

(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
12. Oktober 2006 (12.10.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/106115 A2

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

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2006/061336

(22) Internationales Anmeldedatum:
5. April 2006 (05.04.2006)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
05102705.0 6. April 2005 (06.04.2005) EP

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

(72) Erfinder; und

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

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

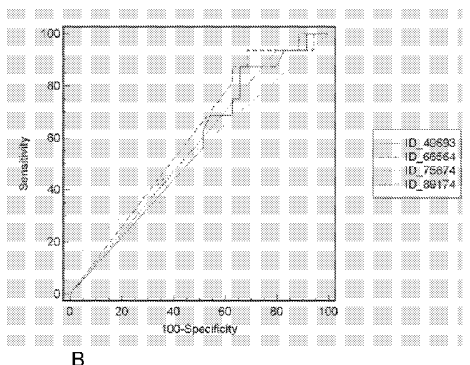
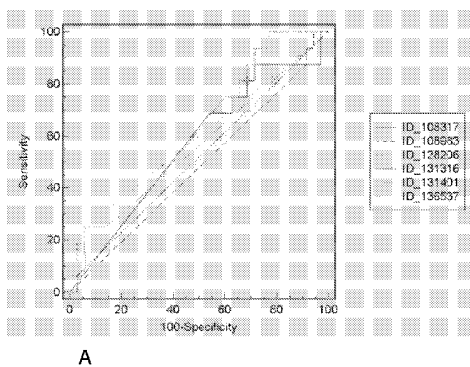
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: POLYPEPTIDE MARKER FOR DIAGNOSING ALZHEIMER'S DISEASE

(54) Bezeichnung: POLYPEPTIDMARKER ZUR DIAGNOSE VON ALZHEIMER



(57) Abstract: The invention relates to a method for diagnosing Alzheimer's disease. In said method, the presence or absence of at least one polypeptide marker in a sample is determined, said polypeptide marker being selected from markers 1-50 (frequency markers), or the amplitude of at least one polypeptide marker is determined, selected from markers 51-279 (amplitude markers), which are characterised by the following values for molecular masses and migration time:

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Diagnose von Alzheimer umfassend den Schritt der Bestimmung einer An- oder Abwesenheit mindestens eines Polypeptid markers in einer Probe, wobei der Polypeptidmarker ausgewählt ist aus den Markern 1-50 (Frequenzmarker), oder der Bestimmung der Amplitude mindestens eines Polypeptidmarkers, ausgewählt aus den Markern 51-279 (Amplitudenmarker), die durch folgende Werte für die Molekularmassen und die Migrationszeit charakterisiert sind:

WO 2006/106115 A2



GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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.

Veröffentlicht:

- *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

Polypeptidmarker zur Diagnose von Alzheimer

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung der An- oder Abwesenheit eines oder mehrerer Peptidmarker in einer Probe eines Individuums zur Diagnose von Alzheimer sowie ein Verfahren zur Diagnose von Alzheimer, wobei die An- oder Abwesenheit des oder der Peptidmarker(s) indikativ für das Vorliegen von Alzheimer ist.

Neuropsychiatrische Erkrankungen des höheren Lebensalters

An Demenzerkrankungen, deren häufigste Ursache die Alzheimer-Krankheit ist, leiden gut 7% der Altenbevölkerung, wobei der Anteil der Erkrankten annähernd exponentiell von weniger als 2% unter den 65-69-Jährigen auf mehr als 30% unter den über 85-Jährigen ansteigt. Insgesamt beläuft sich die Krankenzahl in Deutschland auf derzeit rund eine Mio.; bis zum Jahr 2050 würden es unter der Annahme gleicher Krankheitsraten 2,5 Mio. sein. Jährlich erkranken knapp 2% der zuvor gesunden älteren Menschen an einer Demenz; in Deutschland entspricht das mehr als 200.000 Neuerkrankungen pro Jahr. Schon heute muss ein Drittel der Menschen, die das 65. Lebensjahr erreichen, damit rechnen, im weiteren Altersverlauf eine Demenz zu entwickeln. Geringfügige Symptome einer möglicherweise heraufziehenden Demenz oder die frühesten, noch nicht verlässlich diagnostizierbaren Krankheitsstadien in Form des nach wie vor unscharf definierten Störungsbildes der leichten kognitiven Beeinträchtigung (minimal cognitive impairment, MCI) treten weitaus häufiger auf als eine manifeste Demenz. Aus Feldstudien werden oftmals Prävalenzraten zwischen 10 und 20%, in Einzelfällen auch von mehr als 30% berichtet. Die Vorhersage einer Demenz ist im Einzelfall indessen noch immer mit großer Ungenauigkeit behaftet.

Alzheimer

Die Alzheimer-Krankheit wird auch Morbus Alzheimer oder "Demenz vom Alzheimer-Typ" genannt. Unter dem Begriff Demenz versteht man den Verfall der geistigen Leistungsfähigkeit. Die Alzheimer-Krankheit zeichnet sich vor allem durch eine anfängliche Gedächtnisschwäche aus, die im Verlauf zunimmt und zum Totalverlust der Urteilsfähigkeit und der Persönlichkeit führen kann. Direkt nach

Schlaganfällen ist die Alzheimerdemenz die häufigste schwere Störung der Hirnfunktion im Alter.

Mit der steigenden Lebenserwartung wurde in den Industrieländern immer häufiger jene Krankheit diagnostiziert, die heute Alzheimers Namen trägt. Schwere Gedächtnisstörungen, Verfolgungswahn, Schlaflosigkeit und Unruhe sind die wichtigsten Anzeichen; allerdings können diese Symptome auch bei anderen Krankheiten einzeln oder in Kombination auftreten, wie zum Beispiel im Falle von Altersdemenz und Schlaganfall.

Rund eine Million Demenz-Patienten leben in Deutschland, zwei Drittel von ihnen haben Alzheimer. Das Risiko, an Alzheimer zu erkranken, wächst dabei mit zunehmendem Alter. Schätzungen zufolge sind in den westlichen Ländern etwa fünf Prozent der Bevölkerung über 65 Jahre und rund 20 Prozent der Bevölkerung über 80 Jahre betroffen. Weil Frauen im Durchschnitt länger leben als Männer, ist ihr Risiko, an Alzheimer zu erkranken, somit deutlich erhöht. Obwohl Alzheimer als Alterskrankheit gilt, können seltenere erbliche Formen des Leidens bereits ab dem dreißigsten Lebensjahr ausbrechen.

Zwar ist die Alzheimer-Krankheit derzeit noch unheilbar, die Behandlungsmöglichkeiten haben sich aber in den letzten Jahren verbessert. Je früher die Alzheimer-Krankheit erkannt und behandelt wird, desto besser ist die Chance, den Krankheitsprozess zu verlangsamen.

Die Krankheit beginnt meist schon mehrere Jahrzehnte, bevor die ersten Symptome auftreten. Dabei entstehen im Gehirn Ablagerungen aus Eiweißbruchstücken, so genannte Amyloide. Bei den Amyloiden unterscheidet man mikroskopisch kleine Fasern, die Fibrillen, und kugelförmige Ablagerungen, die Plaques. Diese Ablagerungen verhindern offenbar, dass die Nervenzellen sich untereinander verständigen können. Im Laufe der Zeit sterben dann die Nervenzellen in den Regionen des Gehirns ab, die an der Entwicklung von Gedächtnis, Sprache und Denkfähigkeit beteiligt sind.

Nur in Ausnahmefällen wird die Krankheit durch Genveränderungen ausgelöst und bricht dann schon in jüngerem Alter aus. Dies kann zum Beispiel passieren,

wenn die Erbinformation des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) geschädigt ist. Es bilden sich vermehrt schädliche Spaltprodukte von APP, die den wichtigsten Bestandteil der Plaques bilden. Ähnlich wirken sich Veränderungen anderer Gene aus, der Präseniline. Sie erhöhen die Aktivität von Enzymen, die das APP zerlegen, und beschleunigen deshalb ebenfalls die Klumpenbildung im Gehirn.

Der wichtigste genetische Risikofaktor ist ein Molekül (ApoE), welches am Transport von Cholesterin im Blut beteiligt ist. Die Erbinformation für ApoE kommt in drei Varianten vor. Eine Variante (ApoE4) erhöht das Krankheitsrisiko im statistischen Durchschnitt um das Vier- bis Fünffache, eine andere Variante (ApoE2) senkt das Risiko.

Diagnose

Obwohl immer wieder von einfachen Tests berichtet wird, kann Alzheimer mit letzter Sicherheit erst nach dem Tod eines Patienten festgestellt werden, wenn im Gehirn die typischen Ablagerungen zu finden sind. In der Praxis kommt es darauf an, so früh wie möglich eine möglichst sichere Diagnose zu stellen.

Typische Symptome der Alzheimer Demenz sind:

- Störungen des Kurzzeitgedächtnisses
- Denkschwierigkeiten
- Sprachstörungen
- Depressionen
- Eingeschränktes Urteilsvermögen
- Wahnvorstellungen
- Persönlichkeitsveränderungen

Eine Verschlechterung des Kurzzeitgedächtnisses als erstes Symptom ist meist schon im Alter von 60 bis 70 Jahren zu beobachten. Konzentrationsfähigkeit und Denkleistung lassen nach, Sprachstörungen treten auf, die Müdigkeit nimmt zu. Häufig treten in der Anfangsphase die Symptome einer Depression auf. Dazu kommen Verhaltensänderungen wie Verwirrtheit, Angst, Unruhe und Aggressivität. Alltagsfähigkeiten wie Ankleiden, Essenszubereitung oder Einkaufen können sie nicht mehr bewältigen, schließlich verlieren sie die Kontrolle über ihre Körper-

funktionen. Im Endstadium verstummen die Patienten oft, sind bettlägerig und völlig auf die Hilfe anderer angewiesen.

Wie bereits beschrieben, gibt es keine funktionierende Früherkennung und keine verlässliche Diagnose bei Alzheimer. Es stellte sich also die Aufgabe, ein Verfahren und eine Methode zur möglichst wenig invasiven, schnellen und kostengünstigen Diagnose von Alzheimer zu finden.

Wittke et al. in Elektrophoresis 26 (2005) 1476-1487 beschreiben die Verwendung von Markern in humanem Urin durch CE-MS-Kopplung und ihre grundsätzliche Eignung zur Diagnose von Alzheimer. Es zeigt sich aus heutiger Sicht, dass die dort gefundenen Marker nur eine geringe Aussagekraft aufweisen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, zumindest einige der genannten Nachteile des Standes der Technik zu überwinden, insbesondere Marker bereitzustellen, die eine gegenüber dem Stand der Technik verbesserte Aussagekraft haben.

Überraschender Weise wurde nun gefunden, dass bestimmte Peptidmarker in Kombination in einer Probe eines Individuums zur Diagnose von Alzheimer verwendet werden können. Folglich ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Verwendung der An- oder Abwesenheit von mindestens drei Polypeptidmarkern in einer Probe eines Individuums zur Diagnose von Alzheimer, wobei der Polypeptidmarker ausgewählt ist aus den Polypeptidmarkern Nr. 1 bis Nr. 279, die durch die in Tabelle 1 angegebenen Molekularmassen und ihre Migrationszeiten charakterisiert sind.

