



(10) **DE 10 2009 060 102 A1** 2011.06.22

(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2009 060 102.3**

(22) Anmeldetag: **21.12.2009**

(43) Offenlegungstag: **22.06.2011**

(51) Int Cl.: **C07D 207/46 (2006.01)**

(71) Anmelder:
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 06108, Halle, DE; Universität Köln, 50931, Köln, DE

(72) Erfinder:
Schäfer, Mathias, Dr., 50126, Bergheim, DE; Schmalz, Hans-Günther, Prof. Dr., 50321, Brühl, DE; Sinz, Andrea, Prof. Dr., 04315, Leipzig, DE

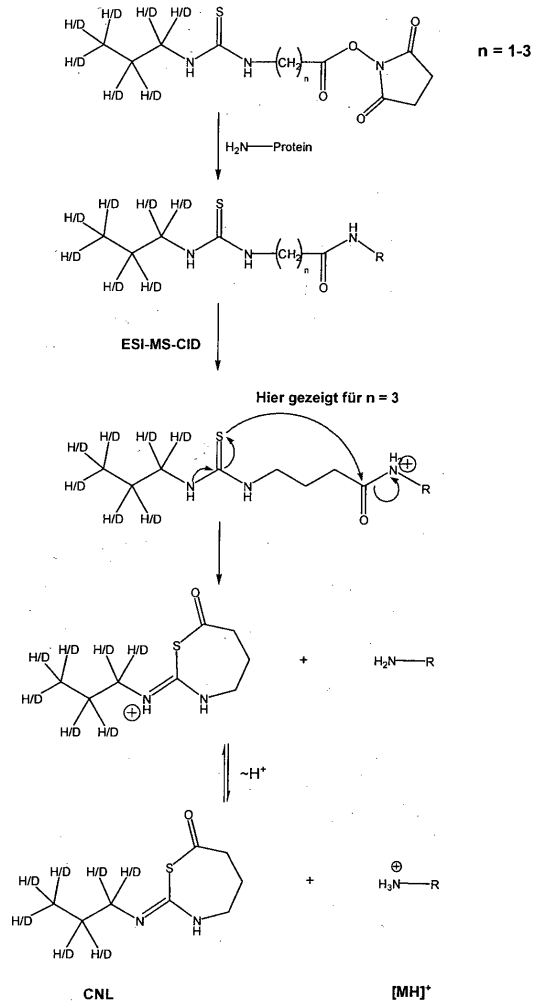
(74) Vertreter:
Michalski Hüttermann & Partner Patentanwälte, 40221, Düsseldorf, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
siehe Folgeseiten

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Rechercheantrag gemäß § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Derivatisierungsreagenzien zur tandem-massenspektrometrischen Quantifizierung von Proteinen**



(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine Harnstoff- oder Thioharnstoff-Verbindung, welche an ihren Stickstofffunktionalitäten eine Alkylgruppe und eine Alkansäure-N-hydroxysuccinimidester-Gruppe aufweisen. Die erfindungsgemäßen Harnstoff- oder Thioharnstoff-Verbindungen eignen sich in besonderer Weise zur Derivatisierung von Proteinen, welche in einem tandemmassenspektrometrischen Verfahren quantifiziert werden sollen.

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

US	2007/00 23 628	A1
US	2006/02 86 673	A1
WO	2007/1 17 665	A2
WO	2007/0 35 080	A1
WO	2005/0 00 878	A2

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Reagenz zur Derivatisierung von Proteinen. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Harnstoff- oder Thioharnstoff-Reagenz zur Derivatisierung von Proteinen, welche mittels massenspektrometrischen Methoden, insbesondere der Tandem-Massenspektrometrie, quantifiziert werden sollen.

[0002] Proteine gehören zu den Grundbausteinen aller Zellen. Neben ihrer strukturbildenden Eigenschaft in der Zelle sind sie auch in vielfältiger Weise an biochemischen Prozessen in der Zelle beteiligt.

[0003] Proteine selbst bestehen aus Aminosäuren, die durch Peptidbindungen zu Ketten verbunden sind. Im menschlichen Körper sowie den Körpern der meisten Säugetiere werden 21 unterschiedliche Aminosäuren zum Aufbau von Proteinen genutzt. Die aus den Aminosäureketten aufgebauten Proteine können in einer Länge von ca. 100 Aminosäuren bis zu einer Länge von über 30.000 Aminosäuren variieren.

[0004] Die quantitative Analyse von Aminosäuren ist für eine Vielzahl biochemischer Prozesse ein sehr geeignetes Mittel, diese Prozesse zu Erklären, zu Beurteilen und etwaige Rückschlüsse auf beeinflussende Faktoren zu finden.

