

(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  
24. September 2009 (24.09.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2009/115570 A2**

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

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2009/053242

(22) Internationales Anmeldedatum:  
19. März 2009 (19.03.2009)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
08153007.3 19. März 2008 (19.03.2008) EP  
08167429.3 23. Oktober 2008 (23.10.2008) EP

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

(72) Erfinder; und

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

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

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,  
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,  
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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND MARKER FOR DIAGNOSIS OF TUBULAR KIDNEY DAMAGE AND ILLNESSES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND MARKER ZUR DIAGNOSE VON TUBULÄREN NIERENSCHÄDEN UND -ER-  
KRANKUNGEN

Figur 1 / Tabelle 1

Marker	Masse (Da)	Q6-T (min)
1	292.4	20.8
2	991.6	21.6
3	1016.5	25.6
4	1032.5	25.9
5	1050.5	28.9
6	1071.5	21.4
7	1086.5	26.1
8	1089.5	26.2
9	1100.5	37.6
10	1110.4	33.6
11	1114.5	25.6
12	1128.4	33.6
13	1128.5	25.7
14	1134.6	23.7
15	1141.5	24.5
16	1154.5	25.7
17	1169.6	23.7
18	1173.5	37.6
19	1182.6	26.3
20	1186.5	22.4
21	1191.5	36.2
22	1194.6	26.7
23	1211.5	25.6
24	1234.6	27.4
25	1247.5	22.0
26	1250.6	27.9
27	1250.6	20.4
28	1257.4	33.9
29	1263.5	22.7
30	1265.6	27.1
31	1287.6	27.4
32	1289.6	22.4
33	1317.6	27.3
34	1324.6	26.7
35	1338.6	24.6
36	1350.6	27.1
37	1351.6	38.8
38	1353.7	25.6
39	1363.4	36.3
40	1367.6	38.9
41	1378.6	28.8
42	1382.6	21.8
43	1405.6	20.1
44	1407.6	21.6
45	1409.6	22.0
46	1422.6	21.7
47	1425.6	22.3

Masse = Mass

Marker	Masse (Da)	Q6-T (min)
48	1435.7	23.6
49	1435.7	22.5
50	1447.7	19.5
51	1449.6	21.9
52	1451.7	29.2
53	1451.7	22.6
54	1466.7	21.9
55	1469.7	23.7
56	1470.7	21.1
57	1485.7	23.5
58	1486.7	21.2
59	1523.7	22.0
60	1526.7	23.9
61	1536.7	29.8
62	1542.7	24.0
63	1554.7	28.6
64	1562.7	22.5
65	1576.7	19.5
66	1579.7	20.1
67	1579.7	29.8
68	1592.7	19.5
69	1595.7	30.0
70	1608.7	22.4
71	1609.8	30.2
72	1623.7	24.1
73	1624.8	37.7
74	1636.7	22.5
75	1639.7	30.3
76	1640.8	23.2
77	1654.8	23.1
78	1679.7	22.6
79	1680.9	23.8
80	1682.8	30.9
81	1697.7	30.9
82	1716.7	20.2
83	1725.6	38.5
84	1732.8	26.2
85	1737.8	23.7
86	1764.7	19.9
87	1784.8	23.9
88	1788.8	30.3
89	1798.8	31.8
90	1817.7	20.2
91	1826.7	19.9
92	1860.8	21.4
93	1876.9	22.2
94	1892.9	22.2

Marker	Masse (Da)	Q6-T (min)
95	1916.9	20.3
96	1933.9	21.6
97	1934.8	19.9
98	1949.8	21.7
99	1966.8	21.0
100	2013.9	25.2
101	2014.9	21.9
102	2020.0	24.6
103	2029.9	20.4
104	2030.9	32.6
105	2046.8	32.6
106	2047.8	21.9
107	2055.8	25.4
108	2058.7	23.2
109	2062.8	28.8
110	2063.9	22.0
111	2067.8	20.6
112	2070.8	25.4
113	2075.8	25.7
114	2080.9	20.2
115	2129.9	27.0
116	2137.9	21.6
117	2154.0	25.6
118	2170.0	25.9
119	2175.0	33.3
120	2186.0	25.9
121	2192.0	22.4
122	2211.0	33.6
123	2216.0	33.6
124	2257.9	35.9
125	2266.0	22.2
126	2282.0	22.2
127	2292.0	27.3
128	2377.1	20.8
129	2407.1	27.7
130	2414.2	19.6
131	2423.1	27.7
132	2430.1	28.3
133	2442.1	34.1

