(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
30. Oktober 2003 (30.10.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/089933 A1

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: G01N 33/68, 33/569, 33/573

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/03939

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. April 2003 (15.04.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
02008841.5 19. April 2002 (19.04.2002) EP

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **B.R.A.H.M.S AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; Neuendorfstr. 25, 16761 Hennigsdorf (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **BERGMANN, Andreas** [DE/DE]; Baumläuferweg 47, 12351 Berlin (DE). **STRUCK, Joachim** [DE/DE]; Holsteinische Strasse 28, 12161 Berlin (DE). **ÜHLEIN, Monika** [DE/DE]; Hufelandstrasse 15, 10407 Berlin (DE).

(74) Anwälte: **ANDRAE, Steffen** usw.; Andrae Flach Haug, Balanstr.55, 81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(national)*: JP, US.

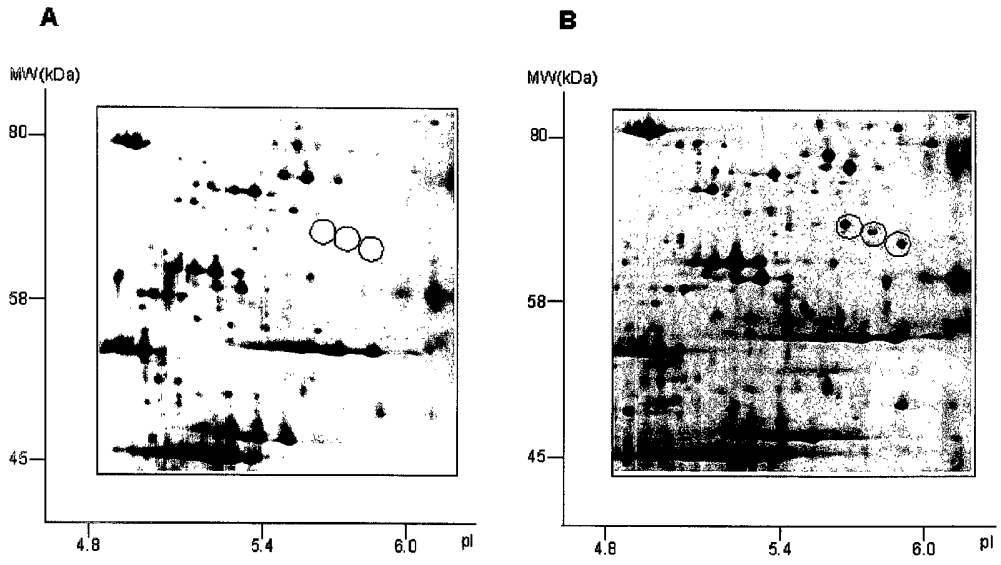
(84) Bestimmungsstaaten *(regional)*: europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

Veröffentlicht:
— *mit internationalem Recherchenbericht*

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: USES OF THE CARBAMOYL PHOSPHATE SYNTHESIS 1 (CPS 1) AND THE FRAGMENTS THEREOF FOR THE DIAGNOSIS OF INFLAMMATORY DISEASES AND SEPSIS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNGEN DER CARBAMOYLPHOSPHAT SYNTHESE 1 (CPS 1) UND IHRER FRAGMENTE FÜR DIE DIAGNOSE VON ENTZÜNDUNGSERKRANKUNGEN UND SEPSIS



(57) Abstract: The invention relates to the use of the carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS 1) and/or fragments of the N-terminal part of the CPS 1 of body fluids or body tissues, as marker peptides for diagnostic detection, and for the prognosis and control of the development of inflammations and infections, including sepsis, and liver failure in the case of multi-organ failure, or for determinations relating to inflammatory liver diseases and other liver diseases.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 03/089933 A1

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

(57) Zusammenfassung: Verwendung von der Carbamoylphosphat Synthetase 1 (CPS 1) und/oder von Fragmenten des N-terminalen Teils der CPS 1 aus Körperflüssigkeiten oder Körpergeweben als Markerpeptide zum diagnostischen Nachweis und für die Verlaufsprognose sowie die Verlaufskontrolle von Entzündungen und Infektionen, einschliesslich Sepsis, sowie von Leberversagen im Rahmen eines Multiorganversagens oder für Bestimmungen im Zusammenhang mit entzündlichen und anderen Lebererkrankungen.

VERWENDUNGEN DER CARBAMOYLPHOSPHAT SYNTHESE 1 (CPS 1) UND IHRER FRAGMENTE FÜR DIE DIAGNOSE VON ENTZÜNDUNGSERKRANKUNGEN UND SEPSIS

Die vorliegende Erfindung betrifft Verwendungen des Enzyms Carbamoylphosphat Synthetase 1 (E.C. 6.3.4.16, nachfolgend stets abgekürzt CPS 1) und neuer Fragmente davon für die medizinische Diagnostik von Entzündungserkrankungen und Sepsis. Sie beruht auf dem erstmaligen Nachweis des Auftretens von Fragmenten der CPS 1 in Lebergewebe von Primaten, bei denen experimentell durch Toxinverabreichunge eine Sepsis bzw. systemische Entzündung erzeugt worden war, sowie auf dem anschließenden Nachweis stark erhöhter Konzentrationen von CPS 1 in der Zirkulation von Sepsispatienten.

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

Als Entzündungen (Inflammationen) werden ganz allgemein bestimmte physiologische Reaktionen eines Organismus auf

verschiedenartige äußere Einwirkungen wie z.B. Verletzungen, Verbrennungen, Allergene, Infektionen durch Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze und Viren, auf Fremdgewebe, die Abstoßungsreaktionen auslösen, oder auf bestimmte entzündungsauslösende endogene Zustände des Körpers, z.B. bei Autoimmunerkrankungen und Krebs, bezeichnet. Entzündungen können als harmlose, lokal begrenzte Reaktionen des Körpers auftreten, sind jedoch auch typische Merkmale zahlreicher ernster chronischer und akuter Erkrankungen von einzelnen Geweben, Organen, Organ- und Gewebsteilen.

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

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

desaktivierende Substanzen (z.B. Interleukin-10) beteiligt sind.

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

Während wenigstens im europäischen Raum die durch eine positive Blutkultur nachweisbare systemische bakterielle Infektion lange den Sepsisbegriff prägte, wird die Sepsis heute in erster Linie als systemische Entzündung verstanden, die infektiöse Ursachen hat, als Krankheitsgeschehen jedoch große Ähnlichkeiten mit systemischen Entzündungen aufweist, die durch andere Ursachen ausgelöst werden. Dem genannten Wandel des Sepsis-Verständnisses entsprechen Veränderungen der diagnostischen Ansätze. So wurde der direkte Nachweis bakterieller Erreger durch komplexe Überwachungen physiolo-

gischer Parameter und in jüngerer Zeit insbesondere auch durch den Nachweis bestimmter am Sepsisgeschehen bzw. am Entzündungsgeschehen beteiligter endogener Substanzen, d.h. spezifischer "Biomarker", ersetzt bzw. ergänzt.

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

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

Veröffentlichung angeführte frühere Literaturstellen wird zur Ergänzung der vorliegenden Beschreibung ausdrücklich Bezug genommen.

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

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

In der vorliegenden Anmeldung wird ein Ergebnis eines anderen fruchtbaren, rein experimentellen Ansatzes für die Suche nach weiteren entzündungs- bzw. sepsisspezifischen Biomolekülen berichtet. Auch diese experimentellen Untersuchungen nehmen ihren Ausgang bei der Bestimmung von Procalcitin im Zusammenhang mit systemischen entzündlichen Reaktionen infektiöser Ätiologie. So war sehr früh beobachtet worden, dass bei Sepsis das Procalcitonin offensichtlich nicht auf

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

Da die bei Entzündungen gebildeten endogenen Substanzen Teil der komplexen Reaktionskaskade des Körpers sind, sind derartige Substanzen außerdem nicht nur von diagnostischem Interesse, sondern es wird gegenwärtig auch mit erheblichem Aufwand versucht, durch Beeinflussung der Entstehung und/-oder der Konzentration einzelner derartiger Substanzen therapeutisch in das Entzündungsgeschehen einzugreifen, um die zum Beispiel bei Sepsis beobachtete systemische Aus-

breitung der Entzündung möglichst frühzeitig zu stoppen. In diesem Sinne sind nachweislich am Entzündungsgeschehen beteiligte endogene Substanzen auch als potentielle therapeutische Targets anzusehen. Trotz der bisherigen eher enttäuschenden Ergebnisse derartiger therapeutischer Ansätze besteht weiterhin ein hohes Interesse daran, bisher im entsprechenden Zusammenhang nicht beschriebene, möglichst entzündungs- bzw. sepsisspezifische endogene Biomoleküle zu identifizieren, die auch als therapeutische Targets neue Erfolgsaussichten für die therapeutische Sepsiskontrolle eröffnen.

Die vorliegenden Erfindung beruht darauf, dass sich in Primaten und Menschen bei infektiös bedingten Entzündungen in der Zirkulation deutlich erhöhte Konzentrationen des Enzyms Carbamoylphosphat Synthetase (CPS 1), sowie Fragmente davon, nachweisen lassen, und zwar im Unterschied zu unbehandelten Kontrollindividuen bzw. Gesunden, bei denen diese nicht gefunden werden, was CPS 1 und ihre Fragmente für die Entzündungsdiagnostik/Sepsisdiagnosik geeignet macht.

Die Verwendungen in der Diagnostik, die sich aufgrund des erstmals nachgewiesenen Auftretens von CPS 1 und ihrer Fragmente bei der experimentellen Simulation von Entzündungen bzw. Sepsis sowie dem Nachweis deutlich erhöhter Konzentrationen von CPS 1-Immunreaktivität in Seren von Septikern eröffnen, werden in allgemeiner Form in den Ansprüchen 1 bis 7 beansprucht.

Die Ansprüche 8 bis 16 betreffen die sich aus den neuen Erkenntnissen ergebenden Varianten diagnostischer Verfahren

Wie nachfolgend im experimentellen Teil noch näher ausgeführt wird, war Ausgangspunkt der Erfindung die Feststellung, dass nach experimenteller Auslösung einer künstlichen Sepsis in Pavianen durch Endotoxinverabreichung (LPS aus Salmonella Typhimurium) und 2D-gelektrophoretischer Auf-

arbeitung von Lebergewebe der behandelten Tiere eine Gruppe von nur bei den behandelten Tieren identifizierbaren benachbarten Proteinspots gefunden werden konnte. Die den Spots entsprechenden proteinischen Produkte mit (gelektrophoretisch bestimmten) molaren Massen von ca. 68 kDa, 69 kDa und 70 kDa ± 3 kDa wurden aus dem Elektrophoresegel isoliert, massenspektrometrisch untersucht und als lösliche Fragmente von CPS 1 identifiziert.

Anschließend wurde unter Verwendung eines Immunoassays, der die genannten Fragmente erkannte, festgestellt, dass in der Zirkulation von Sepsispatienten in stark erhöhten Konzentrationen Bestandteile mit der Immunreaktivität dieser Fragmente gefunden werden, wobei sich diese Bestandteile bei einer genaueren Identifizierung (u.a. Abtrennung und Molekulargewichtsbestimmung) wenigstens überwiegend als das vollständige, oder wenigstens weitgehend vollständige, Enzym CPS 1 erwiesen.

Bei der massenspektrometischen Analyse von drei aus dem Gel isolierten Proteinspots, die als solche eine relativ geringe Intensität aufwiesen, durch Tandem-Massenspektrometrie wurden aus allen drei Proteinspots kurze, teilweise identische Teilpeptide ("Tags") identifiziert, die sich in identischer Form in der Sequenz der humanen CPS 1 (SEQ ID NO:6) wiederfanden, wobei die konkret identifizierten Peptide Aminosäuresequenzen aus dem N-terminalen Bereich der CPS 1 Aminosäuren bis zu Position 624 des CPS 1 (SEQ ID NO:6) umfaßten.

Aufgrund der Identität der identifizierten massenspektrometrischen Fragmente mit Teilsequenzen aus dem N-terminalen Teil der CPS 1 ist die Identifizierung der untersuchten Proteinspotss als CPS 1-Fragmente nach anerkannten Kriterien als eindeutig anzusehen.

