

(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
25. Juli 2002 (25.07.2002)

PCT

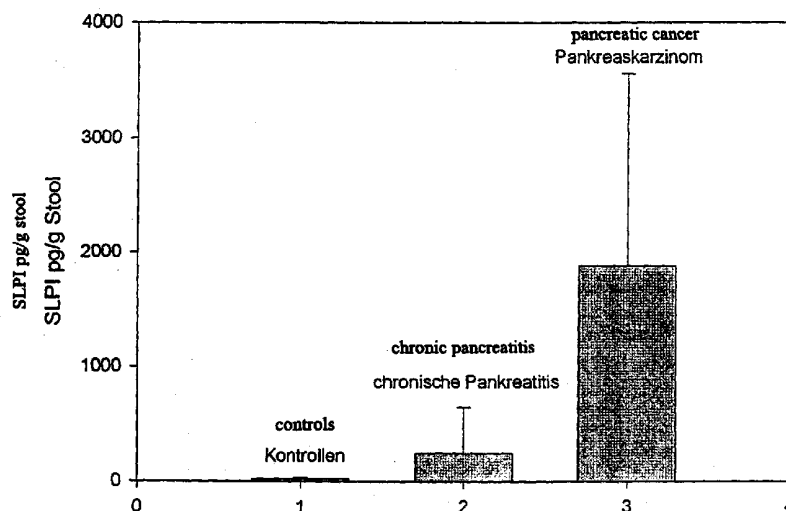
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/057785 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/574** (74) Anwälte: **SCHRELL, Andreas** usw.; Maybachstrasse 6A, 70469 Stuttgart (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/14511 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): JP, US.
- (22) Internationales Anmeldedatum:
11. Dezember 2001 (11.12.2001) (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
101 01 792.8 17. Januar 2001 (17.01.2001) DE
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: **NILIUS, Manfred** [DE/DE]; Breitscheidstrasse 51, 39114 Magdeburg (DE).
- Veröffentlicht:**
— mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen
- 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.

(54) Title: METHOD FOR DETECTING PANCREATIC AND GASTRO-INTESTINAL ILLNESSES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS PANKREATITISCHER UND GASTROINTESTINALER ERKRANKUNGEN

SLPI concentrations in the stool
SLPI Konzentrationen im Stuhl



(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting gastric and pancreatic illnesses, using antibodies in serum and in stools.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis gastraler und pankreatitischer Erkrankungen unter Einsatz von Antikörpern in Serum und Stuhl.



WO 02/057785 A1

Verfahren zum Nachweis pankreatitischer und gastro-
intestinaler Erkrankungen

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Nachweis pankreatischer und gastrointestinaler Erkrankungen, insbesondere Verfahren zum Nachweis von Pankreaskarzinomen, chronischer Pankreatitis, gast-
10 rischer Läsionen und entzündlicher Darmerkrankungen.

Pankreatische Erkrankungen, wie Pankreaskarzinom oder chronische Pankreatitis, stellen ebenso wie gastrointestinale Erkrankungen, also zum Beispiel
15 gastrische Läsionen oder entzündliche Darmerkrankungen, ernsthafte Gefährdungen des menschlichen und tierischen Körpers dar. Eine frühzeitige und möglichst spezifische Diagnose derartiger Krankheiten ist für eine erfolgversprechende Therapie uner-
20 lässlich. Bisher werden fast alle Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes mit invasiven Methoden (Endoskopie, Koloskopie, ERCP, etc.) mit Gewebeprobentnahme, unterstützt durch bildgebende Verfahren (Sonografie, Röntgenologie, Computertomografie,
25 etc.) als Standardmethoden diagnostiziert. In der Vorphase dieser Untersuchungen haben sich einige Labormethoden als Routinemethoden etabliert, die Aufschluss über eine Insuffizienz bestimmter innerer Organe wie zum Beispiel des Pankreas geben können.
30 Diese Labormethoden sind jedoch meist aufwendig und müssen oft an frischem Material (Magensaft, Pankreassaft, Duodenalsaft, etc.) innerhalb einer

kurzen Zeit durchgeführt werden, da durch die enzymatische Zusammensetzung des Probenmaterials sonst ein Nachweis spezifischer Faktoren oft nicht mehr gelingt (dies gilt vor allem für Enzym-Substrat-Reaktionen). Werden bestimmte Parameter im Serum der Patienten bestimmt, sind diese Werte oft nicht in gewünschtem Maße zuverlässig (große intra- und interindividuelle Schwankungen) und zeigen eine extrem geringere Sensitivität.

Bei einigen wenigen Erkrankungen (chronische Pankreatitis, Helicobacter pylori-Infektion des Magens, bakterielle Darmfehlbesiedlung, etc.) haben sich in jüngster Zeit auch Atemteste (zum Beispiel ^{13}C -Harnstoffatemtest, H_2 -Glucoseatemtest, ^{13}C -Triglycerid-Atemtest, etc.) etablieren können, deren Durchführung aber bisher nur an wenigen Zentren möglich ist, da entsprechend teures Equipment (zum Beispiel Massenspektrometer) zur Verfügung muss, und deren Kosten, bedingt durch zum Beispiel teure ^{13}C -Markierung, nicht mehr weiter gesenkt werden können.

Daher eignen sich diese Methoden meist auch nicht zur Aufnahme in entsprechende Vorsorge-Screening-Programme.

Bisher gibt es nur ganz wenige diagnostische Tests, mit denen bestimmte Erkrankungen im Stuhl der Patienten nachgewiesen werden können. Dazu zählt zum Beispiel der Hämoccult-Test zum Nachweis okulter Blutes im Stuhl als Screening-Methode für das Darmkarzinom, der Nachweis von Pankreas-Elastase im Stuhl zur Diagnose der chronischen Pankreatitis und

der jüngst entwickelte *Helicobacter pylori*-Stuhl-
Test zum Nachweis der *Helicobacter pylori*-Infektion
im Magen. Bei den letzten beiden Tests wird der
Nachweis mittels Antikörpertechnologie durchge-
5 führt.

Bezüglich des Tests für die Pankreaselastase lässt
sich feststellen, dass der Test zwar ein brauchba-
res Verfahren zur Diagnose der schweren exokrinen
Pankreasinsuffizienz ist, milde bis mäßige Funkti-
10 onseinschränkungen jedoch relativ schlecht nach-
weist.

