

(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
29. Oktober 2009 (29.10.2009)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/130330 A1

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

HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NL, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2009/055059

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. April 2009 (27.04.2009)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (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, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

Veröffentlicht:

(30) Angaben zur Priorität:
08155176.4 25. April 2008 (25.04.2008) EP

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

(71) Anmelder und
(72) Erfinder: RUDOLPH, Lenhard [DE/DE]; Albert-Einstein-Allee 11, 89081 Ulm (DE).

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)

(74) Anwälte: SCHREIBER, Christoph et al.; Postfach 10
22 41, 50462 Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,

(54) Title: MARKER FOR DETERMINING BIOLOGICAL AGEING

(54) Bezeichnung: MARKER ZUR BESTIMMUNG DER BIOLOGISCHEN ALTERUNG

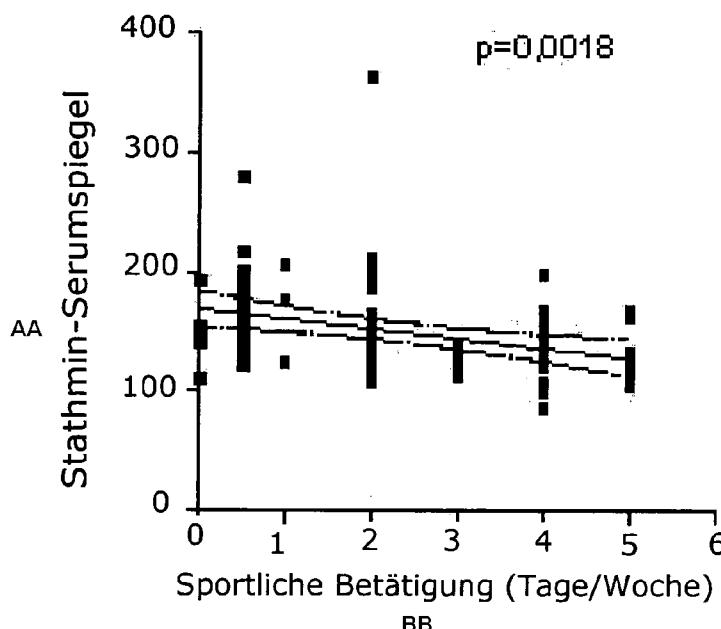


Fig.2A

AA...Stathmin serum level
BB...sport activity (days/week)

(57) Abstract: The invention relates to a method for determining the existence and extent of DNA damage and telomere dysfunction in humans and animals, said method comprising the following steps: the quantity or activity of at least one protein marker in a blood or serum sample is determined, the protein being selected from the group consisting of EF1 α , chitobiosidases, stathmin and CRAMP.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Bestimmung des Vorliegens und des Ausmaß von DNA-Schädigung und Telomerdysfunktion in Mensch oder Tier umfassend folgende Schritte: Bestimmung der Menge oder der Aktivität mindestens eines Proteinmarkers in einer Blut- oder Serumprobe, wobei das Protein ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus EF1 α , Chitobiosidasen, Stathmin und CRAMP.

MARKER ZUR BESTIMMUNG DER BIOLOGISCHEN ALTERUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft Marker, die zur Bestimmung von biologischer Alterung, regenerativer Kapazität und Prognose bei altersassoziierten und chronischen Erkrankungen genutzt werden können, insbesondere Marker, die aus Blut oder Serum bestimmt werden können.

Die Anzahl an alten und chronisch kranken Menschen steigt in den meisten Ländern der Welt (1). Die Bestimmung der biologischen Alterung, der regenerativen Kapazität oder der Prognose bei chronischen und altersassoziierten Erkrankungen stellt ein grundlegendes medizinisches Problem dar. Biomarker, die für solche Fragestellungen genutzt werden können, sind derzeit nicht verfügbar. Die Identifizierung leicht bestimmbarer Biomarker, welche die biologische Alterung, die Regenerationskapazität und das Krankheitsrisiko im Alter anzeigen, könnte zur Verbesserung und Individualisierung von Therapien (Therapiebeginn, Therapieauswahl, etc.) im Alter und bei chronischen Erkrankungen genutzt werden. Darüber hinaus können solche Marker genutzt werden, um Medikamente, Substanzen, Nahrungsprodukte/Zusätze und Verhaltensmaßnahmen zu entwickeln, welche die biologische Alterung aufhalten können.

Bei vielen altersassoziierten und chronischen Erkrankungen ist eine Früherkennung von klinischer Bedeutung. Frühe Erkennung und Prognoseabschätzung ist klinisch notwendig, um eine Therapie einzuleiten, die genau an die spezielle Erkrankung und den individuellen Verlauf angepasst ist. Hierdurch kann das Risiko verringert werden, dass die Patienten weitere Folgeerkrankungen oder Komplikationen entwickeln. Darüber hinaus stellen invasive Therapien beim alten Menschen häufig auch ein Risiko dar. Die Abschätzung des Risikos therapeutischer Nebenwirkungen oder Komplikationen könnte zu einer besseren Therapieauswahl führen. Dies erscheint insbesondere bei Therapien

- 2 -

indiziert, die eine regenerative Reserve des Patienten erfordern, wie zum Beispiel Operationen, Chemotherapie oder Radiotherapie.

Einer der wenigen biologischen Marker, der mit Alterung, alternsassoziierten Erkrankungen und chronischen Erkrankungen assoziiert ist, ist die Verkürzung der Telomere. Die Telomere bilden die Endstücke der Chromosomen (2). Eine Verkürzung der Telomere tritt in menschlichen Zellen mit jeder Zellteilung auf (3). Hierdurch wird die Proliferationskapazität menschlicher Zellen auf 50-70 Teilungen begrenzt (3). Im Menschen tritt eine Verkürzung der Telomere im Rahmen der Alterung in fast allen Geweben auf (4). Die Verkürzung der Telomere korreliert mit dem Überleben von 60-75 jährigen Menschen (5). Eine akzelerierte Verkürzung der Telomere wurde mit alternsassoziierten Erkrankungen wie Alzheimer (6), Diabetes Mellitus (7), kardiovaskulären Erkrankungen (8) und Tumorentwicklung (9) assoziiert. Darüber hinaus korreliert die Verkürzung der Telomere mit Krankheits-Progression und Organversagen bei chronischen Erkrankungen wie Hepatitis (10) und myelodysplastischen Syndromen (11).

Die Bestimmung der Telomerlänge hat sich in der Klinik bislang nicht durchsetzen können, da hierfür technisch aufwendige Verfahren wie Southern Blot, quantitative Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung oder quantitative PCR eingesetzt werden müssen. Darüber hinaus ist die Probengewinnung oft schwierig. So korreliert die Telomerverkürzung im Lebergewebe mit dem Voranschreiten von chronischen Lebererkrankungen zur Leberzirrhose (10). Es müssten deswegen Leberbiopsien durchgeführt werden, um die Prognose und den Krankheitsverlauf abschätzen zu können.

Ein weiteres Problem der Telomerlängenbestimmung ist, dass die Telomerlänge *per se* nur eine begrenzte Aussagekraft über die Zellfunktion und die regenerativen Kapazität hat. Tierversuche haben gezeigt, dass nicht die mittlere Telomerlänge entscheidend ist, sondern die Anzahl der kritisch kurzen, dysfunktionellen Telomere (12). So kommt es im Mausmodell zu einer vorzeitigen

Alterung und einer Verminderung des Organerhalts, wenn die Zahl der dysfunktionellen Telomere erhöht ist, obwohl eventuell die mittlere Telomerlänge noch relativ lang ist (12). Diese Ergebnisse sind auch für die Proliferationsfähigkeit menschlicher Zellen von Bedeutung. So kommt es zur Induktion von Seneszenz und damit zum irreversiblen Proliferationsverlust der Zellen, wenn die Anzahl von dysfunktionellen Telomeren pro Zelle ein gewisses Maß überschreitet (13).

Zusammenfassend erscheint Telomerdysfunktion ein Hinweis auf Alterung, alternsassoziierte Erkrankungen, sowie für chronische Erkrankungen darzustellen. Allerdings konnte sich die Bestimmung der Telomerdysfunktion als klinischer Marker nicht durchsetzen, da die Telomerdysfunktion methodisch schwer zu bestimmen ist und Biopsien aus den betroffenen Organen häufig nicht verfügbar sind.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es ein Verfahren bereit zu stellen, mit dem in einfacher Weise eine Bestimmung biologischer Alterung, regenerativer Kapazität und Prognose bei alternsassoziierten und chronischen Erkrankungen erfolgen kann.

Gelöst wird dieses Problem nun mit der Identifizierung von Markerproteinen, die in Antwort auf Telomerdysfunktion (oder andere Formen von DNA-Schädigung) von Zellen sezerniert werden und mit einfachen Verfahren im Blutserum bestimmt werden können.

Es wurde eine Gruppe von vier Proteinen identifiziert, die von Zellen in Antwort auf Telomerdysfunktion oder DNA Schädigung sezerniert werden (Jiang, Rudolph, Schiffer, Mischak et al. 2008 und unpublizierte Daten). Diese Proteine wurden im Kulturüberstand von Knochenmarkzellen aus Telomerase Knockout ($Terc^{-/-}$) Mäusen mit dysfunktionellen Telomeren identifiziert. Es wurde in Vorarbeiten gezeigt, dass $Terc^{-/-}$ Mäuse Telomerdysfunktion in Knochenmarkzellen entwickeln und hierdurch die Funktion von hämatopoetischen

- 4 -

Stamm- und Progenitorzellen eingeschränkt wird. Zur Identifizierung von Markerproteinen der Telomerdysfunktion wurden Knochenmarkzellen aus diesen Mäusen in Kurzkultur (4 Std.) genommen. Es wurde dann eine Proteomanalyse der sezernierten Proteine im Zellkulturüberstand mittels CE-TOF-MS durchgeführt. In diesem Verfahren wurden vier Proteine identifiziert, die spezifisch mit der Alterung von telomerdysfunktionellen Mäusen assoziiert sind.

