



(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2017 216 292.9**

(22) Anmeldetag: **14.09.2017**

(43) Offenlegungstag: **14.03.2019**

(51) Int Cl.: **C07K 14/47 (2006.01)**
C12N 1/00 (2006.01)

(71) Anmelder:

**Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, 39106
Magdeburg, DE**

(74) Vertreter:

**Kailuweit & Uhlemann Patentanwälte
Partnerschaft mbB, 01187 Dresden, DE**

(72) Erfinder:

**Bertrand, Jessica, Prof. Dr., 39110 Magdeburg,
DE; Lohmann, Christoph, Prof. Dr., 39110
Magdeburg, DE; Rudolf, Margit, Dr., 39116
Magdeburg, DE; Pinno, Karsten, 39175 Biederitz,
DE**

(56) Ermittelter Stand der Technik:

1. Internet-Recherche am 30.04.2018: www.ncbi.nlm.gov/proteinSyndecan 4 mit der Accession Nummer AAV38480

2. Internet-Recherche am 30.04.2018: www.ncbi.nlm.gov/Blast Sequenzvergleich von SEQ ID NO:1 mit AAV38480

3. ECHTERMEYER, F.; u. a.: Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. 2001. In: J. Clin. Invest., Vol. 107, S. R9-R14

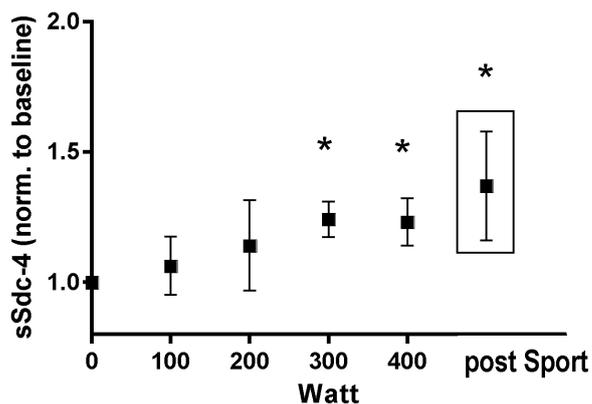
4. WANG, Z.; u. a.: Importance of syndecan-4 and syndecan-2 in osteoplast cell adhesion and survival mediated by tissue transglutaminase-fibronectin complex. 2010. In: Experimental Cell Research, Vol. 317, S. 367-381

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.

(54) Bezeichnung: **Biomarker zur Bestimmung der körperlichen Belastung von Menschen und Tieren und Verfahren zur Bestimmung der körperlichen Belastung sowie ein Kit zur Durchführung des Verfahrens**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft einen Biomarker zur Bestimmung der sportlichen körperlichen Belastung von Menschen und Tieren sowie und Verfahren zur Bestimmung der sportlichen körperlichen Belastung sowie ein Kit zur Durchführung des Verfahrens Erfindungsgemäß wird ein Biomarker aus der Gruppe der Heparansulfat-Proteoglykane, insbesondere aus der Familie der Syndekan-Familie verwendet, dessen Konzentration im Blut Rückschlüsse über die körperliche Belastung des Menschen oder Tieres nach körperlicher Aktivität erlaubt. Das Verfahren eignet sich auch zur Bestimmung des Trainingszustands von Sportlern.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft einen Biomarker zur Bestimmung der körperlichen Belastung von Menschen und Tieren und ein Verfahren zur Bestimmung der körperlichen Belastung sowie ein Kit zur Durchführung des Verfahrens.

[0002] Die Messung von Laktatkonzentrationen im Blut als belastungsabhängiger Parameter in der Leistungsdiagnostik ist seit den 1980er Jahren fest implementiert. Es gibt jedoch verschiedene Einschränkungen dieser Methode. So ist z.B. die nicht ausreichende Hyperämisierung des Ohrläppchens für Abnahme kapillarisierten Blutes zum Teil ein Problem, wie auch die Anreicherung mit zu viel Venenblut. Fehlerhafte Abnahmebedingungen der Laktatproben stellen eine potentielle Artefaktquelle dar. Laktat hat neben den spirometrischen Daten eine besondere Bedeutung bei der Bestimmung des Übergangs vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel. Dieser Schwellenwert wird bei einem Stufen-Belastungstest ermittelt. Der Laktatwert erweist sich jedoch als zum Teil unzuverlässiger Parameter, da sich Laktat auch nach sehr starker Belastung relativ schnell (ca. 10 Minuten) abbaut und auf den Ausgangswert absinkt.

