

(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
17. März 2011 (17.03.2011)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2011/029954 A2

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

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2010/063475

(22) Internationales Anmeldedatum:
14. September 2010 (14.09.2010)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
09170190.4 14. September 2009 (14.09.2009) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MOSAIQUES DIAGNOSTICS AND THERAPEUTICS AG [DE/DE]; Mellendorfer Str. 7-9, 30625 Hannover (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MISCHAK, Harald [AT/DE]; Storchstraße 6, 31319 Sehnde (DE).

(74) Anwalt: VON KREISLER SELTING WERNER; Deichmannhaus am Dom, Bahnhofsvorplatz 1, 50667 Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,

BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)

— mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

(54) Title: POLYPEPTIDE MARKER FOR DIAGNOSING AND ASSESSING VASCULAR DISEASES

(54) Bezeichnung : POLYPEPTIDMARKER ZUR DIAGNOSTIK UND BEURTEILUNG VASKULÄRER ERKRANKUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for diagnosing vascular diseases, comprising the step in which the presence, absence or amplitude of at least three polypeptide markers is determined in a urine sample, wherein the polypeptide markers are selected from the markers characterized in table 1 by values for the molecular masses and the migration time.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Diagnostik von vaskulären Erkrankungen umfassend den Schritt der Bestimmung einer An- oder Abwesenheit oder Amplitude von mindestens drei Polypeptidmarkern in einer Urinprobe, wobei der Polypeptidmarker ausgewählt sind aus den Markern, die in Tabelle 1 durch Werte für die Molekularmassen und die Migrationszeit charakterisiert sind.



WO 2011/029954 A2

Polypeptidmarker zur Diagnostik und Beurteilung vaskulärer Erkrankungen

Beschreibung der Erfindung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung der An- oder Abwesenheit eines oder mehrerer Peptidmarker in einer Probe eines Individuums zur Diagnostik und Beurteilung des Schweregrades von vaskulären Erkrankungen (VE) sowie ein Verfahren zur Diagnostik und Beurteilung der vaskulären Erkrankung, wobei die An- oder Abwesenheit des oder der Peptidmarker(s) indikativ
10 für den Schweregrad einer VE ist.
- Vaskuläre Erkrankungen sind Erkrankungen, die die Gefäße eines Organismus und in weiterer Folge Organe wie zum Beispiel das Herz, das Gehirn, die Niere, etc., betreffen. Dies sind z.B. Arteriosklerose, Durchblutungsstörungen, Bluthochdruck, sowie Herzrhythmusstörungen.
- 15 Arteriosklerose bezeichnet die Verhärtung von Arterien durch Gefäßeinlagerungen. Cholesterinkristallablagerungen führen zur Bildung von entzündlichen Herden (Atheromen), in denen sich Blutbestandteile, Fettstoffe, Stoffwechselschlacken und Kalksalze festsetzen. Es bilden sich sogenannte Plaques, flächige Verkalkungen; wodurch die Gefäßwand härter und enger wird. Die Arterie
20 verliert an Elastizität und der Bluttransport vom Herzen in die einzelnen Körperbereiche wird erschwert. Folgeerkrankungen sind beispielsweise Angina pectoris, Herzinfarkt, Kreislaufkollaps, Schlaganfall, tief liegende Beinvenenthrombosen, Embolien. Durchblutungsstörungen betreffen meistens den unteren Körperbereich, von der Bauchaorta bis zu den Fußarterien und führen zu
25 einer Verringerung des Blutflusses und der Sauerstoffzufuhr in das Muskelgewebe, das allmählich abstirbt. Im letzten Stadium bilden sich Geschwüre und die Gefäße verschließen sich derart, dass eine Amputation unumgänglich wird. Bluthochdruck hat keine eindeutige Ursache, so kann die Einnahme von Medikamenten oder eine übermäßige Sekretion von Nierenhormonen den Blutdruck
30 hochschnellen lassen. Hohe Blutdruckwerte liegen ebenfalls bei Dauerstress vor, bei dem es zu Gefäßkrämpfen kommt. Bluthochdruck schädigt die Gefäßwände, so dass die Gefahr eines Zerreißens oder eines Verschlusses besteht.

Vaskuläre Erkrankungen können durch Vorbeugung vermieden werden, weil sie mit einer ungesunden Lebensführung assoziiert sind. Durch eine radikale Umkehr in der Lebensweise ist Arterienverkalkung im Frühstadium aufzuhalten, z.B. durch Senken von Blutdruck- und Blutfettwerten. Das Fortschreiten vaskulärer Erkrankungen kann zudem durch medikamentöse Therapien (z.B. Acetylsalicylsäure, Betarezeptorenblocker, ACE-Hemmer, etc.) verlangsamt werden. Allerdings ist festzuhalten, dass geschädigte Gefäße irreparabel sind, der Prozess im fortgeschrittenen Stadium nicht rückgängig zu machen ist. Dieses macht eine frühzeitige Erkennung der vaskulären Erkrankungen besonders wichtig.

Die Diagnostik von VE erfolgt bei koronaren Herzerkrankung zunächst indirekt über Evaluierung von Risikofaktoren und durch nicht-invasive Untersuchungen wie Blutdruckmessung, Ruhe und Belastungs-EKG, sowie durch Blutbilder zur Bestimmung des Lipidstatus (LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Triglyzeride), Nüchternblutzucker und ggf. HbA1c. Ergeben diese Untersuchungen das Vorliegen von Hochrisikomerkmale, d.h. es ist mit schwerwiegenden vaskulären Ereignissen (Tod, Myokardinfarkt) innerhalb der nächsten Zeit zu rechnen, wird mit Hilfe von invasiver Diagnostik z.B. in Form einer Koronarangiographie eine genauere Diagnose erstellt. Dazu werden Herz und Herzkranzgefäße sowie andere Gefäße mit Hilfe eines Katheters und Röntgenbestrahlung untersucht. Um das Herz und die Gefäße auf dem Röntgenbild besser sichtbar machen zu können, werden Röntgen-Kontrastmittel verwendet. Als Indikation zur Koronarangiographie gilt eine niedrige oder mittlere Vortest-Wahrscheinlichkeit, wobei die nicht-invasive Diagnostik keine zuverlässigen Ergebnisse ergeben hat. Die Koronarangiographie kann allerdings nur durchgeführt werden, wenn neben den zuvor genannten Voruntersuchungen, verschiedene Komplikationen wie z.B. eine Schilddrüsenüberfunktion oder eine Kontrastmittelallergie ausgeschlossen sind. Weil das Kontrastmittel über die Niere ausgeschieden wird, muss zudem eine ausreichende Nierenfunktion vorliegen. Damit wird deutlich, dass der Bedarf hinsichtlich einer nicht-invasiven Möglichkeit zur frühzeitigen und zuverlässigen Diagnose von vaskulären Erkrankungen besteht.

Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Verfahren und Mittel für die Diagnose von vaskulären Erkrankungen bereit zu stellen.

- Gelöst wird die Aufgabe durch ein Verfahren zur Diagnostik von vaskulären Erkrankungen umfassend den Schritt der Bestimmung einer An- oder Abwesenheit oder Amplitude von mindestens drei Polypeptidmarkern in einer Urinprobe, wobei die Polypeptidmarker ausgewählt sind aus den Markern, die in Tabelle 1 durch Werte für die Molekularmassen, die Migrationszeit charakterisiert und ggf. ihre Peptidsequenz charakterisiert sind.