Tabelle 1: Polypeptidmarker zur Diagnose von Alzheimer sowie ihre Molekularmassen und Migrationszeiten:

Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]	Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]	Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]	Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]
1	1073,35	34,96	71	1130,37	35,19	142	2166,09	27,84	212	3905,8	27,72
2	1073,35	35,9	72	1130,63	27,07	143	2168,66	34,88	213	3929,73	23,07
3	1110,31	37,67	73	1135,56	27,03	144	2179,03	25,31	214	3934,76	24,02
4	1111,3	34,97	74	1150,61	26,55	145	2278,11	26,17	215	3951,07	22,77
5	1196,36	36,37	75	1158,62	27,02	146	2283,18	26,31	216	4005,54	22,57
6	1265,63	27,22	76	1183,66	27,49	147	2314,3	22,71	217	4087,12	26,92
7	1322,44	36,2	77	1186,56	27,21	148	2320,43	23,21	218	4112,78	24,46
8	1387,07	20,42	78	1217,56	21,8	149	2327,24	34,9	219	4131,68	22,54
9	1390,49	36,26	79	1229,62	27,38	150	2341,12	26,74	220	4164,86	25,11
10	1423,57	29,85	80	1250,61	27,59	151	2343,24	34,95	221	4192,99	34,95
11	1453,55	30,47	81	1276,43	35,7	152	2368,24	21,24	222	4203,13	26,14
12	1490,43	35,48	82	1283,4	35,91	153	2377,25	28,07	223	4218,31	20,6
13	1494,62	30,23	83	1300,67	29,7	154	2390,26	27,33	224	4232,32	32,35
14	1819,86	23,51	84	1306,74	22,16	155	2392,73	35,48	225	4250	27,68
15	1927,02	21	85	1333,44	35,93	156	2409,28	27,64	226	4278	25,3
16	2128,97	26,03	86	1342,44	35,43	157	2410,3	30,62	227	4301,93	21,26
17	2214,22	26,48	87	1347,71	28,94	158	2448,39	21,07	228	4307,09	31,58
18	2313,26	30,32	88	1349,67	28,25	159	2475,21	27,09	229	4349,06	28,17
19	2423,19	27,03	89	1360,67	28,06	160	2475,27	24,74	230	4384,07	19,8
20	2428,11	27,16	90	1386,68	28,62	161	2486,04	35,76	231	4428,79	32,86
21	2521,33	27,86	91	1388,74	27,97	162	2500,33	19,99	232	4464,64	21,54
22	2644,31	21,1	92	1399,44	36,06	163	2521,36	19,26	233	4468,61	23,47
23	2706,37	28,3	93	1404,73	29,49	164	2522,35	27,9	234	4510,97	28,56
24	3068,46	30,03	94	1409,63	22,11	165	2527,42	19,79	235	4548,03	25,95
25	3079,61	37,02	95	1449,7	22,04	166	2549,29	27,66	236	4562	29,31
26	3153,38	35,65	96	1451,72	28,84	167	2584,37	35,6	237	4562	29,31
27	3229,79	25,02	97	1464,7	30,57	168	2684,32	21,38	238	4564,18	26,01
28	3438,77	23,49	99	1475,77	30,05	169	2698,41	22,52	239	4583,84	24,2
29	3481,8	30,62	100	1499,74	29,89	170	2799,17	25,07	240	4637,81	27,82
30	3567,61	23,88	101	1519,76	31,87	171	2816,31	28,74	241	4730,71	19,63
31	3685,85	25,47	102	1535,74	30	172	2851,42	27,7	242	4749,41	21,81
32	3921,84	29,49	103	1542,78	23,24	173	2923,51	36,73	243	4750,06	19,53
33	4036,3	24,92	104	1550,67	27,47	174	2982,72	19,97	244	4890,59	23,27
34	4038,22	20,53	105	1552,61	30,78	175	3019,54	24,72	245	4933,64	20,57
35	4093,96	21,04	106	1590,81	32,46	176	3173,68	22,95	246	4986,98	21,35
36	4145,22	24,51	107	1596,83	30,32	177	3192,67	37,66	247	5039,63	25,68
37	4372,3	19,37	108	1614,84	31,54	178	3215,61	28,53	248	5042,1	24,31
38	4377,95	30,81	109	1623,65	31,1	179	3218,4	30,31	249	5060,4	20,09
39	4496,98	19,35	110	1628,8	20,75	180	3221,59	22,7	250	5110,36	25,28
40	4516	19,37	111	1636,79	22,71	181	3279,66	25,32	251	5122,44	20,75
41	4540,4	22	112	1659,81	27,41	182	3282,34	36,05	252	5157,79	34,26
42	4586,98	19,38	113	1692,91	31,38	183	3298,42	36,17	253	5181,63	25,36
43	4596,23	19,6	114	1703,89	33,01	184	3302,68	23,31	254	5258,56	22,09
44	4810,95	19,77	115	1727,92	32,13	185	3324,7	21,62	255	5439,46	25,41
45	5227,91	25,08	116	1732,88	31,36	186	3386,77	22,21	256	5495,33	31,72
46	5582,16	24,3	117	1738,68	32,16	187	3401,73	23,48	257	5660,6	31,55
47	6402,73	22,3	118	1741,83	30,56	188	3408,76	26,04	258	5745,2	19,72
48	7749,32	19,97	119	1756,89	19,81	189	3462,68	21,25	259	5891,27	24,16
49	7760,02	28,72	120	1771,97	30,02	190	3466,75	23,9	260	6224,17	25,27
50	10671,25	28,92	121	1800,02	25	191	3524,8	31,72	261	6327,46	22,03
51	824,48	19,92	122	1816,98	33,53	192	3529,84	23,7	262	6498,75	20,1
52	840,49	19,92	123	1820,06	32,23	193	3595,77	23,89	263	6611,97	28,44
53	846,38	25,96	124	1841,77	36,26	194	3605,4	21,53	264	6617,76	24,03
54	897,41	25,86	125	1849,68	18,31	195	3614,82	22,01	265	6813,98	23,14
55	911,3	34,1	126	1850,96	31,97	196	3644,79	29,39	266	6881,81	21,72
56	950,57	24,13	127	1867,72	33,07	197	3645,25	26,69	267	6893,8	24,57
57	973,26	35,47	128	1869,92	31,28	198	3650,74	19,9	268	6985,31	21,87
58	984,45	26,32	129	1873	21,26	199	3672,71	21,9	269	7026,99	22,02
59	988,57	35,65	130	1900,07	24,19	200	3677,74	24,3	270	7049,04	22,79
60	1013,43	25,18	131	1914,07	25,67	201	3685,86	22,21	271	7106,83	23
61	1016,3	35,53	132	1915,72	34,24	202	3687,78	20,58	272	7142,49	21,32
62	1041,58	36,79	133	1917,03	24,99	203	3693,93	27,15	273	7210,86	22,94
63	1053,52	25,25	134	1955,95	27,81	204	3741,63	20,1	274	8176,16	19,47
64	1055,61	25,7	135	2021,11	21,85	205	3768,77	31,84	275	8186,93	20,72
65	1082,55	23,75	136	2041,99	32,56	206	3782,94	22,68	276	8289,28	19,39
66	1082,65	26,15	137	2053,18	20,54	207	3788,04	25,24	277	9724,01	25,64
67	1083,5	27,14	138	2072,15	27,04	208	3792,76	27,25	278	12529	20,64
68	1083,55	25,61	139	2077,07	25,44	209	3819,82	32,74	279	14557,83	19,21
69	1085,63	36,39	140	2085,12	33,75	210	3881,87	24,56			
70	1094,61	25,99	141	2140,12	20,56	211	3903,08	25,71			

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, Alzheimer sehr frühzeitig und verlässlich zu diagnostizieren. Dadurch kann die Krankheit in einem frühen Stadium therapiert werden. Die Erfindung ermöglicht weiterhin eine kostengünstige, schnelle und zuverlässige Diagnose bei nur minimal invasiven Eingriffen.

5 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 30% Methanol, 0,5% Ameisensäure in Wasser verwendet.
10

Es ist bekannt, dass die CE-Migrationszeit variieren kann. Dennoch ist die Reihenfolge, mit der die Polypeptidmarker migrieren, für jedes verwendete CE System unter den angegebenen Bedingungen typischerweise gleich. Um dennoch auftretende Unterschiede in der Migrationszeit auszugleichen, kann das System unter
15 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 den Tabellen 1 bis 3 gezeigt sind, wurde mittels Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie (CE-MS) bestimmt,
20 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 $\pm 0,05\%$.

25 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.
30 oxidiert, sein.

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

Die erfindungsgemäßen Polypeptide (siehe Tabelle 1 bis 3) werden verwendet, um Alzheimer zu diagnostizieren. Unter Diagnose versteht man den Vorgang der Erkenntnisgewinnung durch die Zuordnung von Symptomen oder Phänomenen zu einer Krankheit oder Verletzung. Im vorliegenden Fall wird von der An- oder Abwesenheit bestimmter Polypeptidmarker auf das Vorliegen von Alzheimer geschlossen. Hierzu werden die erfindungsgemäßen Polypeptidmarker in einer Probe eines Individuums bestimmt, wobei ihre An- oder Abwesenheit auf das Vorliegen von Alzheimer schließen lässt. 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 Alzheimer ist. Tabelle 2 zeigt Polypeptidmarker, die typischerweise bei Patienten mit Alzheimer (krank) vorhanden sind, wie z.B. Polypeptidmarker Nr. 1 oder Nr. 50, jedoch bei Probanden ohne Alzheimer (Kontrolle) nicht oder nur selten vorhanden sind. Weiterhin gibt es Polypeptidmarker, die bei Individuen ohne Alzheimer vorhanden sind, jedoch bei Individuen mit Alzheimer seltener oder gar nicht auftreten, z.B. die Polypeptidmarker Nr. 43 oder 44.

Tabelle 2: Polypeptidmarker zur Diagnose von Alzheimer, ihre Molekularmassen und Migrationszeiten sowie ihre An- und Abwesenheit in den einzelnen Gruppen als Häufigkeit je Gruppe (1=100%, 0=0%) bei der an Alzheimer erkrankten Patientengruppe sowie der Kontrollgruppe (Probenaufarbeitung und Messung wie im Beispiel beschrieben).

Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]	Frequenz- unterschied	Häufigkeit je Gruppe	
				Alzheimer Demenz	Kontrollen
1	1073,35	34,96	0,45	0,45	0
2	1073,35	35,9	-0,48	0,46	0,94
3	1110,31	37,67	-0,44	0	0,44
4	1111,3	34,97	-0,41	0,27	0,69
5	1196,36	36,37	-0,44	0,31	0,75
6	1265,63	27,22	0,41	0,66	0,25
7	1322,44	36,2	0,44	0,75	0,31
8	1387,07	20,42	-0,41	0,09	0,5
9	1390,49	36,26	0,42	0,55	0,13
10	1423,57	29,85	0,48	0,79	0,31
11	1453,55	30,47	0,44	0,63	0,19
12	1490,43	35,48	0,42	0,79	0,38
13	1494,62	30,23	0,5	0,75	0,25
14	1819,86	23,51	-0,48	0,27	0,75
15	1927,02	21	0,48	0,67	0,19
16	2128,97	26,03	0,46	0,96	0,5
17	2214,22	26,48	0,52	0,83	0,31
18	2313,26	30,32	0,48	0,67	0,19
19	2423,19	27,03	0,41	0,6	0,19
20	2428,11	27,16	-0,45	0,36	0,81
21	2521,33	27,86	-0,44	0	0,44
22	2644,31	21,1	0,45	0,89	0,44
23	2706,37	28,3	0,46	0,71	0,25
24	3068,46	30,03	0,46	0,77	0,31
25	3079,61	37,02	-0,42	0,46	0,88
26	3153,38	35,65	0,46	0,71	0,25
27	3229,79	25,02	-0,44	0	0,44
28	3438,77	23,49	0,44	0,75	0,31
29	3481,8	30,62	0,45	0,89	0,44
30	3567,61	23,88	-0,44	0,18	0,63
31	3685,85	25,47	-0,44	0,18	0,63
32	3921,84	29,49	-0,41	0,09	0,5
33	4036,3	24,92	0,5	0,69	0,19
34	4038,22	20,53	-0,63	0	0,63
35	4093,96	21,04	0,5	0,63	0,13
36	4145,22	24,51	0,42	0,42	0
37	4372,3	19,37	-0,44	0,18	0,63
38	4377,95	30,81	0,5	0,63	0,13
39	4496,98	19,35	-0,41	0,09	0,5
40	4516	19,37	-0,45	0,36	0,81
41	4540,4	22	-0,41	0,09	0,5
42	4586,98	19,38	-0,41	0,27	0,69
43	4596,23	19,6	-0,47	0,09	0,56
44	4810,95	19,77	-0,44	0	0,44
45	5227,91	25,08	0,54	0,73	0,19
46	5582,16	24,3	0,4	0,4	0
47	6402,73	22,3	0,44	0,63	0,19
48	7749,32	19,97	-0,41	0,09	0,5
49	7760,02	28,72	0,46	0,71	0,25
50	10671,25	28,92	0,48	0,67	0,19

