

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-76403

(P2008-76403A)

(43) 公開日 平成20年4月3日(2008.4.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 27/62 (2006.01)	G O 1 N 27/62 V	2 G O 4 1
	G O 1 N 27/62 X	
	G O 1 N 27/62 D	
	G O 1 N 27/62 K	
	G O 1 N 27/62 L	
審査請求 有 請求項の数 29 O L (全 86 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-265544 (P2007-265544)
 (22) 出願日 平成19年10月11日 (2007.10.11)
 (62) 分割の表示 特願2003-555211 (P2003-555211)
 の分割
 原出願日 平成14年12月9日 (2002.12.9)
 (31) 優先権主張番号 60/340,460
 (32) 優先日 平成13年12月8日 (2001.12.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/364,847
 (32) 優先日 平成14年3月14日 (2002.3.14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. WINDOWS

(71) 出願人 504142097
 マイクロマス ユーケー リミテッド
 イギリス、エム23 9エルズイー、マン
 チェスター、ウィゼンショー、フローズ
 ロード
 (74) 代理人 110000040
 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ
 (72) 発明者 ジェロマノス、スコット
 アメリカ合衆国、07748 ニュージャ
 ーシー州、ミドルタウン、クレスト ロー
 ド 2

最終頁に続く

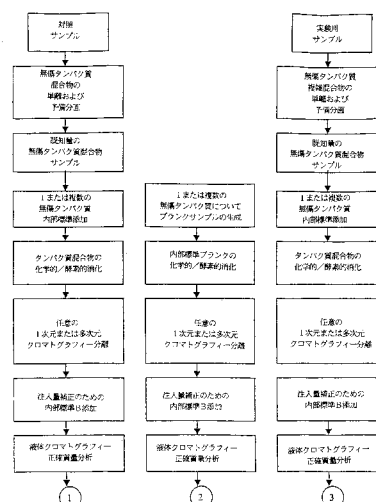
(54) 【発明の名称】 マススペクトル測定方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】生物由来分子のマススペクトル測定による同定方法。

【解決手段】分子は、前記分子について正確に同定した質量対電荷比、および、溶出時間または荷電状態等の、少なくとも1つのさらなる物理化学的性質に基づき同定する。さらなる物理化学的性質を用いても良い。実験的に決定した正確質量および物理化学的性質は、続いて、情報の参照用テーブルにより比較することができる。前記参照用テーブルは、生成されても良く、または、公知のデータベース中のデータにおける物理化学的性質を計算しても良い。2の異なるサンプル中における同じ分子を認識し、および好ましくは同定する能力は、特定の生物学的分子が、対照サンプルと比較して実験用サンプル内で異なるように発現されているかどうか、決定するために用いても良い。

【選択図】図1A



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

第 1 の生物由来分子混合物を含む第 1 のサンプルを準備する工程、

前記第 1 の混合物中における第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 1 の物理化学的性質を測定する工程、

前記第 1 の混合物中における第 1 の分子の質量を分析し、そして、前記第 1 の混合物中における第 1 の分子の質量対電荷比を正確に決定する工程、

第 2 の生物由来分子混合物を含む第 2 のサンプルを準備する工程、

前記第 2 の混合物中における第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 1 の物理化学的性質を測定する工程、

前記第 2 の混合物中における第 1 の分子の質量を分析し、そして、前記第 2 の混合物中における第 1 の分子の質量対電荷比を正確に決定する工程、

および、

前記第 1 の混合物中における第 1 の分子の強度と前記第 2 の混合物中における第 1 の分子の強度とを決定する工程を含み、

前記第 1 の混合物中における第 1 の分子と前記第 2 の混合物中における第 1 の分子とは、実質的に等しい質量対電荷比を有し、かつ、実質的に等しい前記第 1 の物理化学的性質を有すると決定されたものである、

マスペクトル測定方法。

【請求項 2】

前記第 1 の混合物および / または前記第 2 の混合物が、複数の異なるバイオポリマー、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、アミノ酸、炭水化物、糖、脂質、脂肪酸、ビタミン、ホルモン、DNA の一部もしくは断片、cDNA の一部もしくは断片、RNA の一部もしくは断片、mRNA の一部もしくは断片、tRNA の一部もしくは断片、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、リボヌクレアーゼ、酵素、代謝産物、ポリサッカライド、リン酸化ペプチド、リン酸化タンパク質、グリコペプチド、グリコプロテインまたはステロイドを含む、請求項 1 に記載のマスペクトル測定方法。

【請求項 3】

前記第 1 の混合物および / または前記第 2 の混合物が、異なる特性を有する、少なくとも 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, または 5000 の分子を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 1 の混合物および / または前記第 2 の混合物が、非等モルの不均一複雑混合物 (heterogeneous complex mixture) を含む、請求項 1、2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子の質量対電荷比、および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の質量対電荷比を、20 ppm, 19 ppm, 18 ppm, 17 ppm, 16 ppm, 15 ppm, 14 ppm, 13 ppm, 12 ppm, 11 ppm, 10 ppm, 9 ppm, 8 ppm, 7 ppm, 6 ppm, 5 ppm, 4 ppm, 3 ppm, 2 ppm, 1 ppm または <1 ppm までの範囲で決定する、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子の質量対電荷比、および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の質量対電荷比を、15-20 ppm, 10-15 ppm, 5-10 ppm または 1-5 ppm までの範囲で決定する、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子の質量対電荷比、および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の質量対電荷比を、0.01 マスユニット, 0.009 マスユニット, 0.008 マスユニット, 0.007 マスユニット, 0.006 マスユニット, 0.005 マスユニット, 0.004 マスユニット, 0.003 マスユニット, 0.002 マスユニット, 0.001 マス

10

20

30

40

50

ユニット または <0.001 マスユニットまでの範囲で決定する、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

下記工程のうち少なくとも 1 つをさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

- (i) 前記第 1 の混合物中における第 1 の分子の強度を、前記第 1 の混合物中における第 2 の分子の強度と比較する工程；
- (ii) 前記第 1 の混合物中における第 1 の分子の強度を、前記第 2 の混合物中における第 1 の分子の強度と比較する工程；
- (iii) 前記第 1 の混合物中における第 2 の分子の強度を、前記第 2 の混合物中における第 2 の分子の強度と比較する工程；
- (iv) 前記第 2 の混合物中における第 1 の分子の強度を、前記第 2 の混合物中における第 2 の分子の強度と比較する工程；および
- (v) (a) 前記第 1 の混合物中における第 1 の分子の強度と前記第 2 の混合物中における第 1 の分子の強度との比を、(b) 前記第 1 の混合物中における第 2 の分子の強度と前記第 2 の混合物中における第 2 の分子の強度との比と比較する工程。

10

【請求項 9】

前記第 1 の混合物中における第 2 の分子が、実質的に、前記第 2 の混合物中における第 2 の分子と同じである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記第 2 の分子が、前記第 1 および第 2 の混合物に対して、内因性(endogenous)または外因性(exogenous)である、請求項 8 または 9 に記載の方法。

20

【請求項 11】

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 2 の物理化学的性質を測定する工程をさらに含み、かつ、前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子が、実質的に等しい前記第 2 の物理化学的性質を有すると決定する、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 3 の物理化学的性質を測定する工程をさらに含み、かつ、前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子が、実質的に等しい前記第 3 の物理化学的性質を有すると決定する、請求項 11 に記載の方法。

30

【請求項 13】

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 4 の物理化学的性質を測定する工程をさらに含み、かつ、前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子が、実質的に等しい前記第 4 の物理化学的性質を有すると決定する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 5 のまたはさらなる物理化学的性質を測定する工程をさらに含み、かつ、前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子が、実質的に等しい前記第 5 のまたはさらなる物理化学的性質を有すると決定する、請求項 13 に記載の方法。

40

【請求項 15】

前記第 1 のおよび / または前記第 2 のおよび / または前記第 3 のおよび / または前記第 4 のおよび / または前記第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質が、(i) 溶出時間(elution time)、疎水性、親水性、移動時間(migration time)、またはクロマトグラフィー保持時間(chromatographic retention time); (ii) 溶解度; (iii) 分子体積またはサイズ; (

50

iv) 正味電荷(net charge)、荷電状態(charge state)、イオン電荷または複合的な実測荷電状態; (v) 等電点(pl); (vi) 解離定数(pKa); (vii) 抗体親和力; (viii) 電気泳動移動度; (ix) イオン化ポテンシャル; (x) 双極子モーメント; (xi) 水素結合可能性(hydrogen-bonding capability) または水素結合能力(hydrogen-bonding capacity); および (xii) 気相中におけるイオン移動度(ion mobility)からなる群から選択される、請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子の質量対電荷比および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の質量対電荷比を、(i) フーリエ変換("FT")質量分析計; (ii) フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴("FTICR")質量分析計; (iii) 飛行時間("TOF")質量分析計; (iv) 直交加速式(orthogonal acceleration)飛行時間("oaTOF")質量分析計; (v) 磁気セクタ質量分析計; (vi) 四重極質量分析装置(quadrupole mass analyser); (vii) イオントラップ質量分析装置; および(viii) フーリエ変換オービトラップ(orbitrap)、静電氣的イオンサイクロトロン共鳴質量分析計または静電氣的フーリエ変換質量分析計のいずれかにより質量分析する、請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 17】

(i) 前記第 1 のサンプルを病気に罹った生物から採取し、かつ、前記第 2 のサンプルを病気に罹っていない生物から採取するか;

(ii) 前記第 1 のサンプルを治療した生物から採取し、かつ、前記第 2 のサンプルを治療していない生物から採取するか; または

20

(iii) 前記第 1 のサンプルを変異体の生物から採取し、かつ、前記第 2 のサンプルを野生型の生物から採取する、請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子を同定する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

1 またはそれ以上のさらなる生物由来分子混合物を含む 1 またはそれ以上のさらなるサンプルを準備する工程、

前記 1 またはそれ以上のさらなる混合物中における第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 1 の物理化学的性質を測定する工程、

30

前記 1 またはそれ以上のさらなる混合物中における前記第 1 の分子の質量を分析し、そして、前記 1 またはそれ以上のさらなる混合物中における前記第 1 の分子の質量対電荷比を正確に決定する工程、

および、

前記 1 またはそれ以上のさらなる混合物中における第 1 の分子の強度を決定する工程をさらに含む、

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子、前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子、および前記 1 またはそれ以上のさらなる混合物中における前記第 1 の分子は、実質的に等しい質量対電荷比および実質的に等しい前記第 1 の物理化学的性質、および任意に等しい前記第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくははさらなる物理化学的性質を有すると決定する、

40

請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載の方法。

【請求項 20】

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記 1 またはそれ以上のさらなる混合物中における前記第 1 の分子を同定する工程をさらに含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子は、前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子の強度が、前記第 2 の

50

混合物中における前記第 1 の分子の強度と、あらかじめ決定した量を超えて異なる場合にのみ同定する、請求項 18、19 または 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子は、前記第 1 の混合物中における複数の異なる分子の平均強度が、前記第 2 の混合物中における複数の異なる分子の平均強度と、あらかじめ決定した量を超えて異なる場合にのみ同定する、請求項 18、19 または 20 に記載の方法。

【請求項 23】

前記あらかじめ決定した量が、(i) 1%; (ii) 2%; (iii) 5%; (iv) 10%; (v) 20%; (vi) 50%; (vii) 100%; (viii) 150%; (ix) 200%; (x) 250%; (xi) 300%; (xii) 350%; (xiii) 400%; (xiv) 450%; (xv) 500%; (xvi) 1000%; (xvii) 5000%; および (xviii) 10000% からなる群から選択される、請求項 21 または 22 に記載の方法。