10 **Tabelle 1.** Polypeptidmarker

Nr.	Protein ID	Masse (Da)	CE-T (min)	Sequenz	Parental Protein	Start	Stop
1	1495	838.40	35.06				
2	3796	884.29	43.81				
3	3806	884.32	24.85				
4	11413	981.59	24.80	VLNLGPITR	Uromodulin	598	606
5	11989	988.52	22.44				
6	14071	1032.50	21.21				
7	15776	1068.45	24.76				
8	16168	1073.32	35.32				
9	16859	1082.49	20.78				
10	16854	1082.50	23.91				
11	18833	1113.46	27.30				
12	18939	1114.48	24.21				
13	19648	1126.47	21.18				
14	19828	1129.46	27.91				
15	19871	1130.34	35.39				
16	20334	1138.47	37.07				
17	20690	1140.47	21.07				
18	21147	1150.56	22.43				
19	21365	1154.51	25.64	PpGEAGKpGEQG	Collagen alpha-1 (I) chain	651	662
20	22625	1169.57	23.71				
21	22885	1174.54	38.13	ADIAPSTDDLAS	Microfibrillar-associated protein 5	63	74
22	23724	1187.36	35.69				

23	24291	1196.32	36.11				
24	25363	1216.54	24.24				
25	25429	1217.53	35.78				
26	26163	1226.53	21.02				
27	26879	1238.56	21.14				
28	26919	1239.43	33.81				
29	26929	1239.51	35.72				
30	28466	1263.54	22.73				
31	29279	1276.40	35.92				
32	29677	1283.37	36.12				
33	30575	1297.58	27.37	SpGSpGPDGKTGPp	Collagen alpha-1 (I) chain	543	556
34	31480	1312.55	29.77				
35	31525	1312.62	22.45				
36	32481	1326.57	21.67				
37	32823	1332.54	21.74				
38	32874	1333.42	36.11				
39	33135	1338.60	23.99				
40	33776	1351.64	38.76				
41	34186	1358.38	36.46				
42	34432	1363.43	36.34				
43	34795	1368.58	21.90				
44	36345	1396.62	28.12	SpGERGETGPpGPAG	Collagen alpha-1 (III) chain	796	810
45	36784	1405.69	23.42				
46	37698	1422.68	28.14				
47	38752	1438.45	36.76				
48	38780	1438.66	29.52	GLpGTGGPpGENGKpG	Collagen alpha-1 (III) chain	642	657
49	38798	1438.67	27.88	GLpGTGGPpGENGKpG	Collagen alpha-1 (III) chain	642	657
50	38910	1440.56	24.30	DEAGSEADHEGTHS	Fibrinogen alpha chain	605	618
51	40091	1449.64	21.86				
52	40487	1457.60	21.93				
53	41431	1466.66	21.87				
54	41770	1473.63	22.21				
55	41833	1474.67	22.44				
56	42216	1483.70	20.65				
57	42304	1485.67	23.77	DGQpGAKGEpGDAGAK	Collagen alpha-1 (I) chain	820	835
58	42867	1496.63	22.34				
59	43828	1512.69	26.62				

60	44592	1523.67	21.97				
61	44679	1524.65	20.03				
62	44718	1525.48	37.16				
63	45503	1540.75	39.98				
64	45980	1552.50	37.21				
65	46184	1556.74	40.03				
66	46606	1562.69	22.46				
67	47285	1575.75	30.20				
68	48089	1579.68	20.06				
69	48131	1580.50	36.39				
70	48751	1592.70	22.18				
71	49243	1593.69	22.38				
72	50008	1609.75	30.20	TGSpGSpGPDGKTGP P Gp	Collagen alpha-1 (I) chain	541	558
73	50593	1619.79	40.40				
74	50638	1620.70	22.66				
75	51916	1636.70	20.03				
76	51929	1636.74	22.50				
77	52189	1640.58	23.24				
78	52769	1649.73	22.64				
79	53554	1662.74	30.70				
80	53744	1666.78	30.66	KpGEQGVpGDLGApGPSG	Collagen alpha-1 (I) chain	657	674
81	53800	1667.79	40.56				
82	54846	1687.54	37.79				
83	55582	1697.74	30.88	NGAPGNDGAKGDAGAPGAPG	Collagen alpha-1 (I) chain	700	719
84	56053	1706.78	22.69				
85	57265	1732.77	28.18				
86	57537	1737.78	23.73	NDGApGKNGERGGpGG p Gp	Collagen alpha-1 (III) chain	586	604
87	57531	1737.78	31.00	TGSpGSpGPDGKTGPPGpAG	Collagen alpha-1 (I) chain	541	560
88	58355	1754.90	31.26				
89	58941	1765.81	31.00	GPpGEAGKpGEQGVpGDLG	Collagen alpha-1 (I) chain	650	668
90	59745	1782.84	25.91				
91	59773	1783.79	39.82				
92	59793	1784.81	39.92				
93	60628	1806.83	23.06				
94	60751	1807.81	20.65				
95	60816	1808.79	23.72				
96	61221	1817.69	20.23				

97	61332	1819.80	23.36				
98	61480	1823.77	25.04				
99	61573	1825.79	20.13	DEAGSEADHEGTHSTKR	Fibrinogen alpha chain	605	621
100	63209	1860.83	21.40	EGSpGRDGSpGAKGDRGET	Collagen alpha-1 (I) chain	1021	1039
101	63916	1876.84	23.38				
102	64170	1880.90	43.91				
103	64256	1882.80	20.24	DEAGSEADHEGTHSTKRG	Fibrinogen alpha chain	605	622
104	64869	1892.77	40.25				
105	65998	1913.90	40.96				
106	67097	1931.90	31.49	APEAQVSVQPNFQQDKF	Prostaglandin-H2 D-isomerase; N-term.	23	39
107	67386	1936.88	32.24	GEKGPSGEAGTAGPpGTpGPQG	Collagen alpha-2 (I) chain	844	865
108	67951	1950.85	35.77				
109	68163	1955.88	28.11				
110	68701	1969.84	25.23				
111	69080	1976.88	32.38				
112	69681	1989.88	32.44				
113	69979	1996.79	20.98				
114	70024	1997.91	25.16				
115	70456	2008.90	32.29				
116	71599	2030.91	21.85				
117	72048	2034.99	40.19				
118	72095	2036.90	31.52				
119	72240	2040.88	39.35				
120	72641	2048.93	24.46				
121	72868	2055.14	33.40	VVVKLFSDPITVTPVEV	Clusterin	405	423
122	74057	2079.00	24.68				
123	74987	2089.96	39.52				
124	75128	2093.92	33.78				
125	77018	2133.96	27.77	DGQPGAKGEpGDAGAKG- DAGP PGp	Collagen alpha-1 (I) chain	820	843
126	79581	2184.57	35.08				
127	79720	2187.95	39.78				
128	80551	2199.00	22.31				
129	82026	2226.99	26.28	GNSGEpGApGSKGDTGAK- GEpGPVG	Collagen alpha-1 (I) chain	431	455

130	82509	2233.05	20.51	GKNGDDGEAGKPGRpGERG PpG P	Collagen alpha-1 (I) chain	227	249
131	83577	2249.04	20.53	GKNGDDGEAGKpGRpGERG PpG P	Collagen alpha-1 (I) chain	227	249
132	86785	2310.06	41.31				
133	88093	2336.04	26.66				
134	90013	2370.12	30.74				
135	90054	2371.08	22.79				
136	90989	2392.65	35.59				
137	91044	2394.08	23.64				
138	96875	2529.14	28.25	GPPGADGQpGAKGEpGDA- GAKGDA Gp PpG	Collagen alpha-1 (I) chain	815	843
139	97599	2547.99	21.44				
140	98089	2559.18	19.41	DEAGSEADHEGTHSTKRGHAKS RP	Fibrinogen alpha chain	605	628
141	98899	2567.20	28.21				
142	99021	2570.19	42.56				
143	100991	2612.21	34.91				
144	102924	2647.20	23.47				
145	104954	2682.14	22.49				
146	106667	2726.28	42.94				
147	107016	2733.78	34.16				
148	111304	2834.19	22.47				
149	112106	2854.36	34.86				
150	113910	2903.36	35.71				
151	114086	2907.35	35.96				
152	116543	2973.45	24.37				
153	117009	2977.37	29.12				

Die Auswertung der gemessenen Polypeptide kann anhand der An- oder Abwesenheit oder Amplitude der Marker unter Berücksichtigung der folgenden Grenzwerte erfolgen:

- Spezifität ist definiert als die Nummer der tatsächlich negativen Proben geteilt durch die Summe der Anzahl der tatsächlich Negativen und der Anzahl der Falsch-Positiven. Eine Spezifität von 100% bedeutet, dass ein Test alle gesun-

den Personen als gesund erkennt, d.h. kein Gesunder wird als krank identifiziert. Dies trifft keine Aussage darüber, wie gut der Test kranke Patienten erkennt.

Sensitivität ist definiert als die Anzahl der tatsächlichen positiven Proben geteilt durch die Summe der Anzahl der tatsächlich Positiven und die Anzahl der Falsch-Negativen. Eine Sensitivität von 100% bedeutet, dass der Test alle Kranken erkennt. Er trifft keine Aussage, wie gut der Test gesunde Personen erkennt.

Durch die erfindungsgemäßen Markern ist es möglich, für vaskuläre Erkrankungen eine Spezifität von mindestens 60, bevorzugt mindestens 70, mehr bevorzugt 80, noch mehr bevorzugt mindestens 90 und am meisten bevorzugt mindestens 95% zu erreichen.

