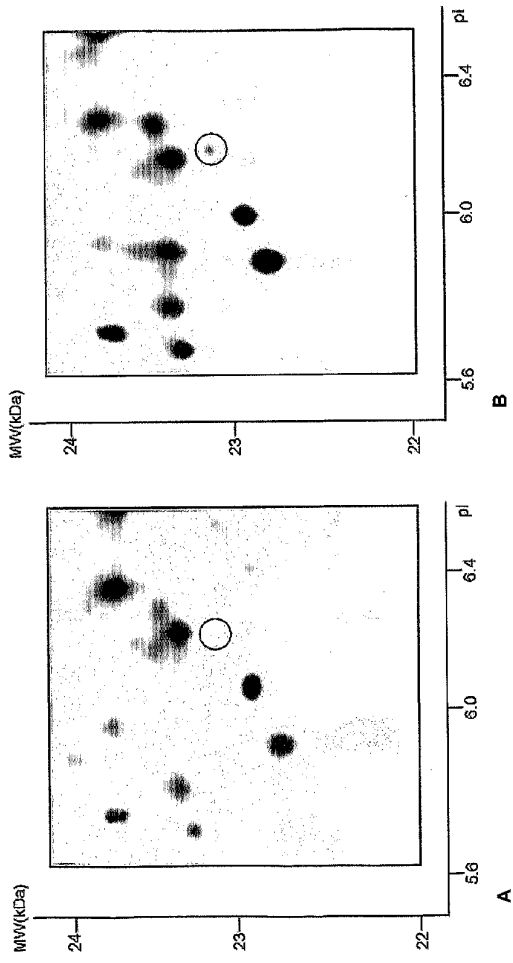


Figure 1

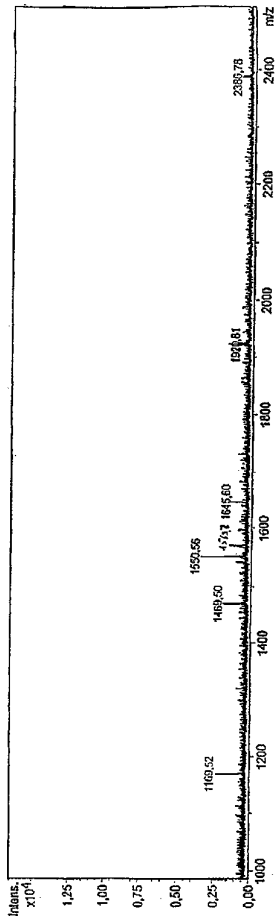


Figure 2

WO 03/005035

1/2

PCT/EP02/06660

SEQUENCE LISTING

<110> B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaft
<120> Verwendungen des Calcineurin B Homologen Proteins (CHB)
für die Diagnose und Therapie von
Entzündungserkrankungen und Sepsis
<130> 3536 PCT AS
<140>
<141>
<150> DE 101 31 922.3
<151> 2001-07-02
<160> 6
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Primat (Pavian)
<400> 1
Leu Tyr Ser Arg Phe Thr Ser Leu Asp Lys
1 5 10

<210> 2
<211> 12
<212> PRT
<213> Primat (Pavian)
<400> 2
Lys Glu Thr Gly Phe Ser His Ser Gln Ile Thr Arg
1 5 10

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> Primat (Pavian)
<400> 3
Thr Leu Ala His Phe Arg Pro Ile Glu Asp Asn Glu Lys
1 5 10

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> Primat (Pavian)
<400> 4
Ala Ser Thr Leu Leu Arg Asp Glu Glu Leu Glu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 5
<211> 20

WO 03/005035

2/2

PCT/EP02/06660

<212> ERT
 <213> Primat (Pavian)
 <400> 5
 Ile Ile Asn Ala Phe Phe Pro Glu Gly Glu Asp Gln Val Asn Phe Arg
 1 5 10 15
 Gly Phe Met Arg
 20