[0003] Des Weiteren erreicht die Laktatkonzentration bei einer Dauerbelastung im aeroben Bereich schnell einen „steady state“, so dass unter diesen Bedingungen keine genaue Aussage über die Beanspruchung des Körpers getroffen werden kann. Auch besteht eine Abhängigkeit von der kompartimentalen Verteilung des Laktates, d.h. die Konzentration im Blut ist nicht die Konzentration des Laktates im belasteten Muskel. Auch unterscheidet sich die Laktatkonzentration im und außerhalb des Erythrozyten, so dass immer die Hämolyse der Proben angeraten werden muss.

[0004] Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung einen Biomarker und ein Verfahren zur Bestimmung des Biomarkers in Blutproben bereitzustellen, welches die Nachteile der bisherigen Verfahren zur Bestimmung der Belastung von Menschen und Tieren bei körperlicher Aktivität überwindet.

[0005] Die Aufgabe wird durch einen Biomarker, ein Verfahren zur Bestimmung des Biomarkers sowie ein Kit zur Bestimmung des Biomarkers gelöst. Vorteilhaftere Ausgestaltungen sind in den abhängigen Ansprüchen angegeben.

[0006] Ein erster Aspekt der Erfindung betrifft einen Biomarker zur Bestimmung der Belastung von Menschen und Tieren durch körperliche Aktivität. Insbesondere ist der Biomarker zur Bestimmung der körperlichen Belastung bei sportlicher Aktivität in Menschen vorgesehen. Dabei wird erfindungsgemäß die Konzentration des Biomarkers in einer zu untersu-

chenden Probe untersucht und mit einem Referenzwert korreliert. Basierend auf der Abweichung zwischen Referenzwert und bestimmter Konzentration des Biomarkers in der Probe kann eine Aussage zum Belastungszustand des Menschen vorgenommen werden.

[0007] Erfindungsgemäß ist der Biomarker ein Protein ausgewählt der Gruppe der Heparansulfat-Proteoglykane.

[0008] In Ausführungsformen der Erfindung ist der Biomarker ausgewählt aus der Gruppe der transmembranen Heparansulfat-Proteoglykane.

[0009] Transmembrane Heparansulfat Proteoglykane wie z.B. Syndekane sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt. Sie vermitteln unter anderem Adhäsionsprozesse an extrazelluläre Matrix-Proteine und Wachstumsfaktoren. Syndekane regulieren auch die Anlagerung von Zellen an die extrazelluläre Matrix von Endothelzellen und ermöglichen dadurch die Transmigration und Invasion, sowohl normaler als auch transformierter Zellen [1]. Viele extrazelluläre Matrix-Proteine (z.B. Fibronectin, Kollagen, Laminin) enthalten multiple Bindemotive, die auch von Proteoglykanen erkannt werden [2]. Es wird angenommen, dass Syndekane als Ko-Rezeptoren mit Integrinen und extrazellulären Matrixproteinen die Zell-Zell- und Zell-Matrix- Interaktion vermitteln [3, 4]. Die konservierten zytoplasmatischen Domänen der Syndekane enthalten Bindestellen für Proteine, die die Assoziation mit Mikrofilamenten und dem Aktinzytoskelett vermitteln und dadurch die Zellmorphologie regulieren und Überlebenssignale vermittelt [2].

[0010] In Ausführungsformen der Erfindung ist der Biomarker ausgewählt aus der Gruppe der Syndekan-Protein-Familie. Bevorzugt ist der Biomarker ausgewählt aus den Ectodomänen der Syndekan-Familie.

[0011] In Ausführungsformen der Erfindung ist der Biomarker ein Protein mit einer Identität von > 70%, bevorzugt > 80%, besonders bevorzugt > 90% zu der SEQ ID No.1. Die in der SEQ ID No.1 wiedergegebene Sequenz entspricht dabei der von humanem Syndekan-4.