Eine sichere Methode zur nicht-invasiven Differenz-
zierung malignomverdächtiger Pankreasveränderungen
steht nach wie vor nicht zur Verfügung. Als Kandi-
15 daten für die nicht-invasive Diagnostik des Pankre-
askarzinoms sind vor allem Marker in der Diskussi-
on, die bestimmte Genmutationen nachweisen (K-Ras,
p16, p53). Da die einzelnen Gene im zeitlichen Ver-
lauf der Entstehung eines Karzinoms unterschiedlich
20 in Aktion treten, sind sie auch mit einer unter-
schiedlichen Wahrscheinlichkeit mit dem Entstehen
eines Karzinoms assoziiert.

So können zum Beispiel K-Ras Mutationen schon in
einem prämaligen Stadium, also in einem Stadium
25 des „Entstehens“ eines Karzinoms, nachgewiesen wer-
den, während die Tumor-Supressor-Gene p16 und p53
bei vorhandenem Karzinom inaktiviert sind. Gene,
die früh an der Entstehung des Karzinoms beteiligt
sind, haben allerdings den Nachteil, dass sie auch
30 in Vorstufen der Tumorentstehung, sogenannten „prä-
maligen“ Zuständen und bei Patienten mit chroni-

scher Pankreatitis ohne Tumor nachgewiesen werden können, was ihre Vorhersagekraft wiederum einschränkt. Deshalb ist eine Kombination verschiedener dieser Tumormarker beziehungsweise anderer spezifischer Marker für das Pankreaskarzinom anzustreben.

Dasselbe gilt für den als Verlaufsparemeter genutzten Nachweis von CA 19-9, einem Tumormarker der in Patientenserum als Verlaufs-Marker und Rezidiv-Indikator bestimmt wird. Studien zeigen, dass eben auch 5/7 Patienten mit einer chronischen Pankreatitis erhöhte CA 19-9 Serumwerte haben, und nach einer erfolgten Operation eines Pankreaskarzinoms eine Normalisierung der Serum CA 19-9 Spiegel nur in 10-29% der Fälle eintritt.

Bisher steht ein kommerzieller Kit zum Nachweis von K-Ras mittels PCR-Technik zur Verfügung (Elucigene K-Ras7; Zeneca Diagnostics), doch ist diese Technik zeitaufwendig und teuer und erfordert wie alle molekularbiologischen Methoden einen sehr sorgfältigen (sterilen) Umgang mit dem Untersuchungsmaterial und der Durchführung des Testverfahrens, um DNA-Kontaminationen aus der Umwelt zu vermeiden, die den Nachweis falsch negativ oder falsch positiv beeinflussen können.

Als ein weiterer Marker zur Diagnose des Pankreaskarzinoms bietet sich die Bestimmung von Carboxypeptidase A (CPA) an. Dieses Enzym wird ausschließlich im Pankreas als Vorläufer („Proenzym“) Procarboxypeptidase A (PCPA) gebildet. Durch Abspaltung

- 5 -

des Propeptids wird das Enzym in aktive Carboxypeptidase überführt.

PCPA wird im Serum von Pankreastumorpatienten erhöht nachgewiesen. Außerdem wird Carboxypeptidase A vom gesunden Pankreas im Vergleich mit anderen Pankreasenzymen (Elastase, Amylase, etc.) nur in geringem Maße sezerniert (ca. 5% Anteil an der Enzymsekretion). Es ist deshalb zu erwarten, dass eine krankhafte Veränderung des Pankreas (Pankreatitis, Pankreaskarzinom) zum Abfall des Enzyms unter die Nachweisgrenze und/oder zu einem Anstieg des „unreifen“ Proenzym (PCPA) führt. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass Carboxypeptidase A die Darmpassage unbeschadet übersteht und im Stuhl zu quantifizieren ist.

Es gibt bisher keinen kommerziellen Nachweiskit zur Bestimmung von CPA beziehungsweise PCPA in Körperflüssigkeiten oder Stuhl.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass eine sichere, nicht-invasive Diagnostik chronischer Veränderungen bei den meisten gastrointestinalen Erkrankungen nach wie vor nicht zur Verfügung steht.

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa vergeht zwischen dem Auftreten erster Symptome bis zur Diagnosestellung im Allgemeinen ein sehr langer Zeitraum, der die Durchführung einer Heilbehandlung in vielen Fällen sehr erschwert oder sogar unmöglich macht. Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) unklarer Ätio-

logie für die gegenwärtig weder befriedigende Diagnose- noch Therapiemöglichkeiten zur Verfügung stehen. Die gegenwärtig zur Diagnose von Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa durchgeführten Verfahren umfassen das Feststellen von Entzündungsparametern sowie mikrobiologische und serologische Untersuchungen von Körperflüssigkeiten und Stuhl. Hinzu kommen in einigen Fällen sonografische und endoskopische Untersuchungsverfahren. Überdies wurden Verfahren unter Einsatz radioaktiver Isotopen wie ¹¹¹Indium oder ⁹⁹Technezium entwickelt, im Rahmen derer mit diesen Isotopen Leukozyten markiert und nachgewiesen wurden. Obgleich diese Verfahren eine hohe Sensitivität und Spezifität für den Nachweis von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa aufweisen, erweisen sie sich als technisch kompliziert, teuer und für den Patienten als belastend. Bestimmte Patientengruppen wie Kinder oder schwangere Frauen können diesen Diagnoseverfahren nicht ausgesetzt werden.

Es wurden daher schonendere Verfahren entwickelt, die auf der Basis von Antikörpertests einen spezifischen Nachweis bestimmter Krankheitsbilder schon frühzeitig ermöglichen. So beschreibt die US-PS 5,455,160 Verfahren zur Diagnose onkologischer Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes sowie von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Die Druckschrift offenbart den Einsatz von Antikörpern, die gegen Calprotectin gerichtet sind, insbesondere den Einsatz eines Enzym-Immuntests zur Quantifikation von Calprotectin im Stuhl von Patienten, wobei eine erhöhte Menge von Calprotectin einen Hinweis auf eine der vorgenannten Krankheiten gibt.

Die DE 41 07 765 A1 beschreibt ein Verfahren zur Gewinnung von einem hochspezifischen Pankreas-Elastase 1-Antikörper, der sowohl mit Körperflüssigkeiten als auch mit Stuhl reagiert. Ein gemäß
5 dieses Verfahrens gewonnener Antikörper eignet sich zur Diagnose der chronischen und akuten Pankreatitis im Stuhl.

SLPI (Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor), ein 11,7 kDa großes Protein mit Protease-
10 inhibitorischer Funktion ist aus Si-Tahar (Gastroenterology 118 (2000), 1061-1071) als mögliches therapeutisches Agens gegen intestinale schädigende Einflüsse wie mikrobielle Infektionen, bekannt.