Durch die erfindungsgemäßen Markern ist es möglich, für vaskuläre Erkrankungen eine Sensitivität von mindestens 60, bevorzugt mindestens 70, mehr bevorzugt 80, noch mehr bevorzugt mindestens 90 und am meisten bevorzugt mindestens 95% zu erreichen.

Zur Analyse der An- oder Abwesenheit bzw. Amplitude werden folgende Werte zugrundegelegt:

Tabelle 2:

Nr.	Protein_ID	Masse	CE-T	Frequenz VE	Mittelwert VE	Frequenz Kontrolle	Mittelwert Kontrolle	Regulationsfaktor*
1	1495	838,40	35,1	35%	36	31%	92	-2,3
2	3796	884,29	43,8	24%	25	46%	110	-8,5
3	3806	884,32	24,9	67%	177	85%	537	-3,8
4	11413	981,59	24,8	78%	279	82%	787	-3,0
5	11989	988,52	22,4	47%	113	26%	72	2,8
6	14071	1032,50	21,2	59%	349	64%	633	-2,0
7	15776	1068,45	24,8	95%	1716	69%	2751	-1,2
8	16168	1073,32	35,3	97%	4627	97%	8438	-1,8
9	16859	1082,49	20,8	26%	40	23%	39	1,2
10	16854	1082,50	23,9	48%	92	56%	246	-3,1
11	18833	1113,46	27,3	78%	238	84%	389	-1,8
12	18939	1114,48	24,2	38%	52	59%	173	-5,1
13	19648	1126,47	21,2	54%	148	54%	302	-2,0
14	19828	1129,46	27,9	62%	130	76%	257	-2,4
15	19871	1130,34	35,4	82%	410	81%	759	-1,8
16	20334	1138,47	37,1	40%	51	34%	79	-1,3
17	20690	1140,47	21,1	76%	1218	81%	2251	-2,0

18	21147	1150,56	22,4	71%	209	53%	147	1,9
19	21365	1154,51	25,7	77%	276	71%	584	-2,0
20	22625	1169,57	23,7	46%	41	39%	63	-1,3
21	22885	1174,54	38,1	22%	50	32%	87	-2,5
22	23724	1187,36	35,7	61%	525	80%	1082	-2,7
23	24291	1196,32	36,1	98%	18682	97%	32361	-1,7
24	25363	1216,54	24,2	89%	738	80%	1604	-2,0
25	25429	1217,53	35,8	54%	1454	27%	854	3,4
26	26163	1226,53	21,0	66%	330	76%	586	-2,0
27	26879	1238,56	21,1	17%	46	19%	47	-1,1
28	26919	1239,43	33,8	44%	176	20%	81	4,8
29	26929	1239,51	35,7	26%	142	48%	614	-8,0
30	28466	1263,54	22,7	58%	208	81%	601	-4,0
31	29279	1276,40	35,9	91%	3155	99%	5853	-2,0
32	29677	1283,37	36,1	89%	464	89%	638	-1,4
33	30575	1297,58	27,4	45%	662	81%	4441	-12,1
34	31480	1312,55	29,8	98%	1603	94%	2021	-1,2
35	31525	1312,62	22,5	78%	604	68%	675	-1,0
36	32481	1326,57	21,7	25%	51	23%	48	1,2
37	32823	1332,54	21,7	53%	408	10%	102	21,1
38	32874	1333,42	36,1	53%	77	59%	128	-1,9
39	33135	1338,60	24,0	80%	288	59%	258	1,5
40	33776	1351,64	38,8	65%	158	43%	158	1,5
41	34186	1358,38	36,5	96%	2051	96%	2797	-1,4
42	34432	1363,43	36,3	98%	1828	99%	3211	-1,8
43	34795	1368,58	21,9	29%	97	35%	154	-1,9
44	36345	1396,62	28,1	75%	488	62%	757	-1,3
45	36784	1405,69	23,4	75%	267	67%	297	-1,0
46	37698	1422,68	28,1	74%	2053	81%	3255	-1,7
47	38752	1438,45	36,8	97%	5564	99%	8313	-1,5
48	38780	1438,66	30,2	31%	90	35%	171	-2,1
49	38798	1438,67	27,9	98%	3225	95%	6756	-2,0
50	38910	1440,56	24,3	35%	77	44%	128	-2,1
51	40091	1449,64	21,9	99%	5122	97%	6380	-1,2
52	40487	1457,60	21,9	26%	45	28%	75	-1,8
53	41431	1466,66	21,9	100%	2801	98%	3314	-1,2
54	41770	1473,63	22,2	39%	231	42%	439	-2,0
55	41833	1474,67	22,4	56%	429	53%	540	-1,2
56	42216	1483,70	20,7	57%	157	41%	177	-0,8
57	42304	1485,67	23,8	96%	1111	88%	1138	-0,9
58	42867	1496,63	22,3	21%	25	23%	52	-2,3
59	43828	1512,69	26,6	54%	65	25%	37	3,8
60	44592	1523,67	22,0	93%	4861	96%	7108	-1,5
61	44679	1524,65	20,0	89%	526	74%	619	-1,0
62	44718	1525,48	37,2	100%	2505	99%	3428	-1,4
63	45503	1540,75	40,0	34%	866	55%	1217	-2,3
64	45980	1552,50	37,2	95%	2320	92%	3635	-1,5

65	46184	1556,74	40,0	40%	320	49%	428	-1,6
66	46606	1562,69	22,5	80%	1276	75%	1421	-1,0
67	47285	1575,75	30,2	57%	148	35%	826	-3,4
68	48089	1579,68	20,1	99%	8298	100%	12271	-1,5
69	48131	1580,50	36,4	23%	158	17%	171	-0,8
70	48751	1592,70	22,2	66%	351	73%	518	-1,6
71	49243	1593,69	22,4	36%	97	43%	125	-1,5
72	50008	1609,75	30,2	63%	528	54%	661	-1,1
73	50593	1619,79	40,4	56%	118	22%	51	5,8
74	50638	1620,70	22,7	25%	84	48%	210	-4,8
75	51916	1636,70	20,0	84%	856	87%	1765	-2,1
76	51929	1636,74	22,5	99%	12206	99%	14540	-1,2
77	52189	1640,58	23,2	94%	4862	96%	7587	-1,6
78	52769	1649,73	22,6	80%	707	79%	838	-1,2
79	53554	1662,74	30,7	31%	46	33%	106	-2,5
80	53744	1666,78	30,7	61%	159	73%	413	-3,1
81	53800	1667,79	40,6	45%	293	21%	116	5,4
82	54846	1687,54	37,8	89%	229	62%	177	1,9
83	55582	1697,74	30,9	93%	1081	90%	1354	-1,2
84	56053	1706,78	22,7	98%	880	93%	1357	-1,5
85	57265	1732,77	28,2	79%	2155	93%	2915	-1,6
86	57537	1737,78	23,7	100%	5346	96%	6769	-1,2
87	57531	1737,78	31,0	88%	2357	93%	3345	-1,5
88	58355	1754,90	31,3	88%	5814	58%	4585	1,9
89	58941	1765,81	31,0	85%	1586	80%	1622	-1,0
90	59745	1782,84	25,9	62%	407	58%	268	1,6
91	59773	1783,79	39,8	55%	219	60%	274	-1,4
92	59793	1784,81	39,9	42%	228	25%	119	3,2
93	60628	1806,83	23,1	70%	207	66%	235	-1,1
94	60751	1807,81	20,7	95%	1928	94%	3116	-1,6
95	60816	1808,79	23,7	45%	128	51%	190	-1,7
96	61221	1817,69	20,2	97%	3122	98%	4734	-1,5
97	61332	1819,80	23,4	100%	4640	99%	6251	-1,3
98	61480	1823,77	25,0	36%	109	40%	120	-1,2
99	61573	1825,79	20,1	94%	1756	93%	2406	-1,4
100	63209	1860,83	21,4	50%	430	75%	1000	-3,5
101	63916	1876,84	23,4	75%	292	73%	295	-1,0
102	64170	1880,90	43,9	49%	456	64%	729	-2,1
103	64256	1882,80	20,2	100%	25031	100%	36640	-1,5
104	64869	1892,77	40,3	29%	221	26%	477	-1,9
105	65998	1913,90	41,0	55%	147	33%	80	3,1
106	67097	1931,90	31,5	40%	79	20%	30	5,3
107	67386	1936,88	32,2	91%	315	85%	370	-1,1
108	67951	1950,85	35,8	84%	714	84%	780	-1,1
109	68163	1955,88	28,1	68%	301	52%	249	1,6
110	68701	1969,84	25,2	75%	771	71%	701	1,2
111	69080	1976,88	32,4	36%	164	47%	219	-1,7