[0005] Eine Möglichkeit der Quantifizierung von Aminosäuren und/oder Proteinen ist deren Analyse mittels Massenspektrometrie. Bei der Quantifizierung mittels Massenspektrometrie wird die Häufigkeit, mit der aus der zu analysierenden Substanz, hier dem Protein, stammende Ionen oder deren Massenfragmente auftreten, bestimmt. Hierzu wird die zu analysierende Substanz – auch als Analyt bezeichnet – mittels einer geeigneten Ionisierungsmethode ionisiert, einem Analysator zugeführt und durch einen Detektor detektiert. Zur Ionisierung können unterschiedliche Verfahren angewendet werden, wobei in der heutigen Praxis zwischen z. B. EI (electron impact), ESI (electron spray ionisation), CI (chemical ionisation), MALDI (matrix assisted laser desorption ionisation), um nur einige zu nennen, unterschieden wird.

[0006] In der Ionenquelle wird der Analyt ionisiert. Bei einem hinreichenden Energieeintrag in den Analyten bei der Ionisierung kommt es zur Fragmentierung des Analyten, wobei für den jeweiligen Energieeintrag typische Fragmente aus dem Analyten abgespalten werden. Das daraus entstehende Fragmentierungsmuster ist charakteristisch für den zu untersuchenden Analyten.

[0007] Im Analysator werden die durch die Ionisation erzeugten Ionen nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) getrennt. Auch hierbei gibt es verschiedene Techniken, wie beispielsweise die TOF (Time-of-flight) -Technik, bei der Flugzeiten von Ionen gemessen werden, die nach einer definierten Beschleunigung eine Flugstrecke konstanter Länge zurückgelegt haben.

[0008] Im Detektor werden die nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis getrennten Ionen schließlich detektiert. Geeignete Detektoren sind z. B. Photomultiplier oder Sekundärelektronenvervielfacher SEV.

[0009] Eine für die Quantifizierung von Proteinen gut geeignete Strategie ist die sogenannte Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). Diese zeichnet sich durch ihre große Empfindlichkeit, Selektivität sowie ihre Automatisierbarkeit aus. Bei der Tandem-Massenspektrometrie werden mehrere Analysatoren hintereinander gekoppelt oder es wird eine sogenannte Ionenfalle verwendet. Zwischen den Analysatoren wird eine Kollisionszelle oder Stoßkammer angeordnet, in welcher die erzeugten Ionen unter Verwendung eines Inertgases wie z. B. Argon, Helium oder Xenon einem stoßinduziertem Zerfall (CID) unterworfen werden. Der Analyt wird in der Ionenquelle ionisiert und ein für die CID-Experimente vorgesehenes Vorläuferion wird anschließend im ersten Massenspektrometer selektiert. So ausgewählte Ionen werden dann in die Kollisionszelle geleitet, wo sie mit dem inerten Gas zusammenstoßen und zerfallen. Die Fragmentationen werden in dem zweiten, nachgeschalteten Massenanalysator aufgetrennt und anschließend detektiert. Hierdurch wird ein vollständiges Spektrum der von dem im ersten Massenfilter ausgewählten Ionen erzeugt (sogenannte Produktionenspektren).

[0010] Mittels der Tandem-Massenspektrometrie können mit verschiedenen kombinierten Scanmethoden Informationen über die Struktur des Analyten erhalten werden. Beim schon erwähnten Produktionen-Experiment (product-ion scan) werden alle Produktionen eines Vorläuferions registriert.

[0011] Bei dem sogenannten Vorläuferionen-Scan (precursor-ion scan) wird in dem ersten Massenanalysator über einen weiten Bereich von Masse/Ladungsverhältnissen gescannt, während der zweite Massenanalysator

auf ein konstantes Massen/Ladungsverhältnis eines charakteristischen Produktions eingestellt ist. Dieser Scan liefert dann die Vorläuferionen, die ein gemeinsames Produktion liefern.

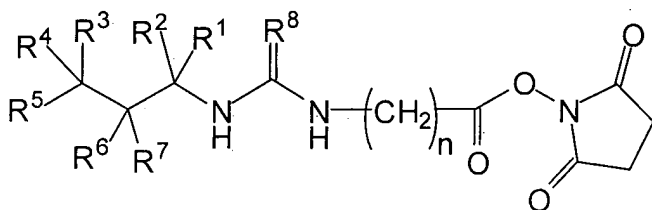
[0012] Bei dem sogenannten Neutralteilchenverlust-Scan (neutral loss scan, CNL) werden beide Massenanalysatoren gleichzeitig mit einem bestimmten Massenversatz gescannt, so dass nur Vorläuferionen, die exakt den eingestellten Verlust eines neutralen Fragmentes liefern, registriert werden.