Marker	Masse (Da)	Q6-T (min)
134	2446.1	28.4
135	2471.2	34.8
136	2483.1	27.6
137	2580.1	23.0
138	2587.2	21.1
139	2590.1	22.6
140	2599.2	28.3
141	2612.2	34.9
142	2639.3	21.4
143	2656.2	19.5
144	2663.2	23.5
145	2682.1	22.5
146	2742.3	29.0
147	2767.3	21.7
148	2825.3	24.5
149	2912.2	25.6
150	2923.4	26.4
151	2939.4	20.4
152	3002.2	21.6
153	3013.3	22.3
154	3021.4	23.4
155	3041.4	30.0
156	3092.5	31.3
157	3106.5	31.3
158	3149.5	31.3
159	3193.4	22.6
160	3209.4	22.7
161	3260.6	25.8
162	3359.6	31.9
163	3375.6	31.9
164	3759.0	19.4
165	3868.6	21.1
166	4097.9	24.6
167	4099.0	21.1
168	4321.0	25.2
169	4457.0	23.0
170	4533.2	23.9
171	4960.4	20.6

(57) Abstract: Method for diagnosis of tubular kidney damages and illnesses comprising the step of determining a presence or non-presence or amplitude of at least three polypeptide markers in a urine sample, wherein the polypeptide markers are selected from the markers that are characterized in Table 1 by values for molecular weight and migration time.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Diagnostik von

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2009/115570 A2



**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)

### **Verfahren und Marker zur Diagnose von tubulären Nierenschäden und -erkrankungen**

Die vorliegende Erfindung betrifft die Diagnose von tubulären Schädigungen und Erkrankungen der Niere, wie z.B. das Debré-de-Toni-Fanconi-Syndrom, der Dent-Krankheit, der Zystinose oder erworbener Formen durch die Einwirkung von Medikamenten, wie z.B. Zytostatika.

Die Anzahl an Patienten mit tubulären Nierenerkrankungen ist in den letzten Jahren durch den Einsatz von teilw. bekannten oder weniger bekannten nephrotoxischen Zytostatika in der Chemotherapie stark angestiegen. Daher stellen tubuläre Nierenerkrankungen bspw. ein wachsendes Problem in die Nachsorge von chemotherapierten Krebspatienten dar.

Tubuläre Nierenschäden und -erkrankungen sind in frühen Phasen mit leichter Ausprägung reversibel, wogegen schwere Schädigungen persistieren. Daher ist die Früherkennung tubulärer Schäden der Niere sehr wichtig, so dass die Patienten gegebenenfalls frühzeitig einer entsprechenden Therapie zugeführt werden können.

Die Diagnose tubulärer Nierenschäden basiert im Allgemeinen auf der Bestimmung von Glukosurie und niedrig molekularer Proteinurie, Serumanalysen und klinischer Untersuchung. Erbkrankheiten, wie Zystinose und Dent-Krankheit können genetisch diagnostiziert werden. Obwohl viele verschiedene Proteine im Urin von Patienten mit Tubulusschäden detektierbar sind, werden diese nicht oder nur selten zur Diagnose genutzt.

Verschieden Versuche sind unternommen worden, um Proteine im Urin zur Diagnose tubulärer Nierenschäden- und erkrankungen zu charakterisieren.

Vilasi, A., Cutillas, P.R., Maher, A.D., Zirah, S.F. *et al.*, Combined proteomic and metabonomic studies in three genetic forms of the renal Fanconi syndrome. *Am. J Physiol Renal Physiol* 2007, 293, F456-F467 beschreiben den Einsatz von 2-dimensionalen Gelelektrophorese gefolgt von Mass-fingerprinting zur Identifizierung von Biomarkern zur Diagnose eines tubulären Nierenschadens.

