

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-511773

(P2004-511773A)

(43) 公表日 平成16年4月15日(2004.4.15)

(51) Int. Cl.⁷

G01N 27/62

C12Q 1/37

G01N 33/483

G01N 33/53

G01N 33/566

F I

G01N 27/62

D

テーマコード (参考)

2G045

4B063

G01N 27/62

F

G01N 27/62

V

C12Q 1/37

G01N 33/483

Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 133 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-534819 (P2002-534819)

(86) (22) 出願日 平成12年10月12日 (2000.10.12)

(85) 翻訳文提出日 平成15年4月8日 (2003.4.8)

(86) 国際出願番号 PCT/US2000/028261

(87) 国際公開番号 WO2002/031484

(87) 国際公開日 平成14年4月18日 (2002.4.18)

(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ,

TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), O A (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(71) 出願人 500023211

ヒューマン ゲノム サイエンス イン
コーポレイテッドアメリカ合衆国 20850 メリーラン
ド州 ロックヴィル キー ウェスト ア
ヴェニュー 9410

(71) 出願人 501438670

シファージェン バイオシステムズ, イン
コーポレイテッドアメリカ合衆国 カリフォルニア 945
55, フレモント, ダンバートン サ
ークル 6611

(74) 代理人 100091096

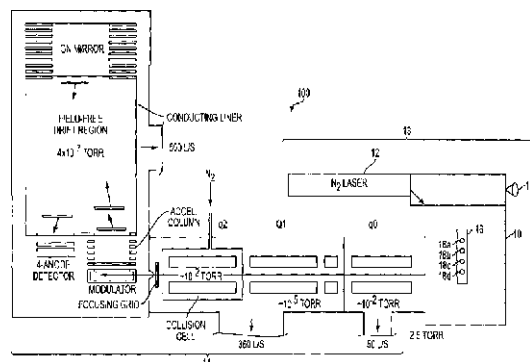
弁理士 平木 祐輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アフィニティ捕捉タンデム質量分析を用いた分子相互作用の特性を決定する方法

(57) 【要約】

本発明は、アフィニティ捕捉プローブインターフェース、レーザ脱離イオン化源、およびタンデム質量分析計を含む分析機器を提供する。また、本発明の機器を利用する、タンパク質発見および同定の新規方法、ならびに分子相互作用の特性付の新規方法も提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第 1 分子結合パートナーと第 2 分子結合パートナーとの間の結合相互作用の特性を決定する方法であって：

レーザー脱離イオン化プローブの表面に固定した第 1 結合パートナーに対して第 2 結合パートナーを結合させるステップ；

前記第 2 結合パートナーをフラグメント化するステップ；ならびに次いで

前記フラグメントの少なくとも 1 つをタンデム質量分析計測定により検出して、

前記検出したフラグメントの質量スペクトルが前記結合相互作用の特性を決定するステップを含んでなる、前記方法。

10

【請求項 2】

第 2 結合パートナーを第 1 結合パートナーと結合させるステップの前に、さらに第 1 結合パートナーをアフィニティ捕捉プローブの表面へ固定するステップを含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

第 1 パートナーのアフィニティ捕捉プローブ表面への固定が直接的結合である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

プローブ表面との直接的結合が共有結合である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

共有結合が第 1 結合パートナーのアミンとプローブ表面のカルボニルジイミダゾール部分との結合である、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

共有結合が第 1 結合パートナーのアミノまたはチオール基とプローブ表面のエポキシ基との結合である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

プローブ表面との直接的結合が非共有結合である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 8】

プローブ表面との直接的結合が配位または供与結合である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

配位または供与結合が前記プローブ表面の金属との結合である、請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 10】

金属が金及び白金からなる群から選択される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

アフィニティ捕捉プローブを固定する表面がクロマトグラフィ吸着表面である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 12】

クロマトグラフィ吸着表面が逆相、陰イオン交換、陽イオン交換、固定された金属アフィニティ捕捉、及び混合モード表面からなる群から選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

第 1 パートナーのアフィニティ捕捉プローブ表面への固定が間接的結合である、請求項 2 に記載の方法。

40

【請求項 14】

間接的結合が共有結合により第 1 結合パートナーをアフィニティ捕捉プローブ表面と結合する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

アフィニティ捕捉プローブ表面との間接的共有結合が切断しうるリンカーを含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

リンカーが化学、酵素、及び放射からなる群から選択される薬剤により切断しうる、請求

50

項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

間接的結合が非共有結合により第 1 結合パートナーをアフィニティ捕捉プローブ表面と結合する、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 8】

アフィニティ捕捉プローブ表面との非共有間接的結合がビオチン分子を含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

アフィニティ捕捉プローブ表面との非共有間接的結合がアビジン分子を含む、請求項 1 7 に記載の方法。

10

【請求項 2 0】

アフィニティ捕捉プローブ表面との非共有間接的結合がストレプトアビジン分子を含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 1】

第 1 分子結合パートナーがタンパク質、核酸、炭水化物、及び脂質からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 2】

第 1 分子結合パートナーがタンパク質である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

タンパク質が天然に生じる、請求項 2 2 に記載の方法。

20

【請求項 2 4】

タンパク質が多細胞真核生物、単細胞真核生物、原核生物、及びウイルスからなる群から選択される生物中に天然に生じる、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

タンパク質が多細胞真核生物中に天然に生じる、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

多細胞真核生物が哺乳類、昆虫、線虫、魚類、及び管束植物からなる群から選択される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

多細胞真核生物が哺乳類である、請求項 2 6 に記載の方法。

30

【請求項 2 8】

前記哺乳類がヒトである、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

哺乳類がげっ歯類である、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 0】

げっ歯類がマウス、ラット、またはモルモットである、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 1】

タンパク質が天然に生じない、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 3 2】

タンパク質が組換え融合タンパク質である、請求項 3 1 に記載の方法。

40

【請求項 3 3】

タンパク質が抗体、受容体、転写因子、細胞骨格タンパク質、細胞周期タンパク質、及びリボソームタンパク質からなる群から選択される、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

タンパク質が抗体である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

タンパク質が受容体である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 6】

受容体が細胞表面受容体、膜貫通受容体、及び核受容体からなる群から選択される、請求項 3 5 に記載の方法。

50

【請求項 37】

第1結合パートナーに対する第2結合パートナーの結合が、前記第1結合パートナーを生物学的サンプルと接触させることにより達成される、請求項1に記載の方法。

【請求項 38】

生物学的サンプルが血液、リンパ液、尿、脳脊髄液、滑液、乳、唾液、硝子体液、房水、粘液、精液からなる群から選択される体液である、請求項37に記載の方法。

【請求項 39】

生物学的体液が血液である、請求項38に記載の方法。

【請求項 40】

体液が尿である、請求項38に記載の方法。

10

【請求項 41】

生物学的体液がCSFである、請求項38に記載の方法。

【請求項 42】

生物学的サンプルが細胞溶解物である、請求項37に記載の方法。

【請求項 43】

第2結合パートナーがタンパク質である、請求項1に記載の方法。

【請求項 44】

第1結合パートナーに対する第2結合パートナーの結合が、前記第1結合パートナーを化学合成されたコンビナトリアルライブラリーのアリコートと接触させることにより達成される、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 45】

第1結合パートナーに対する第2結合パートナーの結合が、前記第1結合パートナーを生物学的にディスプレイされたコンビナトリアルライブラリーのアリコートと接触させることにより達成される、請求項1に記載の方法。

【請求項 46】

ライブラリーがファージディスプレイされたライブラリーである、請求項45に記載の方法。

【請求項 47】

フラグメント化が、第2結合パートナーを酵素と接触させることにより達成される、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 48】

フラグメント化が、第2結合パートナーを酵素と接触させることにより達成される、請求項43に記載の方法。

【請求項 49】

酵素が特定のエンドプロテアーゼである、請求項48に記載の方法。

【請求項 50】

エンドプロテアーゼがトリプシン、Glu-C(V8)プロテアーゼ、エンドプロテイナーゼArg-C(セリンプロテアーゼ)、エンドプロテイナーゼArg-C(システインプロテアーゼ)、Asn-Nプロテアーゼ、及びLys-Cプロテアーゼからなる群から選択される、請求項49に記載の方法。

40

【請求項 51】

プロテアーゼがトリプシンである、請求項50に記載の方法。

【請求項 52】

フラグメント化が、第2結合パートナーを液相化学物質と接触させることにより達成される、請求項1に記載の方法。

【請求項 53】

化学物質がCNBrである、請求項52に記載の方法。

【請求項 54】

第2結合パートナーを第1結合パートナーと結合させるステップの後にかつ前記第2結合パートナーをフラグメント化するステップの前に：

50

さらに前記第 2 結合パートナーを変性するステップを含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 55】

第 2 結合パートナーをフラグメント化するステップの後に：

さらに、プローブを第 1 溶出液を用いて洗浄するステップを含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 56】

プローブを第 1 溶出液を用いて洗浄するステップの後にかつフラグメントをタンデム質量分析計測定により検出するステップの前に：

さらに少なくとも 1 つの溶出特性が前記第 1 溶出液と異なる第 2 溶出液を用いて前記プローブを洗浄するステップを含んでなる、請求項 55 に記載の方法。 10

【請求項 57】

溶出特性は pH、イオン強度、界面活性剤強度、及び疎水性からなる群から選択される、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

フラグメント化するステップの後にかつ前記フラグメントを検出するステップの前に：

さらにプローブにエネルギー吸収分子を適用するステップを含んでなる、請求項 1 または 55 に記載の方法。

【請求項 59】

フラグメント化するステップの後にかつフラグメントを検出するステップの前に：

さらに、プローブを分析装置のアフィニティ捕捉プローブインターフェースに係合させるステップであり、ここで、前記分析装置はレーザー脱離イオン化源；アフィニティ捕捉プローブインターフェース；及びタンデム質量分析計を含んでなり、かつ前記アフィニティ捕捉プローブインターフェースは、アフィニティ捕捉プローブと係合しかつ前記プローブを前記レーザー源に対して照会可能な関係にかつ同時に前記タンデム質量分析計と連絡して配置することができる、前記ステップ；ならびに次いで 20
前記レーザー源を用いて第 2 結合パートナーのフラグメントを前記プローブから脱離しかつイオン化するステップを含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 60】

タンデム質量分析計測定が全イオン質量の測定である、請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 61】

タンデム質量分析計測定がフラグメントのサブセットの質量の測定である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 62】

タンデム質量分析計測定が単イオンの監視測定である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 63】

検出するステップの後に、さらにフラグメント測定を、第 2 結合パートナーの第一級アミノ酸配列に対するフラグメント化酵素切断規則を適用することにより予測されるフラグメントと比較するステップを含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 64】

検出するステップの後にかつ比較するステップの前に、さらに第 2 結合パートナーを m/z / m/z 分析を通して同定するステップを含んでなる、請求項 63 に記載の方法。 40

【請求項 65】

m/z / m/z 分析を通して同定するステップが：

質量分析によって第 2 結合パートナーの第 1 フラグメントを選択するステップ；

第 2 結合パートナー第 1 フラグメントを気相で解離するステップ；

第 2 結合パートナー第 1 フラグメントのフラグメントスペクトルを測定するステップ、ならびに次いで

前記フラグメントスペクトルを、データベース中の先に登録されたアミノ酸配列データから予想されるフラグメントスペクトルと比較するステップを含んでなる、請求項 64 に記 50

載の方法。

【請求項 6 6】

アミノ酸配列データが実験及び予想されるデータからなる群から選択される、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

解離が衝突により誘導された解離である、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 8】

第 1 結合パートナーが抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6 9】

第 1 結合パートナーが T 細胞受容体である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 7 0】

第 1 結合パートナーが M H C 分子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7 1】

第 1 結合パートナーが受容体でありかつ第 2 結合パートナーが前記受容体のアゴニストである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7 2】

第 1 結合パートナーが受容体でありかつ第 2 結合パートナーが受容体の部分アゴニストである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

第 1 結合パートナーが受容体でありかつ第 2 結合パートナーが受容体のアンタゴニストである、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 7 4】

第 1 結合パートナーが受容体でありかつ第 2 結合パートナーが受容体の部分アンタゴニストである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7 5】

第 1 結合パートナーが糖タンパク質受容体でありかつ第 2 結合パートナーがレクチンである、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

30

本発明は、化学および生化学分析の分野に関し、特に、タンデム質量分析法による、分析物および分析物間の親和性相互作用の改良された同定および特性決定のための装置および方法に関する。

【0002】

発明の背景

質量分析計の改良された性能および低コストに伴った、エレクトロスプレーイオン化 (E S I) およびマトリクス支援レーザー脱離 / イオン化 (M A L D I) 技術の到来により、過去 10 年にわたって、質量分析法 (M S) が、複合生化学システムから精製されるタンパク質を含む生物学的に関連する巨大分子の研究において、標準的な分析ツールの間で特定の位置を占めていた。

40

【0003】

例えば、ペプチド質量フィンガープリント法として既知の技術では、生物学的試料から精製されるタンパク質を同定するために質量分析法が用いられる。同定は、精製されたタンパク質のタンパク質分解フラグメントの質量スペクトルを、予めデータベースに含ませた主要配列から予想される質量と照合することによって行われる。R o e p s t o r f f , The Analyst 117: 299 - 303 (1992); P a p p i n e t a l . , Curr. Biol. 3 (6): 327 - 332 (1993); M a n n e t a l . , Biol. Mass Spectrom. 22: 338 - 345 (1993); Y a t e s e t a l . , Anal. Biochem. 213: 397 - 408 (1993); H e n z e l e t a l . , Proc. Natl. Aca

50

d. Sci. USA 90: 5011-5015 (1993); James et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 195: 58-64 (1993)。

同様のデータベース調査によるアプローチが開発されている。このアプローチでは、精製されたタンパク質を同定するために、衝突誘導解離 (CID) または MALDI ポストソース分解 (PSD) から得られるフラグメント質量スペクトルを用いる。Eng et al., J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 5: 976-989 (1994); Griffin et al., Rapid Commun. Mass Spectrom. 9: 1546-1551 (1995); Yates et al., 米国特許出願第 5, 538, 897 号および第 6, 017, 693 号; Mann et al., Anal. Chem. 66: 4390-4399 (1994)。

10

【0004】

単離されたタンパク質の少なくとも部分的な de novo 配列決定を可能にする質量分析技術もまた開発されている。Chait et al., Science 262: 89-92 (1993); Keough et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 7131-6 (1999); Bergman, EXS 88: 133-44 (2000) において検討されている。

【0005】

タンパク質の質量スペクトルの解釈および公開ドメイン配列データベース調査を容易にするソフトウェアリソースは、現在、インターネット上で容易にアクセスでき、タンパク質の同定が容易になっている。これらの中には、Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu>)、PROWL (<http://prowl.rockefeller.edu>) および Mascot Search Engine (Matrix Science Ltd., London, UK, www.matrixscience.com) がある。

20

【0006】

高精度の質量割当てによって有用な情報が得られる (例えば、上記の技術によって精製タンパク質の同定が容易になる) が、このような情報は限られている。有意なさらなる分析力は、MS 分析を標的タンパク質の酵素および / または化学的改変と組み合わせること、構造上の構成要素の解明を可能にすること、翻訳後の改変およびタンパク質同定を促進することによって発揮されるであろう。

30

【0007】

さらに、血液、血清、血漿、リンパ液、間質液、尿、滲出物、全細胞、細胞溶解物、および細胞分泌物などの生物学的複合物質は、通常、数百の生物学的分子、ならびに有機および無機塩を含み、これらは、直接的な質量分析法には用いられない。従って、有意な試料の調製および精製工程は、通常、MS 調査の前に必要である。

【0008】

液体クロマトグラフィー (イオン交換、サイズ排除、アフィニティおよび逆相クロマトグラフィー)、膜透析、円心分離、免疫沈降および電気泳動などの従来の試料精製方法は、通常、大量の開始試料を必要とする。このような大量の試料が得られたとしても、これらの精製プロセスでは、少量の成分が失われる傾向があり、非特異的結合および希釈の影響により、分析物を損失することになる。これらの方法はまた、大抵の場合、労働集約的である。

40

【0009】

このように、従来のような冗長的な高価な液相精製を必要とせずに、異質の試料に存在する主要なタンパク質および主要でないタンパク質の質量分析検出を容易にする方法および装置が求められていることは明白である。さらに、容易な試料精製を可能にするだけでなく、質量分析の前のシリアルおよびパラレル試料改変アプローチを可能にする MSプラットフォームも求められている。

【0010】

50

上記の需要は、一部には、アフィニティ捕捉レーザー脱離イオン化アプローチの開発によって満たされている。Hutchens et al., Rapid Commun. Mass Spectrom. 7: 576 - 580 (1993); 米国特許第5,719,060号、第5,894,063号、第6,020,208号および第6,027,942号。巨大分子のMS分析用のこの新しい手順では、少なくとも1つの表面にアフィニティ試薬を含む新規のレーザー脱離イオン化プローブが用いられる。アフィニティ試薬は、異質の試料から所望の分析物を吸着し、それらを次のレーザー脱離イオン化に適切な形態でプローブの表面に集める。分析物の吸着および脱離の連結によって、オフライン精製アプローチを不要にし、より小さな初期試料の分析が可能になり、質量分析の前のプローブ表面での直接的な試料改変アプローチがさらに容易になる。

10

【0011】

アフィニティ捕捉レーザー脱離イオン化アプローチによると、質量分析法を、イムノアッセイ(Nelson et al., Anal. Chem. 67: 1153 ~ 1158 (1995))およびアフィニティクロマトグラフィー(Brockman et al., Anal. Chem. 67: 4581 - 4585 (1995))を含む従来の多数の生物学的分析アッセイ形態に適応させることができる。アフィニティ捕捉レーザー脱離イオン化アプローチは、ペプチドおよびタンパク質(Hutchens et al., Rapid Commun. Mass Spectrom. 7: 576 - 580 (1993); Mouradian et al., J. Amer. Chem. Soc. 118: 8639 - 8645 (1996); Nelson et al., Rapid Commun. Mass Spectrom. 9: 1380 - 1385 (1995); Nelson et al., J. Molec. Recognition 12: 77 - 93 (1999); Brockman et al., J. Mass Spectrom. 33: 1141 - 1147 (1998); Yip et al., J. Biol. Chem. 271: 32825 - 33 (1996))だけでなく、オリゴヌクレオチド(Jurinke et al., Anal. Chem. 69: 904 - 910 (1997); Tang et al., Nucl. Acids Res. 23: 3126 - 3131 (1995); Liu et al., Anal. Chem. 67: 3482 - 90 (1995))、細菌(Bundy et al., Anal. Chem. 71: 1460 - 1463 (1999))、および小分子(Wei et al., Nature 399: 243 - 246 (1999))の研究にも適用されている。商業上のレベルでは、アフィニティ捕捉レーザー脱離イオン化は、CiphergenのProteinChip(登録商標)Systems(Ciphergen Biosystems, Inc. Fremont, California, USA)において具現化される。

20

30

【0012】

アフィニティ捕捉レーザー脱離イオン化技術は、当該技術分野における深刻な問題を解決したが、難点は未だに残っている。

【0013】

このアプローチが生物学的試料からのタンパク質の捕捉に適用されると、捕捉され、次の分析に得られる全タンパク質の約1ピコモルを見ることは一般的である。通常、クロマトグラフィー表面バイオチップ上のアフィニティ捕捉では、完全な精製は得られない。さらに、自由溶液または2-Dゲルの変性環境において行われる消化と比較して、固相抽出試料に関して見られる消化効率は良好ではない。従って、約50%が目的のタンパク質であり、このタンパク質の約10%を消化することに成功したとすると、最も多くて約50フェムtomolのペプチドだけが検出に利用できる。

40

【0014】

データベース調査実験におけるウシフェツインの実質的なトリプシン消化を用いて、例えば、1.0 ppmの過剰な精度(大抵のMS技術では現在のところ達成できない)であっても、この複合真核生物ゲノムに対するサーチを行うと、単一のペプチド質量では、タン

50

バク質IDの照合は、あまり信頼性がよくないことが示されている。2つのペプチドについても、同様に信頼性の低い結果が得られる。3つのペプチドが提出されて初めて、300 ppm未満のエラーの質量割当てに対して信頼性のある結果が得られる。この場合、大抵のデバイスでは、内部標準較正が必要である。しかし、5またはそれ以上のペプチドにおいては、1000 ppmを上回るエラーである質量精度では、さらなる信頼性は得られない。

【0015】

さらに、多数のタンパク質が同時に消化されると、異質のペプチドプールが作成され、良好なデータベース調査は、過剰な精度を必要とするだけでなく、多くの場合、主要な配列情報を必要とする。タンデムMS/MSアプローチは、主要な配列情報を提供することにおける有意な実用性を示している。Biemann et al., Acc. Chem. Res. 27: 370 - 378 (1994); Spengler et al., Rapid Commun. Mass Spectrom. 1991, 5: 198 - 202 (1991); Spengler et al., Rapid Commun. Mass Spectrom. 6: 105 - 108 (1992); Yates et al., Anal. Chem. 67: 1426 - 1436 (1995); Kaufman et al., Rapid Commun. Mass Spectrom. 7: 902 - 910 (1993); Kaufman et al., Intern. J. Mass Spectrom. Ion Processes 131: 355 - 385 (1994)。

10

20

【0016】

しかし、最近まで、レーザ脱離に基づいた分析に得られる唯一のMS/MSアプローチは、ポストソース分解分析(PSD)であった。PSDは、ピコモルレベルのペプチドに関する妥当な配列情報を提供することができるが、このフラグメント化プロセスの効率は全体としては低い。このアプローチにおいて頻繁に示される良好でない質量精度および感度と組み合わせられると、アフィニティ捕捉レーザ脱離イオン化プローブにおいて頻繁に見出される少量のタンパク質の分析への適用は、非常に限定されている。近年、衝突誘導解離(CID)MS/MS分析を行うことが可能なレーザ脱離イオン化四重極飛行時間型質量分析計(LDI Qq-TOF)が開発されている。Krutchinsky et al., Rapid Commun. Mass Spectrom. 12: 508 - 518 (1998)。

30

【0017】

従って、アフィニティ捕捉レーザ脱離質量分析の感度および質量精度を増加させる装置および方法が求められている。プローブ上の消化効率を増加させ、容易に溶解されるタンパク質の均質でない混合物の消化によって生成されるペプチドを可能にする方法および装置が求められている。アフィニティ捕捉レーザ脱離タンデム質量分析法の効率を増加させる装置および方法が求められている。

【0018】

発明の概要

本発明の目的は、現存するアフィニティ捕捉レーザ脱離イオン化質量分析の感度、質量精度、質量解像度を増加させる装置および方法を提供し、ms/ms能力を加えることである。さらに、本発明の他の目的は、これらの改良された分析能力を利用する生体分子分析の方法を提供することである。

40

【0019】

本発明は、第1の態様において、分析機器を提供することによって、当該技術分野における上記およびその他の目的および需要を満足する。

【0020】

本発明の分析機器は、レーザ脱離イオン化源と、アフィニティ捕捉プローブインターフェースと、タンデム質量分析計とを有し、アフィニティ捕捉プローブインターフェースは、アフィニティ捕捉プローブと係合し、プローブがタンデム質量分析計と通信している間レ

50

ーザ脱離源によって照会 (i n t e r r o g a t e) され、プローブから脱離されたイオンが質量分析計に入るようにプローブを配置することが可能である。

【 0 0 2 1 】

通常、レーザ脱離イオン化源は、レーザ励起源およびレーザ光学列を有し、レーザ光学列は、励起された光子をレーザ励起源からプローブインターフェースに送信するように機能する。このような実施形態では、レーザ光学列は、通常、照会されたプローブ表面 1 平方ミリメートル当たり約 2 0 ~ 1 0 0 0 マイクロジュールのエネルギーを送達する。

【 0 0 2 2 】

レーザ励起源は、連続レーザおよびパルスレーザからなる群から選択され、様々な実施形態では、窒素レーザ、Nd : YAGレーザ、エルビウム : YAGレーザおよびCO₂レーザからなる群から選択される。現在好ましい実施形態では、レーザ励起源は、パルス窒素レーザである。

10

【 0 0 2 3 】

実施形態の 1 つのセットでは、レーザ光学列は、レンズ、ミラー、プリズム、減衰器、およびビームスプリッタからなる群から選択される光学構成要素を有する。

【 0 0 2 4 】

実施形態の他のセットでは、レーザ光学列は、入力端および出力端を有する光ファイバを有し、レーザ励起源は、上記光ファイバの入力端に結合される。

【 0 0 2 5 】

光ファイバレーザ光学列のいくつかの実施形態では、レーザ光学列は、光学減衰器をさらに有する。減衰器は、レーザ励起源と、光ファイバの入力端との間に配置され、レーザ励起源を光ファイバの入力端に結合させるように作用するか、または光ファイバの出力端とプローブとの間に配置され得る。

20

【 0 0 2 6 】

光ファイバ光学列のある実施形態では、光ファイバの出力端は、約 2 0 0 ~ 4 0 0 μ m の最大直径を有し、入力端は、約 4 0 0 ~ 1 2 0 0 μ m の直径を有する。

【 0 0 2 7 】

分析機器はまた、プローブがプローブインターフェースと係合した後視覚化されるように、プローブ観察光学部品を有し得る。

【 0 0 2 8 】

ある実施形態では、レーザ光学列は、レーザ励起源を光ファイバの入力端に結合するレーザカプラを有し得る。上記のように、カプラは、光学減衰器として作用し得る。他の実施形態では、カプラは、プローブがプローブインターフェースと係合した後プローブの視覚化を促進するように作用し得る。

30

【 0 0 2 9 】

上記の後者のある実施形態では、カプラまたはファイバのいずれかが二又分岐され、上記レーザ励起源からの少量のエネルギーを分離する。あるいは、このような二又分岐によって、可視光を導入して脱離部位を照会することができる。

【 0 0 3 0 】

視覚化光学部品が光学列に含まれるか、またはファイバを含むレーザ光学列が、二又分岐または三又分岐を含む場合、分析機器はさらに、上記プローブから反射される光を検出するように配置されたCCDカメラを有し得る。

40

【 0 0 3 1 】

通常の実施形態では、アフィニティ捕捉プローブインターフェースは、アフィニティ捕捉プローブに可逆的に係合することが可能なプローブホルダーを有する。インターフェースはまた、通常、それ自体プローブホルダーと可逆的に係合することが可能なプローブ導入ポートを有する。

【 0 0 3 2 】

通常の実施形態では、プローブインターフェースはさらに、プローブ位置アクチュエータアセンブリおよびインターフェースイオン収集システムを有する。プローブホルダーが導

50

入ポートと係合すると、プローブホルダーは、プローブ位置アクチュエータと接触するように配置され、プローブ位置アクチュエータ自体は、レーザイオン化源（通常、レーザ光学列に対して）およびイオン収集システムの両方に対して、プローブホルダー（通常、その係合したプローブを有する）を移動可能に配置することができる。通常の実施形態では、アクチュエータは、上記プローブホルダーを並進運動可能かつ回転可能に配置することができる。

【0033】

プローブインターフェースは、通常、プローブ導入ポートに接続された真空排出システムも有する。真空排出システムによって、プローブは、準大気圧において、レーザ脱離イオン化源によって照会される。

10

【0034】

本発明の分析機器は、タンデム質量分析計を有する。タンデム質量分析計は、様々な実施形態において、QqTOF MS、イオントラップMS、イオントラップTOF MS、TOF-TOF MS、およびフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴MSからなる群から選択される。本発明の分析機器において用いられるのに現在好ましいのは、QqTOF MSである。

【0035】

好ましい実施形態では、タンデム質量分析計は、QqTOF MSであり、レーザ励起源は、パルス窒素レーザであり、プローブにおけるレーザフルエンスは、最小脱離閾値の約2～4倍であり、タンデム質量分析計は、約20～50 ppmの外部標準質量精度を有する。

20

【0036】

本発明の分析機器は、アフィニティ捕捉レーザ脱離イオン化プローブと係合するように設計されている。従って、上記の実施形態はすべて、アフィニティ捕捉プローブインターフェースと係合するアフィニティ捕捉プローブを有し得る。

【0037】

これらの実施形態におけるアフィニティ捕捉プローブは、通常、レーザ源と照会可能な関係になるように配置される少なくとも1つの試料吸着面を有する。試料吸着面は、クロマトグラフ吸着面および生体分子アフィニティ面からなる群から選択される。通常、このようなクロマトグラフ吸着面は、逆相、陰イオン交換、陽イオン交換、固定化金属アフィニティ捕捉および混合モード表面からなる群から選択され、生体分子アフィニティ面の生体分子は、抗体、受容体、核酸、レクチン、酵素、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ブドウ球菌プロテインA、およびブドウ球菌プロテインGからなる群から選択される。

30

【0038】

アフィニティ捕捉レーザ脱離イオン化プローブは、レーザ源と照会可能な関係になるように配置され得る複数の別個にアドレス型試料吸着面を有し、少なくとも2つの異なるこのような吸着面を有し得る。

【0039】

他の実施形態では、本発明の分析機器は、タンデム質量分析計の検出器とインターフェースされるデジタルコンピュータを有する。さらに、いくつかの実施形態では、機器はまた、コンピュータに対してローカルであるかまたはコンピュータと通信アクセス可能なデジタルコンピュータによって実行できるソフトウェアプログラムを有し得る。このような実施形態におけるソフトウェアプログラムは、レーザ脱離イオン化源を制御することが可能であるか、タンデム質量分析計によるデータ取得の少なくとも1つの態様を制御することが可能であるか、上記タンデム質量分析計によって得られるデータ上で少なくとも1つの分析ルーチンを実施することが可能であるか、またはこれらの機能の任意のサブセットを可能にする。