[0013] Bei der Quantifizierung von Proteinen mittels der zuvor beschriebenen Methoden werden die Proteine mit einem Derivatisierungsreagenz umgesetzt und anschließend enzymatisch gespalten. Die dabei erhaltenen Peptide können dann massenspektrometrisch, z. B. unter Verwendung des CNL-Verfahrens, quantifiziert werden.

[0014] Ein Nachteil bisher verwendeten Derivatisierungsreagenzien ist es, dass die massenspektrometrische Detektion anhand von Produktionen in einem Bereich von m/z 114 bis 117 erfolgt. Dieser Massenbereich ist aber bei den genannten Verfahren aufgrund des relativ niedrigen Masse/Ladungsverhältnisses problematisch, da insbesondere Quadrupolionenfallen einen low-mass-cut-off zeigen, also nur schwerlich Vorläuferionen von $m/z > 1000$ und Produktionen im Bereich von m/z 114–117 abdecken können. Zudem führt die Detektion von Produktionen mit solch niedrigen m/z -Werten zu langen Messzyklen, was einem schnellen Probendurchsatz behindert.

[0015] Unter Berücksichtigung des zuvor ausgeführten ist es die AUFGABE der vorliegenden Erfindung ein verbessertes Derivatisierungsreagenz für die massenspektrometrische Quantifizierung von Proteinen, sowie ein entsprechendes Quantifizierungsverfahren anzugeben.

[0016] GELÖST wird diese Aufgabe durch eine Harnstoff- oder Thioharnstoff-Verbindung, aufweisend die allgemeine Strukturformel



, wobei $R^8 = S$ oder O , $n = 1$ bis 3 und R^1 bis R^7 unabhängig voneinander H, D, oder ein Halogen sind.

[0017] Hinsichtlich des Verfahrens wird diese Aufgabe durch ein Verfahren zur massenspektrometrischen Quantifizierung von Proteinen, insbesondere mittels tandem-massenspektrometrischer Methoden, gelöst, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass das zu quantifizierende Protein vor seiner Aufgabe auf ein geeignetes Massenspektrometer an seinem N-Terminus und/oder einem Lysin-Rest mit einer Harnstoff- oder Thioharnstoff-Verbindungen derivatisiert wird, welche an ihren Stickstofffunktionalitäten eine Alkylgruppe und eine Alkansäure-N-hydroxysuccinimidester-Gruppe aufweist.

[0018] Die erfindungsgemäßen Harnstoff- oder Thioharnstoff-Verbindungen führen bei der tandem-massenspektrometrischen Quantifizierung an mit ihr derivatisierten Proteinen im Fall der erfindungsgemäßen Thioharnstoff-Verbindungen abhängig vom Deuterierungsgrad zu einem CNL von ≥ 186 u. Sofern zusätzlich halogenierte Derivate des Quantifizierungsreagenzes verwendet werden, ergibt sich ein entsprechend anderer Massenversatz. Im Fall der erfindungsgemäßen Harnstoff-Verbindungen ergibt sich in Abhängigkeit des Deuterierungsgrades ein CNL von 59 u bis 66 u, wobei auch hier die Möglichkeit besteht, die Masse des abzuspaltenden Fragments durch einmalige oder mehrfache Halogenierung zusätzlich zu variieren.

[0019] Die Funktionsweise der erfindungsgemäßen Derivatisierungsreagenzien beruht auf den Eigenschaften des zentralen Thioharnstoff- bzw. Harnstofffragments, das bei Kollisionsanregung (CID) durch einen nukleophilen Angriff die benachbarte Amidbindung vorhersehbar, wohldefiniert und reproduzierbar spaltet bzw. selbst gespalten wird. Durch diese definierten Fragmentierungsreaktionen ergeben sich charakteristische Verluste von neutralen Molekülfragmenten, die sensitiv und selektiv mittels CNL in tandem-massenspektrometrischen Experimenten detektiert werden können. Durch Variation des Deuterierungsgrades und/oder Halogenierung in dem abzuspaltenden Teil des Reagenz kann die Regulation eines Proteins in verschiedenen Zellstadien, zu unterschiedlichen Zeiten, unter bestimmten Wachstumsbedingungen etc. selektiv und intern standardisiert

untersucht werden. Die Protein-Quantifizierung mittels MS/MS mit gezielter Derivatisierung der Lysinreste der Proteine, bzw. deren N-Terminus ist von herausragender Bedeutung für die Proteomanalyse.