10

【請求項 24】

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子を同定する前記工程が、前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の、前記第 1 の物理化学的性質、ならびに、任意に前記第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質、および前記決定された質量対電荷比を、分子のインデックス(index of molecules)と比較する工程を含み、前記インデックスが、

20

(i) 掲載された(indexed)各分子の個性(identity);

(ii) 掲載された各分子の、実験的に決定されたまたは予想された第 1 の物理化学的性質;

(iii) 掲載された各分子の、実験的に決定されたまたは予想された、正確な質量または質量対電荷比; および

(iv) 任意に、掲載された各分子の、実験的に決定されたもしくは予想された第 2 の物理化学的性質および / または、掲載された各分子の、実験的に決定されたもしくは予想された第 3 の物理化学的性質、および / または掲載された各分子の、実験的に決定されたもしくは予想された第 4 の物理化学的性質、および / または掲載された各分子の、実験的に決定されたもしくは予想された第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質を含む、請求項 18 ~ 23 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 25】

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子がペプチドを含み、かつ、前記分子のインデックスがペプチドのインデックスを含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記ペプチドのインデックスは、1 またはそれ以上のタンパク質が、どのようにして断片化または消化され、複数のペプチドを生じることが可能であるかを決定することにより生成されたものである、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子がペプチドを含み、かつ、前記分子のインデックスがタンパク質のインデックスを含む、請求項 24 に記載の方法。

40

【請求項 28】

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子を同定する前記工程が、前記第 1 のおよび / または第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質を前記分子のインデックスから計算する工程を含み、前記インデックスが、

(i) 掲載された各分子の個性; および

(ii) 掲載された各分子の、実験的に決定されたまたは予想された、正確な質量または質

50

量対電荷比を含む、請求項 18 ~ 27 のいずれかに記載の方法。

【請求項 29】

前記インデックスが、(i) タンパク質またはプロテオーム(proteome)のシーケンスデータベース；(ii) 発現シーケンスタグ (Expressed Sequence Tag)(EST)のデータベース；または (iii) 遺伝子もしくはゲノムのデータベースを含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子を、

(i) 前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の、決定した質量対電荷比を、掲載された分子の質量または質量対電荷比と比較した際の近似性；および / または

(ii) 前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の、前記第 1 の物理化学的性質を、掲載された分子における前記第 1 の物理化学的性質と比較した際の近似性；および / または

(iii) 前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の、第 2 の物理化学的性質を、掲載された分子における前記第 2 の物理化学的性質と比較した際の近似性；および / または

(iv) 前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の、第 3 の物理化学的性質を、掲載された分子における前記第 3 の物理化学的性質と比較した際の近似性；および / または

(v) 前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の、第 4 の物理化学的性質を、掲載された分子における前記第 4 の物理化学的性質と比較した際の近似性；および / または

(vi) 前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の、第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質を、掲載された分子における前記第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質と比較した際の近似性に基き同定する、請求項 18 ~ 29 のいずれかに記載の方法。

【請求項 31】

生物由来分子混合物を準備する工程、

前記混合物中における第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 1 の物理化学的性質を測定する工程、

前記第 1 の分子の質量を分析し、そして、前記第 1 の分子の質量対電荷比を正確に決定する工程、

および、

前記第 1 の分子を、少なくとも、前記第 1 の分子における前記第 1 の物理化学的性質および前記正確に決定した質量対電荷比に基き同定する工程を含む、

マスペクトル測定方法。

【請求項 32】

前記分子混合物が、複数の異なるバイオポリマー、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、アミノ酸、炭水化物、糖、脂質、脂肪酸、ビタミン、ホルモン、DNAの一部もしくは断片、cDNAの一部もしくは断片、RNAの一部もしくは断片、mRNAの一部もしくは断片、tRNAの一部もしくは断片、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、リボヌクレアーゼ、酵素、代謝産物、ポリサッカライド、リン酸化ペプチド、リン酸化タンパク質、グリコペプチド、グリコプロテインまたはステロイドを含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記第 1 の分子を定量する工程をさらに含む、請求項 31 または 32 に記載の方法。

【請求項 34】

ペプチド混合物を準備する工程、

前記混合物中における、ペプチドを含む第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 1 の物理

10

20

30

40

50

化学的性質を測定する工程、

前記ペプチドを含む第 1 の分子の質量対電荷比を正確に決定する工程、

および、

前記ペプチドを含む第 1 の分子を、少なくとも、前記ペプチドを含む第 1 の分子における、前記測定した第 1 の物理化学的性質および前記正確に決定した質量対電荷比に基づき同定する工程を含む、

マスペクトル測定方法。

【請求項 35】

1 もしくはそれ以上のペプチドおよび / または 1 もしくはそれ以上の合成分子を含む内部標準を、前記ペプチド混合物または前記ペプチド混合物のフラクション(fraction)に添加する工程をさらに含む、請求項 34 に記載の方法。

10

【請求項 36】

タンパク質混合物を準備する工程、

少なくとも前記タンパク質のうちいくつかに由来するペプチドの混合物を準備する工程

、

前記タンパク質混合物中における少なくとも 1 つのタンパク質および / または、前記ペプチド混合物中におけるペプチドを含む第 1 の分子の、質量または質量対電荷比以外の第 1 の物理化学的性質を測定する工程、

前記ペプチドを含む第 1 の分子の質量対電荷比を正確に決定する工程、

および、

20

前記ペプチドを含む第 1 の分子を、少なくとも、前記ペプチドを含む第 1 の分子における、前記測定した第 1 の物理化学的性質および前記正確に決定した質量対電荷比に基づき同定する工程を含む、

マスペクトル測定方法。

【請求項 37】

1 もしくはそれ以上のタンパク質および / または 1 もしくはそれ以上の合成分子を含む内部標準を、前記タンパク質混合物または前記タンパク質混合物のフラクション(fraction)に添加する工程をさらに含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記タンパク質混合物を、好ましくは 1 次元電気泳動法、多次元電気泳動法、サイズ排除クロマトグラフィー、またはアフィニティークロマトグラフィーにより、1 またはそれ以上のタンパク質を前記タンパク質混合物から分離するように分画する工程をさらに含む、かつ、前記タンパク質混合物から分離した前記 1 またはそれ以上のタンパク質を、次に、前記ペプチド混合物を与えるように消化または断片化する、請求項 36 または 37 に記載の方法。

30

【請求項 39】

前記タンパク質混合物を、前記ペプチド混合物を与えるように消化または断片化する工程をさらに含む、請求項 36 または 37 に記載の方法。

【請求項 40】

1 またはそれ以上のペプチドの第 1 のフラクションを前記ペプチド混合物から分離する工程をさらに含む、請求項 34 ~ 39 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 41】

前記 1 またはそれ以上のペプチドを、(i) 高速液体クロマトグラフィー("HPLC"); (ii) 陰イオン交換; (iii) 陰イオン交換クロマトグラフィー; (iv) 陽イオン交換; (v) 陽イオン交換クロマトグラフィー; (vi) イオン対逆相クロマトグラフィー; (vii) クロマトグラフィー; (viii) 一次元電気泳動法; (ix) 多次元電気泳動法; (x) サイズ排除; (xi) アフィニティー; (xii) 逆相クロマトグラフィー; (xiii) キャピラリー電気泳動クロマトグラフィー("CEC"); (xiv) 電気泳動法; (xv) イオン移動度分離法(ion mobility separation); (xvi) 電界非対称性イオン移動度分離法(Field Asymmetric Ion Mobility Separation) ("FAIMS"); または (xvii) キャピラリー電気泳動法により前記ペプチド混合物が

50

ら分離する、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記第 1 のフラクション中における前記 1 またはそれ以上のペプチドが、実質的に等しい前記第 1 の物理化学的性質、好ましくは、等しい溶出時間、疎水性、親水性、移動時間またはクロマトグラフィー保持時間を有する、請求項 40 または 41 に記載の方法。

【請求項 43】

前記ペプチドを含む第 1 の分子を定量する工程をさらに含む、請求項 34 ~ 42 のいずれかに記載の方法。

【請求項 44】

ペプチドを含む 1 またはそれ以上の同定された第 1 の分子と相関関係があるタンパク質または翻訳後修飾 (Post Translationally Modified) ("PTM") タンパク質を同定する工程をさらに含む、請求項 34 ~ 43 に記載の方法。

10

【請求項 45】

前記タンパク質または翻訳後修飾タンパク質を定量する工程をさらに含む、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

前記タンパク質または前記翻訳後修飾タンパク質と相関関係があると考えられる全てのペプチドの強度が、あらかじめ決定された 1 またはそれ以上の範囲内に含まれることをチェックする工程をさらに含む、請求項 44 または 45 に記載の方法。

20

【請求項 47】

代謝産物の混合物を準備する工程、

前記混合物中における代謝産物を含む第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 1 の物理化学的性質を測定する工程、

前記代謝産物を含む第 1 の分子の質量対電荷比を正確に決定する工程、

および、

前記代謝産物を含む第 1 の分子を、少なくとも、前記代謝産物を含む第 1 の分子における、前記測定した第 1 の物理化学的性質および前記正確に決定した質量対電荷比に基づき同定する工程を含む、

マススペクトル測定方法。

30

【請求項 48】

前記混合物中における前記代謝産物のうち少なくとも一部 (at least some) が、(i) 血漿; (ii) 尿; (iii) 糞便; (iv) 汗; または (v) 呼気からの抽出物である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

(i) DNA の一部もしくは断片を複数; (ii) RNA の一部もしくは断片を複数; (iii) オリゴヌクレオチドを複数および / もしくはオリゴヌクレオシドを複数; (iv) 核酸を複数; (v) 遺伝子の一部もしくは断片を複数; (vi) リボヌクレアーゼ (RNases) を複数; (vii) cDNA の一部もしくは断片を複数; (viii) mRNA の一部もしくは断片を複数; または (ix) tRNA の一部もしくは断片を複数含む混合物を準備する工程、

前記混合物中における第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 1 の物理化学的性質を測定する工程、

40

前記第 1 の分子における質量対電荷比を正確に決定する工程、

および、

前記第 1 の分子を、少なくとも、前記第 1 の分子における、前記測定した第 1 の物理化学的性質および前記正確に決定した質量対電荷比に基づき同定する工程を含む、

マススペクトル測定方法。

【請求項 50】

(i) リン酸化ペプチド; (ii) リン酸化タンパク質; (iii) グリコペプチド; (iv) グリコプロテイン; (v) 炭水化物; (vi) 糖; (vii) 脂質; (viii) 脂肪酸; (ix) ビタミン; (x) ホルモン; (xi) ステロイド; (xii) モノクローナルまたはポリクローナル抗体; およ

50

び (xiii) ポリサッカライドを含む群から選択される混合物を準備する工程、

前記混合物中における第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 1 の物理化学的性質を測定する工程、

前記第 1 の分子における質量対電荷比を正確に決定する工程、

および、

前記第 1 の分子を、少なくとも、前記第 1 の分子における、前記測定した第 1 の物理化学的性質および前記正確に決定した質量対電荷比に基づき同定する工程を含む、マスペクトル測定方法。

【請求項 5 1】

前記混合物が、異なる特性を有する、少なくとも 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, または 5000 の分子を含む、請求項 3 1 ~ 5 0 のいずれかに記載の方法。 10

【請求項 5 2】

前記混合物が、非等モルの不均一複雑混合物 (heterogeneous complex mixture) を含む、請求項 3 1 ~ 5 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 3】

前記第 1 の分子における質量対電荷比を正確に決定する前記工程が、前記第 1 の分子における質量対電荷比を、20 ppm, 19 ppm, 18 ppm, 17 ppm, 16 ppm, 15 ppm, 14 ppm, 13 ppm, 12 ppm, 11 ppm, 10 ppm, 9 ppm, 8 ppm, 7 ppm, 6 ppm, 5 ppm, 4 ppm, 3 ppm, 2 ppm, 1 ppm または <1 ppm までの範囲で決定することを含む、請求項 3 1 ~ 5 2 のいずれかに記載の方法。 20