40

【0040】

他の態様では、本発明は、少なくとも1つの試験タンパク質を分析するための方法を提供

50

する。

【0041】

この方法は、(a)アフィニティ捕捉タンパク質バイオチップ上で試験タンパク質または複数のタンパク質を捕捉すること、(b)タンパク質分解剤を用いてタンパク質バイオチップ上で試験タンパク質のタンパク質切断産物を生成すること、および(c)タンデム質量分析計を用いて少なくとも1つのタンパク質切断産物を分析することを含む。この態様のこれらの実施形態では、分析工程は、(i)タンパク質バイオチップからタンパク質切断産物を気相に脱離し、対応する親イオンペプチドを生成すること、(ii)第1の質量分析計を用いて、次のフラグメント化のための親イオンペプチドを選択すること、(iii)気相における選択されたフラグメント化条件下で選択された親イオンペプチドをフラグメント化し、産物イオンフラグメントを製造すること、および(iv)産物イオンフラグメントの質量スペクトルを生成することを含む。このように、質量スペクトルは、試験タンパク質の分析を提供する。

10

【0042】

本発明のこの態様の特定の実施形態では、方法はさらに、質量スペクトルとデータベース内のタンパク質の理論的質量スペクトルとの一致近似性(closeness-of-fit analysis)の測定値に基づいて、データベースにおける試験タンパク質に対する少なくとも1つのタンパク質同定候補を同定するタンパク質データベース調査プロトコルに、質量スペクトルを提示することによって、試験タンパク質に対する少なくとも1つのタンパク質同定候補を決定するさらなる工程(d)を含む。

20

【0043】

特に、これらの実施形態の中で、工程(d)はさらに、試験タンパク質の質量および試験タンパク質の元の種をプロトコルに提示することを含む。

【0044】

他の実施形態では、方法はさらに、(i)(b)のタンパク質切断産物の質量スペクトルを生成すること、および(ii)タンパク質分解剤を用いて生成されると予想される同定候補の切断産物の理論的な質量スペクトルと、タンパク質切断産物の質量スペクトルとの間の一致近似性の測定値を決定し、それによりその測定値が試験タンパク質に対応するタンパク質バイオチップ上でタンパク質切断産物を示すコンピュータプロトコルに、タンパク質切断産物の質量スペクトルを提示することによって、同定候補と試験タンパク質とを比較すること(e)をさらに含む。

30

【0045】

方法のさらに他の実施形態は、選択された親イオンペプチドが同定候補から予想されるタンパク質切断産物に対応しない工程(c)を繰り返す工程(f)、および(f)の選択された親イオンペプチドに対して(d)を繰り返す工程(g)をさらに含む。

【0046】

本発明のこの態様では、試験タンパク質は、第1の生物学的試料と第2の生物学的試料との間で差次的に発現されるタンパク質であり得る。これらのいくつかの実施形態では、第1および第2の生物学的試料は、正常な供給源および病理学上の供給源から得られる。

【0047】

第3の態様では、本発明は、第1の分子結合パートナーと第2の分子結合パートナーとの間の結合相互作用を特性決定する方法を提供する。

40

【0048】

この態様では、方法は、第2の結合パートナーを第1の結合パートナーに結合することであって、上記第1の結合パートナーは、レーザ脱離イオン化プローブの表面に固定化される、結合することと、第2の結合パートナーをフラグメント化することと、タンデム質量分析計測定によって少なくとも1つのフラグメントを検出することであって、それによって、検出されたフラグメントの質量スペクトルは、結合相互作用の特性を決定し、検出することとを含む。

【0049】

50

本発明のこの態様の特定の実施形態では、第1の結合パートナーは、まず、第2の結合パートナーが第1の結合パートナーに結合する前に、アフィニティ捕捉プローブの面に固定化される。

【0050】

このような固定は、共有結合などの、第1のパートナーのアフィニティ捕捉プローブへの直接的な結合によって行われ得る。通常の共有結合の実施形態には、第1の結合パートナーのアミンと上記プローブ面のカルボニルジイミダゾール部分との間の共有結合、および上記第1の結合パートナーのアミノもしくはチオール基とプローブ面のエポキシ基との間の共有結合が含まれる。

【0051】

固定はまた、第1の結合パートナーと、プローブ面の金または白金などの金属との間の配位結合または供与結合などの直接的な非共有結合によっても行われ得る。固定はまた、第1の結合パートナーを、逆相、陰イオン交換、陽イオン交換、固定化金属アフィニティ捕捉および混合モード面からなる群から選択される、クロマトグラフ吸着面と相互作用させることによって行われ得る。

【0052】

あるいは、固定は、間接的であってもよく、これは、間接的であるが共有結合であり得る。これらの後者の特定の実施形態では、第1の結合パートナーは、切断可能なリンカーなどのリンカーを通して共有結合によって固定化され得る。間接的な固定はまた、ピオチン/アビジン、ピオチン/ストレプトアビジン相互作用を介したプローブへの固定などの、非共有結合でも行われ得る。

【0053】

本発明のこの態様では、第1の分子結合パートナーは、タンパク質、核酸、炭化水物および脂質からなる群から選択され得る。通常、第1の結合パートナーは、タンパク質であり、これは、多細胞真核生物、単細胞真核生物、原核生物、およびウイルスからなる群から選択される生物体からの天然に存在するタンパク質、または組換え融合タンパク質などの人工タンパク質であり得る。

【0054】

第1の結合パートナーがタンパク質である実施形態では、タンパク質は、とりわけ、抗体、受容体、転写因子、細胞骨格タンパク質、細胞周期タンパク質、およびリボソームタンパク質からなる群から選択され得る。

【0055】

固定化された第1の結合パートナーへの第2の結合パートナーの結合は、通常の実施形態では、第1の結合パートナーを生物学試料と接触させることによって行われる。試料は、血液、リンパ液、尿、脳脊髄液、滑液、ミルク、唾液、硝子体液、水様液、粘液および精液、もしくは細胞溶解物、または他の形態の試料から選択される流体であり得る。

【0056】

第1の結合パートナーがタンパク質である実施形態を含む様々な実施形態では、第2の結合パートナーはタンパク質であり得る。あるいは、第2の結合パートナーは、組み合わせライブラリー内に存在する化合物であり得る。ここで、第1の結合パートナーへの第2の結合パートナーの結合は、第1の結合パートナーを化学的に合成されたコンビナトリアルライブラリーのアリコートと接触させることによって行われる。さらに他の代替では、第2の結合パートナーは、ファージディスプレイライブラリーなどの生物学的に表示された組み合わせライブラリーの成分であり得る。

【0057】

通常の特定の実施形態では、フラグメント化することは、第2の結合パートナーを酵素と接触させることによって行われる。ここで、第2の結合パートナーは、タンパク質であり、酵素は、通常、トリプシン、Glu-C(V8)プロテアーゼ、エンドプロテイナーゼ Arg-C(セリンプロテアーゼ)、エンドプロテイナーゼ Arg-C(システインプロテアーゼ)、Asn-Nプロテアーゼ、およびLys-Cプロテアーゼなどの特異的なエ

10

20

30

40

50

ンドプロテアーゼである。あるいは、フラグメント化することは、上記第2の結合パートナーをC N B rなどの液相化学物質と接触させることによって行われ得る。

【0058】

いくつかの実施形態では、方法は、第2の結合パートナーを上記第1の結合パートナーと結合させた後、および第2の結合パートナーをフラグメント化する前に、第2の結合パートナーを変性することをさらに含む。

【0059】

様々な実施形態では、方法は、第2の結合パートナーをフラグメント化した後、プローブを第1の溶離剤、および場合によっては、第2の溶離剤で洗浄する工程をさらに含む。第2の溶離剤は、pH、イオン強度、洗剤強度、および疎水性などの少なくとも1つの溶出特性において第1の溶離剤とは異なる。

10

【0060】

通常の実施形態では、方法は、フラグメント化の後であって、第2の結合パートナーのフラグメントの検出前に、分子をプローブに吸収するエネルギーを適用する工程をさらに含む。好ましい実施形態では、次に、プローブは、本発明の分析機器のアフィニティ捕捉プローブインターフェース、および機器のレーザー源を用いてプローブからイオン化および脱離された第2の結合パートナーのフラグメントと係合する。

【0061】

機器は、イオンの全質量の測定、フラグメントのサブセットの質量の測定、および単一イオンモニタリング測定を含む、この方法においていくつかのタイプの有用な測定を行うために用いられ得る。

20

【0062】

有用なことに、方法の実施形態は、第2の結合パートナーのフラグメントの質量分析測定の後、そのフラグメント測定を、フラグメント化酵素の切断規則を第2の結合パートナーの第1のアミノ酸配列に適用することによって予想されるフラグメント測定と比較し、このような比較によって分子間の相互作用の特性を決定する工程を含む。

【0063】

第2の結合パートナーの同定が既知ではない場合、方法は、このような比較の前に、m s / m s 分析を通して第2の結合パートナーを同定することをさらに含み得る。このようなM S / M S 分析には、第2の結合パートナーの第1のフラグメントを質量分析によって選択する工程と、第2の結合パートナーの第1のフラグメントを気相において解離する工程と、第2の結合パートナーの第1のフラグメントのフラグメントスペクトルを測定する工程と、フラグメントスペクトルを、データベースに予め含ませたアミノ酸配列データから予想されるフラグメントスペクトルと比較する工程とを含み得る。アミノ酸配列データは、実験データおよび予想データからなる群から選択され得る。通常の実施形態では、解離は、衝突誘導解離である。

30

【0064】

方法のいくつかの実施形態では、第1の結合パートナーは、抗体、T細胞受容体、およびMHC分子からなる群から選択される。他の実施形態では、第1の結合パートナーは、受容体であり、第2の結合パートナーは、受容体のアゴニスト、受容体の部分アゴニスト、上記受容体のアンタゴニスト、および上記受容体の部分アンタゴニストからなる群から選択される。他の実施形態では、第1の結合パートナーは、糖タンパク質受容体であり、第2の結合パートナーは、レクチンである。

40

【0065】

第4の態様では、本発明は、分析物を検出する方法を提供する。方法は、アフィニティ捕捉プローブを、本発明の分析機器のアフィニティ捕捉プローブインターフェースに係合させることであって、アフィニティ捕捉プローブには分析物が結合している、係合させることと、機器のレーザー源を用いて、プローブから分析物またはそれらのフラグメントを脱離およびイオン化することと、次に、脱離されたイオン上で、タンデム質量分析測定によって分析物を検出することとを含む。

50

【0066】

この態様では、方法は、脱離およびイオン化する工程の後および検出する工程の前に、上記脱離されたイオンの衝突誘導解離を行うことをさらに含み得る。このような解離の前に、いくつかの実施形態では、イオンのサブセットは、衝突解離用に選択され得る。

【0067】

他の実施形態では、分析物をプローブに吸着する前の工程が行われ得る。さらに他の実施形態では、分析物を吸着させた後および上記プローブを上記プローブインターフェースに係合させる前に、上記プローブおよび上記分析物をエネルギー吸収分子に付着するように接触させる工程が行われ得る。

【0068】

本発明の上記および他の目的および利点は、添付の図面を参照しながら以下の詳細な説明を考慮することによって明白となる。添付の図面では、全体と通して、同様の参照符号は同様の部分を指す。

【0069】

発明の詳細な説明

I. 定義

本明細書で用いられているように、特に以下で示されている用語は、以下の定義を有する。特に記載のない限り、本明細書で用いられる用語はすべて、本発明に関係する当業者によって一般に理解される意味をもつ。

【0070】

「分析物」は、検出が望まれる試料の任意の成分を指す。この用語は、試料中の単一の成分または複数の成分を指し得る。

【0071】

「プローブ」は、レーザ脱離イオン化源と照会可能な関係であり、かつ大気圧または準大気圧において同時に通信するように気相イオン分析計と係合して配置されると、分析物から得られるイオンを分光計に導入するために用いられ得るデバイスを指す。本明細書で用いられる「プローブ」は、通常、プローブインターフェースによって可逆的に係合可能である。

【0072】

「アフィニティ補足プローブ」は、プローブが均質でない混合物から分析物を抽出および濃縮するのに十分な相互作用を通して分析物を結合するプローブを指す。高純度濃縮は必要ない。結合相互作用は、通常、プローブの吸着面に分析物を吸着させることによって仲介される。ProteinChip（登録商標）Arrayという用語は、本発明において用いられる、Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, Californiaから入手可能なアフィニティ補足プローブを指す。

【0073】

「吸着」は、分析物の吸着体への検出可能な非共有結合を指す。

【0074】

「吸着体」は、分析物を吸着することができる任意の物質を指す。用語「吸着体」は、本明細書では、単一の物質（「モノプレックス吸着体」）（例えば、化合物または官能基）および複数の異なる物質（「マルチプレックス吸着体」）を指すために用いられる。マルチプレックス吸着体中の吸着体物質は、「吸着体種」と呼ばれる。例えば、プローブ基板上のレーザアドレス型吸着面は、異なる結合特性を有する多くの異なる吸着体種（例えば、陰イオン交換物質、金属キレート化剤、または抗体）によって特徴づけられるマルチプレックス吸着体を含み得る。

【0075】

「吸着面」は、吸着体を含む表面を指す。

【0076】

「クロマトグラフ吸着面」は、分析物間のクロマトグラフ識別または分析物の分離を可能な吸着体を含む表面を指す。このように、この用語は、クロマトグラフ技術において理解

10

20

30

40

50

されるように、陰イオン交換部分、陽イオン交換部分、逆相部分、金属アフィニティ補足部分および混合モード吸着体を含む表面を指す。

【0077】

「生体分子アフィニティ面」は、特異的結合が可能な生体分子を有する吸着体を含む表面を指す。

【0078】

「特異的結合」は、異質（均質でない）試料に同時に存在する2つの分子種が試料中の他の分子種と結合するよりも優先的に互いに結合する能力を指す。通常、特異的な結合相互作用は、少なくとも2倍、より通常は、 $10 \sim 100$ 倍を超える反応における偶発の結合相互作用とは区別される。分析物を検出するために用いられると、特異的結合は、異質（均質でない）試料における分析物の存在を決定する際に十分に識別力がある。通常、特異的結合反応の親和性またはアビディティは、少なくとも約 10^{-7} M であり、より大きな特異性を有する特異的結合反応は、通常、少なくとも 10^{-8} M ～ 少なくとも約 10^{-9} M の親和性またはアビディティを有する。

10

【0079】

「エネルギー吸収分子」および同等の頭字語「EAM」は、プローブに付着すると、レーザ脱離イオン化源からエネルギーを吸着し、その後、接触した分析物の脱離およびイオン化に貢献することが可能な分子を指す。この用語は、米国特許第5,719,060号、第5,894,063号、第6,020,208号および第6,027,942号においてそのように呼ばれるすべての分子を含む。これらの特許の開示は、その全体を参考により本明細書中に援用する。この用語は、明らかに、桂皮酸誘導体、シナピン酸誘導体（「SPA」）、シアノヒドロキシ桂皮酸（「CHCA」）およびジヒドロキシ安息香酸を含む。

20

【0080】

「タンデム質量分析計」は、イオン混合物中のイオンの2つの連続した段階 m/z に基づいた識別を行うことが可能な任意の気相イオン分析計を指す。この用語は、2つの質量分析計、および質量分析の前にイオンを選択的に獲得または保持することが可能な単一の質量分析計を有する分析計を含む。このように、この用語は、明らかに、QQTOF質量分析計、イオントラップ質量分析計、イオントラップ-TOF質量分析計、TOF-TOF質量分析計、およびフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計を含む。

30

【0081】

「溶離剤」は、吸着面の吸着体への分析物の吸着に影響を与えるかまたは変更するために用いられる薬剤（通常は、液体）を指す。溶離剤はまた、本明細書では、「選択性閾値変更剤」とも呼ばれる。

【0082】

「溶離特性」は、吸着面の吸着体への分析物の吸着に影響を与えるかまたは変更する能力に貢献する溶離剤の物理的または化学的特性を指す。2つの溶離剤は、分析物および吸着体と接触して配置されると、吸着体に対する分析物の親和性の程度が異なる場合、異なる溶離特性を有する。溶離特性には、例えば、pH、イオン強度、カオトロピズム（chaotropism）の程度、洗剤強度および温度が含まれる。

40

【0083】

「生物学試料」および「生物学的試料」は、複製が可能な生物体の少なくとも一部から得られる試料を同等に指す。本明細書で用いられるように、生物学試料は、ウイルス、原核生物、単細胞真核生物、および多細胞真核生物を含む既知の分類界の任意のものから得ることができる。生物学試料は、その培養部分由来のものを含む、生物体全体またはその一部から得ることができる。生物学試料は、ホモジェネート、細胞成分分画、溶解物および液体を含む、本コンテキストに適切な任意の物理的形態であり得る。

【0084】

「生体分子」は、生物学試料において見出すことができるが、必ずしも生物学試料由来である必要ではない分子を指す。

50

【 0 0 8 5 】

「有機生体分子」は、ステロイド、アミノ酸、ヌクレオチド、糖質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、複合炭水化物、および脂質などの生物学試料において見出すことができるが、必ずしも生物学試料由来である必要はない有機分子を指す。

【 0 0 8 6 】

「小さな有機分子」は、医薬品において一般に用いられる有機分子に匹敵するサイズの有機分子を指す。この用語には、有機生体高分子（例えば、タンパク質、核酸等）は含まれない。本明細書で用いられる小さな有機分子は、通常、最大約 5 0 0 0 D a、最大約 2 5 0 0 D a、最大約 2 0 0 0 D a、または最大約 1 0 0 0 D a のサイズ範囲である。

【 0 0 8 7 】

「生体高分子」は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、多糖類、およびポリグリセリド（例えば、ジグリセリドまたはトリグリセリド）などの生物学試料において見出すことができるが、必ずしも生物学試料由来である必要はないポリマーを指す。

【 0 0 8 8 】

「フラグメント」は、分析物の化学的、酵素的または物理的分解による産物を指す。フラグメントは、中性またはイオン性状態であり得る。

【 0 0 8 9 】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、本明細書では、アミノ酸モノマー（残基）を含む天然に存在するかまたは合成のポリマーを指すために同義で用いられる。ここで、アミノ酸モノマーは、天然に存在するアミノ酸、天然に存在するアミノ酸構造変異体、およびペプチド結合に関与することが可能な合成の人工類縁体を含む。ポリペプチドは、例えば、炭水化物残基を添加して糖タンパク質を形成することによって改変され得る。用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、糖タンパク質および非糖タンパク質を含む。

【 0 0 9 0 】

「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、ヌクレオチドモノマー（塩基）を含む天然に存在するかまたは合成のポリマーを同等に指す。ポリヌクレオチドは、デオキシリボ核酸（「DNA」）およびリボ核酸（「RNA」）などの天然に存在する核酸、および核酸類縁体を含む。核酸類縁体には、人工の塩基を含む類縁体、およびヌクレオチドモノマーが天然に存在するホスホジエステル結合以外の方法で連結されている類縁体が含まれる。ヌクレオチド類縁体には、例えば、限定はされないが、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロトリエステル、ホスホルアミダート、ボラノホスフェート、メチルホスホネート、キラル - メチルホスホネート、2 - O - メチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸（PNA）等を含む。

【 0 0 9 1 】

本明細書で用いられる「分子結合パートナー」（同等に、「特異的結合パートナー」）は、特異的結合を示す分子対、通常は生体分子の対を指す。限定はされないが、例として、受容体およびリガンド、抗体および抗原、ビオチンおよびアビジン、ならびにビオチンおよびストレプトアビジンが挙げられる。

【 0 0 9 2 】

「受容体」は、通常、生物学試料において見出すことができるが、必ずしも生物学試料由来である必要ではない、リガンドとの特異的な結合に関与し得る分子、通常は巨大分子を指す。この用語はさらに、特異的リガンド結合が依然として可能なフラグメントおよび誘導体を含む。

【 0 0 9 3 】

「リガンド」は、指定された受容体または抗体との特異的な結合に関与することができる任意の化合物を指す。

【 0 0 9 4 】

「抗体」は、リガンドとの特異的な結合に関与することが可能な、少なくとも 1 つの免疫グロブリン遺伝子または少なくとも 1 つの免疫グロブリン遺伝子のフラグメントによって

10

20

30

40

50

実質的にコードされたポリペプチドを指す。この用語は、天然に存在する形態、ならびにフラグメントおよび誘導体を含む。本明細書で用いられる用語の範囲内のフラグメントには、標的分子に対する特異的な結合が依然として可能なフラグメントであれば、F a b、F a b' および F (a b) ' 2 フラグメントなどの様々なペプチダーゼによる消化によって生成されるフラグメント、化学的解離、化学的切断、および組換えによって生成されるフラグメントを含む。例えば、ファージディスプレイによって生成されるような、通常の組換えフラグメントは、一本鎖 F a b および s c F v (「一本鎖可変領域」) フラグメントを含む。この用語の範囲内の誘導体は、種間キメラ抗体およびヒト化抗体を含む、連続して改変されているが、標的分子に特異的に結合することが依然として可能な抗体(またはそのフラグメント)を含む。本明細書で用いられるように、抗体は、天然 B リンパ球、

10

【0095】

「抗原」は、抗体によって結合され得るリガンドを指す。抗原は、免疫原性である必要はない。抗体と接触する抗原の部分は、「エピトープ」と名付けられる。

【0096】

「フルエンス」は、照会された画像の単位領域あたりに送達されるエネルギーを指す。

【0097】

II. アフィニティ捕捉プローブタンデム質量分析計

第1の態様において、本発明は、アフィニティ捕捉レーザ脱離イオン化試料導入の利点と、高精度、高質量解像度のタンデム質量分析計の利点とを組み合わせる分析機器を提供する。この組み合わせにより、既知の技術を行うための現存するデバイスに対して優れた利点が提供される。さらに、新規の機器によって、タンパク質発見の新規の方法が可能になり、現存するアプローチよりもさらに迅速、さらに効率的、かつさらに感度のよい、特異的結合パートナー同士および特異的結合パートナー間での分子相互作用を同定および特性決定する新規の方法が可能になる。まず、機器について全体的に簡単に説明する。その後、アフィニティ捕捉プローブインターフェースの特性についてさらに詳細に説明する。

20

【0098】

簡単に、図1を参照する。機器100は、レーザ脱離/イオン化源13、アフィニティ捕捉プローブインターフェース10、およびタンデム質量分析計14を有する。図1は、レーザ源12がパルス窒素レーザであり、タンデム質量分析計14が直交四重極飛行時間質量分析計(QqTOF)タンデムMSである好ましい実施形態を示す。

30

【0099】

レーザ脱離/イオン化源

レーザ脱離/イオン化源13は、アフィニティ捕捉プローブ16に付着したタンパク質および他の分析物を脱離およびイオン化する、適切に条件付けされ方向付けられた、エネルギー光子を生成する。レーザ脱離/イオン化源13は、レーザ源12、レーザ光学列11、およびオブションとして、プローブ観察光学部品18を含む。

【0100】

レーザ脱離/イオン化源13は、パルスレーザ12を用いるか、または連続レーザ12からのビームを機械的もしくは電子的に切断することによって、パルスレーザエネルギーを生成する。通常、パルスレーザが好ましい。好ましいパルスレーザ源には、窒素レーザ、Nd:YAGレーザ、エルビウム:YAGレーザおよびCO₂レーザが含まれる。簡単なフットプリントおよび比較的低いコストのため、パルス窒素レーザが現在好ましい。

40

【0101】

レーザ12から発せられる光子は、レーザ光学列11によって、プローブ16の面に入射するように方向づけられる。光学列11は、脱離エネルギーの集束スポットの形態の適切な脱離フルエンスが、プローブ16に送達されるように、各レーザパルスの強度を収集、方向づけ、集束、細分、および制御するように機能するレンズ、ミラー、プリズム、減衰器、および/またはビームスプリッタで構成され得る。

50

【0102】

あるいは、光学列11は、各レーザパルスのエネルギーを収集、方向づけ、および細分するように機能する光ファイバレイで構成され得る。

【0103】

本実施形態では、レーザ12の出力は、光カプラを用いて光ファイバの入力側に結合される。カプラは、通常、焦点距離および直径がファイバの入力開口数に対して適切であるレンズを含む。

【0104】

ファイバに入射するエネルギーの量は、ファイバに対するレンズ位置の慎重な調整によって制御され得る。この場合、光ファイバカプラは、光学減衰器として二倍になり得る。他の好ましい実施形態では、レーザの全出力エネルギーは、ファイバに結合され、減衰器は、光ファイバの出力側と、光学列の脱離スポット集束素子との間に配置される。さらに他の好ましい実施形態では、光学減衰器は、レーザと光ファイバカプラとの間に配置される。すべての場合において、光学減衰は、レーザ12の出力エネルギーとは独立して、プローブ16の面に適切なレーザフルエンスを送達することを確実にするために用いられる。通常のレーザフルエンスは、1平方ミリメートル当たり約20~1000μジュールである。

10

【0105】

光ファイバ成分はレーザから集束されたエネルギーを受け取るときに損傷されることが多いことが確認されているため、ファイバの入力側の受け入れ面積を最大にし、入射レーザエネルギーのフルエンスが、ファイバの損傷閾値未満となるようにすることが有利である。後者によって、レーザおよび光ファイバに対して光カプラの相対的な位置を調整すると、光ファイバに対するレーザビームの位置合わせも単純化する。しかし、プローブ16において妥当な脱離フルエンスレベルを得るためには、約200μJ/レーザパルスの最大エネルギーを送達する通常の窒素レーザと共に用いられる場合、最大の出力側ファイバの直径は400μm(ミクロン)を越えてはならない。この問題の解決法は、入力側の直径が約400~1200ミクロンであり、出力側の直径が200~400ミクロンであるテーバー状の光ファイバを組み込むことである。

20

【0106】

通常、脱離スポットは、脱離およびイオン化を誘導するのに十分なフルエンスを維持すると共に、プローブ16の最大の面積に照会することによって、各パルスに対するイオンの生成を最大するサイズに集束されるべきである。直交四重極飛行時間タンデム質量分析計に結合したレーザ脱離/イオン化源における約200μJ/パルスの最大エネルギーを送達する通常の窒素レーザを用いながら、最適なレーザスポットエリアは、0.4平方ミリメートルと0.2平方ミリメートルとの間の範囲に決定された。

30

【0107】

レーザ脱離/イオン化源13は、通常は光学列11の主要な部分として、プローブ観察光学部品18を含み得る。観察光学部品18は、脱離部位(すなわち、レーザによって照会されるプローブ16の領域)の照射および観察を可能にする照射源、レンズ、ミラー、プリズム、二色性ミラー、バンドパスフィルタ、およびCCDカメラを含み得る。

40

【0108】

レーザ光学列11が光ファイバを含む場合、観察光学部品18は、光ファイバ自体からの光を利用することができる。

【0109】

例えば、光ファイバカプラは、二又分岐され、少量のレーザ励起エネルギーを分離し、適用されたレーザエネルギーをモニタリングするための手段として用いるようにするか、または二又分岐され、可視光を導入し、脱離部位を照射し得る。

【0110】

上記の2つの実施形態の第1の実施形態では、励起エネルギーのほんの一部は、プローブ16に送達されるレーザエネルギーの実際の量を反射するように較正されたレーザエネル

50

ギー回路の主要構成要素である光検出器に衝突するように方向づけられる。第2の実施形態では、可視光は、CCDカメラに結合された別個のセットの光光学部品を通して、または光ファイバの主要な分岐点で反射された光をCCDカメラに方向づける、光ファイバとレーザ励起源との間の、プリズムまたは二色性ミラーを用いることによって、脱離部位を照射し、この領域の観察を可能にするように方向づけられる。あるいは、プリズムまたは二色性ミラーは、光ファイバの照射ファイバ分岐点と、照射源との間に直線上に配置され、この分岐点に結合されるすべての反射像が、CCDカメラに衝突するように方向付けられる。さらに他の実施形態では、ファイバは、1つの分岐が脱離ノイオン化レーザパルスを送達し、第2の分岐が脱離部位を照射するための可視光を送達し、第3の分岐が脱離部位からの反射光をCCDカメラに送信するように三又分岐され得る。これらの観察方式のそれぞれに対して、適切なバンドパスフィルタは、プローブ表面上の入射レーザパルスの直接的な反射として起こる、または入射レーザパルスによる電子励起の直接的な結果としてプローブ表面から発せられる二次的な光子である、高エネルギー光子を損傷する可能性のある送信を防止するために、CCDカメラと観察光学列との間で展開されるべきである。

10

20

30

40

50

【0111】

プローブインターフェース

アフィニティ捕捉プローブインターフェース10は、アフィニティ捕捉プローブ16と可逆的に係合し、プローブ16を、レーザ源12と照会可能な関係にすると同時に、タンデム質量分析計14と通信するように配置することが可能である。この通信は、大気圧または準大気圧を支持する。

【0112】

プローブインターフェース10は、プローブホルダー、プローブ導入ポート、プローブ位置アクチュエータアセンブリ、真空および空気アセンブリ、およびインターフェースイオン収集システムを含む。

【0113】

プローブホルダーは、プローブ16の形状因子と一致するように形成されたプローブインターフェース10の構成要素である。プローブ16はProteinChip(登録商標) Array(Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, CA, USA)である場合、プローブホルダーは、ProteinChip(登録商標) Arrayの形状因子と一致する。

【0114】

プローブホルダーは、単一のプローブ16または複数のプローブ16を保持し得る。ホルダーは、レーザ脱離ノイオン化源13によって照会されるような適切な配向で、かつインターフェースイオン収集システムに対して、各プローブ16を配置する。

【0115】

プローブホルダーは、位置アクチュエータアセンブリと密接に接触する。

【0116】

アクチュエータアセンブリは、プローブの異なる領域が照会され、このような照射から生じるイオンが、収集されてタンデム質量分析計14に導入されるように、レーザ脱離ノイオン化源13およびインターフェースイオン収集システムに対して、プローブ16の相対的な位置を移動させる。

【0117】

アクチュエータは、レーザ脱離ノイオン化源およびイオン収集システムに対するプローブの位置を一定に維持しながら、プローブ16の並進運動および/または回転運動を支持する電子機械デバイスからなる。このような電子機械デバイスは、限定されないが、機械的または光学位置センサ、ソレノイド、ステッパーマーター、線形モーションアクチュエータと直接もしくは間接的に通信するDCもしくはAC同期モーター、線形もしくは円形モーションガイドレール、ジンバル、ベアリング、またはアクスルを含む。