<310> 6
 <311> 194
 <312> ERT
 <313> Homo sapiens
 <300>
 <301> Lin, Xia
 <302> A calcineurin homologous protein inhibits
 GTPase-stimulated Na-H exchange
 <303> Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
 <304> 1996
 <305> vol.93
 <306> 12631-12636
 <400> 6
 Gly Ser Arg Ala Ser Thr Leu Leu Arg Asp Glu Glu Leu Glu Glu Ile
 1 5 10 15
 Lys Lys Glu Thr Gly Phe Ser His Ser Gln Ile Thr Arg Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Arg Phe Thr Ser Leu Asp Lys Gly Glu Asn Gly Thr Leu Ser Arg Glu
 35 40 45
 Asp Phe Gln Arg Ile Pro Glu Leu Ala Ile Asn Pro Leu Gly Asp Arg
 50 55 60
 Ile Ile Asn Ala Phe Phe Pro Glu Gly Glu Asp Gln Val Asn Phe Arg
 65 70 75 80
 Gly Phe Met Arg Thr Leu Ala His Phe Arg Pro Ile Glu Asp Asn Glu
 85 90 95
 Lys Ser Lys Asp Val Asn Gly Pro Glu Pro Leu Asn Ser Arg Ser Asn
 100 105 110
 Lys Leu His Phe Ala Phe Arg Leu Tyr Asp Leu Asp Lys Asp Glu Lys
 115 120 125
 Ile Ser Arg Asp Glu Leu Leu Gln Val Leu Arg Met Met Val Gly Val
 130 135 140
 Asn Ile Ser Asp Glu Gln Leu Gly Ser Ile Ala Asp Arg Thr Ile Gln
 145 150 155 160
 Glu Ala Asp Gln Asp Gly Asp Ser Ala Ile Ser Phe Thr Glu Phe Val
 165 170 175
 Lys Val Leu Glu Lys Val Asp Val Glu Gln Lys Met Ser Ile Arg Phe
 180 185 190
 Leu His

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		National Application No PCT/EP 02/06660
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 G01N33/569 A61P29/00		
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) IPC 7 G01N		
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, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 22439 A (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH ;WEGLOEHNER WOLFGANG (DE); STRUCK JOACHIM) 20 April 2000 (2000-04-20) page 2, line 1 - line 19 page 4, line 23 - line 26 page 9, line 18 -page 10, line 20 page 11, line 9 page 27, line 17 --- -/--	1,5-7 2
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 claims) 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 ** 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 ** 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. *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 September 2002		Date of mailing of the international search report 10/10/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5616 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gundlach, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/06660

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LIN X ET AL: "Inhibition of calcineurin phosphatase activity by a calcineurin B homologous protein." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 274, no. 51, 17 December 1999 (1999-12-17), pages 36125-36131, XP002213293 UNITED STATES ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document -& DATABASE SWISS-PROT 'Online! ID: CA22_HUMAN , 15 July 1998 (1998-07-15) "Calcium-binding protein p22 (CHP)" Database accession no. Q99653 XP002213294 abstract</p>	1-7
A	<p>WO 99 37790 A (INCYTE PHARMA INC ;CORLEY NEIL C (US); LAL PREETI (US); TANG Y TOM) 29 July 1999 (1999-07-29) cited in the application the whole document</p>	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 02/06660

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0022439	A	20-04-2000	DE 19847690 A1	20-04-2000
			WO 0022439 A2	20-04-2000
			EP 1121600 A2	08-08-2001
WO 9937790	A	29-07-1999	AU 2326099 A	09-08-1999
			CA 2317920 A1	29-07-1999
			EP 1047787 A1	02-11-2000
			JP 2002500890 T	15-01-2002
			WO 9937790 A1	29-07-1999
			US 2002091084 A1	11-07-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/EP 02/06660
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/68 G01N33/569 A61P29/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBL		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X A	WO 00 22439 A (BRAHMS DIAGNOSTICA GMBH ; WEGLOEHNER WOLFGANG (DE); STRUCK JOACHIM) 20. April 2000 (2000-04-20) Seite 2, Zeile 1 - Zeile 19 Seite 4, Zeile 23 - Zeile 26 Seite 9, Zeile 18 - Seite 10, Zeile 20 Seite 11, Zeile 9 Seite 27, Zeile 17 --- -/-	1,5-7 2
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besondere bedeutsam angesehen 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 dieser anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung befragt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benützung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *S* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angeeignet ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindungsfähiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindungsfähiger 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 naheliegender ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche 12. September 2002		Absenddatum des Internationalen Recherchenberichts 10/10/2002
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentamt 2 NL - 2280 HV Dordrecht Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Gundlach, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/06660