Die Identifizierung der nur nach Sepsis- bzw. Entzündungs-

auslösung in dem Pavian-Lebergewebe gefundenen Proteine als Fragmente aus den N-terminalen Teil der CPS 1 ist von hohem wissenschaftlichen, diagnostischen und therapeutischen Interesse.

Die anschließende Feststellung, dass in der Zirkulation von menschlichen Sepsispatienten stark erhöhte Konzentrationen einer oder ggf. mehrerer Spezies mit der Immunreaktivität der identifizierten CPS 1-Fragmente beobachtet werden, die sich jedoch als das vollständige, oder wenigstens im wesentlichen vollständige, Enyzm CPS 1 erwiesen, das ggf. auch einer besonderen solubilisierten Form vorliegen kann, erhöhte den Wert der beschriebenen ersten Befunde noch erheblich.

Für die medizinische Diagnostik spielten CPS 1 bzw. CPS 1-Fragmente bisher noch keine praktische Rolle. Das Enzym CPS 1 ((E.C. 6.3.4.16) selbst ist jedoch seit langem gut bekannt. Es katalysiert die Umwandlung von Ammoniak, Bicarbonat und 2 ATP unter Bildung von Carbamoylphosphat im ersten Schritt des Harnstoffzyklus. Es spielt dabei auch eine Rolle bei der Biosynthese von Arginin, das seinerseits ein Substrat für die Biosynthese von NO, z.B. bei einem Endotoxin-Schock, ist (vgl. Shoko Tabuchi et al., Regulation of Genes for Inducible Nitric Oxide Synthase and Urea Cycle Enzymes in Rat Liver in Endotoxin Shock, Biochemical and Biophysical Research Communications 268, 221-224 (2000)). CPS 1 ist von dem cytosolischen Enzym CPS 2 (E.C. 2.7.2.5.) zu unterscheiden, das ebenfalls eine Rolle im Harnstoffzyklus spielt, jedoch das Substrat Glutamin verarbeitet. Es ist bekannt, dass CPS 1 in Mitochondrien lokalisiert ist und im Lebergewebe in dieser Form in großen Mengen (es macht von 2-6% des Leber-Gesamtproteins aus) vorkommt. Seine Aminosäuresequenz (SEQ ID NO:6) und genetische Lokalisierung ist seit langem bekannt (vgl. Haraguchi Y. et al, Cloning and sequence of a cDNA encoding human carbamyl phosphate synthetase I: molecular analysis of hyperammonemia, Gene 1991, Nov. 1; 107 (2):-335-340). Zu seiner physiologischen Rolle kann verwiesen

werden auf Reviewartikel wie z.B. H.M.Holder et al., Carbamoyl phosphate synthetase: an amazing biochemical odyssey from substrate to product, CMLS, Cell.Mol.Life Sci. 56 (1999) 507-522 und die darin referierte Literatur, sowie die Einleitung der Veröffentlichung Mikiko Ozaki et al., Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Carbamoylphosphate Synthetase I: Plasma Enzyme in Rat Experimental Hepatitis and Its Clearance, Enzyme Protein 1994, 95:48:213-221.

Gemäß Shoko Tabuchi et al., loc.cit. wird in Rattenlebern bei einem künstlichen Endotoxin-Schock (LPS) keine Erhöhung des Enzyms (Proteins) beobachtet. Gemäß Li Yin et al., Participation of different cell types in the restitutive response of the rat liver to periportal injury induced by allyl alcohol, Journal of Hepatology 1999, 31:497-507, läßt sich bei einer Leberschädigung durch Allylakohol bei histologischen Untersuchungen nach drei Tagen in allen Hepatocyten eine Steigerung der CPS 1-Expression beobachten.

Es wurde ferner festgestellt, dass sich im Rattenmodell bei einer durch Verabreichung von Galactosamin experimentell erzeugten akuten Hepatitis im Rattenplasma eine stark erhöhte immunologische CPS 1-Aktivität findet (nachgewiesen mit einem ELISA mit anti-Ratten CPS 1 IgG aus Kaninchen), und zwar 24-48 h nach der Behandlung mit dem Hepatitis-auslösenden Galactosamin. Im Rattenplasma wurden während der akuten Hepatitis auch zunehmend CPS 1-Fragmente mit molaren Massen von ca. 140 und 125 kDa ohne sonstige nähere Charakterisierung (Sequenzzuordnung) erkennbar, während bei einer begleitenden Immunoblotting-Analyse in humanen Autopsie-Proben keine CPS 1-Fragmente mit CPS 1-Immunreaktivität beobachtet werden konnten (Mikiko Ozaki et al., loc. cit.).

Eine Eignung von im wesentlichen vollständiger CPS 1 und von löslichen CPS 1-Fragmenten, insbesondere von Fragmenten mit molaren Massen von 68-70 kDa ± 3 kDa aus dem N-terminalen Teil der CPS 1, als Biomarker für die Diagnose von Entzün-

dungen und Sepsis bei Menschen, der in humanem Serum oder Plasma bestimmt werden kann, läßt sich aus den Literaturbefunden nicht ableiten.

Aufgrund der nachgewiesenen verstärkten Bildung der humanen CPS 1 bei Sepsis, und von Fragmenten von CPS 1 bei Pavianen mit einer experimentell erzeugten Sepsis, und zwar im Gegensatz zu unbehandelten bzw. gesunden Patienten bzw. Tieren, in deren Zirkulation bzw. Lebergewebe trotz identischer Aufarbeitung und Lagerung keine derartigen Fragmente nachweisbar waren, eignen sich CPS 1 und ihre Fragmente für diagnostische Zwecke. Werden für den Nachweis nach an sich bekannten immundiagnostischen Verfahren CPS 1 und ihre Fragmente als Reagenzien oder zur Erzeugung bestimmter spezifischer Antikörper benötigt, können die Fragment nach Verfahren, die inzwischen zum Stand der Technik gehören, synthetisch oder gentechnologisch als Rekombinationsprodukte hergestellt werden.

Ferner können die benötigten CPS 1-Fragmente nach bekannten Verfahren des modernen Standes der Technik auch zur Erzeugung spezifischer polyklonaler oder monoklonaler Antikörper verwendet werden, die als Hilfsmittel für die diagnostische Bestimmung der erfindungsgemäßen Peptide und/oder auch als potentielle therapeutische Mittel geeignet sind. Die Erzeugung geeigneter monoklonaler oder polyklonaler Antikörper gegen bekannte Peptid-Teilsequenzen gehört heute zum allgemeinen Stand der Technik.

Bei der Bestimmung von CPS 1 bzw. CPS 1-Fragmenten in Patientenseren kann grundsätzlich so vorgegangen werden, wie das z.B. für die selektive Procalcitoninbestimmung beschrieben ist in P.P.Ghillani, et al., "Monoclonal antipeptide antibodies as tools to dissect closely related gene products", The Journal of Immunology, vol. 141, No.9, 1988, 3156-3163; und P.P.Ghillani, et al., "Identification and Measurement of Calcitonin Precursors in Serum of Patients

with Malignant Diseases", Cancer research, vol.49, No.23, 1989, 6845-6851; wobei ausdrücklich ergänzend auch auf die dort beschriebenen Immunisierungstechniken verwiesen wird, die eine Möglichkeit für die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern auch gegen Teilsequenzen der CPS 1 darstellen. Variationen der beschriebenen Techniken und/oder weitere Immunisierungstechniken kann der Fachmann einschlägigen Standardwerken und Veröffentlichungen entnehmen und sinngemäß anwenden. Ein bevorzugter Immunoassay zur Bestimmung von CPS 1 in humanen biologischen Flüssigkeiten, insbesondere humanem Serum oder Plasma, wird nachfolgend, zusammen mit damit gewonnenen Messergebnissen und der näheren Charakterisierung des nachgewiesenen Analyten, im experimentellen Teil beschrieben.

Als Verwendung im Sinne der vorliegenden Anmeldung ist auch eine Verwendung von CPS 1 bzw. löslichen CPS 1-Fragmenten als Bestandteil (Reagens) eines Assaykits anzusehen, oder eine Verwendung zur Erzeugung von Assaykomponenten, z.B. poly- oder monoklonalen Antikörpern, die z.B. in immobilisierter und/oder markierter Form in der Regel ebenfalls in Assaykits vorgesehen sind.

Dabei ist auch ausdrücklich die Erzeugung von CPS 1-Antikörpern unter Anwendung von Techniken der direkten genetischen Immunisierung mit DNA zu erwähnen. Es liegt im Rahmen der vorliegenden Erfindung, zur Immunisierung z.B. eine cDNA von CPS 1 oder der gewünschten CPS 1-Fragmente zu verwenden, da es sich in der Vergangenheit gezeigt hat, dass durch derartige Immunisierungstechniken das Spektrum der gewinnbaren Antikörper erweitert werden kann.

Es ist zusätzlich ausdrücklich darauf hinzuweisen, dass es bei der erfindungsgemäßen Bestimmung von CPS 1 oder CPS 1-Fragmenten aus dem N-terminalen Teil der CPS 1-Sequenz je nach Assaydesign auch dazu kommen kann, dass ggf. gleichzeitig in der biologischen Flüssigkeit vorhandene andere, z.B.

längere lösliche CPS 1-Bruchstücke, die diese Fragmente enthalten, oder auch in löslicher Form vorliegende Formen der vollständigen CPS 1 (die normalerweise in den Mitochondrien lokalisiert ist) bestimmtm oder mitbestimmt werden. Auch derartige Verfahren sind, im Sinne der vorliegenden Erfindung, als erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung von CPS 1 bzw. CPS 1-Fragmenten anzusehen.

CPS 1 gemäß SEQ ID NO:6 oder lösliche Formen davon oder lösliche Teilpeptide davon, z.B. solche, die eine der Teilsequenzen von SEQ ID NO:1 bis SEQ ID NO:5 und/oder andere Teilsequenzen aus dem N-Terminus von CPS 1 enthalten oder daraus bestehen, können somit aufgrund der vorliegenden Ergebnisse als spezifische Markerpeptide (Biomarker) zum diagnostischen Nachweis und zur Verlaufskontrolle von Entzündungen und Infektionen (insbesondere, wie Procalcitonin, auch von systemischen Infektionen vom Sepsistyp) dienen.

An Stelle der Bestimmung von CPS 1 oder der CPS 1-Bruchstücke oder ggf. posttranslational modifizierter Formen davon soll für diagnostische Zwecke ggf. auch eine Bestimmung der zugehörigen mRNA nicht ausgeschlossen sein. Die CPS 1-Bestimmung kann für diagnostische Zwecke u.U. auch indirekt als Bestimmung einer Enzymaktivität, die der CPS 1-Aktivität oder der Restaktivität der CPS 1-Fragmente entspricht, erfolgen.

Es ist ferner möglich, die Bestimmung von CPS 1 und/oder CPS 1-Fragmenten als Prognosemarker und Marker für die Überwachung des Krankheitsverlaufs von Entzündungen, insbesondere systemischen Entzündungen, und Sepsis im Rahmen einer Kombinationsmessung mit anderen Markern durchzuführen.

Neben einer Kombination mit einer Procalcitoninmessung kommt insbesondere eine Kombination der Messung von CPS 1 mit der Bestimmung anderer Marker für Sepsis und systemische Entzündungen in Betracht, und zwar insbesondere mit CA 19-9, CA

125, S100B oder an der Regulierung von Entzündungen beteiligten S100A-Proteinen, oder mit der Bestimmung der in den älteren, nachfolgend genannten unveröffentlichten deutschen Patentanmeldungen der Anmelderin beschriebenen neuartigen Sepsismarker Inflammin (DE 101 19 804.3) und CHP (DE 101 31 922.3), des Proteins LASP-1 und/oder mit der Bestimmung von löslichen Cytokeratinfragmenten, insbesondere der neu aufgefundenen löslichen Cytokeratin-1-Fragmente (sCY1F;; DE 101 30 985.6) sowie der bekannten Tumormarker CYFRA-21 oder TPS und/oder eines oder mehrerer der o.g. Prohormone. Auch eine gleichzeitige Bestimmung des bekannten Entzündungsparameters C-reaktives Protein (CRP) kann vorgesehen sein. Aufgrund der in dieser und den verwandten Anmeldungen der Anmelderin beschriebenen neuen Ergebnisse ist für die Sepsis-Feindiagnose außerdem generell eine Kombination mit Messungen von bekannten oder noch aufzufindenden Biomolekülen in Betracht zu ziehen, die als gewebe- bzw. organspezifische Entzündungsmarker geeignet sind.