【請求項 5 4】

前記第 1 の分子における質量対電荷比を正確に決定する前記工程が、前記第 1 の分子における質量対電荷比を、15-20 ppm, 10-15 ppm, 5-10 ppm または 1-5 ppm までの範囲で決定することを含む、請求項 3 1 ~ 5 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 5】

前記第 1 の分子における質量対電荷比を正確に決定する前記工程が、前記第 1 の分子における質量対電荷比を、0.01 マスユニット, 0.009 マスユニット, 0.008 マスユニット, 0.007 マスユニット, 0.006 マスユニット, 0.005 マスユニット, 0.004 マスユニット, 0.003 マスユニット, 0.002 マスユニット, 0.001 マスユニット または <0.001 マスユニットまでの範囲で決定することを含む、請求項 3 1 ~ 5 4 のいずれかに記載の方法。 30

【請求項 5 6】

前記第 1 の分子を、前記第 1 の物理化学的性質の効力によって前記混合物中における他の分子から分離する、請求項 3 1 ~ 5 5 のいずれかに記載のマスペクトル測定方法。

【請求項 5 7】

前記第 1 の分子を、時間的におよび / または空間的に、前記混合物中における他の分子と分離する、請求項 5 6 に記載のマスペクトル測定方法。

【請求項 5 8】

前記第 1 の分子を、(i) 高速液体クロマトグラフィー ("HPLC"); (ii) 陰イオン交換; (iii) 陰イオン交換クロマトグラフィー; (iv) 陽イオン交換; (v) 陽イオン交換クロマトグラフィー; (vi) イオン対逆相クロマトグラフィー; (vii) クロマトグラフィー; (viii) 一次元電気泳動法; (ix) 多次元電気泳動法; (x) サイズ排除; (xi) アフィニティー; (xii) 逆相クロマトグラフィー; (xiii) キャピラリー電気泳動クロマトグラフィー ("CEC"); (xiv) 電気泳動法; (xv) イオン移動度分離法 (ion mobility separation); (xvi) 電界非対称性イオン移動度分離法 (Field Asymmetric Ion Mobility Separation) ("FAIMS"); または (xvii) キャピラリー電気泳動法により前記混合物中における他の分子から分離する、請求項 5 6 または 5 7 のいずれかに記載のマスペクトル測定方法。 40

【請求項 5 9】

少なくとも前記第 1 の物理化学的性質を、前記混合物中における分子のマスペクトルが 50

ら決定する、請求項 3 1 ~ 5 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 0】

前記第 1 の物理化学的性質が、正味電荷(net charge)、荷電状態(charge state)、イオン電荷または複合的な実測荷電状態を含む、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記混合物中における前記第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 2 の物理化学的性質を測定する工程をさらに含み、前記第 2 の物理化学的性質は前記第 1 の物理化学的性質とは異なり、かつ、

前記第 1 の分子を同定する前記工程は、前記第 1 の分子を、少なくとも、前記第 1 の分子における前記第 1 および第 2 の物理化学的性質ならびに前記決定した質量対電荷比に基づき同定することをさらに含む、請求項 3 1 ~ 6 0 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 6 2】

前記混合物中における前記第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 3 の物理化学的性質を測定する工程をさらに含み、前記第 3 の物理化学的性質は前記第 1 および第 2 の物理化学的性質とは異なり、かつ、

前記第 1 の分子を同定する前記工程は、前記第 1 の分子を、少なくとも、前記第 1 の分子における前記第 1、第 2 および第 3 の物理化学的性質ならびに前記決定した質量対電荷比に基づき同定することをさらに含む、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記混合物中における前記第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 4 の物理化学的性質を測定する工程をさらに含み、前記第 4 の物理化学的性質は前記第 1、第 2 および第 3 の物理化学的性質とは異なり、かつ、

前記第 1 の分子を同定する前記工程は、前記第 1 の分子を、少なくとも、前記第 1 の分子における前記第 1、第 2、第 3 および第 4 の物理化学的性質ならびに前記決定した質量対電荷比に基づき同定することをさらに含む、請求項 6 2 に記載の方法。

20

【請求項 6 4】

前記混合物中における前記第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 5 のまたはさらなる物理化学的性質を測定する工程をさらに含み、前記第 5 のまたはさらなる物理化学的性質は前記第 1、第 2、第 3 および第 4 の物理化学的性質とは異なり、かつ、

前記第 1 の分子を同定する前記工程は、前記第 1 の分子を、少なくとも、前記第 1 の分子における前記第 1、第 2、第 3、第 4、第 5 のまたはさらなる物理化学的性質ならびに前記決定した質量対電荷比に基づき同定することをさらに含む、請求項 6 3 に記載の方法。

30

【請求項 6 5】

前記第 1 のおよび / または第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質が、(i) 溶出時間(elution time)、疎水性、親水性、移動時間(migration time)、またはクロマトグラフィー保持時間(chromatographic retention time); (ii) 溶解度; (iii) 分子体積またはサイズ; (iv) 正味電荷(net charge)、荷電状態(charge state)、イオン電荷または複合的な実測荷電状態; (v) 等電点(pI); (vi) 解離定数(pKa); (vii) 抗体親和力; (viii) 電気泳動移動度; (ix) イオン化ポテンシャル; (x) 双極子モーメント; (xi) 水素結合可能性(hydrogen-bonding capability) または水素結合能力(hydrogen-bonding capacity); および (xii) 気相中におけるイオン移動度(ion mobility)からなる群から選択される、請求項 3 1 ~ 6 4 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 6 6】

1 もしくはそれ以上の内因性(endogenous)および / または 1 もしくはそれ以上の外因性(exogenous)分子を内部標準として用いることをさらに含む、請求項 3 1 ~ 6 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 7】

前記内部標準は、少なくとも前記第 1 の物理化学的性質を、ならびに任意に前記第 2 の

50

および / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質を較正する(calibrate)ために使用する、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記第 1 の分子を同定する前記工程が、前記第 1 の分子の、前記第 1 の物理化学的性質、ならびに、任意に前記第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質、および前記決定された質量対電荷比を、分子のインデックス(index of molecules)と比較する工程を含み、前記インデックスが、

(i) 掲載された(indexed)各分子の個性(identity);

(ii) 掲載された各分子の、実験的に決定されたまたは予想された第 1 の物理化学的性質; および

(iii) 掲載された各分子の、実験的に決定されたまたは予想された、正確な質量または質量対電荷比を含む、請求項 3 1 ~ 6 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 9】

前記第 1 の分子がペプチドを含み、かつ、前記分子のインデックスがペプチドのインデックスを含む、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記ペプチドのインデックスは、1 またはそれ以上のタンパク質が、どのようにして断片化または消化され、複数のペプチドを生じることが可能であるかを決定することにより生成されたものである、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記第 1 の分子がペプチドを含み、かつ、前記分子のインデックスがタンパク質のインデックスを含む、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記第 1 の分子を、

(i) 前記第 1 の分子の、決定した質量対電荷比を、掲載された分子の質量または質量対電荷比と比較した際の近似性; および / または

(ii) 前記第 1 の分子の、前記第 1 の物理化学的性質を、掲載された分子における前記第 1 の物性値と比較した際の近似性; および / または

(iii) 前記第 1 の分子の、第 2 の物理化学的性質を、掲載された分子における前記第 2 の物性値と比較した際の近似性; および / または

(iv) 前記第 1 の分子の、第 3 の物理化学的性質を、掲載された分子における前記第 3 の物性値と比較した際の近似性; および / または

(v) 前記第 1 の分子の、第 4 の物理化学的性質を、掲載された分子における前記第 4 の物性値と比較した際の近似性; および / または

(vi) 前記第 1 の分子の、第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質を、掲載された分子における前記第 5 のもしくはさらなる物性値と比較した際の近似性に基づき同定する、請求項 6 8 ~ 7 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 3】

前記第 1 の分子を同定する前記工程が、前記第 1 のおよび / または第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質を分子のインデックスから計算する工程を含み、前記インデックスが、

(i) 掲載された各分子の個性; および

(ii) 掲載された各分子の、実験的に決定されたまたは予想された、正確な質量または質量対電荷比を含む、請求項 3 1 ~ 7 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 4】

前記インデックスが、(i) タンパク質もしくはプロテオーム(proteome)のシーケンスデータベース; (ii) 発現シーケンスタグ (Expressed Sequence Tag) (EST) のデータベース; または (iii) 遺伝子もしくはゲノムのデータベースを含む、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 75】

生物由来分子をマスペクトル測定により同定するために使用するインデックスを生成させる方法であり、

生物由来分子の質量または質量対電荷比を正確に決定する工程、

前記生物由来分子における、質量または質量対電荷比以外の第1の物理化学的性質を決定する工程、および

任意に、前記生物由来分子における第2のおよび/または第3のおよび/または第4のおよび/または第5のもしくはさらなる物理化学的性質を決定する工程を含む方法。

【請求項 76】

生物由来分子をマスペクトル測定により同定するために使用するインデックスを生成させる方法であり、

ポリペプチドまたはタンパク質の消化または断片化により生じるペプチドを含む分子の質量または質量対電荷比を正確に決定する工程、

前記ペプチドを含む分子における、質量または質量対電荷比以外の第1の物理化学的性質を決定する工程、および

任意に、前記ペプチドを含む分子における第2のおよび/または第3のおよび/または第4のおよび/または第5のもしくはさらなる物理化学的性質を決定する工程を含む方法。

【請求項 77】

生物由来分子をマスペクトル測定により同定するために使用するインデックスを生成させる方法であり、

ポリペプチドまたはタンパク質の消化または断片化により生じるペプチドを含む分子の質量または質量対電荷比を正確に決定する工程、

前記ペプチドが由来する1またはそれ以上のタンパク質における、質量または質量対電荷比以外の第1の物理化学的性質を決定する工程、および

任意に、前記タンパク質における第2のおよび/または第3のおよび/または第4のおよび/または第5のもしくはさらなる物理化学的性質を決定する工程を含む方法。

【請求項 78】

前記分子における前記質量対電荷比を、20 ppm, 19 ppm, 18 ppm, 17 ppm, 16 ppm, 15 ppm, 14 ppm, 13 ppm, 12 ppm, 11 ppm, 10 ppm, 9 ppm, 8 ppm, 7 ppm, 6 ppm, 5 ppm, 4 ppm, 3 ppm, 2 ppm, 1 ppm または <1 ppmまでの範囲で決定する、請求項 75、76 または 77 に記載の方法。

【請求項 79】

前記分子における前記質量対電荷比を、15-20 ppm, 10-15 ppm, 5-10 ppm または 1-5 ppmまでの範囲で決定する、請求項 75 ~ 78 のいずれかに記載の方法。

【請求項 80】

前記分子における前記質量対電荷比を、0.01 マスユニット, 0.009 マスユニット, 0.008 マスユニット, 0.007 マスユニット, 0.006 マスユニット, 0.005 マスユニット, 0.004 マスユニット, 0.003 マスユニット, 0.002 マスユニット, 0.001 マスユニット または <0.001 マスユニットまでの範囲で決定する、請求項 75 ~ 79 のいずれかに記載の方法。

