

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4467589号  
(P4467589)

(45) 発行日 平成22年5月26日(2010.5.26)

(24) 登録日 平成22年3月5日(2010.3.5)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>GO 1 N 27/62</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 27/62	V
<b>C 4 O B 30/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 4 O B 30/10	
<b>C 4 O B 20/04</b>	<b>(2006.01)</b>	C 4 O B 20/04	

請求項の数 19 (全 83 頁)

(21) 出願番号	特願2007-50865 (P2007-50865)	(73) 特許権者	501407584
(22) 出願日	平成19年2月28日(2007.2.28)		ターゲット ディスカバリー, インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2002-566627 (P2002-566627) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, インダストリアル ロード 1539
原出願日	平成13年10月19日(2001.10.19)	(74) 代理人	100078282
(65) 公開番号	特開2007-178443 (P2007-178443A)		弁理士 山本 秀策
(43) 公開日	平成19年7月12日(2007.7.12)	(74) 代理人	100062409
審査請求日	平成19年2月28日(2007.2.28)		弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	60/242,165	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成12年10月19日(2000.10.19)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/242,398		
(32) 優先日	平成12年10月19日(2000.10.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴマー配列の決定のための質量欠損標識

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

サンプル中の標識された分子または標識された分子のフラグメントの質量と標識されていない分子または標識されていない分子のフラグメントの質量を識別するための方法であって、ここで、該標識された分子または標識された分子のフラグメントの質量と該標識されていない分子または標識されていない分子のフラグメントの質量は、1原子質量単位 (amu) 未満の違いがあり、該方法は、以下の工程：

(a) 質量分析計を使用することにより、該標識された分子または標識された分子のフラグメントの質量および該標識されていない分子または標識されていない分子のフラグメントの質量の質量スペクトルを蓄積する工程であって、ここで、該標識された分子または標識された分子のフラグメントが、標識部分で標識されており、ここで、該標識部分は、17~77の原子番号を有している少なくとも1つの質量欠損元素を含んでいる、工程；

ならびに  
(b) 該標識部分の核結合エネルギーに基づいて、該標識された分子または標識された分子のフラグメントの質量と該標識されていない分子または標識されていない分子のフラグメントの質量を識別する工程

を包含する、方法。

【請求項2】

請求項1に記載の方法であって、前記標識部分が、原子番号35~63の少なくとも1つの質量欠損元素を含む、方法。

## 【請求項 3】

請求項 2 に記載の方法であって、前記標識部分が、原子番号 39 ~ 58 の少なくとも 1 つの質量欠損元素を含む、方法。

## 【請求項 4】

請求項 2 に記載の方法であって、前記標識部分が、臭素、ヨウ素、ユーロピウム、およびイットリウムからなる群より選択される少なくとも 1 つの質量欠損元素を含む、方法。

## 【請求項 5】

請求項 4 に記載の方法であって、前記質量欠損元素が、ユーロピウムである、方法。

## 【請求項 6】

請求項 4 に記載の方法であって、前記質量欠損元素が、イットリウムである、方法。

10

## 【請求項 7】

請求項 4 に記載の方法であって、前記質量欠損元素が、臭素である、方法。

## 【請求項 8】

請求項 4 に記載の方法であって、前記質量欠損元素が、ヨウ素である、方法。

## 【請求項 9】

請求項 1 に記載の方法であって、前記標識分子および前記標識分子フラグメントが、標識オリゴマーフラグメントである、方法。

## 【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法であって、ここで、前記標識オリゴマーが、標識タンパク質、標識オリゴヌクレオチド、標識オリゴサッカリド、標識脂質および合成物の標識ポリマーからなる群より選択され、標識オリゴマーフラグメントが、標識タンパク質フラグメント、標識オリゴヌクレオチドフラグメント、標識オリゴサッカリドフラグメント、標識脂質フラグメント、および合成物フラグメントの標識ポリマーからなる群より選択される、方法。

20

## 【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法であって、前記合成物の標識ポリマーは、標識アクリレート、標識メタクリレート、標識ナイロン、標識ポリエステル、標識ポリイミド、標識ニトリルゴム、および標識ポリオレフィン、標識アクリレートフラグメント、標識メタクリレートフラグメント、標識ナイロンフラグメント、標識ポリエステルフラグメント、標識ポリイミドフラグメント、標識ニトリルゴムフラグメント、および標識ポリオレフィンフラグメントからなる群より選択される、方法。

30

## 【請求項 12】

請求項 9 に記載の方法であって、前記標識オリゴマーは、標識オリゴヌクレオチドであり、該標識オリゴマーフラグメントが、標識オリゴヌクレオチドフラグメントである、方法。

## 【請求項 13】

請求項 1 に記載の方法であって、各々が異なる数の質量欠損元素で標識されている数個の標識分子が前記質量スペクトルの蓄積の前に混合される、方法。

## 【請求項 14】

請求項 9 に記載の方法であって、前記標識オリゴマーフラグメントが、酵素的な方法、化学分解法、または質量分析断片化法を使用して生成される、方法。

40

## 【請求項 15】

請求項 14 に記載の方法であって、前記質量分析計の断片化法が、インソース衝突誘起解離、および衝突セル衝突誘起解離から選択される、方法。

## 【請求項 16】

請求項 1 に記載の方法であって、各々が異なる数の安定同位体を有する数個の標識分子が、前記質量スペクトルの蓄積の前に、混合される、方法。

## 【請求項 17】

請求項 16 に記載の方法であって、ここで、前記安定同位体が、独立して、H、C、N、O、Cl、Br および S の同位体からなる群より選択される、方法。

## 【請求項 18】

50

請求項16に記載の方法であって、前記安定同位体が、 $^{79}\text{Br}$ および $^{81}\text{Br}$ から独立して選択される、方法。

【請求項19】

請求項1に記載の方法であって、前記サンプルが、コンビナトリアルライブラリーとして生成された分子の複合混合物を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、「Methods for Determining Protein and Peptide Terminal Sequences」の表題で、2000年10月19日に提出された、米国仮特許出願番号第60/242,165号、および「Methods for Determining Protein and Peptide Terminal Sequence,」の表題で、2000年10月19日に提出された、米国仮特許出願番号第60/242,398号(代理人登録番号No.05265.P001)の利点を請求する。これらの出願は、すべての目的のためのそれらの全体において参考として援用されている。

10

【背景技術】

【0002】

(政府によって基金を援助された研究および開発の下で行われた発明に対する権利の記載)

20

なし。

【0003】

(発明の背景)

多くの分子は、得られる標識されたイオンフラグメントの質量が、もともとの分子の同定または再構築のために使用され得る質量分析計において、化学的、電気的(電子ビームまたは中性の気体分子との電界誘起衝突)、または光学的(エキシマーレーザー)によってフラグメンテーションされる。他の例では、分子は、質量分析によってさらに識別される、分離プロセスによる共溶出物(coelute)である場合がある。一部の例では、標識は、質量スペクトル中の他の化学的なノイズから、得られる標識イオンまたはイオンフラグメントの同定を補助するために、もとの分子または混合物中の特異的な分子に付着させられる。典型的には、この標識は、もとの分子中にすでに含まれている元素または元素の放射性同位体から構成される。この方法では、質量スペクトルにおいて2個以上の予め決定された相対量のピークを見ることができ、そして標識されたフラグメントの同定を確認するために使用することができる。しかし、標識が、親分子にすでに含まれている元素(もしくはこれらの元素の放射性同位体)、またはサンプルマトリックスから作成されるかもしくはそうでなければサンプルマトリックスを含有している他のイオンを含む場合は、1個以上の標識されたフラグメントのピークは、スペクトル中の他の未標識のイオンのピークと重複する場合があります、これによって標識されたイオンの同定を混乱させる。

30

【0004】

40

組織学的には、エドマン分解法のような技術が、タンパク質の配列決定に広く使用されている。Stark: Methods in Enzymology, 25:103-120(1972); Niall: Methods in Enzymology, 27:942-1011(1973); Gray: Methods in Enzymology, 25:121-137(1972); Schroeder: Methods in Enzymology, 25:138-143(1972); Creighton, Proteins: Structures and Molecular Principles (W.H. Freeman, NY, 1984); Niederwieser: Methods

in Enzymology, 25:60-99(1972); および Thiedeら

50

、F E B S L e t t . , 3 5 7 : 6 5 - 6 9 ( 1 9 9 5 ) を参照のこと。しかし、衝突誘起解離質量分析(MS)法(MS/MS配列決定)は迅速に展開し、そしてエドマン技術よりも速くそして少量のタンパク質を必要とすることが証明された; Shevchenko, A.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 93: 14440 - 14445 (1996); Wilmsら、Nature, 379: 466 - 469 (1996); Mark, J., 「Protein structure and identification with MS/MS.」(PE/Sciex Seminar Series, Protein Characterization and Proteomicsで示された研究論文): Automated high throughput technologies for drug discovery, Foster City, CA (March, 1988); およびBieman, Methods in Enzymology, 193: 455 - 479 (1990)を参照のこと。

10

## 【0005】

MS配列決定は、タンパク質の消化によって単離された単一のペプチドをランダムにフラグメンテーションするためにMSのイオン化領域中の高い電圧を使用するか、またはより典型的には、イオントラップでの衝突誘起解離を使用するタンデムMSによるかのいずれかによって達成される。Bieman(前出)を参照のこと。以下を含むいくつかの技術が、MS/MS配列決定に使用されるペプチドフラグメントを選択するために使用され得る: 四重極MSユニット中での親ペプチドフラグメントの蓄積(Mark, J.前出; Mann, M., IBC Proteomics donference, Boston, MA (Nov 10~11, 1997); およびBieman, Methods in Enzymology, 193: 455 - 479 (1990)を参照のこと)、ES-TOF MS検出と組み合わせたキャピラリー電気泳動分離(Aebersold, R. 「Proteome analysis: Biological assay or data archive?」IBC Proteomics conference, Coronado, CA (1998年6月11日~12日)およびSmithら、CRC Handbook of Capillary Electrophoresis: A Practical Approach, 第8章、185 - 206頁(CRC Press, Boca Raton, FL, 1994))を参照のこと)、または他の液体クロマトグラフィーによる分離(Niall, H.D.: Methods in Enzymology, 27: 942 - 1011 (1973)およびCreighton, T.E., Proteins: Structures and Molecular Principles (W.H. Freeman, NY, 1984))。ペプチドのアミノ酸配列は、MSにおいて個々のアミノ酸残基に関して公表された質量を使用して、得られたペプチドのMSフラグメンテーションパターンにおいて観察される分子量の差異から推定され(Bieman, K., : Methods in Enzymology, 193: 888 (1990))、そして半自動ペプチド配列決定アルゴリズムで体系化されている(Hinesら、J Am Soc Mass Spectrom, 3: 326 - 336 (1992))。

20

30

## 【0006】

例えば、陽イオンモード(positive ion mode)で獲得されたMS/MS実験で単離された1425.7 Daのペプチド(HSDAVFTDNYTR)の質量スペクトルでは、1425.7 Daの全ペプチドと、次の最大質量のフラグメント( $y_1$ , 1288.7 Da)との間の差異は、137 Daである。これは、アミド結合で切断されるN末端のヒスチジン残基の予想される質量に対応する。このペプチドについては、完全な配列決定は、ペプチド骨格に沿ったほぼすべての残基でのペプチドの切断に対応する、非常に豊富なフラグメントイオンの作成の結果として、可能である。上記のペプチド配列においては、正に荷電したフラグメントイオンの本質的に全てのセットの作成(ペプチドのいずれかの末端を含む)は、N末端および/またはC末端の両方の塩基度の結果である。塩基性残基がN末端および/またはC末端に存在する場合には、衝突誘起解離(CID)スペ

40

50

クトルにおいて産生されるイオンのほとんどが、その残基を含む (Z a i a , J . : P r o t e i n a n d P e p t i d e A n a l y s i s b y M a s s S p e c t r o m e t r y , J . R . C h a p m a n 編、29 - 41頁、Humana Press Totowa, NJ, 1996; および Johnson, R. S. ら、Mass Spectrom. Ion Processes, 86: 137 - 154 (1988))。なぜなら、正電荷は、一般的には、塩基部位に存在するからである。塩基性残基の存在は、典型的には、得られるスペクトルを簡単にする。なぜなら、塩基性部位は、限定された系列の特異的な娘イオンへのフラグメンテーションを指向するからである。塩基性残基を有さないペプチドは、より複雑なフラグメントイオンの混合物へフラグメンテーションされる傾向にある。これは、配列の決定をさらに困難にする。

10

## 【0007】

核酸の配列決定は、歴史的には、親の核酸配列からコピーされたランダムな数の塩基を含有している核酸フラグメントの合成を通じて (例えば、Sanger および Colson、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 74: 5463 - 5467 (1977); および Maxam および Gilbert、METHODS IN ENZYMOLOGY, 65: 499 - 560 (1980) によって定義された方法で) 行われている。Sanger および Colson によって記載された方法のバリエーションは、不完全なポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 方法を DNA フラグメントのラダーを合成するために使用する (Nakamaye ら、Nuc. Acids Res., 16 (21): 9947 - 9959 (1988) を参照のこと)。質量分析法は、Koster、米国特許第 5, 691, 141 号 および 同第 6, 194, 144 号; Monforte ら、米国特許第 5, 700, 642 号 および Butler ら、米国特許第 6, 090, 558 号 によって記載されているように、DNA ラダーのより迅速でありそして複雑な分離および同定のために開発されている。これらの方法では、核酸フラグメントは、質量分析計に同時に導入され、そして「短いタンデムな反復」配列またはの数が、合成された質量フラグメントのラダーの個々の元素の間での質量の差異から推定される。Koster、米国特許第 6, 194, 144 号に記載されているように、十分に特有の質量の異なるタグを有している特有の核酸のものと鑄型から合成された核酸フラグメントを別々に標識することによって、いくつかの核酸を平行して同時に配列決定することが可能であり、かつ所望される。さらに、特有の質量の標識を使用して、イオン化の間の配列のラダーの元素のサブフラグメンテーション、または質量分析計でのイオンの伝達を回避するため、ならびに、他の無関係な核酸および混乱されるマトリックス混入物から核酸フラグメントを精製するために注意を払わなければならない。その結果、明らかな配列を、得られた質量スペクトルから得ることができる。これらの参考文献は、すべての目的のためのそれらの全体において参考として援用されている。

20

30

## 【0008】

質量分析計で質量タグ方法を利用する、ポリサッカライド配列決定方法また、Rademacher ら、米国特許第 5, 100, 778 号、ならびに Parekh および Prime の米国特許第 5, 667, 984 号 によって記載されている。これらの方法では、特有の質量タグが、精製されたポリサッカライドサンプルに付着させられる。ポリサッカライドサンプルは、続いてアリコートに分けられ、これは、もとのポリサッカライドから誘導された一連の標識されたオリゴサッカライドフラグメントを生じるように酵素的および/または化学溶解的切断の種々のレジメに供される。これらのフラグメントは、同時に質量分析計に導入され、そしてもとのポリサッカライド中に含まれる糖の配列が、ランダム標識されたオリゴサッカライドフラグメントから質量スペクトルにおいて作成された得られた質量のラダーから決定される。スループットの増大は、それぞれの特有の精製されたもとのポリサッカライドサンプルに対して連結させられた種々の質量タグの使用を通じて、同時に平行していくつかの異なるサンプルを処理することによって得られる場合がある。再び、配列決定のあいまいさを回避するためには、質量スペクトルでのサブフラグメンテーションの回避、および未標識のオリゴサッカライド混入物からの標識されたフラグメン

40

50

トの精製のために、オリゴサッカライドサンプルに注意を払わなければならない。

【0009】

脂質中の脂肪酸組成およびその位置の同定は、細胞の状態の重要な指標であり得る。例えば、OliverおよびStringer、Appl. Environ. Microbiol., 4:461(1984)、ならびにHoodら、Appl. Environ. Microbiol., 52:788(1986)の両方ともが、Vibrio sp.の餓死の際にリン脂質の99.8%が失われることを報告している。Cronan, J. Bacteriol., 95:2054(1968)は、Escherchia coli K-12のホスファチジルグリセロール含有量の50%が、リン酸の枯渇の開始から2時間以内にカルジオリピンに転換され、そして脂肪酸の組成もまた有意にシフトすることを見出した。薬物および代謝産物の取り込み、膜貫通タンパク質の固定、細胞表面でのウイルスの認識、腫瘍の増殖および転移、ならびに動脈の疾患におけるその潜在的な役割に起因して、細胞膜の脂質組成にもまた、医学的な関心が集まっている。

10

【0010】

組み合わせによって合成された化学的ライブラリーの個々の成分の同定のための同様の質量タグアプローチが、Sugarmanら、米国特許第6,056,926号およびBrennerら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 89:5381-5383(1992)によって記載されている。ここでは、特有の質量タグ標識が、固体表面上で目的の化合物と同時に合成され、その後、固体表面に対して適用された種々の処理工程を同定するために使用される。この質量標識が、質量分析計による固体表面からの切断後に同定され得る。組み合わせアプローチによって産生され得るライブラリーの大きさの限界は、作成され得る特有の質量標識の数、および目的の化合物からこれらの標識を識別する能力である。

20

【0011】

Nessら、米国特許第6,027,890号、Schmidtら、第WO99/32501号、およびAebersoldら、第WO00/11208号は全て、それぞれの供給源について異なる質量タグを用いて、異なる供給源から得られた生物学的分子を別々に標識するための方法を記載する。次いで、サンプルが標識後に混合され、そして分離反応または親和性の豊富さによってまとめて処理され、その結果、各サンプル由来の個々の化合物が、混合物中で等しく処理されることを確実にする。次いで、個々の別々に標識された生物学的化合物の相対的な濃度が、質量スペクトルでの個々の質量タグの相対的な豊富さによって決定される。これらの方法の限界は、使用される質量標識が、サンプル混合物のあらゆる処理、およびイオン化、および質量分析計中で生じるイオンの輸送に関して、実質的に等しく作用しなければならないことである。この理由のために、典型的には、化学的なアナログである(例えば、安定な放射性同位体アナログであるか、または互いに単純な誘導体である)標識が選択される。これらの方法の限界は、1回の同時の分析のために混合され得るサンプルの数である。これは、ほぼ同一の分離特性、およびイオン化、および伝達効率を有して合成され得る、質量タグ誘導体の数によって制限される。これらの方法の別の限界は、質量標識された分子または切断された標識を、未標識の生体分子およびマトリックス混入物から識別する能力である。生体分子およびマトリックス混入物はまた、質量分析計に導入されたサンプル中に存在する場合もある。この後者の限界は、頻繁に、標識されたサンプルが質量分析の前に徹底的に精製されなければならないこと、そして標識された分子の質量分析計の中でのサブフラグメンテーションを回避しなければならないことを意味する。

30

40

【0012】

Schmidtら、第WO99/32501号(1999年7月1日)は、切断可能な質量標識中の識別可能な質量欠損元素として、水素の代わりにフッ素の使用を記載する。この作業の基本は、これらの2つの元素の間の0.009422amuの一同位体質量の差異である。しかし、これはきわめて小さい質量の差異であり、これは、極めて高解像度の質量分析計で、そしてこれらの質量分析計で最小の質量の範囲でのみ解析することが可

50

能である。質量分析計の解析は、質量の範囲に依存し、そして通常は、100万分の1で記録される。例えば、この業界で一般的な典型的な飛行時間型検出装置は、100万amu(10ppm)の質量で約10amuの質量解析度を有する。従って、FとHとの間に匹敵する小さな質量の差異は、約940amuを上回っては解析することができず、そしてなお低いm/zでは実質的に客観的にとらえることは不可能である。

#### 【0013】

Schmidtらはさらに、過フッ素化(perfluorinate)された炭水化物の質量欠損が、単純な炭水化物とは区別され得ることに注目する。例えば、 $C_6F_5$ の最大化学量論を有する多フッ素化されたアリールタグの一同位体の質量は、正確に166.992015amuである。最も近い炭化水素の一同位体質量は、167.179975である。これは、 $C_{12}H_{23}$ の化学量論に対応し、そして約1125ppmの質量の差異を容易に解析することができる。最小の多フッ素化脂肪族タグの質量は、68.995209amuであり、これは、 $CF_3$ の化学量論に対応する。これに対して最も近い一同位体の炭化水素の質量は、69.070425であり、これは、 $C_5H_9$ の化学量論に対応しており、そして1089ppmの差異に対応している。

10

#### 【0014】

しかし、ヘテロ元素を含む有機分子(例えば、NおよびO(これらは、生物学的分子の典型である))については、フッ素の質量欠損は容易には識別することはできない。例えば、 $C_3HO_2$ の化学量論を含む任意の分子は、 $CF_3$ のものとはわずかに35ppm異なる、一同位体質量を有する。これによって、69amuでもなおほとんど識別することはできない。同様に、 $C_7H_3O_5$ の一同位体の化学量論を含む任意の分子は、167amuで $C_6F_5$ とはわずかに36ppm異なる。

20

#### 【0015】

C、N、およびOの安定な同位体が計算に含まれる場合は、 $C_6F_5$ の質量欠損は、 $[^{12}C]_4[^{13}C]_2[^{15}N]_3[^{16}O]_2$ の化学量論を含む分子と比較して、1.4ppmを識別することができないまでに減少する。同様に、 $CF_3$ についての質量欠損は、 $[^{12}C]_2[^{13}C][^{16}O]_2$ の化学量論を含む分子と比較して、わずか29ppmにまで減少させる。タグの全体の質量が200amuを超えて増大するに伴って、複数のフッ素をなおも伴って導入された質量欠損は、他のヘテロ元素および安定な同位体の欠損の中でも迅速に識別不可能になる。分子へのなおさらなるフッ素の付加は、多くの場合、可溶性の束縛に起因して実行することができない。

30

#### 【0016】

複雑な質量スペクトルデータから目的の個々のピークをデコンボリューションする(deconvolving)一般的なプログラムが、特に、時間解析分離法(例えば、GC/MSおよびLC/MS)と組み合わせた場合に、低分子の複雑な混合物について以前に記載されている(Stein, S.E., "An integrated method for spectrum extraction and compound identification from GC/MS Data", J Am Soc Mass Spect, 10:770-781(1999)およびMallard, G.W. およびJ. Reed, "Automated Mass Spectral Deconvolution & Identification System, AMDIS - User Guide" (US Department of Commerce, Gaithersburg, MD, 1997))。しかし、これらの技術は、配列決定の目的のための生体ポリマー(例えば、タンパク質、核酸、およびポリサッカライド)のフラグメンテーションスペクトルには適用されていない。実際、これらの方法は、典型的には、完全な化学種を同定することを試み、そして一般的にはMSでのフラグメンテーション条件を回避するように模索する。これらは、特有の質量タグを含有している標識された生体分子イオンの同定とも組み合わせられてはいない。

40

#### 【0017】

ペプチドのいずれかの末端上に電荷濃縮部分を含むことによってペプチドのCIDスペ

50

クトルを簡単にする概念の拡大により、他の研究者は、N末端への硬い正電荷の連結によってN末端での塩基性残基の存在または非存在にはかわらず、CID実験でもとのペプチドに由来するN末端のフラグメントイオンの完全な系列の産生を指向することを、実証した。Johnson, R. S.ら、*Mass Spectrom. Ion Processes*, 86:137-154 (1988); Vath, J. E.ら、*Fresenius Z. Anal. Chem.*, 331:248-252 (1988); Stults, J. T.ら、*Anal. Chem.*, 65:1703-1708 (1993); Zaiia, J., ら、*J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 6:423-436 (1995); Wagner, D. S.ら、*Biol. Mass Spectrom.*, 20:419-425 (1991); および Huang, Z.-H.ら、*Anal. Biochem.*, 268:305-317 (1999)を参照のこと。理論的には、すべてのフラグメントイオンは、固定された荷電した基によって指向される電荷移動フラグメンテーション (charge-remote fragmentation) によって産生される。Tomer, K. B.ら、*J. Am. Chem. Soc.*, 105:5487-5488 (1983)を参照のこと。

#### 【0018】

ペプチドは、固定された電荷基のいくつかのクラスで標識されている。これらには、ジメチルアルキルアンモニウム、置換されたピリジニウム、第4級ホスホニウム (quaternary phosphonium)、およびスルホニウム誘導体が含まれる。有用な標識の特徴には、合成の容易さ、標識されたペプチドのイオン化効率の増大、および好ましくない標識フラグメンテーションを最小に有する特異的なフラグメントイオン系列の標識されたペプチドからの形成が含まれる。Zaiia (*Protein and Peptide Analysis by Mass Spectrometry*, J. R. Chapman編、29-41、Humana Press, Totowa, NJ, 1996)は、これらの基準を満たす標識には、ジメチルアルキルアンモニウムのクラス、および第4級ホスホニウム誘導体が含まれることを報告した。さらに、置換されたピリミジウム誘導体は、高エネルギーのCIDにおいて有用であることが報告されている。Bures, E. J.ら、*Anal. Biochem.*, 224:364-372 (1995) および Aebersold, R.ら、*Protein Science*, 494-503頁 (Cambridge University Press, 1992)を参照のこと。

#### 【0019】

分析学的方法での一部の進歩を除いて、タンパク質の同定には、プロテオミクス (proteomics) の分野での主要な障害が残っている。例えば、その推定されるゲノム配列からの単一の精製されたタンパク質の同定のために十分な長さのタンパク質配列タグを作成するためには、18時間にいたるまでが必要であり得る (Shevchenko, A.ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 93:14440-14445 (1996))。さらに、明確なタンパク質の同定は、タンパク質配列タグ (PS T、Clauser, K. R.ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 92:5072-5076 (1995) および Li, G., M., ら、*Electrophoresis*, 18:391-402 (1997)) を参照のこと) を作成することによって達成され得、より大きなペプチドおよびタンパク質のイオン化効率の限界がMS技術の本来の検出感度を制限し、そして少量のタンパク質の同定のためのMSの使用を阻害する。さらに、飛行時間型 (TOF) 検出装置の質量の精度の限界もまた、現在利用されているMS/MS配列決定方法の有用性を妨げ得、それによって、配列決定の前に、タンパク質がより扱いやすいペプチドへとタンパク質溶解および/または化学的溶解手段によって消化されることが必要である (Ambler, R. P., : *Methods in Enzymology*, 25:143-154 (1972) および Gross, E.: *Methods in Enzymology*, 11:238-255 (1967) を参照のこと)。さらに、以前に記載されたMSラダー配列決定アルゴリズムは、タンパク質については実行することができない。なぜなら、このような大きい分子のCIDの間に作成

10

20

30

40

50



されるペプチドフラグメントの量、および質量のラダーを効率的に覆い隠す配列を開始する適切なもとのイオンを同定することができないからである。

【0020】

タンパク質の混合物からのそれらの分離後のタンパク質のMSの同定のための2つの基本的な戦略が提案されている：1) 質量プロファイルフィンガープリント(「MSフィンガープリント」)(James, P.ら、Biochem Biophys Res Commun, 195:58-64(1993)、およびYates, J. R.ら、Anal. Biochem., 214:397-408(1993));および2) MS/MSによる1つ以上のペプチドドメインの配列決定(「MS/MS配列決定」)(Mann, M., IBC Proteomics conference, Boston, MA(1997年11月10日~11日));Wilm, M.ら、Nature, 379:466-469(1996);およびChait, B. T.ら、Science, 262:89-92(1993)を参照のこと)。MSフィンガープリントは、完全なタンパク質のタンパク質溶解による消化によって作成されたいくつかのペプチドの質量を正確に測定すること、そしてそのペプチドの質量のフィンガープリントを用いて既知のタンパク質についてのデータベースを検索することによって達成される。MS/MS配列決定には、MS/MS機器の四重極の配列特異的フラグメントイオンの作成による、タンパク質の1つ以上のPSTの正確な決定が含まれる。

【0021】

Clauserら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 92:5072-5076(1995)は、タンパク質がゲノムデータベースから決定された理論的な配列の参照を可能にする、PSTの決定を通じてのみ正確に同定され得ることを示唆した。Liら、Electrophoresis, 18:391-402(1997)は、MSフィンガープリントによる個々のタンパク質の信頼できる同定が、匹敵する理論的なペプチド質量のデータベースの大きさが増大するに伴って低下するという知見によってこの主張を証明したと思われる。Liら(前出)はまた、彼らが、MSの感受性の限界に起因してゲル中の最大量のタンパク質についてのペプチドマップを得ることができただけであることを報告したが、彼らのマトリクス補助型のレーザー脱着MALDI方法論は、以前に報告された方法を上回って検出感受性を改善することを実証した。明らかに、迅速でありそしてコスト的にも有効であるタンパク質配列決定技術によって、プロテオミクス研究の速度を改善しそしてコストをより低くする。同様に、Kosterによって記載されているように、配列決定の前の核酸の調製および精製(まさに、質量分析計による)は、核酸の配列決定の時間およびコストを増大させる。質量分析計の識別能力の改善(その結果、複数のタンパク質、核酸、ポリサッカライド、または他の配列が同時に決定されるか、あるいは、特異的なイオンが未標識の有機物質から良好に区別され得る)は、既存の方法を上回る相当の有用性を有する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0022】

本発明はこのような方法を提供する。

(1) 以下の工程を包含する、オリゴマーの末端部分を配列決定するための方法：

(a) オリゴマーの末端に標識を共有結合させそして標識されたオリゴマーを形成するように、該オリゴマーを標識部分と接触させる工程であって、該標識部分は、17から77までの原子番号を有している少なくとも1つの元素を含有しており、ただし該元素はイオウまたはリン以外である、工程

(b) 標識されたオリゴマーフラグメントを生じるように、酵素的、化学分解、または質量分析フラグメンテーション法を使用して、該標識されたオリゴマーをフラグメンテーションする工程；および

(c) 少なくとも2つの末端残基の配列を決定するために、質量分析フラグメンテーション方法を使用して、該標識されたオリゴマーフラグメントを分析する工程。

- (2) 前記標識部分が、原子番号35から63までの少なくとも1つの元素を含む、項目1に記載の方法。
- (3) 前記標識部分が、原子番号39から58までの少なくとも1つの元素を含む、項目2に記載の方法。
- (4) 前記標識部分が、臭素、ヨウ素、ユーロピウム、およびイリウムからなる群より選択される少なくとも1つの元素を含む、項目2に記載の方法。
- (5) 前記元素がユーロピウムである、項目4に記載の方法。
- (6) 前記元素がイリウムである、項目4に記載の方法。
- (7) 前記元素が臭素である、項目4に記載の方法。
- (8) 前記元素がヨウ素である、項目4に記載の方法。 10
- (9) 前記オリゴマーが、タンパク質、オリゴヌクレオチド、オリゴサッカライド、および脂質からなる群より選択される、項目1に記載の方法。
- (10) 前記オリゴマーがオリゴヌクレオチドである、項目9に記載の方法。
- (11) 前記配列が少なくとも3個の残基である、項目9に記載の方法。
- (12) 前記配列が少なくとも4個の残基である、項目9に記載の方法。
- (13) 異なる数の質量欠損元素でそれぞれ標識されたいくつかのオリゴマーが、フラグメンテーション工程または分析工程の前に混合される、項目1に記載の方法。
- (14) 以下の工程を包含する、オリゴマー混合物中のオリゴマーの一部を配列決定するための、方法：
- (a) 該オリゴマーの末端に標識を共有結合させ、そして標識されたオリゴマー混合物を形成するように、該オリゴマー混合物を末端標識部分と接触させる工程であって、該末端標識部分は、17から77までの原子番号を有している少なくとも1つの元素を含有しており、ただし、該元素はイオウまたはリン以外である、工程、 20
- (b) 該標識されたオリゴマー混合物中の個々の標識されたオリゴマーを分離する工程；ならびに
- (c) 少なくとも2つの末端残基の配列を決定するために質量分析方法によって工程(b)から該個々の標識されたオリゴマーを分析する工程。
- (15) 前記元素が35から63までの原子番号を有する、項目14に記載の方法。
- (16) 前記元素が39から58までの原子番号を有する、項目14に記載の方法。
- (17) 前記元素が、臭素、ヨウ素、ユーロピウム、およびイリウムからなる群より選択される、項目14に記載の方法。 30
- (18) 生物学的サンプルからのオリゴマーのグループの単離の工程(a)の前にさらに工程を包含する、項目14に記載の方法。
- (19) 前記生物学的サンプルが疾患組織サンプル由来である、項目18に記載の方法。
- (20) 前記生物学的サンプルが健常組織サンプル由来である、項目18に記載の方法。
- (21) 前記分離工程が、標識されたオリゴマー混合物のキャピラリー電気泳動の少なくとも1つの方法によって行われる、項目14に記載の方法。
- (22) 前記質量分析方法がESI-TOF MSを使用する、項目14に記載の方法 40
- (23) 以下の工程を包含する、複数の残基を有しているオリゴマーの構造および機能の分析のための方法：
- (a) 曝された残基および曝されていない残基を別々に標識し、そして別々に標識されたオリゴマーを生じるように、該オリゴマーを質量欠損標識と接触させる工程であって、ここで、該質量欠損標識試薬は、イオウまたはリン以外である、17から77までの原子番号を有している少なくとも1つの元素を含有している、工程、
- (b) 3次元構造中に曝されている該オリゴマーの配列、および3次元構造中には曝されていない該オリゴマーの配列を決定するために、質量分析方法によって、該別々に標識されたオリゴマーを分析する工程。 50

(24) 前記オリゴマーがタンパク質、核酸、またはオリゴサッカライドである、項目23に記載の方法。

(25) 前記質量欠損標識試薬が、35から63までの原子番号の少なくとも1つの元素を含む、項目23に記載の方法。

(26) 前記質量欠損標識試薬が臭素であり、そして前記オリゴマーがタンパク質である、項目26に記載の方法。

(27) 前記質量欠損標識試薬が、原子番号39から58までの少なくとも1つの元素を含む、項目23に記載の方法。

(28) 前記別々に標識されたオリゴマーが、工程(b)の前に酵素的または化学分解法によってフラグメンテーションされる、項目23に記載の方法。

(29) 前記オリゴマーがタンパク質であり、前記質量欠損が臭素またはヨウ素であり、そして前記曝された残基が該タンパク質中に存在するチロシン残基の一部を含む、項目23に記載の方法。

