

(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
21. März 2019 (21.03.2019)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2019/053190 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 33/68 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2018/074881

(22) Internationales Anmeldedatum:
14. September 2018 (14.09.2018)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2017 216 292.9
14. September 2017 (14.09.2017) DE

(71) Anmelder: OTTO-VON-GUERICKE-UNIVERSITÄT
MAGDEBURG [DE/DE]; Leipziger Str. 44, 39120 Magdeburg (DE).

(72) Erfinder: **BERTRAND, Jessica**; Klausenerstraße 7, 39112 Magdeburg (DE). **LOHMANN, Christoph**; Kleiststraße 12, 39110 Magdeburg (DE). **RUDOLF, Margit**; Osterweddinger Straße 8, 39116 Magdeburg (DE). **PINNO, Karsten**; Am Kreuzberg 12, 39175 Biederitz (DE).

(74) Anwalt: **KAILUWEIT UND UHLEMANN PATENTANWÄLTE PARTNERSCHAFT MBB**; Bamberger Straße 49, 01187 Dresden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

(54) Title: BIOMARKERS FOR DETERMINING THE PHYSICAL EXERTION OF HUMANS AND ANIMALS, AND METHOD FOR DETERMINING THE PHYSICAL EXERTION AND A KIT FOR CARRYING OUT THE METHOD

(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

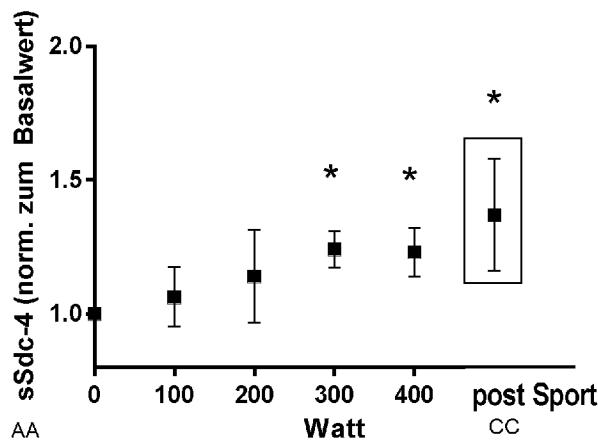


Abbildung 1
BB

AA sSdc-4 (normalized to the basal value)

BB Figure 1

CC Post sport

(57) Abstract: The invention relates to a biomarker for determining the physical exertion of humans and animals in sport and a method for determining the physical exertion in sport, and a kit for carrying out the method. According to the invention, use is made of a biomarker of the group of heparan sulfate proteoglycans, in particular of the family of the syndecan family, the concentration of which in the blood allows conclusions to be drawn about the physical exertion of the human or animal after physical activity. The method is also suitable for determining the training state of athletes.

(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



WO 2019/053190 A1

SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

Biomarker zur Bestimmung der körperlichen Belastung von Menschen und Tieren und Verfahren zur Bestimmung der körperlichen Belastung sowie ein Kit zur Durchführung des Verfahrens

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.

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.

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.

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.

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

Ein erster Aspekt der Erfindung betrifft einen Biomarker zur Verwendung in einem Verfahren 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 untersuchenden 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. Der Biomarker ist dabei bevorzugt ein lösliches Protein oder Peptid.

Erfindungsgemäß ist der Biomarker ein Protein oder Peptid ausgewählt der Gruppe der Heparansulfat-Proteoglykane.

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

Transmembrane Heparansulfat Proteoglykane wie z.B. Syndekane sind an einer Vielzahl von zellularen 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].

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.

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.

In Ausführungsformen der Erfindung ist der Biomarker ein Protein mit der Sequenz SEQ ID No.1. Syndekan-4 wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen synthetisiert wird. 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-Osteoarthrose eine

wichtige Rolle, da der Verlust 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 Gewebeerletzungen 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].

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.

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.

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

Insbesondere die Ektodomäne von Syndekan-4 weist dabei eine Konservierung auf, die einen Einsatz als Biomarker auch in Tieren erlaubt.

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.

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

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.

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.

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.

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

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.