【0118】

プローブ導入ポートによって、装填されたプローブ 16 を有するプローブホルダーは、過度のレベルの大気ガスをプローブインターフェース 10 およびタンデム質量分析計 14 に導入することなく、プローブ位置アクチュエータアセンブリに配置される。

【0119】

後者を成し遂げるために、プローブ導入ポートは、真空排出システム（プローブ導入ポート排出システム）を用いて、大気ガスをポンプで排出し、チップを作業位置に移動させる前に、目的のポート圧力を成し遂げる。プローブを交換している間、プローブアクチュエータアセンブリは、プローブを作業位置（レーザ脱離源 13 およびイオン収集システムと配列された位置）から交換位置に移動させる。その間に、アクチュエータは、間もなく大気圧まで引き上げられる交換ポートと、質量分析計の入口との間にシールを提供し得る。質量分析計の入口にシールをした後、大気ガスは、プローブ導入ポート加圧システムによってプローブ導入ポートに導入される。これにより、プローブホルダーの大気面と導入ポートとの間の圧力差が除去され、プローブホルダーは、プローブ位置アクチュエータアセンブリから除去される。

10

【0120】

前に分析されたプローブ 16 を除去し、新しいプローブ 16 を設置した後、プローブホルダーは、その位置アクチュエータに置き換えられ、試料装填プロセスが開始する。上記のように、プローブ導入ポートは、排出システムによって準大気圧までポンプで引き下げられ得る。目的の試料導入圧力を成し遂げると、プローブアクチュエータシステムは、プローブ 16 を交換位置から作業位置に移動させ、その間に、質量分析計入口へのシールを開く。

20

【0121】

あるいは、イオンが大気圧に保持された脱離チャンバにおいて生成され、最終的には、質量分析計入口にイオンを導入するイオン光学アセンブリに向けられる場合、プローブ導入ポートは大気圧に維持されるため、これを排出し、加圧する必要はない。

【0122】

プローブ導入ポート排出システムは、真空ポンプ、圧力センサ、真空適合性管および接続取付け具、ならびに真空適合性バルブからなる。真空適合性弁は、同時に作用すると、プローブ 16 が作業位置に移動され得るように、試料交換に続いて導入ポート内に含まれる大気ガスの制御された排出を可能にする。真空ポンプは、限定はされないが、一段もしくは多段オイル機械ポンプ、スクロールポンプ、または無潤滑式薄膜ポンプであり得る。好ましい実施形態では、真空適合性弁は、電氣的に制御されるソレノイドバルブである。同じ実施形態では、圧力センサは、大気圧～1ミリの範囲の圧力領域で動作することが可能な電子センサである。このような圧力センサとしては、限定はされないが、熱電対真空計およびピラニ真空計が挙げられる。同じ実施形態では、このシステムの一斉動作は、アナログ論理回路またはデジタルマイクロプロセッサによって提供される論理制御下で成し遂げられる。アナログ論理回路またはデジタルマイクロプロセッサは、圧力真空計および位置センサからの入力を一致させ、機器全体の動作の一部としての試料ポートの自動的な排出を可能にする。

30

【0123】

プローブ導入ポート加圧システムは、ガス供給源、圧力センサ、ガス導管および取付け具、およびガス適合性バルブからなる。ガス適合性バルブは、同時に作用すると、交換ポートを加圧し、それによって、プローブホルダーをアクチュエータアセンブリから除去するガスの制御された導入を可能にする。

40

【0124】

1つの実施形態では、ガス供給源は、未処理の大気ガスである。他の実施形態では、ガス供給源は、加圧システムへの導入の前に、第1に、水分吸収剤トラップを通して、オプションとして、第2に、微粒子フィルターを通して方向づけられる大気ガスである。他の実施形態では、加圧ガスは、大気ガスを用いる代わりに、窒素などの乾燥不活性ガスまたは任意の費用効果的な希ガスの精製された供給源によって供給される。

50

【0125】

好ましい実施形態では、加圧システムのガス導管、取付け具、いくつかのバルブおよび圧力センサは、排出システムで用いられるものである。同じ実施形態では、このシステムの一斉動作は、アナログ論理回路またはデジタルマイクロプロセッサによって提供される論理制御下で成し遂げられる。アナログ論理回路またはデジタルマイクロプロセッサは、圧力真空計および位置センサからの入力を用い、機器全体の動作の一部としての試料ポートの自動的な加圧を可能にする。

【0126】

ブローインターフェース圧力調節システムは、ブロー16の試料提示（吸着）面とイオン収集システムとの間に存在する脱離チャンバにおいて、選択的なバックグラウンドガス圧力を提供するように機能する。受容可能な脱離チャンバ圧力は、大気圧～0.1マイクロトルの範囲に及ぶ。好ましい圧力範囲は、1トル～1ミリトルの範囲に及ぶ。ブローインターフェース圧力調節システムは、ガス供給源、ガス導管および取付け具、ガスフロー調節器、および圧力センサからなる。ガス供給源は、未処理大気ガスである。他の実施形態では、ガス供給源は、調節システムに導入される前に、第1に、水分吸収剤トラップを通して、オプションとして、第2に、微粒子フィルターを通して方向付けられる大気ガスである。他の実施形態では、調節ガスは、窒素などの乾燥不活性ガスまたは任意の費用効果的な希ガスの精製された供給源によって供給される。ガスフロー調節器は、手動で制御されるフローリストラクターであり得る。あるいは、ガスフロー調節は、電子的に制御されるフローリストラクターを用いて成し遂げられ得る。好ましい実施形態では、好ましい脱離チャンバ圧力の閉ループ制御は、アナログ論理回路またはデジタルマイクロプロセッサによって提供される論理制御下で自動的に成し遂げられる。アナログ論理回路またはデジタルマイクロプロセッサは、自動化されたガスフロー調節器と積極的に相互作用し、圧力真空計からの予め確立された読取りを成し遂げる。

10

20

【0127】

インターフェースイオン収集システムは、静電イオン収集アセンブリ、オプションの空気イオン収集アセンブリ、および静電またはRFイオンガイドからなる。静電イオン収集アセンブリは、脱離チャンバ内に脱離されたイオンを収集し、それらを質量分析計の入口に方向づけるように機能するDC静電レンズ素子の配置からなる。

【0128】

1つの実施形態では、このアセンブリは、2つの静電素子からなる。第1の素子は、ブローホルダーおよびブロー表面を含み、第2の素子は、エキストラクターレンズである。エキストラクターレンズは、アレイの表面から0.2～4mmの間離して配置されている。エキストラクターレンズは、直径2mm～20mmの範囲のアーチャを有し、このアーチャは、脱離部位の中心から質量分析計入口の中心まで延在する垂直軸の周囲に同心円上に設けられている。独立したDC電位は、このアセンブリの各素子に与えられる。

30

【0129】

好ましい実施形態では、エキストラクターレンズは、直径10mmのアーチャを有し、アレイ表面から1mm離して設けられている。同じ好ましい実施形態では、エキストラクターとアレイとの間には、10ボルトの電位差が確立される。

40

【0130】

空気イオン収集アセンブリは、ガスの所定のフローが形成され、脱離チャンバ内に脱離されたイオンの質量分析計入口への大量の転送を助けるように、ガス供給源、導管、管コネクタ、ガスフロー調節器、ガス圧力センサ、およびガス放出ポートからなる。

【0131】

ガス供給源は、未処理の大気ガスである。他の実施形態では、ガス供給源は、システムに導入される前に、第1に、水分吸収剤トラップを通して、オプションとして、第2に、微粒子フィルターを通して方向づけられる大気ガスである。他の実施形態では、イオン収集ガスは、窒素などの乾燥不活性ガスまたは任意の費用効果的な希ガスの精製された供給源によって供給される。

50

【0132】

ガスフロー調節器は、手動で制御されるフローリストラクターであり得る。あるいは、ガスフロー調節は、電子的に制御されるフローリストラクターを用いて成し遂げられ得る。圧力センサは、限定はされないが、熱電対真空計およびピラニ真空計であり得る。ガス放出ポートは、プローブ16の背後に設けられ、大量のガスフローを、プローブの周囲に、および脱離部位と質量分析計の入口との間に中央に設けられた垂直軸の下方に誘導する。

【0133】

好ましい実施形態では、ガスのフローは、イオンを一掃する十分なフローが脱離チャンバを過剰に加圧せずに生成されるように、類縁体またはデジタル制御回路を用いて自動閉ループ制御下にある。

10

【0134】

インターフェースイオン収集システムの最終構成要素はイオンガイドである。イオンガイドは、収集されたイオンを質量分析計14に転送するように機能する。これは、静電またはRFの種類であり得る。好ましい実施形態は、多極RFイオンガイドである。後者の例としては、四重極または六重極イオンガイドである。以下にさらに詳細に記載する好ましいQq-TOF機器では、イオンガイドは、四重極RFイオンガイドである。イオンは、静電および空気イオン収集システムによってそれぞれ形成される静電および空気加速力によってイオンガイドに方向づけられる。好ましい実施形態では、イオンガイドのDC静電電位は、エキストラクターレンズのDC静電電位よりも通常10~20ボルト低い。

【0135】

20

タンデム質量分析計

本発明の分析機器は、タンデム質量分析計14をさらに有する。タンデム質量分析計14は、直交四重極飛行時間(Qq-TOF)、イオントラップ(IT)、イオントラップ飛行時間(IT-TOF)、飛行時間飛行時間(TOF-TOF)、およびイオンサイクロトロン共鳴(ICR)種を含む群から有効に選択され得る。

【0136】

現在好ましいのは、以下に詳細に記載する直交Qq-TOF MSである。

【0137】

QqTOF MSの主な長所は、優れた質量精度および解像力、ペプチドにおける向上した感度および低いmw範囲、ならびに低エネルギー衝突誘導解離(CID)を用いることによる優れたms/ms性能である。エレクトロスプレーイオン化源を有する直交QqTOFは、AB/MDS Sciex (QSTAR (登録商標); AB/MDS - Sciex, Foster City, California, USA) から入手可能である。

30

【0138】

図2を参照しながら、QqTOFの原理および特徴を簡単に概説する。

【0139】

イオンは、第1の四重極レンズ「q0」の前に脱離チャンバ内で形成される。q0内の圧力は、通常、約0.01~1トルに維持されるが、大気圧にも維持され得る。このように、脱離されたイオンは、形成された直後にバックグラウンドガスとの衝突によって迅速に冷却される。

40

【0140】

このイオン集団の冷却または減衰によって、3つの主な利点を提供される。

【0141】

第1に、冷却によって、脱離されたイオンの初期のエネルギー分布は除去され、その総エネルギーは熱エネルギーに近似する点まで減少する。これによって、直交抽出要件は単純化し、イオン位置およびエネルギーの変化が補償され、最終的な解像力は向上する。この向上した解像度の直接的な結果は、低いppmレベルまで引き下げられ高められた質量精度である。

【0142】

50

衝突冷却の第2の主な利点は、長期のイオン分解率を減少させる能力である。ガス衝突は、内部励起を緩和し、ペプチドおよびタンパク質イオンの安定性を向上させる。この安定化効果は、イオンが約1トルの圧力のバックグラウンドガスの存在下で形成されるとき、最大になると考えられる。他によって公開されている測定では、小グループの損失およびバックグラウンドフラグメント化は、実質的に除去され、高い m/z タンパク質および他の不安定な生体高分子（すなわち、複合糖質、DNA等）の送信が向上することを示している。より速い分解メカニズム（迅速かつインソース型分解）が依然として起こる。

【0143】

q0衝突冷却の最終的な利点は、質量分析計へのイオンの疑似連続フローの形成である。q0におけるイオン衝突によって、脱離雲は、q0の軸に沿って広がる。この広がりによって、様々な脱離事象からのイオンが重なり始め、分析計へのイオンのエレクトロスプレ

10

【0144】

q0を通過した後、イオンは、第2の四重極22（「Q1」）に入る。この四重極は、イオンガイドまたは質量フィルタとして機能する。ここで、 m/z または単一イオンモニタリング（SIM）実験に対してイオン選択が行われる。

【0145】

Q1を出た後、イオンは、衝突セル26内に配置された第3の四重極24（「q2」）に入る。簡単な実験の間、q2は、簡単なrfイオンガイドとして動作する。 m/z 実験に対して、q2は、約 10^{-2} トルの圧力において衝突ガスで満たされ、低エネルギーCIDを促進する。

20

【0146】

q2を出た後、イオンは、q2の出口と、集束グリッド28との間に適用されるDC電位差によってわずかに加速される。この加速は、イオンの速度をY軸方向に「偏向」し、その速度は、 m/z の平方根に逆比例する。これは、異なる m/z のすべてのイオンが、直交抽出および自由飛行の後、検出器に衝突する場合に成し遂げられなければならない。このような偏向が成し遂げられない場合、異なる m/z のイオンは、同じY軸速度で直交抽出領域に入る。

【0147】

飛行時間におけるように、より低い m/z のイオンは、より大きな m/z のイオンの前に検出器に衝突する。Y軸における絶対置換度は、Z軸におけるイオンの飛行時間とイオンのY軸速度との積である。検出器が中間体の m/z イオンに対して最適化されたロケーションに配置される場合、より軽いイオンは、図2における検出器の右側に到達する検出器を「アンダーシュート」する。逆に、より大きな m/z のイオンは、検出器を「オーバーシュート」し、図2における検出器の左側に到達する。この結果、すべてのイオンが共通の検出点に衝突する場合には、すべてのイオンは、Z軸速度とY軸速度との一定の比を維持する必要がある。上記のグリッド偏向方法はこれを成し遂げる。

30

【0148】

集束グリッド28を通過した後、イオンは、直交抽出素子の変調器領域30に到達する。変調器30は、1秒当たり10,000パルス（10kHz）に近いレートでパルスされる。イオンは、イオン光学部品の加速器コラム32に押され、直交飛行時間（O-TOF）の自由飛行領域34に出る。エネルギー補正は、イオンがイオンミラー36に入ると成し遂げられる。ミラーでは、イオンは、方向転換し、迅速に応答するシェブロンアレイマイクロチャネルプレート検出器38に衝突する。

40

【0149】

この原型の配置に対する代替を用いることもできる。

【0150】

例えば、上記で提示した構造では、高い加速エネルギーでは、O-TOFを行うことは困難である。ペプチドおよびタンパク質に対するイオン検出感度は、イオンエネルギー全体が増加するにつれて向上することは十分に確立されている。人間のインシュリン（MW =

50

5807.65 Da)では、検出効率は、通常のマイクロチャネルプレート検出器を用いる場合、35 keVのイオンエネルギーで100%に近づく。イオンが20または30 keVのエネルギーに加速される場合、自由飛行管ライナー40および他の対応する構成要素は、それぞれ、-20 kVまたは-30 kVに変動されなければならない。このような電位で簡単なイオン光学素子上に安定した絶縁を提供することが困難であることは既知である。このような電位で複数の素子を安全かつ信頼性をもって変動させることは困難である。1つの解決法は、後段加速技術である。

【0151】

上記のデバイスとは異なって、このような代替のデバイスは、検出器後段加速器（図示せず）を用いる。イオンは、直交抽出素子を離れた後、約4 keVのエネルギーに加速され、自由飛行領域は、-4 kVで変動される。イオンが後段加速器検出器アセンブリに入ると、さらなる加速が成し遂げられる。このアセンブリでは、イオンは、ライナー電位に保持されるフィールド保持グリッドを通過する。次に、イオンは、フィールド保持グリッドと、検出器の一次イオン変換面との間に確立されるフィールド内でさらなる加速を受ける。このような加速フィールドは、4~10 mmの距離にわたって、約10~20 kVである。

10

【0152】

直交設計は、イオン形成から飛行時間測定を切り離すため、多数の利点の実現される。

【0153】

イオンシールディングおよびイオン加速フィールド崩壊によるピークの広がりなどの、レーザフルエンスに関連する問題は解決される。なぜなら、脱離ブルームのイオンは、TOF質量分析計に直交抽出および加速される前に、拡張および冷却される期間が長い（通常、数ミリ秒）。さらに、直交抽出は、EAMの過剰な中性負荷によって形成される化学的ノイズによる従来の抽出スペクトルである、高レーザエネルギーの開始時に見られる大きな隆起およびベースライン異常の大半が除去される。中性子は、変調器領域においては抽出されないため、イオンのみが検出器に送信され、化学的ノイズはかなり低減される。

20

【0154】

これらの要因によって、平行して連続なまたは遅延したイオン抽出アプローチにおいて通常用いられるものよりも2~3倍大きなレーザフルエンスの使用が可能になる。最終的な結果は、向上した外部標準質量精度の決定（通常のエラーは20~50 ppmの間である）、向上した量的な再生、および向上したシグナル対ノイズだけでなく、良好でない試料-EAM均質性の存在下でも「スイートスポット(sweet spots)」を追跡かつ探求する必要性がほぼ完全に除去されることである。さらなる利益は、広いm/z範囲のイオンを分析するために低いおよび高いレーザエネルギー走査を行う必要性がないことである。単一のレーザフルエンスは、現在、低いおよび高いmwイオンを共に見るために用いられ、未知の混合物の分析を著しく簡略化している。

30

【0155】

恐らく、従来の平行抽出アプローチと比較した場合のこのデバイスの最も印象的な利点の1つは、迅速に試料を配置する必要がないことである。TOF測定はイオン形成プロセスから実質的に除去されるため、イオンの元の位置はもはや重要ではない。さらに、イオン形成は、高電圧抽出フィールドを同時に適用することなく高圧環境で成し遂げられるため、固体試料入口システムの設計要件は非常に緩和される。優れた外部標準質量精度の性能を維持しながら、二次元試料マニピュレータを用いて、簡単なアプローチがとられる。さらに、試料の提示面は、金属または他の導電媒体で形成される必要はない。

40

【0156】

要するに、レーザ脱離イオン化(LDI)QQ-TOF MSは、現存するLDI-TOF MS技術に対して以下の利点を有する：(1)外部標準質量精度（通常、20~50 ppm）の増加；(2)解像度の向上；(3)ms/ms効率の改良；(4)高および低エネルギー走査に対する必要性を除去する単一の高レーザエネルギーレベルを用いたシグナル生成が容易になったこと；(5)TDC技術および最小脱離閾値よりも2~4倍のレ

50

ーザフルエンスを用いた量的能力の向上；（６）二次元試料アクチュエータの要件の低減；（７）プローブ表面を提示する試料様のプラスチック構成要素（例えば、射出成形された二次元プローブアレイ）を用いるための電位；（８）単一のイオンモニタリングを用いた化学的ノイズの低下、およびEAM化学ノイズドメインにおけるイオンに対する測定能力の向上。

【0157】

レーザ脱離イオン化（LDI）Qq-TOF MSは、タンパク質特性決定および同定において、現存するMALDI-PSDアプローチに対して以下の利点を有する。

【0158】

LDI-QqTOFは、より高い質量解像力および質量精度を提供する。データベース調査アプローチでは、この向上した能力により、偽陽性データベースヒットの数が低減され、同定が単純化する。さらに、QqTOFはまた、PSD MS/MSで得ることができる感度よりも一桁より大きなものを提供する。

10

【0159】

本発明の分析機器は、シングルMS分析に対して、印象的なMS/MS能力および20 ppm未満の質量割当てエラーを示す。後者は、単一のアフィニティ捕捉プローブの表面に同時に保持される多数のタンパク質の同定を可能にする。

【0160】

他の構成要素

アフィニティ捕捉プローブタンデムMS機器100は、通常、タンデム質量分析計検出器とインターフェースされるデジタルコンピュータをさらに含む。デジタルコンピュータは、通常、レーザ脱離源12とさらにインターフェースされ、これにより、上記コンピュータは、イオン生成を制御し、データの取得および分析に参与することができる。

20

【0161】

分析ソフトウェアは、コンピュータに対してローカルかまたはリモートであり得るが、コンピュータに通信アクセス可能なものが可能である。例えば、コンピュータは、ワールドワイドウェブ上で使用可能な、Protein Prospector、PROWL、またはMasco Search Engineのような分析パッケージの使用を可能とするインターネットとの接続を有する。分析ソフトウェアは、LANまたはWANサーバ上に、リモートに存在していてもよい。

30

【0162】

アフィニティ捕捉プローブ

本明細書中以下の項で詳細に記載されるように、分析を行うため、吸着された分析物を有する少なくとも1つのアフィニティ捕捉プローブ16は、レーザ脱離/イオン化源13が照会し、かつ脱離イオンをタンデム質量分析計14に送達する位置で、プローブインタフェース10に係合される。

【0163】

プローブ16は、典型的に、1つまたは複数の吸着面18を有し、この面は、互いに異なっていてよい（18a、18b、18c、18d）。通常、複数の吸着面18が存在する場合には、すべては、プローブ16の共通面上に露出される。

40

【0164】

吸着面18は、通常、クロマトグラフ吸着面かまたは生体分子アフィニティ面のいずれかである。

【0165】

クロマトグラフアフィニティ面は、吸着体のクロマトグラフ識別または分析物の分離が可能な吸着体を有する。したがって、かかる表面は、陰イオン交換部分、陽イオン交換部分、逆相部分、金属アフィニティ捕捉部分、および混合モードの吸収体を含むことができ、かかる用語はクロマトグラフの技術分野で理解される。生体分子アフィニティ表面は、特異的結合が可能な生体分子を含む吸着体を有する。したがって、かかる表面は、抗体、受容体、核酸、レクチン、酵素、ピオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ブドウ球菌ブ

50

ロテイン A およびブドウ球菌プロテイン G を含むことができる。吸着面は、以下の項にさらに記載されている。

【0166】

インタフェース 10 は、プローブ 16 を、レーザ脱離 / イオン化源 13 に対して照会可能な関係に置いている。通常、レーザがプローブの吸着面 18 に照会することが望ましい。したがって、インタフェース 10 は、プローブ 16 の吸着面 18 を、レーザ脱離 / イオン化源 13 に対して照会可能な関係に置く。吸着面 18 がプローブ 16 の一面上のみに位置されている場合には、プローブ 16 および / またはインタフェース 10 のプローブホルダーは、非対称のサイズに寸法化されていてもよく、それゆえ、吸着面 18 がレーザ脱離源 13 に向かって存在する方向に、プローブ 16 が挿入されることとなる。

10

【0167】

プローブ 16 が複数の吸着面 18 を有する場合には、レーザ源 12 が、各吸着面 18 に個別にアドレスされ得ることが望ましい。これは、レーザ源 12 とインタフェース 10 の間に介在されたレンズにより、レーザ源 12 および / またはインタフェース 10 を可動とすることにより、あるいはそれらの組合せにより、達成可能である。

【0168】

プローブ 16 は、シングル MS 分析に現在用いられているような、アフィニティ捕捉プローブであり得る (例えば、Ciphergen Biosynthesis, Inc., Fremont, CA USA から市販されているもの)。

【0169】

20

III. アフィニティプローブタンデム MS 機器の適用

上述した本発明の分析機器は、以下に順に記載する、(1) タンパク質の発見および同定、および (2) 特異的な結合対の間の相互作用の特性化に意義深い利点を提供し、かつこれらのための新規な方法をもたらす。

【0170】

一般に、上述した分析機器の利点は、アフィニティ捕捉プローブ技術、特に、特異的受容体の結合システムと組み合わされるシングル質量 MS およびタンデム MS モードにおける、高い質量精度の測定が可能を含む。

【0171】

A. タンパク質の発見および同定

30

1. 本発明の方法の利点

タンパク質生物学者が解決しようと試みる、1組の関連した問題は、タンパク質の発見、同定、およびアッセイの開発である。タンパク質の発見は、例えば、診断マーカとして機能し、または重要な細胞機能を行うことから生物学的に興味深い系のタンパク質を見出すプロセスである。タンパク質の同定は、発見されたタンパク質の同一性を決定するプロセスである。アッセイの開発は、タンパク質を検出するための信頼可能なアッセイの開発のプロセスである。本発明の方法は、従来の技術と比較して、これらのプロセスを行う専門家に利点を提供する。

【0172】

本発明の第 1 の利点は、これが、タンパク質の発見からタンパク質の同定、アッセイの開発へのプロセス工程を行うためのシングルプラットフォームを提供することである。SELDI 技術に基づくシングルプラットフォームの提供は、発見およびアッセイの認証の間の時間を有意に短縮する。すなわち、従来の技術を用いて数ヶ月要したものが、今や、数週間または数日で可能である。本発明の方法は、実験を行うのに必要な試料の量を有意に低減させる。従来の方法がマイクロモルの分析物を必要としたのに対し、本発明の方法は、ピコモルの分析物で同じ実験を行うことができる。これにより、試料が乏しいか、またはスケールアップが困難な場合の、有意なハードルを越えることができる。

40

【0173】

以前は、タンパク質の発見および単離は、2Dゲルまたはウェスタンブロットを用いて達成されていた。しかし、差次的に発現されたタンパク質を検出するための、ゲルの互いの

50

比較は、困難な手順である。

【0174】

発見されたタンパク質は、今や、質量分析方法を用いて同定され得る。重要なタンパク質は、単離され、かつプロテアーゼでゲル中で完全にフラグメント化されることが可能であり、そのペプチドフラグメントは、質量分析計および適当なバイオフィンフォマティクス方法により分析可能である。しかし、ゲルは現在の質量分析方法に適合するものではなく、ペプチドフラグメントをゲルから除去しなければならない。後者のプロセスは、不可避免的に試料の減損をもたらし、このアプローチは、多量の開始タンパク質および物質を必要とする。タンパク質が希少であった場合には、重要なタンパク質にその可能性があるように、このことはプロセスの困難さを増大させる。

10

【0175】

いったん同定されると、専門家は、そのタンパク質を検出するための信頼可能なアッセイを開発する必要がある。通常、これはELISAアッセイの開発を含む。この技術は、同様に、抗体の産生を必要とする。これは、特に、所定のタンパク質が免疫化のための量を産生するのが困難である場合に、時間の無駄となる作業となり得る。

【0176】

したがって、従来の技術は、タンパク質の発見、タンパク質の同定およびタンパク質のアッセイを達成するための3つの異なる技術を必要としていた。本発明の方法は、これを1つの技術で達成可能である。

【0177】

20

2. タンパク質の発見、同定およびアッセイの開発

タンパク質の発見、同定およびアッセイの開発のための本発明の方法は、1つまたは複数の所定のタンパク質を発見するためのディファレンスマップを準備することと、上記タンパク質をアフィニティ捕捉プローブタンデムMSにより同定することと、アフィニティ捕捉プローブレザ脱離イオン化クロマトグラフ表面アッセイまたはアフィニティ捕捉プローブレザ脱離イオン化生体特異的表面アッセイを用いて認証することとを含む。

【0178】

上記方法は、以下のように進行可能である。所定のタンパク質を用意し、または、例えば、濃縮水研究 (retentate study) のディファレンスマッピングを用いることにより発見する。これらの方法は、例えば、国際公開第98/59362号 (Hutchens and Yip) に記載されている。簡潔には、いくつかの重要な点で異なる2つの生物学的試料 (例えば、正常と罹患、機能的と非機能的) を、濃縮水クロマトグラフ方法により検査する。この方法は、試料を、複数の異なるクロマトグラフアフィニティおよび洗浄条件に曝し、続いて、アフィニティ捕捉プローブレザ脱離イオン化により「保持されたタンパク質」を検査することを含む。2つの試料の間の差次的に発現されたタンパク質は、さらなる検査のための候補である。これらは質量分析計で検査されているので、これらの候補タンパク質の分子量は既知である。

30

【0179】

通常、上記所定のタンパク質の他に多数のタンパク質がチップ上に保持される。このため、次の任意的な工程は、さらなる分析用に試料を単純化するため、1つまたは複数の所定のタンパク質が保持されるアフィニティおよび洗浄条件を改良することである (これらは、Hutchens and Yipの出願中に同様に記載されている)。単一の所定のタンパク質の捕捉が理想的であるが、約10個以下のタンパク質の捕捉が望ましい。上記改良された方法は、上記所定のタンパク質の改良されたクロマトグラフアッセイを提供する。

40

【0180】

保持されたタンパク質は、次いで、選択したタンパク質分解作用物質を用いるプローブ上でのフラグメント化に供され、これにより、その後の研究対象のためのペプチドのプールが作成される。切断パターンが既知であり、かつデータベースに格納された、タンパク質のコンピュータ内での (in silico) 切断を含むバイオフィンフォマティクス方法

50

に適合していることから、トリプシンのような特異的エンドプロテアーゼによる消化が有利である。得られるペプチドは、次いで、高解像度、高精度のMS-MS（例えば、100万当り20部未満の質量割り当てエラー、およびおよそ10,000の解像力）により分析される。この時点では、特定のペプチドフラグメントが所定のタンパク質の切断産物か、あるいは他の保持されたタンパク質の1つの切断産物かどうかは、明らかでない場合がある。それにもかかわらず、この分析は、ペプチドフラグメントの1つを選択し（可能であればランダムに、可能であれば所定のタンパク質に対応する情報に基づいて）、かつそのペプチドを気相フラグメント化に供することにより、進行する。かかる方法の1つは、衝突誘導解離（CID）である。MS-MS装置は、質量分析計中で所定のペプチドと他のペプチドを単離するので、ペプチドはチップから単離される必要はない。これにより、選択されたペプチドフラグメントの他のフラグメント化パターンが生成されることとなる。

10

【0181】

データベース調査プロトコルのような、当該技術分野で既に確立された方法を用いて、フラグメント化パターンからの情報は、ペプチドフラグメントが由来するタンパク質の1つまたは複数の推定同定候補を生成するために、タンパク質のデータベースを照会させるのに用いられる。そのプロトコルは、一般に、予想されたタンパク質の質量スペクトルが、いかに十分に選択されたフラグメントの実際の質量スペクトルに合致しているかを測定する、一致近似性分析を行う。データベース中のタンパク質は、次いで、タンパク質フラグメントがデータベースのタンパク質に対応する、信頼性測定に基づいてランク付けされ得る。ともに既知である、親タンパク質の質量および元の種に関する知識は、生成された同定候補の数を限定する助けとなるであろう。