(30) 前記質量分析方法が、ESI-TOF MSを使用する、項目23に記載の方法。

(31) 前記質量分析方法がESI-TOF MSを使用する、項目29に記載の方法。

(32) 以下の工程を包含する、オリゴマーの末端部分を配列決定するための、方法：

(a) オリゴマーの末端に標識を共有結合させそして標識されたオリゴマーを形成するように、該オリゴマーの第1のサンプルを標識部分と接触させる工程であって、該標識部分は、17から77までの原子番号を有している1つの元素を含有しており、ただし該元素はイオウまたはリン以外である、工程

(b) オリゴマーの末端に標識を共有結合させそして標識されたオリゴマーを形成するように、該オリゴマーの第2のサンプルを標識部分と接触させる工程であって、該標識部分は、17から77までの原子番号を有している2つの元素を含有しており、ただし該元素はイオウまたはリン以外である、工程；

(c) 必要に応じて、さらなるサンプルを用いて1から3回工程(b)を繰り返す工程であって、ここで、該標識部分はそれぞれ、17から77までの原子番号を有する3、4、または5個の元素を有し、ただし、該元素はイオウまたはリン以外である、工程；

(d) 工程(a)から(c)までの標識されたオリゴマーを混合する工程；

(e) 標識されたオリゴマーフラグメントを生じるように、酵素的、化学分解、または質量スペクトルによるフラグメンテーション方法を使用して、該標識されたオリゴマーをフラグメンテーションする工程；ならびに

(f) 少なくとも2個の末端残基の配列を決定するために、質量スペクトルによるフラグメンテーション方法を使用して該標識されたオリゴマーフラグメントを分析する、工程。

(33) 前記元素のそれぞれが35から63までの原子番号を有する、項目32に記載の方法。

(34) 前記元素のそれぞれが39から58までの原子番号を有する、項目32に記載の方法。

(35) 前記元素のそれぞれが、臭素、ヨウ素、ユーロピウム、およびイリウムからなる群より選択され、そして前記オリゴマーがタンパク質である、項目32に記載の方法。

(36) 前記元素のそれぞれが、臭素、ヨウ素、ユーロピウム、およびイリウムからなる群より選択され、そして前記オリゴマーがオリゴヌクレオチドである、項目32に記載の方法。

(37) 前記元素のそれぞれが、臭素、ヨウ素、ユーロピウム、およびイリウムからなる群より選択され、そして前記オリゴマーがオリゴサッカライドである、項目32に記載の方法。

(38) 以下の工程を包含するオリゴマーの一部を配列決定するための、方法：

(a) オリゴマーフラグメントを生じるように、1つ以上の特異的な酵素的または化学

10

20

30

40

50

分解によるフラグメンテーション方法を使用して該オリゴマーのアリコートフラグメンテーションする工程であって、ここで、種々のフラグメンテーション方法がそれぞれのアリコートに対して適用される、工程；

(b) オリゴマーフラグメントの末端に第1の標識部分を共有結合させそして標識されたオリゴマーフラグメントを形成するように、オリゴマーフラグメントの第1のアリコートを第1の標識部分と接触させる工程であって、該第1の標識部分は、17から77までの原子番号を有している1つの元素を含有しており、ただし、該元素はイオウまたはリン以外である、工程；

(c) 必要に応じて、オリゴマーフラグメントの末端に別の標識部分を共有結合させそして標識されたオリゴマーフラグメントを形成するように、オリゴマーフラグメントの他のアリコートを他の別の標識部分と接触させる工程であって、該別の標識部分は、17から77までの原子番号を有している2つ以上の元素を有しており、ただし、該元素はイオウまたはリン以外である、工程；

(d) 必要に応じて、標識されたオリゴマーフラグメントのアリコートを混合する工程；ならびに

(e) 該オリゴマーの少なくとも2つの残基の配列を決定するために、質量分析フラグメンテーション方法を使用して該標識されたオリゴマーフラグメントを分析する、工程。

(39) 前記オリゴマーが脂質である、項目38に記載の方法。

(40) 前記オリゴマーがタンパク質である、項目38に記載の方法。

(41) 前記オリゴマーが核酸である、項目38に記載の方法。

(42) 前記オリゴマーがオリゴサッカライドである、項目38に記載の方法。

(43) 前記元素が35から63までの原子番号を有する、項目38に記載の方法。

(44) 前記元素が39から58までの原子番号を有する、項目43に記載の方法。

(45) 以下の工程を包含する、2つ以上のサンプルに由来する分析物の相対量を比較するための、方法；

(a) 該分析物に対して標識を共有結合させそして標識された分析物を形成するように、第1のサンプルの分析物を標識部分と接触させる工程であって、該標識部分は、17から77までの原子番号を有する1つの元素を有しており、ただし該元素はイオウまたはリン以外である、工程；

(b) それぞれのサンプル中の分析物に対して標識を共有結合させるために、次のサンプルの分析物を標識部分と接触させる工程であって、ここで、それぞれの次のサンプルについて使用される標識部分は、17から77までの原子番号を有しているさらなる元素を含み、ただし該元素は、イオウまたはリン以外である、工程；

(c) 標識された分析物のアリコートを混合する工程；および

(d) サンプル間の1つ以上の分析物の相対量を決定するために、質量分析フラグメンテーション方法を使用して該標識された分析物を分析する工程。

( ) 前記元素が35から63までの原子番号を有する、項目45に記載の方法。

(47) 前記元素が39から58までの原子番号を有する、項目45に記載の方法。

(48) 以下の工程を包含する、合成またはスクリーニングのいずれかの際に、化学的なライブラリーの元素をタグ化するための、方法；

(a) ルートタグに対して標識を共有結合させそして標識されたタグを形成するように、ルートタグを標識部分と接触させる工程であって、該標識部分は、17から77までの原子番号を有している1つの元素を有しており、ただし、上記の元素はイオウまたはリン以外である、工程；

(b) 必要に応じて、該ルートタグにさらなる標識を共有結合させそして多標識タグを形成するように、ルートをさらなる標識部分と接触させる工程であって、該標識部分は、17から77までの原子番号を有している1個の元素を有しており、ただし、該元素は、イオウまたはリン以外である、工程；ならびに

(c) 17から77までの原子番号を有している元素のその質量および数の両方を決定するために、質量分析方法によって該標識されたタグを分析する工程であって、その結果

10

20

30

40

50

、元素の質量および数によって、ライブラリーの特異的な化合物に曝した化学的なプロセスを同定し、そしてライブラリー由来の化学実体を同定する、工程。

(49) 前記元素が35から63までの原子番号を有する、項目48に記載の方法。

(50) 前記元素が39から58までの原子番号を有する、項目48に記載の方法。

【0023】

(発明の要旨)

本発明は、広範囲の種々の分子への質量欠損標識の適用を提供する。本発明の方法は、「インソースでの(in-source)」または四重極子でのオリゴマー衝突誘導性解離のいずれかの間に適用され得るので、この方法は、オリゴマーフラグメントの化学合成(例えば、化学分解消化によるかまたは酵素的消化、あるいは、SangerまたはPCR配列決定フラグメント合成)の必要性を優先的に排除する。従って、本発明の方法は、他の方法を使用して得ることができる時間よりも有意に減少したオリゴマー配列決定時間を提供する。この方法はまた、より伝統的なオリゴマー配列決定アプローチ(例えば、ペプチドのMS/MS配列決定、質量分析によるSangerおよびPCR配列決定(KosterおよびButlerらによって記載されているような)、ならびにRademacherらおよびParikhらによって記載されているようなポリサッカライド配列決定)を上回る改良として適用され得る。平行して同時に処理されるサンプルの数を増加させることによる、1回の質量スペクトルで多数のタグを識別する能力の増大は、さらに大きな組み合わせライブラリーが合成またはスクリーニングされることを可能にする。さらに、配列決定されるオリゴマーが本発明の方法を使用して高度にフラグメント化されるので、イオン化効率および得られるフラグメントの変動性は、親オリゴマーのものよりも高く、従って、他の方法を上回って改善される検出感度を導く。

【0024】

1つの局面においては、本発明は、以下の工程を包含する、オリゴマーまたはポリマーの末端部分を配列決定するための方法を提供する：

(a) オリゴマーの末端に標識を共有結合させ、そして標識されたオリゴマーを形成するように、上記のオリゴマーを標識部分と接触させる工程であって、この標識部分は、17から77までの原子番号を有する少なくとも1つの元素を含有しており、ただし、上記の元素はイオウまたはリン以外であり；そしてこのオリゴマーはその構造中に、イオウまたはリンを除いて、17から77の間の原子番号を有する元素を含まない、工程

(b) 標識されたオリゴマーフラグメントを生じるように、酵素的、化学的溶解、または質量分析によるフラグメント化方法を使用して標識されたオリゴマーをフラグメント化する工程；ならびに

(c) 標識の付近の少なくとも2つの単量体エレメントの配列を決定するための質量分析配列決定方法またはアルゴリズムを使用して、標識されたオリゴマーフラグメントを分析する工程。

【0025】

オリゴマーがタンパク質、ペプチド、または核酸である実施態様の1つのグループにおいては、上記の方法はさらに以下の工程を包含する：

(d) 遺伝子配列データのデータベースから予想される配列を検索するために、少なくとも2つの末端残基の配列を使用して、タンパク質または遺伝子を同定する工程。

【0026】

別の局面においては、本発明は、以下の工程を包含する、オリゴマー混合物中のオリゴマーの一部を配列決定するための方法を提供する：

(a) オリゴマーの1つの末端に標識を共有結合させ、そして標識されたオリゴマー混合物を形成するように、オリゴマー混合物を標識部分と接触させる工程であって、この標識部分は、17から77までの原子番号を有する少なくとも1つの元素を含有しており、ただし、上記の元素はイオウまたはリン以外であり；そしてオリゴマーはその構造中に、イオウまたはリンを除く、17から77の間の原子番号を有する元素を含まない、工程、

(b) オリゴマー混合物中の個々の標識されたオリゴマーを分離する工程；ならびに

(c) 少なくとも2つの末端残基の配列を決定するために質量分析方法によって工程(b)による標識されたオリゴマーを分析する工程。

【0027】

このオリゴマーがタンパク質である実施態様の1つのグループにおいては、この方法はさらに以下の工程を包含する：

(d) 遺伝子配列データのデータベースから予想されるタンパク質配列を検索するために、標識されたタンパク質およびその配列のタンパク質末端位置の分離座標(separation coordinate)と組み合わせて、少なくとも2つのC末端または2つのN末端の残基の配列を使用することによって、タンパク質を同定する工程。

【0028】

なお別の局面においては、本発明は、以下の工程を包含する、複数の単量体を有するオリゴマーの構造および機能の分析のための方法を提供する：

(a) 曝されたモノマーおよび曝されていないモノマーを差示的に標識し、そして差示的に標識されたオリゴマーを生じるように、オリゴマーを質量欠損標識試薬と接触させる工程であって、ここで、質量欠損標識試薬は、イオウまたはリン以外である、17から77までの原子番号を有する少なくとも1つの元素を含有しており；そしてこのオリゴマーはその構造中に、イオウまたはリンを除く、17から77の間の原子番号を有する元素を含まない、工程、

(b) 3次元構造中に曝されているオリゴマーの配列、および3次元構造中には曝されていないオリゴマーの配列を決定するための質量分析方法によって、差示的に標識されたオリゴマーを分析する工程。

【0029】

なお別の局面においては、以下の工程を包含する方法が、混合物からの標識された生体分子の定量的決定のために適用され得る：

(a) 生体分子に標識を共有結合させそして標識された生体分子混合物を形成するように、1つのサンプルから得られた生体分子を標識部分と接触させる工程、生体分子に標識を共有結合させそして標識された生体分子を形成するように、少なくとも1つの他のサンプルから得られた生体分子の同様のセットを標識部分と接触させる工程であって、第1の標識部分は、17から77までの原子番号を有する少なくとも1つの元素を含有しており、そしてそれぞれの連続する標識部分は、17から77までの原子番号を有する少なくとも1つのさらなる元素を含有しており；ただし、上記の元素は、イオウまたはリン以外であり；そしてこの生体分子はその構造中に、イオウまたはリンを除く17から77の間の原子番号を有する元素を含まない、工程；

(b) それぞれの供給源に由来する差示的に標識された生体分子サンプルを混合する工程；

(c) 必要に応じて、親和性または他の手段によって生体分子を分離する工程；ならびに

(d) 個々の標識された生体分子、または上記の標識された生体分子から切断された標識の相対量を決定するために、質量分析方法によって差示的に標識された生体分子を分析する工程。

【0030】

なお別の局面においては、以下の工程を包含する方法が、組み合わせライブラリーをコードするために使用され得る：

(a) 合成表面が曝され、そして標識された合成表面を形成する化学的プロセスを同定するために、合成表面をタグ単量体と接触させる工程であって、このタグ単量体は、17から77までの原子番号を有する少なくとも1つの元素を含有する、工程、

(b) 必要に応じて、合成表面が曝され、そして連続して標識された合成表面を形成する引き続く化学的プロセス工程を同定するために、合成表面を連続タグ単量体と接触させる工程であって、このタグ単量体は、17から77までの原子番号を有する少なくとも1つの元素を含有する、工程、

10

20

30

40

50

(c) 単一の多タグ化分子または個々のタグのセットのいずれかとして、合成表面から単量体タグを切断する工程、

(d) 表面の化学処理歴を決定するために、質量分析方法によってタグの組成を分析する工程。

#### 【0031】

上記の方法のそれぞれにおいては、オリゴマーフラグメントの末端標識されたオリゴマーの配列決定のための確固たるアルゴリズムの使用によって、従来のMS/MS配列決定アルゴリズムアプローチを上回る利点を提供する。例えば、1つの特別な利点は、質量分析によるフラグメント化技術がフラグメントを作成するために使用される場合に、消化の前により小さいフラグメントにする必要なく、全長オリゴマー（例えば、タンパク質またはDNAおよびRNAのような核酸）を部分的に配列決定する能力である。別の利点は、質量スペクトルにおいて化学的なノイズ（例えば、未標識のオリゴマーまたは分子、および有機マトリックス混入物）を自動的に濾過する能力である。別の利点は、この方法が、標識の既知の質量欠損に基づいて自動的に開始し、そして配列の決定のためには親イオンの大きさまたは組成の知見を全く必要とはしないことである。別の利点は、この方法が高度に自動化され得ることである。なお別の利点は、質量スペクトルの下限での作業によって得られる絶対的な質量の精度の改善に起因して、配列の曖昧さがより少なく生じることである。なお別の利点は、より強力なイオン化条件を使用することによって生じる良好なイオン化効率および対応する検出感度、ならびに、標識の付加によるフラグメントへの硬い（hard）またはイオン化が可能な電荷の導入である。標識を通じた電荷の導入のなお別の利点は、イオン化が可能な残基を含まないかもしれないオリゴマーの領域から部分的なオリゴマー配列を決定する能力である。本発明の方法が、あらゆる有機ポリマーの配列分析に、または2つ以上のサンプルの間での任意の有機分子の相対的な定量に適用され得ることは、当業者に明らかである。ただし、質量欠損標識は、有機ポリマーまたは分子に結合させられ得る。

#### 【0032】

（発明の詳細な説明）

（定義）

他に定義されない限りは、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学用語は、一般的には、本発明が属する当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。一般的には、本明細書中で使用される名称、および以下に記載されている分子生物学、有機化学、およびタンパク質化学の研究室手順は、当該分野で周知でありそして一般的に使用されているものである。ペプチド合成のための標準的な技術が使用される。一般的には、酵素反応および精製工程は、製造業者の説明書に従って行われる。これらの技術および手順は、一般的には、当該分野での従来の方法、および種々の一般的な参考文献（一般的には、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第2版(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N. Y., および Methods in Enzymology, Biemann編、193: 295 - 305、351 - 360 および 455 - 479 (1993) (これらは本明細書中で参考として援用されている) を参照のこと) に従って行われる。これらは、この文献を通じて提供される。本明細書中で使用される名称、ならびに以下に記載される数学的および統計学的分析、分析化学、および有機合成の手順は当業者に公知であり、そして当該分野で使用されている。化学合成および化学的分析については、標準的な技術、またはその改変が使用される。

#### 【0033】

用語「質量欠損」または「質量欠損標識」は、サンプルの質量スペクトルにおいて容易に同定されるために十分でありそして異なる質量を提供する、標識の一部または標識全体をいう。従って、質量欠損は、典型的には、17から77まで、そしてより詳細には、35から63までの原子番号を有する元素であり、これはイオウまたはリン以外である。典

10

20

30

40

50

型的な有機化学物質（すなわち、グループ 1 およびグループ 2 のヘテロ元素を含有する有機化学物質さえ）（例えば、生体分子）との使用に最も有効な質量欠損標識は、35 から 63 までの原子番号を有する 1 つ以上の元素を取り込む。最も好ましい質量欠損の例は、臭素元素、ヨウ素元素、ユーロピウム元素、およびイットリウム元素である。

【0034】

本明細書中で使用される場合は、用語「オリゴマー」は、残基が類似であるが、典型的には同一ではない、残基の任意のポリマーをいう。一般的には、オリゴマーは、タンパク質、オリゴヌクレオチド、核酸、オリゴサッカライド、ポリサッカライド、および脂質などの天然に存在しているポリマーを含むことを意味する。オリゴマーはまた、フリーラジカル、縮合体、合成起源のアニオン性またはカチオン性ポリマー、（例えば、限定的ではないが、アクリレート、メタクリレート、ナイロン、ポリエステル、ポリイミド、ニトリルゴム、ポリオレフィン、およびこれらのクラスの合成ポリマーの種々の単量体のブロックコポリマーまたはランダムコポリマー）をいい得る。本明細書中に記載されている分析方法に供されるオリゴマーは、それらの天然に存在している数の典型である残基数を有する。例えば、オリゴヌクレオチドであるオリゴマーは、数百およびさらには数千の残基を有し得る。同様に、タンパク質は、一般的には、百またはそれ以上の残基を有する（しかし、より小さいフラグメント（例えば、ペプチド）の配列決定もまた有用である）。オリゴサッカライドは、典型的には、3 から 100 個の糖残基を有する。脂質は通常は、2 個または 3 個の脂肪酸残基を有する。

【0035】

本明細書中で使用される場合は、用語タンパク質、ペプチド、およびポリペプチドは、アミノ酸残基のポリマーをいう。この用語はまた、その中の 1 つ以上のアミノ酸が対応する天然に存在しているアミノ酸の化学的なアナログ（これには、翻訳後のプロセス（例えば、グリコシル化およびリン酸化）によって改変されるアミノ酸が含まれる）であるアミノ酸ポリマーに対しても適用される。

【0036】

「タンパク質」は、本明細書中で使用される場合は、ペプチド、酵素、糖タンパク質、ホルモン、レセプター、抗原、抗体、成長因子などを含むがこれらに限定されない、任意のタンパク質を意味する。本発明において好ましいタンパク質には、少なくとも 25 アミノ酸残基、より好ましくは、少なくとも 35 アミノ酸残基、そしてなおより好ましくは、少なくとも 50 アミノ酸残基から構成されるタンパク質が含まれる。

【0037】

「ペプチド」は、単量体がアミノ酸であり、そしてアミド結合を通じて一緒に連結されているポリマーをいうか、あるいは、ポリペプチドと呼ばれるポリマーをいう。アミノ酸が  $\alpha$ -アミノ酸である場合は、L-光学異性体または D-光学異性体のいずれかが使用され得る。さらに、天然には存在しないアミノ酸（例えば、 $\beta$ -アラニン、フェニルグリシン、およびホモアルギニン）もまた含まれる。アミノ酸は、D-異性体または L-異性体のいずれかであり得る。L-異性体が一般的には好ましい。一般的な概説については、Spatola, A. F., CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein 編, Marcel Dekker, New York, 267 頁 (1983) を参照のこと。

【0038】

「タンパク質配列決定タグ」は、本明細書中で使用される場合は、タンパク質の部分的な配列を示す少なくとも 2 個のアミノ酸の連続する系列をいう。好ましい P S T は、本発明の標識、または本発明の標識のフラグメント、または本発明の標識のイオン化誘導体を含む。

【0039】

用語「核結合エネルギー」は、元素の計算された核質量と実際の核質量との間での質量の格差をいう。これは、その構成成分である単離された核子へと核を分裂させるために必

10

20

30

40

50



要なエネルギーの質量当量（相対性理論に従う）として定義される。Bueche, F., 「Principles of Physics」(McGraw-Hill, NY, 1977)を参照のこと。

【0040】

用語「デコンボリューション」は、ランダムなノイズおよび周期的なノイズの両方を含むか、あるいは、そうでなければ電氣的または物理的な回収方法との相互作用によって不明確であるデータから目的の情報を回収するための数学的手順およびアルゴリズムを広範囲に定義する。

【0041】

用語「アルキル」は、約1～30個の炭素、および好ましくは、4～20個の炭素、そしてより好ましくは、6～18個の炭素を一般的には有する、分枝または分枝していない、飽和または不飽和の、一価の炭化水素基をいうように、本明細書中で使用される。アルキル基が1～6個の炭素元素を有する場合は、これは「低級アルキル」と呼ばれる。適切なアルキル基には、例えば、1個以上のメチレン、メチン(methine)および/またはメチン(methyne)基を含有する構造が含まれる。分枝構造は、i-プロピル、t-ブチル、i-ブチル、2-エチルプロピルなどと類似の分枝モチーフを有する。本明細書中で使用される場合は、この用語は、「置換されたアルキル」および「環式アルキル」を含む。

10

【0042】

「置換されたアルキル」は、例えば、低級アルキル、アリアル、アシル、ハロゲン(すなわち、ハロアルキル(例えば、 $CF_3$ ))、ヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アルキルアミノ、アシルアミノ、チオアミド、アシルオキシ、アリアルオキシ、アリアルアルキル、メルカプト、チア、アザ、オキソ、飽和および不飽和両方の環式炭化水素、ヘテロ環などのような1つ以上の置換基を含むとまさに記載されているアルキルをいう。これらの基は、任意の炭素またはアルキル部分の置換基に結合され得る。さらに、これらの基は、アルキル鎖からぶら下がり得るか、またはアルキル鎖に組み込まれ得る。

20

【0043】

用語「アリアル」は、芳香族置換基をいうために本明細書中で使用される。これは、単一の芳香族環、あるいは一緒に縮合しているか、共有結合されているか、またはメチレン部分もしくはエチレン部分のような共通の基に対して連結されている、複数の芳香族環であり得る。共通の連結基はまた、ベンズフェノンにおける場合のように、カルボニルであり得る。芳香族環(単数または複数)としては、とりわけ、フェニル、ナフチル、ピフェニル、ジフェニルメチルおよびベンゾフェノンなどが挙げられ得る。用語「アリアル」は、「アリアルアルキル」および「置換されたアリアル」を含む。

30

【0044】

「置換されたアリアル」は、低級アルキル、アシル、ハロゲン、アルキルハロ(例えば、 $CF_3$ )、ヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アルキルアミノ、アシルアミノ、アシルオキシ、フェノキシ、メルカプト、ならびに芳香族環(単数または複数)に縮合しているか、共有結合しているか、またはメチレン部分もしくはエチレン部分のような共通の基に対して連結している、飽和環式炭化水素および不飽和環式炭化水素の両方のような1つ以上の官能基を含むとしてまさに記載される、アリアルをいう。連結基はまた、例えば、シクロヘキシルフェニルケトンにおいて、カルボニルであり得る。用語「置換されたアリアル」は、「置換されたアリアルアルキル」を含む。

40

【0045】

用語「アリアルアルキル」は、アリアル基が、本明細書中で定義されるようなアルキル基によって別の基に連結している、「アリアル」のサブセットをいうために本明細書中で使用される。

【0046】

「置換されたアリアルアルキル」は、置換されたアリアル基が、本明細書中で定義されるようなアルキル基によって別の基に結合している、「置換されたアリアル」のサブセッ

50

トを定義する。

【0047】

用語「アシル」は、ケトン置換基 - C(O)R を記載するように使用され、ここでは、R は、本明細書中で定義されているような、アルキルまたは置換されたアルキル、アリーールまたは置換されたアリーールである。

【0048】

用語「ハロゲン」は、フッ素元素、臭素元素、塩素元素およびヨウ素元素をいうために本明細書中で使用される。

【0049】

用語「ランタニド系列」は、57と71との間の原子番号を有する周期表中の元素をいう。

10

【0050】

用語「ヒドロキシ」は、基 - OH をいうために本明細書中で使用される。

【0051】

用語「アミノ」は、- NR R' を示すために使用され、ここで、R および R' は、独立して、H、アルキル、アリーールまたはそれらの置換されたアナログである。「アミノ」は、「アルキルアミノ」（これは2級アミンおよび3級アミンを示す）および「アシルアミノ」（これは、基 RC(O)NR' を記載する）を含む。

【0052】

用語「アルコキシ」は、- OR 基をいうために本明細書中で使用され、ここで、R はアルキルまたはその置換されたアナログである。適切なアルコキシ基としては、例えば、メトキシ、エトキシ、t-ブトキシなどが挙げられる。

20

【0053】

本明細書中で使用される場合、用語「アリーールオキシ」は、酸素元素を介して別の基に直接連結されている芳香族基を示す。この用語は、芳香族基が、「置換されたアリーール」について上記に記載されているように置換されている、「置換されたアリーールオキシ」部分を含む。例示的なアリーールオキシ部分としては、フェノキシ、置換されたフェノキシ、ベンジルオキシ、フェネチルオキシなどが挙げられる。

【0054】

本明細書中で使用される場合、「アリーールオキシアルキル」は、本明細書中で定義されているように、アルキル基に対して酸素元素を介して連結している芳香族基を定義する。この用語「アリーールオキシアルキル」は、芳香族基が、「置換されたアリーール」について記載されているように置換されている、「置換されたアリーールオキシアルキル」部分を含む。

30

【0055】

本明細書中で使用される場合、用語「メルカプト」は、一般構造 - S - R の部分を定義し、ここで、R は、H、アルキル、アリーール、または本明細書中で定義されているようなヘテロ環式である。

【0056】

用語「飽和環式炭化水素」は、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチルなど、ならびにこれらの構造体の置換されたアナログのような基を示す。これらの環式炭化水素は、単環構造体または多環構造体であり得る。

40

【0057】

用語「不飽和環式炭化水素」は、シクロペンテン、シクロヘキセンなど、およびそれらの置換されたアナログのような、少なくとも1つの二重結合を有する一価の非芳香族基を記載するように使用される。これらの環式炭化水素は、単環構造体または多環構造体であり得る。

【0058】

用語「ヘテロアリーール」は、本明細書中で使用される場合、芳香族環（単数または複数）の1つ以上の炭素元素が、窒素、酸素またはイオウのようなヘテロ元素によって置き換

50

えられている芳香族環をいう。ヘテロアリールは、単一の芳香族環、複数の芳香族環（単数または複数）、または1つ以上の非芳香族環に結合した1つ以上の芳香族環であり得る構造体をいう。複数の環を有している構造においては、環は一緒に縮合し得るか、共有結合され得るか、またはメチレン部分もしくはエチレン部分のような共通の基に対して連結され得る。共通の連結基はまた、フェニルピリジリケトンにおける場合のように、カルボニルであり得る。本明細書中で使用される場合、チオフェン、ピリジン、イソオキサゾール、フタルイミド、ピラゾール、インドール、フランなどのような環、またはこれらの環のベンゾ縮合アナログは、用語「ヘテロアリール」によって定義される。

【0059】

「ヘテロアリールアルキル」は、「ヘテロアリール」のサブセットを定義し、ここで、本明細書中で定義されるようなアルキル基は、別の基に対してヘテロアリール基を連結する。

10

【0060】

「置換されたヘテロアリール」は、まさに記載されているようなヘテロアリールをいい、ここで、ヘテロアリール核は、低級アルキル、アシル、ハロゲン、ハロアルキル（例えば、 $CF_3$ ）、ヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アルキルアミノ、アシルアミノ、アシルオキシ、メルカプトなどのような1つ以上の官能基で置換されている。従って、ヘテロ芳香族環の置換されたアナログ（例えば、チオフェン、ピリジン、イソオキサゾール、フタルイミド、ピラゾール、インドール、フランなど、またはこれらの環のベンゾ縮合アナログ）は、用語「置換されたヘテロアリール」によって定義される。

20

【0061】

「置換されたヘテロアリールアルキル」は、本明細書中で定義されるようなアルキル基が、別の基に対してヘテロアリール基を連結している、上記のような「置換されたヘテロアリール」のサブセットをいう。

【0062】

用語「ヘテロ環式」は、環中の1～12個の炭素元素および窒素、イオウ、または酸素から選択される1～4個のヘテロ元素から形成される、単環または複数の縮合環を有している、一価の飽和または不飽和の非芳香族環を記載するように本明細書中で使用される。このようなヘテロ環は、例えば、テトラヒドロフラン、モルホリン、ピペリジン、ピロリジンなどである。

30

【0063】

用語「置換されたヘテロ環式」は、本明細書中で使用される場合、ヘテロ環核が、低級アルキル、アシル、ハロゲン、ハロアルキル（例えば、 $CF_3$ ）、ヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アルキルアミノ、アシルアミノ、アシルオキシ、メルカプトなどのような1つ以上の官能基で置換されている、「ヘテロ環」のサブセットを記載する。

【0064】

用語「ヘテロ環式アルキル」は、本明細書中で定義されるようなアルキル基が、別の基にヘテロ環式基を連結している、「ヘテロ環式」のサブセットを定義する。

【0065】

用語「キレート」は、共有ではない手段を介した、実質的有機分子に対する金属元素または金属イオンの強力に会合的な結合をいう。これらは、有機金属分子としても別に公知である。

40

【0066】

（一般論）

本発明は、質量分析計での標識された分子および未標識の分子または分子のフラグメントの識別を改善するための、質量分析方法にある。この方法は、オリゴマーの配列決定に関して、および質量スペクトルで識別され得る組み合わせの複雑さの増大に関して、使用され得る。本方法は、質量欠損を取り込んでいる標識試薬で分子またはオリゴマーの末端を標識すること、そして質量スペクトルにおいて、得られた質量欠損標識分子を他の未標識の分子または未標識のオリゴマーフラグメントから識別することによって、実行される

50

## 【0067】

1つの実施態様においては、標識されたオリゴマーは、質量分析計のイオン化ゾーンでフラグメンテーションされた（インソースフラグメンテーション）か、またはMS/MS機器の衝突セル中でフラグメンテーションされたかのいずれかのインタクトな標識されたオリゴマーを用い、そして標識された末端からオリゴマーの末端配列を決定するための数学的アルゴリズムを使用して、配列決定され得る。別の実施態様において、標識されたオリゴマーは、親の鋳型から合成され得るか、または、化学分解的もしくは酵素的に消化されて、標識の種々の質量欠損によって質量スペクトルにおいてアルゴリズムによって同定される標識されたフラグメントの配列決定ラダーを含むフラグメントを形成し得る。標識されたオリゴマーおよびオリゴマーフラグメントは、得られる質量スペクトルでのそれらの特有の質量特徴によって、未標識のオリゴマーおよびフラグメントから区別され、そしてそれらの相対量および/または特有の質量特徴（質量欠損に起因する）によって、イオン化マトリックスならびに混入しているオリゴマーおよびフラグメントに関係している未標識のオリゴマーフラグメントおよびピークから解析される。累積ランキングシステムが、連続残基の質量ラダーを用いて決定された配列の確実性を強くするためのアルゴリズムによって使用される。いくつかの実施態様においては、このプロセスは、精製された標識されたタンパク質について1分未満で達成され、これによって、現行のMS/MSタンパク質配列決定技術よりも500～1000倍迅速な方法を生じる。

10

## 【0068】

1つの実施態様においては、標識されたオリゴマーは、衝突誘起解離（CID）によってMSが高度にフラグメンテーションされる。CIDは、イオン化ゾーンで（例えば、インソース）または衝突ゾーンに導入された非オリゴマーガスとの高エネルギー衝突により衝突セル中で、達成され得る。好ましい標識は、親のオリゴマーと比較して、イオン化効率の増大および得られる標識されたオリゴマーフラグメントイオンの揮発性の増大を導き、従って、これによって全体的な検出感度を改善する。好ましい標識は、それが付着しているフラグメントに特有の質量特徴を与える。特に好ましい実施態様において、特有の質量特徴は、オリゴマー残基（例えば、C、H、O、N、PおよびS）に会合している元素の核結合エネルギーとは実質的に異なる核結合エネルギーを含む標識中に取り込まれた、1つ以上の元素から構成され得る。別の実施態様においては、同位体によって異なるバージョンの標識の混合物は、質量スペクトルにおいて目的のピークを解析するために、得られる同位体対の相対量と同時に使用され得る。別の実施態様においては、1つ以上のメチル単位もしくはメチレン単位、および/または同位体的に純粋なアナログ（例えば、D対HもしくはC1）の付加によって異なる標識アナログは、質量スペクトルの目的のピークを独自に識別するために、使用され得る。なお別の実施態様においては、標識されたオリゴマー、フラグメントまたはイオンに関係しているピークは、それらの質量のシフトによって、未標識のオリゴマーまたはフラグメントから解析され得る。オリゴマーまたは配列タグの配列は、好ましくは、質量スペクトルの低分子量の末端から構築され、それによって以前の方法を上回る利点（例えば、より大きい絶対的な質量精度、およびより容易な配列決定）を提供する。タンパク質の場合は、この利点には、得られる標識されたペプチドフラグメントからの、Q残基およびK残基の分解が含まれる。

20

30

40

## 【0069】

この技術のための適切な標識の選択には、いくつかの基準の考慮が必要である。第1に、標識は好ましくは、MSのフラグメンテーション条件に耐えるために十分に頑強である。第2に、標識は好ましくは、オリゴマー骨格の内部切断によって作製された全ての未標識のオリゴマーフラグメントから、またはサンプル中に存在し得る他の未標識の有機分子から識別可能な特有の質量/電荷（ $m/z$ ）特徴（例えば、質量欠損）をもまた作製する。第3に、標識はまた、イオン化が可能なまたは恒久的にイオン化された基を保有して、なおも荷電していない末端残基を含む多量のイオンをフラグメンテーションによって生じ