In Ausführungsformen der Erfindung ist der Referenzwert $15,1 \pm 2,6$ ng/mL des erfindungsgemäßen Biomarkers.

Die Bestimmung der Konzentration des erfindungsgemäßen Biomarkers erfolgt ex vivo.

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.

Mittels des zweiten Reagenz kann durch den Standard eine Kalibriergerade erstellt werden, die eine Quantifizierung des Biomarkers in der Probe erlaubt.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

Die Bestimmung der Konzentration des erfindungsgemäßen Biomarkers erfolgt ex vivo.

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

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.

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.

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.

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

Nachfolgend soll die Erfindung anhand einiger Ausführungsbeispiele und zugehöriger Figuren eingehender erläutert werden. Die Ausführungsbeispiele sollen dabei die Erfindung beschreiben ohne diese zu beschränken.

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 Gegenüberstellung der Konzentration des Biomarkers im Serum bei Sportlern und Nichtsportlern

Fig.3 eine Messung belastungsassoziierter Blutparameter in drei Hobby-Ausdauersportlern bei einem Stufen-Endbelastungstest auf dem Fahrradergometer, in

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

Fig. 5 eine Messung des löslichen Syndekan-4 in einem Belastungstest bei einem Hobby-Ausdauersportler vor Beginn der Triathlon-Saison und nach einer Extrembelastung (Ironman), in

Fig. 6 eine Darstellung ein Vergleich der Menge des Biomarkers im Serum nach Belastung über einen Zeitraum von zwei Stunden bei Sportlern und Nichtsportlern und in

Fig. 7 eine Darstellung der Messung von Serumleveln des Biomarkers in verschiedenen Tieren

Ausführungsbeispiele

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.

In einem weiteren Ausführungsbeispiel ist in Fig. 2 die Gegenüberstellung der Konzentration des Biomarkers im Serum bei Sportlern (34 ± 12 ng/ml) und Nichtsportlern (19 ± 5 ng/ml) dargestellt. Dabei zeigt sich bereits eine signifikante Erhöhung des Biomarkers bei Sportlern im Vergleich zu Nichtsportlern. Hierbei wurden für die Untersuchung bei Sportlern Proben von Triathleten und

einem Handballteam über die Saison erhoben. Die jeweiligen Personengruppen waren dabei gemischt, um geschlechtsabhängige Effekte auszuschließen.

In einem weiteren Ausführungsbeispiel wurden, wie in Fig. 3 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.

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. 4 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.

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 abgegeben. Hier konnte, wie in Fig. 5 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 kann, wie belastbar ein Sportler zu dem entsprechenden Zeitpunkt ist und ob eventuell eine Überbelastungssymptomatik besteht.

In einem weiteren Ausführungsbeispiel ist in Fig. 6 ein Vergleich der Serumwerte des Biomarkers von Sportlern und Nichtsportlern dargestellt. Dabei absolvierten beide Gruppen einen Endbelastungs-Stufen-Ergometertest. Die Konzentration des Biomarkers im Serum wurde vor

der Belastung und unmittelbar danach sowie im zeitlichen Abstand von einer und zwei Stunden nach Belastung bestimmt. Zu sehen ist hierbei ein Anstieg des Levels des Biomarkers bei Sportlern um etwa 30% im Vergleich von nur 10% bei Nichtsportlern. Die Gruppen waren bei der Bestimmung gemischt. Es konnte kein geschlechtsabhängiger Einfluss auf die Konzentration des Biomarkers im Serum festgestellt werden.

Schließlich ist in Fig. 7 die Quantifizierung des Biomarkers in verschiedenen Tieren gezeigt. Dabei wurden zunächst die Basislevel des Biomarkers in den Tieren bestimmt.