15 Aus der WO 94/06454 ist die Verwendung von SLPI als prophylaktisches Agens gegenüber einer HIV-Infektion bekannt. In der WO 99/17800 ist die Verwendung von SLPI in pulverisierter Form als pharmazeutisches Agens beschrieben. Die dort speziell be-
20 schriebene pulverisierte Darreichungsform dient dem Einsatz von SLPI im Rahmen einer Inhalationstherapie. Aus der US 5,633,227 geht die Verwendung von SLPI zur Behandlung von Asthma oder allergischer Rhinitis hervor. Aus der JP 07103977 gehen immuno-
25 logische Sandwich-Tests für SLPI oder SLPI-Elastase-Komplexe hervor, wobei SLPI Fragmente mit den Aminosäureresten 1 bis 54 und 55 bis 107 erkannt werden. Es wird beschrieben, dass mittels des beschriebenen Systems Erkrankungen der Atemwege
30 nachgewiesen werden können. Aus der JP 03279862 gehen ebenfalls Antikörper-basierte Testverfahren für SLPI hervor.

Für SLPI ist bekannt, dass dieses Protein inhibitorische Aktivität gegenüber Chymotrypsintyp-Proteasen (wie pankreatische Elastase) und Trypsintyp-Proteasen aufweist. Für die erstgenannte Aktivität ist bekannt, dass diese dem C-terminalen Bereich und die zweitgenannte Aktivität dem N-terminalen Bereich von SLPI zuzuordnen ist. Die US 5,851,983 beschreibt auf der Basis dieser Erkenntnisse hergestellte verkürzte und Fusionsproteine sowie pharmazeutische Anwendungsmöglichkeiten derselben. Schließlich offenbart die WO 96/08275 weitere Fragmente von SLPI und deren Einsatz zur Inhibierung von Tryptasen.

Das der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende technische Problem liegt also darin, einfach durchzuführende, schonende, kostengünstige sowie schnell durchzuführende Nachweisverfahren für pankreatische und gastrointestinale Erkrankungen, insbesondere Pankreaskarzinom, chronische Pankreatitis, gastrische Läsionen und entzündliche Darmerkrankungen bereitzustellen.

Die Erfindung löst dieses Problem durch die Bereitstellung eines Verfahrens zum Nachweis einer Krankheit eines menschlichen oder tierischen Körpers, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Pankreaskarzinom, chronischer Pankreatitis, gastrischer Läsion und entzündlicher Darmerkrankung, wobei Serum oder Stuhl des menschlichen oder tierischen Körpers gewonnen und SLPI (Sekretorischer Leukozyten-Protease-Inhibitor), Fragmente oder Komplexe davon durch Inkontaktbringen mit immunologischen Mitteln nachgewiesen wird, insbesondere, wobei die Konzent-

ration an SLPI, Fragmenten oder Komplexen davon im Serum oder Stuhl bestimmt wird. Erfindungsgemäß konnte überraschenderweise gezeigt werden, dass unter Einsatz immunologischer Mittel, insbesondere monoclonaler oder polyclonaler Antikörper, ein Nachweis der genannten Krankheiten im Serum oder im Stuhl des menschlichen oder tierischen Körpers möglich ist, indem die Anwesenheit beziehungsweise Abwesenheit von SLPI, Komplexen oder Fragmenten davon, insbesondere die Konzentration an vorhandenem SLPI, im Vergleich zu nicht erkrankten Kontrollpersonen bestimmt wird.

An chronischer Pankreatitis oder Pankreaskarzinom erkrankte Patienten lassen sich erfindungsgemäß dadurch diagnostizieren, dass in ihrem Stuhl SLPI auftritt, insbesondere in erhöhter Konzentration gegenüber Gesunden. Der Stuhl von gesunden menschlichen oder tierischen Körpern weist sehr wenig oder kein SLPI auf. Erfindungsgemäß kann mittels der vorliegenden Erfindung im Stuhl von Patienten nicht nur chronische Pankreatitis oder Pankreaskarzinom bestimmt, sondern überdies auch der Erkrankungsgrad mittels einer SLPI-Konzentrationsbestimmung quantifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die SLPI-Konzentrationen im Stuhl mit den dort vorhandenen Konzentrationen an Elastase-1 korrelieren. Es konnte insbesondere gezeigt werden, dass bei Patienten mit chronischer Pankreatitis die SLPI-Konzentrationen im Stuhl mit den Elastase-1-Konzentrationen und dass auch die SLPI-Konzentration bei gesunden Kontrollpersonen mit den Elastase-1-Konzentrationen dieser Personen korreliert. Gleiches gilt für die SLPI-Konzentration von

- 10 -

Patienten mit Pankreaskarzinom, die demgemäß ebenfalls mit den Elastase-1-Konzentrationen dieser Patienten korreliert.

Die Erfindung ist unter anderem deswegen überraschend, als dass gezeigt werden konnte, dass SLPI
5 im Darmtrakt nicht in jedem Fall sofort abgebaut wird. Vielmehr kann bei Patienten mit chronischer Pankreatitis und Pankreaskarzinom SLPI im Stuhl nachgewiesen werden.

10 Die Erfindung betrifft also insbesondere Verfahren zum immunologischen Nachweis von pankreatischen Erkrankungen durch Detektion von SLPI im Stuhl von menschlichen oder tierischen Körpern.

Erfindungsgemäß konnte überdies gezeigt werden,
15 dass bei gesunden Kontrollpersonen, die keine gastrischen Läsionen wie Gastritis oder Ulkus aufwiesen, die SLPI-Konzentration im Serum geringer als bei Patienten mit solchen Läsionen ist. Erfindungsgemäß kann das vorliegende Verfahren zum immunologischen Nachweis von pankreatischen und gastroin-
20 testinalen Erkrankungen also auch zur Diagnose von gastralen Läsionen dienen, wobei eine gegenüber normalen, gesunden Vergleichspersonen erhöhte SLPI-Konzentrationen im Serum nachgewiesen wird. Die Er-
25 findung betrifft daher insbesondere auch Verfahren zum immunologischen Nachweis von gastrointestinalen Erkrankungen durch Detektion von SLPI im Serum von menschlichen oder tierischen Körpern.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird
30 unter dem Begriff "immunologische Mittel" insbeson-