Zusätzlich oder auch alternativ zu den Frequenzmarkern (Bestimmung der An- oder Abwesenheit) können auch die in Tabelle 3 angegebenen Amplitudenmarker zur Diagnose von Alzheimer verwendet werden (Nummer 51-279). Amplituden-

marker werden in der Weise verwendet, das nicht die An oder Abwesenheit entscheidend ist, sondern die Höhe des Signals (die Amplitude) bei Anwesenheit des Signals in beiden Gruppen entscheidet. In Tabelle 3 sind die mittleren Amplituden der entsprechenden Signale (charakterisiert über Masse and Migrationszeit) über alle gemessenen Proben angegeben. Um eine Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlich konzentrierten Proben oder unterschiedlichen Messmethoden zu erreichen 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. Alle verwendeten Gruppen bestehen aus mindestens 15 einzelnen Patienten- oder Kontrollproben, um eine verlässliche mittlere Amplitude zu erhalten. Die Entscheidung zu einer Diagnose (Alzheimer oder nicht) 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 Alzheimer -Gruppe ist. Entsprechen die mittleren Amplituden eher den mittleren Amplituden der Alzheimergruppe, so ist von dem Vorliegen einer Alzheimer Erkrankung auszugehen, entspricht sie eher den mittleren Amplituden der Kontroll-Gruppe, ist nicht von einer Alzheimererkrankung auszugehen. Eine genauere Definition soll anhand von Marker Nr. 130 (Tabelle 3) gegeben werden. Die mittlere Amplitude des Markers ist bei einer Alzheimer Erkrankung deutlich erhöht (920 ppm gegen 373 ppm in der Kontrollgruppe). Liegt nun in einer Patientenprobe der Wert für diesen Marker bei 0 bis 373 ppm, bzw. maximal 20% darüber, also 0 bis 448 ppm, gehört diese Probe zur Kontrollgruppe. Liegt der Wert bei 920 ppm, bzw. 20% darunter, oder höher, also zwischen 736 ppm und sehr hohen Werten, ist dies als Hinweis auf eine Alzheimer Erkrankung zu werten. Je geringer der Abstand zwischen den Amplituden der Kontrollgruppe und der Alzheimer Gruppe, desto dichter muss der Wert, der zwischen den beiden Referenzwerten liegt, an einem Referenzwert liegen.

Eine Möglichkeit ist, den Bereich zwischen den mittleren Amplituden in drei Teile zu zerlegen. Liegt der Wert im unteren Drittel, ist dies indikativ für den unteren Wert, liegt der Wert im oberen Drittel, ist dies indikativ für den oberen Wert. Liegt er im mittleren Drittel, ist keine Aussage hinsichtlich dieses Markers möglich.

Tabelle 3: Amplitudenmarker

- 10 -

Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]	mittlere Amplitude je Gruppe		Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]	mittlere Amplitude je Gruppe	
			Alzheimer	Kontrollen				Alzheimer	Kontrollen
51	824,48	19,92	568,85	501,97	128	1869,92	31,28	223,93	140,79
52	840,49	19,92	810,27	593,64	129	1873	21,26	440,7	270,85
53	846,38	25,96	100,62	122,25	130	1900,07	24,19	920,26	373,01
54	897,41	25,86	81,54	48,26	131	1914,07	25,67	1519,39	1746,72
55	911,3	34,1	242,62	247,96	132	1915,72	34,24	180,37	151,24
56	950,57	24,13	78,07	67,87	133	1917,03	24,99	197,09	216,02
57	973,26	35,47	179,96	150,04	134	1955,95	27,81	129,24	99,09
58	984,45	26,32	110,69	132,44	135	2021,11	21,85	346,14	257,95
59	988,57	35,65	211,75	188,31	136	2041,99	32,56	193,08	127,84
60	1013,43	25,18	175,63	104,85	137	2053,18	20,54	501,38	674,91
61	1016,3	35,53	909,17	810,15	138	2072,15	27,04	601,86	494,89
62	1041,58	36,79	86,97	139,71	139	2077,07	25,44	261,1	214,6
63	1053,52	25,25	87,43	46,52	140	2085,12	33,75	215,62	302,81
64	1055,61	25,7	277,17	465,96	141	2140,12	20,56	256,95	290,52
65	1082,55	23,75	78,89	50,53	142	2166,09	27,84	128,57	52,54
66	1082,65	26,15	112,48	104,55	143	2168,66	34,88	257,1	291,77
67	1083,5	27,14	118,51	108,08	144	2179,03	25,31	84,93	31,65
68	1083,55	25,61	271,44	164,33	145	2278,11	26,17	438,37	314,65
69	1085,63	36,39	140,8	145,98	146	2283,18	26,31	619,59	634,52
70	1094,61	25,99	460,11	418,75	147	2314,3	22,71	1018,08	1167,69
71	1130,37	35,19	670,41	372,37	148	2320,43	23,21	212,67	166,8
72	1130,63	27,07	115,03	78,26	149	2327,24	34,9	1737,42	1517,73
73	1135,56	27,03	60,46	58,13	150	2341,12	26,74	304,17	535,15
74	1150,61	26,55	80,41	45,34	151	2343,24	34,95	270,79	236,16
75	1158,62	27,02	68,79	40,98	152	2368,24	21,24	101,48	105,72
76	1183,66	27,49	110,3	73,65	153	2377,25	28,07	2711,11	1749,4
77	1186,56	27,21	315,86	221,73	154	2390,26	27,33	617,62	500,67
78	1217,56	21,8	90,54	80,33	155	2392,73	35,48	512,31	482,03
79	1229,62	27,38	99,75	62,81	156	2409,28	27,64	275,81	159,58
80	1250,61	27,59	455,17	151,8	157	2410,3	30,62	338,59	232,89
81	1276,43	35,7	1739,68	1000,12	158	2448,39	21,07	488,24	440,74
82	1283,4	35,91	104,76	53	159	2475,21	27,09	757,06	535,45
83	1300,67	29,7	120,17	58,65	160	2475,27	24,74	478,15	297,04
84	1306,74	22,16	552,66	320,23	161	2486,04	35,76	2280,47	1824,17
85	1333,44	35,93	268,17	204,63	162	2500,33	19,99	110,01	94,92
86	1342,44	35,43	275,61	325,49	163	2521,36	19,26	516,08	635,2
87	1347,71	28,94	83,29	67,88	164	2522,35	27,9	4135,44	3306,09
88	1349,67	28,25	363,22	580,39	165	2527,42	19,79	393,22	500,27
89	1360,67	28,06	90,7	94,56	166	2549,29	27,66	99,25	108,48
90	1386,68	28,62	366,31	404,69	167	2584,37	35,6	451,18	260,07
91	1388,74	27,97	319,52	394,09	168	2684,32	21,38	1926,21	155,86
92	1399,44	36,06	179,15	82,16	169	2698,41	22,52	182,49	220,4
93	1404,73	29,49	165,77	108,43	170	2799,17	25,07	445,75	375,83
94	1409,63	22,11	288,37	317,52	171	2816,31	28,74	1366,84	1928,38
95	1449,7	22,04	77,35	102,04	172	2851,42	27,7	495,9	288,67
96	1451,72	28,84	111,94	52,91	173	2923,51	36,73	818,47	883,22
97	1464,7	30,57	1169,16	1453,9	174	2982,72	19,97	3750,78	5523,72
98	1464,7	30,57	1346,04	1453,9	175	3019,54	24,72	170,57	189,58
99	1475,77	30,05	216,71	146,11	176	3173,68	22,95	155,36	252,28
100	1499,74	29,89	104,53	57,36	177	3192,67	37,66	689,53	1089,16
101	1519,76	31,87	392,54	271,33	178	3215,61	28,53	1305,23	2016,28
102	1535,74	30	2366,44	3661,09	179	3218,4	30,31	1384,58	1875,79
103	1542,78	23,24	713,91	533,83	180	3221,59	22,7	170,45	217,24
104	1550,67	27,47	576,53	637,58	181	3279,66	25,32	141,5	83
105	1552,61	30,78	176,95	110,5	182	3282,34	36,05	1082,36	1351,09
106	1590,81	32,46	1491,15	1260,68	183	3298,42	36,17	268,81	282,69
107	1596,83	30,32	873,36	577,23	184	3302,68	23,31	316,81	508,67
108	1614,84	31,54	688,7	410,65	185	3324,7	21,62	422,39	490,7
109	1623,65	31,1	697,2	364,52	186	3386,77	22,21	670,34	395,98
110	1628,8	20,75	304,52	326,72	187	3401,73	23,48	2618,95	4622,56
111	1636,79	22,71	1006,43	814,9	188	3408,76	26,04	175,22	94,81
112	1659,81	27,41	589,62	358,41	189	3462,68	21,25	2161,32	2653,08
113	1692,91	31,38	127,4	95,57	190	3466,75	23,9	904,51	559,21
114	1703,89	33,01	287,84	258,89	191	3524,8	31,72	1130,3	410,29
115	1727,92	32,13	552,58	276,12	192	3529,84	23,7	1979,26	2916,13
116	1732,88	31,36	596,19	543,08	193	3595,77	23,89	344,53	455,24
117	1738,68	32,16	92,84	40,42	194	3605,4	21,53	321,29	479,63
118	1741,83	30,56	114,01	84,13	195	3614,82	22,01	161,46	267,85
119	1756,89	19,81	176,68	85,89	196	3644,79	29,39	1038,75	749,16
120	1771,97	30,02	328,73	214,56	197	3645,25	26,69	1161,31	741,33
121	1800,02	25	516,9	674,37	198	3650,74	19,9	1029,39	1161,19
122	1816,98	33,53	395,82	180,33	199	3672,71	21,9	1896,48	819,91
123	1820,06	32,23	107,09	76,57	200	3677,74	24,3	1717,39	1567,09
124	1841,77	36,26	847,46	1396,48	201	3685,86	22,21	9259,98	16077,47
125	1849,68	18,31	405,84	688,91	202	3687,78	20,58	832,51	1095,77
126	1850,96	31,97	116,29	133,34	203	3693,93	27,15	344,49	218,63
127	1867,72	33,07	1356,26	956,64	204	3741,63	20,1	547,74	806,46

