



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 602 23 696 T2 2009.01.29

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 425 586 B1

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **G01N 33/58** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 23 696.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB02/04240**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 767 650.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/025576**

(86) PCT-Anmeldetag: **16.09.2002**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **27.03.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.06.2004**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **21.11.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.01.2009**

(30) Unionspriorität:

**01307830 14.09.2001 EP**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR**

(73) Patentinhaber:

**Electrophoretics Ltd., Cobham, Surrey, GB**

(72) Erfinder:

**THOMPSON, Andrew Hugin, Cambridge CB4 3QF,  
GB; HAMON, Christian, 65934 Frankfurt am Main,  
DE; SCHAFER, Jurgen, 36341 Lauterbach, DE;  
KUHN, Karsten, 44139 Dortmund, DE; SCHWARZ,  
Josef, 60529 Frankfurt, DE; NEUMANN, Thomas,  
65929 Frankfurt am Main, DE**

(74) Vertreter:

**TER MEER STEINMEISTER & Partner GbR  
Patentanwälte, 81679 München**

(54) Bezeichnung: **MASSENMARKER**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

**[0001]** Diese Erfindung betrifft nützliche Verbindungen zur Markierung von Molekülen von Interesse, insbesondere von Biomolekülen wie Peptiden und Proteinen. Genauer betrifft diese Erfindung die Markierung von Analyten zum Nachweis mittels Massenspektrometrie sowie begleitende Verfahren zur Analyse von massenmarkierten Analyten mittels Massenspektrometrie.

**[0002]** Verschiedene Verfahren zur Markierung von Molekülen von Interesse, einschließlich radioaktiver Atome, Fluoreszenzfarbstoffe, lumineszierender Reagenzien, Reagenzien zum Auffangen von Elektronen und lichtabsorbierender Farbstoffe, sind auf dem Fachgebiet bekannt. Jedes dieser Markierungssysteme hat Eigenschaften, welche es für bestimmte Anwendungen geeignet und für andere Anwendungen nicht geeignet macht. Aus Gründen der Sicherheit führte das Interesse an nichtradioaktiven Markierungssystemen zu der verbreiteten kommerziellen Entwicklung von Fluoreszenz-Markierungssystemen, insbesondere für die Genanalyse. Fluoreszenz-Markierungssysteme erlauben die gleichzeitige Markierung einer relativ kleinen Zahl von Molekülen, wobei typischerweise vier Marker und möglicherweise bis zu acht Marker gleichzeitig verwendet werden können. Jedoch begrenzen die Kosten für die Nachweisapparatur und die Schwierigkeiten bei der Analyse der erhaltenen Signale die Anzahl der Marker, die gleichzeitig in einem Fluoreszenz-Nachweisschema verwendet werden können.

**[0003]** In letzter Zeit hat es auf dem Gebiet der Massenspektrometrie als ein Verfahren zum Nachweis von Marker, welche über eine spaltbare Bindung an ihr assoziiertes Molekül von Interesse gebunden sind, Fortschritte gegeben. Bei zahlreichen molekularbiologischen Anwendungen ist es erforderlich, dass die Möglichkeit besteht, Trennungen der Moleküle von Interesse vor der Analyse durchzuführen. Diese Trennverfahren umfassen im Allgemeinen Flüssigphasentrennungen. In den letzten Jahren sind für die Massenspektrometrie eine Reihe von Schnittstellen-Anpassungen für Flüssigphasentrennungen entwickelt worden, welche die Massenspektrometrie als ein Nachweissystem für diese Arten von Anwendungen besonders wirkungsvoll machen. Bis vor kurzem wurde die Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie angewendet, um Analytionen oder deren Fragmentionen direkt nachzuweisen, wobei jedoch bei vielen Anwendungen wie der Nucleinsäureanalyse die Struktur des Analyten durch eine indirekte Markierung bestimmt werden kann. Dies ist im Hinblick auf die Anwendung der Massenspektrometrie besonders vorteilhaft, da komplexe Biomoleküle wie DNAs komplexe Massenspektren zeigen und mit einer relativ geringen Empfindlichkeit nachgewiesen werden. Indirekter Nachweis bedeutet, dass ein assoziiertes Markermolekül verwendet werden kann, um den ursprünglichen Analyten zu identifizieren, wenn der Marker im Hinblick auf einen empfindlichen Nachweis und ein einfaches Massenspektrum konzipiert wird. Einfaches Massenspektrum bedeutet, dass mehrere Marker verwendet werden können, um mehrere Analyte gleichzeitig zu analysieren.

**[0004]** PCT/GB98/00127 beschreibt Arrays von Nucleinsäuresonden, kovalent gebunden an spaltbare Marker, welche mittels Massenspektrometrie nachweisbar sind, wodurch die Sequenz der kovalent gebundenen Nucleinsäuresonde identifiziert wird. Die markierten Sonden dieser Anmeldung haben die Struktur Nu-L-M, worin Nu eine Nucleinsäure ist, welche kovalent an L, eine spaltbare Verbindungsgruppe, gebunden ist, welche wiederum kovalent an M, einen Massenmarker, gebunden ist. Bevorzugte spaltbare Verbindungsgruppen in dieser Anmeldung werden innerhalb der Ionenquelle des Massenspektrometers abgespalten. Bevorzugte Massenmarker sind substituierte Polyarylether. Diese Anmeldung offenbart eine Vielzahl von Ionisationsmethoden und die Analyse mittels Quadrupol-Massenanalysatoren, TOF-Analysatoren und Magnetfeld-Sektorinstrumenten als spezifische Verfahren zur Analyse von Massenmarkern mittels Massenspektrometrie.

**[0005]** PCT/GB94/01675 offenbart Liganden und insbesondere Nucleinsäuren, welche über eine spaltbare Bindung an Massenmarkermoleküle gebunden sind. Bevorzugte spaltbare Verbindungsgruppen sind durch Licht spaltbar. Diese Anmeldung benennt die Matrixunterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI)-Flugzeit (TOF)-Massenspektrometrie als ein spezifisches Verfahren zur Analyse von Massenmarkern mittels Massenspektrometrie.

**[0006]** PCT/US97/22639 offenbart freisetzbare, schwerflüchtige Massenmarkermoleküle. In bevorzugten Ausführungsformen umfassen diese Marker Polymere, typischerweise Biopolymere, welche über eine spaltbare Bindung an eine reaktive Gruppe oder einen Liganden, d. h. eine Sonde, gebunden sind. Bevorzugte spaltbare Verbindungsgruppen sind höchstwahrscheinlich chemisch oder enzymatisch spaltbar. Diese Anmeldung benennt die MALDI-TOF-Massenspektrometrie als ein spezifisches Verfahren zur Analyse von Massenmarkern mittels Massenspektrometrie.

**[0007]** PCT/US97/01070, PCT/US97/01046 und PCT/US97/01304 offenbaren Liganden und insbesondere

Nucleinsäuren, welche über eine spaltbare Bindung an Massenmarkermoleküle gebunden sind. Bevorzugte spaltbare Verbindungsgruppen sind höchstwahrscheinlich chemisch oder durch Licht spaltbar. Diese Anmeldungen offenbaren eine Vielzahl von Ionisierungsverfahren und die Analyse durch Quadrupol-Massenanalytoren, TOF-Analysatoren und Magnetfeld-Sektorinstrumenten als spezifische Verfahren zur Analyse von Massenmarkern mittels Massenspektrometrie.

**[0008]** Keine dieser Anmeldungen gemäß dem Stand der Technik erwähnt die Verwendung einer Tandem- oder sequentiellen Massenanalyse zur Anwendung bei der Analyse von Massenmarkern.

**[0009]** Gygi et al. (Nature Biotechnology 17 (1999), 994–999, "Quantitative analysis of complex Protein mixtures using isotope-coded affinity tags") offenbaren die Verwendung von 'Isotop-codierten Affinitätsmarkern' zum Auffangen von Peptiden aus Proteinen, um eine Proteinexpressionsanalyse zu ermöglichen. In diesem Artikel beschreiben die Autoren die Verwendung eines Biotin-Linkers, die mit Thiolen reagiert, zum Auffangen von Peptiden, welche Cysteinreste enthalten. Eine Proteinprobe aus einer Quelle wird mit dem Biotin-Linker umgesetzt und mit einer Endopeptidase verdaut. Die biotinylierten, Cysteinreste enthaltenden Peptide können dann mit Avidin-beschichteten Kugelchen für die anschließende Analyse mittels Massenspektrometrie isoliert werden. Zwei Proben können quantitativ miteinander verglichen werden, indem eine Probe mit dem Biotin-Linker markiert wird und die zweite Probe mit einer deuterierten Form des Biotin-Linkers markiert wird. Jedes Peptid in den Proben wird dann als ein Peakpaar in dem Massenspektrum wiedergegeben. Die Integrierung der Peaks in dem Massenspektrum, welche jedem Marker entsprechen, ergibt die relativen Expressionsmengen des Peptids, welches an die Marker gebunden ist.

**[0010]** Diese Methode der 'Isotop-Codierung' beinhaltet eine Reihe von Einschränkungen. Eine Erste ist die Abhängigkeit vom Vorhandensein von Thiolen in einem Protein – viele Proteine enthalten keine Thiole, während andere mehrere enthalten. Bei einer Variante dieser Methode können Verbindungsgruppen derart ausgelegt werden, dass sie mit anderen Seitenketten wie Aminen reagieren. Da jedoch viele Proteine mehr als einen Lysinrest enthalten, würden bei diesem Ansatz im Allgemeinen mehrere Peptide pro Protein isoliert werden. Es ist wahrscheinlich, dass auf diese Weise die Komplexität der Probe für eine Analyse mittels Massenspektrometrie nicht ausreichend reduziert wird. In einer Probe, welche zu viele Spezies enthält, tritt wahrscheinlich eine 'Ionensuppression' auf, wobei bestimmte Spezies gegenüber anderen Spezies bevorzugt ionisieren, welche normalerweise bei dem Massenspektrum einer weniger komplexen Probe beobachtet wird. Im Allgemeinen ist es wahrscheinlich, dass beim Auffangen von Proteinen durch ihre Seitenketten entweder zu viele Peptide pro Protein erhalten werden oder bestimmte Proteine gänzlich fehlen.

**[0011]** Die zweite Einschränkung dieses Ansatzes ist die Methode, welche angewendet wird, um die Expressionsmengen von Proteinen in verschiedenen Proben zu vergleichen. Die Markierung jeder Probe mit einer anderen Isotopvariante des Affinitätsmarkers resultiert in einem zusätzlichen Peak in dem Massenspektrum für jedes Peptid in jeder Probe. Dies bedeutet, dass wenn zwei Proben zusammen analysiert werden, doppelt so viele Peaks in dem Spektrum auftreten. In gleicher Weise, falls drei Proben zusammen analysiert werden, ist das Spektrum dreimal so komplex wie für eine Probe allein. Es ist offensichtlich, dass dieser Ansatz begrenzt ist, da durch die immer größer werdende Zahl von Peaks die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, dass durch zwei verschiedene Peptide Peaks erhalten werden, welche sich in dem Massenspektrum überlappen.

**[0012]** Eine weitere Einschränkung, welche durch die Autoren der vorstehenden Veröffentlichung beschrieben wird, ist die Veränderung der Beweglichkeit, welche durch die Marker hervorgerufen wird. Die Autoren berichten, dass Peptide, welche mit dem deuterierten Biotinmarker markiert sind, unmittelbar nach demselben Peptid, das mit dem nicht deuterierten Marker markiert ist, eluieren.

**[0013]** Die für ein Analytmaterial erhaltenen Massenspektren sind gegen Verunreinigungen sehr empfindlich. Im Wesentlichen ist jedes Material, welches in das Massenspektrometer eingetragen wird und welches ionisierbar ist, in dem Massenspektrum vertreten. Dies bedeutet, dass es für viele Analysen unerlässlich ist, den Analyt sorgfältig zu reinigen, bevor er in das Massenspektrometer eingebracht wird. Für Systeme mit einem hohen Durchsatz zur indirekten Analyse von Analyten durch Massenmarker wäre es wünschenswert, irgendwelche unnötigen Probenpräparationsschritte zu vermeiden. Das heißt, dass es wünschenswert würde, wenn die Marker vor einem Hintergrund von verunreinigendem Material nachgewiesen werden könnten und es sicher ist, dass der Peak, welcher nachgewiesen wird, tatsächlich einem Marker entspricht. Der Stand der Technik offenbart keine Verfahren oder Zusammensetzungen, die das Signal-zu-Rausch-Verhältnis, welches durch eine Massenspektrometrie basierend auf Detektionssystemen erreichbar ist, verbessern können oder die eine Bestätigung vorsehen können, dass ein Massenpeak in einem Spektrum durch die Anwesenheit eines Massenmarkers hervorgerufen wurde.

**[0014]** Zum Zwecke des Nachweises von Analyten im Anschluss an eine flüssigchromatographische oder elektrophoretische Trennung ist es wünschenswert, dass die verwendeten Marker das Trennverfahren nur minimal beeinträchtigen. Falls eine Reihe solcher Marker verwendet wird, ist es wünschenswert, dass der Effekt jedes Mitglieds der Reihe auf seinen assoziierten Analyten dem Effekt jedes anderen Markers entspricht. Dies steht in gewissem Maße im Widerspruch zum Zweck einer Massenmarkierung, welche dazu dient, Reihen von Marker zu erzeugen, die in dem Massenspektrometer basierend auf ihrer Masse aufgetrennt werden können. Gemäß dem vorstehenden Stand der Technik wird offenbart, dass Massenmarker vorzugsweise einen Unterschied von 4 Dalton aufweisen sollten, um eine Interferenz der Isotopen-Peaks eines Markers mit denjenigen eines anderen Markers zu verhindern. Dies bedeutet, dass um 250 verschiedene Massenmarker zu erzeugen, Marker erforderlich wären, welche einen Bereich von etwa 1000 Dalton und vermutlich mehr abdecken, da es nicht unerheblich ist, große Reihen von Marker zu erzeugen, welche einen Unterschied von genau 4 Dalton aufweisen. Durch diesen Massenbereich werden nahezu sicher Massenmarker erhalten, die eine unterschiedliche Auswirkung auf ein Trennverfahren haben, welches dem Nachweis mittels Massenspektrometrie vorausgeht. Dies hat auch Auswirkungen auf die Gerätekonstruktion, weil sich aufgrund der Vergrößerung des Massenbereiches, über den ein Massenspektrometer Ionen nachweisen kann, die Kosten des Gerätes erhöhen.

**[0015]** Es ist folglich ein Ziel dieser Erfindung, die mit dem vorhergehenden Stand der Technik assoziierten Probleme zu lösen und Massenmarker bereitzustellen, welche vor dem Hintergrund einer Verunreinigung nachgewiesen werden können und deren Identität als Massenmarker bestätigt werden kann. Ferner ist es ein Ziel dieser Erfindung, Reihen von Markern bereitzustellen, welche innerhalb eines komprimierten Massenbereiches aufgetrennt werden können, so dass die Marker die Trennverfahren nur in einem sehr geringen Maße beeinträchtigen, und welche in einem Massenspektrometer, welches Ionen über einen begrenzten Bereich von Masse-zu-Ladung-Verhältnissen nachweist, ohne Weiteres nachgewiesen werden können.

**[0016]** Es ist auch ein Ziel dieser Erfindung, Verfahren zur Analyse von Biomolekülen bereitzustellen, welche die Marker dieser Erfindung verwenden, um den Durchsatz, die Signal-zu-Rausch-Verhältnisse und die Empfindlichkeit solcher Tests, insbesondere für die Analyse von Peptiden, zu maximieren.

**[0017]** Gemäß einem ersten Aspekt stellt die Erfindung einen Satz von zwei oder mehreren Massenmarkern bereit, wobei jeder Marker in dem Satz eine Massenmarkergruppe umfasst, welche über mindestens eine Amidbindung an eine Massenmarkierungsgruppe gebunden ist, wobei die Aggregatmasse jedes Markers in dem Satz gleich oder verschieden sein kann, und wobei die Masse der Massenmarkergruppe jedes Markers in dem Satz gleich oder verschieden sein kann, und wobei der Satz eine Gruppe von Markern umfasst, welche eine Massenmarkergruppe mit einer gleichen Masse aufweisen, oder wobei der Satz eine Gruppe von Markern umfasst, welche eine gleiche Aggregatmasse haben, und wobei in jeder Gruppe von Markern innerhalb des Satzes, welche eine Massenmarkergruppe mit einer gleichen Masse aufweisen, jeder Marker eine Aggregatmasse hat, welche sich von allen anderen Markern in dieser Gruppe unterscheidet, und wobei in jeder Gruppe von Markern innerhalb des Satzes, welche eine gleiche Aggregatmasse haben, jeder Marker eine Massenmarkergruppe aufweist, welche eine Masse hat, welche sich von derjenigen aller anderen Massenmarkergruppen in dieser Gruppe unterscheidet, so dass alle Massenmarker in dem Satz mittels Massenspektrometrie voneinander unterscheidbar sind, und wobei die Massenmarkergruppe eine Aminosäure umfasst und die Massenmarkierungsgruppe eine Aminosäure umfasst.

**[0018]** Der im vorliegenden Zusammenhang verwendete Begriff Massenmarkergruppe soll auf eine Gruppe verweisen, welche mittels Massenspektrometrie nachweisbar ist, während der im vorliegenden Zusammenhang verwendete Begriff Massenmarkierungsgruppe auf eine Gruppe verweisen soll, welche nicht notwendigerweise mittels Massenspektrometrie nachweisbar sein muss, aber vorhanden ist, um sicherzustellen, dass ein Massenmarker eine gewünschte Aggregatmasse aufweist. Die Anzahl der Marker in dem Satz ist nicht besonders begrenzt, vorausgesetzt, dass der Satz eine Vielzahl von Markern umfasst. Jedoch wird bevorzugt, wenn der Satz zwei oder mehr, drei oder mehr, vier oder mehr oder fünf oder mehr Marker umfasst.

**[0019]** Die vorliegende Erfindung stellt auch eine Reihe von Massenmarkern bereit, umfassend zwei oder mehrere Sätze von Massenmarkern, wie oben definiert, wobei sich die Aggregatmasse eines jeden der Massenmarker in irgendeinem Satz von der Aggregatmasse eines jeden der Massenmarker in jedem anderen Satz in der Reihe unterscheidet. Die Massenmarkergruppe und die Massenmarkierungsgruppe umfassen beide mindestens eine Aminosäure. Jedoch können die Gruppen gegebenenfalls weitere Gruppen wie zusätzliche Aminosäuregruppen und/oder Arylethergruppen umfassen. So können die Gruppen modifizierte Aminosäuren oder Peptide sein. Die Massen der verschiedenen Sätze in der Reihe können gegebenenfalls durch das Anhängen von weiteren Aminosäuregruppen an entweder eine oder beide Gruppen unterschieden werden.

**[0020]** Die Erfindung stellt ferner ein Analyseverfahren bereit, welches Verfahren das Nachweisen eines Analyten durch die Identifizierung eines Massenmarkers oder einer Kombination von Massenmarkern, welcher bzw. welche dem Analyten zuordenbar ist, mittels Massenspektrometrie umfasst, wobei der Massenmarker ein Massenmarker aus einem Satz oder einer Reihe von Massenmarkern, wie oben definiert, ist.

**[0021]** In bestimmten Ausführungsformen dieser Erfindung können die Massenmarker reaktive Funktionalitäten umfassen, welche die Bindung der Massenmarker an die Analytmoleküle begünstigen. Die Marker in dieser Ausführungsform haben vorzugsweise die folgende Form:

Aminosäure 1 – Amidbindung – Aminosäure 2 – reaktive Funktionalität

wobei die Massenmarkergruppe und die Massennormierungsgruppe jeweils entweder der Aminosäure 1 oder der Aminosäure 2 entsprechen können.

**[0022]** In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung sind die Reihen von Markern vorzugsweise alle chemisch identisch und werden die Massen der Massennormierungsgruppe und der Massenmarkergruppe (z. B. der vorstehenden Aminosäure 1 oder Aminosäure 2) durch Isotopen-Substitutionen verändert.

**[0023]** In weiteren bevorzugten Ausführungsformen dieser Erfindung können die Marker eine die Empfindlichkeit erhöhende Gruppe umfassen, wobei die Marker vorzugsweise der folgenden Form entsprechen:  
Empfindlichkeit erhöhende Gruppe – Aminosäure 1 – Amidbindung – Aminosäure 2 – reaktive Funktionalität

**[0024]** In diesem Beispiel ist die Gruppe, welche die Empfindlichkeit erhöht, üblicherweise an die Massenmarkergruppe gebunden, da beabsichtigt ist, die Empfindlichkeit des Nachweises dieser Gruppe in dem Massenspektrometer zu erhöhen. Die reaktive Funktionalität ist als eine Gruppe dargestellt, welche an eine andere Gruppe als die Gruppe, welche die Empfindlichkeit erhöht, gebunden ist bzw. innerhalb davon vorliegt. Jedoch ist es nicht erforderlich, die Marker nicht auf diese Weise zu begrenzen, wobei die Marker in einigen Fällen eine die Empfindlichkeit erhöhende Gruppe umfassen, ohne dass eine reaktive Funktionalität vorhanden ist. In anderen Ausführungsformen kann die die Empfindlichkeit erhöhende Gruppe an die gleiche Gruppe wie die reaktive Funktionalität gebunden sein.

**[0025]** In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung umfassen die Massenmarker ein Reagens für eine Affinitätsabfangreaktion. Vorzugsweise ist der Ligand für eine Affinitätsabfangreaktion Biotin. Der Ligand für eine Affinitätsabfangreaktion ermöglicht, dass markierte Analyte von unmarkierten Analyten getrennt werden können, indem diese z. B. an einer mit Avidin beschichteten festen Phase abgefangen werden.

**[0026]** Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zur Analyse eines Biomoleküls oder einer Mischung von Biomolekülen bereit. Dieses Verfahren umfasst vorzugsweise die Schritte:

1. Umsetzen des Biomoleküls oder der Mischung von Biomolekülen mit einem Massenmarker im Einklang mit dieser Erfindung;
2. Wahlweise Abtrennen des markierten Biomoleküls mittels Elektrophorese oder Chromatographie;
3. Ionisieren des markierten Biomoleküls;
4. Selektieren von Ionen mit einem vorher festgelegten Masse-zu-Ladung-Verhältnis, welches dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis der bevorzugten Ionen des markierten Biomoleküls entspricht, in einem Massenanalysator;
5. Induzieren der Dissoziation der selektierten Ionen mittels Kollision;
6. Nachweisen der Kollisionsprodukte, um Ionen der Kollisionsprodukte zu identifizieren, welche auf die Massenmarker hindeuten.

**[0027]** In dieser Ausführungsform, in welcher die Massenmarker einen Affinitätsmarker umfassen, können die affinitätsmarkierten Biomoleküle durch einen Gegenliganden abgefangen werden, um zu ermöglichen, dass markierte Biomoleküle von unmarkierten Biomolekülen getrennt werden können. Dieser Schritt wird vorzugsweise vor dem vorstehenden wahlweisen zweiten Schritt ausgeführt.

**[0028]** In bestimmten Ausführungsformen wird der Schritt des Selektierens der Ionen mit einem vorher festgelegten Masse-zu-Ladung-Verhältnis in dem ersten Massenanalysator eines sequentiellen Instruments ausgeführt. Die selektierten Ionen werden dann in eine separate Kollisionszelle gelenkt, worin sie gemäß dem vierten Schritt des ersten Aspekts der Erfindung mit einem Gas oder einer festen Oberfläche kollidieren. Die Kollisionsprodukte werden dann in einen weiteren Massenanalysator eines sequentiellen Instruments gelenkt, um die Kollisionsprodukte gemäß dem fünften Schritt des ersten Aspekts dieser Erfindung nachzuweisen. Typische sequentielle Instrumente schließen Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer, Tandem-Sektorinstrumente und Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer ein.

**[0029]** In anderen Ausführungsformen werden der Schritt des Selektierens der Ionen mit einem vorher festgelegten Masse-zu-Ladung-Verhältnis, der Schritt des Kollidierens der selektierten Ionen mit einem Gas und der Schritt des Nachweises der Kollisionsprodukte innerhalb der gleichen Zone des Massenspektrometers ausgeführt. Dies kann zum Beispiel mit Hilfe von Ionenfallen-Massenanalysatoren und Fourier-Transformation-Ionencyclotron-Resonanz-Massenspektrometern bewirkt werden.

**[0030]** Gemäß einem anderen Aspekt stellt diese Erfindung Sätze oder Reihen von massenmarkierten Molekülen mit der folgenden Form bereit:

#### Analyt-Linker-Marker

wobei der Marker ein Massenmarker aus einem Satz oder einer Reihe im Einklang mit dieser Erfindung ist, der Linker eine Verbindungsgruppe, wie nachstehend beschrieben, ist, und der Analyt ein Analyt von Interesse wie ein Biomolekül sein kann. Ein bevorzugter Aspekt dieser Ausführungsform ist, wenn die Analyten (einer, mehr als einer oder auch alle der Analyten) in dem Satz oder der Reihe Standardanalyten mit einer bekannten Masse und mit bestimmten chromatographischen Eigenschaften sind. Solche Standards können in den Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um einen Vergleich mit unbekannten Analyten vorzusehen, wie zum Beispiel bei der Analyse der Ergebnisse eines chromatographischen Trennschritts.

**[0031]** Diese Erfindung beschreibt Massenmarker, welche in einfacher Weise mit einem Peptidsynthesegerät hergestellt werden können. Tatsächlich umfassen die in dieser Erfindung verwendeten Verbindungen Peptide und modifizierte Peptide. Die Peptidsynthese sieht eine chemische Diversität vor, welche die Herstellung eines großen Bereichs von Markern mit bestimmten Eigenschaften in einer automatisierten Art und Weise ermöglicht.

**[0032]** Der Begriff 'MS/MS' im Zusammenhang mit Massenspektrometern verweist auf Massenspektrometer, welche in der Lage sind, Ionen zu selektieren und die selektierten Ionen einer kollisionsinduzierten Dissoziation (CID) zu unterwerfen, und welche die Fragmentionen einer weiteren Analyse unterziehen können.

**[0033]** Der Begriff 'sequentielle Instrument' verweist auf Massenspektrometer, welche eine MS/MS durchführen können, wobei die Massenanalysatoren in Reihe angeordnet sind und jeder Schritt des MS/MS-Prozesses nacheinander in miteinander verbundenen Massenanalysatoren ausgeführt wird. Typische sequentielle Instrumente schließen Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer, Tandem-Sektorinstrumente und Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer ein.

**[0034]** Die Erfindung wird nun ausschließlich durch Beispiele unter Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen ausführlicher beschrieben, welche bedeuten:

**[0035]** [Fig. 1](#) zeigt einen Satz von 3 Massenmarkern, abgeleitet von Lysin;

**[0036]** [Fig. 2](#) zeigt einen Satz von 5 Massenmarkern, abgeleitet von Alanin;

**[0037]** [Fig. 3](#) zeigt einen Satz von 5 Massenmarkern, abgeleitet von Alanin und Tyrosin;

**[0038]** [Fig. 4](#) zeigt einen Satz von 4 Massenmarkern, abgeleitet von fluorierten Formen von Phenylglycin;

**[0039]** [Fig. 5](#) zeigt einen Satz von 4 Massenmarkern, abgeleitet von fluorierten Formen von Phenylglycin und Phenylalanin;

**[0040]** [Fig. 6a](#) zeigt einen Satz von 2 Affinitätsliganden-Massenmarkern, abgeleitet von Methionin, welche eine Hydrazid-Funktionalität zur Markierung von Kohlenhydraten aufweisen;

**[0041]** [Fig. 6b](#) zeigt einen Satz von 2 Affinitätsliganden-Massenmarkern, abgeleitet von Methionin, welche eine Boronsäure-Funktionalität zur Markierung von Kohlenhydraten aufweisen;

**[0042]** [Fig. 7](#) zeigt einen Satz von 2 Affinitätsliganden-Massenmarkern, abgeleitet von Methionin, welche eine Thiol-Funktionalität zur Markierung von Dehydroalanin- und Methyldehydroalaninresten aufweisen;

**[0043]** [Fig. 8](#) zeigt einen Satz von 2 Affinitätsliganden-Massenmarkern, abgeleitet von Methionin, welche eine Maleimid-Funktionalität zur Markierung von freien Thiolen aufweisen;

**[0044]** [Fig. 9a](#) zeigt einen Syntheseweg für die Erzeugung eines Fmoc-geschützten, deuterierten Methionin-

restes, und [Fig. 9b](#) zeigt einen Syntheseweg für die Erzeugung einer reaktiven Verbindungsgruppe, welche als eine die Empfindlichkeit erhöhende Gruppe wirksam sein kann;

**[0045]** [Fig. 10](#) zeigt ein Paar von beispielhaften Peptiden, abgeleitet von verschiedenen Isotopenformen von Methionin, welche synthetisiert wurden, um die Merkmale dieser Erfindung zu veranschaulichen;

**[0046]** [Fig. 11](#) zeigt ein Elektrospray-Massenspektrum für eine Mischung der zwei Peptide, welche in [Fig. 10](#) gezeigt sind;

**[0047]** [Fig. 12](#) zeigt ein Elektrospray-Massenspektrum der Fragmentierung eines jeden der zwei Peptide, welche in [Fig. 10](#) gezeigt sind;

**[0048]** [Fig. 13](#) zeigt einen hypothetischen Fragmentierungsmechanismus, der wahrscheinlich für die in den [Fig. 12](#) und [Fig. 14](#) gezeigten Spektren verantwortlich ist;

**[0049]** [Fig. 14](#) zeigt ein Elektrospray-Spektrum der Fragmentierung einer 70:30-Mischung der zwei Peptide, welche in [Fig. 10](#) gezeigt sind;

**[0050]** [Fig. 15](#) zeigt ein Diagramm, welches die erwarteten Verhältnisse der Peptide A und B ([Fig. 10](#)) aufgetragen gegen die beobachteten Verhältnisse der Peptide A und B in einer Reihe von ESI-MS/MS-Analysen von Mischungen aus A und B zeigt;

**[0051]** [Fig. 16a](#)–[Fig. 16c](#) veranschaulichen angenommene Fragmentierungsmechanismen;

**[0052]** [Fig. 17a](#)–[Fig. 17d](#) veranschaulichen Marker, welche eine vermehrte Spaltung an der spaltbaren Amidbindung zeigen;

**[0053]** [Fig. 18a](#) und [Fig. 18b](#) zeigen die Strukturen von zwei Ausführungsformen der TMT-Marker;

**[0054]** [Fig. 19a](#) und [Fig. 19b](#) zeigen typische CID-Spektren für ein Peptid, welches mit einem TMT-Marker der ersten Generation markiert ist, bei Kollisionsenergien von 40 V ([Fig. 19a](#)) und 70 V ([Fig. 19b](#));

**[0055]** [Fig. 20a](#), [Fig. 20b](#) und [Fig. 20c](#) zeigen MS- und MS/MS-Spektren für dreifach geladene Ionen des Peptids 2 (vgl. Tabelle 7), welches mit TMT-Markern der ersten und zweiten Generation markiert ist;

**[0056]** [Fig. 21](#) zeigt ein typisches CID-Spektrum für ein Peptid (Peptid 2 in Tabelle 7), welches mit einem TMT-Marker der zweiten Generation markiert ist;

**[0057]** [Fig. 22](#) zeigt, dass der Ladungszustand des TMT-markierten Peptids die Entstehung der Markerfragmente in den CID-Spektren der markierten Peptide nicht beeinflusst;

**[0058]** [Fig. 23](#) zeigt Peptidmischungen zusammen mit den erwarteten und den gemessenen Häufigkeitsverhältnissen für sowohl die erste als auch die zweite Generation von Markern;

**[0059]** [Fig. 24](#) zeigt die gleichzeitige Elution jedes Peptidpaars und der Peptide A und B für jedes Peptid aus Tabelle 7;

**[0060]** [Fig. 25](#) zeigt eine Dynamikstudie für ein Paar der TMT-Peptide 3A und 3B, welche in einem Verhältnis von 40:60 vorliegen und welche in Verdünnungen im Bereich von 100 fmol bis 100 pmol analysiert worden sind; und

**[0061]** [Fig. 26a](#), [Fig. 26b](#) und [Fig. 26c](#) zeigen die Ergebnisse eines 'Spiking'-Experiments, wobei Peptidpaare von 3A und 3B (500 fmol insgesamt, in einem Verhältnis von jeweils 40:60), welche einen TMT-Marker der zweiten Generation tragen, mit einem Trypsin-Spaltprodukt von Rinderserumalbumin (2 pmol) gemischt wurden.

**[0062]** Die [Fig. 1](#) bis [Fig. 5](#) veranschaulichen eine Reihe von wichtigen Merkmalen der Marker dieser Erfindung. Die Marker sind in allen [Fig. 1](#) bis [Fig. 5](#) gebunden an eine 'reaktive Funktionalität' dargestellt, welche zum Beispiel eine Verbindungsgruppe für einen N-Hydroxysuccinimidester sein oder irgendeiner einer Reihe anderer Möglichkeiten entsprechen kann, von denen einige nachstehend besprochen werden. Die [Fig. 1](#),

[Fig. 2](#) und [Fig. 4](#) zeigen, dass eine Anzahl von Markern durch Kombinieren von unterschiedlich massenmodifizierten Formen derselben Aminosäure in Form einer Reihe von Dipeptiden erzeugt werden kann. Die [Fig. 3](#) und [Fig. 5](#) zeigen Sätze von Markern, welche durch Kombinieren von unterschiedlichen Aminosäuren in Form von Heterodimeren erzeugt werden. Die [Fig. 1](#) bis [Fig. 3](#) veranschaulichen Marker, welche alle dieselbe Gesamtmasse haben und welche chemisch identisch sind. Diese Marker unterscheiden sich im Hinblick auf die Verteilung der Isotope in den Molekülen, während sich die Marker in den [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#), welche alle dieselbe Gesamtmasse haben, aber chemisch nicht identisch sind, im Hinblick auf die Verteilung der Fluorsubstituenten in den Markern unterscheiden.

**[0063]** Im Folgenden wird [Fig. 1](#) ausführlicher besprochen. [Fig. 1](#) zeigt 3 Homodimere von Lysin. Das Lysin ist an den  $\epsilon$ -Aminogruppen mit Methylsulfonylchlorid blockiert worden. Die Sulfonamidbindung ist gegenüber einer Fragmentierung beständiger als eine herkömmliche Amidbindung, so dass die Verkappungsgruppe nicht verloren geht, wenn der Marker durch eine kollisionsinduzierte Dissoziation bei Energien, welche ausreichend sind, um die herkömmliche Grundgerüst-Amidbindung zwischen dem Paar von modifizierten Lysinresten zu spalten, in einem Massenspektrometer fragmentiert wird. Die Verkappungsgruppe wird verwendet, um eine Protonierung in der  $\epsilon$ -Position während der Ionisierung der Marker in einem Massenspektrometer zu verhindern. Das verkappte Lysin kann vor der Synthese der Massenmarker vorgesehen werden. Die  $\epsilon$ -Aminogruppe kann zum Beispiel durch Kopplung der Aminosäure an Methylsulfonylchlorid in Gegenwart von Kupferionen selektiv modifiziert werden. Amin- und Säurefunktionalitäten in der  $\alpha$ -Position können mit verschiedenen zweiwertigen Kationen Chelate bilden, wodurch die  $\alpha$ -Aminogruppe reaktionsunfähig wird. Die  $\alpha$ -Aminogruppe des Dipeptids ist in eine Guanidinogruppe umgewandelt worden, um die Protonierung an dieser Position in dem Marker während der Ionisierung in einem Massenspektrometer zu begünstigen und um die Masse des Fragmentierungsprodukts von dem zweiten Alaninrest und den natürlichen Alaninresten in dem Protein zu unterscheiden. Die Guanidinierung der  $\alpha$ -Position kann als letzter Schritt einer herkömmlichen Peptidsynthese vor der Entschützung des Peptids und der Abspaltung von dem Harz ausgeführt werden (Tian Z. und Roeske R. W., Int. J. Peptide Protein Res. 37 (1991), 425–429, "Guanidination of a Peptide side chain amino group on a solid support"). Für die Herstellung der drei verschiedenen Marker würden unterschiedliche deuterierte Formen von Lysin verwendet werden. Die Gesamtmasse eines jeden der drei Marker ist gleich, wobei sich aber das N-terminale Lysin in jedem Marker von den anderen zwei Marker um mindestens 4 Dalton unterscheidet. Diese Massendifferenz ist üblicherweise ausreichend, um zu verhindern, dass sich natürliche Isotopenpeaks der fragmentierten Teile jedes Markers in dem Massenspektrum mit den Isotopenpeaks der fragmentierten Teile der anderen Marker überlappen.

**[0064]** Nachfolgend wird [Fig. 2](#) ausführlicher besprochen. [Fig. 2](#) zeigt 5 Homodimere von Alanin. Für die Herstellung der fünf verschiedenen Marker würden unterschiedlich isotopisch substituierte Formen von Alanin verwendet werden. Die Gesamtmasse eines jeden der fünf Marker ist gleich, wobei sich aber das N-terminale Alanin in jedem Marker von den anderen vier Marker um mindestens 1 Dalton unterscheidet. Die  $\alpha$ -Aminogruppe des Dipeptidmarkers ist methyliert worden, um das Fragmentierungsprodukt dieser Aminosäure von den Fragmentierungsprodukten des zweiten Alaninrestes und den natürlichen Alaninresten in dem Protein zu unterscheiden und um die Protonierung an dieser Position in dem Marker während der Ionisierung in einem Massenspektrometer zu begünstigen.

**[0065]** Nachstehend wird [Fig. 3](#) ausführlicher besprochen. [Fig. 3](#) zeigt 5 Heterodimere von Alanin und Tyrosin. Für die Herstellung der fünf verschiedenen Marker würden unterschiedlich isotopisch substituierte Formen von Alanin und Tyrosin verwendet werden.

**[0066]** Die Gesamtmasse eines jeden der fünf Marker ist gleich, wobei sich aber das N-terminale Alanin in jedem Marker von den anderen vier Markern um mindestens 1 Dalton unterscheidet. Die  $\alpha$ -Aminogruppe des Dipeptidmarkers ist methyliert worden, um das Fragmentierungsprodukt dieser Aminosäure von den Fragmentierungsprodukten der natürlichen Alaninreste in dem Protein zu unterscheiden und um die Protonierung an dieser Position in dem Marker während der Ionisierung in einem Massenspektrometer zu begünstigen.

**[0067]** Im Folgenden wird [Fig. 4](#) ausführlicher besprochen. [Fig. 4](#) zeigt 4 Dimere von Phenylglycin. Für die Herstellung der vier verschiedenen Marker würden unterschiedlich fluorsubstituierte Formen von Phenylglycin verwendet werden. Die Gesamtmasse eines jeden der vier Marker ist gleich, wobei sich aber das N-terminale Phenylglycin in jedem Marker von den anderen drei Marker um mindestens ein Fluoratom unterscheidet. Die  $\alpha$ -Aminogruppe des Dipeptidmarkers ist methyliert worden, um das Fragmentierungsprodukt dieser Aminosäure von dem Fragmentierungsprodukt des zweiten Phenylglycinrestes zu unterscheiden und um die Protonierung an dieser Position in dem Marker während der Ionisierung in einem Massenspektrometer zu begünstigen.

**[0068]** Nachfolgend wird [Fig. 5](#) ausführlicher besprochen. [Fig. 5](#) zeigt 4 Dimere, umfassend Phenylglycin und Phenylalanin. Für die Herstellung der vier verschiedenen Marker würden unterschiedlich fluorsubstituierte Formen von Phenylglycin und Phenylalanin verwendet werden. Die Gesamtmasse eines jeden der vier Marker ist gleich, wobei sich aber das N-terminale Alanin in jedem Marker von den anderen drei Markern durch die Masse von mindestens einem Fluoratom unterscheidet. Die  $\alpha$ -Aminogruppe des Dipeptidmarkers ist methyliert worden, obwohl lediglich zu dem Zweck, die Aminogruppe vor Nebenreaktionen zu schützen und die Protonierung zu verstärken, da es nicht erforderlich ist, die erste Aminosäure zu unterscheiden, weil sich das Fragmentierungsprodukt ohne eine Methylierung von dem zweiten Aminosäurerest des Markerpeptids unterscheiden würde. Die  $\alpha$ -Aminogruppe kann gegebenenfalls durch eine Methylierung oder Guanidinierung modifiziert werden, um die Protonierung an dieser Position in dem Marker während der Ionisierung in einem Massenspektrometer zu begünstigen.

**[0069]** Die vorliegende Erfindung wird nun ausführlicher beschrieben. In einer bevorzugten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung einen Satz von Massenmarkern bereit, wie oben definiert, wobei jeder Marker in den Satz eine Massenmarkergruppe mit einer gleichen Masse aufweist und wobei jeder Marker in den Satz eine spezifische Aggregatmasse hat.

**[0070]** In einer anderen, mehr bevorzugten Ausführungsform hat jeder Marker in den Satz eine gleiche Masse und enthält jeder Marker in den Satz eine Massenmarkergruppe mit einer spezifischen Masse.

**[0071]** Der Satz von Markern ist nicht notwendigerweise auf die vorstehend beschriebenen zwei bevorzugten Ausführungsformen begrenzt, sondern kann zum Beispiel Marker beider Typen umfassen, vorausgesetzt, dass alle Marker mittels Massenspektrometrie unterscheidbar sind, wie vorstehend erläutert wurde.

**[0072]** Es wird bevorzugt, dass in einem Satz von Markern des zweiten Typs jede Massenmarkergruppe in dem Satz eine gleiche Basisstruktur aufweist und jede Massennormalisierungsgruppe in dem Satz eine gleiche Basisstruktur aufweist, und dass jeder Massenmarker in dem Satz eine oder mehrere Massenregulierungsgruppen umfasst, welche an die Basisstruktur der Massenmarkergruppe und/oder die Basisstruktur der Massennormierungsgruppe gebunden sind oder innerhalb davon vorliegen. In dieser Ausführungsform umfasst jede Massenmarkergruppe in dem Satz eine unterschiedliche Anzahl an Massenregulierungsgruppen und weist jeder Massenmarker in dem Satz die gleiche Anzahl an Massenregulierungsgruppen auf.