Es handelt sich bei diesen Proteinen um:

1. Elongation Factor 1 alpha: (EF-1alpha): Dieses Protein kontrolliert die translatioelle Proteinsynthese und ist in menschlichen Zellen in Antwort auf Proliferationsverlust (Seneszenz) hochreguliert (18,19).
2. Chitinase 3 like protein 3 (Chi3L3): Dieses Protein gehört zu der Familie der Chitinasen, die ebenfalls in Antwort auf eine Aktivierung des innaten Immunsystems aktiviert werden (15, 16). Die Hochregulation eines Mitglieds der Chitinase Familie wurde mit der Alterung von menschlichen Knorpelzellen assoziiert (17). Folgeuntersuchungen zeigten, dass die Bestimmung der Enzymaktivität von Chitobiosidasen, Chitinasen, Chitibiasen und/oder N-Acetyl-Glucosaminidasen zur Bestimmung des Alter und des Risikos der Entwicklung von altersassoziierten Erkrankungen und Krebs im Menschen genutzt werden können. Dabei werden alle oder einzelne Aktivitäten von Chitobiosidasen, Chitinasen, Chitibiasen und N-Acetyl-Glucosaminidasen gemessen.
3. Catelcidine-Related Anti-Microbial Protein (CRAMP, im Menschen auch als LL-37 bezeichnet): Dieses Protein wird in Antwort auf eine Aktivierung des innaten Immunsystems aktiviert und scheint eine Funktion bei der Protektion gegen bakterielle Infektionen zu haben (14).
4. Stathmin (OP18): Dieses Protein kontrolliert die Stabilität der Mikrotubuli, Zellmotilität und Mitose (20).

Die Bestimmung erfolgt bevorzugt aus Blut- oder Serumproben.

Es zeigt sich, dass diese vier Proteinmarker in verschiedenen Organen von telomerdysfunktionellen Mäusen hochreguliert werden (Niere, Leber, Lunge, Gehirn, Milz und Herz). Zusätzlich ist die Proteinexpression dieser Markerproteine im Blutserum von alternden Mäusen mit dysfunktionellen Telomeren erhöht. Diese Marker erscheinen spezifisch zu sein für die Alterung im Rahmen von Telomerdysfunktion, da eine Hochregulation dieser Markerproteine nicht in Wildtyp-Mäusen mit langen Telomeren auftritt. Die Arbeiten zeigen ebenfalls, dass die gleichen Markerproteine in alternden menschlichen Zellen (Fibroblasten) im Rahmen der Alterung hochreguliert werden sowie in Antwort auf Strahlungs-induzierte DNA-Schädigung in jungen menschlichen Zellen.

Orthologe Proteine der im Maussystem identifizierten Markerproteine sind im Menschen für drei der vier Proteine bekannt: EF-1alpha, Stathmin, CRAMP. Ein Ortholog für Chi3L3 ist im Menschen derzeit nicht bekannt. Allerdings ist es möglich, die Enzymaktivität von Chitobiosidasen, Chitinases, Chitibiasen und N-Acetyl- Glucosaminidasen in menschlichen Proben zu bestimmen. Die Untersuchungen zeigen erstmals, dass diese Enzymaktivitäten zur Bestimmung des Alter und des Risikos der Entwicklung von alternsassoziierten Erkrankungen und Krebs genutzt werden können. Die Bestimmung von Chitobiosidasen ist besonders bevorzugt.

Ein wesentliches Merkmal der Alterung ist die Akkumulation von DNA-Schädigung. In diesem Sinne ist auch die Akkumulation von Telomerdysfunktion zu verstehen, da es in Antwort auf Telomerdysfunktion zu Aktivierung von DNA-Schädigungssignalwegen in Zellen kommt (21). Eine Reihe von frühzeitigen Alterungssyndromen im Menschen ist mit der Mutation von Genen verbunden, die für die Aufrechterhaltung von DNA-Stabilität notwendig sind. Eigene Untersuchungen zeigen, dass die identifizierten Markerproteine auch in menschlichen Zellen in Antwort auf Bestrahlungs-induzierte DNA-Schädigung hochreguliert werden. So kommt es in Antwort auf Bestrahlung zu einer signifikanten Hochregulation der Markerproteine auf RNA und Proteinebene. Zu-

- 6 -

sätzlich ist eine Hochregulation der Markerproteine im Zellkulturmedium von bestrahlten menschlichen Zellen im Vergleich mit unbestrahlten menschlichen Zellen nachweisbar.

Weiterhin wurden Methoden etabliert, die 3 orthologen Markerproteine im Blutserum vom Menschen mittels Elisa nachzuweisen. Darüber hinaus wurde ein kommerziell verfügbarer Kit zur Bestimmung der Enzymaktivität von Chitinasen, Chitibiasen und N-Acetyl -Glucosaminidasen in menschlichen Proben zu bestimmen.

Weitere Verfahren zur Detektion der Markerproteine sind quantitative PCRs für die Markerproteine. Weiterhin wurden zusätzlich Antikörper definiert, die zur immunhistochemischen Detektion der Markerproteine in menschlichen Gewebepräparaten nutzbar sind.

Die identifizierten Proteine sind Biomarker für DNA-Schädigung, Telomerdysfunktion und können zur Bestimmung des biologischen Alters, regenerativer Kapazität, des Krebsrisikos, des Risikos der Entwicklung von altersassoziierten Erkrankungen und der Prognose bei chronischen Erkrankungen in Mensch und Tier genutzt werden. Die Verfahren beziehen sich auf *ex vivo* Untersuchungen von Körperflüssigkeiten oder Biopsien.

Das Verfahren ist auf Säugetiere und insbesondere Menschen anwendbar. Die Bestimmung *ex-vivo* ist bevorzugt.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren können folgende Ziele erreicht werden:

1. Bestimmung des Vorliegens von DNA Schädigung und dyfunktionellen Telomeren

DNA Schädigung und Telomerdysfunktion sind grundlegende Mechanismen, die der Entstehung von altersassoziierten Erkrankungen, Alterung, nachlas-

sender Regenerationsfähigkeit, und Krebsentstehung zu Grunde liegen. Der Nachweis von DNA-Schädigung und Telomerdysfunktion ist schwierig. Es gibt derzeit keine einfach bestimmbaren Serummarker, die im Blut oder Körperflüssigkeiten bestimmt werden können und auf das Vorhandensein von DANN Brüchen oder Telomerdysfunktion hindeuten. Die definierten Marker können für diese Applikation genutzt werden. Die Untersuchungen zeigen erstmals, dass die identifizierten Marker in Antwort auf Telomerdysfunktion oder DNA-Schädigung im Blutserum ansteigen. Aufgrund der zunehmenden Erkenntnis, dass DNA Schädigung und Telomerdysfunktion grundlegend der Entwicklung von alterns-assoziierten Erkrankungen und Krebs zu Grunde liegen, stellt die Erfindung einen wesentlichen Fortschritt in der Medizin dar und kann als neuer Biomarker genutzt werden.

2. Bestimmung des biologischen Alters und der voraussichtlichen Lebenserwartung:

Das biologische Alter eines Individuums kann von dem chronologischen Alter abweichen. Es ist bekannt, dass genetische Faktoren, Lebensumstände, Lebensgewohnheiten, Ernährungsgewohnheiten, äußere Faktoren und viele andere Faktoren einen Einfluss auf die Alterung des Organismus haben. Das biologische Alter bestimmt die Lebenserwartung und Fitness des alternden Individuums teilweise stärker als das chronologische Alter. Langsam gealterte, 60-jährige Menschen können zum Teil fitter sein und eine längere Lebenserwartung haben als vorgealterte 50 Jährige.

Die Messung der Expression der hier definierten Biomarker kann das Vorliegen und das Ausmaß von DNA-Schädigung und Telomerdysfunktion bestimmen. Es gibt zunehmend Hinweise dass diese beiden Parameter mit dem biologischen Alter eines Individuums und dessen voraussichtlicher Lebenserwartung korrelieren. Die Messung kann in Körperflüssigkeiten (z.B.: Serum, Blut, Urin, Speichel, Liquor) oder in Gewebe- und Organ-Biopsien und Proben erfolgen. Neben der Messung mittels Färbungen, PCR und Genarray können die Marker auch

mit modernen Bildgebungsverfahren bestimmt werden (molekulare Bildgebung). Diese Verfahren sind geeignet, den Alterungszustand von Organen zu bestimmen oder gealterte Zellklone mit erhöhtem Entartungsrisiko zu identifizieren.

Die Bestimmung des biologischen Alters und der voraussichtlichen Lebenserwartung mithilfe dieser Marker ist für folgende Bereiche geeignet:

- a) Persönliche Lebensplanung: Für die individuelle Lebensplanung ist es von Bedeutung, abschätzen zu können, wie lange man voraussichtlich fit und arbeitsfähig ist und was die eigene, voraussichtliche Lebenserwartung ist. Die Bestimmung der hier definierten Biomarker kann dazu genutzt werden, das biologische Alter und die Lebenserwartung des Individuums zu bestimmen. Dies kann dem Individuum bei der persönlichen Lebensplanung helfen.
- b) Medizinischer Bereich: Im medizinischen Bereich ist es bei der Therapieplanung von Bedeutung, das biologische Alter und die Lebenserwartung eines Patienten bestimmen zu können. Dies ist insbesondere bei invasiven Therapien (Operationen, Intensivmedizin, Organtransplantation, etc. von Bedeutung). Die Bestimmung der hier definierten Biomarker kann dazu genutzt werden, das biologische Alter und die Lebenserwartung des Individuums zu bestimmen. Dies kann Medizinern dabei helfen, individuelle Therapieindikationen besser zu stellen.
- c) Lifestyle und Wellness Industrie: Es gibt Hinweise, dass Sport und Wellness-Anwendungen einen günstigen Einfluss auf die Alterung haben können. Welche Programme/Anwendungen für wen am besten geeignet sind, die Alterung aufzuhalten, ist nicht bekannt. Darüber hinaus ist es nicht möglich, den Erfolg solcher Verfahren objektiv zu bestimmen. Die Bestimmung der hier definierten Biomarker kann dazu genutzt werden, den Einsatz solcher

Verfahren zu optimieren und den Erfolg der Maßnahmen im Verlauf zu beurteilen.