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>LIN X ET AL: "Inhibition of calcineurin phosphatase activity by a calcineurin B homologous protein." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., Bd. 274, Nr. 51, 17. Dezember 1999 (1999-12-17), Seiten 36125-36131, XP002213293 UNITED STATES ISSN: 0021-9258 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -& DATABASE SWISS-PROT 'Online! ID: CA22_HUMAN ; 15. Juli 1998 (1998-07-15) "Calcium-binding protein p22 (CHP)" Database accession no. Q99653 XP002213294 Zusammenfassung ---</p>	1-7
A	<p>WO 99 37790 A (INCYTE PHARMA INC ;CORLEY NEIL C (US); LAL PREETI (US); TANG Y TOM) 29. Juli 1999 (1999-07-29) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----</p>	1-7

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/06660

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0022439	A	20-04-2000	DE	19847690 A1	20-04-2000
			WO	0022439 A2	20-04-2000
			EP	1121600 A2	08-08-2001
WO 9937790	A	29-07-1999	AU	2326099 A	09-08-1999
			CA	2317920 A1	29-07-1999
			EP	1047787 A1	02-11-2000
			JP	2002500890 T	15-01-2002
			WO	9937790 A1	29-07-1999
			US	2002091084 A1	11-07-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
// C 1 2 N 9/16	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 N 9/16	B

(74)代理人 100107836

弁理士 西 和哉

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72)発明者 アンドレアス・ベルクマン

ドイツ・1 2 3 5 1・ベルリン・パウムロイファーヴェーク・4 7

(72)発明者 ヨアヒム・シュトルック

ドイツ・1 2 1 6 1・ベルリン・ホルシュタイニツシェ・シュトラッセ・2 8

(72)発明者 モニカ・ユーライン

ドイツ・1 0 4 0 7・ベルリン・フーフェラントシュトラッセ・1 5

Fターム(参考) 4B050 CC07 DD11 LL01 LL03

4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ03 QQ33 QR48 QS33

4C084 AA02 BA02 BA08 BA17 BA18 BA23 CA18 DB31 DC50 MA01

NA14 ZB111 ZB351 ZC032 ZC062

4C085 AA13 AA14 BB07 EE01

专利名称(译)	使用钙调神经磷酸酶B样蛋白 (CHP) 诊断和治疗炎症疾病和败血症		
公开(公告)号	JP2005500044A	公开(公告)日	2005-01-06
申请号	JP2003510960	申请日	2002-06-17
[标]申请(专利权)人(译)	布拉姆斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	裴埃尔啊她IMS股份公司		
[标]发明人	アンドレアスベルクマン ヨアヒムシュトルック モニカユーライン		
发明人	アンドレアス・ベルクマン ヨアヒム・シュトルック モニカ・ユーライン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K38/46 A61K39/395 A61P5/22 A61P29/00 A61P31/04 C12N9/16 C12Q1/42 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/1738 A61P29/00 G01N33/56911 G01N33/6893 G01N2800/26 Y10T436/105831 Y10T436/24		
FI分类号	C12Q1/42.ZNA A61K39/395.D A61K39/395.P A61P5/22 A61P29/00 A61P31/04 G01N33/53.D A61K37/02 C12N9/16.B		
F-TERM分类号	4B050/CC07 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ33 4B063/QR48 4B063/QS33 4C084/AA02 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/DB31 4C084/DC50 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZB111 4C084/ZB351 4C084/ZC032 4C084/ZC062 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB07 4C085/EE01		
代理人(译)	渡边 隆 正和青山 村山彦		
优先权	10131922 2001-07-02 DE		
其他公开文献	JP4307250B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

使用来自体液或身体组织的钙调神经磷酸酶B同源蛋白 (CHP) 作为标记肽用于诊断，预后和监测炎症和感染的过程和/或作为治疗影响炎症和/或感染过程的靶标。