112	69681	1989,88	32,4	86%	272	84%	320	-1,1
113	69979	1996,79	21,0	82%	561	83%	1253	-2,3
114	70024	1997,91	25,2	65%	208	26%	56	9,2
115	70456	2008,90	32,3	24%	360	27%	250	1,3
116	71599	2030,91	21,9	42%	118	16%	39	7,9
117	72048	2034,99	40,2	43%	72	48%	126	-2,0
118	72095	2036,90	31,5	47%	51	21%	28	4,0
119	72240	2040,88	39,4	25%	49	16%	27	2,9
120	72641	2048,93	24,5	96%	1499	93%	1409	1,1
121	72868	2055,14	33,4	30%	195	16%	111	3,3
122	74057	2079,00	24,7	55%	170	49%	182	-1,0
123	74987	2089,96	39,5	50%	141	33%	100	2,1
124	75128	2093,92	33,8	46%	115	31%	77	2,2
125	77018	2133,96	27,8	96%	4175	94%	2918	1,5
126	79581	2184,57	35,1	82%	570	69%	564	1,2
127	79720	2187,95	39,8	95%	1501	93%	1451	1,1
128	80551	2199,00	22,3	46%	81	24%	60	2,6
129	82026	2226,99	26,3	74%	10980	93%	17324	-2,0
130	82509	2233,04	20,5	78%	413	52%	344	1,8
131	83577	2249,04	20,5	64%	307	49%	323	-0,8
132	86785	2310,06	41,3	63%	155	58%	191	-1,1
133	88093	2336,04	26,7	48%	82	9%	10	42,0
134	90013	2370,12	30,7	23%	39	19%	34	1,4
135	90054	2371,08	22,8	66%	182	36%	66	5,1
136	90989	2392,65	35,6	25%	179	23%	140	1,4
137	91044	2394,08	23,6	42%	143	18%	50	6,6
138	96875	2529,14	28,3	45%	111	12%	19	21,7
139	97599	2547,99	21,4	65%	289	37%	223	2,3
140	98089	2559,18	19,4	60%	1075	44%	790	1,9
141	98899	2567,20	28,2	53%	197	24%	64	6,8
142	99021	2570,19	42,6	95%	7702	82%	5976	1,5
143	100991	2612,21	34,9	87%	711	74%	428	2,0
144	102924	2647,20	23,5	68%	129	37%	135	-0,6
145	104954	2682,14	22,5	96%	1032	93%	1167	-1,1
146	106667	2726,28	42,9	91%	5136	77%	3966	1,5
147	107016	2733,78	34,2	61%	184	36%	84	3,7
148	111304	2834,19	22,5	42%	84	37%	75	1,3
149	112106	2854,36	34,9	98%	4323	85%	3723	1,3
150	113910	2903,36	35,7	42%	36	15%	11	8,9
151	114086	2907,35	36,0	76%	314	34%	80	8,8
152	116543	2973,45	24,4	70%	408	42%	212	3,2
153	117009	2977,37	29,1	75%	253	38%	101	5,0

*)

Wenn Mittelwert(VE) > Mittelwert(Kontrolle): Frequenz(VE)*Mittelwert(VE)/ Frequenz(Kontrolle)*Mittelwert(Kontrolle)

Wenn Mittelwert(VE) < Mittelwert(Kontrolle): -(Frequenz(Kontrolle)*Mittelwert(Kontrolle) / Frequenz(VE)*Mittelwert(VE))

Masse in Dalton

CE-Zeit in Minuten

Die Migrationszeit wird mittels Kapillarelektrophorese (capillary electrophoresis, CE) – wie z.B. in Beispiel unter Punkt 2 ausgeführt – bestimmt. In diesem Beispiel wird eine 90 cm lange Glaskapillare mit einem inneren Durchmesser (ID) von 50 µm und einem äußeren Durchmesser (OD) von 360 µm bei einer angelegten Spannung von 30 kV betrieben. Als Laufmittel wird zum Beispiel 30% Methanol, 0,5% Ameisensäure in Wasser verwendet.

Es ist bekannt, dass die CE-Migrationszeit variieren kann. Dennoch ist die Reihenfolge, mit der die Polypeptidmarker eluieren, für jedes verwendete CE System unter den angegebenen Bedingungen typischerweise gleich. Um dennoch auftretende Unterschiede in der Migrationszeit auszugleichen, kann das System unter Verwendung von Standards, für die die Migrationszeiten genau bekannt sind, normiert werden. Diese Standards können z.B. die in den Beispielen angegebenen Polypeptide sein (siehe Beispiel Punkt 3).

Die Charakterisierung der Polypeptide, die in der Tabelle 1 gezeigt sind, wurde mittels Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie (CE-MS) bestimmt, einem Verfahren, das z.B. ausführlich von Neuhoff et al. (*Rapid communications in mass spectrometry*, 2004, Bd. 20, Seite 149-156) beschrieben wurde. Die Variation der Molekülmassen zwischen einzelnen Messungen oder zwischen verschiedenen Massenspektrometern ist bei exakter Kalibrierung relativ klein, typischerweise im Bereich von $\pm 0,1\%$, vorzugsweise im Bereich von $\pm 0,05\%$, mehr bevorzugt $\pm 0,03\%$, noch mehr bevorzugt $\pm 0,01\%$ oder $0,005\%$.

Die erfindungsgemäßen Polypeptidmarker sind Proteine oder Peptide oder Abbauprodukte von Proteinen oder Peptiden. Sie können chemisch modifiziert sein, z.B. durch posttranslationale Modifikationen wie Glykolisierung, Phosphorylierung, Alkylierung oder Disulfidverbrückung, oder durch andere Reaktionen, z.B. im Rahmen des Abbaus, verändert sein. Darüber hinaus können die Polypeptidmarker auch im Rahmen der Aufreinigung der Proben chemisch verändert, z.B. oxidiert, sein. Ausgehend von den Parametern, die die Poly-

peptidmarker bestimmen (Molekularmasse und Migrationszeit), ist es möglich, durch im Stand der Technik bekannte Verfahren die Sequenz der entsprechenden Polypeptide zu identifizieren.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide werden verwendet, um vaskuläre Erkrankungen zu diagnostizieren. Unter Diagnose versteht man den Vorgang der Erkenntnisgewinnung durch die Zuordnung von Symptomen oder Phänomenen zu einer Krankheit oder Verletzung. Die An- oder Abwesenheit eines Polypeptidmarkers kann durch jedes im Stand der Technik bekannte Verfahren gemessen werden. Verfahren, die verwendet werden können, sind weiter unten beispielhaft aufgeführt.

Ein Polypeptidmarker ist anwesend, wenn sein Messwert mindestens so hoch ist wie der Schwellenwert. Liegt sein Messwert darunter, ist der Polypeptidmarker abwesend. Der Schwellenwert kann entweder durch die Sensitivität des Messverfahrens (Nachweisgrenze) bestimmt werden oder anhand von Erfahrungen definiert werden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird der Schwellenwert vorzugsweise überschritten, wenn der Messwert der Probe für eine bestimmte Molekularmasse mindestens doppelt so hoch ist, wie der einer Leerprobe (z.B. nur Puffer oder Lösungsmittel). Der oder die Polypeptidmarker wird/werden in der Weise verwendet, dass seine/ihre An- oder Abwesenheit gemessen wird, wobei die An- oder Abwesenheit indikativ für die vaskuläre Erkrankungen ist. So gibt es Polypeptidmarker, die typischerweise bei Individuen mit vaskulären Erkrankungen vorhanden sind, jedoch bei Individuen ohne vaskuläre Erkrankungen seltener oder gar nicht auftreten. Weiterhin gibt es Polypeptidmarker, die bei Patienten mit vaskulären Erkrankungen vorhanden sind, jedoch bei Patienten ohne vaskuläre Erkrankungen nicht oder nur seltener vorhanden sind.