- 11 -

Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]	mittlere Amplitude je Gruppe	
			Alzheimer	Kontrollen
205	3768,77	31,84	533,93	377,59
206	3782,94	22,68	360,79	364,04
207	3788,04	25,24	609,58	782,85
208	3792,76	27,25	682,32	432,09
209	3819,82	32,74	120,7	133,76
210	3881,87	24,56	3257,71	1968,09
211	3903,08	25,71	2177,14	2780,86
212	3905,8	27,72	23257,92	16304,43
213	3929,73	23,07	2742,02	3430,19
214	3934,76	24,02	653,19	487,54
215	3951,07	22,77	25509,01	32844,44
216	4005,54	22,57	566,89	387,06
217	4087,12	26,92	607,44	490,16
218	4112,78	24,46	267,94	308,15
219	4131,68	22,54	653,71	586,61
220	4164,86	25,11	781,59	466,12
221	4192,99	34,95	1761,93	1496,61
222	4203,13	26,14	613,9	1051,15
223	4218,31	20,6	939,4	1360,44
224	4232,32	32,35	318,48	349,1
225	4250	27,68	504,35	286,25
226	4278	25,3	1161,81	745,21
227	4301,93	21,26	476,37	698,84
228	4307,09	31,58	157,37	88,2
229	4349,06	28,17	15449,01	7992,31
230	4384,07	19,8	465,18	981,39
231	4428,79	32,86	827,48	433,08
232	4464,64	21,54	4084,32	2311,8
233	4468,61	23,47	3429,99	2945,88
234	4510,97	28,56	1157,68	629,08
235	4548,03	25,95	3177,96	2703,21
236	4562	29,31	509,94	403,2
237	4562	29,31	574,68	403,2
238	4564,18	26,01	497,67	438,34
239	4583,84	24,2	7608,37	7241,51
240	4637,81	27,82	337,27	294,89
241	4730,71	19,63	797,93	1759,4
242	4749,41	21,81	725,74	426,89
243	4750,06	19,53	4365,88	3189,94
244	4890,59	23,27	1965,12	1418,61
245	4933,64	20,57	878,93	735,48
246	4986,98	21,35	637,73	533,05
247	5039,63	25,68	1039,64	1389,17
248	5042,1	24,31	3686,99	3120,74
249	5060,4	20,09	3307,86	1942,65
250	5110,36	25,28	637,44	697,57
251	5122,44	20,75	1342	851,23
252	5157,79	34,26	200,52	208,01
253	5181,63	25,36	5716,39	4305,72
254	5258,56	22,09	12476,68	10602,4
255	5439,46	25,41	713,92	522,3
256	5495,33	31,72	1776,93	1297,43
257	5660,6	31,55	893,02	595,49
258	5745,2	19,72	851,4	1608,76
259	5891,27	24,16	482,2	422,63
260	6224,17	25,27	1104,36	995,62
261	6327,46	22,03	1410,46	1027,79
262	6498,75	20,1	3989,56	2972,62
263	6611,97	28,44	311,21	338,55
264	6617,76	24,03	2799,82	1943,58
265	6813,98	23,14	4217,01	3699,9
266	6881,81	21,72	450,1	868,21
267	6893,8	24,57	2537,57	1569,65
268	6985,31	21,87	2238,63	1577,04
269	7026,99	22,02	2132,66	1480,92
270	7049,04	22,79	8522,63	6229,31
271	7106,83	23	766,91	575,59
272	7142,49	21,32	1014,86	557,95
273	7210,86	22,94	915,21	568,24
274	8176,16	19,47	11495,92	7835,63
275	8186,93	20,72	1706,07	1130,11
276	8289,28	19,39	4317,47	3227,21
277	9724,01	25,64	3380,24	1957,82
278	12529	20,64	38234,95	9397,12
279	14557,83	19,21	1514,79	2225,19

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 Alzheimer leiden kann, z.B. ein Tier oder ein Mensch. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Individuum um ein Säugetier, wie z.B. einen Hund oder
5 ein Pferd, am meisten bevorzugt handelt es sich um einen Menschen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird nicht nur ein Polypeptidmarker, sondern eine Kombination von Markern verwendet, um Alzheimer zu diagnostizieren. Dabei wird durch ihre An- oder Abwesenheit auf das Vorliegen von Alzheimer geschlossen. Durch Vergleich einer Mehrzahl von Polypeptidmarkern kann die Verfälschung des Gesamtergebnisses durch einzelne individuelle
10 Abweichungen von der typischen Anwesenheitswahrscheinlichkeit im Kranken oder Kontrollindividuum reduziert oder vermieden werden.

Bei der Probe, in der die An- oder Abwesenheit des oder der erfindungsgemäßen Polypeptidmarker gemessen werden, kann es sich um jede Probe handeln, die
15 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 (Alzheimer oder nicht) zu treffen. Beispielsweise kann es sich um Blut, Urin, eine Gelenkflüssigkeit, eine Gewebeflüssigkeit, ein Körpersekret, Schweiß, Liquor, Lymphe, Darm-, Magen-,
20 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, eine Blutprobe, wobei es sich bei einer Blutprobe um eine
25 (Blut)serum- oder (Blut)plasmaprobe handeln kann oder eine Liquorprobe. Als Liquor wird die Cerebrospinalflüssigkeit bezeichnet, die mit dem Gehirn in Kontakt steht und auch das Rückenmark umspült. Aus dem Rückenmark kann sie auch mit wenig Aufwand durch Punktion entnommen werden.

Blutproben können durch im Stand der Technik bekannte Verfahren beispielsweise aus einer Vene, Arterie oder Kapillare entnommen werden. Für gewöhnlich
30 wird eine Blutprobe erhalten, indem einem Individuum venöses Blut mittels einer

Spritze z.B. aus dem Arm entnommen wird. Der Begriff Blutprobe bezieht auch Proben ein, die aus Blut durch weitere, aus dem Stand der Technik bekannte Aufreinigungs- und Trennverfahren gewonnen wurden, wie z.B. Blutplasma oder Blutserum.

- 5 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, oder indirekte Verfahren,
10 wie z.B. mittels Liganden, bestimmt werden.

Falls erforderlich oder wünschenswert kann die Probe des Individuums, z.B. die Urin- oder Blutprobe, vor der Messung der An- oder Abwesenheit des oder der Polypeptidmarker durch jedes geeignete Mittel vorbehandelt und z.B. aufgereinigt oder aufgetrennt werden. Die Behandlung kann z.B. eine Aufreinigung,
15 Trennung, Verdünnung oder Konzentrierung umfassen. Die Verfahren können beispielsweise eine Zentrifugation, Filtration, Ultrafiltration, Dialyse, eine Fällung oder chromatographische Verfahren wie Affinitätstrennung oder Trennung mittels Ionenaustauscher-chromatographie, 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
20 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
30 Kapillarelektrophorese 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
- 5 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
- 10 eines 10 kDa Proteins mit einer Messgenauigkeit von ca. $\pm 0,01\%$ aus einem komplexen Gemisch zu vermessen. Bei Massenspektrometern ist eine ionenbildende Einheit mit einem geeigneten Analysegerät gekoppelt. Zum Beispiel werden meistens Elektrospray-Ionisations (ESI) Interfaces verwendet, um Ionen aus
- 15 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.
- 20 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 geladenen 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.
- 25 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
- 30 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 Diagnose von Alzheimer 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 schwachen Säure (z.B. 0,1% 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 50 bis 75 µm eingesetzt. Die verwendeten Längen
5 betragen 30-100 cm. Darüber hinaus bestehen die Kapillaren in der Regel aus Kunststoffumhüllten Quarzglas. Die Kapillaren können sowohl unbehandelt sein, 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
10 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
15 ionisiert und online in ein daran gekoppeltes Massenspektrometer zur Detektion überführt.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren können vorteilhafter Weise mehrere Polypeptidmarker zur Diagnose von Alzheimer verwendet werden. Insbesondere können mindestens drei Polypeptidmarker verwendet werden, beispielsweise die
20 Marker 1, 2 und 3; 1, 2 und 4, usw.

Mehr bevorzugt ist die Verwendung von mindestens 4, 5, oder 6 Markern.

Noch mehr bevorzugt ist die Verwendung von mindestens 13 Markern, beispielsweise die Marker 1 bis 13.

Am meisten bevorzugt ist die Verwendung aller 279 in den Tabellen 1 bis 3 aufgeführten Marker.
25

In einer Ausführungsform werden die Marker 123, 144, 167, 38, 255, 257 und 72 verwendet.

Um die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen von Alzheimer bei Verwendung mehrerer Marker zu bestimmen, können dem Fachmann bekannte statistische Verfahren verwendet werden. Beispielsweise kann das von Weissinger et al. (*Kidney*
30

Int., 2004, 65:2426-2434) beschriebene Random-Forests-Verfahren unter Verwendung eines Computerprogramms wie z.B. S-Plus verwendet werden.

Beispiel:1. Probenvorbereitung:

- 5 Zur Detektion der Polypeptidmarker für Alzheimer wurde Liquor verwendet. Liquor wurde von gesunden Spendern (Vergleichsgruppe) sowie Patienten, die an Alzheimer leiden, durch Lumbalpunktion abgenommen. Es wurden Kontrollproben von 6 Personen (Alter 32-64 Jahre) ohne neurologische oder psychiatrische Krankheiten verwendet. Die Liquorproben für die Alzheimer-Gruppe stammten
10 von 23 Patienten (Alter 57-76 Jahre), für die MCI - Gruppe von 8 Patienten (Alter 60-75 Jahre).

Für die nachfolgende CE-MS Messung mussten die im Liquor vorkommenden großen Proteine wie Albumin und Immunglobuline durch Ultrafiltration abgetrennt werden. Dazu wurden 700 µl Liquor entnommen und mit 700 µL Filtrationspuffer (4 M Harnstoff, 10 mM NH₄OH, 0,02% SDS) versetzt. Diese 1,4 mL
15 Probenvolumen wurden ultrafiltriert (Amicon 30 kDa, Millipore, Bedford, USA). Die UF wurde bei 3000 U/min in einer Zentrifuge durchgeführt bis 1,2 mL Ultrafiltrat erhalten wurden.

Die erhaltenen 1,2 mL Filtrat wurden dann auf eine Pharmacia C-2 Säule aufgetragen (Pharmacia, Uppsala, Schweden), um Harnstoff, Salze und andere störende
20 Komponenten zu entfernen. Die gebundenen Polypeptide wurden dann mit 50% Acetonitril, 0,5% Ameisensäure in Wasser von der C-2 Säule eluiert und lyophilisiert. Zur CE-MS Messung wurden die Polypeptide mit 20 µl Wasser (HPLC-Reinheit, Merck) resuspendiert.

25 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 30 % Methanol und 0,5% Ameisensäure in Wasser. Für den "Sheath-Flow" am MS wurde 30% Isopropanol mit 0,5% Ameisensäure verwendet, hier mit einer Flussrate von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. 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 einem Druck von 1 psi 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 NH_3 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 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 350 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
--------------------	----------------

- 19 -

	Aprotinin, (SIGMA, Taufkirchen, DE; Kat.Nr. A1153)	9,2 min
	Ribonuclease, SIGMA, Taufkirchen, DE; Kat.Nr.; R4875	10,9 min
	Lysozym, SIGMA, Taufkirchen, DE; Kat.Nr.; L7651	8,9 min
	“REV”, Sequenz: REVQSKIGYGRQIIS	15,6 min
5	“ELM”, Sequenz: ELMTGELPYSHINNRDQIIFMVGR	23,4 min
	“KINCON”, Sequenz: TGSLPYSHIGSRDQIIFMVGR	20,0 min
	“GIVLY” Sequenz: GIVLYELMTGELPYSHIN	36,8 min

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.