**[0073]** In dieser Beschreibung bedeutet gleiche Basisstruktur, dass zwei oder mehrere Einheiten die gleiche Struktur haben, welche im Wesentlichen das (den) gleiche(n) strukturelle(n) Skelett, Grundgerüst oder Kern aufweist. Dieses Skelett oder Grundgerüst kann zum Beispiel eine oder mehrere Aminosäuren umfassen. Vorzugsweise umfasst das Skelett eine Reihe von Aminosäuren, welche über Amidbindungen miteinander verbunden sind. Jedoch können auch andere Einheiten wie Arylethergruppen vorhanden sein. Das Skelett oder Grundgerüst kann Substituenten-Seitengruppen oder Atom- oder Isotopensubstitutionen innerhalb davon aufweisen, ohne dass die gemeinsame Basisstruktur verändert wird.

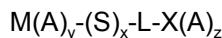
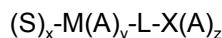
**[0074]** Typischerweise umfasst ein Satz von Massenmarkern des oben erwähnten zweiten Typs Massenmarker der Formel:



worin M die Massennormierungsgruppe ist, X die Massenmarkergruppe ist, A eine Massenregulierungsgruppe ist, L die spaltbare Verbindungsgruppe, umfassend die Amidbindung, ist, y und z ganze Zahlen von 0 oder größer sind, und y + z eine ganze Zahl von 1 oder größer ist. Vorzugsweise ist M eine Gruppe, welche gegenüber einer Fragmentierung beständig ist; ist L eine Verbindungsgruppe, welche gegenüber einer Fragmentierung bei der Kollision mit einem anderen Molekül oder Atom empfindlich ist; und ist X vorzugsweise eine vorionisierte Gruppe, welche gegenüber einer Fragmentierung beständig ist. Die Summe der Massen von M und X ist für alle Mitglieder des Satzes gleich. Vorzugsweise haben M und X die gleiche Basisstruktur oder Kernstruktur, wobei diese Struktur durch die Massenregulierungsgruppen modifiziert wird. Die Massenregulierungsgruppen stellen sicher, dass die Summe der Massen von M und X für alle Massenmarker in einem Satz gleich ist, aber gewährleisten, dass jedes X eine unterschiedliche (spezifische) Masse hat.

**[0075]** Die vorliegende Erfindung umfasst auch Reihen mit einer Vielzahl von Sätzen von Massenmarkern. Die Reihen von Massenmarkern der vorliegenden Erfindung sind nicht besonders begrenzt, vorausgesetzt, dass sie eine Vielzahl von Sätzen von Massenmarkern im Einklang mit der vorliegenden Erfindung enthalten. Es wird bevorzugt, dass die Reihen zwei oder mehr, drei oder mehr, vier oder mehr oder fünf oder mehr Sätze

von Massenmarkern umfassen. Vorzugsweise weist jeder Massenmarker in der Reihe eine der folgenden Strukturen auf:



worin S eine Massenreihen-Modifizierungsgruppe ist, M die Massennormierungsgruppe ist, X die Massenmarkergruppe ist, A die Massenregulierungsgruppe ist, L die spaltbare Verbindungsgruppe, umfassend die Amidbindung, ist, x eine ganze Zahl von 0 oder größer ist, y und z ganze Zahlen von 0 oder größer sind, und y + z eine ganze Zahl von 1 oder größer ist. Die Massenreihen-Modifizierungsgruppe unterscheidet die Massen der Sätze voneinander. Diese Gruppe kann eine Gruppe eines beliebigen Typs sein, aber ist vorzugsweise eine Aminosäure oder eine Arylethergruppe. Die Sätze können anhand der Masse dadurch unterschieden werden, dass sie eine unterschiedliche Anzahl von Aminosäuren in ihren Einheiten als andere Marker aus anderen Sätzen umfassen.

#### Verbindungsgruppen

**[0076]** In dieser Besprechung wird vorstehend und nachstehend auf Verbindungsgruppen verwiesen, welche verwendet werden können, um Moleküle von Interesse an die Massenmarkergruppierungen dieser Erfindung zu binden. Eine Vielzahl von Verbindungsgruppen, welche zwischen den Massenmarkern dieser Erfindung und dem kovalent gebundenen Analyten davon eingeführt werden können, ist auf dem Fachgebiet bekannt. Einige dieser Verbindungsgruppen können spaltbar sein. Oligo- oder Polyethylenglycole oder deren Derivate, wie solche, welche bei Maskos U. & Southern E. M., Nucleic Acids Research 20 (1992), 1679–1684, offenbart sind, können als Verbindungsgruppen verwendet werden. Verbindungsgruppen auf der Basis von Bernsteinsäure werden auch häufig verwendet, obwohl diese für Anwendungen in Verbindung mit der Markierung von Oligonucleotiden weniger bevorzugt werden, da sie im Allgemeinen basenlabil sind und folglich mit den basenvermittelten Entschützungsschritten, die in einer Reihe von Oligonucleotidsynthesegeräten verwendet werden, nicht kompatibel sind.

**[0077]** Propargylalkohol ist eine bifunktionelle Verbindungsgruppe, welche eine Bindung vorsieht, die unter den Bedingungen einer Oligonucleotidsynthese stabil ist, und ist eine bevorzugte Verbindungsgruppe zur Verwendung in Verbindung mit dieser Erfindung im Zusammenhang mit der Anwendung von Oligonucleotiden. In gleicher Weise ist 6-Aminohexanol ein nützliches bifunktionelles Reagens zur Verknüpfung von geeignet funktionalisierten Molekülen und stellt daher ebenfalls eine bevorzugte Verbindungsgruppe dar.

**[0078]** Eine Vielzahl von bekannten spaltbaren Verbindungsgruppen kann in Verbindung mit den Verbindungen dieser Erfindung verwendet werden, wie zum Beispiel durch Licht spaltbare Verbindungsgruppen. Ortho-nitrobenzylgruppen sind als durch Licht spaltbare Verbindungsgruppen bekannt, und insbesondere 2-Nitrobenzylester und 2-Nitrobenzylamine, welche an der Benzylaminbindung gespalten werden. Für eine Übersicht über spaltbare Verbindungsgruppen vgl. Lloyd-Williams et al., Tetrahedron 49 (1993), 11065–11133, worin eine Vielzahl von durch Licht spaltbare oder chemisch spaltbare Verbindungsgruppen behandelt wird.

**[0079]** WO 00/02895 offenbart die Vinylsulfonverbindungen als spaltbare Verbindungsgruppen, welche ebenfalls zur Verwendung in Verbindung mit dieser Erfindung, insbesondere bei Anwendungen im Zusammenhang mit der Markierung von Polypeptiden, Peptiden und Aminosäuren, geeignet sind.

**[0080]** WO 00/02895 offenbart die Verwendung von Siliconverbindungen als Verbindungsgruppen, welche durch eine Base in der Gasphase spaltbar sind. Diese Verbindungsgruppen sind ebenfalls zur Verwendung in Verbindung mit dieser Erfindung, insbesondere bei Anwendungen im Zusammenhang mit der Markierung von Oligonucleotiden, geeignet.

**[0081]** Es ist vorstehend erwähnt worden, dass die Massenmarker der vorliegenden Erfindung reaktive Funktionalitäten, Re, umfassen können, um ihre Bindung an Analyte zu erleichtern. In bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist Re eine reaktive Funktionalität oder Gruppe, welche ermöglicht, dass der Massenmarker mit einer geeigneten funktionellen Gruppe in einem Analytmolekül, wie zum Beispiel, aber nicht begrenzt auf, einem Nucleotid, einem Oligonucleotid, einem Polynucleotid, einer Aminosäure, einem Peptid oder einem Polypeptid, kovalent reagieren kann. Re kann an die Massenmarker über eine Verbindungsgruppe gebunden sein, welche spaltbar sein kann, aber nicht spaltbar sein muss. Eine Vielzahl von reaktiven Funktionalitäten kann in die Massenmarker dieser Erfindung eingeführt werden.

**[0082]** In der nachstehenden Tabelle 1 sind einige reaktive Funktionalitäten aufgeführt, welche mit nukleophilen Funktionalitäten, welche in Biomolekülen zu finden sind, unter Bildung einer kovalenten Bindung zwischen den zwei Einheiten reagieren können. Für Anwendungen in Verbindung mit synthetischen Oligonucleotiden werden häufig primäre Amine oder Thiole an den Enden der Moleküle eingeführt, um eine Markierung zu ermöglichen. Irgendeine der nachstehend aufgeführten Funktionalitäten könnte in die Verbindungen dieser Erfindung eingeführt werden, um zu ermöglichen, dass die Massenmarker an ein Molekül von Interesse gebunden werden können. Eine reaktive Funktionalität kann auch verwendet werden, um gegebenenfalls eine weitere Verbindungsgruppe mit einer anderen reaktiven Funktionalität einzuführen. Tabelle 1 soll nicht vollständig sein, und die vorliegende Erfindung ist nicht auf die Verwendung der aufgeführten Funktionalitäten allein begrenzt.

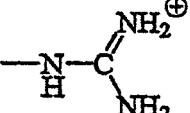
Tabelle 1

Nukleophile Funktionalität	Reaktive Funktionalität	Erhaltene Verbindungsgruppe
-SH	-SO <sub>2</sub> -CH=CR <sub>2</sub>	-S-CR <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SO <sub>2</sub> -
-NH <sub>2</sub>	-SO <sub>2</sub> -CH=CR <sub>2</sub>	-N(CR <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> oder -NH-CR <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SO <sub>2</sub> -
-NH <sub>2</sub>		-CO-NH-
-NH <sub>2</sub>		-CO-NH-
-NH <sub>2</sub>	-NCO	-NH-CO-NH-
-NH <sub>2</sub>	-NCS	-NH-CS-NH-
-NH <sub>2</sub>	-CHO	-CH <sub>2</sub> -NH-
-NH <sub>2</sub>	-SO <sub>2</sub> Cl	-SO <sub>2</sub> -NH-
-NH <sub>2</sub>	-CH=CH-	-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
-OH	-OP(NCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	-OP(=O)(O)O-

**[0083]** Es sollte bekannt sein, dass bei Anwendungen in Verbindung mit der Markierung von Oligonucleotiden mit den Massenmarkern dieser Erfindung einige der vorstehenden reaktiven Funktionalitäten oder die daraus resultierenden Verbindungsgruppen vor der Einführung in ein Oligonucleotidsynthesegerät geschützt werden können. Vorzugsweise sollten ungeschützte Ester-, Thioether- und Thioester- oder Amin- und Amidbindungen vermieden werden, da diese üblicherweise in einem Oligonucleotidsynthesegerät nicht stabil sind. Eine große Vielzahl von Schutzgruppen ist auf dem Fachgebiet bekannt, welche verwendet werden können, um Bindungen vor unerwünschten Nebenreaktionen zu schützen.

**[0084]** In dieser Besprechung wird nachstehend auf "Ladung tragende Funktionalitäten" und solubilisierende Gruppen verwiesen. Diese Gruppen können in Massenmarker, wie zum Beispiel in die Massenmarker der Erfindung, eingeführt werden, um die Ionisierung davon und die Löslichkeit zu begünstigen. Die Auswahl der Marker hängt davon ab, ob ein Nachweis für positive oder negative Ionen verwendet werden soll. In der nachstehenden Tabelle 2 sind einige Funktionalitäten aufgeführt, welche in Massenmarker eingeführt werden können, um entweder eine positive oder eine negative Ionisierung zu begünstigen. Die Tabelle soll nicht vollständig sein, und die vorliegende Erfindung ist nicht auf die Verwendung der aufgeführten Funktionalitäten allein begrenzt.

Tabelle 2

Positiv-Ionen-Modus	Negativ-Ionen-Modus
-NH <sub>2</sub>	-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
-NR <sub>2</sub>	-PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
-NR <sub>3</sub> <sup>+</sup>	-PO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
	-CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
	
-SR <sub>2</sub> <sup>+</sup>	

**[0085]** WO 00/02893 offenbart die Verwendung von Metallionen bindenden Gruppen, wie zum Beispiel Kronenether oder Porphyrine, um die Ionisierung von Massenmarkern zu verstärken. Diese Gruppen sind auch zur Verwendung in Verbindung mit den Massenmarkern dieser Erfindung geeignet.

**[0086]** Die Komponenten der Massenmarker dieser Erfindung sind vorzugsweise gegenüber einer Fragmentierung beständig, so dass die Stelle der Fragmentierung in den Markern durch die Einführung einer Bindung, welche in einfacher Weise durch eine kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) aufgebrochen wird, kontrolliert werden kann. Arylether sind ein Beispiel für eine Klasse von Verbindungen, welche gegenüber einer Fragmentierung beständig sind, die in dieser Erfindung verwendet werden können. Diese Verbindungen sind auch chemisch inert und thermisch stabil. WO 99/32501 beinhaltet eine ausführliche Besprechung der Verwendung von Polyethern in der Massenspektrometrie.

**[0087]** Früher basierte das allgemeine Verfahren für die Synthese von Arylethern auf der Ullmann-Kopplung von Arylbromiden an Phenole in Gegenwart von Kupferpulver bei etwa 200°C (repräsentative Referenz: Stetter H. & Duve G., Chemische Berichte 87 (1954), 1699).

**[0088]** Mildere Verfahren für die Synthese von Arylethern sind unter Verwendung eines anderen Metallkatalysators entwickelt worden, wobei aber die Reaktionstemperatur immer noch zwischen 100°C und 120°C liegt (Iyoda M., Sakaitani M., Otsuka H. und Oda M., Tetrahedron Letters 26 (1985), 477). Dies ist ein bevorzugter Weg für die Herstellung von Polyether-Massenmarkern. Vgl. die Synthese von FT77 in den nachstehenden Beispielen. Ein vor kurzem veröffentlichtes Verfahren sieht einen besonders bevorzugten Weg für die Herstellung von Polyether-Massenmarkern vor, da es unter viel mildereren Bedingungen als die früheren Verfahren durchgeführt wird (Evans D. E., Katz J. L. und West T. R., Tetrahedron Lett. 39 (1998), 2937).

**[0089]** Die vorliegende Erfindung stellt auch einen Satz von zwei oder mehreren Sonden bereit, wobei sich jede Sonde in dem Satz unterscheidet und an einen spezifischen Massenmarker oder eine spezifische Kombination von Massenmarkern aus einem Satz oder einer Reihe von Massenmarkern, wie oben definiert, gebunden ist.

**[0090]** Weiterhin bereitgestellt wird eine Reihe von Sonden, umfassend zwei oder mehrere Sätze von Sonden, wobei jede Sonde in irgendeinem Satz an einen spezifischen Massenmarker oder eine spezifische Kombination von Massenmarkern aus einem Satz von Massenmarkern, wie oben definiert, gebunden ist, und wobei die Sonden in irgendeinem Satz an Massenmarker aus dem gleichen Satz von Massenmarkern gebunden sind, und wobei jeder Satz von Sonden an Massenmarker aus spezifischen Sätzen von Massenmarkern aus einer Reihe von Massenmarkern, wie oben definiert, gebunden ist.

**[0091]** In einer Ausführungsform ist jede Sonde vorzugsweise an eine spezifische Kombination von Massenmarkern gebunden, wobei sich jede Kombination durch die Anwesenheit oder die Abwesenheit eines jeden Massenmarkers in dem Satz von Massenmarkern und/oder die Menge eines jeden Massenmarkers, welche an die Sonde gebunden ist, unterscheidet. Dies wird als "gemischte Form" der vorliegenden Erfindung bezeichnet.

net, da die Sonden an eine Mischung von Massenmarkern gebunden werden können.

**[0092]** Unter den vorstehenden Aspekten ist die Art der Sonde nicht besonders begrenzt. Jedoch umfasst jede Sonde vorzugsweise ein Biomolekül. Es kann ein beliebiges Biomolekül verwendet werden, wobei das Biomolekül aber vorzugsweise aus einer DNA, einer RNA, einem Oligonucleotid, einer Nucleinsäurebase, einem Peptid, einem Polypeptid, einem Protein und einer Aminosäure gewählt ist.

**[0093]** In einer bevorzugten Ausführungsform stellt diese Erfindung Sätze und Reihen von massenmarkierten Analyten wie Nucleotiden, Oligonucleotiden und Polynucleotiden der folgenden Form bereit:

Analyt-Linker-Marker

worin der Linker eine Verbindungsgruppe ist, wie oben definiert, und der Marker ein Massenmarker aus irgendeinem bzw. irgendeiner der oben definierten Sätze und Reihen ist.

**[0094]** Unter dem vorstehenden Aspekt ist die Art des Analyten nicht besonders begrenzt. Jedoch umfasst jeder Analyt vorzugsweise ein Biomolekül. Es kann ein beliebiges Biomolekül verwendet werden, wobei das Biomolekül aber vorzugsweise aus einer DNA, einer RNA, einem Oligonucleotid, einer Nucleinsäurebase, einem Peptid, einem Polypeptid, einem Protein und einer Aminosäure gewählt ist.

**[0095]** In einer Ausführungsform ist jeder Analyt vorzugsweise an eine spezifische Kombination von Massenmarkern gebunden, wobei sich jede Kombination durch die Anwesenheit oder die Abwesenheit eines jeden Massenmarkers in dem Satz von Massenmarkern und/oder die Menge eines jeden Massenmarkers, welche an die Sonde gebunden ist, unterscheidet. Wie oben erwähnt, wird dies als "gemischte Form" der vorliegenden Erfindung bezeichnet, da die Sonden an eine Mischung von Massenmarkern gebunden werden können.

**[0096]** Wie oben erwähnt, stellt die vorliegende Erfindung ein Analyseverfahren bereit, welches Verfahren das Nachweisen eines Analyten durch die Identifizierung eines Massenmarkers oder einer Kombination von Massenmarkern, welcher bzw. welche dem Analyten zuordenbar ist, mittels Massenspektrometrie umfasst, wobei der Massenmarker ein Massenmarker aus einem Satz oder einer Reihe von Massenmarkern, wie oben definiert, ist. Die Art des Verfahrens ist nicht besonders begrenzt, vorausgesetzt, dass das Verfahren von der Verwendung der Massenmarker der vorliegenden Erfindung, um einen Analyten zu identifizieren, profitiert. Das Verfahren kann zum Beispiel ein Verfahren zur Sequenzierung einer Nucleinsäure oder ein Verfahren zum Erstellen eines Expressionsprofils eines Gens oder mehrerer Gene durch das Nachweisen der Mengen an Protein in einer Probe sein. Das Verfahren ist besonders vorteilhaft, weil es angewendet werden kann, um eine Vielzahl von Analyten in einfacher Weise gleichzeitig zu analysieren. Jedoch weist das Verfahren auch Vorteile im Hinblick auf die individuelle Analyse einzelner Analyte auf, weil unter Verwendung der vorliegenden Massenmarker Massenspektren erzeugt werden, welche eindeutiger als herkömmliche Spektren sind, wodurch das Verfahren genauer und empfindlicher wird.

**[0097]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren bereit, welches Verfahren umfasst:

(a) Inkontaktbringen eines oder mehrerer Analyten mit einem Satz von Sonden oder einer Reihe von Sonden, wobei jede Sonde in dem Satz oder in der Reihe für mindestens einen Analyten spezifisch ist, und wobei die Sonden wie oben definiert sind,

(b) Identifizieren eines Analyten durch das Nachweisen der Sonde, welche für den Analyt spezifisch ist.

**[0098]** In dieser Ausführungsform wird bevorzugt, dass der Massenmarker von der Sonde abgespalten wird, bevor der Massenmarker mittels Massenspektrometrie nachgewiesen wird.

**[0099]** Die Art der Verfahren dieser besonderen Ausführungsform ist nicht besonders begrenzt. Jedoch wird bevorzugt, dass das Verfahren das Inkontaktbringen einer oder mehrerer Nucleinsäuren mit einem Satz von Hybridisierungssonden umfasst. Der Satz von Hybridisierungssonden umfasst typischerweise einen Satz von bis zu 256 4-Meren, wobei jede Sonde in dem Satz eine andere Kombination von Nucleinsäurebasen aufweist. Dieses Verfahren kann für den Nachweis der Anwesenheit von Zielnucleinsäuren geeignet sein oder kann alternativ in einem stufenweisen Verfahren zur Sequenzierung einer oder mehrerer Nucleinsäure-Matrizen mittels Primerextension angewendet werden.

**[0100]** Die Massenmarker der vorliegenden Erfindung sind für die Verwendung in zweidimensionalen Analyseverfahren besonders geeignet, was in erster Linie auf die große Zahl von Markern zurückzuführen ist, welche gleichzeitig unterschieden werden können. Die Marker können daher in einem zweidimensionalen Gelelektrophoreseverfahren oder in einem zweidimensionalen massenspektrometrischen Verfahren verwendet werden.

## Peptidsynthese

**[0101]** Die Synthese vieler Beispiele der Peptidmassenmarker dieser Erfindung ist unter Verwendung von herkömmlichen Peptidsyntheseverfahren und kommerziell erhältlichen Reagenzien möglich. Modifizierte Aminosäuren, welche kommerziell nicht erhältlich sind, werden ebenfalls für die Synthese anderer Peptidmassenmarker in Betracht gezogen.

**[0102]** Die moderne Peptidsynthese wird typischerweise an Festphasenträgern in automatisierten Synthesegeräten durchgeführt, worin alle notwendigen Reagenzien für jeden Schritt einer Peptidsynthese an dem festen Träger bereitgestellt werden und verbrauchte Reagenzien sowie unverbrauchte überschüssige Reagenzien am Ende eines jeden Schrittes in dem Zyklus entfernen werden. Die Festphasen-Peptidsynthese wird jedoch häufig manuell ausgeführt, insbesondere dann, wenn spezifische Reagenzien zum ersten Male getestet werden sollen. Im Wesentlichen beinhaltet die Peptidsynthese die Anlagerung von N-geschützten Aminosäuren an den festen Träger. Das Peptid wird normalerweise derart synthetisiert, dass die C-terminale Carboxylgruppe des Peptids an den Träger gebunden ist, wobei die Sequenz des Peptids ausgehend von der C-terminalen Aminosäure bis zu der N-terminalen Aminosäure zusammengesetzt wird. Die C-terminale Aminosäure wird über eine spaltbare Bindung an den Träger gekoppelt. Die N-geschützte α-Aminogruppe jeder Aminosäure wird entschützt, um die Kopplung der Carboxylgruppe der nächsten Aminosäure an das wachsende Peptid an dem festen Träger zu ermöglichen. Für die meisten Zwecke wird die Peptidsynthese mit Hilfe eines von zwei unterschiedlichen Verfahren durchgeführt, welche Verfahren sich im Hinblick auf die Bedingungen unterscheiden, welche erforderlich sind, um die N-Schutzgruppe zu entfernen. Die tert-Butyloxycarbonylgruppe (t-Boc) wird unter milden sauren Bedingungen abgespalten, z. B. Trifluoressigsäure in Dichlormethan, während die Fluorenylmethoxycarbonylgruppe (Fmoc) unter milden basischen Bedingungen, z. B. 20% Piperidin in Dimethylformamid, abgespalten wird. Reaktive Seitenketten in den Aminosäuren müssen während den Zyklen der Bildung einer Amidbindung ebenfalls geschützt werden. Diese Seitenketten schließen die ε-Aminogruppe von Lysin, die Guanidino-Seitenkette von Arginin, die Thiol-Funktionalität von Cystein, die Hydroxyl-Funktionalitäten von Serin, Threonin und Tyrosin, den Indolring von Tryptophan und den Imidazolring von Histidin ein. Die Auswahl der Schutzgruppen, welche zum Schutz der Seitenketten verwendet werden, wird durch die Bedingungen zur Abspaltung der α-Amino-Schutzgruppen bestimmt, da die Seitenketten-Schutzgruppen unter den Entschützungsbedingungen, um die α-Amino-Schutzgruppen zu entfernen, beständig sein müssen. Eine erste Schutzgruppe ist 'orthogonal' zu einer zweiten Schutzgruppe angeordnet, falls die erste Schutzgruppe unter den Bedingungen, welche zum Entschützen der zweiten Schutzgruppe verwendet werden, gegenüber einer Entschützung beständig ist, und falls unter den Bedingungen zum Entschützen der ersten Schutzgruppe keine Entschützung der zweiten Schutzgruppe hervorgerufen wird.

**[0103]** Beispiele für Seitenketten-Schutzgruppen, welche mit Fmoc-Synthesegeräten kompatibel sind, sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3

Seitenkette	Schutzgruppe
ε-Aminogruppe von Lysin	t-Boc-Gruppe
Guanidino-Funktionalität von Arginin	Nitrogruppe oder 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonylgruppe
Imidazolring von Histidin	τ-Tritylgruppe oder π-Benzylloxymethylgruppe (Bom)
Hydroxyl-Funktionalitäten von Serin, Threonin und Tyrosin	tert-Butylgruppe
Indolring von Tryptophan	t-Boc
Thiol-Funktionalität von Cystein	Trityl- oder Benzylgruppe
Amid-Funktionalitäten von Glutamin und Asparagin	Gewöhnlich nicht erforderlich, wobei aber zum Beispiel eine Tritylgruppe verwendet werden kann
Carbonsäure-Funktionalitäten von Glutaminsäure und Asparaginsäure	tert-Butylgruppe
Thioether von Methionin	Zuweilen geschützt als Sulfoxid

**[0104]** Andere Seitenketten-Schutzgruppen, welche orthogonal zu einer Fmoc-Schutzgruppe angeordnet

sind, sind dem Fachmann bekannt und können in Verbindung mit dieser Erfindung verwendet werden (vgl. zum Beispiel Fields G. B. & Noble R. L., Int. J. Pept. Protein Res. 35 (3) (1990), 161–214, "Solid Phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids").

**[0105]** Schutzgruppen für reaktive Seitenketten-Funktionalitäten, welche mit einer t-Boc-Synthese kompatibel sind, sind nachstehend in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4

Seitenkette	Schutzgruppe
$\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin	Benzylloxycarbonyl (Z)-Gruppe
Guanidino-Funktionalität von Arginin	Gewöhnlich nicht erforderlich, wobei aber eine Nitrierung verwendet werden kann
Imidazolring von Histidin	$\pi$ -Benzylloxymethyl (Bom)-Gruppe
Hydroxyl-Funktionalitäten von Serin, Threonin und Tyrosin	Benzylgruppe
Hydroxyl-Funktionalität von Tyrosin	2-Brombenzylloxycarbonylgruppe
Indolring von Tryptophan	Gewöhnlich nicht erforderlich
Thiol-Funktionalität von Cystein	Benzylgruppe
Amid-Funktionalitäten von Glutamin und Asparagin	Gewöhnlich nicht erforderlich
Carbonsäure-Funktionalitäten von Glutaminsäure und Asparaginsäure	Benzylestergruppe
Thioether von Methionin	Zuweilen geschützt als Sulfoxid

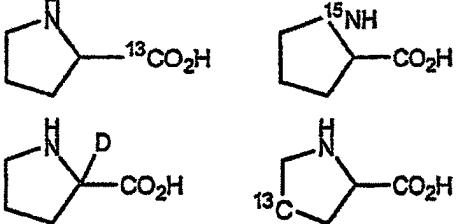
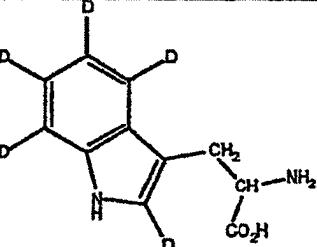
**[0106]** Wiederum sind dem Fachmann andere Schutzgruppen zur Verwendung in Verbindung mit reaktiven Seitenketten bekannt, welche orthogonal zu einer t-Boc- $\alpha$ -Amino-Schutzgruppe angeordnet sind. Verschiedene andere feste Träger und Harze sind im Handel für die Peptidsynthese unter Anwendung entweder eines Fmoc- oder eines t-Boc-Verfahrens erhältlich (für eine Übersicht über feste Träger vgl. Meldal M., Methods Enzymol. 289 (1997), 83–104, "Properties of solid supports").

#### Massenmodifizierte Aminosäuren

**[0107]** Eine Vielzahl von Aminosäuren kann in der Massenmarkergruppe und der Massennormalisierungsgruppe verwendet werden. Neutrale Aminosäuren werden in der Massennormalisierungsgruppe bevorzugt, und geladene Aminosäuren werden in den Massenmarkergruppen bevorzugt (da auf diese Weise die Ionisierung begünstigt wird und die Empfindlichkeit erhöht wird), welche z. B. in der Position vorliegen, die als Aminosäure 1 bzw. Aminosäure 2 in der ersten und vierten Ausführungsform dieser Erfindung gekennzeichnet ist. Eine Reihe von kommerziell erhältlichen, isotopisch massenmodifizierten Aminosäuren ist nachstehend in Tabelle 5 angegeben. Eine Kombination von 1, 2, 3 oder 4 oder mehr Aminosäuren aus dieser Liste wird in einer jeden der erfindungsgemäßen Gruppen bevorzugt.

Tabelle 5

Aminosäure	Isotopenformen				
Alanin	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{CH}_3^{13}\text{CH}({}^{15}\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{CD}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{CD}_3\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , ${}^{13}\text{CH}_3{}^{13}\text{CH}({}^{15}\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$	$\text{CH}_3\text{CD}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{CD}_3\text{CD}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{CD}_3{}^{13}\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ ,			
Arginin	$[({}^{15}\text{NH}_2)_2\text{CNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}]^+$				
Asparagin	$\text{H}_2\text{N}^{13}\text{COCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2\text{N}^{13}\text{CO}{}^{13}\text{CH}_2{}^{13}\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2{}^{15}\text{NCOCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2{}^{15}\text{NCO}{}^{13}\text{CH}_2{}^{15}\text{NH}_2\text{CO}_2\text{H}$				
Asparaginsäure	$\text{HO}_2{}^{13}\text{CCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}_2\text{CCH}_2{}^{13}\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}_2{}^{13}\text{C}{}^{13}\text{CH}_2{}^{13}\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}_2{}^{13}\text{C}{}^{13}\text{CH}_2{}^{13}\text{CH}({}^{15}\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{CH}({}^{15}\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{CH}({}^{15}\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$				
Cystein	Nicht erhältlich				
Glutaminsäure	$\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}_2\text{CCH}_2{}^{13}\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}_2\text{C}{}^{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}_2{}^{13}\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}_2{}^{13}\text{C}{}^{13}\text{CH}_2{}^{13}\text{CH}({}^{15}\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}_2\text{CCD}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}_2{}^{13}\text{C}{}^{13}\text{CH}_2{}^{13}\text{CH}({}^{15}\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$				
Glutamin	$\text{H}_2\text{NCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2\text{N}^{13}\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2\text{NCOC}_2\text{CD}_2\text{CD}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2{}^{15}\text{NCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2\text{NCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}({}^{15}\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2{}^{15}\text{NCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}({}^{15}\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2{}^{15}\text{N}^{13}\text{CO}{}^{13}\text{CH}_2{}^{13}\text{CH}_2{}^{13}\text{CH}({}^{15}\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$				
Glycin	$\text{H}_2\text{NCH}_2{}^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2\text{NCD}_2\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2{}^{15}\text{NCH}_2{}^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2{}^{15}\text{N}^{13}\text{CH}_2{}^{13}\text{CO}_2\text{H}$	$\text{H}_2\text{N}^{13}\text{CH}_2{}^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2{}^{15}\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2{}^{15}\text{N}^{13}\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$			
Histidin	$(\text{CH})_2\text{N}_2\text{CCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $(\text{CH})_2\text{N}_2\text{CCH}_2\text{CH}({}^{15}\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $(\text{CH})_2{}^{15}\text{N}_2\text{CCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$				
Isoleucin	Nicht erhältlich				
Leucin	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2{}^{13}\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $(\text{CH}_3)_2\text{CHCD}_2\text{CD}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{CO}_2\text{H}$ , $(\text{CD}_3)_2\text{CDCD}_2\text{CD}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $(\text{CD}_3)_2\text{CDCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}({}^{15}\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$				
Lysin	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2{}^{13}\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2\text{N}^{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2{}^{13}\text{CH}({}^{15}\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CD}_2\text{CD}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2\text{NCD}_2\text{CD}_2\text{CD}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$				

	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2^{15}\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2^{15}\text{N}^{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$
Methionin	$\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2^{13}\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $^{13}\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CD}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{CD}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2^{15}\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $^{13}\text{CD}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2^{13}\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$
Phenylalanin	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2^{13}\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $^{13}\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CD}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{C}_6\text{H}_5\text{CD}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{C}_6\text{D}_5\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{C}_6\text{D}_5\text{CD}_2\text{CD}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)^{15}\text{CO}_2\text{H}$
Prolin	
Serin	$\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}^{13}\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HOCH}_2^{13}\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}^{13}\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)^{15}\text{CO}_2\text{H}$
Threonin	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$
Tryptophan	
Tyrosin	$\text{HO}(\text{C}_6\text{H}_4)\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}(\text{C}_6\text{H}_4)\text{CH}_2^{13}\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}(\text{C}_6\text{H}_4)^{13}\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}(\text{C}_6\text{H}_4)^{13}\text{CH}_2^{13}\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}(\text{C}_6\text{H}_4)^{13}\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}(\text{C}_6\text{H}_4)^{13}\text{CH}_2^{13}\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}(\text{C}_6\text{H}_4)\text{CD}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}(\text{C}_6\text{D}_2\text{H}_2)\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}(\text{C}_6\text{D}_4)\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}(\text{C}_6\text{H}_4)\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)^{15}\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}^{17}\text{O}(\text{C}_6\text{H}_4)\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{H}^{18}\text{O}(\text{C}_6\text{H}_4)\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}(\text{C}_6\text{H}_4)\text{CH}_2^{13}\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{HO}(\text{C}_6\text{H}_4)^{13}\text{CH}_2^{13}\text{CH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$
Valin	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}(\text{NH}_2)^{13}\text{CO}_2\text{H}$ , $(\text{CH}_3)_2\text{CH}^{13}\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $(\text{CH}_3)_2\text{CHCD}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $(\text{CD}_3)_2\text{CDCD}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}(\text{NH}_2)^{15}\text{CO}_2\text{H}$

**[0108]** Für viele der vorstehenden Aminosäuren sind sowohl die D- als auch die L-Formen erhältlich (zum Beispiel von ISOTEC Inc., Miamisburg, Ohio), welche beide bei der Herstellung der Marker dieser Erfindung verwendet werden können. Mischungen von D- und L-Formen sind ebenfalls erhältlich, aber werden weniger bevorzugt, wenn die Marker dieser Erfindung in chromatographischen Trennverfahren verwendet werden sollen. Für einige Anwendungen stehen auch Fmoc- oder t-Boc-geschützte Derivate zur Verfügung.

**[0109]** Massenmodifizierte Aminosäuren, welche auf der Substitution von Wasserstoff durch Deuterium und der Substitution von  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{N}$ -Isotopen durch  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Isotope basieren, sind ebenfalls erhältlich und können in gleicher Weise für die Synthese der Marker dieser Erfindung verwendet werden. Verschiedene Aminosäuren, die typischerweise nicht in Peptiden vorkommen, können ebenfalls in den Marker dieser Erfindung verwendet werden; zum Beispiel sind deuterierte Formen von Aminobuttersäure im Handel erhältlich. Für die Zwecke dieser Erfindung werden nicht radioaktive, stabile Isotope aus Sicherheitsgründen bevorzugt, wobei die Erfindung aber nicht notwendigerweise auf stabile Isotope begrenzt ist.

**[0110]** Fluorierte Derivate einer Reihe von Aminosäuren sind ebenfalls erhältlich. Einige der kommerziell erhältlichen fluorierten Aminosäuren sind nachstehend in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6

Aminosäure	Fluorierte Formen
Glutaminsäure	<chem>HO2CCFHCH2CH(NH2)CO2H</chem>
Leucin	<chem>(CH3)(CH3)CHCH2CH(NH2)CO2H</chem>
Phenylalanin	<chem>C6F4CH2CH(NH2)CO2H</chem> , <chem>C6F2H3CH2CH(NH2)CO2H</chem> , <chem>C6F3H2CH2CH(NH2)CO2H</chem>
Phenylglycin	<chem>C6F4CH(NH2)CO2H</chem> , <chem>C6F2H3CH(NH2)CO2H</chem> , <chem>C6F3H2CH(NH2)CO2H</chem>
Valin	<chem>(CH3)2CFCH(NH2)CO2H</chem>

**[0111]** Für die meisten der vorstehenden fluorierten Aminosäuren sind die Reagenzien als Mischungen von D- und L-Formen erhältlich. Im Allgemeinen werden fluorierte Varianten von Aminosäuren weniger bevorzugt als isotopensubstituierte Varianten. Die fluorierten Verbindungen können verwendet werden, um eine Reihe von Massenmarkern zu erzeugen, welche dieselbe Masse haben, wobei jeder Marker aber chemisch verschieden ist, was bedeutet, dass ihr Verhalten in einem Massenspektrometer stärker variiert als das Verhalten von isotopensubstituierten Marker. Ferner weisen die Marker unterschiedliche chromatographische Eigenschaften auf, falls die Marker in chromatographischen Trennverfahren verwendet werden sollen.

#### Reaktive Funktionalitäten

**[0112]** Gemäß einigen Aspekten dieser Erfindung, wie bereits erläutert, umfassen die Massenmarker der Erfindung eine reaktive Funktionalität. In den einfachsten Ausführungsformen kann diese ein N-Hydroxysuccinimidester sein, welcher durch die Aktivierung des C-Terminus der Markerpeptide dieser Erfindung eingeführt wird. Bei der herkömmlichen Peptidsynthese ist es erforderlich, dass dieser Aktivierungsschritt ausgeführt wird, nachdem der Peptidmassenmarker von dem festen Träger, welcher für die Synthese davon verwendet wird, abgespalten worden ist. Ein N-Hydroxysuccinimidester-aktivierter Peptidmassenmarker könnte auch mit Hydrazin umgesetzt werden, um eine reaktive Hydrazin-Funktionalität zu erhalten, die zum Beispiel verwendet werden, um Zuckergruppen zu markieren, welche mit Periodat oxidiert wurden. Aminogruppen oder Thiole können bei einigen Anwendungen als reaktive Funktionalitäten verwendet werden und können durch den Einbau eines Lysin- oder Cysteinrestes im Anschluss an die Aminosäure 2 des Markerpeptids eingeführt werden können. Lysin kann verwendet werden, um Marker unter Verwendung eines Carbodiimids als ein Kopplungsreagens an freie Carboxyl-Funktionalitäten zu koppeln. Lysin kann auch als Ausgangspunkt verwendet werden, um andere reaktive Funktionalitäten in die Markerpeptide dieser Erfindung einzuführen. Die Thiolreaktive Maleimid-Funktionalität kann durch die Umsetzung der ε-Aminogruppe von Lysin mit Maleinsäureanhydrid eingeführt werden. Die Thiolgruppe des Cysteinrestes kann als Ausgangspunkt für die Synthese einer Vielzahl von Alkenylsulfonverbindungen verwendet werden, welche nützliche Protein-Markierungsreagenzien sind, die mit Thiolen und Aminen reagieren. Verbindungen wie Aminohexansäure können verwendet werden, um eine Abstandsgruppe zwischen den massenmodifizierten Aminosäuren und der reaktiven Funktionalität vorzusehen.

#### Liganden für eine Affinitätsabfangreaktion

**[0113]** In bestimmten Ausführungsformen gemäß dem ersten Aspekt dieser Erfindung umfassen die Massenmarker einen Liganden für eine Affinitätsabfangreaktion. Liganden für eine Affinitätsabfangreaktion sind Liganden, welche hochspezifische Bindungspartner haben. Diese Bindungspartner erlauben, dass Moleküle, die mit dem Liganden markiert sind, durch den Bindungspartner selektiv abgefangen werden können. Vorzugsweise wird ein fester Träger mit dem Bindungspartner derivatisiert, so dass die mit dem Affinitätsliganden markierten Moleküle an dem Festphasenträger selektiv abgefangen werden können. Ein bevorzugter Ligand für eine Affinitätsabfangreaktion ist Biotin, welches durch Standardverfahren, welche auf dem Fachgebiet bekannt sind, in die Peptidmassenmarker dieser Erfindung eingeführt werden kann. Insbesondere kann ein Lysinrest im Anschluss an die Aminosäure 2 eingeführt werden, mit dessen Hilfe ein aminreaktives Biotin an die Peptidmassenmarker gebunden werden kann (vgl. zum Beispiel Geahlen R. L. et al., Anal. Biochem. 202 (1) (1992), 67–68, "A general method for preparation of peptides biotinylated at the carboxy terminus"; Sawutz D. G. et al., Peptides 12 (5) (1991), 1012–1019, "Synthesis and molecular characterization of a biotinylated analog of [Lys]bradykinin"; Natarajan S. et al., Int. J. Pept. Protein Res. 40 (6) (1992), 567–567, "Site-specific biotinylation. A novel approach and its application to endothelin-1 analogs and PHT-analog"). Iminobiotin ist ebenfalls geeignet. Eine Vielzahl von Avidin-Gegenliganden für Biotin ist erhältlich, welche monomeres und tetrameres Avidin und Streptavidin umfassen, wobei diese Gegenliganden alle auf einer Reihe von festen Träger erhältlich

sind.