Zusätzlich oder auch alternativ zu den Frequenzmarkern (Bestimmung der An- oder Abwesenheit) können auch Amplitudenmarker zur Diagnose verwendet werden. Amplitudenmarker werden in der Weise verwendet, dass nicht die An- oder Abwesenheit entscheidend ist, sondern die Höhe des Signals (die Amplitude) bei Anwesenheit des Signals in beiden Gruppen entscheidet. Dabei sind

zwei Nominierungsverfahren möglich, um eine Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlich konzentrierten Proben oder unterschiedlichen Messmethoden zu erreichen. Im ersten Ansatz werden alle Peptidsignale einer Probe auf eine Gesamtamplitude von 1 Million Counts normiert. Die jeweiligen mittleren Amplituden der Einzelmarker sind daher als parts per million (ppm) angegeben.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit über ein alternatives Normierungsverfahren weitere Amplitudenmarker zu definieren: in diesem Fall werden alle Peptidsignale einer Probe mit einem gemeinsamen Normierungsfaktor skaliert. Dazu wird eine lineare Regression zwischen den Peptid-Amplituden der einzelnen Proben und den Referenzwerten aller bekannten Polypeptide gebildet. Die Steigerung der Regressionsgeraden entspricht gerade der relativen Konzentration und wird als Normierungsfaktor für diese Probe verwandt.

Die Entscheidung zu einer Diagnose fällt dabei je nachdem, wie hoch die Amplitude der jeweiligen Polypeptidmarker in der Patientenprobe im Vergleich zu den mittleren Amplituden in der Kontrollgruppe bzw. der "Krank"-Gruppe ist. Liegt der Wert nahe an der mittleren Amplitude der "Krank"-Gruppe, ist von dem Vorliegen einer vaskulären Erkrankung auszugehen, entspricht sie eher den mittleren Amplituden der Kontroll-Gruppe, ist nicht von einer vaskulären Erkrankung auszugehen. Der Abstand zur mittleren Amplitude kann als eine Wahrscheinlichkeit für die Zugehörigkeit zu einer Gruppe interpretiert werden. Alternativ kann der Abstand zwischen dem Messwert und der mittleren Amplitude als eine Wahrscheinlichkeit für die Zugehörigkeit zu einer Gruppe betrachtet werden.

Ein Frequenzmarker ist eine Variante des Amplitudenmarkers, bei dem in einigen Proben die Amplitude so gering ist, dass sie unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Es ist möglich, solche Frequenzmarker in Amplitudenmarker umzurechnen, in dem in die Berechnung der Amplitude die entsprechenden Proben, bei denen der Marker nicht gefunden wird, mit einer sehr kleinen Amplitude - im Bereich der Nachweisgrenze - in die Berechnung eingeht.

Das Individuum, von dem die Probe stammt, in der die An- oder Abwesenheit eines oder mehrerer Polypeptidmarker bestimmt wird, kann jedes Individuum sein, das an vaskulären Erkrankungen leiden kann. Vorzugsweise handelt es

sich bei dem Individuum um ein Säugetier, am meisten bevorzugt handelt es sich um einen Menschen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden nicht nur drei Polypeptidmarker, sondern eine größere Kombination von Markern verwendet.

- 5 Durch Vergleich einer Mehrzahl von Polypeptidmarkern kann die Verfälschung des Gesamtergebnisses durch einzelne individuelle Abweichungen von der typischen Anwesenheitswahrscheinlichkeit im einzelnen Individuum reduziert oder vermieden werden.

- Bei der Probe, in der die An- oder Abwesenheit des oder der erfindungsgemä-
10 ßen Polypeptidmarker gemessen werden, kann es sich um jede Probe handeln, die aus dem Körper des Individuums gewonnen wird. Bei der Probe handelt es sich um eine Probe, die über eine Polypeptidzusammensetzung verfügt, die geeignet ist, Aussagen über den Zustand des Individuums zu treffen. Beispielsweise kann es sich um Blut, Urin, eine Gelenkflüssigkeit, eine Gewebe-
15 flüssigkeit, ein Körpersekret, Schweiß, Liquor, Lymphe, Darm-, Magen-, Pankreassaft, Galle, Tränenflüssigkeit, eine Gewebeprobe, Sperma, Vaginalflüssigkeit oder eine Stuhlprobe handeln. Vorzugsweise handelt es sich um eine Flüssigprobe. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Probe um eine Urinprobe.

- 20 Urinproben können wie im Stand der Technik bekannt genommen werden. Vorzugsweise wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Mittelstrahlurinprobe verwendet. Die Urinprobe kann z.B. mittels eines Katheters oder auch mit Hilfe eines Urinierungsapparates, wie in WO 01/74275 beschrieben, entnommen werden.

- 25 Die An- oder Abwesenheit eines Polypeptidmarkers in der Probe kann durch jedes im Stand der Technik bekannte Verfahren, das zur Messung von Polypeptidmarkern geeignet ist, bestimmt werden. Dem Fachmann sind solche Verfahren bekannt. Grundsätzlich kann die An- oder Abwesenheit eines Polypeptidmarkers durch direkte Verfahren, wie z.B. Massenspektrometrie,
30 oder indirekte Verfahren, wie z.B. mittels Liganden, bestimmt werden.

Falls erforderlich oder wünschenswert kann die Probe des Individuums, z.B. die Urinprobe, vor der Messung der An- oder Abwesenheit des oder der Poly-

peptidmarker durch jedes geeignete Mittel vorbehandelt und z.B. aufgereinigt oder aufgetrennt werden. Die Behandlung kann z.B. eine Aufreinigung, Trennung, Verdünnung oder Konzentrierung umfassen. Die Verfahren können beispielsweise eine Zentrifugation, Filtration, Ultrafiltration, Dialyse, eine Fällung oder chromatographische Verfahren wie Affinitätstrennung oder Trennung mittels Ionenaustauscherchromatographie, oder eine elektrophoretische Trennung sein. Besondere Beispiele hierfür sind Gelelektrophorese, zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE), Kapillarelektrophorese, Metallaffinitätschromatographie, immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC), Affinitätschromatographie auf der Basis von Lektinen, Flüssigchromatographie, Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), Normal- und Umkehrphasen-HPLC, Kationenaustauscherchromatographie und selektive Bindung an Oberflächen. Alle diese Verfahren sind dem Fachmann gut bekannt und der Fachmann wird das Verfahren in Abhängigkeit von der verwendeten Probe und dem Verfahren zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit des oder der Polypeptidmarker auswählen können.

In einer Ausführungsform der Erfindung wird die Probe vor ihrer Messung mittels Elektrophorese aufgetrennt, mittels Ultrazentrifugation gereinigt und/oder mittels Ultrafiltration in Fraktionen, die Polypeptidmarker bestimmter molekularer Größe enthalten, aufgetrennt.

Vorzugsweise wird ein massenspektrometrisches Verfahren verwendet, um die An- oder Abwesenheit eines Polypeptidmarkers zu bestimmen, wobei diesem Verfahren eine Aufreinigung oder Auftrennung der Probe vorgeschaltet werden kann. Die massenspektrometrische Analyse besitzt gegenüber den derzeit gängigen Verfahren den Vorteil, dass die Konzentration vieler (>100) Polypeptide einer Probe mittels einer einzigen Analyse bestimmt werden kann. Jeder Typ eines Massenspektrometers kann verwendet werden. Mit der Massenspektrometrie ist es möglich, routinemäßig 10 fmol eines Polypeptidmarkers, also 0.1 ng eines 10 kDa Proteins mit einer Messgenauigkeit von ca. $\pm 0.01\%$ aus einem komplexen Gemisch zu vermessen. Bei Massenspektrometern ist eine Ionen-bildende Einheit mit einem geeigneten Analysegerät gekoppelt. Zum Beispiel werden meistens Elektrospray-Ionisations (ESI) Interfaces ver-

wendet, um Ionen aus Flüssigproben zu vermessen, wohingegen die Matrix-assisted-laser-desorption/ionisation (MALDI) Technik verwendet wird, um Ionen aus mit einer Matrix kristallisierten Probe zu vermessen. Zur Analyse der entstandenen Ionen können z.B. Quadrupole, Ionenfallen oder Time-of-flight (TOF) Analysatoren verwendet werden.

Bei der Elektrosprayionisation (ESI) werden die in Lösung vorliegenden Moleküle u.a. unter dem Einfluss von Hochspannung (z.B. 1-8 kV) versprüht, wobei sich geladene Tröpfchen bilden, die durch Verdampfen des Lösungsmittels kleiner werden. Schließlich kommt es durch sog. Coulomb-Explosionen zur Bildung freier Ionen, die dann analysiert und detektiert werden können.