[0012] In Ausführungsformen der Erfindung ist der Biomarker ein Protein mit der Sequenz SEQ ID No.1

[0013] Syndekan-4 wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen synthetisiert. Einige Studien zeigen inzwischen, dass die Expression von Syndekan-4 durch pro-inflammatorische Zytokine angeschaltet wird [5]. Der knockout von Syndekan-4 führt in Mäusen zu einer verzögerten Wundheilung und Frakturheilung [5, 6]. Syndekan-4 spielt auch in der Knie-Osteoarthritis eine wichtige Rolle, da der Ver-

lust oder die Hemmung von Syndekan-4 zu einem Schutz vor osteoarthrotischen Veränderungen des Gelenkknorpels führt [7]. Diese Studien legen nahe, dass Syndekan-4 eng mit Gewebe-Remodellierung insbesondere unter entzündlichen Bedingungen assoziiert ist [1]. Unter entzündlichen Bedingungen kann das membran-gebundenen Syndekan-4 durch sog. Shedding in die lösliche Form überführt werden. Dieser Prozess ist häufig mit Gewebeverletzungen assoziiert und das lösliche Syndekan-4 kann in den Wundflüssigkeiten nachgewiesen werden [8]. Die Menge des löslichen Syndekan-4 hängt von der Menge an Sheddasen im Gewebe ab. Zu den Syndekan-4 Sheddasen zählen insbesondere MMP-3, MMP-9 und TACE [8].

[0014] Der Nachweis von löslichem Syndekan-4 als Serum-Biomarker wurde bereits für akute Pneumonie [9], chronische Herzinsuffizienz [10] und atopischer Dermatitis [11] etabliert. Für die Vorhersage der kardiovaskulären Sterblichkeit in Hämodialyse-Patienten ist ebenfalls der Nachweis von Syndekan-4 im Serum vorgeschlagen worden [12]. Diese Studien zeigen, dass der Nachweis von löslichem Syndekan-4 im Serum zum einen möglich ist und zum anderen krankheitsbedingt verändert sein kann.

[0015] Bevorzugt ist der Biomarker ein Protein mit einer Identität von > 70%, bevorzugt > 80%, besonders bevorzugt > 90% zu der SEQ-ID No.2. Die in der SEQ-ID No.2 wiedergegebene Sequenz entspricht dabei der Ectodomäne von humanem Syndekan-4. Die Ectodomäne wird durch das Shedding freigesetzt und kann als löslicher Biomarker im Blut nachgewiesen werden.

[0016] In Ausführungsformen der Erfindung ist der Biomarker ein Protein mit der Sequenz SEQ-ID No.2.

[0017] Insbesondere die Ectodomäne von Syndekna-4 weist dabei eine Konservierung auf, die einen Einsatz als Biomarker auch in Tieren erlaubt.

[0018] Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung des Biomarkers zur Bestimmung der körperlichen Belastung von Menschen und Tieren. In einer Ausführungsform der Erfindung wird der Biomarker zur Bestimmung der körperlichen Belastung von Menschen durch körperliche Aktivität, insbesondere Sport, verwendet.

[0019] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der körperlichen Belastung durch körperliche Aktivität von Menschen und Tieren.

[0020] Dabei umfasst das Verfahren erfindungsgemäß die Schritte:

- Bereitstellen einer zu untersuchenden Probe eines Menschen oder Tieres,
- Bestimmung der Konzentration des erfindungsgemäßen Biomarkers in der Probe,
- Vergleich der bestimmten Konzentration des Biomarkers mit einem Referenzwert,
- Ermittlung des Belastungszustands des Menschen oder Tieres basierend auf dem Vergleich der in der Probe bestimmten Konzentration des Biomarkers mit dem Referenzwert.

[0021] In Ausführungsformen der Erfindung ist die zu untersuchende Probe eine Blutprobe, bevorzugt eine venöse Blutprobe. In r Ausführungsformen der Erfindung ist die zu untersuchende Probe eine Blutplasmaprobe.

[0022] In Ausführungsformen der Erfindung erfolgt die Bestimmung der Konzentration des erfindungsgemäßen Biomarkers mit einem Verfahren ausgewählt aus Immunassay (ELISA), Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Impedanz, Western Blot und Massenspektroskopie.

[0023] In Ausführungsformen der Erfindung erfolgt die Bestimmung der Konzentration des Biomarkers mittels als Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA).

[0024] In Ausführungsformen der Erfindung wird als Referenzwert die Konzentration des erfindungsgemäßen Biomarkers vor der Belastung bestimmt. Die durch die körperliche Belastung des Menschen oder Tieres bedingte Erhöhung der Konzentration des Biomarkers wird dabei auf den so bestimmten Referenzwert als Basalwert bestimmt.

[0025] In Ausführungsformen der Erfindung ist der Referenzwert 15,1 ±2,6 ng/mL des erfindungsgemäßen Biomarkers.

[0026] Die Bestimmung der Konzentration des erfindungsgemäßen Biomarkers erfolgt ex vivo.