50

## 【0070】

質量欠損元素としてのFの限定された有用性（Schmidtら、第WO99/32501号（1999年7月1日））とは対照的に、本発明は、はるかに大きな質量の差異を示し、従って、より広い有用性を示す、質量欠損元素を使用する。例えば、アリール基上の1つのヨウ素の置換によって、0.1033 amuの質量欠損を生じ、これは5つのアリールF置換の質量欠損よりも5倍を超えて改善されている。アリール環上の単一のI（C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>I）は、202.935777 amuの一同位体（monoisotopic）質量を示す。これは、202.974687 amuという、安定な同位体とヘテロ元素を含有している有機分子（[<sup>12</sup>C]<sub>9</sub>[<sup>15</sup>N][<sup>16</sup>O]<sub>5</sub>）との最も近い組み合わせとは、192 ppm異なる。従って、Iの質量欠損と同様の質量欠損を示す任意の元素（すなわち、35と63との間の原子番号）の単一の置換によって、有機ヘテロ元素の任意の組み合わせについての3,891 amuの総質量に対して識別可能な質量欠損（10 ppmレベルで）を生じる。2つのこのような元素は、7,782 amuの総質量に対して識別可能な質量欠損を示す。3つのこのような元素は、11,673 amuの総質量に対して識別可能な質量欠損を示す。あるいは、I（または等価な質量欠損元素）の単一、二重、または三重の付加が、10 ppmの質量分解能を用いて、質量スペクトルにおいて4,970 amuの総質量に対して互いに識別され得る。

10

## 【0071】

本発明は、質量欠損標識分子またはフラグメントの同定のため、ならびに標識されたオリゴマーフラグメントからのオリゴマー配列の決定のためのロバストアルゴリズムを質量スペクトルに取り込む。このアルゴリズムによって、既知である標識の質量のみから開始して、全ての可能性のあるオリゴマー配列についてのスペクトルデータを検索する。このアルゴリズムは、全ての可能性のあるオリゴマー配列をランク付けるために、標識されたオリゴマーフラグメントの質量対電荷比、および得られたMSピークの相対量の両方を使用する。累積（前向き）ランキングが、特定の残基の連続数のような配列が質量スペクトルで見い出されるのを排除するために使用される。好ましい実施態様においては、化学的なノイズは、配列決定アルゴリズムの適用の前に、質量スペクトルから選択的に分析される。以前の配列決定アルゴリズムとは異なり、現在のアルゴリズムは、それが開始イオンもしくは親イオンのいずれかを定義するため、または質量スペクトルにおける予想される配列ピークを同定もしくは適正にするためのいずれかの、人による介入を伴わずに実行され得るので、確固としたものである。別の実施態様においては、最も高くランク付けされた配列の可能性が、配列データから予想される可能性のあるオリゴマー配列のデータベース（特に、オリゴマーが得られた生物体に制限されたもの）中でのそれらの存在によってさらに適正にされ得る。別の実施態様においては、最も高くランク付けられた配列の能力が、親のオリゴマーの分離コーディネート（例えば、タンパク質の等電点および分子量）および/またはその単量体組成によって、さらに適正にされ得る。

20

30

## 【0072】

本発明は、1つ以上の元素を、他の元素の他の化学量論的組み合わせは有さないかもしれない、スペクトル中の特有の質量位置に標識の質量を移動させる核結合エネルギー（しばしば、質量欠損と呼ばれる）を有する標識内に取り込む。このようにして、標識されたフラグメントは、化学的なノイズからより容易に識別され、そしてより少ない相対量で存在する場合およびより複雑なサンプル混合物中に存在する場合にはより良い精度で検出され得る。さらに、この方法は、種々のイオン化方法によって産生される、より少量の標識されたフラグメント（例えば、タンパク質およびペプチドのフラグメンテーションによって産生されたd-イオンおよびw-イオン）の同定を補助するために使用され得る。

40

## 【0073】

質量欠損の使用はまた、質量分析計において2つ以上の供給源から得られる同じ分子の相対量の定量にも適用され得る（例えば、第WO00/11208号、第EP1042345A1号、および第EP979305A1号を参照のこと）。この特定の的方法論を使用して、標識は、1つの元素の、それぞれの供給源由来の分子に添加されるその元素の安定

50

な同位体での置換によって、他の標識とは異なるオリゴマーに結合され得る。標識に続いて供給源が混合され、そして分子の相対量またはそれぞれの供給源由来の標識が、質量スペクトルにおいて定量される。異なる同位体が、それぞれの供給源由来の同じ分子について生じるピークを独特に区別するように使用される。1つ以上の質量欠損元素を標識内に取り込むためのこの方法の改変は、得られる標識された分子または標識が、得られる質量スペクトル中のあらゆる化学的ノイズに取って代わられるので、この定量を改善し得る。

#### 【0074】

本発明は、タンパク質の配列決定方法（例えば、逆転質量ラダー配列決定（PCT公開第WO00/11208号を参照のこと）および他のMSタンパク質配列決定）、定量、ならびに同定方法（例えば、米国特許第6,027,890号およびPCT公開第WO99/32501号および同第WO00/11208号に概説されている同定方法）と組み合わせ使用され得る。本明細書中に記載されているとおりの質量欠損標識はまた、米国特許第5,700,642号、同第5,691,141号、同第6,090,558号、および同第6,194,144号に概説されるMSによるDNA配列決定方法にも適用され得る。なおさらに、本明細書中に記載されているような質量欠損標識は、ポリサッカライド（例えば、タンパク質のグリコシル化パターン）の配列を決定するために使用され得る。米国特許第5,100,778号および同第5,667,984号に提供されている一般的な方法を参照のこと。

#### 【0075】

より広範囲には、質量欠損標識がポリマーの末端に共有結合され得る限りは、天然または合成であるかどうかにはかかわらず、この方法を用いて、種々の供給源に由来する任意のポリマーの同定（配列決定）または定量を改善し得る。

#### 【0076】

本発明はまた、異なる供給源由来の非ポリマー化学種の分子に標識が共有結合され得る限りは、異なる供給源由来の非ポリマー化学種の構造的な同定または相対的定量のためにも使用され得る。例としては以下が挙げられる：ディファレンシャル（疾患組織対健常組織）アミノ酸分析；ディファレンシャルヌクレオチド分析；ディファレンシャルサッカライド分析；不飽和および分岐脂肪酸のディファレンシャル脂肪酸分析および構造決定；脂質分析および構造決定；ならびに栄養素の品質管理適用、および組み合わせライブラリータグ（米国特許第6,056,926号、ならびにBrenner, S. およびR. A. Lerner, 「Encoded combinatorial chemistry」, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 89:5381-5383 (1992) に概説されているとおり）。

#### 【0077】

核酸（例えば、DNAまたはRNA）の質量欠損標識に関して最初に、米国特許第6,090,558号および同第6,194,144号のそれぞれが、どのようにしてDNAが、プライマー配列中に特有の質量標識を取り込んでいる合成されたフラグメントから配列決定され得るかを記載している。対照的に、本発明は、未標識フラグメントから標識されたフラグメントを識別し、そしてより確固としたなお敏感な方法を提供するために、質量欠損を有している標識のみを使用して標識が行われることを提供する。質量欠損標識の使用の別の利点は、この様式で並行して配列決定され得る異なる核酸の数の増大である。（より一般的な標識プロセスよりもむしろ）質量欠損標識の利点は、以前の研究では開示されていなかった。

#### 【0078】

同様に、第WO00/11208号、同第EP1042345A1号、第EP979305A1号、および米国特許第6,027,890号は、種々の供給源間のタンパク質分子およびDNA分子のディファレンシャル分析および定量のための特有の質量標識の使用を記載している。しかし、これらの参考文献のそれぞれは、特有の質量標識中に質量欠損元素を取り込むことの利点を予想することも同定することもできない。

#### 【0079】

次に、オリゴサッカライド標識に関して、第EP698218B1号は、標識された炭水化物の使用、およびそれらのアッセイでの用途を記載し、そして米国特許第5,100,778号および同第5,667,984号は、MSによるオリゴサッカライド配列の決定のための質量標識の使用を記載している。それらの中で開示された技術は、特有の質量タグでの標識に適用し得るかもしれないが、MSピークをスペクトルの非干渉領域にシフトさせる目的のために標識中に質量欠損を取り込むことは開示されておらずそして明らかでもない。従って、本明細書中に記載されている質量欠損標識方法論の適用によって、先行技術に記載されている（標識中への質量欠損の取り込みのための適切な改変を伴う）ように、または当業者が利用可能な任意の他の方法によって炭水化物を標識し、そして質量分析計において質量欠損標識フラグメントを同定することによって、複雑な炭水化物の糖配列を同定するための方法が提供される。炭水化物の構造は、上記に記載されているDNAおよびMS/MSタンパク質配列決定方法と同様の、最小標識フラグメントからの質量付加によって、全体として、または一部、決定され得る。さらに、標識中への質量欠損元素の取り込みは、化学的なノイズから標識フラグメントを単離することについて有用性を有する。

10

#### 【0080】

次いで、脂質に関しては、脂肪酸の組成および配列が、グリシドール骨格から酵素消化された脂肪酸を標識することによって決定され得、ここで、種々の質量欠損標識が、配列特異的である種々の酵素消化物についてタグとして適用される。

#### 【0081】

記載されるそれぞれの適用において、アミノ酸、脂質、およびヌクレオチドは、当業者が一般的に利用可能である方法によって誘導体化され得る。同位体によって異なる標識が、異なるサンプルから得られたまたは抽出されたこれらの分子のこのような誘導体化のために使用される場合は、ディファレンシャル定量分析がMSによって行われ得る。しかし、それぞれの例においては、標識中への質量欠損元素の取り込みによって、標識された分子をスペクトル中の他の化学的なノイズから単離し、そしてより正確な相対量の測定値を得る能力が改善される。しかし、得られる質量スペクトルにおいて同時に識別され得るサンプルの数を増大させるために標識中に異なる数の質量欠損元素を取り込むことは、先行技術においては予想されていない。この方法論はまた、生物学的サンプル中の代謝産物の単離および同定を改善するためにも適用され得（例えば、2000年4月19日に提出された、米国出願第09/553,424号を参照のこと）、ここで、供給源から得られた同位体富化代謝産物の混合物が、続いて、富化されていない形態からの、同位体富化代謝産物の同定および定量を容易にするために、質量欠損を含有している標識で誘導体化される。

20

30

#### 【0082】

オリゴマーの配列決定および同定に加えて、質量欠損標識は、生物学的に活性な高分子（例えば、タンパク質、核酸、およびオリゴサッカライドのようなオリゴマー）の構造および機能をプローブするために使用され得る。

#### 【0083】

重水素交換方法（Andersenら、J. Biol. Chem. 276(17): 14204-11(2001)を参照のこと）は、リガンド結合に関係している2次および高次のタンパク質構造および領域をプローブするために使用されている。溶媒に曝されておりそして結合したリガンドによって埋もれても隠されてもいない部分は、重水の存在下では、はるかに高速で水素を重水素に交換する。続くタンパク質のタンパク質分解、ならびに重水素を入れられたおよび重水素を入れられていないタンパク質分解フラグメントの質量スペクトル分析によって、どの部分が特異的な高次構造元素に、またはエピトープの結合に関係しているかについての情報を導き出すことができる。

40

#### 【0084】

重水素の代わりにオリゴマーまたは他の高分子を標識するために質量欠損元素が使用される改良された方法が、本明細書中で提供される。特異的な反応基を標的化し得る質量欠

50

損を有している元素を取り込んでいる低分子の使用、および例えば、完全なまたはタンパク質分解されたタンパク質サンプルの、フラグメンテーションパターンの分析によって、構造または機能についての情報を、質量欠損標識で単一または複数で標識されているか、あるいは未標識の生成物についての検索によって得ることができる。この情報は、質量欠損標識が提供する化学的なノイズの減少によって、より容易にそしてはっきりと得られる。詳細には、活性なタンパク質は、タンパク質のチロシン残基を標的化する臭素またはヨウ素ガスのような質量欠損標識に曝され得る。チロシン残基は、それらのゲノムの遺伝子座（すなわち、表面であるか埋まっているか）およびそれらのリガンド結合における関与に依存して別々に標識される。先にタンパク質分解が行われるかまたは行われずに、タンパク質はフラグメンテーションされ得、そしてチロシン標識パターンが、臭素またはヨウ素元素の取り込みによって生じるピークについての検索によって質量分析計において容易にプローブされ得る。

10

## 【0085】

質量欠損標識が有用な用途を有する別の分野は、質量欠損を有する元素をまだ含まない低分子および高分子（例えば、ほとんどの生物学的に誘導された材料）の両方の組み合わせ分析においてである。この適用においては、組み合わせライブラリーとして作製された物質（例えば、タンパク質およびペプチド（抗体および酵素を含む）、ポリサッカライド、ポリヌクレオチド、医薬品、または触媒）の複雑な混合物が、米国特許第6,056,926号に、そしてBrenner, S.およびR. A. Lerner、「Encoded combinatorial chemistry」Proc. Natl. Acad. Sci., 89:5381-5383(1992)によって記載されているように、タグ元素を取り込むことによって、活性についてプローブされ得る。タグの数の増大、および質量欠損元素を取り込んでいるタグの使用によって、より大きな組み合わせライブラリーを評価することができる。所望される結合特性を有するこれらの物質は、質量欠損標識に匹敵する質量のシフトを示す。きわめて複雑な混合物中でもなお、質量欠損の結果としてシフトしたピークを同定することは簡単な仕事である。

20

## 【0086】

（実施形態の説明）

（オリゴマーの末端部分の配列決定）

上記を参照して、本発明は、1つの局面において、以下の工程を包含する、オリゴマーの末端部分を配列決定するための方法を提供する：

30

（a）オリゴマーの末端に標識を共有結合させそして標識されたオリゴマーを形成するように、上記のオリゴマーを標識部分と接触させる工程であって、標識部分は、17から77までの原子番号を有している少なくとも1つの元素を含有しており、ただし、上記の元素はイオウでもリンでもない、工程

（b）酵素的、化学分解、または質量分析法フラグメンテーション法によってオリゴマーをフラグメンテーションする工程；および

（c）少なくとも2つの末端残基の配列を決定するために、質量分析フラグメンテーション方法を使用して、フラグメンテーションされた標識されたオリゴマーを分析する工程。

40

## 【0087】

本発明のこの局面では、オリゴマーは、本質的に任意の供給源（例えば、組織サンプル、生検、細胞抽出物など）から得ることができる。好ましくは、オリゴマーは、妨害成分を含まないように単離されそして精製される。単離されたオリゴマーは、質量分析フラグメンテーション方法による分析に適切な標識されたオリゴマーを形成するように、オリゴマーの末端に標識を共有結合させるために、標識部分と接触させられ得る。オリゴマーの標識のための特定の方法および条件は、オリゴマー中に存在する官能基、および標識試薬中に存在する反応基に依存して、確立された方法に従って行われ得る。典型的には、共有結合は、標識とオリゴマーとの間での、例えば、アミド結合、エステル結合、尿素結合、チオ尿素結合、ジスルフィド結合、ホスホジエステル結合、スルホネート結合、イミン結

50



合、およびヒドラジド結合の形成を通じて作製され得る。結合化学のより完全な議論は、以下の節に提供される。

【0088】

得られる標識されたオリゴマーのフラグメンテーションは、化学分解、酵素的、または質量分析方法を通じて達成され得る。あるいは、フラグメントは、もとの分子の不完全な複製（例えば、核酸の配列決定）によって作製される場合がある。

【0089】

標識されたオリゴマーサンプルのフラグメンテーション後、フラグメントは、少なくとも2個、より好ましくは3個、なおより好ましくは、4個、5個、または6個の末端残基の配列を決定するために、質量分析方法を使用して分析される。一部の実施形態においては、7個以上の末端残基の配列が決定される。好ましい質量分析方法が、以下の実施例に記載される。

10

【0090】

好ましい実施形態の1つのグループにおいては、標識部分は、35から63、なおより好ましくは、39から58の原子番号を有している少なくとも1つの元素を含む。特に好ましい実施形態のグループにおいては、この部分は、臭素、ヨウ素、ユーロピウム、およびイットリウムから選択される少なくとも1つの元素を含む。なおより好ましくは、標識部分は、1個から3個の臭素またはヨウ素元素を有する。

【0091】

本発明のこの局面において配列決定される好ましいオリゴマーには、タンパク質（またはペプチド）、オリゴヌクレオチド、オリゴサッカライド、および脂質が含まれる。より好ましくは、オリゴマーはタンパク質（またはペプチド）またはオリゴサッカライドである。

20

【0092】

関連する局面においては、本発明は、以下の工程を包含する、オリゴマー混合物中のオリゴマーの一部を配列決定するための方法を提供する：

(a) オリゴマーの1つの末端に標識を共有結合させ、そして標識されたオリゴマーの混合物を形成するように、オリゴマー混合物を標識部分と接触させる工程であって、標識部分は、17から77までの原子番号を有している少なくとも1つの元素を含有しており、ただし、上記の元素はイオウでもリンでもない、工程、

30

(b) 上記のオリゴマー混合物中の個々の標識されたオリゴマーを分離する工程；および

(c) 少なくとも2つの末端残基の配列を決定するために、質量分析方法によって工程(b)による標識されたオリゴマーを分析する工程。

【0093】

本発明のこの局面のオリゴマー混合物は、タンパク質の混合物、オリゴヌクレオチドの混合物、オリゴサッカライドの混合物、脂質の混合物などであり得、そして典型的には、細胞溶解物のような生物学的供給源から得られる。あるいは、サンプルは、動物組織（疾患または健常）、植物抽出物、細菌供給源、ウイルス供給源などから得ることができる。好ましくは、オリゴマー混合物は、当該分野で公知の方法を使用して、潜在的な妨害成分の量を減少させるために精製されている。

40

【0094】

オリゴマー混合物中のオリゴマーの標識は、一般的には、単一のオリゴマーについて上記のように、以下にさらに詳細に記載される標識を使用して行われ得る。オリゴマー混合物中の標識されたオリゴマーの分離は、キャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、ゲル電気泳動（その全ての形態）、クロマトグラフィー（例えば、サイズ排除、イオン交換など）、またはガスクロマトグラフィーなどのような方法を使用して達成され得る。分離プロセスによって得られた分離された個々の標識されたオリゴマーは、次いで、少なくとも2つの末端残基の配列を決定するために、本明細書中に記載されている質量分析方法を使用して分析され得る。好ましくは、質量分析方法は、ESI-T

50

OF MSである。

【0095】

好ましい実施形態の1つのグループにおいては、標識部分は、35から63、なおより好ましくは、39から58の原子番号を有している少なくとも1つの元素を含む。特に好ましい実施形態のグループにおいては、この部分は、臭素、ヨウ素、ユーロピウム、およびイットリウムから選択される少なくとも1つの元素を含む。なおより好ましくは、標識部分は、1個から3個の臭素またはヨウ素元素を有する。

【0096】

1つの関連する局面においては、本発明は、以下の工程を包含する、オリゴマーの末端部分を配列決定するための方法を提供する：

(a) オリゴマーの末端に標識を共有結合させ、そして標識されたオリゴマーを形成するように、第1のオリゴマーサンプルを標識部分と接触させる工程であって、標識部分は、17から77までの原子番号を有している1つの元素を有しており、ただし、上記の元素はイオウでもリンでもない、工程；

(b) オリゴマーの末端に標識を共有結合させ、そして第2の標識されたオリゴマーを形成するように、第2のオリゴマーサンプルを標識部分と接触させる工程であって、標識部分は、17から77までの原子番号を有している2つの元素を有しており、ただし、上記の元素は、同じかまたは異なり得るが、イオウでもリンでもない、工程；

(c) 必要に応じて、さらなるオリゴマーサンプルを用いて工程(b)を1回から3回繰り返す工程であって、ここでは、標識部分はそれぞれ、17から77までの原子番号を有している3個、4個、または5個の元素を有しており、ただし、上記の元素はイオウでもリンでもない、工程；

(d) 工程(a)から(c)までによる標識されたオリゴマーを混合する工程；

(e) 標識されたオリゴマーフラグメントを生じるように、酵素的、化学分解、または質量分析フラグメンテーション方法を使用して、標識されたオリゴマーをフラグメンテーションする、工程；および

(f) 少なくとも2つの末端残基の配列を決定するために、質量分析フラグメンテーション方法を使用して、標識されたオリゴマーフラグメントを分析する、工程。

【0097】

なお別の関連する局面においては、本発明は、以下の工程を包含する、オリゴマーの一部を配列決定する方法を提供する：

(a) オリゴマーフラグメントを生じるように、1つ以上の特異的な酵素的または化学分解によるフラグメンテーション方法を使用して、オリゴマーのアリコートフラグメンテーションする工程であって、ここで、異なるフラグメンテーション方法がそれぞれのアリコートに対して適用される、工程；

(b) オリゴマーフラグメントの末端に第1の標識部分を共有結合させ、そして標識されたオリゴマーフラグメントを形成するように、オリゴマーフラグメントの第1のアリコートを第1の標識部分と接触させる工程であって、第1の標識部分は、17から77までの原子番号を有している1つの元素を含有しており、ただし、上記の元素はイオウでもリンでもない、工程；

(c) 必要に応じて、オリゴマーフラグメントの末端に別の標識部分を共有結合させ、そして標識されたオリゴマーフラグメントを形成するように、オリゴマーフラグメントの他のアリコートを他の異なる標識部分と接触させる工程であって、別の標識部分は、17から77までの原子番号を有している2つ以上の元素を含有しており、ただし、上記の元素はイオウでもリンでもない、工程；

(d) 必要に応じて、標識されたオリゴマーフラグメントのアリコートを混合する、工程；および

(e) オリゴマーの少なくとも2つの残基の配列を決定するために、質量分析フラグメンテーション方法を使用して、標識されたオリゴマーフラグメントを分析する、工程。

【0098】

特定の好ましい局面においては、フラグメンテーションされた標識されたオリゴマーは、再分配され、そして標識およびフラグメンテーションのさらなる工程に供される。

【0099】

なお別の関連する局面においては、本発明は、以下の工程を包含する、オリゴマーの一部を配列決定するための方法を提供する：

(a) オリゴマーサンプルのいくつかのアリコート調製する工程；

(b) オリゴマーの一方の末端に標識を共有結合させ、そして標識されたオリゴマーの混合物を形成するように、それぞれのアリコート中のオリゴマーを標識部分と接触させる工程であって、ここで、それぞれのアリコートは、17から77までの原子番号を有している異なる数の元素を含有している標識で標識され、ただし、上記の元素はイオウでもリンでもない工程；

(c) 異なる酵素的または化学分解法によって、それぞれのアリコート中の標識されたオリゴマーをフラグメンテーションする工程；

(d) それぞれのアリコートに由来する反応産物を混合する工程；

(e) 少なくとも2つの末端残基の配列を決定するために、質量分析フラグメンテーション方法を使用して、フラグメンテーションされた標識されたオリゴマーの混合物を分析する、工程。

【0100】

関連するバリエーションにおいては、本発明は、以下の工程を包含する、オリゴマーサンプルの配列を決定するために複数の反応産物を同時に分析するための方法を提供する：

(a) オリゴマーサンプルのいくつかのアリコート調製する工程；

(b) 異なる酵素的または化学分解法によってそれぞれのアリコート中のオリゴマーをフラグメンテーションする工程；

(c) 反応産物の一方の末端に標識を共有結合させ、そして標識された反応産物の混合物を形成するように、それぞれのアリコート中の反応産物を標識部分と接触させる工程であって、ここで、それぞれのアリコートは、17から77までの原子番号を有している異なる数の元素を含有している標識で標識され、ただし、上記の元素はイオウでもリンでもない、工程；

(d) それぞれのアリコートに由来する標識された反応産物の混合物を混合する工程；および

(e) オリゴマー中の少なくとも2つの単量体の配列を決定するために、質量分析方法を使用して、工程(d)の混合された標識された反応産物の混合物を分析する工程。

【0101】

別のバリエーションにおいては、本発明は、以下の工程を包含する、サンプル中の複数のオリゴヌクレオチドを配列決定するための方法を提供する：

(a) それぞれのプライマーの一方の末端に標識を共有結合させ、そして標識されたプライマー混合物を形成するように、それぞれのプライマーを標識部分と接触させることによって合成プライマーを標識する工程であって、ここで、それぞれのプライマーは、17から77までの原子番号を有している異なる数の元素を含有している標識で標識され、ただし、上記の元素はイオウでもリンでもない、工程；

(b) 標識されたプライマー混合物に対してサンプル鋳型を添加する工程；

(c) 酵素的または化学的方法によって、サンプル鋳型から複数の標識されたオリゴマーを合成する工程；および

(d) サンプル鋳型の配列を決定するために、質量分析方法を使用して工程(c)で合成された標識されたオリゴマーを分析する工程。

【0102】

これらの後者の局面およびバリエーションのそれぞれにおいては、好ましい標識は、本発明の先の局面に関して上記に記載されているように、35から63、より好ましくは39から58の原子番号を有している元素を含有している標識である。他の好ましい実施形態もまた、上記と同様である。

10

20

30

40

50

## 【0103】

(標識されたタンパク質)

水性の溶媒、または混合した水性/有機溶媒環境下での異なる試薬でのタンパク質の標識は当該分野で公知であり、そして本発明の実行に有用である広範囲の標識試薬および技術を、当業者が容易に利用することができる。例えば、Meansら、CHEMICAL MODIFICATION OF PROTEINS, Holden-Day, San Francisco, 1971; Feeneyら、MODIFICATION OF PROTEINS: FOOD, NUTRITIONAL AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS, Advances in Chemistry Series, 第198巻、American Chemical Society, Washington, D.C., 1982; Feeneyら、FOOD PROTEINS: IMPROVEMENT THROUGH CHEMICAL AND ENZYMATI  
MODIFICATION, Advances in Chemistry Series, 第160巻、American Chemical Society, Washington, D.C., 1977; および Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996を参照のこと。

10

## 【0104】

標識が行われ得、そしてPSTが、タンパク質のN末端またはC末端のいずれかから決定され得る。真核生物タンパク質の約59~90%が、N末端でアセチル化され(Creighton, T.E., Proteins: Structures and Molecular Principles (W.H. Freeman, NY, 1984)を参照のこと)、従って、N末端標識に対して不応性である。しかし、このようなタンパク質の天然のNアセチル基は、時折、本発明の目的のために標識として使用され得るが、N末端の4個の残基のうちの1つ以上のアミノ酸がイオン化が可能である(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸残基である)か、またはイオン化が可能であるように誘導され得る(例えば、チロシン、セリン、およびシステイン残基)場合に限られる。従って、N末端またはC末端のいずれかを標識するためのストラテジーが、任意の所定のタンパク質についての最大級の配列決定能力を供給するように、提供される。一旦、標識が選択されると、デコンボリュージョンアルゴリズムは、任意の  
改変された残基に対応する質量を検索するように改変され得る。

20

30

## 【0105】

(フラグメンテーションスペクトルの特徴)

質量スペクトル(図1)は、基本的には、検出装置のプレートに衝突するイオンの数(総数)である。イオンが検出装置のプレートに衝突する時間によって、プレートに衝突するイオンの質量対電荷( $m/z$ )比を決定する。検出装置のプレートは、 $m/z$ が既知である分子を用いて較正される。検出装置のプレート上のピンのそれぞれのスキャン時間は、次いで、平均の $m/z$ 値に割り当てられ、そして機器の特定の設計形態に基づいて定義された範囲の $m/z$ 比を有するイオンを回収する。一般的には、それぞれの検出装置のピンによってカバーされる大きさの範囲は、ピンの $m/z$ 値の平方根に変換される。これは、絶対的な質量の精度が、質量分析計での $m/z$ の増大に伴って減少することを意味する。質量分析計のノイズは、常にポジティブである。従って、シグナルは、常に、それぞれのピン中でゼロよりも大きいかまたはゼロである。

40

## 【0106】

フラグメンテーションされたタンパク質の質量スペクトルのいくつかの特徴は、標識されたペプチドの相対的なシグナル強度に依存して、真のタンパク質配列を同定または適切にランク付けする能力を阻害し得、そして本発明のアルゴリズムによってデコンボリュージョンされる。相対的なシグナル強度は、質量スペクトル中の他のイオンおよびノイズの量と比較した、標識されたペプチドフラグメントイオンの量として定義される。第1の特徴は、検出装置への最初の衝突であり、これによって、ベースラインのシフトを生じ、そ

50

して約500 amuを上回る領域の量を増大させるように検出装置を荷電させ得る。これは、質量スペクトルの見掛けのベースラインのシフトとして観察される(図1)。もとのタンパク質の多価状態もまた、約1000 amuを上回るm/z位置で、同じ方法での部分的なベースラインのバリエーションに寄与し得る。これは、約2000 amuを上回るm/z位置で、図1においてさらに明らかに観察される。

#### 【0107】

観察される第2の特徴は、高度なフラグメンテーション条件(例えば、インソースフラグメンテーションのための高いノズル電位)によって質量分析計中の電荷位置に対して周期的な質量でフラグメントイオンの量の増大を生じることである(図2)。12,000,000として定義された<sup>12</sup>Cの質量較正目盛上では、これらのタンパク質フラグメントは、約1 amu離れた特徴的なピークパターンを形成する。さらに有効なフラグメンテーション条件では、ピークは、質量スペクトルにおいてほぼ1 amuの間隔ごとに現れる。ピークとピークとの間隔の平均は、フラグメンテーションされる特定のタンパク質によってわずかに変化することが観察される。これは、タンパク質またはそれぞれのamuでピークによって示されるフラグメントの元素組成におけるわずかな差異に起因すると考えられる。

#### 【0108】

高度なフラグメンテーション条件で、質量スペクトルの事実上全てのピークが、このほぼ1 amuのパターンでこれが実質的に重なり合う(図3)。本発明の重要な局面を可能にするのが、この観察である。第1に、ピークのほとんどがこのパターン(またはこのパターンの複数の荷電状態の類似物)に重なるので、この周期的な間隔から離れている標識されたフラグメント(例えば、標識が、異常な核結合エネルギーを有する1つ以上の元素を含む、標識されたフラグメント)由来のシグナルピークを容易に識別することが可能である。第2に、周期性によって、質量スペクトル中の部分的な最小および最大を決定することが可能である。その結果、スペクトルは、部分的なノイズについて修正され得、それによって質量スペクトルでのそれぞれの質量-対-電荷位置での数の実際の量をより良好に決定することが可能である。第3に、平均または特徴的なピークの形状が、高度なフラグメンテーション条件で所望されないスペクトルのノイズについて決定され得、そしてこのノイズはデコンボリューションされるかまたは質量スペクトルの残りから引き算され得る。従って、ランク付けアルゴリズムへのその寄与を減少させ、そして本発明のアルゴリズムによって産生される配列決定の信頼性を改善する。他のより大きな周期的なパターンもまたデータ中で見られる場合があることがあり、そして示されるこの主要なパターンに加えて配列のデコンボリューションを補助するために同様に適応されることが、当業者に明らかである。

#### 【0109】

(標識)

上記のように、以下の考慮が、標識試薬の選択に関係する：

i) 標識の質量は好ましくは特有であり、そして好ましくは、低いバックグラウンドを有するスペクトルの領域にフラグメントの質量をシフトさせる；

ii) 標識は、好ましくは、N末端またはC末端に電荷のフラグメンテーションを直接移動させるように、一定の正または負電荷を含む；

iii) 標識は、好ましくは、フラグメンテーション条件下で強く、そして好ましくないフラグメンテーションを受けない；

iv) 標識の化学的性質は、好ましくは、条件の範囲(特に、変性条件)のもとで十分であり、それによってN末端またはC末端を再生可能にそして均一に標識する；

v) 標識されたタンパク質は、好ましくは、選択されたMS緩衝液システム中で可溶なままである；

vi) 標識は好ましくは、オリゴマーのイオン化効率を増大させるか、またはそれを少なくとも抑制はしない；そして

vii) 標識は、それぞれの標識されたフラグメントの位置で特有の質量分析パターン

10

20

30

40

50

を作成するように、2つ以上の同位体によって異なる種の混合物を含み得る。

【0110】

標識の選択基準に関して、好ましい標識部分は、検出強化成分、イオン質量特徴成分、および反応性官能基（好ましくは、タンパク質のC末端またはN末端と反応する）を有する標識部分である。反応性基は、他の2つの標識成分のいずれかまたは両方に対して直接連結させられ得る。

【0111】

1つの実施形態においては、標識は、質量スペクトルの他のピークによる質量のラダーを同定する能力をさらに増大させるように、対で使用される。混合された同位体標識の使用は、標識されたフラグメントピークのさらなるデコンボリューションに特に適切である。なぜなら、豊富な同位体の対は、質量スペクトル中の標識されたフラグメントについてのみ存在し、そして同位体は典型的には、同様のイオン化およびフラグメンテーション効率を示すからである。1つ以上のメチルまたはメチレン基、あるいは荷電状態によって異なる標識のアナログもまた、使用され得る。さらに、2つの化学的に異なる分子が、標識されたフラグメントの質量のラダーの同定を強化するための二重標識の状況で使用され得る。1つの実施形態においては、単一のサンプルは、二重標識で同時に標識され、そして組み合わせられた質量スペクトルが作成される。好ましい実施形態においては、二連のサンプルが別々に標識され、そしてMSでのフラグメンテーションの前にほぼ同じ割合で混合される。この後者の実施形態についての1つの利点は、側鎖もまた標識される場合に、シグナルの希釈の可能性を最小にすることによる。別の実施形態においては、二連のサンプルが別の標識で標識され、MSで別々にフラグメンテーションされ、そして事実上の二重標識されたスペクトルを形成するように質量スペクトルが互いに合算される。

【0112】

なお別の実施形態においては、反応性官能基は、リンカーによって、検出強化成分およびイオン質量特徴成分の一方または両方から分離される。リンカーは、好ましくは、それが化学的に安定でありそして不活であるように設計され、その結果、反応性基およびタグの他の2つの成分の少なくとも一方の十分な分離が可能である。本発明の好ましい実施形態においては、リンカーは、炭化水素鎖から、または最も好ましくは、アリールもしくはヘテロアリール環に連結された炭化水素鎖から構成され、そして好ましくは、イオン化が可能な基と連結基との間にさらなる間隔を提供する。