dere der Einsatz von Antikörpern zum Nachweis von Antigenen, insbesondere SLPI, SLPI-haltigen Komplexen, zum Beispiel Protein-Protein-Komplexen homo- oder heteromerer Zusammensetzung oder SLPI-Fragmenten verstanden. Im Zusammenhang mit der vor-
5 liegenden Erfindung werden unter dem Begriff SLPI im Folgenden auch dessen Komplexe zum Beispiel mit anderen Proteinen, wie ein SLPI-Elastase-1-Komplex, oder Fragmente von SLPI, zum Beispiel C- oder N-
10 terminale Fragmente, verstanden. Solche Fragmente können zum Beispiel Aminosäurereste 1 bis 54 (N-terminales Fragment) oder 55 bis 107 (C-terminales Fragment) aufweisen. Hinsichtlich der vorgenannten Positionsangaben wird auf die US 5,851,983 und die
15 dort in SEQ ID Nr. 4 angegebene Nummerierung verwiesen. Der Offenbarungsgehalt der US 5,851,983 sowie der WO 96/08275 hinsichtlich der dort offenbarten Fragmente von SLPI wird hiermit vollständig in den Offenbarungsgehalt der vorliegenden Erfindung
20 mit einbezogen und verdeutlicht, dass für die dort genannten Fragmente in Kombination mit dem vorliegenden erfindungsgemäßen Verfahren Schutz begehrt wird.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter dem Begriff Antikörper sowohl monoclonale
25 als auch polyclonale Antikörper sowie Fragmente davon verstanden, solange diese spezifisch SLPI, SLPI-haltige Komplexe, zum Beispiel SLPI-Elastase-1-Komplexe, oder SLPI-Fragmente erkennen und binden. In bevorzugter Ausführung binden die Antikörper
30 oder Fragmente davon keine anderen Antigene. Selbstverständlich können die Antikörper oder Fragmente modifiziert sein, zum Beispiel mit anderen

Molekülen oder Teilen davon konjugiert, assoziiert oder kovalent oder nicht-kovalent gebunden sein, zum Beispiel mit Farbmarkierungen, radioaktiven Markierungen, messbare Reaktionen auslösenden Enzymen, wie Phosphatasen, Peroxidasen, Enzymsubstraten, fluoreszierenden Substanzen, chemiluminiszenten Substanzen, cytotoxischen Agentien, Spacern, Trägerstoffen oder ähnliches. Die markierten, konjugierten oder nicht-modifizierten Antikörper können in löslicher oder immobilisierter Form, zum Beispiel auf Trägermatrices oder Kügelchen, vorliegen. Zum Beispiel können die enzymmarkierten Antikörper in einem zweiten Enzymamplifikationssystem eingesetzt werden.

Erfindungsgemäß wird in bevorzugter Ausführung unter dem Einsatz immunologischer Mittel das Inkontaktbringen einer Probe, das heißt von Serum oder Stuhl, insbesondere homogenisierten Stuhls, mit einem immunologischen Agens verstanden, umfassend wenigstens einen Antikörper, der spezifisch das Antigen, also SLPI, erkennt.

Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung von Antikörpern gegen SLPI zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung von SLPI im Stuhl oder Serum eines menschlichen oder tierischen Körpers. Erfindungsgemäß ist es so möglich, unter Verwendung des Antikörpers gegen SLPI gastrointestinale Erkrankungen spezifisch in Serum und Pankreaskarzinom oder chronische Pankreatitis im Stuhl nachzuweisen.

Die erfindungsgemäßen Verfahren unter Einsatz immunologischer Mittel können bevorzugt als Sandwich-ELISA, indirekter oder kompetitiver ELISA ausgeführt sein, wobei besonders bevorzugt HTP-Verfahren
5 (high through put) eingesetzt werden.

Im Rahmen eines erfindungsgemäßen Sandwich-ELISAs ist die Bereitstellung mindestens zwei verschiedener monoclonaler Antikörper nötig, die vorzugsweise gegen unterschiedliche Epitope, alternativ aber
10 auch gleiche Epitope, von SLPI gerichtet sind. Die mindestens zwei Antikörper können in homogenen oder heterogenen System zum Beispiel löslich und/oder geträgert vorliegen.

Erfindungsgemäß ist es selbstverständlich auch möglich, die immunologischen Mittel als System aus
15 drei unterschiedlichen Antikörpern auszuführen, wobei einer der Antikörper in heterogener Phase vorliegt und die beiden anderen Antikörper löslich sind. Einer der beiden löslichen Antikörper ist
20 markiert, während der andere unmarkiert ist. Der lösliche Antikörper ist in dieser Ausführungsform gegen den nicht markierten Antikörper gerichtet.

Erfindungsgemäß durchgeführte Verfahren unter Einsatz immunologischer Mittel erfordern in besonders
25 bevorzugter Ausführungsform also die Inkubation des Serums oder, bevorzugt homogenisierten und gegebenenfalls verdünnten, Stuhls mit mindestens zwei verschiedenen Antikörpern, die spezifisch für SLPI sind. In bevorzugter Ausführungsform ist einer der
30 beiden Antikörper an eine Festphase gebunden, wobei dies in üblicher Weise geschieht. Der weitere Anti-

körper liegt vorteilhafterweise in löslicher Form vor und trägt in bevorzugter Ausführungsform eine Markierung. Werden erfindungsgemäß weitere Antikörper verwendet, so trägt in bevorzugter Ausführungsform nur einer von diesen eine Markierung.

Erfindungsgemäß ist in einer Ausführungsform vorgesehen, dass entweder ein unspezifisch mit SLPI bindefähiger Antikörper oder besonders bevorzugt ein spezifisch mit SLPI bindefähiger Antikörper an eine feste Phase gebunden wird. Dieser an die Festphase gebundene Antikörper wird anschließend mit dem Serum oder dem Stuhl und, gegebenenfalls nach einem Waschschrift, einem zweiten Antikörper inkubiert, der spezifisch mit SLPI bindefähig ist, in einer löslichen Form vorliegt und eine Markierung trägt. Sofern der an die Festphase gebundene Antikörper ein unspezifisch mit SLPI bindefähiger Antikörper ist, binden an der Festphase nicht nur SLPI, sondern auch andere Antigene. Der zweite Antikörper, der jedoch spezifisch mit SLPI bindet, reagiert nun spezifisch nur mit SLPI beziehungsweise dem Komplex aus SLPI und erstem Antikörper, so dass nur SLPI-Moleküle spezifisch einen markierten Antikörper tragen und so nach Trennung der festen von der flüssigen Phase quantifiziert werden können.