Zitierte Nichtpatentliteratur

1. **Pap, T.** and J. Bertrand, Syndecans in cartilage breakdown and synovial inflammation. *Nat Rev Rheumatol*, 2013. 9(1): p. 43-55.
2. **Beauvais, D.M.**, B.J. Burbach, and A.C. Rapraeger, The syndecan-1 ectodomain regulates alphavbeta3 integrin activity in human mammary carcinoma cells. *J Cell Biol*, 2004. 167(1): p. 171-81.
3. **Woods, A.** and J.R. Couchman, Syndecan-4 and focal adhesion function. *Curr Opin Cell Biol*, 2001. 13(5): p. 578-83.
4. **Bass, M.D.**, M.R. Morgan, and M.J. Humphries, Integrins and syndecan-4 make distinct, but critical, contributions to adhesion contact formation. *Soft Matter*, 2007. 3(3): p. 372-376.
5. **Bertrand, J.**, et al., Syndecan 4 supports bone fracture repair, but not fetal skeletal development, in mice. *Arthritis Rheum*, 2013. 65(3): p. 743-52.
6. **Echtermeyer, F.**, et al., Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J Clin Invest*, 2001. 107(2): p. R9-R14.
7. **Echtermeyer, F.**, et al., Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nat Med*, 2009. 15(9): p. 1072-6.
8. **Subramanian, S.V.**, M.L. Fitzgerald, and M. Bernfield, Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J Biol Chem*, 1997. 272(23): p. 14713-20.
9. **Nikaido, T.**, et al., Serum Syndecan-4 as a Possible Biomarker in Patients With Acute Pneumonia. *J Infect Dis*, 2015. 212(9): p. 1500-8.
10. **Takahashi, R.**, et al., Serum syndecan-4 is a novel biomarker for patients with chronic heart failure. *J Cardiol*, 2011. 57(3): p. 325-32.
11. **Nakao, M.**, et al., Increased syndecan-4 expression in sera and skin of patients with atopic

dermatitis. *Arch Dermatol Res*, 2016. 308(9): p. 655-660.

12. **Jaroszynski, A.J.**, et al., Syndecan-4 Is an Independent Predictor of All-Cause as Well as Cardiovascular Mortality in Hemodialysis Patients. *PLoS One*, 2016. 11(9): p. e0163532.

13. **Ellefsen, S.**, et al., Blood flow-restricted strength training displays high functional and biological efficacy in women: a within-subject comparison with high-load strength training. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2015. 309(7): p. R767-79.

14. **Eftestol, E.**, et al., Increased hypertrophic response with increased mechanical load in skeletal muscles receiving identical activity patterns. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016. 311(4): p. C616-C629.

15. **Pilat, C.**, et al., Exploring effects of a natural combination medicine on exercise-induced inflammatory immune response: A double-blind RCT. *Scand J Med Sci Sports*, 2015. 25(4): p. 534-42.

Patentansprüche

1. Biomarker zur Verwendung in einem Verfahren 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 4, 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 zu 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, wobei

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 oder 2 ausgebildet ist.

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

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.

9. Verwendung eines Reagenz nach Anspruch 8 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 Anspruch 8.

10. Verwendung eines Biomarkers nach Anspruch 1 oder 2 oder eines Verfahren nach Anspruch 3 bis 6 zur Bestimmung der körperlichen Belastung von Menschen oder Tieren durch körperliche Aktivität.