【0113】

当業者によって理解されるように、種々の炭化水素鎖および改変された炭化水素鎖が、本発明で利用され得る。フェニル環に連結させられる好ましい炭化水素鎖は、アルカンのファミリーにおいて見られ得、2個の炭素元素から約20個の炭素元素までの長さの範囲のリンカーが特に好ましい。本発明の好ましい実施形態においては、リンカーは、フェネチル、脂肪族アミド、または第2級アミン基である。

【0114】

（検出強化成分）

本明細書中で使用される場合、検出強化成分は、質量分析計でのタンパク質フラグメントの検出を容易にする標識部分の一部をいう。従って、検出強化成分は、質量分析計のイオン化室中のフラグメンテーション条件下で正に荷電したイオン種を提供し得るか、またはこの成分は、質量分析計のイオン化室中のフラグメンテーション条件下で負に荷電したイオン種を提供し得る。多くの検出強化成分について、存在するイオン化された種の量は、タンパク質を可溶化するために使用される媒体に依存する。好ましい検出強化成分（すなわち、正電荷または負電荷を生じ得る種）は、3つのカテゴリーに分類され得る：1）「硬い」電荷を保有している成分、2）「軟らかい」電荷を保有している成分、および3）電荷は提供しないが、「軟らかい」電解を保有しているタンパク質残基に密接に近接している成分。

【0115】

「硬い」電荷を保有している成分は、媒体のpHにかかわらず、全ての条件下で実質的

10

20

30

40

50

にイオン化される元素の配列である。「硬い」正に荷電した検出強化成分には、テトラアルキルまたはテトラアリアルアンモニウム基、テトラアルキルまたはテトラアリアルホスホニウム基、ならびにN-アルキル化またはNアシル化ヘテロシクリルおよびヘテロアリアル（例えば、ピリジニウム）基が含まれるがこれらに限定されない。「硬い」負に荷電した検出成分には、テトラアルキルまたはテトラアシルホウ酸基が含まれるが、これらに限定されない。

【0116】

「軟らかい」電荷を保有している成分は、それぞれ、それらのpKaよりも高いかまたは低いpH（すなわち、塩基および酸）でイオン化される元素の配列である。本発明の状況では、「軟らかい」正電荷には、8より大きい、好ましくは10より大きい、そして最も好ましくは12より大きいpKaを有する塩基が含まれる。本発明の状況では、「軟らかい」負電荷には、4.5より小さい、そして好ましくは2より小さい、そして最も好ましくは、1より小さいpKaを有する酸が含まれる。極端なpKaでは、「軟らかい」電荷は「硬い」電荷としての分類にほぼ近い。「軟らかい」正に荷電した検出強化成分には、第1級、第2級、および第3級アルキルまたはアリアルアンモニウム基、置換および非置換のヘテロシクリルおよびヘテロアリアル（例えば、ピリジニウム）基、アルキルまたはアリアルシッフ塩基またはイミン基、ならびにグアニジノ基が含まれるが、これらに限定されない。「軟らかい」負に荷電した検出強化成分には、アルキルまたはアリアルカルボキシル基、アルキルまたはアリアルスルホネート基、およびアルキルまたはアリアルホスホネート基またはホスフェート基が含まれるが、これらに限定されない。

【0117】

「硬い」荷電した基および「軟らかい」荷電した基の両方について、当業者によって理解されるように、この基は、反対の電荷の対イオンと同時に生じる。例えば、種々の実施形態では、負に荷電した基についての対イオンには、低級アルキルの有機酸（例えば、酢酸塩）、ハロゲン化有機酸（例えば、トリフルオロ酢酸）、および有機スルホン酸（例えば、N-モルホリノエタンスルホン酸）のオキシアニオン（oxyanion）が含まれる。負に荷電した基についての対イオンには、例えば、アンモニア陽イオン、アルキルまたはアリアルアンモニウム陽イオン、およびアルキルまたはアリアルスルホニウム陽イオンが含まれる。

【0118】

中性であるが、「軟らかい」電荷を保有しているタンパク質残基に密接に近接している成分（例えば、リジン、ヒスチジン、アルギニン、グルタミン酸、またはアスパラギン酸）が、検出強化成分として使用され得る。この場合は、標識は、イオン化されていないかまたはイオン化が可能な基を保有し、そして検出の強化は、電荷を保有している付近のタンパク質残基によって提供される。本発明の状況では、密接な近接は、タンパク質の標識された末端から約4残基以内と定義され、そしてより好ましくは、タンパク質の標識された末端の約2残基以内と定義される。

【0119】

標識の検出強化成分はまた、多価であり得るかまたは多価になり得る。例えば、複数の負電荷を有する標識は、1つまたは一価の種（例えば、カルボン酸）を取り込むことができるか、あるいはこれは、1つ以上の多価の種（例えば、リン酸）を取り込むことができる。本発明のこの実施形態の代表的な例においては、複数のカルボン酸を保有している種（例えば、ポリアミノカルボキシレートキレート 試薬（例えば、EDTP、DTPA））がタンパク質に連結される。タンパク質および他の種にポリアミノカルボキシレートを連結させる方法は、当該分野で周知である。例えば、Mearesら、「Properties of In Vivo Chelate-Tagged Proteins and Polypeptides」、MODIFICATION OF PROTEINS: FOOD, NUTRITIONAL, AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS; Feeneyら編、American Chemical Society, Washington, D.C., 1982、370-387頁; Kasinaら

10

20

30

40

50

、Bioconjugate Chem., 9:108-117(1998); Songら、Bioconjugate Chem., 8:249-255(1997)を参照のこと。

#### 【0120】

同様の様式で、複数の正電荷を有する標識は購入され得るか、または当業者が利用可能な方法を使用して調製され得る。例えば、2個の正電荷を有している標識部分が、ジアミン(例えば、エチレンジアミン)から迅速にそして容易に調製され得る。代表的な合成経路では、ジアミンは、当該分野で公知の方法を使用して一保護(monoprotect)され、そして保護されていないアミン部分が続いて、1つ以上の正電荷を有している種(例えば、(2-プロモエチル)臭化トリメチルアンモニウム)(Aldrich)で

10

ジアルキル化される。当該分野で認識されている方法を使用する脱保護によって、少なくとも2つの正電荷を保有している反応性標識種を提供する。多価標識種への多くのこのような簡単な合成経路が、当業者によく知られている。

#### 【0121】

(イオン質量特徴成分)

イオン質量特徴成分は、好ましくは、質量スペクトル分析において特有のイオン質量特徴を示す、標識部分の一部である。イオン質量特徴成分には、タンパク質がイオン化される条件下では効率よくイオン化されない部分(例えば、芳香族炭素化合物)ならびに多価イオン種を生成するタンパク質イオン化条件下で容易にイオン化する分子が含まれる。両方のタイプの化合物が、質量スペクトルにおいて標識に連結させられたアミノ酸およびペ

20

プチドのイオン/質量特徴をシフトさせる(標識されたタンパク質のフラグメンテーションの後)ために使用され得る。結果として、標識されたアミノ酸およびペプチドは、得られる質量スペクトルにおけるそれらのイオン/質量パターンによって、標識されていないアミノ酸およびペプチドとは容易に識別される。好ましい実施形態においては、イオン質量特徴成分は、20個の天然のアミノ酸の全てについての残基の質量とは一致しない質量を、質量分析フラグメンテーションの間に産生されるタンパク質フラグメントに与える。

#### 【0122】

最も好ましい実施形態においては、イオン質量特徴成分は、タンパク質の主要な構成成分とは異なる核結合エネルギーを示す任意の元素である。タンパク質の主要な構成成分は：C、H、N、O、およびSである。 $^{12}\text{C} = 12.000000$ の質量標準として核結合

30

#### 【0123】

別の実施形態においては、特有のイオン質量特徴成分は、多価標識の使用によって作成され得る。このような多価標識は、異なる核結合エネルギーを有する元素を取り込むことができるか、または核結合エネルギーにおいて主要なタンパク質構成成分のものと同様で

40

50



ある元素のみから構成され得る。このような荷電状態は、標識中に取り込まれる「硬い」電荷、または「軟らかい」電荷、または「硬い」電荷と「軟らかい」電荷との組み合わせを用いて形成され得る。2から4の間の多価の「硬い」荷電状態が好ましい。3の多価の「硬い」荷電状態が、標識がC、H、N、O、およびSと同様の核結合エネルギーを有する元素だけから構成される場合には、最も好ましい。2の多価の「硬い」荷電状態が、標識が、C、H、N、O、およびSとは異なる核結合エネルギーを示す少なくとも1つの元素を含む場合には、最も好ましい。

#### 【0124】

当業者に明らかであるように、見かけ上の質量スペクトルピークは、未標識のアミノ酸およびペプチドのフラグメンテーションによって生じ得るばかりではなく、サンプルおよび/またはマトリックス中の不純物によってもまた生じ得る。標識のイオン質量特徴の固有性をさらに増大させ、そして「ノイズ」からの所望される標識されたフラグメントのピークの同定を可能にするために、標識の質量の最適化によって、スペクトルのノイズの少ない領域に標識されたフラグメントをシフトさせることが好ましい。例えば、標識質量が、100 amuより大きくそして700 amuより小さいイオンを作製することが好ましい。使用される標識の質量の上限は、質量分析計の質量解析能力によって決定される。これは、低分子量の標識の分子量を増大させること、または高分子量の標識上の電荷数を増大させることによって行われ得る。

#### 【0125】

標識部分に対してより特有の質量特徴を提供するための代替の方法は、標識中への安定な同位体の組み込みである（例えば、Gygiら、Nature Biotechnol. 17:994-999(1999)を参照のこと）。例えば、標識部分に8個の重水素元素を組み込むこと、およびタンパク質を50:50の重水素化標識と非重水素化標識との混合物で標識することによって、標識を含む一価のフラグメントが、同等の強度の二重線として容易に同定される；一方は、非重水素化標識を有する種に対応する質量であり、そして他方は、8 amuの間隔があいている、重水素化標識を有する種に対応する質量である。好ましい実施形態においては、質量の差異は、一価の状態では約1 amuより大きい。最も好ましい実施形態においては、質量の差異は、一価の状態では約4から約10 amuまでである。C、H、N、O、およびSとは有意に異なる各結合エネルギーを示す元素の複数の同位体の組み込みが、好ましい、BrおよびEu元素は、これらが約50:50の量で2つの天然の同位体を示すので、最も好ましい。

#### 【0126】

標識部分に対してより特有の質量特徴を提供するための別の方法は、標識上にアルキルおよび/またはアリアル置換基を組み込むことである。その結果、フラグメントのピークの対応するセットは、質量スペクトルにおいて容易に認識可能になる。例えば、タンパク質は、トリメチルアンモニウム基を含む標識と、トリメチルアンモニウム基の代わりにジメチルエチルアンモニウム基を含む同じ標識との混合物で標識され得る。この標識部分は、互いに14 amu異なる、配列中のそれぞれのアミノ酸についての2つのフラグメントイオンピークを生じる。多くのこのような組み合わせが導かれ得ることが当業者に明らかである。

#### 【0127】

(反応性基)

標識部分の第3の成分は、N末端アミノ基、C末端アミノ基、またはNもしくはC末端アミノ酸の別の構成成分と反応性の官能基である。

#### 【0128】

反応性官能基は、タグ上の任意の位置に配置され得る。例えば、反応性基は、アリアル核上、またはアリアル核に連結させられた鎖（例えば、アルキル鎖）上に配置され得る。反応性基がアルキル基またはアリアル核に鎖で繋がれた置換されたアルキル鎖に連結させられる場合は、反応性基は好ましくは、アルキル鎖の末端部分に配置される。本発明の実施において有用である反応性基および反応のクラスは、一般的には、生体結合の化学的性

10

20

30

40

50

質の当業者周知である。本発明に好ましい反応のクラスは、水性または混合された水性/有機溶媒環境下での比較的穏やかな条件下で処理されるものである。

【0129】

タンパク質中の第1級アミノ基(N末端を含む)を標的化する特に好ましい化学的性質には、例えば、以下が含まれる：フッ化アリール(Sanger, F., *Biochem. J.*, 39:507(1945); Creighton, T.E., *Proteins: Structures and Molecular Principles* (W.H. Freeman, NY, 1984); Niederwieser, A.: *Methods in Enzymology*, 25:60-99(1972); および Hirs, C.H.W.ら、*Arch. Biochem. Biophys.*, 111:209-222(1965)を参照のこと)、塩化スルホニル(Gray, W.R.: *Methods in Enzymology*, 25:121-137(1972))、シアン酸塩(Stark, G.R.: *Methods in Enzymology*, 25:103-120(1972))、イソチオシアネート(Niall, H.D.: *Methods in Enzymology*, 27:942-1011(1973))、イミドエステル(Galella, G.ら、*Can. J. Biochem.*, 60:71-80(1982))、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル(Lomant, A.J.ら、*J. Mol. Biol.*, 104:243-261(1976))、O-アシルイソ尿素(Lomant, A.J.ら、*J. Mol. Biol.*, 104:243-261(1976))、クロロカルボネートおよびカルボニルアジド(Solomons, T.W.G, *Organic Chemistry* (John Wiley & Sons, NY, 1976))、アルデヒド(Novotnyら、*Anal. Chem.*, 63:408(1991))およびNovotnyら、*J. Chromatography*, 499:579(1990))、およびアルキルハライドおよび活性化されたアルケン(Wagner, D.S.ら、*Biol. Mass Spectrometry*, 20:419-425(1991))。タンパク質のカルボキシル基と反応する化学的な構成成分の好ましい例は、ベンジルハライド(Solomons, T.W.G, *Organic Chemistry* (John Wiley & Sons, NY, 1976); Merrifield, B., *Science*, 232:341-347(1986))、およびHorton, H.R.ら、*Methods in Enzymology*, 25:468(1972))およびカルボジイミド(Yamada, H.ら、*Biochem.*, 20:4836-4842))であり、特に安定化される場合には、N-ヒドロキシスクシンイミド(Grabarek, Z.ら、*Anal. Biochem.*, 185:131-135(1990)を参照のこと)を使用する。これらのカルボキシル標識アプローチの両方が、C末端とともにカルボキシルを含有しているアミノ酸残基(例えば、アスパラギンおよびグルタミン)を標識することが予想される。これらおよび他の有用な反応は、例えば、March, *ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY*, 第3版、John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, *BIOCONJUGATE TECHNIQUES*, Academic Press, San Diego, 1996; およびFeeneyら、*MODIFICATION OF PROTEINS; Advances in Chemistry Series*, 第198巻、American Chemical Society, Washington, D.C., 1982において議論されている。

【0130】

反応性官能基は、それらがタグの組み立てに必須の反応に関与も妨害しないように選択され得る。あるいは、反応性官能基は、保護基の存在によって反応への関与から保護され得る。当業者は、これが選択された反応条件の設定を妨害しないように特定の官能基を保護する方法を理解している。有用な保護基の例については、例えば、Greeneら、*PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS*, John Wiley & Sons, New York, 1991を参照のこと。

## 【 0 1 3 1 】

図5および6は、1つ以上の臭素(図5)またはヨウ素(図6)元素を有する種々の標識部分の構造を提供する。適切な標識は、5-ブロモニコチン酸、6-ブロモ-2-ヒドロキシキノリン-4-カルボン酸(BHQ C)、6-ブロモピコリン酸、4-ブロモベンズアルデヒド、ならびに他の市販の臭素置換されたアリアルカルボン酸を含む。なお他の標識は、アリアルカルボン酸またはその保護された形態の臭素化またはヨウ素化を通じて適切に調製され得る。芳香族化合物の臭素化およびヨウ素化のための方法は当業者に周知であり、そしてそれらの調製のための参考文献は、例えば、March、ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY、第4版、John Wiley & Sons、の一般的なテキストに見ることができる。カルボン酸残基は、典型的には、タンパク質との接触の前に活性化される(例えば、NHSエステルとして)ことを、当業者はさらに理解している。さらに、標識残基の試験は、大部分がイオン化が可能な窒素元素を有する(アンモニウムイオンの $pK_a$ より低いpHでアンモニウム基として存在する)ことを示す。

10

## 【 0 1 3 2 】

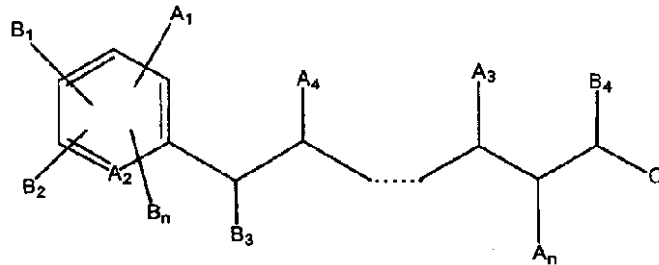
表1は、本発明の標識に有用な標識部分の非限定的な記載を提供する。

## 【 0 1 3 3 】

【表 1】

表1

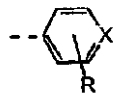
一般的な質量欠損標識  
 ・ A部分は、MSイオン化のための電荷（正または負）を保有している。  
 ・ B部分は質量欠損元素である。  
 ・ C部分は、生体分子への結合のための反応基である。  
 ・ A、B、およびC部分は、種々の芳香族/脂肪族フレームワーク上に配置される。



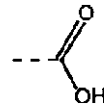
10

## 1 A. 例示的な A n 部分：

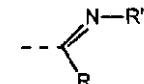
--NRR' R,R'=H, アルキル, 芳香族



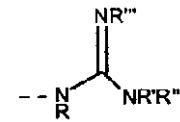
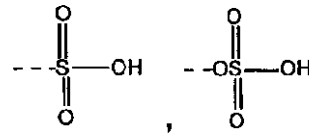
R=H, アルキル, 芳香族, OH, OR', NO<sub>2</sub>, Cl, F...  
 X=Nまたは他の塩基性ヘテロ環



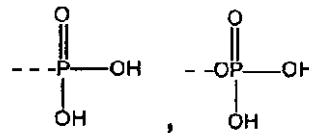
20



R,R'=H, アルキル, 芳香族



R,R',R'',R'''=H, アルキル, 芳香族



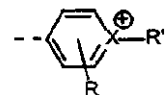
--PRR'

R,R'=H, アルキル, 芳香族

30

--<sup>⊕</sup>NRR'R''

R,R',R''=アルキル, 芳香族



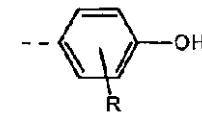
R=H, アルキル, 芳香族, OH, OR', NO<sub>2</sub>, Cl, F...  
 R'=アルキル, 芳香族  
 X=N-, S-, O-含有ヘテロ環

--<sup>⊖</sup>BRR'R''

R,R',R''=アルキル, 芳香族

--<sup>⊕</sup>SRR'

R,R'=アルキル, 芳香族



--<sup>⊕</sup>ORR'

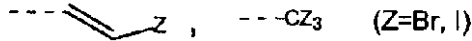
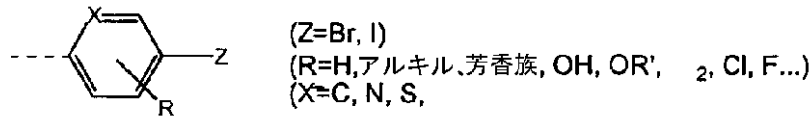
R,R'=アルキル, 芳香族

R=H, アルキル, 芳香族  
 NO<sub>2</sub>, Cl, F...

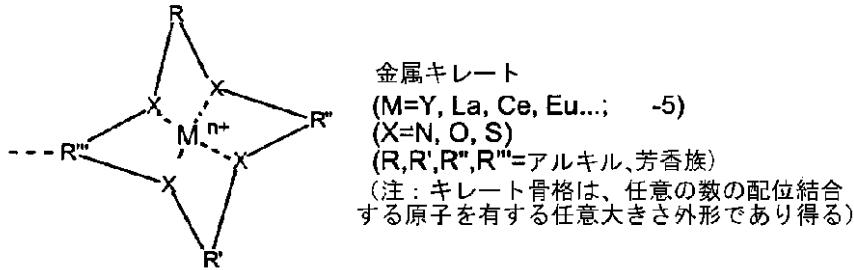
40

(表 1 の続き)

## 1 B. 例示的な B n 部分 :

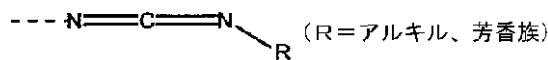
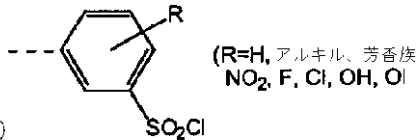
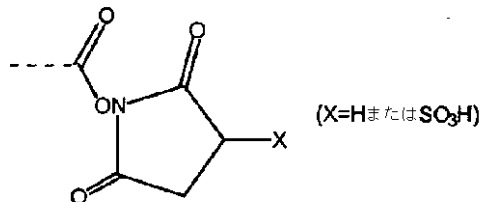


10

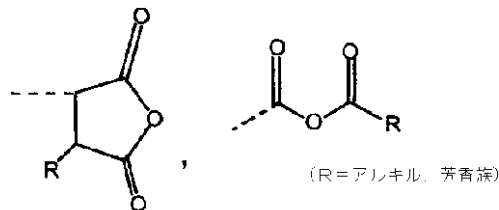
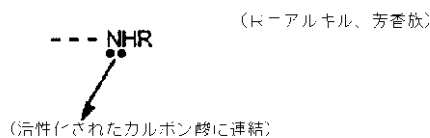
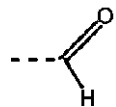


## 1 C. 例示的な C 部分 :

20



30



40

## (合成)

一旦、反応基、リンカー、およびイオン化が可能な基またはイオン質量特徴成分が選択されると、最終的な化合物が、標準的な有機化学反応を利用して合成される。本発明での使用に好ましい化合物は、5 - ブロモ - 3 - ピリジル酢酸 (5 - Br - 3 - PAA) の N H S エステルまたは同様の試薬である。

## 【 0 1 3 4 】

適切な標識部分の選択を伴う、タンパク質へ標識を連結させるための条件は、タンパク質の N 末端または C 末端が均一に標識され、そして標識されたタンパク質が適切な M S 緩衝液システム中で可溶性のままであることを確実にしなければならない。典型的には、標識は、変性条件 (例えば、界面活性剤または 8 M の尿素) 下で行われる。界面活性剤およ

50

び尿素の両方ともが、MSのイオン化を抑制し、そして迅速な浄化を提供しそして適切なMS緩衝液に対して標識されたタンパク質サンプルを導入する方法もまた、使用されるべきである。

**【0135】**

(検出可能な部分)

別の好ましい実施態様においては、タンパク質は、例えば、タンパク質の精製および分離プロセス(例えば、電気泳動)においてその検出される能力を増進する部分で標識される。検出可能な部分は、例えば、分光光度計(例えば、UV/Vis、蛍光、電子スピン共鳴(ESR)、核磁気共鳴(NMR)など)、放射性同位体の検出などによって検出され得る。タンパク質がUV/Visによって検出される場合は、一般的には、タンパク質に対して色素形成性標識(例えば、フェニル、ナフチルなど)を連結することが所望される。同様に、蛍光顕微鏡による検出のためには、蛍光団が、好ましくはタンパク質に連結される。例えば、Quantum Dye(登録商標)は、蛍光Euキレートであり、そして5-カルボキシ-2',4',5',7'-テトラプロモスルホンフルオレセインスクシンイミジルエステルは、N末端反応性の臭素を含有している蛍光団である(それぞれ、Research Organics, カタログ#0723QおよびMolecular Probes, カタログ#C-6166から商業的に入手することができる)。ESRについては、検出可能な部分はフリーラジカル(例えば、一酸化窒素基を含む部分)であり得る。タンパク質がNMR法によって検出される場合は、検出可能な部分は、NMRに利用可能な核(例えば、フッ素、<sup>13</sup>Cなど)を用いて富化され得る。

10

20

**【0136】**

本発明の好ましい実施態様においては、検出可能な部分は蛍光団である。多くの反応性蛍光標識は、例えば以下から商業的に入手することができる; SIGMA chemical company (Saint Louis, MO)、Molecular Probes (Eugene, OR)、R&D systems (Minneapolis, MN)、Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ)、CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA)、Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI)、Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD)、Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)、およびPE-Applied Biosystems (Foster City, CA)、ならびに当業者に公知の多くの他の商業的な供給源。さらに、当業者は、特定の適用について適切な蛍光団を選択する方法を認識しており、そしてそれを商業的に容易に入手することができない場合は、必要な新しい蛍光団を合成するか、または所望される蛍光標識になるように商業的に入手することができる蛍光化合物を合成によって改変することができる。

30

**【0137】**

以下の参考文献によって説明されるように、特定のタグについて適切な蛍光団を選択するための文献において、事実上の手引きの多くの詳細を利用することができる: Pescera編、FLUORESCENCE SPECTROSCOPY (Marcel Dekker, New York, 1971); Whiteら、FLUORESCENCE ANALYSIS: A PRACTICAL APPROACH (Marcel Dekker, New York, 1970); など。文献にはまた、レポーター-失活因子(quencher)対の選択のための、蛍光分子および色素形成性分子の多くのリスト、ならびにそれらの関連する光学特性を提供する参考文献も含まれる: 例えば、Berlman, HANDBOOK OF FLUORESCENCE SPECTRA OF AROMATIC MOLECULES, 第2版 (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, COLOUR AND CONSTITU

40

50

TION OF ORGANIC MOLECULES (Academic Press, New York, 1976); Bishop 編、INDICATORS (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS (Molecular Probes, Eugene, 1992)、Pringsheim, FLUORESCENCE AND PHOSPHORESCENCE (Interscience Publishers, New York, 1949) など。さらに、分子に付加され得る容易に利用可能な反応基による共有結合のために、レポーターおよび失活因子分子を誘導するための文献には、多くの指針が存在する。

【0138】

他の分子および表面へ蛍光団を結合させるために利用可能な化学反応の多様性および有用性は、蛍光団を用いて誘導される核酸の調製について、文献の本文に説明される。例えば、Haugland (前出); Ullmanら、米国特許第3,996,345号; Khannaら、米国特許第4,351,760号を参照のこと。従って、特定の適用についてエネルギー交換対を選択すること、およびプローブ分子(例えば、低分子の生体活性物質、核酸、ペプチド、または他のポリマー)にこの対のメンバーを結合させることは、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0139】

タンパク質に対して直接連結される蛍光団に加えて、蛍光団はまた、間接的な手段によっても連結され得る。例示的な実施態様においては、リガンド分子(例えば、ビオチン)が、好ましくはタンパク質に共有結合され得る。次いで、リガンドは別の分子(例えば、ストレプトアビジン)に結合する。別の分子は、本質的に検出可能であるか、あるいは、本発明の蛍光化合物のようなシグナルシステム、または非蛍光化合物の転換によって蛍光化合物を生じる酵素に共有結合され得る。標的としての目的に有用な酵素には、例えば、加水分解酵素(特に、ホスファターゼ、エステラーゼ、およびグリコシダーゼ)、または酸化酵素(特に、ペルオキシダーゼ)が挙げられる。蛍光化合物には、上記で議論されているように、フルオレセインおよびその誘導體、ローダミンおよびその誘導體、ダンシル、ウンベリフェロンなどが挙げられる。使用され得る種々の標識またはシグナル発生システムの概要については、米国特許第4,391,904号を参照のこと。

【0140】

有用な蛍光検出可能部分は、例えば、光エネルギーまたは電気化学的エネルギーを含む、当該分野で公知の任意の様式でそれらを励起させることによって、蛍光にされ得る(例えば、Kulmalaら、Analytica Chimica Acta 386:1(1999)を参照のこと)。蛍光標識を検出する手段は当業者に周知である。従って、例えば、蛍光標識は、適切な光の波長で蛍光団を励起させること、および得られる蛍光を検出することによって検出され得る。蛍光は、感光フィルムによって、電子検出装置(例えば、電荷結合素子(CCD)または光電子増倍管など)の使用によって、視覚的に検出され得る。同様に、酵素標識は、酵素についての適切な基質を提供すること、そして得られる反応産物を検出することによって検出され得る。

【0141】

任意の分離技術とMS配列決定方法との間の処理工程が少なければ少ないほど、タンパク質がより早く同定され得、そしてプロテオミクス研究のコストが少なくなる。典型的な電気泳動用緩衝液(例えば、Hochstrasserら、Anal. Biochem., 173:424(1988)およびO'Farrell, J. Biol. Chem., 250:4007(1975))は、質量分析計中でのタンパク質のイオン化を抑制する成分(例えば、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝液およびドデシル硫酸ナトリウム)を含む。これらの成分は、MSでのイオン化は抑制しない他のより揮発性である成分(例えば、モルホリノアルキルスルフォネート緩衝液および短命の界面活性剤)で置き換えられ得る。別の実施態様においては、サンプルは、質量分析計の揮発性のプロトン供給源を提供するように、重炭酸アンモニウムまたは酢酸アンモニウム緩衝液で希釈され

10

20

30

40

50

る。Wilm, M.ら、Anal. Chem., 68:1-8 (1996)。別の実施態様においては、緩衝液交換は、サンプルが分離プロセスの出口からMSの入り口まで運ばれるように、クロマトグラフィーによるかまたはタンジェニシャルフロー透析を通じて行われる。

#### 【0142】

(標識手順)

一部の例においては、電気泳動緩衝液中に存在する塩(例えば、TRISおよびSDS)ならびに尿素は、標識されたタンパク質のイオン化を抑制し得、そして配列分析を混乱させる可能性のある小さい質量/電荷のイオンを作製し得る。従って、スピン透析手順が、MS分析の前に迅速に緩衝液システムを交換するために使用され得る。あるいは、脱塩カラム(例えば、Milliporeから販売されているZipTip(登録商標)チップ)が、サンプルの浄化および緩衝液交換に使用され得る。脱塩されたサンプルは、WilmおよびMann(Wilmら(前出)を参照のこと)によって記載されているように、メタノールの最少量が添加された0.1Mの重炭酸アンモニウム中に、またはMark(「Protein structure and identification with MS/MS」、PE/Sciex Seminar Seriesで示される紙、Protein Characterization and Proteomics: Automated high throughput technologies for drug discovery, Foster City, CA (March, 1998)を参照のこと)によって記載されているように、最少量のアセトニトリルが添加されている0.01Mの酢酸アンモニウム緩衝液(0.1%の蟻酸を含有する)中に、再懸濁され得る。

#### 【0143】

化合物の結合速度が、化合物がポリペプチドの配列決定に適切であることを確認するために試験され得る。一般的には、結合速度が速ければ早いほど、より好ましい化合物である。50 から70 で2から10分の間の結合速度が特に好ましい。同様に、より長い間にわたる反応混合物への暴露がペプチド結合を加水分解するかまたは、ポリペプチド残基との不十分でありそして再生不可能な副反応を導く(これは、質量スペクトルのデコンボリューションを複雑にし得る)場合があるので、早い反応速度もまた好ましい。

#### 【0144】

別の好ましい実施態様においては、タンパク質混合物の1つ以上の成分が、標識がポリペプチドに連結される前に固体支持体に可逆的に連結される。例えば、多数の樹脂、膜、または紙を含む種々の材料が、固体支持体として使用され得る。これらの支持体はさらに、切断可能な機能性を取り込むように誘導され得る。この目的のために使用され得る多数の切断可能な基には、ジスルフィド(-S-S-)、グリコール(-CH[OH]-CH[OH]-)、アゾ(-N=N-)、スルホン(-SO<sub>2</sub>-)、およびエステル(-COO-)結合が含まれる(Tae, Methods in Enzymology, 91:580 (1983)を参照のこと)。特に好ましい支持体には、Sequelon TM (Milligen/Bioscience, Burlington, Mass.)のような膜が挙げられる。これらの支持体の組み立てのための代表的な材料には、特に、ポリスチレン、多孔性ガラス、ポリビニリデンフルオライド、およびポリアクリルアミドが挙げられる。特に、ポリスチレン支持体には、特に以下が挙げられる:(1)(2-アミノエチル)アミノメチルポリスチレン(Laurson, J. Am. Chem. Soc. 88:5344 (1966)を参照のこと);(2)アリアルアミノ基を有している番号(1)と同様のポリスチレン(Laurson, Eur. J. Biochem. 20:89 (1971)を参照のこと);(3)アミノポリスチレン(Laursonら、FEBS Lett. 21:67 (1972)を参照のこと);および(4)トリエチレンテトラアミンポリスチレン(Hornら、FEBS Lett. 36:285 (1973)を参照のこと)。多孔性ガラス支持体には、以下が挙げられる:(1)3-アミノプロピルガラス(Wachterら、FEBS Lett. 35:97 (1973)を参照のこと);お



よび(2)N-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルガラス(Bridgen、FEBS Lett. 50:159(1975)を参照のこと)。これらの誘導された多孔性ガラス支持体のp-フェニレンジイソチオシアネートとの反応によって、活性化されたイソチオシアネートガラスが導かれる(Wachterら(前出)を参照のこと)。ポリアクリルアミドベースの支持体もまた有用であり、これには、架橋された-アラニルヘキサメチレンジアミンポリジメチルアクリルアミド(Athertonら、FEBS Lett. 64:173(1976)を参照のこと)およびN-アミノエチルポリアクリルアミド(Cavadoreら、FEBS Lett. 66:155(1976)を参照のこと)が挙げられる。

#### 【0145】

当業者は、上記に記載されている固体支持体へのポリペプチドの結合のための適切な化学的性質を容易に利用する(一般的には、MachleidtおよびWachter、Methods in Enzymology:[29]New

Supports in Splid-Phase Sequencing 263-277(1974)を参照のこと)。好ましい支持体および結合方法には、EDC結合を有するアミノフェニルガラス繊維紙(Aebersoldら、Anal. Biochem., 187:56-65(1990);DITCガラス繊維(Aebersoldら、Biochem. 27:6860-6867(1988)およびポリビニリデンフルオライド(PVDF)膜(SequeNet™ chemistryとともに、Immobilon P™ Milligen/Biosearch, Burlington, Mass.(Pappinら、CURRENT RESEARCH IN PROTEIN CHEMISTRY, Villafranca J.(編)、191-202頁、Academic Press, San Diego, 1990を参照のこと))の使用が含まれる。