【請求項 81】

前記第1のおよび/または第2のおよび/または第3のおよび/または第4のおよび/または第5のもしくはさらなる物理化学的性質が、(i) 溶出時間(elution time)、疎水性、親水性、移動時間(migration time)、またはクロマトグラフィー保持時間(chromatographic retention time); (ii) 溶解度; (iii) 分子体積またはサイズ; (iv) 正味電荷(net charge)、荷電状態(charge state)、イオン電荷または複合的な実測荷電状態; (v) 等電点(pI); (vi) 解離定数(pKa); (vii) 抗体親和力; (viii) 電気泳動移動度; (ix) イオン化ポテンシャル; (x) 双極子モーメント; (xi) 水素結合可能性(hydrogen-bonding capability) または水素結合能力(hydrogen-bonding capacity); および (xii) 気相中における

10

20

30

40

50

るイオン移動度(ion mobility)からなる群から選択される、請求項 75 ~ 80 のいずれかに記載の方法。

【請求項 82】

比較的低い(lower)閾値以下に質量または質量対電荷比を有する分子に対し、相対的に低い優先順位を割り当てる工程をさらに含む、請求項 75 ~ 81 のいずれかに記載の方法。

【請求項 83】

前記比較的低い閾値が、(i) <500 ダルトン；(ii) 500-1000 ダルトン；(iii) 1000-1500 ダルトン；(iv) 1500-2000 ダルトン；(v) 2000-2500 ダルトン；(vi) 2500-3000 ダルトン；および (vii) 3000-3500 ダルトンの範囲である、請求項 82 に記載の方法。

10

【請求項 84】

前記比較的低い閾値が、6, 7, 8, 9, 10, 11 または 12 よりも少ないアミノ酸を有するペプチドにおける質量または質量対電荷比に相当する、請求項 82 に記載の方法。

【請求項 85】

比較的高い(upper)閾値以上に質量または質量対電荷比を有する分子に対し、相対的に低い優先順位を割り当てる工程をさらに含む、請求項 82、83 または 84 に記載の方法。

【請求項 86】

前記比較的高い閾値が、(i) 5000-5500 ダルトン；(ii) 5500-6000 ダルトン；(iii) 6000-6500 ダルトン；(iv) 6500-7000 ダルトン；(v) 7000-7500 ダルトン；(vi) 7500-8000 ダルトン；(vii) 8000-8500 ダルトン；(viii) 8500-9000 ダルトン；(ix) 9000-9500 ダルトン；(x) 9500-10000 ダルトン；(xi) 10000-10500 ダルトン；(xii) 10500-11000 ダルトン；(xiii) 11000-11500 ダルトン；(xiv) 11500-12000 ダルトン；(xv) 12000-12500 ダルトン；(xvi) 12500-13000 ダルトン；(xvii) 13000-13500 ダルトン；(xviii) 13500-14000 ダルトン；(xix) 14000-14500 ダルトン；(xx) 14500-15000 ダルトン；(xxi) 15000-15500；(xxii) 15500-16000；(xxiii) 16000-16500；および (xiv) >16500 ダルトンの範囲である、請求項 85 に記載の方法。

20

【請求項 87】

前記第 1 のおよび / または第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のおよびさらなる物理化学的性質を計算する工程をさらに含む、請求項 75 ~ 86 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 88】

質量分析計であって、

前記第 1 の分子における質量対電荷比を正確に決定する質量分析装置(mass analyser)を含み、

使用において、少なくとも、前記第 1 の分子における質量対電荷比以外の第 1 の物理化学的性質を測定し、そして、任意に、第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質を測定し、

かつ、前記質量分析計は、少なくとも、前記第 1 の分子における前記第 1 の物理化学的性質および前記正確に決定した質量対電荷比に基づき、そして、任意に、前記第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質に基づき、前記第 1 の分子を同定する手段をさらに含む、質量分析計。

40

【請求項 89】

前記第 1 のおよび / または第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質は、(i) 液体クロマトグラフィーもしくは高速液体クロマトグラフィー("HPLC")カラム；(ii) 逆相高速液体クロマトグラフィーカラム；(iii) 超高压液体クロマトグラフィーカラム；(iv) サイズ排除クロマトグラフィーカラム；(v) アフィニティークロマトグラフィーカラム；(vi) キャピラリー電気泳動("CE")カラム；(vii) イオンクロマトグラフィーカラム；(viii) 1次元もしくは多次元電

50

気泳動デバイス; または (ix) ガスを含むドリフトチューブを用いて測定される、請求項 8 8 に記載の質量分析計。

【請求項 9 0】

前記第 1 のおよび / または第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質は、前記第 1 の分子のマスペクトルから計る、請求項 8 8 または 8 9 に記載の質量分析計。

【請求項 9 1】

前記物理化学的性質が、正味電荷(net charge)、荷電状態(charge state)、イオン電荷または複合的な実測荷電状態を含む、請求項 9 0 に記載の質量分析計。

【請求項 9 2】

前記第 1 のおよび / または第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質が、(i) 溶出時間(elution time)、疎水性、親水性、移動時間(migration time)、またはクロマトグラフィー保持時間(chromatographic retention time); (ii) 溶解度; (iii) 分子体積またはサイズ; (iv) 正味電荷(net charge)、荷電状態(charge state)、イオン電荷または複合的な実測荷電状態; (v) 等電点(pI); (vi) 解離定数(pKa); (vii) 抗体親和力; (viii) 電気泳動移動度; (ix) イオン化ポテンシャル; (x) 双極子モーメント; (xi) 水素結合可能性(hydrogen-bonding capability) または水素結合能力(hydrogen-bonding capacity); および (xii) 気相中におけるイオン移動度(ion mobility)からなる群から選択される、請求項 8 8 ~ 9 1 のいずれかに記載の質量分析計。

【請求項 9 3】

前記第 1 の分子における質量対電荷比を、20 ppm, 19 ppm, 18 ppm, 17 ppm, 16 ppm, 15ppm, 14 ppm, 13 ppm, 12 ppm, 11 ppm, 10 ppm, 9 ppm, 8 ppm, 7 ppm, 6 ppm, 5 ppm, 4 ppm, 3 ppm, 2 ppm, 1 ppm または <1 ppmまでの範囲で決定する、請求項 8 8 ~ 9 2 のいずれかに記載の質量分析計。

【請求項 9 4】

前記第 1 の分子における質量対電荷比を、15-20 ppm, 10-15 ppm, 5-10 ppm または 1-5 ppmまでの範囲で決定する、請求項 8 8 ~ 9 3 のいずれかに記載の質量分析計。

【請求項 9 5】

前記第 1 の分子における質量対電荷比を、0.01 マスユニット, 0.009 マスユニット, 0.008 マスユニット, 0.007 マスユニット, 0.006 マスユニット, 0.005 マスユニット, 0.004 マスユニット, 0.003 マスユニット, 0.002 マスユニット, 0.001 マスユニット または <0.001 マスユニットまでの範囲で決定する、請求項 8 8 ~ 9 4 のいずれかに記載の質量分析計。

【請求項 9 6】

前記質量分析計が、(i) フーリエ変換("FT")質量分析計; (ii) フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴("FTICR")質量分析計; (iii) 飛行時間("TOF")質量分析計; (iv) 直交加速式(orthogonal acceleration)飛行時間("oaTOF")質量分析計; (v) 磁気セクタ質量分析計; (vi) 四重極質量分析装置(quadrupole mass analyser); (vii) イオントラップ質量分析装置; および(viii)フーリエ変換オービトラップ(orbitrap)、静電氣的イオンサイクロトロン共鳴質量分析計または静電氣的フーリエ変換質量分析計を含む群から選択される、請求項 8 8 ~ 9 5 のいずれかに記載の質量分析計。

【請求項 9 7】

主として分子イオンまたは擬分子イオン(molecular or pseudo-molecular ions)を生成するイオン源をさらに含む、請求項 8 8 ~ 9 6 のいずれかに記載の質量分析計。

【請求項 9 8】

前記イオン源が、大気圧イオン化源(atmospheric pressure ionization source)を含む、請求項 8 8 ~ 9 7 のいずれかに記載の質量分析計。

【請求項 9 9】

前記イオン源が、(i) 電子スプレーイオン化(Electrospray ionisation) ("ESI")イオ

10

20

30

40

50

ン源; (ii) 大気圧化学イオン化 (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) ("APCI") イオン源; (iii) 大気圧光イオン化 (Atmospheric Pressure Photo Ionisation) ("APPI") イオン源; および (iv) 大気圧マトリクス補助レーザー脱着イオン化 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) ("MALDI") イオン源からなる群から選択される、請求項 9 8 に記載の質量分析計。

【請求項 1 0 0】

前記イオン源が非大気圧イオン化源 (non-atmospheric pressure ionization source) を含む、請求項 8 8 ~ 9 7 のいずれかに記載の質量分析計。

【請求項 1 0 1】

前記イオン源が、(i) 高速原子衝突 ("FAB") イオン源; (ii) 液体二次イオン質量分析 (Liquid Secondary Ions Mass Spectrometry) ("LSIMS") イオン源; (iii) マトリクス補助レーザー脱着イオン化 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) ("MALDI") イオン源; (iv) マトリクス補助レーザー脱着イオン化 (Matrix Assisted Laser Desorption) ("MALDI") イオン源と、衝突冷却イオン (collisionally cooling ions) のための衝突セルとの組み合わせ; および (v) レーザー脱着イオン化 (Laser Desorption Ionisation) ("LDI") イオン源からなる群から選択される、請求項 1 0 0 に記載の質量分析計。 10

【請求項 1 0 2】

質量分析計であって、

前記質量分析計により分析される第 1 の分子を同定するための同定手段を含み、前記同定手段は、使用時に分子のインデックスを参照し、 20

前記インデックスが、

(i) 掲載された (indexed) 各分子の個性 (identity);

(ii) 掲載された各分子の、実験的に決定されたまたは予想された第 1 の物理化学的性質;

(iii) 掲載された各分子の、実験的に決定されたまたは予想された、正確な質量または質量対電荷比; および

(iv) 任意に、掲載された各分子の、実験的に決定されたまたは予想された、第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質を含む、

質量分析計。

【請求項 1 0 3】

前記インデックスが、少なくとも部分的に、前記質量分析計により保存されもしくは生成され、および / または、前記インデックスが、少なくとも部分的に、遠隔的に、好ましくはインターネットにより、保存されもしくは生成される、請求項 1 0 2 に記載の質量分析計。 30

【請求項 1 0 4】

質量分析計であって、

前記質量分析計により分析される第 1 の分子を同定するための同定手段を含み、前記同定手段は、使用時に分子のインデックスを参照し、

前記インデックスが、

(i) 掲載された (indexed) 各分子の個性 (identity); および 40

(ii) 掲載された各分子の、実験的に決定されたまたは予想された質量または質量対電荷比を含み、

かつ、前記同定手段は、前記インデックス中における前記分子の、質量または質量対電荷比以外の第 1 の物理化学的性質をさらに決定し、そして、任意に、前記インデックス中における前記分子の、第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質をさらに決定する、

質量分析計。

【請求項 1 0 5】

前記インデックスが、(i) タンパク質またはプロテオーム (proteome) のシーケンスデータベース; (ii) 発現シーケンスタグ (Expressed Sequence Tag) (EST) のデータベース; 50

または (iii) 遺伝子もしくはゲノムのデータベースを含む、請求項 104 に記載の質量分析計。

【請求項 106】

タンパク質混合物を準備する工程、

少なくとも前記タンパク質のうちいくつかに由来するペプチド混合物を準備する工程、

前記タンパク混合物中における少なくとも 1 つのタンパク質および / または前記ペプチド混合物中におけるペプチドを含む第 1 の分子の、質量または質量対電荷比以外の第 1 の物理化学的性質を測定する工程、

任意に、前記タンパク混合物中における少なくとも 1 つのタンパク質および / または前記ペプチド混合物中における前記ペプチドを含む第 1 の分子の、質量または質量対電荷比以外の第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質を測定する工程、