- 2 -

Methodisch liegt der Fokus hier jedoch auf Proteinen/Peptiden mit einem Molekulargewicht >10 kDa. Das angewendete Verfahren ist mit einem hohen Zeitaufwand verbunden, der den Einsatz in der klinischen Routine verhindert. Zusätzlich kann aufgrund einer fehlenden Validierung der Moleküle in einer geblindeten Studie, wie sie als Standardvorgehen in der klinischen Proteomforschung vorgeschlagen wurden (Mischak, H., Apweiler, R., Banks, R.E., Conaway, M. *et al.*, Clinical Proteomics: a need to define the field and to begin to set adequate standards. *PROTEOMICS - Clinical Applications* 2007, 1, 148-156.) die Spezifität der identifizierten Proteine nicht als gesichert angesehen werden. Daher ist weiterhin Bedarf an einer schnellen und einfachen Methode zur Diagnose, tubulären Nierenerkrankungen.

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

Gelöst wird die Aufgabe durch ein Verfahren zur Diagnostik von tubulären Nierenerkrankungen umfassend den Schritt der Bestimmung einer An- oder Abwesenheit oder Amplitude von mindestens eines Polypeptidmarkers in einer Urinprobe, wobei der Polypeptidmarker ausgewählt ist aus den Markern, die in Tabelle 1 durch Werte für die Molekularmassen und die Migrationszeit charakterisiert sind.

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 gesunden 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-

- 3 -

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 Marker ist es möglich, für tubuläre Nierenschäden 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 Marker ist es möglich, für tubuläre Nierenschäden eine Sensitivität von mindestens 60, bevorzugt mindestens 70, mehr bevorzugt 80, noch mehr bevorzugt mindestens 90 und am meisten bevorzugt mindestens 95% zu erreichen.

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 den Tabellen 1 bis 4 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

- 4 -

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 Abbau-  
produkte 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 Polypeptidmarker bestimmen (Molekular-  
masse 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 tubuläre Nierenerkrankungen 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 die An- oder Abwesenheit bestimmter Polypeptidmarker auch Differentialdiagnostik genutzt. 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 Molekü-

- 5 -

larmasse 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 tubuläre Nierenerkrankung ist. So gibt es Polypeptidmarker, die typischerweise bei Individuen mit tubulärer Nierenerkrankung vorhanden sind, jedoch bei Individuen ohne tubuläre Nierenerkrankung seltener oder gar nicht auftreten. Weiterhin gibt es Polypeptidmarker, die bei Patienten mit tubulärer Nierenerkrankung vorhanden sind, jedoch bei Patienten ohne tubuläre Nierenerkrankung 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. In den Tabellen sind die mittleren Amplituden der entsprechenden Signale (charakterisiert über Masse and Migrationszeit) über alle gemessenen Proben angegeben. 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.

- 6 -

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 tubulären Nierenerkrankung auszugehen, entspricht sie eher den mittleren Amplituden der Kontroll-Gruppe, ist nicht von einer tubulären Nierenerkrankung 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 gering ist. 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 tubulären Nierenerkrankungen 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. 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.



- 7 -

Bei der Probe, in der die An- oder Abwesenheit des oder der erfindungsgemäßen 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 Gewebeflüssigkeit, 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.

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.

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, 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 Polypeptidmarker 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

- 8 -

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 Analysengerät gekoppelt. Zum Beispiel werden meistens Elektrospray-Ionisations (ESI) Interfaces verwendet, 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

- 9 -

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 gemesse-

- 10 -

nen 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 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.

- 11 -

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 vorteilhafter Weise mehrere Polypeptidmarker zur Diagnostik verwendet werden.

Bevorzugt ist die Verwendung von mindestens 3, 5, 6, 8, oder 10 Markern.

In einer Ausführungsform werden 20 bis 50 Marker verwendet.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die mindestens 1, 3, 5, 6, 8 oder 10 Marker ausgewählt aus den Markern 2, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 28, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 43, 49, 55, 57, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 68, 69, 70, 73, 77, 80, 82, 86, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 102, 103, 108, 111, 114, 115, 116, 121, 126, 131, 132, 134, 138, 139, 141, 144, 145, 146, 150, 151, 152, 154, 156, 157, 159, 161, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 171.