[0020] Die erfindungsgemäßen Harnstoff- oder Thioharnstoff-Verbindungen zeichnen sich die durch eine außerordentliche strukturelle Simplität aus, wodurch sie einfach und kostengünstig synthetisiert werden können. Die Variation der Masse durch Veränderung der Länge der zentralen Alkylkette und die Einführung von zusätzlichen Funktionalitäten durch Halogenierung sind weitere Möglichkeiten, die erfindungsgemäßen Harnstoff- oder Thioharnstoff-Verbindungen an spezifische massenspektrometrische Rahmenbedingungen anzupassen (Variation der detektierten CNL Fragmente). Ebenso ist die Deuterierung der Verbindung unproblematisch, genauso wie Synthese von ^{13}C gelabelten Derivaten. Hierdurch können die erfindungsgemäßen Harnstoff- oder Thioharnstoff-Verbindungen über noch weitere Bereiche variiert werden.

[0021] Die erfindungsgemäßen Thioharnstoff-Reagenzien zeichnen sich durch eine substantiell erleichterte Fragmentierbarkeit aus, da der Schwefel des Thioharnstoffs deutlich nukleophiler als der Carbonylsauerstoff eines analogen Harnstoffreagenzes ist. Insofern ist das Thioharnstoff-Reagenz für die Fragmentierungen bei niedriger Anregungsenergie (0–100 eV) z. B. in Triple-Quadrupol- und linearen Ionenfallen oder Orbitrap-Instrumenten etc. hervorragend geeignet, wohingegen das Harnstoffanalogon vornehmlich für die Kollisionsaktivierung bei erhöhter Energie (keV) in TOF/TOF Systemen bestimmt ist.

[0022] [Fig. 1](#) zeigt den Reaktions- und Fragmentierungsmechanismus einer erfindungsgemäßen Thioharnstoff-Verbindung;

[0023] [Fig. 2](#) zeigt den Reaktions- und Fragmentierungsmechanismus einer erfindungsgemäßen Harnstoff-Verbindung;

[0024] [Fig. 3](#) zeigt ein Syntheschema zur Synthese einer erfindungsgemäßen Thioharnstoff-Verbindung;

[0025] [Fig. 4](#) zeigt ein Syntheschema zur Synthese einer erfindungsgemäßen Harnstoff Verbindung.

[0026] In [Fig. 1](#) wird die Struktur einer erfindungsgemäßen Thioharnstoff-Verbindung mit einer Alkylkettenlänge von $n = 3$ gezeigt. Im Zuge der Derivatisierung des zu quantifizierenden Proteins wird ein N-Hydroxysuccinimid-Rest einer erfindungsgemäßen Thioharnstoff-Verbindung gegen das zu quantifizierende Protein substituiert, welches mit einer Amin-Funktionalität (N-Terminus, Seitenkette von Lysin, Ornithin etc.) an die erfindungsgemäße Verbindung koppelt. Das so erhaltene Proteinderivat wird dann in einem massenspektrometrischen Experiment mittels ESI ionisiert (protoniert) und in einem Tandem-Massenspektrometer mittels CID weiter fragmentiert. Dabei kommt es zu einer Ringschlussreaktion zwischen dem Carbonyl-Kohlenstoff und dem Schwefelatom des aus der erfindungsgemäßen Thioharnstoff-Verbindung hervorgegangenen Molekülrests unter Abspaltung des zu quantifizierenden Proteinrests und zu einer anschließenden Protonenübertragung auf diesen. Das so erhaltene $[\text{MH}]^+$ -Fragment des zu quantifizierenden Peptids kann massenspektrometrisch detektiert werden. Der abgespaltene Heterozyklus führt in Abhängigkeit des Deuterierungsgrades zu einem CNL gemäß der nachfolgenden Tabelle.

Tab. 1

Deuterierungsgrad	CNL [u]
D ₀	186
D ₁	187
D ₂	188
D ₃	189
D ₄	190
D ₅	191
D ₆	192
D ₇	193

[0027] In [Fig. 2](#) wird die Struktur einer erfindungsgemäßen Harnstoff-Verbindung mit einer Alkylkettenlänge von $n = 3$ gezeigt. Im Zuge der Derivatisierung des zu quantifizierenden Proteins wird ein N-Hydroxysuccinimid-

Rest einer erfindungsgemäßen Harnstoff-Verbindung gegen das zu quantifizierende Protein substituiert, welches mit einer Amin-Funktionalität (N-Terminus, Seitenkette von Lysin, Ornithin etc.) an die erfindungsgemäße Verbindung koppelt. Das so erhaltene Proteinderivat wird dann in einem massenspektrometrischen Experiment mittels ESI ionisiert und in einem Tandem-Massenspektrometer mittels CID fragmentiert. Dabei kommt es zu einer Ringschlussreaktion zwischen dem Carboxylsauerstoff der ursprünglichen Carboxylgruppe und dem Carbonylkohlenstoff der Harnstofffunktionalität des aus der erfindungsgemäßen Harnstoff-Verbindung hervorgegangenen Molekülrestes unter Abspaltung eines Propylamin-Restes, wobei das zu quantifizierende Protein als funktionaler Rest an den gebildeten Heterozyklus gebunden ist. Nach einer anschließenden Protonenübertragung wird ein $[MH+111]^+$ -Fragment des zu quantifizierenden Proteins erhalten, welches massenspektrometrisch detektiert werden kann. Das abgespaltene Propylamin führt in Abhängigkeit des Deuterierungsgrades zu einem CNL gemäß der nachfolgenden Tabelle.