#### 【0146】

本発明の実施においては、固体支持体へのポリペプチドの連結は、ポリペプチドと固体支持体との間での共有または非共有的相互作用のいずれかによって生じ得る。固体支持体へのポリペプチドの非共有結合のためには、固体支持体は、ポリペプチドが非供給的な相互作用によって固体支持体に連結するように選択される。例えば、ガラス繊維である固体支持体は、ポリペプチドを非共有的に連結する固体支持体の表面を提供するように、ポリブレン、ポリマー性第四級アンモニウム塩(Tarrら、Anal. Biochem., 84:622(1978)を参照のこと)でコーティングされ得る。他の適切な吸着性の固相は、商業的に入手することができる。例えば、溶液中のポリペプチドは、ポリビニリジンフルオライド(PVDF、Immobilon, Millipore Corp., Bedford, Mass.)のような合成のポリマー、または陽イオン性の表面でコーティングされたPVDF(Immobilon CD, Millipore Corp., Bedford, Mass.)上に固定され得る。これらの支持体は、ポリブレンを用いて、またはそれを用いることなく使用され得る。あるいは、ポリペプチドサンプルは、エレクトロブロットイングと呼ばれるプロセスによって、ポリアクリルアミドからの直接のポリペプチドの抽出によって配列決定のために調製され得る。エレクトロブロットイングプロセスは、溶液中に存在し得る他のペプチドからのポリペプチドの単離を不要にする。適切なエレクトロブロットイング膜には、ImmobilonおよびImmobilon CD(Millipore Corp., Bedford, Mass.)が挙げられる。

#### 【0147】

より最近では、非共有的な疎水性相互作用によって固体支持体上に固定されたポリペプチドに対して化学反応が行われる、自動化された方法が開発されている。このアプローチでは、水性緩衝液中のサンプル(これは、塩および変性剤を含む場合がある)が、固体支持体を含むカラム上に加圧によって充填される。次いで、結合したポリペプチドが、妨害する化合物を除去し、それによって標識のために準備された結合したポリペプチド

10

20

30

40

50

を残すように、圧力によってリンスされる (Hewlett-Packard Product Brochure

23-5091-5168E (1992年11月) および Horn, 米国特許第5,918,273号 (1999年6月29日) を参照のこと)。

【0148】

結合したポリペプチドは、ポリペプチドの末端アミノ酸と標識部分との間で結合が生じるために十分な条件下で、そして十分な時間の間、反応させられる。支持体の物理的特性は、特異的な標識部分についての反応条件を最適にするように選択され得る。好ましくは、ポリペプチドのアミノ基との結合は、塩基性条件下 (例えば、トリメチルアミンまたは N-エチルモルホリンのような有機塩基の存在下) で生じる。好ましい実施態様においては、標識は、メタノール：水 (75 : 25 v/v) 中の5%の N-エチルモルホリンの存在下で、結合したペプチドと反応させられる。連結の形態に起因して、過剰な試薬、結合塩基、および反応副生成物が、極度に極性の洗浄溶媒によって除去され、その後、質量分析計によって標識されたポリペプチドが取り出されそして配列決定される。種々の試薬 (例えば、メタノール、水、メタノールと水の混合物、またはアセトンを含む) が、洗浄溶媒として適切である。

10

【0149】

標識反応が、液相中で完全に行われると、反応混合物は好ましくは、透析、ゲル浸透クロマトグラフィーなどのような精製サイクルに供される。

【0150】

(タンパク質の一部の配列決定)

別の局面においては、本発明は、以下の工程を包含する、タンパク質混合物中のタンパク質の一部を配列決定するための方法を提供する：

(a) タンパク質の C 末端または N 末端に標識を共有結合させ、そして標識されたタンパク質混合物を形成するように、タンパク質混合物を C 末端または N 末端標識部分と接触させる工程であって、C 末端または N 末端標識部分は、17 から 77 まで、より好ましくは 35 から 77 までの原子番号を有している少なくとも 1 つの元素を含有しており、ただし、上記の元素はイオウ以外である、工程、

(b) 上記のタンパク質混合物中の個々の標識されたタンパク質を分離する工程；および

30

(c) 少なくとも 2 つの C 末端または N 末端の残基の配列を決定するために、質量分析方法によって工程 (b) による標識されたタンパク質を分析する工程。

【0151】

実施態様の 1 つのグループにおいては、この方法はさらに以下の工程を包含する：

(d) 遺伝子配列データのデータベースから予想されるタンパク質配列を検索するために、標識されたタンパク質および配列のタンパク質の末端位置の分離座標と組み合わせて少なくとも 2 つの C 末端または 2 つの N 末端の残基の配列を使用して、タンパク質を同定する工程。

【0152】

好ましい実施態様は、本発明の他の局面について上記に記載されている実施態様である。

40

【0153】

(分離)

好ましい実施形態においては、タグ化手順がタンパク質の混合物に対して行われる。タグ化手順後に、タンパク質の混合物は分離プロセスに供される。分離プロセスは、好ましくは、タンパク質混合物を別々の画分に分離する。それぞれの画分は好ましくは、タンパク質混合物の 1 つの標識されたタンパク質だけを実質的に多く含む。

【0154】

本発明の方法は、ポリペプチドの配列を決定するために利用される。本発明の好ましい実施形態においては、標識されたポリペプチドは「実質的に純粋」であり、これは、ポリ

50

ペプチドは約80%同質であり、そして好ましくは約99%以上同質であることを意味する。当業者に周知の多くの方法が、そのアミノ酸配列を決定する前にポリペプチドを精製するために利用され得る。代表的な例には、HPLC、逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)、ゲル電気泳動、クロマトグラフィー、または多数のペプチド精製方法の全てが含まれる(一般的には、METHODS IN PROTEIN SEQUENCE ANALYSISと題された出版物を参照のこと)。

#### 【0155】

キャピラリー電気泳動、および特に、多次元キャピラリー電気泳動(例えば、「Protein Separation via Multidimensional Electrophoresis」と題され、そして2000年2月25日に提出された、同時係属中の同一人に譲受された米国特許出願番号第09/513,486号に記載されている)の使用がなおより好ましい。

10

#### 【0156】

実質的に純粋な標識されたポリペプチドが、本明細書中に記載されている方法において好ましく利用されるが、同じ標識を含有しているポリペプチド混合物の配列を決定することもまた可能である。簡潔には、1つの実施形態においては、混合物中のペプチドのうちの1つの観察された質量と同じ計算された質量を有する仮定の配列の全てを決定するためのアルゴリズムが利用される。Johnsonら、Protein Science 1:1083-1091(1992)を参照のこと。これらの配列は、次いで、このようなアルゴリズムを使用してペプチドのタンデムな質量スペクトル中のフラグメントイオンをそれらのそれぞれがどれだけうまく説明するかに従って、性能指数を与えられ、混合物中のポリペプチドの配列が容易に決定され得る。同時に分析されるオリゴマーの混合物は、異なる数の質量欠損元素を取り込んでいる標識で優先的に標識される。

20

#### 【0157】

上記のように、本明細書中の方法は、健常組織のサンプルまたは疾患組織のサンプルからタンパク質を同定するために特に有用である。実施形態の1つのグループにおいては、この方法は、健常組織のサンプル由来のタンパク質の混合物、および疾患組織のサンプル由来のタンパク質の混合物の両方に対して適用される。従って、本発明のこの局面で使用されるタンパク質混合物は、本質的に全ての供給源から得ることができる。組織サンプルからタンパク質を単離する方法は周知である。

30

#### 【0158】

本発明においては、誘導された末端アミノ酸を有するポリペプチドが質量分析計によって配列決定される。種々の質量分析計が、本発明において使用され得る。代表的な例には、三重四重極質量分析計、扇形磁場型装置(磁場タンデム型質量分析計、JEOL、Peabody, Mass.);イオンスプレー質量分析計、Bruinsら、Anal. Chem., 59:2642-2647(1987);エレクトロスプレー質量分析計、Fennら、Science 246:64-71(1989);レーザー脱着飛行時間型質量分析計、Karasら、Anal. Chem., 60:2299-2301(1988)、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(Extrel Corp., Pittsburgh, Mass.)。好ましい実施形態においては、エレクトロスプレー質量分析計(Mariner<sup>TM</sup>モデル、PE Biosystems, Foster City, California)が、誘導された末端ポリペプチドのフラグメンテーションに利用され、そして50ppmより高い質量精度を有する飛行時間型検出装置が、標識されたフラグメントの質量から配列を決定するために使用される。

40

#### 【0159】

当業者は、本発明の方法を使用して得られる配列情報が、タンパク質の可能性のある実態の数をなおさらに減少させるための分析のもとでタンパク質の他の特徴と組み合わせられうることを理解する。従って、好ましい実施形態においては、本発明の方法は、タンパク質の同定のために特徴的な1つ以上の他のタンパク質を有するタンパク質配列タグによる情報を組み合わせる。配列データを補うために有用なデータには、アミノ酸組成、特異

50

的な残基（例えば、システイン）の数および同一性、切断情報、タンパク質分解による（例えば、トリプシンによる）および/または化学分解によるペプチドの質量、亜細胞性の位置、ならびに分離座標（例えば、保持時間、 $pI$ 、 $2-D$ 電気泳動座標など）が含まれるが、これらに限定されない。タンパク質の同定のために本発明の $PS T$ による情報と組み合わせられ得る特定のタンパク質またはタンパク質のクラスに特徴的なデータの他の形態は、当業者に明らかである。特定のタンパク質に特徴的である多量のデータはより包括的であるので、分析下のタンパク質は、より短いタンパク質配列タグを使用して同定され得る。

#### 【0160】

従って、さらに好ましい実施形態においては、タンパク質の1つ以上の特徴に関する情報は、約4個のアミノ酸の長さ、より好ましくは、約3個のアミノ酸の長さの $PS T$ による情報と組み合わせられ、なおより好ましくは、約2個のアミノ酸の長さが、タンパク質の同定のために使用される。

#### 【0161】

（配列決定アルゴリズム）

本発明は、一部の実施形態においては、フラグメンテーションされた標識されたタンパク質の質量スペクトルから直接タンパク質配列タグを決定するための数学的アルゴリズムの使用を含む。特有の質量タグ標識が配列決定される末端に連結されるという条件で、タンパク質のいずれかの末端からタンパク質配列タグを決定するためのアルゴリズムが使用され得る。このアルゴリズムでの使用のための出発質量スペクトルは、標識されたタンパク質またはペプチドがフラグメンテーションされ得る任意の質量分析計によって產生され得る。飛行時間型質量スペクトルは、他の質量分析計の検出システムを上回るそれらの改良された質量精度に起因して、好ましい。しかし、他の精度の低い質量分析計の検出システムが、特に、内部質量標準（例えば、連結されたペプチドを有さないフラグメンテーションされた標識）が、得られる質量スペクトルの質量精度を改善するために使用される場合に、使用され得る。タンパク質のフラグメンテーションは、タンデムな質量分析計の衝突セル中で $CID$ によって、または電子スプレーもしくは $MALDI$ イオン化源中のインソースフラグメンテーションによってのいずれかで行われ得る。

#### 【0162】

このアルゴリズムには、シグナルの質量/電荷の位置およびその相対量の両方の使用が必要である。1つの実施形態においては、シグナルの相対量は、質量/電荷の位置にすぐ隣接している位置と比較され、そしてピークが目的の電荷位置に対する質量に存在する相対的な確率を定量化するために使用される。この実施形態では、ピークが存在する相対的な確率が、全ての競合配列の間で比較される。別の実施形態では、目的の質量/電荷の位置のそれぞれでのシグナルが、全ての競合する配列の質量/電荷の位置で、それに対して直接比較される。後者の方法は、明確にするためにさらに記載される。当業者は、この方法が、それぞれの競合する配列に関係している質量/電荷の位置でのシグナルの相対量に基づいて競合する配列をランク付けするための同様の方法を提供するために、多くの方法で適応させられ得ることを理解する。

#### 【0163】

アルゴリズムはさらに、それぞれの可能性のある配列から生じると予想されるイオンの相対量が、続く残基によって生じると予想されるイオンの相対量と積または和によって組み合わせられる（方程式1）、累積配列ランキングシステムから構成される。この方法では、イオン化またはフラグメンテーションの効率、および付随するマトリックスまたは重複するノイズのピークにおける配列特異的差異（これは、ポリペプチド鎖中のそれぞれの残基位置での正確な配列の割り当てを混乱させる）が、排除され得る。続く残基位置に向かって伝わる任意の所定の残基位置での配列の割り当ての誤りの確率は、真の配列に関係する確率よりも低い。次いで、それぞれの可能性のある配列 $j$ についての全体的なランクが、以下によって決定され得る：

#### 【0164】

【数 1】

$$R_{j,n} = \prod_{i=1}^n p_{i,j} \text{ または } \sum_{i=1}^n p_{i,j} \quad (1)$$

ここでは、 $R_{j,n}$  は、残基の長さ  $n$  で任意の所定の配列  $j$  に対して与えられた累積ランキングであり、そして  $p_{i,j}$  は、残基の長さ  $i$  に匹敵するその  $j$  の中の配列に割り当てられた相対的なランクである。多くの方法が、それぞれの競合する質量 / 電荷の位置でのシグナルの相対量の比較と一致して、任意の残基の長さ  $i$  でのそれぞれの配列  $j$  に対して相対的なランク ( $p$ ) を割り当てるために使用され得ることは、当業者に明らかである (前出)。好ましい実施形態においては、それぞれの残基の長さ ( $i$ ) での競合配列の可能性の相対的なランキング ( $p$ ) は、可能性のオートスケーリング (autoscaling) によって決定される場合がある。この方法の特定のバリエーションにおいては、ランキング ( $p$ ) は、正規型 (Gaussian) 確率分布または対数正規型の (Poisson) 確率分布のような認知されているか実証されている確率分布に基づいて割り当てられ得、その結果、それぞれの配列についての相対的なランクは、0 と 1 の間で変化する。例えば、以下である：

【0165】

【数 2】

$$p_i = \text{NORMDIST} \left[ \frac{(C_{i,j} - \bar{C}_i)}{\sigma_i} \right] \quad (2)$$

ここで；

$$\bar{C}_i = \frac{\sum_{j=1}^{19^i} C_{i,j}}{19^i} \quad (3)$$

そして

$$\sigma_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{19^i} C_{i,j}^2 - \frac{\left( \sum_{j=1}^{19^i} C_{i,j} \right)^2}{19^i}}{(19^i - 1)}} \quad (4)$$

$i$  個のアミノ酸残基を含有している任意の配列  $j$  に対応している記号 ( $C_{i,j}$ ) が、質量スペクトルにおいて相対的なシグナルの豊富さの後ろにあるこのシグナルに関係している任意の方法によって決定され得ることが、当業者には明らかである。質量分析計での衝突誘起フラグメンテーションによって、1つ以上のタイプのイオンの産生を生じ得る。タンデムな質量分析計での CID 方法は、一般的には、N 末端から a、b、および c イオン型を、そして C 末端から x、y、および z イオンを生じる。さらに、標識および特定の amino 酸残基は、「軟らかい」電荷の数に依存して、スペクトル中の 1つより多くの質量 / 電荷の位置で標識されたペプチドフラグメントの産生を導き得る、「軟らかい」電荷を含む場合がある。この方法のバリエーションにおいては、それぞれのイオン型および可能性のある電荷状態に関係しているシグナルは、任意の所定の配列  $j$  に関係している累積的なシグナルを生じるように組み合わせられ得る：

【0166】

10

20

30

40

【数3】

$$C_{i,j} = \sum_{k=\text{最大の電荷状態}}^{\text{最大のイオン型}} \sum_{l=1}^{\text{最大のイオン型}} c_{i,j,k,l} \quad (5)$$

ここでは、 $c$  は、それぞれのイオン型 ( $k$ ) および荷電状態 ( $l$ ) の ( $m/z$ ) の計算、ならびに質量スペクトルのデータ中での対応する数 ( $c_{i,j,k,l}$ ) の照合によって決定される。

【0167】

【数4】

$$c_{i,j,k,l} = \text{LOOKUP}[(m/z)_{i,j,k,l}] \quad (6)$$

任意の残基の長さ  $i$ 、配列  $j$ 、荷電状態  $k$ 、およびイオン型  $l$  についての電荷に対する質量比の計算は、以前に記載されている方法により、アミノ酸および配列中の任意の連結された標識の化学量論および可能性のある荷電状態から決定される (Methods in Enzymology, Biemann 編、193: 295-305、351-360、および 455-479 (1993) を参照のこと)。

【0168】

多数のバリエーションが、記載されている塩基の配列決定方法について作成され得る。例えば、好ましい実施形態においては、任意の所定の配列に関係している全シグナルの決定のために使用される荷電状態およびイオン型の数は、フラグメンテーション方法に最も頻繁に関係していることが経験的に見出されている特定のサブセットに限定され得る。タンデムな質量分析計での CID フラグメンテーションは、優先的に、最も豊富に  $b$  イオンおよび  $y$  イオンを生じ、そして  $c$  および  $x$  イオンを最少に生じる。インソースフラグメンテーションは、有意な量の  $a$ 、 $b$ 、および  $y$  イオンのみを生じることが見出されている。これらの場合、アルゴリズムは、優先的に、 $c$  および  $x$  イオン、または  $c$ 、 $x$ 、および  $z$  イオンを無視するように適応させられ得る。イオン量もまた、CID およびインソースの両方のフラグメンテーションにおいてペプチドフラグメントのより可能性の高い荷電状態を減少させるようである。この現象はまた、アルギニン、およびアミン以外の電荷を保持している可能性が高い他のイミノである「軟らかい」電荷種 (例えば、リジンまたはヒスチジン残基) に特異的な配列であり得る。別のバリエーションにおいては、より多数の荷電状態に関係している質量/電荷の位置は、任意の配列  $j$  に関係している全シグナルを決定する場合には、配列特異的塩基について無視される場合がある。

【0169】

バリエーションにおいては、複数の標識 (同位体および非同位体の両方) が、二重配列決定アプローチを使用してアルゴリズムに取り込まれ得る。このアプローチにおいては、本発明者らは、2つの残基表を定義する。一方は、それぞれの標識型 (任意の標識された残基) についてである。次いで、配列決定アルゴリズムが、それぞれの残基表を使用して別々に適応され、その結果、第1の標識 ( $c_{i,j,k,l}$ ) に関係している数が第2の標識 ( $d_{i,j,k,l}$ ) のものとは別に決定される。

【0170】

【数5】

$$c_{i,j,k,l} = \text{LOOKUP}[(m/z)_{i,j,k,l} | \text{標識 1}] \quad (7)$$

$$d_{i,j,k,l} = \text{LOOKUP}[(m/z)_{i,j,k,l} | \text{標識 2}] \quad (8)$$

10

20

30

40

50

全ての方程式 1 ~ 6 は、c および d の両方に適応され、そして本発明者らは以下のように定義することができる：

【 0 1 7 1 】

【 数 6 】

$$q_i = \text{NORMDIST} \left[ \frac{(D_{i,j} - \bar{D}_i)}{\sigma_i \text{標識 2}} \right] \quad (9)$$

$$\bar{D}_i = \frac{\sum_{j=1}^{19^i} D_{i,j}}{19^i} \quad (10) \quad 10$$

$$\sigma_i \text{標識 2} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{19^i} D_{i,j}^2 - \frac{\left(\sum_{j=1}^{19^i} D_{i,j}\right)^2}{19^i}}{(19^i - 1)}} \quad (11)$$

$$D_{i,j} = \sum_{k=\text{最小の電荷状態}}^{\text{最大の電荷状態}} \sum_{l=1}^{\text{最大のイオン型}} d_{i,j,k,l} \quad (12) \quad 20$$

次いで、それぞれの標識を用いて得られたそれぞれの配列 j の相対的な可能性を掛け算することによって、本発明者らは、配列についての複合的なランキングを得ることができる。

【 0 1 7 2 】

【 数 7 】

$$R_{j,n} = \prod_{i=1}^n (p_i q_i) \text{ または } \sum_{i=1}^n (p_i q_i) \quad (9) \quad 30$$

このバリエーションは、さらに、1つより多くの標識について拡大され得る。この複数の標識化アプローチで使用される質量分析計のファイルは、2つ以上の標識の既知の混合物を含有しているタンパク質サンプルの同時のフラグメンテーションによって作成される。さらに、別の一標識タンパク質フラグメンテーションによる質量分析計のデータは、この方法による分析のために実質的に複数の質量分析計ファイルを作成するために、互いに合算され得る。このバリエーションは、複数の標識ストラテジーの任意のタイプとともに使用され得る（前出）。

【 0 1 7 3 】

同位体標識（天然の同位体存在比または既知の相対的同位体存在比の複数の標識のいずれか）についての別の好ましい実施形態においては、アルゴリズムが、予想される量の同位体系列に対するそれらの適合によって競合配列のピークを定量またはランク付けするように適応させられ得る。例えば、2つの同位体によって異なる標識が、既知の相対量として使用される場合は、それぞれの配列の質量対電荷比が、両方の標識同位体、質量スペクトルのデータから決定された対応する数値、および決定された予想量（ ）に適合するランクまたは可能性について、決定され得る。

【 0 1 7 4 】

（標識されたオリゴマー）

本発明は、標識されたタンパク質に関して上記に記載されているが、当業者は、使用される複数の標識および標識方法が、他の標識されたオリゴマー（例えば、標識されたオリゴヌクレオチド、標識されたオリゴサッカライドなど）の調製に適応可能であることを認 50

識する。

【0175】

核酸は、Butlerら、米国特許第6,090,558号；Moforteら、米国特許第5,700,642号；ならびにKoster、米国特許第6,194,144号および同第5,691,141号によって記載されている方法の改変を通じて本発明によって配列決定され得る。好ましくは、本明細書中の方法は、プライマー配列、伸張因子配列、または終結因子配列のいずれかの中に「質量欠損」標識を有している、Sanger配列決定またはポリメラーゼ連鎖反応プライマーを使用する。「質量欠損」標識は、17から77、より好ましくは35から63の原子番号（ただし、上記の元素はイオウまたはリン以外である）を有している1つ以上の元素を取り込んでいるそのような標識である。好ましくは、プライマーまたは末端のいずれかが、そのように産生される核酸のオリゴマー中に取り込まれる「質量欠損」元素の数を制御するために、標識される。あるいは、核酸の3'末端または5'末端が、「質量欠損」標識で標識され得、そしてMaxamおよびGilbert、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74:560-564 (1977)に記載されている方法によって、標識されたフラグメントの系列を生じるように、核酸がフラグメンテーションされ得る。

10

【0176】

オリゴサッカライドは、Parekhら、米国特許第5,667,984号およびRademacherら、米国特許第5,100,778号によって記載されている方法の改変を通じて本発明によって配列決定され得る。好ましくは、還元糖末端と反応性である「質量欠損」標識が使用される。より好ましくは、このような標識は、ピリジルアミノの官能性を含む。ここでは、ピリジニル環は1個から3個のBrおよび/またはIで置換される。標識は、オリゴサッカライドの選択的酵素的加水分解の前に、または酵素的加水分解の後で行われ得る。好ましくは、オリゴサッカライドは、「質量欠損」標識で酵素的加水分解の前に標識され、そしてもとの末端の還元糖を区別するために酵素的加水分解の後で異なる「質量欠損」標識で標識される。

20

【0177】

（同時分析のための質量タグ）

本発明はオリゴマーに関して上記に記載されているが、当業者は、使用される複数の標識および標識方法が、他のサンプルについて特有の質量「タグ」（例えば、組み合わせ化学ライブラリーについてのタグ、種々のサンプルから得られた代謝物についてのタグなど）の調製に適応可能であることを認識している。このような方法によって、質量分析計によるいくつかのサンプルの同時の分析および比較が可能である。

30

【0178】

（構造および機能の分析のための方法）

なお別の局面においては、本発明は、以下の工程を包含する、複数の残基を有しているオリゴマーの構造および機能の分析のための方法を提供する：

（a）曝された残基および曝されていない残基を差示的に標識し、そして差示的に標識されたオリゴマーを生じるように、オリゴマーを質量欠損標識試薬と接触させる工程であって、ここでは、質量欠損標識試薬は、イオウまたはリン以外である17から77までの原子番号を有している少なくとも1つの元素を含有している、工程；

40

（b）三次元構造に曝されているオリゴマーの配列、および三次元構造に曝されていないオリゴマーの配列を決定するために、質量分析方法によって差示的に標識されたオリゴマーを分析する工程。

【0179】

配列決定に関する上記の方法を用いて、本発明のこの局面は、それについての暴露された残基の三次元構造および/または機能の一部の指標が想定される、本質的に全てのオリゴマー（例えば、タンパク質、核酸、オリゴサッカライド）に対して適用され得る。この方法は、タンパク質の分析における特定の使用を見出す。

【0180】

50



上記のように、質量欠損標識試薬は、典型的には、イオウまたはリンをのぞく、17から77の原子番号を有している少なくとも1つの元素を含む。タンパク質構造の情報が必要とされるこれらの適用については、質量欠損標識試薬は、リン元素を含み得る。なぜなら、この元素はタンパク質中には存在しない（もちろん、リン酸化されたタンパク質を除く）からである。好ましくは、質量欠損標識試薬は、リンまたはイオウをのぞく、35から63、より好ましくは、39から58までの原子番号を有している元素を含む。

【0181】

特に好ましい実施態様の1つのグループにおいては、オリゴマーは、臭素元素またはヨウ素元素のいずれかを含むタンパク質および標識試薬である。より好ましくは、標識試薬は、例えば、折りたたまれたタンパク質中の露出しているチロシン残基を標識することができる臭素ガスである。

10

【0182】

他の好ましい実施態様においては、使用される質量分析方法は、ESI-TOF MSを使用する。

【0183】

本発明のこの局面を実行するための他の好ましい実施態様および条件は、一般的にはオリゴマー（そして特に、タンパク質）の標識および配列決定に関して上記に記載したとおりである。

【0184】

（分析物の相対量の比較のための方法）

20

なお別の局面においては、本発明は、以下の工程を包含する、2つ以上のサンプル由来の分析物の相対量を比較するための方法を提供する：

（a）第1のサンプルの分析物を標識部分と接触させて、分析物に対して標識を共有結合させ、そして標識された分析物を形成させる工程であって、標識部分は、17から77までの原子番号を有する1つの元素を有しており、ただしこの元素はイオウでもリンでもない、工程；

（b）次のサンプルの分析物を標識部分と接触させて、それぞれのサンプル中の分析物に対して標識を共有結合させる工程であって、ここでは、次のサンプルのそれぞれについて使用される標識部分は、17から77までの原子番号を有しているさらなる元素を含み、ただしこの元素は、イオウでもリンでもない、工程；

30

（c）標識された分析物のアリコートを混合する工程；および

（d）質量分析フラグメンテーション方法を使用して標識された分析物を分析して、サンプル間の1つ以上の分析物の相対量を決定する工程。

【0185】

好ましい標識部分は、本明細書を通じて記載されている標識部分であり、より好ましくは35から63まで、なおより好ましくは、39から58までの原子番号の元素を有している標識部分である。サンプルは本質的には、動物組織、植物または植物抽出物、細菌サンプル、ウイルスサンプルなどに由来する任意の生物学的サンプルであり得る。

【0186】

（化学物質ライブラリーの成分を標識するための方法）

40

質量欠損標識の別の適用は、組み合わせ化学物質ライブラリーについてのタグとしてである。例示的な用途は、組み合わせライブラリーの合成と同時の、質量欠損タグの作製である。典型的な合成には、ウェルに対して種々の組み合わせまたは化学物質を順次添加することによって、ビーズまたはウェル表面に係留された組み合わせライブラリーを組み立てることが含まれる。BrennerおよびLerner (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 89: 5381-5383 (1992)) および Sugarmanら (2000年5月2日に発行された米国特許第6,056,926号) によって記載されているように、化学物質ライブラリーの合成の間に、処置工程について特異的な質量タグ、または特定の化学物質の化学物質組成物を同時に合成することもまた可能である。このようなタグは、ルートタグ上への異なる反応基の連続的な付加によって作製され得

50

る。このようなルートタグは、1級アミンであり得る。この場合、1つの反応基はルートに添加されて2級アミンを作製し得、ここで、反応基の質量が変化して、化学物質の特定の化学物質の正体またはこのライブラリー由来の化学物質が曝露された処理工程を示す。続く工程では、第2の反応基が、ルートタグ上の2級アミンに付加されて、3級アミンが作製される。この第2の基のこの質量は、組み合わせライブラリー中の特定の化学物質の同定において、第2の化学処理工程または変化を示す。さらに多くのルートタグの組み合わせを可能にする同様のアプローチは、オリゴマーのルートタグに対する種々の単量体単位の連続的な付加である（例えば、Merrifieldペプチド合成）。

【0187】

しかし、このアプローチは、可能なタグの組み合わせの数によって制限され、その結果、続いての反応基の付加による付加的な質量は、最終的なタグが質量分析法によって分析される場合には、重複しない。本発明は、それぞれの工程で市長中のルートタグにさらなる質量欠損元素を付加することによってこの問題を回避する。本発明によって解決されるさらなる問題は、化学物質自体の質量、またはライブラリー由来の特定の化学物質の活性のスクリーニングまたはアッセイの間に存在し得るあらゆる他の成分の質量から、組み合わせライブラリー中の特定の化学物質を同定するために作製されたタグを識別する能力である。タグ中での質量欠損の使用は、タグが、化学物質または化学物質のライブラリーのいずれか、およびスクリーニングアッセイに由来する任意のマトリックス混入物の質量スペクトルにおいて独自に同定されることを可能にする。

【0188】

上記を参照して、本発明は、化学物質ライブラリーのメンバーが合成の過程の間に曝される合成配列を示すための質量欠損標識を使用するための方法を提供する。

【0189】

詳細には、本発明は、以下の工程を包含する、合成またはスクリーニングのいずれかの間に、化学物質ライブラリーの元素をタグ化するための方法を提供する：

(a) ルートタグを標識部分と接触させて、ルートタグに対して標識を共有結合させ、そして標識されたタグを形成させる工程であって、上記の標識部分は、17から77までの原子番号を有している1つの元素を有しており、ただし、上記の元素はイオウでもリンでもない、工程；

(b) 必要に応じて、ルートタグをさらなる標識部分と接触させて、ルートタグにさらなる標識を共有結合させ、そして多標識タグを形成させる工程であって、上記の標識部分は、17から77までの原子番号を有している1個の元素を有しており、ただし、上記の元素は、イオウでもリンでもない、工程；ならびに

(c) 標識されたタグを質量分析方法によって分析して、17から77までの原子番号を有している元素の質量および数の両方を決定する工程であって、その結果、元素の質量および数によって、ライブラリーの特定の化学物質が曝露された化学的なプロセスを同定し、そしてライブラリーの化学物質の正体が同定される、工程。

【0190】

好ましい元素（例えば、質量欠損元素）は、上記の本発明の他の局面について記載されているとおりである。

【0191】

本発明の材料、方法、およびデバイスは、以下の実施例によってさらに説明される。これらの実施例は、本願発明を説明するために提供され、本願発明を限定するために提供されるのではない。

【0192】

(実施例)

(実施例1)

この実施例においては、高マンノース型オリゴサッカライド(図7)を標識し、そして配列決定する。このオリゴサッカライドを、Perekhら、米国特許第5,667,984号に記載されている方法と同様の方法を使用して標識する。簡潔には、質量欠損標識

10

20

30

40

50

(2-アミノ-6-ヨード-ピリジン(標識1))を、シアノ水素化ホウ素ナトリウム( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ )の存在下でオリゴサッカライドの還元末端に共有結合させる。これによって、親のオリゴサッカライド中に単一の質量欠損元素(ヨウ素)を取り込む。質量欠損元素の付加によって、標識されたオリゴサッカライドフラグメントが、質量スペクトルにおいて未標識のフラグメントおよびマトリックスイオンとは識別されることが可能になる。

【0193】

標識1結合体化オリゴサッカライドを、次いで、適切な反応緩衝液中に種々のサッカライド(表1.1および表1.2を参照のこと)を含有している反応チューブにアリコートに分ける。反応を完了まで進行させ、そして得られた反応産物を、再び、シアノ水素化ホウ素ナトリウムの存在下で、それぞれの酵素について示した質量欠損標識(表1.2を参照のこと)との反応によって、このフラグメントの新たに形成された還元末端に結合させる。標識2および標識3のそれぞれは、異なる数の質量欠損元素を含み、これによって、消化されたフラグメントがもとのオリゴサッカライドの最終フラグメントから識別されることが可能となる。

【0194】

【表2】

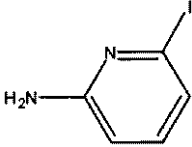
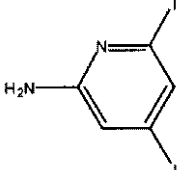
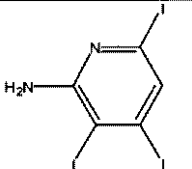
表 1.1  
オリゴサッカラーゼ酵素

酵素 #	種	酵素
1	<i>Aspergillus saitoi</i>	$\alpha$ -マンノシダーゼ I
2	タチナタマメ	$\alpha$ -マンノシダーゼ
3	<i>Achatina saitoi</i>	$\alpha$ -マンノシダーゼ II
4	タチナタマメ	$\beta$ -ヘキソサミニダーゼ
5	<i>Prevotella</i> sp.	$\beta$ -ヘキソサミニダーゼ
6	<i>Achatina fulica</i>	$\beta$ -マンノシダーゼ
7	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	N-アセチル $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ
8	<i>Helix pomatia</i>	$\beta$ -マンノシダーゼ

【0195】

【表 3】

表 1.2  
反応と標識との組み合わせ

酵素 *	作用	使用した質量欠損標識
なし	なし	
1	任意の部位で1 $\alpha$ 2マンノースを切断する	
3	任意の部位で1 $\alpha$ 3,6マンノースを切断する 分岐糖に連結されている場合には1 $\alpha$ 3マンノースを切断する	

\* 酵素の番号は表 1.1 の記載に対応する

標識 3 結合体化反応混合物（すなわち、酵素 # 3 で消化した）のアリコート、酵素 1 でさらに消化する。この反応によって作製された還元糖末端を、続いて、先に記載したように標識 2 に結合させる。