[0027] Gegenstand der Erfindung ist auch ein Kit zur Durchführung eines Verfahrens zu Bestimmung der Belastung durch körperliche Aktivität von Menschen und Tieren. Das Kit umfasst dabei

- ein erstes Reagenz, welches zur Interaktion mit dem erfindungsgemäßen Biomarker ausgebildet ist und
- ein zweites Reagenz, welches als Standard zur Quantifizierung des Biomarkers ausgebildet ist.

[0028] Mittels des zweiten Reagenz kann durch den Standard eine Kalibriergerade erstellt werden, die ei-

ne Quantifizierung des Biomarkers in der Probe erlaubt.

[0029] In Ausführungsformen der Erfindung ist das erste Reagenz ein Antikörper oder -fragment, welches zur Bindung an eine Sequenz mit einer Identität von > 70 %, bevorzugt > 80%, bevorzugt > 90% ausgewählt aus SEQ. ID No. 1 oder 2 ausgebildet ist.

[0030] In Ausführungsformen der Erfindung ist das erste Reagenz ein Antikörper oder -fragment, welches zur Bindung an eine Sequenz ausgewählt aus SEQ. ID No. 1 oder 2 ausgebildet ist. Unter einem Antikörperfragment wird dabei ein Fab-Fragment oder scFv-Fragment verstanden.

[0031] In Ausführungsformen der Erfindung umfasst das Kit weiterhin ein drittes Reagenz, welches zur Interaktion mit dem ersten Reagenz ausgebildet ist. Bevorzugt umfasst das dritte Reagenz ein an das dritte Reagenz gebundene funktionelle Einheit, welche als Enzym oder Farbstoff oder Marker ausgebildet ist. Als Marker kommen dabei beispielsweise radioaktive fluoreszente/ HRP-Marker in Betracht.

[0032] In Ausführungsformen der Erfindung ist das dritte Reagenz ein Antikörper oder -fragment, welches zur Interaktion mit dem ersten Reagenz ausgebildet ist.

[0033] In Ausführungsformen der Erfindung ist das Kit als ELISA-Kit ausgebildet und umfasst einen ersten Antikörper zur Bindung an den Biomarker sowie einen zweiten Antikörper zur Bindung an den ersten Antikörper, wobei der zweite Antikörper weiterhin ein an den zweiten Antikörper gebundenes Enzym als funktionelle Einheit aufweist. Vorteilhaft kann das Kit weiterhin das Substrat für das Enzym enthalten, wobei der Umsatz des Substrats direkt abhängig ist von der Enzymmenge und ein detektierbares Signal ergibt, dass zur Quantifizierung verwendet wird.

[0034] Mittels des erfindungsgemäßen Biomarkers ist es möglich, die körperliche Belastung eines Menschen oder Tieres nach oder während körperlicher Aktivität zu bestimmen. Dabei dient der erfindungsgemäße Biomarker bevorzugt als Marker für Belastung und Überbelastung bei Sportlern. Die bisherige Messung von Laktatkonzentrationen im Blut als belastungsabhängiger Parameter in der Leistungsdiagnostik ist seit den 1980er Jahren fest implementiert haben jedoch verschiedene Nachteile, wie die nicht ausreichende Hyperämisierung des Ohrläppchens für Abnahme kapillarisierten Blutes, wie auch die Anreicherung mit zu viel Venenblut. Die Problematik des schnellen Absinkens des Laktatwertes ist bei dem erfindungsgemäßen Biomarker, insbesondere bei Syndekan-4 weniger ausgeprägt, da die Werte direkt nach dem Sport nicht sofort absinken. Des Weiteren erreicht die Laktatkonzentration bei einer

Dauerbelastung im aeroben Bereich schnell einen „steady state“, so dass unter diesen Bedingungen keine genaue Aussage über die Beanspruchung des Körpers getroffen werden kann. Im Gegensatz dazu bildet der erfindungsgemäße Biomarker die muskuläre Belastung und keine Stoffwechselaktivität ab.

[0035] Neben diesen zusätzlichen Erkenntnissen zur Belastungsabbildung dient die Menge des Biomarkers, bevorzugt Syndekan-4, im Serum insbesondere auch als Marker für die Überbelastung von Sportlern. Bisher gibt es keinen verlässlichen Serummarker zur Diagnose einer Überbelastung eines Sportlers. Häufig wird der Zustand der Überbelastung zu spät oder gar nicht erkannt, so dass es zu Verletzungen und langen Regenerationszeiten kommt. Mittels des erfindungsgemäßen Biomarkers kann bei über die Abnahme der basalen Konzentration des Biomarkers gleichzeitig die Regenerationsfähigkeit des Sportlers quantifiziert werden, um somit einen optimalen Wiedereinstieg ins Training zu gewährleisten.