Die eigentliche CPS 1-Bestimmung kann auf irgendeine geeignete, an sich bekannte Weise erfolgen, wobei Immunoassays eines geeigneten Assaydesigns bevorzugt sind.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird die immundiagnostische Bestimmung als heterogener Sandwich-Immunoassay durchgeführt, bei dem einer der Antikörper an eine beliebige Festphase, beispielsweise die Wände beschichteter Teströhrchen (z.B. aus Polystyrol; "Coated Tubes"; CT) oder an Mikrotiterplatten, zum Beispiel aus Polystyrol, oder an Partikel, beispielsweise Magnetpartikel immobilisiert ist, während der andere Antikörper einen Rest trägt, der ein direkt nachweisbares Label darstellt oder eine selektive Verknüpfung mit einem Label ermöglicht und der Detektion der gebildeten Sandwich-Strukturen dient. Auch eine zeitlich verzögerte bzw. nachträgliche Immobilisierung unter Verwendung geeigneter Festphasen ist möglich.

Grundsätzlich können alle in Assays der beschriebenen Art verwendbaren Markierungstechniken angewandt werden, zu denen Markierungen mit Radioisotopen, Enzymen, Fluoreszenz-, Chemolumineszenz- oder Biolumineszenz-Labeln und direkt optisch detektierbaren Farbmarkierungen, wie beispielsweise Goldatomen und Farbstoffteilchen, wie sie insbesondere für sog. Point-of-Care (POC) oder Schnelltests verwendet werden, gehören. Die beiden Antikörper können auch im Falle heterogener Sandwich-Immunoassays Teile eines Nachweissystems der nachfolgend im Zusammenhang mit homogenen Assays beschriebenen Art aufweisen.

Es liegt somit im Rahmen der vorliegenden Erfindung, das erfindungsgemäße Verfahren auch als Schnelltest auszugestalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann ferner als homogenes Verfahren ausgestaltet werden, bei dem die aus den beiden Antikörpern und dem nachzuweisenden CPS 1 gebildeten Sandwichkomplexe in der flüssigen Phase suspendiert bleiben. In einem solchen Fall ist es bevorzugt, beide Antikörper mit Teilen eines Nachweissystems zu markieren, das dann, wenn beide Antikörper in einen einzigen Sandwich integriert werden, eine Signalerzeugung oder Signalauslösung ermöglicht. Derartige Techniken sind insbesondere als Fluoreszenzverstärkungs- oder Fluoreszenzlöschungs-Nachweisverfahren ausgestaltbar. Ein besonderes bevorzugtes derartiges Verfahren betrifft die Verwendung von paarweise einzusetzenden Nachweisreagenzien, wie sie beispielsweise beschrieben sind in US-A-4 822 733, EP-B1-180 492 oder EP-B1-539 477 und dem darin zitierten Stand der Technik. Sie ermöglichen eine Messung, die selektiv nur Reaktionsprodukte erfaßt, die beide Markierungskomponenten in einem einzigen Immunkomplex enthalten, direkt in der Reaktionsmischung. Als Beispiel ist auf die unter den Marken TRACE® (Time Resolved Amplified Cryptate Emission) bzw. KRYPTOR® angebotene Technologie zu verweisen, die die Lehren der o.g. Anmeldungen umsetzt.

Der Inhalt der genannten älteren Anmeldungen der Anmelderin ist durch die ausdrückliche Bezugnahme auf diese Anmeldungen als Teil der Offenbarung der vorliegenden Anmeldung anzusehen.

Nachfolgend wird die Auffindung und Identifizierung der CPS 1-Fragmente, sowie die Bestimmung von Substanzen mit der Immunreaktivität dieser Fragmente in der menschlichen Zirkulation, die sich anschließend als das wenigstens im wesentlichen vollständige Enzym CPS 1 bzw. eine lösliche Form davon erwiesen, in näheren Einzelheiten geschildert, wobei auf das beigefügte Sequenzprotokoll bezug genommen wird. Die Figuren zeigen:

Fig. 1 Ansichten von 2D-Elektrophoresegelen, die einen Vergleich der Spotmuster von cytoplasmatischen Leberzellproteinen eines gesunden Pavians (A) mit den Leberzellproteinen eines Pavians 5h nach einer durch LPS-Verabreichung induzierten Sepsis (B) ermöglichen. Der Pfeil zeigt die Positionen der drei erfindungsgemäßen sepsisspezifischen Produkte (CPS 1-Fragmente) an, die in Darstellung (B) durch einen Kreis hervorgehoben sind.

Fig. 2 die Ergebnisse der Messung der CPS 1-Immunreaktivität in Plasmen von gesunden Normalpersonen und Patienten mit Sepsis mit einem im experimentellen Teil genauer beschreibenen Immunoassay, wobei die gestrichelte Linie die untere Nachwesgrenze des Tests anzeigt.

Fig.3 Western-Blot-Banden von Plasmaproben unter Verwendung von anti-CPS Antiseren. Aufgetragen wurden (Panel A) Proben von Normalpersonen (N1-N3) und Sepsispatienten (S1-S3). Zur Detektion von CPS 1 wurde ein Gemisch von Antiseren gegen zwei defi-

nierte CPS 1-Epitope (Pos. 184-199 und 245-257 der CPS 1 gemäß SEQ ID NO:6) eingesetzt. Die Spezifität der Reaktion wurde geprüft, indem in einem zweiten Ansatz (Panel B) die Antiseren mit einem Überschuß der Peptide vorinkubiert wurden, die zur Immunisierung bzw. Gewinnung der Antiseren eingesetzt worden waren. Die Positionen der Molekulargewichtsmarker sind angezeigt.

Fig. 4 ein CPS 1-Immunchromatogramm einer Gelfiltrationschromatographie von Sepsisplasma. 100 µl eines Sepsisplasmas wurden über eine Bio-Sil SEC-400HPLC-Säule chromatographiert. Es wurden Fraktionen á 1 ml gesammelt, und die CPS 1-Immunreaktivität der einzelnen Fraktionen wurde gemessen. Positionen von Größenstandards, die in einem getrennten Lauf chromatographiert wurden, sind angegeben.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Infektionssimulation durch Endotoxinverabreichung im Tiermodell (Paviane).

In Anlehnung an die mit Pavianen durchgeführten Versuche zur Stimulierung der Procalcitonin-Ausschüttung durch Endotoxininjektionen (vgl.H.Redl, et al., "Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: Relationship to cytokines and neopterin", Crit Care Med 2000, Vol.28. No.11, 3659-3663; H.Redl, et al., "Non-Human Primate Models of Sepsis", in: Sepsis 1998; 2:243-253) wurden Pavianen (männlich, ca. 2 Jahre alt, 27 bis 29 kg schwer) jeweils 100 µg LPS (Lipopolysaccharid aus Salmonella Typhimurium, Bezugsquelle: Sigma) pro kg Körpergewicht intravenös verabreicht. 5 bis 5,5 h nach der Injektion wurden die Tiere durch intravenöse Verabreichung von 10 ml Doletal getötet. Innerhalb von 60 min nach ihrem Exitus wurden sämtliche

Organe/Gewebe präpariert und durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff stabilisiert.

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

Weil Versuche mit den wie oben gewonnenen Proben ergeben hatten, dass die größten Procalcitoninmengen in Lebergewebe behandelter Tiere gefunden wird, wurde für die Suche nach neuen sepsisspezifischen Biomarkern mit Proteinextrakten aus der Pavianleber gearbeitet.

2. Proteomanalyse unter Verwendung cytoplasmatischer Leberzellproteine von Pavianen.

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

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

Zur Auswertung wurden die Proteinspotmuster der Proben unbehandelter Tieren mit den Proteinspotmustern verglichen, die aus Lebergewebeproben behandelter Tiere resultierten. Substanzen, die bei keiner Kontrollprobe, aber bei allen behandelten Tieren zusätzlich auftraten, wurden für weitere analytische Untersuchungen selektiert. Fig. 1 zeigt einen Vergleich der 2D-Elektrophoresegele für eine Kontrollprobe (A) und eine Probe eines behandelten Tieres (B), wobei drei zusätzliche Proteinspots in (B) mit molaren Massen von ca. 68 kDa, 69 kDA und 70 kDa (± 3 kDa) und isoelektrischen Punkten von ca. 6,0, 5,8 bzw. 5,6 durch einen Pfeil und einen Kreis hervorgehoben sind.

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

Die für die weitere Analyse vorselektierten Proteinspots wurden aus dem Gel ausgeschnitten.

Die Proteinspots wurden jeweils unter Anwendung der Methode, die in A.Otto, et al., "Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis using an effective sample preparation for mass spectrometry", Electrophoresis 1996, 17, 1643-1650; beschrieben ist, trypsinverdaut und anschließend massenspektroskopisch analysiert

und zwar unter Anwendung massenspektrometrischer Untersuchungen, wie sie z.B. in G.Neubauer, et al., "Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex", in: nature genetics vol. 20, 1998, 46-50; J.Lingner, et al., "Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase", in: Science, Vol.276, 1997, 561-567; M.Mann, et al., "Use of mass spectrometry-derived data to annotate nucleotide and protein sequence databases", in: TRENDS in Biochemical Sciences, Vol.26, 1, 2001, 54-61; beschrieben und diskutiert werden.

Dabei wurden Fragmente des Trypsinverdaus aller drei Proteinspots nach einer ESI (ElectroSprayIonisierung) auch einer Tandem-Massenspektrometrie unterzogen. Es wurde ein Q-TOF-Massenspektrometer mit einer sog. nanoflow-Z-Spray-Ionenquelle der Firma Micromass, UK, verwendet. Dabei wurde entsprechend der Arbeitsanleitung des Geräteherstellers gearbeitet.

3. Identifizierung von CPS 1-Fragmenten

Wie in den Figuren 1(A) und 1(B) gezeigt ist, finden sich in Leberzellextrakten von Pavianen, denen eine LPS-Injektion verabreicht worden war, u.a. drei neue Proteinspots, für die aufgrund der Gelektrophoresedaten im Vergleich mit Markersubstanzen mit bekanntem Molekulargewicht Molekulargewichte von ca. 68 kDa, 69 kDa und 70 kDa (± 3 kDa) abgeschätzt wurden, während aus der relativen Position der Proteine aus der ersten Dimension zugehörige isoelektrische Punkte von etwa 6,0, 5,8 bzw. 5,6 ermittelt wurden, d.h. isoelektrische Punkte im Bereich von ca. 5,5 bis 6,1.

Diese Proteine wurden wie oben erläutert massenspektrometrisch analysiert.

Aus den "Mutterspektren" der drei trypsinverdauten Poteine

wurden jeweils einzelne Fragmente ("Tags") durch Tandem-Massenspektroskopie identifiziert. Die für diese Fragmente erhaltenen Massenspektren konnten auf an sich bekannte Weise rechnerisch ausgewertet werden und lieferten die folgenden Ergebnisse (massenspektrometrisch ist keine Unterscheidung zwischen den Aminosäuren Leucin (L) und Isoleucin (I) sowie den Aminosäuren Lysin (K) und Glutamin (Q) möglich; die nachfolgenden Sequenzen berücksichtigen daher bereits die Zuordnung zum bekannten Spektrum der vollständigen CPS 1 gemäß SEQ ID NO:6):

Proteinspot bei 70 kDa (± 3 kDa):

Fragment 70/1:	GQNQPVLNITN	(SEQ ID NO:1)
Fragment 70/2:	NQPVLNI	(SEQ ID NO:2)
Fragment 70/3:	AQTAHIVLEDGTK	(SEQ ID NO:3)

Proteinspot bei 69 kDa (± 3 kDa):

Fragment 69/1:	GQNQPVLNITN	(SEQ ID NO:1)
Fragment 69/2:	TAHI	(SEQ ID NO:4)

Proteinspot bei 68 kDa (± 3 kDa):

Fragment 68/1:	NQPVLNI	(SEQ ID NO:2)
Fragment 68/2:	AFAMTNQILVEK	(SEQ ID NO:5).