- d) Gesunde Nahrungsmittel/Nahrungsmittelzusätze: Es gibt Hinweise, dass die Ernährung einen günstigen Einfluss auf die Alterung nehmen kann. Welche Nahrungsmittel/Nahrungsmittelzusätze für wen am besten geeignet sind, die Alterung aufzuhalten, ist nicht bekannt. Darüber hinaus ist es schwierig, den Erfolg solcher Maßnahmen zu bestimmen. Die Bestimmung der hier definierten Biomarker kann dazu genutzt werden, den Einsatz solcher Verfahren zu optimieren und den Erfolg der Maßnahmen im Verlauf zu beurteilen.
- e) Medikamente/Substanzen zur Verbesserung von Fitness, Organfunktion und Lebenserwartung: Es gibt eine stetig wachsende Anzahl von Medikamenten und Substanzen, die einen günstigen Einfluss auf Alterung und Fitness im Alter haben können. Welche Medikamente/Substanzen für wen am besten geeignet sind die Alterung aufzuhalten, ist nicht bekannt. Darüber hinaus ist es schwierig, den Erfolg solcher Medikamente/Substanzen zu bestimmen. Die Bestimmung der hier definierten Biomarker kann dazu genutzt werden, den Einsatz solcher Medikamente/Substanzen zu optimieren und den Erfolg der Maßnahmen im Verlauf zu beurteilen.
- f) Forensischer Bereich/Kriminalistik: Die Bestimmung der hier definierten Marker kann genutzt werden das biologische Alter von Opfern von Gewaltverbrächen und Unfällen zu bestimmen.
- g) Bestimmung des biologischen Alters und der Lebenserwartung von Nutztieren, Haustieren, Sporttieren:

Der Handel mit Nutztieren, Haustieren und im Sport eingesetzten Tieren (z.B.: Rennpferde, Springpferde, Kamele, Hunde, etc.) ist häufig von medizinischen Gutachten über die Fitness und die voraussichtliche Nutzdauer der Tiere begleitet. Die Messung der hier definierten Marker kann genutzt wer-

- 10 -

den das biologische Alter und die voraussichtliche Fitnessspanne und die Lebenserwartung von Tieren zu bestimmen.

- h) Sportmedizin/Profisport: Die Bestimmung der hier genannten Marker kann dazu genutzt werden, das biologische Alter und die Fitness von Sportlern zu bestimmen.
- i) Versicherungen: Die Bestimmung der hier genannten Marker kann dazu genutzt werden, das biologische Alter und die Fitness von Versicherungsnehmern zu bestimmen.
- j) Arbeits-/Umweltmedizin: Die Bestimmung der hier definierten Marker kann dazu genutzt werden, den Einfluss bestimmter Tätigkeiten und den Einfluss von Umweltfaktoren auf die biologische Alterung und die Fitness von Individuen zu bestimmen.

3. Es gibt experimentell Hinweise, dass die Akkumulation von DNA-Schädigung und Telomerdysfunktion die Regenerationsfähigkeit von Geweben und Organen limitiert. Die hier definierten Biomarker können deswegen zur Bestimmung der Regenerationsfähigkeit von Geweben und Organen genutzt werden. Die Messung kann in Körperflüssigkeiten (z.B.: Serum, Blut, Urin, Speichel, Liquor) oder in Gewebe- und Organ-Biopsien/Proben erfolgen. Die Bestimmung der Regenerationsfähigkeit von Organen- und Geweben mithilfe dieser Marker ist für folgende Bereiche geeignet:

- a) Bestimmung der Prognose und Therapieplanung bei chronischen Erkrankungen: Eine Reihe chronischer Erkrankungen führt im Endstadium zum Versagen der betroffenen Organe. Interindividuelle Verläufe können sehr unterschiedlich sein. Die Vorhersage des individuellen Verlaufs ist klinisch bedeutsam, um das Timing von invasiven Therapien (z.B.: Organtransplantationen) besser planen zu können. Die Bestimmung der hier definierten Marker kann dazu genutzt werden, die individuelle Prognose bei chronischen

- 11 -

Erkrankungen (z.B.: Hepatiden, Lungenfibrose, Anämien, chronisch entzündliche Erkrankungen) zu bestimmen.

b) Bestimmung der Prognose und Therapieplanung bei akuten Erkrankungen und Verletzungen.

Eine Reihe akuter Erkrankungen und Verletzungen kann zum Versagen der betroffenen Organe und zum Versterben der Patienten führen. Interindividuelle Verläufe können sehr unterschiedlich sein. Die Vorhersage des individuellen Verlaufs ist klinisch bedeutsam, um das Timing und den Nutzen von invasiven Therapien (z. B.: Operationen, Intensivmedizinische Maßnahmen) abzuschätzen. Die Bestimmung der hier definierten Marker kann dazu genutzt werden, die individuelle Prognose bei akuten Erkrankungen und Verletzungen zu bestimmen.

4. Es gibt zunehmend Hinweise, dass die Akkumulation von DNA Schädigung und Telomerdysfunktion das Risiko des Auftretens und die Prognose von alternsassoziierten Erkrankungen bestimmt. Die Bestimmung der hier definierten Marker kann deswegen zur Bestimmung des Risikos des Auftretens und der Prognose von alternsassoziierten Erkrankungen genutzt werden. Die Messung kann in Körperflüssigkeiten (z.B.: Serum, Blut, Urin, Speichel, Liquor) oder in Gewebe- und Organ-Biopsien/Proben erfolgen.

Die Bestimmung des Risikos des Auftretens und der Prognose von alternsassoziierten Erkrankungen mithilfe der hier definierten Marker ist für folgende Bereiche geeignet:

a) Bestimmung des Risikos des Auftretens von alternsassoziierten Erkrankungen: Eine Vielzahl von Erkrankungen ist mit der Alterung assoziiert (Gefäßkrankheiten, Diabetes Mellitus, Demenz, Schlaganfälle, etc.). Es wäre von klinischer Bedeutung, dass Risiko des Auftretens solcher Erkrankungen abschätzen zu können, um ggf. frühzeitig mit präventiven oder therapeuti-

- 12 -

schen Gegenmaßnahmen zu beginnen. Die Bestimmung der hier definierten Marker kann dazu genutzt werden, das individuelle Risiko, an alternsassoziierten Erkrankungen zu erkranken, bestimmen.

b) Bestimmung der Prognose von alternsassoziierten Erkrankungen: Eine Vielzahl von Erkrankungen ist mit der Alterung assoziiert (Gefäßkrankheiten, Diabetes Mellitus, Demenz, Schlaganfälle, etc.). Es wäre von klinischer Bedeutung, die Prognose solcher Erkrankungen abschätzen zu können, um dem individuellen Verlauf angepasste Therapiemaßnahmen zu ergreifen. Die Bestimmung der hier definierten Marker kann dazu genutzt werden, den individuellen Verlauf und die Prognose bei alternsassoziierten Erkrankungen zu bestimmen.

5. Es gibt zunehmend Hinweise, dass DNA Schädigung und Telomerdysfunktion zur Krebsentstehung führt. Die Bestimmung der hier definierten Marker kann deswegen zur Bestimmung des Krebsrisikos bei chronischen Erkrankungen und im Rahmen der Alterung genutzt werden. Die Messung kann in Körperflüssigkeiten (z.B.: Serum, Blut, Urin, Speichel, Liquor) oder in Gewebe- und Organ-Biopsien/Proben erfolgen.

Die Bestimmung des Krebsrisikos mithilfe der hier definierten Marker ist für folgende Bereiche geeignet:

- a) Bestimmung des Krebsrisikos im Rahmen der Alterung. Im Alter steigt das Krebsrisiko an. Die hier definierten Marker zeigen das Krebsrisiko im Rahmen der Alterung an. Eine Bestimmung des Krebsrisikos kann dazu genutzt werden Krebsvorsorgeuntersuchungen dem individuellen Krebsrisiko anzupassen.
- b) Bestimmung des Krebsrisikos bei chronischen Erkrankungen. Bei vielen chronischen Erkrankungen (z.B.: Hepatiden, entzündliche Darmerkrankungen) steigt das Krebsrisiko an. Die definierten Marker zeigen das individuel-

le Krebsrisiko bei chronischen Erkrankungen an. Eine Bestimmung des Krebsrisikos kann dazu genutzt werden Krebsvorsorgeuntersuchungen dem individuellen Krebsrisiko anzupassen. Darüber hinaus kann das Timing von Präventivmaßnahmen (Operation/Transplantation) verbessert werden.

- c) Bestimmung des Krebsrisikos bei genetischer Prädisposition und bei genetischen Erkrankungen. Viele genetische Erkrankungen (z.B. LiFraumeni-Syndrom, Adenomatosis Polyposis Coli) gehen mit einem erhöhten Krebsrisiko einher. Die Bestimmung der hier definierten Marker kann das individuelle Krebsrisiko bei genetischer Prädisposition anzeigen und so zur Verbesserung von Krebsvorsorge und einem verbesserten Timing von Präventivmaßnahmen bei diesen Erkrankungen genutzt werden.
- d) Allgemeine Krebsvorsorgeuntersuchung: Die "allgemeine Krebsvorsorgeuntersuchung" ist für viele Krebsarten (z.B. Kolonkarzinom, Prostatakarzinom, Mamma-Karzinom) im Rahmen der Alterung empfohlen und folgt dabei allgemeinen, medizinischen Richtlinien zum Zeitpunkt und zur Häufigkeit der Vorsorgeuntersuchung. Das individuelle Risiko an Krebs zu erkranken ist bei diesen Maßnahmen nicht berücksichtigt. Die Bestimmung der hier definierten Marker kann das individuelle Krebsrisiko anzeigen und kann zu einer verbesserten, dem individuellen Risiko angepassten „allgemeinen Krebsvorsorge“ genutzt werden.