**[0114]** Andere Liganden für eine Affinitätsabfangreaktion schließen Digoxigenin, Fluorescein, Nitrophenylgruppen und eine Reihe von Peptidepitopen, wie zum Beispiel das c-myc-Epitop, für welches selektive monoklonale Antikörper zur Verfügung stehen, als Gegenliganden ein. Metallionen bindende Liganden, wie zum Beispiel Hexahistidin, welches ohne Weiteres Ni<sup>2+</sup>-Ionen bindet, sind ebenfalls geeignet. Zum Beispiel sind im Handel Chromatographieharze erhältlich, welche Iminodiessigsäure-chelatierte Ni<sup>2+</sup>-Ionen enthalten. Diese immobilisiertes Nickel enthaltenden Säulen können verwendet werden, um Peptidmassenmarker abzufangen, welche Histidin-Oligomere umfassen. Alternativ kann eine Funktionalität für eine Affinitätsabfangreaktion mit einem geeignet derivatisierten Festphasenträger selektiv reaktiv sein. Zum Beispiel ist bekannt, dass Boronsäure mit vizinalen cis-Diolen und chemisch ähnlichen Liganden, wie Salicylhydroxaminsäure, selektiv reagiert. Boronsäure umfassende Reagenzien sind zum Abfangen von Proteinen an festen Trägern, derivatisiert mit Salicylhydroxaminsäure, entwickelt worden (Stolowitz M. L. et al., Bioconjug. Chem. 12 (2) (2001), "Phenylboronic acid-salicylhydroxamic acid bioconjugates. 1. A novel boronic acid complex for Protein immobilization"; Wiley J. P. et al., Bioconjug. Chem. 12 (2) (2001), 240–250, "Phenylboronic acid-salicylhydroxamic acid bioconjugates. 2. Polyvalent immobilization of Protein ligands for affinity chromatography", Prolinx, Inc., Staat Washington, USA). Es wird davon ausgegangen, dass es verhältnismäßig einfach sein sollte, eine Phenylboronsäure-Funktionalität an einen Peptidmassenmarker dieser Erfindung zu binden, um Afbangreagenzien herzustellen, welche durch selektive chemische Reaktionen abgefangen werden können. Die Verwendung dieser Art einer chemischen Reaktion wäre mit Biomolekülen, welche vizinale cis-Diole enthaltende Zucker tragen, nicht direkt vereinbar; jedoch könnten diese Arten von Zuckern mit Phenylboronsäure oder verwandten Reagenzien vor der Umsetzung mit Boronsäurederivatisierten Peptidmassenmarker-Reagenzien blockiert werden.

Die Empfindlichkeit erhöhende Gruppen und Massendifferenzierung mittels Massenspektrometrie

**[0115]** In bevorzugten Ausführungsformen gemäß dem ersten und vierten Aspekt dieser Erfindung umfassen die Peptidmassenmarker eine die Empfindlichkeit erhöhende Gruppe. Die [Fig. 1](#) bis [Fig. 5](#) veranschaulichen die Verwendung einer Methylierung oder einer Guanidinierung als Verfahren zur Verbesserung der Empfindlichkeit. Zusätzlich können diese die Empfindlichkeit erhöhenden Gruppen die Fragmentierungsprodukte der N-terminalen Aminosäure von den Fragmentierungsprodukten der zweiten Aminosäure in dem Peptidmarker und den natürlichen Aminosäureresten in dem Protein unterscheiden, falls diese Aminosäure dieselbe Aminosäure wie die erste Aminosäure ist. Die Empfindlichkeit erhöhende Gruppe kann auch die Fragmentierungsprodukte der N-terminalen Aminosäure des Peptidmassenmarkers von den Fragmentierungsprodukten der natürlichen Aminosäuren unterscheiden, wenn die Marker dieser Erfindung verwendet werden, um Peptide und Proteine zu markieren. Die Guanidinogruppe und die tertiäre Aminogruppe sind beide als die Empfindlichkeit erhöhende Gruppen für eine Elektrospray-Massenspektrometrie nützlich.

**[0116]** Verschiedene andere Verfahren zur Derivatisierung von Peptiden sind ebenfalls entwickelt worden. Diese schließen die Verwendung von quaternären Ammoniumderivaten, quaternären Phosphoniumderivaten und Pyridylderivaten für die Positiv-Ionen-Massenspektrometrie ein. Halogenierte Verbindungen, insbesondere halogenierte aromatische Verbindungen, sind gut bekannte Elektrophore, d. h. sie nehmen sehr leicht thermische Elektronen auf. Eine Vielzahl von Derivatisierungsreagenzien auf der Basis von fluorierten aromatischen Verbindungen (Bian N. et al., Rapid Commun. Mass. Spectrom. 11 (16) (1997), 1781–1784, "Detection via laser desorption and mass spectrometry of multiplex electrophore-labelled albumin") sind für den Nachweis durch Elektroneneinfang entwickelt worden, welcher ein hochempfindlicher Ionisierungs- und Nachweisprozess ist, der in Verbindung mit einer Negativ-Ionen-Massenspektrometrie verwendet werden kann (Abdel-Baky S. und Giese R. W., Anal. Chem. 63 (24) (1991), 2986–2989, "Gas chromatography/electron capture negative-ion mass spectrometry at the zeptomole level"). Eine fluorierte aromatische Gruppe könnte ebenfalls als eine die Empfindlichkeit erhöhende Gruppe verwendet werden. Aromatische Sulfonsäuren sind ebenfalls zur Verbesserung der Empfindlichkeit bei der Negativ-Ionen-Massenspektrometrie verwendet worden.

**[0117]** Jeder Typ der die Empfindlichkeit erhöhenden Gruppe hat verschiedene Vorteile, welche von dem angewendeten Ionisierungsverfahren und den anwendeten Verfahren zur Massenanalyse abhängen. Der Mechanismus, durch den die Empfindlichkeit erhöht wird, kann für jede Art von Gruppe ebenfalls unterschiedlich sein. Einige Derivatisierungsverfahren erhöhen die Basizität und begünstigen auf diese Weise die Protonierung und die Ladungskalisierung, während andere Verfahren die Oberflächenaktivität der markierten Peptide erhöhen, wodurch die Empfindlichkeit von Oberflächen-Desorptionstechniken wie bei einer Matrix-unterstützten Laserdesorption/Ionisation (MALDI) und einem schnellen Atombeschuss (FAB) erhöht wird. Die Negativ-Ionen-Massenspektrometrie ist häufig empfindlicher, da das Hintergrundrauschen geringer ist. Eine Veränderung der Ladung durch Derivatisierung kann auch die Fragmentierungsprodukte der derivatisierten Peptide

verändern, wenn eine kollisionsinduzierte Dissoziation angewendet wird. Insbesondere werden durch einige Derivatisierungstechniken die Fragmentierungsmuster vereinfacht, was besonders vorteilhaft ist. Die Auswahl einer die Empfindlichkeit erhöhenden Gruppe wird durch die massenspektrometrischen Techniken, welche verwendet werden, bestimmt (für eine Übersicht vgl. Roth et al., Mass Spectrometry Reviews 17 (1998), 255–274, "Charge derivatization of peptides for analysis by mass spectrometry"). Für die Zwecke dieser Erfindung können alle der bekannten Derivatisierungstechniken in Verbindung mit den Peptidmassenmarkern dieser Erfindung verwendet werden. Die veröffentlichten Protokolle können ohne eine Modifikation verwendet werden, um die Peptidmassenmarker dieser Erfindung im Anschluss an eine Festphasen-Peptidsynthese zu derivatisieren, oder können die Protokolle gegebenenfalls für die Verwendung bei einer Festphasen-Peptidsynthese in einfacher Weise angepasst werden.

### Analyse von Peptiden mittels Massenspektrometrie

**[0118]** Die wesentlichen Merkmale eines Massenspektrometers sind wie folgt:  
Einlasssystem → Ionenquelle → Massenanalysator → Ionendetektor → Datenerfassungssystem

**[0119]** Es gibt bevorzugte Einlasssysteme, Ionenquellen und Massenanalysatoren zum Zwecke der Analyse von Peptiden.

#### Einlasssysteme

**[0120]** Gemäß dem zweiten Aspekt dieser Erfindung wird ein chromatographisches oder elektrophoretisches Trennverfahren bevorzugt, um die Komplexität der Probe vor der Analyse mittels Massenspektrometrie zu reduzieren. Eine Vielzahl von massenspektrometrischen Techniken sind mit bestimmten Trenntechniken, insbesondere der Kapillarzonenelektrophorese und der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), kompatibel. Die Auswahl der Ionenquelle ist zum Teil begrenzt, wenn eine Auftrennung erforderlich ist, da Ionisierungstechniken wie MALDI und FAB (nachstehend besprochen), bei welchen Material von einer festen Oberfläche abgedampft wird, für chromatographische Trennverfahren weniger geeignet sind. Für die meisten Zwecke ist es sehr aufwändig gewesen, eine chromatographische Trennung mit einer massenspektrometrischen Analyse durch eine dieser Techniken zu kombinieren. Dynamische FAB- und Ionisierungstechniken, welche auf einer Verdampfung wie einer elektrischen Verdampfung, thermischen Verdampfung und APCI basieren, sind alle ohne Weiteres mit einer nachgeschalteten chromatographischen Trennung kompatibel, wobei Gerätschaften für die Durchführung einer solchen Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Analyse im Handel erhältlich sind.

#### Ionisierungstechniken

**[0121]** Für viele biologische Anwendungen der Massenspektrometrie werden sogenannte 'weiche' Ionisierungstechniken verwendet. Diese ermöglichen, dass große Moleküle wie Proteine und Nucleinsäuren in einer im Wesentlichen intakten Form ionisiert werden können. Die Flüssigphasentechniken erlauben, dass große Biomoleküle in Form von Lösungen mit einem mildem pH und in niedrigen Konzentrationen in das Massenspektrometer eingebracht werden können. Eine Reihe von Techniken ist zur Verwendung in Verbindung mit dieser Erfindung geeignet, einschließlich, aber nicht begrenzt auf, die Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS), der schnelle Atombeschuss (FAB), die Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation-Massenspektrometrie (MALDI-MS) und die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck-Massenspektrometrie (APCI-MS).

#### Elektrospray-Ionisation

**[0122]** Die Elektrospray-Ionisation setzt voraus, dass die verdünnte Lösung des Analytmoleküls in einer 'zerstäubten' Form, d. h. als ein feiner Sprühnebel, in das Spektrometer eingebracht wird. Die Lösung wird zum Beispiel durch die Spitze einer geladenen Nadel in einen Strom von wasserfreiem Stickstoff und ein elektrostatisches Feld zerstäubt. Der Ionisierungsmechanismus ist nicht vollständig verstanden, aber es wird davon ausgegangen, dass er im Allgemeinen wie folgt funktioniert. In einem Strom von Stickstoff wird das Lösungsmittel verdampft. Bei einem kleinen Tropfen hat dies eine Konzentration des Analytmoleküls zur Folge. In Anbetracht der Tatsache, dass die meisten Biomoleküle eine Nettoladung besitzen, wird dadurch die elektrostatische Abstoßung des gelösten Moleküls erhöht. Während die Verdampfung andauert, wird diese Abstoßung schließlich größer als die Oberflächenspannung des Tropfens und der Tropfen zerfällt in kleinere Tröpfchen. Dieser Prozess wird zuweilen als 'Coulomb-Explosion' bezeichnet. Das elektrostatische Feld trägt zusätzlich dazu bei, die Oberflächenspannung der Tropfen zu überwinden und den Zerstäubungsprozess zu begünstigen. Die Verdampfung dauert bei den kleineren Tröpfchen an, welche wiederum wiederholt zerplatzen, bis die

Biomoleküle, wie auch das gesamte Lösungsmittel, im Wesentlichen in der Dampfphase vorliegen. Dieses Technik ist in Verbindung mit der Verwendung von Massenmarkern besonders wichtig, da bei dieser Technik eine relativ geringe 'Energiemenge bei dem Ionisierungsprozess auf die Ionen übertragen wird und die Energieverteilung innerhalb einer Population tendenziell innerhalb eines engeren Bereichs liegt, verglichen mit anderen Techniken. Die Ionen werden unter Verwendung von elektrischen Feldern, welche durch geeignet positionierte Elektroden aufgebaut werden, aus der Ionisierungskammer heraus beschleunigt. Die Polarität der Felder kann verändert werden, um entweder negative oder positive Ionen zu gewinnen. Der Potenzialunterschied zwischen diesen Elektroden bestimmt, ob positive oder negative Ionen in den Massenanalysator eingetragen werden, und auch die kinetische Energie, mit welcher diese Ionen in das Massenspektrometer eintreten. Dies ist im Hinblick auf die Fragmentierung der Ionen in dem Massenspektrometer von Bedeutung. Je mehr Energie auf eine Population von Ionen übertragen wird, um so wahrscheinlicher ist es, dass die Fragmentierung durch eine Kollision der Analytmoleküle mit dem Badegas, welches innerhalb der Quelle vorhanden ist, erfolgt. Durch die Anpassung des elektrischen Feldes, welches verwendet wird, um die Ionen aus der Ionisierungskammer heraus zu beschleunigen, ist es möglich, die Fragmentierung der Ionen zu kontrollieren. Dies ist vorteilhaft, wenn die Fragmentierung von Ionen als ein Mittel zur Entfernung von Markern aus einem markierten Biomolekül angewendet wird. Die Electrospray-Ionisation ist besonders vorteilhaft, da sie in Verbindung mit einer Flüssigchromatographie, bezeichnet als Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS), verwendet werden kann.

#### Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation (MALDI)

**[0123]** Die MALDI-Technik setzt voraus, dass die Biomoleküllösung innerhalb eines großen molaren Überschusses einer durch Licht anregbaren 'Matrix' eingebettet ist. Der Einsatz von Laserlicht mit einer geeigneten Frequenz resultiert in der Anregung der Matrix, was wiederum eine schnelle Verdampfung der Matrix zusammen mit dem eingeschlossenen Biomolekül zur Folge hat. Der Protonentransfer von der sauren Matrix auf das Biomolekül werden protonierte Formen des Biomoleküls erhalten, welche durch eine Positiv-Ionen-Massenspektrometrie, insbesondere mittels Time-of-Flight (TOF)-Massenspektrometrie, detektiert werden können. Bei der MALDI-TOF ist auch eine Negativ-Ionen-Massenspektrometrie möglich. Bei dieser Technik wird eine wesentliche Menge von translatorischer Energie auf die Ionen übertragen, wobei aber dennoch keine übermäßige Fragmentierung hervorgerufen wird. Die Beschleunigungsspannungen können wiederum dazu verwendet werden, die Fragmentierung in Verbindung mit dieser Technik zu kontrollieren.

#### Schneller Atombeschuss

**[0124]** Der Begriff 'schneller Atombeschuss' (Fast Atom Bombardment, FAB) beschreibt eine Reihe von Techniken zur Verdampfung und Ionisierung von relativ unflüchtigen Molekülen. Bei diesen Techniken wird eine Probe durch die Kollision der Probe mit einem energiereichen Strahlenbündel von Xenonatomen oder Cäsiumionen von einer Oberfläche desorbiert. Die Probe wird zusammen mit einer einfachen Matrix, typischerweise einem nicht flüchtigen Material, z. B. m-Nitrobenzylalkohol (NBA) oder Glycerin, auf eine Oberfläche aufgebracht. FAB-Techniken sind auch mit Flüssigphasen-Einlasssystemen kompatibel, wobei die Flüssigkeit, welche aus einem Kapillarelektrophorese-Einlasssystem oder einem Hochdruckflüssigchromatographiesystem eluiert, eine Fritte passiert, wobei die Oberfläche der Fritte im Wesentlichen von der Analytlösung bedeckt ist, welche mittels Atombeschuss von der Oberfläche der Fritte ionisiert werden kann.

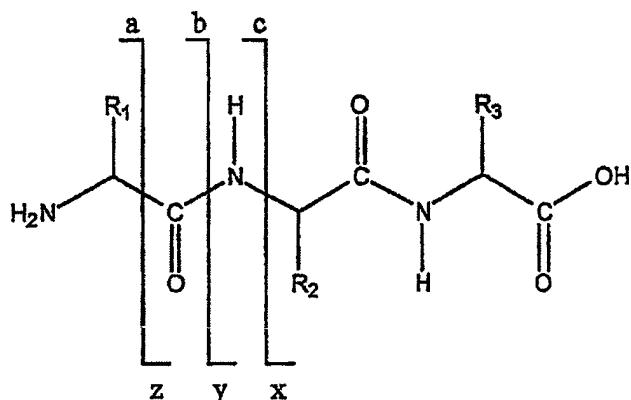
#### Massenanalysatoren

**[0125]** Die Fragmentierung von Peptiden durch eine kollisionsinduzierte Dissoziation wird in Verbindung mit dieser Erfindung verwendet, um die Marker der Proteine zu identifizieren. Verschiedene Massenanalysator-Geometrien können verwendet werden, um Peptide zu fragmentieren und um die Masse der Fragmente zu bestimmen.

#### MS/MS- und MS<sup>m</sup>-Analyse von Peptiden

**[0126]** Tandem-Massenspektrometer erlauben, dass Ionen mit einem vorher festgelegten Masse-zu-Ladung-Verhältnis selektiert und durch eine kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) fragmentiert werden können. Die Fragmente können dann detektiert werden, um strukturelle Informationen für das selektierte Ion vorzusehen. Wenn Peptide mittels CID in einem Tandem-Massenspektrometer analysiert werden, werden charakteristische Spaltungsmuster beobachtet, welche ermöglichen, dass die Sequenz des Peptids bestimmt werden kann. Natürliche Peptide fragmentieren typischerweise zufällig an den Amidbindungen des Peptidgrundgerüstes, wobei eine Reihe von Ionen erhalten wird, welche für das Peptid charakteristisch sind. CID-Fragmentrei-

hen werden mit  $a_n$ ,  $b_n$ ,  $c_n$ , etc. bezeichnet, entsprechend der Spaltung an der  $n$ -ten Peptidbindung, wenn die Ladung des Ions an dem N-terminalen Fragment des Ions beibehalten wird. In gleicher Weise werden Fragmentreihen mit  $x_n$ ,  $y_n$ ,  $z_n$ , etc. bezeichnet, wenn die Ladung an dem C-terminalen Fragment des Ions beibehalten wird.



**[0127]** Trypsin und Thrombin sind bevorzugte Spaltungsagenzien für die Tandem-Massenspektrometrie, da sie Peptide mit basischen Gruppen an beiden Enden des Moleküls, d. h. mit der  $\alpha$ -Aminogruppe an dem N-Terminus und mit Lysin- oder Arginin-Seitenketten an dem C-Terminus, erzeugen. Dies begünstigt die Bildung von zweifach geladenen Ionen, worin die geladenen Zentren an gegenüberliegenden Enden des Moleküls angeordnet sind. Diese zweifach geladenen Ionen sehen nach einer CID sowohl C-terminale als auch N-terminale Ionenreihen vor. Dadurch wird die Bestimmung der Sequenz des Peptids erleichtert. Im Allgemeinen werden nur eine oder zwei der möglichen Ionenreihen in den CID-Spektronen eines bestimmten Peptids beobachtet. Bei energiearmen Kollisionen, welche für Quadrupol-Instrumente typisch sind, überwiegt die b-Reihe der N-terminalen Fragmente oder die y-Reihe der C-terminalen Fragmente. Wenn zweifach geladene Ionen analysiert werden, dann werden häufig beide Reihen detektiert. Im Allgemeinen überwiegt die y-Ionenreihe gegenüber der b-Reihe.

**[0128]** Im Allgemeinen fragmentieren Peptide durch einen Mechanismus, welcher die Protonierung des Amid-Grundgerüsts, gefolgt durch einen intramolekularen nukleophilen Angriff, beinhaltet, was die Bildung einer 5-gliedrigen Oxazolonstruktur und die Spaltung der Amidbindung, welche protoniert wurde, zur Folge hat (Schlosser A. und Lehmann W. D., J. Mass Spectrom. 35 (2000), 1382–1390, "Five-membered ring formation in unimolecular reactions of peptides: a key structural element controlling low-energy collision induced dissociation"). [Fig. 16a](#) zeigt einen vorgeschlagenen Mechanismus für diese Art der Fragmentierung. Dieser Mechanismus setzt eine Carbonylgruppe von einer Amidbindung, welche einem protonierten Amid auf der N-terminalen Seite des protonierten Amids benachbart ist, voraus, um den nukleophilen Angriff auszuführen. Durch ein geladenes Oxazoloniumion werden Ionen der b-Reihe erhalten, während durch einen Protonentransfer von dem N-terminalen Fragment auf das C-terminale Fragment Ionen der y-Reihe erhalten werden, wie in [Fig. 16a](#) gezeigt ist. Die Erfordernis für eine geeignet angeordnete Carbonylgruppe wird nicht als Grund für die Spaltung von Amidbindungen angesehen, welche der N-terminalen Aminosäure benachbart sind, wenn der N-Terminus ungeschützt ist, wobei im Allgemeinen keine Ionen der b-Reihe für das Amid zwischen der N-terminalen und der zweiten Aminosäure in einem Peptid beobachtet werden. Jedoch werden durch Peptide mit acetylierten N-Termini die strukturellen Anforderungen für diesen Mechanismus nicht erfüllt, wobei die Fragmentierung an der Amidbindung unmittelbar nach der ersten Aminosäuren durch diesen Mechanismus erfolgen kann. Peptide mit thioacetylierten N-Termini, wie in [Fig. 16c](#) gezeigt, werden durch den Oxazolon-Mechanismus leicht gespalten, da das Schwefelatom nukleophiler als das Sauerstoffatom in der gleichen Position ist. Die Fragmentierung des Amid-Grundgerüsts eines Peptids kann durch die Methylierung des Grundgerüsts auch moduliert werden. Die Methylierung eines Amid-Stickstoffatoms in einem Peptid kann die Fragmentierung an der darauf folgenden Amidbindung, welche C-terminal zu dem methylierten Amid vorliegt, fördern und auch die Bildung von b-Ionen begünstigen. Die verstärkte Fragmentierung kann zum Teil auf den elektronenspendenden Effekt der Methylgruppe zurückzuführen sein, wodurch die Nukleophilie der Carbonylgruppe des methylierten Amids erhöht wird, während die vermehrte Bildung von b-Ionen ein Ergebnis der Unfähigkeit des gebildeten Oxazoloniumions, Protonen auf das C-terminale Fragment zu übertragen, wie in [Fig. 16c](#) gezeigt, sein kann. Im Zusammenhang mit dieser Erfindung kann die Thioacetylierung des N-Terminus eines Dipeptidmarkers dazu verwendet werden, die Spaltung des Peptidmarkers an der darauf folgenden Amidbindung zu verstärken. In gleicher Weise verstärkt auch eine Methylierung des Stickstoffatoms einer N-terminalen Acetyl- oder Thioacetylgruppe die Spaltung der benachbarten Amidbindung. Die [Fig. 17a](#) und [Fig. 17b](#) veranschaulichen Paare von Markern, bei welchen diese Methoden zur Verstärkung der Spaltung an der gekennzeichneten Amidbin-

dung zum Einsatz kommen.

**[0129]** Die Leichtigkeit der Fragmentierung des Amid-Grundgerüsts eines Polypeptids oder Peptids wird auch wesentlich durch die Seitenketten-Funktionalitäten des Peptids bestimmt. Folglich bestimmt die Sequenz eines Peptids, wo es am leichtesten fragmentiert. Im Allgemeinen ist es schwer vorherzusagen, welche Amidbindungen in einer Peptidsequenz leicht fragmentieren. Dies hat wichtige Auswirkungen auf die Konstruktion der Peptidmassenmarker dieser Erfindung. Allerdings sind bestimmte Beobachtungen gemacht worden, welche die Konstruktion von Peptidmassenmarker ermöglichen, die an der gewünschten Amidbindung fragmentieren. Zum Beispiel ist bekannt, dass Prolin die Fragmentierung an der N-terminalen Amidbindung davon begünstigt (Schwartz B. L. & Bursey M. M., Biol. Mass Spectrom. 21 (1997), 92), da die Fragmentierung an dem C-terminalen Amid eine energetisch ungünstige, gespannte, bicyclische Oxazolonstruktur zur Folge hat. Asparaginsäure begünstigt ebenfalls die Fragmentierung an der N-terminalen Amidbindung hiervon. Jedoch sind Asp-Pro-Bindungen bei einer niederenergetischen CID-Analyse besonders labil (Wysocki V. H. et al., J. Mass Spectrom. 35 (12) (2000), 1399–1406, "Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation"), wobei Asparaginsäure unter diesen Umständen anscheinend die Spaltung der Amidbindung auf der C-terminalen Seite davon begünstigt. Daher können Prolin- und Asp-Pro-Bindungen in den Peptidmarkern dieser Erfindung auch dazu verwendet werden, die Fragmentierung an festgelegten Stellen innerhalb eines Peptids zu begünstigen. Die [Fig. 17c](#) und [Fig. 17d](#) veranschaulichen Paare von Marker, bei welchen diese Methoden zur Verstärkung der Spaltung an der gekennzeichneten Amidbindung zum Einsatz kommen. [Fig. 17c](#) veranschaulicht ein Paar von Tripeptidmarkern mit der Sequenz Alanin-Prolin-Alanin. Die Prolinbindung begünstigt die Spaltung an dem N-terminalen Amid hiervon. Dieser Effekt wird durch die Anwesenheit einer Thioacetyl-Schutzgruppe am N-Terminus des Tripeptids verstärkt, wobei die Spaltbarkeit durch eine Methylierung des N-terminalen Stickstoffatoms weiter verstärkt wird. Die Marker haben dieselbe Masse, wobei aber in dem ersten Marker ein Alaninrest vorhanden ist, welcher schwere Isotope an der dritten Position des Tripeptids enthält, während in dem zweiten Marker ein Alaninrest vorhanden ist, der schwere Isotope an der ersten Position des Tripeptids enthält. [Fig. 17d](#) veranschaulicht ein Paar von Tripeptidmarkern mit der Sequenz Asparaginsäure-Prolin-Alanin. Die Prolinbindung begünstigt die Spaltung an dem N-terminalen Amid hiervon. Dieser Effekt wird durch die Anwesenheit des Asparaginsäurerestes verstärkt. Der N-Terminus des Tripeptids ist methyliert, um eine lokalisierte Protonierung an dieser Stelle zu begünstigen. Die Marker haben dieselbe Masse, wobei aber in dem ersten Marker ein Alaninrest vorhanden ist, welcher schwere Isotope an der dritten Position des Tripeptids enthält, während in dem zweiten Marker ein Asparaginsäurerest vorhanden ist, der schwere Isotope an der ersten Position des Tripeptids enthält.

**[0130]** Eine typische Tandem-Massenspektrometer-Geometrie ist ein Tripel-Quadrupol, umfassend zwei Quadrupol-Massenanalysatoren, welche durch eine Kollisionskammer, ebenfalls ein Quadrupol, getrennt sind. Dieses Kollisionsquadrupol fungiert als eine Ionenschleuse zwischen den zwei Massenanalysator-Quadrupolen. In das Kollisionsquadrupol kann ein Gas eingebracht werden, um eine Kollision mit dem Ionenstrahl aus dem ersten Massenanalysator zu ermöglichen. Der erste Massenanalysator selektiert Ionen, welche die Kollisionszelle passieren, wo sie fragmentieren, auf der Basis ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses. Die Fragmentationen werden aufgetrennt und in dem dritten Quadrupol detektiert. Bei anderen Geometrien als bei Tandem-Analysatoren kann eine induzierte Spaltung durchgeführt werden. Ionenfallen-Massenspektrometer können die Fragmentierung begünstigen, indem in die Falle selbst ein Gas eingebracht wird, welches mit den eingefangenen Ionen kollidiert. Ionenfallen enthalten im Allgemeinen ein Badegas wie Helium, wobei die Fragmentierung zum Beispiel durch die Zugabe von Neon begünstigt wird. In gleicher Weise können die eingefangenen Ionen einer photoneninduzierten Fragmentierung unterworfen werden. Eine andere vorteilhafte Geometrie ist ein Quadrupol-Tandem-Instrument mit orthogonal angeordnetem Flugzeit-Massenspektrometer, welches die hohe Abtastrate eines Quadrupols mit der größeren Empfindlichkeit eines Reflektor-TOF-Massenspektrometers vereinigt, um die Produkte einer Fragmentierung zu identifizieren.

**[0131]** Herkömmliche 'Sektor'-Instrumente stellen eine andere verbreitete Geometrie dar, welche bei der Tandem-Massenspektrometrie verwendet wird. Ein Sektor-Massenanalysator umfasst zwei separate 'Sektoren', und zwar einen elektrischen Sektor, der einen Ionenstrahl, welcher eine Quelle verlässt, unter Verwendung von elektrischen Feldern zu einem Strahl von Ionen mit derselben kinetischen Energie bündelt; und einen magnetischen Sektor, welcher die Ionen auf der Basis ihrer Masse auftrennt, um ein Spektrum in einem Detektor zu erzeugen. Für die Tandem-Massenspektrometrie kann ein Massenanalysator mit zwei Sektoren dieser Art verwendet werden, wobei der elektrische Sektor die erste Stufe des Massenanalysators vorsieht und der magnetische Sektor den zweiten Massenanalysator vorsieht, wobei zwischen den zwei Sektoren eine Kollisionszelle angeordnet ist. Massenanalysatoren, welche zwei vollständige Sektoren bilden, die durch eine Kollisionszelle voneinander getrennt sind, können ebenfalls zur Analyse von massenmarkierten Peptiden verwendet werden.

## Innenfallen

**[0132]** Innenfallen-Massenanalysatoren sind mit den Quadrupol-Massenanalysatoren verwandt. Die Ionenfalle besteht im Allgemeinen aus einer Konstruktion von 3 Elektroden – einer zylindrischen Elektrode mit 'Schutz'-Elektroden an jedem Ende, welche einen Hohlraum bilden. Ein Potenzial in Form einer sinusförmigen Radiofrequenz wird an die zylindrische Elektrode angelegt, während an den Schutzelektroden eine Spannung mit DC- oder AC-Potenzialen angelegt wird. Ionen, die in den Hohlraum injiziert werden, werden durch das oszillierende elektrische Feld der zylindrischen Elektrode auf eine stabile, kreisförmige Flugbahn gezwungen. Jedoch zeigen bestimmte Ionen für eine bestimmte Amplitude des oszillierenden Potenzials eine instabile Flugbahn und werden aus der Falle herausgeschleudert. Die Ionen einer Probe, welche in die Falle injiziert werden, können entsprechend ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses durch Veränderung des oszillierenden Radiofrequenz-Potenzials nacheinander aus der Falle herausgeschleudert werden. Die herausgeschleuderten Ionen können dann detektiert werden, um ein Massenspektrum zu erhalten.

**[0133]** Innenfallen werden im Allgemeinen in Verbindung mit einer geringen Menge eines 'Badegases' wie Helium, welches in dem Hohlraum der Ionenfalle vorhanden ist, betrieben. Dadurch wird sowohl die Auflösung als auch die Empfindlichkeit der Apparatur erhöht, da die Ionen, welche in die Falle eintreten, durch die Kollision mit dem Badegas im Wesentlichen auf die Umgebungstemperatur des Badegases abgekühlt werden. Durch die Kollisionen wird sowohl die Ionisierung verstärkt, wenn eine Probe in die Falle eingebracht wird, als auch die Amplitude der Ionenflugbahnen gedämpft und die Geschwindigkeit der Ionen auf ihren Flugbahnen verringert, wodurch die Ionen näher am Zentrum der Falle festgehalten werden. Dies bedeutet, dass wenn das oszillierende Potenzial verändert wird, Ionen, deren Flugbahnen instabil werden, im Verhältnis zu den abgebremsten, zirkulierenden Ionen schneller an Energie gewinnen und die Falle in einem dichteren Bündel verlassen, wodurch ein engerer und größerer Peak erhalten wird.

**[0134]** Innenfallen können Tandem-Massenspektrometer-Geometrien nachahmen. In der Tat können sie multiple Massenspektrometer-Geometrien imitieren, wodurch komplexe Analysen von eingefangenen Ionen ermöglicht werden. Eine einzelne Massenspezies einer Probe kann in einer Falle festgehalten werden, d. h. alle anderen Spezies können herauskatapultiert werden, und anschließend kann die festgehaltene Spezies durch die Überlagerung einer zweiten oszillierenden Frequenz über die erste Frequenz vorsichtig angeregt werden. Die angeregten Ionen kollidieren dann mit dem Badegas und fragmentieren, falls sie ausreichend angeregt werden. Die Fragmente können dann weiter analysiert werden. Es ist möglich, ein Fragmention zur weiteren Analyse zurückzuhalten, indem die anderen Ionen herauskatapultiert werden und das Fragmention anschließend angeregt wird, so dass es fragmentiert. Dieser Prozess kann solange wiederholt werden, wie eine ausreichende Menge der Probe vorhanden ist, um eine weitere Analyse zu ermöglichen. Es sollte bekannt sein, dass diese Instrumente im Allgemeinen einen hohen Anteil der Fragmentionen nach der induzierten Fragmentierung zurückhalten. Diese Instrumente und FTICR-Massenspektrometer (nachstehend besprochen) repräsentieren eher eine Form der Tandem-Massenspektrometrie mit einer zeitlichen Auflösung als eine Tandem-Massenspektrometrie mit einer räumlichen Auflösung, welche bei linearen Massenspektometern anzutreffen ist.

## Fourier-Transformation-Ionen-Cyclotron-Resonanz-Massenspektrometrie (FTICR-MS)

**[0135]** Die FTICR-Massenspektrometrie weist insofern ähnliche Eigenschaften wie die Innenfallen auf, als eine Probe von Ionen innerhalb eines Hohlraums zurückgehalten wird, wobei aber bei der FTICR-MS die Ionen durch gekreuzte elektrische und magnetische Felder in einer Hochvakuumkammer eingefangen sind. Das elektrische Feld wird durch ein Paar von Plattenelektroden erzeugt, welche zwei Seiten eines Behälters bilden. Der Behälter ist innerhalb des Feldes eines supraleitenden Magneten enthalten, welcher in Verbindung mit den zwei Platten, den Einfangplatten, injizierte Ionen auf eine kreisförmige Flugbahn zwischen den Einfangplatten senkrecht zu dem angelegten Magnetfeld zwingt. Die Ionen werden durch Anlegen eines Radiofrequenz-Impulses an zwei 'Transmitterplatten', welche die zwei anderen gegenüberliegenden Seiten des Behälters bilden, angeregt, so dass sie auf höheren Umlaufbahnen kreisen. Durch die Zyklloidbewegung der Ionen werden entsprechende elektrische Felder auf den verbleibenden zwei gegenüberliegenden Seiten des Behälters, welche die 'Empfängerplatten' umfassen, erzeugt. Durch die Anregungsimpulse werden die Ionen angeregt, so dass sie auf höheren Umlaufbahnen kreisen, welche absinken, wenn die kohärenten Bewegungen der Ionen durch Kollisionen aufgehoben werden. Die entsprechenden Signale, welche durch die Empfängerplatten detektiert werden, werden durch eine Fourier-Transformation (FT)-Analyse in ein Massenspektrum umgewandelt.

**[0136]** Für Experimente mittels einer induzierten Fragmentierung können diese Instrumente wie eine Ionenfalle funktionieren, wobei alle Ionen, bis auf eine einzelne Spezies von Interesse, aus der Falle herauskatapul-

tiert werden können. Ein Kollisionsgas kann in die Falle eingebracht werden, und die Fragmentierung kann induziert werden. Die Fragmentionen können anschließend analysiert werden. Im Allgemeinen sieht die Kombination von Fragmentierungsprodukten und einem Badegas eine schlechte Auflösung vor, wenn die Signale, welche durch die 'Empfängerplatten' detektiert werden, durch eine FT-Analyse analysiert werden. Jedoch können die Fragmentionen aus dem Hohlraum herauskatapultiert werden und zum Beispiel in einer Tandem-Konfiguration in Verbindung mit einem Quadrupol analysiert werden.

#### Trennung von markierten Peptiden mittels Chromatographie oder Elektrophorese

**[0137]** In dem wahlweisen zweiten Schritt gemäß dem zweiten Aspekt dieser Erfindung werden markierte Biomoleküle vor der Analyse mittels Massenspektrometrie einer chromatographischen Trennung unterworfen. Diese umfasst vorzugsweise eine Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), welche direkt mit einem Massenspektrometer gekoppelt sein kann, um eine nachgeschaltete Analyse der Peptide, so wie sie aus der chromatographischen Säule eluieren, zu ermöglichen. Eine Vielzahl von Trenntechniken kann mittels HPLC ausgeführt werden, wobei jedoch die Umkehrphasenchromatographie ein verbreitetes Verfahren für die Trennung von Peptiden vor einer Massenspektrometrie ist. Die Kapillarzonenelektrophorese ist ein anderes Trennverfahren, welches direkt mit einem Massenspektrometer zur automatischen Analyse von eluierenden Proben gekoppelt sein kann. Diese und andere Fraktionierungstechniken können angewendet werden, um die Komplexität einer Mischung von Biomolekülen vor der Analyse mittels Massenspektrometrie zu reduzieren.

#### Anwendungen der Erfindung

##### Markierung von Peptiden und Polypeptiden und Analyse mittels LC-MS-MS

**[0138]** In bevorzugten Ausführungsformen gemäß dem zweiten Aspekt dieser Erfindung werden die Marker zur Analyse von Mischungen von Peptiden mittels Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS-MS) verwendet. Die Verwendung der Massenmarker dieser Erfindung gemäß dem zweiten Aspekt wird nun im Zusammenhang mit der Analyse von Peptiden besprochen. Peptidmassenmarker, wie solche in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#), können zur Markierung von Peptiden verwendet werden. Falls die reaktive Funktionalität in diesen Verbindungen ein N-Hydroxysuccinimidester ist, dann sind die Marker mit freien Aminogruppen, wie  $\alpha$ -Aminogruppen und  $\epsilon$ -Aminogruppen in Lysin, reaktiv.

**[0139]** Nach Anlagerung der Marker haben die markierten Peptide eine Masse, welche um die Masse des Markers verändert ist. Die Masse des Peptids kann ausreichend sein, um das Ausgangsprotein zu identifizieren. In diesem Fall muss nur der Marker nachgewiesen werden, was durch eine selektive Reaktionsüberwachung mit einem Tripel-Quadrupol erreicht werden kann, wie im Folgenden ausführlicher besprochen wird. Zusammenfassend wird der erste Quadrupol des Tripel-Quadrupols derart eingestellt, dass er Ionen durchlässt, deren Masse-zu-Ladung-Verhältnis demjenigen des Peptids von Interesse, angepasst an die Masse des Markers, entspricht. Die selektierten Ionen werden dann in dem zweiten Quadrupol einer kollisionsinduzierten Dissoziation (CID) unterworfen. Unter den bei der Analyse der Peptide verwendeten Sortierungsbedingungen fragmentieren die Ionen überwiegend an den Amidbindungen in dem Molekül. Die Marker in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) enthalten eine Amidbindung, welche bei der Spaltung den N-terminalen Teil des Markers freisetzt. Obwohl die Marker alle die gleiche Masse haben, unterscheidet sich der terminale Teil aufgrund von Unterschieden im Hinblick auf die Substituenten auf beiden Seiten der Amidbindung. Auf diese Weise können die Marker voneinander unterschieden werden. Die Anwesenheit des Markerfragments, welches mit einem Ion einer spezifischen Masse assoziiert ist, würde bestätigen, dass das Ion ein Peptid war, wobei die relativen Peakhöhen der Marker von verschiedenen Proben Informationen über die relativen Mengen der Peptide in ihren Proben liefern. Falls die Masse nicht ausreichend ist, um ein Peptid zu identifizieren, entweder weil eine Reihe von terminalen Peptiden in der Probe dieselbe terminale Masse haben oder weil das Peptid unbekannt ist, kann die Sequenzinformation anschließend durch die Analyse des vollständigen CID-Spektrums ermittelt werden. Die Peaks der Peptidfragmentierung können dazu verwendet werden, die Peptide zu identifizieren, während die Peaks der Massenmarker Informationen über die relativen Mengen der Peptide liefern.

**[0140]** Die Analyse von Proteinen mittels Tandem-Massenspektrometrie, insbesondere von Mischungen von Peptiden, wird durch das "Rauschen" in den erhaltenen Spektren erschwert. Aus biologischen Proben isolierte Peptide sind häufig mit Pufferreagenzien, Denaturierungsmitteln und Detergenzien verunreinigt, welche alle Peaks in das Massenspektrum einbringen. Als Ergebnis sind häufig mehr Verunreinigungspeaks als Peptidpeaks in dem Spektrum vorhanden, wobei die Identifizierung der Peaks, welche Peptiden entsprechen, das größte Problem darstellt, insbesondere bei kleinen Proben von Proteinen, welche schwer zu isolieren sind. Als Ergebnis werden unterschiedliche Verfahren angewendet, um festzustellen, welche Peaks Peptiden entspre-

chen, bevor eine ausführliche CID-Analyse durchgeführt wird. Instrumente auf der Basis eines Tripel-Quadrupols erlauben eine 'Vorläufer-Ionen-Analyse' (vgl. Wilm M. et al., Anal. Chem. 68 (3) (1996), 527–533, "Parent ion scans of unseparated Peptide mixtures"). Der Tripel-Quadrupol wird in einem 'Einzelreaktion-Monitoring'-Modus betrieben, wobei der erste Quadrupol über den vollständigen Massenbereich scannt und jedes durchgelassene Ion in dem zweiten Quadrupol einer CID unterworfen wird. Der dritte Quadrupol ist so eingestellt, dass er nur ein spezifisches Fragmention detektiert, welches üblicherweise ein charakteristisches Fragmention eines Peptids, wie zum Beispiel ein Immoniumion, ist. Das Vorhandensein von Phosphatgruppen kann mittels dieser Sortierungstechnik ebenfalls nachgewiesen werden. Bei einem anderen Verfahren, welches in Verbindung mit Quadrupol/Flugzeit-Massenspektrometern angewendet wird, wird nach zweifach geladenen Ionen gesucht, um Ionen zu identifizieren, welche bei einer CID Tochterionen mit höheren Masse-zu-Ladung-Verhältnissen als das Ausgangsion ergeben. Ein weiteres Verfahren zur Identifizierung von zweifach geladenen Ionen ist das Suchen nach Gruppen von Peaks in dem Spektrum, welche nur 0,5 Dalton auseinander liegen und geeignete Intensitätsverhältnisse aufweisen, was darauf hinweisen würde, dass es sich bei den Ionen um dieselben Ionen handelt, welche sich nur durch den in dem Molekül vorhandenen <sup>13</sup>C-Anteil unterscheiden.

**[0141]** Durch die Markierung von Peptiden mit den Massenmarkern dieser Erfindung kann eine neue Form der Vorläufer-Ionen-Analyse vorgesehen werden, bei welcher die Peptidpeaks durch das Vorhandensein von Fragmenten, welche den Massenmarkern dieser Erfindung entsprechen, identifiziert werden, nachdem die markierten Peptide einer CID unterworfen wurden. Insbesondere können die Peptide, welche aus jeder Probe isoliert wurden, mit Hilfe der Verfahren dieser Erfindung mit mehr als einem Marker markiert werden. Eine äquimolare Mischung aus einem 'Vorläufer-Ionen-Analyse'-Marker, welcher in allen Proben verwendet wird, und einem probenspezifischen Marker kann verwendet werden, um die Peptide in jeder Probe zu markieren. Auf diese Weise haben Veränderungen im Hinblick auf den Anteil der Peptide in den verschiedenen Proben bei einer Vorläufer-Ionen-Analyse keine ungünstige Auswirkung auf die Identifizierung der Peptidpeaks.