Die obigen Teilsequenzen gemäß SEQ ID NO:1 bis SEQ ID NO:5 konnten als Teilsequenzen der unter NiceProt View of SWISS PROT: P31327 zu findenden Sequenz der humanen CPS 1 mit einer Aminosäurekette einer Länge von 1500 Aminosäuren und einer zugehörigen rechnerischen molaren Masse (ohne Berücksichtigung evtl. posttranslationaler Modifizierungen) von 164,939 kDa (SEQ ID NO:6) identifiziert werden. Es ergab sich die folgenden Zuordnung der Teilpeptide:

SEQ ID NO:1 Aminosäuren 317 - 327

SEQ ID NO:2 Aminosäuren 319 - 325
SEQ ID NO:3 Aminosäuren 43 - 55
SEQ ID NO:4 Aminosäuren 45 - 48
SEQ ID NO:5 Aminosäuren 613 - 624

Die gefundenen Aminosäuren überspannen einen Abschnitt von Aminosäure 43 bis Aminosäure 624, d.h. einen wesentlichen Teil des aminoterminalen Teils der CPS 1.

Es ist ergänzend darauf hinzuweisen, dass sich die gefundenen Sequenzen nicht dem verwandten cytosolischen Enzym CPS 2 zuordnen ließen.

4. CPS 1-Immunreaktivitäts-Bestimmungen in humanen Plasmen von gesunden Normalpersonen und Sepsispatienten

4.1 Material und Methoden

4.1.1. Peptidsynthesen

Abgeleitet von der bekannten Aminosäuresequenz des humanen CPS 1 wurden zwei Bereiche ausgewählt (Pos. 184-199: Peptidbereich 1; SEQ ID NO:7; Pos. 245-257: Peptidbereich 2; SEQ ID NO:8). Jeweils ergänzt um einen N-terminalen Cystein-Rest wurden beide Bereiche nach Standardverfahren als lösliche Peptide chemisch synthetisiert, gereinigt, mittels Massenspektrometrie und Reversed Phase HPLC qualitätskontrolliert und in Aliquots lyophilisiert (Firma JERINI AG, Berlin, Deutschland). Die Aminosäuresequenzen der Peptide lauten:

Peptid PCEN17: CEFEGQPVDFVDPNKQN SEQ ID NO:7
Peptid PCVD14: CVPWNHDFTKMEYD SEQ ID NO:8

Rekombinantes Standardmaterial wurde von der Fima InVivo GmbH (Hennigsdorf, Deutschland) bezogen. Es handelte sich um einen kruden Zellextrakt eines E. coli-Stamms, der den rekombinanten N-terminalen Bereich von humaner CPS 1 (Pos.

1-640 aus SEQ ID NO:6), ergänzt um einen N-terminalen Strep-tag, exprimierte. Dem Extrakt wurde eine arbiträre Konzentration an CPS 1 zugeschrieben.

4.1.2. Konjugation und Immunisierung

Mittels MBS (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimid Ester) wurden die o.g. Peptide PCEN17 und PCVD14 an das Trägerprotein KLH (Keyhole limpet hemocyanin) konjugiert (s. Arbeitsanleitung "NHS-Esters-Maleimide Crosslinkers" Firma PIERCE, Rockford, IL, USA). Mit diesen Konjugaten wurden Schafe nach folgendem Schema immunisiert: Jedes Schaf erhielt initial 100 µg Konjugat (Massenangabe bezogen auf den Peptid-Anteil des Konjugats) und anschließend 4-wöchentlich je 50 µg Konjugat (Massenangabe bezogen auf den Peptid-Anteil des Konjugats). Beginnend mit dem vierten Monat nach Beginn der Immunisierung wurden 4-wöchentlich je Schaf 700 ml Blut abgenommen und daraus durch Zentrifugation Antiserum gewonnen. Konjugationen, Immunisierungen und Gewinnung von Antiseren wurden von der Firma MicroPharm, Carmarthenshire, UK, durchgeführt.

4.1.3. Reinigung der Antikörper

In einem 1-Schritt Verfahren wurden aus den Antiseren, die beginnend mit dem vierten Monat nach der Immuniserung gewonnen worden waren, die Peptid-spezifischen Antikörper präpariert.

Dazu wurden zunächst die Peptide PCEN17 und PCVD14 an SulfoLink Gel gekoppelt (s. Arbeitsanleitung "SulfoLink Kit" Firma PIERCE, Rockford, IL, USA). Dabei wurden zur Kopplung je 5 mg Peptid pro 5 ml Gel angeboten.

Die Affinitätsreinigung von Peptid-spezifischen Antikörpern aus Schaf Antiseren gegen beide Peptide wurde wie folgt durchgeführt:

Die Peptid-Säulen wurden zunächst drei mal im Wechsel mit je 10 ml Elutionspuffer (50 mM Citronensäure, pH 2.2) und Bindungspuffer (100 mM Natriumphosphat, 0.1% Tween, pH 6.8) gewaschen. 100 ml der Antiseren wurden über 0,2 µm filtriert und mit dem vorhandenen Säulenmaterial versetzt. Dazu wurde das Gel quantitativ mit 10 ml Bindungspuffer aus der Säule gespült. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur unter Schwenken. Die Ansätze wurden quantitativ in Leersäulen (NAP 25, Pharmacia, entleert) überführt . Die Durchläufe wurden verworfen. Anschließend wurde mit 250 ml Bindungspuffer proteinfrei (Proteingehalt des Waschеluats < 0,02 A280 nm) gewaschen. Auf die gewaschene Säulen wurde Elutionspuffer gegeben, und es wurden Fraktionen à 1 ml gesammelt. Von jeder Fraktion wurde der Proteingehalt mittels der BCA-Methode (s. Arbeitsanleitung Firma PIERCE, Rockford, IL, USA) bestimmt. Fraktionen mit Proteinkonzentrationen > 0.8 mg/ml wurden gepoolt. Nach Proteinbestimmung der Pools mittels der BCA-Methode ergaben sich Ausbeuten von 27 mg für den anti- PCEN17 Antikörper und 33 mg für den anti- PCVD14 Antikörper.

4.1.4. Markierung

Über eine NAP-5 Gelfiltrationssäule (Pharmacia) wurden 500 µl des gereinigten anti- PCEN17 Antikörpers (s.o.) in 1 ml 100 mM Kalium-Phosphatpuffer (pH 8,0) nach Arbeitsanleitung umgepuffert. Die Proteinkonzentationsbestimmung der Antikörperlösung ergab einen Wert von 1,5 mg/ml.

Zur Chemilumineszenzmarkierung des Antikörpers wurden 67 µl der Antikörperlösung mit 10 µl MA70-Akridinium-NHS-Ester (1 mg/ml; Firma HOECHST Behring) versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 423 µl 1 M Glycin zugesetzt und weitere 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Markierungsansatz über eine NAP-5 Gelfiltrationssäule (Pharmacia) in 1 ml Laufmittel A (50 mM Kaliumphosphat, 100 mM NaCl, pH 7.4) nach Arbeitsanleitung umge-

puffert und dabei von niedermolekularen Bestandteilen befreit. Zur Abtrennung letzter Reste nicht an Antikörper gebundenen Labels wurde eine Gelfiltrations-HPLC durchgeführt (Säule: Waters Protein Pak SW300). Die Probe wurde aufgetragen und bei einer Flußrate von 1 ml/min mit Laufmittel A chromatographiert. Mit einem Duchflußphotometer wurden die Wellenlängen 280 nm und 368 nm gemessen. Das Absorptionsverhältnis 368 nm/280 nm als Maß für den Markierungsgrad des Antikörpers betrug am Peak 0.10. Die monomeren Antikörper enthaltenden Fraktionen (Retentionszeit 8-10 min) wurden gesammelt und in 3 ml 100 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, 5% Bovines Serum Albumin, 0.1% Natrium Azid, pH 7.4, gesammelt.

4.1.5. Kopplung

Bestrahlte 5 ml Polystyrolröhrchen (Firma Greiner) wurden mit gereinigtem anti-PCVD14 Antikörper wie folgt beschichtet: Der Antikörper wurde in 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,8 zu einer Konzentration von 6.6 µg/ml verdünnt. In jedes Röhrchen wurden 300 µl dieser Lösung pipettiert. Die Röhrchen wurden 20 Stunden bei 22°C inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt. Dann wurde jedes Röhrchen mit 4.2 ml 10 mM Natriumphosphat, 2% Karion FP, 0.3% Bovines Serum Albumin, pH 6.5 befüllt. Nach 20 Stunden wurde die Lösung abgesaugt. Schließlich wurden die Röhrchen in einem Vakuumtrockner getrocknet.

4.2. Durchführung und Auswertung des Immunoassays

4.2.1. Assaygestaltung

Es wurde ein Assaypuffer folgender Zusammensetzung hergestellt:

100 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, 5% Bovines Serum Albumin, 0.1% unspez. Schaf IgG, 0.1% Natrium Azid, pH 7.4

Als Standardmaterial diente in E. coli exprimiertes rekombinantes humanes CPS 1 in Form eines kruden E. coli-Extrakts, enthaltend das gesamte lösliche intrazelluläre Protein. Dieser Extrakt wurde seriell in Pferdenormalserum (Firma SIGMA) verdünnt. Den so hergestellten Standards wurden arbiträre Konzentrationen gemäß ihrer Verdünnung zugeschrieben.

4.2.2. Messung von EDTA-Plasmen von augenscheinlich Gesunden und von Patienten mit Sepsis.

In die o.g. Teströhrchen wurden je 50 µl Standard bzw. Probe sowie 200 µl Assaypuffer pipettiert. Es wurde 18 Stunden bei 22°C unter Schütteln inkubiert. Dann wurde 4 x mit je 1 ml Waschlösung (0.1% Tween 20) pro Röhrchen gewaschen. Dann wurde in jedes Röhrchen 200 µl Assaypuffer, enthaltend 0.5 Millionen RLU des MA70-markierten Tracer-Antikörpers, pipettiert. Es wurde zwei Stunden bei 22°C unter Schütteln inkubiert. Dann wurde 4 x mit je 1 ml Waschlösung (0.1% Tween 20) pro Röhrchen gewaschen, abtropfen gelassen und die am Röhrchen gebundene Chemilumineszenz in einem Luminometer (Firma BERTHOLD, LB952T; Basisreagenzien BRAHMS AG) vermessen.

Unter Verwendung der Software MultiCalc (Spline Fit) wurde die Konzentration an CPS 1 Immunreaktivität abgelesen. Die Ergebnisse sind in Figur 2 gezeigt. Es ist eine eindeutige Unterscheidung von Gesunden und Sepsispatienten zu erkennen.

5. Western-Blot Analysen von Plasmen

Zur näheren molekularen Charakterisierung der CPS 1 Immunreaktivität in Sepsisplasmen wurden Proben solcher Plasmen mittels Western-Blot analysiert:

5.1. Gelherstellung

Es wurde ein 7,5%iges SDS-Trenngel für eine PROTEAN II xi Cell (Fa. BIO-RAD) gemäß Anleitung Fa. Bio-Rad gegossen:

11.25 ml 1 M Tris pH 8,8
+ 7,5 ml 30% Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1), Fa. Biorad
+ 10,79 ml Milli-Q-Wasser
+ 300 µl 10% SDS
+ 150 µl 10% APS
+ 15 µl TEMED

Nach Überschichtung mit Wasser und Polymerisation wurde ein 5%iges SDS-Sammelgel wie folgt gegossen:

1.25 ml 1 M Tris pH 6,8
+ 1.33 ml 30% Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1), Fa. Biorad
+ 7.26 ml Milli-Q-Wasser
+ 100 µl 10% SDS
+ 50 µl 10% APS
+ 10 µl TEMED

5 ml Sammelgellösung wurden auf das Trenngel pipettiert, der Kamm eingesteckt und polymerisieren gelassen.

5.2. Gelelektrophorese

Je 5 µl von EDTA-Plasmaproben von drei gesunden Kontrollpersonen sowie von drei Sepsispatienten wurden mit 20 µl PBS, 2.5 µl Glycerin und 5 µl Cracking buffer (120 mM Tris/-HCl, pH 6.4, 2% SDS, 20% Glycerin, 20% ß-Mercaptoethanol, 0.002% Bromphenolblau) versetzt und 10 min bei 90°C inkubiert, dann aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurden 10 µl Rainbow Marker RPN 756 (Fa. Pharmacia) aufgetragen.

Als Kammer wurde eine PROTEAN II xi Cell (Fa. BIO-RAD) verwendet. Elektrophoresepuffer war: 25 mM Tris/HCl, 90 mM Glycin, 0.1% SDS, pH 8.6. Die Elektrophoresebedingungen waren: 45 min bei 46V/16 mA, 30 min bei 120 V/50 mA, 150 min bei 150V/56 mA, 90 min bei 190 V/45 mA.