In einer mehr bevorzugten Ausführungsform werden die mindestens 1, 3, 5, 8 oder 10 Marker ausgewählt aus den Markern 2, 17, 19, 32, 43, 60, 63, 65, 68, 80, 82, 86, 88, 91, 96, 97, 98, 99, 111, 115, 138, 139, 159, 171.

Am meisten bevorzugt ist die Verwendung von mindestens 1, 3, 5, 6, 8 oder 10 Marker ausgewählt aus der Gruppe der Marker 17, 19, 32, 60, 63, 68, 72, 82, 86, 91, 97, 99, 111, 138, 139, 171.

Um die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Erkrankung bei Verwendung mehrerer Marker zu bestimmen, können dem Fachmann bekannte statistische 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 an Nierenerkrankungen 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 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 0,01% NH<sub>4</sub>OH 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.

- 13 -

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 NH<sub>3</sub> 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:

- 14 -

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

Die Proteine/Polypeptide werden jeweils in einer Konzentration von 10 pmol/μl 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 in der folgenden Tabelle angegeben:



<b>H (mono)</b>	1,0079	1,0079	1,0079	1,0079	1,0079	1,0079	1,0079	1,0079
<b>m/z</b>	<b><u>Aprotinin</u></b>	<b>Ribonuclease</b>	<b>Lysozym</b>	<b>REV</b>	<b>KINCON</b>	<b>ELM</b>	<b>GIVLY</b>	
	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	

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  $\pm 5$  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.

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 (z.B. mit MS Excel) seine

Messung in Form von  $m/z$  versus Migrationszeit plottet, 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 tubulären Nierenerkrankungen umfassend den Schritt der Bestimmung einer An- oder Abwesenheit oder Amplitude von mindestens eines Polypeptidmarkers 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 folgender in Tabelle 2 aufgeführter Referenzwerte erfolgt.
3. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei mindestens drei, 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 tubulären Nierenerkrankungen.
9. Verfahren zur Diagnose von tubulären Nierenerkrankungen umfassend die Schritte
  - a) der Auftrennung einer Probe in mindestens drei, 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.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei mindestens 10 Teilproben gemessen werden.
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.
12. Markerkombination, umfassend mindestens 10 Marker ausgewählt aus den Markern der Tabelle 1, die durch Molekularmassen und Migrationszeit (CE-Zeit) charakterisiert sind.
13. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 9 bis 11, wobei die Sensitivität mindestens 60% und der Spezifität mindestens 40% beträgt.

14. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 9 bis 11 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Masse der Marker  $\leq 5$  kDa ist.

- 1/7 -

Figur 1 / Tabelle 1

Marker	Masse (Da)	CE-T (min)
1	902,4	20,9
2	981,6	24,8
3	1016,5	25,8
4	1032,5	25,9
5	1050,5	26,9
6	1071,5	21,4
7	1096,5	26,1
8	1099,5	28,2
9	1100,5	37,0
10	1110,4	33,6
11	1114,5	25,6
12	1128,4	33,6
13	1128,5	25,7
14	1134,6	23,7
15	1141,5	24,5
16	1154,5	25,7
17	1169,6	23,7
18	1173,5	37,5
19	1182,6	28,3
20	1186,5	22,4
21	1191,5	36,2
22	1194,6	26,7
23	1211,5	25,8
24	1234,6	27,4
25	1247,5	22,0
26	1250,6	27,9
27	1250,6	20,4
28	1257,4	33,9
29	1263,5	22,7
30	1265,6	27,1
31	1297,6	27,4
32	1299,6	22,4
33	1317,6	27,3
34	1324,6	28,7
35	1338,6	24,0
36	1350,6	27,1
37	1351,6	38,8
38	1353,7	25,6
39	1363,4	36,3
40	1367,6	38,9
41	1378,6	28,8
42	1392,6	21,8
43	1405,6	20,1
44	1407,6	21,6
45	1409,6	22,0
46	1422,6	21,7
47	1425,6	22,3