Figurenbeschreibung:

Figur 1: Die Marker von Telomerdysfunktion und DNA-Schädigung sind im Blut nachweisbar und zeigen das Tumorrisiko im Rahmen der Alterung und bei chronischer Lebererkrankung an.

- A) Der Serumspiegel von EF1alpha ist signifikant erhöht im Blut von Hepatitis C Virus infizierten Patienten, die im Verlauf der Erkrankung Leberkrebs entwickelten (Gruppe 1) gegenüber Patienten die im gleichen Beobachtungszeitraum keinen Leberkrebs entwickelten (Gruppe 2, $p=0,02$).

- B) 85 jährige Probanden mit erhöhtem EF1alpha Serumspiegel (50% der Probanden oberhalb des mittleren Serumspiegels = blaue Linie) zeigten ein signifikant höheres Risiko im Verlauf von 4 Jahren an Krebs zu erkranken im Vergleich zu 85 jährigen Probanden mit niedrigerem EF1alpha Serumspiegel (50% der Probanden unterhalb des mittleren Serumspiegels = rote Linie, p=0.002).
- C) die Chitinase-Enzymaktivität ist signifikant erhöht im Blut von Hepatitis C Virus infizierten Patienten, die im Verlauf der Erkrankung Leberkrebs entwickelten (Gruppe 1) gegenüber Patienten die im gleichen Beobachtungszeitraum keinen Leberkrebs entwickelten (Gruppe 2, p=0,02).
- D) 85 jährige Probanden mit erhöhtem CRAMP Serumspiegel (50% der Probanden oberhalb des mittleren Serumspiegels = blaue Linie) zeigten ein signifikant höheres Risiko im Verlauf von 4 Jahren an Krebs zu erkranken im Vergleich zu 85 jährigen Probanden mit niedrigerem CRAMP Serumspiegel (50% der Probanden unterhalb des mittleren Serumspiegels = rote Linie, p=0.002).

Figur 2: Die Marker von Telomerdysfunktion und DNA-Schädigung sind im Blut nachweisbar und sind durch den Lebenswandel (Rauchen, Sport, Fettleibigkeit) beeinflusst.

- A-C) Der Proteinspiegel von EF1alpha und Stathmin und die Chitinase Enzymaktivität im menschlichen Blut-Serum korrelieren signifikant negativ mit der sportlichen Aktivität. Diese Daten indizieren, dass mehr sportliche Aktivität mit einer verminderten DNA Schädigung assoziiert ist.
- D) Der Proteinspiegel von Stathmin und die Chitinase Enzymaktivität im menschlichen Blut-Serum korrelieren signifikant positiv mit Zigarettenrauchen (gemessen in pack years = Lebensjahre in denen eine Schachtel Zigaretten pro Tag geraucht wurde). Diese Daten indizieren, dass Rauchen mit einer verstärkten DNA Schädigung assoziiert ist.
- E-G) Der Proteinspiegel von EF1alpha, Stathmin und CRAMP im menschlichen Blut-Serum korrelieren signifikant positiv mit Fettleibigkeit (gemessen als

Body Mass Index). Diese Daten indizieren, dass Fettleibigkeit mit einer verstärkten DNA Schädigung assoziiert ist.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

EF-1alpha: Die Hochregulation dieses Protein ist mit dem Proliferationsverlust (Seneszenz) von menschlichen Zellen in Kultur in Verbindung gebracht worden (18,19). Eine Verbindung mit menschlicher Alterung und alternsassoziierten Erkrankungen ist nicht beschrieben worden. Ferner ist bislang nicht gezeigt worden, dass Ef1alpha durch DNA-Schädigung und Telomerdysfunktion hochreguliert wird. Ferner ist bislang nicht gezeigt worden, dass Ef1alpha durch DNA-Schädigung und Telomerdysfunktion hochreguliert wird.

Die Untersuchungen zeigen erstmals, dass dieses Protein im Blutserum in Antwort auf Telomerdysfunktion und DNA-Schädigung ansteigt (Jiang et al. 2009). Darüber hinaus zeigen die Arbeiten erstmals, dass EF-1alpha Protein im menschlichen Blut nachweisbar ist und im Rahmen der Alterung und bei alternsassozierter Erkrankungen und chronischen Erkrankungen ansteigt (Jiang et al. 2009). So ist der Blutserum Spiegel von EF-1alpha bei alten Menschen im Altersheim ($n=20$, mittleres Alter 85 Jahre, EF-1alpha= 1,5 Einheiten) signifikant höher als bei jungen Menschen ($n=31$, mittleres Alter 35 Jahre, EF-1alpha= 1 Einheit, $p=0.0004$). Ein weiterer Anstieg ist bei geriatrischen Patienten zu verzeichnen ($n=72$, mittleres Alter 73 Jahre, EF-1alpha= 1,7 Einheiten, $p=0.0115$). Der Marker zeigte darüber hinaus eine erhöhte Expression im Endstadium chronischer Erkrankungen (z.B. Leberzirrhose und myelodysplastische Syndrome), sowohl im Blutserum als auch in den betroffenen Geweben.

Zusätzlich zeigen die Untersuchungen erstmals, dass die Serumproteinspiegel des Markers das Krebsrisiko im Alter und bei chronischen Erkrankungen anzeigen (Figur 1A). Bei >85 jährigen Probanden war das Risiko innerhalb der

nächsten 4 Jahre an Krebs zu erkranken bei erhöhtem EF-1alpha- Serumspiegel (>Median) signifikant höher (46/243 Probanden entwickelten Tumore) als bei den Probanden mit niedrigeren EF-1alpha- Serumspiegel (<Median, 22/243 Probanden entwickelten Tumore, p=0,001). Zusätzlich war der EF-1alpha- Serumspiegel bei Leberzirrhosepatienten, die im Krankheitsverlauf Leberkrebs entwickelten deutlich höher als bei Leberzirrhosepatienten, die keinen Leberkrebs entwickelten (Figur 1B).

Zusätzlich zeigen unsere Untersuchungen erstmals, dass die Serumproteinspiegel des Markers signifikant von Lebensgewohnheiten (Sport und Fettleibigkeit, Figur 2A, E) beeinflusst werden.

Beispiel 2

CRAMP (im Menschen auch als LL-37 bezeichnet): Die Untersuchungen zeigen erstmals, dass dieses Protein im Blutserum Antwort auf Telomerdysfunktion ansteigt (22). Darüber hinaus belegen unsere Untersuchungen erstmals, dass dieses Protein im menschlichen Blut im Rahmen der menschlichen Alterung und im Rahmen altersassozierter Erkrankungen ansteigt (22). So ist der Blutserum Spiegel von CRAMP bei alten Menschen im Altersheim (n=20, mittleres Alter 85 Jahre, CRAMP= 18ng) signifikant höher als bei jungen Menschen (n=31, mittleres Alter 35 Jahre, CRAMP= 8ng, p<0,0001). Ein weiterer Anstieg ist bei geriatrischen Patienten zu verzeichnen (n=72, mittleres Alter 73 Jahre, CRAMP= 22ng, p=0,0007). Der Marker zeigt darüber hinaus eine erhöhte Expression im Endstadium chronischer Erkrankungen (z.B. Leberzirrhose und Myelodysplastische Syndrome), sowohl im Blutserum als auch in den betroffenen Geweben. Zusätzlich zeigt der Marker das Krebsrisiko im Alter und bei chronischen Erkrankungen an.

Diese Untersuchungen zeigen erstmals, dass der Serumspiegel von CRAMP (LL-37) im menschlichen Blut bei 85 jährigen Probanden das Risiko innerhalb der nächsten 4 Jahre an Krebs zu erkranken anzeigt (Figur 1C). Probanden mit erhöhtem CRAMP- Serumspiegel (>Median) zeigten signifikant höhere Raten der Entwicklung maligner Tumore (44/243 Probanden entwickelten Tumore)

als die Probanden mit niedrigeren CRAMP- Serumspiegel (<Median, 24/243 Probanden entwickelten Tumore, $p=0,006$). Zusätzlich war der CRAMP- Serumspiegel bei Leberzirrhosepatienten mit Leberkrebs deutlich höher als bei Leberzirrhosepatienten ohne Leberkrebs.

Zusätzlich zeigen die Untersuchungen erstmals, dass der Serumspiegel von CRAMP signifikant von Fettleibigkeit beeinflusst wird (Figur 2G).

Beispiel 3

Stathmin: Die Untersuchungen zeigen erstmals, dass dieses Protein im Blutserum in Antwort auf Telomerdysfunktion ansteigt (22). Darüber hinaus belegen die Untersuchungen erstmals, dass dieses Protein im menschlichen Blut im Rahmen der menschlichen Alterung und bei altersassoziierten Erkrankungen ansteigt (22). So ist der Blutserum Spiegel von Stathmin bei alten Menschen im Altersheim ($n=20$, mittleres Alter 85 Jahre, STATHMIN= 1,3 Einheiten) signifikant höher als bei jungen Menschen ($n=31$, mittleres Alter 35 Jahre, STATHMIN= 1 Einheit, $p=0.0001$). Der Marker zeigte darüber hinaus eine erhöhte Expression im Endstadium chronischer Erkrankungen (z.B. Leberzirrhose und Myelodysplastische Syndrome), sowohl im Blutserum als auch in den betroffenen Geweben.

Zusätzlich zeigt der Marker das Krebsrisiko im Alter und bei chronischen Erkrankungen an. Der Stathmin-Serumspiegel ist bei Leberzirrhosepatienten mit Leberkrebs deutlich höher als bei Leberzirrhosepatienten ohne Leberkrebs.

Zusätzlich zeigen die Untersuchungen erstmals, dass die Serumproteinspiegel des Markers signifikant von Lebensgewohnheiten (Sport, Rauchen und Fettleibigkeit, Figur 2A, D, F) beeinflusst werden.