5.3. Blot

Als Blot-Puffer wurde verwendet: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 1% SDS, 20 % Methanol, pH 8,3. Blotfolie war Nitrozellulose-blotfolie Protran BA83, 13 x 13 cm (Fa. Schleicher & Schuell). Die Blot-Apparatur war ein Semi-Dry-Blotter (Modell Pegasus von Fa. Phase).

Das Gel wurde 10 min in Blot-Puffer inkubiert und auf die Blotfolie gelegt und mit mehreren Lagen Whatman 3MM Chromatographie Papier (in Blot-Puffer getränkt) beschichtet. Dann wurde geblottet (0,8 mA/cm2 Gelfläche, 70 min).

5.4. Immunreaktion:

Die Blotfolie wurde in 150 ml PBS-Tween-Protein Lösung (PBS, 0.3% Tween, 1.5 % BSA, 50 µg/ml unspez. Maus IgG) über Nacht bei 4 °C unter Schütteln abgesättigt. In die Lösung wurden dann je 30 µl Schaf anti- PCEN17 bzw. anti-PCVD14 Antiserum (Herstellung der Antiseren s.o.) gegeben, und es wurde 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die Lösung wurde dekantiert, und die Blotfolie wurde 4 x 10 min in je 300ml PBS-Tween-Protein Lösung unter Schütteln gewaschen. Dann wurde der sekundäre Antikörper zugegeben: 30 µl monoklonaler Maus anti-Schaf IgG-alkalische Phosphatase Konjugat (Fa. Sigma, A8062), verdünnt in 150 ml PBS-Tween-Protein Lösung. Es wurde 90 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde dekantiert und 10 min mit 150 ml PBS-Tween-Protein Lösung unter Schütteln gewaschen. Dann wurde dekantiert und 2 x 10 min mit 150 ml Waschpuffer (100 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) unter Schütteln gewaschen.

Es wurde Substrat-Lösung wie folgt hergestellt: 100 ml Entwicklungspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl2) + 350 µl einer Lösung von 50 mg BCIP (5-Bromo-4 Chloro-3 Indolyl Phosphate, Fa. Sigma) pro ml 100% Dimethylformamid, + 450 µl einer Lösung von 100 mg NBT (Nitro blue tetrazolium, Fa. Sigma) pro ml 70% Dimethylformamid.

Die Substratlösung wurde auf die Blotfolie gegeben. Nach 5 Minuten wurde die Farbreaktion durch Waschen der Blotfolie in Wasser beendet. Die Ergebnisse sind in Figur 3 (Panel A) gezeigt.

In einem parallelen Ansatz waren zu der Lösung mit den primären Antiseren (Schaf anti- PCEN17 bzw. anti-PCVD14 Antiserum) die entsprechenden immunogenen Peptide PCEN17 und PCVD14 in einer Endkonzentration von je 2 µg/ml zugegeben und 30 min vorinkubiert worden. Die Ergebnisse sind in Figur 3 (Panel B) gezeigt, wobei auf die Legende zu dieser Figur 3 ausdrücklich Bezug genommen wird.

6. Gelfiltrations-HPLC von Sepsis-Plasma

Zur Ermittlung des apparenten Molekulargewichts der CPS 1 Immunreaktivität aus Sepsis-Plasma in Lösung wurde ein solches Plasma über eine Gelfiltrations-HPLC fraktioniert und die CPS1 Immunreaktivität in den Fraktionen gemessen. Kalibriert wurde die Säule durch eine separate Chromatographie von Standards (Bio-Rad-Standard: Cat.No. 151-1901). Es wurde eine Bio-Sil SEC-400 Säule (7,8x300mm Ser.No.415949) der Firma Bio-Rad verwendet. Laufmittel war 300 mM Kaliumphosphat, 0.1% NaN_3, pH 7.0. Vom Sepsis-Plasma wurden 100 µl chromatographiert, es wurden Fraktionen á 1 ml gesammelt, und je 50 µl davon im Immunoassay vermessen (Durchführung s.o.). Die erhaltenen Ergebnisse (Reaktivität/Fraktion) sind in Figur 4 dargestellt, wobei auf die Legende zu dieser Figur 4 ausdrücklich Bezug genommen wird.

Die Ergebnisse der Messungen der CPS 1-Immunreaktivität in Humanplasmen bzw. der Untersuchungen zur Spezies, die für die beobachtete Immunreaktivität verantwortlich war, lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Mittels des beschriebenen Sandwichimmunoassays wurde gezeigt, daß Plasmen von Sepsispatienten stark erhöhte Konzen-

trationen von CPS 1 Immunreaktivität aufweisen, während in Plasmen von Gesunden CPS 1 nicht zu detektieren war (Fig. 2).

Bei der in Sepsisplasmen zirkulierenden CPS 1-Immunreaktivität handelt es sich offenbar im wesentlichen um das intakte Enzym CPS 1 bzw. eine Form davon mit erhöhter Löslichkeit:

Drei untersuchte Sepsisplasmen zeigten im Western-Blot eine spezifische CPS-Bande bei ca. 150 kDa (Fig. 3). Das entspricht etwa dem für das intakte CPS 1, auf Basis der bekannten Aminosäuresequenz, errechneten Molekulargewicht von rund 160 kDa.

Die Gelfiltrations-HPLC zeigte, daß die CPS 1-Immunreaktivität des untersuchten Sepsis-Plasmas in Lösung ein Molekulargewicht von ca. 200 kDa (+/- 50 kDa) aufweist (Fig. 4).

Die Bemessung von CPS 1 in humanem Serum/Plasma wurde bislang nicht beschrieben, weder für Patienten mit Sepsis noch für andere Krankheitsbilder. Lediglich in einem experimentellen Rattenmodell für akute Hepatitis wurde CPS 1 in Plasma gemessen (s.o. Ozaki et al., 1996). Die Verhältnisse in der Ratte sind aber offenbar nicht mit dem Menschen vergleichbar, denn in der genannten Veröffentlichung wurden bereits für gesunde Tiere CPS-Konzentrationen von 1-2 µg/ml detektiert, während die hierin beschriebenen Messungen von humanen Plasmen Gesunder durch die Anmelderin Werte unterhalb der Nachweisgrenze (abgeschätzt ca. 0.5 ng/ml) erbrachten.

Überraschenderweise zeigte sich für Sepsispatienten eine massive Erhöhung der CPS 1 Immunreaktivität in Plasma. Es ist bekannt, daß bei der Sepsis eine Schädigung der Mitochondrien eintritt (Crouser ED et al., Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity; Crit Care Med. 2002 Feb; 30(2):276-84). Eine der-

artige Schädigung in Verbindung mit Nekrose oder Apoptose könnte Ursache des Übertritts von CPS 1 aus der mitochondrialen Matrix in die Blutzirkulation sein. Da CPS 1 nahezu ausschließlich in der Leber exprimiert wird und dort einen erheblichen Teil des gesamten löslichen Proteins ausmacht, könnte die Bemessung von CPS 1 in besonderer Weise geeignet sein, um Schädigungen der Leber bei der schweren Sepsis oder anderen Zusammenhängen, z.B. im Rahmen eines Multiorganversagens, anzuzeigen.

Die Bestimmung von CPS 1 bzw. CPS 1-Immunreaktivität kann somit neben einer Bestimmung im Zusammenhang mit Diagnose, Monitoring, Prognose von Sepsis allgemein insbesondere auch für Diagnose, Monitoring, Prognose des Leberversagens im Rahmen eines Multiorganversagens oder für Bestimmungen im Zusammenhang mit entzündlichen und anderen Lebererkrankungen erfolgen.

Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegenden Erkenntnisse über das Auftreten erheblicher Konzentrationen von CPS 1 in der Zirkulation von Patienten mit schweren Erkrankungen wie Sepsis und schweren Lebererkrankungen lassen es als möglich erscheinen, dass CPS 1 auch in gelöster Form wenigstens Teile seiner Enzymreaktivität behalten hat und zur Verschärfung der Erkrankung und/oder zu bestimmten unerwünschten Krankheitsfolgen beiträgt. Daraus ergibt sich, dass an sich bekannte Substanzen, die die Expression oder die enzymatische Wirkung von CPS 1 inhibieren. Derartige Substanzen sind z.B. beschrieben in J Steroid Biochem Mol Bio 1991 May; 38(5):599-609; J Biol Chem 1977 May 25; 252(10):3558-60; J Biol Chem 1984 Jan 10; 259(1):323-31 und J Biol Chem 1981 Nov 10; 256(21):11160-5; J Biol Chem 1981 Apr 10; 256(7):3443-6. Zu ihnen gehören insbesondere Ca-Ionen und andere Metallionen und Substanzen vom Steroidtyp.

Patentansprüche

1. Verwendung der Carbamoylphosphat Synthetase (CPS 1) und ihrer Fragmente als Markersubstanz zum diagnostischen Nachweis und für die Verlaufsprognose sowie die Verlaufskontrolle von Entzündungen und Infektionen sowie für Diagnose, Monitoring, Prognose des Leberversagens im Rahmen eines Multiorganversagens oder für Bestimmungen im Zusammenhang mit entzündlichen Lebererkrankungen.

2. Verwendung von Aminosäuresequenzen des N-terminalen Teils der Carbamoylphosphat Synthetase (CPS 1; SEQ ID NO:6) als Markerpeptide zum diagnostischen Nachweis und für die Verlaufsprognose sowie die Verlaufskontrolle von Entzündungen und Infektionen.

3. Verwendung von CPS 1 oder CPS 1-Fragmenten nach Anspruch 2 im Rahmen der differentialdiagnostischen Früherkennung und Erkennung für die Verlaufsprognose, die Beurteilung des Schweregrads und für die therapiebegleitende Verlaufsbeurteilung von Sepsis und schweren Infektionen, insbesondere sepsisähnlichen systemischen Infektionen, durch Bestimmung des Auftretens und/oder der Menge von löslichen CPS 1-Fragmenten in einer biologischen Flüssigkeit eines Patienten.

4. Verwendung von CPS 1 nach Anspruch 1 im Rahmen der differentialdiagnostischen Früherkennung und Erkennung für die Verlaufsprognose, die Beurteilung des Schweregrads und für die therapiebegleitende Verlaufsbeurteilung von Sepsis und schweren Infektionen, insbesondere sepsisähnlichen systemischen Infektionen, durch Bestimmung des Auftretens und/oder der Menge von CPS 1 in einer biologischen Flüssigkeit eines Patienten.

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 oder 3 von CPS 1-

Fragmenten, die einer Sequenz von mindestens 6 Aminosäuren aus dem die Aminosäuren 1 bis ca. 630 der vollständigen CPS 1-Sequenz (SEQ ID NO:6) umfassenden N-terminalen Teil der CPS 1-Sequenz entsprechen.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die CPS 1-Fragmente ausgewählt sind aus Fragmenten mit einer gelelektrophoretisch bestimmten molaren Masse von 68 bis 70 kDa ± 3 kDa und isoelektrischen Punkten in einem Bereich von 5,5 bis 6,1.

7. Verfahren zur differentialdiagnostischen Früherkennung und Erkennung, für die Verlaufsprognose und die Beurteilung des Schweregrads und zur therapiebegleitenden Verlaufsbeurteilung von Sepsis und schweren Infektionen, insbesondere sepsisähnlichen systemischen Infektionen, dadurch gekennzeichnet, dass man die Anwesenheit und/oder Menge von CPS 1 und/oder von CPS 1-Fragmenten aus dem N-terminalen Teil der CPS 1 in einer biologischen Flüssigkeit eines Patienten bestimmt und aus dem Nachweis und/oder der Menge von CSP 1 oder mindestens einem der bestimmten Fragmente Schlüsse hinsichtlich des Vorliegens, des zu erwartenden Verlaufs, des Schweregrads oder des Erfolgs eines Therapie einer Sepsis oder Infektion zieht.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die zur Bestimmung genutzten CPS 1-Sequenzen Sequenzen von Fragmenten aus einem die Aminosäuren 1 bis ca. 630 der vollständigen CPS 1-Sequenz (SEQ ID NO:6) umfassenden N-terminalen Teil der CPS 1 sind.