前記ペプチドを含む第 1 の分子の質量対電荷比を正確に決定する工程、および

前記ペプチドを含む第 1 の分子を、少なくとも、前記測定した、前記タンパク混合物中における少なくとも 1 つのタンパク質および / または前記ペプチド混合物中におけるペプチドを含む第 1 の分子の質量または質量対電荷比以外の第 1 の物理化学的性質、ならびに前記正確に決定した前記第 1 のペプチドの質量対電荷比に基づき、ならびに任意に前記第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質に基づき同定する工程を含む、

マスペクトル測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マスペクトル測定方法に関する。好ましい実施形態は、タンパク質の同定、タンパク質の定量、プロテアーゼ、高分解能マスペクトル、プロテオーム(proteomics)、ゲノム(genomics)およびバイオ情報科学(bioinformatics)に関する。

【背景技術】

【0002】

バイオテクノロジーおよび薬学研究におけるゲノムの(genomic)およびプロテオームの(proteomic)情報の重要性の増大および発展は、多くの革新的なテクノロジーの発展を刺激してきた。転写プロファイリングまたは遺伝子発現分析等のテクノロジープラットフォームは、細胞生理学におけるより良い理解、ならびに、遺伝子発現(mRNA)と内部および環境刺激に対する細胞応答との間の相関関係の発展を可能にする。J.L. DeRisi et al., Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale, Science 278:680-686 (1997); F.P. Roth et al., Finding DNA regulatory motifs within unaligned noncoding sequences clustered by whole-genome mRNA Quantitation, Nat. Biotechnol. 16:939-945 (1998)を参照のこと(非特許文献1及び2)。内部刺激は遺伝子変異および病的状態を含み、同時に、外部刺激は、環境状態(例えば、温度、pH、オスモル濃度等)または化学濃度(例えば、薬物、ホルモン、毒素等)の変化を含む。遺伝子発現の概要が、コンディションの変動に応じてどのように動力学的に変化するかにについての理解は、新規治療標的、治療および疾患進行/退行マーカー(バイオマーカー)の同定および発展について有用な洞察を与えることができる。発現の概要における変化の解明は、巨視的レベルにおける多数の生化学的プロセスにおけるさらに多大な理解を可能にするであろう。遺伝子発現解析技術は、mRNAレベルでの変化を測定し、かつ、その変化を、与えられた刺激に対する細胞応答特性と関連付ける。この分野は、DNA配列の発展とともに顕著に広がっている(例えば、カナダ国Santa ClaraのAffymetrix社により市販されているGeneChip(商標)配列)。しかしながら、この分野における研究は、測定されたmRNAレベルと、mRNAによりエンコードされた実際のタンパク質のレベルとの間には、しばしば程度の低い相関関係しかないことを示してきた。S.P. Gygi et al., Correlation between protein and mRNA abundance in yeast, Mol. Cell. Biol. 19:1720-1730 (1999); L.M.

10

20

30

40

50

Hartford and D.R. Morris, Post-transcriptional gene regulation, Wiley-Liss Inc (1997); and A. Varshavsky, The N-end rule: functions, mysteries, uses, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:12142-12149 (1996)を参照のこと(非特許文献3~5)。この不一致は、種々の転写概要プラットフォーム(transcriptional profiling platforms)にわたる実験再現性の乏しさ、細胞区画化(cellular compartmentalization)の効果、転写効率、転写後修飾、およびタンパク質劣化システム(protein degradation systems)等の種々の要因に帰することができる。

【0003】

プロテオームの定量に対する進歩したアプローチは、細胞プロセスに関係するタンパク質を直接試験することにより、現存するゲノムのアプローチを補完するであろう。これら二つのテクノロジーの結合は、ゲノムおよびプロテオーム(proteome)ネットワークの機能的構造のより完全な概念的理解につながり、細胞生理学のさらに包括的な展望を可能にするであろう。

10

【0004】

プロテオーム研究における二つの普遍的な目標は、設定条件下で与えられた細胞中に存在するタンパク質の定性的な同定、および、前記条件の変化に伴う前記タンパク質の相対レベルの定量的な決定である。残念ながら、最近のプロテオーム分野における分析的アプローチの大多数は、定性的情報または初歩的レベルの定量的情報である。タンパク質の相対発現レベルを定量的に測定する、信頼性がある正確な方法は、欠如している。この定量的情報を引き出す能力は、プロテオームに対して決定的であり、そして、薬物の発見および発達の向上、診断上の/予後の試験に基づく新規タンパク質の発達、ならびに薬物治療戦略の効力のモニターを助けるに十分である(バイオマーカー)。存在する、タンパク質の同定と関連する方法のいくつか、および、タンパク質量量のためにデザインされた最近のテクノロジーについて簡単に述べる。

20

【0005】

一段式(single stage)およびタンデム型(tandem)マスペクトル測定方法の両方の、タンパク質およびヌクレオチドデータベースを用いた上での細胞内タンパク質同定に対する有用性は、広く報告されている。一段式マスペクトル測定方法では、装置の選択肢は、これまで、マトリクス補助レーザー脱着イオン化(Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) (MALDI)飛行時間(Time of Flight)質量分析計(TOF-MS または MALDI-TOF)であった。このMALDI装置は、一価の電荷を有するペプチドイオンの、質量が正確に20 から 50 ppmであるマスペクトルを特徴的に生成する。ペプチドイオンの質量値について生成されたリストは、次に、任意の多数の、前述したタンパク質同定のためのサーチエンジンに提供される(Mann et al., Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases, Biological Mass Spectr. 22(6): 338-45 (1993); Henzel et al., Identification of 2-D Gel Proteins at the femtomole level by Molecular Mass Searching of Peptide Fragments in a Protein Sequence Database, Techniques in Protein Chemistry V, John Crabb ed., (1994); and Pappin et al., Peptide Mass Fingerprinting using MALDI-TOF mass spectrometry, Current Biology 3:327-332 (1993)を参照のこと)(非特許文献6~8)。当業者は、このタンパク質同定方法を、ペプチドマスフィンガープリンティング(Peptide Mass Fingerprinting) ("PMF")と名付けた。ペプチドマスフィンガープリンティングはシンプルな混合物における多数のタンパク質の同定を促進することが示された(Jensen et al., Anal. Chem. 69(23): 4741-50 (1997) (非特許文献9))にも関わらず、この技術における正確性の限界は、複雑な混合物に適用した際には不明確さにつながり、そして、擬陽性帰属(false positive assignments)の可能性は容認できないレベルまで上昇する。さらに、ペプチドマスフィンガープリンティングは、定量的分析に対しては、MALDIイオン化プロセスに関係するイオン抑制問題(ion suppression problems)のために、信頼度の高い使用ができない。タンパク質分析に採用されてきた他の質量分析計の設計の中では、三段式四重極(triple-stage quadrupole) (TSQ)装置および四重極イオントラップ(QIT)装置がある。両方のタイプの装

30

40

50

置は、いずれもMS/MS応用法(MS/MSApplications、後述する)に好適であるが、質量の正確性は50 から 100 ppmに限定される傾向があり、かつ、設計におけるスキャンの性質に依存して、感度が低い。QIT装置は、さらに、比較的限定された電荷容量を有し、かつ、それゆえに、有するダイナミックレンジが限定されている。

【0006】

ペプチドマスフィンガープリンティングに代わるアプローチは、タンデム型マスペクトル測定方法(MS/MS)に関係する。タンパク質のタンデム型マスペクトルによる同定は、プロテオライズされた(proteolyzed)タンパク質断片の1セットの第1次マスペクトルの中から選択された各前駆イオンから生成された生成物イオン(product ions)における、マスペクトルの取得および分析に関係する。この追加の情報は、見かけの質量が同一である異なったタンパク質断片を、それらの生成物イオンスペクトルにより区別することができるため、有用である。MS/MSデータもまた、タンパク質断片前駆イオンのアミノ酸シーケンスを演繹するために使用可能であり、そして、結果として得られるシーケンスは、タンパク質同定のために、タンパク質または翻訳されたヌクレオチドのデータベースと比較される。タンデム型マスペクトルによる同定は、ペプチドマスフィンガープリントにより生成された個性(identity)を確認する第1次シーケンスデータを提供することにより、MALDI-TOFに基づくタンパク質同定の信頼性を顕著に向上させる。Wilm and Mann, Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags, Anal. Chem. 66:4390-4399 (1994); W. Hines et al., Pattern-Based Algorithm for Peptide Sequencing from Tandem High Energy Collision-Induced Dissociation Mass Spectra, J. Am. Soc. Mass Spectrom, 3:326-336 (1992); V. Dancik et al., De Novo Peptide Sequencing via Tandem Mass Spectrometry: A Graph-Theoretical Approach, RECOMB, 135-144 (1999); and Yates et al., U.S. Patent No. 5,538,897を参照のこと(非特許文献10~12、特許文献1)。

【0007】

フラグメントスペクトルを公知のタンパク質シーケンスと迅速に相関付けるためのシステムの提供に有用であるとは言え、これら自動化プロセス中におけるアルゴリズムは、全てのスペクトルに対して最も可能性の高いものを帰属し、そして、ユーザは、ペプチドMS/MSデータから擬陽性が生成する可能性を補うために、同一のタンパク質断片に対する複数の独特なペプチド帰属に依存しなければならない。MS/MSに基づくタンパク質同定の戦略は、ユーザが定義した基準を満足する、任意のポリペプチドイオン分析におけるMSおよびMS/MSモード間の自動切換えと関連付けることができる。MS/MSモードへの切換えは、MSモードにおけるデータ採取を中断し、そして、一度には1つの前駆体イオンしか分析できないために、このシステムにおける正味の処理量は限定される。プロテオームと同程度に複雑な混合物の第1次スペクトルにおける全てのイオンのMS/MS分析は、極度に時間とサンプルを消費するであろう。プロテオームのケースのような複雑な不均質混合物における総合的なタンパク質適用範囲を達成するために、MS/MS切換えは極めて頻繁に起こる必要があり、かつ、そのことが、MSおよびMS/MSデータの両方の質に欠陥を生じさせる。仮試験的同定の質に欠陥を生じさせることは、MSスペクトルにおける実験の定量的な正確さを顕著に減少させる。ペプチドMS/MSスペクトルにおける質に欠陥を生じさせることは、特に、混合物の構成要素が等モル量では存在せず、かつ、いくつかのタンパク質に由来するイオンの数が少ないプロテオームでは、擬陽性同定(false positive identifications)の生成する可能性を顕著に増加させる。

【0008】

多くの科学者が、2-Dタンパク質ゲルを抽出しまたは詳細に分析し、かつ、分離したタンパク質を、キャラクタリゼーションおよび可能な同定のために、上述の方法により質量分析にかけてきた。例えば、H. Nakayama, et al., Capillary column high-performance liquid chromatographic-electrospray ionization triple-stage mass spectrometric analysis of proteins separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Application to cerebellar protein mapping, J. Chrom. A 730:279-287 (1996)

; S.M. Hanash, Biomedical applications of two-dimensional electrophoresis using immobilized pH gradients: current status, *Electrophoresis* 21:1202-1209 (2000); A. Pandey, M. Mann, Proteomics to study genes and genomes, *Nature* 405:837-846 (2000); M.P. Washburn, J.R. Yates, Analysis of the microbial proteome, *Curr. Opin. Microbiol.* 3:292-297 (2000); H. Langen et al., Two-dimensional map of the proteome of *Haemophilus influenzae*, *Electrophoresis*, 21:411-429 (2000)を参照のこと(非特許文献13~17)。このようなハイブリッド手法は、極めて感度が高いが、2Dゲルそれ自体の分解能力(resolving capacity)により制限を受け、かつ、ゲル上における個々のスポットに対して冗長な抽出および分析を必要とする。