【 0 1 9 6 】

次いで、全ての反応由来のアリコートを混合し、メタノール中の 2 % 酢酸の 5 0 % v / v 混合物の添加によって酸化し、そして質量スペクトル分析に供した。酸溶液中でのアセタール結合体の低い安定性に起因して、質量スペクトル分析を、酸性化の直後に行う。あるいは、硬い電荷を取り込んでいる種々の標識系列（例えば、N - アルキル - ヨードピリジニウム系列）を、酸性化することなく質量スペクトル分析に供し得る。得られる質量スペクトルを解析して、本発明の方法による質量欠損標識ピークを含まない全ての化学的なノイズを取り除く。得られた解析された質量欠損スペクトルを、次いで、使用されるそれぞれの質量欠損標識に対して連結され得る全ての可能性のあるオリゴサッカライド配列を予想することによって、本発明の方法によってアルゴリズムにより検索する。

【 0 1 9 7 】

検索アルゴリズムによって、ヘキソース（Hex）と N - アセチルアミノヘキソース（HexNAC）との全ての派生した組み合わせについての質量を計算する。それぞれの Hex 単量体単位は、推定されるフラグメント質量の重量に対して、1 7 9 . 0 5 5 5 6 5 amu の一同位体質量単位を付加する。それぞれの HexNAC 単量体単位は、推定されるフラグメントの質量に対して、2 2 0 . 0 8 2 1 1 4 amu の一同位体質量単位を付加する。フラグメントに含まれるそれぞれの糖（n）について、（n - 1）倍の 1 7 . 0 0 2 7 4 amu の正味の欠損が存在する。標識 1、2、および 3 についての検索基準に適合しているピークのオリゴサッカライド組成物を、それぞれ、図 8 A、8 B、および 8 C に示す。これらのピークに対応しているヘキソースおよび N - アセチルアミノヘキソースの数を、表 1 . 3 に示す。

【 0 1 9 8 】

10

20

30

40

【表 4】

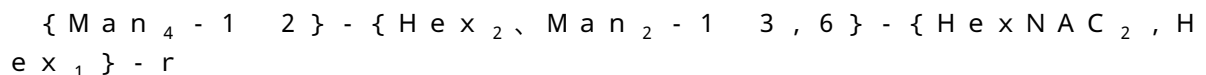
表 1.3  
図 1 (A, B, および C) のピークに対応している  
ヘキソースの数および型

ピーク	組成	
	HexNAC	Hex
A	2	1
B	2	5
C	2	9
D		1
E		1
F		2
G		3

標識 1 に結合体化したフラグメントから形成された質量のラダーは、最も外側の糖がヘキソースであることを示す。標識 1 に結合体化させた最大質量のフラグメントは、親のオリゴサッカライドに対応する。結果として、第 1 の標識 1 結合体化フラグメントと親との間の 4 個のヘキソースの質量の差は、酵素 1 および酵素 3 の両方が  $\alpha$ -マンノースのみを切断するので、4 個の  $\alpha$ -マンノースの存在を示す。ピーク D は、図 8 B における唯一の標識 2 結合体の一致であるので、還元末端由来の最も外側の糖のうちの 4 個は、1-2 結合マンノースでなければならず、そして内部には 1-2 マンノースは存在しなくてもよい。

## 【0199】

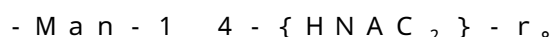
標識 1 の質量のラダーの次のフラグメント（ピーク A）は、以前のフラグメントとはさらに 4 個のヘキソースが異なる。これは、酵素 3 で消化したサンプルに対応しなければならない。唯一の一致している標識 3 結合フラグメント（図 8 C）は、E（1ヘキソースフラグメント）、F（2ヘキソースフラグメント）、および G（3ヘキソースフラグメント）である。ピーク F および G は合計で 5 ヘキソースであるので、これらのフラグメントの少なくとも 1 つは、1-2 結合マンノースを含まなければならない。酵素 3 は 1-3 結合および 1-6 結合のみを切断するので、それゆえ、この構造中には少なくとも 2 つの別の 1-3 および / または 1-6 結合マンノースが存在しなければならない、そしてこれらのマンノースは、4 個の 1-2 結合マンノースに対して内部になければならない。この情報から、以下の部分的な配列が導かれ得る：



ここでは r は、オリゴサッカライドの還元末端を示す。

## 【0200】

このプロセスを、表 1.1 による種々の酵素を用いて、完全な配列が決定されるまで繰り返す。例えば、酵素 3 での消化、続いて酵素 8 での消化によって、最初の配列が以下であることを決定することができる：



## 【0201】

このオリゴサッカライドの還元末端の完全配列を、酵素 3、続いて酵素 7 との反応によって決定する。

## 【0202】

（実施例 2）

この実施例では、質量欠損標識を、脂肪酸の組成の同定、および脂質の配置、または「脂質の配列決定」に使用する。この実施例は、ホスファチジルコリンを利用する；しかし、当業者は、代替の分離方法、スポット、およびリガーゼ選択と組み合わせたこれらの方法を、Lehninger (BIOCHEMISTRY (Worth, NY, 1975))

10

20

30

40

50

を参照のこと)によって定義されるような、鹸化が可能な任意の脂質に対して適応することができることを認識している。

【0203】

HansonおよびPhillips (MANUAL OF METHODS FOR GENERAL BACTERIOLOGY、328頁、Amer. Soc. Microbiol., Washington, DC, 1981を参照のこと)の方法を使用して、E. coli K-12の細胞ペレットのエーテル抽出を通じて脂質抽出物を調製する。エーテルを、蒸発によって抽出物から除去し、そして脂質ペレットを、65:25:5のメタノール:クロロホルム:ギ酸溶媒系(酸化を阻害するために0.1%のブチル化ヒドロキシトルエンを含有している)中に再懸濁した。容量の半分を、印付き(scribed)二酸化ケイ素HLプレート(Altech, Deerfield, IL)の2つのレーンのそれぞれにスポットし、そして乾燥させた。脂質を、WatersおよびHuestis、AMPHIPHILIC INTERACTIONS WITH ERYTHROCYTES AND PLATELETS, DOCTORAL DISSERTATION (Stanford University, Stanford, CA, Dept. of Chemistry, 1992)によって記載されている溶媒系を使用して分離した。このプロセスは、ヘンド基によって脂質を分離する。1つのレーンを取り出し、そしてヨウ素蒸気に曝して、それぞれの脂質画分の相対的な位置を決定した。二酸化珪素マトリックスを、ホスファチジルコリンスポットに対応している発色していないレーン中の領域から掻き取り、そして微量遠心チューブに入れた。

10

20

【0204】

二酸化珪素のペレットを、Cottrell、METH. ENZYMOLOGY、71:698(1981)によって記載されているように、ホスホリパーゼ反応緩衝液(100 $\mu$ l)中に再懸濁し、そして激しくボルテックスした。二酸化珪素懸濁物のアリコート(50 $\mu$ l)を取り出して、第2の微量遠心分離チューブに入れた。第1のアリコートを、Apis mellifera (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)由来の1IUのホスホリパーゼA2の添加によって処理した。ホスホリパーゼA2は、C2脂肪酸を選択的に加水分解する。第2のアリコートを、1IUのNovozyme 871 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)の添加によって処理した。Novozyme 871は、ホスホグリセリドのC3脂肪酸を選択的に加水分解する。両方の反応混合物を、室温で一晩インキュベートした。

30

【0205】

反応混合物を、減圧下で乾燥するまでエバポレートし、そして約25 $\mu$ lのジクロロメタン中に再懸濁した。質量欠損標識1(2-アミノ-5-ヨード-ピリジン)(ジクロロメタン中の1M溶液20 $\mu$ l)を、ホスホリパーゼA2反応混合物に添加した。質量欠損標識2(2-アミノ-3,5-ジヨード-ピリジン)(ジクロロメタン中の1M溶液20 $\mu$ l)を、Novozyme 871反応混合物に添加した。次いで、アリコート(1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミドの1M溶液20 $\mu$ l)を両方のチューブに添加し、そして2時間インキュベートした。カルボジイミドは、酵素によって遊離させられた脂肪酸の質量欠損標識への結合体化を触媒した。反応混合物を、1%のギ酸(v/v)の添加によって酸性化し、そしてABI Mariner MS上でのマイクロスプレーによって、質量分析の直前に混合した。

40

【0206】

化学物質のノイズを、本発明のアルゴリズムによって得られた質量スペクトルから解析し、図9に示す、解析した質量スペクトルを得た。ホスファチジルコリン脂質骨格上のC2およびC3での種々の脂肪酸の正体および相対量を、それぞれの標識への質量付加によって決定した。天然の脂肪酸テイルの長さは、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- (28.031300amu)または-CH=CH- (26.015650)単位のいずれかの倍数で生じる。1つのHの質量(1.007825amu)を、末端メチル基の化学量論を完了するために、それぞれの予想される鎖の長さに加える。分岐した脂肪酸は、分岐点での質量からの1

50

つの水素の欠損が、新しい枝の末端での化学量論を完了するために必要な余分なHによって回復させられるので、一本鎖のアナログから識別することができない。

【0207】

C2位置での種々の脂肪酸の相対量は、種々の標識1結合体化ピークについての一同位体ピークの高さから概算することができる(A<sub>1</sub> F<sub>1</sub>、図9)。ホスファチジルコリンのC3位置での種々の脂肪酸の相対量を、種々の標識2結合体化ピークについての一同位体ピークの高さから概算することができる(A<sub>2</sub> F<sub>5</sub>、図9)。従って、E. coliのホスファチジルコリンの平均の配列を、表2.1に示す。

【0208】

さらなる脂質配列の分解を、第2回目の薄層クロマトグラフィーの特徴、または脂肪酸の疎水性を使用して脂質を分離する他の分離方法の使用を通じて、得ることができる(例えば、Morris, J. Lipid Res., 7: 717-732 (1966)を参照のこと)。

【0209】

【表5】

表 2.1  
E. Coli のホスファチジルコリンの配列組成

ピーク	脂肪酸	およその量 (%)	
		C3 (標識2)	C2 (標識1)
A	n-ドデカン酸	20	10
B	n-テトラデカン酸	20	30
C	パルミトレイン酸	—	2
D	n-ヘキサデカン酸	37	35
E	オレイン酸	—	2
F	n-オクタデカン酸	22	20

(実施例3)

この実施例は、臭素置換基またはヨウ素置換基を有している光で切断され得る質量欠損標識の調製を記載する。これらの標識は、別な方法では質量分析計において低いイオン化または検出効率を示し得る、生体分子(例えば、核酸、タンパク質、または代謝物)の相対量の定量に有用である。質量欠損標識は、質量分析計においてその結合体生体分子についての代用マーカーとして作用する。末端化学のバリエーションは、1級アミン、スルフヒドリル、およびカルボン酸を含有している生体分子への連結のための手段を提供する。質量欠損元素を標識中に含むことによって、サンプル中に存在し得る重複している化学物質のノイズから標識を、および異なる数の質量欠損元素が2つの標識中に取り込まれる場合2つのサンプルを互いに、明らかに分離することが可能である(実施例1をもまた参照のこと)。

【0210】

簡潔には、Schmidtら、WO99/32501(1999年7月1日)によって記載されているように調製した4-(tert-ブチルジメチルシリル)-フェニルホウ酸エーテル(FT106)を、Schmidtら、WO99/32501(1999年7月1日)に記載されているような方法を使用して、表3.1に示す対応する市販のプロモ-フェノールまたはヨード-フェノールの1つと混合して、対応する臭素化質量欠損標識前駆体またはヨウ素化質量欠損標識前駆体を形成させる。さらなるアリールエーテル結合を、市販のヒドロキノンまたは4,4'-ジヒロキシジフェニルエーテルの組込みを介して、FT106と末端質量欠損含有アリール基との間に挿入し得る。これを達成するためには、末端フェノールを、FT106を生成するために使用した同じ方法によって、フェニルポロン酸末端を使用して、再活性化する。同様に、分枝型アリールエーテルを、市販の1,2,4-ベンゼントリオールの添加および再活性化によって生成させ得る。

【0211】

質量欠損標識前駆体(MDP1からMDP5、表3.1)のtert-ブチル-ジメチ

10

20

30

40

50

ルシラン保護基を、塩化メチレン中のモル過剰のフッ化トリメチルスルホニウム、または当該分野で一般的に公知の他の適切な手段を用いて、除去する。対応する脱保護されたフェノールを、さらに、適切にブロックされたアミノリンカーに結合させる（例えば、GB 98/15163.2（1998年7月13日）を参照のこと）。これをその後、Schmidtら（同書）によって記載されているように、第1級アミンに転換させる。このアミンを、さらに、任意の適切なフェニルビニルスルホンと反応させ得る。適切なフェニルビニルスルホンの例としては、そのフェニル環上の、ブロックされた第1級アミン（または、その後アニリンへと還元され得るニトロ基）置換、カルボン酸（例えば、トリフルオロ酢酸エステル）置換、またはチオール（例えば、ジスルフィド結合）置換が挙げられるが、これらに限定されない。次いで、そのリンカーの2°アミノ基を、標識が光切断可能になるように、トリフルオロ酢酸無水物またはメタン塩化スルホニルと反応させる。最後に、そのブロック試薬を、当該分野で一般的に認識されている方法によって取り除き、そして光切断可能な質量欠損タグ結合体分子を生じるための任意の適切な一般的に認識されている結合方法によって、光切断可能な質量タグを、遊離のアミン、カルボン酸、またはチオール基を介して分子または高分子に結合体化させる。

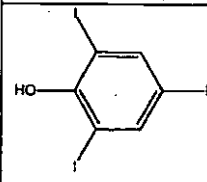
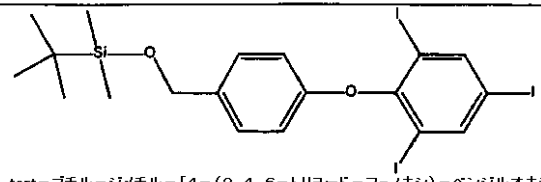
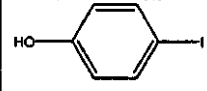
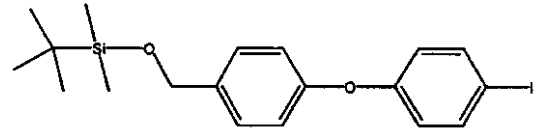
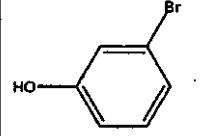
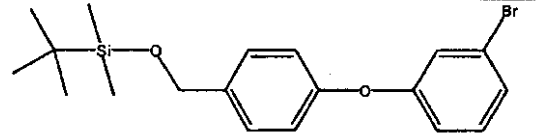
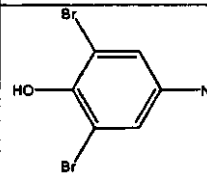
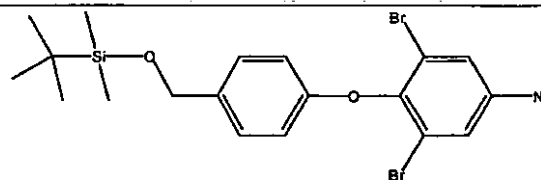
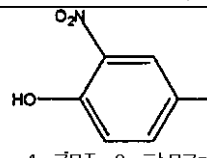
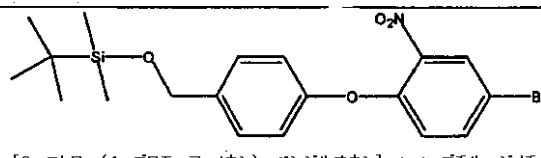
【0212】

（表3.1）

（市販のプロモ-フェノールおよびヨード-フェノール）

【0213】

【表6】

置換フェノール	コード	質量欠損標識前駆体
 2,4,6-トリヨード-フェノール	MDP1	 tert-ブチル-ジメチル-[4-(2,4,6-トリヨード-フェノキシ)-ベンジルオキシ-シラン]
 4-ヨード-フェノール	MDP2	 tert-ブチル-[4-(4-ヨード-フェノキシ)-ベンジルオキシ]-ジメチル-シラン
 3-ブロモ-フェノール	MDP3	 [4-(3-ブロモ-フェノキシオキシ)-ベンジルオキシ]-tert-ブチル-ジメチル-シラン
 2,6-ジブロモ-4-ニトロフェノール	MDP4	 [4-ニトロ-(2,6-ジブロモ-フェノキシ)-ベンジルオキシ]-tert-ジメチルシラン
 4-ブロモ-2-ニトロフェノール	DMP5	 [2-ニトロ-(4-ブロモ-フェノキシ)-ベンジルオキシ]-tert-ブチル-ジメチルシラン

（実施例4）

この実施例は、種々のサンプルから得た親和性精製した質量欠損標識化合物の迅速な定量分析のための、親和性結合性質量標識の使用を例示する。この実施例では、タンパク質

10

20

30

40

50



を使用するが、この方法を、異なるサンプルから同時に精製した任意の分子の比較のための分析に適応させ得ることを、当業者は理解している。

【0214】

その標識の調製を、任意の適切なヘテロ二官能性の臭化アリールまたはヨウ化アリール（例えば、表4.1に示す市販の例）を用いて開始する。MDP4およびMDP5（表3.1）もまた、有用である。これらのアニリンの各々を、化学量論的過剰な、親和性試薬のN-ヒドロキシスクシミド（NHS）エステル（例えば、市販の無水アセトニトリル中のNHS-イミノピオチン分子またはNHS-ピオチン分子）と反応させ得る。この反応混合物を、未反応のNHSエステルの全てを加水分解するために、水の添加の前に、少なくとも2時間インキュベートする。その溶媒を蒸発させて乾燥させる。

10

【0215】

次いで、そのニトロ基を、標準的な方法（例えば、触媒として添加する $\text{SnCl}_2$ を含む $\text{HCl}$ ）を使用して、第1級アミンに還元する。その反応産物（以下の化合物4.1を参照のこと）を、アフィニティークロマトグラフィーによって精製し、そして蒸発させて乾燥させる。次いで、そのアミノ基（ニトロ基の還元によって生じる）を、別の適切な架橋剤（例えば、ヨード酢酸無水物）と反応させるか、またはカルボジイミド化学を使用して、標的分子を含有するカルボン酸への結合のために、そのアミノ基を直接使用し得る。第1級アミンとの反応に適切な別の結合化学物質もまた、使用し得る。

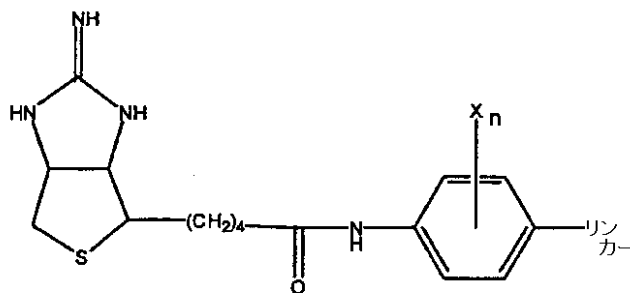
【0216】

必要に応じて、そのアミノ基（または第2のアニリン末端）を、Aebersoldら（WO00/11208（2000年3月2日））によって記載されているように、水素化および過重水素化ポリエチレングリコールとの反応によって、伸長させて、差次的標識のための、同位体によって異なる一連の質量欠損タグを生じさせ得る。同様に、同位体的には純粋である臭化アリール出発物質またはヨウ化アリール出発物質を、同位体に結合させた親和性タグを直接生成するために使用し得る。

20

【0217】

【化1】



4.1

30

化合物4.1は、質量欠損標識したイミノピオチン親和性タグを示し、ここで、Xは、質量欠損元素（例えば、臭素またはヨウ素）を示し、そしてnは、質量欠損元素の数を示す。そのリンカーは、質量欠損親和性結合性タグを標的分子に連結するために使用し得る、任意の結合化学物質である。例としては、アニリン（これは、カルボジイミド化学を介してカルボン酸に連結され得る）、ヨードアセトアミド（ヨード酢酸無水物とアニリンとの反応によって形成される）、または硝酸との反応によって形成されるアジ化物が、挙げられる。

40

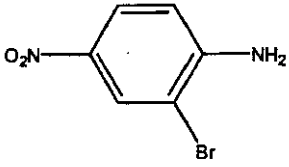
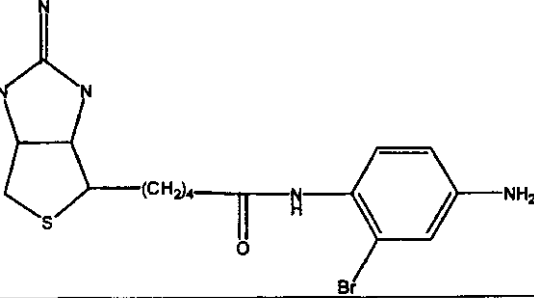
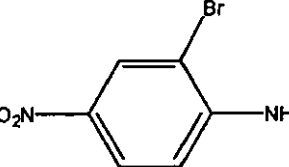
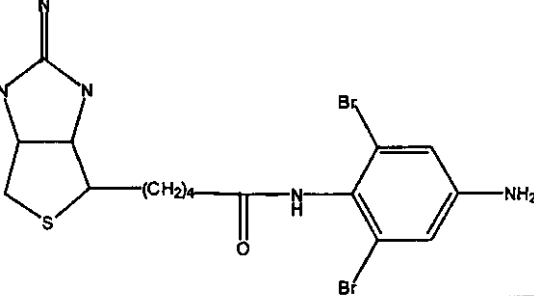
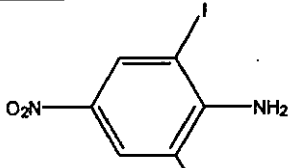
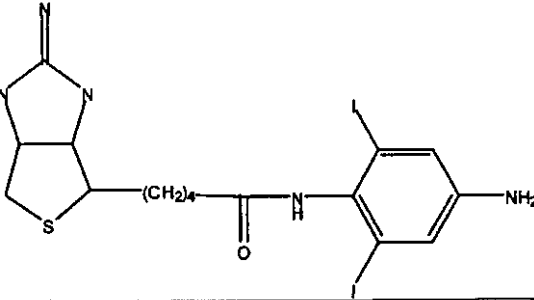
【0218】

（表4.1）

（親和性結合性質量欠損標識の例）

【0219】

【表 7】

ヘテロ二官能性 臭化アリールまたはヨウ化アリール	コード	親和性結合性質量欠損標識
 2-ブロモ-4-ニトロアニリン	MDA1	
 2,6-ジブロモ-4-ニトロアニリン	MDA2	
 2,6-ジヨード-4-ニトロアニリン	MDA3	

このようなタグの使用を例示するために、血漿サンプル(1 ml)を、2人の患者の各々から入手し、そして別個の遠心分離管に配置する。各管を、以下のように処理する。その高分子を、最終濃度約10% w/vになるようにトリクロロ酢酸を添加することによって沈殿させ、そしてその管を、氷上で20分間インキュベートする。その沈殿を遠心分離(14,000 g)によってペレット状にし、そして上清を除去する。そのペレットを減圧下で乾燥させる。乾燥させたペレットを、100 IUのトリプシンおよび0.1% w/vのトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩を含有する、100 μlの適切なトリプシン消化緩衝液中に再懸濁する。その溶液を、37 °Cで一晩インキュベートする。

## 【0220】

MDA1(質量欠損親和性標識1)の同位体的に純粋なアリコート(アミノ酸)を、ヨードアセトアミドリンカーを用いて調製する。サンプル1のトリプシン消化物のアリコート(50 μl)を、10 mgの[<sup>79</sup>Br]-MAD1を含有する遠心分離管に添加する。サンプル2のトリプシン消化物の同様の50 μlアリコートを、10 mgの[<sup>81</sup>Br]-MAD1を含有する遠心分離管に添加する。両方の管を、内容物とともに混合する前に3時間インキュベートする。親和性標識分子を、製造業者によって推奨される手順に従って、ストレプトアビジン-アガロースアフィニティーカラム(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を通過させるクロマトグラフィーによって、精製する。回収したタグ化ペプチド混合物を、本発明の方法によって、未標識ペプチドから生じた化学物質ノイズからデコンボリューション(deconvolve)した質量欠損ピークを用いて、質量分析計によって分析する。残った同位体によって異なるピーク対すべてを、それらの相対量について定量化した。

## 【 0 2 2 1 】

( 実施例 5 )

この実施例は、配列決定方法において光切断可能な質量タグの使用を例示する。

## 【 0 2 2 2 】

本発明の方法を使用して、質量欠損元素（例えば、臭素およびユーロピウム）を、Nessら、米国特許第6,027,890号によって記載されている光切断可能な成分の重量範囲調節成分中に特異的に組み込んだ。これらの元素によって提供される質量欠損は、その質量欠損標識を含有するフラグメントが、そのサンプル中に存在し得る他の有機分子から生じる化学物質ノイズからデコンボリューション（*deconvolve*）されることを可能にする。さらに、この実施例は、本明細書中に記載されるピーク対形成デコンボリューション（*deconvolution*）アルゴリズムの使用法を示し、それによって、高天然量の安定な同位体を有している質量欠損元素を使用する場合に、そのスペクトル中の低いシグナルピークの定量化を可能にする。

10

## 【 0 2 2 3 】

その合成は、工程Hで添加したR<sub>1-36</sub>化合物が、種々の鎖長を有しているアミノ酸のプロモフェニルアミド誘導体からなることを除いて、Nessら（同書）の実施例5に記載されているように進行する。このプロモフェニルアミド誘導体を、以下のように調製する：

約5gの3-プロモ安息香酸および5gの1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミドを、100mlの乾燥トルエン中に溶解させる。約10mlのこの溶液を、10個の反応バイアル各々に等分する。各10mlアリコートに、表5.1のアミノ酸のtert-ブチルエステルのうちの1つ、そのプロモ安息香酸に対する化学量論量を、添加する。種々のアミノ酸tert-ブチルエステル（標準的な方法によって調製した）を、各管に添加する。この反応を、室温で一晩進行させ、そして未反応のtert-ブチルエステルを、トリフルオロ酢酸の添加によって除去する。次いで、溶媒を蒸発によって取り除き、そしてそのプロモフェニルアミド誘導体を、勾配溶出を用いる逆相クロマトグラフィーを使用して、分取逆相HPLCによって精製する。

20

## 【 0 2 2 4 】

そのプロモフェニルアミド誘導体を溶解させ、そしてYMC種のC<sub>8</sub>固定相またはC<sub>18</sub>固定相（寸法約25cm×6mm内径、5~15μm、120~150）と、勾配移動相（最初は50:50の比で水とのアセトニトリルおよび/またはメタノールと水との混合物からなる）を使用して、クロマトグラフする；流速および勾配を、その特定のプロモフェニルアミド誘導体について、分析者が調整する。極端なテーリングまたはピークの広がりが生じる場合には、移動相中の分析物の溶解性を補助するために、0.1モル濃度の酢酸アンモニウム、ジエチルアミン、トリエチルアミン、または水酸化アンモニウムを含むように、水相を必要に応じて改変し得る。1~10%（容量で）のイソプロピルアルコール、ジイソプロピルアルコール、またはテトラヒドロフランの添加を介して、分析物混合物中の構成成分の間での選択性に变化を生じるように、そしてその不純物からの所望されるプロモフェニルアミド標識材料の単離を可能にするように、その有機部分は、必要に応じて、強度が改変され得る。その勾配は、10~20分間の経過にわたって約50%の有機物（容量で）から約90~100%の有機物までへと全溶媒強度を変化させることによって、実行する。その移動層構成成分、流速、開始溶媒強度および最終溶媒強度、ならびに勾配速度の改良は、当業者によって通常行われるように、各誘導体について行う。所望されるプロモフェニルアミド材料の単離された画分を混合し、そして質量タグに組み込む前に蒸発させる。

30

40

## 【 0 2 2 5 】

この手順によって、図10に示す一般的な組成物を有する一連の標識が生成する。これらの標識は、テトラフルオロフェニルでブロックした酸部分を介して、標的分子を含有する任意の第1級アミンと反応させ得る。

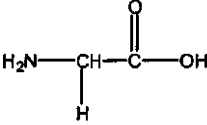
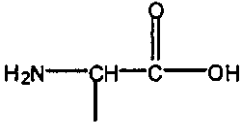
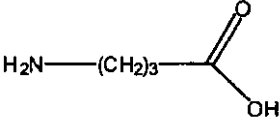
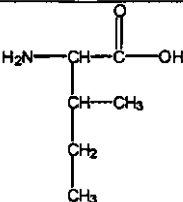
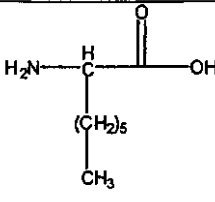
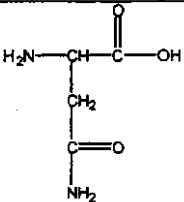
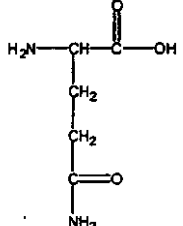
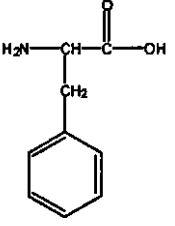
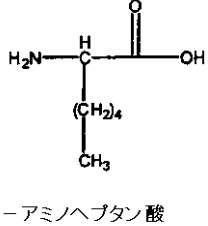
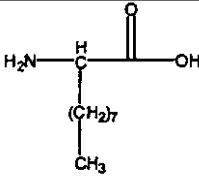
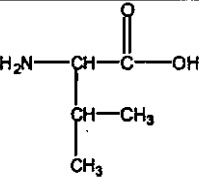
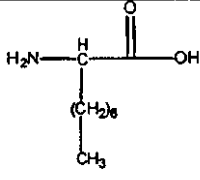
( 表 5 . 1 )

50

(質量タグについてのグループV I 可変重量成分の調製における使用のためのアミノ酸)

【0226】

【表8】

 <p>グリシン</p>	 <p>アラニン</p>	 <p>4-アミノ酪酸</p>
 <p>ロイシンまたはイソロイシン</p>	 <p>2-アミノオクタン酸</p>	 <p>アスパラギン</p>
 <p>グルタミン</p>	 <p>フェニルアラニン</p>	 <p>2-アミノヘプタン酸</p>
 <p>2-アミノデカン酸</p>	 <p>バリン</p>	 <p>2-アミノベラルゴン酸</p>

10

20

(実施例6)

この実施例は、ブラジキニンの配列決定における、上記の実施例5で生成した光切断可能な質量欠損標識の使用を例示する。

30

【0227】

この実施例では、3-プロモ安息香酸およびアラニン結合体質量欠損標識を、当該分野で一般的に認識されている方法を使用して、ペプチドブラジキニンのN末端に連結する。この標識ペプチドを、容量で50:50:1のアセトニトリル:水:トリエチルアミン溶液へと、約1ng/μlに希釈する。この溶液を、標準的なマイクロスプレーヘッドを装備したApplied Biosystems Mariner ESI-TOF質量分析計に、約1μl/分で注射し、そして陰イオンモードで実行した。このスプレーの設定および質量分析計の設定を、オリゴヌクレオチドdT<sub>6</sub>の3<sup>-</sup>荷電状態の最大相対量について最適化した。このオリゴヌクレオチドdT<sub>6</sub>の3<sup>-</sup>荷電状態は、5000より大きい

40

ピーク分解能で達成され得た。Arポンプ型定在波色素レーザー(Coherent)(これは、350nmに変換された)を、スプレーチップと質量分析計のノズルとの間の隙間に向け、そのサンプルのスプレーを、その質量タグを切断するためのレーザー光線に完全に曝すようにした。

【0228】

質量タグで標識されたサンプルを、3秒間持続の30回のスキャンを累積することによって、分析した。その質量スペクトルの化学物質ノイズを、本発明のアルゴリズムを使用してデコンボリューション(deconvolve)し、それによって質量欠損標識のピークを残した(図11A)。

【0229】

50

これらのデコンボリューション ( deconvolve ) したピークを、以下のアルゴリズムを使用して、それらの同位体対の相対量によってさらに定量化した：

【 0 2 3 0 】

【 化 2 】

$$\beta = \left( \frac{\left( \text{計数}_{[^{79}\text{Br}]} + \text{計数}_{[^{81}\text{Br}]} \right)}{2} \right) \left[ 1 - \frac{\left| \text{計数}_{[^{79}\text{Br}]} - \text{計数}_{[^{81}\text{Br}]} \right|}{\left( \text{計数}_{[^{79}\text{Br}]} + \text{計数}_{[^{81}\text{Br}]} \right)} \right]$$

低い方の質量ピークの相対量を、この計算から得た 因子で置き換えた。得られたデコンボリューションしそしてピークを定量化した、質量タグ領域の質量スペクトルを、図 1 1 B に示す。最後に、この 因子のスペクトル中の同位体の系列 ( 図 1 1 C ) を、さらに、BioSpec Data Explorer ソフトウェア (バージョン 4.0、Applied Biosystems, Framingham, MA) にて実行される、当該分野で一般的に公知のアルゴリズムを使用して、単一の一同位体ピークへとデコンボリューションした。

10

【 0 2 3 1 】

( 実施例 7 )

この実施例は、ウマのアポミオグロビン ( Myo ) への、質量欠損標識 ( 5 - プロモニコチン酸の N - ヒドロキシスクシンイミド ( NHS ) エステル ) の結合を例示する。

【 0 2 3 2 】

20

Myo ( 配列決定プレート ) ( Cat # A 8 6 7 3 )、5 - プロモニコチン酸 ( 5 - BrNA ) ( Cat # 2 2 8 4 3 5 )、ドデシル硫酸ナトリウム ( SDS ) ( Cat # L 6 0 2 6 )、および尿素 ( Cat # U 0 6 3 1 ) を、Sigma - Aldrich から購入し、そして供給されたままで使用した。無水ジメチルスルホキシド ( DMSO ) ( Cat # 2 0 8 6 4 )、1 - エチル - 3 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) - 塩酸カルボジイミド ( EDC ) ( Cat # 2 2 9 8 0 )、および NHS ( Cat # 2 4 5 0 0 ) を Pierce から購入し、そして供給されるままで使用した。

【 0 2 3 3 】

5 - BrNA の NHS - エステルを、0.657 mL の DMSO 中に 20.8 mg の 5 - BrNA、52.7 mg の NHS、および 154.1 mg の EDC を溶解させることによって、インサイチュで調製した。そのサンプルを、全ての固体を迅速に溶解させるために、浴型超音波処理器中で短く超音波処理した。その混合物を、4 で一晩インキュベートした。得られた混合物の質量スペクトル分析により、標準的な添加による 5 - BrNA から NHS - エステル ( NHS - 5 - BrNA ) への 93% の変換が、示された。