**[0142]** Nach der Identifizierung und der Selektion eines Peptidions, wird es einer CID unterworfen. Die CID-Spektren sind oft sehr komplex, wobei die Feststellung, welche Peaks in dem CID-Spektrum wichtigen Peptidfragment-Reihen entsprechen, ein weiteres Proben bei der Bestimmung der Sequenz eines Peptids mittels Massenspektrometrie darstellt. Shevchenko et al., Rapid Commun. Mass Spec. 11 (1997), 1015–1024, beschreiben ein weiteres Verfahren, welches die Behandlung der Proteine mit Trypsin in <sup>16</sup>O/<sup>18</sup>O-Wasser (1:1) vor der Analyse umfasst. Die Hydrolysereaktion ergibt zwei Populationen von Peptiden, eine erste Population, worin die terminale Carboxylgruppe <sup>16</sup>O enthält, und eine zweite Population, worin die terminale Carboxylgruppe <sup>18</sup>O enthält. Auf diese Weise würde für jedes Peptid in der Probe ein Doppelpeak von gleicher Intensität für jedes Peptid erhalten werden, wobei der Doppelpeak 2 Dalton auseinander liegt. Dieses Verfahren wird durch interne Peptid-Isotopenpeaks etwas erschwert, aber es ermöglicht eine automatisierte Untersuchung des CID-Spektrums auf Dubletts. Die Massenunterschiede zwischen den Dubletts können bestimmt werden, um die Aminosäure zu identifizieren, durch welche sich die zwei Fragmente unterscheiden. Dieses Verfahren kann in Verbindung mit den Verfahren dieser Erfindung geeignet sein, falls N-terminale Peptide isoliert werden.

#### Erstellen eines Proteinexpressionsprofils

**[0143]** Um zum Beispiel die Veränderungen in einem Krebsgewebe zu verstehen, ist eine Einsicht in alle molekularen Veränderungen in diesem Gewebe erforderlich, wobei diese Veränderungen geeigneterweise mit einem normalen Gewebe in Beziehung gebracht werden. Um alle molekularen Veränderungen zu ermitteln, ist es erforderlich, dass die Veränderungen in Bezug auf die Genexpression und die Proteinexpression und letztendlich die metabolischen Veränderungen gemessen werden können. Es ist möglich, die Expression einer großen Zahl von Genen in verschiedenen Gewebeproben gleichzeitig auf dem Niveau der Boten-RNA (mRNA) mit Hilfe der Microarray-Technologie zu vergleichen (vgl. zum Beispiel Iyer V. R. et al., Science 283 (5398) (1999), 83–87, "The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum"); allerdings korrelieren die mRNA-Spiegel nicht direkt mit den Proteinspiegeln in einem Gewebe. Um ein Proteinexpressionsprofil für ein Gewebe zu erstellen, wird häufig eine zweidimensionale Gelelektrophorese verwendet. Bedauerlicherweise ist diese Technik sehr arbeitsintensiv, wobei es infolge der Schwierigkeit, eine Reproduzierbarkeit zu erreichen, schwierig ist, zwei oder mehr Proben gleichzeitig auf einem zweidimensionalen Gel zu vergleichen. Wie vorstehend besprochen, können Peptide mittels der Verfahren dieser Erfindung effektiv analysiert werden.

**[0144]** Die Marker dieser Erfindung ermöglichen die Identifizierung desselben Peptids in verschiedenen Proben mittels LC-MS-MS. Daneben können die relativen Mengen desselben Peptids in verschiedenen Proben bestimmt werden. Die Möglichkeit, die Identität und die relativen Mengen von Peptiden in einer Reihe von Pro-

ben schnell und empfindlich zu bestimmen, ermöglicht das Erstellen eines Expressionsprofils. Daher beinhaltet ein Ziel dieser Erfindung die Bereitstellung von verbesserten Verfahren für eine vergleichende Analyse von komplexen Proteinproben, welche auf der selektiven Isolierung und Markierung von Peptiden basieren. Im Folgenden werden zwei veröffentlichte Ansätze zur umfassenden Analyse der Proteinexpression, sowie verschiedene Verfahren zur Analyse von bestimmten Proteinzuständen, wie eine Phosphorylierung und eine Kohlenhydratmodifikation beschrieben und erläutert.

#### Terminale Peptidisolierung zum Erstellen eines vollständigen Proteinexpressionsprofils

**[0145]** Die Isolierung von N- oder C-terminalen Peptiden ist als ein Verfahren zum Erstellen eines vollständigen Expressionsprofils einer Proteinprobe beschrieben worden. Die Isolierung von terminalen Peptiden sorgt dafür, dass mindestens ein und nur ein Peptid pro Protein isoliert wird, wodurch sichergestellt wird, dass die Probe, welche analysiert wird, nicht mehr Komponenten als die ursprüngliche Probe umfasst. Durch den Abbau von großen Polypeptiden zu kürzeren Peptiden kann die Probe mittels Massenspektrometrie leichter analysiert werden. Verfahren zur Isolierung von Peptiden ausgehend von den Enden der Polypeptide werden in PCT/GB98/00201 und PCT/GB99/03258 besprochen.

#### Isolierung von Cysteinreste enthaltenden Peptiden

**[0146]** Wie bereits erörtert, offenbaren Gygi et al. (Nature Biotechnology 17 (1999), 994–999) die Verwendung von 'Isotop-codierten Affinitätsmarkern' zum Abfangen von Peptiden aus Proteinen, um eine Proteinexpressionsanalyse zu ermöglichen. Die Autoren berichten, dass ein großer Teil der Proteine (> 90%) in Hefe mindestens einen Cysteinrest enthält (wobei im Durchschnitt ~5 Cysteinreste pro Protein vorhanden sind). Durch das Reduzieren der Disulfidbindungen in einer Proteinprobe und das Verkappen von freien Thiolen mit Iodoacetaimidylbiotin werden alle Cysteinreste markiert. Die markierten Proteine werden dann zum Beispiel mit Trypsin verdaut, und die Cystein-markierten Peptide können mit Hilfe von Avidin-beschichteten Kugelchen isoliert werden. Diese abgefangenen Peptide können dann mittels Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS-MS) analysiert werden, um ein Expressionsprofil für die Proteinprobe zu erstellen. Zwei Proteinproben können miteinander verglichen werden, indem die Cysteinreste mit einem unterschiedlich isotopisch markierten Biotinmarker markiert werden. Dieser Ansatz wird weniger häufig angewendet als ein Ansatz, welcher auf der Isolierung von terminalen Peptiden basiert, da im Durchschnitt mehr als ein Peptid pro Protein isoliert wird, so dass mehr Peptidspezies als Proteinspezies in der Probe vorhanden sind. Diese Erhöhung der Komplexität wird durch die Art der durch Gygi et al. verwendeten Marker noch verstärkt.

**[0147]** Wie vorstehend erläutert, weisen die Affinitätsmarker, welche durch Gygi et al. beschrieben werden, einige Nachteile auf. Die Markierung jeder Probe mit einer anderen Isotopvariante des Affinitätsmarkers resultiert in einem zusätzlichen Peak in dem Massenspektrum für jedes Peptid in jeder Probe. Dies bedeutet, dass wenn zwei Proben gemeinsam analysiert werden, doppelt so viele Peaks in dem Spektrum vorhanden sind. In gleicher Weise, wenn drei Proben gemeinsam analysiert werden, ist das Spektrum dreimal so komplex wie für eine Probe allein. Eine weitere Einschränkung, welche durch die Autoren der vorstehenden Veröffentlichung beschrieben wird, ist die Veränderung der Beweglichkeit, welche durch die Marker hervorgerufen wird. Die Autoren berichten, dass Peptide, welche mit einem deuterierten Biotinmarker markiert sind, unmittelbar nach demselben Peptid, das mit einem nicht deuterierten Marker markiert ist, eluieren. Dies bedeutet, dass eine vergleichende Analyse von mehreren Proben mit Hilfe der Verfahren von Gygi et al. aufgrund der Komplexität der Massenspektren und der Kompliziertheit der chromatographischen Schritte sehr schwierig ist, wenn zwei Proben analysiert werden.

**[0148]** Unter Verwendung der Marker der in [Fig. 8](#) gezeigten Form wird ein verbessertes Verfahren zur Analyse von Proteinproben durch die Markierung von Cysteinresten vorgesehen. [Fig. 8](#) zeigt ein Paar von verbesserten Affinitätsmarkern, welche von Methionin abgeleitet sind. Für die Herstellung der zwei verschiedenen Marker würden unterschiedlich isotopisch substituierte Formen von Methionin verwendet werden. Die Gesamtmasse eines jeden der zwei Marker ist gleich, wobei sich aber das N-terminale Methionin in jedem Marker von dem anderen Marker um 3 Dalton unterscheidet. Die α-Aminogruppe des Dipeptidmarkers ist mit Guanidin derivatisiert worden, um das Fragmentierungsprodukt dieser Aminosäure von dem Fragmentierungsprodukt des zweiten Methioninrestes und der natürlichen Methioninreste in dem Protein zu unterscheiden und um die Protonierung an dieser Position in dem Marker während der Ionisierung in einem Massenspektrometer zu begünstigen. Ferner umfassen diese Marker eine Thiol-reaktive Maleimid-Funktionalität.

**[0149]** In einer Ausführungsform gemäß dem zweiten Aspekt dieser Erfindung umfasst ein Protokoll zur Analyse einer Proteinprobe, enthaltend Polypeptide mit Cysteinresten, die folgenden Schritte:

1. Reduzieren und Umsetzen aller Cysteinreste in mindestens einer Proteinprobe mit einem Maleimid-Affinitätsliganden-Massenmarker;
2. Spalten der Polypeptide mit einer sequenzspezifischen Endoprotease;
3. Abfangen der markierten Peptide an einem mit Avidin derivatisierten festen Träger; und
4. Analysieren der abgefangenen markierten Peptide mittels LC-MS-MS.

**[0150]** Die Proteinproben können vor oder nach der Umsetzung der Probe mit dem Affinitätsliganden-Massenmarker mit der sequenzspezifischen Endoprotease gespalten werden.

#### Isolierung von kohlenhydratmodifizierten Proteinen

**[0151]** Kohlenhydrate sind häufig als Folge einer posttranslationalen Modifikation der Proteine vorhanden. Verschiedene Affinitätschromatographie-Techniken zur Isolierung dieser Arten von Proteinen sind bekannt (für eine Übersicht vgl. Gerard C., Methods Enzymol. 182 (1990), 529–539, "Purification of glycoproteins"). Eine Vielzahl von natürlichen Proteinrezeptoren für Kohlenhydrate ist bekannt. Die Vertreter dieser Klasse von Rezeptoren, welche auch als Lektine bekannt sind, sind für bestimmte Kohlenhydrat-Funktionalitäten hochselektiv. Affinitätssäulen, welche mit spezifischen Lektinen derivatisiert sind, können verwendet werden, um Proteine mit bestimmten Kohlenhydratmodifikationen zu isolieren, während Affinitätssäulen, welche eine Vielzahl von unterschiedlichen Lektinen umfassen, verwendet werden können, um Populationen von Proteinen mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Kohlenhydratmodifikationen zu isolieren. In einer Ausführungsform gemäß dem zweiten Aspekt dieser Erfindung umfasst ein Protokoll zur Analyse einer Probe von Proteinen, welche kohlenhydratmodifizierte Proteine enthält, die folgenden Schritte:

1. Behandeln der Probe mit einem sequenzspezifischen Spaltreagens wie Trypsin oder Lys-C;
2. Aufgeben der Proteinprobe auf Affinitätssäulen, welche Lektine oder Boronsäure-Derivate enthalten, um ausschließlich kohlenhydratmodifizierte Peptide zu isolieren;
3. Markieren der abgefangenen zuckermodifizierten Peptide an der freien  $\alpha$ -Aminogruppe, welche durch die sequenzspezifische Spaltung erzeugt wird, unter Verwendung der Peptidmassenmarker dieser Erfindung; und
4. Analysieren der markierten Peptide mittels LC-MS-MS.

**[0152]** Ein N-Hydroxysuccinimid-aktivierter Marker könnte dazu verwendet werden, die freien  $\alpha$ -Aminogruppen zu markieren. Falls Lys-C verwendet wird, dann enthält jedes kohlenhydratmodifizierte Peptid sowohl eine freie  $\epsilon$ -Aminogruppe als auch eine freie  $\alpha$ -Aminogruppe, welche beide markiert werden können.

**[0153]** Viele Kohlenhydrate enthalten vizinale Diolgruppen, d. h. Hydroxylgruppen, die an benachbarten Kohlenstoffatomen vorliegen. Diolgruppen enthaltende Kohlenhydrate, welche vizinale Diole in einer 1,2-cis-Diolkonfiguration enthalten, reagieren mit Derivaten von Boronsäure unter Bildung von cyclischen Ester. Diese Reaktion wird bei einem basischen pH-Wert begünstigt, aber bei einem sauren pH leicht umgekehrt. An ein Harz immobilisierte Derivate von Phenylboronsäure sind als Affinitätsliganden zum Auffangen von Proteinen mit cis-Diolgruppen enthaltenden Kohlenhydraten verwendet worden. In einer Ausführungsform gemäß dem vierten Aspekt dieser Erfindung kann ein Satz von Affinitätsliganden-Peptidmassenmarkern, umfassend Biotin, gebunden an eine Phenylboronsäuregruppe, wie in [Fig. 6b](#) gezeigt, synthetisiert werden. Diese Boronsäure-Marker können verwendet werden, um zwei verschiedene Proben zu markieren, welche Peptide oder Proteine mit Kohlenhydratmodifikationen, enthaltend vizinale cis-Diole, umfassen. In einer anderen Ausführungsform gemäß dem zweiten Aspekt dieser Erfindung umfasst ein Protokoll zur Analyse einer Proteinprobe, enthaltend kohlenhydratmodifizierte Polypeptide, die folgenden Schritte:

1. Umsetzen von mindestens einer Proteinprobe bei einem basischen pH mit einem Boronsäure-Affinitätsliganden-Massenmarker;
2. Spalten der Polypeptide mit einer sequenzspezifischen Endoprotease;
3. Abfangen der markierten Peptide an einem mit Avidin derivatisierten festen Träger; und
4. Analysieren der abgefangenen markierten Peptide mittels LC-MS-MS.

**[0154]** Die Probe kann vor oder nach der Umsetzung der Probe mit dem Affinitätsliganden-Massenmarker mit der sequenzspezifischen Endoprotease gespalten werden.

**[0155]** Zum Beispiel können vizinale Diolgruppen in Sialinsäuren durch eine oxidative Spaltung mit Periodat auch in Carbonylgruppen umgewandelt werden. Durch die enzymatische Oxidation von Zuckern, welche terminale Galaktose- oder Galaktosamingruppen enthalten, mit Galaktoseoxidase können die Hydroxylgruppen in diesen Zuckern ebenfalls in Carbonylgruppen umgewandelt werden. Komplexe Kohlenhydrate können auch mit Kohlenhydrat-Spaltenzymen, wie Neuramidase, behandelt werden, welche selektiv spezifische Zuckermo-

difikationen entfernen, wobei Zucker zurückbleiben, welche oxidiert werden können. Diese Carbonylgruppen können markiert werden, um zu ermöglichen, dass Proteine, welche solche Modifikationen tragen, nachgewiesen oder isoliert werden können. Hydrazidreagenzien wie Biocytinhydrazid (Pierce & Warriner Ltd., Chester, GB) reagieren mit Carbonylgruppen in Carbonylgruppen enthaltenden Kohlenhydratspezies (Bayer E. A. et al., Anal. Biochem. 170 (1988), 271–281, "Biocytin hydrazide – a selective label for sialic acids, galactose, and other sugars in glycoconjugates using avidin biotin technology"). Alternativ kann eine Carbonylgruppe durch eine reduktive Alkylierung mit einem aminmodifizierten Biotin wie Biocytin und EZ-Link™ PEO-Biotin (Pierce & Warriner Ltd., Chester, GB) markiert werden (Means G. E., Methods Enzymol. 47 (1977), 469–478, "Reductive alkylation of amino groups"; Rayment L., Methods Enzymol. 276 (1997), 171–179, "Reductive alkylation of lysine residues to alter crystallization properties of Proteins"). Auf diese Weise können Proteine, welche vizinale Diolgruppen enthaltende Kohlenhydratmodifikationen tragen, in einer komplexen Mischung biotinyliert werden. Die biotinylierten, d. h. kohlenhydratmodifizierten Proteine können dann unter Verwendung eines mit Avidin derivatisierten festen Trägers isoliert werden.

**[0156]** Ein Satz von Peptidmassenmarkern im Einklang mit dieser Erfindung, wie in [Fig. 6a](#) gezeigt, kann zur Analyse von kohlenhydratmodifizierten Peptiden, welche mit Periodat oxidiert worden sind, synthetisiert werden. [Fig. 6a](#) zeigt einen Satz von zwei Markern, welche von Methionin abgeleitet sind. Für die Herstellung der zwei verschiedenen Marker würden unterschiedlich isotopisch substituierte Formen von Methionin verwendet werden. Die Gesamtmasse eines jeden der zwei Marker ist gleich, wobei sich aber das N-terminale Methionin in jedem Marker von dem anderen Marker um 3 Dalton unterscheidet. Die α-Aminogruppe des Dipeptidmarkers ist mit Guanidin derivatisiert worden, um das Fragmentierungsprodukt dieser Aminosäure von dem Fragmentierungsprodukt des zweiten Methioninrestes zu unterscheiden und um die Protonierung an dieser Position in dem Marker während der Ionisierung in einem Massenspektrometer zu begünstigen. Eine weitere Ausführungsform gemäß dem zweiten Aspekt dieser Erfindung umfasst die folgenden Schritte:

1. Behandeln einer Probe von Polypeptiden mit Periodat, so dass Kohlenhydrate mit vizinalen Diolgruppen in Glykopeptiden in eine Carbonyl-Funktionalität überführt werden;
2. Markieren dieser Carbonyl-Funktionalität mit einem Hydrazid-aktivierten Peptidmassenmarker, welche mit Biotin verbunden ist, wie [Fig. 6a](#) dargestellt;
3. Umsetzen der Proteinprobe mit einer sequenzspezifischen Endoprotease;
4. Auffangen der markierten Peptide an einem mit Avidin derivatisierten festen Träger; und
5. Analysieren der biotinylierten Peptide mittels LC-MS-MS.

**[0157]** Die Proteinprobe kann vor oder nach der Umsetzung der Probe mit dem Affinitätsliganden-Massenmarker mit der sequenzspezifischen Endoprotease gespalten werden.

#### Isolierung von Phosphopeptiden

**[0158]** Die Phosphorylierung stellt eine verbreitete reversible posttranskriptionale Modifikation dar, welche bei der Mehrzahl der Signalübertragungswege in praktisch allen Organismen vorkommt, da die Phosphorylierung häufig als ein transientes Signal verwendet wird, um Veränderungen in Bezug auf den Zustand einzelner Proteine zu vermitteln. Die Phosphorylierung ist ein wichtiges Forschungsgebiet, wobei Hilfsmittel, welche die Analyse der Dynamik einer Phosphorylierung ermöglichen, essentiell sind, um vollständige Einsicht zu erhalten, wie Zellen auf Reize antworten, was die Reaktionen von Zellen auf Wirkstoffe einschließt.

**[0159]** Techniken zur Analyse von Peptiden, welche Phosphoserin und Phosphothreonin enthalten, sind hinreichend bekannt. Eine Klasse von derartigen Verfahren basiert auf einer gut bekannten Reaktion zur beta-Elimination von Phosphaten. Bei dieser Reaktion werden Phosphoserin und Phosphothreonin zu Dehydroalanin und Methyldehydroalanin umgewandelt, welche beide Michael-Akzeptoren sind und mit Thiolen reagieren. Diese Reaktion ist dazu verwendet worden, hydrophobe Gruppen für eine Affinitätschromatographie einzuführen (vgl. zum Beispiel Holmes C. F., FEBS Lett. 215 (1) (1987), 21–24, "A new method for the selective isolation of phosphoserine-containing peptides"). Dithiol-Verbindungsgruppen sind auch verwendet worden, um Fluorescein und Biotin in Phosphoserin und Phosphothreonin enthaltende Peptide einzuführen (Fadden P. und Haystead T. A., Anal. Biochem. 225 (1) (1995), 81–88, "Quantitative and selective fluorophore labelling of phosphoserine an peptides and Proteins: characterization at the attomole level by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence"; Yoshida O. et al., Nature Biotech. 19 (2001), 379–382, "Enrichment analysis of phosphorylated Proteins as a tool for probing the phosphoproteome"). Das Verfahren von Yoshida et al. zur Affinitätsanreicherung von Proteinen, welche an den Serin- und Threoninresten phosphoryliert sind, könnte unter Verwendung des in [Fig. 8](#) gezeigten Maleimid-Markers verbessert werden, um den Vergleich von mehreren Proben zu ermöglichen. Dies wäre für die Analyse der Dynamik von Phosphorylierungskaskaden besonders vorteilhaft.

**[0160]** Ein Peptidmarker mit der in [Fig. 7](#) gezeigten Form würde die direkte Markierung von Phosphothreonin- und Phosphoserinresten, welche einer beta-Elimination unterzogen wurden, ohne eine Dithiol-Verbindungsgruppe ermöglichen. Der Tetrapeptidmarker von [Fig. 7](#) ist von Methionin abgeleitet. Für die Herstellung der zwei verschiedenen Marker würden unterschiedlich isotopisch substituierte Formen von Methionin verwendet werden. Die Gesamtmasse eines jeden der zwei Marker ist gleich, wobei sich aber das N-terminale Methionin in jedem Marker von dem anderen Marker um 3 Dalton unterscheidet. Die  $\alpha$ -Aminogruppe des Dipteidmarkers ist mit Guanidin derivatisiert worden, um das Fragmentierungsprodukt dieser Aminosäure von dem Fragmentierungsprodukt des zweiten Methioninrestes und der natürlichen Methioninreste in Proteinen zu unterscheiden und um die Protonierung an dieser Position in dem Marker während der Ionisierung in einem Massenspektrometer zu begünstigen. Der Peptidmarker ist am N-Terminus mit Guanidin derivatisiert, um eine erhöhte Empfindlichkeit vorzusehen und um den N-terminalen Rest von dem C-terminalen Rest zu unterscheiden. Der Cysteinrest stellt eine freie Thiolgruppe bereit, welche einen nukleophilen Angriff auf Dehydroalanin und Methyldehydroalanin vorsehen kann. Ein verbessertes Protokoll für das auf einer beta-Elimination basierende Markierungsverfahren ist bekannt. Dieses verbesserte Verfahren beinhaltet eine Bariumkatalyse (Byford M. F., Biochem. J. 280 (1991), 261–261, "Rapid and selective modification of phosphoserine residues catalysed by Ba<sup>2+</sup> ions for their detection during Peptide microsequencing"). Diese Katalyse beschleunigt die Reaktion um das 20fache, wodurch die Nebenreaktionen auf einen nicht nachweisbaren Umfang verringert werden. Der in [Fig. 7](#) gezeigte Peptidmarker könnte mit Hilfe der Bariumkatalyse in einfacher Weise an Dehydroalanin oder Methyldehydroalanin, welche aus der beta-Elimination von Phosphaten resultieren, gekoppelt werden. Daher können in einer weiteren Ausführungsform gemäß dem zweiten Aspekt dieser Erfindung Peptide, welche an den Serin- und Threoninresten phosphoryliert sind, in einem Verfahren analysiert werden, welches die folgenden Schritte umfasst:

1. Behandeln einer Probe von Polypeptiden mit Bariumhydroxid zum Herbeiführen einer beta-Elimination der Phosphatgruppen aus Phosphoserin und Phosphothreonin;
2. Markieren der erhaltenen Dehydroalanin- oder Methyldehydroalanin-Funktionalitäten mit dem Thiol-aktivierten Peptidmassenmarker, welcher mit Biotin verbunden ist, wie in [Fig. 7](#) gezeigt;
3. Spalten der Proteinprobe mit einer sequenzspezifischen Endoprotease;
4. Abfangen der markierten Peptide an einem mit Avidin derivatisierten festen Träger; und
5. Analysieren der biotinylierten Peptide mittels LC-MS-MS.

**[0161]** Die Proteinprobe kann vor oder nach der Umsetzung der Probe mit dem Affinitätsliganden-Massenmarker mit der sequenzspezifischen Endoprotease umgesetzt werden.

**[0162]** Eine Reihe von Forschungsgruppen hat über die Herstellung von Antikörpern berichtet, welche an Phosphotyrosinreste in einer großen Vielzahl von Proteinen binden (vgl. zum Beispiel Frackleton A. R. et al., Methods Enzymol. 201 (1991), 79–92, "Generation of monoclonal antibodies against phosphotyrosine and their use for affinity purification of phosphotyrosine-containing Proteins", sowie andere Artikel in dieser Ausgabe von Methods Enzymol.). Dies bedeutet, dass ein wesentlicher Teil der Proteine, welche durch eine Tyrosinphosphorylierung posttranslational modifiziert worden sind, durch eine Affinitätschromatographie unter Verwendung dieser Antikörper als Liganden einer Affinitätssäule isoliert werden können.

**[0163]** Diese Phosphotyrosin-bindenden Antikörper können im Zusammenhang mit dieser Erfindung verwendet werden, um Peptide aus Proteinen zu isolieren, welche Phosphotyrosinreste enthalten. Die tyrosinphosphorylierten Proteine in einer komplexen Mischung können unter Verwendung von Anti-Phosphotyrosin-Antikörper-Affinitätssäulen isoliert werden. In einer weiteren Ausführungsform gemäß dem zweiten Aspekt dieser Erfindung umfasst ein Protokoll zur Analyse einer Probe von Proteinen, welche Proteine enthält, welche an den Threoninresten phosphoryliert sind, die folgenden Schritte:

1. Behandeln der Probe mit einem sequenzspezifischen Spaltreagens wie Trypsin oder Lys-C;
2. Aufgeben der Proteinprobe auf Affinitätssäulen, welche Anti-Phosphotyrosin-Antikörper enthalten, um ausschließlich phosphotyrosinmodifizierte Peptide zu isolieren;
3. Markieren der abgefangenen Phosphopeptide an der freien  $\alpha$ -Aminogruppe, welche durch die sequenzspezifische Spaltung erzeugt wird, unter Verwendung der Peptidmassenmarker dieser Erfindung; und
4. Analysieren der markierten Peptide mittels LC-MS-MS.

**[0164]** Ein N-Hydroxysuccinimid-aktivierter Marker könnte verwendet werden, um die freien  $\alpha$ -Aminogruppen zu markieren.

**[0165]** Eine immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) stellt eine weitere Technik zur Isolierung von Phosphoproteinen und Phosphopeptiden dar. Phosphate werden von Harzen, umfassend dreiwertige Metallionen, insbesondere Gallium(III)-Ionen, festgehalten (Posewitch M. C. und Tempst P., Anal. Chem.

71 (1999), 2883–2892, "Immobilized gallium (III) affinity chromatography of phosphopeptides"). Diese Technik ist insofern vorteilhaft, als sie sowohl serin/threoninphosphorylierte als auch tyrosinphosphorylierte Peptide und Proteine gleichzeitig isolieren kann.

**[0166]** Die IMAC kann daher im Zusammenhang mit dieser Erfindung zur Analyse von Proben von phosphorylierten Proteinen angewendet werden. In einer weiteren Ausführungsform gemäß dem zweiten Aspekt dieser Erfindung umfasst ein Protokoll zur Analyse einer Probe von Proteinen, welche phosphorylierte Proteine enthält, die folgenden Schritte:

1. Behandeln der Probe mit einem sequenzspezifischen Spaltreagens wie Trypsin oder Lys-C;
2. Aufgeben der Proteinprobe auf Affinitätssäule, welche immobilisierte Metallionen umfasst, um ausschließlich phosphorylierte Peptide zu isolieren;
3. Markieren der abgefangenen Phosphopeptide an der freien α-Aminogruppe, welche durch die sequenzspezifische Spaltung erzeugt wird, unter Verwendung der Peptidmassenmarker dieser Erfindung; und
4. Analysieren der markierten Peptide mittels LC-MS-MS.

**[0167]** Ein N-Hydroxysuccinimid-aktivierter Marker könnte verwendet werden, um die freien α-Aminogruppen zu markieren.

**[0168]** In einer anderen Ausführungsform gemäß dem zweiten Aspekt dieser Erfindung kann eine Probe von phosphorylierten Proteinen durch Isolierung der phosphorylierten Proteine, gefolgt durch eine Analyse der N- oder C-terminalen Peptide der Phosphoproteine, analysiert werden. Techniken zur Isolierung von terminalen Peptiden werden in einer Reihe von Patentanmeldungen, z. B. WO 98/32876, WO 00/20870 und EP 01304975.4, offenbart. Ein Protokoll zur Analyse einer Probe von Proteinen, welche phosphorylierte Proteine enthält, würde die folgenden Schritte umfassen:

1. Aufgeben der Proteinprobe auf eine Affinitätssäule, welche immobilisierte Metallionen umfasst, um ausschließlich phosphorylierte Proteine zu isolieren;
2. Isolieren von C- und/oder N-terminalen Peptiden aus den abgefangenen phosphorylierten Proteinen;
3. Markieren der abgefangenen terminalen Peptide unter Verwendung der Peptidmassenmarker dieser Erfindung; und
4. Analysieren der markierten Peptide mittels LC-MS-MS.

### Beispiele

#### Beispiel 1 – Synthese von X-Metd<sup>3</sup>-Met-Gly-OH (A) und X-Met-Metd<sup>3</sup>-Gly-OH (B)

**[0169]** Ein Paar von Peptiden wurde mittels herkömmlicher automatisierter Synthesetechniken synthetisiert, um die Merkmale dieser Erfindung zu erläutern (beide ausgehend von einem im Handel erhältlichen Fmoc-Gly-Trt-PS-Harz von Rapp Polymere, Deutschland). Die zwei Peptide A und B sind in **Fig. 10** dargestellt und werden bezeichnet als die zwei Met-Met-Gly-(D3)-Peptide.

**[0170]** Deuteriertes Methionin (Metd<sup>3</sup>) ist von ISOTEC Inc., Miamisburg, Ohio, USA, erhältlich. Jedoch muss das Fmoc-Reagens zur Verwendung in einem Peptidsynthesegerät unter Verwendung des ungeschützten deuterierten Methionins manuell synthetisiert werden.

#### Synthese von N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-methionin-methyl-d3 (Fmoc-Metd<sup>3</sup>)

**[0171]** Die Synthese von Fmoc-Metd<sup>3</sup> (dargestellt in **Fig. 9a**) wurde in zwei Schritten ausgeführt.

##### 1. Synthese von 9-Fluorenylmethylpentafluorphenylcarbonat

**[0172]** 8,4 ml (60 mmol) Triethylamin wurden bei 0°C zu einer Mischung von 11 g (60 mmol) Pentafluorphenol und 15,5 g (60 mmol) Chlorkohlsäure(9-fluorenylmethyl)ester in 100 ml wasserfreiem Ether zugegeben. Nach der Umsetzung für 2 Stunden wurden 20 ml kaltes Wasser in die Lösung gegossen. Die organische Schicht wurde zweimal mit Wasser gewaschen und dann getrocknet. Nach der Verdampfung des Lösungsmittels wurde das erhaltene Produkt aus Heptan auskristallisiert. Ausbeute: 16,4 g (67%).

##### 2. Synthese von N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-methionin-methyl-d3

**[0173]** 2,2 g (14,5 mmol) L-Methionin-methyl-d3 (Metd<sup>3</sup>) wurden in 50 ml Aceton suspendiert. 2,5 g (29 mmol) Natriumhydrogencarbonat und 60 ml Wasser und im Anschluss daran 5,7 g (14 mmol) 9-Fluorenylmethylpen-

tafluorophenylcarbonat wurden zu der gerührten Suspension zugegeben. Nach der Umsetzung für 48 Stunden wurde der pH der klaren Lösung auf pH 3 erniedrigt, und organische Schicht wurde mit Ethylacetat extrahiert. Nach dem Trocknen der extrahierten organischen Schicht wurde das Ethylacetat verdampft, und das Produkt wurde durch Zugabe von Heptan ausgefällt. Diese Prozedur (Verdünnung mit Ethylacetat und Fällung mit Hexan) wurde zweimal wiederholt, bevor das reine Produkt, Fmoc-Metd<sup>3</sup>, erhalten wurde (Ausbeute: 5,0 g (92%); Fp: 126–128°C; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -30°, c = 1, DMF).

[0174] Die Reaktionssequenzen des Peptidsynthesegeräts für die Herstellung der zwei Peptide, welche in Fig. 10 dargestellt sind, sind nachstehend angegeben.

#### Peptidsequenz (A)

- Aufquellen von 50 mg Fmoc-Gly-Trt-PS-Harz für 5 min in 2 ml Dimethylformamid (DMF);
- Entfernung der Fmoc-Gruppe mit Piperidin in DMF nach Standardprotokollen;
- Lösen von 49 mg (0,32 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) in 800 µl DMF;
- Zugabe von 120 mg (0,32 mmol) Fmoc-Met zu der HOBt-Lösung, Zugeben dieser Lösung zu dem Harz und Inkubieren für 3 min;
- Anschließend Zugabe von 50 µl (0,32 mmol) Diisopropylcarbodiimid (DIC); Kopplungszeit (0,4 M aktivierte Aminosäure).
- Entfernung der Fmoc-Gruppe mit Piperidin in DMF nach Standardprotokollen;
- Lösen von 49 mg (0,32 mmol) HOBt in 800 µl DMF;
- Zugabe von 120 mg (0,32 mmol) Fmoc-Metd<sup>3</sup>, Zugeben dieser Lösung zu dem Harz und Inkubieren für 3 min;
- Anschließend Zugabe von 50 µl (0,32 mmol) DIC; Kopplungszeit (0,4 M aktivierte Aminosäure).
- Entfernung der Fmoc-Gruppe mit Piperidin in DMF nach Standardprotokollen;
- Lösen von 150 mg (0,32 mmol) "Boc<sub>2</sub>X-OSu" in 800 µl DMF und Zugeben dieser Lösung zu dem Harz;
- Anschließend Zugabe von 53 µl Diisopropylethylamin (DIPEA) zu dem Harz, wobei die Kopplung für 3 Stunden fortschreiten gelassen wurde (0,4 M aktivierte Spezies);
- Nach dem Waschen des Harzes wurde die gewünschte Substanz mit 1 ml TFA, enthaltend 2,5% H<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>SiH und Thioanisol, jeweils innerhalb einer Stunde von dem Harz abgespalten;
- Zugabe von 30 ml Wasser zu der TFA-Lösung nach dem Filtrieren, und Entfernen des gesamten Lösungsmittels durch Gefriertrocknen.

[0175] Es wurde ein weißes Pulver der Peptidsequenz (A) erhalten.

#### Peptidsequenz (B)

- Aufquellen von 50 mg Harz für 5 min in 2 ml DMF;
- Entfernung der Fmoc-Gruppe mit Piperidin in DMF nach Standardprotokollen;
- Lösen von 49 mg (0,32 mmol) HOBt in 800 µl DMF;
- Zugabe von 120 mg (0,32 mmol) Fmoc-Metd<sup>3</sup>, Zugeben dieser Lösung zu dem Harz und Inkubieren für 3 min.
- Zugabe von 50 µl (0,32 mmol) DIC; Kopplungszeit (0,4 M aktivierte Aminosäure).
- Entfernung der Fmoc-Gruppe mit Piperidin in DMF nach Standardprotokollen;
- Lösen von 49 mg (0,32 mmol) HOBt in 800 µl DMF;
- Zugabe von 120 mg (0,32 mmol) Fmoc-Met, Zugeben dieser Lösung zu dem Harz und Inkubieren für 3 min;
- Zugabe von 50 µl (0,32 mmol) DIC; Kopplungszeit (0,4 M aktivierte Aminosäure).
- Entfernung der Fmoc-Gruppe mit Piperidin in DMF nach Standardprotokollen;
- Lösen von 150 mg (0,32 mmol) "Boc<sub>2</sub>X-OSu" in 800 µl DMF und Zugeben dieser Lösung zu dem Harz;
- Zugabe von 53 µl DIPEA; Kopplungszeit 3 Stunden (0,4 M aktivierte Spezies);
- Nach dem Waschen des Harzes wurde die gewünschte Substanz mit 1 ml TFA, enthaltend 2,5% H<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>SiH und Thioanisol, jeweils innerhalb einer Stunde von dem Harz abgespalten;
- Zugabe von 30 ml Wasser zu der TFA-Lösung nach dem Filtrieren, und Entfernung des gesamten Lösungsmittels durch Gefriertrocknen.

[0176] Es wurde ein hellgelbes Pulver der Peptidsequenz (B) erhalten.

## HPLC

**[0177]** Nach der Abspaltung wurde ein zu etwa 80% reines Produkt für jedes Peptid erhalten. Die Produkte wurden dann mittels HPLC gereinigt.

## MS

**[0178]** Die Identität der Peptide A und B wurde mittels Massenspektrometrie bestätigt. Ein Masse-zu-Ladung-Verhältnis von 496 wurde als Hauptpeak in sowohl den MALDI- als auch den ESI-Massenspektren für beide Produkte beobachtet, was mit der berechneten Masse für beide Peptide übereinstimmt. Ein Massenspektrum der Analyse einer Mischung der Peptide A und B mittels ESI-Massenspektrometrie ist in [Fig. 11](#) gezeigt. Es ist erkennbar, dass die zwei Peptide Massenspektren aufweisen, welche sich wie erwartet praktisch genau überlappen.

## MS/MS

**[0179]** [Fig. 13](#) zeigt die angenommenen Reaktionsmechanismen der Fragmentierung für die Produkte einer kollisionsinduzierten Dissoziation der in [Fig. 10](#) gezeigten Modellpeptide A und B. [Fig. 12](#) zeigt ein Paar von ESI-MS/MS-Spektren, die durch ein LCQ-Ionenfallen-Massenspektrometer von Finnigan MAT erhalten wurden. Die ESI-MS/MS-Spektren zeigen die Fragmentierungsprodukte der Peptide A und B. Das erwünschte b2-Fragmention (vgl. [Fig. 10](#)) zeigte bei beiden Substanzen eine hohe Intensität (273 nach dem Verlust von Ammoniak für A und 270 nach dem Verlust von Ammoniak für B). [Fig. 14](#) zeigt das ESI-MS/MS-Spektrum für die Fragmentierungsprodukte der Analyse einer Mischung der Peptide A und B, wobei A und B in der Mischung in einem Verhältnis von jeweils 70:30 vorlagen. Dieses Verhältnis ist aus den Intensitäten der Peaks des b2-Fragmentions bei m/z 273 bzw. 270 für die Peptide A und B ersichtlich. Dieses Spektrum zeigt, dass die Marker das Verhältnis der damit assoziierten Peptide anzeigen können, wenn Paare von Proben miteinander verglichen werden. [Fig. 15](#) zeigt eine lineare Regressionskurve für eine Reihe von ESI-MS/MS-Experimenten mit den Peptiden A und B. Das Diagramm zeigt eine graphische Darstellung des Verhältnisses von A zu B in der Mischung aufgetragen gegen die beobachteten Intensitäten der b2-Fragmentionen der ESI-MS/MS-Analyse der Mischungen. Das Diagramm zeigt, dass es eine gute Übereinstimmung zwischen den erwarteten und den beobachteten Verhältnissen gibt.

## Beispiel 2 – 6-[Bis(tert-butyloxycarbonyl)guanidino]hexansäure-N-Hydroxysuccinimidester

**[0180]** Die Synthese der Guanidino-aktiven Ester-Verbindungsgruppe, wie in [Fig. 9b](#) dargestellt, wurde in drei Schritten ausgeführt, wie nachstehend angegeben.

## 1. Synthese von Aminoiminomethansulfonsäure

**[0181]** 50 ml Essigsäureanhydrid und 2 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure wurden zu 45 g (397 mmol) 30%igem Wasserstoffperoxid unter Eiskühlung zugegeben. Nach 30 Minuten wurden noch einmal 100 ml (1157 mmol) Essigsäureanhydrid bei 10–12°C zu der Lösung zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt und erreichte während dieses Zeitraums Raumtemperatur. Nach Zugabe von 150 ml Methanol wurde eine Lösung, hergestellt aus 10 g (131 mmol) Thioharnstoff in 500 ml Methanol, langsam zu der Reaktionslösung bei 15–20°C zugetropft. Die Reaktionslösung wurde bei RT für 48 Stunden gerührt. Nach dem Filtrieren wurde die Lösung auf 60 ml eingeengt. Das erhaltene Produkt wurde abfiltriert und mit Ethanol gewaschen und dann durch Auskristallisieren aus Essigsäure (ca. 1 Liter) gereinigt. Ausbeute: 6,0 g (37%).

## 2. Synthese von 6-Guanidinohexansäure

**[0182]** 6,5 g (50 mmol) 6-Aminohexansäure und 6,9 g (50 mmol) Natriumcarbonat wurden in 50 ml Wasser gelöst. 6,2 g (50 mmol) Aminoiminomethansulfonsäure wurden unter Rühren zu der Lösung zugegeben. Nach 20 Stunden wurde das Produkt abfiltriert und mit Essigsäure, Methanol und dann Ether gewaschen. Ausbeute: 6,6 g (76%).