Bei der Analyse der Ionen mittels TOF wird eine bestimmte Beschleunigungsspannung angelegt, die den Ionen eine gleich große kinetische Energie verleiht. Dann wird sehr genau die Zeit gemessen, die die jeweiligen Ionen benötigen, um eine Driftstrecke durch das Flugrohr zurückzulegen. Da bei gleicher kinetische Energie die Geschwindigkeit der Ionen von Ihrer Masse abhängt, kann diese somit bestimmt werden. TOF-Analysatoren haben eine sehr hohe Scan-Geschwindigkeit und erreichen eine sehr hohe Auflösung.

Bevorzugte Verfahren zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von Polypeptidmarkern schließen Gasphasenionenspektrometrie, wie Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie, MALDI-TOF-MS, SELDI-TOF-MS (Surface enhanced laser desorption ionisation), LC-MS (Liquid chromatography- mass spectrometry), 2D-PAGE-MS und Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie (CE-MS) ein. Alle genannten Verfahren sind dem Fachmann bekannt.

Ein besonders bevorzugtes Verfahren ist CE-MS, in welchem die Kapillarelektrophorese mit Massenspektrometrie gekoppelt wird. Dieses Verfahren ist ausführlich z.B. in der deutschen Patentanmeldung DE 10021737, bei Kaiser et al. (*J. Chromatogr. A*, 2003, Bd. 1013:157-171, sowie *Electrophoresis*, 2004, 25:2044-2055) und bei Wittke et al. (*J. Chromatogr. A*, 2003, 1013:173-181) beschrieben. Die CE-MS Technik erlaubt, das Vorhandensein einiger Hunderter Polypeptidmarker einer Probe gleichzeitig in kurzer Zeit, einem geringen Volumen und hoher Sensitivität zu bestimmen. Nachdem eine Probe vermessen

wurde, wird ein Muster der gemessenen Polypeptidmarker hergestellt. Dieses kann mit Referenzmustern von kranken bzw. gesunden Individuen verglichen werden. In den meisten Fällen ist es ausreichend, eine begrenzte Anzahl von Polypeptidmarkern für die Diagnostik von vaskuläre Erkrankungen zu verwenden. Weiter bevorzugt ist ein CE-MS Verfahren, das CE online an ein ESI-TOF-MS gekoppelt, einschließt.

Für CE-MS ist die Verwendung von flüchtigen Lösungsmitteln bevorzugt, außerdem arbeitet man am besten unter im Wesentlichen salzfreien Bedingungen. Beispiele geeigneter Lösungsmittel umfassen Acetonitril, Methanol und ähnliche. Die Lösungsmittel können mit Wasser verdünnt und mit einer Säure (z.B. 0,1% bis 1% Ameisensäure) versetzt sein, um den Analyten, vorzugsweise die Polypeptide, zu protonieren.

Mit der Kapillarelektrophorese ist es möglich, Moleküle nach ihrer Ladung und Größe zu trennen. Neutrale Teilchen wandern beim Anlegen eines Stromes mit der Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses, Kationen werden zur Kathode beschleunigt und Anionen verzögert. Der Vorteil von Kapillaren in der Elektrophorese besteht im günstigen Verhältnis von Oberfläche zu Volumen, was einen guten Abtransport der beim Stromfluss entstehenden Jouleschen Wärme ermöglicht. Dies wiederum erlaubt das Anlegen hoher Spannungen (üblicherweise bis 30 kV) und damit eine hohe Trennleistung und kurze Analysezeiten.

Bei der Kapillarelektrophorese werden normalerweise Quarzglaskapillaren mit Innendurchmessern von typischerweise 50 bis 75 μm eingesetzt. Die verwendeten Längen betragen 30-100 cm. Darüber hinaus bestehen die Kapillaren in der Regel aus kunststoffumhüllten Quarzglas. Die Kapillaren können sowohl unbehandelt sei, d.h. auf der Innenseite ihre hydrophilen Gruppen zeigen, als auch auf der Innenseite beschichtet sein. Eine hydrophobe Beschichtung kann verwendet werden, um die Auflösung zu verbessern. Zusätzlich zur Spannung kann auch ein Druck angelegt werden, der typischerweise im Bereich von 0-1 psi liegt. Der Druck kann dabei auch erst während der Trennung angelegt oder währenddessen verändert werden.

In einem bevorzugten Verfahren zur Messung von Polypeptidmarkern werden die Marker der Probe mittels Kapillarelektrophorese getrennt, anschließend direkt ionisiert und online in ein daran gekoppeltes Massenspektrometer zur Detektion überführt. In dem erfindungsgemäßen Verfahren können in vorteil-

5 hafter Weise mehrere Polypeptidmarker zur Diagnostik verwendet werden. Bevorzugt ist die Verwendung von mindestens 5, 6, 8, oder 10 Markern. In einer Ausführungsform werden 20 bis 50 Marker verwendet.

Um die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Erkrankung bei Verwendung mehrerer Marker zu bestimmen, können dem Fachmann bekannte statistische

10 Verfahren verwendet werden. Beispielsweise kann das von Weissinger et al. (*Kidney Int.*, 2004, 65:2426-2434) beschriebene Random-Forests-Verfahren unter Verwendung eines Computerprogramms wie z.B. S-Plus oder die in der selben Veröffentlichung beschriebenen support-vector-machines verwendet werden.

Beispiel:

1. Probenvorbereitung:

Zur Detektion der Polypeptidmarker zur Diagnostik wurde Urin verwendet. Urin wurde von gesunden Spendern (Vergleichsgruppe) sowie Patienten, die

20 an vaskulären Erkrankungen leiden, abgenommen. Für die nachfolgende CE-MS Messung mussten die auch in Urin von Patienten in höherer Konzentration vorkommenden Proteine wie Albumin und Immunglobuline durch Ultrafiltration abgetrennt werden. Dazu wurden 700 µl Urin entnommen und mit 700 µm Filtrationspuffer (2M Harnstoff, 10mM Ammoniak, 0.02% SDS) versetzt. Diese

25 1.4 ml Probenvolumen wurden ultrafiltriert (20 kDa, Sartorius, Göttingen, DE). Die UF wurde bei 3000 U/min in einer Zentrifuge durchgeführt bis 1.1 ml Ultrafiltrat erhalten wurden.

Die erhaltenen 1.1 ml Filtrat wurden dann auf eine PD 10 Säule aufgetragen (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) und mit 2.5 ml einer 0.01%

30 NH₄OH eluiert und lyophilisiert. Zur CE-MS Messung wurden die Polypeptide dann mit 20 µl Wasser (HPLC-Reinheit, Merck) resuspendiert.

2. CE-MS Messung:

Die CE-MS Messungen wurden mit einem Kapillarelektrophoresesystem von Beckman Coulter (P/ACE MDQ System; Beckman Coulter Inc, Fullerton, USA) und einem ESI-TOF Massenspektrometer von Bruker (micro-TOF MS, Bruker Daltonik, Bremen, D) durchgeführt. Die CE Kapillaren wurden von Beckman Coulter bezogen, sie hatten einen ID/OD von 50/360 µm und eine Länge von 90 cm. Die mobile Phase für die CE Trennung bestand aus 20% Acetonitril und 0.25% Ameisensäure in Wasser. Für den „Sheath-Flow“ am MS wurde 30% Isopropanol mit 0.5% Ameisensäure verwendet, hier mit einer Flussrate von 2 µl/min. Die Kopplung von CE und MS wurde durch ein CE-ESI-MS Sprayer Kit (Agilent Technologies, Waldbronn, DE) realisiert. Um die Probe zu injizieren, wurde 1 bis max. 6 psi Druck angelegt, die Dauer der Injektion betrug 99 Sekunden. Mit diesen Parametern wurden ca. 150 nl der Probe in die Kapillare injiziert, dieses entspricht ca. 10% des Kapillarvolumens. Um die Probe in der Kapillare aufzukonzentrieren wurde eine „Stacking“-Technik verwendet. Dabei wird vor der Probeninjektion für 7 Sek. (bei 1 psi) eine 1M NH₃ Lösung injiziert, nach der Probeninjektion für 5 Sek. eine 2M Ameisensäurelösung. Nach Anlegen der Trennungsspannung (30 kV) werden die Analyten zwischen diesen Lösungen automatisch aufkonzentriert. Die folgende CE-Trennung wurde mit einer Druckmethode durchgeführt: 40 Minuten mit 0 psi, dann für 2 min 0.1 psi, für 2 min 0.2 psi, für 2 min 0.3 psi, für 2 min 0.4 psi, abschließend 32 min bei 0.5 psi. Die Gesamtdauer eines Trennlaufes betrug damit 80 Minuten. Um auf der Seite des MS eine möglichst gute Signalintensität zu erhalten, wurde das "Nebulizer Gas" auf den niedrigsten möglichen Wert eingestellt. Die an der Spraynadel angelegte Spannung zur Erzeugung des Elektrosprays betrug 3700 - 4100 V. Die übrigen Einstellungen am Massenspektrometer wurden gemäß Anweisung des Herstellers für Peptiddetektion optimiert. Die Spektren wurden über einen Massenbereich von m/z 400 bis m/z 3000 aufgenommen und alle 3 Sek. akkumuliert.