9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass die bestimmte CPS 1-Immunreaktivität Plasmabestandteilen mit einer gelelektrophoretisch bestimmten molaren Masse von 200 kDa ± 50 kDa und/oder Bestandteilen mit einer molaren Mase von 68 bis 70 kDa ± 3 kDa und isoelektrischen Punkten in einem Bereich von 5,5 bis 6,1 zugeordnet

werden kann.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die bestimmten CPS 1-Fragmente, oder die Assayzwecke genutzten Fragmente, solche Fragmente sind, die wenigstens 2 Aminosäure-Teilsequenzen gemäß SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 oder SEQ ID NO:8 enthalten.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass es ein immundiagnostisches Bestimmungsverfahren ist.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass Bestimmung der löslichen CPS 1 oder der CPS 1-Fragmente indirekt als Bestimmung einer zugehörigen CPS 1-mRNA oder als Bestimmung der CPS 1-Enzymaktivität erfolgt.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass es im Rahmen einer Multiparameter-Bestimmung durchgeführt wird, bei der gleichzeitig mindestens ein weiterer Sepsisparameter bestimmt wird und ein Messergebnis in Form eines Satzes von mindestens zwei Messgrößen gewonnen wird, der zur Sepsis-Feindiagnostik ausgewertet wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass im Rahmen der Multiparameter-Bestimmung neben wenigstens einem CPS 1-Fragment wenigstens ein weiterer Parameter bestimmt wird, der ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Procalcitonin, CA 19-9, CA 125, S100B, S100A-Proteinen, löslichen Cytokeratin-Fragmenten, insbesondere CYFRA 21, TPS und/oder löslichen Cytokeratin-1-Fragmenten (sCY1F), den Peptiden Inflammin, CHP, LASP-1 sowie Peptid-Prohormon-Immunreaktivität und dem C-reaktiven Protein (CRP).

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Multiparameter-Bestimmung als Simultanbestimmung mittels einer Chiptechnologie-Messvorrichtung oder einer immunchromatographischen Messvorrichtung erfolgt.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Auswertung des mit der Messvorrichtung gewonnenen komplexen Messergebnisses mit Hilfe eines Computerprogramms erfolgt.

17. Verwendung von CPS 1-Inhibitoren zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Sepsis und schweren Lbererkrankungen.

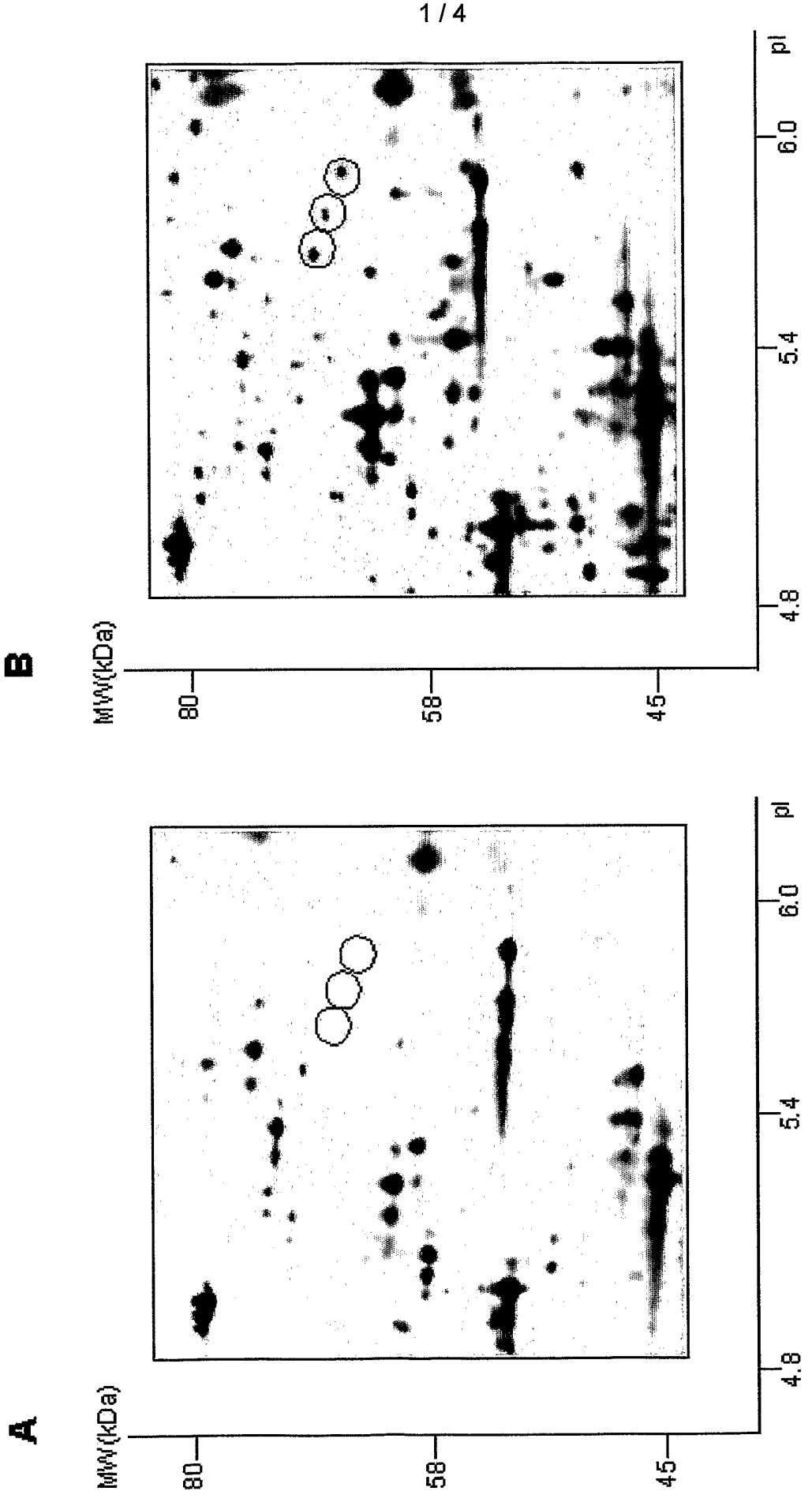


Fig. 1

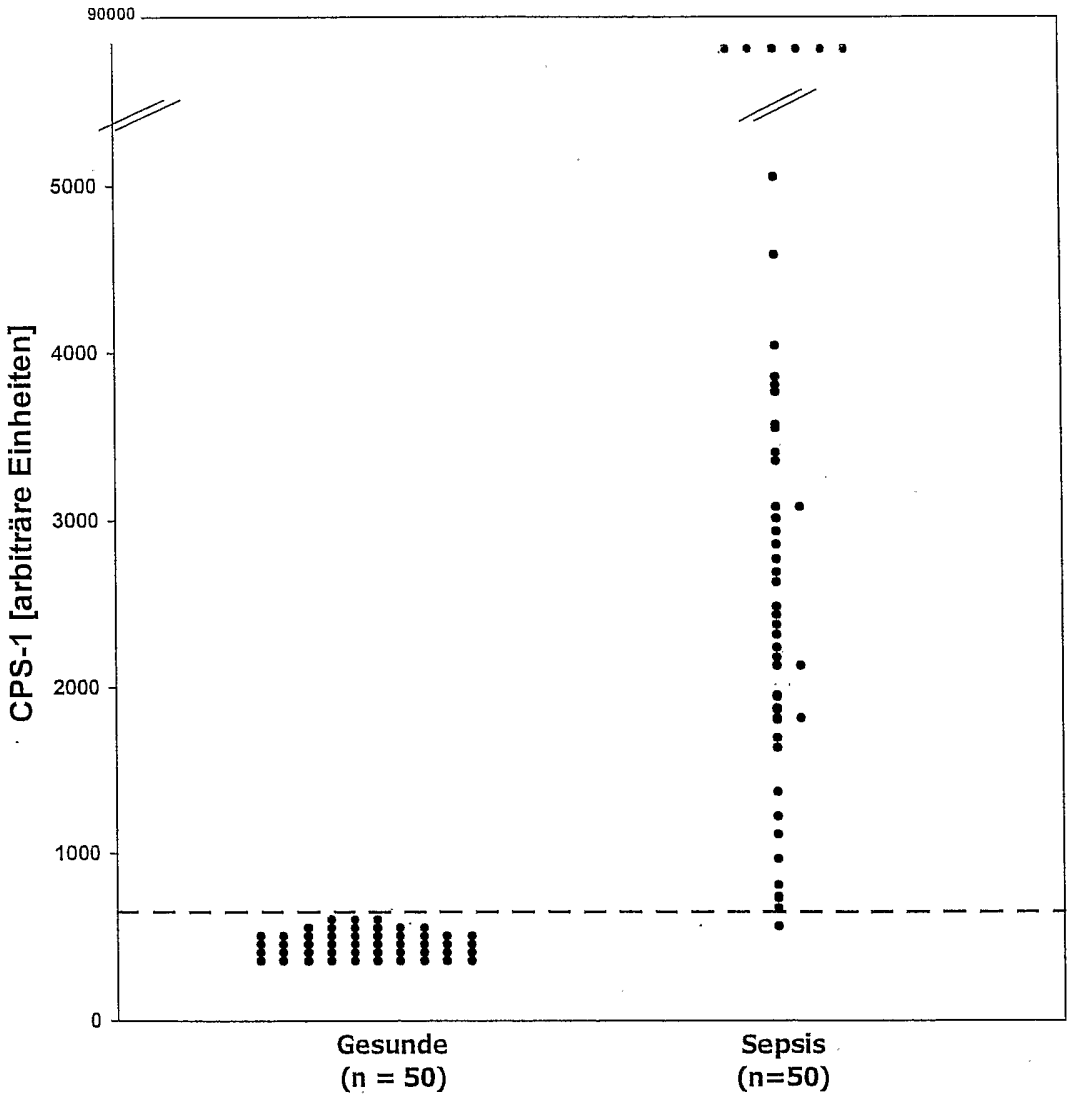

90000
5000
4000
3000
2000
1000
0
CPS-1 [arbiträre Einheiten]
Gesunde
(n = 50)
Sepsis
(n=50)