20

【0182】

次いで、ペプチドフラグメントが生成されるタンパク質の推定同一性が認証される。推定同定候補の一次配列のデータベース、および用いられたタンパク質分解作用物質の切断パターンからの知識を用い、タンパク質分解作用物質による同定候補の切断から発生するべきペプチドフラグメント、特に、その分子量を予想することができる。この予想されたフラグメントの組は、次いで、チップ上に保持されたタンパク質のタンパク質分解切断後に生成した、実際のフラグメントの組と、その質量に基づいて比較される。予想されたフラグメントが説明される場合には、推定同定候補が、チップ上に保持されたタンパク質の1つの同定に実際に対応することを確認できる。そうでない場合には、その後、そのフラグメントが生成されたタンパク質が同定されるまで、消去法により他の推定同定候補を調べなければならない。この時点で、同定されたタンパク質に対応する生成フラグメントは、すでに説明されたものとして、生成フラグメントのすべての組から除かれる。

30

【0183】

アフィニティおよび洗浄条件の改良後に、1つのタンパク質のみが保持された場合には、その後、すべてのペプチドフラグメントが説明されたこととなり、プロセスは完了する。しかし、2個以上のタンパク質が保持されている場合には、状況はより複雑化し得る。例えば、分析に用いられたフラグメントは、所定のタンパク質から生成され、またはチップ上に保持されたが、所定のタンパク質ではないタンパク質により生成され得る。この場合、所定のタンパク質が同定され、または保持されたすべてのタンパク質が同定されるまで、記載したMS-MS方法により、説明されないペプチドフラグメントを分析する工程を繰り返すことが有効である。

40

【0184】

最後に、タンパク質を保持するよう既に決定されたクロマトグラフ表面か、またはアフィニティ捕捉プローブレザ脱離イオン化アッセイにおいての使用のために展開され得る生体特異的表面のいずれかを用いる、アフィニティ捕捉プローブレザ脱離イオン化方法により、所定のタンパク質をアッセイすることができる。生体特異的表面の作製は、抗体のような同定されたタンパク質、または受容体が既知の場合には受容体のための結合パートナーを用意することと、これをチップ表面に付着することを含む。その後、所定のタン

50

パク質は、既述したように、S E L D Iによりアッセイ可能である。

【0185】

B．分子相互作用の特性付

本発明の分析機器は、まず、特異的結合パートナー間の相互作用の研究対象に対する、高感度の、効果的な、シングルプラットフォームのアプローチを可能とする。

【0186】

特異的結合パートナーの相互作用は、生物学的プロセスの広範なスペクトルの根幹にある。従って、かかる相互作用を測定および特性付する能力は、かかるプロセスの十分な理解に前提的に必要である。すなわち、臨床レベルでは、かかる相互作用を測定および特性付する能力は、これらのプロセスにおける病原性異常の理解に、そして、かかる相互作用を調節、ひいては阻害するために用いられ得る作用物質の合理的設計に、重要である。

10

【0187】

組織化された真核組織のレベルでは、例えば、哺乳類神経系の細胞間シグナル伝達は、神経伝達物質とその同系受容体との相互作用により媒介される。かかる結合相互作用の分子的性質の理解は、かかるシグナル伝達の十分な理解に必要である。臨床レベルでは、かかる結合相互作用の分子的性質の理解は、シグナル伝達病理学のメカニズムの十分な理解に、およびかかるシグナル伝達病理学を和らげる作用物質であって、パーキンソン病から精神分裂病までを範囲とする疾患や、脅迫性障害からてんかんを範囲とする疾患の治療に有効な作用物質の合理的な設計に必要である。

【0188】

循環レベルでは、例えば、B細胞受容体の循環抗原との相互作用は、B細胞のクローン増殖、分化、および抗原特異的体液免疫応答を誘発するのに必要とされる。抗原の認識に寄与する抗原エピトープの理解は、免疫応答性の十分な理解に不可欠である。臨床レベルでは、かかる理解は、より強い体液免疫を付与するワクチンの設計に重要である。これと類似して、T細胞受容体の、抗原が存在する細胞上のMHCに付随して表れるペプチドとの相互作用は、細胞免疫を誘発するのに不可欠である。抗原の認識に寄与するT細胞エピトープの理解は、より強い細胞免疫を付与するワクチンの設計に重要である。

20

【0189】

人の細胞レベルでは、細胞外シグナルへの表現型応答は、細胞表面の受容体のリガンドとの最初の相互作用から、シグナルを核に伝達する細胞質内相互作用まで、タンパク質転写因子のDNAとの相互作用まで、少なくとも1つの、ほとんどの場合は分子間相互作用のカスケードにより媒介され、その後、遺伝子発現の変化したパターンが観察される表現型応答をもたらす。

30

【0190】

例えば、卵巣細胞によりエストロゲンおよびプロゲステロンの特徴的な結合は、排卵に必要とされる。一方では、ステロイドホルモン受容体とそのホルモンのリガンドの間、他方では、リガンド受容体とゲノム中のステロイドホルモン応答要素の間、の結合相互作用の分子的性質の理解は、ホルモン応答の理解のために重要である。かかる理解は、一方で、不妊症の理解に、および排卵、着床、および/または胎児の生育可能性の阻害を意図する、RU486のような作用物質の合理的な設計に重要である。

40

【0191】

かかる相互作用は、原核系だけでなく、真核系、および真核生物と原核生物との相互作用においても見出される。例えば、あるグラム陰性菌は、原核生物の尿道の侵入に必要な繊維毛を作り出す。そして、かかる相互作用の理解は、病理学的プロセスの十分な理解に、およびかかる侵入を阻止可能な作用物質の合理的設計に重要である。

【0192】

多くの技術が、特異的結合パートナー間の、かかる分子間相互作用を研究およびマッピングするため、当該技術分野で用いられている。それぞれが、重大な不利点を有する。

【0193】

第1のかかる方法では、特異的結合対の一員は、クロマトグラフカラムに充填された吸着

50

体上に固定化される。第1の(結合された)結合パートナーと接触する第2の(遊離)結合パートナーの構造内の位置をマッピングするため、第2の(遊離)パートナーは切断される。通常、かかる切断は、特異的タンパク質分解酵素によるものであるが、特異的化学的切断(例えば、CNBrによる)または非特異的化学的加水分解で行われることも可能である。その後、消化物はカラムを通され、第1の(固定化された)パートナーが結合したままの第2の(遊離)パートナーのこれらの部分を結合する。

【0194】

第2のパートナーのペプチドは、通常、塩またはpHの勾配を用いて、その後溶出され、通常、MALDIまたはエレクトロスプレーイオン化を用いる質量分析計内にペプチドを導入することにより、同定される。

10

【0195】

このアプローチは、いくつかのよく知られ、かつ、有意な問題を有する。第1に、大量の精製された第1の結合パートナーが、特異的吸着体を作製するために必要とされる。第2に、通常精製された大量の第2の結合パートナーが、消化、吸着、および溶出に必要とされ、これは、これらの各ステージは希釈効果と分析物の損失を伴うことによる。さらに、その後の質量分析は非常に高感度であり得るが、液相分析をMSに接続することは、同様に分析物を損失させることがある。

【0196】

おそらく、より基本的な不利点は、第2の結合パートナーを第1の結合パートナーに結合する前に切断することにより、ペプチドフラグメント中に適当に保持される第2の結合パートナー上のこれらの分子構造のみが結合し、その後検出されることになることである。例えば、抗体が線状にエピトープと結合するのではなく不連続に抗原と結合する場合、かかる不連続なエピトープは、フラグメント化により破壊され得る。すなわち、固定化抗体に対する結合を支持することができず、かかる抗原エピトープは検出され得ない。

20

【0197】

当該技術分野における第2の通常のアプローチは、タンパク質結合パートナー内において、分子間結合に寄与するこれらの残基をマッピングするため、点突然変異を用いることである。

【0198】

この後者のアプローチは、タンパク質結合パートナーがクローニングされ、所望の点突然変異の作製、変化タンパク質の組換え発現、およびそれらの精製を必要とする。その後、変化タンパク質の他のパートナーに対する結合動力学が測定され、分子間相互作用における突然変異残基の効果が決定される。

30

【0199】

それほど用いられることはないが、結合パートナー間の接触の性質は、結合したパートナーのX線結晶解析により明らかにすることができる。この技術は非常に効果的であり、原子レベルでの解析を提供するが、各結合パートナーが高度に精製されていることを必要とし、さらに、適切な共結晶が形成されることを必要とする。

【0200】

本発明のアフィニティ捕捉タンデム質量分析計は、はるかに少量の開始物質を必要とし、点突然変異分析、結晶化を不要とし、かつ結果的に精製度の制約を低減させる改良されたアプローチを提供する。

40

【0201】

第1の工程は、結合パートナーをアフィニティ捕捉プローブ上に固定化することである。

【0202】

いずれのパートナーも固定化することができる。しかし、結合接触についての構造的情報が得られるのは、遊離パートナーである。このアプローチの例として受容体/リガンド相互作用を用いると、プローブ上へのリガンドの固定化は、リガンドの結合に関与する受容体領域の同定を可能とするであろう。プローブ上への受容体の固定化は、受容体へのその結合に関与するリガンド領域の同定を可能とするであろう。リガンドがタンパク質、例え

50

ば、タンパク質ホルモン、サイトカイン、またはケモカインである場合、各パートナーを順に用いる個別の実験により、分子間接触を二面的に理解することができる。

【0203】

プローブに結合したパートナーは、共有結合的または強い非共有結合的相互作用を用いて固定化される。その選択は、固定化されるべきパートナー上の適切な反応基の利用性、およびプローブ表面の化学的性質に依存する。適した化学が分析技術分野で十分に知られている。

【0204】

例えば、固定化されるべき結合パートナーが遊離アミノ基を有する場合、共有結合が、結合パートナーの遊離アミノ基と、プローブ表面のカルボニルジイミダゾール部分との間に形成され得る。これに類似して、結合パートナーの遊離アミノまたはチオール基は、エポキシ基を有するプローブ表面へのパートナーと、共有的に結合するのに用いられ得る。強い配位または供与結合が、結合パートナーの遊離スルフヒドリル基と、プローブ表面の金または白金との間に形成されてもよい。

10

【0205】

任意選択的に、プローブ表面上に残った反応性部位は、その後、活性化したプローブ表面への非特異的結合を低減するため、ブロックされてもよい。

【0206】

第2の（遊離）結合パートナーは、次いで、アフィニティ捕捉チップに接触され、第1の（固定化された）結合パートナーとの結合が可能とされる。

20

【0207】

既知で入手可能である場合、第2の（遊離）結合パートナーは溶液中に純粋な状態で存在可能であるか、または、より通常は、第2の結合パートナーを含有すると思われる生物学的試料のような、異種混合物から捕捉されるであろう。始めの方に記載されている生体マーカー発見アプローチにおけるような、生物学的試料は、血液、血清、血漿、リンパ、間質液、尿、滲出物のような生物学的液体が可能であり、細胞溶解産物、細胞分泌物、またはそれらの一部分留されおよび精製された部分であり得る。

【0208】

プローブは、次いで、定められた溶出特性を有する1つまたは複数の溶離剤で洗浄される。これらの洗浄は、プローブに非特異的に結合する種の数低減するのに役立つ。

30

【0209】

次いで、エネルギー吸収分子が、通常は液相中で適用され、乾燥させる。エネルギー吸収分子の適用は、アフィニティ捕捉プローブの既存の使用と同一の様式で達成される。ProteinChip（登録商標）Arrays（Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, CA, USA）が用いられる場合、エネルギー吸収分子は、製造業者の指示書に従って適用される。

【0210】

アフィニティ捕捉プローブに非共有的に結合した種、例えば、第1の（固定化された）結合パートナーに特異的に結合した第2の結合パートナー、プローブ表面に非特異的に結合した分子、第1の結合パートナーに非特異的に結合した分子は、その後、第1の相のレーザ脱離イオン化質量分析において検出される。

40

【0211】

質量分析計は、PBS II（Ciphergen Biosystems, Inc.（Fremont, CA, USA））のようなシングルステージアフィニティ捕捉LDI-MS装置であってもよい。しかし、本発明のアフィニティ捕捉タンデムMSは、より高い質量精度およびより高い解像度を提供し、好ましい。

【0212】

通常、第2の（遊離）結合パートナーは、以前の研究より既知であるときには、その存否は質量分析により容易に確認可能である。第2の（遊離）結合パートナーが未知のときには、プローブに結合した種それぞれは、順に精査することができる。検出可能な種の数

50

大きすぎるときには、アフィニティ捕捉プローブは、異なる溶出特性（通常、高いストリンジェンシー）を有する溶離剤で洗浄し、分析について存在する種の数に低減させることができる。

【0213】

第2の（遊離）結合パートナーの第1の（固定化された）結合パートナーに対する結合が確認されると、第2の結合パートナーはフラグメント化される。これは、通常、第2の結合パートナー（同様に、プローブ表面上に固定化された第1の結合パートナーに、この時点では非共有的であるが特異的に結合する）を、トリプシン、Glu-C(V8)プロテアーゼ、エンドプロテイナーゼArg-C（セリンプロテアーゼまたはシステインプロテアーゼArg-C酵素のいずれか）、Asn-NプロテアーゼまたはLys-Cプロテアーゼのような特異的エンドプロテアーゼと接触させることにより達成される。

10

【0214】

消化の後、ペプチドは質量分析により検出される。

【0215】

例えば、ペプチド質量フィンガープリント分析により第2の結合パートナーの同定を確認するため、第2の結合パートナーのすべてのフラグメントが同定されるべき場合、エネルギー吸収分子が適用可能であり、プローブは、レーザ脱離イオン化による質量分析にペプチドを導入するために用いられる。この目的のため、Ciphergen PBS II 一段加速線形（single acceleration stage linear）TOF MSが使用可能である。本発明のタンデムMSは、より優れた質量精度と質量解像度を提供し、好ましいが、高い解像度および精度は、任意の所与のデータベース問合せ中の、任意の所与の信頼度でリターンされた、推定「ヒット」数を減少させる。

20

【0216】

しかし、より通常は、固定化された第1の結合パートナーに最も緊密に結合する、第2の結合パートナーのこれらのフラグメントを分析することが望ましい。かかる場合、プローブは、エネルギー吸収分子の添加に先立って、1つまたは複数の溶離剤で洗浄される。

【0217】

この時点で、プローブは、本発明のタンデムMSのインタフェースに挿入され、第2の結合パートナーのフラグメント（通常ペプチド）が検出される。

【0218】

第2の（遊離）結合パートナーの同定が既知のとき、検出されたフラグメントの質量は、フラグメント化酵素の既知の切断則を、第2の結合パートナーの一次アミノ酸配列に適用することにより予測されるものと比較することが可能である。このやり方では、各フラグメントをそれぞれ同定することができ、これにより、第1の結合パートナーとの結合を担う、第2の結合パートナーのこれらの部分の構造内に位置付けることができる。

30

【0219】

理論的には、一段MS装置を使用可能であるが、実際、第2の結合パートナーから生ずるもの以外のフラグメントが存在し、かかる分析を混乱させる。このため、通常の使用における確実な同定は、本発明の装置の高い質量解像度および高い質量精度から恩恵を受け、 m/z 分析からより頻繁に恩恵を受ける。

40

【0220】

第2の（遊離）結合パートナーが未知のとき、このパートナーは、 m/z 分析により同定可能である。

【0221】

通常、かかる分析は、MSの第1の工程で第1の親ペプチドを選択し、選択したペプチドをフラグメント化し、次いでMS分析の第2の工程でフラグメント化質量スペクトルを生成する形態をとる。フラグメント化は気相中で、好ましくは、衝突誘起解離により行われる。本発明のアフィニティ捕捉タンデム質量分析計の好ましい実施形態では、CIDが、約 10^{-2} トルでの窒素ガスとの衝突による q_2 に効果的である。

【0222】

50

次いで、フラグメントスペクトルは、Yatesらの米国特許第5,538,897号および第6,017,693号中に開示されるもの、Protein Prospector MS-TAG(<http://prospector.ucsf.edu>)モジュールに用いられるものような、既知のアルゴリズムを用いる配列データベースを問合せるのに用いられる。

【0223】

推定同定は、同定可能な親由来のすべてのペプチドを確認することが必要とされるときには、第2の親ペプチドを選択し、かつこのアプローチを繰り返すことによりさらに認証され得る。

【0224】

その後、第2の結合パートナーが同定されると、分子間相互作用の性質は上述のように研究可能である。フラグメント化酵素（またはCNBrのような化学物質）の既知の切断則が、現在同定された第2の結合パートナーの一次アミノ酸配列に適用され、実験により測定されたペプチドを理論的消化物上にマッピングし、これにより、固定化された第1の結合パートナーに結合し、したがって天然の分子中で結合に寄与する、ペプチドを同定する。なお上記のように、最も緊密に結合するこれらのペプチドを同定するため、実験は、洗浄のストリンジェンシーを高めつつ繰り返してもよい。

10

【0225】

他の摂動を、分子間結合の性質をさらに明らかにするために行うことができる。

【0226】

第2の結合パートナーのフラグメント化後の、プローブを洗浄するための溶離剤の溶出特性は、相互作用に最も強く寄与するフラグメントを同定するため、あるいは、結合に寄与するpH依存または塩依存接触を同定するため、変更してもよい。

20

【0227】

原則は、もちろん、クロマトグラフおよび分子生物学の技術分野において十分知られている。洗浄のストリンジェンシーの上昇（例えば、高められた塩濃度、より高い温度）とともに、固定化された第1の結合パートナーに、より低い緊密性なストリンジェンシーで結合したこれらのフラグメントは、第1の結合パートナーから溶出されるであろう。本発明の幾何学では、かかる弱く結合するフラグメントは、プローブから溶出され、その後の質量分析から失われる。このため、プローブ、または同一な片方のプローブがストリンジェンシーを上昇させつつ洗浄され、このため第2の結合パートナーのフラグメントの、工程付けられた一連のサブセットが作製され、ここで、連続したサブセットがそれぞれ、より緊密に結合するフラグメントの、より小さいサブセットを有する、一連の実験を行うことができる。

30

【0228】

上記のように、第1の（固定化された）および第2の（遊離）結合パートナーは、交換可能であり、これにより、他方のパートナーの結合接触を明らかにすることができる。

【0229】

さらに有用な摂動は、一方または両方の結合パートナーの、翻訳後修飾の除去または変更である。例えば、第1の結合パートナーが糖タンパク質であるとき、第2の結合パートナーの結合の前および/または後の、1つまたは複数の特異的または非特異的グリコシダーゼを用いた処理は、結合に対する糖残基の寄与を明らかにする助けとなるであろう。

40

【0230】

それと同様に、結合パートナーが核酸であるときには、他の結合パートナーの結合後の、核酸結合パートナーのヌクレアーゼを用いた処理は、不可欠な結合残基の同定の助けとなり得る。

【0231】

分子間相互作用を特性化するための上記アプローチは、当該技術分野のマルチプラットフォームの、労働集約的な、低感度な技術を、シングルプラットフォームの、簡素化された、高感度のアプローチと置き換える。このアプローチは、広い範囲の、異なった生物学的

50

システムおよび問題に適用可能である。

【0232】

上記に提示したように、本発明の方法は、エピトープマッピング、すなわち、抗体、T細胞受容体またはMHCへの結合に寄与する抗原内での接触を同定することに用いられ得る。この方法は、生物学的リガンドのその受容体との結合、核酸に対する転写因子、多タンパク質複合体中の他の転写因子に対する転写因子、の性質を明らかとすることに用いられ得る。

【0233】

タンパク質/タンパク質相互作用に関しては上記で詳細に考察したが、本発明の方法は、レクチンと糖タンパク質、タンパク質と核酸、および低分子と受容体、との間の結合相互作用を明らかとすることに実践可能である。 10

【0234】

特に低分子リガンドについて、本方法は、既知の受容体のアゴニストおよびアンタゴニストの設計にも適用可能である。

【0235】

過去十年にわたり、低分子を多量にコンビナトリアル的に生成するための、および、1つまたは複数の生物学的プロセスに影響する能力についての、種々の均一的生細胞アッセイ中でのかかる分子をスクリーニングするための技術が開発されてきた。例えば、均一的シンチレーション近接アッセイ(homogeneous scintillation proximity assays)が、既知の受容体に結合するためのコンビナトリアルライブラリのスクリーニングに用いられ得る。デジタル画像ベース細胞アッセイ(digital image-based cellular assays)が、受容体の細胞質/核輸送、細胞間カルシウム輸送における変化、細胞運動性における変化のような下流の効果に関するコンビナトリアルライブラリからの化合物のスクリーニングに用いられ得る。 20

【0236】

しかし、かかるリード化合物が同定されると、低分子のその受容体との相互作用についての詳細な理解は、改良された薬学動態学および治療係数を伴う分子の理にかなった設計を容易とするであろう。本発明の技術は、かかる使用に十分に適している。

【0237】

低分子が、エネルギー吸収分子により提供されるものに近いシグナルを提供するときには、コンビナトリアルライブラリ構成物に関する既知の質量についてのみ、シングルイオンモニタリング観察(single ion monitoring looking)を用いて、MSが行われる。 30

【0238】

実施例1

前立腺癌生体マーカーの同定

伝統的に、前立腺癌腫は、前立腺特異的抗原(PSA)の血中レベルの上昇の発見後の、バイオプシーにより診断されている。健常な男性では、PSAは1ng/ml未満のレベルで存在する。BPHおよび前立腺癌腫の両方に関して、PSAレベルは4~10ng/mlまで上昇する(Chen et al., J. Urology 157: 2166-2170 (1997)、Qian et al., Clin. Chem. 43: 352-359 (1997))。PSAは、キモトリプシン活性を有し、チロシンおよびロイシンのC末端を切断することが知られている(Qian et al., Clin. Chem. 43: 352-359 (1997))。 40

【0239】

BPHと診断された患者ならびに前立腺癌腫と診断された患者由来の精液プラズマを、ProteinChip(登録商標)ディファレンシャルディスプレイの技術を用いて分析した。図3は、一人のBPHおよび前立腺癌腫患者の精液タンパク質プロファイルを示す。実際のゲル表示(virtual gel display)を用いて、試料間の比較を 50

見やすいものとしている。前立腺癌 - B P H のタンパク質プロファイルについての差異プロットを、ゲル観察プロットの下に表示する。差異プロットの実際の表示シグナルは、タンパク質が前立腺癌においてアップレギュレートされたことを示し、一方、負のピークは、前立腺癌における下方へのタンパク質制御を示す。可能な前立腺癌生体マーカを示す、いくつかのユニークなアップレギュレートシグナルが検出された。

【0240】

これらのアップレギュレートされたタンパク質の1つのチップ上での単離を、混合モードの表面および中性pH緩衝液での洗浄を用いて達成した(図4参照)。本例では、タンパク質はほぼ同質な程度まで強化した。強化した生体マーカ候補は、その後、トリプシンを用いた *i n s i t u* 消化に供した。インキュベーション後、C H C A (マトリックス) の飽和溶液を添加し、得られた消化産物を S E L D I - T O F により分析した。

10

【0241】

いくつかのペプチドが検出された(図5参照)。得られたペプチドシグナルをタンパク質データベース分析に提出し、ヒトセメノゲリンI (*s e m e n o g e l l i n I*) の予備的同定を行った。生体マーカが、約 5 7 5 1 D a の、セメノゲリンIの分子量 (M W 5 2 , 1 3 1 D a) よりもはるかに小さい分子量を有していたことから、この同定はいくぶん当惑するものであった。

【0242】

同一の精製タンパク質を、P r o t e i n C h i p L D I Q q - T O F M S 検出に提出した(図6参照)。5 7 5 1 D a の親イオンは、L D I Q q - T O F M S / M S 分析 (3 0 0 0 M / z) についての現在の質量限界を超えていたので、二重に荷電したイオンを C I D M S / M S シーケンシングに用いた(図7参照)。C I D M S / M S の結果を用い、タンパク質のデータベース調査を行った。26の *m s / m s* イオンのうち15が、セメノゲリンIのフラグメントにタンパク質分解的に由来する、ヒト精塩基性タンパク質 (S B P) にバックマッピングされ、この候補生体マーカの確実な同定が可能となった。

20

【0243】

上記のような最初の研究により潜在的な生体マーカが即時に明らかとなる一方、任意の生体マーカの完全な認証には、発現および有病率に関する統計的に有意な情報を得るための、数ダースひいては数百の関係ある試料の分析が必要である。

30

【0244】

本明細書中で言及したすべての特許、特許刊行物、および他の刊行された参考文献は、それぞれが個別にかつ特定の明細書中に参照により援用されたのと同様に、その全体が参照により援用される。本書類中の種々の参考文献の引用により、出願人らは、いかなる特定の参考文献も、発明に対する「当該技術分野」として認めるものではない。

【0245】

特定の実施例を提示したけれども、上記記載は例示的なものであり、制限的なものではない。これまでに記載した実施形態の1つまたは複数のいかなる特徴も、本発明の他の実施形態の1つまたは複数の他のいかなる特徴と、いかなる方法によっても、組み合わせることが可能である。さらに、本発明の多くの変形が、明細書の検討に基づいて、当業者に明らかとなるであろう。それゆえ、本発明の範囲は、上記記載を参照して決定されるべきではなく、代わりに、等価物のその十分な範囲に加えて、併記の特許請求の範囲を参照して決定されるべきである。

40

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明の分析機器の実施形態を図式化している。

【図2】図2は、本発明の分析機器における使用に好ましい、直交 Q q T O F タンデム質量分析計の要素をより詳細に示す。

【図3】図3は、一人の B P H および前立腺癌患者の、精液タンパク質プロファイルを示す。

【図4】図4は、図3中で検出可能な、アップレギュレートされたタンパク質の1つのブ

50

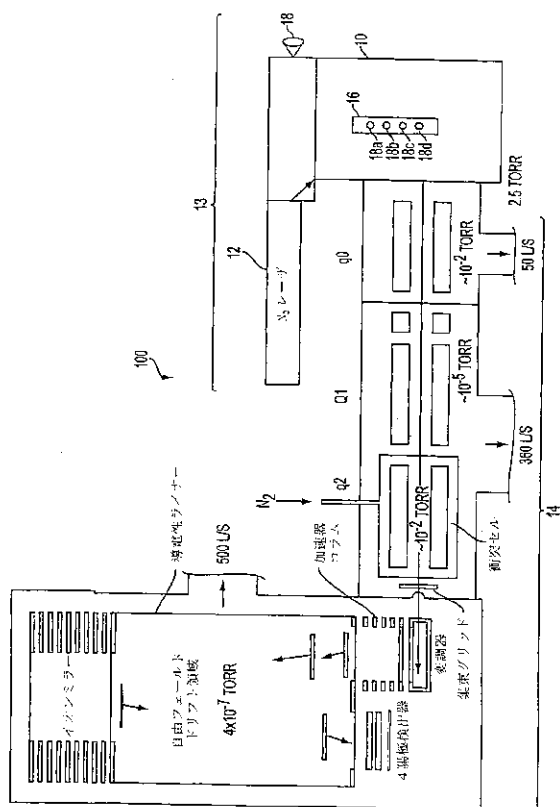
ローブ上単離の結果を示す。

【図5】図5は、強化生体マーカー候補をトリプシンを用いる *in situ* 消化に供した後の、単相のMS分析により検出されたペプチドを示す。

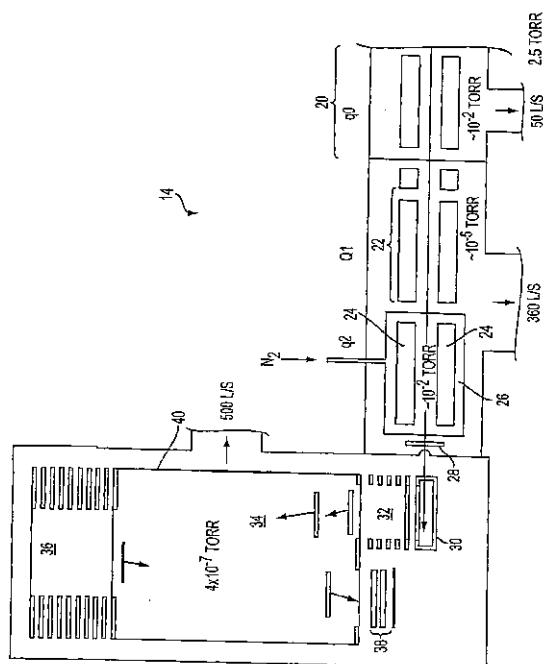
【図6】図6は、本発明の分析装置での、同一精製タンパク質ペプチドの、LDI-Qq-TOF MS分析を示す。