【0009】

プロテオームの熟練者らによって提案された1つのアプローチは、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴(FTICR; L. Li et al., High-throughput peptide identification from protein digests using data-dependent multiplexed tandem FTICR Mass spectrometry coupled with capillary liquid chromatography, *Anal. Chem.* 73:3312-3322 (2001)(非特許文献18); Y. Shen et al., High-Throughput Proteomics Using High-Efficiency Multiple-Capillary Liquid Chromatography with On-Line High-Performance ESI FTICR Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 73:3011-3021 (2001)(非特許文献19)を参照のこと)等のマスマススペクトル技術と連結した、与えられたプロテオームの全ての構成タンパク質の酵素的な消化による複雑なペプチド混合物の生成と、続いてのカラムクロマトグラフィー分離に関する。これは非常に有望なアプローチであるが、FTICRに要求される機器が非常に高価である。FTICRスペクトロメータは、500万ドル以上のコストを要することもあり、そのことが、この方法を広い日常的な使用において非実用的にしている。

【0010】

もう1つは、多次元タンパク質同定テクノロジー(Multi-Dimensional Protein Identification Technology) ("MudPIT")と呼ばれているタンデム式マスマススペクトル技術である(A. Link et al., Direct Analysis of Protein Complexes Using Mass Spectrometry, *Nat. Biotechnol.* 17:676-682 (1999)(非特許文献20); M.P. Washburn et al., Large-Scale Analysis of the Yeast Proteome by Multidimensional Protein Identification Technology, *Nat. Biotechnol.* 19:242-247 (2001)(非特許文献21))。この技術は、事実上、タンデム式マスマススペクトル測定に先立ち、細分化前のサンプルに適用する、クロマトグラフィーの一種であり、タンパク質発現レベルの変化をモニターするために適切であることは示されていない。

【0011】

プロテオームは一般的に極めて複雑である。それらプロテオームは、何千ものタンパク質を含み、これらタンパク質は、相対濃度において5または6種類の強度に変化することもある。ゲノムとは異なり、プロテオームはダイナミックである。すなわち、細胞のプロテオームを形成するタンパク質は細胞の化学的および物理的環境に反応して変化する。翻訳後プロセスは、細胞タンパク質の機能形成をコンスタントに修飾し、そして、このレベルのタンパク質発現は、多数の異なる刺激に影響される。転写概要(mRNAを試験するもの)は、そのような動的系(dynamic system)の解読においては使用が限定される。したがって、プロテオーム中における実際のタンパク質の直接的な定性的および定量的分析が、細胞スケールにおけるタンパク質機能の理解を達成するために要求される。以下のセクションでは、タンパク質情報を定量的に得るために最近使用されている方法について詳述する。

【0012】

2-Dゲル上で分離したタンパク質の、非蛍光色素(クーマシーブルー、ファーストグリーン)、蛍光色素(シプロ赤(Sypro Red)、シプロオレンジ(Sypro Orange))、およびコロイド金属染料(銀、金)による染色等のいくつかの生化学的技術が、タンパク質の相対量を定量するために用いられている。これら染色技術は、不十分な定量精度および正確さにより制限を受ける。なぜならば、各タンパク質に多様な量の染料が組み込まれており、

10

20

30

40

50

かつ、染色されたタンパク質は、ゲルマトリクスのバックグラウンド染色から分離することが難しいからである。細胞でのタンパク質合成中における放射性ラベルまたは代謝性ラベル (^{14}C -アミノ酸、 ^3H -ルシン(lucine)、 ^{35}S -メチオニン)の導入等の他の技術は、古典的な染色技術におけるバックグラウンドノイズに関連するこれらの問題点のいくらかを克服することができる。残念なことに、放射性ラベルには時間がかかり、高価であり、そして、例えば結晶、組織または腫瘍等のヒト由来サンプルに対しては実用的でない(またはめったに許可されない)。したがって、放射性ラベルは実用的な選択肢ではない。

【0013】

ゲルに基づく技術に関連する欠点を克服するために、他の研究者らは、種々の、マスペクトルに基づく方法を使用している。このような方法の1つにおいては、細胞において異なる条件下で成長したタンパク質の相対質量の正確な定量を行なうために、MS-同位体ラベル技術を使用する。この方法では、 ^{15}N 等の安定同位体を細胞成長培地内に導入する。細胞成長プロセス中において生産された、 ^{15}N をエンリッチしたタンパク質は、続いて、未処理の(unaltered)タンパク質と、これら二種類を混合しこれらを同時に分析することにより比較する。対応する ^{15}N 標識ペプチドは、それらの ^{14}N 対と比較する。なぜならば、それらは、予想される質量シフト以外にはほとんど同一の物理的性質を有しているからである。この戦略は、天然のおよび同位体でエンリッチした「対の」ペプチド間の量的な相違を明瞭かつ正確に記録することを可能にする(Y. Oda, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:6591-6596 (1999) (非特許文献22))。しかしながら、この戦略は、効用が限られている。なぜならば、それが、プロテオーム自体に同位体が組み込まれるために十分な時間の長さのために、タンパク質単離に先立ち、エンリッチされた安定同位体培地による処理を要求するからである。

【0014】

最近、この欠点を克服するもう1つのアプローチが提示された(Gygi, S. P., et al., Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags, Nat. Biotechnol. 17:994-999 (1999) (非特許文献23); Griffin, T.J., et al., Quantitative proteomic analysis using a MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometer, Anal. Chem., 73:978-986 (2001) (非特許文献24))。このアプローチは、重い、および軽い同位体コード親和性タグ(isotope-coded affinity tags) (ICAT)を付した誘導タンパク質混合物に関係する。これらのタグは、特定のアミノ酸残基に共有結合しており、そして、ビオチン等の高親和性部分を運び、それは、タグを付していない物質との単離手段として働く。前記タンパク質は、続いて消化され、そして、タグを付したペプチドは、続いての定量的分析のために親和力を精製される。親和力を精製したフラクションは、タンデム式マスペクトル測定方法を用いたシーケンス同定にかけられ、そして、同時に、複雑な(complex)、対照用の(control)および実験用の(experimental)タンパク質混合物に由来する個々のタンパク質の相対発現レベルを測定するために分析される。この技術における初期の発展は、それがかなり強固であり、かつ広く適用可能であることを示した。しかしながら、この方法は、不完全なタグ付加および親和力精製ステップに関連する低収率に悩まされている。このアプローチのもう1つの問題点は、少なくとも1つのフリーなシステイン基を含むタンパク質に対してしか有用でないことである。この落とし穴の一例は、35%のイーストリボソームタンパク質がシステインフリーであり、かつ、それゆえに、ICATテクノロジーを用いて同定または定量できないという事実により例証されている。さらに、これらタグを付したペプチドは、感度の高い(sensitive)MS/MS分析により分析できる質量を有していなければならない。バイオテクノロジーおよび薬学の研究および発展におけるゲノムの(genomic)、プロテオームの(proteomic)および代謝的(metabolomic)情報の重要性の高まりが、多数の革新的技術の発展を刺激してきた。ライフサイエンスにおける多数の分析研究の共通の目標は、生物由来の複雑な化学的混合物中における化学的成分の定性的同定であり、そして、それら混合物中における化学的成分の相対存在量(relative abundance)の定量的測定である。さらに目指す目標は、そのような混合物中

10

20

30

40

50

における、特定の疾患の適応症(indication of a particular disease)に使用できる化学種またはバイオマーカーの発見である。このような研究は、代謝のおよびプロテオームの分野において鍵となる役割を演じるが、ライフサイエンスの他の分野まで容易に拡張することができる。それらバイオマーカーは、しばしば、治療標的として、または少なくとも特定疾患治療のために開発された薬物候補の効力の指標として働き得る化学種または生物学的経路についての情報を提供する。これらバイオマーカー発見の研究は、一般的に、複雑な生物学的混合物の二つの群(populations)を比較することと関係している。これらサンプル群の1つは、典型的には、「対照」状態(通常の、未処理の、疾患に罹っていない等)の典型であり、そして、第2のサンプル群は、典型的には、「実験用」状態(異常な、処理済の、疾患に罹った等)の典型である。これらバイオマーカー発見実験における第1の目標は、二つの面を有する。第1に、前記二つのサンプル群中における各成分は、それらの相対発現レベルが変化したかどうか決定するために、前記二つのサンプルの状態間において統計的に有意な方法で定量的に測定しなければならない。第2の目標は、その発現レベルが変化した各成分を統計的に有意な方法で定性的に同定することであり、そして、一般的に、前記サンプル群中における可能な限り多数の化学成分を定性的に同定することである。このアプリケーションのために開発する分析方法は、感度が高く、かつ、混合物中における化学成分を広ダイナミックレンジ(wide dynamic range)にわたって測定可能なことが理想である。

【特許文献1】米国特許第5,538,897号明細書

【非特許文献1】J.L. DeRisi et al., Science 278:680-686 (1997)

【非特許文献2】F.P. Roth et al., Nat. Biotechnol. 16:939-945 (1998)

【非特許文献3】S.P. Gygi et al., Mol. Cell. Biol. 19:1720-1730 (1999)

【非特許文献4】L.M. Hartford and D.R. Morris, Wiley-Liss Inc (1997)

【非特許文献5】A. Varshavsky, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:12142-12149 (1996)

【非特許文献6】Mann et al., Biological Mass Spectr. 22(6): 338-45 (1993)

【非特許文献7】Henzel et al., Techniques in Protein Chemistry V, John Crabb ed., (1994)

【非特許文献8】Pappin et al., Current Biology 3:327-332 (1993)

【非特許文献9】Jensen et al., Anal. Chem. 69(23): 4741-50 (1997)

【非特許文献10】Wilm and Mann, Anal. Chem. 66:4390-4399 (1994)

【非特許文献11】W. Hines et al., J. Am. Soc. Mass Spectrom, 3:326-336 (1992)

【非特許文献12】V. Dancik et al., RECOMB, 135-144 (1999)

【非特許文献13】H. Nakayama, et al., J. Chrom. A 730:279-287 (1996)

【非特許文献14】S.M. Hanash, Electrophoresis 21:1202-1209 (2000)

【非特許文献15】A. Pandey, M.Mann, Nature 405:837-846 (2000)

【非特許文献16】M.P. Washburn, J.R. Yates, Curr. Opin. Microbiol. 3:292-297 (2000)

【非特許文献17】H. Langen et al., Electrophoresis, 21:411-429 (2000)

【非特許文献18】L. Li et al., Anal. Chem. 73:3312-3322 (2001)

【非特許文献19】Y. Shen et al., Anal. Chem. 73:3011-3021 (2001)

【非特許文献20】A. Link et al., Nat. Biotechnol. 17:676-682 (1999)

【非特許文献21】M.P. Washburn et al., Nat. Biotechnol. 19:242-247 (2001)

【非特許文献22】Y. Oda, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:6591-6596 (1999)

【非特許文献23】Gygi, S. P., et al., Nat. Biotechnol. 17:994-999 (1999)

【非特許文献24】Griffin, T.J., et al., Anal. Chem., 73:978-986 (2001)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

したがって、非常に複雑な生物学的混合物における化学成分を、総合的かつ定量的な方法により、および好ましくは総合的で定量的かつ総合的で定性的な方法により比較するこ

とを可能にする、比較的高速でかつ費用対効果の高い分析方法の必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明は、その一側面によれば、