Marker	Masse (Da)	CE-T (min)
48	1435,7	28,8
49	1435,7	22,5
50	1447,7	19,5
51	1449,6	21,9
52	1451,7	29,2
53	1451,7	22,6
54	1466,7	21,9
55	1469,7	23,7
56	1470,7	21,1
57	1485,7	23,8
58	1486,7	21,2
59	1523,7	22,0
60	1526,7	23,9
61	1538,7	29,8
62	1542,7	24,0
63	1554,7	28,6
64	1562,7	22,5
65	1576,7	19,5
66	1579,7	20,1
67	1579,7	29,8
68	1592,7	19,5
69	1595,7	30,0
70	1608,7	22,4
71	1609,8	30,2
72	1623,7	24,1
73	1624,6	37,7
74	1636,7	22,5
75	1636,7	30,3
76	1640,6	23,2
77	1654,8	23,1
78	1679,7	22,6
79	1680,0	23,8
80	1692,8	30,9
81	1697,7	30,9
82	1716,7	20,2
83	1725,6	38,3
84	1732,8	28,2
85	1737,8	23,7
86	1764,7	19,9
87	1794,8	23,9
88	1798,8	30,3
89	1798,8	31,8
90	1817,7	20,2
91	1835,7	19,9
92	1860,8	21,4
93	1876,9	22,2
94	1892,9	22,2

- 2/7 -

Marker	Masse (Da)	CE-T (min)
95	1916,8	20,3
96	1933,9	21,6
97	1934,8	19,9
98	1949,9	21,7
99	1996,8	21,0
100	2013,9	25,2
101	2014,9	21,9
102	2020,0	24,6
103	2029,9	20,4
104	2030,9	32,6
105	2046,9	32,6
106	2047,9	21,9
107	2055,9	25,4
108	2058,9	23,2
109	2062,9	26,6
110	2063,9	22,0
111	2067,8	20,6
112	2070,9	25,4
113	2078,9	26,7
114	2080,9	20,2
115	2129,0	27,0
116	2137,9	21,8
117	2154,0	25,8
118	2170,0	25,9
119	2175,0	33,3
120	2186,0	25,9
121	2192,0	22,4
122	2211,0	33,6
123	2216,0	33,8
124	2257,9	35,9
125	2266,0	22,2
126	2282,0	22,2
127	2292,0	27,3
128	2377,1	20,8
129	2407,1	27,7
130	2414,2	19,6
131	2423,1	27,7
132	2430,1	28,3
133	2442,1	34,1

Marker	Masse (Da)	CE-T (min)
134	2446,1	28,4
135	2471,2	34,8
136	2483,1	27,6
137	2580,1	23,0
138	2587,2	21,1
139	2589,1	22,6
140	2599,2	28,3
141	2612,2	34,9
142	2639,3	21,4
143	2658,2	19,5
144	2663,2	23,5
145	2682,1	22,5
146	2742,3	29,0
147	2767,3	21,7
148	2825,3	24,5
149	2912,2	25,6
150	2923,4	20,4
151	2939,4	20,4
152	3002,2	23,8
153	3013,3	22,3
154	3021,4	23,4
155	3041,4	30,0
156	3092,5	31,3
157	3108,5	31,3
158	3149,5	31,3
159	3193,4	22,6
160	3209,4	22,7
161	3280,6	25,8
162	3359,6	31,9
163	3375,6	31,9
164	3759,9	19,4
165	3968,6	21,1
166	4097,9	24,6
167	4099,0	21,1
168	4321,9	25,2
169	4457,0	23,0
170	4833,2	23,9
171	4960,4	20,6