【図7】図7は、強化生体マーカー候補の、選択した二重荷電イオンについての、本発明の分析装置からのMS/MS結果を示す。

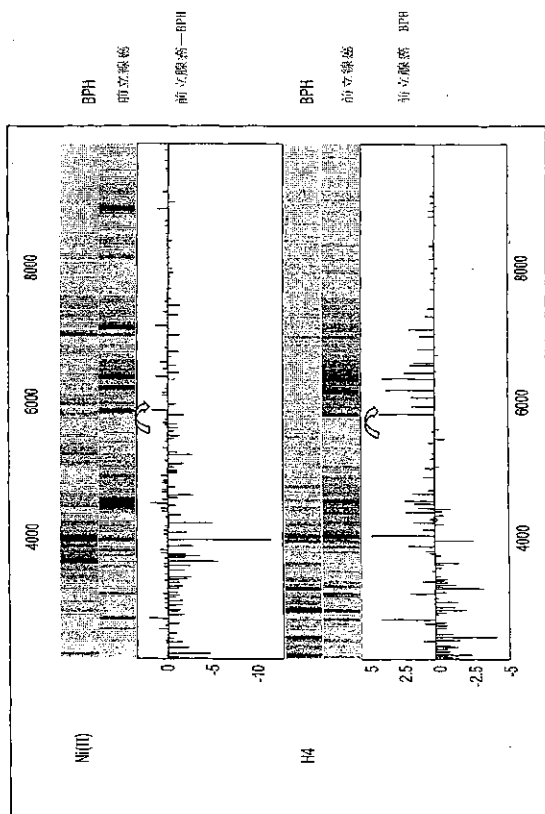
【図1】



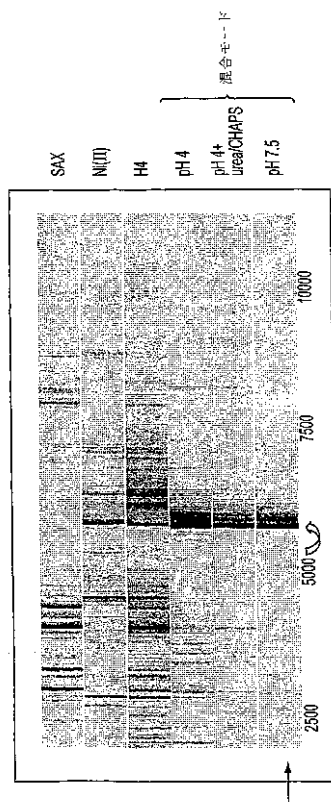
【図2】



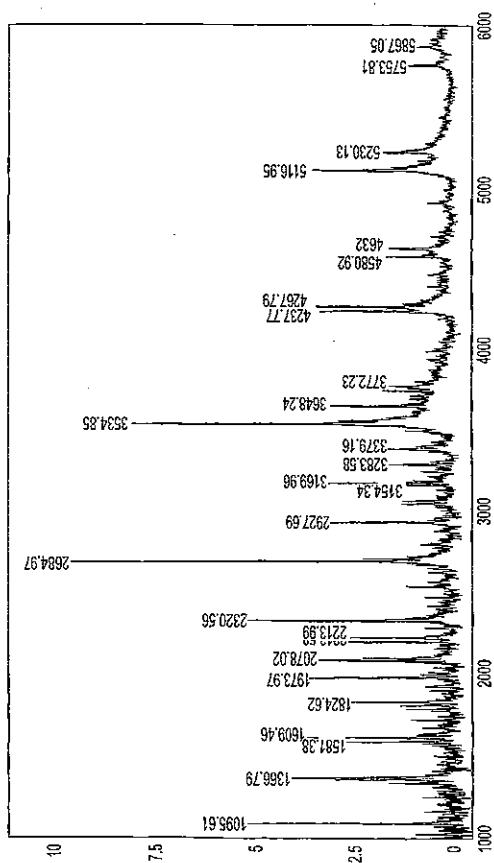
【圖 3】



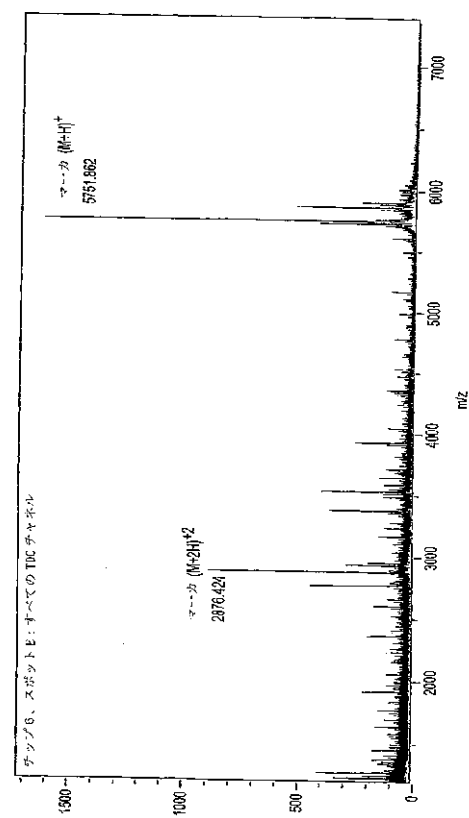
【 図 4 】



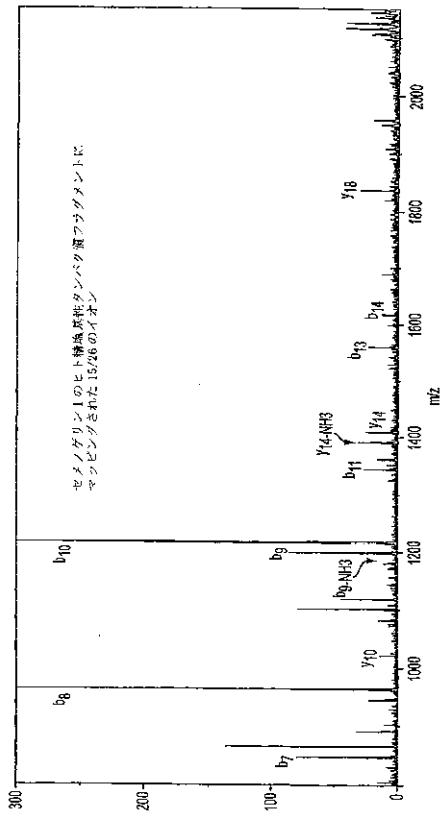
【 図 5 】



【 図 6 】



【図 7】



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)



PCT

WO 02/31484 A2

(74) Agents: MULLOWNEY, Edward, E. et al.; Fish & Neave, 1251 Avenue of the Americas, New York, NY 10020 USA.

(21) International Application Number: PCT/AUS00/28261

(22) International Filing Date: 12 October 2000 (12.10.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(71) Applicants for all designated States except US: CIPHERGEN BIOSYSTEMS, INC. [US/US], 6611 Dumbarton Circle, Fremont, CA 94555 (US). HUMAN GENOME SCIENCES, INC. [US/US], 9410 Key West Avenue, Rockville, MD 20850 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GL, GM, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LI, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

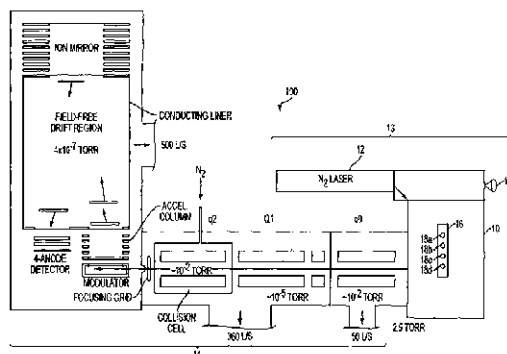
(84) Designated States (regionals): ARIPO patent (GIL, GM, KT, J.S. MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW). Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UJ, UO). European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, NG, SN, TD, TG).

(75) Inventors/Applicants (for US only): **WEINBERGER, Scott** [US/US]; 657 George Street, Montara, CA 94037 (US); **MORRIS, Tim** [US/US]; 501 West Montgomery Avenue, Rockville, MD 20850 (US).

Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

(Continued on next page)

(54) Title: METHODS FOR CHARACTERIZING MOLECULAR INTERACTIONS USING AFFINITY CAPTURE TANDEM MASS SPECTROMETRY



(57) Abstract: The invention provides an analytical instrument comprising an affinity capture probe interface, a laser desorption/ionization source, and a tandem mass spectrometer. Also presented are new methods for protein discovery and identification and for characterization of molecular interactions that utilize the instrument of the present invention.

WO 02/31484 A2

WO 02/31484 A2

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

METHODS FOR CHARACTERIZING MOLECULAR INTERACTIONS USING
AFFINITY CAPTURE TANDEM MASS SPECTROMETRY

FIELD OF THE INVENTION

This invention is in the field of chemical
5 and biochemical analysis, and relates particularly to
apparatus and methods for improved identification and
characterization of analytes and of affinity
interactions between analytes by tandem mass
spectrometry.

10 BACKGROUND OF THE INVENTION

The advent of electrospray ionization (ESI)
and matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)
techniques, coupled with improved performance and lower
cost of mass analyzers, has in the past decade allowed
15 mass spectrometry (MS) to take a place among standard
analytical tools in the study of biologically relevant
macromolecules, including proteins purified from
complex biological systems.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 2 -

For example, in a technique known as peptide mass fingerprinting, mass spectrometry is used to identify proteins purified from biological samples. Identification is effected by matching the mass spectrum of proteolytic fragments of the purified protein with masses predicted from primary sequences prior-accessioned into a database. Roepstorff, *The Analyst* 117:299-303 (1992); Pappin et al., *Curr. Biol.* 3(6):327-332 (1993); Mann et al., *Biol. Mass Spectrom.* 22:338-345 (1993); Yates et al., *Anal. Biochem.* 213:397-408 (1993); Henzel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5011-5015 (1993); James et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195:58-64 (1993).

Similar database-mining approaches have been developed that use fragment mass spectra obtained from collision induced dissociation (CID) or MALDI post-source decay (PSD) to identify purified proteins. Eng et al., *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 5:976-989 (1994); Griffin et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9:1546-1551 (1995); Yates et al., U.S. Patent Nos. 5,538,897 and 6,017,693; Mann et al., *Anal. Chem.* 66:4390-4399 (1994).

Mass spectrometric techniques have also been developed that permit at least partial *de novo* sequencing of isolated proteins. Chait et al., *Science* 262:89-92 (1993); Keough et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7131-6 (1999); reviewed in Bergman, *EXS* 88:133-44 (2000).

Software resources that facilitate interpretation of protein mass spectra and mining of public domain sequence databases are now readily accessible on the internet to facilitate protein

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 3 -

identification. Among these are Protein Prospector
(<http://prospector.ucsf.edu>), PROWL
(<http://prowl.rockefeller.edu>), and the Mascot Search
Engine (Matrix Science Ltd., London, UK,
5 www.matrixscience.com).

Although highly accurate mass assignment
provides useful information - facilitating
identification of purified protein by the above-
described techniques, for example - such information is
10 nonetheless limited. Significant additional analytical
power would be unleashed by combining MS analysis with
enzymatic and/or chemical modification of target
proteins, enabling the elucidation of structural
components, post-translational modifications, and
15 furthering protein identification.

Furthermore, complex biological
materials - such as blood, sera, plasma, lymph,
interstitial fluid, urine, exudates, whole cells, cell
lysates and cellular secretion products - typically
20 contain hundreds of biological molecules, plus organic
and inorganic salts, which precludes direct mass
spectrometry analysis. Thus, significant sample
preparation and purification steps are typically
necessary prior to MS investigation.

25 Classical methods of sample purification,
such as liquid chromatography (ion exchange, size
exclusion, affinity, and reverse phase chromatography),
membrane dialysis, centrifugation, immunoprecipitation,
and electrophoresis, typically demand a large quantity
30 of starting sample. Even when such quantities of
sample are available, minor components tend to become
lost in these purification processes, which suffer from
analyte loss due to non-specific binding and dilution

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 4 -

effects. The methods are also often quite labor intensive.

Thus, there is a clear need for methods and apparatus that facilitate mass spectrometric detection of both major and minor proteins present in heterogeneous samples without requiring extensive prior fluid phase purification. There is further need for an MS platform that allows not only facile sample purification, but also permits serial and parallel sample modification approaches prior to mass spectrometric analysis.

These needs have been met, in part, by the development of affinity capture laser desorption ionization approaches. Hutchens et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7: 576-580 (1993); U.S. Patent Nos. 5,719,060, 5,894,063, 6,020,208, and 6,027,942. This new strategy for MS analysis of macromolecules uses novel laser desorption ionization probes that have an affinity reagent on at least one surface. The affinity reagent adsorbs desired analytes from heterogeneous samples, concentrating them on the probe surface in a form suitable for subsequent laser desorption ionization. The coupling of adsorption and desorption of analyte obviates off-line purification approaches, permitting analysis of smaller initial samples and further facilitating sample modification approaches directly on the probe surface prior to mass spectrometric analysis.

The affinity capture laser desorption ionization approach has allowed mass spectrometry to be adapted to numerous classic bioanalytical assay formats, including immunoassay, Nelson et al., *Anal.*

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 5 -

Chem. 67: 1153-1158 (1995), and affinity chromatography, Brockman et al., *Anal. Chem.* 67: 4581-4585 (1995). The affinity capture laser desorption ionization approach has been applied not only to the study of peptides and proteins, Hutchens et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7:576-580 (1993); Mouradian et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 118: 8639-8645 (1996); Nelson et al., *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 9: 1380-1385 (1995); Nelson et al., *J. Molec. Recognition* 12: 77 - 93 (1999).; Brockman et al., *J. Mass Spectrom.* 33: 1141-1147 (1998); Yip et al., *J. Biol. Chem.* 271: 32825-33 (1996), but also to oligonucleotides, Jurinke et al., *Anal. Chem.* 69:904-910 (1997); Tang et al., *Nucl. Acids Res.* 23: 3126-3131 (1995); Liu et al., *Anal. Chem.* 67: 3482-90 (1995), bacteria, Bundy et al., *Anal. Chem.* 71: 1460-1463 (1999), and small molecules, Wei et al., *Nature* 399:243-246 (1999). At the commercial level, affinity capture laser desorption ionization is embodied in Ciphergen's ProteinChip® Systems (Ciphergen Biosystems, Inc. Fremont, California, USA).

Although the affinity capture laser desorption ionization technique has solved significant problems in the art, difficulties remain.

When this approach is applied to capture proteins from biological samples, it is common to see about one picomole of total protein captured and available for subsequent analysis. Typically, affinity capture on chromatographic surface biochips does not result in complete purification. Additionally, the digestion efficiency seen for solid phase extracted samples, as compared to digests performed in free

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 6 -

solution or the denaturing environment of 2-D gels, is poor. Thus, if about 50% were the protein of interest, and one were successful in digesting about 10% of this protein, at best only about 50 femtomole of some peptides would be available for detection.

Using virtual tryptic digests of bovine fetuin in database mining experiments, it has been demonstrated, for example, that even with an extreme accuracy of 1.0 ppm (a level not currently achievable by most MS techniques), a poor confidence protein ID match is achieved with a single peptide mass when searching against this complex, eukaryotic genome. For two peptides, low confidence results are achieved as well. Only after three peptides are submitted are confident results returned for mass assignments of less than 300 ppm error. In this case, most devices would require internal standard calibration. However, with five or more peptides, no further confidence is afforded with mass accuracies that are better than 1000 ppm error.

Furthermore, when multiple proteins are simultaneously digested, a heterogeneous peptide pool is created and successful database mining requires not only extreme accuracy, but in many instances primary sequence information. Tandem MS/MS approaches have demonstrated significant utility in providing primary sequence information. Biemann et al., *Acc. Chem. Res.* 27: 370 - 378 (1994); Spengler et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1991, 5:198 - 202 (1991); Spengler et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 6:105 - 108 (1992); Yates et al., *Anal. Chem.* 67:1426 - 1436 (1995); Kaufman et al., *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 7:902 -

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 7 -

910 (1993); Kaufman et al., *Intern. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 131:355 - 365 (1994).

Until recently, however, the only MS/MS approach available for laser desorption based analyses was post source decay analysis (PSD). While PSD is capable of providing reasonable sequence information for picomole levels of peptides, the overall efficiency of this fragmentation process is low; when combined with the poor mass accuracy and sensitivity often demonstrated during this approach, its applicability to analysis of low abundance proteins often found on affinity capture laser desorption ionization probes has been greatly limited. Recently, a laser desorption ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometer (LDI Qq-TOF) has been developed that is capable of performing collision induced dissociation (CID) MS/MS analysis. Krutchinsky et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12: 508 - 518 (1998).

There is, therefore, a need for apparatus and methods that would increase the sensitivity and mass accuracy of affinity capture laser desorption mass spectrometry. There is a need for methods and apparatus that would increase on-probe digestion efficiency and that would permit peptides generated by digest of inhomogeneous mixtures of proteins readily to be resolved. There is a need for apparatus and methods that would increase the efficiency of affinity capture laser desorption tandem mass spectrometric analysis.

SUMMARY OF THE INVENTION

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 8 -

It is an object of the present invention to provide apparatus and methods that increase the sensitivity, mass accuracy, mass resolution of existing affinity capture laser desorption ionization mass spectrometer analyses and to add ms/ms capability. It is a further object of the present invention to provide methods of biomolecule analysis that exploit these improved analytical capabilities.

The present invention meets these and other objects and needs in the art by providing, in a first aspect, an analytical instrument.

The analytical instrument of the present invention comprises a laser desorption ionization source, an affinity capture probe interface, and a tandem mass spectrometer, in which the affinity capture probe interface is capable of engaging an affinity capture probe and positioning the probe so that it can be interrogated by the laser desorption source while in communication with the tandem mass spectrometer, thus permitting ions desorbed from the probe to enter the mass spectrometer.

Typically, the laser desorption ionization source comprises a laser excitation source and a laser optical train; the laser optical train functions to transmit excited photons from the laser excitation source to the probe interface. In such embodiments, the laser optical train typically delivers about 20 - 1000 microjoules of energy per square millimeter of interrogated probe surface.

The laser excitation source is selected from the group consisting of a continuous laser and a pulsed laser, and in various embodiments is selected from the group consisting of a nitrogen laser, a Nd:YAG laser,

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 9 -

an erbium:YAG laser, and a CO₂ laser. In a presently preferred embodiment, the laser excitation source is a pulsed nitrogen laser.

In one set of embodiments, the laser optical train comprises optical components selected from the group consisting of lenses, mirrors, prisms, attenuators, and beam splitters.

In an alternative set of embodiments, the laser optical train comprises an optical fiber having an input end and an output end, and the laser excitation source is coupled to said optical fiber input end.

In some of the optical fiber laser optical train embodiments, the laser optical train further comprises an optical attenuator. The attenuator can be positioned between the laser excitation source and the input end of the optical fiber, can serve to couple the laser excitation source to the input end of the optical fiber, or can be positioned between the optical fiber output end and the probe.

In certain of the optical fiber optical train embodiments, the optical fiber output end has a maximum diameter between about 200 - 400 μm and the input end has a diameter of between about 400 to 1200 μm .

The analytical instrument can also include probe viewing optics, to permit the probe to be visualized after its engagement in the probe interface.

In certain embodiments, the laser optical train can include a laser coupler that couples the laser excitation source to the optical fiber input end. As noted above, the coupler can serve as an optical attenuator. In other embodiments, the coupler can

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 10 -

serve to promote visualization of the probe after its engagement in the probe interface.

In certain of these latter embodiments, either the coupler or the fiber is bifurcated and splits off a fraction of energy from said laser excitation source. Alternatively, such bifurcation can allow introduction of visible light to illuminate the desorption locus.

Where visualization optics are included in the optical train, or where a fiber-containing laser optical train includes a bifurcation or trifurcation, the analytical instrument can further comprise a CCD camera positioned to detect light reflected from said probe.

In typical embodiments, the affinity capture probe interface comprises a probe holder which is capable of reversibly engaging the affinity capture probe. The interface also typically comprises a probe introduction port which is itself capable of reversibly engaging the probe holder.

In typical embodiments, the probe interface further comprises a probe position actuator assembly and an interface ion collection system. When the probe holder is engaged in the introduction port, it is placed in contact with the probe position actuator; the probe position actuator, in turn, is capable of movably positioning the probe holder (typically with its engaged probe) with respect both to the laser ionization source (typically, with respect to the laser optical train) and to the ion collection system. In typical embodiments, the actuator is capable of translationally and rotationally positioning said probe holder.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 11 -

The probe interface typically also comprises a vacuum evacuation system coupled to the probe introduction port, which allows the probe to be interrogated by the laser desorption ionization source at subatmospheric pressures.

The analytical instrument of the present invention comprises a tandem mass spectrometer which, in various embodiments, is selected from the group consisting of a QqTOF MS, an ion trap MS, an ion trap TOF MS, a TOF-TOF MS, and a Fourier transform ion cyclotron resonance MS. Presently preferred for use in the analytical instrument of the present invention is a QqTOF MS.

In preferred embodiments, the tandem mass spectrometer is a QqTOF MS and the laser excitation source is a pulsed nitrogen laser, laser fluence at the probe is about 2 to 4 times the minimum desorption threshold, and the tandem mass spectrometer has an external standard mass accuracy of about 20 - 50 ppm.

The analytical instrument of the present invention is designed to engage an affinity capture laser desorption ionization probe. Accordingly, any of the above-described embodiments can include an affinity capture probe engaged in the affinity capture probe interface.

The affinity capture probe in these embodiments will typically have at least one sample adsorption surface positioned in interrogatable relationship to the laser source, the sample adsorption surface selected from the group consisting of chromatographic adsorption surfaces and biomolecule affinity surfaces. Typically, such chromatographic adsorption surface is selected from the group

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 12 -

consisting of reverse phase, anion exchange, cation exchange, immobilized metal affinity capture and mixed-mode surfaces and the biomolecule of the biomolecule affinity surfaces is selected from the group consisting of antibodies, receptors, nucleic acids, lectins, enzymes, biotin, avidin, streptavidin, Staph protein A and Staph protein G.

The affinity capture laser desorption ionization probe can have a plurality of separately addressable sample adsorption surfaces that can be positioned in interrogatable relationship to the laser source and can include at least two different such adsorption surfaces.

In other embodiments, the analytical instrument of the present invention includes a digital computer interfaced with a detector of the tandem mass spectrometer. In some embodiments, the instrument can also further include a software program executable by the digital computer, either local to the computer or communicably accessible to the computer. The software program in such embodiments can be capable of controlling the laser desorption ionization source, or of controlling at least one aspect of data acquisition by the tandem mass spectrometer, or of performing at least one analytical routine on data acquired by said tandem mass spectrometer, or any subset of these functions.

In another aspect, the invention provides a method for analyzing at least one test protein.

The method comprises (a) capturing the test protein or proteins on an affinity capture protein biochip, (b) generating protein cleavage products of the test protein(s) on the protein biochip using a

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 13 -

proteolytic agent; and (c) analyzing at least one protein cleavage product with a tandem mass spectrometer. In these embodiments of this aspect, the analyzing step comprises (i) desorbing the protein cleavage products from the protein biochip into gas phase to generate corresponding parent ion peptides, (ii) selecting a parent ion peptide for subsequent fragmentation with a first mass spectrometer, (iii) fragmenting the selected parent ion peptide under selected fragmentation conditions in the gas phase to produce product ion fragments and (iv) generating a mass spectrum of the product ion fragments. In this fashion, the mass spectrum provides an analysis of the test proteins.

15 In certain embodiments of this aspect of the invention, the method further includes an additional step (d), determining at least one protein identity candidate for a test protein by submitting the mass spectrum to a protein database mining protocol which identifies at least one protein identity candidate for the test protein in the database based on a measure of closeness-of-fit between the mass spectrum and theoretical mass spectra of proteins in the database.

20 In particular of these embodiments, step (d) further comprises submitting the mass of the test protein and the species of origin of the test protein to the protocol.

In other embodiments, the method further comprises (e) comparing the identity candidate to the test protein by: (i) generating a mass spectrum of the protein cleavage products of (b); (ii) submitting the mass spectrum of the protein cleavage products to a computer protocol that determines a measure of

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 14 -

closeness-of-fit between the theoretical mass spectrum of cleavage products of the identity candidate predicted to be generated by using the proteolytic agent, and the mass spectrum of the protein cleavage products, whereby the measure indicates protein cleavage products on the protein biochip that correspond to the test protein.

Yet other embodiments of the method include the further steps of (f), repeating step (c) wherein the selected parent ion peptide does not correspond to a protein cleavage product predicted from the identity candidate; and then (g) repeating (d) for the selected parent ion peptide of (f).

In this aspect of the invention, the test protein can be a protein that is differentially expressed between first and second biological samples. In some of these embodiments, the first and second biological samples are derived from normal and pathological sources.

In a third aspect, the invention provides a method of characterizing binding interactions between a first and second molecular binding partner.

In this aspect, the method comprises binding a second binding partner to a first binding partner, where the said first binding partner is immobilized to a surface of a laser desorption ionization probe; fragmenting the second binding partner; and then detecting at least one of the fragments by a tandem mass spectrometer measurement, whereby the mass spectrum of the detected fragments characterizes the binding interactions.

In certain embodiments of this aspect of the invention, the first binding partner is first

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 15 -

immobilized to a surface of an affinity capture probe before the second binding partner is bound to the first binding partner.

Such immobilizing can be by direct binding of
5 the first partner to the affinity capture probe, such as a covalent bonding. Typical covalent bonding embodiments include covalent bonding between an amine of the first binding partner and a carbonyldiimidazole moiety of said probe surface and between an amino or
10 thiol group of said first binding partner and an epoxy group of the probe surface.

The immobilizing can also be by direct noncovalent bonding, such as a coordinate or dative bonding between the first binding partner and a metal,
13 such as gold or platinum, of the probe surface. The immobilizing can also be by interaction of the first binding partner to a chromatographic adsorption surface selected from the group consisting of reverse phase, anion exchange, cation exchange, immobilized metal
20 affinity capture and mixed-mode surfaces.

Alternatively, the immobilizing can be indirect, which can be covalent, albeit indirect. In certain of these latter embodiments, the first binding partner can be immobilized by covalent bonding through
25 a linker, such as a cleavable linker. Indirect immobilization can also be noncovalent, such as immobilization to the probe via a biotin/avidin, biotin/streptavidin interaction.

In this aspect of the invention, the first
30 molecular binding partner can be selected from the group consisting of protein, nucleic acid, carbohydrate, and lipid. Typically, the first binding partner will be a protein, which can be a naturally

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 16 -

occurring protein from an organism selected from the group consisting of multicellular eukaryote, single cell eukaryote, prokaryote, and virus, or can be a nonnaturally occurring protein, such as a recombinant fusion protein.

In embodiments in which the first binding partner is a protein, the protein can be selected from the group consisting of antibody, receptor, transcription factor, cytoskeletal protein, cell cycle protein, and ribosomal protein, among others.

Binding of the second binding partner to the immobilized first binding partner is, in typical embodiments, effected by contacting the first binding partner with a biologic sample; the sample can be a fluid selected from the group consisting of blood, lymph, urine, cerebrospinal fluid, synovial fluid, milk, saliva, vitreous humor, aqueous humor, mucus and semen, or a cell lysate, or some sample in another form.

In various embodiments, including embodiments in which the first binding partner is a protein, the second binding partner can be a protein. Alternatively, the second binding partner can be a compound present in a combinatorial library, where binding of the second binding partner to the first binding partner is effected by contacting the first binding partner with an aliquot of a chemically synthesized combinatorial library. In yet other alternatives, the second binding partner can be a component of biologically displayed combinatorial library, such as a phage-displayed library.

In certain typical embodiments, fragmenting is effected by contacting the second binding partner

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 17 -

with an enzyme; where the second binding partner is a protein, the enzyme is typically a specific endoprotease, such as trypsin, Glu-C (V8) protease, endoproteinase Arg-C (serine protease), endoproteinase Arg-C (cysteine protease), Asn-N protease, and Lys-C protease. Alternatively, fragmenting can be effected by contacting said second binding partner with a liquid phase chemical, such as CNBr.

In some embodiments, the method further comprises, after binding of the second binding partner to said first binding partner, and before fragmenting the second binding partner, of denaturing the second binding partner.

In various embodiments, the method further comprises the step, after fragmenting the second binding partner, of washing the probe with a first eluant, and, at times, a second eluant, the second eluant differing from the first eluant in at least one elution characteristic, such as pH, ionic strength, detergent strength, and hydrophobicity.

In typical embodiments, the method further comprises, after fragmenting and before detecting the fragments of the second binding partner, the step of applying energy absorbing molecules to the probe. In preferred embodiments, the probe is then engaged in the affinity capture probe interface of the analytical instrument of the present invention, and fragments of the second binding partner ionized and desorbed from the probe using the instrument's laser source.

The instrument can be used to make several types of useful measurements in this method, including a measurement of all ion masses, a measurement of

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 18 -

masses of a subset of fragments, and a single ion monitoring measurement.

Usefully, embodiments of the method include the step, after mass spectrometric measurement of
5 fragments of the second binding partner, of comparing the fragment measurements with those predicted by applying cleavage rules of the fragmenting enzyme to the primary amino acid sequence of the second binding partner, whereby such comparison characterizes the
10 intermolecular interactions.

If the identity of the second binding partner is not known, the method can further comprise, before such comparison, identifying the second binding partner through ms/ms analysis. such MS/MS analysis can
15 include the steps of mass spectrometrically selecting a first fragment of the second binding partner; dissociating the second binding partner first fragment in the gas phase; measuring the fragment spectrum of the second binding partner first fragment, and then
20 comparing the fragment spectrum to fragment spectra predicted from amino acid sequence data prior-accessioned in a database. The amino acid sequence data can be selected from the group consisting of empiric and predicted data, and the dissociating, in
25 typically embodiments, is collision induced dissociation.

In some embodiments of the method, the first binding partner is selected from the group consisting of an antibody, a T cell receptor, and an MHC molecule.
30 In other embodiments, the first binding partner is a receptor and the second binding partner is selected from the group consisting of an agonist of the receptor, a partial agonist of the receptor, an

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 19 -

antagonist of said receptor, and a partial antagonist of said receptor. In other embodiments, the first binding partner is a glycoprotein receptor and the second binding partner is a lectin.

5 In a fourth aspect, the invention provides a method of detecting an analyte, the method comprising engaging a affinity capture probe in the affinity capture probe interface of the analytical instrument of the present invention, the affinity capture probe
10 having an analyte bound thereto; desorbing and ionizing the analyte or fragments thereof from the probe using the instrument's laser source; and then detecting the analyte by a tandem mass spectrometer measurement on the desorbed ions.

15 In this aspect, the method can further comprise, after the desorbing and ionizing step and before detecting, effecting collision induced dissociation of said desorbed ions. Before such dissociation, in some embodiments a subset of ions can
20 be selected for collisional dissociation.