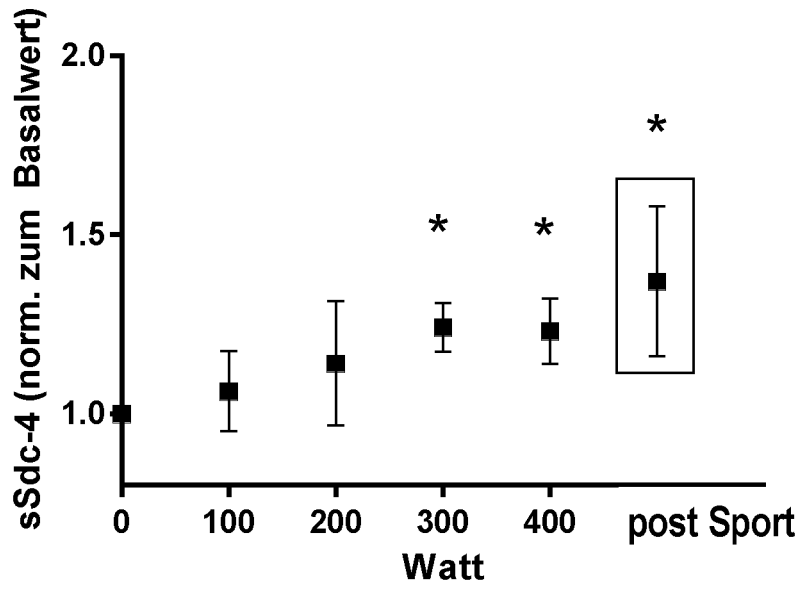


Abbildung 1

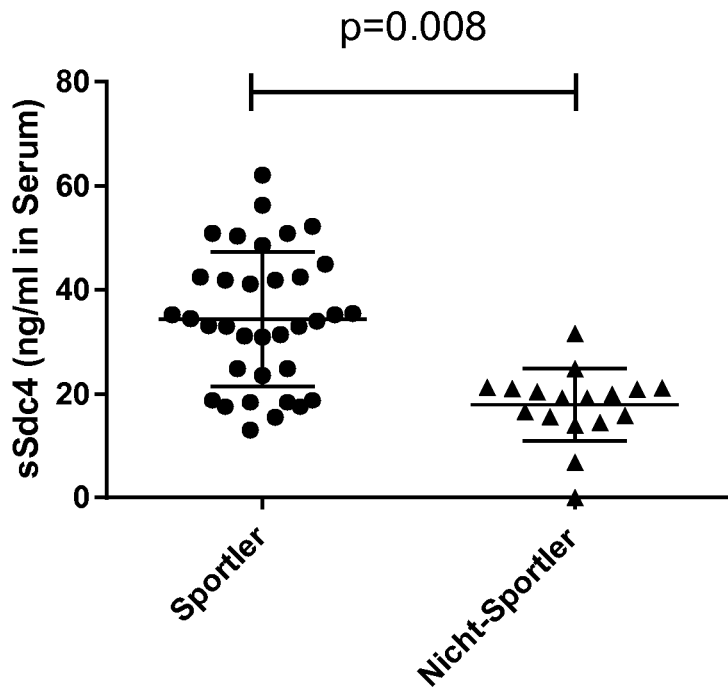


Abbildung 2

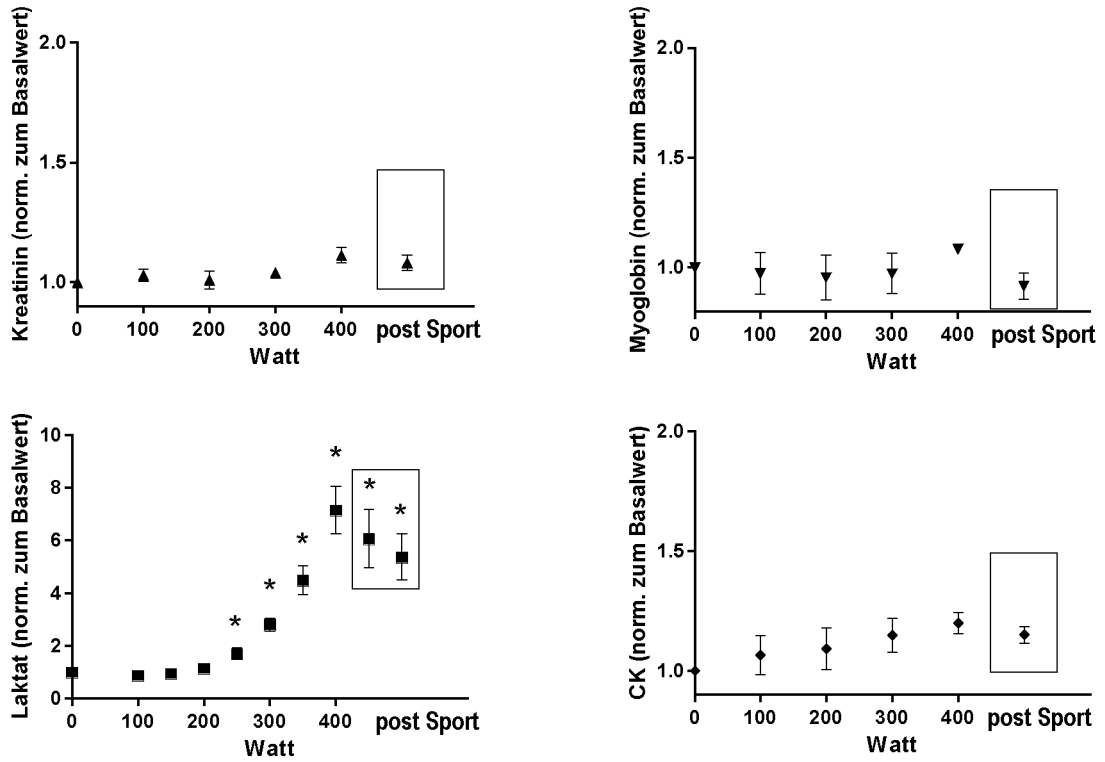


Abbildung 3

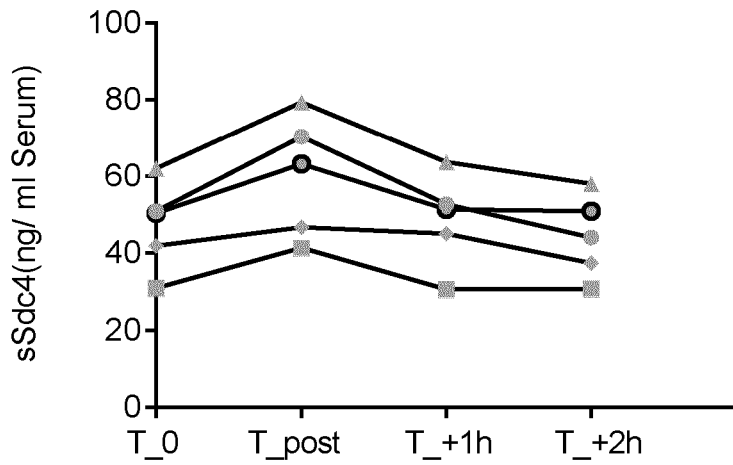


Abbildung 4

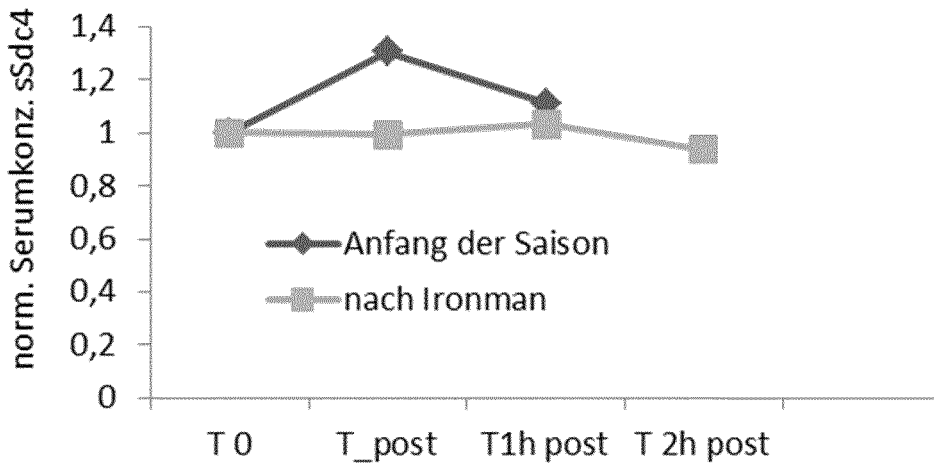


Abbildung 5

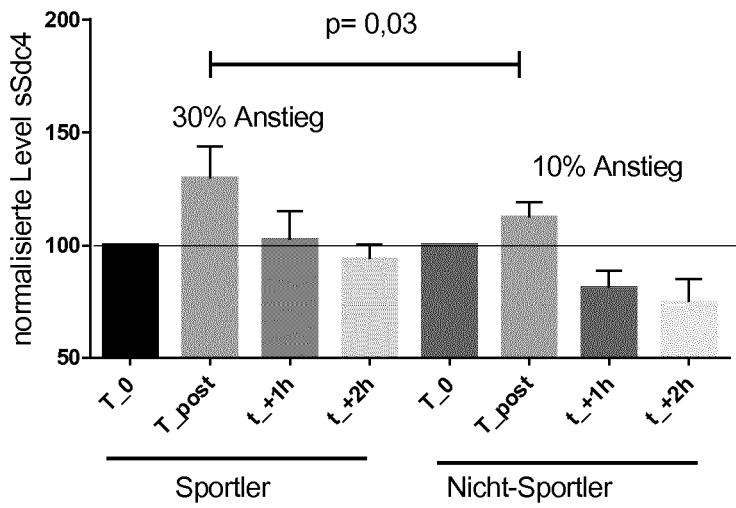


Abbildung 6

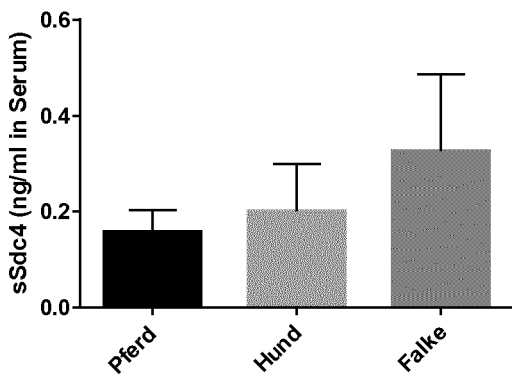


Abbildung 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2018/074881

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/68 (2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
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 practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STIAN ELLEFSEN ET AL. "Blood flow-restricted strength training displays high functional and biological efficacy in women: a within-subject comparison with high-load strength training" <i>AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: REGULATORY, INTEGRATIVE AND COMPARATIVE PHYSIOLOGY.</i> , US, Vol. 309, No. 7, 01 October 2015 (2015-10-01), pages R767-R779 DOI: 10.1152/ajpregu.00497.2014 ISSN: 0363-6119, XP055516313 abstract, table 2	1-6, 9, 10