[0036] Die Bestimmung der Konzentration des erfindungsgemäßen Biomarkers erfolgt ex vivo.

[0037] Weiterhin Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenz, welches zur Interaktion mit dem erfindungsgemäßen Biomarker ausgebildet ist. Bevorzugt bindet das Reagenz an den erfindungsgemäßen Biomarker.

[0038] In Ausführungsformen der Erfindung ist das Reagenz als Antikörper oder -fragment davon ausgebildet ist. Unter einem Antikörperfragment wird dabei ein Fab-Fragment oder scFv-Fragment verstanden.

[0039] In Ausführungsformen der Erfindung ist das Reagenz ein Antikörper oder -fragment ist, welches zur Bindung an eine Sequenz mit einer Identität von > 70 %, bevorzugt > 80%, bevorzugt > 90% ausgewählt aus SEQ. ID No. 1 bis oder 2 ausgebildet ist.

[0040] Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Reagenzes zur Interaktion mit dem erfindungsgemäßen Biomarker sowie die Verwendung des erfindungsgemäßen Reagenzes in dem erfindungsgemäßen Verfahren. Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Reagenzes im erfindungsgemäßen Kit.

[0041] Für die Realisierung der Erfindung ist es auch zweckmäßig, die vorbeschriebenen erfindungsgemäßen Ausgestaltungen, Ausführungsformen und Merkmale der Ansprüche in jeder Anordnung miteinander zu kombinieren.

[0042] Nachfolgend soll die Erfindung anhand einiger Ausführungsbeispiele und zugehöriger Figuren

eingehender erläutert werden. Die Ausführungsbeispiele sollen dabei die Erfindung beschreiben ohne diese zu beschränken.

[0043] Es zeigen die

Fig. 1 eine Messung des löslichen Syndekan-4 in drei Hobby-Ausdauersportlern bei einem Stufen-Endbelastungstest auf dem Fahrradergometer, in

Fig. 2 eine Messung belastungsassoziierter Blutparameter in drei Hobby-Ausdauersportlern bei einem Stufen-Endbelastungstest auf dem Fahrradergometer, in

Fig. 3 eine Messung des löslichen Syndekan-4 in sechs Hobby-Ausdauersportlern nach einem intensiven Intervalltraining und in

Fig. 4 eine Messung des löslichen Syndekan-4 in einem Belastungstest bei einem Hobby-Ausdauersportler vor Beginn der Triathlon-Saison und nach einer Extrembelastung (Ironman).

Ausführungsbeispiele

[0044] In einem ersten Ausführungsbeispiel zeigt die **Fig. 1** die belastungsabhängige Steigerung der Konzentration des erfindungsgemäßen Biomarkers, beispielsweise von Syndekan-4 Spiegel im Serum von Sportlern (3 männliche Probanden). Die Probanden wurden einem Stufen-Endbelastungstest auf dem Fahrradergometer unterzogen. Die jeweiligen Werte wurden zu jeder Wattstufe entnommen. Der letzte Wert (post-Sport) wurde nach 10-minütiger Erholungsphase genommen. Das lösliche Syndekan-4 wurde aus 5 ml Serumproben mittels ELISA gemessen. Die Steigerung des löslichen Syndekan-4 ist abhängig von der Belastungsstufe und steigt bis zu ca. 30% des basalen Levels. Als Referenzwert wird dabei die Konzentration des Biomarkers vor der Belastung bestimmt.

[0045] In einem weiteren Ausführungsbeispiel wurden, wie in **Fig. 2** dargestellt, zum Vergleich zu Messwerten mit löslichem Syndekan-4 in der Literatur etablierte Belastungsmarker wie Kreatinin, Myoglobin und CK sowie auch Laktat in den Proben bestimmt. Die Messung belastungsassoziierter Blutparameter in drei Hobby-Ausdauersportlern erfolgte bei einem Stufen-Endbelastungstest auf dem Fahrradergometer. Die jeweiligen Werte wurden zu jeder Wattstufe entnommen. Der letzte Wert (post-Sport) wurde nach 10-minütiger Erholungsphase genommen. Kreatinin, Myoglobin und CK wurden durch das reguläre Eingangslabor bestimmt. Laktat wurde mittels Blutkapillaren aus dem Ohr gemessen. Es zeigte sich lediglich für Laktat eine statistisch signifikante, belastungsabhängige, Steigerung der Serumlevel, wohingegen die anderen Messparameter (Kreatinin, Myoglobin und

CK) keine signifikante Korrelation mit der Belastungsintensität aufwiesen.