## 3. Synthese von 6-[Bis(tert-butyloxycarbonyl)guanidino]hexansäure-N-Hydroxysuccinimidester

**[0183]** 9,5 g (55 mmol) 6-Guanidinohexansäure und 55 g (270 mmol) N,O-Bistrimethylsilylacetamid wurden in 100 ml Dichlormethan gerührt und unter Rückfluss erhitzt, bis eine klare Lösung erhalten wurde (das Reaktionsgemisch wurde für etwa 10 Stunden stehen gelassen). 46 g (210 mmol) Di-tert-butylpyrocarbonat wurden

zu der Lösung bei RT zugegeben, und das Reaktionsgemisch wurde unter Rückfluss für 3 Stunden erhitzt, nachdem es bei RT für 18 Stunden (über Nacht) gerührt worden war. Die Lösung wurde dann auf RT gekühlt und mit einer 10%igen Citronensäurelösung und einer Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wurde das Pyrocarbonat bei 80–90°C unter verminderterem Druck abdestilliert. Die erhaltene viskose Flüssigkeit (30 g) wurde zusammen mit 8,6 g (75 mmol) N-Hydroxysuccinimid in 100 ml Dichlormethan gelöst. 15,5 g (75 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) wurden in Portionen zu dem Reaktionsgemisch unter Rühren bei RT zugegeben. Nach 17 Stunden wurde der Harnstoff durch Filtration entfernt. Die Lösung wurde mit einer 10%igen Citronensäurelösung gewaschen, und nach der Entfernung des Lösungsmittels wurde das Produkt mittels Chromatographie (Silicagel, Lösungsmittel: Dichlormethan/Ethylacetat) gereinigt. Das Produkt wurde dann aus Diisopropylether auskristallisiert. Ausbeute: 6,0 g (19%). Rf: 0,77 (Dichlormethan/Ethylacetat: 3/1). Fp: 108–109°C.

### Beispiel 3

#### Versuchsprotokolle

**[0184]** Die [Fig. 18a](#) und [Fig. 18b](#) zeigen zwei Paare von TMT-Reagenzien. Diese Reagenzien sind Peptidmarker gemäß dieser Erfindung, umfassend eine 'Marker'-Aminosäure, gebunden an eine die Empfindlichkeit erhöhende Gruppe ([1], [2], [3]), welche eine Guanidino-Funktionalität ist, sowie eine 'Massennormierungs'-Aminosäure, und in dem zweiten Paar von Markern eine die Spaltung begünstigende Gruppe, welche in diesem Fall Prolin ist ([4]). Diese Marker sind derart aufgebaut, dass bei der Analyse durch eine kollisions-induzierte Dissoziation (CID) das Markerfragment freigesetzt wird, wobei ein Ion mit einem spezifischen Masse-zu-Ladung-Verhältnis erhalten wird. Das gegenwärtig anerkannte Modell für eine Peptidspaltung während einer CID setzt eine Protonierung des Peptidgrundgerüsts voraus, gefolgt von einem nukleophilen Angriff auf die Carbonylgruppe des protonierten Amids durch den darauf folgenden N-terminalen Carbonylrest in der Peptidkette, wobei ein relativ stabiles Oxazolon gebildet wird, was die Spaltung der Amidbindung zur Folge hat ([5]). Die Empfindlichkeit erhöhende Gruppe ist über eine Amidbindung an den N-terminalen Methioninrest gebunden, wobei die Spaltung aber nicht an diesem Amid erfolgt, da in diesem Bereich kein geeignet angeordnetes Amid vorliegt, um eine Zykлизierung und eine Spaltung in dieser Position zu ermöglichen, so dass die Spaltung nur zwischen den zwei Methioninresten erfolgen kann. Dies bedeutet, dass sich das N-terminale Methionin von dem zweiten Methionin durch die Masse der Guanidino-Sensitivierungsgruppe unterscheidet. Auf diese Weise ermöglicht jedes Paar von Markern, dass ein Paar von Peptiden durch eine MS/MS-Analyse unterschieden werden kann. Jeder Marker kann auch eine reaktive Funktionalität tragen. In der Figur ist die reaktive Funktionalität R nicht näher bezeichnet, aber könnte einen N-Hydroxysuccinimidester darstellen, welcher die spezifische Markierung von Aminogruppen erlaubt. Es ist offensichtlich, dass diese reaktive Funktionalität ohne Weiteres variiert werden kann, um die Markierung von verschiedenen biologischen Nukleophilen zu ermöglichen. Ferner kann der Aufbau des Markers in einfacher Weise modifiziert werden, um einen Affinitätsliganden wie Biotin aufzunehmen. Außerdem sollte selbstverständlich sein, dass mehr als zwei Marker erzeugt werden können, um den Vergleich von weiteren Proben oder die Einführung von markierten Standards zu ermöglichen.

**[0185]** In den folgenden Beispielen sind die in Tabelle 7 aufgeführten Peptide in einer Form synthetisiert worden, als wenn sie mit den vorstehenden Markern an der α-Aminogruppe vollständig markiert worden waren, d. h. der Marker wurde während der Synthese 'vorher eingeführt', um die Leistungsfähigkeit der Marker unabhängig von den Markierungsreaktionen zu testen, so dass in den folgenden Beispielen die 'R'-Gruppe, wie in [Fig. 18a](#) und [Fig. 18b](#) gezeigt, der Peptidsequenz entspricht, an welche der Marker gebunden ist. Die markierten Peptide wurden mittels ESI-MS/MS und LC-ESI-MS/MS analysiert.

**[0186]** Die [Fig. 18a](#) und [Fig. 18b](#) zeigen die Strukturen zweier Ausführungsformen der TMT-Marker. Die Marker sind modular aufgebaut und umfassen unterschiedliche funktionelle Komponenten, die den einzelnen synthetischen Komponenten bei der automatisierten Synthese dieser Reagenzien entsprechen. Jeder Marker umfasst eine Sensitivierungsgruppe und eine Massendifferenzierungsgruppe, welche zusammen das 'Markerfragment' umfassen, das tatsächlich nachgewiesen wird. Das Markerfragment ist an eine Massennormierungsgruppe gebunden, welche sicherstellt, dass jeder Marker in einem Paar von Markern die gleiche Gesamtmasse und dieselbe Atomzusammensetzung hat. Die Marker der ersten und der zweiten Generation unterscheiden sich dadurch, dass der Marker der zweiten Generation zusätzlich eine Gruppe enthält, welche die Fragmentierung begünstigt, d. h. Prolin. Die Marker umfassen weiterhin eine reaktive Funktionalität (R), um zu ermöglichen, dass der Marker an ein beliebiges Peptid gekoppelt werden kann. In den vorliegenden Experimenten entspricht R einer Sequenz einer Reihe von Peptidsequenzen. Das angenommene Markerfragment, welches durch die Marker erhalten wird, ist in [Fig. 18c](#) basierend auf den gegenwärtigen Theorien der Mechanismen

einer Grundgerüst-Protonierung-abhängigen Fragmentierung dargestellt ([5]).

#### Synthese von TMT-markierten Peptiden

**[0187]** Die in Tabelle 7 gezeigten Peptide wurden mit Hilfe von herkömmlichen automatisierten Fmoc-Synthesetechniken synthetisiert (jeweils ausgehend von dem im Handel erhältlichen Fmoc-Gly-Trt-PS-Harz von Rapp Polymere, Deutschland). Deuteriertes Methionin (Metd<sup>3</sup>) ist von ISOTEC Inc., Miamisburg, Ohio, USA, erhältlich. Das Fmoc-Metd<sup>3</sup>-Reagens zur Verwendung in einem Peptidsynthesegerät wurde unter Verwendung eines ungeschützten deuterierten Methionins manuell synthetisiert, wie oben beschrieben wurde. Die Guanidino-'Sensitivierungsgruppe', welche die Empfindlichkeit erhöht, wurde in Form eines N-Hydroxysuccinimides (NHS-Esters) synthetisiert, wie oben beschrieben, und durch herkömmliche Verfahren während der automatisierten Peptidsynthese an die entschützten α-Aminogruppen der synthetisierten Peptide gebunden.

Tabelle 7

Peptidsequenzen		Generation 1		Generation 2	
		M <sub>i</sub>	Ion bei m/z (z)	M <sub>i</sub>	Ion bei m/z (z)
1A	TMT-GVATVSLPR	1319.7	660.9 (2+)	1415.7	708.9 (2+)
1B	TMT-GVATVSLPR	1319.7	660.9 (2+)	1415.7	708.9 (2+)
2A	TMT-GLGEHNIDVLEGNEQFINAAK	2688.31	897.1 (3+)	2784.3	928.8 (3+)
2B	TMT-GLGEHNIDVLEGNEQFINAAK	2688.31	897.1 (3+)	2784.3	928.8 (3+)
3A	TMT-GNKPGVYTK	1383.7	462.2 (3+)	1479.7	494.3 (3+)
3B	TMT-GNKPGVYTK	1383.7	462.2 (3+)	1479.7	494.3 (3+)
4A	TMT-GDPAALKRARNTTEAARRSRAR KLQRMKQGGC	3874.6	969.7 (4+)	3970.6	993.7 (4+)
4B	TMT-GDPAALKRARNTTEAARRSRAR KLQRMKQGGC	3874.6	969.7 (4+)	3970.6	993.7 (4+)

**[0188]** Tabelle 7: Mit den vorstehend aufgeführten Peptiden wurden Häufigkeitsverhältnis-Experimente durchgeführt. Mit den ersten drei Sequenzen der oben angegebenen Peptidsequenzen wurden HPLC-Experimente durchgeführt. Die Paare von synthetischen Peptiden wurden unter Verwendung eines TMT-Reagens von entweder der ersten oder der zweiten Generation hergestellt, wobei das TMT-Reagens vorher am N-Terminus in die Peptidsequenz eingeführt wurde. Für jeden Marker werden die Sequenz, die monoisotopische Molekülmasse und die Masse-zu-Ladung-Verhältnisse der vorliegenden Ionenspezies angegeben.

#### MS/MS-Analyse der TMT-markierten Peptide

**[0189]** Die Analysen wurden mittels Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie unter Verwendung von entweder einem Finnigan LCQ Deca-Instrument mit einem Finnigan Surveyor HPLC-System (Säule: 50 × 2,1 mm, 5 µm HyPURITY™ Elite C18) oder eines QTOF 2-Instruments von Micromass Ltd., Manchester, GB, mit einem Cap-LC-HPLC-System von LEAP Technologies (Säule: PepMap C18-HPLC-Säule von Dionex mit einem Innendurchmesser von 75 µm, wobei das Harz eine Partikelgröße von 3 µm und eine Porengröße von 100 Å aufwies).

**[0190]** Die Ionen-Häufigkeitsverhältnisse wurden mittels Addition und Mittelwertbildung unter Verwendung einer Reihe von Spektren eines eluierenden Peptidpaars, gefolgt durch die Bestimmung der Verhältnisse der Peakintensitäten für die Markerfragmente, bestimmt.

#### Beispiel 3a – Vergleich von TMT-Markern der ersten und der zweiten Generation

**[0191]** Um die Vorteile eines Markers zu veranschaulichen, welcher derart aufgebaut ist, dass er eine die Fragmentierung begünstigende Gruppe enthält, wurden zwei unterschiedliche TMT-Anordnungen untersucht. Die Marker unterscheiden sich dadurch, dass in die Marker der zweiten Generation ein Prolinrest eingeführt

wurde ([Fig. 18a](#) und [Fig. 18b](#)). Es ist bekannt, dass Prolin die Spaltung der Amidbindung an dem N-terminalen Ende davon begünstigt ([4]).

**[0192]** Erste Experimente zur Fragmentierung von TMT-Markern der ersten Generation mit einem Micromass QTOF 2-Instrument zeigten, dass die Intensität der TMT-Fragmente in hohem Maße von der Aminosäuresequenz des Peptids abhängig war und dass die Markerfragmente bei niedrigen Kollisionsenergien nicht genau die Häufigkeiten der markierten Peptide wiedergaben. Wie in [Fig. 18c](#) gezeigt, weisen die erwarteten Markerfragmente einen m/z-Wert von 287 oder 290 auf, wobei für die Marker der ersten Generation ein zweites Ionenpaar mit Masse-zu-Ladung-Verhältnissen von 270 oder 273 beobachtet wird. Es wird davon ausgegangen, dass diese Fragmente darauf zurückzuführen sind, dass in den erwarteten Markerfragmenten ein Verlust von Ammoniak auftritt. Ein Beispiel für ein typisches CID-Spektrum für ein Peptid, welches mit Markern der ersten Generation markiert ist, ist in [Fig. 19](#) gezeigt. Bei niedrigeren Kollisionsenergien variierten die Intensitäten dieser zwei Fragmentklassen mit der Sequenz des gebundenen Peptids, wobei bei höheren CID-Energien praktisch ausschließlich die 270/273-Fragmente beobachtet wurden. Bei diesen höheren Kollisionsenergien gaben die 270/273-Markerfragmente genau die Häufigkeiten der Peptidpaare wieder. Weitere Experimente unter Verwendung eines Finnigan LCQ-Ionenfallen-Massenspektrometers haben dasselbe Fragmentierungsmuster wie das QTOF-Instrument für die TMT-Marker der ersten Generation ergeben. Der beobachtete Ammoniakverlust tritt sowohl bei den LCQ- als auch den QTOF-Experimenten auf. Diese Instrumente unterscheiden sich in der Art und Weise, wie die CID ausgeführt wird (selektive Aktivierung und Fragmentierung des Ausgangsions allein bei dem LCQ-Instrument gegenüber einer seriellen Fragmentierung aller Ionen bei dem QTOF-Instrument). Da der Verlust von NH<sub>3</sub> in beiden Instrumenten auftritt, weist dies darauf hin, dass der Verlust von NH<sub>3</sub> direkt bei dem Ion des Ausgangspeptids auftritt und nicht das Ergebnis von nachfolgenden Kollisionen des erwarteten Fragmentions ist und ein spezifisches Merkmal dieser Markerstruktur darstellt. Bei beiden Instrumenten wird die Entstehung des 270/273-Fragments durch höhere Kollisionsenergien begünstigt. Dies bedeutet, dass die Analyse bei hohen Kollisionsenergien durchgeführt werden musste, um ein konstantes Verhalten für diesen Marker vorzusehen.

**[0193]** Obwohl die CID in dem LCQ-Instrument selektiver ist, ist sie bedauerlicherweise auf die Verwendung davon in Verbindung mit TMT-Markern begrenzt, da es mit diesem Instrumententyp nicht möglich ist, kleine CID-Fragmentierungsprodukte von großen Vorläufermolekülen nachzuweisen. Jedoch waren die aufeinanderfolgenden Fragmentierungen bei höheren Kollisionsenergien in dem QTOF-Instrument ebenfalls problematisch. In dem QTOF-Instrument werden die Reihen von b- oder y-Ionenfragmenten, welche die Sequenzinformation bereitstellen, weiter fragmentiert, wobei kleinere Spezies erhalten werden, so dass keine Sequenzinformation für das Peptid erhalten werden konnte. Als Ergebnis der Erfordernis für eine Hochenergie-CID, um die Freisetzung der Markerfragmente sicherzustellen und um eine genaue Quantifizierung zu erhalten, können die TMT-Marker der ersten Generation in dem QTOF-Instrument lediglich dazu verwendet werden, eine zuverlässige Quantifizierung, ohne Identifizierung des Peptids, vorzusehen. Dies trifft auch für andere serielle MS/MS-Instrumente zu.

**[0194]** Die [Fig. 19a](#) und [Fig. 19b](#) zeigen typische CID-Spektren für ein Peptid, welches mit einem TMT-Marker der ersten Generation markiert ist, bei Kollisionsenergien von 40 V ([Fig. 19a](#)) und 70 V ([Fig. 19b](#)). In [Fig. 19a](#) sind schwache Peaks sowohl in der 270/273- als auch der 287/290-Region bei 40 V erkennbar, wobei diese aber nicht die Häufigkeiten der markierten Peptide genau wiedergeben. Jedoch können bei diesem Beschleunigungspotential einige sequenzspezifische Ionen der y-Reihe beobachtet werden. In [Fig. 19b](#) sind die Peaks, welche dem Markerfragment entsprechen, bei einem m/z-Wert von 270 und 273 für den TMT-Marker der ersten Generation bei einer Kollisionsenergie von 70 V deutlich erkennbar. Bei dieser Kollisionsenergie geben die Intensitäten dieser Peaks die relativen Häufigkeiten jedes Peptids genau wieder (vgl. das Nebenbild für eine Vergrößerung der Markerregion in [Fig. 19b](#)), wobei aber keine Sequenzdaten ermittelt werden können.

**[0195]** Diese Ergebnisse führten zu der Entwicklung einer zweiten Generation von TMT-Markern, welche einen Prolinrest in der TMT-Gruppe enthalten, um die Fragmentierung zu verstärken. Zur Quantifizierung des Effekts des Prolinrestes in den Markern der zweiten Generation wurde eine 50:50-Mischung von Peptiden, welche mit entweder dem Marker der ersten oder der zweiten Generation markiert sind, mittels MS/MS analysiert. Die zwei erhaltenen Peptide mit der Sequenz Guanidinocaproyl-Met(D3)-Met-GLGEHNIDVLEGNEQFINAAK bzw. Guanidinocaproyl-Met(D3)-Pro-Met-GLGEHNIDVLEGNEQFINAAK sahen Ionen vor, welche der [M+3H]<sup>3+</sup>-Spezies entsprechen, mit Masse-zu-Ladung-Verhältnissen von etwa 897 und 929 für die Marker der ersten bzw. der zweiten Generation. Um dieselben Kollisionsbedingungen für beide Vorläufer vorzusehen, wurden die Peptide zuerst gemischt und dann in einem QTOF-Instrument analysiert, wobei der Quadrupol derart eingestellt wurde, dass entweder Ionen mit einem m/z-Wert von etwa 897 oder 929 selektiert wurden. Jedes

selektierte Ion wurde einer CID bei ansteigenden Kollisionsenergien unterworfen.

**[0196]** Bei Kollisionsenergien von 20 V oder weniger wurde für beide TMT-Typen praktisch keine Fragmentierung beobachtet. Bei einer Kollisionsenergie von 30 V–35 V ist es möglich, die erwarteten TMT-Fragmentionen für das Peptid mit dem Marker der zweiten Generation bei einem m/z-Wert von 290 in dem CID-Spektrum zu erkennen, während für das Peptid mit dem Marker der ersten Generation bei derselben Energie keine Fragmentionen bei einem m/z-Wert von 273 in dem Spektrum erkennbar sind, vgl. [Fig. 20](#), wenn gleich ein schwaches Fragment bei einem m/z-Wert von 290 beobachtet werden kann. Das Markerfragment für das Peptid, welches einen TMT-Marker der ersten Generation enthält, kann nicht beobachtet werden, bis eine Kollisionsenergie von 70 V verwendet wird (Daten nicht gezeigt). Bei kleineren Peptiden, welche mit dem TMT-Marker der ersten Generation markiert sind, wurde das Markerfragment bei niedrigeren Energien erhalten, wobei hohe Kollisionsenergien erforderlich waren, um das Markerfragment aus größeren Peptiden freizusetzen. Die Abhängigkeit der Energie, welche erforderlich war, um das Markerfragment freizusetzen, von der Größe des Peptides war für den TMT-Marker der zweiten Generation viel geringer. Der Vergleich der CID-Spektren von Peptiden, markiert mit TMT-Markern, enthaltend Prolin, mit Peptiden, markiert mit TMT-Markern ohne Prolin, zeigt deutlich, dass die Einführung der Aminosäure Prolin als eine die Fragmentierung verstärkende Gruppe eine Fragmentierung in Bezug auf das erwartete TMT-Markerfragment begünstigt, ohne dass sehr hohe Kollisionsenergien erforderlich sind. Bei diesen niedrigen Energien geben die Häufigkeitsverhältnisse der TMT-Fragmentionen der Prolin enthaltenden TMT-Marker auch genau die Verhältnisse der Konzentrationen der markierten Peptide wieder. Ferner kann das Peptid bei diesen niedrigeren Kollisionsenergien anhand der b- und y-Reihen hiervon identifiziert werden.

**[0197]** Die [Fig. 20a](#), [Fig. 20b](#) und [Fig. 20c](#) zeigen MS- und MS/MS-Spektren für dreifach geladene Ionen des Peptids 2 (vgl. Tabelle 2), welches mit den TMT-Markern der ersten und der zweiten Generation markiert wurde. Die Peptide wurden mit einem QTOF-Instrument analysiert. [Fig. 20a](#) zeigt das MS-Modus-TOF-Spektrum der Peptidmischung. Für die CID-Analyse wurde der erste Quadrupol derart eingestellt, dass er entweder Ionen mit einem m/z-Wert von etwa 897 oder 929 selektiert. Das CID-Spektrum bei 35 V für Guanidinocaproyl-Met(D3)-Met-GLGEHNIDVLEGNEQFINAAK ist in [Fig. 20b](#) gezeigt, und das CID-Spektrum bei 35 V für Guanidinocaproyl-Met(D3)-Pro-Met-GLGEHNIDVLEGNEQFINAAK ist in [Fig. 20c](#) gezeigt. In [Fig. 20b](#) konnte das erwartete Markerfragment für den TMT-Marker der ersten Generation mit einem m/z-Wert von 273 nicht beobachtet werden, während in [Fig. 20c](#) das erwartete Markerfragment für den TMT-Marker der zweiten Generation mit einem m/z-Wert von 290 bei 35 V deutlich erkennbar ist.

**[0198]** Das verbesserte Verhalten der TMT-Marker der zweiten Generation ist aus [Fig. 21](#) ersichtlich, das ein typisches CID-Spektrum für ein Peptid zeigt, welches mit diesen Markern markiert ist. Die Markerfragmente, welche die Häufigkeitsverhältnisse wiedergeben, sind bei den erwarteten m/z-Werten von 287 und 290 ohne Weiteres erkennbar. Außerdem ist sowohl die b-Reihe als auch die y-Reihe erkennbar, welche die Bestimmung der Sequenz des Peptids ermöglichen. Die CID wurde bei einer relativ niedrigen Kollisionsenergie von 40 V durchgeführt. Die Peaks bei einem m/z-Wert von 287 und 290 für die TMT-Marker der zweiten Generation geben die relativen Häufigkeiten für jedes Peptid wieder (vgl. das Nebenbild mit einer Vergrößerung des relevanten Bereichs des Massenspektrums).

**[0199]** [Fig. 22](#) zeigt deutlich, dass der Ladungszustand des TMT-markierten Peptids die Entstehung der Markerfragmente in den CID-Spektren der markierten Peptide nicht beeinflusst. Dieses Beispiel zeigt ein Peptid, welches mit einem TMT-Marker der ersten Generation markiert ist, wobei für die TMT-Marker der zweiten Generation das gleiche Ergebnis erhalten wird. Dies ist insofern vorteilhaft, als die Abtastung des Spektrums ohne aufwändige Anpassungen der Abtastungs-Software, um den Ladungszustand jedes Peptids auszugleichen, erfolgen kann. Bei anderen Isotop-Markierungsverfahren wie der ICAT verändert der Ladungszustand die Massendifferenz zwischen jedem markierten Ionenpaar, so dass für zweifach geladene Ionen die Massendifferenz halbiert wird, für dreifach geladene Ionen die Massendifferenz einem Drittel der Massendifferenz für die einfach geladenen Ionen entspricht, etc. Die Software für die Durchmusterung auf Peptidpaare mittels herkömmlicher Isotop-Markierungsverfahren wie der ICAT muss daher diese Arten von Problemen kompensieren und entweder verschiedene mögliche Massendifferenzen zulassen oder bestimmte Klassen von Ionen ignorieren, wodurch entweder die Möglichkeit für eine fehlerhafte Identifizierung von Peptidpaaren erhöht wird oder mögliche Ionenpaare, welche nützliche Informationen liefern könnten, übergangen werden.

**[0200]** [Fig. 22](#) zeigt einen Vergleich der Spektren für Peptid 4 aus Tabelle 7, wobei die CID mit entweder der  $[M+4H]^{4+}$ -Spezies (unteres Spektrum) oder der  $[M+5H]^{5+}$ -Spezies (oberes Spektrum) durchgeführt wurde. Das vorstehende Peptid enthält den TMT-Marker der ersten Generation. Das 4+-Ion hat einen m/z-Wert von 969,3, während das 5+-Ion einen m/z-Wert von 775,6 aufweist. Das Fragmention des Markers wird in beiden Spektren

bei dem erwarteten Masse-zu-Ladung-Verhältnis von 273 beobachtet, was zeigt, dass nur eine Ladung in dem Markerfragment lokalisiert ist.

**[0201]** [Fig. 23](#) zeigt die Daten für die erwarteten und die beobachteten Verhältnisse der Peptide für ESI-MS/MS-Analysen der in Tabelle 7 aufgeführten vier Peptide. Die Peptide wurden sowohl mit den TMT-Markern der ersten als auch der zweiten Generation analysiert. Die Häufigkeitsverhältnisse wurden mittels Analyse der Peakmaxima bei d3 (A) und d0 (B) der Ionenpeaks des Markerfragments im Anschluss an eine Peak-Normalisierung bei 290 und 287 für TMT2 bestimmt. Die Messungen wurden mit einem QTOF-Instrument durchgeführt. Die eingefügte Tabelle in [Fig. 23](#) zeigt die erwarteten und die beobachteten Verhältnisse der Fragmente des b-Ions für die MS/MS-Analyse der eluierenden TMT-markierten Peptide. Es ist ersichtlich, dass beide TMT-Generationen eine genaue Wiedergabe der Häufigkeitsverhältnisse der Peptide in den Mischungen vorsehen und dass die Marker ein lineares Verhalten über den gesamten Bereich der untersuchten Peptidverhältnisse zeigen.

Beispiel 3b – Nachweis eines identischen chromatographischen Verhaltens der TMT-Marker bei einer LC-MS

**[0202]** Eine Mischung von vier synthetischen Peptidpaaren wurde unter Verwendung der TMT-Marker der zweiten Generation, welche vorher am N-Terminus jedes Peptids eingeführt wurden, synthetisiert. Die Peptidpaare wurden alle gemeinsam analysiert. Jedes Peptidpaar wurde in einem anderen Verhältnis hergestellt. Die Sequenzen, die theoretischen monoisotopischen Massen und die Massen der zweifach geladenen Ionen sind in Tabelle 7 angegeben. Die Peptide wurden auf eine C18-Umkehrphasen-HPLC-Säule aufgegeben und getrennt. Der Zweck dieses Experiments war, die exakt gleichzeitige Elution der entsprechenden Paare von Peptiden mit unterschiedlichen TMT-Markern, ohne das irgendwelche Schwierigkeiten auftreten, zu demonstrieren. Die Verhältnisse der Peptidpaare wurden erwartet und blieben über den gesamten Elutionszeitraum für jedes Peptidpaar konstant, wobei ein weiteres Ziel dieses Experiments darin lag, zu zeigen, dass die Quantifizierung der Peptidpaare in Verbindung mit einer parallel durchgeföhrten Sequenzbestimmung ausgeführt werden konnte und dass es möglich wäre, eine Durchmusterung auf andere Peptide durchzuführen, ohne dass die vollständige Elution des Peptids abgewartet werden muss. Eine vollständige Elution der Peptidpaare ist für eine genaue Quantifizierung mittels der ICAT-Strategie und anderen Peptidanalysetechniken mittels einer herkömmlichen Isotopmarkierung unerlässlich. Dadurch wird die Durchflussleistung dieser Methoden begrenzt.

**[0203]** [Fig. 24](#) zeigt die gleichzeitige Elution jedes Peptidpaars, der Peptide A und B für jedes Peptid aus Tabelle 7, wobei die C18-Umkehrphasen-HPLC-Spuren deutlich erkennbar sind. Für jedes Peptid werden Ionenströme mit einem m/z-Wert von 287 und 290 registriert, welche den Markerfragmenten eines jeden der TMT-Marker entsprechen. Die untere Spur für jedes Peptid entspricht dem gesamten Ionenstrom. Es sind die Elutionsprofile der drei Peptide, aufgenommen bei jedem der Masse-zu-Ladung-Verhältnisse der b<sub>2</sub>-Ionen der Markerfragmente, gezeigt. Es ist deutlich erkennbar, dass die Peptidpaare als eine einzige Fraktion eluieren. Im MS/MS-Modus ergab die Überwachung der Ionen der Markerfragmente in jedem Fall nahezu identische Ergebnisse. Für jedes Peptidpaar stimmten die beobachteten Verhältnisse mit den erwarteten Verhältnissen in einem in annehmbaren Maße überein.

**[0204]** Da die markierten Peptide exakt gleichzeitig eluieren, bleiben die Verhältnisse der Peptidpaare in dem Elutionsprofil erhalten, was bedeutet, dass es nicht erforderlich ist, den gesamten Ionenstrom für die eluierenden Ionen zu integrieren, um die relative Häufigkeit jedes Peptidpaars zu bestimmen.

Beispiel 3c – Untersuchung der Empfindlichkeit und der Robustheit der TMT-Technologie

**[0205]** Um eine wirksame Verbesserung gegenüber einer herkömmlichen Isotopmarkierung vorzusehen, muss die TMT-Technologie mindestens so empfindlich wie andere Isotop-Markierungsverfahren sein und muss einen weitgehend vergleichbaren Dynamikbereich aufweisen. Zusätzlich müssen die Eigenschaften der Marker über den gesamten erwarteten Dynamikbereich der zu analysierenden Proben konstant bleiben. Schließlich ist es erforderlich, dass diese Marker in der Lage sind, das Rauschen in dem Massenspektrometer zu kompensieren. Um den Dynamikbereich des Systems zu untersuchen und um zu zeigen, dass die Eigenschaften der TMT-Marker über den gesamten Dynamikbereich konstant bleiben, wurde die Aufrechterhaltung der Peptidverhältnisse innerhalb eines Bereichs von unterschiedlichen Konzentrationen eines der markierten synthetischen Peptide (Peptid 3A und 3B) untersucht. Wie aus [Fig. 25](#) ersichtlich ist, wurden bei einer Verdünnungsreihe der Peptide 3A und 3B, gemischt in einem Verhältnis von 40:60, von 100 pmol bis 100 fmol die Verhältnisse zuverlässig aufrechterhalten, wobei in den meisten Fällen eine Abweichung innerhalb von 5% von dem erwarteten Verhältnis beobachtet wurde. Diese und andere Ergebnisse (nicht gezeigt) zeigen, dass die Markerpeptide die spezifische Intensität, mit der ein Peptid in dem MS/MS-Modus nachgewiesen wird, nicht ver-

mindert, d. h. die Analyse der TMT-markierten Peptide mittels CID weist im Wesentlichen die gleiche Empfindlichkeit wie die MS/MS-Analyse von unmarkierten Peptiden auf. Basierend auf Vergleichen von LCQ- und QTOF-Instrumenten im Hinblick auf die Analyse von kleinen Peptiden scheint die spezifische Empfindlichkeit instrumentenabhängig zu sein (die Markerfragmente von großen Peptiden, markiert mit TMT-Markern, können aufgrund der spezifischen Einschränkungen im Hinblick auf die CID bei diesem Instrumententyp nicht mit dem LCQ-Instrument nachgewiesen werden). Die Empfindlichkeit, bei der es möglich ist, die Sequenz der markierten Peptide zu bestimmen, scheint bei keinem der bisher getesteten Peptide wesentlich verändert worden zu sein. Bedeutungsvolle Unterschiede zwischen den Verhältnissen der Peptide können über den gesamten Bereich der getesteten Konzentrationen nachgewiesen werden ([Fig. 25](#)).

**[0206]** Die [Fig. 26a](#), [Fig. 26b](#) und [Fig. 26c](#) zeigen die Ergebnisse eines 'Spiking'-Experiments, bei dem Peptidpaare von 3A und 3B (500 fmol insgesamt, in einem Verhältnis von jeweils 40:60), welche einen TMT-Marker der zweiten Generation tragen, mit dem Spaltprodukt von Rinderserumalbumin (2 pmol) gemischt wurden. [Fig. 26a](#) zeigt das Basis-Peak-Chromatogramm der Analyse in einem MS/MS-Modus. Während des Laufs wurden die ersten fünf Ionen mit der stärksten Intensität, welche in dem MS-Modus analysiert wurden, in dem MS/MS-Modus bei 30 V automatisch fragmentiert. Die TMT-Peptidpaare wurden untersucht und auf dem Basis-Peak-Chromatogramm lokalisiert. Anschließend wurde das Verhältnis der TMT2-Fragmente aus dem MS/MS-Spektrum für die Masse  $[M+3H]^{3+}$  (eine Vergrößerung der Markerfragmente ist in [Fig. 9b](#) gezeigt, und das gesamte Spektrum ist in [Fig. 9c](#) gezeigt) durch den Vergleich der Intensität der Masse-zu-Ladung-Verhältnisse (287 und 290) der d0- und d3-TMT-Fragmente berechnet.

**[0207]** In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob es möglich ist, markierte Peptide vor einem Hintergrund von verunreinigenden Peptiden nachzuweisen. Die Peptidpaare 3A und 3B, welche einen TMT-Marker der zweiten Generation tragen, wurden mit einem 20fachen Überschuss eines Spaltprodukts von Rinderserumalbumin gemischt. Die Peptidmischung wurde dann mit einem LC-QTOF-Instrument analysiert. Die fünf Ionen mit der stärksten Intensität aus der Durchmusterung einer jeden Elution wurden einer CID unterworfen, um die Peptide zu identifizieren. Die erwarteten Peptide wurden nachgewiesen, und der Bereich des Spektrums, welcher den Markerfragmenten entspricht, wurde analysiert, um das Häufigkeitsverhältnis der nachgewiesenen Peptide zu bestimmen. Durch die CID-Analyse (Kollisionsenergie 30 V) wird das in [Fig. 26c](#) gezeigte Spektrum erhalten. Für das Verhältnis der Peptide 3A und 3B wurde durch den Vergleich der Peakintensitäten bei Masse-zu-Ladung-Verhältnissen des Fragments von 290 (d3-TMT-Gruppe) und 287 (d0-TMT-Gruppe) jeweils ein Wert von 39,3% zu 60,7% ermittelt. Das erwartete Verhältnis betrug 40% 3A zu 60% 3B, so dass das Peptidverhältnis innerhalb eines Fehlers von 1,7% nachgewiesen wurde. Die Qualität des erhaltenen MS/MS-Spektrums ([Fig. 26b](#) und [Fig. 26c](#)) bei der verwendeten niedrigen Kollisionsenergie ermöglicht die eindeutige Identifizierung der Peptidsequenz mit Hilfe einer Datenbankdurchsuchung. Dieses Experiment zeigt deutlich, dass eine komplexe Mischung von mit Trypsin behandelten Peptiden die Analyse von Peptidpaaren, welche mit den TMT-Markern der zweiten Generation markiert sind, nicht beeinflusst und dass die TMT-Marker dazu beitragen können, das Rauschen der Probe zu kompensieren. Ferner scheinen keine Suppressionsprobleme aufzutreten, da die Verhältnisse von Peptiden, welche in geringen Konzentrationen vorliegen, in Gegenwart von anderen Peptiden, welche in hohen Konzentrationen vorliegen, dennoch bestimmt werden können.

## Referenzen

- Brancia F. L., Oliver S. G. und Gaskell S. J., Improved matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of tryptic hydrolysates of proteins following guanidination of lysine-containing peptides, Rapid Commun. Mass Spectrom. 14 (21) (2000), S. 2070–2073.
- Roth K. D. et al., Charge derivatization of peptides for analysis by mass spectrometry, Mass Spectrom. Rev. 17 (4) (1998), S. 255–274.
- Brancia F. L. et al., A combination of chemical derivatisation and improved bioinformatics tools optimises protein identification for proteomics, Electrophoresis 22 (3) (2001), S. 552–559.
- Schwartz B. L. und Bursey M. M., Some proline substituent effects in the tandem mass spectrum of protonated pentaalanin, Biol. Mass Spectrom. 21 (2) (1992), S. 92–96.
- Schlosser A. und Lehmann W. D., Five-membered ring formation in unimolecular reactions of peptides: a key structural element controlling low-energy collisioninduced dissociation of peptides, J. Mass Spectrom. 35 (12) (2000), S. 1382–1390.
- Griffin T. J. et al., Toward a high-throughput approach to quantitative proteomic analysis: expression-dependent protein identification by mass spectrometry, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 12 (2001), 1238–1246.
- Zhou H., Watts J. D. und Aebersold R., A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation, Nat. Biotechnol. 19 (4) (2001), S. 375–378.
- Oda Y., Nagasu T. und Chait B. T., Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the

phosphoproteome, Nat. Biotechnol. 19 (4) (2001), S. 379–382.

9. Ficarro S. B. et al., Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*, Nat. Biotechnol. 20 (3) (2002), S. 301–305.

## Sequenzprotokoll

<110> XZILLION GMBH & CO. KG

<120> MASS LABELS

<130> 208649/CMH/AV

<140> PCT/GB02/04240

<141> 2002-09-14

<150> EP01307830.8

<151> 2001-09-14

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TMT labelled peptide

<400> 1

Gly Val Ala Thr Val Ser Leu Pro Arg

1 5

<sup>a</sup>

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TMT labelled peptide

<400> 2

Gly Leu Gly Glu His Asn Ile Asp Val Leu Glu Gly Asn Glu Gln Phe

1 5 10 15

Ile Asn Ala Ala Lys

20

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TMT labelled peptide

<400> 3

Gly Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys

1 5

<210> 4  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> TMT-markiertes Peptid

&lt;400&gt; 4

Gly Asp Pro Ala Ala Leu Lys Arg Ala Arg Asn Thr Glu Ala Ala Arg  
1 5 10 15

Arg Ser Arg Ala Arg Lys Leu Gln Arg Met Lys Gln Gly Gly Cys  
20 25 30

<210> 5  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> TMT-Peptid der ersten Generation

&lt;400&gt; 5

Met Met Gly Ile Gly Glu His Asn Ile Asp Val Leu Glu Gly Asn Glu  
1 5 10 15

Gln Phe Ile Asn Ala Ala Lys  
20

<210> 6  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> TMT-markiertes Peptid der zweiten Generation

&lt;400&gt; 6

Met Pro Met Gly Leu Gly Glu His Asn Ile Asp Val Leu Glu Gly Asn  
1 5 10 15

Glu Gln Phe Ile Asn Ala Ala Lys  
20

<210> 7  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> TMT-Marker der zweiten Generation

&lt;400&gt; 7

Met Pro Met Gly  
1

**Patentansprüche**

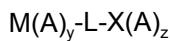
1. Satz von zwei oder mehreren Massenmarkern, wobei jeder Marker in dem Satz eine Massenmarkergruppe umfasst, welche über eine spaltbare Verbindungsgruppe mit mindestens einer Amidbindung an eine Massennormierungsgruppe gebunden ist, wobei jede Massennormierungsgruppe sicherstellt, dass ein Massenmarker eine gewünschte Aggregatmasse besitzt, und wobei der Satz eine Gruppe von Markern umfasst, welche eine Massenmarkergruppe mit einer gleichen Masse aufweisen, und jeder Marker eine Aggregatmasse hat, welche sich von allen anderen Marker in dieser Gruppe unterscheidet; oder eine Gruppe von Marker, welche eine Massenmarkergruppe aufweisen, wobei jede Massenmarkergruppe eine Masse hat, welche sich von derjenigen aller anderen Massenmarkergruppen in dieser Gruppe unterscheidet, und jeder Marker in der Gruppe eine gleiche Aggregatmasse hat; und wobei alle Massenmarker in dem Satz mittels Massenspektroskopie voneinander unterscheidbar sind, und wobei die Massenmarkergruppe eine Aminosäure umfasst, und die Massennormierungsgruppe eine Aminosäure umfasst.

2. Satz von Massenmarkern nach Anspruch 1, wobei jeder Marker in dem Satz eine Massenmarkergruppe mit einer gleichen Masse umfasst, und jeder Marker in dem Satz eine spezifische Aggregatmasse hat.

3. Satz von Massenmarkern nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei jeder Marker in dem Satz eine Massenmarkergruppe mit einer spezifischen Masse umfasst, und jeder Marker in dem Satz eine gleiche Aggregatmasse hat.

4. Satz von Massenmarkern nach Anspruch 3, wobei jede Massenmarkergruppe in dem Satz eine gleiche Basisstruktur hat, und jede Massennormierungsgruppe in dem Satz eine gleiche Basisstruktur besitzt, die der gemeinsamen Basisstruktur der Massenmarkergruppen entsprechen oder davon verschieden sein kann, und wobei jeder Massenmarker in dem Satz eine oder mehrere Massenregulierungsgruppen umfasst, wobei die Massenregulierungsgruppen an die Basisstruktur der Massenmarkergruppe und/oder die Basisstruktur der Massennormierungsgruppe gebunden sind oder innerhalb davon vorliegen, so dass jede Massenmarkergruppe in dem Satz eine unterschiedliche Anzahl an Massenregulierungsgruppen umfasst, und jeder Massenmarker in dem Satz die gleiche Anzahl an Massenregulierungsgruppen aufweist.

5. Satz von Massenmarkern nach Anspruch 4, wobei jeder Massenmarker in dem Satz die folgende Struktur hat:



worin M eine Massennormierungsgruppe, umfassend eine Aminosäure, ist; X eine Massenmarkergruppe, umfassend eine Aminosäure, ist; A eine Massenregulierungsgruppe ist; L eine spaltbare Verbindungsgruppe, umfassend die Amidbindung, ist; y und z ganze Zahlen von 0 oder größer sind, und y + z eine ganze Zahl von 1 oder größer ist.

6. Satz von Massenmarkern nach Anspruch 4 oder Anspruch 5, wobei die Massenregulierungsgruppe gewählt ist aus:

- (a) einem Isotopen-Substituenten, welcher innerhalb der Basisstruktur der Massenmarkergruppe und/oder innerhalb der Basisstruktur der Massennormierungsgruppe vorliegt, und
- (b) Substituentenatomen oder -gruppen, welche an die Basisstruktur der Massenmarkergruppe und/oder an die Basisstruktur der Massennormierungsgruppe gebunden sind.

7. Satz von Massenmarkern nach Anspruch 6, wobei die Massenregulierungsgruppe aus einem Halogenatom-Substituenten, einem Methylgruppen-Substituenten und  $^2\text{H}$ - oder  $^{13}\text{C}$ -Isotopen-Substituenten gewählt ist.

8. Satz von Massenmarkern nach Anspruch 7, wobei die Massenregulierungsgruppe ein Fluoratom-Substituent ist.

9. Satz von Massenmarkern nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die spaltbare Verbindungsgruppe, welche die Massenmarkergruppe mit der Massennormierungsgruppe verbindet, eine Verbindungsgruppe ist, welche durch eine kollisionsinduzierte Dissoziation spaltbar ist.

10. Satz von Massenmarkern nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die spaltbare Verbindungsgruppe Prolin und/oder Asparaginsäure umfasst.