Erfindungsgemäß kann also beispielsweise auch vorgesehen sein, im Rahmen eines Sandwich-ELISAs einen nicht markierten SLPI-spezifischen ersten Antikörper zum Beispiel an einen Träger zu binden, die Testlösung beziehungsweise -suspension hinzuzugeben, wobei das in der Testlösung oder -suspension vorhandene SLPI von dem ersten Antikörper gebunden

wird. Anschließend wird eine zweiter markierter Antikörper gegen SLPI hinzugegeben, der spezifisch mit SLPI oder dem Komplex aus SLPI und erstem Antikörper reagiert. Mittels der Markierung des zweiten Antikörpers kann unter Einsatz einer Eichlösung die Menge an SLPI bestimmt werden.

Wird an die Festphase ein an SLPI spezifisch bindender erster Antikörper fixiert, so wird an der Festphase auch nur SLPI spezifisch gebunden. Bei der Inkubation mit dem zweiten löslichen Antikörper reagiert auch dieser ausschließlich mit SLPI. Nach Trennung der festen von der flüssigen Phase kann über die Markierung des zweiten Antikörpers eine genaue Quantifizierung von SLPI vorgenommen werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sieht die Erfindung auch vor, dass eine Mikrotiterplatte mit einem ersten spezifisch oder unspezifisch an SLPI bindenden Antikörper überzogen wird, dass anschließend das Serum oder der Stuhl mit der beschichteten Mikrotiterplatte in Kontakt gebracht und, nach Abwaschen ungebundener Bestandteile, ein markierter, zum Beispiel Biotin-markierter, zweiter Antikörper gegen SLPI zu der Mikrotiterplatte gegeben wird, wobei die Mikrotiterplatte unter Bedingungen inkubiert wird, dass der zweite Antikörper an SLPI binden kann. Anschließend wird die feste von der flüssigen Phase getrennt und entweder die Markierung direkt nachgewiesen oder, bei Verwendung eines enzymmarkierten zweiten Antikörpers, ein Substrat hinzugegeben, und die Umsetzung des Substrates quantitativ bestimmt. So kann vorgesehen sein, dass der mit Biotin markierte zweite Antikörper in

- 16 -

einer nächsten Inkubation mit einem Konjugat von Peroxidase (POD) und Streptavidin reagiert. Die Peroxidase ist in der Lage, das Substrat ABTS (2, 2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)Diamoniumsalz) zu oxidieren. Oxidiertes ABTS kann anschließend photometrisch bestimmt werden.

In einer erfindungsgemäß besonders bevorzugten Ausführungsform wird der erste Antikörper an einer Trägermatrix, zum Beispiel einer Vlies-, Gewebs- oder Membranstruktur, derart gebunden, dass er nicht wie üblicherweise den Boden der Vertiefung einer ELISA-Immunoplatte darstellt, sondern direkt in die Matrix eingebunden ist. Bevorzugte Matrixes sind Hohlfaser-Membranen oder mikroporöse Flachmembranen, die in einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung auch mit Ionenaustauschergruppen versehen sein können.

Polyclonale Antikörper lassen sich herstellen, indem Tiere mit isolierter und vollständig gereinigtem SLPI oder Fragmenten davon immunisiert werden und so Antiseren mit polyclonalen Antikörpern in an sich bekannter Weise erhalten werden. Monoclonale Antikörper werden nach an sich bekannten Methoden hergestellt. Die erfindungsgemäß eingesetzten Antikörper gegen SLPI können im Handel erhältliche Antikörper sein.

Die erfindungsgemäß nachweisbaren gastrischen Läsionen können Symptome einer Gastritis oder eines Ulcus darstellen. Die erfindungsgemäß nachweisbaren entzündlichen Erkrankungen können beispielsweise auf eine Helicobacter pylori-Infektion zurückzuführen

ren oder Symptome von Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa sein.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass bei dem
5 Nachweis von SLPI im Serum oder Stuhl des Patienten gleichzeitig auch die Elastase 1-Konzentration nachgewiesen wird. Die menschliche pankreatische Elastase-1 übersteht die Passage durch den Darm unbeschadet und kann im Stuhl als Protein quantifi-
10 ziert werden. Die Elastase-1-Konzentration im Stuhl spiegelt die exokrine Pankreasfunktion wieder. Werte größer 200 µg Elastase/pro Gramm Stuhl weisen auf eine normale exokrine Pankreasfunktion und Werte kleiner 200 µg Elastase/pro Gramm Stuhl weisen
15 auf eine exokrine Pankreasinsuffizienz hin. Bei einer akuten Pankreatitis wird in der akuten Entzündungsphase Elastase-1 in das Serum abgegeben, so dass eine Quantifizierung der Elastase im Serum die Diagnose oder den Ausschluss dieser Krankheit er-
20 laubt. Eine hohe Konzentration an Elastase-1 im Serum deutet daher auf eine Pankreatitis hin.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele
25 und der dazugehörigen Figuren näher erläutert.

Die Figuren zeigen:

Figur 1 ein Histogramm zur SLPI-Konzentration im Stuhl,

Figur 2 ein Histogramm zur Elastase-1-Konzentration im Stuhl und

Figur 3 und 4 jeweils ein Histogramm zur SLPI-Konzentration im Serum.

5 Beispiel 1

Nachweis von SLPI im Stuhl von Patienten mit chronischer Pankreatitis

Von 42 Patienten ohne chronische Pankreatitis, 6 Patienten mit Pankreaskarzinom und 19 Patienten mit
10 chronischer Pankreatitis wurden jeweils 100 mg Stuhl gewonnen, abgewogen und mit Extraktionspuffer (phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,2, mit Detergenz und Natriumazid) extrahiert und verdünnt.

15 Die Extraktion wird durchgeführt, indem die Stuhlprobensuspension bei Raumtemperatur mehrfach kräftig mit einem Reagenzglasschüttelgerät gemixt wird. Die Stühle müssen gut homogenisiert sein, um eine vollständige Extraktion zu gewährleisten. Nach mindestens fünf Minuten Extraktion wird noch einmal
20 abschließend gemixt. Nach Absetzen der Partikel werden die Stuhlprobenextrakte wie folgt verdünnt.

Die Verdünnung der Probenextrakte erfolgte zur Messung von SLPI in einer Verdünnung von 1:100 und zur vergleichenden Messung von Elastase-1 mit einer
25 Verdünnung von 1:500.

Die SLPI-Konzentrationen im Stuhl wurden mittels eines SLPI-ELISAs (Quantikine®, Kat. Nr. DP 100,

- 19 -

6/99) der Firma R&D Systems (R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland) bestimmt.