Fig. 2

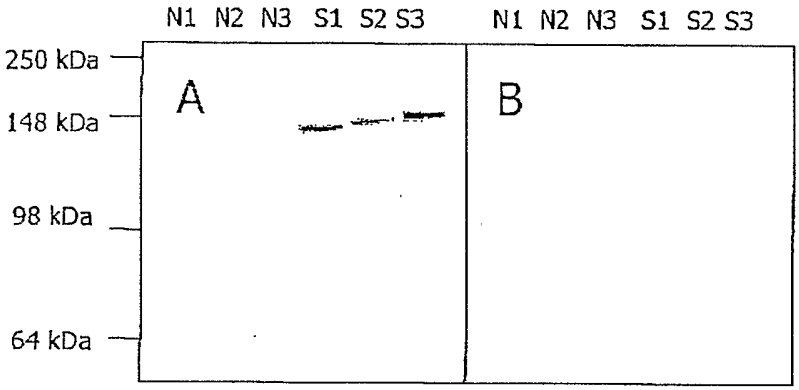


Fig. 3

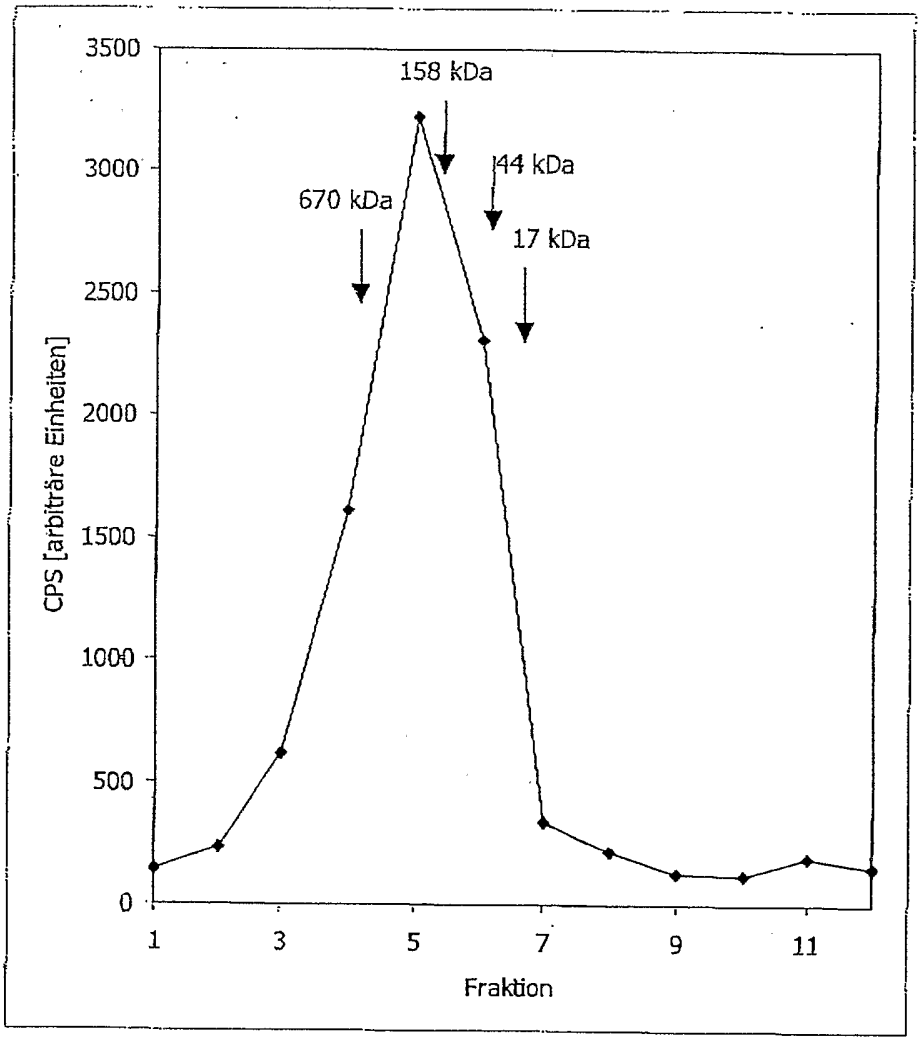

3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
CPS [arbiträre Einheiten]
158 kDa
670 kDa
44 kDa
17 kDa
1
3
5
7
9
11
Fraktion

Fig. 4

SEQUENCE LISTING

<110> B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaft

<120> Verwendungen der Carbamoylphosphat Synthetase 1 (CPS 1) und ihrer Fragmente für die Diagnose von Entzündungserkrankungen und Sepsis

<130> 3695PCT AS

<140>
<141>

<150> 02008841.5 EP
<151> 2002-04-19

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Primat (Pavian)

<400> 1
Gly Gln Asn Gln Pro Val Leu Asn Ile Thr Asn
1 5 10

<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Primat (Pavian)

<400> 2
Asn Gln Pro Val Leu Asn Ile
1 5

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> Primat (Pavian)

<400> 3
Ala Gln Thr Ala His Ile Val Leu Glu Asp Gly Thr Lys
1 5 10

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> Primat (Pavian)

<400> 4
Thr Ala His Ile
1

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> Primat (Pavian)

<400> 5
Ala Phe Ala Met Thr Asn Gln Ile Leu Val Glu Lys
1 5 10

<210> 6
<211> 1500
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Met Thr Arg Ile Leu Thr Ala Phe Lys Val Val Arg Thr Leu Lys Thr
1 5 10 15

Gly Phe Gly Phe Thr Asn Val Thr Ala His Gln Lys Trp Lys Phe Ser
20 25 30

Arg Pro Gly Ile Arg Leu Leu Ser Val Lys Ala Gln Thr Ala His Ile
35 40 45

Val Leu Glu Asp Gly Thr Lys Met Lys Gly Tyr Ser Phe Gly His Pro
50 55 60

Ser Ser Val Ala Gly Glu Val Val Phe Asn Thr Gly Leu Gly Gly Tyr
65 70 75 80

Pro Glu Ala Ile Thr Asp Pro Ala Tyr Lys Gly Gln Ile Leu Thr Met
85 90 95

Ala Asn Pro Ile Ile Gly Asn Gly Gly Ala Pro Asp Thr Thr Ala Leu
100 105 110

Asp Glu Leu Gly Leu Ser Lys Tyr Leu Glu Ser Asn Gly Ile Lys Val
115 120 125

Ser Gly Leu Leu Val Leu Asp Tyr Ser Lys Asp Tyr Asn His Trp Leu
130 135 140

Ala Thr Lys Ser Leu Gly Gln Trp Leu Gln Glu Glu Lys Val Pro Ala
145 150 155 160

Ile Tyr Gly Val Asp Thr Arg Met Leu Thr Lys Ile Ile Arg Asp Lys
165 170 175

Gly Thr Met Leu Gly Lys Ile Glu Phe Glu Gly Gln Pro Val Asp Phe
180 185 190

Val Asp Pro Asn Lys Gln Asn Leu Ile Ala Glu Val Ser Thr Lys Asp
195 200 205

Val Lys Val Tyr Gly Lys Gly Asn Pro Thr Lys Val Val Ala Val Asp
210 215 220

Cys Gly Ile Lys Asn Asn Val Ile Arg Leu Leu Val Lys Arg Gly Ala
225 230 235 240

Glu Val His Leu Val Pro Trp Asn His Asp Phe Thr Lys Met Glu Tyr
245 250 255

Asp Gly Ile Leu Ile Ala Gly Gly Pro Gly Asn Pro Ala Leu Ala Glu
260 265 270

Pro Leu Ile Gln Asn Val Arg Lys Ile Leu Glu Ser Asp Arg Lys Glu
275 280 285

Pro Leu Phe Gly Ile Ser Thr Gly Asn Leu Ile Thr Gly Leu Ala Ala
290 295 300

Gly Ala Lys Thr Tyr Lys Met Ser Met Ala Asn Arg Gly Gln Asn Gln
305 310 315 320

Pro Val Leu Asn Ile Thr Asn Lys Gln Ala Phe Ile Thr Ala Gln Asn
325 330 335

His Gly Tyr Ala Leu Asp Asn Thr Leu Pro Ala Gly Trp Lys Pro Leu
340 345 350

Phe Val Asn Val Asn Asp Gln Thr Asn Glu Gly Ile Met His Glu Ser
355 360 365

Lys Pro Phe Phe Ala Val Gln Phe His Pro Glu Val Thr Pro Gly Pro
370 375 380

Ile Asp Thr Glu Tyr Leu Phe Asp Ser Phe Phe Ser Leu Ile Lys Lys
385 390 395 400

Gly Lys Ala Thr Thr Ile Thr Ser Val Leu Pro Lys Pro Ala Leu Val
405 410 415

Ala Ser Arg Val Glu Val Ser Lys Val Leu Ile Leu Gly Ser Gly Gly
420 425 430

Leu Ser Ile Gly Gln Ala Gly Glu Phe Asp Tyr Ser Gly Ser Gln Ala
435 440 445

Val Lys Ala Met Lys Glu Glu Asn Val Lys Thr Val Leu Met Asn Pro
450 455 460

Asn Ile Ala Ser Val Gln Thr Asn Glu Val Gly Leu Lys Gln Ala Asp
465 470 475 480

Thr Val Tyr Phe Leu Pro Ile Thr Pro Gln Phe Val Thr Glu Val Ile
485 490 495

Lys Ala Glu Gln Pro Asp Gly Leu Ile Leu Gly Met Gly Gly Gln Thr
500 505 510

Ala Leu Asn Cys Gly Val Glu Leu Phe Lys Arg Gly Val Leu Lys Glu
515 520 525

Tyr Gly Val Lys Val Leu Gly Thr Ser Val Glu Ser Ile Met Ala Thr
530 535 540

Glu Asp Arg Gln Leu Phe Ser Asp Lys Leu Asn Glu Ile Asn Glu Lys
545 550 555 560

Ile Ala Pro Ser Phe Ala Val Glu Ser Ile Glu Asp Ala Leu Lys Ala
565 570 575

Ala Asp Thr Ile Gly Tyr Pro Val Met Ile Arg Ser Ala Tyr Ala Leu
580 585 590

Gly Gly Leu Gly Ser Gly Ile Cys Pro Asn Arg Glu Thr Leu Met Asp
595 600 605

Leu Ser Thr Lys Ala Phe Ala Met Thr Asn Gln Ile Leu Val Glu Lys
610 615 620

```
Ser Val Thr Gly Trp Lys Glu Ile Glu Tyr Glu Val Val Arg Asp Ala
625                 630                 635                 640

Asp Asp Asn Cys Val Thr Val Cys Asn Met Glu Asn Val Asp Ala Met
                645                 650                 655

Gly Val His Thr Gly Asp Ser Val Val Val Ala Pro Ala Gln Thr Leu
            660                 665                 670

Ser Asn Ala Glu Phe Gln Met Leu Arg Arg Thr Ser Ile Asn Val Val
        675                 680                 685

Arg His Leu Gly Ile Val Gly Glu Cys Asn Ile Gln Phe Ala Leu His
    690                 695                 700

Pro Thr Ser Met Glu Tyr Cys Ile Ile Glu Val Asn Ala Arg Leu Ser
705                 710                 715                 720

Arg Ser Ser Ala Leu Ala Ser Lys Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Phe
                725                 730                 735

Ile Ala Ala Lys Ile Ala Leu Gly Ile Pro Leu Pro Glu Ile Lys Asn
            740                 745                 750

Val Val Ser Gly Lys Thr Ser Ala Cys Phe Glu Pro Ser Leu Asp Tyr
        755                 760                 765

Met Val Thr Lys Ile Pro Arg Trp Asp Leu Asp Arg Phe His Gly Thr
    770                 775                 780

Ser Ser Arg Ile Gly Ser Ser Met Lys Ser Val Gly Glu Val Met Ala
785                 790                 795                 800

Ile Gly Arg Thr Phe Glu Glu Ser Phe Gln Lys Ala Leu Arg Met Cys
                805                 810                 815

His Pro Ser Ile Glu Gly Phe Thr Pro Arg Leu Pro Met Asn Lys Glu
            820                 825                 830

Trp Pro Ser Asn Leu Asp Leu Arg Lys Glu Leu Ser Glu Pro Ser Ser
        835                 840                 845

Thr Arg Ile Tyr Ala Ile Ala Lys Ala Ile Asp Asp Asn Met Ser Leu
    850                 855                 860

Asp Glu Ile Glu Lys Leu Thr Tyr Ile Asp Lys Trp Phe Leu Tyr Lys
865                 870                 875                 880

Met Arg Asp Ile Leu Asn Met Glu Lys Thr Leu Lys Gly Leu Asn Ser
                885                 890                 895

Glu Ser Met Thr Glu Glu Thr Leu Lys Arg Ala Lys Glu Ile Gly Phe
            900                 905                 910

Ser Asp Lys Gln Ile Ser Lys Cys Leu Gly Leu Thr Glu Ala Gln Thr
        915                 920                 925

Arg Glu Leu Arg Leu Lys Lys Asn Ile His Pro Trp Val Lys Gln Ile
    930                 935                 940

Asp Thr Leu Ala Ala Glu Tyr Pro Ser Val Thr Asn Tyr Leu Tyr Val
945                 950                 955                 960

Thr Tyr Asn Gly Gln Glu His Asp Val Asn Phe Asp Asp His Gly Met
                965                 970                 975
```

```
Met Val Leu Gly Cys Gly Pro Tyr His Ile Gly Ser Ser Val Glu Phe
            980                 985                 990

Asp Trp Cys Ala Val Ser Ser Ile Arg Thr Leu Arg Gln Leu Gly Lys
        995                1000                1005

Lys Thr Val Val Val Asn Cys Asn Pro Glu Thr Val Ser Thr Asp Phe
   1010                1015                1020

Asp Glu Cys Asp Lys Leu Tyr Phe Glu Glu Leu Ser Leu Glu Arg Ile
1025                1030                1035                1040

Leu Asp Ile Tyr His Gln Glu Ala Cys Gly Gly Cys Ile Ile Ser Val
               1045                1050                1055

Gly Gly Gln Ile Pro Asn Asn Leu Ala Val Pro Leu Tyr Lys Asn Gly
           1060                1065                1070

Val Lys Ile Met Gly Thr Ser Pro Leu Gln Ile Asp Arg Ala Glu Asp
       1075                1080                1085

Arg Ser Ile Phe Ser Ala Val Leu Asp Glu Leu Lys Val Ala Gln Ala
   1090                1095                1100

Pro Trp Lys Ala Val Asn Thr Leu Asn Glu Ala Leu Glu Phe Ala Lys
1105                1110                1115                1120

Ser Val Asp Tyr Pro Cys Leu Leu Arg Pro Ser Tyr Val Leu Ser Gly
               1125                1130                1135

Ser Ala Met Asn Val Val Phe Ser Glu Asp Glu Met Lys Lys Phe Leu
           1140                1145                1150

Glu Glu Ala Thr Arg Val Ser Gln Glu His Pro Val Val Leu Thr Lys
       1155                1160                1165

Phe Val Glu Gly Ala Arg Glu Val Glu Met Asp Ala Val Gly Lys Asp
   1170                1175                1180

Gly Arg Val Ile Ser His Ala Ile Ser Glu His Val Glu Asp Ala Gly
1185                1190                1195                1200

Val His Ser Gly Asp Ala Thr Leu Met Leu Pro Thr Gln Thr Ile Ser
               1205                1210                1215

Gln Gly Ala Ile Glu Lys Val Lys Asp Ala Thr Arg Lys Ile Ala Lys
           1220                1225                1230

Ala Phe Ala Ile Ser Gly Pro Phe Asn Val Gln Phe Leu Val Lys Gly
       1235                1240                1245

Asn Asp Val Leu Val Ile Glu Cys Asn Leu Arg Ala Ser Arg Ser Phe
   1250                1255                1260

Pro Phe Val Ser Lys Thr Leu Gly Val Asp Phe Ile Asp Val Ala Thr
1265                1270                1275                1280

Lys Val Met Ile Gly Glu Asn Val Asp Glu Lys His Leu Pro Thr Leu
               1285                1290                1295

Asp His Pro Ile Ile Pro Ala Asp Tyr Val Ala Ile Lys Ala Pro Met
           1300                1305                1310

Phe Ser Trp Pro Arg Leu Arg Asp Ala Asp Pro Ile Leu Arg Cys Glu
       1315                1320                1325
```

```
Met Ala Ser Thr Gly Glu Val Ala Cys Phe Gly Glu Gly Ile His Thr
   1330                1335                1340

Ala Phe Leu Lys Ala Met Leu Ser Thr Gly Phe Lys Ile Pro Gln Lys
1345                1350                1355                1360

Gly Ile Leu Ile Gly Ile Gln Gln Ser Phe Arg Pro Arg Phe Leu Gly
                1365                1370                1375

Val Ala Glu Gln Leu His Asn Glu Gly Phe Lys Leu Phe Ala Thr Glu
           1380                1385                1390

Ala Thr Ser Asp Trp Leu Asn Ala Asn Asn Val Pro Ala Thr Pro Val
       1395                1400                1405

Ala Trp Pro Ser Gln Glu Gly Gln Asn Pro Ser Leu Ser Ser Ile Arg
   1410                1415                1420

Lys Leu Ile Arg Asp Gly Ser Ile Asp Leu Val Ile Asn Leu Pro Asn
1425                1430                1435                1440

Asn Asn Thr Lys Phe Val His Asp Asn Tyr Val Ile Arg Arg Thr Ala
                1445                1450                1455

Val Asp Ser Gly Ile Pro Leu Leu Thr Asn Phe Gln Val Thr Lys Leu
           1460                1465                1470

Phe Ala Glu Ala Val Gln Lys Ser Arg Lys Val Asp Ser Lys Ser Leu
       1475                1480                1485

Phe His Tyr Arg Gln Tyr Ser Ala Gly Lys Ala Ala
   1490                1495                1500
```