11. Satz von Massenmarkern nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Massenmarkergruppe und/oder die Massennormierungsgruppe eine Gruppe umfasst, welche gegen eine Fragmentierung beständig ist.
12. Satz von Massenmarkern nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Massenmarkergruppe eine die Empfindlichkeit erhöhende Gruppe, wie zum Beispiel eine vorionisierte Gruppe, umfasst.
13. Satz von Massenmarkern nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Massenmarkergruppe oder die Massennormierungsgruppe eine reaktive Funktionalität umfasst.
14. Satz von Massenmarkern nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei jeder Massenmarker in dem Satz einen Liganden für eine Affinitätsabfangreaktion, wie zum Beispiel Biotin, umfasst.
15. Satz von zwei oder mehreren Analyten, wobei jeder Analyt in dem Satz sich unterscheidet und an einen spezifischen Massenmarker oder eine spezifische Kombination von Massenmarkern aus einem Satz von Massenmarkern, wie in einem der Ansprüche 1–14 definiert, gebunden ist.
16. Satz von Analyten nach Anspruch 15, wobei ein Analyt oder mehrere Analyten in dem Satz einem Standardanalyten mit einer bekannten Masse oder mit bekannten chromatographischen Eigenschaften entspricht bzw. entsprechen.
17. Satz von zwei oder mehreren Sonden, wobei jede Sonde in dem Satz sich unterscheidet und an einen spezifischen Massenmarker oder eine spezifische Kombination von Massenmarkern aus einem Satz von Massenmarkern, wie in einem der Ansprüche 1–14 definiert, gebunden ist.
18. Satz von Analyten oder Sonden nach einem der Ansprüche 15–17, wobei jeder Analyt oder jede Sonde an eine spezifische Kombination von Massenmarkern gebunden ist, und wobei sich jede Kombination durch die Anwesenheit oder die Abwesenheit eines jeden Massenmarkers in dem Satz von Massenmarkern und/oder die Menge eines jeden Massenmarkers, welche an die Sonde gebunden ist, unterscheidet.
19. Satz von Analyten oder Sonden nach einem der Ansprüche 15–18, wobei jeder Analyt oder jede Sonde ein Biomolekül umfasst.
20. Satz von Analyten oder Sonden nach Anspruch 19, wobei das Biomolekül aus einer DNA, einer RNA, einem Oligonucleotid, einer Nucleinsäurebase, einem Protein und/oder einer Aminosäure gewählt ist.
21. Analyseverfahren, welches Verfahren das Nachweisen eines Analyten durch die Identifizierung eines Massenmarkers oder einer Kombination von Massenmarkern, welcher bzw. welche dem Analyten zuordenbar ist, mittels Massenspektroskopie umfasst, wobei der Massenmarker ein Massenmarker aus einem Satz von Massenmarkern, wie in einem der Ansprüche 1–14 definiert, ist.
22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei die verwendeten Massenmarker Marker sind, welche einen Liganden für eine Affinitätsabfangreaktion umfassen, und die markierten Analyten durch das Abfangen des Liganden für eine Affinitätsabfangreaktion mit einem Gegenliganden von den unmarkierten Analyten getrennt werden.
23. Verfahren nach Anspruch 21 oder Anspruch 22, wobei zwei oder mehrere Analyten durch das gleichzeitige Identifizieren ihrer Massenmarker oder Kombinationen von Massenmarkern mittels Massenspektroskopie nachgewiesen werden.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 21–23, wobei jeder Analyt durch eine spezifische Kombination von Massenmarkern aus einem Satz oder einer Reihe von Massenmarkern, wobei sich jede Kombination durch die Anwesenheit oder die Abwesenheit eines jeden Massenmarkers in dem Satz oder der Reihe und/oder die Menge eines jeden Massenmarkers unterscheidet, identifiziert wird.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 21–24 zur Identifizierung von zwei oder mehreren Analyten, wobei die Analyten vor dem Nachweisen ihrer Massenmarker mittels Massenspektroskopie entsprechend ihrer Masse aufgetrennt werden.
26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Analyten, welche identifiziert werden sollen, mit einem oder

mehreren Standardanalyten mit einer bekannten Masse oder mit bekannten Eigenschaften in Bezug auf das angewendete Trennverfahren vermischt werden, um die Charakterisierung der Analyten zu erleichtern.

27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei die Standardanalyten wie in Anspruch 16 definiert sind.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 25–27, wobei die Trennung durch ein chromatographisches oder elektrophoretisches Verfahren erfolgt.
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 21–28, wobei der Massenspektrometer, welcher verwendet wird, um den Massenmarker nachzuweisen, einen oder mehrere Massenanalysatoren umfasst, welche Massenanalysatoren geeignet sind, um Ionen einer bestimmten Masse oder eines bestimmten Massenbereiches für den Nachweis durchzulassen, und/oder in der Lage sind, die Dissoziation der Ionen zu bewirken.
30. Verfahren nach Anspruch 29, wobei Ionen einer bestimmten Masse oder eines bestimmten Massenbereiches, die bzw. der für einen oder mehrere bekannte Massenmarker spezifisch ist, unter Verwendung des Massenanalysators ausgewählt werden, die ausgewählten Ionen dissoziert werden, und die Dissoziationsprodukte nachgewiesen werden, um Ionenmuster zu identifizieren, welche die selektierten Massenmarker anzeigen.
31. Verfahren nach Anspruch 29 oder Anspruch 30, wobei der Massenspektrometer drei Quadrupol-Massenanalysatoren umfasst.
32. Verfahren nach Anspruch 31, wobei ein erster Massenanalysator verwendet wird, um Ionen einer bestimmten Masse oder eines bestimmten Massenbereiches zu selektieren, ein zweiter Massenanalysator verwendet wird, um die selektierten Ionen zu dissoziieren, und ein dritter Massenanalysator verwendet wird, um die erhaltenen Ionen nachzuweisen.
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 21–32, welches Verfahren umfasst:
  - (a) Inkontaktbringen eines oder mehrerer Analyten mit einem Satz von Sonden, wobei die Sonden wie in einem der Ansprüche 17–20 definiert sind,
  - (b) Identifizieren eines Analyten durch das Nachweisen einer Sonde, welche dem Analyten zuordenbar ist.
34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei der Massenmarker vor dem Nachweisen des Massenmarkers mittels Massenspektroskopie von der Sonde abgespalten wird.
35. Verfahren nach Anspruch 33 oder Anspruch 34, welches Verfahren das Inkontaktbringen einer oder mehrerer Nucleinsäuren mit einem Satz von Hybridisierungssonden umfasst.
36. Verwendung eines Massenmarkers aus einem Satz von Markern, wie in einem der Ansprüche 1–14 definiert, in einem Analyseverfahren.
37. Verwendung nach Anspruch 36 in einem zweidimensionalen elektrophoretischen Analyseverfahren.
38. Verwendung nach Anspruch 36 in einem zweidimensionalen massenspektrometrischen Analyseverfahren.
39. Verwendung nach einem der Ansprüche 36–38 in einem Verfahren zur Sequenzierung einer oder mehrerer Nucleinsäuren.
40. Verwendung nach einem der Ansprüche 36–38 in einem Verfahren zum Erstellen eines Genexpressionsprofils.
41. Verwendung nach einem der Ansprüche 36–38 in einem Verfahren zum Erstellen eines Proteinexpressionsprofils.
42. Verwendung nach einem der Ansprüche 36–38 in einem Verfahren zur Sortierung von Nucleinsäuren.

Es folgen 34 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

Fig. 1.

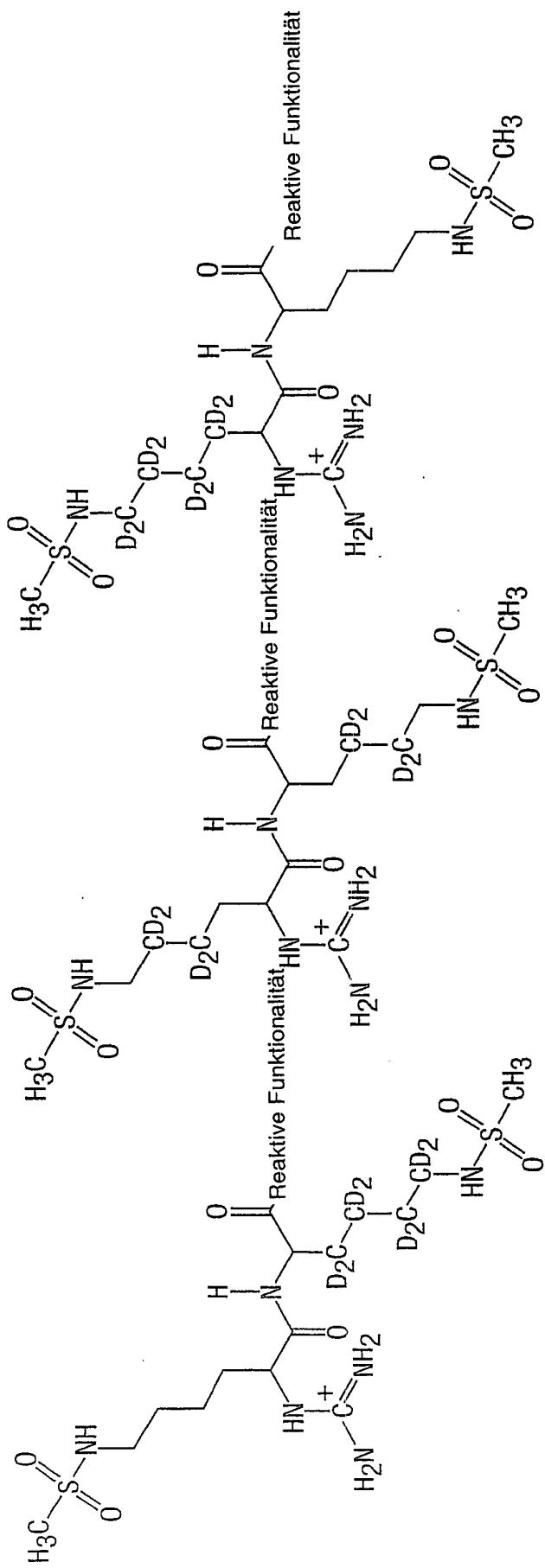


Fig.2.

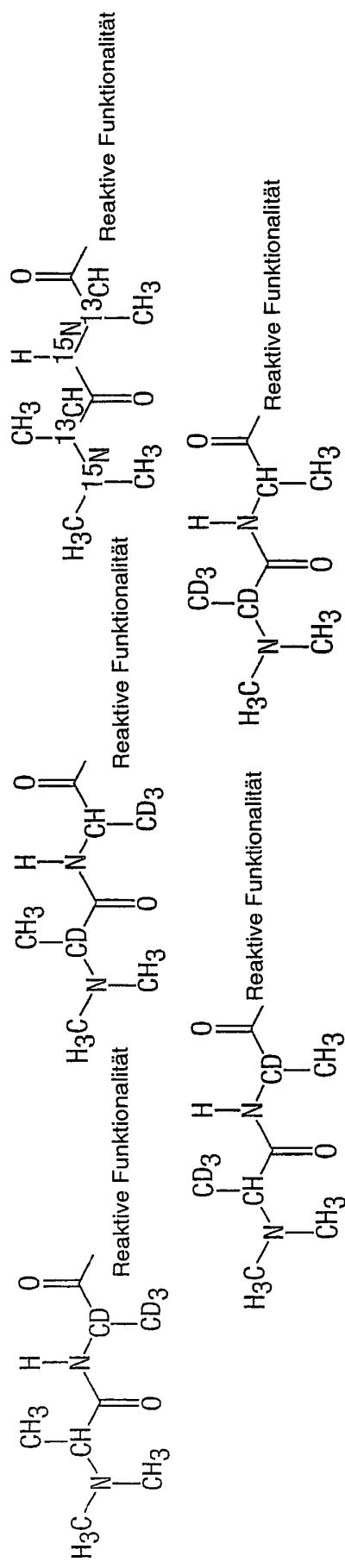


Fig. 3.

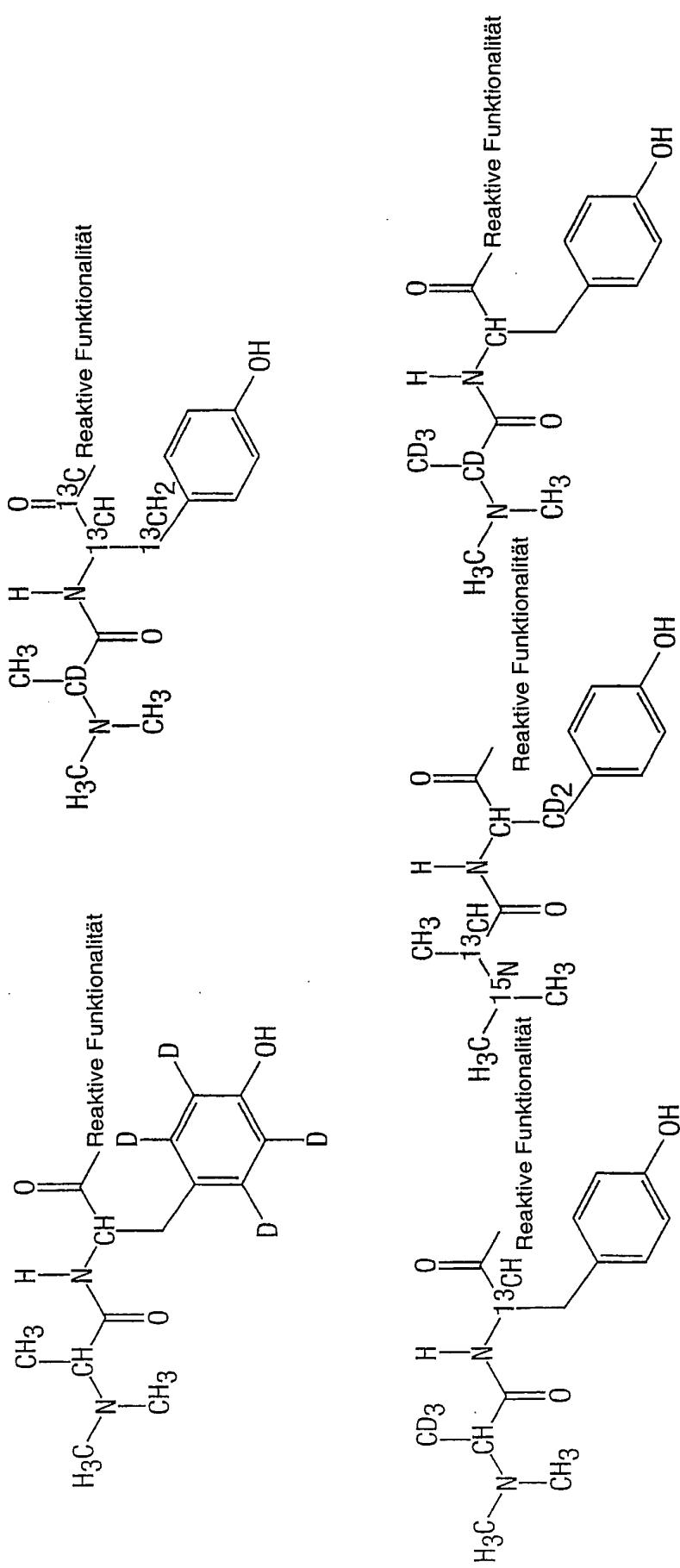


Fig.4.

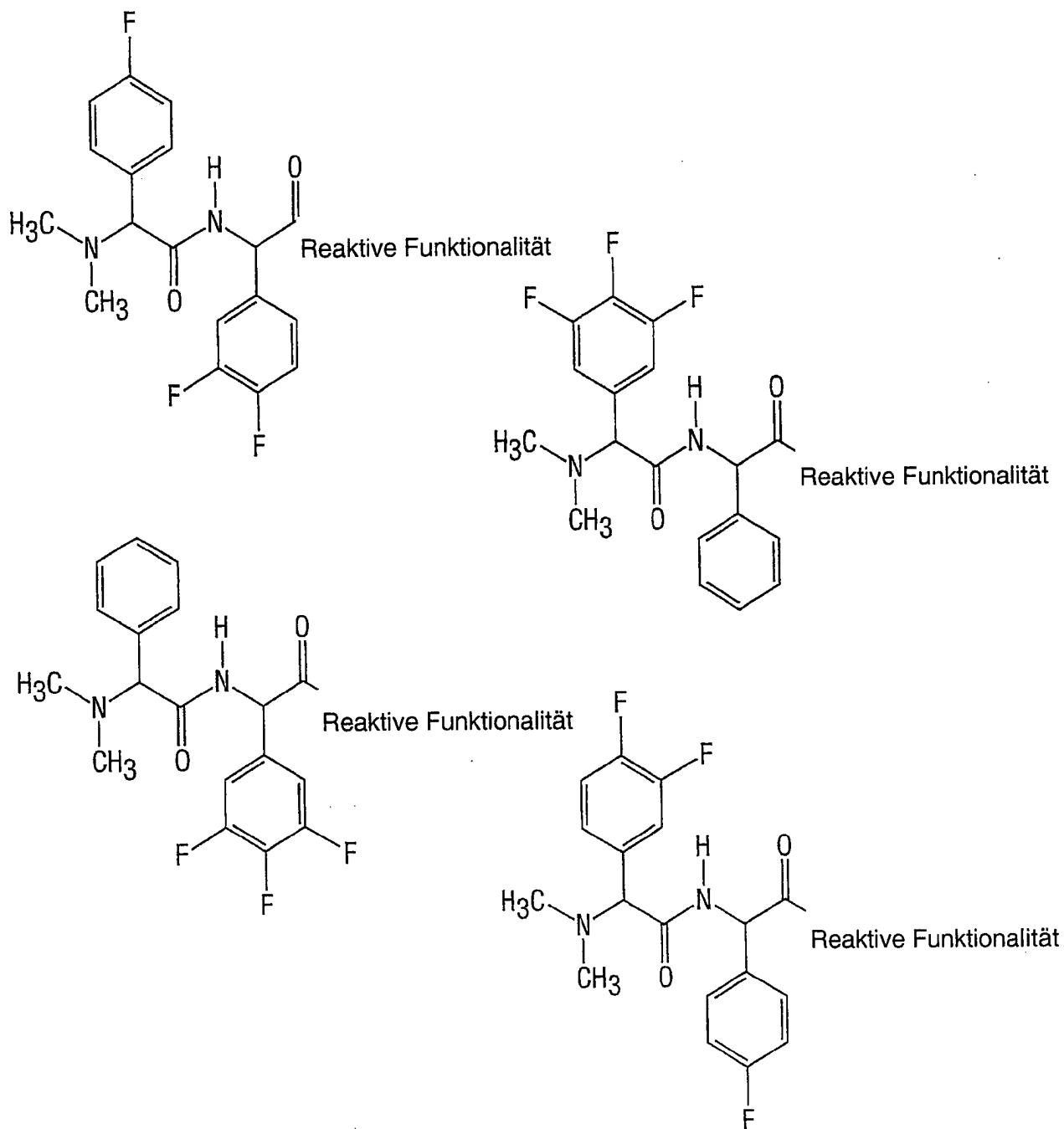


Fig.5.

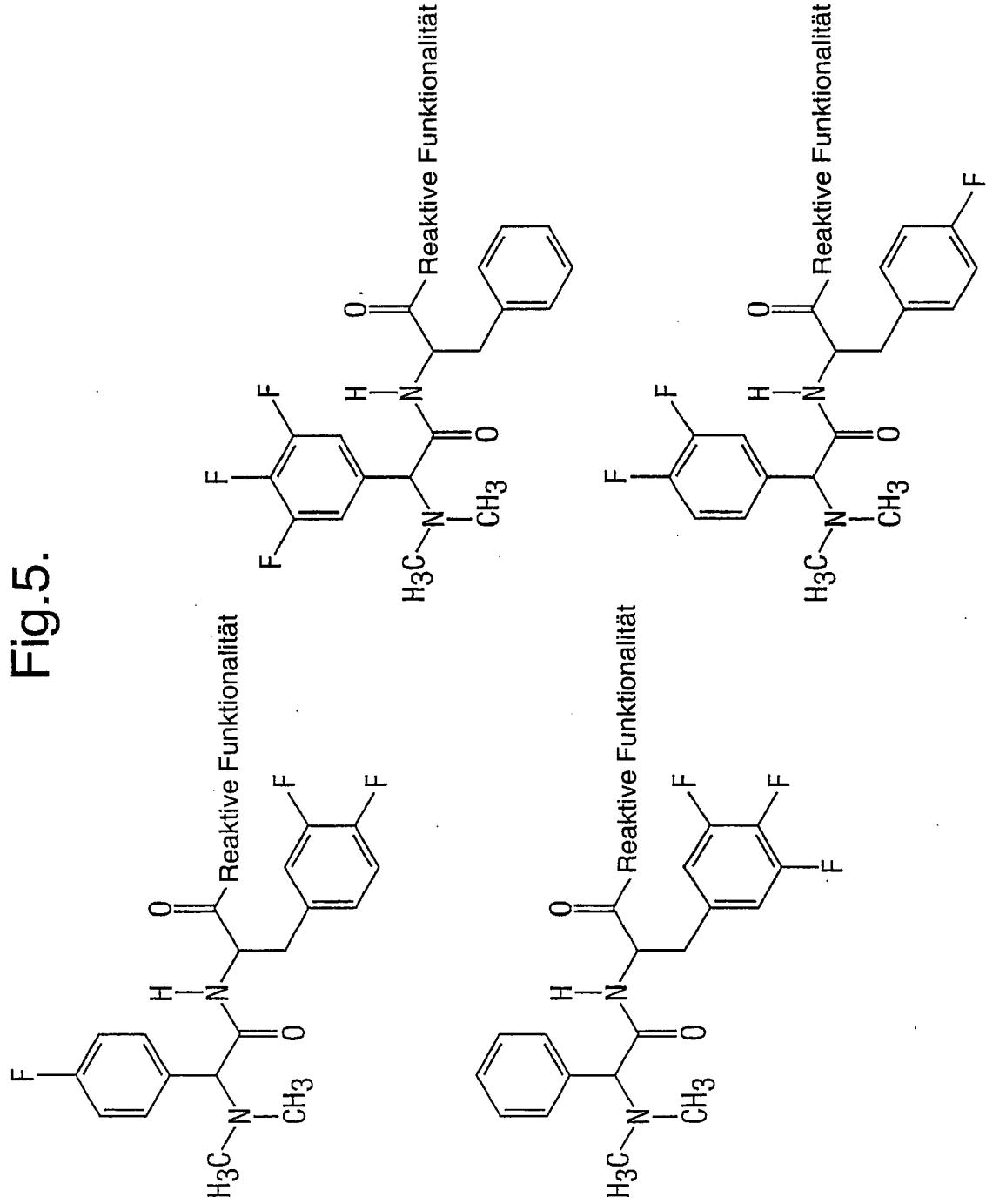


Fig.6a.

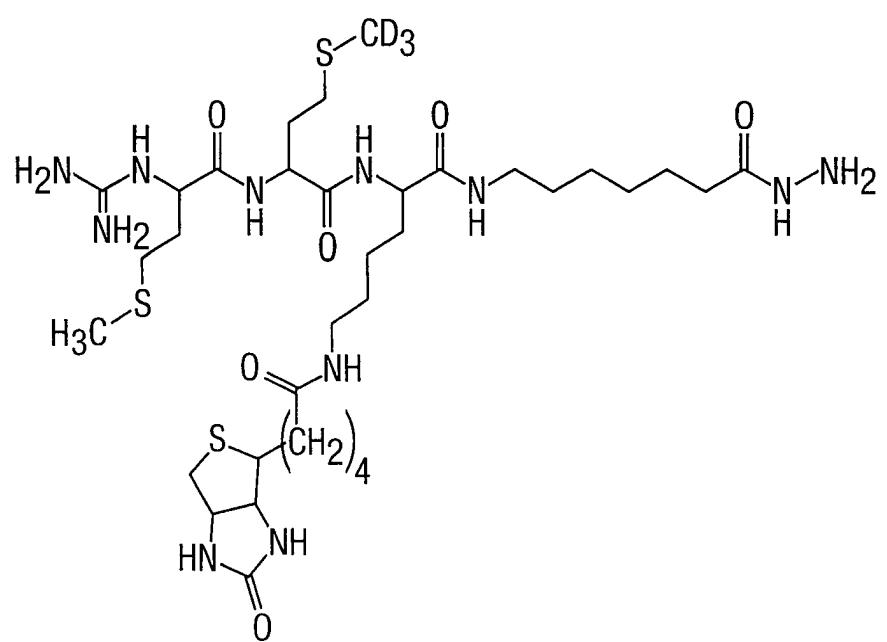
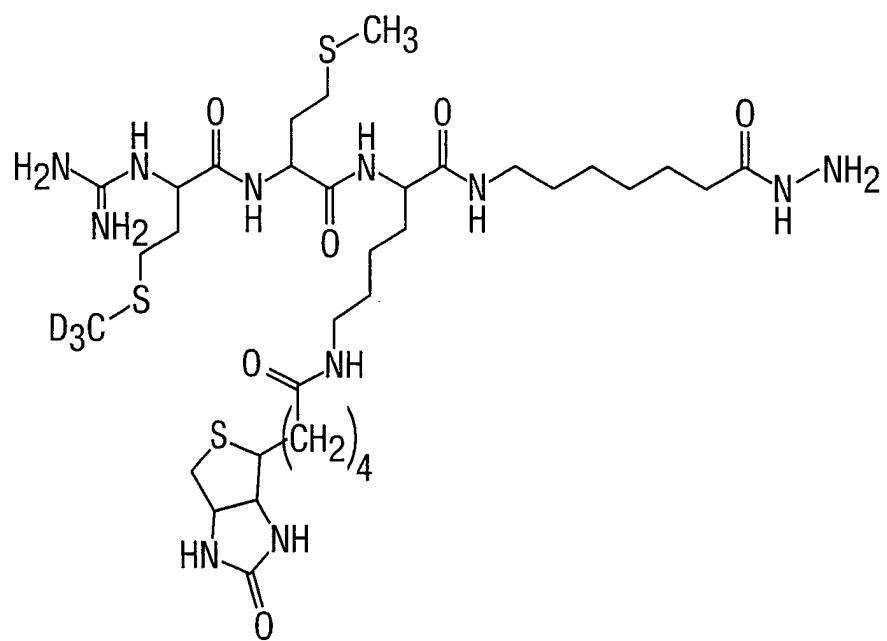


Fig.6b.

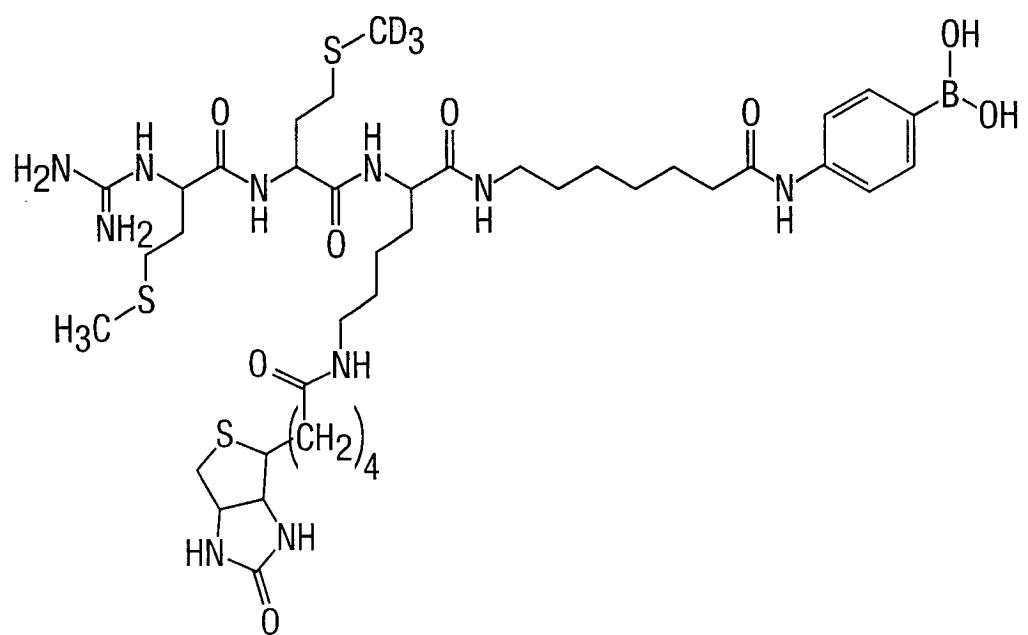
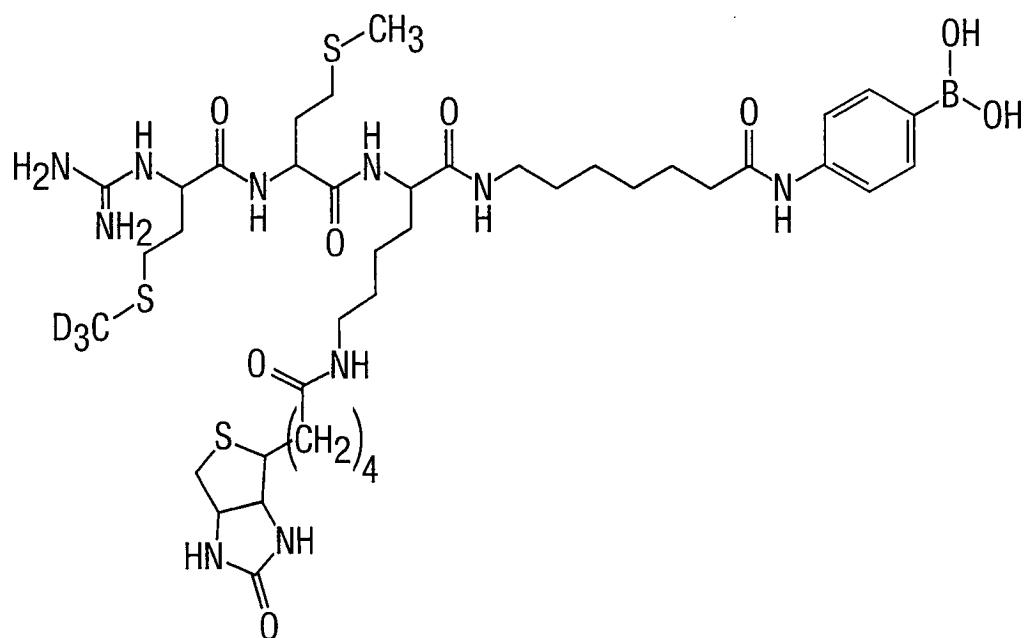


Fig.7.

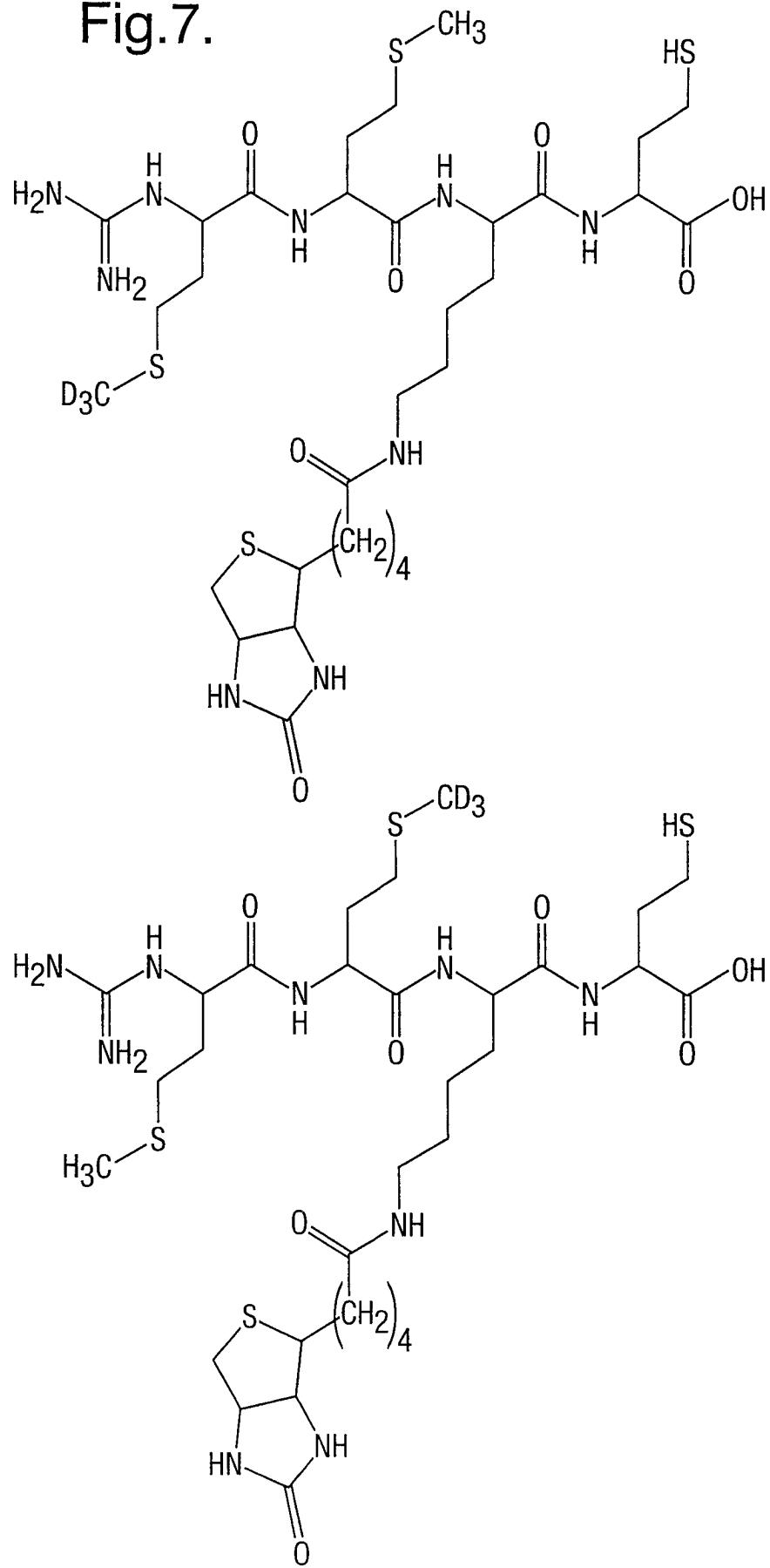
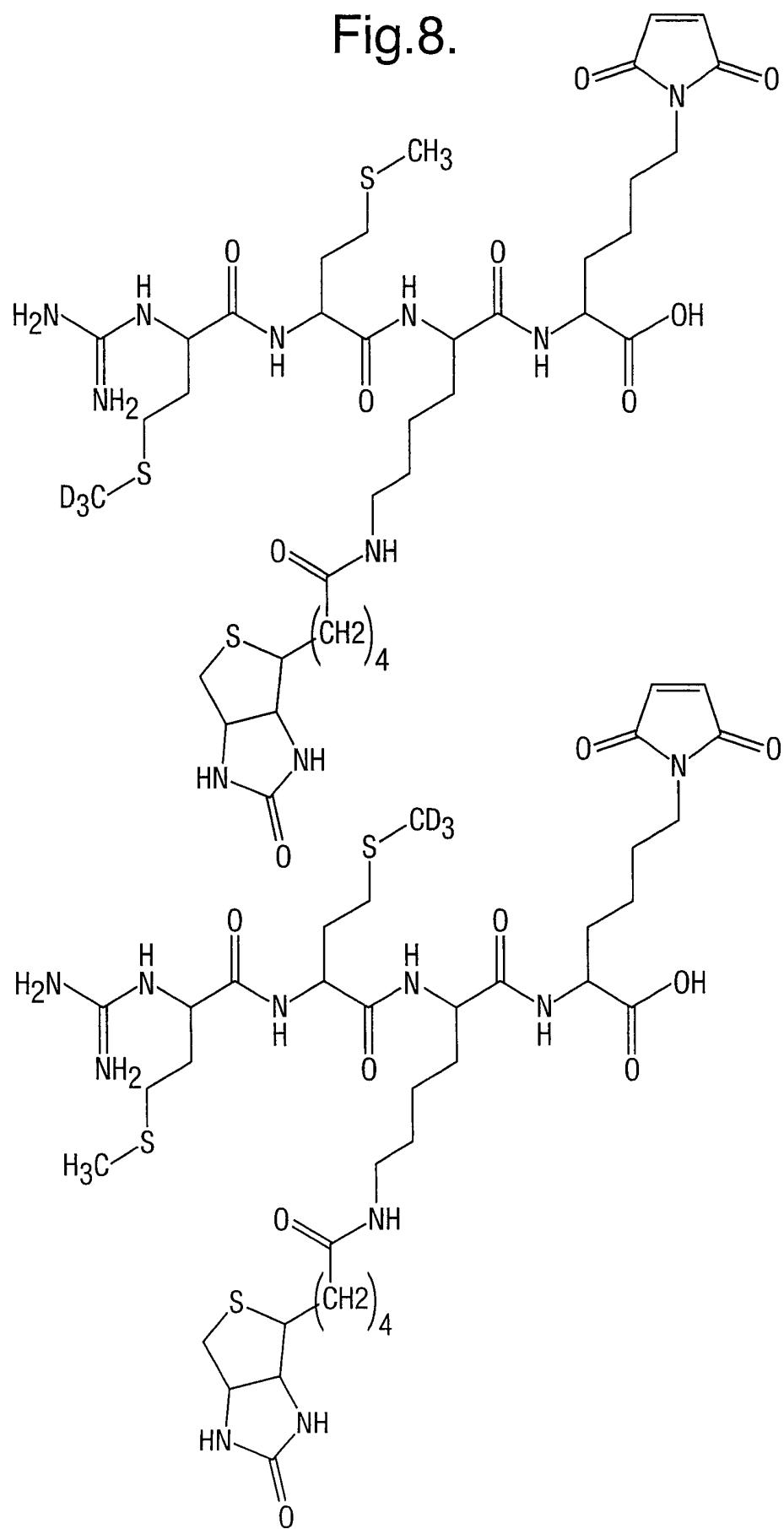


Fig.8.



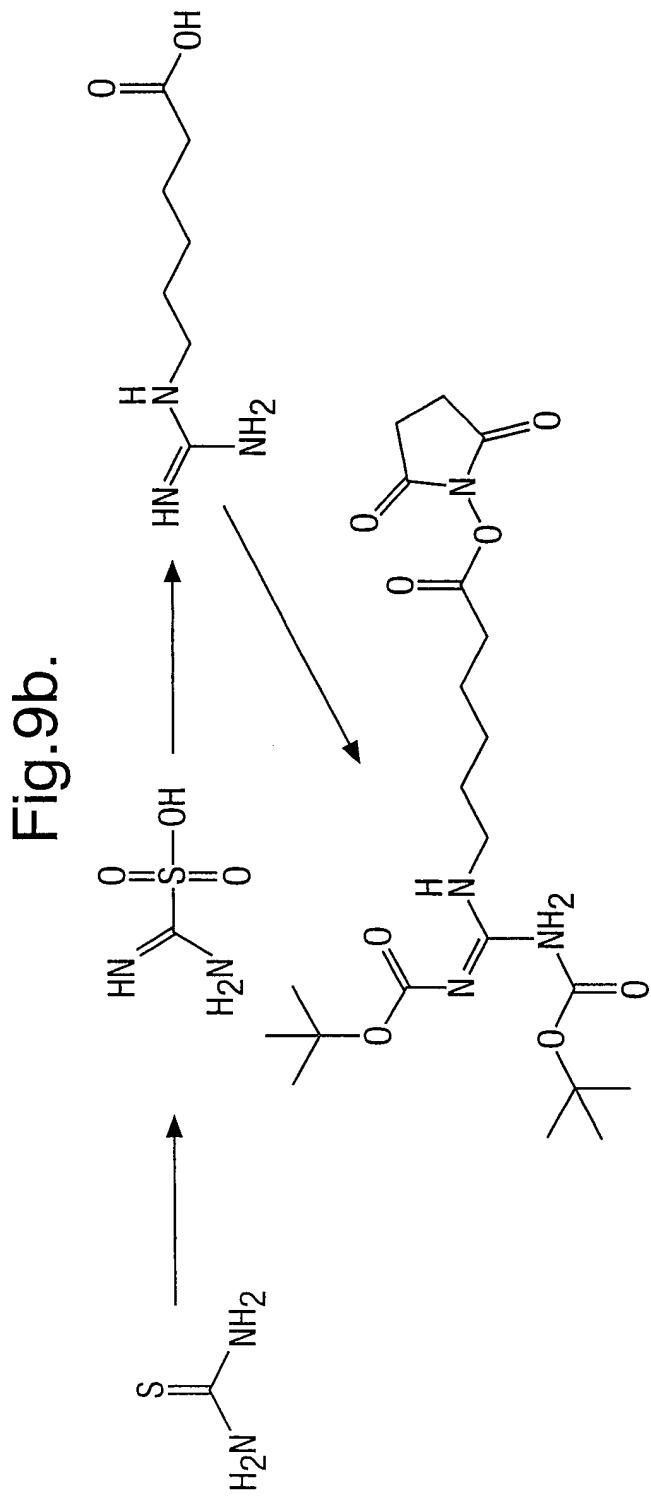
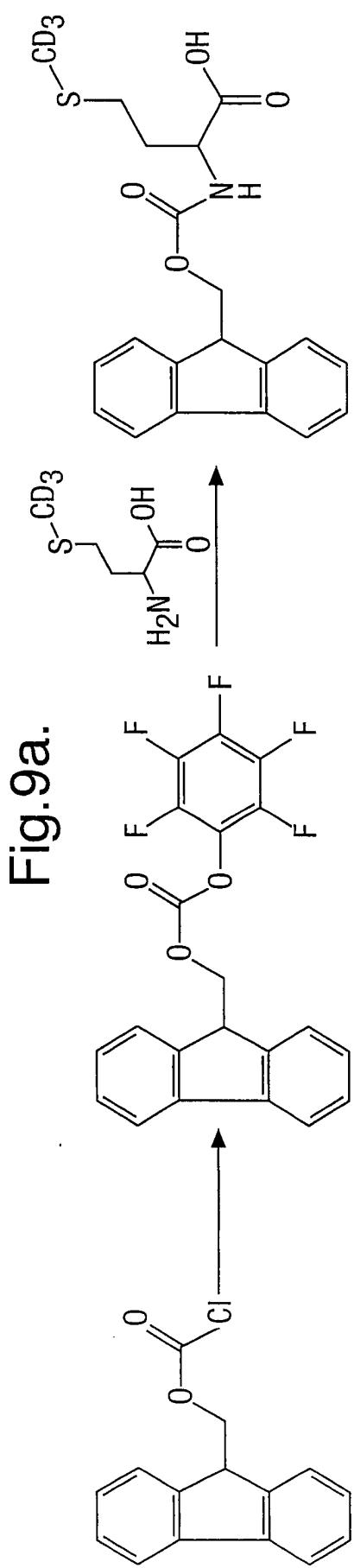


Fig.10a.