3. Standards für die CE-Messung

Zur Kontrolle und Kalibrierung der CE-Messung wurden die folgenden Proteine bzw. Polypeptide eingesetzt, welche unter den gewählten Bedingungen durch die unten aufgeführten CE-Migrationszeiten charakterisiert sind:

Protein/Polypeptid	Migrationszeit
Aprotinin, (SIGMA, Taufkirchen, DE; Kat.Nr. A1153)	19.3 min
Ribonuclease, SIGMA, Taufkirchen, DE; Kat.Nr.; R4875	19.55min
Lysozym, SIGMA, Taufkirchen, DE; Kat.Nr.; L7651	19.28 min
"REV", Sequenz: REVQSKIGYGRQIIS	20.95 min
"ELM", Sequenz: ELMTGELPYSHINNRDQIIFMVGR	23.49 min
"KINCON", Sequenz: TGSLPYSHIGSRDQIIFMVGR	22.62 min
"GIVLY" Sequenz: GIVLYELMTGELPYSHIN	32.2 min

5

Die Proteine/Polypeptide werden jeweils in einer Konzentration von 10 pmol/ μ l in Wasser eingesetzt. "REV", "ELM", "KINCON" und "GIVLY" stellen synthetische Peptide dar.

Es ist dem Fachmann prinzipiell bekannt, dass bei kapillarelektrophoretischen Trennungen geringe Schwankungen der Migrationszeiten auftreten können. Unter den beschriebenen Bedingungen ändert sich jedoch die Migrationsreihenfolge nicht. Es ist für den Fachmann in Kenntnis der angegebenen Massen und CE-Zeiten problemlos möglich, eigene Messungen den erfindungsgemäßen Polypeptidmarkern zuzuordnen. Hierzu kann er beispielsweise wie folgt vorgehen: zunächst wählt er eines der in seiner Messung gefundenen Polypeptide (Peptid 1) aus und versucht, innerhalb eines Zeitfensters der angegebenen CE-Zeit (beispielsweise ± 5 min) eine oder mehrere übereinstimmende Massen zu finden. Findet er innerhalb dieses Intervalls nur eine übereinstimmende Masse, ist die Zuordnung fertig gestellt. Findet er mehrere passende Massen, muss noch eine Entscheidung über die Zuordnung gefällt werden. Hierzu wird ein weiteres Peptid (Peptid 2) aus der Messung ausgewählt und versucht, hierfür einen passenden Polypeptidmarker zu identifizieren, wobei wieder ein entsprechendes Zeitfenster berücksichtigt wird. Lassen sich nun wiederum mit einer entsprechenden Masse mehrere Marker finden, ist die wahrscheinlichste

Zuordnung die, bei der zwischen der Verschiebung für das Peptide 1 und für das Peptid 2 ein im Wesentlichen linearer Zusammenhang besteht. In Abhängigkeit von der Komplexität des Zuordnungsproblems bietet es sich für den Fachmann an, gegebenenfalls weitere Proteine aus seiner Probe für die Zuordnung zu verwenden, beispielsweise zehn Proteine. Typischerweise sind die Migrationszeiten entweder um gewisse absolute Werte verlängert oder verkürzt oder es treten Stauchungen oder Strickungen des gesamten Verlaufs auf. Co-migrierende Peptide co-migrieren aber auch unter solchen Bedingungen.

- 10 Zudem kann der Fachmann sich die von Zuerbig et al. in Electrophoresis 27 (2006), Seiten 2111 - 2125 beschriebenen Migrationsmuster zu nutze machen. Wenn er mit Hilfe eines einfachen Diagramms seine Messung in Form von m/z versus Migrationszeit aufträgt, werden ebenfalls die beschriebenen Linienmuster sichtbar. Durch Abzählen der Linien ist nun eine einfache Zuordnung der einzelnen Polypeptide möglich. Auch andere Vorgehensweisen zur Zuordnung sind möglich. Grundsätzlich könnte der Fachmann auch die oben genannten Peptide als internen Standard verwenden, um seine CE-Messungen zuzuordnen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Diagnostik von vaskuläre Erkrankungen umfassend den Schritt der Bestimmung einer An- oder Abwesenheit oder Amplitude von mindestens drei Polypeptidmarkern in einer Urinprobe, wobei der Polypeptidmarker ausgewählt sind aus den Markern, die in Tabelle 1 durch Werte für die Molekularmassen und die Migrationszeit charakterisiert sind.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Auswertung der bestimmten An- oder Abwesenheit oder Amplitude der Marker anhand der in Tabelle 2 aufgeführten Referenzwerte erfolgt.
3. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei mindestens fünf, mindestens sechs, mindestens acht, mindestens zehn, mindestens 20 oder mindestens 50 Polypeptidmarker verwendet werden, wie sie in Anspruch 1 definiert sind.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Probe eines Individuums eine Mittelstrahlurinprobe.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei Kapillarelektrophorese, HPLC, Gasphasenionenspektrometrie und/oder Massenspektrometrie zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit oder Amplitude der Polypeptidmarker verwendet wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei vor einer Messung der Molekularmasse der Polypeptidmarker eine Kapillarelektrophorese durchgeführt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei Massenspektrometrie zum Nachweis der An- oder Abwesenheit des/der Polypeptidmarker verwendet wird.
8. Verwendung von mindestens drei Polypeptidmarker ausgewählt aus den Markern gemäß Tabelle 1, die durch die Werte für die Molekularmassen und die Migrationszeit charakterisiert ist, zur Diagnostik von vaskulären Erkrankungen.
9. Verfahren zur Diagnose von vaskulären Erkrankungen umfassend die Schritte

- a) der Auftrennung einer Probe in mindestens fünf, bevorzugt 10 Teilproben,
 - b) Analyse von mindestens fünf Teilproben zur Bestimmung einer An- oder Abwesenheit oder Amplitude mindestens eines Polypeptidmarkers in der Probe, wobei der Polypeptidmarker ausgewählt ist aus den Markern der Tabelle 1, die durch die Molekularmassen und Migrationszeit (CE-Zeit) charakterisiert sind.
- 5
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei mindestens 10 Teilproben gemessen werden.
- 10 11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die CE-Zeit bezogen ist auf eine 90 cm lange Glaskapillare mit einem inneren Durchmesser (ID) von 50 µm bei einer angelegten Spannung von 25 kV, wobei als Laufmittel 20% Acetonitril, 0,25% Ameisensäure in Wasser verwendet wird.
- 15 12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 9 bis 11, wobei die Sensitivität mindestens 60% und der Spezifität mindestens 40% beträgt.