Tab. 2

Deuterierungsgrad	CNL [u]
D ₀	59
D ₁	60
D ₂	61
D ₃	62
D ₄	63
D ₅	64
D ₆	65
D ₇	66

[0028] Fig. 3 zeigt ein Syntheschema zur Synthese einer erfindungsgemäßen Thioharnstoff-Verbindung, ausgehend von kommerziell erhältlichen Aminosäuren. In einer ersten Synthesestufe wird eine entsprechende Aminosäure, z. B. Glycin, mit Thionylchlorid in Anwesenheit von Methanol verestert. Die erhaltene Verbindung wird anschließend in das entsprechende Thioisocyanat überführt. Das erhaltene Thioisocyanat wird mit einem deuterierten oder halogenierten Propylamin zum entsprechenden Methylester umgesetzt. Nach der Hydrolyse des Methylesters zur Säure erfolgt die Aktivierung zu einem erfindungsgemäßen NHS-Aktivester, z. B. mittels DCC-Kupplung (N,N'-Dicyclohexylmethandiimin-Kupplung) oder TFA-NHS (Trifluoressigsäure-N-Hydroxysuccinimid).

[0029] Fig. 4 zeigt ein Syntheschema zur Synthese einer erfindungsgemäßen Harnstoff-Verbindung, ausgehend von kommerziell erhältlichen Carbonsäureestern. In einer ersten Synthesestufe erfolgt abhängig von der Ausgangssubstanz entweder erst die Umsetzung zum Säurechlorid unter Verwendung von z. B. Phosgen, oder die Umsetzung der Ausgangsverbindung mit Hydrazin zum entsprechenden Hydrazid. Anschließend erfolgt eine Umsetzung mit Natriumazid bzw. Natriumnitrid zum Säureazid, welches dann in das Thioisocyanat überführt werden kann. Das Thioisocyanat kann dann mit einem deuterierten und/oder halogenierten Propylamin in den entsprechenden Methylester überführt werden, welcher dann z. B. mittels Lithiumhydroxid zur Säure hydrolysiert wird. Diese wiederum wird z. B. mittels DCC-Kupplung oder Umsetzung mit TFA-NHS zum NHS-Aktivester aktiviert.

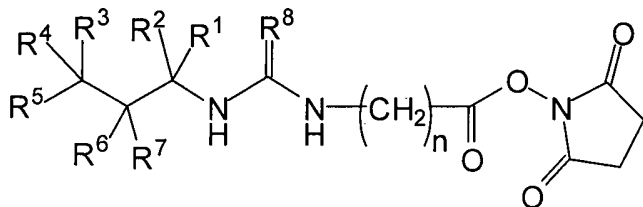
Beispielhafte Derivatisierung eines Proteins unter Verwendung der erfindungsgemäßen Reagenzien und Quantifizierung eines Proteins

[0030] Für die Reaktion des Proteins mit dem Quantifizierungsreagenz wird eine wässrige Lösung des Proteins (ca. 10 mg/ml) mit HEPES Puffer (pH 7.4) so verdünnt, dass 1 ml einer 10 μ molaren Protein-Lösung erhalten wird. Eine DMSO-Lösung des Quantifizierungsreagenz mit bekannter Konzentration wird in ca. 100 fachen molaren Überschuss zugegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur nach ca. 60 Minuten durch Zugabe von Ammoniumbicarbonat-Lösung abgebrochen. Eine definierte Menge dieser Lösung wird verdaut (z. B. mit Trypsin) und die erhaltene Peptid-Mischung wird bis zur massenspektrometrischen Analyse bei -20°C gelagert. Eine Quantifizierung kann dann mittels Tandem-MS auf Basis des definierten Zerfalls derivatisierter Peptide bzw. Proteine gemäß dem verwendeten Derivatisierungsreagenzes mit CID erfolgen. Die Detektion und quantitative Analyse kann im Multiple-Reaction-Monitoring (MRM-Verfahren) anhand der charak-

teristischen Neutralteilchenverluste CNL in Relation zum analogen CNL eines internen Standards i. e. ein Derivatisierungsreagenz mit einem anderen Deuterierungsgrad und insofern auch anderem CNL erfolgen.

Patentansprüche

1. Harnstoff- oder Thioharnstoff-Verbindung, aufweisend die allgemeine Strukturformel



, wobei $R^8 = S$ oder O , $n = 1$ bis 3 und R^1 bis R^7 unabhängig voneinander H, D, oder ein Halogen sind.