Dieser ELISA setzt eine 96 Vertiefungen umfassende Polystyrolmikrotiterplatte ein, die mit monoclonalen gegen menschliches SLPI gerichteten Antikörper aus der Maus beschichtet ist. Nach Pipettieren des Extraktes in die Vertiefungen wird SLPI durch den immobilisierten monoclonalen Antikörper gebunden. Nach Abwaschen ungebundener Substanzen wird ein mit einem Enzym verbundener polyclonaler Antikörper, der spezifisch für menschliches SLPI ist, in die Vertiefungen gegeben (polyclonaler Antikörper gegen menschliches SLPI, verbunden mit Meerrettich-Peroxidase). Nach Abwaschen ungebundener Antikörper-Enzymreagenzien wird eine Substratlösung in die Vertiefungen gegeben und die Farbentwicklung als Maß für gebundenes SLPI gemessen.

Die Konzentration an pankreatitischer Elastase-1 wurde mittels eines Elastase-1-ELISAs der Firma ScheBo-Tech® (Giessen, Deutschland, Kat. Nr. 07, April 2000, EP 0 547 059 B1) bestimmt.

Es ergaben sich folgende in den Figuren 1 und 2 dargestellte Resultate:

Die Figur 1 zeigt die SLPI-Konzentrationen im Stuhl der Patienten (SLPI in Picogramm pro Gramm Stuhl), aufgetragen für die Patientengruppe ohne chronische Pankreatitis, die Patientengruppe mit Pankreaskarzinom und die Patientengruppe mit chronischer Pankreatitis. Es zeigt sich deutlich, dass die Mitglieder der Kontrollgruppe kein beziehungsweise nur

sehr wenig SLPI im Stuhl haben, während die beiden Patientengruppen mit chronischer Pankreatitis und Pankreaskarzinom erheblich erhöhte SLPI-Konzentrationen im Stuhl aufweisen.

- 5 Die Figur 2 zeigt die an den gleichen Patientengruppen durchgeführten Konzentrationsmessungen von Elastase-1. Die gesunde Kontrollgruppe weist einen deutlich über 200 µg/g Stuhl liegenden Elastasegehalt auf, während die beiden Patientengruppen mit
10 chronischer Pankreatitis und Pankreaskarzinom signifikant reduzierte Elastase-1-Konzentrationen im Stuhl aufweisen.

Beispiel 2

Beispiel 2a

- 15 Nachweis von SLPI im Serum von Patienten mit beziehungsweise ohne eine Magenerkrankung.

Von 17 Patienten mit normalem Magenbefund (oB) und 33 Patienten mit einem Magen- oder Dünndarmgeschwür (Ulcus ventriculi oder Ulcus duodeni) wurde jeweils
20 5 ml Blut gewonnen und durch Zentrifugieren bei 3000 rpm, RT, 10 Minuten Serum gewonnen.

Die Verdünnung der Serumproben erfolgte zur Messung von SLPI in einer Verdünnung von 1:100.

- 25 Die SLPI-Konzentrationen im Serum wurden mittels SLPI-ELISAs (Quantikine®, Kat. Nr. DP 100, 6/99) der Firma R&D Systems (R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland) bestimmt. Der ELISA wurde wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

Die Figur 3 zeigt die SLPI-Konzentration in ng/ml in der Kontrollgruppe und der Patienten.

Resultate:

Die Patientengruppe zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höhere SLPI-Serumkonzentrationen.

Beispiel 2b

Von 17 Patienten mit normalem Magenbefund (Kontrollen), 16 Patienten mit chronischer Gastritis und 18 Patienten mit Geschwürsleiden wurde jeweils 5 ml Blut gewonnen und durch Zentrifugieren bei 3000 rpm, RT, 10 Min. Serum gewonnen.

Die Verdünnung der Serumproben erfolgte zur Messung von SLPI in einer Verdünnung 1:100.

Die SLPI-Konzentrationen im Serum wurden mittels SLPI-ELISAs (Quantkine®, Kat. Nr. DP 100, 6/99) der Firma R&D Systems (R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland) bestimmt.

Der ELISA wurde wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

Sowohl Patienten mit einer chronischen Gastritis als auch Patienten mit Geschwürsleiden (Ulcus ventriculi oder Ulcus duodeni) hatten eine signifikant erhöhte SLPI-Konzentration im Serum.

Die Figur 4 zeigt die SLPI-Konzentrationen in ng/ml im Serum von Patienten mit normalem Magenbefund,

- 22 -

Patienten mit chronischer Gastritis und Patienten mit Geschwürsleiden (Ulcus). Die Figur zeigt deutlich, dass die gesunde Kontrollgruppe eine erheblich geringere SLPI-Konzentration im Serum aufweist als sowohl die Patientengruppe mit chronischer Gastritis als auch die mit Ulcus-Leiden.

Resultate:

SLPI-Serumkonzentrationen sind auch als Marker für gastrointestinale Läsionen geeignet.