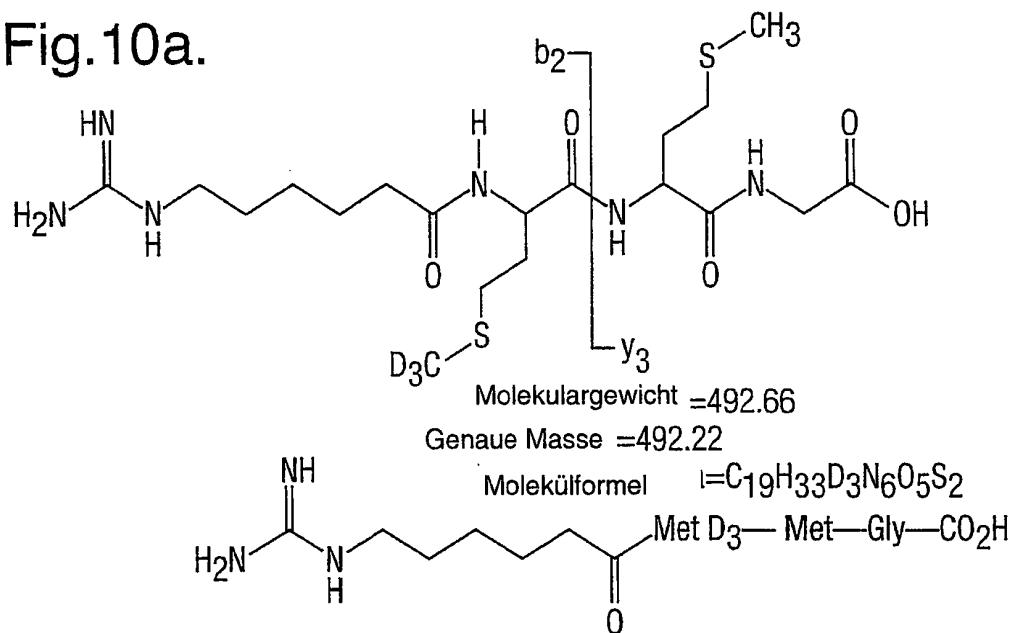
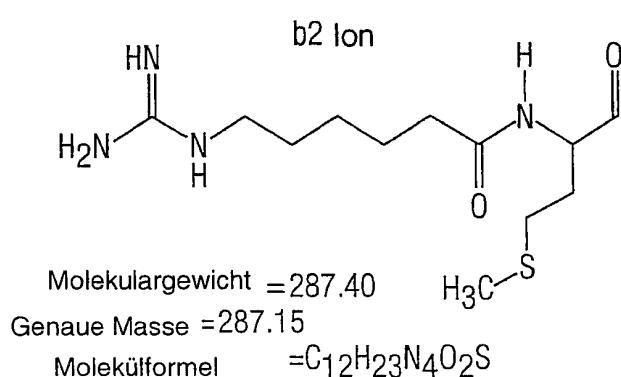
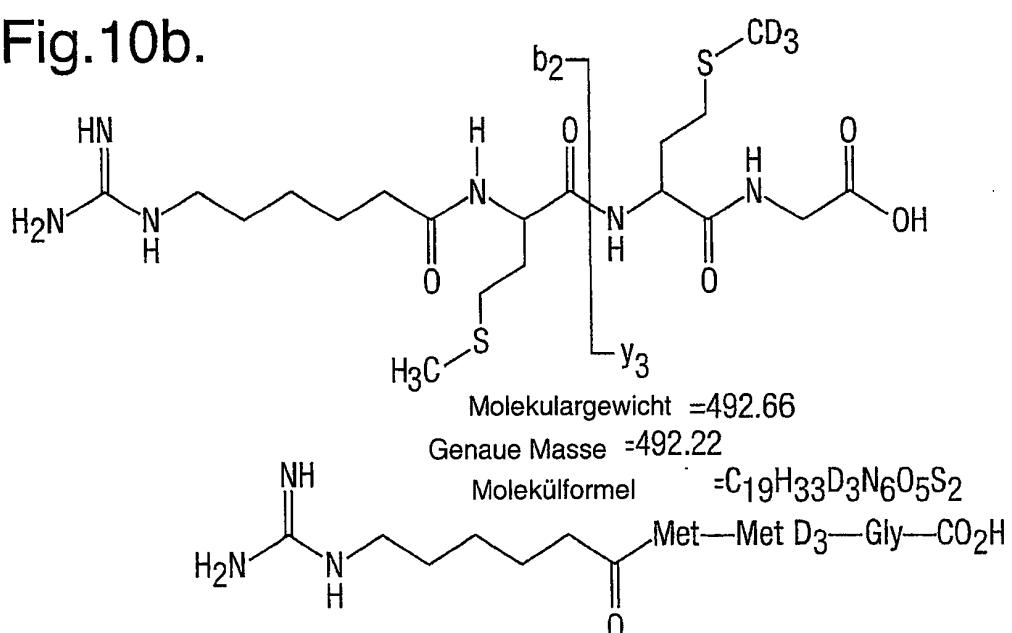


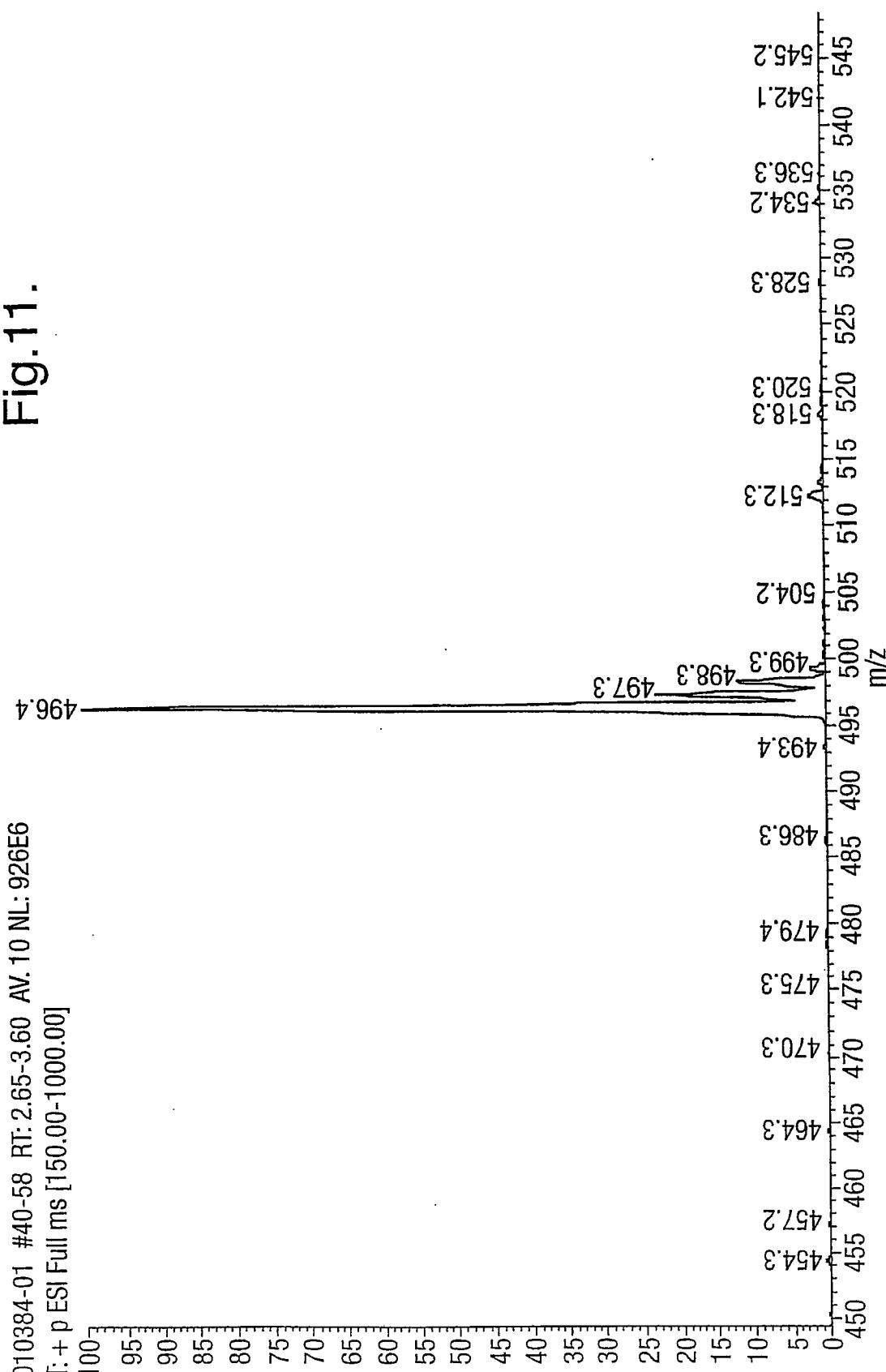
Fig.10b.



Elektrospray-Spektrum einer Mischung der zwei Met-Met-Gly(D3)-Peptidsequenzen vor der Fragmentierungs-(MS/MS)-Analyse

010384-01 #40-58 RT: 2.65-3.60 AV: 1.0 NL: 926E6  
T: + p ESI Full ms [150.00-1000.00]

Fig. 11.



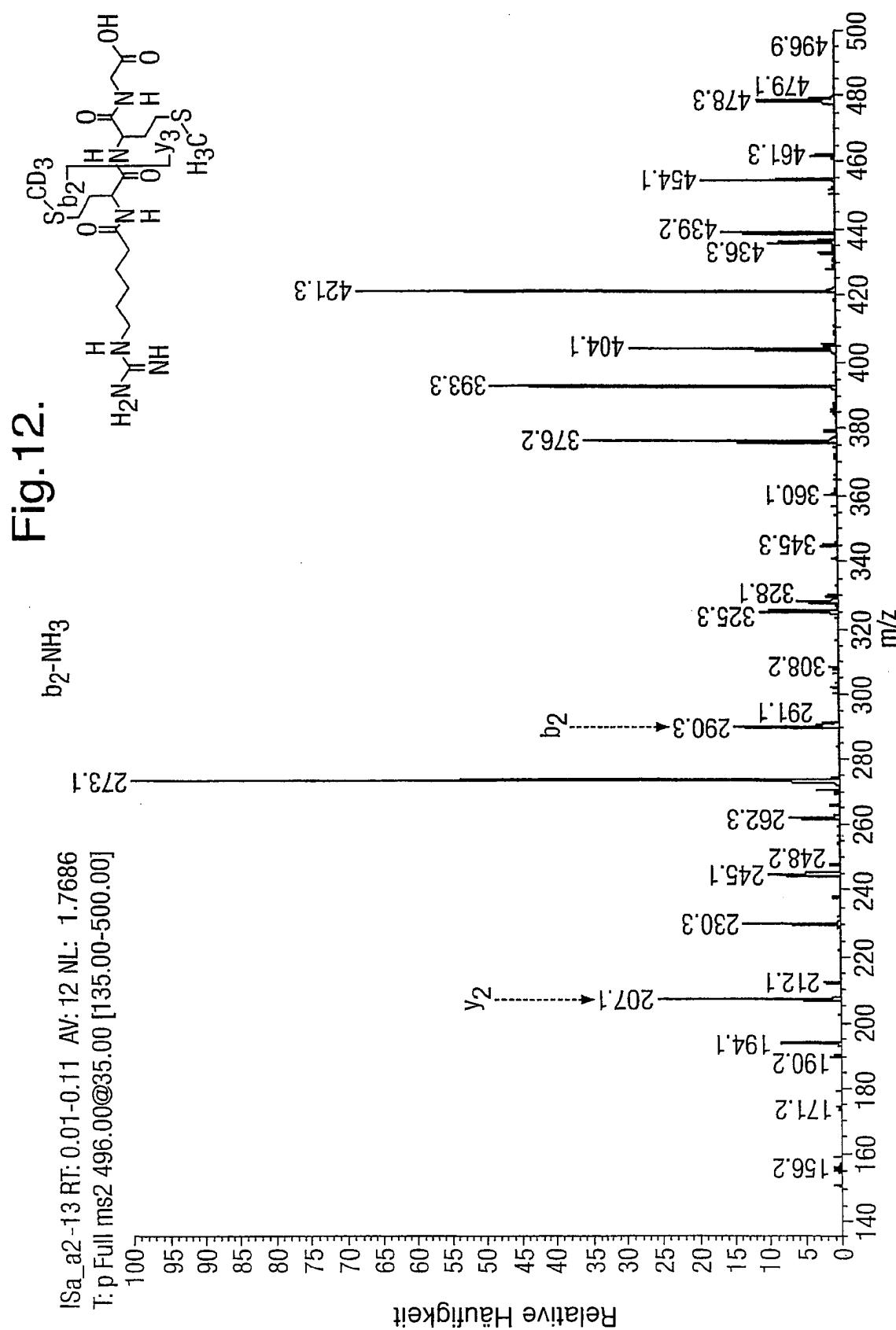


Fig.12 (Cont).

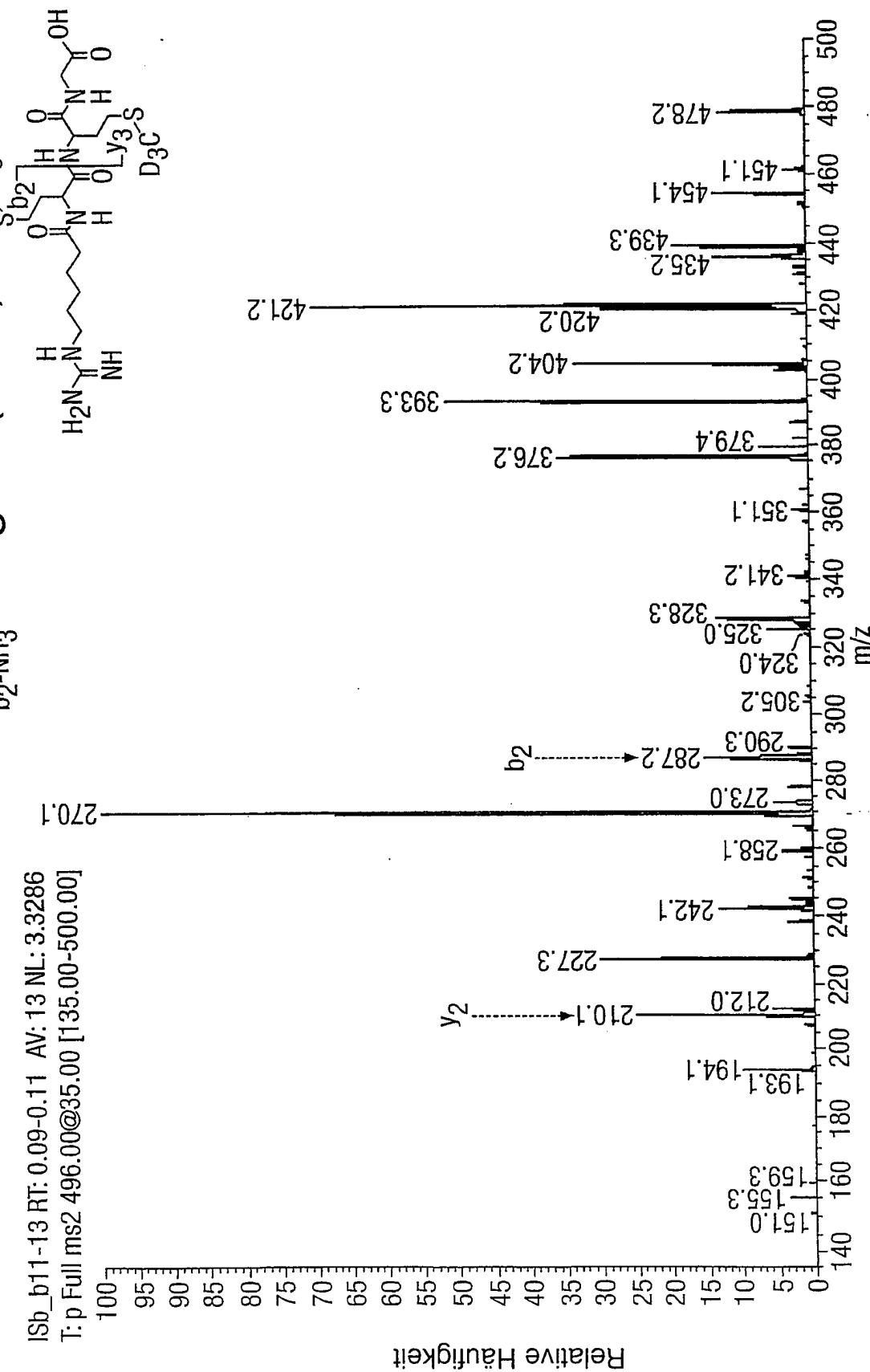
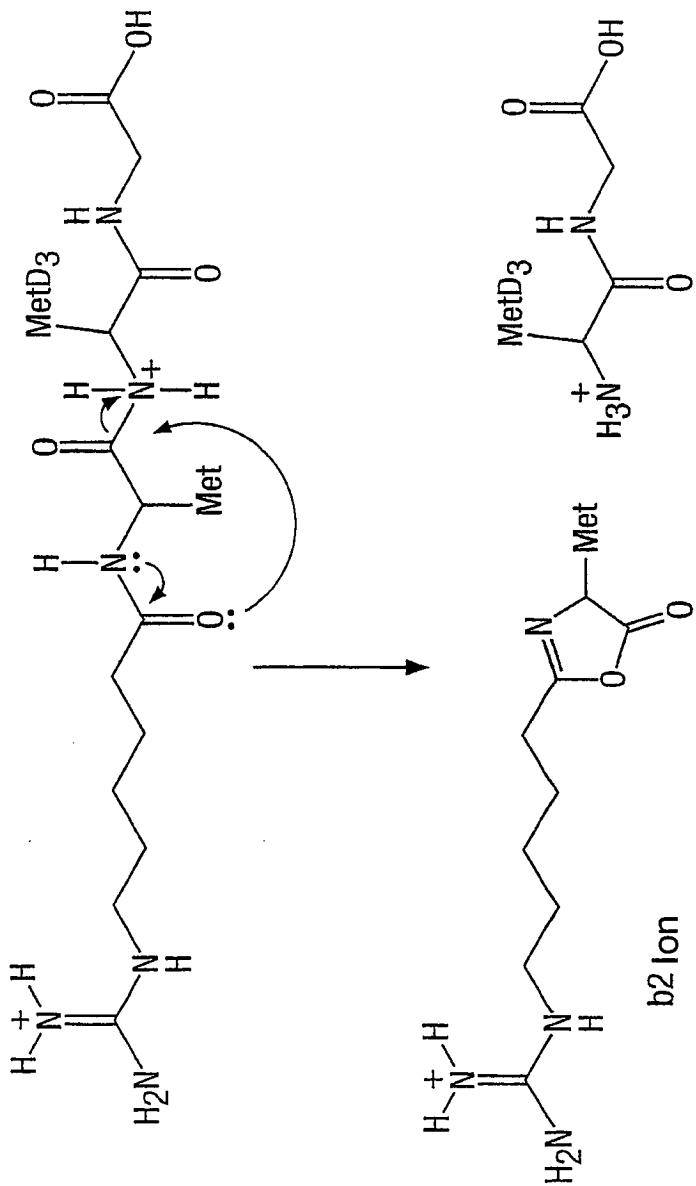
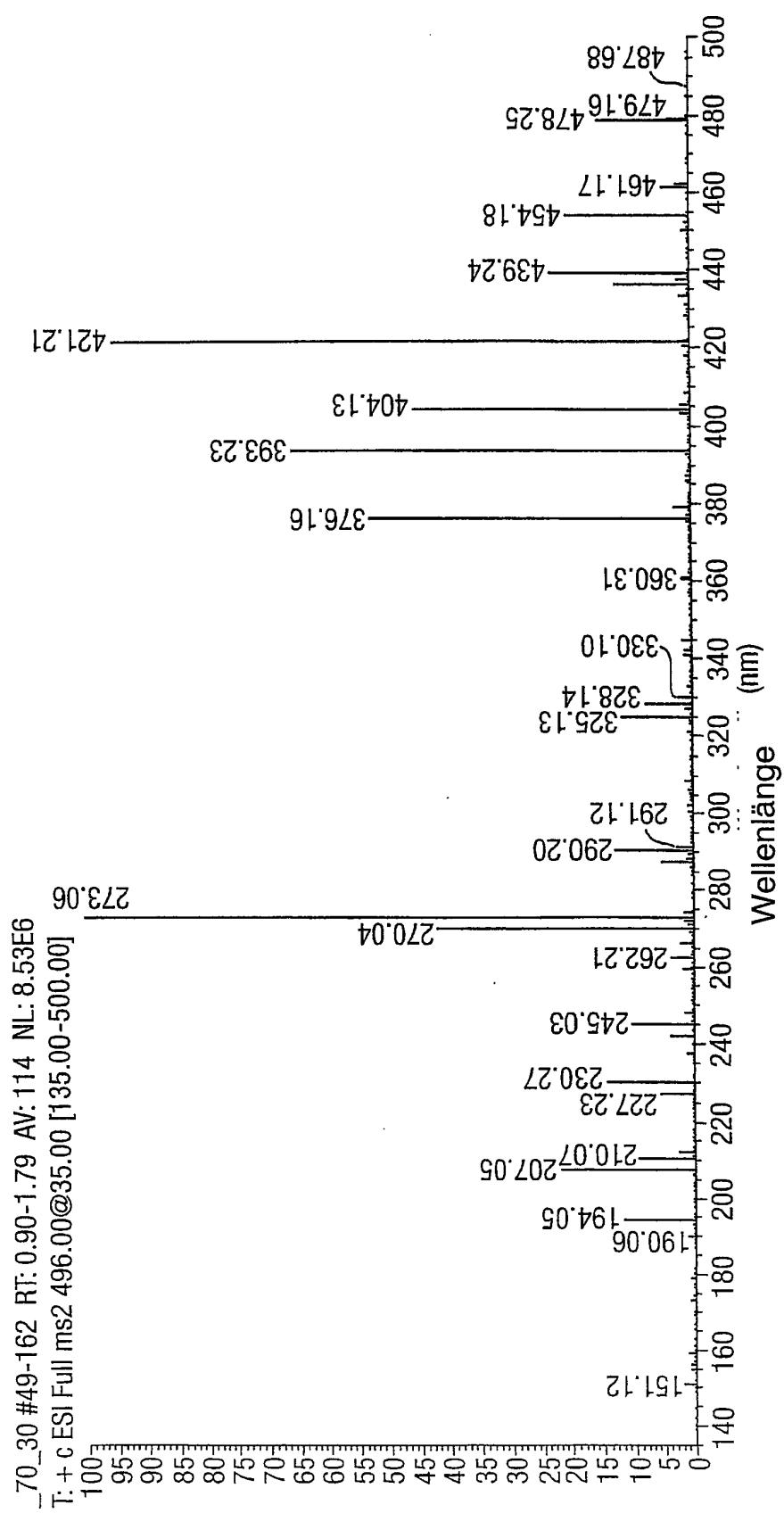


Fig. 13.



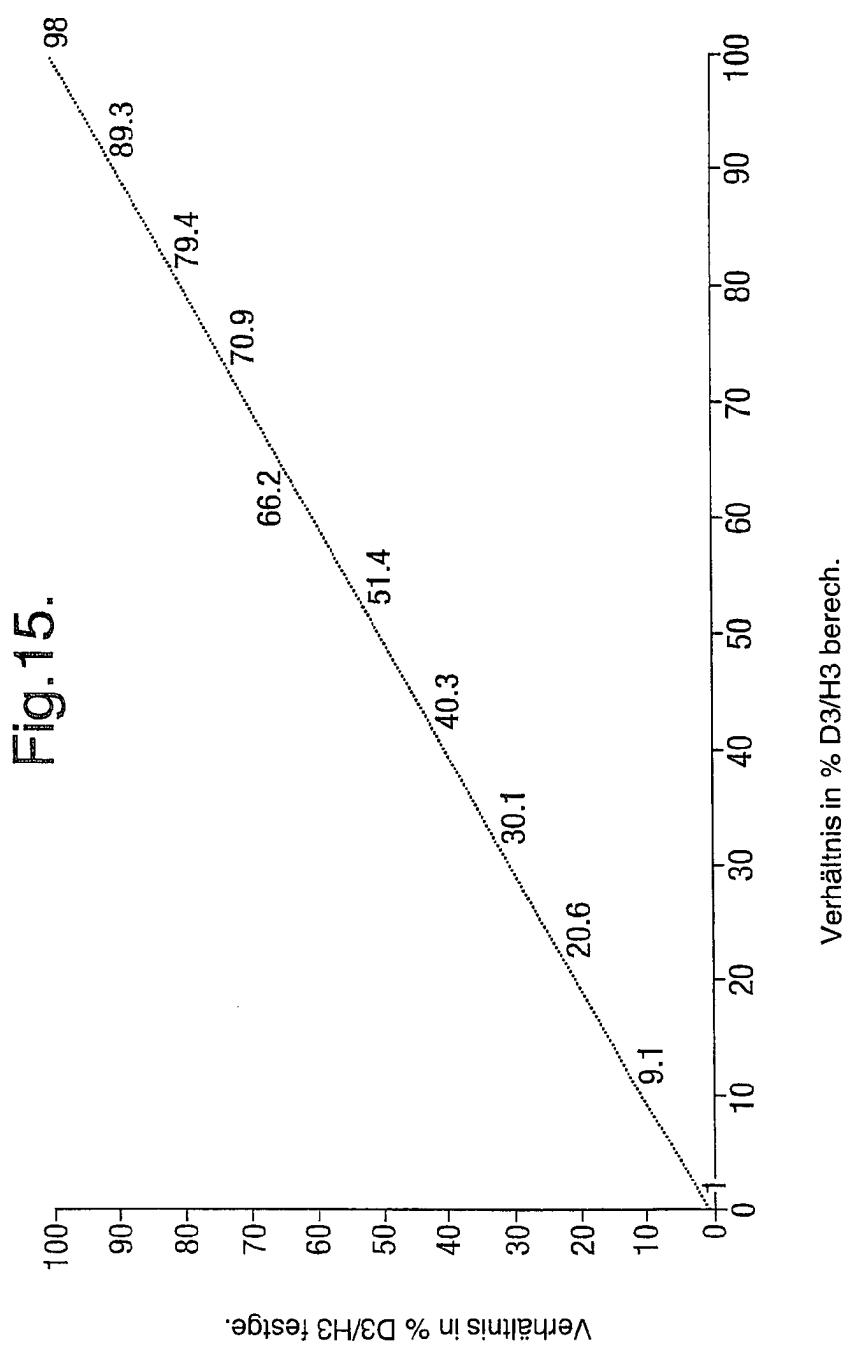
Gesamtes ESI-MS-Spektrum: Fragmentierung einer Mischung der Peptide A und B (Verhältnis A:B = 70:30)

Fig. 14.

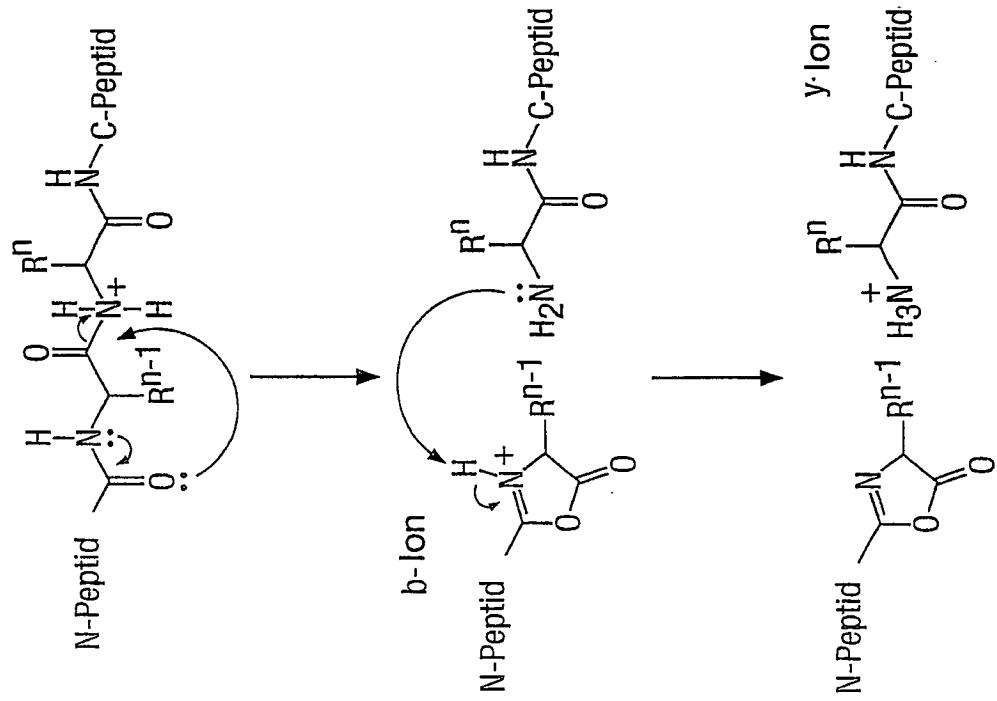


## Studie zur Quantifizierung mittels ESI-MS/ms von Mischungen der Peptide A und B

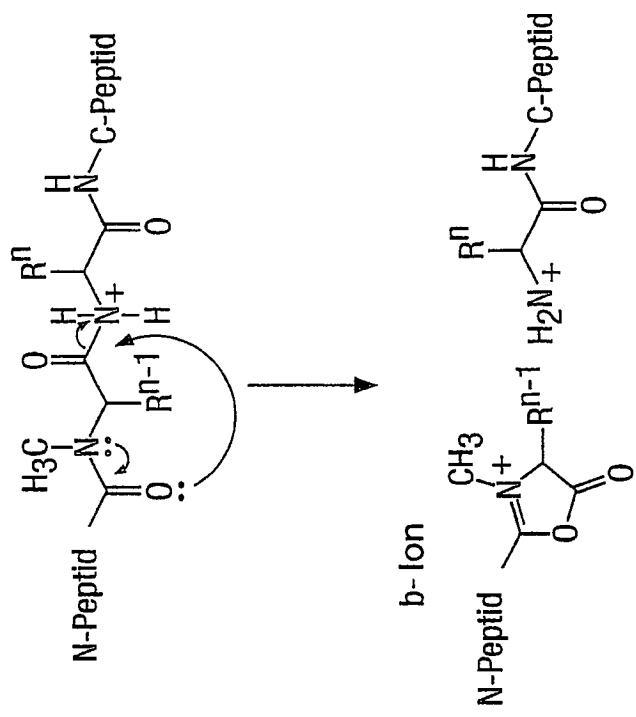
$$f (\%) \text{ berech.} = 0,9960 (\% \text{ festge.}) - 1,005$$



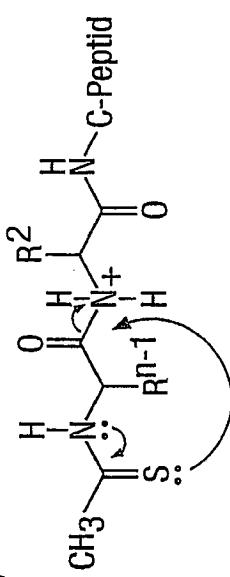
**Fig. 16a.**



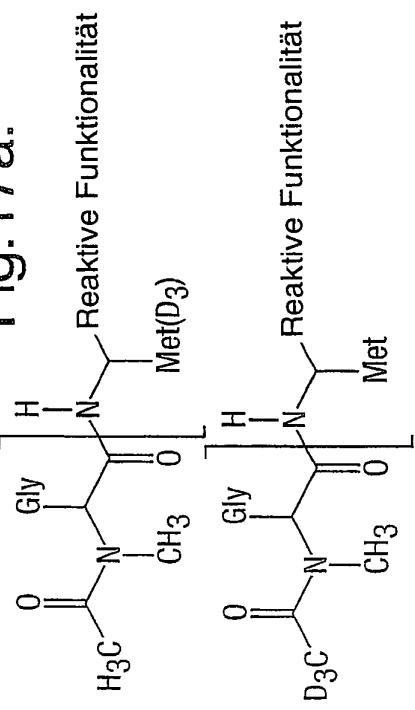
**Fig. 16b.**



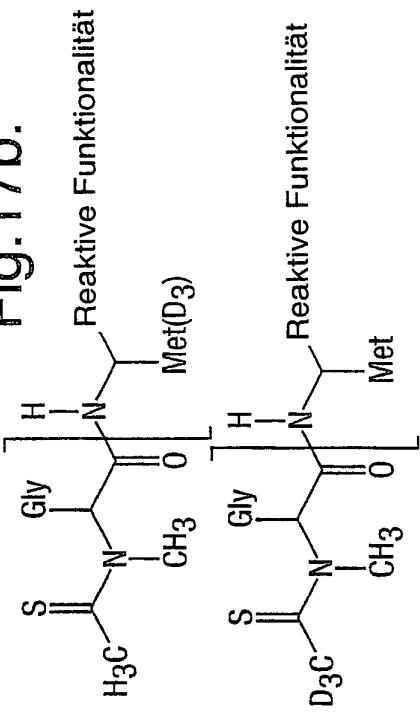
**Fig. 16c.**



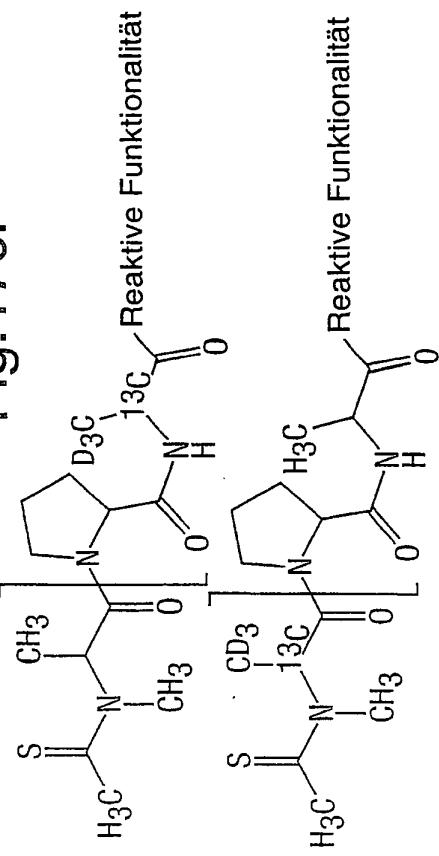
**Fig. 17a.**



**Fig. 17b.**



**Fig. 17c.**



**Fig. 17d.**

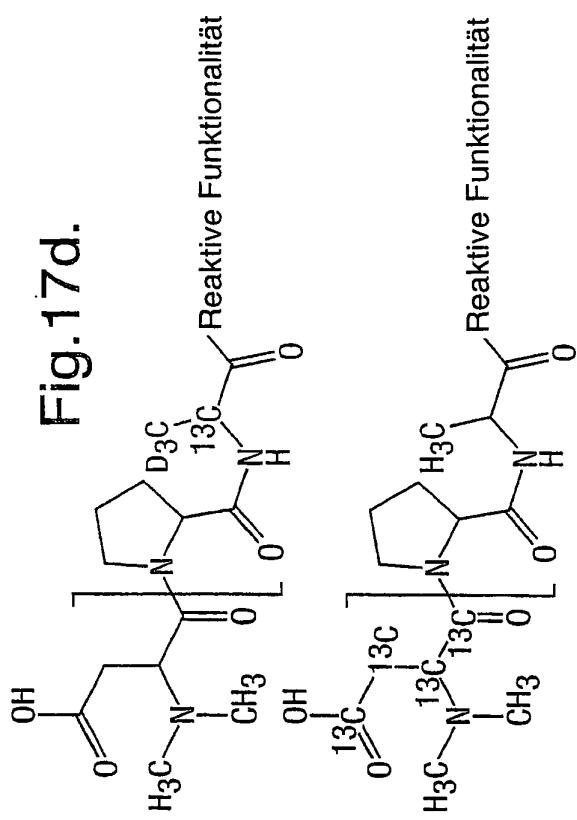


Fig. 18a.

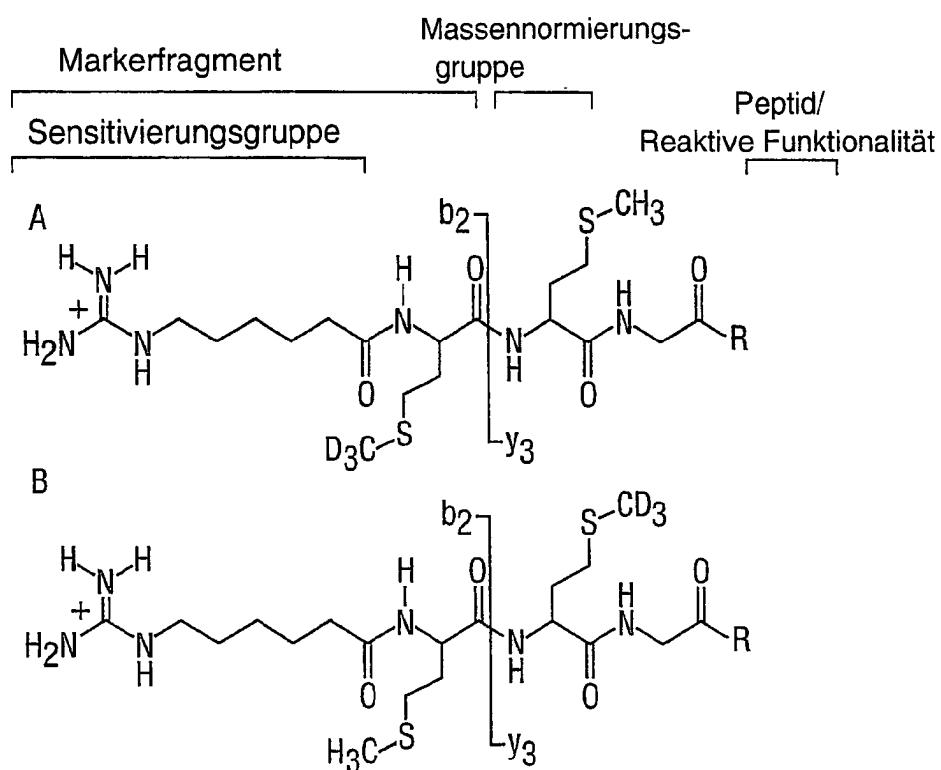


Fig. 18b.

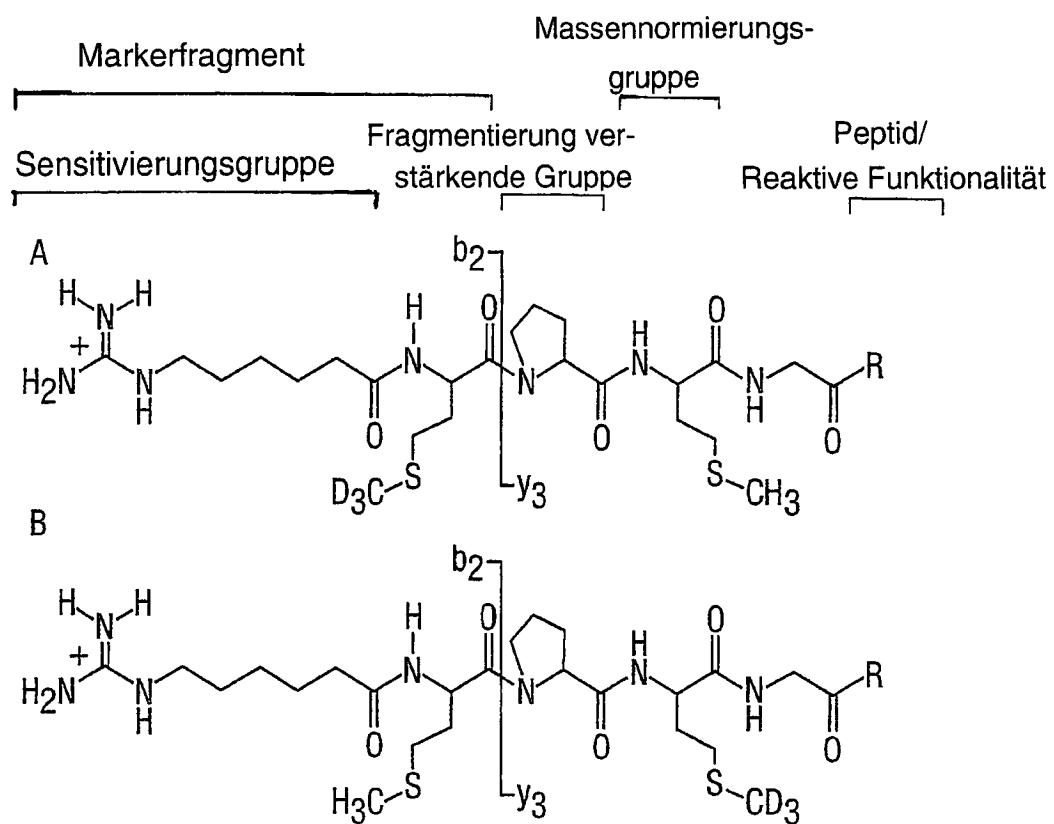


Fig. 18c.

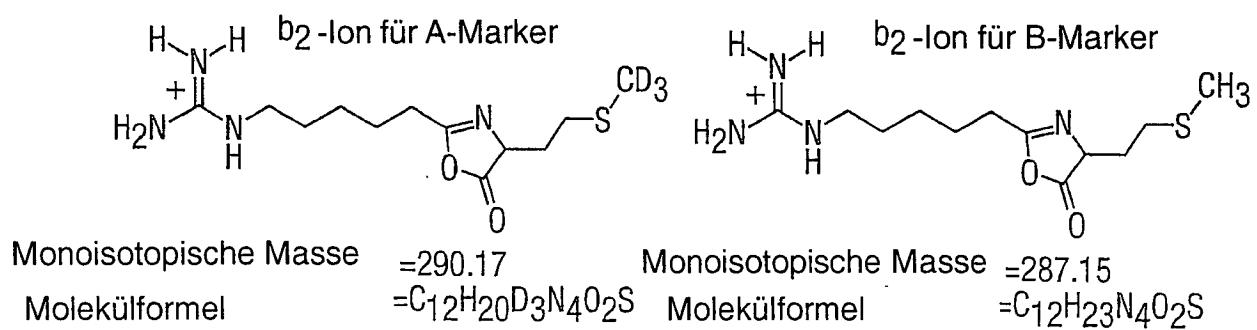


Fig. 19a.