Die Molekularmassen der Peptide sowie die in der MS sichtbaren m/z Verhältnisse der einzelnen Ladungszustände sind wie folgt:

H (mono)	1,0079	1,0079	1,0079	1,0079	1,0079	1,0079	1,0079
m/z	Aprotinin	Ribonuclease	Lysozym	REV	KINCON	ELM	GIVLY
	Mono Mass	Mono Mass	Mono Mass	Mono Mass	Mono Mass	Mono Mass	Mono Mass
0	6513,09	13681,32	14303,88	1732,96	2333,19	2832,41	2048,03
1	6514,0979	13682,328	14304,888	1733,9679	2334,1979	2833,4179	2049,0379
2	3257,5529	6841,6679	7152,9479	867,4879	1167,6029	1417,2129	1025,0229
3	2172,0379	4561,4479	4768,9679	578,6612	778,7379	945,1446	683,6846
4	1629,2804	3421,3379	3576,9779	434,2479	584,3054	709,1104	513,0154
5	1303,6259	2737,2719	2861,7839	347,5999	467,6459	567,4899	410,6139
6	1086,5229	2281,2279	2384,9879	289,8346	389,8729	473,0762	342,3462
7	931,4494	1955,4822	2044,4193	248,5736	334,3208	405,6379	293,5836
8	815,1442	1711,1729	1788,9929	217,6279	292,6567	355,0592	257,0117
9	724,6846	1521,1546	1590,3279	193,559	260,2512	315,7201	228,5668
10	652,3169	1369,1399	1431,3959	174,3039	234,3269	284,2489	205,8109
11	593,107	1244,7643	1301,3606	158,5497	213,1161	258,4997	187,1924
12	543,7654	1141,1179	1192,9979	145,4212	195,4404	237,0421	171,6771
13	502,0148	1053,4171	1101,3063	134,3125	180,4841	218,8856	158,5486

4. Vergleich der erfindungsgemäßen Marker mit dem Stand der Technik

Wittke et al. in Elektrophoresis 26 (2005), 1476-1487 beschreiben in Tabelle 1 zehn Marker, die indikativ für das Vorliegen von Alzheimer sein sollen. Weitergehende Untersuchungen haben gezeigt, dass die gefundenen Marker nur eine geringere Spezifität aufweisen.

Figur 1a zeigt die Aussagekraft der Biomarker aus der Publikation. Dargestellt sind die Biomarker mit den ID's 108317 (ID-paper 356), 108983 (ID Paper 362), ID 128206 (ID Paper 472), ID 131316 (ID Paper 490), ID 131401 (ID Paper 491) und ID 136537 (ID Paper 515).

Figur 1b zeigt die Aussagekraft weiterer Biomarker aus der Publikation. Dargestellt sind die Biomarker mit den ID's 49693 (ID Paper 51), 66564 (ID Paper 111), ID 75674 (ID-Paper 142), ID 89174 (ID Paper 208).

Es ist deutlich zu erkennen, dass der prädiktive Wert nahezu für jeden der zehn in der Veröffentlichung enthaltenden Marker nahe 0 liegt im Gegensatz zu den erfindungsgemäß beanspruchten Markern.

Figur 2a und b zeigen die entsprechende Analyse für zwölf erfindungsgemäße Marker. Diese führen zu einer korrekten Trennung der Gruppen (gesund ./ Alzheimer). Durch Auswahl von mindestens drei Markern erreicht die Analyse eine Genauigkeit von 84%.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Diagnose von Alzheimer umfassend den Schritt der Bestimmung einer An- oder Abwesenheit mindestens eines Polypeptidmarkers in einer Probe, wobei der Polypeptidmarker ausgewählt ist aus den Markern 1-50 (Frequenzmarker), oder der Bestimmung der Amplitude mindestens eines Polypeptidmarkers, ausgewählt aus den Markern 51-279 (Amplitudenmarker), die durch folgende Werte für die Molekularmassen und die Migrationszeit charakterisiert sind:

- 22 -

Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]	Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]	Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]	Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]
1	1073,35	34,96	71	1130,37	35,19	142	2166,09	27,84	212	3905,8	27,72
2	1073,35	35,9	72	1130,63	27,07	143	2168,66	34,88	213	3929,73	23,07
3	1110,31	37,67	73	1135,56	27,03	144	2179,03	25,31	214	3934,76	24,02
4	1111,3	34,97	74	1150,61	26,55	145	2278,11	26,17	215	3951,07	22,77
5	1196,36	36,37	75	1158,62	27,02	146	2283,18	26,31	216	4005,54	22,57
6	1265,63	27,22	76	1183,66	27,49	147	2314,3	22,71	217	4087,12	26,92
7	1322,44	36,2	77	1186,56	27,21	148	2320,43	23,21	218	4112,78	24,46
8	1387,07	20,42	78	1217,56	21,8	149	2327,24	34,9	219	4131,68	22,54
9	1390,49	36,26	79	1229,62	27,38	150	2341,12	26,74	220	4164,86	25,11
10	1423,57	29,85	80	1250,61	27,59	151	2343,24	34,95	221	4192,99	34,95
11	1453,55	30,47	81	1276,43	35,7	152	2368,24	21,24	222	4203,13	26,14
12	1490,43	35,48	82	1283,4	35,91	153	2377,25	28,07	223	4218,31	20,6
13	1494,62	30,23	83	1300,67	29,7	154	2390,26	27,33	224	4232,32	32,35
14	1819,86	23,51	84	1306,74	22,16	155	2392,73	35,48	225	4250	27,68
15	1927,02	21	85	1333,44	35,93	156	2409,28	27,64	226	4278	25,3
16	2128,97	26,03	86	1342,44	35,43	157	2410,3	30,62	227	4301,93	21,26
17	2214,22	26,48	87	1347,71	28,94	158	2448,39	21,07	228	4307,09	31,58
18	2313,26	30,32	88	1349,67	28,25	159	2475,21	27,09	229	4349,06	28,17
19	2423,19	27,03	89	1360,67	28,06	160	2475,27	24,74	230	4384,07	19,8
20	2428,11	27,16	90	1386,68	28,62	161	2486,04	35,76	231	4428,79	32,86
21	2521,33	27,86	91	1388,74	27,97	162	2500,33	19,99	232	4464,64	21,54
22	2644,31	21,1	92	1399,44	36,06	163	2521,36	19,26	233	4468,61	23,47
23	2706,37	28,3	93	1404,73	29,49	164	2522,35	27,9	234	4510,97	28,56
24	3068,46	30,03	94	1409,63	22,11	165	2527,42	19,79	235	4548,03	25,95
25	3079,61	37,02	95	1449,7	22,04	166	2549,29	27,66	236	4562	29,31
26	3153,38	35,65	96	1451,72	28,84	167	2584,37	35,6	237	4562	29,31
27	3229,79	25,02	97	1464,7	30,57	168	2684,32	21,38	238	4564,18	26,01
28	3438,77	23,49	99	1475,77	30,05	169	2698,41	22,52	239	4583,84	24,2
29	3481,8	30,62	100	1499,74	29,89	170	2799,17	25,07	240	4637,81	27,82
30	3567,61	23,88	101	1519,76	31,87	171	2816,31	28,74	241	4730,71	19,63
31	3685,85	25,47	102	1535,74	30	172	2851,42	27,7	242	4749,41	21,81
32	3921,84	29,49	103	1542,78	23,24	173	2923,51	36,73	243	4750,06	19,53
33	4036,3	24,92	104	1550,67	27,47	174	2982,72	19,97	244	4890,59	23,27
34	4038,22	20,53	105	1552,61	30,78	175	3019,54	24,72	245	4933,64	20,57
35	4093,96	21,04	106	1590,81	32,46	176	3173,68	22,95	246	4986,98	21,35
36	4145,22	24,51	107	1596,83	30,32	177	3192,67	37,66	247	5039,63	25,68
37	4372,3	19,37	108	1614,84	31,54	178	3215,61	28,53	248	5042,1	24,31
38	4377,95	30,81	109	1623,65	31,1	179	3218,4	30,31	249	5060,4	20,09
39	4496,98	19,35	110	1628,8	20,75	180	3221,59	22,7	250	5110,36	25,28
40	4516	19,37	111	1636,79	22,71	181	3279,66	25,32	251	5122,44	20,75
41	4540,4	22	112	1659,81	27,41	182	3282,34	36,05	252	5157,79	34,26
42	4586,98	19,38	113	1692,91	31,38	183	3298,42	36,17	253	5181,63	25,36
43	4596,23	19,6	114	1703,89	33,01	184	3302,68	23,31	254	5258,56	22,09
44	4810,95	19,77	115	1727,92	32,13	185	3324,7	21,62	255	5439,46	25,41
45	5227,91	25,08	116	1732,88	31,36	186	3386,77	22,21	256	5495,33	31,72
46	5582,16	24,3	117	1738,68	32,16	187	3401,73	23,48	257	5660,6	31,55
47	6402,73	22,3	118	1741,83	30,56	188	3408,76	26,04	258	5745,2	19,72
48	7749,32	19,97	119	1756,89	19,81	189	3462,68	21,25	259	5891,27	24,16
49	7760,02	28,72	120	1771,97	30,02	190	3466,75	23,9	260	6224,17	25,27
50	10671,25	28,92	121	1800,02	25	191	3524,8	31,72	261	6327,46	22,03
51	824,48	19,92	122	1816,98	33,53	192	3529,84	23,7	262	6498,75	20,1
52	840,49	19,92	123	1820,06	32,23	193	3595,77	23,89	263	6611,97	28,44
53	846,38	25,96	124	1841,77	36,26	194	3605,4	21,53	264	6617,76	24,03
54	897,41	25,86	125	1849,68	18,31	195	3614,82	22,01	265	6813,98	23,14
55	911,3	34,1	126	1850,96	31,97	196	3644,79	29,39	266	6881,81	21,72
56	950,57	24,13	127	1867,72	33,07	197	3645,25	26,69	267	6893,8	24,57
57	973,26	35,47	128	1869,92	31,28	198	3650,74	19,9	268	6985,31	21,87
58	984,45	26,32	129	1873	21,26	199	3672,71	21,9	269	7026,99	22,02
59	988,57	35,65	130	1900,07	24,19	200	3677,74	24,3	270	7049,04	22,79
60	1013,43	25,18	131	1914,07	25,67	201	3685,86	22,21	271	7106,83	23
61	1016,3	35,53	132	1915,72	34,24	202	3687,78	20,58	272	7142,49	21,32
62	1041,58	36,79	133	1917,03	24,99	203	3693,93	27,15	273	7210,86	22,94
63	1053,52	25,25	134	1955,95	27,81	204	3741,63	20,1	274	8176,16	19,47
64	1055,61	25,7	135	2021,11	21,85	205	3768,77	31,84	275	8186,93	20,72
65	1082,55	23,75	136	2041,99	32,56	206	3782,94	22,68	276	8289,28	19,39
66	1082,65	26,15	137	2053,18	20,54	207	3788,04	25,24	277	9724,01	25,64
67	1083,5	27,14	138	2072,15	27,04	208	3792,76	27,25	278	12529	20,64
68	1083,55	25,61	139	2077,07	25,44	209	3819,82	32,74	279	14557,83	19,21
69	1085,63	36,39	140	2085,12	33,75	210	3881,87	24,56			
70	1094,61	25,99	141	2140,12	20,56	211	3903,08	25,71			

- 23 -

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Auswertung der bestimmten An- oder Abwesenheit anhand folgender Referenzwerte erfolgt:

Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]	Frequenz- unterschied	Häufigkeit je Gruppe	
				Alzheimer Demenz	Kontrollen
1	1073,35	34,96	0,45	0,45	0
2	1073,35	35,9	-0,48	0,46	0,94
3	1110,31	37,67	-0,44	0	0,44
4	1111,3	34,97	-0,41	0,27	0,69
5	1196,36	36,37	-0,44	0,31	0,75
6	1265,63	27,22	0,41	0,66	0,25
7	1322,44	36,2	0,44	0,75	0,31
8	1387,07	20,42	-0,41	0,09	0,5
9	1390,49	36,26	0,42	0,55	0,13
10	1423,57	29,85	0,48	0,79	0,31
11	1453,55	30,47	0,44	0,63	0,19
12	1490,43	35,48	0,42	0,79	0,38
13	1494,62	30,23	0,5	0,75	0,25
14	1819,86	23,51	-0,48	0,27	0,75
15	1927,02	21	0,48	0,67	0,19
16	2128,97	26,03	0,46	0,96	0,5
17	2214,22	26,48	0,52	0,83	0,31
18	2313,26	30,32	0,48	0,67	0,19
19	2423,19	27,03	0,41	0,6	0,19
20	2428,11	27,16	-0,45	0,36	0,81
21	2521,33	27,86	-0,44	0	0,44
22	2644,31	21,1	0,45	0,89	0,44
23	2706,37	28,3	0,46	0,71	0,25
24	3068,46	30,03	0,46	0,77	0,31
25	3079,61	37,02	-0,42	0,46	0,88
26	3153,38	35,65	0,46	0,71	0,25
27	3229,79	25,02	-0,44	0	0,44
28	3438,77	23,49	0,44	0,75	0,31
29	3481,8	30,62	0,45	0,89	0,44
30	3567,61	23,88	-0,44	0,18	0,63
31	3685,85	25,47	-0,44	0,18	0,63
32	3921,84	29,49	-0,41	0,09	0,5
33	4036,3	24,92	0,5	0,69	0,19
34	4038,22	20,53	-0,63	0	0,63
35	4093,96	21,04	0,5	0,63	0,13
36	4145,22	24,51	0,42	0,42	0
37	4372,3	19,37	-0,44	0,18	0,63
38	4377,95	30,81	0,5	0,63	0,13
39	4496,98	19,35	-0,41	0,09	0,5
40	4516	19,37	-0,45	0,36	0,81
41	4540,4	22	-0,41	0,09	0,5
42	4586,98	19,38	-0,41	0,27	0,69
43	4596,23	19,6	-0,47	0,09	0,56
44	4810,95	19,77	-0,44	0	0,44
45	5227,91	25,08	0,54	0,73	0,19
46	5582,16	24,3	0,4	0,4	0
47	6402,73	22,3	0,44	0,63	0,19
48	7749,32	19,97	-0,41	0,09	0,5
49	7760,02	28,72	0,46	0,71	0,25
50	10671,25	28,92	0,48	0,67	0,19

5

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Auswertung der Amplitude der Marker 51-279 anhand folgender Referenzwerte erfolgt:

- 24 -

Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]	mittlere Amplitude je Gruppe		Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]	mittlere Amplitude je Gruppe	
			Alzheimer	Kontrollen				Alzheimer	Kontrollen
51	824,48	19,92	568,85	501,97	128	1869,92	31,28	223,93	140,79
52	840,49	19,92	810,27	593,64	129	1873	21,26	440,7	270,85
53	846,38	25,96	100,62	122,25	130	1900,07	24,19	920,26	373,01
54	897,41	25,86	81,54	48,26	131	1914,07	25,67	1519,39	1746,72
55	911,3	34,1	242,62	247,96	132	1915,72	34,24	180,37	151,24
56	950,57	24,13	78,07	67,87	133	1917,03	24,99	197,09	216,02
57	973,26	35,47	179,96	150,04	134	1955,95	27,81	129,24	99,09
58	984,45	26,32	110,69	132,44	135	2021,11	21,85	346,14	257,95
59	988,57	35,65	211,75	188,31	136	2041,99	32,56	193,08	127,84
60	1013,43	25,18	175,63	104,85	137	2053,18	20,54	501,38	674,91
61	1016,3	35,53	909,17	810,15	138	2072,15	27,04	601,86	494,89
62	1041,58	36,79	86,97	139,71	139	2077,07	25,44	261,1	214,6
63	1053,52	25,25	87,43	46,52	140	2085,12	33,75	215,62	302,81
64	1055,61	25,7	277,17	465,99	141	2140,12	20,56	256,95	290,52
65	1082,55	23,75	78,89	50,53	142	2166,09	27,84	128,57	52,54
66	1082,65	26,15	112,48	104,55	143	2168,66	34,88	257,1	291,77
67	1083,5	27,14	118,51	108,08	144	2179,03	25,31	84,93	31,65
68	1083,55	25,61	271,44	164,33	145	2278,11	26,17	438,37	314,65
69	1085,63	36,39	140,8	145,98	146	2283,18	26,31	619,59	634,52
70	1094,61	25,99	460,11	418,75	147	2314,3	22,71	1018,08	1167,69
71	1130,37	35,19	670,41	372,37	148	2320,43	23,21	212,67	166,8
72	1130,63	27,07	115,03	78,26	149	2327,24	34,9	1737,42	1517,73
73	1135,56	27,03	60,46	58,13	150	2341,12	26,74	304,17	535,15
74	1150,61	26,55	80,41	45,34	151	2343,24	34,95	270,79	236,16
75	1158,62	27,02	68,79	40,98	152	2368,24	21,24	101,48	105,72
76	1183,66	27,49	110,3	73,65	153	2377,25	28,07	2711,11	1749,4
77	1186,56	27,21	315,86	221,73	154	2390,26	27,33	617,62	500,67
78	1217,56	21,8	90,54	80,33	155	2392,73	35,48	512,31	482,03
79	1229,62	27,38	99,75	62,81	156	2409,28	27,64	275,81	159,58
80	1250,61	27,59	455,17	151,8	157	2410,3	30,62	338,59	232,89
81	1276,43	35,7	1739,68	1000,12	158	2448,39	21,07	488,24	440,74
82	1283,4	35,91	104,76	53	159	2475,21	27,09	757,06	535,45
83	1300,67	29,7	120,17	58,65	160	2475,27	24,74	478,15	297,04
84	1306,74	22,16	552,66	320,23	161	2486,04	35,76	2280,47	1824,17
85	1333,44	35,93	268,17	204,63	162	2500,33	19,99	110,01	94,92
86	1342,44	35,43	275,61	325,49	163	2521,36	19,26	516,08	635,2
87	1347,71	28,94	83,29	67,88	164	2522,35	27,9	4135,44	3306,09
88	1349,67	28,25	363,22	580,39	165	2527,42	19,79	393,22	500,27
89	1360,67	28,06	90,7	94,56	166	2549,29	27,66	99,25	108,48
90	1386,68	28,62	366,31	404,69	167	2584,37	35,6	451,18	260,07
91	1388,74	27,97	319,52	394,09	168	2684,32	21,38	1926,21	155,86
92	1399,44	36,06	179,15	82,16	169	2698,41	22,52	182,49	220,4
93	1404,73	29,49	165,77	108,43	170	2799,17	25,07	445,75	375,83
94	1409,63	22,11	288,37	317,52	171	2816,31	28,74	1366,84	1928,38
95	1449,7	22,04	77,35	102,04	172	2851,42	27,7	495,9	288,67
96	1451,72	28,84	111,94	52,91	173	2923,51	36,73	818,47	883,22
97	1464,7	30,57	1169,16	1453,9	174	2982,72	19,97	3750,78	5523,72
98	1464,7	30,57	1346,04	1453,9	175	3019,54	24,72	170,57	189,58
99	1475,77	30,05	216,71	146,11	176	3173,68	22,95	155,36	252,28
100	1499,74	29,89	104,53	57,36	177	3192,67	37,66	689,53	1089,16
101	1519,76	31,87	392,54	271,33	178	3215,61	28,53	1305,23	2016,28
102	1535,74	30	2366,44	3661,09	179	3218,4	30,31	1384,58	1875,79
103	1542,78	23,24	713,91	533,83	180	3221,59	22,7	170,45	217,24
104	1550,67	27,47	576,53	637,58	181	3279,66	25,32	141,5	83
105	1552,61	30,78	176,95	110,5	182	3282,34	36,05	1082,36	1351,09
106	1590,81	32,46	1491,15	1260,68	183	3298,42	36,17	268,81	282,69
107	1596,83	30,32	873,36	577,23	184	3302,68	23,31	316,81	508,67
108	1614,84	31,54	688,7	410,65	185	3324,7	21,62	422,39	490,7
109	1623,65	31,1	697,2	364,52	186	3386,77	22,21	670,34	395,98
110	1628,8	20,75	304,52	326,72	187	3401,73	23,48	2618,95	4622,56
111	1636,79	22,71	1006,43	814,9	188	3408,76	26,04	175,22	94,81
112	1659,81	27,41	589,62	358,41	189	3462,68	21,25	2161,32	2653,08
113	1692,91	31,38	127,4	95,57	190	3466,75	23,9	904,51	559,21
114	1703,89	33,01	287,84	258,89	191	3524,8	31,72	1130,3	410,29
115	1727,92	32,13	552,58	276,12	192	3529,84	23,7	1979,26	2916,13
116	1732,88	31,36	596,19	543,08	193	3595,77	23,89	344,53	455,24
117	1738,68	32,16	92,84	40,42	194	3605,4	21,53	321,29	479,63
118	1741,83	30,56	114,01	84,13	195	3614,82	22,01	161,46	267,85
119	1756,89	19,81	176,68	85,89	196	3644,79	29,39	1038,75	749,16
120	1771,97	30,02	328,73	214,56	197	3645,25	26,69	1161,31	741,33
121	1800,02	25	516,9	674,37	198	3650,74	19,9	1029,39	1161,19
122	1816,98	33,53	395,82	180,33	199	3672,71	21,9	1896,48	819,91
123	1820,06	32,23	107,09	76,57	200	3677,74	24,3	1717,39	1567,09
124	1841,77	36,26	847,46	1396,48	201	3685,86	22,21	9259,98	16077,47
125	1849,68	18,31	405,84	688,91	202	3687,78	20,58	832,51	1095,77
126	1850,96	31,97	116,29	133,34	203	3693,93	27,15	344,49	218,63
127	1867,72	33,07	1356,26	956,64	204	3741,63	20,1	547,74	806,46