2. Thioharnstoff-Verbindung gemäß Anspruch 1, wobei R^1 bis R^7 unabhängig voneinander H, D, oder F, Cl, Br, I sind.

3. Verfahren zur massenspektrometrischen Quantifizierung von Proteinen, insbesondere mittels tandem-massenspektrometrischer Methoden, dadurch gekennzeichnet, dass das zu quantifizierende Protein vor seiner Aufgabe auf ein geeignetes Massenspektrometer an seinem N-Terminus und/oder der Seitenkettenaminfunktion eines Lysin-Rests mit einer Harnstoff- oder Thioharnstoff-Verbindung derivatisiert wird, welche an seinen Stickstofffunktionalitäten eine Alkylgruppe und eine Alkansäure-N-hydroxysuccinimidester-Gruppe aufweist.

4. Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei das Protein an seinem N-Terminus und/oder einem Lysin-Rest mit einer Harnstoff- oder Thioharnstoff-Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 derivatisiert wird.

5. Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei zur massenspektrometrischen Quantifizierung von Proteinen, welche aus verschiedenen Zellstadien, zu unterschiedlichen Zeiten und/oder unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen gewonnen wurden, diese mit einer Thioharnstoff-Verbindung gemäß einem der beiden Ansprüche 1 oder 2 derivatisiert werden, wobei R^1 bis R^7 unabhängig voneinander H oder D sind und der Deuterierungsgrad der Thioharnstoff-Verbindung in Abhängigkeit der verschiedenen Zellstadien, unterschiedlichen Zeiten und/oder unterschiedlichen Wachstumsbedingungen variiert wird.

6. Verwendung einer Thioharnstoff-Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 zur tandem-massenspektrometrischen Quantifizierung von Proteinen.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