Beispiel 4

Enzymaktivität von Chitinasen, Chitibiasen und N-Acetyl- Glucosaminidasen: Eine Erhöhung der Sekretion von Chitinase-like-Protein ist in der Zellkultur von Knorpelzellen von gealterten Menschen und bei Arthritis Patienten beschrieben

worden (17). Eine Erhöhung der Enzym Aktivität von Chitinases, Chitibiasen und N-Acetyl- Glucosaminidasen im menschlichen Blut oder in menschlichen Geweben/Organen als Folge von DNA-Schädigung, Telomerdysfunktion, Alterung oder Erkrankungen ist bislang nicht beschrieben worden.

Die Untersuchungen zeigen erstmals, dass die Enzym Aktivität von Chitobiosidasen, Chitinases, Chitibiasen und N-Acetyl- Glucosaminidasen im Blutserum in Antwort auf Telomerdysfunktion ansteigt (22). Darüber hinaus belegen die Untersuchungen erstmals, dass diese Enzymaktivitäten im menschlichen Blut im Rahmen der menschlichen Alterung und bei altersassozierter Erkrankungen ansteigen (22). So ist die Enzymaktivität von Chitinases, Chitibiasen und N-Acetyl- Glucosaminidasen im Blutserum von alten Menschen im Altersheim ($n=20$, mittleres Alter 85 Jahre, Chitinase-Enzym-Aktivität = 52 Units) signifikant höher als bei jungen Menschen ($n=31$, mittleres Alter 35 Jahre, Enzym-Aktivität = 24 Units, $p=0,0004$). Ein weiterer Anstieg ist bei geriatrischen Patienten zu verzeichnen ($n=72$, mittleres Alter 73 Jahre, Enzym-Aktivität: 56 Units, $p=0,0216$). Die Enzymaktivität von Chitinases, Chitibiasen und N-Acetyl- Glucosaminidasen ist darüber hinaus im Endstadium chronischer Erkrankungen (z.B. Leberzirrhose und Myelodysplastische Syndrome) im Blutserum erhöht.

Die Untersuchungen zeigen darüber hinaus erstmals, dass die im Blutserum gemessene Enzymaktivität von Chitobiosidasen, Chitinases, Chitibiasen und N-Acetyl- Glucosaminidasen das Krebsrisiko bei chronischen Erkrankungen anzeigen. Die Enzymaktivität von Chitobiosidasen, Chitinases, Chitibiasen und N-Acetyl- Glucosaminidasen ist bei Leberzirrhosepatienten mit Leberkrebs deutlich höher als bei Leberzirrhosepatienten, die im Krankheitsverlauf Leberkrebs entwickelten deutlich höher als bei Leberzirrhosepatienten, die im gleichen Nachbeobachtungs-Zeitraum keinen Leberkrebs entwickelten (Figur 1D).

- 19 -

Zusätzlich zeigen die Untersuchungen erstmals, dass Chitinase-Enzymaktivität signifikant von Lebensgewohnheiten (Sport und Rauchen, Figur 2C, D) beeinflusst werden.

Literatur

1. Wolfgang Lutz, Warren Sanderson & Sergei Scherbov. The coming acceleration of global population ageing. *Nature* **451**, 716-719
2. Chan SR, Blackburn EH. Telomeres and telomerase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004; **359**:109-21.
3. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Nov 1; **89**(21):10114-8.
4. Jiang H, Ju Z, Rudolph KL. Telomere shortening and ageing. *Z Gerontol Geriatry* 2007; **40**:314-324.
5. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet.* 2003 Feb 1; **361**(9355):393-5.
6. Panossian LA, Porter VR, Valenzuela HF, Zhu X, Reback E, Masterman D, Cummings JL, Effros RB. Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status. *Neurobiol Aging.* 2003; **24**:77-84.
7. Jeanclos E, Krolewski A, Skurnick J, Kimura M, Aviv H, Waram JH, Aviv A. Shortened telomere length in white blood cells of patients with IDDM. *Diabetes.* 1998; **47**:482-6.
8. Minamino T, Komuro I. Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Circ Res.* 2007 Jan 5; **100**(1):15-26.
9. Wu X, Amos CI, Zhu Y, Zhao H, Grossman BH, Shay JW, Luo S, Hong WK, Spitz MR. Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Aug 20; **95**(16):1211-8.
10. Wiemann SU, Satyanarayana A, Tsahuridu M, Tillmann HL, Zender L, Klempnauer J, Flemming P, Franco S, Blasco MA, Manns MP, Rudolph KL. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J.* 2002; **16**:935-42.
11. Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Fujimura T, Kawakubo K, Shimamoto T, Iwabuchi A, Toyama K. Telomere shortening associated with disease evolution patterns in myelodysplastic syndromes. *Cancer Res.* 1994 Jul 1; **54**(13):3557-60.
12. Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell.* 2001 Oct 5; **107**(1):67-77.
13. Zou Y, Sfeir A, Gryaznov SM, Shay JW, Wright WE. Does a sentinel or a subset of short telomeres determine replicative senescence? *Mol Biol Cell.* 2004 Aug; **15**(8):3709-18.
14. Nizet V, Ohtake T, Lauth X, Trowbridge J, Rudisill J, et al. (2001). Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* **414**: 454-457.
15. Zhu Z, Zheng T, Homer RJ, Kim YK, Chen Ny, et al. (2004). Acidic Mammalian Chitinase in Asthmatic Th2 Inflammation and IL-13 Pathway Activation. *Science* **304**:1678-1682.

16. Reese TA, Liang HE, Tager AM, Luster AD, Van Rooijen N, et al. (2007). Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature* 447: 92-96.
17. Dozin B, Malpeli M, Camardella L, Cancedda R, Pietrangelo A. (2002). Response of young, aged and osteoarthritic human articular chondrocytes to inflammatory cytokines: molecular and cellular aspects. *Matrix Biol* 21: 449-459.
18. Wang E, Moutsatsos IK, & Nakamura T. (1989). Cloning and molecular characterization of a cDNA clone to statin, a protein specifically expressed in nonproliferating quiescent and senescent fibroblasts. *Exp Gerontol* 24: 485-49
19. Giordano T, Kleinsek D, & Foster DN. (1989). Increase in abundance of a transcript hybridizing to elongation factor I alpha during cellular senescence and quiescence. *Exp Gerontol* 24: 501-513.
20. Rubin CI, & Atweh GF. (2004). The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J Cell Biochem* 93: 242-250.
21. d'Adda di Fagagna et al. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426:194-8.
22. Jiang H, Schiffer E, Song Z, Wang J, Zürbig P, Thedieck K, Moes S, Saal N, Bantel H, Jantos J, Brecht M, Jenö P, Hall MN, Hager K, Manns MP, Hecker H, Ganser A, Döhner K, Bartke A, Meissner C, Mischak H, Ju Z, Rudolph KL. Proteins induced by telomere dysfunction and DNA damage represent biomarkers of human aging and disease. *Proc Nat Acad Sci* 2008, 105:11299-304

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung des Vorliegens und des Ausmaß von DNA-Schädigung und Telomerdysfunktion in Mensch oder Tier umfassend folgende Schritte:

Bestimmung der Menge oder der Aktivität mindestens eines Proteinmarkers in einer Blut- oder Serumprobe, wobei das Protein ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus EF1 α , Chitobiosidasen, Stathmin und CRAMP.

2. Verfahren zur Bestimmung des Alterungszustandes eines Organismus umfassend folgende Schritte:

Bestimmung der Menge oder der Aktivität mindestens eines Proteinmarkers in einer Probe, wobei das Protein ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus (i) EF1 α , (ii) CRAMP, (iii) Stathmin und (iv) Chitinase Genfamilie.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Aktivität der Chitinase Genfamilie die Enzymaktivität von Chitobiosidasen Chitinasen, Chitibiasen und/oder N-Acetyl-Glucosaminidasen gemessen wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Messung der Expression erfolgt durch Messung:

- des Proteins,
- Messung von Bruchstücken des Proteins,
- Messung von mRNA, die für das Protein kodiert,
- Messung von mRNA-Fragmenten, die für das Protein kodieren,
- Messung der biologischen Aktivität der Proteins.
- Bildliche Darstellung der Proteine oder der Aktivität der Proteine (molekulares Imaging)

5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Messung in Körperflüssigkeiten oder in Gewebe- und Organbiopsien oder -proben erfolgt.
6. Verfahren nach mindestens Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Körperflüssigkeiten ausgewählt werden aus Blut, Urin, Speichel und Liquori, insbesondere aus Serum.
7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren zur Bestimmung des biologischen Alters, der voraussichtlichen Lebenserwartung, der Regenerationsfähigkeit von Geweben und Organen, des Risikos des Auftretens und der Prognose von alternsassoziierten Erkrankungen, der Bestimmung des Krebsrisikos bei chronischen Erkrankungen, der Bestimmung des Krebsrisikos im Rahmen der Alterung, Bestimmung des Krebsrisikos im Rahmen chronischer Erkrankungen dient.
8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 75, dadurch gekennzeichnet, dass 2, 3 oder 4 Proteinmarker aus der Gruppe (i) CRAMP, (ii) EF1 α , (iii) Stathmin und (iv) Chitinase Genfamilie bestimmt werden.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Aktivität der Chitinasen Genfamilie als Enzymaktivität von Chitobiosidasen, Chitin- asen, Chitibiasen und N-Acetyl-Glucosaminidasen bestimmt wird.
10. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das die Marker bzw. die Markeraktivität durch Bildgebung (molekulares Imaging) dargestellt werden.