- 25 -

Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]	mittlere Amplitude je Gruppe	
			Alzheimer	Kontrollen
205	3768,77	31,84	533,93	377,59
206	3782,94	22,68	360,79	364,04
207	3788,04	25,24	609,58	782,85
208	3792,76	27,25	682,32	432,09
209	3819,82	32,74	120,7	133,76
210	3881,87	24,56	3257,71	1968,09
211	3903,08	25,71	2177,14	2780,86
212	3905,8	27,72	23257,92	16304,43
213	3929,73	23,07	2742,02	3430,19
214	3934,76	24,02	653,19	487,54
215	3951,07	22,77	25509,01	32844,44
216	4005,54	22,57	566,89	387,06
217	4087,12	26,92	607,44	490,16
218	4112,78	24,46	267,94	308,15
219	4131,68	22,54	653,71	586,61
220	4164,86	25,11	781,59	466,12
221	4192,99	34,95	1761,93	1496,61
222	4203,13	26,14	613,9	1051,15
223	4218,31	20,6	939,4	1360,44
224	4232,32	32,35	318,48	349,1
225	4250	27,68	504,35	286,25
226	4278	25,3	1161,81	745,21
227	4301,93	21,26	476,37	698,84
228	4307,09	31,58	157,37	88,2
229	4349,06	28,17	15449,01	7992,31
230	4384,07	19,8	465,18	981,39
231	4428,79	32,86	827,48	433,08
232	4464,64	21,54	4084,32	2311,8
233	4468,61	23,47	3429,99	2945,88
234	4510,97	28,56	1157,68	629,08
235	4548,03	25,95	3177,96	2703,21
236	4562	29,31	509,94	403,2
237	4562	29,31	574,68	403,2
238	4564,18	26,01	497,67	438,34
239	4583,84	24,2	7608,37	7241,51
240	4637,81	27,82	337,27	294,89
241	4730,71	19,63	797,93	1759,4
242	4749,41	21,81	725,74	426,89
243	4750,06	19,53	4365,88	3189,94
244	4890,59	23,27	1965,12	1418,61
245	4933,64	20,57	878,93	735,48
246	4986,98	21,35	637,73	533,05
247	5039,63	25,68	1039,64	1389,17
248	5042,1	24,31	3686,99	3120,74
249	5060,4	20,09	3307,86	1942,65
250	5110,36	25,28	637,44	697,57
251	5122,44	20,75	1342	851,23
252	5157,79	34,26	200,52	208,01
253	5181,63	25,36	5716,39	4305,72
254	5258,56	22,09	12476,68	10602,4
255	5439,46	25,41	713,92	522,3
256	5495,33	31,72	1776,93	1297,43
257	5660,6	31,55	893,02	595,49
258	5745,2	19,72	851,4	1608,76
259	5891,27	24,16	482,2	422,63
260	6224,17	25,27	1104,36	995,62
261	6327,46	22,03	1410,46	1027,79
262	6498,75	20,1	3989,56	2972,62
263	6611,97	28,44	311,21	338,55
264	6617,76	24,03	2799,82	1943,58
265	6813,98	23,14	4217,01	3699,9
266	6881,81	21,72	450,1	868,21
267	6893,8	24,57	2537,57	1569,65
268	6985,31	21,87	2238,63	1577,04
269	7026,99	22,02	2132,66	1480,92
270	7049,04	22,79	8522,63	6229,31
271	7106,83	23	766,91	575,59
272	7142,49	21,32	1014,86	557,95
273	7210,86	22,94	915,21	568,24
274	8176,16	19,47	11495,92	7835,63
275	8186,93	20,72	1706,07	1130,11
276	8289,28	19,39	4317,47	3227,21
277	9724,01	25,64	3380,24	1957,82
278	12529	20,64	38234,95	9397,12
279	14557,83	19,21	1514,79	2225,19

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei mindestens drei oder mindestens vier oder mindestens fünf oder mindestens zehn oder alle Polypeptidmarker verwendet werden, wie sie in Anspruch 1 definiert sind.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Probe eines Individuums eine Blutprobe (Serum- oder Plasmaprobe), oder eine Liquorprobe (Cerebrospinalflüssigkeit) ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei Kapillarelektrophorese, HPLC, Gasphasenionenspektrometrie und/oder Massenspektrometrie zum Nachweis der An- oder Abwesenheit des/der Polypeptidmarker verwendet wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei vor der Messung der Molekularmasse der Polypeptidmarker eine Kapillarelektrophorese durchgeführt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei Massenspektrometrie zum Nachweis der An- oder Abwesenheit des/der Polypeptidmarker verwendet wird.
9. Verwendung mindestens eines Polypeptidmarkers ausgewählt aus den Markern Nr. 1 bis 279, der durch die folgenden Werte für die Molekularmassen und die Migrationszeit charakterisiert ist

Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]	Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]	Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]	Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]
1	1073,35	34,96	71	1130,37	35,19	142	2166,09	27,84	212	3905,8	27,72
2	1073,35	35,9	72	1130,63	27,07	143	2168,66	34,88	213	3929,73	23,07
3	1110,31	37,67	73	1135,56	27,03	144	2179,03	25,31	214	3934,76	24,02
4	1111,3	34,97	74	1150,61	26,55	145	2278,11	26,17	215	3951,07	22,77
5	1196,36	36,37	75	1158,62	27,02	146	2283,18	26,31	216	4005,54	22,57
6	1265,63	27,22	76	1183,66	27,49	147	2314,3	22,71	217	4087,12	26,92
7	1322,44	36,2	77	1186,56	27,21	148	2320,43	23,21	218	4112,78	24,46
8	1387,07	20,42	78	1217,56	21,8	149	2327,24	34,9	219	4131,68	22,54
9	1390,49	36,26	79	1229,62	27,38	150	2341,12	26,74	220	4164,86	25,11
10	1423,57	29,85	80	1250,61	27,59	151	2343,24	34,95	221	4192,99	34,95
11	1453,55	30,47	81	1276,43	35,7	152	2368,24	21,24	222	4203,13	26,14
12	1490,43	35,48	82	1283,4	35,91	153	2377,25	28,07	223	4218,31	20,6
13	1494,62	30,23	83	1300,67	29,7	154	2390,26	27,33	224	4232,32	32,35
14	1819,86	23,51	84	1306,74	22,16	155	2392,73	35,48	225	4250	27,68
15	1927,02	21	85	1333,44	35,93	156	2409,28	27,64	226	4278	25,3
16	2128,97	26,03	86	1342,44	35,43	157	2410,3	30,62	227	4301,93	21,26
17	2214,22	26,48	87	1347,71	28,94	158	2448,39	21,07	228	4307,09	31,58
18	2313,26	30,32	88	1349,67	28,25	159	2475,21	27,09	229	4349,06	28,17
19	2423,19	27,03	89	1360,67	28,06	160	2475,27	24,74	230	4384,07	19,8
20	2428,11	27,16	90	1386,68	28,62	161	2486,04	35,76	231	4428,79	32,86
21	2521,33	27,86	91	1388,74	27,97	162	2500,33	19,99	232	4464,64	21,54
22	2644,31	21,1	92	1399,44	36,06	163	2521,36	19,26	233	4468,61	23,47
23	2706,37	28,3	93	1404,73	29,49	164	2522,35	27,9	234	4510,97	28,56
24	3068,46	30,03	94	1409,63	22,11	165	2527,42	19,79	235	4548,03	25,95
25	3079,61	37,02	95	1449,7	22,04	166	2549,29	27,66	236	4562	29,31
26	3153,38	35,65	96	1451,72	28,84	167	2584,37	35,6	237	4562	29,31
27	3229,79	25,02	97	1464,7	30,57	168	2684,32	21,38	238	4564,18	26,01
28	3438,77	23,49	99	1475,77	30,05	169	2698,41	22,52	239	4583,84	24,2
29	3481,8	30,62	100	1499,74	29,89	170	2799,17	25,07	240	4637,81	27,82
30	3567,61	23,88	101	1519,76	31,87	171	2816,31	28,74	241	4730,71	19,63
31	3685,85	25,47	102	1535,74	30	172	2851,42	27,7	242	4749,41	21,81
32	3921,84	29,49	103	1542,78	23,24	173	2923,51	36,73	243	4750,06	19,53
33	4036,3	24,92	104	1550,67	27,47	174	2982,72	19,97	244	4890,59	23,27
34	4038,22	20,53	105	1552,61	30,78	175	3019,54	24,72	245	4933,64	20,57
35	4093,96	21,04	106	1590,81	32,46	176	3173,68	22,95	246	4986,98	21,35
36	4145,22	24,51	107	1596,83	30,32	177	3192,67	37,66	247	5039,63	25,68
37	4372,3	19,37	108	1614,84	31,54	178	3215,61	28,53	248	5042,1	24,31
38	4377,95	30,81	109	1623,65	31,1	179	3218,4	30,31	249	5060,4	20,09
39	4496,98	19,35	110	1628,8	20,75	180	3221,59	22,7	250	5110,36	25,28
40	4516	19,37	111	1636,79	22,71	181	3279,66	25,32	251	5122,44	20,75
41	4540,4	22	112	1659,81	27,41	182	3282,34	36,05	252	5157,79	34,26
42	4586,98	19,38	113	1692,91	31,38	183	3298,42	36,17	253	5181,63	25,36
43	4596,23	19,6	114	1703,89	33,01	184	3302,68	23,31	254	5258,56	22,09
44	4810,95	19,77	115	1727,92	32,13	185	3324,7	21,62	255	5439,46	25,41
45	5227,91	25,08	116	1732,88	31,36	186	3386,77	22,21	256	5495,33	31,72
46	5582,16	24,3	117	1738,68	32,16	187	3401,73	23,48	257	5660,6	31,55
47	6402,73	22,3	118	1741,83	30,56	188	3408,76	26,04	258	5745,2	19,72
48	7749,32	19,97	119	1756,89	19,81	189	3462,68	21,25	259	5891,27	24,16
49	7760,02	28,72	120	1771,97	30,02	190	3466,75	23,9	260	6224,17	25,27
50	10671,25	28,92	121	1800,02	25	191	3524,8	31,72	261	6327,46	22,03
51	824,48	19,92	122	1816,98	33,53	192	3529,84	23,7	262	6498,75	20,1
52	840,49	19,92	123	1820,06	32,23	193	3595,77	23,89	263	6611,97	28,44
53	846,38	25,96	124	1841,77	36,26	194	3605,4	21,53	264	6617,76	24,03
54	897,41	25,86	125	1849,68	18,31	195	3614,82	22,01	265	6813,98	23,14
55	911,3	34,1	126	1850,96	31,97	196	3644,79	29,39	266	6881,81	21,72
56	950,57	24,13	127	1867,72	33,07	197	3645,25	26,69	267	6893,8	24,57
57	973,26	35,47	128	1869,92	31,28	198	3650,74	19,9	268	6985,31	21,87
58	984,45	26,32	129	1873	21,26	199	3672,71	21,9	269	7026,99	22,02
59	988,57	35,65	130	1900,07	24,19	200	3677,74	24,3	270	7049,04	22,79
60	1013,43	25,18	131	1914,07	25,67	201	3685,86	22,21	271	7106,83	23
61	1016,3	35,53	132	1915,72	34,24	202	3687,78	20,58	272	7142,49	21,32
62	1041,58	36,79	133	1917,03	24,99	203	3693,93	27,15	273	7210,86	22,94
63	1053,52	25,25	134	1955,95	27,81	204	3741,63	20,1	274	8176,16	19,47
64	1055,61	25,7	135	2021,11	21,85	205	3768,77	31,84	275	8186,93	20,72
65	1082,55	23,75	136	2041,99	32,56	206	3782,94	22,68	276	8289,28	19,39
66	1082,65	26,15	137	2053,18	20,54	207	3788,04	25,24	277	9724,01	25,64
67	1083,5	27,14	138	2072,15	27,04	208	3792,76	27,25	278	12529	20,64
68	1083,55	25,61	139	2077,07	25,44	209	3819,82	32,74	279	14557,83	19,21
69	1085,63	36,39	140	2085,12	33,75	210	3881,87	24,56			
70	1094,61	25,99	141	2140,12	20,56	211	3903,08	25,71			

zur Diagnose von Alzheimer.

Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]	Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]	Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]	Nr	Masse [g/mol]	Migrationszeit [min]
1	1073,35	34,96	71	1130,37	35,19	142	2166,09	27,84	212	3905,8	27,72
2	1073,35	35,9	72	1130,63	27,07	143	2168,66	34,88	213	3929,73	23,07
3	1110,31	37,67	73	1135,56	27,03	144	2179,03	25,31	214	3934,76	24,02
4	1111,3	34,97	74	1150,61	26,55	145	2278,11	26,17	215	3951,07	22,77
5	1196,36	36,37	75	1158,62	27,02	146	2283,18	26,31	216	4005,54	22,57
6	1265,63	27,22	76	1183,66	27,49	147	2314,3	22,71	217	4087,12	26,92
7	1322,44	36,2	77	1186,56	27,21	148	2320,43	23,21	218	4112,78	24,46
8	1387,07	20,42	78	1217,56	21,8	149	2327,24	34,9	219	4131,68	22,54
9	1390,49	36,26	79	1229,62	27,38	150	2341,12	26,74	220	4164,86	25,11
10	1423,57	29,85	80	1250,61	27,59	151	2343,24	34,95	221	4192,99	34,95
11	1453,55	30,47	81	1276,43	35,7	152	2368,24	21,24	222	4203,13	26,14
12	1490,43	35,48	82	1283,4	35,91	153	2377,25	28,07	223	4218,31	20,6
13	1494,62	30,23	83	1300,67	29,7	154	2390,26	27,33	224	4232,32	32,35
14	1819,86	23,51	84	1306,74	22,16	155	2392,73	35,48	225	4250	27,68
15	1927,02	21	85	1333,44	35,93	156	2409,28	27,64	226	4278	25,3
16	2128,97	26,03	86	1342,44	35,43	157	2410,3	30,62	227	4301,93	21,26
17	2214,22	26,48	87	1347,71	28,94	158	2448,39	21,07	228	4307,09	31,58
18	2313,26	30,32	88	1349,67	28,25	159	2475,21	27,09	229	4349,06	28,17
19	2423,19	27,03	89	1360,67	28,06	160	2475,27	24,74	230	4384,07	19,8
20	2428,11	27,16	90	1386,68	28,62	161	2486,04	35,76	231	4428,79	32,86
21	2521,33	27,86	91	1388,74	27,97	162	2500,33	19,99	232	4464,64	21,54
22	2644,31	21,1	92	1399,44	36,06	163	2521,36	19,26	233	4468,61	23,47
23	2706,37	28,3	93	1404,73	29,49	164	2522,35	27,9	234	4510,97	28,56
24	3068,46	30,03	94	1409,63	22,11	165	2527,42	19,79	235	4548,03	25,95
25	3079,61	37,02	95	1449,7	22,04	166	2549,29	27,66	236	4562	29,31
26	3153,38	35,65	96	1451,72	28,84	167	2584,37	35,6	237	4562	29,31
27	3229,79	25,02	97	1464,7	30,57	168	2684,32	21,38	238	4564,18	26,01
28	3438,77	23,49	99	1475,77	30,05	169	2698,41	22,52	239	4583,84	24,2
29	3481,8	30,62	100	1499,74	29,89	170	2799,17	25,07	240	4637,81	27,82
30	3567,61	23,88	101	1519,76	31,87	171	2816,31	28,74	241	4730,71	19,63
31	3685,85	25,47	102	1535,74	30	172	2851,42	27,7	242	4749,41	21,81
32	3921,84	29,49	103	1542,78	23,24	173	2923,51	36,73	243	4750,06	19,53
33	4036,3	24,92	104	1550,67	27,47	174	2982,72	19,97	244	4890,59	23,27
34	4038,22	20,53	105	1552,61	30,78	175	3019,54	24,72	245	4933,64	20,57
35	4093,96	21,04	106	1590,81	32,46	176	3173,68	22,95	246	4986,98	21,35
36	4145,22	24,51	107	1596,83	30,32	177	3192,67	37,66	247	5039,63	25,68
37	4372,3	19,37	108	1614,84	31,54	178	3215,61	28,53	248	5042,1	24,31
38	4377,95	30,81	109	1623,65	31,1	179	3218,4	30,31	249	5060,4	20,09
39	4496,98	19,35	110	1628,8	20,75	180	3221,59	22,7	250	5110,36	25,28
40	4516	19,37	111	1636,79	22,71	181	3279,66	25,32	251	5122,44	20,75
41	4540,4	22	112	1659,81	27,41	182	3282,34	36,05	252	5157,79	34,26
42	4586,98	19,38	113	1692,91	31,38	183	3298,42	36,17	253	5181,63	25,36
43	4596,23	19,6	114	1703,89	33,01	184	3302,68	23,31	254	5258,56	22,09
44	4810,95	19,77	115	1727,92	32,13	185	3324,7	21,62	255	5439,46	25,41
45	5227,91	25,08	116	1732,88	31,36	186	3386,77	22,21	256	5495,33	31,72
46	5582,16	24,3	117	1738,68	32,16	187	3401,73	23,48	257	5660,6	31,55
47	6402,73	22,3	118	1741,83	30,56	188	3408,76	26,04	258	5745,2	19,72
48	7749,32	19,97	119	1756,89	19,81	189	3462,68	21,25	259	5891,27	24,16
49	7760,02	28,72	120	1771,97	30,02	190	3466,75	23,9	260	6224,17	25,27
50	10671,25	28,92	121	1800,02	25	191	3524,8	31,72	261	6327,46	22,03
51	824,48	19,92	122	1816,98	33,53	192	3529,84	23,7	262	6498,75	20,1
52	840,49	19,92	123	1820,06	32,23	193	3595,77	23,89	263	6611,97	28,44
53	846,38	25,96	124	1841,77	36,26	194	3605,4	21,53	264	6617,76	24,03
54	897,41	25,86	125	1849,68	18,31	195	3614,82	22,01	265	6813,98	23,14
55	911,3	34,1	126	1850,96	31,97	196	3644,79	29,39	266	6881,81	21,72
56	950,57	24,13	127	1867,72	33,07	197	3645,25	26,69	267	6893,8	24,57
57	973,26	35,47	128	1869,92	31,28	198	3650,74	19,9	268	6985,31	21,87
58	984,45	26,32	129	1873	21,26	199	3672,71	21,9	269	7026,99	22,02
59	988,57	35,65	130	1900,07	24,19	200	3677,74	24,3	270	7049,04	22,79
60	1013,43	25,18	131	1914,07	25,67	201	3685,86	22,21	271	7106,83	23
61	1016,3	35,53	132	1915,72	34,24	202	3687,78	20,58	272	7142,49	21,32
62	1041,58	36,79	133	1917,03	24,99	203	3693,93	27,15	273	7210,86	22,94
63	1053,52	25,25	134	1955,95	27,81	204	3741,63	20,1	274	8176,16	19,47
64	1055,61	25,7	135	2021,11	21,85	205	3768,77	31,84	275	8186,93	20,72
65	1082,55	23,75	136	2041,99	32,56	206	3782,94	22,68	276	8289,28	19,39
66	1082,65	26,15	137	2053,18	20,54	207	3788,04	25,24	277	9724,01	25,64
67	1083,5	27,14	138	2072,15	27,04	208	3792,76	27,25	278	12529	20,64
68	1083,55	25,61	139	2077,07	25,44	209	3819,82	32,74	279	14557,83	19,21
69	1085,63	36,39	140	2085,12	33,75	210	3881,87	24,56			
70	1094,61	25,99	141	2140,12	20,56	211	3903,08	25,71			

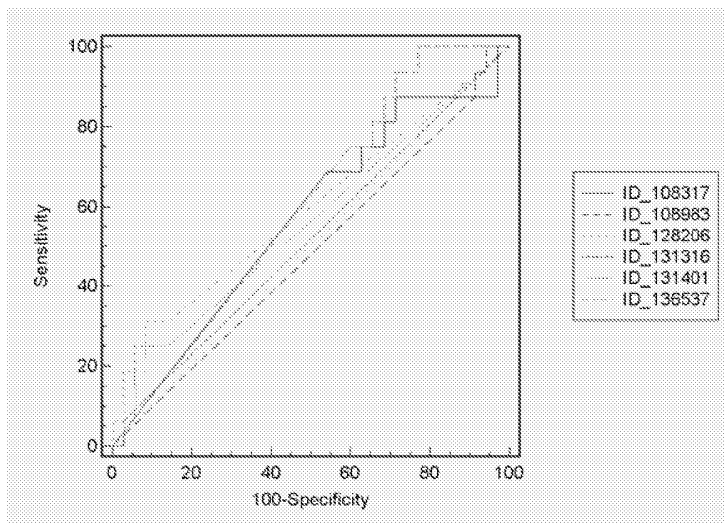


Fig.1 A

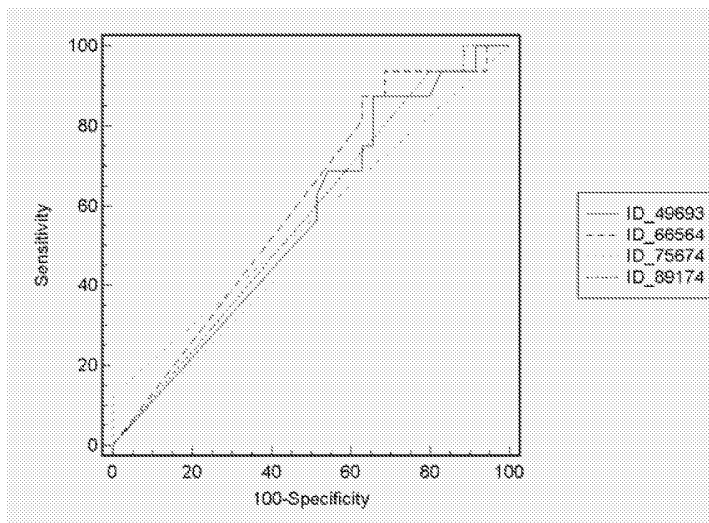


Fig.1 B

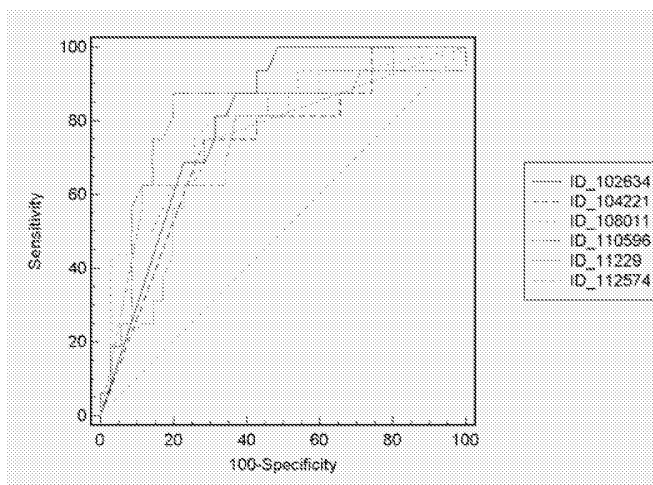


Fig.2A

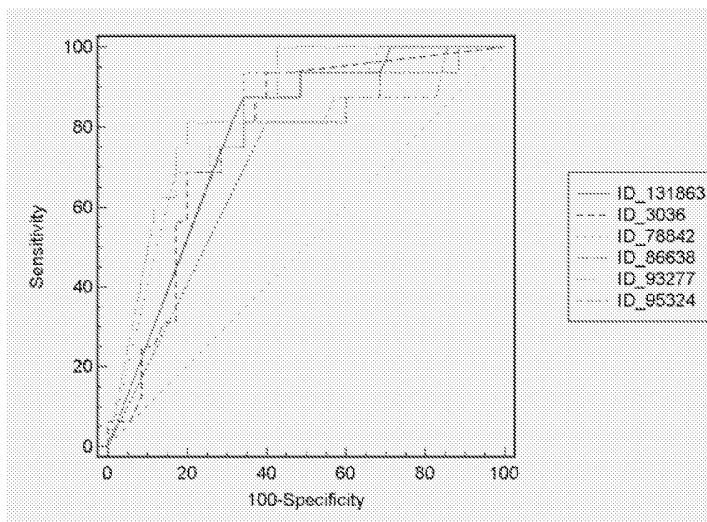


Fig.2B