[0046] In einem weiteren Ausführungsbeispiel wurde der zeitliche Verlauf der Menge des Biomarkers (Syndekan-4) im Serum untersucht. Zur Untersuchung der zeitabhängigen Serumspiegel von Syndekan-4 wurden sechs Hobby-Ausdauersportler (3 Männer und 3 Frauen) vor der Trainingsbelastung Blut entnommen und dann direkt nach einem intensiven Intervalltraining, sowie ein und zwei Stunden nach dem Training. Die jeweiligen Proben wurden mittels Einzelpunktion der Vene in Serumröhrchen entnommen. Es zeigt sich, wie in **Fig. 3** dargestellt, ein Peak der Menge an löslichem Syndekan-4 direkt nach der Belastung. Der mittlere Anstieg von löslichem Syndkan-4 in allen Probanden beträgt 30 % zum basalen Level.

[0047] In einem weiteren Ausführungsbeispiel wurde untersucht, ob der Syndekan-4 als Überbelastungsmarker dienen kann. Dazu wurden die Syndekan-4 Serumlevel bei einem Probanden (Triathlet) zu Beginn der Sportsaison mittels eines Stufen-Belastungstests gemessen und den typischen Anstieg von Syndekan-4 nach der Belastung beobachtet. Der gleiche Proband hat 2 Wochen nach einer Extrembelastung (Ironman) die Serumproben vor und nach einer sportlichen Belastung abgeben. Hier konnte, wie in **Fig. 4** dargestellt, kein Anstieg der löslichen Syndekan-4 Konzentration im Vergleich zum basalen Level festgestellt werden. Dies gibt einen ersten Hinweis darauf, dass lösliches Syndekan-4 somit tatsächlich vorhersagen, wie belastbar ein Sportler zu dem entsprechenden Zeitpunkt ist und ob eventuell eine Überbelastungssymptomatik besteht.

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO ST.25. Dieses kann sowohl in DEPATISnet als auch im DPMAregister aufgerufen werden.

Patentansprüche

1. Biomarker zur Bestimmung der Belastung von Menschen oder Tieren durch körperliche Aktivität, wobei der Biomarker ein Protein ein Protein mit einer Identität von > 70%, bevorzugt > 80%, besonders bevorzugt > 90% zu der SEQ ID No.1 oder SEQ ID No. 2 ist.
2. Biomarker nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Biomarker ein Protein mit der Sequenz SEQ ID No.1 oder 2.
3. Verfahren zur Bestimmung der körperlichen Belastung von Menschen oder Tieren durch körperliche Aktivität umfassend die Schritte:
 - Bereitstellen einer zu untersuchenden Probe eines Menschen oder Tieres,

- Bestimmung der Konzentration des Biomarkers nach einem der Ansprüche 1 oder 2 in der Probe,
- Vergleich der bestimmten Konzentration des Biomarkers mit einem Referenzwert,
- Ermittlung des Belastungszustands des Menschen basierend auf dem Vergleich der in der Probe bestimmten Konzentration des Biomarkers mit dem Referenzwert.

4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Bestimmung der Konzentration mit einem Verfahren ausgewählt aus Immunassay, Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Impedanz, erfolgt.

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Referenzwert die Konzentration des erfindungsgemäßen Biomarkers vor der Belastung bestimmt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Referenzwert $15,1 \pm 2,6$ ng/mL des Biomarkers nach Anspruch 1 oder 2 ist.

7. Kit zur Bestimmung zur Durchführung eines Verfahrens zur Bestimmung der Belastung durch körperliche Aktivität von Menschen nach einem der Ansprüche 4 oder 5 umfassend

- ein erstes Reagenz, welches zur Interaktion mit dem Biomarker ausgebildet ist und
- ein zweites Reagenz, welches als Standard zur Quantifizierung des Biomarkers ausgebildet ist.

8. Kit nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass das erste Reagenz ein Antikörper oder -fragment ist, welches zur Bindung an eine Sequenz mit einer Identität von $> 70\%$, bevorzugt $> 80\%$, bevorzugt $> 90\%$ ausgewählt aus SEQ. ID No. 1 bis oder 2 ausgebildet ist.

9. Reagenz zur Interaktion mit dem Biomarker nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei das Reagenz als Antikörper oder -fragment davon ausgebildet ist.