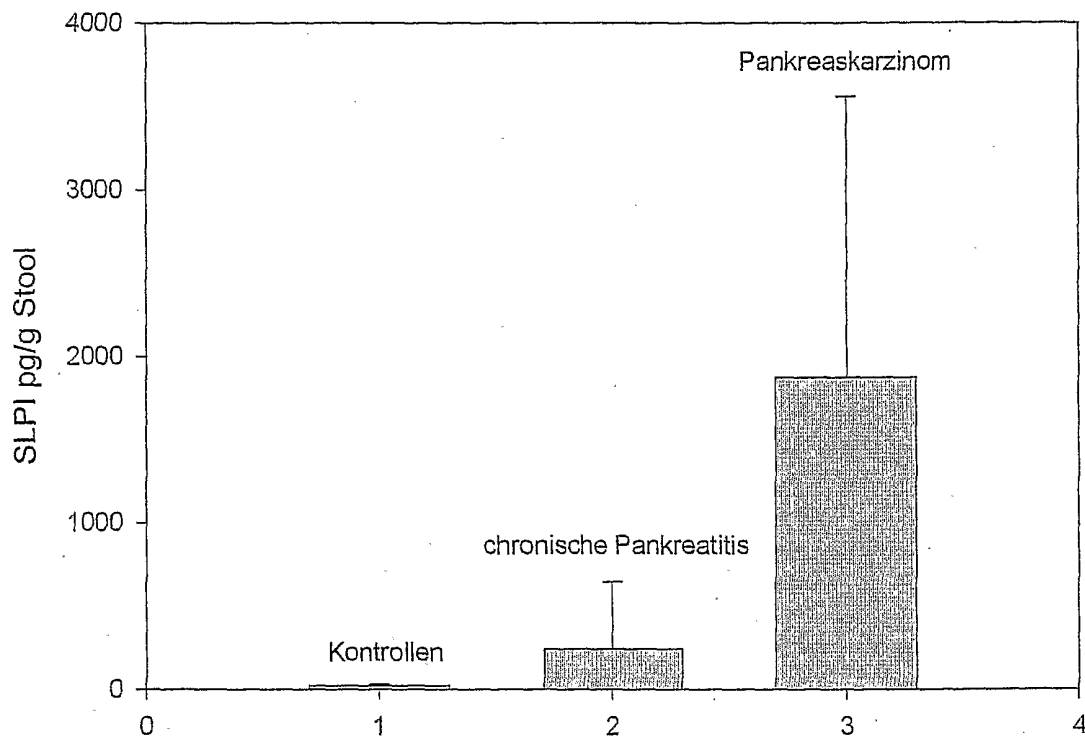
10

Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis einer Krankheit eines
5 menschlichen oder tierischen Körpers ausgewählt aus
der Gruppe bestehend aus Pankreaskarzinom, chroni-
scher Pankreatitis, gastrischer Läsion und entzünd-
licher Darmerkrankung, wobei Serum oder Stuhl des
Körpers gewonnen und in diesem vorhandenes SLPI
10 (sekretorischer Leukocyten-Protease-Inhibitor), ein
Fragment oder ein Komplex davon durch Inkon-
taktbringen mit immunologischen Mitteln nachgewie-
sen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Stuhl vor
15 Inkontaktbringen mit den immunologischen Mitteln
homogenisiert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die im-
munologischen Mittel Antikörper, insbesondere mar-
kierte Antikörper, gegen SLPI, Fragmente oder Kom-
20 plexe davon sind.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die SLPI-
Antikörperreaktion mittels eines ELISA-Tests nach-
gewiesen wird.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprü-
25 che, wobei die gastrische Läsion auf eine Gastritis
oder einen Ulcus zurückzuführen ist.

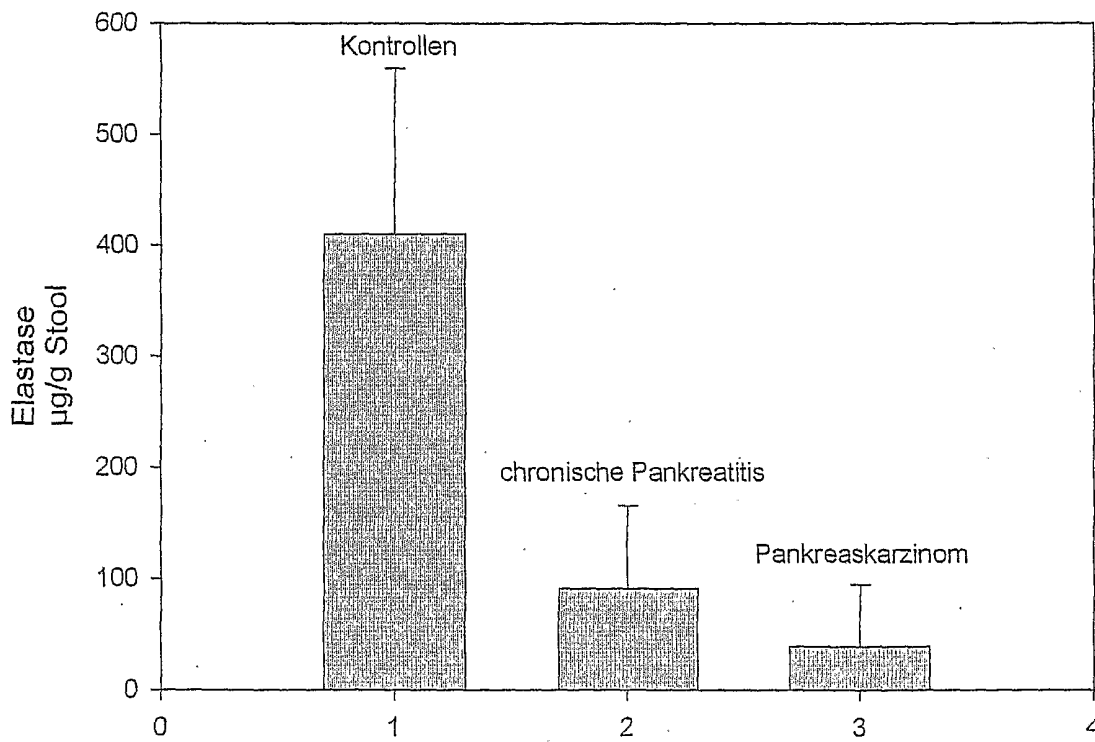
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die entzündliche Darmerkrankung Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa ist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei im Serum oder Stuhl des Körpers neben der SLPI-Antikörperreaktion auch die Elastase 1-Konzentration nachgewiesen wird.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Antikörper monoclonale Antikörper sind.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Komplex ein SLPI-Elastase-1-Komplex ist.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Fragment von SLPI der N-terminale Bereich von SLPI mit den Aminosäureresten 1 bis 54 ist.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Fragment von SLPI der C-terminale Teil von SLPI mit den Aminosäureresten 55 bis 107 ist.
12. Verwendung von gegen SLPI-Fragmenten oder Komplexen davon gerichteten Antikörpern zum Nachweis einer Krankheit eines menschlichen oder tierischen Körpers in Stuhl oder Serum des menschlichen oder tierischen Körpers, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Pankreaskarzinom, chronischer Pankreatitis, gastrischer Läsion und entzündlicher Darmerkrankung.