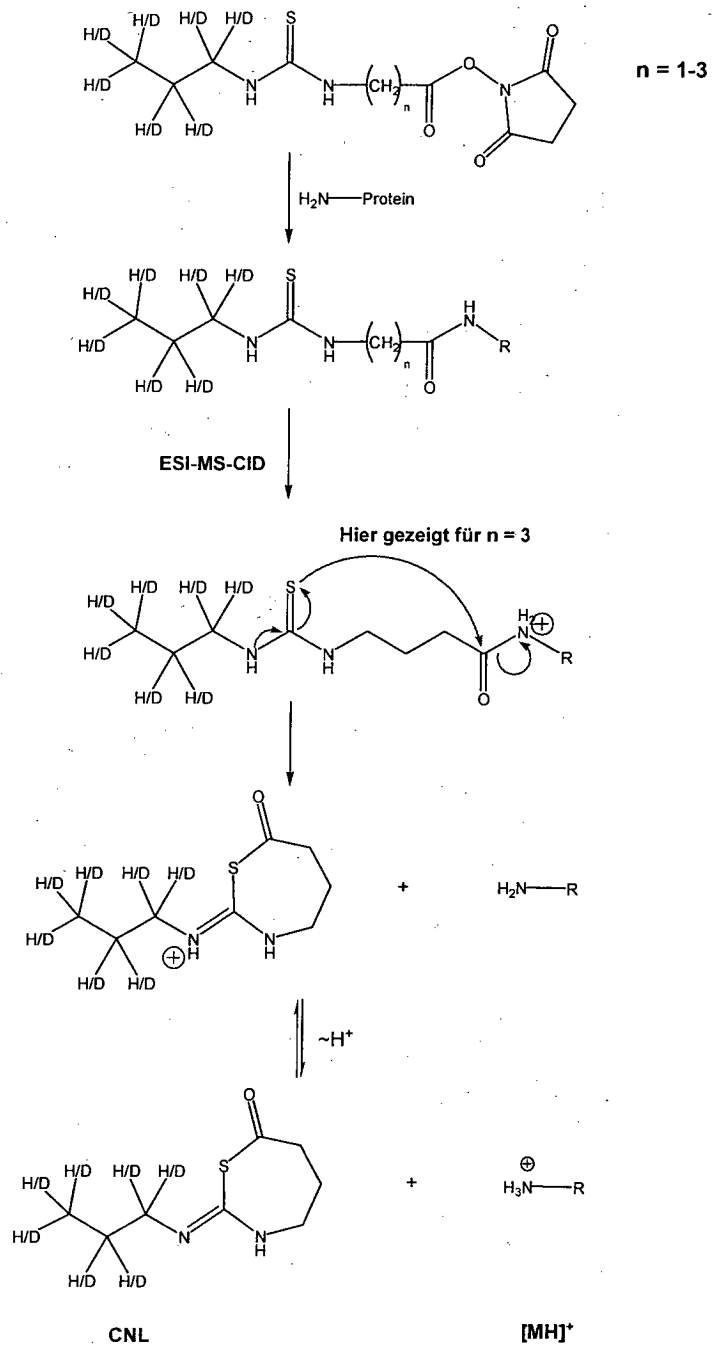


Fig. 1

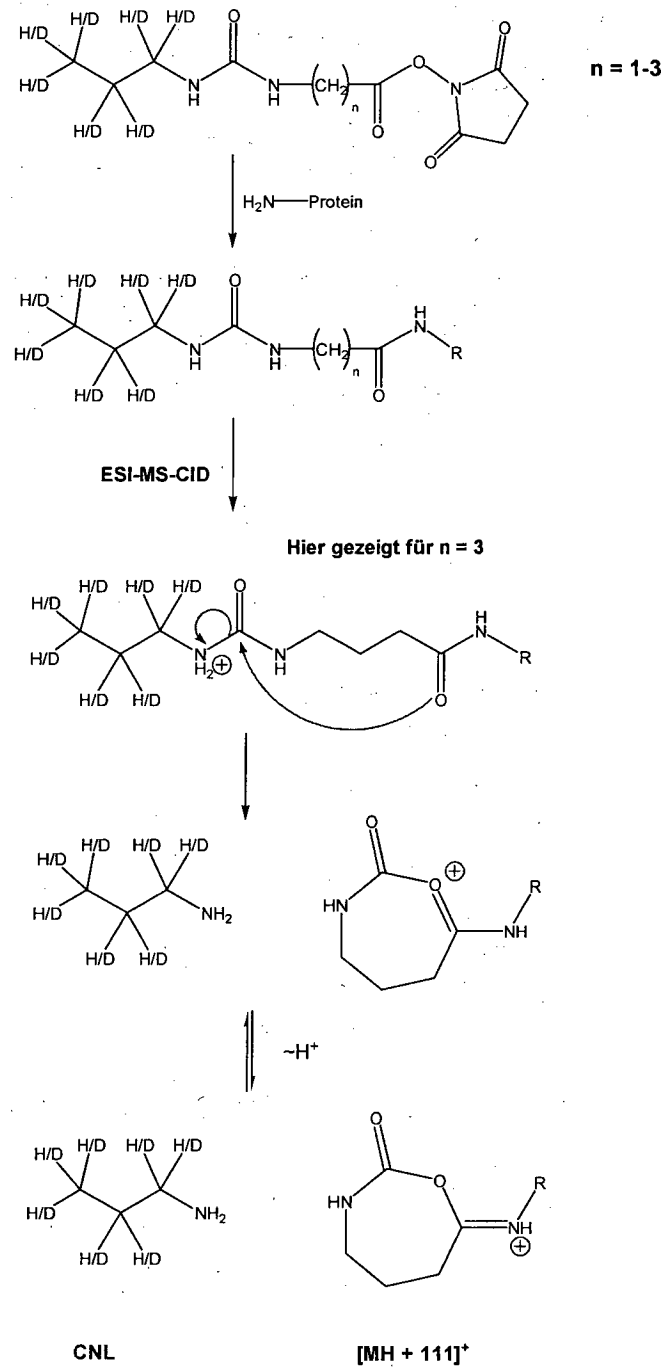


Fig. 2