第1の生物由来分子混合物を含む第1のサンプルを準備する工程、

前記第1の混合物中における第1の分子の、質量対電荷比以外の第1の物理化学的性質を測定する工程、

前記第1の混合物中における第1の分子の質量を分析し、そして、前記第1の混合物中における第1の分子の質量対電荷比を正確に決定する工程、

第2の生物由来分子混合物を含む第2のサンプルを準備する工程、

前記第2の混合物中における第1の分子の、質量対電荷比以外の第1の物理化学的性質を測定する工程、

前記第2の混合物中における第1の分子の質量を分析し、そして、前記第2の混合物中における第1の分子の質量対電荷比を正確に決定する工程、

および、

前記第1の混合物中における第1の分子の強度と前記第2の混合物中における第1の分子の強度とを決定する工程を含み、

前記第1の混合物中における第1の分子と前記第2の混合物中における第1の分子とは、実質的に等しい質量対電荷比を有し、かつ、実質的に等しい前記第1の物理化学的性質を有すると決定されたものである、

マススペクトル測定方法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

前記第1の混合物および/または前記第2の混合物は、複数の異なるバイオポリマー、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、アミノ酸、炭水化物、糖、脂質、脂肪酸、ビタミン、ホルモン、DNAの一部もしくは断片、cDNAの一部もしくは断片、RNAの一部もしくは断片、mRNAの一部もしくは断片、tRNAの一部もしくは断片、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、リボヌクレアーゼ、酵素、代謝産物、ポリサッカライド、リン酸化ペプチド、リン酸化タンパク質、グリコペプチド、グリコプロテインまたはステロイドを含んでいても良い。

【0018】

前記第1の混合物および/または前記第2の混合物は、好ましくは、異なる特性を有する、少なくとも2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, または 5000 の分子を含む。好ましくは、前記第1の混合物および/または前記第2の混合物は、非等モルの不均一複雑混合物 (heterogeneous complex mixture) を含む。

【0019】

前記第1の混合物中における前記第1の分子の質量対電荷比、および/または前記第2の混合物中における前記第1の分子の質量対電荷比は、好ましくは、20 ppm, 19 ppm, 18 ppm, 17 ppm, 16 ppm, 15 ppm, 14 ppm, 13 ppm, 12 ppm, 11 ppm, 10 ppm, 9 ppm, 8 ppm, 7 ppm, 6 ppm, 5 ppm, 4 ppm, 3 ppm, 2 ppm, 1 ppm または <1 ppmまでの範囲で決定する。好ましくは、前記第1の混合物中における前記第1の分子の質量対電荷比、および/または前記第2の混合物中における前記第1の分子の質量対電荷比は、15-20 ppm, 10-15 ppm, 5-10 ppm または 1-5 ppmまでの範囲で決定する。好ましくは、前記第1の混合物中における前記第1の分子の質量対電荷比、および/または前記第2の混合物中における前記第1の分子の質量対電荷比は、0.01 マスユニット, 0.009 マスユニット, 0.008 マスユニット, 0.007 マスユニット, 0.006 マスユニット, 0.005 マスユニット, 0.004 マスユニット, 0.003 マスユニット, 0.002 マスユニット, 0.001 マスユニット または <0.001 マスユニットまでの範囲で決定する。

【0020】

前記第 1 の分子の定量は、下記工程のうち少なくとも 1 つに関係していても良い。

- (i) 前記第 1 の混合物中における第 1 の分子の強度を、前記第 1 の混合物中における第 2 の分子の強度と比較する工程；
- (ii) 前記第 1 の混合物中における第 1 の分子の強度を、前記第 2 の混合物中における第 1 の分子の強度と比較する工程；
- (iii) 前記第 1 の混合物中における第 2 の分子の強度を、前記第 2 の混合物中における第 2 の分子の強度と比較する工程；
- (iv) 前記第 2 の混合物中における第 1 の分子の強度を、前記第 2 の混合物中における第 2 の分子の強度と比較する工程；および
- (v) (a) 前記第 1 の混合物中における第 1 の分子の強度と前記第 2 の混合物中における第 1 の分子の強度との比を、(b) 前記第 1 の混合物中における第 2 の分子の強度と前記第 2 の混合物中における第 2 の分子の強度との比と比較する工程。

10

【 0 0 2 1 】

前記第 1 の混合物中における第 2 の分子は、好ましくは、実質的に、前記第 2 の混合物中における第 2 の分子と同じである。

【 0 0 2 2 】

前記第 2 の分子は、前記第 1 および第 2 の混合物に対して、内因性(endogenous)または外因性(exogenous)であっても良い。

【 0 0 2 3 】

好ましくは、前記方法は、

20

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 2 の物理化学的性質を測定する工程をさらに含み、かつ、前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子が、実質的に等しい前記第 2 の物理化学的性質を有すると決定する。

【 0 0 2 4 】

好ましくは、前記方法は、

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 3 の物理化学的性質を測定する工程をさらに含み、かつ、前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子が、実質的に等しい前記第 3 の物理化学的性質を有すると決定する。

30

【 0 0 2 5 】

好ましくは、前記方法は、

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 4 の物理化学的性質を測定する工程をさらに含み、かつ、前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子が、実質的に等しい前記第 4 の物理化学的性質を有すると決定する。

【 0 0 2 6 】

好ましくは、前記方法は、

前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 5 のまたはさらなる物理化学的性質を測定する工程をさらに含み、かつ、前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子が、実質的に等しい前記第 5 のまたはさらなる物理化学的性質を有すると決定する。

40

【 0 0 2 7 】

前記第 1 のおよび / または前記第 2 のおよび / または前記第 3 のおよび / または前記第 4 のおよび / または前記第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質は、好ましくは、(i) 溶出時間(elution time)、疎水性、親水性、移動時間(migration time)、またはクロマトグラフィー保持時間(chromatographic retention time); (ii) 溶解度; (iii) 分子体積またはサイズ; (iv) 正味電荷(net charge)、荷電状態(charge state)、イオン電荷または複合的な実測荷電状態; (v) 等電点(pI); (vi) 解離定数(pKa); (vii) 抗体親和力; (viii)

50

i) 電気泳動移動度; (ix) イオン化ポテンシャル; (x) 双極子モーメント; (xi) 水素結合可能性(hydrogen-bonding capability) または水素結合能力(hydrogen-bonding capacity); および (xii) 気相中におけるイオン移動度(ion mobility)からなる群から選択される。

【0028】

前記第1の混合物中における前記第1の分子の質量対電荷比および/または前記第2の混合物中における前記第1の分子の質量対電荷比は、(i) フーリエ変換("FT")質量分析計; (ii) フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴("FTICR")質量分析計; (iii) 飛行時間("TOF")質量分析計; (iv) 直交加速式(orthogonal acceleration)飛行時間("oaTOF")質量分析計; (v) 磁気セクタ質量分析計; (vi) 四重極質量分析装置(quadrupole mass analyser); (vii) イオントラップ質量分析装置; および(viii) フーリエ変換オービトラップ(orbitrap)、静電氣的イオンサイクロトロン共鳴質量分析計または静電氣的フーリエ変換質量分析計のいずれかにより質量分析しても良い。

【0029】

前記第1のサンプルは実験用のサンプルを含んでいても良く、そして、前記第2のサンプルは対照サンプルを含んでいても良い。例えば、前記第1のサンプルは病気に罹った生物から採取しても良く、そして前記第2のサンプルは病気に罹っていない生物から採取しても良い。その他、前記第1のサンプルは治療した生物から採取しても良く、そして、前記第2のサンプルは治療していない生物から採取しても良い。さらなる選択肢としては、前記第1のサンプルは変異体の生物から採取しても良く、そして、前記第2のサンプルは野生型の生物から採取しても良い。

【0030】

前記第1の混合物中における前記第1の分子および/または前記第2の混合物中における前記第1の分子は、同定しても良い。

【0031】

実施形態は、3、4、5またはそれ以上の異なるサンプルを分析および定量できるように企図している。それに応じ、前記方法においては、

1またはそれ以上のさらなる生物由来分子混合物を含む1またはそれ以上のさらなるサンプルを準備する工程、

前記1またはそれ以上のさらなる混合物中における第1の分子の、質量対電荷比以外の第1の物理化学的性質を測定する工程、

前記1またはそれ以上のさらなる混合物中における前記第1の分子の質量を分析し、そして、前記1またはそれ以上のさらなる混合物中における前記第1の分子の質量対電荷比を正確に決定する工程、

および、

前記1またはそれ以上のさらなる混合物中における第1の分子の強度を決定する工程をさらに含み、

前記第1の混合物中における前記第1の分子、前記第2の混合物中における前記第1の分子、および前記1またはそれ以上のさらなる混合物中における前記第1の分子は、実質的に等しい質量対電荷比および実質的に等しい前記第1の物理化学的性質、および任意に等しい前記第2のおよび/または第3のおよび/または第4のおよび/または第5のものしくはさらなる物理化学的性質を有すると決定しても良い。前記第1の混合物中における前記第1の分子および/または前記第2の混合物中における前記第1の分子および/または前記1またはそれ以上のさらなる混合物中における前記第1の分子は、続いて同定しても良い。

【0032】

前記第1の分子の同定は、同じ環境下において、あらかじめ決定された閾値よりも大きな、異なる式(expression)が存在する場合にのみ実行しても良い。例えば、実験用サンプル中に存在する分子は、対照サンプルよりも高い(または低い)濃度が存在する場合にのみ同定しても良い。例えば、前記第1の混合物中における前記第1の分子および/または

前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子は、前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子の強度が、前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の強度と、あらかじめ決定した量を超えて異なる（正方向にまたは負方向に）場合にのみ同定しても良い。その他、前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子は、前記第 1 の混合物中における複数の異なる分子の平均強度が、前記第 2 の混合物中における複数の異なる分子の平均強度と、あらかじめ決定した量を超えて異なる場合にのみ同定しても良い。いずれのケースにおいても、前記あらかじめ決定した量は、(i) 1%; (ii) 2%; (iii) 5%; (iv) 10%; (v) 20%; (vi) 50%; (vii) 100%; (viii) 150%; (ix) 200%; (x) 250%; (xi) 300%; (xii) 350%; (xiii) 400%; (xiv) 450%; (xv) 500%; (xvi) 1000%; (xvii) 5000%; および (xviii) 10000% からなる群から選択しても良い。

10

【 0 0 3 3 】

一実施形態においては、分子は、データベースを参照することにより同定しても良い。例えば、前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子を同定する前記工程が、前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子の、前記第 1 の物理化学的性質、ならびに、任意に前記第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質、および前記決定された質量対電荷比を、分子のインデックス(index of molecules)と比較する工程を含み、前記インデックスが、

20

(i) 掲載された(indexed)各分子の個性(identity);
(ii) 掲載された各分子の、実験的に決定されたまたは予想された第 1 の物理化学的性質;
(iii) 掲載された各分子の、実験的に決定されたまたは予想された、正確な質量または質量対電荷比; および
(iv) 任意に、掲載された各分子の、実験的に決定されたもしくは予想された第 2 の物理化学的性質および / または、掲載された各分子の、実験的に決定されたもしくは予想された第 3 の物理化学的性質、および / または掲載された各分子の、実験的に決定されたもしくは予想された第 4 の物理化学的性質、および / または掲載された各分子の、実験的に決定されたもしくは予想された第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質を含んでも良い。前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子はペプチドを含んでも良く、そして、前記分子のインデックスはペプチドのインデックスを含んでも良い。前記ペプチドのインデックスは、1 またはそれ以上のタンパク質が、どのようにして断片化または消化され、複数のペプチドを生じることが可能であるかを決定することにより生成されたものであっても良い。その他、前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子はペプチドを含んでも良く、そして、前記分子のインデックスがタンパク質のインデックスを含んでも良い。

30

【 0 0 3 4 】

他の一実施形態によれば、前記データのうち少なくともいくつかを計算しても良い。それに応じ、前記第 1 の混合物中における前記第 1 の分子および / または前記第 2 の混合物中における前記第 1 の分子を同定する前記工程は、前記第 1 のおよび / または第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質を前記分子のインデックスから計算する工程を含み、前記インデックスが、