X	MARIT HJORTH ET AL. "The effect of acute and long-term physical activity on extracellular matrix and serglycin in human skeletal muscle" <i>PHYSIOLOGICAL REPORTS</i> , Vol. 3, No. 8, 01 August 2015 (2015-08-01), page e12473 DOI: 10.14814/phy2.12473 ISSN: 2051-817X, XP055516307 abstract; page e12473, column 2	1-6, 9, 10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 November 2018		Date of mailing of the international search report 18 January 2019
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Behrens, Ralf Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Milène Catoire ET AL. "Identification of human exercise-induced myokines using secretome analysis" <i>Physiological Genomics</i> , 01 April 2014 (2014-04-01), pages 256-267, Retrieved from the Internet: https://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/physiolgenomics.00174.2013 DOI: 10.1152/physiolgenomics.00174.2013 XP055516308 abstract, figure 2	1-6,9,10
X	FRANK ECHTERMEYER ET AL. "Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis" <i>NATURE MEDICINE, NATURE PUB. CO, NEW YORK</i> , Vol. 15, No. 9, 01 September 2009 (2009-09-01), pages 1072-1077, [retrieved on 2009-08-16] DOI: 10.1038/NM.1998 ISSN: 1078-8956, XP007916418 abstract, figure 1, page 1073, column 1	1-6, 9, 10
X	US 2013324698 A1 (ECHTERMEYER FRANK [DE] ET AL) 05 December 2013 (2013-12-05) examples	1-6, 9, 10
A	CARINA SEIDEL ET AL. "A sandwich ELISA for the estimation of human syndecan-2 and syndecan-4 in biological samples" <i>JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS, US</i> , Vol. 34, No. 4, 01 March 2004 (2004-03-01), pages 797-801 DOI: 10.1016/S0731-7085(03)00569-7 ISSN: 0731-7085, XP055516617	1-6, 9, 10
A	Vincent Rioux ET AL. "Sandwich immunoassay for the measurement of murine syndecan-4" <i>Journal of Lipid Research</i> , United States, 01 January 2002 (2002-01-01), page 167, Retrieved from the Internet: http://www.jlr.org/content/43/1/167.full.pdf XP055516615	1-6, 9, 10

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

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

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

1. Claims: 1-6, 10 (in full); 9 (in part)

A biomarker according to claim 1.