In other embodiments, the antecedent step can be performed of adsorbing analyte to the probe, and in yet other embodiments, a step can be performed after adsorbing analyte and prior to engaging said probe in
25 said probe interface, of adherently contacting said probe and said analyte with energy absorbing molecules.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The above and other objects and advantages of the present invention will be apparent upon
30 consideration of the following detailed description taken in conjunction with the accompanying drawings, in

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 20 -

which like characters refer to like parts throughout,
and in which:

FIG. 1 schematizes an embodiment of the
analytical instrument of the present invention;

5 FIG. 2 shows in greater detail the elements
of an orthogonal QqTOF tandem mass spectrometer
preferred for use in the analytical instrument of the
present invention;

10 FIG. 3 displays the seminal fluid protein
profiles of a single BPH and prostate cancer patient;

FIG. 4 shows results of on-probe isolation of
one of the upregulated proteins detectable in FIG. 3;

15 FIG. 5 shows peptides detected by a single
phase of MS analysis after the enriched biomarker
candidate was exposed to in situ digestion using
trypsin;

FIG. 6 shows LDI Qq-TOF MS analysis of the
same purified protein peptides on the analytical device
of the present invention; and

20 FIG. 7 shows MS/MS results from the
analytical device of the present invention of a
selected doubly charged ion of the enriched biomarker
candidate.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

25 I. Definitions

As used herein, the terms set forth with
particularity below have the following definitions. If
not otherwise defined, all terms used herein have the
meaning commonly understood by a person skilled in the
30 arts to which this invention belongs.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 21 -

"Analyte" refers to any component of a sample that is desired to be detected. The term can refer to a single component or a plurality of components in the sample.

5 "Probe" refers to a device that, when positionally engaged in interrogatable relationship to a laser desorption ionization source and in concurrent communication at atmospheric or subatmospheric pressure with a gas phase ion spectrometer, can be used to
10 introduce ions derived from an analyte into the spectrometer. As used herein, the "probe" is typically reversibly engageable by a probe interface.

"Affinity capture probe" refers to a probe that binds analyte through an interaction that is
15 sufficient to permit the probe to extract and concentrate the analyte from an inhomogeneous mixture. Concentration to purity is not required. The binding interaction is typically mediated by adsorption of analyte to an adsorption surface of the probe. The
20 term ProteinChip® Array refers to affinity capture probes that are commercially available from CIPHERGEN Biosystems, Inc., Fremont, California, for use in the present invention.

"Adsorption" refers to detectable noncovalent
25 binding of an analyte to an adsorbent.

"Adsorbent" refers to any material capable of adsorbing an analyte. The term "adsorbent" is used herein to refer both to a single material ("monoplex adsorbent") (e.g., a compound or a functional group)
30 and to a plurality of different materials ("multiplex adsorbent"). The adsorbent materials in a multiplex adsorbent are referred to as "adsorbent species." For

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 22 -

example, a laser-addressable adsorption surface on a probe substrate can comprise a multiplex adsorbent characterized by many different adsorbent species (e.g., anion exchange materials, metal chelators, or antibodies) having different binding characteristics.

"Adsorption surface" refers to a surface having an adsorbent.

"Chromatographic adsorption surface" refers to a surface having an adsorbent capable of chromatographic discrimination among or separation of analytes. The phrase thus includes surfaces having anion exchange moieties, cation exchange moieties, reverse phase moieties, metal affinity capture moieties, and mixed-mode adsorbents, as such terms are understood in the chromatographic arts.

"Biomolecule affinity surface" refers to a surface having an adsorbent comprising biomolecules capable of specific binding.

"Specific binding" refers to the ability of two molecular species concurrently present in a heterogeneous (inhomogeneous) sample to bind to one another preferentially over binding to other molecular species in the sample. Typically, a specific binding interaction will discriminate over adventitious binding interactions in the reaction by at least two-fold, more typically more than 10- to 100-fold. When used to detect analyte, specific binding is sufficiently discriminatory when determinative of the presence of the analyte in a heterogeneous (inhomogeneous) sample. Typically, the affinity or avidity of a specific binding reaction is least about 10^{-7} M, with specific binding reactions of greater specificity typically

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 23 -

having affinity or avidity of at least 10^{-6} M to at least about 10^{-9} M.

"Energy absorbing molecules" and the equivalent acronym "EAM" refer to molecules that are capable, when adhered to a probe, of absorbing energy from a laser desorption ionization source and thereafter contributing to the desorption and ionization of analyte in contact therewith. The phrase includes all molecules so called in U.S. Patent Nos. 5,719,060, 5,894,063, 6,020,208, and 6,027,942, the disclosures of which are incorporated herein by reference in their entireties. The phrase explicitly includes cinnamic acid derivatives, sinapinic acid ("SPA"), cyano hydroxy cinnamic acid ("CHCA") and dihydroxybenzoic acid.

"Tandem mass spectrometer" refers to any gas phase ion spectrometer that is capable of performing two successive stages m/z-based discrimination of ions in an ion mixture. The phrase includes spectrometers having two mass analyzers as well as those having a single mass analyzer that are capable of selective acquisition or retention of ions prior to mass analysis. The phrase thus explicitly includes QqTOF mass spectrometers, ion trap mass spectrometers, ion trap-TOF mass spectrometers, TOF-TOF mass spectrometers, and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometers.

"Eluant" refers to an agent, typically a solution, that is used to affect or modify adsorption of an analyte to an adsorbent of an adsorption surface. Eluants also are referred to herein as "selectivity threshold modifiers."

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 24 -

"Elution characteristic" refers to a physical or chemical characteristic of an eluant that contributes to its ability to affect or modify adsorption of an analyte to an adsorbent of an adsorption surface. Two eluants have different elution characteristics if, when put in contact with an analyte and adsorbent, the degree of affinity of the analyte for the adsorbent differs. Elution characteristics include, for example, pH, ionic strength, degree of chaotropism, detergent strength, and temperature.

"Biologic sample" and "biological sample" identically refer to a sample derived from at least a portion of an organism capable of replication. As used herein, a biologic sample can be derived from any of the known taxonomic kingdoms, including virus, prokaryote, single celled eukaryote and multicellular eukaryote. The biologic sample can derive from the entirety of the organism or a portion thereof, including from a cultured portion thereof. Biologic samples can be in any physical form appropriate to the context, including homogenate, subcellular fractionate, lysate and fluid.

"Biomolecule" refers to a molecule that can be found in, but need not necessarily have been derived from, a biologic sample.

"Organic biomolecule" refers to an organic molecule that can be found in, but need not necessarily have been derived from, a biologic sample, such as steroids, amino acids, nucleotides, sugars, polypeptides, polynucleotides, complex carbohydrates and lipids.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 25 -

"Small organic molecule" refers to organic molecules of a size comparable to those organic molecules generally used in pharmaceuticals. The term excludes organic biopolymers (e.g., proteins, nucleic acids, etc.). Small organic molecules as used herein typically range in size up to about 5000 Da, up to about 2500 Da, up to about 2000 Da, or up to about 1000 Da.

"Biopolymer" refers to a polymer that can be found in, but need not necessarily have been derived from, a biologic sample, such as polypeptides, polynucleotides, polysaccharides and polyglycerides (e.g., di- or tri-glycerides).

"Fragment" refers to the products of the chemical, enzymatic, or physical breakdown of an analyte. Fragments may be in a neutral or ionic state.

The terms "polypeptide", "peptide", and "protein" are used interchangeably herein to refer to a naturally-occurring or synthetic polymer comprising amino acid monomers (residues), where amino acid monomer here includes naturally-occurring amino acids, naturally-occurring amino acid structural variants, and synthetic non-naturally occurring analogs that are capable of participating in peptide bonds.

Polypeptides can be modified, e.g., by the addition of carbohydrate residues to form glycoproteins. The terms "polypeptide," "peptide" and "protein" include glycoproteins as well as non-glycoproteins.

"Polynucleotide" and "nucleic acid" equivalently refer to a naturally-occurring or synthetic polymer comprising nucleotide monomers (bases). Polynucleotides include naturally-occurring

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 26 -

nucleic acids, such as deoxyribonucleic acid ("DNA") and ribonucleic acid ("RNA"), as well as nucleic acid analogs. Nucleic acid analogs include those which include non-naturally occurring bases, and those in which nucleotide monomers are linked other than by the naturally-occurring phosphodiester bond. Nucleotide analogs include, for example and without limitation, phosphorothioates, phosphorodithioates, phosphotriesters, phosphoramidates, boranophosphates, methylphosphonates, chiral-methyl phosphonates, 2-O-methyl ribonucleotides, peptide-nucleic acids (PNAs), and the like.

As used herein, "molecular binding partners" - and equivalently, "specific binding partners" - refer to pairs of molecules, typically pairs of biomolecules, that exhibit specific binding. Nonlimiting examples are receptor and ligand, antibody and antigen, biotin and avidin, and biotin and streptavidin.

"Receptor" refers to a molecule, typically a macromolecule, that can be found in, but need not necessarily have been derived from, a biologic sample, and that can participate in specific binding with a ligand. The term further includes fragments and derivatives that remain capable of specific ligand binding.

"Ligand" refers to any compound that can participate in specific binding with a designated receptor or antibody.

"Antibody" refers to a polypeptide substantially encoded by at least one immunoglobulin gene or fragments of at least one immunoglobulin gene,

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 27 -

that can participate in specific binding with a ligand. The term includes naturally-occurring forms, as well as fragments and derivatives. Fragments within the scope of the term as used herein include those produced by digestion with various peptidases, such as Fab, Fab' and F(ab)'₂ fragments, those produced by chemical dissociation, by chemical cleavage, and recombinantly, so long as the fragment remains capable of specific binding to a target molecule. Typical recombinant fragments, as are produced, e.g., by phage display, include single chain Fab and scFv ("single chain variable region") fragments. Derivatives within the scope of the term include antibodies (or fragments thereof) that have been modified in sequence, but remain capable of specific binding to a target molecule, including interspecies chimeric and humanized antibodies. As used herein, antibodies can be produced by any known technique, including harvest from cell culture of native B lymphocytes, hybridomas, recombinant expression systems, by phage display, or the like.

"Antigen" refers to a ligand that can be bound by an antibody. An antigen need not be immunogenic. The portions of the antigen that make contact with the antibody are denominated "epitopes".

"Fluence" refers to the energy delivered per unit area of interrogated image.

II. Affinity Capture Probe Tandem Mass Spectrometer

In a first aspect, the present invention provides an analytical instrument that combines the

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 28 -

advantages of affinity capture laser desorption ionization sample introduction with the advantages of high accuracy, high mass resolution, tandem mass spectrometers. The combination provides significant advantages over existing devices for performing known techniques. Furthermore, the new instrument makes possible new methods of protein discovery and makes possible new methods of identifying and characterizing molecular interactions between and among specific binding partners that are more at once more efficient and more sensitive than existing approaches. The instrument will first briefly be described as a whole; thereafter, features of the affinity capture probe interface will be described in greater detail.

Briefly, with reference to FIG. 1, instrument 100 comprises laser desorption/ionization source 13; affinity capture probe interface 10, and tandem mass spectrometer 14. Shown in FIG. 1 is a preferred embodiment in which laser source 12 is a pulsed nitrogen laser and tandem mass spectrometer 14 is an orthogonal quadrupole time-of-flight mass spectrometer (QqTOF) tandem MS.

Laser desorption/ionization source

Laser desorption/ionization source 13 produces energetic photons that, properly conditioned and directed, desorb and ionize proteins and other analytes adherent to affinity capture probe 16. Laser desorption/ionization source 13 comprises laser source 12, laser optical train 11, and, optionally, probe viewing optics 18.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 29 -

Laser desorption/ionization source 13 produces pulsed laser energy either through use of a pulsed laser 12 or, alternatively, by mechanically or electronically chopping the beam from a continuous laser 12. Typically, pulsed lasers are preferred. Preferred pulsed laser sources include nitrogen lasers, Nd:YAG lasers, erbium:YAG lasers, and CO₂ lasers. Presently preferred is a pulsed nitrogen laser, due to simple footprint and relatively low cost.

Photons emitted from laser 12 are directed to strike the surface of probe 16 by laser optical train 11. Optical train 11 can consist of an arrangement of lenses, mirrors, prisms, attenuators, and/or beam splitters that function to collect, direct, focus, sub-divide, and control the intensity of each laser pulse so that an appropriate desorption fluence in the form of a focused spot of desorption energy is delivered to probe 16.

Alternatively, optical train 11 can consist of a fiber optic array that functions to collect, direct, and sub-divide the energy of each laser pulse.

In this embodiment, the output of laser 12 is coupled to the input side of an optical fiber using an optical coupler; the coupler is typically comprised of a lens whose focal length and diameter is appropriate for the input numerical aperture of the fiber.

The amount of energy entering the fiber can be controlled by prudent adjustment of the lens position with respect to the fiber; in this instance, the fiber optical coupler can double as an optical attenuator. In another preferred arrangement, the total output energy of the laser is coupled into the fiber and an attenuator is placed between the output

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 30 -

side of the optical fiber and the desorption spot focusing elements of the optical train. In yet another preferred arrangement, an optical attenuator is placed between the laser and the optical fiber coupler. In all instances, optical attenuation is employed to insure the delivery of appropriate laser fluence to the surface of probe 16 independent of the output energy of laser 12. Typical laser fluences are on the order of 20 - 1000 pJoules/square millimeter.

As it is well established that fiber optic components can often be damaged when accepting focused energy from lasers, it is advantageous to maximize the acceptance area of the input side of the fiber so that the fluence of the incident laser energy is below the damage threshold of the fiber. The latter also simplifies alignment of the laser beam with the optical fiber when adjusting the relative position of the optical coupler with respect of the laser and optical fiber. However, in order to obtain reasonable desorption fluence levels at probe 16, a maximum exit side fiber diameter of 400 μm (microns) should not be exceeded when used with typical nitrogen lasers delivering a maximum energy of about 200 μJ /laser pulse. A solution to this problem lies in the incorporation of a tapered optical fiber whose input side has a diameter on the order of 400 to 1200 microns and output side has a diameter of 200 to 400 microns.

Typically, the desorption spot should be focused to a size that maximizes the generation of ions for each pulse by interrogating the greatest area of probe 16 while maintaining sufficient fluence to induce desorption and ionization. While using typical nitrogen lasers delivering a maximum energy of about

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 31 -

200 μ J/pulse in a laser desorption/ionization source coupled to a quadrupole-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer, an optimum laser spot area has been determined to range between 0.4 and 0.2 square millimeters.

Laser desorption/ionization source 13 can include, typically as an integral part of optical train 11, probe viewing optics 18. Viewing optics 18 can contain an illumination source, lenses, mirrors, prisms, dichroic mirrors, band-pass filters, and a CCD camera to allow the illumination and viewing of the desorption locus, i.e., the region of probe 16 to be interrogated by laser.

Where laser optical train 11 comprises an optical fiber, viewing optics 18 can take advantage of light from the optical fiber itself.

For example, the fiber optic coupler can be bifurcated to split off a small fraction of the laser excitation energy to be used as a means of monitoring the applied laser energy, or it can be bifurcated to allow the introduction of visible light to illuminate the desorption locus.

In the first of these two embodiments, a small fraction of the excitation energy is directed to impinge upon a photo-detector that is an integral component of a laser energy circuit calibrated to reflect the actual amount of laser energy delivered to probe 16. In the second embodiment, visible light is directed to illuminate the desorption locus making viewing of this region possible, either through a separate set of photo optics coupled to a CCD camera or by the employment of a prism or dichroic mirror, between the optical fiber and the laser excitation

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 32 -

source, that directs light reflected up the main branch of the optical fiber towards a CCD camera. Alternatively, a prism or dichroic mirror can be placed in line between the illuminating fiber branch of the
5 optical fiber and the illumination source to allow any back reflected images that couple into this branch to be directed to impinge upon a CCD camera. In yet another embodiment, the fiber can be trifurcated so that one branch delivers desorption /ionization laser
10 pulses, the second branch delivers visible light for illuminating the desorption locus, and the third branch transmits reflected light from the desorption locus to a CCD camera. For each of these viewing schemes, an appropriate band-pass filter should be deployed between
15 the CCD camera and viewing optical train to prevent the transmission of possibly damaging high energy photons that arise as the direct reflection of the incident laser pulse upon the probe surface or are secondary photons emitted from the probe surface as a direct
20 consequence of electronic excitation by the incident laser pulse.

Probe interface

Affinity capture probe interface 10 is capable of reversibly engaging affinity capture
25 probe 16, positioning probe 16 in interrogatable relationship to laser source 12 and concurrently in communication with tandem mass spectrometer 14; the communication supports atmospheric to subatmospheric pressure.

30 Probe interface 10 comprises a probe holder, probe introduction port, probe position actuator

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 33 -

assembly, vacuum and pneumatic assembly, and an interface ion collection system.

The probe holder is a component of probe interface 10 shaped to conform to the form factor of probe 16. Where probe 16 is a ProteinChip® Array (Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, CA USA), the probe holder conforms to the form factor of the ProteinChip® Array.

The probe holder can hold a single probe 16 or a plurality of probes 16. The holder positions each probe 16 in proper orientation to be interrogated by laser desorption/ionization source 13 and with respect to the interface ion collection system.

The probe holder makes intimate contact with a position actuator assembly.

The actuator assembly moves the relative position of probe 16 with respect to laser desorption/ionization source 13 and the interface ion collection system so that different regions of the probe can be interrogated and ions resulting from such irradiation collected for introduction into tandem mass spectrometer 14.

The actuator consists of electro-mechanical devices that support translational and/or rotational movement of probe 16 while maintaining the probe's position with respect to the laser desorption/ionization source and ion collection system constant. Such electro-mechanical devices include but are not limited to mechanical or optical position sensors, solenoids, stepper motors, DC or AC synchronous motors that either directly or indirectly communicate with linear motion actuators, linear or

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 34 -

circular motion guide rails, gimbals, bearings, or axles.

A probe introduction port allows the probe holder, containing loaded probes 16, to be placed onto
5 the probe position actuator assembly without introducing undue levels of atmospheric gas into the probe interface 10 and tandem mass spectrometer 14.

In order to accomplish the latter, the probe introduction port uses a vacuum evacuation system (the
10 probe introduction port evacuation system) to pump out atmospheric gas, achieving a target port pressure prior to moving the chip into the working position. During probe exchange, the probe actuator assembly moves the probes from the working position (that position in
15 alignment with laser desorption source 13 and the ion collection system) to an exchange position. In doing so, the actuator can provide a seal between the exchange port that is soon to be raised to atmospheric pressure, and the inlet of the mass spectrometer.
20 After sealing off the mass spectrometer inlet, atmospheric gas is introduced into the probe introduction port by a probe introduction port pressurization system. This eliminates the pressure difference between the atmospheric surface of the probe
25 holder and the introduction port, allowing the probe holder to be removed from the probe position actuator assembly.

Following the removal of previously analyzed probes 16 and the installation of new probes 16, the
30 probe holder is replaced into its position actuator and the sample loading process begins. As previously described, the probe introduction port can be pumped down to sub-atmospheric pressure by the evacuation

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 35 -

system. Upon achieving the target sample introduction pressure, the probe actuator system moves probe 16 from the exchange position to the working position, and in doing so opens the seal to the mass spectrometer inlet.

5 Where, alternatively, ions are generated in a desorption chamber held at atmospheric pressure and ultimately directed to an ion optic assembly that introduces the ions to the mass spectrometer inlet, it is not necessary to evacuate and pressurize the probe introduction port since it will be maintained at
10 atmospheric pressure.

 The probe introduction port evacuation system consists of a vacuum pump, pressure sensor, vacuum compatible tubing and connecting fittings, as well as
15 vacuum compatible valves that, when acting in concert, allow the controlled evacuation of atmospheric gas contained within the introduction port following sample exchange so that probes 16 can be moved into the working position. The vacuum pump can be, but is not
20 limited to, a single stage or multi-stage oil mechanical pump, a scroll pump, or oil-free diaphragm pump. In a preferred embodiment, the vacuum compatible valves are electrically controlled solenoid valves. In the same embodiment, the pressure sensor is an
25 electronic sensor capable of operating in pressure domains ranging from atmospheric pressure to 1 millitorr. Such pressure sensors include but are not limited to thermocouple gauges and pirani gauges. In the same embodiment, concerted operation of this system
30 is achieved under logic controlled provided by an analog logic circuit or digital microprocessor that reconciles inputs from the pressure gauge and positional sensors to allow for automated evacuation of

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 36 -

the sample port as part of the overall instrument operation.

The probe introduction port pressurization system consists of a gas source, pressure sensor, gas
5 conducting tubing and fittings, and gas compatible valves that, when acting in concert, allow the controlled introduction of gas that pressurizes the exchange port, thus allowing removal of the probe holder from the actuator assembly.

10 In one embodiment, the gas source is untreated atmospheric gas. In another embodiment, the gas source is atmospheric gas that is first directed through a moisture absorbent trap and optionally
15 secondly through a particulate filter prior to introduction to the pressurization system. In another embodiment, pressurizing gas is supplied by a purified source of dry inert gas such as nitrogen or any of the cost-effective noble gases in lieu of using atmospheric gas.

20 In a preferred embodiment, the gas conducting tubing, fittings, some of the valves, and pressure sensor of the pressurization system are those used in the evacuation system. In the same embodiment,
25 logic control provided by an analog logic circuit or digital microprocessor that utilizes inputs from the pressure gauge and positional sensors to allow for automated pressurizing of the sample port as part of the overall instrument operation.

30 The probe interface pressure regulation system functions to provide selective background gas pressure in the desorption chamber that exists between the sample presenting (adsorption) surface of probe 16

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 37 -

and the ion collection system. Acceptable desorption chamber pressure ranges extend from atmospheric pressure to 0.1 microtorr. A preferred pressure range extends from 1 torr to 1 millitorr. The probe

5 interface pressure regulation system consists of a gas source, gas conducting tubing and fittings, a gas flow regulator, and a pressure sensor. The gas source can be untreated atmospheric gas. In another embodiment, the gas source is atmospheric gas that is first

10 directed through a moisture absorbent trap and optionally secondly through a particulate filter prior to introduction to the regulation system. In another embodiment, regulation gas is supplied by a purified source of dry inert gas such as nitrogen or any of the

15 cost-effective noble gases. The gas flow regulator may be a manually controlled flow restrictor. Alternatively, gas flow regulation may be achieved by using an electronically controlled flow restrictor. In a preferred embodiment, close loop control of preferred

20 desorption chamber pressure is achieved in an automated fashion under logic control provided by an analog logic circuit or digital microprocessor that actively interacts with an automated gas flow regulator to achieve a pre-established reading from the pressure

25 gauge.

The interface ion collection system consists of electrostatic ion collection assembly, an optional pneumatic ion collection assembly, and an electrostatic or RF ion guide. The electrostatic ion collection

30 assembly consists of an arrangement of DC electrostatic lens elements that function to collect ions desorbed within the desorption chamber and direct them towards the mass spectrometer inlet.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 38 -

In one embodiment, this assembly consists of two electrostatic elements. The first element is comprised of the probe holder and probe surface and the second is an extractor lens. The extractor lens is
5 arranged to be between 0.2 to 4 mm away from the surface of the array. The extractor lens contains an aperture ranging from 2 mm to 20 mm in diameter that is concentrically located about a normal axis that extends from the center of the desorption locus to the center
10 of the mass spectrometer inlet. Independent DC potentials are applied to each element of this assembly.

In a preferred embodiment, the extractor lens contains a 10 mm diameter aperture and is located 1 mm
15 away from the array surface. In the same preferred embodiment, a ten volt potential difference is established between the extractor and array.

The pneumatic ion collection assembly consists of a gas source, conducting tubing, tubing
20 connectors, gas flow regulators, gas pressure sensors, and a gas emission port so that a predetermined flow of gas can be created to assist the bulk transfer of desorbed ions within the desorption chamber into the mass spectrometer inlet.

25 The gas source can be untreated atmospheric gas. In another embodiment, the gas source is atmospheric gas that is first directed through a moisture absorbent trap and optionally secondly through a particulate filter prior to introduction to the
30 system. In another embodiment, ion collection gas is supplied by a purified source of dry inert gas such as nitrogen or any of the cost-effective noble gases.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 39 -

The gas flow regulator can be a manually controlled flow restrictor. Alternatively, gas flow regulation can be achieved by using an electronically controlled flow restrictor. The pressure sensor can be
5 but is not limited to thermocouple gauges and pirani gauges. The gas emission port is located behind probe 16 to induce bulk gas flow around the probes and down the normal axis centrally located between the desorption locus and the mass spectrometer inlet.

10 In a preferred embodiment the flow of gas is under automatic closed loop control by the use of analog or digital control circuitry so that an adequate ion-sweeping flow is generated without over-pressurizing the desorption chamber.

15 The final component of the interface ion collection system is the ion guide. The ion guide functions to transfer the collected ions into mass spectrometer 14. It can be of the electrostatic or RF variety. A preferred embodiment is a multipolar RF ion
20 guide. An example of the latter is a quadrupole or hexapole ion guide. In the preferred Qq-TOF instrument described in greater detail below, the ion guide is a quadrupole RF ion guide. Ions are directed into the ion guide by electrostatic and pneumatic accelerative
25 forces, respectively created by the electrostatic and pneumatic ion collection systems. In a preferred embodiment the DC electrostatic potential of the ion guide is less than that of the extractor lens by typically 10 to 20 volts.

30 Tandem Mass Spectrometer

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 40 -

The analytical instrument of the present invention further includes tandem mass spectrometer 14. Tandem mass spectrometer 14 can usefully be selected from the group that includes orthogonal quadrupole
5 time-of-flight (Qq-TOF), ion trap (IT), ion trap time-of-flight (IT-TOF), time-of-flight time-of-flight (TOF-TOF), and ion cyclotron resonance (ICR) varieties.

Presently preferred, and further described in detail below, is an orthogonal Qq-TOF MS.

10 The major strengths of the QqTOF MS are outstanding mass accuracy and resolving power; enhanced sensitivity in the peptide and low *m/z* range; and superior ms/ms performance by employing low energy collision induced dissociation (CID). An orthogonal
15 QqTOF with electrospray ionization source is available commercially from AB/MDS Sciex (QSTAR™; AB/MDS-Sciex, Foster City, California, USA).

With reference to FIG. 2, the principles and features of the QqTOF will be briefly outlined.

20 Ions are created in a desorption chamber prior to the first quadrupole lens "q0". Pressure within q0 is typically maintained at about 0.01 to 1 torr, but can also be maintained at atmospheric pressure. In this manner, desorbed ions are rapidly
25 cooled by collisions with the background gas shortly after their formation.

This cooling or damping of the ion population provides three major advantages.

30 First, the cooling eliminates the initial energy distributions of the desorbed ions and reduces their total energy down to a point that approximates their thermal energy. This simplifies the orthogonal extraction requirement, compensating for variations in ion position and energy, thus improving ultimate

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 41 -

resolving power. A direct consequence of this improved resolution is enhanced mass accuracy down to the low ppm level.

The second major advantage of collisional cooling is its ability to decrease the rate of long term ion decay. Gas collisions relax internal excitation and improve the stability of peptide and protein ions. This stabilizing effect appears to be maximized when ions are created in the presence of about 1 torr pressure of background gas. Measurements published by others have indicated that losses of small groups and background fragmentation can be practically eliminated, improving the transmission of high mw proteins and other labile biopolymers (i.e. glycoconjugates, DNA, etc.). Faster decay mechanisms (prompt and in-source type decay) still occur.

The final advantage of q0 collisional cooling is in the creation of a pseudo-continuous flow of ions into the mass analyzer. Ion collisions in q0 cause the desorption cloud to spread out along the axis of q0. This spreading creates a situation in which ions from various desorption events begin to overlap, creating an electrospray-like continuous introduction of ions into the analyzer.

After passing through q0, ions enter a second quadrupole 22 ("Q1"). This quadrupole functions as either an ion guide or as a mass filter. It is here that ion selection is created for ms/ms or single ion monitoring (SIM) experiments.

After exiting Q1, ions enter a third quadrupole 24 ("q2") positioned in collision cell 26. During simple experiments, q2 is operated as a simple rf ion guide. For ms/ms experiments, q2 is filled with collision gas at a pressure of about 10^{-2} torr to promote low energy CID.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 42 -

After exiting q2, ions are slightly accelerated by a DC potential difference applied between the exit of q2 and focusing grid 28. This acceleration "biases" the velocities of the ions in the Y-axis so that their velocities are now inversely related to the square root of their m/z. This must be accomplished if all ions of different m/z are to strike the detector after orthogonal extraction and free flight. If such biasing is not accomplished, ions of different m/z will enter the orthogonal extraction region with the same Y-axis velocity.

As always in time-of-flight, ions of lower m/z will strike the detector before ions of greater m/z. The absolute degree of displacement in the Y-axis will be a product of an ion's flight time in the Z-axis and an ion's Y-axis velocity. If the detector is placed at some location optimized for intermediate m/z ions, lighter ions will "undershoot" the detector arriving to the right side of the detector in FIG. 2. Conversely, ions of greater m/z will "overshoot" the detector and arrive at the left side of the detector in FIG. 2. Consequently, it is necessary for all ions to maintain a constant ratio of Z- and Y-axis velocities if all ions are to strike a common detection point. The previously described grid biasing method accomplishes this.

After passing through focusing grid 28, ions arrive in modulator region 30 of the orthogonal extraction elements. Modulator 30 is pulsed at rates approaching 10,000 pulses/second (10 MHz). Ions are pushed into accelerator column 32 of the ion optic and exit out into free flight region 34 of the orthogonal time-of-flight (O-TOF). Energy correction is achieved when the ions enter ion mirror 36. In the mirror, ions are turned around and are directed to strike fast response, chevron array microchannel plate detector 38.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 43 -

Alternatives to this prototypical arrangement can be used.

For example, the geometry presented above presents the difficulty of performing O-TOF at high acceleration energies. It is well established that ion detection sensitivity for peptides and proteins is improved as total ion energy increases. For human insulin (MW = 5807.65 Da), detection efficiency approaches 100% at ion energies of 35 keV when using typical microchannel plate detectors. If the ions are to be accelerated to 20 or 30 keV of energy, free flight tube liner 40 and other corresponding components must be floated to - 20 kV or - 30 kV, respectively. The difficulties in providing stable electrical isolation on simple ion optic elements at such potentials are well known. To safely and reliably float a plurality of elements at such potentials is difficult. One solution is the employment of post-acceleration technology.

Unlike the device described above, such an alternative device employs a detector post accelerator (not shown). Ions are accelerated to about 4 keV of energy after leaving the orthogonal extraction elements and the free flight region is floated at - 4 kV. Further acceleration is achieved as ions enter a post-accelerator detector assembly. In this assembly, ions pass through a field-retaining grid held at liner potential. Ions then receive additional acceleration in a field established between the field-retaining grid and the primary ion conversion surface of the detector. Such acceleration fields are on the order of 10 to 20 kV over 4 to 10 mm distances.