TABELLE 1

Nr#	Protein ID	Masse	CE-T	Sequenz	Parental Protein	Start	Stop
1	1495	838,40	35,1				
2	3796	884,29	43,8				
3	3806	884,32	24,9				
4	11413	981,59	24,8	VLNLGPITR	Uromodulin	598	606
5	11989	988,52	22,4				
6	14071	1032,50	21,2				
7	15776	1068,45	24,8				
8	16168	1073,32	35,3				
10	16854	1082,50	23,9				
9	16859	1082,49	20,8				
11	18833	1113,46	27,3				
12	18939	1114,48	24,2				
13	19648	1126,47	21,2				
14	19828	1129,46	27,9				
15	19871	1130,34	35,4				
16	20334	1138,47	37,1				
17	20690	1140,47	21,1				
18	21147	1150,56	22,4				
19	21365	1154,51	25,6	PpGEAGKpGEQG	Collagen alpha-1 (I) chain	651	662
20	22625	1169,57	23,7				
21	22885	1174,54	38,1	ADIAPSTDDLAS	Microfibrillar-associated protein 5	63	74
22	23724	1187,36	35,7				
23	24291	1196,32	36,1				
24	25363	1216,54	24,2				
25	25429	1217,53	35,8				
26	26163	1226,53	21,0				
27	26879	1238,56	21,1				
28	26919	1239,43	33,8				
29	26929	1239,51	35,7				
30	28466	1263,54	22,7				
31	29279	1276,40	35,9				
32	29677	1283,37	36,1				
33	30575	1297,58	27,4	SpGSpGPDGKTGPp	Collagen alpha-1 (I) chain	543	556
33	30575	1297,58	27,4	SpGSpGPDGKTGPp	Collagen alpha-1 (I) chain	543	556
34	31480	1312,55	29,8				
35	31525	1312,62	22,5				
36	32481	1326,57	21,7				
37	32823	1332,54	21,7				
38	32874	1333,42	36,1				
39	33135	1338,60	24,0				
40	33776	1351,64	38,8	PpGPpGPpGPPGPPS	Collagen alpha-1(I) chain	1179	1193
41	34186	1358,38	36,5				
42	34432	1363,43	36,3				
43	34795	1368,58	21,9				
44	36345	1396,62	28,1	SpGERGETGPpGPAG	Collagen alpha-1 (III) chain	796	810
45	36784	1405,69	23,4				
46	37698	1422,68	28,1				
47	38752	1438,45	36,8				
48	38780	1438,66	29,5	GLpGTGGPpGENGKpG	Collagen alpha-1 (III) chain	642	657
49	38798	1438,67	27,9	GLpGTGGPpGENGKpG	Collagen alpha-1 (III) chain	642	657
50	38910	1440,56	24,3	DEAGSEADHEGTHS	Fibrinogen alpha chain	605	618
51	40091	1449,64	21,9				
52	40487	1457,60	21,9				
53	41431	1466,66	21,9				
54	41770	1473,63	22,2				
55	41833	1474,67	22,4				
56	42216	1483,70	20,7				
57	42304	1485,67	23,8	DGQpGAKGEpGDAGAK	Collagen alpha-1 (I) chain	820	835
58	42867	1496,63	22,3				
59	43828	1512,69	26,6				

FIG. 1

60	44592	1523,67	22,0				
61	44679	1524,65	20,0				
62	44718	1525,48	37,2				
63	45503	1540,75	40,0				
64	45980	1552,50	37,2				
65	46184	1556,74	40,0				
66	46606	1562,69	22,5				
67	47285	1575,75	30,2				
68	48089	1579,68	20,1	SpGSpGPDGKTGPPGpAG	Collagen alpha-1(I) chain	543	560
69	48131	1580,50	36,4				
70	48751	1592,70	22,2				
71	49243	1593,69	22,4				
72	50008	1609,75	30,2	TGSpGSpGPDGKTGPPGp	Collagen alpha-1 (I) chain	541	558
72	50008	1609,75	30,2	TGSpGSpGPDGKTGPPGp	Collagen alpha-1 (I) chain	541	558
73	50593	1619,79	40,4				
74	50638	1620,70	22,7				
75	51916	1636,70	20,0	GSpGSpGPDGKTGPpGPAG	Collagen alpha-1(I) chain	542	560
76	51929	1636,74	22,5				
77	52189	1640,58	23,2				
78	52769	1649,73	22,6				
79	53554	1662,74	30,7				
80	53744	1666,78	30,7	KpGEQGVpGDLGApGPSG	Collagen alpha-1 (I) chain	657	674
81	53800	1667,79	40,6				
82	54846	1687,54	37,8				
83	55582	1697,74	30,9	NGAPGNDGAKGDAGAPGA PG	Collagen alpha-1 (I) chain	700	719
84	56053	1706,78	22,7				
85	57265	1732,77	28,2	WVGTGASEAEKTGAQEL	Gelsolin		
87	57531	1737,78	31,0	TGSpGSpGPDGKTGPPGpA G	Collagen alpha-1 (I) chain	541	560
86	57537	1737,78	23,7	NDGApGKNGERGGpGGpG p	Collagen alpha-1 (III) chain	586	604
88	58355	1754,90	31,3				
89	58941	1765,81	31,0	GPpGEAGKpGEQGVpGDLG	Collagen alpha-1 (I) chain	650	668
90	59745	1782,84	25,9				
91	59773	1783,79	39,8				
92	59793	1784,81	39,9				
93	60628	1806,83	23,1				
94	60751	1807,81	20,7				
95	60816	1808,79	23,7				
96	61221	1817,69	20,2				
97	61332	1819,80	23,4				
98	61480	1823,77	25,0				
99	61573	1825,79	20,1	DEAGSEADHEGTHSTKR	Fibrinogen alpha chain	605	621
100	63209	1860,83	21,4	EGSpGRDGSpGAKGDRGE T	Collagen alpha-1 (I) chain	1021	1039
101	63916	1876,84	23,4				
102	64170	1880,90	43,9				
103	64256	1882,80	20,2	DEAGSEADHEGTHSTKRG	Fibrinogen alpha chain	605	622
104	64869	1892,77	40,3				
105	65998	1913,90	41,0				
106	67097	1931,90	31,5	APEAQSVQPNFQQDKF	Prostaglandin-H2 D-isomerase; N-term.	23	39
107	67386	1936,88	32,2	GEKGPSGEAGTAGPpGTpG PQG	Collagen alpha-2 (I) chain	844	865
108	67951	1950,85	35,8				
109	68163	1955,88	28,1				
110	68701	1969,84	25,2				
111	69080	1976,88	32,4				
112	69681	1989,88	32,4				

FIG. 1

113	69979	1996,79	21,0				
114	70024	1997,91	25,2				
115	70456	2008,90	32,3				
116	71599	2030,91	21,9	EGSpGRDGSpGAKGDRGET GP	Collagen alpha-1 (I) chain	10201	1041
117	72048	2034,99	40,2				
118	72095	2036,90	31,5				
119	72240	2040,88	39,4				
120	72641	2048,93	24,5				
121	72868	2055,14	33,4	VVVKLFSDSPITVTVPVEV	Clusterin	405	423
122	74057	2079,00	24,7	DAGApGApGGKGDAGApG ERGPpG	Collagen alpha-1(III) chain	664	687
123	74987	2089,96	39,5				
124	75128	2093,92	33,8				
125	77018	2133,96	27,8	DGQPGAKGEPGDAGAKGD AGPPGp	Collagen alpha-1 (I) chain	820	843
126	79581	2184,57	35,1				
127	79720	2187,95	39,8				
128	80551	2199,00	22,3	KGNSGEPGApGSKGDTGAK GEPGP	Collagen alpha-1 (I) chain	430	453
129	82026	2226,99	26,3	GNSGEPGApGSKGDTGAK GEPGPVG	Collagen alpha-1 (I) chain	431	455
130	82509	2233,05	20,5	GKNGDDGEAGKPGRpGER GPpGP	Collagen alpha-1 (I) chain	227	249
131	83577	2249,04	20,5	GKNGDDGEAGKpGRpGER GpPGP	Collagen alpha-1 (I) chain	227	249
132	86785	2310,06	41,3				
133	88093	2336,04	26,7				
134	90013	2370,12	30,7				
135	90054	2371,08	22,8	kGNSGEPGApGSKGDTGAK GEPGPVG	Collagen alpha-1 (I) chain	430	455
136	90989	2392,65	35,6				
137	91044	2394,08	23,6				
138	96875	2529,14	28,2	GPPGADGQpGAKGEPGDA GAKGDA GpPGP	Collagen alpha-1 (I) chain	815	843
139	97599	2547,99	21,4				
140	98089	2559,18	19,4	DEAGSEADHEGTHSTKRG HAKSRP	Fibrinogen alpha chain	605	628
141	98899	2567,20	28,2	AGPpGAPGApGAPGPVGA GKSGDRGETGP	Collagen alpha-1 (I) chain	1042	1071
142	99021	2570,19	42,6				
143	100991	2612,21	34,9				
144	102924	2647,20	23,5	NRGERGSEGSPGHGPQPG PpGPpGApGP	Collagen alpha-1 (III) chain	1168	1195
145	104954	2682,14	22,5				
146	106667	2726,28	42,9				
147	107016	2733,78	34,2				
148	111304	2834,19	22,5				
149	112106	2854,36	34,9				
150	113910	2903,36	35,7				
151	114086	2907,35	36,0	TGEVGAVGPpGFAGEKGPS GEAGTAGPpGTpGP	Collagen alpha-2 (I) chain	831	863
152	116543	2973,45	24,4	NVGApGAKGARGSAGPpG ATGFpGAAGRVGPpGP	Collagen alpha-1 (I) chain	855	888
153	117009	2977,37	29,1				

FIG. 1