1.1. Claims: 3-6, 10 (in full); 9 (in part)

A method according to claim 3.

2. Claims: 7 (in full); 9 (in part)

A kit according to claim 7.

3. Claim: 8

A reagent according to claim 8.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **1-6, 10 (in full); 9 (in part)**

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2018/074881

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2013324698	A1	05 December 2013	EP	2420250	A1	22 February 2012
				EP	2603236	A1	19 June 2013
				US	2013324698	A1	05 December 2013
				WO	2012020072	A1	16 February 2012
.....							

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G01N33/68 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G01N		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	STIAN ELLEFSEN ET AL: "Blood flow-restricted strength training displays high functional and biological efficacy in women: a within-subject comparison with high-load strength training", AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: REGULATORY, INTEGRATIVE AND COMPARATIVE PHYSIOLOGY., Bd. 309, Nr. 7, 1. Oktober 2015 (2015-10-01), Seiten R767-R779, XP055516313, US ISSN: 0363-6119, DOI: 10.1152/ajpregu.00497.2014 Abstrakt, Tabelle 2 ----- -/--	1-6,9,10
<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 besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
8. November 2018	18/01/2019	
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Behrens, Ralf	

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MARIT HJORTH ET AL: "The effect of acute and long-term physical activity on extracellular matrix and serglycin in human skeletal muscle", PHYSIOLOGICAL REPORTS, Bd. 3, Nr. 8, 1. August 2015 (2015-08-01), Seite e12473, XP055516307, ISSN: 2051-817X, DOI: 10.14814/phy2.12473 Abstrakt; S.e12473 Sp.2 -----	1-6,9,10
X	Milène Catoire ET AL: "Identification of human exercise-induced myokines using secretome analysis", Physiological Genomics, 1. April 2014 (2014-04-01), Seiten 256-267, XP055516308, DOI: 10.1152/physiolgenomics.00174.2013 Gefunden im Internet: URL:https://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/physiolgenomics.00174.2013 Abstrakt, Abbildung 2 -----	1-6,9,10
X	FRANK ECHTERMEYER ET AL: "Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis", NATURE MEDICINE, NATURE PUB. CO, NEW YORK, Bd. 15, Nr. 9, 1. September 2009 (2009-09-01), Seiten 1072-1077, XP007916418, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/NM.1998 [gefunden am 2009-08-16] Abstrakt, Abbildung 1, S.1073 Sp.1 -----	1-6,9,10
X	US 2013/324698 A1 (ECHTERMEYER FRANK [DE] ET AL) 5. Dezember 2013 (2013-12-05) Beispiele -----	1-6,9,10
A	CARINA SEIDEL ET AL: "A sandwich ELISA for the estimation of human syndecan-2 and syndecan-4 in biological samples", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS, Bd. 34, Nr. 4, 1. März 2004 (2004-03-01), Seiten 797-801, XP055516617, US ISSN: 0731-7085, DOI: 10.1016/S0731-7085(03)00569-7 -----	1-6,9,10
	-/--	

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>Vincent Rioux ET AL: "Sandwich immunoassay for the measurement of murine syndecan-4", Journal of Lipid Research, 1. Januar 2002 (2002-01-01), Seite 167, XP055516615, United States Gefunden im Internet: URL:http://www.jlr.org/content/43/1/167.full.pdf -----</p>	1-6,9,10

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

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

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

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

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

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

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

siehe Zusatzblatt

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

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

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

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Dieser internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfasst:
1-6, 10(vollständig); 9(teilweise)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

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

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

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

1. Ansprüche: 1-6, 10(vollständig); 9(teilweise)

Biomarker nach Anspruch 1.

1.1. Ansprüche: 3-6, 10(vollständig); 9(teilweise)

Verfahren nach Anspruch 3.

2. Ansprüche: 7(vollständig); 9(teilweise)

Kit nach Anspruch 7.

3. Anspruch: 8

Reagenz nach Anspruch 8.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2018/074881

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2013324698	A1	EP 2420250 A1	22-02-2012
		EP 2603236 A1	19-06-2013
		US 2013324698 A1	05-12-2013
		WO 2012020072 A1	16-02-2012