- 3/7 -

Figur 2 / Tabelle 2

Marker	tubulärer Schaden	mittlere log Amp. (log Median)	Kontrolle	mittlere log Amp. (log Median)
1	0,63	1,47 (2,08)	0,92	2,39 (2,53)
2	0,13	0,23 (0,00)	0,88	1,93 (1,93)
3	0,79	2,10 (2,55)	0,97	3,03 (3,10)
4	0,42	0,78 (0,00)	0,86	1,93 (2,16)
5	0,58	1,11 (1,14)	0,97	2,58 (2,64)
6	0,33	0,60 (0,00)	0,80	1,71 (2,06)
7	0,88	2,70 (3,05)	0,92	3,43 (3,79)
8	0,63	1,30 (1,82)	0,88	2,12 (2,39)
9	0,29	0,55 (0,00)	0,86	1,85 (2,15)
10	0,25	0,44 (0,00)	0,81	1,84 (2,14)
11	0,92	2,41 (2,71)	0,92	2,99 (3,29)
12	0,54	1,32 (1,77)	0,89	2,42 (2,65)
13	0,46	0,91 (0,00)	0,89	2,25 (2,50)
14	0,54	1,16 (1,56)	0,89	2,35 (2,60)
15	0,50	0,98 (0,66)	0,78	1,81 (2,22)
16	0,17	0,36 (0,00)	0,70	1,82 (2,47)
17	0,00	0,00 (0,00)	0,66	2,08 (2,05)
18	0,42	0,90 (0,00)	0,89	2,08 (2,39)
19	0,08	0,14 (0,00)	0,73	1,68 (2,16)
20	0,50	1,19 (0,93)	0,91	2,73 (3,00)
21	0,63	1,60 (2,17)	0,92	2,58 (2,80)
22	0,79	2,36 (2,90)	0,98	3,31 (3,38)
23	0,17	0,28 (0,00)	0,75	1,66 (2,17)
24	0,46	1,24 (0,00)	0,81	2,63 (3,03)
25	0,58	1,29 (1,84)	0,91	2,27 (2,49)
26	0,79	3,43 (4,27)	0,88	4,10 (4,65)
27	0,38	0,72 (0,00)	0,75	1,69 (2,13)
28	0,25	0,67 (0,00)	0,86	2,30 (2,54)
29	0,54	1,15 (1,71)	0,86	2,35 (2,68)
30	0,75	2,58 (3,37)	0,98	3,85 (3,92)
31	0,54	1,46 (2,17)	0,92	2,84 (3,12)
32	0,17	0,33 (0,00)	0,84	2,05 (2,39)
33	0,71	1,80 (2,32)	0,05	0,10 (0,00)
34	0,83	2,48 (2,94)	0,28	0,72 (0,00)
35	0,21	0,44 (0,00)	0,70	1,66 (2,12)
36	0,42	1,02 (0,00)	0,88	2,35 (2,61)
37	0,46	1,16 (0,00)	0,94	2,51 (2,74)
38	0,75	1,78 (2,31)	0,91	2,57 (2,88)
39	0,67	1,76 (2,25)	0,98	2,94 (3,12)
40	0,63	1,75 (2,44)	1,00	3,01 (3,07)
41	0,79	2,55 (3,18)	0,95	3,59 (3,74)

- 4/7 -

Marker	tubulärer Schaden	mittlere log Amp (log Median)	Kontrolle	mittlere log Amp (log Median)
42	0,75	2,10 (2,60)	0,94	3,00 (3,14)
43	0,25	0,53 (0,00)	0,84	2,21 (2,58)
44	0,50	1,23 (0,81)	0,94	2,53 (2,69)
45	0,88	2,76 (3,08)	0,95	3,48 (3,69)
46	0,75	2,06 (2,55)	0,94	2,93 (3,15)
47	0,50	1,28 (0,74)	0,86	2,72 (3,17)
48	0,88	2,81 (3,29)	0,92	3,45 (3,74)
49	0,46	1,13 (0,00)	0,92	2,46 (2,63)
50	0,46	1,02 (0,00)	0,86	2,46 (2,88)
51	0,96	2,54 (2,71)	0,94	3,10 (3,36)
52	0,88	3,44 (3,87)	0,86	3,80 (4,41)
53	0,71	1,93 (2,65)	0,98	3,12 (3,24)
54	0,67	1,72 (2,24)	0,88	2,67 (3,07)
55	0,58	1,52 (2,13)	0,92	3,14 (3,47)
56	0,42	0,94 (0,00)	0,88	2,17 (2,44)
57	0,21	0,58 (0,00)	0,89	2,89 (3,25)
58	0,67	1,67 (2,11)	0,92	2,67 (2,92)
59	0,71	1,94 (2,61)	0,92	2,90 (3,15)
60	0,21	0,43 (0,00)	0,91	2,22 (2,45)
61	0,46	0,98 (0,00)	0,88	2,19 (2,46)
62	0,21	0,46 (0,00)	0,75	1,90 (2,50)
63	0,21	0,40 (0,00)	0,73	1,49 (1,79)
64	0,25	0,64 (0,00)	0,73	2,02 (2,62)
65	0,17	0,42 (0,00)	0,80	2,28 (2,85)
66	0,79	2,28 (2,79)	0,95	3,36 (3,49)
67	0,83	2,66 (3,27)	1,00	3,52 (3,54)
68	0,25	0,51 (0,00)	0,75	1,96 (2,54)
69	0,17	0,41 (0,00)	0,89	2,37 (2,68)
70	0,17	0,37 (0,00)	0,70	1,71 (2,34)
71	0,79	2,89 (3,56)	0,70	2,17 (2,95)
72	0,58	1,73 (2,40)	0,94	3,36 (3,62)
73	0,50	1,21 (0,72)	0,94	2,57 (2,78)
74	0,71	2,09 (2,90)	0,94	3,24 (3,39)
75	0,29	0,95 (0,00)	0,73	2,55 (3,43)
76	0,58	1,56 (1,90)	0,86	3,21 (3,70)
77	0,79	2,31 (2,90)	0,41	0,87 (0,00)
78	0,33	0,74 (0,00)	0,75	2,01 (2,60)
79	0,42	1,17 (0,00)	0,91	3,23 (3,47)
80	0,42	1,13 (0,00)	0,97	3,20 (3,38)
81	0,79	2,34 (2,81)	0,95	3,04 (3,20)
82	0,08	0,19 (0,00)	0,75	1,92 (2,45)
83	0,50	1,28 (0,56)	0,91	2,66 (2,93)