30

【 0 2 3 4 】

Myo を、5% ( w / v ) の水性 SDS 溶液中に 5.35 mg / mL の濃度で 95 にて 20 分間加熱することによって、変性させた。室温まで冷却した後、Myo を、最終濃度 1% ( w / v ) の SDS および 6.4 M の尿素を含有する、80 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 ( pH 7.0 ) 中に、1.07 mg / mL になるように希釈した。上記に記載したように調製した 0.353 mL ( 50 μmol ) の NHS - 5 - BrNA を 2 mL ( 2.14 mg ) の変性ミオグロビンに添加することによって、Myo を、NHS - 5 - BrNA で標識した。そのサンプルを、暗所で室温にて一晩インキュベートした。次いで、そのサンプルを、尿素および SDS を除去するために 50% ( v / v ) の水性酢酸で大規模透析した。この尿素および SDS は、エレクトロスプレー質量スペクトル分析に対して有害な影響を有する。タンパク質の欠如が、大規模透析の間に明らかであったが、定量化はしていなかった。最後の透析の後、そのサンプルを、speed vac ( Savant ) 中で乾燥させきった。

40

【 0 2 3 5 】

( 実施例 8 )

50

この実施例は、定期的な化学物質ノイズからシフトされる、IMLSによる5-BrNA標識ミオグロビン（実施例7に記載したように調製した）に由来する配列決定質量スペクトルフラグメントイオン種の生成を例示する。

#### 【0236】

サンプルを、容量で1%の酢酸を含有する0.1mLの50%の水性アセトニトリル溶液中に、乾燥させた5-BrNA標識ミオグロビン（実施例7）を溶解させることによって、質量分析のために調製した。この標識タンパク質を、Schneiderら(WO 00/63683号、2000年10月26日)によって記載されているエレクトロスプレー飛行時間型質量分析計(Mariner<sup>TM</sup>、PE Biosystems, Inc.)のインソース(in-source)フラグメンテーションに供した。その質量分析計の設定を最適化し、そしてその機器を、製造業者の指示書に従ってそのサンプルを注入する直前に校正した。そのサンプルを、1 $\mu$ L/分の速度で、エレクトロスプレー供給源中に、50 $\mu$ m内径のキャピラリーを介して連続して注入した。そのノズル電位を、インソースフラグメンテーションを誘導するために300Vに設定した。スペクトルを累積させ、そして50~2000質量対電荷ユニットの範囲で、345sについて合計した。

10

#### 【0237】

生の質量スペクトルのデータの試験は、標識自体の一価のb型イオン(一同位体質量183.94)の明確の証拠を示した。これは、約1amuの周期で現れる周期的な化学的ノイズの一部であるピークの左側に、約0.15amuシフトされる(図12Aを参照のこと)。このピークの実体は、第1のピークの約2amu上流に存在する第2のピーク(185.94)の出現によって確認され、この第2のピークは、より質量の大きい臭素の同位体(<sup>81</sup>Br)を組み込む、標識されたフラグメントイオンに対応する。これらの2つのピークの相対的な強度はほぼ等しく、これは、約1:1の天然での臭素同位体の量を反映している。

20

#### 【0238】

このことは、IMLSの間にタンパク質から生成される化学的ノイズ(これは、強い質量欠損を示さない元素から構成される)から分離され得る、質量欠損元素(例えば、臭素)を組み込む標識特異的フラグメントイオンを生成することの有用性を説明する。

#### 【0239】

スペクトルデータを、ミオグロビンのN末端のフラグメントイオンに対応する、質量欠損によってシフトしたピークの証拠について試験した。一価のa<sub>1</sub>イオンの二重線(グリシン)は、212.97および214.96のm/zで現れる(図12Bを参照のこと)。さらに、d<sub>2</sub>イオン(グリシン-ロイシン)の計算された質量(284.05および286.05のm/z)に対応している二重線が現れる(図12Cを参照のこと)。このように、配列決定イオンが生成される。この標識を用いて観察される、一般に低い量の配列決定イオンのピークは、ピリジル環との標識カルボニルの結合体化によって高度に安定化される、標識自体の生成されたイオンの高い強度の結果である(図12Aを参照のこと)。この高度に結合体化させられた種の生成は、タンパク質のアミド骨格にわたる標識アミド結合の優先的な切断を導き、これによって、有意な配列決定イオンの欠損を導く。結果として、タンパク質のアミド骨格の結合エネルギーと同様の結合エネルギーの標識アミド結合を生じるように、1つ以上のメチレン基によって芳香族環から標識カルボニルを分離することが好ましい。

30

40

#### 【0240】

##### 実施例9

この実施例は、ウマアポミオグロビン(Myo)への、質量欠損標識である5-プロモ-3-ピリジル酢酸(5-Br-3-PAA)のN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステルの結合体化を説明する。

#### 【0241】

5-Br-3-PAA(Cat# 13579)を、Lancaster Synthesisから購入し、そして供給されるように使用した。Myo(配列決定グレード)(

50

Cat # A 8 6 7 3)、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)(Cat # L 6 0 2 6)、および尿素(Cat # U 0 6 3 1)を、Sigma-Aldrichから購入し、そして供給されるように使用した。無水ジメチルスルホキシド(DMSO)(Cat # 2 0 8 6 4)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)(Cat # 2 2 9 8 0)、およびNHS(Cat # 2 4 5 0 0)をPierceから購入し、そして供給されるように使用した。

【0242】

5-Br-3-PAAのNHS-エステル(NHS-5-Br-3-PAA)を、0.235 mLのDMSO中に12.7 mgの5-Br-3-PAA、7.4 mgのNHS、および12.5 mgのEDCを溶解させることによって、インサイチュで調製した。この混合物を、暗所にて、室温で24時間インキュベートした。得られた混合物の質量スペクトル分析は、標準の添加による5-Br-3-PAAの53%の転換を示した。転換があまり完了していないので、さらなるNHS(7.2 mg)およびEDC(7.5 mg)を添加し、そしてさらに24時間インキュベートした。この2回目のインキュベーション期間の後、得られた混合物の質量スペクトル分析は、出発物質の93%の転換を示した。

10

【0243】

Myoを、0.54 mLの5%(w/v)のSDS水溶液で、1.89 mgを、20分間95で加熱することによって変性させた。室温への冷却の後、20 mMのリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)中の1.89 mLの9 Mの尿素を、サンプルに添加した。NHS-5-Br-3-PAA(0.24 mL ~ 19 mMの最終濃度)を、変性させたミオグロビンに添加した。サンプルを、暗所で室温にて一晚インキュベートした。反応混合物を、尿素およびNHS-5-Br-3-PAA反応副生成物を除去するために、0.1%(w/v)のSDSを含有している25 mMのTris(pH 8.3)緩衝液に対してスピントラリスした。標識したミオグロビンを含有している最終残留物(約0.6 mL)を、結合したSDSを除去するためにクロロホルム抽出手順に供した(Puchadesら(1999)、Rap. Comm. Mass. Spec. 13, 344-349)。サンプルに対して、2.4 mLのメタノール、0.6 mLのクロロホルム、および1.8 mLの水を添加した。サンプルを、チューブを1回反転させることによって混合した。サンプルを、相分離を補助するために遠心分離(3743 g、20分、室温)し、そして最上部の層のほとんどを廃棄した。メタノール(1.8 mL)を、残存している下層、および界面に沈殿しているタンパク質に対して添加した。チューブを激しくボルテックスし、そして沈殿したタンパク質を遠心分離(3743 g、40分、室温)によってペレット化した。上清をデカントしそして廃棄し、残ったタンパク質ペレットを、窒素ガス流を用いて乾燥させた。乾燥させた標識されたMyoを、0.4 mLの10%(v/v)の酢酸水溶液中に再懸濁した。タンパク質濃度(2.6 mg/mL)をBCAアッセイによって、標準としてBSAを使用して測定した。

20

30

【0244】

実施例10

この実施例は、周期的な化学的ノイズからシフトされる、IMLSによる、5-Br-3-PAAで標識したミオグロビン(実施例9で調製した)に由来する、配列決定質量欠損スペクトルフラグメントイオン種の生成を説明する。

40

【0245】

サンプルを、1.2容量%の酢酸を含有する0.5 mLの50%のアセトニトリル水溶液中に、5-Br-3-PAAで標識したミオグロビン(150 µg)を溶解させることによって、質量分析のために調製した。この標識したタンパク質を、Schneiderら(第W000/63683号、2000年10月26日)によって記載されるような、エレクトロスプレー飛行時間型質量分析計(Mariner(登録商標)、PE Biosystems, Inc.)のインソースフラグメント化(in-source fragmentation)に供した。質量分析計の設定を最適化し、そして機器を製造業者の説明書に従って、サンプルの注入の直前に校正した。サンプルを、1.2 µL/分の速

50

度で、エレクトロスプレーの供給源に、50  $\mu\text{m}$ のI.D.キャピラリーを通じて連続して注入した。ノズル電位を、インソースフラグメント化を誘導するために225 Vに設定した。スペクトルを累積し、そして50 ~ 2000の範囲の質量対電荷ユニットで、180秒間で合計した。

#### 【0246】

生の質量スペクトルのデータの試験は、標識されたミオグロビンのN末端に由来する、一価の $b_1 \sim b_6$ イオンの明確な証拠を示す(図13A ~ B、図14AおよびB、ならびに図15AおよびB)。 $^{79}\text{Br}$ または $^{81}\text{Br}$ 元素のいずれかを取り込んでいるbイオンに対応する二重線のピーク(約50 : 50の天然での臭素の量を反映する)は、約1 amuの周期頻度で現れる周期的な化学的ノイズの左側に、それらの質量欠損(約0.15)分シフトされる。従って、5 - BrNAで標識されたミオグロビンによって産生された、限定された配列決定イオン(実施例1および2で議論した)とは異なり、この標識されたミオグロビンは、標識カルボニルとピリジン環との間に介在しているメチレン単位とともに、最初の6個のN末端残基を通じてbイオンの完全な質量ラダーを生じる。これは、ほぼおそらく、5 - BrNA(切断に対してより感受性である)と比較して、切断能力に関してタンパク質骨格のアミド結合に類似する5 - Br - 3 - PAAのアミド結合の結果である。

#### 【0247】

##### 実施例11

この実施例は、4 - プロモベンズアルデヒドで標識したアポミオグロブリンのIMLSのための1つの方法を記載する。

#### 【0248】

アルデヒドでのタンパク質のN末端標識、それに続く、還元剤での安定化によって、第2級アミンの連結を有する標識を生じる。この連結は、対応するアミドよりもエネルギー的に安定である。従って、IMLSの間に、この標識は、ペプチドアミド結合と比較して、最少のフラグメント化を示すはずであり、従って、目的のより豊富なフラグメントイオンを産生するはずである。さらに、化学反応による直接の塩基部位の生成は、「軟らかい」電荷部分を提供し、これは、事前の連結を必要とすることなく、標識中に荷電した部分を組み込むことを可能にする。

#### 【0249】

4 - プロモベンズアルデヒドは、Sigma - Aldrichから入手され得る。このアルデヒドを、5 - プロモニコチン酸のNHSEステルでのミオグロビンの標識のために、実施例10に記載した条件と同様の様式で、変性させたミオグロビンの水性緩衝溶液に対して添加し得る。反応の完了時点で、標識したミオグロビンを、シアノ水素化ホウ素ナトリウム(sodium cyanoborohydride)での生成されたイミンの還元によって安定化させる。この還元剤は、イミン様二重結合を選択的に還元し、そしてペプチドおよびタンパク質に一般的に見られる他の官能基は還元しない。得られる標識の化学結合は、第2級アミンである。次いで、標識されたタンパク質を、透析またはゲル濾過によって精製する。標識されたタンパク質を、MS適合性の緩衝系中に溶解させ、そしてIMLSを、実施例10に記載した様式で行う。

#### 【0250】

##### 実施例12

この実施例は、5 - プロモニコチン酸で標識したユビキチンのIMLSを説明する。

#### 【0251】

ユビキチンを、アポミオグロブリンについて実施例7に概説した手順に従って、5 - プロモニコチン酸で標識する。標識したユビキチンを、実施例8に記載する質量分析計でのインソースフラグメント化に供し、そしてスペクトルを、標識を含有しているN末端フラグメントイオンの存在について分析する。

#### 【0252】

##### 実施例13



この実施例は、6 - ブロモ - 2 - ヒドロキシ - キノリン - 4 - カルボン酸 ( B H Q C ) で標識したアポミオグロビンの I M L S を説明する。

【 0 2 5 3 】

B H Q C の N H S エステルを、5 - ブロモニコチン酸の N H S エステルの調製について実施例 7 に記載した手順に従って調製する。アポミオグロビンを、実施例 7 に記載した手順と同様の手順を使用して B H Q C で標識する。標識したアポミオグロビンを、実施例 1 0 に記載した質量分析計でのインソースフラグメント化に供する。質量スペクトルのデータを、標識した N 末端フラグメントイオンについて分析する。

【 0 2 5 4 】

実施例 1 4

この実施例は、6 - ブロモ - 2 - ヒドロキシ - キノリン - 4 - カルボン酸 ( B H Q C ) で標識したユビキチンの I M L S を説明する。

【 0 2 5 5 】

ユビキチンを、アポミオグロブリンについて実施例 1 3 に概説した手順に従って、B H Q C で標識することができる。次いで、標識したユビキチンを、実施例 1 0 に記載した質量分析計でのインソースフラグメント化に供する。その後、質量スペクトルデータを、標識した N 末端フラグメントイオンについて分析する。

【 0 2 5 6 】

実施例 1 5

この実施例は、実施例 5 に記載した E S I - T O F 質量分析計でのインソースでフラグメント化した 5 - B r - 3 - P A A 標識ミオグロビンの N 末端配列を見出すための、本発明の自動デコンボリューション ( d e c o n v o l u t i o n ) および配列決定アルゴリズムの使用を説明する。

【 0 2 5 7 】

実施例 5 からの質量スペクトルを作成するために使用した生のデータを、データ獲得システムから A S C I I 形式で取り出す。化学的ノイズの天然の周期を、付録に示す「デコンボルバー ( d e c o n v o l v e r ) 」コードを使用してこの生のデータから決定し、そして 1 . 0 0 0 5 7 5 a m u と決定する。この天然の周期を使用して、スペクトルを、M S において常にポジティブである機器の誤差を補正するために、ベースラインを設定する ( 出力ファイル \* . b s l ) ( 図 1 6 ) 。ベースライン設定は、データの各 1 . 0 0 0 5 7 5 a m u ブロックにおける最少データ値が、そのデータのブロック中の全てのデータ点毎を通して差し引きすることによって、ゼロに調整されることを意味する。その後、ベースラインが設定されたデータファイルを、質量欠損 ( B r を含有している ) ピークを定量化するように「因子」で処理する。質量欠損ピークは、[ <sup>79</sup> B r ] ピークよりも 1 . 9 9 7 9 5 4 a m u 上流の、適合する [ <sup>81</sup> B r ] ピークを常に有する ( 図 1 6 ) 。次いで、得られた \* . b f c ファイルを、「シークエンサー ( s e q u e n c e r ) 」コード ( 「 M e t h o d s f o r D e t e r m i n i n g P r o t e i n a n d P e p t i d e T e r m i n a l S e q u e n c e s 」 と題された、代理人登録番号第 0 5 2 6 5 . P 0 0 1 号の、2 0 0 1 年 1 0 月 1 9 日に提出された同時係属出願を参照のこと ( その開示は、本明細書中で参考として援用されている ) ) を通して、最上位にランクされた溶液から最初の 4 個の残基までの N 末端ミオグロビン配列 ( 5 - B r - 3 - P A A - G L S D G E ) を用いて処理する。本実施例において、「シークエンサー」コードは、b - イオンの第 1 の電荷状態についての検索に限定した。

【 0 2 5 8 】

「シークエンサー」コードを、最初の 5 個の残基の配列を決定するために実行する場合、配列 G L S D W ( これは、7 5 6 . 1 9 9 3 の理論上の質量を生じる ) は、真の配列の 6 番目の残基の質量欠損位置に対応するピーク ( 7 5 6 . 1 8 4 0 での G L S D G E ) と重複する ( 図 1 7 ) 。これは、5 個の残基で最上位にランク付けされる配列である G L S D W を生じる。しかし、「シークエンサー」を、6 個の残基を通して実行する場合、真の配列 G L S D G E もまた、最上位にランクされる。なぜなら、G L S D W は、その 6 番目

10

20

30

40

50

の残基で競合する配列を増幅しないからである。これは、累積確率アルゴリズムの利点を示す。

#### 【0259】

##### 実施例16

この実施例は、本発明の質量欠損元素（例えば、臭素）、イオン化が可能な基（すなわち、ピリジル）、およびポリペプチドまたは他の種のN末端または他の所望される第1級もしくは第2級アミノ基への連結のための無水コハク酸連結部分を組み込む、一般的な質量欠損標識の合成を説明する。無水コハク酸、および見かけ上のその誘導体は、ポリペプチドのアミノ基とほぼ定量的に効率よく反応することが実証されている（Munchbachら、Anal. Chem. 72: 4047-4057 (2000)を参照のこと）。イオン化が可能な基（ $A_1 \dots A_n$ ）、質量欠損元素（ $B_1 \dots B_n$ ）、および中心部の無水コハク酸反応部分（SA）（図18aを参照のこと）の任意の組み合わせを含む、他の匹敵する脂肪族/芳香族種が、容易に合成され得る。

10

#### 【0260】

例示的な戦略として、図18bは、 $\{(A_1 \dots A_n) - (B_1 \dots B_n) - SA\}$ 質量欠損標識についての全体的な合成スキームを概説する。このスキームでは、5-ブロモ-3-ピリジル酢酸（Lancaster, Cat # 13579）を、最初に、水を除去した酸触媒の存在下でのエタノールとの反応によってエチルエステルに転換させる。次いで、得られたエステルを、エタノール中のナトリウムエトキシドの塩基性溶液中での元素性臭素との反応によって臭素化する。次いで、臭素化した炭素を、リチウムジ-（プロモアセトアルデヒドジメチルアセタール）銅塩と、無水有機溶媒（例えば、テトラヒドロフラン）中で選択的に反応させる。このリチウムジ-（プロモアセトアルデヒドジメチルアセタール）銅塩は、市販のプロモアセトアルデヒドジメチルアセタール（Aldrich, Cat # 242500）をリチウムと反応させて、有機リチウム種を形成し、このリチウム種を、 $Cu(II)I$ との反応によって銅塩（cuprate）に転換することによって調製される。得られた産物を、酸水溶液で処理して、アセタール部分を除去し、そしてエステルを加水分解して遊離の酸に戻す。遊離のアルデヒドを、標準的な酸化剤（例えば、 $Ag^+$ ）によって対応するカルボン酸へと酸化させ、そして合成を、所望される無水コハク酸誘導体を形成するように、2つの生成されたカルボン酸基の環化および脱水によって完了する。

20

30

#### 【0261】

##### 実施例17

この実施例は、DNA配列決定適用での質量欠損標識の使用を説明する。示したスキーム（図19）は、Sangerの方法を使用する例示的な配列決定技術を示す；しかし、同様の方法論を、当業者に公知のMazam-Gilbertのような他のDNA配列決定戦略あるいはPCRまたは他の戦略に対して適応することが可能である。

#### 【0262】

簡潔には、クローニングした未知のDNA配列（例えば、 $d(GTTACAGGAAAT)$ ）を保持するM13プラスミドを、最初に、M13複製起点プライマー（ $d(AGTCACGACGACGTTGT)rA$ ）とハイブリダイズさせる。このプライマーは、その3'末端をrAで標識して、そのプライマーを、RNAse（Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa）によって選択的に切断可能にする。反応容量を半分に分け、そして2つのチューブに移す。一方のチューブには、ポリメラーゼ、dNTP、dGTP、ならびに質量欠損標識したddATP\*（図20aを参照のこと）およびddGTP\*（図20bを参照のこと）を添加する。他方のチューブには、ポリメラーゼ、dNTP、ならびに質量欠損標識したddTTP\*（図20cを参照のこと）およびddCTP\*（図20dを参照のこと）を添加する。図20に示す改変されたddNTPは、例示的であり、そして標準的な手順に従って調製される（Kricka, L. J., NONISOTOPIC DNA PROBE

40

50

TECHNIQUES, Academic Press, New York (1992); Keller, G. H. および Manak, M. M., DNA PROBES, Stockton, New York (1989) を参照のこと)。質量欠損標識部分で誘導体化され、そして種々の長さおよび/または組成を有する多くの種類の架橋剤によって分離されたプリン塩基およびピリミジン塩基を含む、多くの他の改変された ddNTP が有用である。DNA の複製および鎖伸長を、37 °C でのインキュベーションによって開始する。質量のラダーが、ddNTP での鎖終結によって生成される。反応終了時での変性および RNase での切断工程は、テンプレートからその鎖終結産物を取り外し、そしてプライマーを遊離させ、このプライマーは、ハイブリダイゼーションによって選択的に除去され得る。DNA フラグメントを質量分析計に適合する緩衝液中に溶解させ、そして陰イオンモードで ESI-TOF 質量分析計中に流す。各々のフラグメントについての一連の多価イオンに対応するピークを、機器の製造業者 (Applied Biosystems) によって供給される標準的なアルゴリズムを使用してデコンボリュートし、ゼロ価の質量のみを含むスペクトルを作成する。その後、このゼロ価のスペクトルをまた、機器供給元のアルゴリズムを使用して、中心軌跡をとる (centroid)。

10

## 【0263】

質量スペクトルデータを以下のように分析する。ddA\* および ddG\* を含有するサンプル由来のスペクトルをデコンボリュートし、そして化学的ノイズを排除して、組み込まれた臭素元素またはヨウ素元素を有するピークのみを残す (図 21)。ddT\* および ddC\* を含有するサンプル由来のスペクトルを、同様に処理する (図 22)。両方のデコンボリュートしたスペクトルを考慮して、最も高い質量フラグメントを、ddA\* / ddG\* スペクトルにおいて見出す (4114.733) (図 21)。このフラグメントはまた、同位体対が存在しない場合には、ヨウ素質量元素を含むフラグメントとして同定され得；従って、「未知」の配列の最後のヌクレオチドは、A である。次に低い質量を有する質量フラグメントは、3695.611 および 3697.609 の二重線であり、これは、ddT\* / ddC\* スペクトルにおいて見出される (図 22)。この二重線は、臭素元素の組み込みを示し、そして従って、その配列中の次のヌクレオチドは、T である。このプロセスを、最後のピーク (この場合、ddT\* / ddC\* スペクトル中の 748.1850) の一本のピーク、従って、これは、C に対応する) が見出されるまで、繰り返す。このように、配列 ATTCCTGTAAC を決定し、そして反転させそしてヌクレオチド相補体を置換すると、「未知」の配列 GTTACAGGAAT が、決定される。

20

30

## 【0264】

この実施例では、本発明の本明細書中で、約 4000 MW の DNA セグメントが配列決定される。1 つの質量欠損元素を組み込む質量欠損種を識別する能力は、5000 を超える質量では低下するので、本明細書中に提示した例よりも大きい DNA セグメントは、終結 ddNTP においてより多くの質量欠損元素を使用することによってか、あるいは、「ローリングプライマー」の方法を使用することによって、配列決定され得る。「ローリングプライマー」方法では、配列決定される所望の DNA のより短いセグメントを、上記の手順を使用して得、そして新しいプライマーを、その推定配列から作製して、そのより大きな DNA 鎖に沿って配列決定を継続する。最後に、このより短いフラグメントを、末端と末端に配置して、その未知 DNA の配列を明らかにする。

40

## 【0265】

## 実施例 18

この実施例では、本発明者らは、ウシユビキチン (Sigma-Aldrich) を配列決定するために質量欠損標識 (5-Br-3-PAA) を使用する。ユビキチンを、タンパク質標識工程を 100% のアセトニトリル中に行ったことを除いて、ミオグロビンについて実施例 7 で記載したものと同一手順によって標識した。標識されたユビキチンサンプルを調製し、そして実施例 8 に記載する ESI-TOF 質量分析計に導入した。得られた質量スペクトルをデコンボリュートし、そして実施例 10 に記載するように配列決定した。

50

## 【0266】

真のコピキチンのN末端配列(MQIFVK、GenBankから入手した)を、「シーケンサー」を2個、3個および4個の残基に対して実行して、正確に決定した。正確な配列を、1番目の残基での19個の競合する可能性から2番目にランク付けされた。正確な配列はまた、5番目の残基で2番目に(MQIFRに次いで)にランク付けされた。

## 【0267】

本明細書中に記載する実施例および実施形態は、単に例示目的のためのものであり、そしてそれを考慮した種々の改変または変更が、当業者に対して示唆され、そして本出願および添付の特許請求の範囲の精神および範囲内に含まれることが理解される。本明細書中で引用される全ての刊行物、特許および特許出願が、全ての目的のためにそれらの全体において本明細書中で参考として援用される。

10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0268】

【図1】図1は、PE Biosystems Mariner質量分析計での325Vのノズル電位の高度なフラグメント化条件で行われた、グリコーゲンホスホリラーゼの質量スペクトルを示す。

【図2】図2は、グリコーゲンホスホリラーゼの質量スペクトル(図1)の、いくつかの20amu区画にわたって約1amuの間隔で観察される周期的なピークのパターンを示す。

【図3】図3は、50~550amuの範囲の325Vでのグリコーゲンホスホリラーゼフラグメント化データについての、1amuの間隔での全MSピークの重ね合わせを示す。

20

【図4】図4は、同位体質量数の関数として、周期表の元素についての核結合エネルギーを示す。

【図5】図5は、少なくとも1つの臭素置換基を有する多数の標識部分の構造を示す。

【図6】図6は、少なくとも1つのヨウ素置換基を有する多数の標識部分の構造を示す。

【図7】図7は、実施例1に提供される方法を使用して配列決定され得る、高マンノース型オリゴサッカライドの構造を提供する。

【図8-1】図8Aは、標識1で標識された高マンノース型オリゴサッカライド消化物についての、デコンボリュートした質量欠損スペクトルを示す。図8Bは、標識2で標識された高マンノース型オリゴサッカライド消化物についての、デコンボリュートした質量欠損スペクトルを示す。図8Cは、標識3で標識された高マンノース型オリゴサッカライド消化物についての、デコンボリュートした質量欠損スペクトルを示す。

30

【図8-2】図8Aは、標識1で標識された高マンノース型オリゴサッカライド消化物についての、デコンボリュートした質量欠損スペクトルを示す。図8Bは、標識2で標識された高マンノース型オリゴサッカライド消化物についての、デコンボリュートした質量欠損スペクトルを示す。図8Cは、標識3で標識された高マンノース型オリゴサッカライド消化物についての、デコンボリュートした質量欠損スペクトルを示す。

【図8-3】図8Aは、標識1で標識された高マンノース型オリゴサッカライド消化物についての、デコンボリュートした質量欠損スペクトルを示す。図8Bは、標識2で標識された高マンノース型オリゴサッカライド消化物についての、デコンボリュートした質量欠損スペクトルを示す。図8Cは、標識3で標識された高マンノース型オリゴサッカライド消化物についての、デコンボリュートした質量欠損スペクトルを示す。

40

【図9】図9は、標識1および標識2で標識された脂質についての、デコンボリュートした質量欠損スペクトルを示す(実施例2を参照のこと)。

【図10】図10は、Brが標識の残部へアミノ酸(R)を通じて連結される質量欠損元素である、光切断が可能な質量欠損標識についての一般的な構造を示す。

【図11-1】図11Aは、光浄化型(photo cleared)質量欠損の、デコンボリュートした質量欠損スペクトルを示す。図11Bは、光浄化型一同位体(mono-isotopic)質量欠損タグの、タグ臭素同位体分解スペクトルを示す。図11C

50

は、同位体分解質量スペクトルを示す。

【図11-2】図11Aは、光浄化型 (photo cleared) 質量欠損の、デコンボリュートした質量欠損スペクトルを示す。図11Bは、光浄化型一同位体 (mono-isotopic) 質量欠損タグの、タグ臭素同位体分解スペクトルを示す。図11Cは、同位体分解質量スペクトルを示す。

【図11-3】図11Aは、光浄化型 (photo cleared) 質量欠損の、デコンボリュートした質量欠損スペクトルを示す。図11Bは、光浄化型一同位体 (mono-isotopic) 質量欠損タグの、タグ臭素同位体分解スペクトルを示す。図11Cは、同位体分解質量スペクトルを示す。

【図12-1】図12Aは、質量スペクトルの他の化学的ノイズからのb-イオンフラグメントの分解を示す。図12Bは、質量スペクトルの他の化学的ノイズからのa-イオンフラグメントの分解を示す。図12Cは、質量スペクトルの他の化学的ノイズからのd-イオンフラグメントの分解を示す。

10

【図12-2】図12Aは、質量スペクトルの他の化学的ノイズからのb-イオンフラグメントの分解を示す。図12Bは、質量スペクトルの他の化学的ノイズからのa-イオンフラグメントの分解を示す。図12Cは、質量スペクトルの他の化学的ノイズからのd-イオンフラグメントの分解を示す。

【図12-3】図12Aは、質量スペクトルの他の化学的ノイズからのb-イオンフラグメントの分解を示す。図12Bは、質量スペクトルの他の化学的ノイズからのa-イオンフラグメントの分解を示す。図12Cは、質量スペクトルの他の化学的ノイズからのd-イオンフラグメントの分解を示す。

20

【図13-1】図13Aは、標識の一価 (single-charged) のbイオンの質量に対応する、周期的なノイズによってシフトさせられる臭素同位体対の二重ピーク (doublet) を示す。図13Bは、標識されたミオグロビンのN末端の一価のb1イオンの質量に対応する周期的なノイズによってシフトさせられる臭素同位体対の二重ピークを示す。

【図13-2】図13Aは、標識の一価 (single-charged) のbイオンの質量に対応する、周期的なノイズによってシフトさせられる臭素同位体対の二重ピーク (doublet) を示す。図13Bは、標識されたミオグロビンのN末端の一価のb1イオンの質量に対応する周期的なノイズによってシフトさせられる臭素同位体対の二重ピークを示す。

30

【図14-1】図14Aおよび図14Bは、一価のa<sub>1</sub>イオンに対応している周期的な種によってシフトさせられる、臭素同位体対の二重ピークを示す。

【図14-2】図14Aおよび図14Bは、一価のa<sub>1</sub>イオンに対応している周期的な種によってシフトさせられる、臭素同位体対の二重ピークを示す。

【図15-1】図15Aおよび図15Bは、一価のd<sub>a2</sub>イオンに対応している周期的な種によってシフトさせられた、臭素同位体対の二重ピークを示す。

【図15-2】図15Aおよび図15Bは、一価のd<sub>a2</sub>イオンに対応している周期的な種によってシフトさせられた、臭素同位体対の二重ピークを示す。

【図16】図16は、ESI-TOF質量分析計でインソースでフラグメント化された、5-Br-3-PAA標識ミオグロビンの生の、ベースラインを設定された、および因子質量スペクトルを示す。

40

【図17】図17は、5-Br-3-PAA標識ミオグロビン中の最初の5残基の配列を決定するための、「配列決定装置」コードの使用の結果を示す。

【図18A】図18は、イオン化が可能な基 (A<sub>1</sub> . . . A<sub>n</sub>)、質量欠損元素 (B<sub>1</sub> . . . B<sub>n</sub>)、およびコア無水コハク酸反応性部分 (SA) の組み合わせを含有する質量欠損標識についての一般式 (図18a)、ならびに { (A<sub>1</sub> . . . A<sub>n</sub>) - (B<sub>1</sub> . . . B<sub>n</sub>) - SA } 質量欠損標識についての全体の合成スキーム (図18b) を示す。

【図18B】図18は、イオン化が可能な基 (A<sub>1</sub> . . . A<sub>n</sub>)、質量欠損元素 (B<sub>1</sub> . . . B<sub>n</sub>)、およびコア無水コハク酸反応性部分 (SA) の組み合わせを含有する質

50

量欠損標識についての一般式（図18a）、ならびに $\{ (A_1 \dots A_n) - (B_1 \dots B_n) - SA \}$ 質量欠損標識についての全体の合成スキーム（図18b）を示す。

【図19】図19は、本明細書中で提供される標識ストラテジーと組み合わせて、Sangerによって記載された方法を使用する例示的な配列決定技術を説明する。

【図20】図20は、本明細書中に提供される配列決定方法において使用され得る、標識された塩基を示す。

【図21】図21は、 $ddA^* / ddG^*$ 質量スペクトルを示す（実施例18を参照のこと）。

【図22】図22は、 $ddT^* / ddC^*$ 質量スペクトルを示す（実施例18を参照のこと）。（配列表）

【表 1】

## SEQUENCE LISTING

<110> Schneider, Luke V. Hall, Michael P. Petesch, Robert Target Discovery, Inc.	
<120> Mass Defect Labeling for the Determination of Oligomer Sequences	
<130> 020444-000710PC	10
<140> PCT/US01/49951	
<141> 2001-10-19	
<150> US 60/242,165	
<151> 2000-10-19	
<150> US 60/242,398	
<151> 2000-10-19	
<160> 13	
<170> PatentIn Ver. 2.1	
<210> 1	20
<211> 6	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence:true N-terminal horse apomyoglobin (Myo) sequence	
<220>	
<221> MOD_RES	
<222> (1)	
<223> Xaa = Gly labeled with 5-bromo-3-pyridylacetic acid (5-Br-3-PAA)	30
<400> 1	
Xaa Leu Ser Asp Gly Glu	
1 5	
<210> 2	
<211> 5	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence:competing 5 residue false sequence, top ranked sequence at five residues	40
<220>	
<221> MOD_RES	
<222> (1)	
<223> Xaa = Gly labeled with 5-bromo-3-pyridylacetic acid (5-Br-3-PAA)	