SLPI Konzentrationen im Stuhl



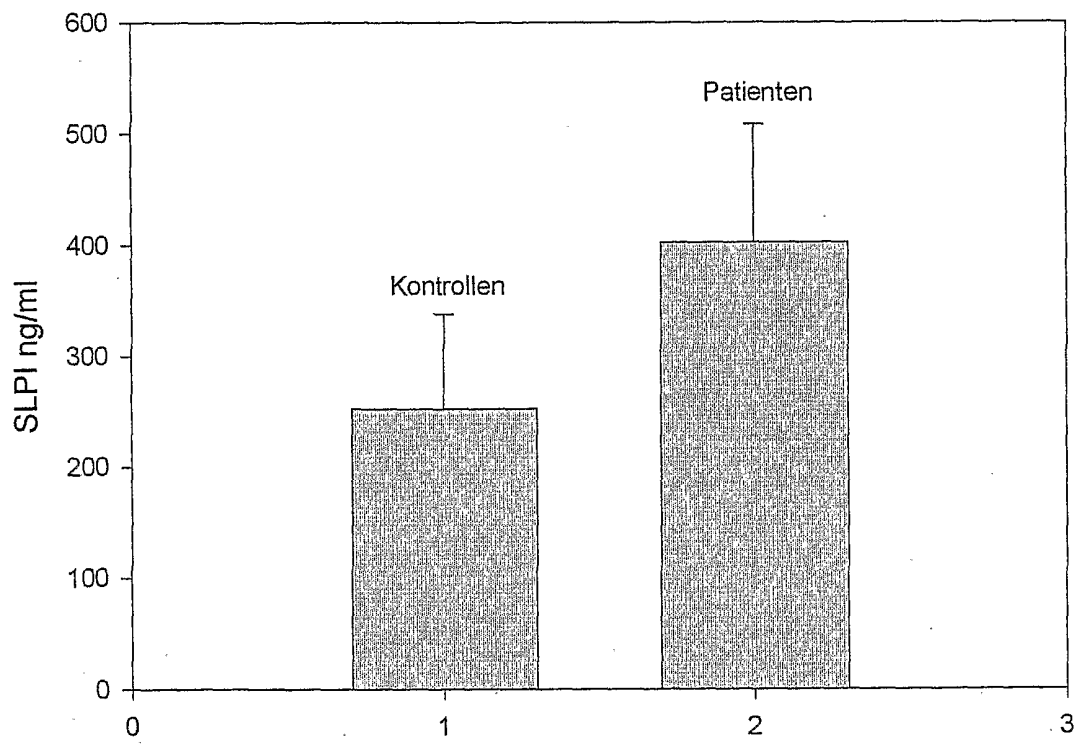
Figur 1

Elastase-1 Konzentrationen im Stuhl



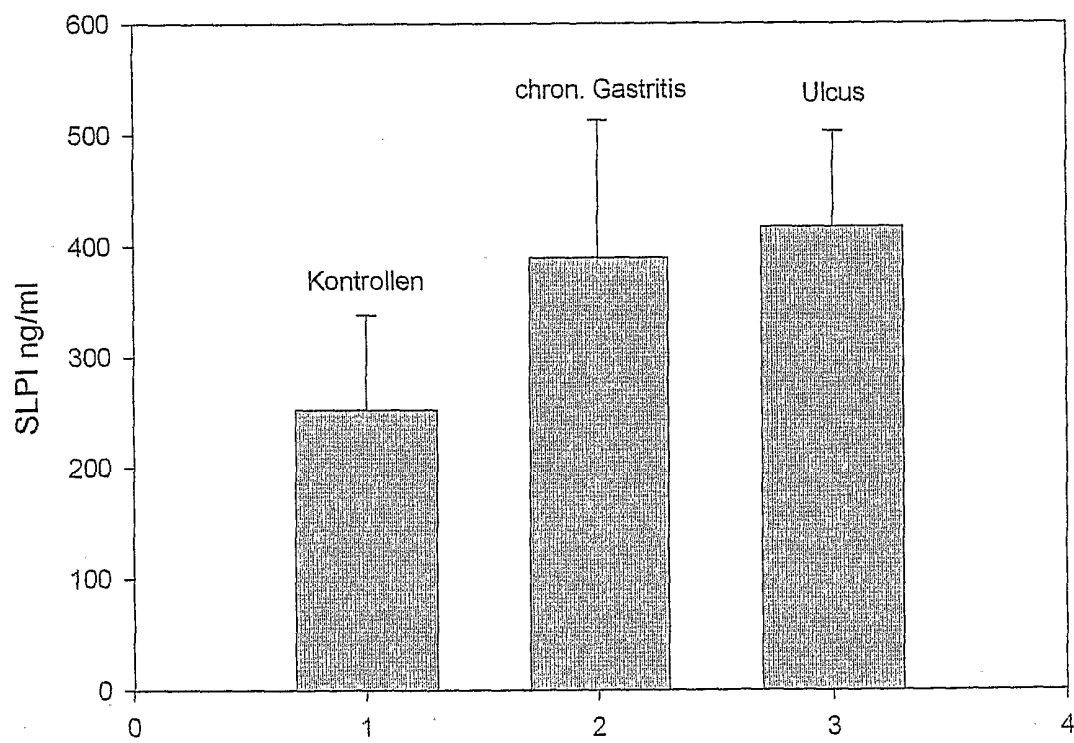
Figur 2

SLPI Serumkonzentrationen



Figur 3

SLPI Serumkonzentrationen



Figur 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/14511

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/574

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)

BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>NYSTROM M ET AL: "The elimination of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) from the gastrointestinal tract in man." SCANDINAVIAN JOURNAL OF CLINICAL AND LABORATORY INVESTIGATION, vol. 57, no. 2, 1997, pages 119-125, XP002200455 ISSN: 0036-5513 page 124, left-hand column, paragraph 3 ----- -/--</p>	1-12

Further documents are listed in the continuation of box C.

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

29 May 2002

Date of mailing of the international search report

19/06/2002

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

Cuendet, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/14511

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AMESHIMA SHINGO ET AL: "Increased secretory leukoprotease inhibitor in patients with nonsmall cell lung carcinoma." CANCER, vol. 89, no. 7, 1 October 2000 (2000-10-01), pages 1448-1456, XP002200456 ISSN: 0008-543X page 1448 page 1455, left-hand column	1-12
P,A	STOCKLEY R A ET AL: "Assessment of airway neutrophils by sputum colour: Correlation with airways inflammation." THORAX, vol. 56, no. 5, May 2001 (2001-05), pages 366-372, XP002200457 ISSN: 0040-6376 the whole document	1-12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/14511

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/574

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)

BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>NYSTROM M ET AL: "The elimination of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) from the gastrointestinal tract in man." SCANDINAVIAN JOURNAL OF CLINICAL AND LABORATORY INVESTIGATION, Bd. 57, Nr. 2, 1997, Seiten 119-125, XP002200455 ISSN: 0036-5513 Seite 124, linke Spalte, Absatz 3</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-12

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

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

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

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

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

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

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

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

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

* & * Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. Mai 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19/06/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
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

Bevollmächtigter Bediensteter

Cuendet, P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>AMESHIMA SHINGO ET AL: "Increased secretory leukoprotease inhibitor in patients with nonsmall cell lung carcinoma." CANCER, Bd. 89, Nr. 7, 1. Oktober 2000 (2000-10-01), Seiten 1448-1456, XP002200456 ISSN: 0008-543X Seite 1448 Seite 1455, linke Spalte</p>	1-12
P,A	<p>STOCKLEY R A ET AL: "Assessment of airway neutrophils by sputum colour: Correlation with airways inflammation." THORAX, Bd. 56, Nr. 5, Mai 2001 (2001-05), Seiten 366-372, XP002200457 ISSN: 0040-6376 das ganze Dokument</p>	1-12