- 5/7 -

Marker	tubulärer Schaden	mittlere log Amp (log Median)	Kontrolle	mittlere log Amp (log Median)
84	0,46	1,60 (0,00)	0,92	3,35 (3,67)
85	0,83	2,45 (3,04)	0,94	3,33 (3,58)
86	0,08	0,18 (0,00)	0,72	1,79 (2,33)
87	0,67	1,84 (2,57)	0,94	2,99 (3,21)
88	0,83	2,40 (2,75)	0,39	0,88 (0,00)
89	0,54	1,47 (2,06)	0,89	2,64 (2,95)
90	0,46	1,19 (0,00)	0,92	3,32 (3,65)
91	0,13	0,32 (0,00)	0,88	2,66 (3,02)
92	0,50	1,18 (0,71)	0,89	2,61 (2,96)
93	0,67	1,60 (2,00)	1,00	3,01 (3,03)
94	0,54	1,30 (1,62)	0,95	2,59 (2,76)
95	0,54	1,36 (1,62)	0,92	3,15 (3,45)
96	0,33	0,81 (0,00)	0,95	2,49 (2,65)
97	0,17	0,41 (0,00)	0,86	2,46 (2,83)
98	0,17	0,33 (0,00)	0,73	1,70 (2,16)
99	0,17	0,37 (0,00)	0,88	2,58 (3,01)
100	0,79	2,09 (2,49)	0,95	2,99 (3,23)
101	0,75	2,08 (2,57)	0,92	3,10 (3,35)
102	0,25	0,52 (0,00)	0,86	2,31 (2,72)
103	0,13	0,32 (0,00)	0,70	1,77 (2,30)
104	0,58	1,58 (2,08)	0,94	2,92 (3,09)
105	0,75	2,13 (2,58)	0,95	3,01 (3,15)
106	0,96	3,15 (3,27)	0,91	3,68 (3,99)
107	0,67	1,57 (1,99)	0,88	2,57 (2,92)
108	0,58	1,56 (2,28)	0,98	2,81 (2,88)
109	0,29	0,70 (0,00)	0,81	2,19 (2,63)
110	0,83	2,63 (3,14)	0,97	3,61 (3,76)
111	0,29	0,77 (0,00)	0,91	2,99 (3,27)
112	0,75	2,01 (2,29)	0,94	2,99 (3,15)
113	0,96	2,99 (3,21)	0,98	3,60 (3,71)
114	0,54	1,40 (1,33)	0,97	3,07 (3,23)
115	0,17	0,33 (0,00)	0,83	1,80 (2,08)
116	0,25	0,65 (0,00)	0,81	2,34 (2,83)
117	0,88	2,74 (3,24)	0,95	3,40 (3,59)
118	0,96	3,82 (4,09)	0,92	3,96 (4,36)
119	1,00	3,88 (3,88)	1,00	3,62 (3,63)
120	0,71	1,92 (2,44)	0,95	2,93 (3,09)
121	0,29	0,70 (0,00)	0,86	2,46 (2,81)
122	0,67	2,05 (2,85)	0,92	3,32 (3,62)
123	0,50	1,20 (0,82)	0,92	2,34 (2,54)
124	0,42	1,17 (0,00)	0,80	2,61 (3,17)
125	0,67	1,83 (2,45)	0,91	3,11 (3,40)