-1/6-

EF1alpha

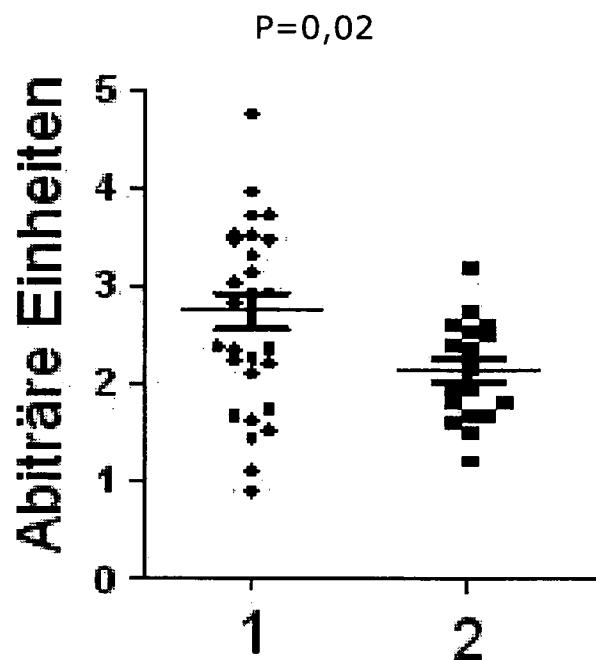


Fig.1A

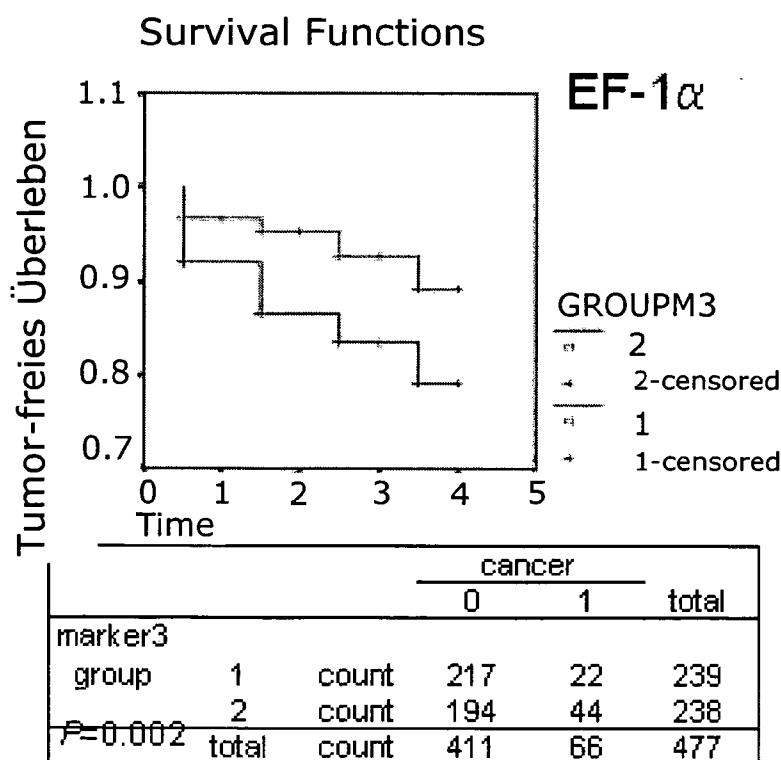


Fig.1B

-2/6-

Chitinase-Enzymaktivität P=0.02

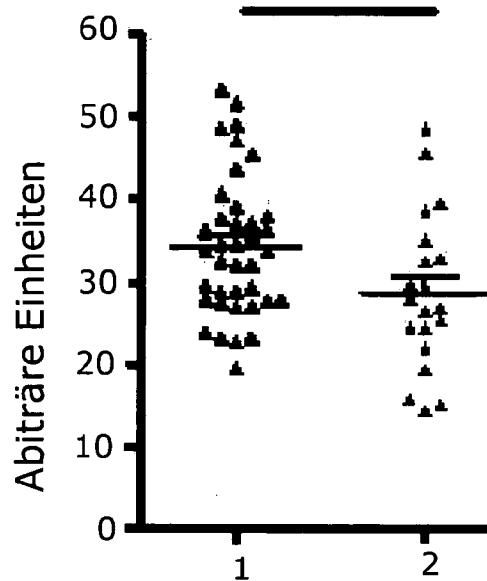


Fig.1C

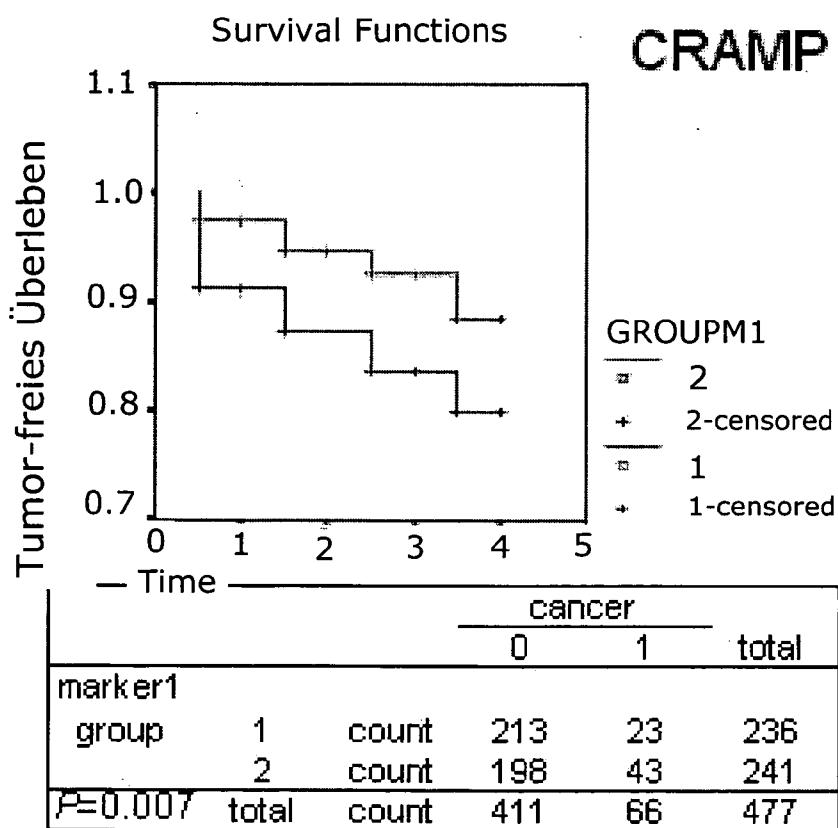


Fig.1D

-3/6-

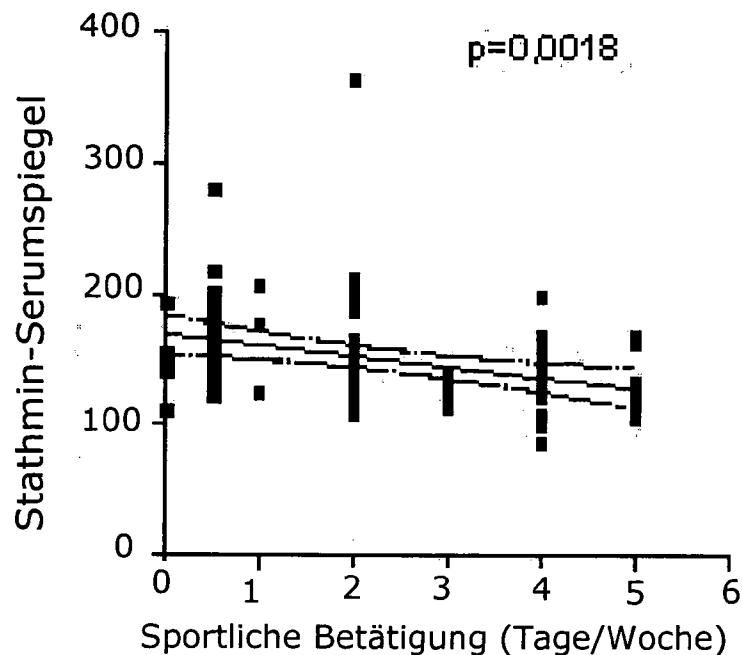


Fig.2A

-4/6-

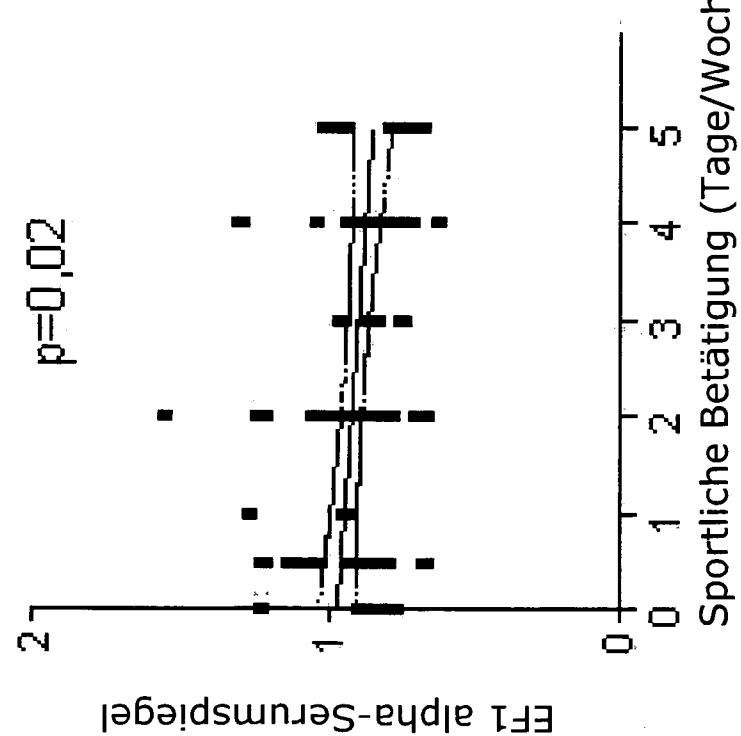
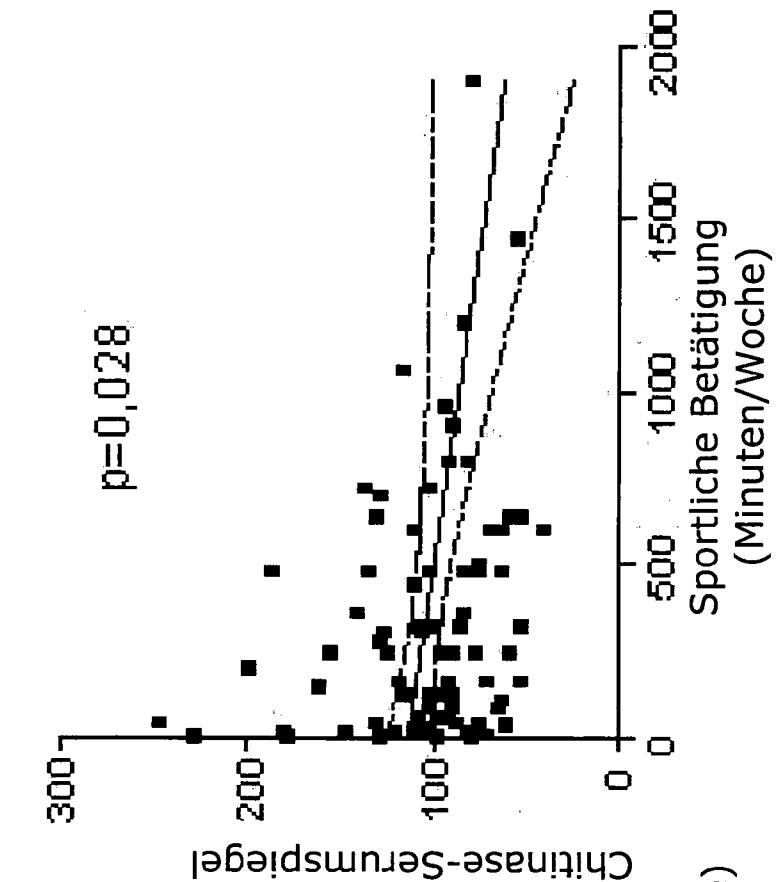