Because the orthogonal design uncouples the time of flight measurement from ion formation, a number of advantages are realized.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 44 -

Laser fluence related problems, such as peak broadening due to ion shielding and ion acceleration field collapse, are eliminated because ions of the desorption plume have an extended period of time (typically a few milliseconds) to expand and cool prior to orthogonal extraction and acceleration into the TOF mass analyzer. Additionally, orthogonal extraction eliminates much of the large hump and baseline anomaly seen at the beginning of high laser energy, conventional extraction spectra due to the chemical noise created by the excessive neutral load of the EAM. Because neutrals are not extracted in the modulator region, only ions are transmitted down to the detector and chemical noise is appreciably reduced.

These factors allow the use of laser fluences that are 2 - 3 times greater than those normally employed during parallel continuous or delayed ion extraction approaches. The net result is an almost complete elimination of the need to hunt and search for "sweet spots" even in the presence of poor sample-EAM homogeneity, as well as improved external standard mass accuracy determination (typical errors are between 20 - 50 ppm), improved quantitative reproducibility, and improved signal to noise. An additional benefit is the elimination of the need to perform low and high laser energy scans to analyze ions of a broad m/z range. A single laser fluence can now be employed to see both low and high m/z ions, greatly simplifying the analysis of unknown mixtures.

Perhaps one of the most impressive advantages of this device when compared to conventional parallel extraction approaches lies in its ability to obviate the need for rigid sample positioning requirements. Because the TOF measurement is substantially removed from the ion formation process, the original position of the ion is no longer important. Furthermore, since

WO 02/31484

PCT/US00/28261

~ 45 ~

ion formation is accomplished in a high-pressure environment without concomitant application of high voltage extraction fields, the design requirements of solid-state sample inlet systems are greatly relieved.

5 Simple approaches can be taken to employ 2-dimensional sample manipulators while maintaining excellent, external-standard mass accuracy performance. Additionally, sample presenting surfaces no longer need to be made of metals or other conductive media.

10 To summarize, the laser desorption ionization (LDI) Qq-TOF MS has the following advantages over existing LDI-TOF MS technology: (1) increased external standard mass accuracy (20 - 50 ppm typical); (2) enhanced resolution; (3) improved ms/ms efficiency;
15 (4) improved ease of signal production using a single high laser energy level that eliminates the need for high and low energy scans; (5) improved quantitative ability through the use of TDC technology and laser fluences 2 - 4 times above minimum desorption
20 threshold; (6) reduced requirements for 2-dimension sample actuators; (7) potential for using plastic components for sample presenting probe surfaces (injection molded two dimensional probe arrays, for example); (8) reduced chemical noise by using single
25 ion monitoring and enhanced ability to measure for ions in the EAM chemical noise domain.

The laser desorption ionization (LDI) Qq-TOF MS has the following advantages over existing MALDI-PSD approaches in protein characterization and
30 identification.

The LDI-QqTOF provides higher mass resolving power and mass accuracy; in database mining approaches, this increased capability reduces the number of false positive database hits, simplifying identification.
35 Furthermore, the QqTOF also provides greater than an

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 46 -

order of magnitude greater sensitivity than can be obtained with PSD MS/MS.

The analytical instrument of the present invention demonstrates impressive MS/MS capability and less than 20 ppm mass assignment error for single MS analysis. The latter has allowed the identification of a number of proteins simultaneously retained on the surface of a single affinity capture probe.

Other Components

10 Affinity capture probe tandem MS instrument typically further comprises a digital computer interfaced with the tandem mass spectrometer detector. The digital computer is typically further interfaced with laser desorption source 12, permitting the
15 computer both to control ion generation and to participate in data acquisition and analysis.

Analysis software can be local to the computer or can be remote, but communicably accessible to the computer. For example, the computer can have a
20 connection to the internet permitting use of analytical packages such as Protein Prospector, PROWL, or the Mascot Search Engine, which are available on the world wide web. The analysis software can also be remotely resident on a LAN or WAN server.

Affinity Capture Probes

To conduct analyses, such as those described in detail in sections herein below, at least one affinity capture probe 16 having adsorbed analyte is engaged in probe interface 13 in position to be
30 interrogated by laser desorption/ionization source 13 and to deliver desorbed ions into tandem mass spectrometer 14.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 47 -

Probes 16 typically have one or more adsorption surfaces 18, which surfaces can differ from one another (18a, 18b, 18c, 18d). Typically, if there are a plurality of adsorption surfaces 18, all are exposed on a common face of probe 16.

Adsorption surfaces 18 are typically either chromatographic adsorption surfaces or biomolecule affinity surfaces.

Chromatographic affinity surfaces have an adsorbent capable of chromatographic discrimination among or separation of analytes. Such surfaces can thus include anion exchange moieties, cation exchange moieties, reverse phase moieties, metal affinity capture moieties, and mixed-mode adsorbents, as such terms are understood in the chromatographic arts. Biomolecule affinity surfaces have an adsorbent comprising biomolecules capable of specific binding. Such surfaces can thus include antibodies, receptors, nucleic acids, lectins, enzymes, biotin, avidin, streptavidin, Staph protein A and Staph protein G. Adsorbent surfaces are further described in a section below.

Interface 10 positions probe 16 in interrogatable relationship to laser desorption/ionization source 13. Typically, it is desired that the laser interrogate probe adsorption surfaces 18. Accordingly, interface 10 positions probe 16 adsorption surfaces 18 in interrogatable relationship to laser desorption/ionization source 13. If adsorption surfaces 18 are positioned on only one face of probe 16, probe 16 and/or the probe holder of interface 10 can be asymmetrically dimensioned, thus obligating insertion of probe 16 in the orientation that presents adsorption surfaces 18 to laser desorption source 13.

Where probe 16 has a plurality of adsorption surfaces 18, it will be desired that laser source 12 be

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 48 -

able discretely to address each adsorption surface 18. This can be accomplished by optics interposed between laser source 12 and interface 10, by rendering laser source 12 and/or interface 10 movable, or by a combination thereof.

Probe 16 can be an affinity capture probe as presently used in single MS analysis (e.g., those commercially available from Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, CA USA).

13

III. Applications of the Affinity Probe Tandem MS Instrument

The above-described analytical instrument of the present invention provides significant advantages in, and affords novel methods for, (1) protein discovery and identification and (2) the characterization of interactions between specific binding pairs, which will now be described in turn.

In general, the advantages of the above-described analytical instrument include: the ability to do high mass accuracy measurements in single mass MS and tandem MS mode combined with affinity capture probe technology, especially with a specific receptor binding system.

25 A. Protein Discovery and Identification

1. Advantages of the Methods of the Invention

One related set of problems that protein biologists attempt to solve is protein discovery, identification, and assay development. Protein discovery is the process of finding proteins in a system that are biologically interesting because, for

30

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 49 -

example, they function as diagnostic markers or carry out critical cell functions. Protein identification is the process of determining the identify of a discovered protein. Assay development is the process of

5 developing a reliable assay to detect the protein. The methods of this invention provides advantages for the practitioner in carrying out these processes compared with previous technologies.

A primary advantage of this invention is that
10 it provides a single platform on which to carry out process steps from protein discovery to protein identification to assay development. The provision of a single platform based on SELDI technology significantly decreases the time between discovery and
15 assay validation: What used to takes months using previous technologies can now take weeks or days. The methods of this invention also significantly reduce the amount of sample required to perform the experiments. Whereas previous methods required micromoles of
20 analyte, the present methods can perform the same experiments with picomoles of analyte. This overcomes a significant hurdle when sample is scarce or scale-up is difficult.

Previously, protein discovery and isolation
25 was accomplished using 2D gels or Western Blots. However, comparison of gels to each other to detect differentially expressed proteins is a difficult procedure.

The discovered protein might now be
30 identified using mass spectrometry methods. Important proteins could be isolated and ultimately fragmented in the gel with proteases and the peptide fragments could be analyzed by a mass spectrometer and appropriate bioinformatics methods. However, gels are not
35 compatible with present mass spectrometry methods, and peptide fragments have to be removed from the gel.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 50 -

Because the latter process inevitably resulted sample loss, this approach required large quantities of starting protein and material. When the protein was rare, as important proteins can be, this increased the difficulty of the process.

Once identified, the practitioner needs to develop a reliable assay to detect the protein. Typically, this involves developing an ELISA assay. This technology, in turn, required the production of antibodies. This can be a time consuming task, especially if the protein of interest is difficult to produce in quantity for immunization.

Thus, prior techniques could have required three different technologies to accomplish protein discovery, protein identification and protein assay. The methods of the present invention can accomplish this with one technology.

2. Methods of Protein Discovery, Identification and Assay Development

The methods of this invention for protein discovery, identification and assay development involve preparing a difference map to discover a protein or proteins of interest, identifying the protein by affinity capture probe tandem MS, and validating using an affinity capture probe laser desorption ionization chromatographic surface assay or affinity capture probe laser desorption ionization biospecific surface assay.

The process can proceed as follows. A protein of interest is provided or is discovered by, for example, using difference mapping of retentate studies. These methods are described in, for example, WO 98/59362 (Hutchens and Yip). Briefly, two biological samples that differ in some important respect (e.g., normal v. diseased; functional v. non-

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 51 -

functional) are examined by retentate chromatography methods. The methods involve exposing the samples to a plurality of different chromatographic affinity and wash conditions, followed by examination of the

5 "retained proteins" by affinity capture probe laser description ionization. Proteins that are differentially expressed between the two samples are candidates for further examination. Because they have been examined on a mass spectrometer, the molecular

10 weights of these candidate proteins are known.

Normally, scores of proteins in addition to the proteins of interest will be retained on the chip. Therefore a next optional step is to refine the affinity and wash conditions under which the protein or

15 proteins of interest are retained so as to simplify the sample for further analysis. (These also are described in the Hutchens and Yip application.) While capture of the single protein of interest is ideal, capture of no more than about ten detectable proteins is favorable.

20 The refined method provides an improved chromatographic assay for the protein of interest.

The retained proteins are then subject to fragmentation on the probe using a proteolytic agent of choice, producing a pool of peptides for subsequent

25 study. Digestion by specific endoproteases such as trypsin is advantageous because the cleavage pattern is known and is compatible with bioinformatics methods involving *in silico* cleavage of proteins stored in a database. The resulting peptides are then analyzed by

30 high resolution, high accuracy MS-MS (e.g., having a mass assignment error of less than 20 parts per million and resolving power of approximately 10,000). At this point, it may not be clear whether a particular peptide fragment is a cleavage product of the protein of

35 interest or of one of the other retained proteins. Nevertheless, the analysis proceeds by selecting one of

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 52 -

the peptide fragments (possibly at random, possibly based on information that it corresponds to the protein of interest) and subjecting the peptide to gas phase fragmentation. One such method is collision-induced dissociation (CID). The peptide need not be isolated from the chip, because the MS-MS device isolates the peptide of interest from the other peptides in the mass spectrometer. This will generate a further fragmentation pattern of the selected peptide fragment.

Using methods already established in the art, such as database mining protocols, information from the fragmentation pattern is used to interrogate a protein database to generate one or more putative identify candidates for the protein from which the peptide fragment is derived. The protocols generally perform a closeness-of-fit analysis that measures how well the predicted mass spectrum of a protein matches the actual mass spectrum of the selected fragment. Proteins in the database can then be ranked based on the confidence measurement that the protein fragment corresponds to a database protein. Knowledge of the mass of the parent protein and the species of origin, both of which are already known, will assist in limiting the number of identify candidates generated.

Then, the putative identity of the protein from which the peptide fragment was generated is verified. Using knowledge from the database of the primary sequence of the putative identity candidate and the cleavage pattern of the proteolytic agent used, one can predict the peptide fragments and, in particular, their molecular weights, that should be generated from the cleavage of the identity candidate by the proteolytic agent. This predicted set of fragments is then compared with the actual set of fragments generated after proteolytic cleavage of the proteins retained on the chip based on their masses. If the

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 53 -

predicted fragments are accounted for, then one is confident that the putative identity candidate actually corresponds to the identify of one of the proteins retained on the chip. If not, then one must test other putative identity candidates through a process of elimination until the protein from which the fragment is generated is identified. At this point, the generated fragments that correspond to the identified protein can be eliminated from the total set of fragments generated as having been accounted for.

If only one protein was retained after refining the affinity and wash conditions, then all the peptide fragments will have been accounted for and the process is complete. However, if more than one protein has been retained, the situation may be more complicated. For example, the fragment used in the analysis may have been generated from the protein of interest, or it may have been generated by a protein that was retained on the chip, but that is not the protein of interest. In this case, it is useful to repeat the steps of analyzing the peptide fragments not accounted for by the MS-MS methods described until the protein of interest is identified or all the retained proteins have been identified.

Finally, the protein of interest can be assayed by affinity capture probe laser desorption ionization methods using either chromatographic surface already determined to retain the protein or a biospecific surface can be developed for use in an affinity capture probe laser desorption ionization assay. Creation of biospecific surfaces involves providing a binding partner for the identified protein, such as an antibody, or a receptor if a receptor is known, and attaching this to the chip surface. Then, the protein of interest can be assayed by SELDI as already described.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 54 -

B. Characterization of Molecular Interactions

The analytical instrument of the present invention makes possible, for the first time, a sensitive, efficient, single-platform approach to the study of interactions between specific binding partners.

Specific binding partner interactions are at the core of a wide spectrum of biological processes. Accordingly, the ability to measure and to characterize such interactions is a necessary prerequisite to a full understanding such processes; at the clinical level, the ability to measure and to characterize such interactions is important to an understanding of pathologic aberrations in those processes, and to the rational design of agents that can be used to modulate, or even abrogate, such interactions.

At the level of organized eukaryotic tissues, for example, intercellular signaling in the mammalian nervous system is mediated through interactions of neurotransmitters with their cognate receptors. An understanding of the molecular nature of such binding interactions is necessary for a full understanding of such signaling mechanisms. At the clinical level, an understanding of the molecular nature of such binding interactions is required for a full understanding of the mechanism of signaling pathologies, and for the rational design of agents that palliate such signaling pathologies, agents useful for treatment of diseases ranging from Parkinson's disease to schizophrenia, from obsessive compulsive disorder to epilepsy.

At the circulatory level, for example, interaction of B cell receptors with circulating antigen is required to trigger B cell clonal expansion, differentiation, and antigen-specific humoral immune response. An understanding of the antigenic epitopes

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 55 -

that contribute to antigen recognition is critical to a full understanding of immune responsiveness. At the clinical level, such understanding is important to the design of vaccines that confer more robust humoral immunity. Analogously, interaction of T cell receptors with peptide displayed in association with MHC on antigen-presenting cells is critical to the triggering of cellular immunity. An understanding of the T cell epitopes that contribute to antigen recognition is important to the design of vaccines that confer more robust cellular immunity.

At the level of individual cells, phenotypic response to extracellular signals is mediated by at least one, most often a cascade of intermolecular interactions, from the initial interaction of a cell surface receptor with ligand, to intracytoplasmic interactions that transduce the signal to the nucleus, to interaction of protein transcription factors with DNA, the altered patterns of gene expression then leading to the observed phenotypic response.

For example, discriminative binding of estrogen and progesterone by ovarian cells is required for ovulation. An understanding of the molecular nature of binding interactions between steroid hormone receptors and the hormone ligand, on the one hand, and liganded receptor with steroid hormone response elements in the genome, on the other, is important for an understanding of the hormonal response. Such understanding, in turn, is important for an understanding of infertility, and for the rational design of agents - such as RU486 - that are intended to abrogate ovulation, implantation, and/or fetal viability.

Such interactions are found not only in eukaryotic systems, but in prokaryotic systems and in the interaction of prokaryotes with eukaryotes. For

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 56 -

example, certain gram negative bacteria elaborate a pilus that is required for invasion of the eukaryotic urethra; and understanding of such interaction is important to full comprehension of the pathologic process, and for the rational design of agents that can prevent such invasion.

A number of techniques are used in the art to study and map such intermolecular interactions between specific binding partners. Each has significant disadvantages.

In a first such method, one member of a specific binding pair is immobilized on an adsorbent which is packed in chromatographic column. To map the location within the structure of the second (free) binding partner that makes contact with the first (bound) binding partner, the second (free) partner is cleaved. Typically, such cleavage is by specific proteolytic enzyme, although specific chemical cleavage (e.g., by CNBr) or even nonspecific chemical hydrolysis can be done. Thereafter, the digest is passed over the column to bind those portions of the second (free) partner that still bind to the first (immobilized) partner.

The peptides of the second partner are then eluted, typically using a salt or pH gradient, and identified, typically by introducing the peptides into a mass spectrometer using by MALDI or electrospray ionization.

This approach has several well known, and significant, problems. First, a large quantity of purified first binding partner is required in order to create the specific adsorbent. Second, a large quantity of second binding partner, typically purified, is required for digestion, adsorption, and elution, since each of these stages is attended by dilution effects and analyte loss. Furthermore, although the

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 57 -

subsequent mass spectrometric analysis can be highly sensitive, interfacing the fluid phase analysis to MS can also occasion analyte loss.

Perhaps a more fundamental disadvantage is that, by cleaving the second binding partner before binding to the first partner, only those molecular structures on the second binding partner that are properly maintained in the peptide fragments will bind, and thereafter be detected. If, for example, an antibody binds antigen at discontinuous, rather than linear, epitopes, such discontinuous epitopes can be destroyed by fragmentation; unable to support binding to the immobilized antibody, such antigenic epitopes cannot be detected.

A second typical approach in the art is to use point mutations to map, within a protein binding partner, those residues that contribute to intermolecular binding.

This latter approach requires that the protein binding partner have been cloned, the creation of the desired point mutations, recombinant expression of the altered protein, and purification thereof. Thereafter, the binding kinetics to the other partner of the altered protein is measured to determine the effect of the mutated residue on the intermolecular interaction.

Less often used, the nature of the contacts between binding partners can be elucidated by X-ray crystallography of the bound partners. This technique is highly effective, and provides atomic level resolution, but requires that each binding partner be highly purified, and further requires that suitable co-crystals be formed.

The affinity capture tandem mass spectrometry instrument of the present invention provides an improved approach that requires far less starting

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 58 -

material, obviates point mutational analysis, crystallization, and substantially reduces the purity requirement.

5 The first step is to immobilize one of the binding partners on an affinity capture probe.

10 Either partner can be immobilized; it is the free partner, however, for which structural information about the binding contacts will be obtained. Using receptor/ligand interactions as exemplary of the approach, immobilizing the ligand on the probe will permit the identification of regions of the receptor that participate in binding the ligand; immobilizing the receptor on the probe will permit the identification of regions of the ligand that participate in its binding to the receptor. Where the ligand is a protein - for example a protein hormone, cytokine, or chemokine - separate experiments, using each partner in turn, will yield a bilateral understanding of the intermolecular contacts.

20 The probe-bound partner can be immobilized using covalent or strong noncovalent interactions. The choice will depend upon the availability of suitable reactive groups on the partner to be immobilized and on the chemical nature of the surface of the probe. Appropriate chemistries are well known in the analytical arts.

30 For example, where the binding partner to be immobilized has free amino groups, covalent bonds can be formed between the free amino groups of the binding partner and a carbonyldiimidazole moiety of the probe surface. Analogously, free amino or thiol groups of the binding partner can be used covalently to bind the partner to a probe surface having epoxy groups. Strong coordinate or dative bonds can be formed between free sulfhydryl groups of the binding partner and gold or platinum on the probe surface.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 59 -

Optionally, remaining reactive sites on the probe surface can then be blocked to reduce nonspecific binding to the activated probe surface.

5 The second (free) binding partner is then contacted to the affinity capture chip and allowed to bind to the first (immobilized) binding partner.

The second (free) binding partner can be present pure in solution, if known and available, or, more typically, will be captured from a heterogeneous mixture, such as a biological sample suspected to contain the second binding partner. The biological sample, as in biomarker discovery approaches described earlier, can be a biological fluid, such as blood, sera, plasma, lymph, interstitial fluid, urine, exudates, can be a cell lysate, a cellular secretion, or a partially fractionated and purified portion thereof.

20 The probe is then washed with one or more eluants having defined elution characteristics. These washes serve to reduce the number of species that bind nonspecifically to the probe.

Energy absorbing molecules are then applied, typically in the liquid phase, and allowed to dry. Application of energy absorbing molecules is effected in the same manner as for existing uses of affinity capture probes; where ProteinChip® Arrays (CiphaGen Biosystems, Inc., Fremont, CA, USA) are used, energy absorbing molecules are applied according to manufacturer instructions.

30 Species that are noncovalently bound to the affinity capture probe - e.g., second binding partners specifically bound to the first (immobilized) binding partners, molecules nonspecifically bound to the probe surface, molecules nonspecifically bound to the first binding partners - are then detected in a first phase of laser desorption ionization mass spectrometry.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 60 -

The mass spectrometer can be a single stage affinity capture LDI-MS device, such as the PBS II from Ciphergen Biosystems, Inc. (Fremont, CA USA). However, the affinity capture tandem MS of the present invention provides higher mass accuracy and higher mass resolution and is preferred.

Typically, the second (free) binding partner will be known from earlier studies, and its presence or absence readily confirmable by mass spectrometry. If the second (free) binding partner is unknown, each of the species bound to the probe can be investigated in turn. If the number of detectable species is too high, the affinity capture probe can be washed with eluants having different elution characteristics (typically, increased stringency), to reduce the number of species present for analysis.

Once binding of the second ("free") binding partner to the first (immobilized) binding partner is confirmed, the second binding partner is fragmented. This is typically accomplished by contacting the second binding partner (which is, at this point, noncovalently but specifically bound to the first binding partner, which is, in turn, immobilized on the probe surface) with specific endoproteases, such as trypsin, Glu-C (V8) protease, endoprotease Arg-C (either the serine protease or cysteine protease Arg-C enzyme), Asn-N protease, or Lys-C protease.

After digestion, peptides are detected by mass spectrometry.

If all fragments of the second binding partner are to be identified - e.g., to confirm the identity of the second binding partner by peptide mass fingerprint analysis - energy absorbing molecules can be applied and the probe used to introduce the peptides into a mass spectrometry by laser desorption ionization. For this purpose, the Ciphergen PBS II

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 61 -

single acceleration stage linear TOF MS can be used; the tandem MS of the present invention, which provides superior mass accuracy and mass resolution is preferred, since the increased resolution and accuracy reduces the number of putative "hits" returned at any given confidence level in any given database query.

More typically, however, it is desired to analyze those fragments of the second binding partner that bind most tightly to the immobilized first binding partner. In such case, the probe is washed with one or more eluants prior to addition of energy absorbing molecules.

At this point, the probe is inserted into the interface of the tandem MS of the present invention, and fragments (typically peptides) of the second binding partner detected.

If the identify of the second (free) binding partner is known, the masses of the detected fragments can be compared with those predicted by applying the known cleavage rules of the fragmenting enzyme to the primary amino acid sequence of the second binding partner. In this fashion, each fragment can be identified, thus locating within the structure of the second binding partner those portions responsible for binding to the first binding partner.

Although, in theory, a single stage MS device can be used, in practice fragments other than those arising from the second binding partner will be present, confounding such analysis. Definitive identification in the usual case thus benefits from the high mass resolution and mass accuracy of the instrument of the present invention, and further often benefits from ms/ms analysis.

If the second (free) binding partner is not known, the partner can be identified by ms/ms analysis.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 62 -

Typically, such analysis takes the form of selecting a first parent peptide in a first stage of MS, fragmenting the selected peptide, and then generating a fragment mass spectrum in a second stage of MS analysis. Fragmentation is done in the gas phase, preferably by collision-induced dissociation. In the preferred embodiment of the affinity capture tandem mass spectrometer of the present invention, CID is effected in q2 by collision with nitrogen gas at about 10^{-3} Torr.

The fragment spectrum is then used to query sequence databases using known algorithms, such as that disclosed in Yates et al., U.S. Patent Nos. 5,538,897 and 6,017,693, and that employed in Protein Prospector MS-TAG (<http://prospector.ucsf.edu>) module.

Putative identifications can be further verified by selecting a second parent peptide and repeating the approach, as necessary to confirm that all peptides derive from an identifiable parent.

Thereafter, once the second binding partner is identified, the nature of the intermolecular interaction can be studied as set forth above. The known cleavage rules of the fragmenting enzyme (or chemical, such as CNBr) is applied to the primary sequence of the now-identified second binding partner, and the empirically measured peptides mapped onto the theoretical digest, thus identifying the peptides that had bound to, and thus in the native molecule contribute to the binding to, the immobilized first binding partner. And as above, the experiment can be repeated with increasing stringency of wash to identify those peptides most tightly bound.

Other perturbations can be performed to elucidate further the nature of the intermolecular binding.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 63 -

The elution characteristics of the eluant to wash the probe following fragmentation of the second binding partner can be altered to identify the fragments that contribute most strongly to the interaction, or to identify pH-dependent or salt-dependent contacts that contribute to binding.

The principle is of course well-known in the chromatographic and molecular biological arts: with increased stringency of wash (e.g., increased salt concentration, higher temperature), those fragments less tightly bound to the immobilized first binding partner will be eluted off the first binding partner. In the present geometry, such poorly binding fragments will elute off the probe and be lost from the subsequent mass spectrometric analysis. A series of experiments can thus be performed in which the probe, or identical counterpart probes, are washed at increasing stringency, thus creating a graded series of subsets of fragments of the second binding partner, in which each successive subset has a smaller subset of more tightly binding fragments.

As noted above, the first (immobilized) and second (free) binding partners can be interchanged, allowing the other partner's binding contacts to be elucidated.

A further useful perturbation is removal or alteration of post-translational modifications on one or both of the binding partners. For example, if the first binding partner is a glycoprotein, treatment with one or more specific or nonspecific glycosidases prior to, and/or after, binding of the second binding partner will help elucidate the contribution of sugar residues to the binding.

Analogously, where one of the binding partners is nucleic acid, treatment of the nucleic acid binding partner with nuclease after binding of the

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 64 -

other binding partner can help identify critical binding residues.

The above-described approach to characterizing intermolecular interactions replaces the multi-platform, labor-intensive, insensitive techniques of the prior art with a single platform, streamlined, sensitive approach. The approach is applicable to a wide variety of different biological systems and problems.

As suggested above, the methods of the present invention can be used to for epitope mapping - that is, to identify the contacts within an antigen that contribute to binding to antibody, T cell receptor, or MHC. The methods can be used to elucidate the nature of binding of biological ligands to their receptors, of transcription factors to nucleic acid, of transcription factors to other transcription factors in a multiprotein complex.

Although particularly discussed above with respect to protein/protein interactions, the methods of the present invention can be practiced to elucidate the binding interactions between lectins and glycoproteins, protein and nucleic acid, and small molecules and receptors.

Particularly with respect to small molecule ligands, the methods can also be applied to the design of agonists and antagonists of known receptors.

Over the past decade, techniques have been developed for combinatorially generating large numbers of small molecules and for screening such molecules in various homogeneous and live cell assays for their ability to affect one or more biological processes. For example, homogeneous scintillation proximity assays can be used to screen combinatorial libraries for binding to a known receptor; digital image-based cellular assays can be used to screen compounds from

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 65 -

combinatorial libraries for downstream effects, such as cytoplasmic/nuclear transport of receptors, changes in intracellular calcium distribution, changes in cell motility.

5 Once such a lead compound is identified, however, a detailed understanding of the interaction of the small molecule with its receptor will facilitate intelligent design of molecules with improved pharmacokinetics and therapeutic index. The techniques
10 of the present invention are well suited for such use.

 If the small molecule provides a signal near that provided by the energy absorbing molecules, MS is performed with single ion monitoring looking only for the known mass for the combinatorial library component.

15 EXAMPLE 1
 Identification of Prostate Cancer Biomarker

 Traditionally, prostatic carcinoma is diagnosed via biopsy after discovery of elevated blood levels of prostate specific antigen (PSA). In normal
20 males, PSA is present at levels of less than 1 ng/ml. For both BPH and prostatic carcinoma, PSA levels may be elevated to 4-10 ng/ml. Chen *et al.*, *J. Urology* 157:2166-2176 (1997); Qian *et al.*, *Clin. Chem.* 43:352-359 (1997). PSA is known to have chymotryptic
25 activity, cleaving at the C-terminus of tyrosine and leucine. Qian *et al.*, *Clin. Chem.* 43:352-359 (1997).

 Seminal plasma from patients diagnosed with BPH as well as patients diagnosed with prostatic carcinoma were analyzed using the technique of
30 ProteinChip® differential display. FIG. 3 displays the seminal fluid protein profiles of a single BPH and prostate cancer patient. A virtual gel display is used

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 66 -

to enhance visual comparison between samples. A difference plot for the protein profiles of prostate cancer minus BPH is displayed beneath the gel view plots. Positively displaced signals of the difference plot indicate proteins that are upregulated in prostate cancer, while negative peaks represent prostate cancer downward protein regulation. Several uniquely upregulated signals, indicating possible prostate cancer biomarkers, were detected.

On-chip isolation of one of these upregulated proteins was achieved by using a mixed mode surface and neutral pH buffer wash (see FIG. 4). In this case, the protein was enriched to near homogeneity. The enriched biomarker candidate was then exposed to in-situ digestion using trypsin. After incubation, a saturated solution of CECA (matrix) was added and the subsequent digest products analyzed by SELDI-TOF.

Several peptides were detected (see FIG. 5). The resultant peptide signals were submitted for protein database analysis and a preliminary identification of human semenogellin I was made. This identification was somewhat perplexing, since the biomarker had a molecular weight of about 5751 Da, far less than that of semenogellin I (MW 52,131 Da).