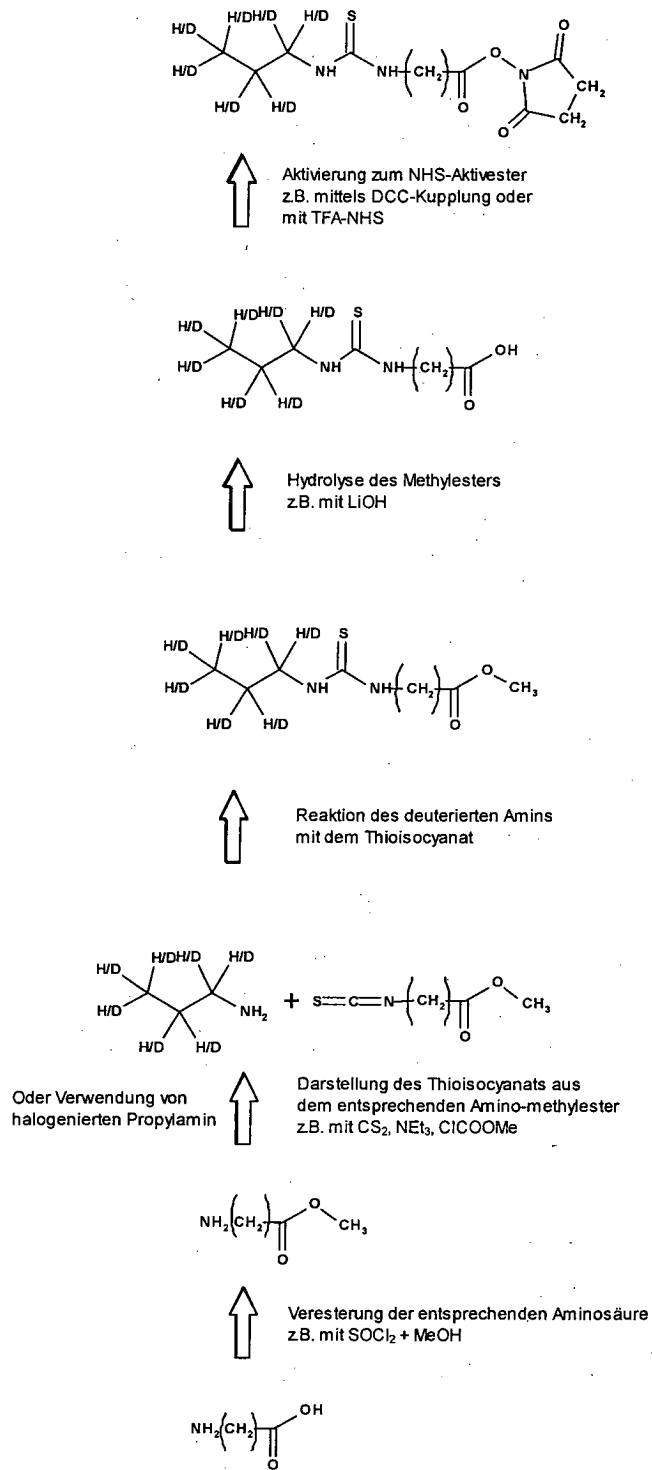


Fig. 3

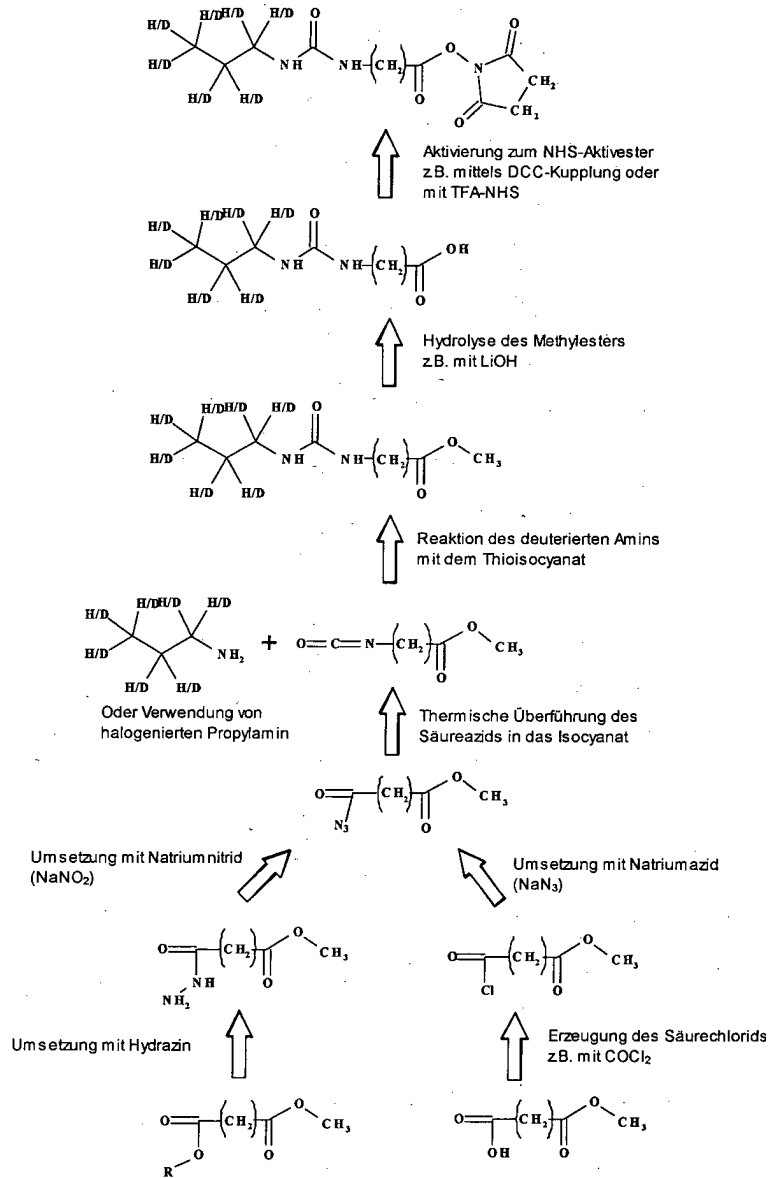


Fig. 4