Fig.2B

Fig.2C

-5/6-

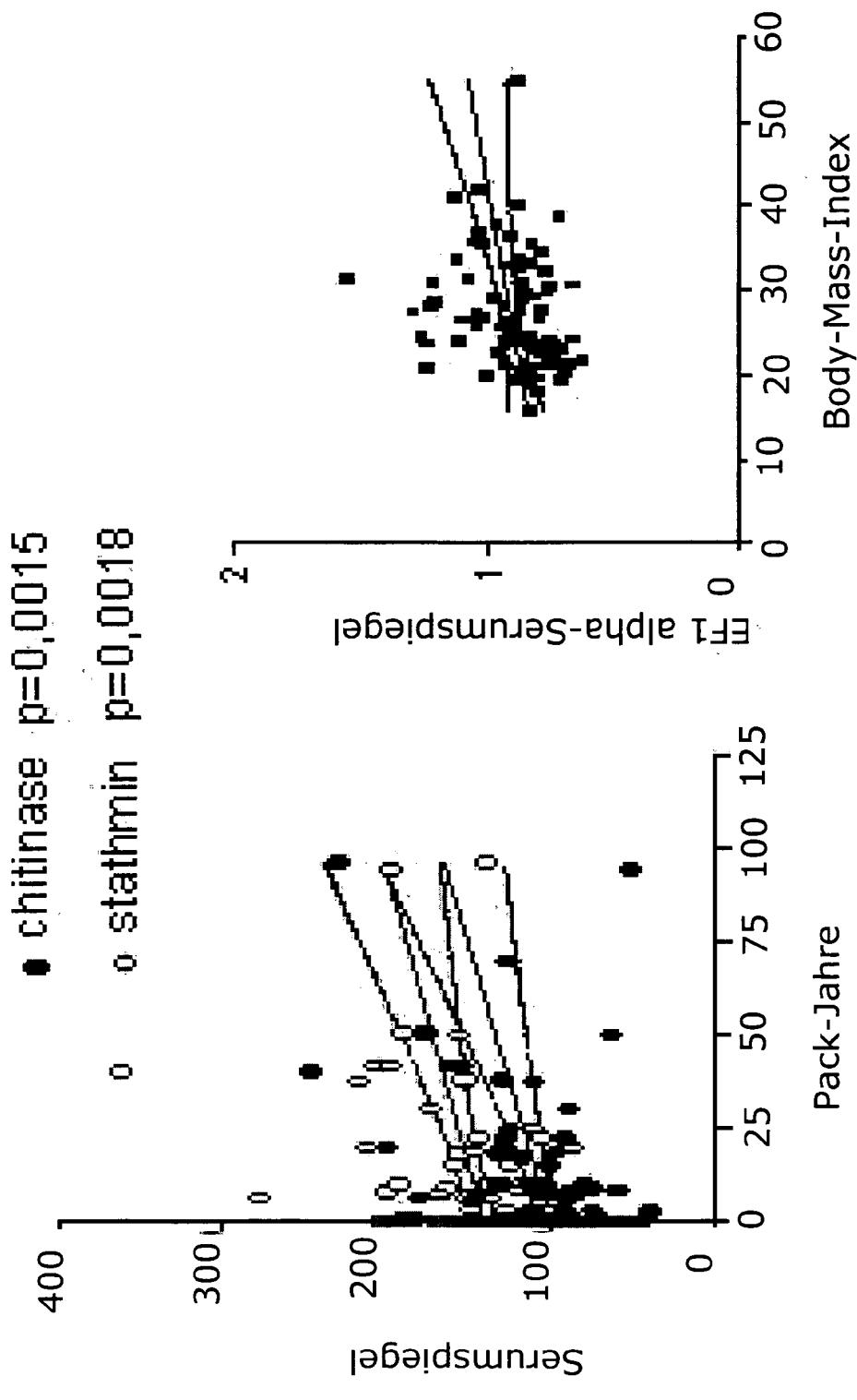


Fig.2D

Fig.2E

-6/6-

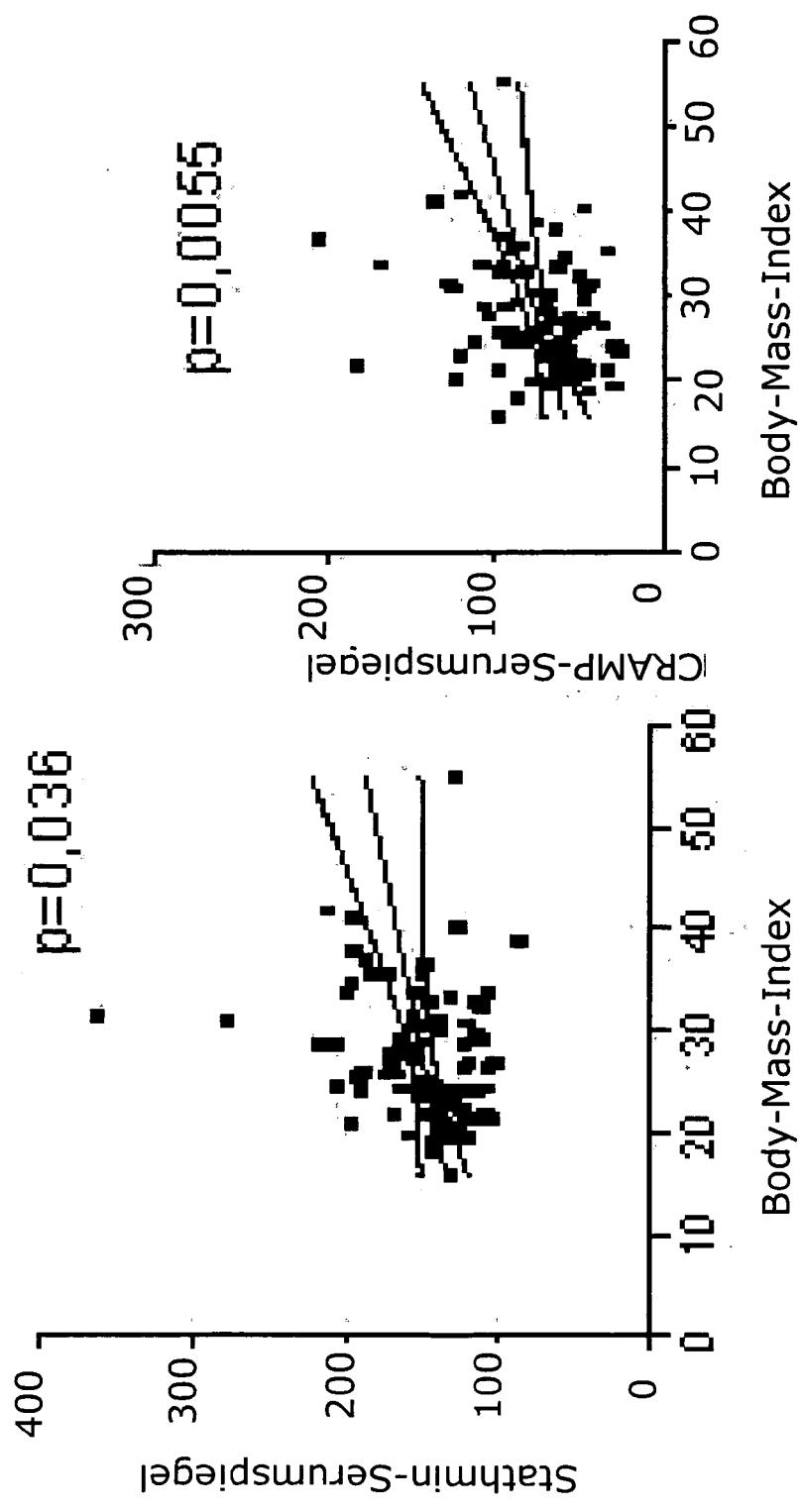


Fig.2F

Fig.2G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
 PCT/EP2009/055059

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/68

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 08 319298 A (FUJI REBIO KK) 3 December 1996 (1996-12-03) the whole document insbesondere Zusammenfassung. -----	1,2,4-8, 10
A	JP 2002 107363 A (ASAHI TECHNO GLASS CORP) 10 April 2002 (2002-04-10) the whole document insbesondere Zusammenfassung. -----	1,2,4-8, 10
A	US 2002/192679 A1 (CHUBINSKAYA S ET AL) 19 December 2002 (2002-12-19) the whole document insbesondere Zusammenfassung. ----- -/-	1,2,4-8, 10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 July 2009

Date of mailing of the international search report

02/10/2009

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Weber, Peter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2009/055059	
---	--