The same purified protein was submitted for ProteinChip LDI Qq-TOF MS detection (see FIG. 6). Because the parent ion at 5751 Da was beyond the current mass limit for LDI Qq-TOF MS/MS analysis (3000 M/z), the doubly charged ion was used for CID MS/MS sequencing (see FIG. 7). The CID MS/MS results were used to perform protein database mining. 15 of the 26 ms/ms ions mapped back to human seminal basic protein (SBP), a proteolytically derived fragment of semenogellin I, providing definitive identification of this candidate biomarker.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 67 -

While initial studies such as these quickly reveal potential biomarkers, complete validation of any biomarker requires analysis of dozens or even hundreds of relevant samples to obtain statistically significant information regarding expression and prevalence.

All patents, patent publications, and other published references mentioned herein are hereby incorporated by reference in their entireties as if each had been individually and specifically incorporated by reference herein. By their citation of various references in this document, applicants do not admit that any particular reference is "prior art" to their invention.

While specific examples have been provided, the above description is illustrative and not restrictive. Any one or more of the features of the previously described embodiments can be combined in any manner with one or more features of any other embodiments in the present invention. Furthermore, many variations of the invention will become apparent to those skilled in the art upon review of the specification. The scope of the invention should, therefore, be determined not with reference to the above description, but instead should be determined with reference to the appended claims along with their full scope of equivalents.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 68 -

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of characterizing binding interactions between a first and second molecular binding partner, the method comprising:
binding a second binding partner to a first binding partner, said first binding partner immobilized to a surface of a laser desorption ionization probe;
fragmenting said second binding partner; and
then
detecting at least one of said fragments by a tandem mass spectrometer measurement,
the mass spectrum of said detected fragments characterizing said binding interactions.
2. The method of claim 1, further comprising the step, before binding of said second binding partner to said first binding partner, of:
immobilizing a first binding partner to a surface of an affinity capture probe.
3. The method of claim 2, wherein said immobilizing of said first partner to said affinity capture probe surface is a direct binding.
4. The method of claim 3, wherein said direct binding to said probe surface is a covalent bonding.
5. The method of claim 4, wherein said covalent bonding is between an amine of said first binding partner and a carbonyldiimidazole moiety of said probe surface.
6. The method of claim 4, wherein said covalent bonding is between an amino or thiol group of

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 69 -

said first binding partner and an epoxy group of said probe surface.

7. The method of claim 3, wherein said direct binding to said probe surface is a noncovalent bonding.

8. The method of claim 7, wherein said direct binding to said probe surface is a coordinate or dative bonding.

9. The method of claim 8, wherein said coordinate or dative bonding is to a metal of said probe surface.

10. The method of claim 9, wherein said metal is selected from the group consisting of gold and platinum.

11. The method of claim 2, wherein said affinity capture probe immobilizing surface is a chromatographic adsorption surface.

12. The method of claim 11, wherein said chromatographic adsorption surface is selected from the group consisting of reverse phase, anion exchange, cation exchange, immobilized metal affinity capture and mixed-mode surfaces.

13. The method of claim 2, wherein said immobilizing of said first partner to said affinity capture probe surface is an indirect binding.

14. The method of claim 13, wherein said indirect binding covalently binds said first binding partner to said affinity capture probe surface.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 70 -

15. The method of claim 14, wherein said indirect covalent binding to said affinity capture probe surface includes a cleavable linker.

16. The method of claim 15, wherein said linker is cleavable by an agent selected from the group consisting of a chemical, an enzyme, and radiation.

17. The method of claim 13, wherein said indirect binding noncovalently binds said first binding partner to said affinity capture probe surface.

18. The method of claim 17, wherein said noncovalent indirect bonding to said affinity capture probe surface includes a biotin molecule.

19. The method of claim 17, wherein said noncovalent indirect bonding to said affinity capture probe surface includes an avidin molecule.

20. The method of claim 17, wherein said noncovalent indirect bonding to said affinity capture probe surface includes a streptavidin molecule.

21. The method of claim 1, wherein said first molecular binding partner is selected from the group consisting of protein, nucleic acid, carbohydrate, and lipid.

22. The method of claim 21, wherein said first molecular binding partner is a protein.

23. The method of claim 22, wherein said protein is naturally occurring.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 71 -

24. The method of claim 23, wherein said protein occurs naturally in an organism selected from the group consisting of multicellular eukaryote, single cell eukaryote, prokaryote, and virus.

25. The method of claim 24, wherein said protein occurs naturally in a multicellular eukaryote.

26. The method of claim 25, wherein said multicellular eukaryote is selected from the group consisting of mammals, insects, nematodes, fish, and vascular plants.

27. The method of claim 26, wherein said multicellular eukaryote is a mammal.

28. The method of claim 27, wherein said mammal is homo sapiens.

29. The method of claim 27, wherein said mammal is a rodent.

30. The method of claim 27, wherein said rodent is a mouse, rat, or guinea pig.

31. The method of claim 22, wherein said protein is nonnaturally occurring.

32. The method of claim 31, wherein said protein is a recombinant fusion protein.

33. The method of claim 22, wherein said protein is selected from the group consisting of antibody, receptor, transcription factor, cytoskeletal protein, cell cycle protein, and ribosomal protein.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 72 -

34. The method of claim 33, wherein said protein is an antibody.

35. The method of claim 33, wherein said protein is a receptor.

36. The method of claim 35, wherein said receptor is selected from the group consisting of cell surface receptor, transmembrane receptor, and nuclear receptor.

37. The method of claim 1, wherein said binding of said second binding partner to said first binding partner is effected by contacting said first binding partner with a biologic sample.

38. The method of claim 37, wherein said biological sample is a fluid selected from the group consisting of blood, lymph, urine, cerebrospinal fluid, synovial fluid, milk, saliva, vitreous humor, aqueous humor, mucus and semen.

39. The method of claim 38, wherein said biological fluid is blood.

40. The method of claim 38, wherein said fluid is urine.

41. The method of claim 38, wherein said biological fluid is CSF.

42. The method of claim 37, wherein said biological sample is a cell lysate.

43. The method of claim 1, wherein said second binding partner is a protein.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 73 -

44. The method of claim 1, wherein said binding of said second binding partner to said first binding partner is effected by contacting said first binding partner with an aliquot of a chemically synthesized combinatorial library.

45. The method of claim 1, wherein said binding of said second binding partner to said first binding partner is effected by contacting said first binding partner with an aliquot of a biologically displayed combinatorial library.

46. The method of claim 45, wherein said library is a phage-displayed library.

47. The method of claim 1, wherein said fragmenting is effected by contacting said second binding partner with an enzyme.

48. The method of claim 43, wherein said fragmenting is effected by contacting said second binding partner with an enzyme.

49. The method of claim 48, wherein said enzyme is a specific endoprotease.

50. The method of claim 49, wherein said endoprotease is selected from the group consisting of trypsin, Glu-C (V8) protease, endoproteinase Arg-C (serine protease), endoproteinase Arg-C (cysteine protease), Asn-N protease, and Lys-C protease.

51. The method of claim 50, wherein said protease is trypsin.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 74 -

52. The method of claim 1, wherein said fragmenting is effected by contacting said second binding partner with a liquid phase chemical.

53. The method of claim 52, wherein said chemical is CNBr.

54. The method of claim 1, further comprising the step, after binding of said second binding partner to said first binding partner, and before fragmenting said second binding partner, of:
denaturing said second binding partner.

55. The method of claim 1, further comprising the step, after fragmenting said second binding partner, of:
washing said probe with a first eluant.

56. The method of claim 55, further comprising, after washing said probe with a first eluant and before detecting fragments by a tandem mass spectrometer measurement, the step of:
washing said probe with a second eluant, said second eluant differing from said first eluant in at least one elution characteristic.

57. The method of claim 56, wherein said elution characteristic is selected from the group consisting of pH, ionic strength, detergent strength, and hydrophobicity.

58. The method of claim 1 or 55, further comprising the step, after fragmenting and before detecting said fragments, of:
applying energy absorbing molecules to said probe.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 75 -

59. The method of claim 1, further comprising the steps, after fragmenting and before detecting said fragments, of:

engaging said probe in the affinity capture probe interface of an analytical instrument, said analytical instrument comprising:

a laser desorption ionization source;
an affinity capture probe interface; and
a tandem mass spectrometer,

wherein said affinity capture probe interface is capable of engaging an affinity capture probe and positioning said probe in interrogatable relationship to said laser source and concurrently in communication with said tandem mass spectrometer; and then

desorbing and ionizing fragments of said second binding partner from said probe using said laser source.

60. The method of claim 1, wherein said tandem mass spectrometer measurement is a measurement of all ion masses.

61. The method of claim 1, wherein said tandem mass spectrometer measurement is a measurement of masses of a subset of fragments.

62. The method of claim 1, wherein said tandem mass spectrometer measurement is a single ion monitoring measurement.

63. The method of claim 1, further comprising the step, after said detecting, of comparing said fragment measurements with those predicted by applying cleavage rules of the

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 76 -

fragmenting enzyme to the primary amino acid sequence of said second binding partner.

64. The method of claim 63, further comprising the step, after said detecting and before said comparing, of identifying said second binding partner through ms/ms analysis.

65. The method of claim 64, wherein said identifying through ms/ms analysis comprises the steps of:

mass spectrometrically selecting a first fragment of said second binding partner;
dissociating said second binding partner first fragment in the gas phase;
measuring the fragment spectrum of said second binding partner first fragment, and then comparing said fragment spectrum to fragment spectra predicted from amino acid sequence data prior-accessioned in a database.

66. The method of claim 65, wherein said amino acid sequence data are selected from the group consisting of empiric and predicted data.

67. The method of claim 65, wherein said dissociating is collision induced dissociation.

68. The method of claim 1, wherein said first binding partner is an antibody.

69. The method of claim 1, wherein said first binding partner is a T cell receptor.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

- 77 -

70. The method of claim 1, wherein said first binding partner is an MHC molecule.

71. The method of claim 1, wherein said first binding partner is a receptor and said second binding partner is an agonist of said receptor.

72. The method of claim 1, wherein said first binding partner is a receptor and said second binding partner is a partial agonist of said receptor.

73. The method of claim 1, wherein said first binding partner is a receptor and said second binding partner is an antagonist of said receptor.

74. The method of claim 1, wherein said first binding partner is a receptor and said second binding partner is a partial antagonist of said receptor.

75. The method of claim 1, wherein said first binding partner is a glycoprotein receptor and said second binding partner is a lectin.

WO 02/31484

PCT/US00/28261

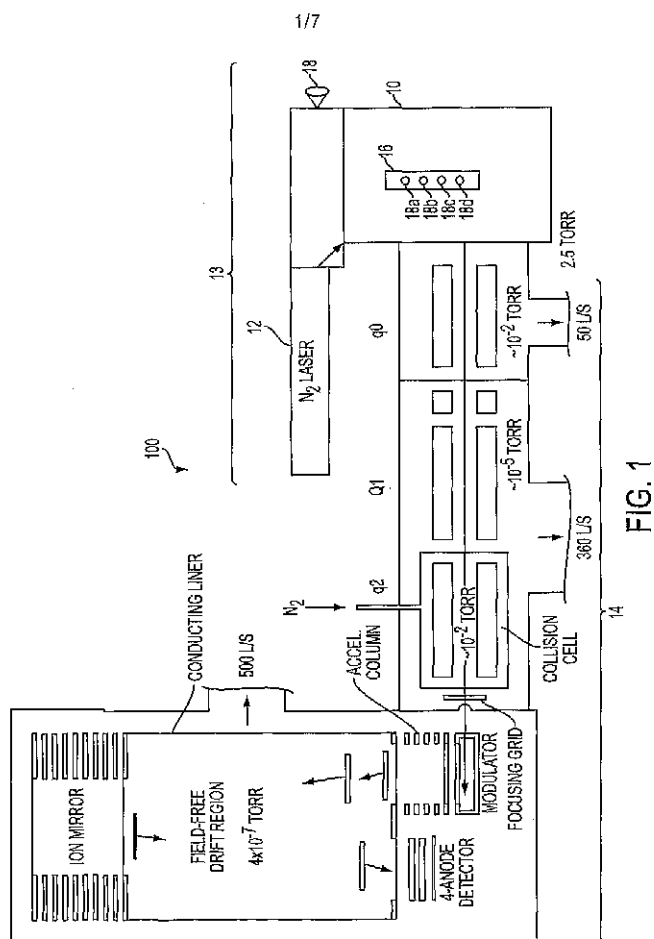


FIG. 1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

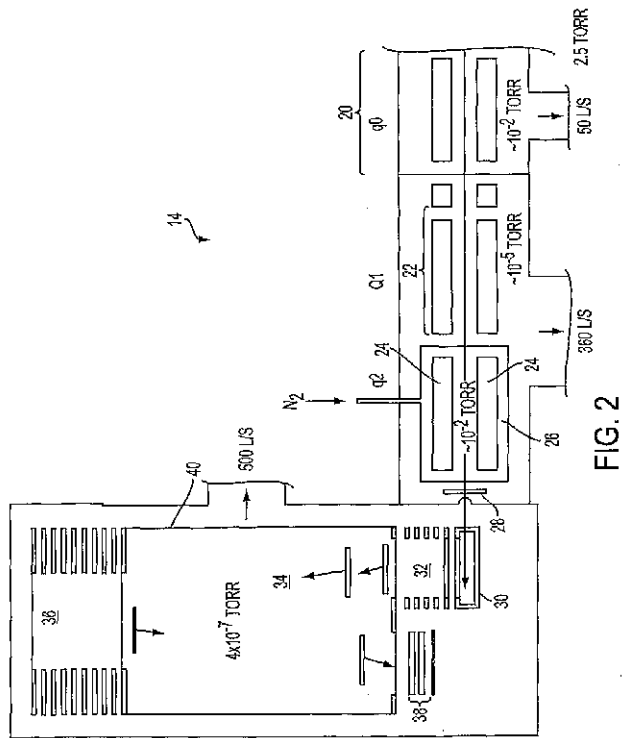


FIG. 2

WO 02/31484

PCT/US00/28261

3/7

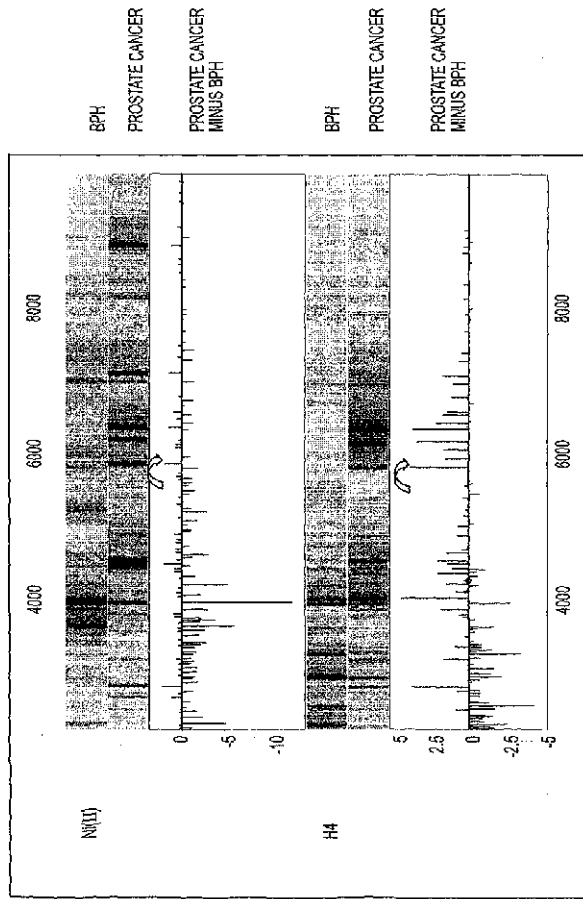


FIG. 3

WO 02/31484

PCT/US00/28261

4/7

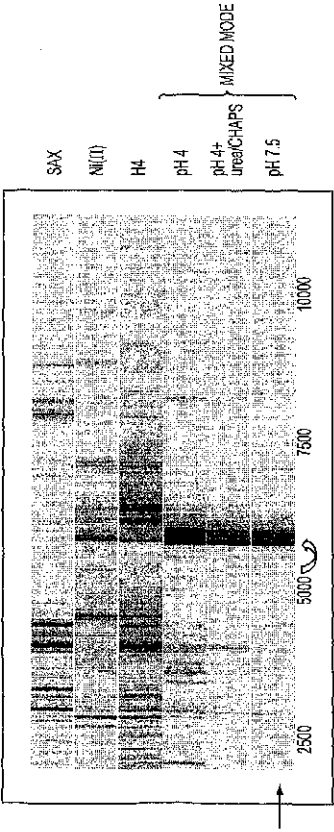
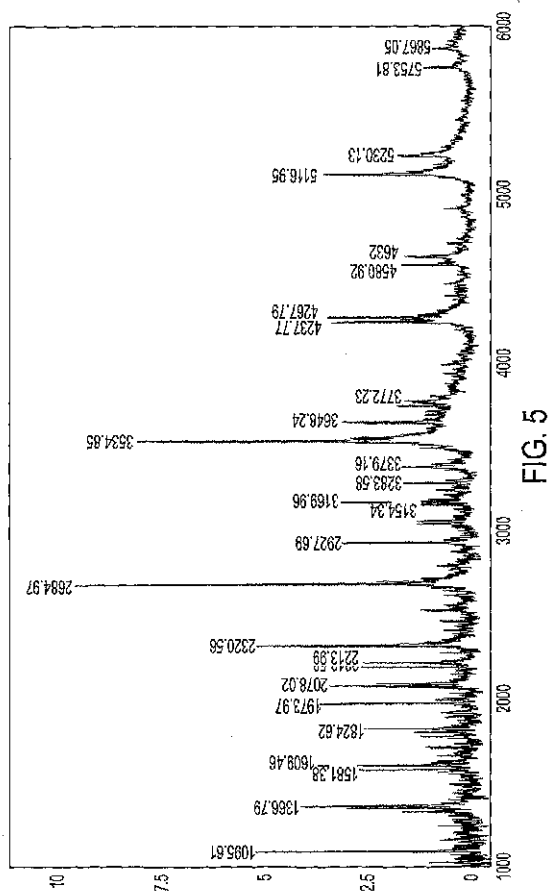


FIG. 4

WO 02/31484

PC/T/1.3A

5/7



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/31484

PCT/US00/28261

6/7

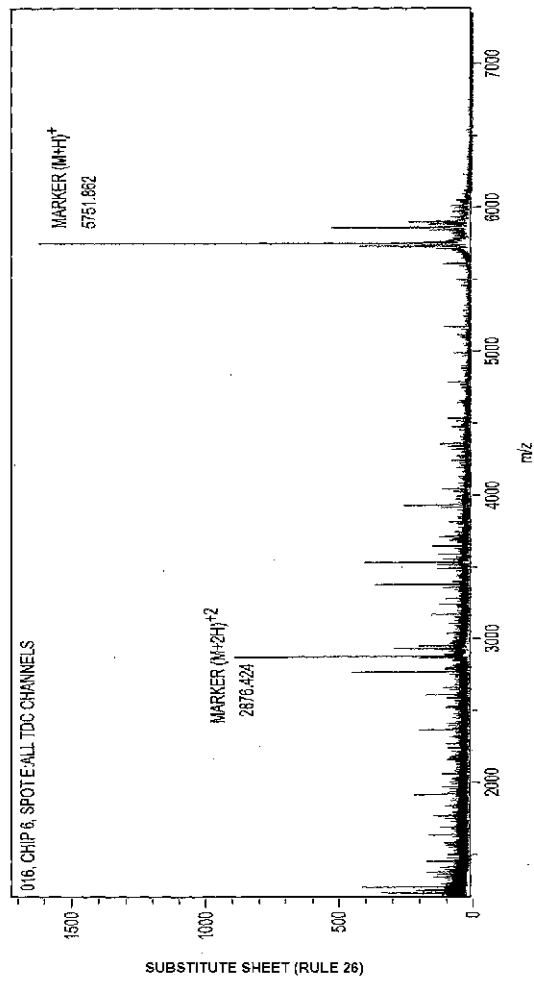
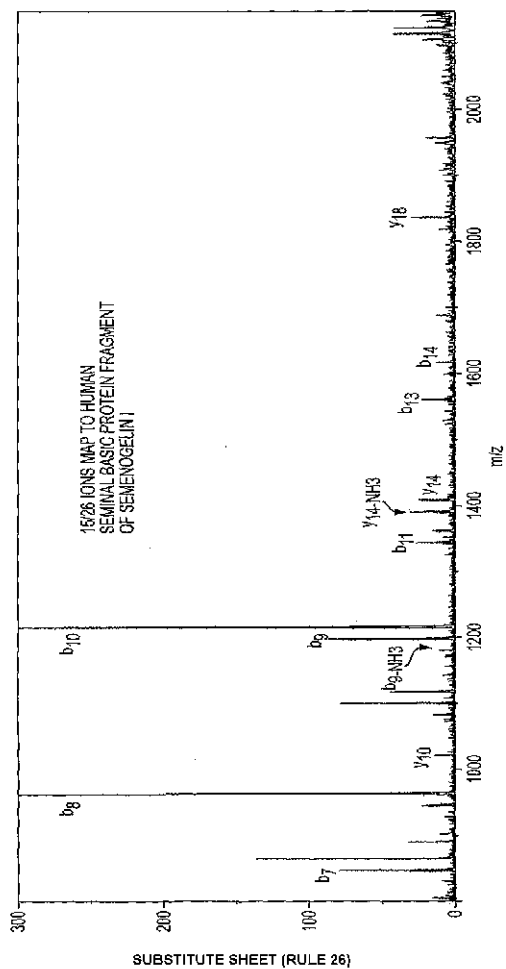


FIG. 6

WO 02/31484

PCT/US00/28261

7/7



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
18 April 2002 (18.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/031484 A3(51) International Patent Classification⁷: G01N 33/68, H01J 49/00

(21) International Application Number: PCT/US00/28261

(22) International Filing Date: 12 October 2000 (12.10.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(71) Applicants (for all designated States except US): CIPHERGEN BIOSYSTEMS, INC. [US/US]; 66.1 Dumbarton Circle, Fremont, CA 94555 (US); HUMAN GENOME SCIENCES, INC. [US/US]; 9410 Key West Avenue, Rockville, MD 20859 (US).

(74) Agents: MULLOWNEY, Edward, E. et al.: Fish & Neave, 125, Avenue of the Americas, New York, NY 10020 (US).

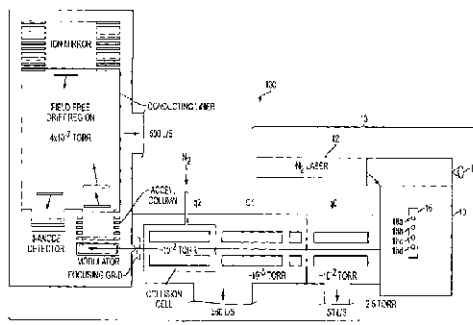
(81) Designated States (optional): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (optional): ARIP (patent) (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LI, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): WEINBERGER, Scot [US/US]; 657 George Street, Montara, CA 94037 (US); MORRIS, Tina [US/US]; 501 West Montgomery Avenue, Rockville, MD 20859 (US).Published:
with international search report(88) Date of publication of the international search report:
25 July 2002

[Continued on next page]

(54) Title: METHODS FOR CHARACTERIZING MOLECULAR INTERACTIONS USING AFFINITY CAPTURE TANDEM MASS SPECTROMETRY



(57) Abstract: The invention provides an analytical instrument comprising an affinity capture probe interface, a laser desorption/ionization source, and a tandem mass spectrometer. Also presented are new methods for protein discovery and identification and for characterization of molecular interactions that utilize the instrument of the present invention.

WO 02/031484 A3

WO 02/031484 A3

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Note: on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
18 April 2002 (18.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/031484 A3(51) International Patent Classification: G01N 33/68
11013-49/00(US): MORRIS, Tina [US/US]; 501 West Montgomery
Avenue, Rockville, MD 20850 (US).

(21) International Application Number: PCT/US00/08761

(74) Agents: MULLOWNEY, Edward, F. et al.; Fish &
Nemve, 1251 Avenue of the Americas, New York, NY
10020 (US).

(22) International Filing Date: 11 October 2000 (1.10.2000)

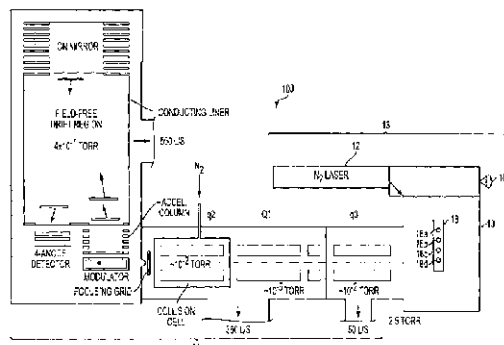
(25) Filing Language: English

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GU, HK, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PE, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) Publication Language: English

(71) Applicants (for all designated States except US): CL-
PIPERGEN BIOSYSTEMS, INC. [US/US]; 5611
Dumbarton Circle, Fremont, CA 94555 (US); HUMAN
GENOME SCIENCES, INC. [US/US]; 9410 Key West
Avenue, Rockville, MD 20850 (US).(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE,
IT, LI, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: METHODS FOR CHARACTERIZING MOLECULAR INTERACTIONS USING AFFINITY CAPTURE TANDEM
MASS SPECTROMETRY(57) Abstract: The invention provides an analytical instrument comprising an affinity capture probe interface, a laser desorption
ionization source, and a tandem mass spectrometer. Also presented are new methods for protein discovery and identification and for
characterization of molecular interactions that utilize the instrument of the present invention.

WO 02/031484 A3

WO 02/031484 A3 **Published:**

— with international search report

(15) Information about Correction:

see PCT Gazette No. 36/2003 of 4 September 2003, Section II

(88) Date of publication of the international search report:

25 July 2003

(48) Date of publication of this corrected version:

4 September 2003

For two letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Title and Application No. PCI/US 00/28261
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 601N33/68 H01J49/00		
According to International Classification (H-C) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 601N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 40610 A (PERCEPTIVE BIOSYSTEMS INC) 12 August 1999 (1999-08-12) page 2, line 29 - page 3, line 8 page 5, line 24 - line 29 ---	1-75
Y	US 5 538 897 A (ENG JAMES K ET AL) 23 July 1996 (1996-07-23) column 18, line 27 - line 36 ---	1-75
Y	WO 94 28418 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE ; YIP TAI TUNG (US); HUTCHENS T WILLIAM (US) 8 December 1994 (1994-12-08) page 51, line 10 - page 70, line 8; example 3 --- -/-	1-75
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "L" earlier document not published on or after the international filing date "P" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is used to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to underline the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step without the document in issue alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other relevant documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 5 April 2002		Date of mailing of the international search report 19/04/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, 111, 5818 Patentstr. 2 NL - 2286 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2500, 1 x 51 651 regional Fax (+31-70) 340-3018		Author/Local officer Hart-Davis, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Application No. PC/US 00/28261
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Quotation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RAYMACKERS JCS ET AL: "Identification of two-dimensionally separated human cerebrospinal fluid proteins by N-terminal sequencing, matrix-assisted laser desorption/ionization - mass spectrometry, nanoliquid chromatography-electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry, and tandem mass spectrometry." ELECTROPHORESIS, vol. 21, no. 11, June 2000 (2000-06), pages 2266-2283, XP008001622 ISSN: 0173-0835 page 2270, column 1, paragraph 2 page 2274, column 1, paragraph 1	1-75
A	WO 98 59360 A (YIP TAI TUNG ;CIPHERGEN BIOSYSTEMS INC (US); HUTCHENS T WILLIAM (U) 30 December 1998 (1998-12-30) claims 1-9 & WO 98 59362 A 30 December 1998 (1998-12-30) cited in the application	1-75
A	ANDERSEN J S ET AL: "Functional genomics by mass spectrometry" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 480, no. 1, 25 August 2000 (2000-08-25), pages 25-31, XP004337489 ISSN: 0014-5793 the whole document	1-75
T	PURCELL A W ET AL: "The use of post-source decay in matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry to delineate T cell determinants" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 249, no. 1-2, 1 March 2001 (2001-03-01), pages 17-31, XP004317467 ISSN: 0022-1759 the whole document	1-75

Form PC/US 28261 (continuation of second sheet), July 1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

 Int. and Application No.
 PC1/J5 00/28261

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9940610	A	12-08-1999	US 6348688 B1
			EP 1060502 A2
			JP 2002503020 T
			WO 9940610 A2
US 5538897	A	23-07-1996	CA 2185574 A1
			EP 0750747 A1
			JP 3195358 B2
			JP 9510780 T
			WO 9525281 A1
WO 9428418	A	08-12-1994	US 6017693 A
			21-09-1995
			02-01-1997
			06-08-2001
			28-10-1997
			21-09-1995
			25-01-2000
			13-03-1997
			20-12-1994
			08-12-1994
			13-03-1996
			12-05-2000
			10-02-2000
			22-09-1997
WO 9859360	A	30-12-1998	US 6124137 A
			26-09-2000
			08-12-1994
			20-09-2001
			17-02-1998
			22-02-2000
			13-04-1999
			16-08-2001
			04-01-1999
			04-01-1999
WO 9859360	A	30-12-1998	04-01-1999
			01-11-2000
			13-09-2000
			13-09-2000
			05-04-2000
			05-04-2000
			05-04-2000
			12-12-2000
			17-02-2000
			30-12-1998
			30-12-1998
			30-12-1998
			01-05-2001
			16-06-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
// G 0 1 N 27/64	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/566	
	G 0 1 N 27/64	B

(74)代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(74)代理人 100111741

弁理士 田中 夏夫

(72)発明者 ワインバーガー, スコット

アメリカ合衆国 9 4 3 0 7 カリフォルニア州, モンタラ, ジョージ ストリート 6 5 7

(72)発明者 モリス, タイ

アメリカ合衆国 2 0 8 5 0 メリーランド州, ロックビル, ウェスト モントゴメリー アヴェ
ニュー 5 0 1

F ターム(参考) 2G045 AA40 BA13 BB11 BB14 BB51 CA01 CA17 CB03 CB07 CB14
DA36 FA34 FA40 FB02 GC07 JA01
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ03 QQ79 QR16 QR48 QR54 QR82 QS12
QS15 QS28 QS32 QS33 QS39 QX04