Kollisionsenergie 40 V/TMT Peptid 2, 75% A 25%

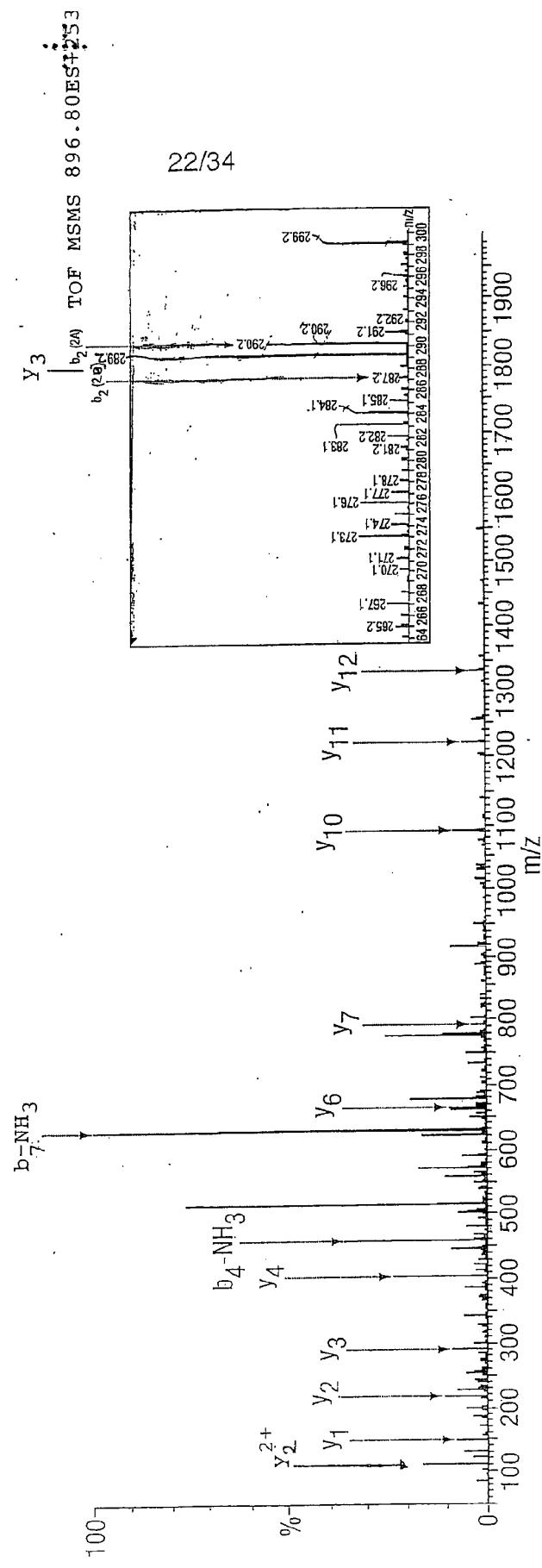


Fig. 19b

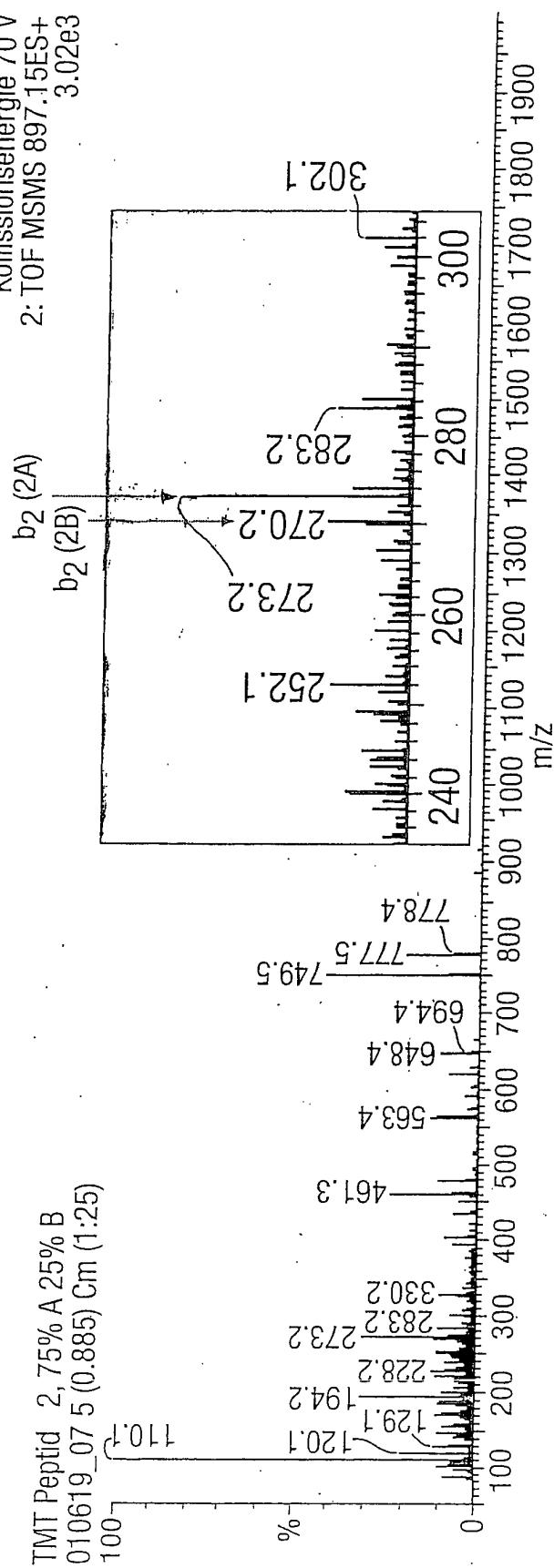
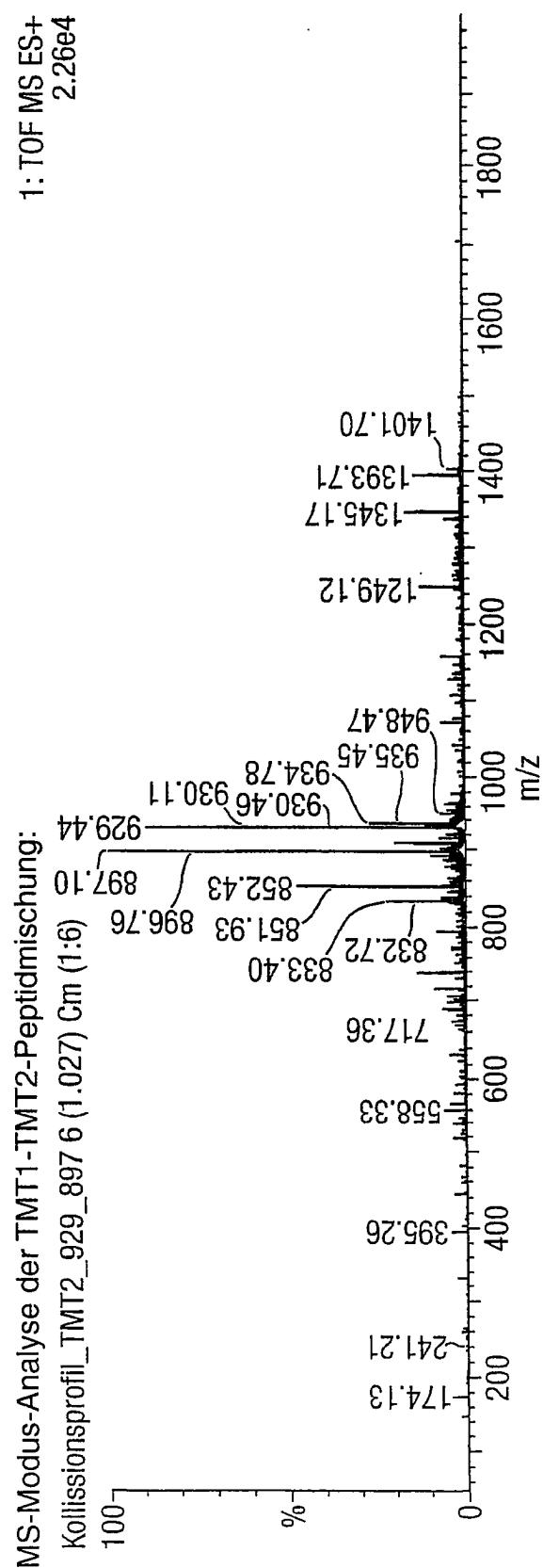
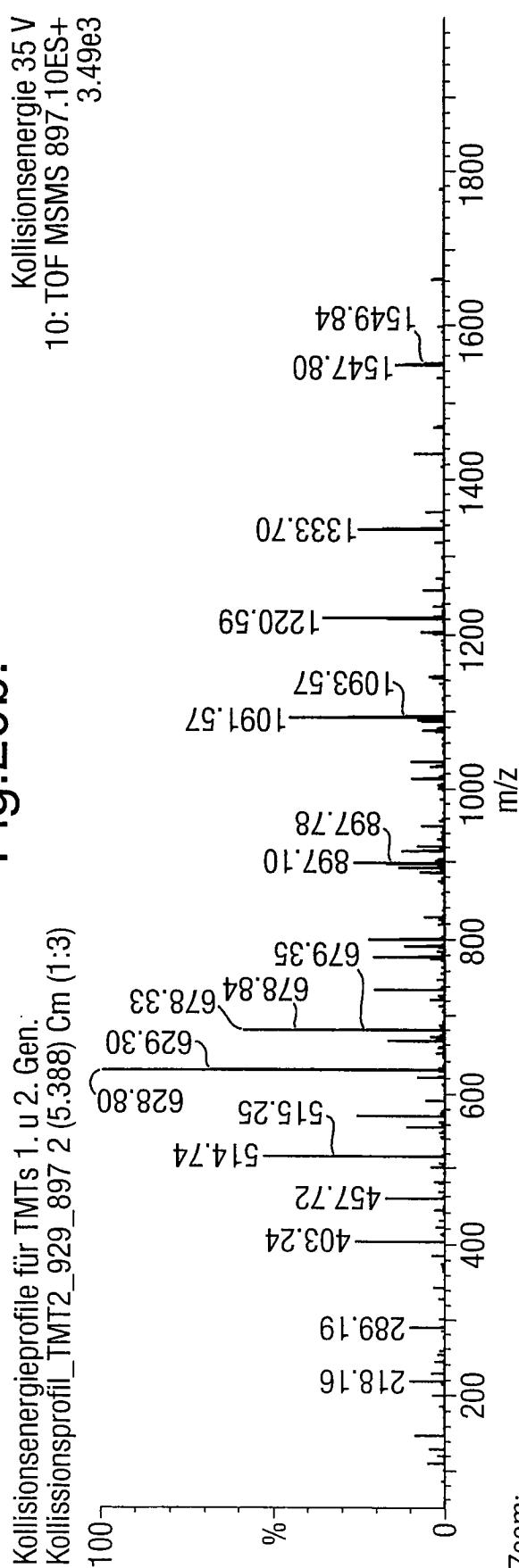
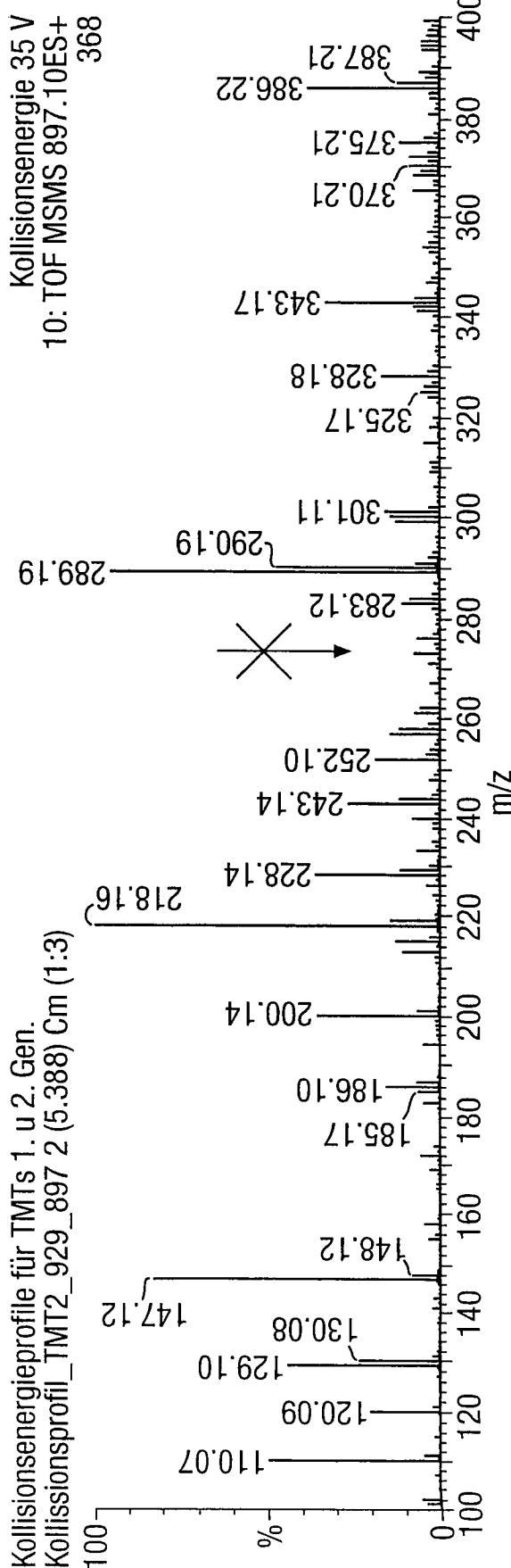


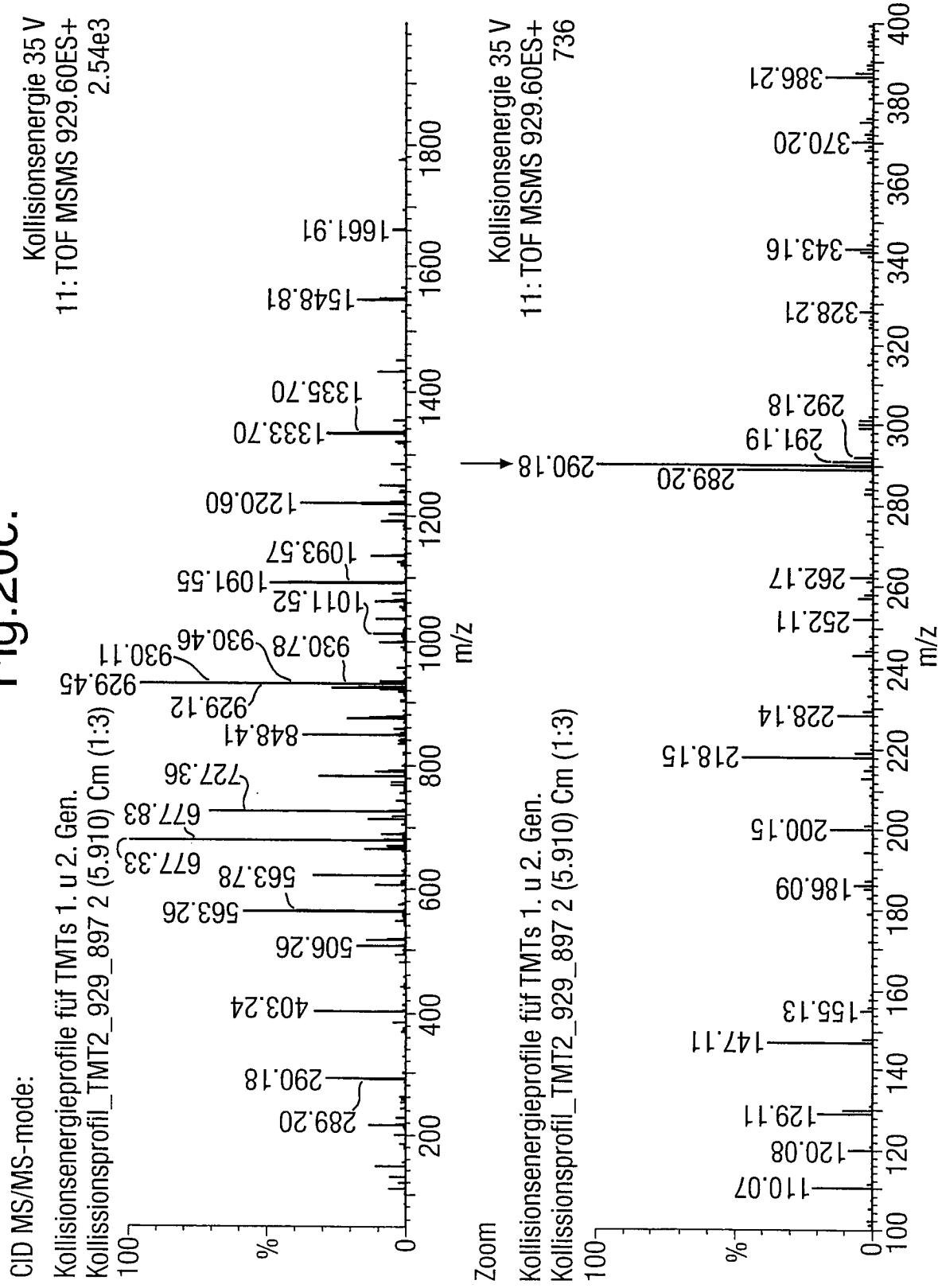
Fig.20a.

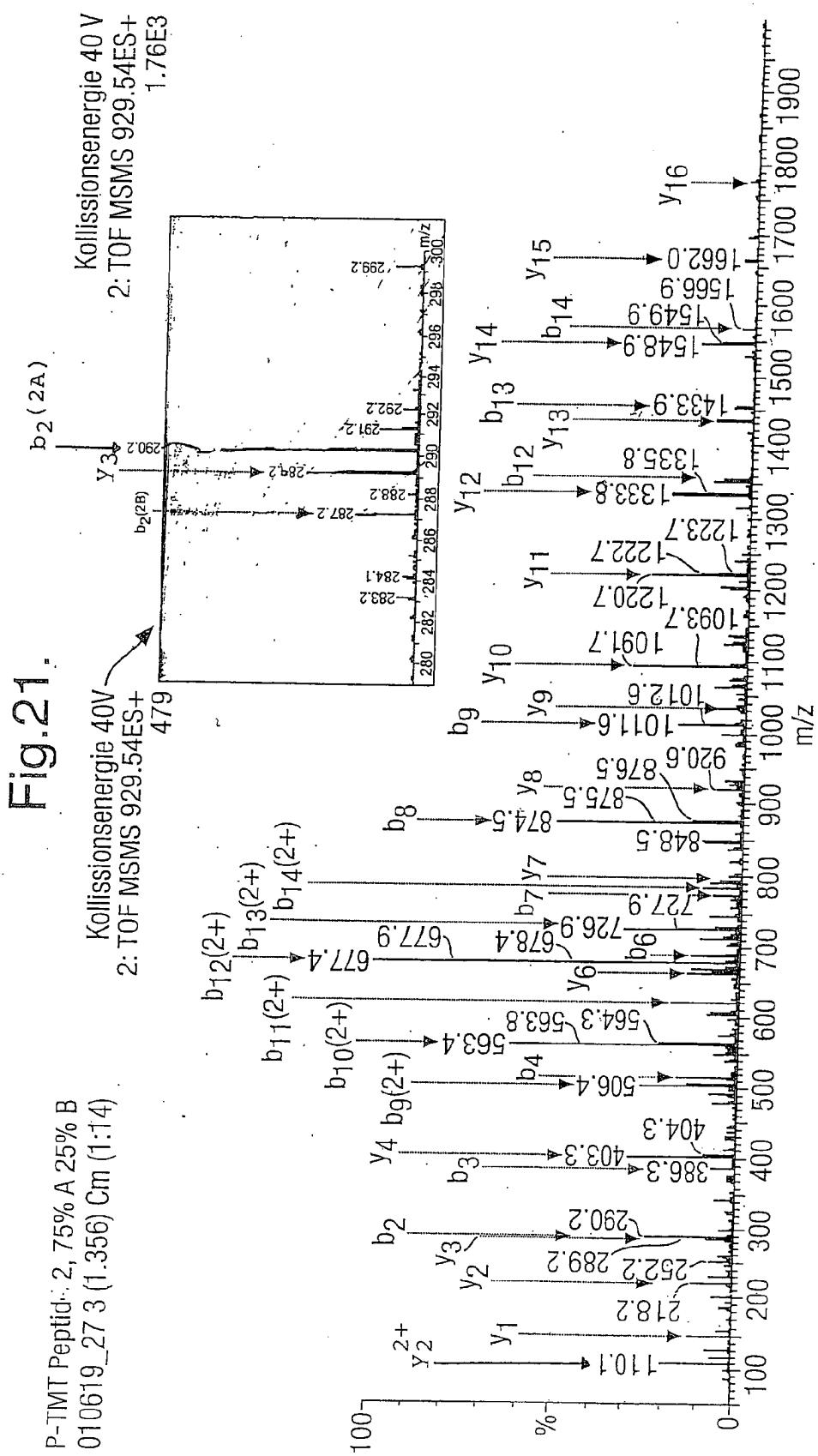


**Fig.20b.**

Zoom:



**Fig.20c.**



16.07.01  
test\_nano\_010437\_04\_775 99 (8.590) Cm (88:100)

**Fig.22.** TOF MSMS 775.60ES+  
4.42e3

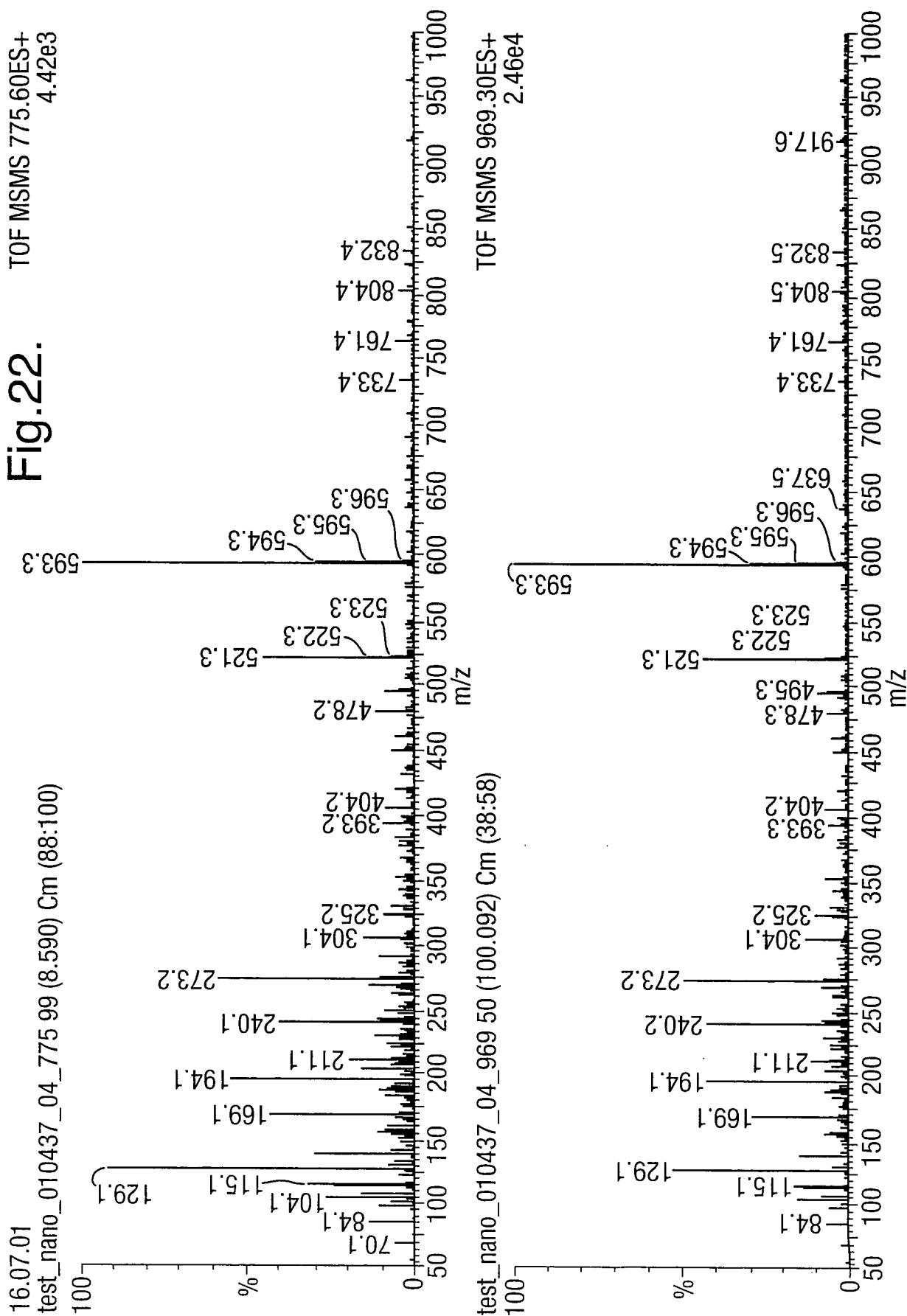


Fig.23.

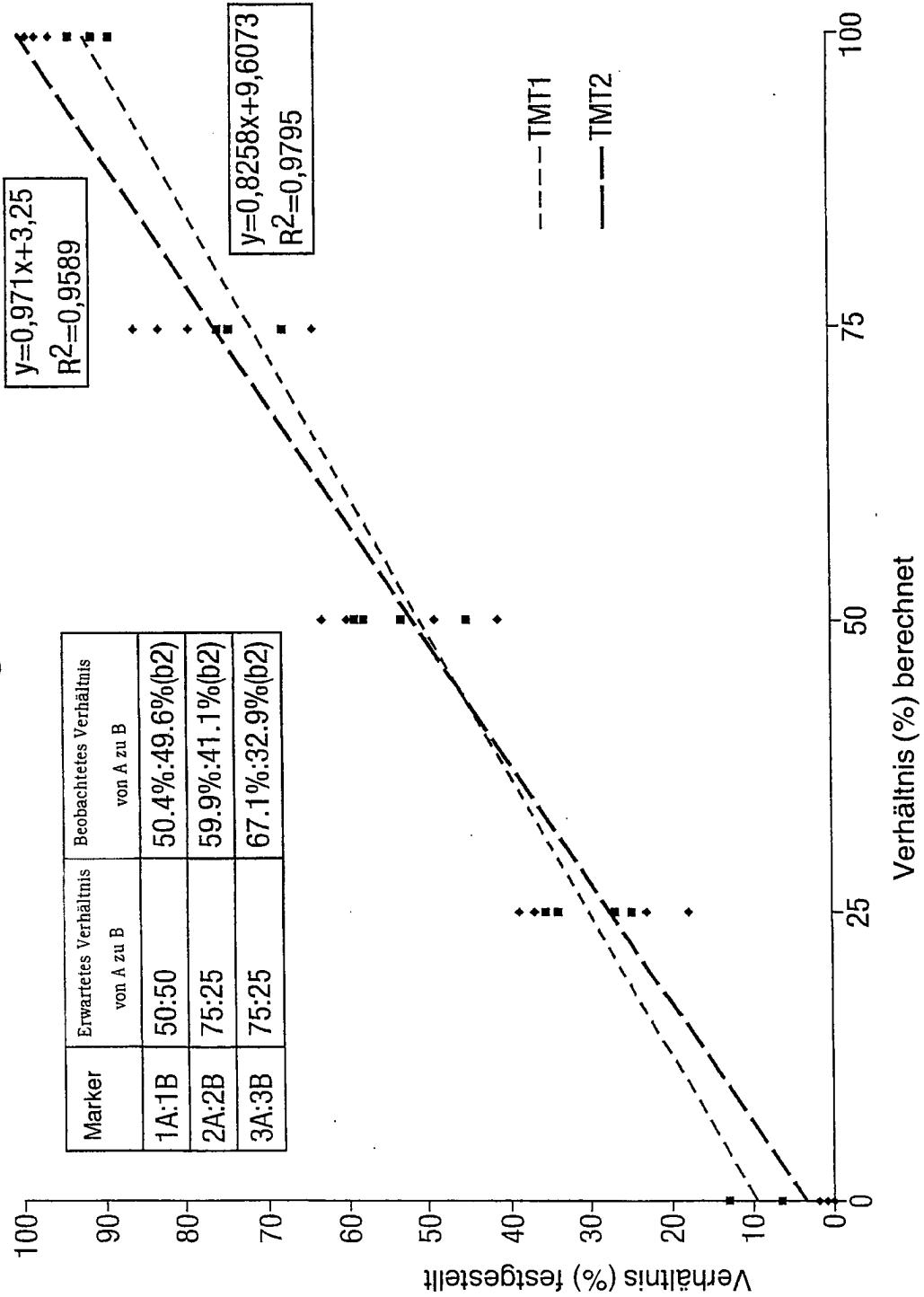


Fig.24.

## Peptid 1:

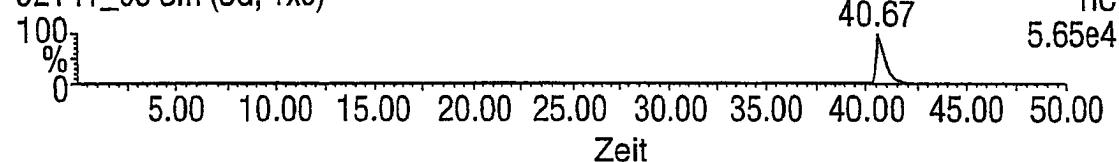
P-TMT P1 50%A P2 25%A P3 75%A  
02141\_05 Sm (SG, 1x5)



02141\_05 Sm (SG, 1x5)



02141\_05 Sm (SG, 1x5)



## Peptid 2:

P-TMT P1 50%A P2 25%A P3 75%A  
02141\_07 Sm (SG, 1x13)



02141\_07 Sm (SG, 1x13)



02141\_07 Sm (SG, 1x13)

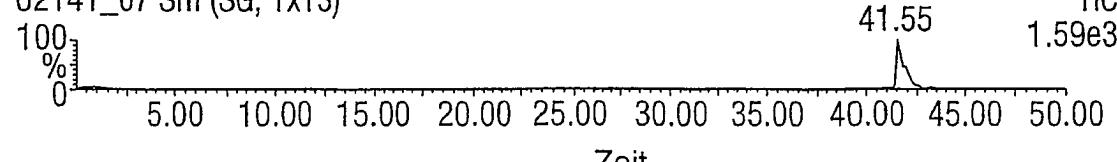


Fig.24 (Cont).

Peptid 3:

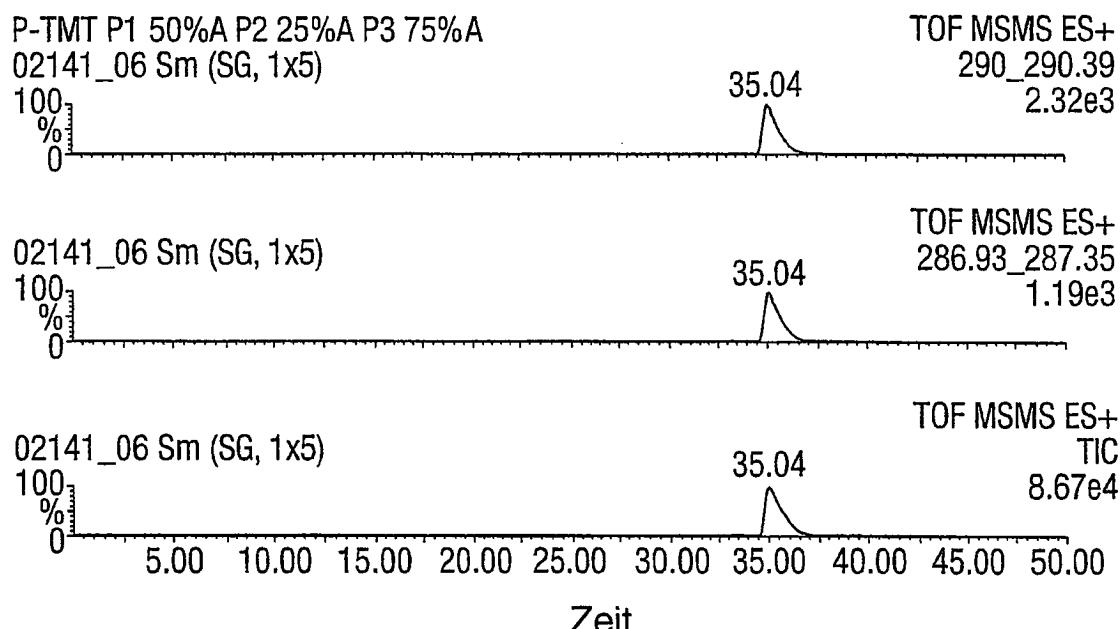


Fig.25.

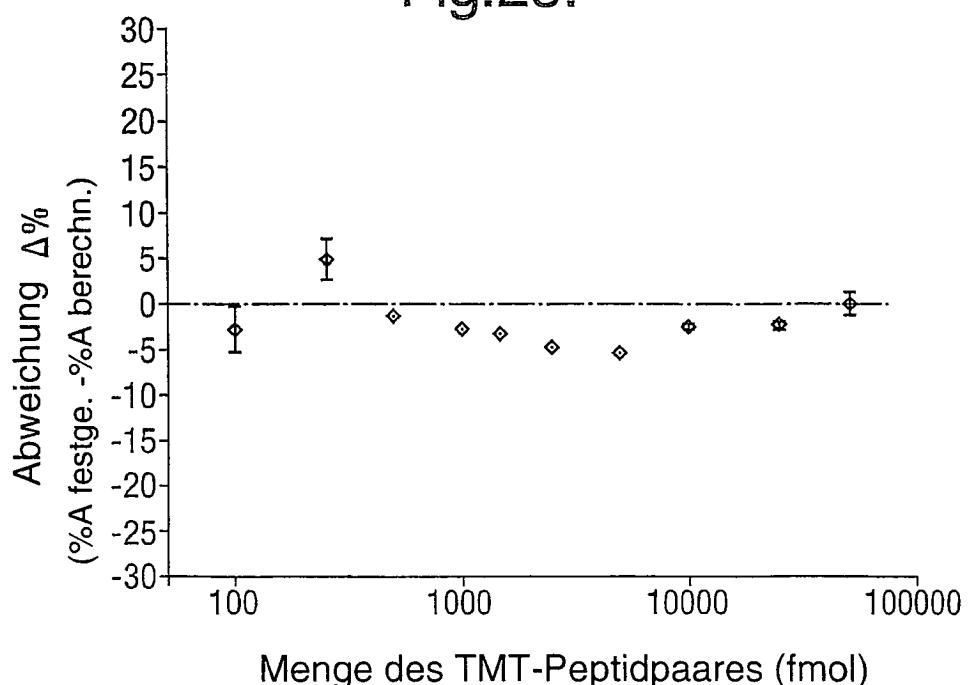


Fig.26a.

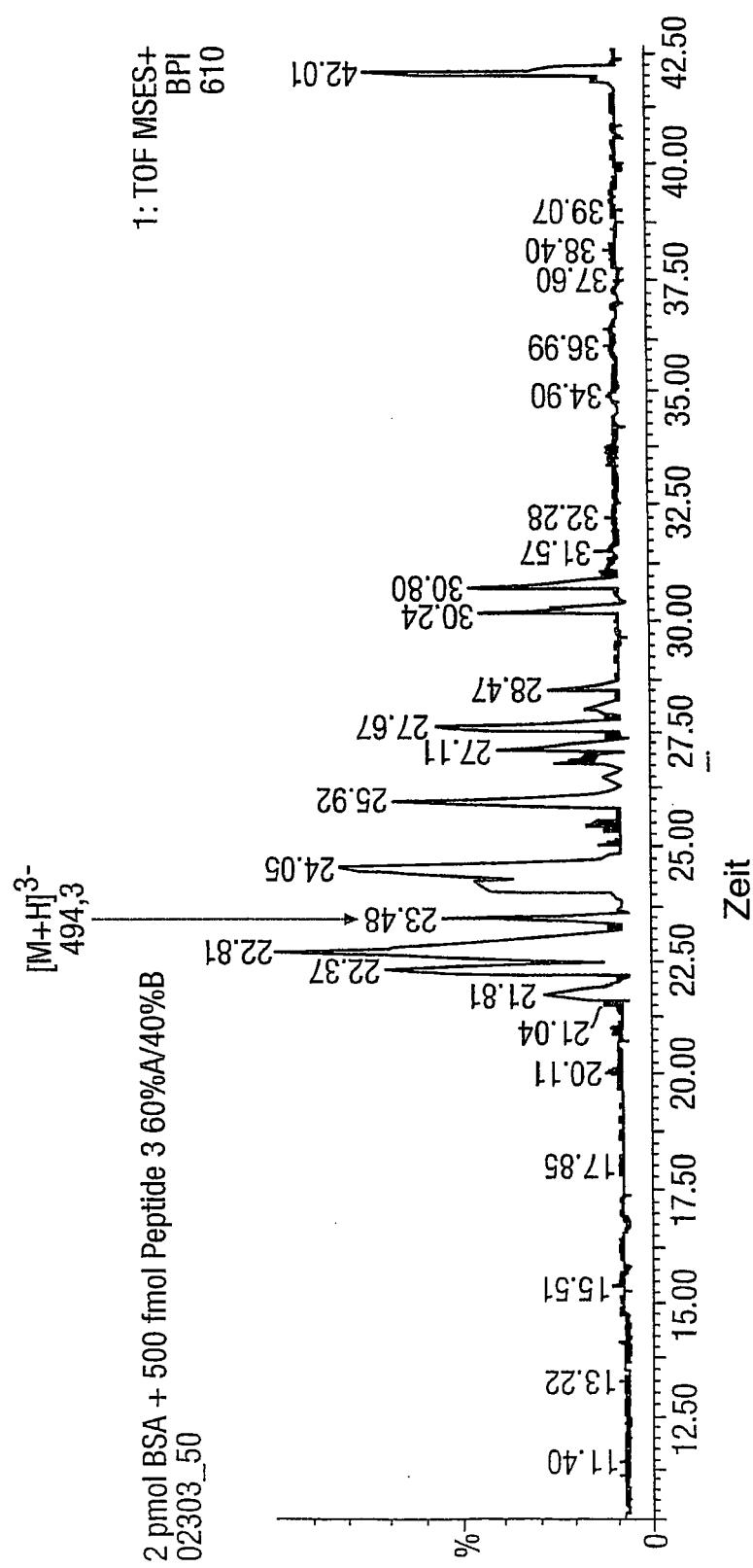


Fig.26b.

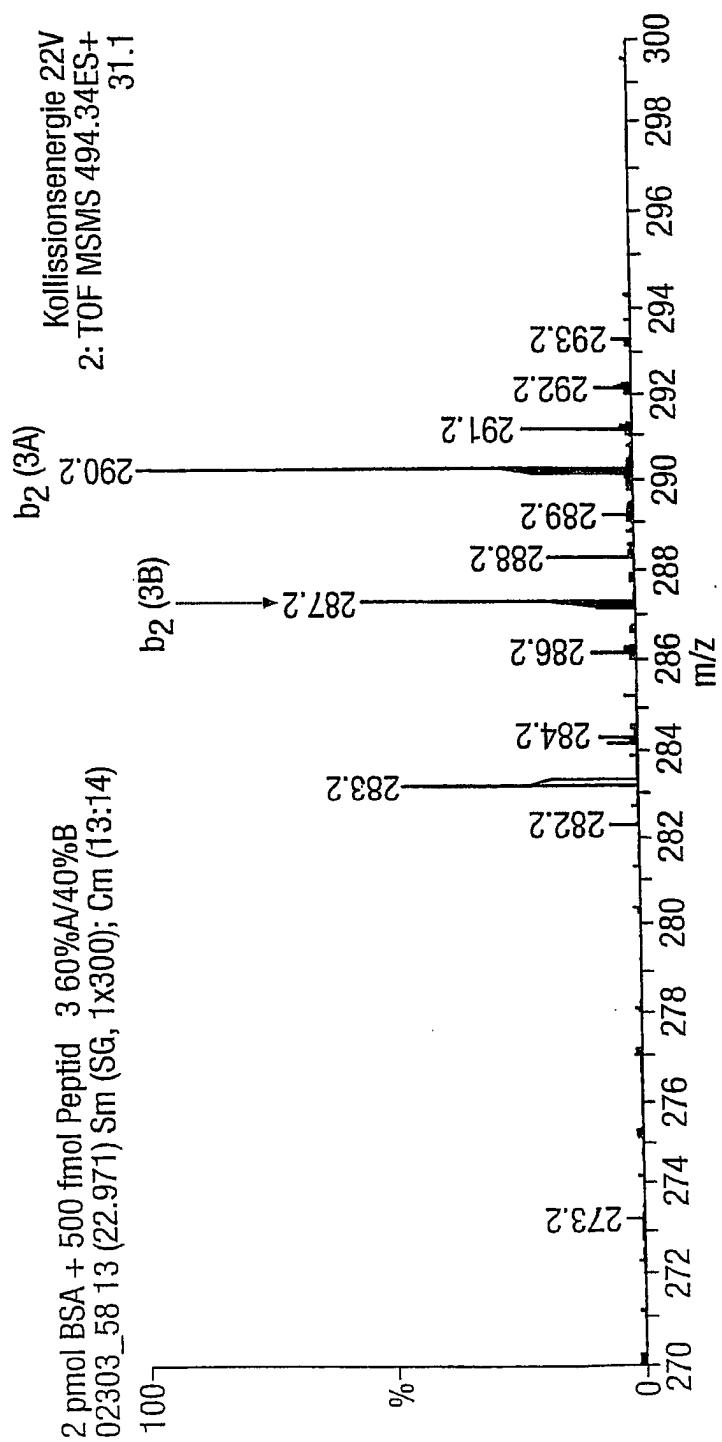


Fig.26c.

2 pmol BSA + 500 fmol Peptide 3 60%A/40%B  
02303\_58 13 (22.971) Sm (SG, 1x300); Cm (13:14)