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 7
```
Cys Glu Phe Glu Gly Gln Pro Val Asp Phe Val Asp Pro Asn Lys Gln
  1               5                  10                  15

Asn
```

<210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 8
```
Cys Val Pro Trp Asn His Asp Phe Thr Lys Met Glu Tyr Asp
  1               5                  10
```

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat[redacted] Application No
PCT/EP 03/03939

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/68 G01N33/569 G01N33/573

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ARDAWI M S M: "HEPATIC GLUTAMINE METABOLISM IN THE SEPTIC RAT" CLINICAL SCIENCE (LONDON), vol. 82, no. 6, 1992, pages 709-716, XP008008364 ISSN: 0143-5221 abstract page 711, left-hand column, line 19; table 4 --- -/--	1-16

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority 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	Date of mailing of the international search report
25 July 2003	06/08/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Gundlach, B

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/03939

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TABUCHI SHOKO ET AL: "Regulation of genes for inducible nitric oxide synthase and urea cycle enzymes in rat liver in endotoxin shock." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 268, no. 1, 5 February 2000 (2000-02-05), pages 221-224, XP001113123 ISSN: 0006-291X cited in the application figures 2,3	7,12,13
A	WO 00 73322 A (CHRISTMAN BRIAN W ;SUMMAR MARSHALL L (US); UNIV VANDERBILT (US)) 7 December 2000 (2000-12-07) claim 57; figure 11	1-17
A	SCHIMKE T: "Adaptive Characteristics of Urea Cycle Enzymes in the Rat" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 237, 1962, pages 459-468, XP008008974 page 460, left-hand column, paragraph 2	2,3,7,13
X	SCHOUW NIELSEN S ET AL: "ACUTE SYSTEMIC AND LOCAL INFLAMMATION DECREASES HEPATIC EXPRESSION OF UREA CYCLE ENZYMES" JOURNAL OF HEPATOLOGY, MUNKSGAARD INTERNATIONAL PUBLISHERS, COPENHAGEN, DK, vol. 32, no. SUPPL 2, 29 May 2000 (2000-05-29), page 161 XP001159742 ISSN: 0168-8278	1
Y	abstract	17
X	OZAKI M ET AL: "ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY OF CARBAMOYLPHOSPHATE SYNTHETASE I: PLASMA ENZYME IN RAT EXPERIMENTAL HEPATITIS AND ITS CLEARANCE" ENZYME PROTEIN, KARGER, BASEL, CH, vol. 48, no. 4, 1994, pages 213-221, XP008018977 ISSN: 1019-6773 abstract	1

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat[redacted] Application No
PCT/EP 03/03939

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TYGSTRUP N ET AL: "EXPRESSION OF LIVER FUNCTIONS FOLLOWING SUB-LETHAL AND NON-LETHAL DOSES OF ALLYL ALCOHOL AND ACETAMINOPHEN IN THE RAT" JOURNAL OF HEPATOLOGY, MUNKSGAARD INTERNATIONAL PUBLISHERS, COPENHAGEN, DK, vol. 27, no. 1, July 1997 (1997-07), pages 156-162, XP001159744 ISSN: 0168-8278 abstract page 157, paragraph 3 figure 3 ---	1
X	YIN L ET AL: "PARTICIPATION OF DIFFERENT CELL TYPES IN THE RESTITUTIVE RESPONSE OF THE RAT LIVER TO PERIPORTAL INJURY INDUCED BY ALLYL ALCOHOL" JOURNAL OF HEPATOLOGY, MUNKSGAARD INTERNATIONAL PUBLISHERS, COPENHAGEN, DK, vol. 31, no. 3, September 1999 (1999-09), pages 497-507, XP001159743 ISSN: 0168-8278 abstract ---	1
Y	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1989 SZONDY Z ET AL: "EFFECT OF POLYAMINES ON THE CARBAMOYLPHOSPHATE SYNTHETASE ACTIVITY OF CAD PROTEIN" Database accession no. PREV199089003267 XP002249138 abstract & ACTA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA HUNGARICA, vol. 24, no. 1-2, 1989, pages 107-118, ISSN: 0237-6261 -----	17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
EP03/03939

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

See supplementary 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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

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.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.
EP03/03939

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

1. Claims 1 (in part), 2-16 (in full)

   carbamoyl synthetase as marker for sepsis, inflammations and infections.

2. Claims 1 (in part), 17 (in full)

   carbamoyl synthetase as marker or target protein for liver diseases.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 03/03939

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0073322 A	07-12-2000	US 6346382 B1	12-02-2002
		AU 5455600 A	18-12-2000
		EP 1187844 A1	20-03-2002
		WO 0073322 A1	07-12-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/03939

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/68 G01N33/569 G01N33/573

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ARDAWI M S M: "HEPATIC GLUTAMINE METABOLISM IN THE SEPTIC RAT" CLINICAL SCIENCE (LONDON), Bd. 82, Nr. 6, 1992, Seiten 709-716, XP008008364 ISSN: 0143-5221 Zusammenfassung Seite 711, linke Spalte, Zeile 19; Tabelle 4 --- -/--	1-16

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] 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
25. Juli 2003	06/08/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Gundlach, B

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/03939

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	TABUCHI SHOKO ET AL: "Regulation of genes for inducible nitric oxide synthase and urea cycle enzymes in rat liver in endotoxin shock." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Bd. 268, Nr. 1, 5. Februar 2000 (2000-02-05), Seiten 221-224, XP001113123 ISSN: 0006-291X in der Anmeldung erwähnt Abbildungen 2,3 ---	7,12,13
A	WO 00 73322 A (CHRISTMAN BRIAN W ;SUMMAR MARSHALL L (US); UNIV VANDERBILT (US)) 7. Dezember 2000 (2000-12-07) Anspruch 57; Abbildung 11 ---	1-17
A	SCHIMKE T: "Adaptive Characteristics of Urea Cycle Enzymes in the Rat" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 237, 1962, Seiten 459-468, XP008008974 Seite 460, linke Spalte, Absatz 2 ---	2,3,7,13
X	SCHOUW NIELSEN S ET AL: "ACUTE SYSTEMIC AND LOCAL INFLAMMATION DECREASES HEPATIC EXPRESSION OF UREA CYCLE ENZYMES" JOURNAL OF HEPATOLOGY, MUNKSGAARD INTERNATIONAL PUBLISHERS, COPENHAGEN, DK, Bd. 32, Nr. SUPPL 2, 29. Mai 2000 (2000-05-29), Seite 161 XP001159742 ISSN: 0168-8278	1
Y	Zusammenfassung ---	17
X	OZAKI M ET AL: "ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY OF CARBAMOYLPHOSPHATE SYNTHETASE I: PLASMA ENZYME IN RAT EXPERIMENTAL HEPATITIS AND ITS CLEARANCE" ENZYME PROTEIN, KARGER, BASEL, CH, Bd. 48, Nr. 4, 1994, Seiten 213-221, XP008018977 ISSN: 1019-6773 Zusammenfassung ---	1

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/03939

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	TYGSTRUP N ET AL: "EXPRESSION OF LIVER FUNCTIONS FOLLOWING SUB-LETHAL AND NON-LETHAL DOSES OF ALLYL ALCOHOL AND ACETAMINOPHEN IN THE RAT" JOURNAL OF HEPATOLOGY, MUNKSGAARD INTERNATIONAL PUBLISHERS, COPENHAGEN, DK, Bd. 27, Nr. 1, Juli 1997 (1997-07), Seiten 156-162, XP001159744 ISSN: 0168-8278 Zusammenfassung Seite 157, Absatz 3 Abbildung 3 ---	1
X	YIN L ET AL: "PARTICIPATION OF DIFFERENT CELL TYPES IN THE RESTITUTIVE RESPONSE OF THE RAT LIVER TO PERIPORTAL INJURY INDUCED BY ALLYL ALCOHOL" JOURNAL OF HEPATOLOGY, MUNKSGAARD INTERNATIONAL PUBLISHERS, COPENHAGEN, DK, Bd. 31, Nr. 3, September 1999 (1999-09), Seiten 497-507, XP001159743 ISSN: 0168-8278 Zusammenfassung ---	1
Y	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1989 SZONDY Z ET AL: "EFFECT OF POLYAMINES ON THE CARBAMOYLPHOSPHATE SYNTHETASE ACTIVITY OF CAD PROTEIN" Database accession no. PREV199089003267 XP002249138 Zusammenfassung & ACTA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA HUNGARICA, Bd. 24, Nr. 1-2, 1989, Seiten 107-118, ISSN: 0237-6261 -----	17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/03939

Feld I 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 Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die 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 II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die 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 eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr 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. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren 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 (teilweise), 2-16 (vollständig)

   Carbamoylsynthetase als Marker für Sepsis, Entzündungen und Infektionen

2. Ansprüche: 1 (teilweise), 17 (vollständig)

   Carbamoylsynthetase als Marker oder Zielprotein für Leberkrankheiten

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/03939

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0073322 A	07-12-2000	US 6346382 B1	12-02-2002
		AU 5455600 A	18-12-2000
		EP 1187844 A1	20-03-2002
		WO 0073322 A1	07-12-2000