10. Reagenz nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Reagenz ein Antikörper oder -fragment ist, welches zur Bindung an eine Sequenz mit einer Identität von $> 70\%$, bevorzugt $> 80\%$, bevorzugt $> 90\%$ ausgewählt aus SEQ. ID No. 1 bis oder 2 ausgebildet ist.

11. Verwendung eines Reagenz nach Anspruch 9 oder 10 zur Interaktion mit einem Biomarker nach einem der Ansprüche 1 oder 2 oder in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 6 oder in einem Kit nach einem der Ansprüche 7 oder 8.

12. Verwendung eines Biomarkers nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung der körperlichen Belastung von Menschen oder Tieren durch körperliche Aktivität.

Es folgen 2 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

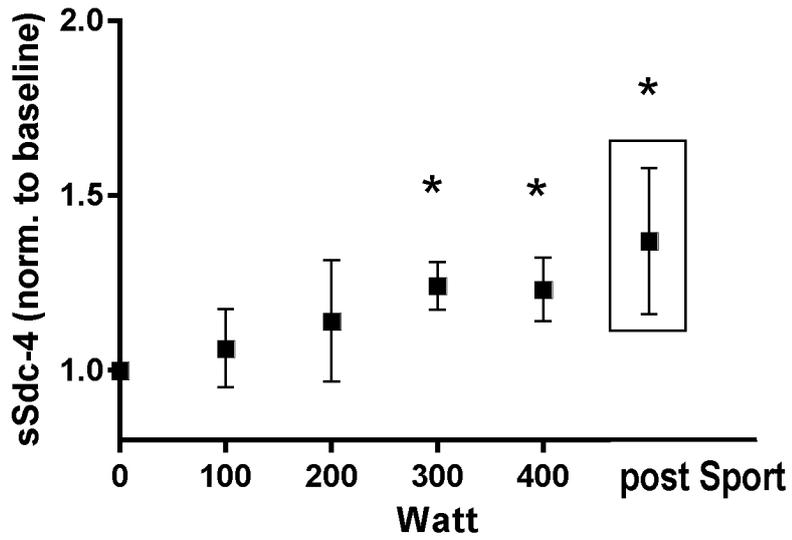


Fig. 1

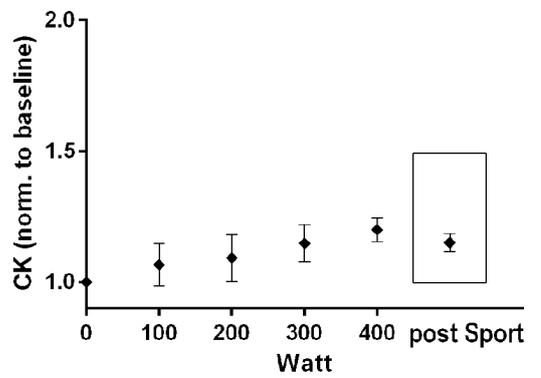
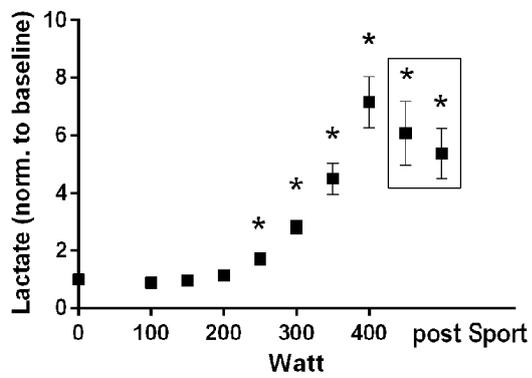
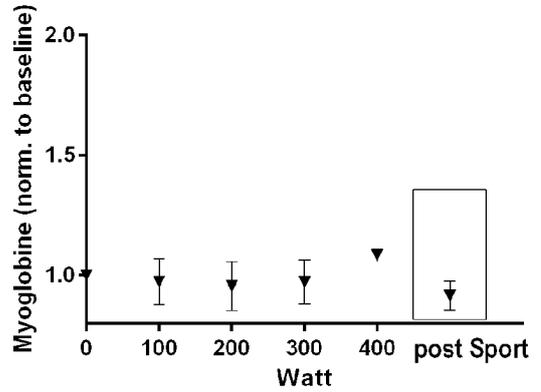
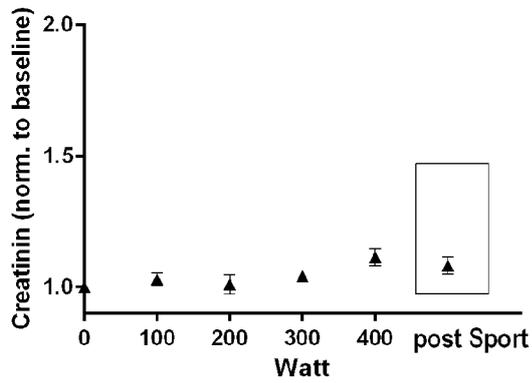