## 【表 2】

<400> 2 Xaa Leu Ser Asp Trp 1 5		
<210> 3 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence:sequence carrying cloned unknown DNA sequence		10
<400> 3 tcagtgtgctgc tgcaacatgt tacaggaat	30	
<210> 4 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <221> modified_base <222> (1) <223> n = ribosyl adenosine		20
<220> <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:M13 origin of replication primer labeled at the 5' end with ribosyl adenosine		
<220> <223> Description of Artificial Sequence:M13 origin of replication primer labeled at the 5' end with ribosyl adenosine		
<400> 4 ntggtgcagc agcactga	18	30
<210> 5 <211> 12 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Description of Artificial Sequence:DNA fragment from mass ladder produced by chain termination		
<400> 5 caatgtcctt ta	12	40
<210> 6 <211> 11 <212> DNA <213> Artificial Sequence		



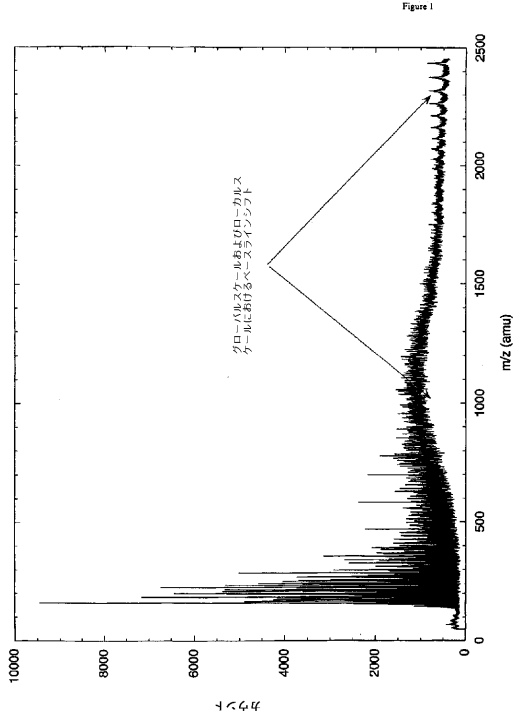
## 【表 3】

<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:DNA fragment from mass ladder produced by chain termination		
<400> 6 caatgtcctt t	11	
<210> 7 <211> 10 <212> DNA <213> Artificial Sequence		10
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:DNA fragment from mass ladder produced by chain termination		
<400> 7 caatgtcctt	10	
<210> 8 <211> 5 <212> PRT <213> Artificial Sequence		20
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:competing 5 residue false sequence, top ranked sequence at five residues		
<400> 8 Gly Leu Ser Asp Trp 1 5		
<210> 9 <211> 6 <212> PRT <213> Artificial Sequence		30
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:true N-terminal horse apomyoglobin (Myo) sequence		
<400> 9 Gly Leu Ser Asp Gly Glu 1 5		
<210> 10 <211> 12 <212> DNA <213> Artificial Sequence		40
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:cloned unknown DNA sequence		
<400> 10 gttacaggaa at	12	

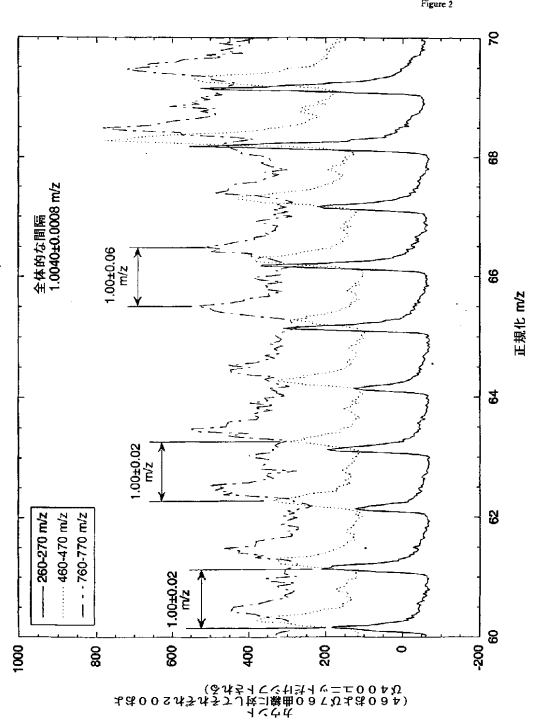
## 【表 4】

<210> 11		
<211> 12		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:sequence determined from mass spectral data analysis		
<400> 11		
atttcctgta ac	12	10
<210> 12		
<211> 6		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:true ubiquitin N-terminal sequence		
<400> 12		
Met Gln Ile Phe Val Lys		
1 5		20
<210> 13		
<211> 5		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:first ranked competing possibility at fifth residue		
<400> 13		
Met Gln Ile Phe Arg		
1 5		30
		40

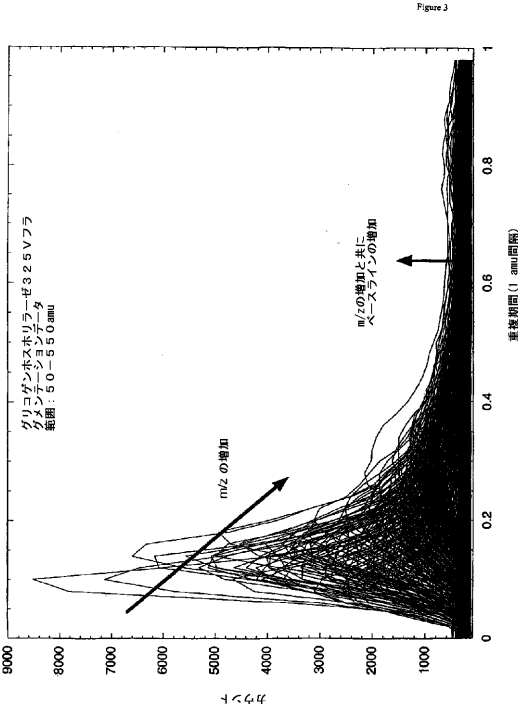
【 図 1 】



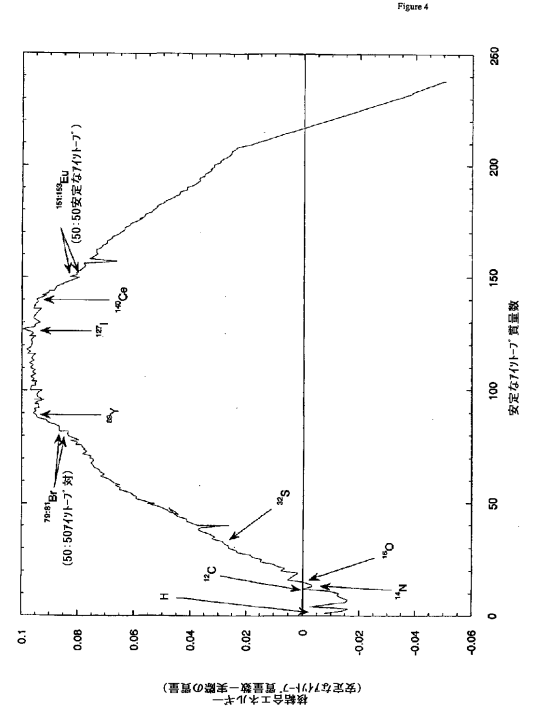
【 図 2 】



【 図 3 】

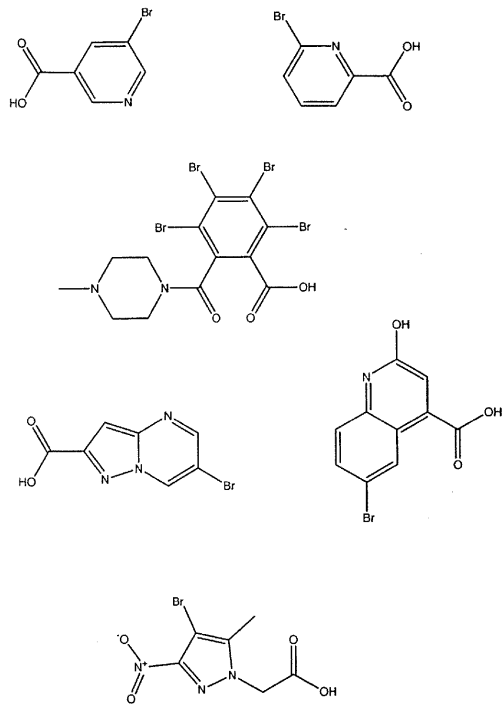


【 図 4 】



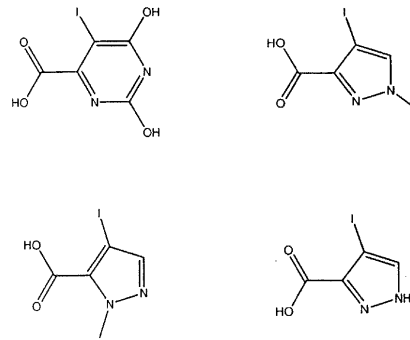
【 図 5 】

Figure 5



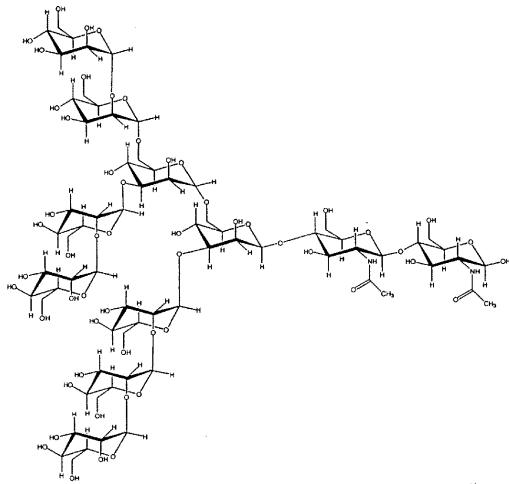
【 図 6 】

Figure 6



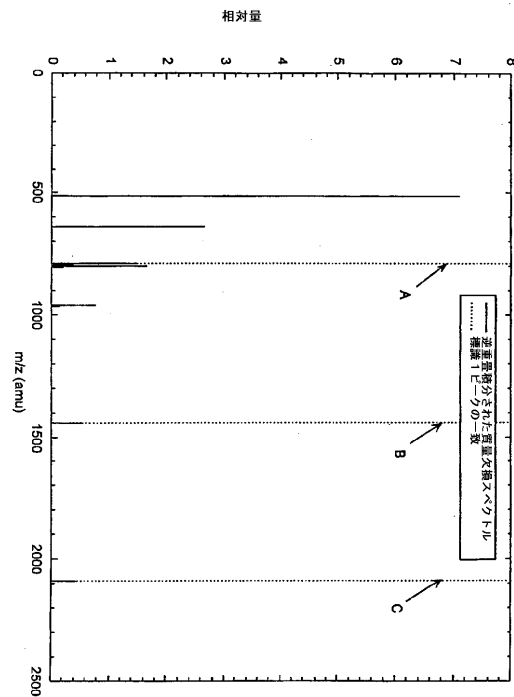
【 図 7 】

Figure 7



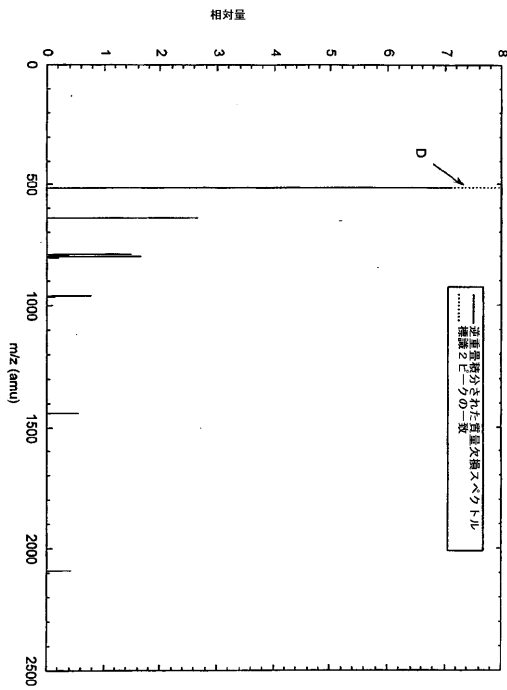
【 図 8 - 1 】

Figure 8A



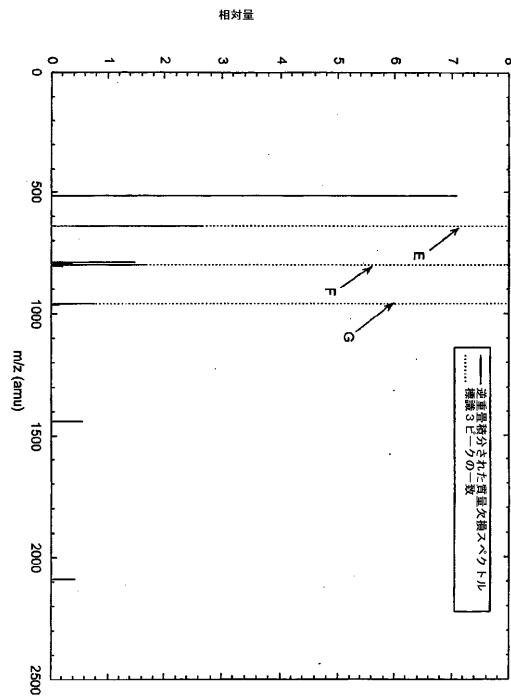
【 8 - 2 】

Figure 8B



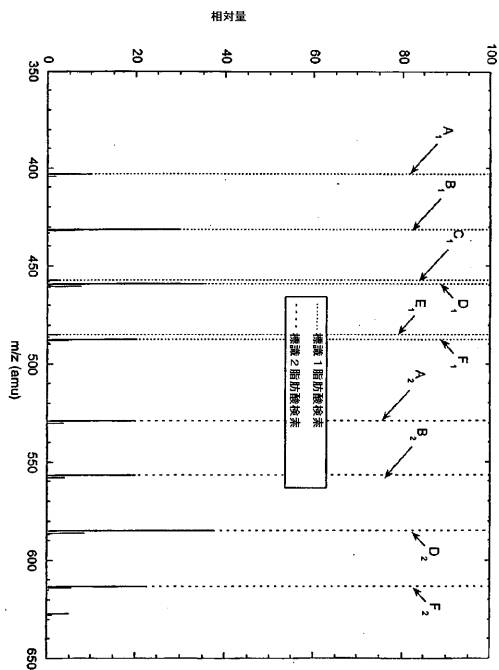
【 8 - 3 】

Figure 8C



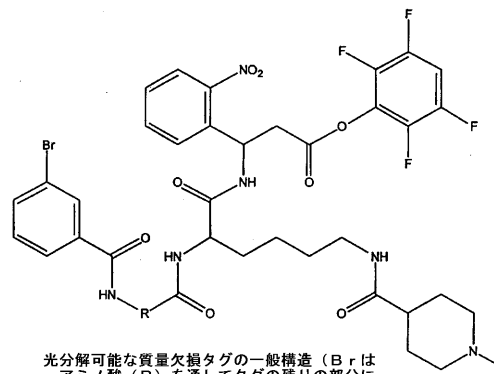
【 9 】

Figure 9



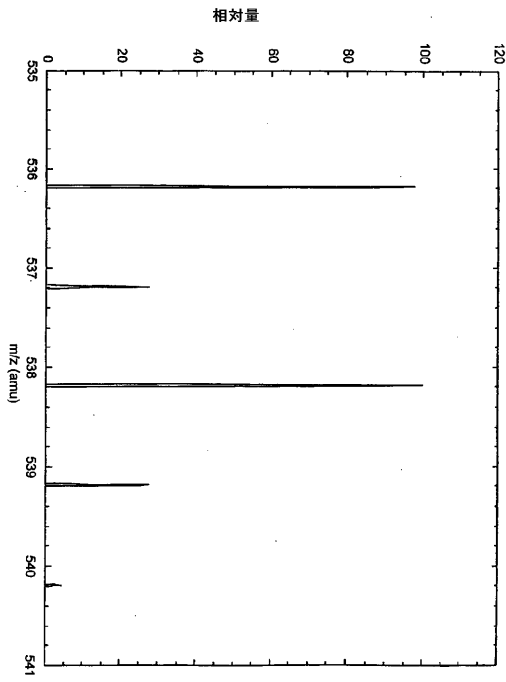
【 10 】

Figure 10



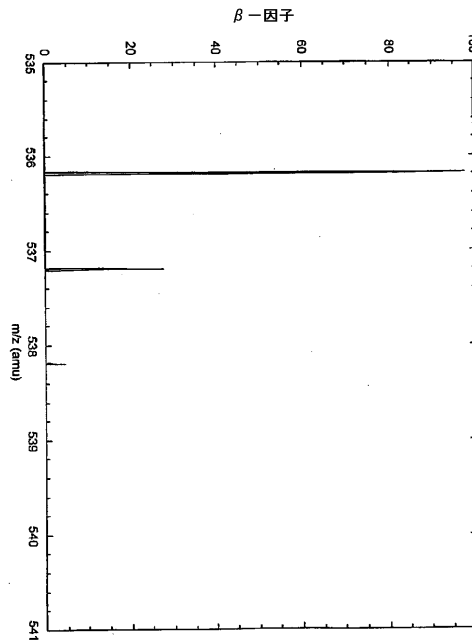
【 1 1 - 1 】

Figure 11A



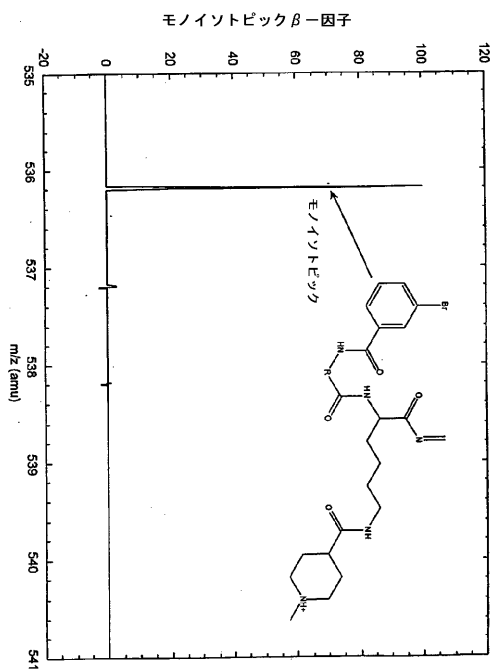
【 1 1 - 2 】

Figure 11B



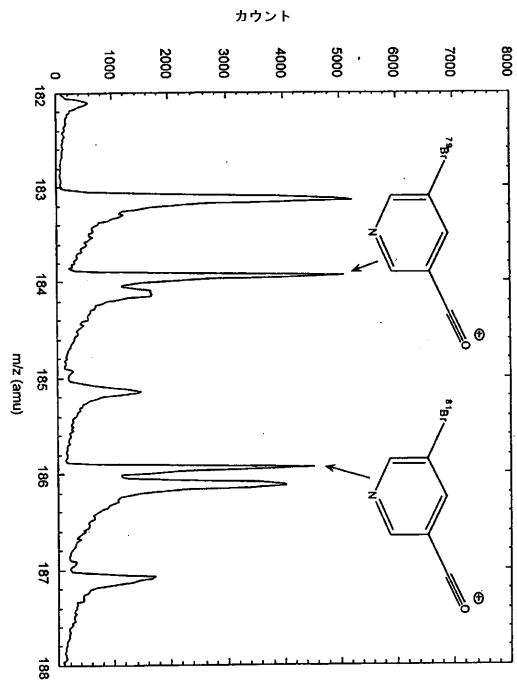
【 1 1 - 3 】

Figure 11C



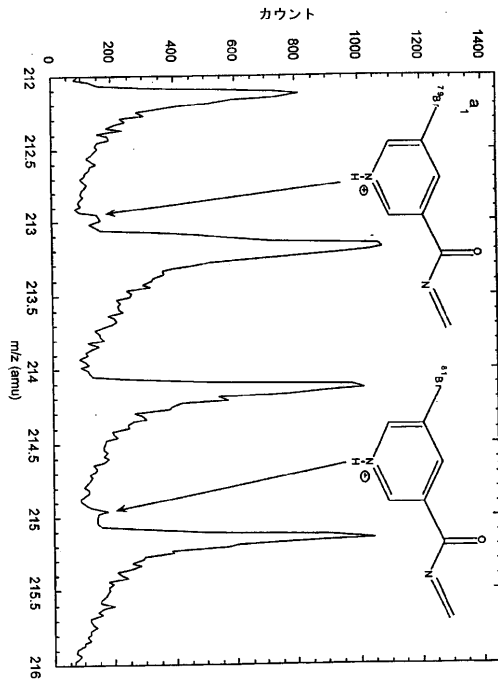
【 1 2 - 1 】

Figure 12A



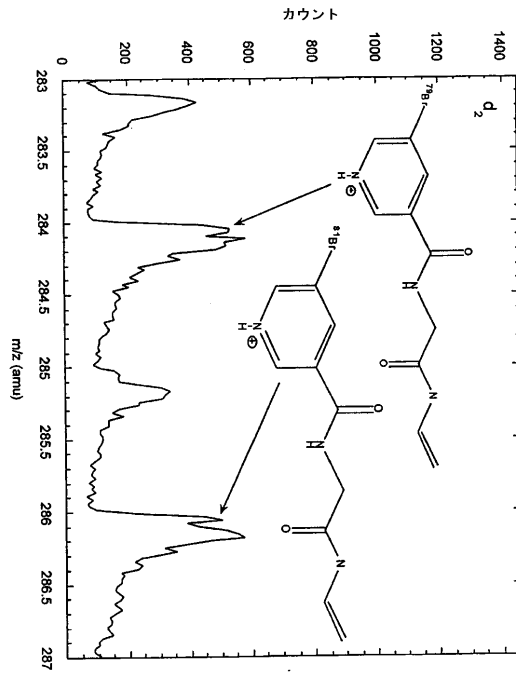
【 1 2 - 2 】

Figure 12B



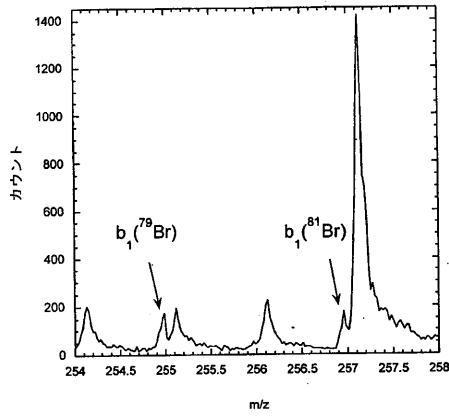
【 1 2 - 3 】

Figure 12C



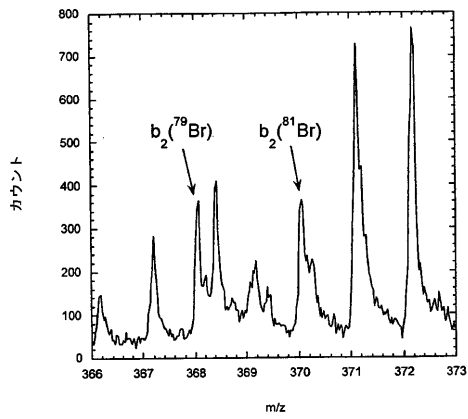
【 1 3 - 1 】

FIGURE 13A

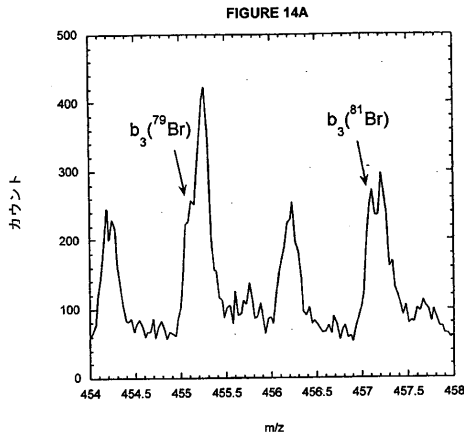


【 1 3 - 2 】

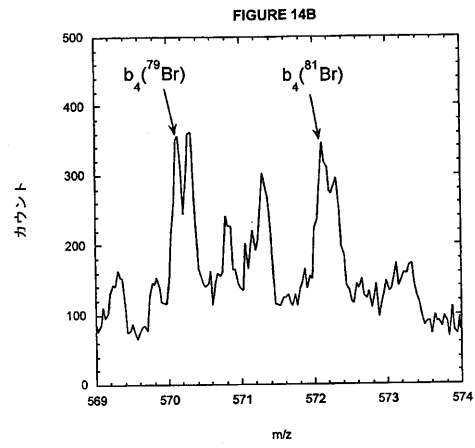
FIGURE 13B



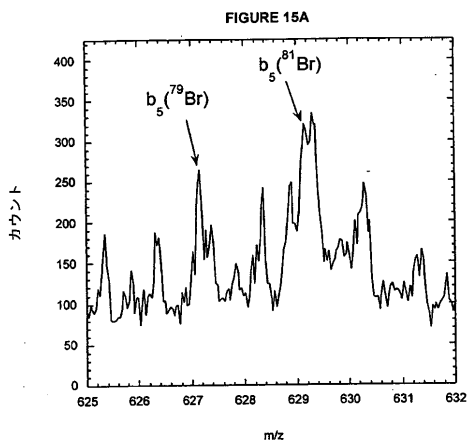
【 図 14 - 1 】



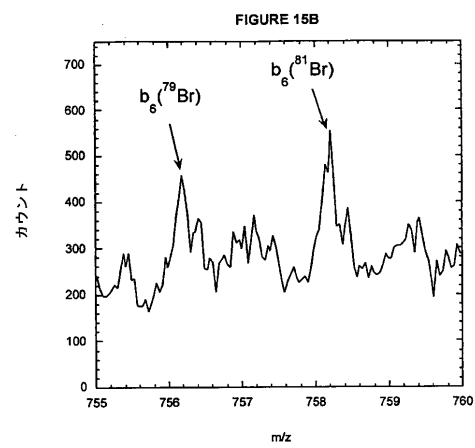
【 図 14 - 2 】



【 図 15 - 1 】



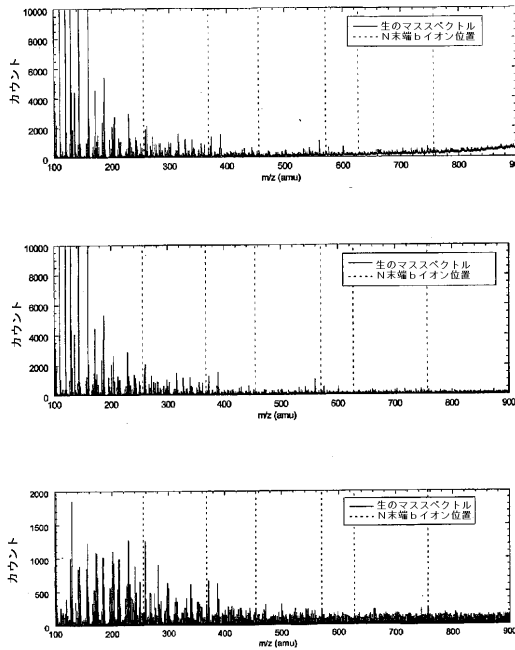
【 図 15 - 2 】





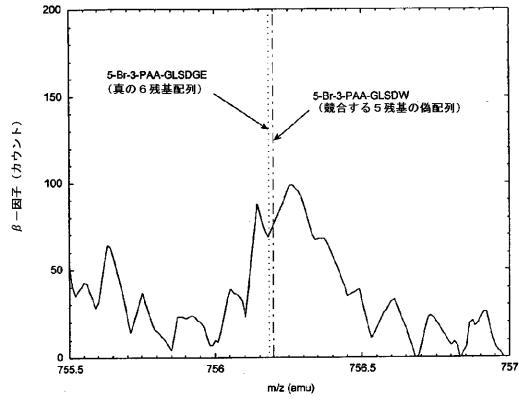
【 図 16 】

Figure 16



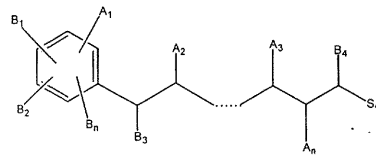
【 図 17 】

Figure 17



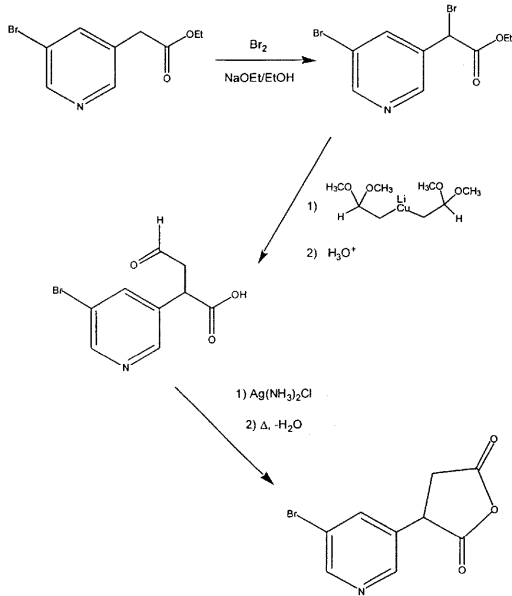
【 図 18 A 】

Figure 18A



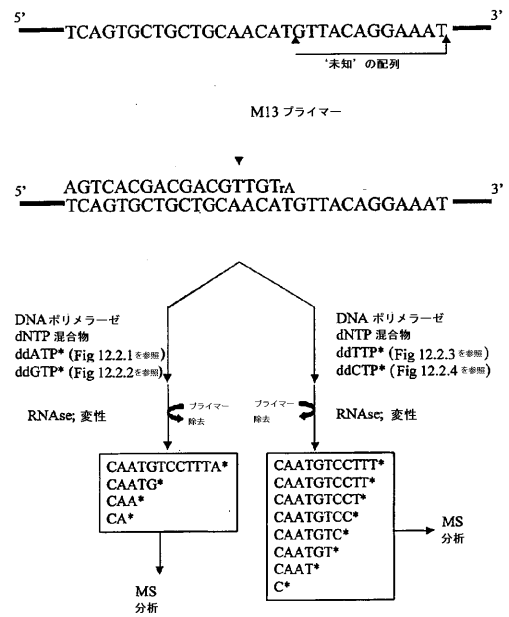
【 図 18 B 】

Figure 18B



【 図 19 】

Figure 19



【 20 】

Figure 20A

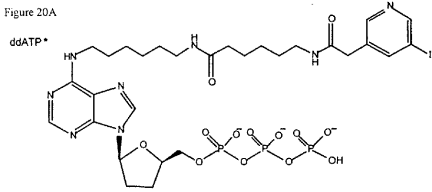


Figure 20B

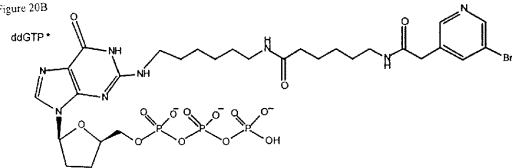


Figure 20C

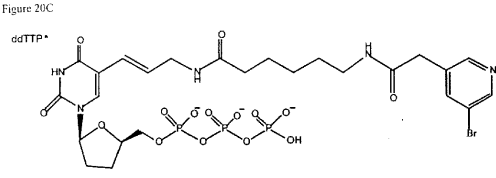
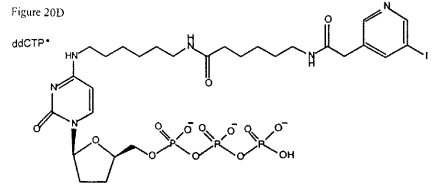
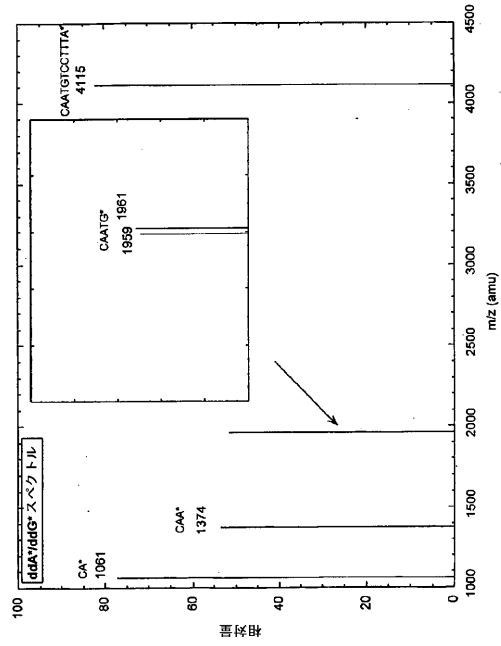


Figure 20D



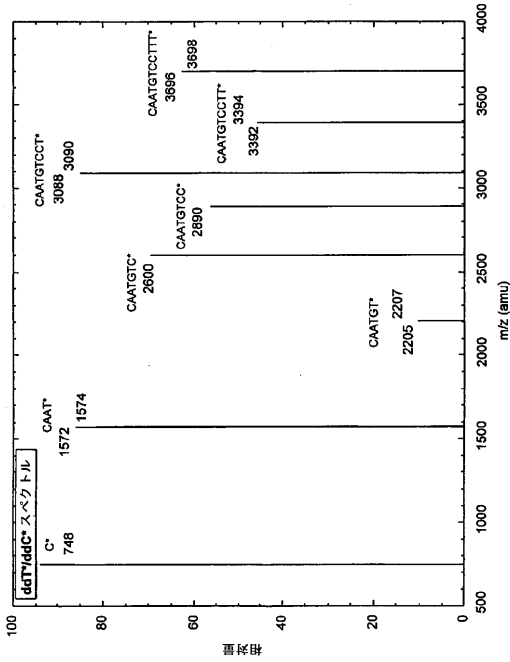
【 21 】

Figure 21



【 22 】

Figure 22



## フロントページの続き

- (72)発明者 ルーク ブイ . シュナイダー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94019, ハーフ ムーン ベイ, ワン ジョンソン  
ピアー, シー - 30
- (72)発明者 マイケル ピー . ホール  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, ローレル ストリート 1  
364, ナンバー11
- (72)発明者 ロバート ペテッシュ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94560, ニューアーク, ロバートソン アベニュー  
6004

審査官 島田 英昭

- (56)参考文献 国際公開第02/061661(WO, A2)  
国際公開第00/002893(WO, A1)  
国際公開第98/031830(WO, A1)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N27/62 - 27/70  
H01J49/00 - 49/48  
C40B20/04  
C40B30/10