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2003/032030 A1 (PROLLA T ET AL) 13 February 2003 (2003-02-13) the whole document insbesondere Zusammenfassung. -----	1, 2, 4-8, 10
A	JU Z ET AL: "Telomere dysfunction induces environmental alterations limiting hematopoietic stem cell function and engraftment" NATURE MEDICINE, vol. 13, no. 6, June 2007 (2007-06), pages 742-747, XP002538828 the whole document insbesondere Zusammenfassung; Abbildung 4a; Seite 745, Spalte 1, Zeilen 3-8. -----	1, 2, 4-8, 10
A	BAKKENIST C J ET AL: "Disappearance of the telomere dysfunction-induced stress response in fully senescent cells." CANCER RES, vol. 64, no. 11, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 3748-3752, XP002538829 the whole document insbesondere Zusammenfassung; Absatz "ATM activation is a marker ..." auf Seite 3749. -----	1, 2, 4-8, 10
X	LI MING ET AL: "Proteomic analysis of the aging-related proteins in human normal colon epithelial tissue" J BIOCHEM MOL BIOL, vol. 40, no. 1, January 2007 (2007-01), pages 72-81, XP002538830 the whole document insbesondere Titel; Zusammenfassung; Tabelle 1, Spot No 3 und 40. -----	2, 4-8, 10
A	the whole document insbesondere Titel; Zusammenfassung; Tabelle 1, Spot No 3 und 40.	1
X	CZERNICKI T ET AL: "Gene expression profile as a prognostic factor in high-grade gliomas" INT J ONCOL, vol. 30, no. 1, January 2007 (2007-01), pages 55-64, XP002538831 the whole document insbesondere Titel; Abbildung 2, Spalte "EEF1A1"; Seite 60, Spalte 2, Zeilen 20-25. -----	2, 4, 5, 7, 10
A	the whole document insbesondere Ansprüche 1, 7, 8, 11, 14, 15, 18, 19. -----	1
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2009/055059

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/104488 A (CANCER CARE ONTARIO; LEE J M) 18 December 2003 (2003-12-18) the whole document insbesondere Titel; Ansprüche 4 und 6.	2,4-7,10 1
X	SUN Y ET AL: "Human prostatic carcinoma oncogene PTI-1 is expressed in human tumor cell lines and prostate carcinoma patient blood samples" CANCER RES, vol. 57, no. 1, 1997, pages 18-23, XP002538832	2,4-7,10
A	the whole document insbesondere Titel; Zusammenfassung.	1
P,X	JIANG H ET AL: "Proteins induced by telomere dysfunction and DNA damage represent biomarkers of human aging and disease" PROC NAT ACAD SCI USA, vol. 105, no. 32, August 2008 (2008-08), pages 11299-11304, XP002538833 cited in the application the whole document	1,2,4-8, 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2009/055059

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

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

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

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

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

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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.:

see additional sheet

Remark on Protest

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

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

1. Claims 1, 2, 4-8, 10 (in part)

Method for determining the state of ageing of an organism, for example the existence and extent of DNA damage and telomere dysfunction in humans and animals, based on the determination of the protein marker EF1 α in a sample.

2. Claims 1, 2, 4-8, 10 (in part), 3, 9 (in full)

Method for determining the state of ageing of an organism, for example the existence and extent of DNA damage and telomere dysfunction in humans and animals, based on the determination of chitobiosidases in a sample.

3. Claims 1, 2, 4-8, 10 (in part)

Method for determining the state of ageing of an organism, for example the existence and extent of DNA damage and telomere dysfunction in humans and animals, based on the determination of the protein marker stathmin in a sample.

4. Claims 1, 2, 4-8, 10 (in part)

Method for determining the state of ageing of an organism, for example the existence and extent of DNA damage and telomere dysfunction in humans and animals, based on the determination of the protein marker CRAMP in a sample.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/055059

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
JP 8319298	A	03-12-1996		NONE
JP 2002107363	A	10-04-2002	JP 3754611 B2	15-03-2006
US 2002192679	A1	19-12-2002	US 2008213807 A1 US 2007015178 A1	04-09-2008 18-01-2007
US 2003032030	A1	13-02-2003	US 2006068438 A1	30-03-2006
WO 2007082073	A	19-07-2007	NONE	
WO 03104488	A	18-12-2003	AU 2003240326 A1 CA 2488413 A1	22-12-2003 18-12-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/055059

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. G01N33/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte 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, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	JP 08 319298 A (FUJIREBIO KK) 3. Dezember 1996 (1996-12-03) das ganze Dokument insbesondere Zusammenfassung. -----	1,2,4-8, 10
A	JP 2002 107363 A (ASAHI TECHNO GLASS CORP) 10. April 2002 (2002-04-10) das ganze Dokument insbesondere Zusammenfassung. -----	1,2,4-8, 10
A	US 2002/192679 A1 (CHUBINSKAYA S ET AL) 19. Dezember 2002 (2002-12-19) das ganze Dokument insbesondere Zusammenfassung. -----	1,2,4-8, 10
		-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

28. Juli 2009

02/10/2009

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

Weber, Peter

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/055059

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 2003/032030 A1 (PROLLA T ET AL) 13. Februar 2003 (2003-02-13) das ganze Dokument insbesondere Zusammenfassung. -----	1,2,4-8, 10
A	JU Z ET AL: "Telomere dysfunction induces environmental alterations limiting hematopoietic stem cell function and engraftment" NATURE MEDICINE, Bd. 13, Nr. 6, Juni 2007 (2007-06), Seiten 742-747, XP002538828 das ganze Dokument insbesondere Zusammenfassung; Abbildung 4a; Seite 745, Spalte 1, Zeilen 3-8. -----	1,2,4-8, 10
A	BAKKENIST C J ET AL: "Disappearance of the telomere dysfunction-induced stress response in fully senescent cells." CANCER RES., Bd. 64, Nr. 11, 1. Juni 2004 (2004-06-01), Seiten 3748-3752, XP002538829 das ganze Dokument insbesondere Zusammenfassung; Absatz "ATM activation is a marker ..." auf Seite 3749. -----	1,2,4-8, 10
X	LI MING ET AL: "Proteomic analysis of the aging-related proteins in human normal colon epithelial tissue" J BIOCHEM MOL BIOL, Bd. 40, Nr. 1, Januar 2007 (2007-01), Seiten 72-81, XP002538830	2,4-8,10
A	das ganze Dokument insbesondere Titel; Zusammenfassung; Tabelle 1, Spot No 3 und 40. -----	1
X	CZERNICKI T ET AL: "Gene expression profile as a prognostic factor in high-grade gliomas" INT J ONCOL, Bd. 30, Nr. 1, Januar 2007 (2007-01), Seiten 55-64, XP002538831	2,4,5,7, 10
A	das ganze Dokument insbesondere Titel; Abbildung 2, Spalte "EEF1A1"; Seite 60, Spalte 2, Zeilen 20-25. -----	1
X	WO 2007/082073 A (UNIV CALIFORNIA; WONG D T W; ZHOU X) 19. Juli 2007 (2007-07-19)	2,4,5,7, 10
A	das ganze Dokument insbesondere Ansprüche 1, 7, 8, 11, 14, 15, 18, 19. -----	1
		-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/055059

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 03/104488 A (CANCER CARE ONTARIO; LEE J M) 18. Dezember 2003 (2003-12-18) das ganze Dokument insbesondere Titel; Ansprüche 4 und 6.	2,4-7,10
A	SUN Y ET AL: "Human prostatic carcinoma oncogene PTI-1 is expressed in human tumor cell lines and prostate carcinoma patient blood samples" CANCER RES, Bd. 57, Nr. 1, 1997, Seiten 18-23, XP002538832 das ganze Dokument insbesondere Titel; Zusammenfassung.	1
X	JIANG H ET AL: "Proteins induced by telomere dysfunction and DNA damage represent biomarkers of human aging and disease" PROC NAT ACAD SCI USA, Bd. 105, Nr. 32, August 2008 (2008-08), Seiten 11299-11304, XP002538833 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	2,4-7,10
P,X		1,2,4-8, 10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

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 Recherchengebühren 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 Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung solcher Gebühren aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren 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 Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Dieser internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfasst:
s. Zusatzblatt

Bemerkungen hinsichtlich
eines Widerspruchs

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

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

1. Ansprüche: 1,2,4-8,10 (teilweise)

Verfahren zur Bestimmung des Alterungszustandes eines Organismus zum Beispiel des Vorliegens und des Ausmaß von DNA-Schädigung und Telomerdysfunktion in Mensch oder Tier basierend auf der Bestimmung des Proteinmarkers EF1alpha in einer Probe.

2. Ansprüche: 1,2,4-8,10 (teilweise) 3,9 (ganz)

Verfahren zur Bestimmung des Alterungszustandes eines Organismus zum Beispiel des Vorliegens und des Ausmaß von DNA-Schädigung und Telomerdysfunktion in Mensch oder Tier basierend auf der Bestimmung der Chitobiosidasen in einer Probe.

3. Ansprüche: 1,2,4-8,10 (teilweise)

Verfahren zur Bestimmung des Alterungszustandes eines Organismus zum Beispiel des Vorliegens und des Ausmaß von DNA-Schädigung und Telomerdysfunktion in Mensch oder Tier basierend auf der Bestimmung des Proteinmarkers Stathmin in einer Probe.

4. Ansprüche: 1,2,4-8,10 (teilweise)

Verfahren zur Bestimmung des Alterungszustandes eines Organismus zum Beispiel des Vorliegens und des Ausmaß von DNA-Schädigung und Telomerdysfunktion in Mensch oder Tier basierend auf der Bestimmung des Proteinmarkers CRAMP in einer Probe.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/055059

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
JP 8319298	A	03-12-1996	KEINE			
JP 2002107363	A	10-04-2002	JP	3754611 B2		15-03-2006
US 2002192679	A1	19-12-2002	US	2008213807 A1		04-09-2008
			US	2007015178 A1		18-01-2007
US 2003032030	A1	13-02-2003	US	2006068438 A1		30-03-2006
WO 2007082073	A	19-07-2007	KEINE			
WO 03104488	A	18-12-2003	AU	2003240326 A1		22-12-2003
			CA	2488413 A1		18-12-2003