Fig. 2

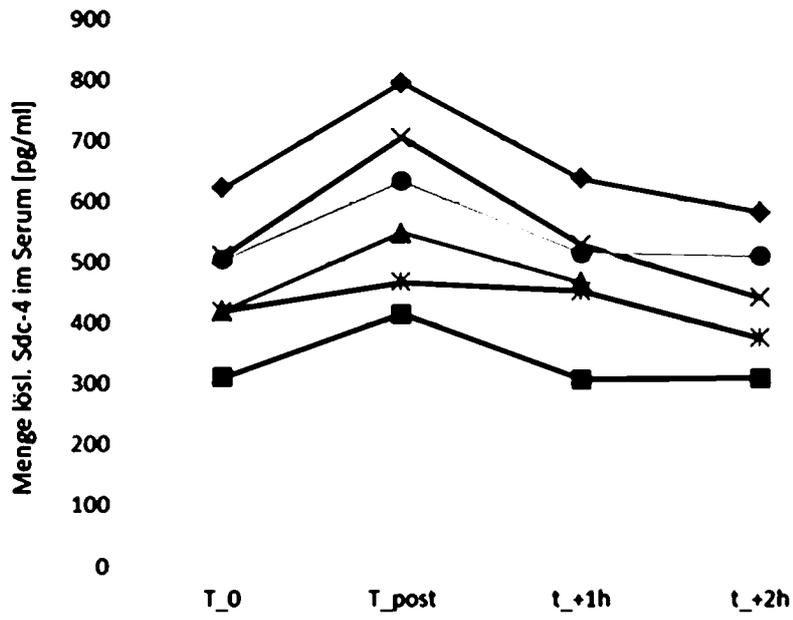


Fig. 3

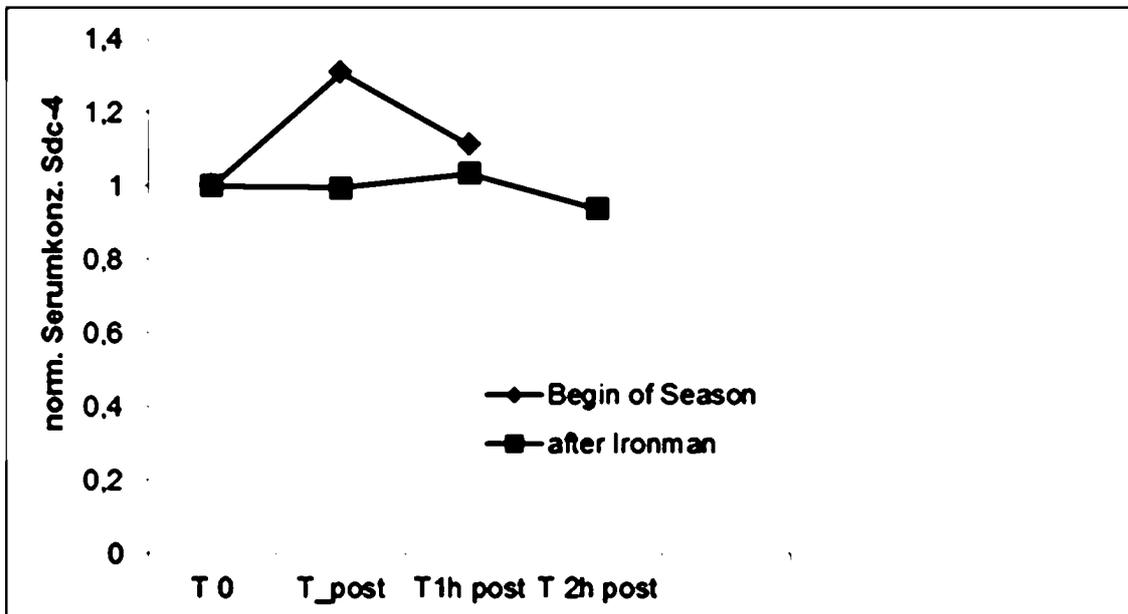


Fig. 4