- 6/7 -

Marker	tubulärer Schaden	mittlere log Amp (log Median)	Kontrolle	mittlere log Amp (log Median)
126	0,17	0,38 (0,00)	0,78	1,98 (2,39)
127	0,83	2,86 (3,36)	0,97	3,70 (3,82)
128	0,67	2,03 (2,81)	0,98	3,42 (3,59)
129	0,63	1,51 (1,92)	0,95	2,67 (2,79)
130	0,71	2,16 (2,73)	0,34	0,83 (0,00)
131	0,29	0,63 (0,00)	0,84	2,10 (2,53)
132	0,42	1,02 (0,00)	0,88	2,41 (2,73)
133	0,33	0,83 (0,00)	0,80	2,20 (2,70)
134	0,21	0,42 (0,00)	0,73	1,67 (2,19)
135	0,38	0,86 (0,00)	0,77	2,01 (2,48)
136	0,63	1,63 (2,29)	0,97	2,77 (2,85)
137	0,42	0,98 (0,00)	0,84	2,20 (2,54)
138	0,29	0,67 (0,00)	0,92	2,70 (2,96)
139	0,17	0,33 (0,00)	0,70	1,58 (2,12)
140	0,96	2,98 (3,04)	0,88	2,21 (2,48)
141	0,42	0,95 (0,00)	0,77	2,11 (2,61)
142	0,46	1,05 (0,00)	0,84	2,12 (2,47)
143	0,71	2,89 (3,82)	0,34	1,10 (0,00)
144	0,38	0,95 (0,00)	0,86	2,38 (2,80)
145	0,21	0,51 (0,00)	0,75	1,88 (2,32)
146	0,46	1,03 (0,00)	0,89	2,52 (2,79)
147	0,25	0,65 (0,00)	0,78	1,94 (2,33)
148	0,79	2,84 (3,51)	1,00	3,90 (3,94)
149	0,79	2,34 (2,88)	1,00	3,18 (3,19)
150	0,79	3,09 (3,83)	0,08	0,31 (0,00)
151	0,71	2,68 (3,60)	0,09	0,31 (0,00)
152	0,21	0,39 (0,00)	0,72	1,60 (2,04)
153	0,63	2,35 (3,50)	0,91	3,66 (4,12)
154	0,08	0,22 (0,00)	0,78	1,93 (2,32)
155	0,50	1,40 (0,84)	0,94	2,80 (3,00)
156	0,50	1,22 (0,81)	0,94	2,66 (2,87)
157	0,46	2,29 (2,31)	0,89	2,62 (2,69)
158	0,38	0,92 (0,00)	0,78	2,20 (2,85)
159	0,08	3,08 (3,08)	0,69	2,95 (3,06)
160	0,75	2,49 (3,17)	1,00	3,78 (3,83)
161	0,33	0,76 (0,00)	0,78	2,11 (2,64)
162	0,58	1,52 (1,99)	0,86	2,75 (3,19)
163	0,29	0,83 (0,00)	0,98	2,89 (2,90)
164	0,71	2,53 (3,28)	0,19	0,48 (0,00)
165	0,38	0,97 (0,00)	0,92	3,09 (3,37)
166	0,42	1,23 (0,00)	0,94	2,96 (3,18)
167	0,71	2,82 (3,95)	0,17	0,59 (0,00)

- 7/7 -

Marker	tubulärer Schaden	mittlere log Amp (log Median)	Kontrolle	mittlere log Amp (log Median)
168	0,79	3,16 (3,96)	0,25	0,78 (0,00)
169	0,71	2,51 (3,42)	0,13	0,33 (0,00)
170	0,71	2,39 (3,23)	0,30	0,79 (0,00)
171	0,75	3,47 (4,63)	0,14	0,43 (0,00)