40

(i) 掲載された各分子の個性; および
(ii) 掲載された各分子の、実験的に決定されたまたは予想された、正確な質量または質量対電荷比を含んでも良い。

【 0 0 3 5 】

前記分子のインデックスは、(i) タンパク質またはプロテオーム(proteome)のシーケンスデータベース; (ii) 発現シーケンスタグ (Expressed Sequence Tag)(EST)のデータベ

50

ース；または (iii) 遺伝子もしくはゲノムのデータベースを含んでも良い。

【0036】

他の実施形態は、正確な質量および他の物理化学的性質の両方を含むデータベースを参照し、他の物理化学的性質を、前記データベース中のデータから計算することを企図する。例えば、前記データベースは、分子のリストおよびそれらの正確な質量と保持時間を含んでも良く、そして、解離定数(pKa)等の第2の物理化学的性質を計算しても良い。

【0037】

前記第1の混合物中における前記第1の分子および/または前記第2の混合物中における前記第1の分子は、

(i) 前記第1の混合物中における前記第1の分子および/または前記第2の混合物中における前記第1の分子の、決定した質量対電荷比を、掲載された分子の質量または質量対電荷比と比較した際の近似性；および/または

(ii) 前記第1の混合物中における前記第1の分子および/または前記第2の混合物中における前記第1の分子の、前記第1の物理化学的性質を、掲載された分子における前記第1の物理化学的性質と比較した際の近似性；および/または

(iii) 前記第1の混合物中における前記第1の分子および/または前記第2の混合物中における前記第1の分子の、第2の物理化学的性質を、掲載された分子における前記第2の物理化学的性質と比較した際の近似性；および/または

(iv) 前記第1の混合物中における前記第1の分子および/または前記第2の混合物中における前記第1の分子の、第3の物理化学的性質を、掲載された分子における前記第3の物理化学的性質と比較した際の近似性；および/または

(v) 前記第1の混合物中における前記第1の分子および/または前記第2の混合物中における前記第1の分子の、第4の物理化学的性質を、掲載された分子における前記第4の物理化学的性質と比較した際の近似性；および/または

(vi) 前記第1の混合物中における前記第1の分子および/または前記第2の混合物中における前記第1の分子の、第5のもしくはさらなる物理化学的性質を、掲載された分子における前記第5のもしくはさらなる物理化学的性質と比較した際の近似性に基き同定しても良い。

【0038】

本発明は、他の一側面によれば、

生物由来分子混合物を準備する工程、

前記混合物中における第1の分子の、質量対電荷比以外の第1の物理化学的性質を測定する工程、

前記第1の分子の質量を分析し、そして、前記第1の分子の質量対電荷比を正確に決定する工程、

および、

前記第1の分子を、少なくとも、前記第1の分子における前記第1の物理化学的性質および前記正確に決定した質量対電荷比に基き同定する工程を含む、

マススペクトル測定方法を提供する。

【0039】

前記分子混合物は、好ましくは、複数の異なるバイオポリマー、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、アミノ酸、炭水化物、糖、脂質、脂肪酸、ビタミン、ホルモン、DNAの一部もしくは断片、cDNAの一部もしくは断片、RNAの一部もしくは断片、mRNAの一部もしくは断片、tRNAの一部もしくは断片、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、リボヌクレアーゼ、酵素、代謝産物、ポリサッカライド、リン酸化ペプチド、リン酸化タンパク質、グリコペプチド、グリコプロテインまたはステロイドを含む。

【0040】

前記第1の分子は、さらに定量しても良い。

【0041】

本発明は、他の一側面によれば、
ペプチド混合物を準備する工程、
前記混合物中における、ペプチドを含む第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 1 の物理化学的性質を測定する工程、
前記ペプチドを含む第 1 の分子の質量対電荷比を正確に決定する工程、
および、
前記ペプチドを含む第 1 の分子を、少なくとも、前記ペプチドを含む第 1 の分子における、前記測定した第 1 の物理化学的性質および前記正確に決定した質量対電荷比に基づき同定する工程を含む、
マススペクトル測定方法を提供する。

10

【0042】

1 もしくはそれ以上のペプチドおよび / または 1 もしくはそれ以上の合成分子を含む内部標準を、前記ペプチド混合物または前記ペプチド混合物のフラクション(fraction)に添加しても良い。

【0043】

本発明は、他の一側面によれば、
タンパク質混合物を準備する工程、
少なくとも前記タンパク質のうちいくつかに由来するペプチドの混合物を準備する工程、
前記タンパク質混合物中における少なくとも 1 つのタンパク質および / または、前記ペプチド混合物中におけるペプチドを含む第 1 の分子の、質量または質量対電荷比以外の第 1 の物理化学的性質を測定する工程、
前記ペプチドを含む第 1 の分子の質量対電荷比を正確に決定する工程、
および、
前記ペプチドを含む第 1 の分子を、少なくとも、前記ペプチドを含む第 1 の分子における、前記測定した第 1 の物理化学的性質および前記正確に決定した質量対電荷比に基づき同定する工程を含む、
マススペクトル測定方法を提供する。

20

【0044】

1 もしくはそれ以上のタンパク質および / または 1 もしくはそれ以上の合成分子を含む内部標準を、前記タンパク質混合物または前記タンパク質混合物のフラクション(fraction)に添加しても良い。

30

【0045】

前記タンパク質混合物は、あらかじめ分画しても良い。例えば、前記方法においては、前記タンパク質混合物を分画する工程、好ましくは、1 次元電気泳動法、例えば 1D ゲル、多次元電気泳動法、例えば 2D ゲル、サイズ排除クロマトグラフィー、またはアフィニティークロマトグラフィーにより、1 またはそれ以上のタンパク質を前記タンパク質混合物から分離するように分画する工程をさらに含み、かつ、前記タンパク質混合物から分離した前記 1 またはそれ以上のタンパク質を、次に、前記ペプチド混合物を与えるように消化または断片化しても良い。

40

【0046】

他の実施形態によれば、前記タンパク質混合物は、あらかじめタンパク質の分画を何ら行なうことなく消化しても良く、そして、それゆえに、前記方法は、前記タンパク質混合物を、前記ペプチド混合物を与えるように消化または断片化する工程をさらに含んでも良い。

【0047】

前記ペプチドは、質量分析に先立ち分画しても良い。前記方法は、1 またはそれ以上のペプチドの第 1 のフラクションを前記ペプチド混合物から分離する工程をさらに含んでも良い。前記 1 またはそれ以上のペプチドは、(i) 高速液体クロマトグラフィー("HPLC"); (ii) 陰イオン交換; (iii) 陰イオン交換クロマトグラフィー; (iv) 陽イオン交換;

50

(v) 陽イオン交換クロマトグラフィー; (vi) イオン対逆相クロマトグラフィー; (vii) クロマトグラフィー; (viii) 一次元電気泳動法; (ix) 多次元電気泳動法; (x) サイズ排除; (xi) アフィニティー; (xii) 逆相クロマトグラフィー; (xiii) キャピラリー電気泳動クロマトグラフィー("CEC"); (xiv) 電気泳動法; (xv) イオン移動度分離法(ion mobility separation); (xvi) 電界非対称性イオン移動度分離法(Field Asymmetric Ion Mobility Separation) ("FAIMS"); または (xvi) キャピラリー電気泳動法により前記ペプチド混合物から分離しても良い。好ましくは、前記第1のフラクション中における前記1またはそれ以上のペプチドは、実質的に等しい前記第1の物理化学的性質、好ましくは、等しい溶出時間、疎水性、親水性、移動時間またはクロマトグラフィー保持時間を有する。それゆえに、クロマトグラフィー方法は、1またはそれ以上のペプチドを、例えば、溶出時間、疎水性、親水性、移動時間またはクロマトグラフィー保持時間に基づき、ペプチドのプール(pool)から分離するために用いても良い。

10

【0048】

前記ペプチドは、さらに定量しても良い。

【0049】

特に好ましい実施形態によれば、同定された1またはそれ以上のペプチドと相関関係があるタンパク質または翻訳後修飾(Post Translationally Modified) ("PTM")タンパク質を同定しても良い。前記タンパク質または翻訳後修飾タンパク質は、さらに、それ自体を定量しても良い。

20

【0050】

前記同定プロセスにおいては、種々の改良を企図している。一の改良は、前記タンパク質または前記翻訳後修飾タンパク質と相関関係があると考えられる全てのペプチドの強度が、あらかじめ決定された1またはそれ以上の範囲内に含まれる(すなわち、前記強度が矛盾しない)ことをチェックする工程をさらに含む。

【0051】

タンパク質およびペプチドに加え、本発明は、代謝産物の分析に特に好適である。他の一側面によれば、本発明は、

代謝産物の混合物を準備する工程、

前記混合物中における代謝産物を含む第1の分子の、質量対電荷比以外の第1の物理化学的性質を測定する工程、

30

前記代謝産物を含む第1の分子の質量対電荷比を正確に決定する工程、

および、

前記代謝産物を含む第1の分子を、少なくとも、前記代謝産物を含む第1の分子における、前記測定した第1の物理化学的性質および前記正確に決定した質量対電荷比に基づき同定する工程を含む、

マススペクトル測定方法を提供する。

【0052】

前記混合物中における前記代謝産物のうち少なくとも一部(at least some)は、血漿および/または尿および/または糞便および/または汗および/または呼気から抽出しても良い。

40

【0053】

他の一側面によれば、本発明は、

(i) DNAの一部もしくは断片を複数; (ii) RNAの一部もしくは断片を複数; (iii) オリゴヌクレオチドを複数および/もしくはオリゴヌクレオシドを複数; (iv) 核酸を複数; (v) 遺伝子の一部もしくは断片を複数; (vi) リボヌクレアーゼ(RNases)を複数; (vii) cDNAの一部もしくは断片を複数; (viii) mRNAの一部もしくは断片を複数; または (ix) tRNAの一部もしくは断片を複数含む混合物を準備する工程、

前記混合物中における第1の分子の、質量対電荷比以外の第1の物理化学的性質を測定する工程、

前記第1の分子における質量対電荷比を正確に決定する工程、

50

および、

前記第1の分子を、少なくとも、前記第1の分子における、前記測定した第1の物理化学的性質および前記正確に決定した質量対電荷比に基づき同定する工程を含む、マスペクトル測定方法を提供する。

【0054】

他の一側面によれば、本発明は、

(i) リン酸化ペプチド; (ii) リン酸化タンパク質; (iii) グリコペプチド; (iv) グリコプロテイン; (v) 炭水化物; (vi) 糖; (vii) 脂質; (viii) 脂肪酸; (ix) ビタミン; (x) ホルモン; (xi) ステロイド; (xii) モノクローナルまたはポリクローナル抗体; および (xiii) ポリサッカライドを含む群から選択される混合物を準備する工程、

10

前記混合物中における第1の分子の、質量対電荷比以外の第1の物理化学的性質を測定する工程、

前記第1の分子における質量対電荷比を正確に決定する工程、

および、

前記第1の分子を、少なくとも、前記第1の分子における、前記測定した第1の物理化学的性質および前記正確に決定した質量対電荷比に基づき同定する工程を含む、マスペクトル測定方法を提供する。

【0055】

前記混合物は、好ましくは、異なる特性を有する、少なくとも2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, または 5000の分子を含む。前記好ましい実施形態は、非等モルの不均一複雑混合物 (heterogeneous complex mixture) に対する使用に特に好適である。

20

前記第1の分子における質量対電荷比を正確に決定する前記工程は、好ましくは、前記第1の分子における質量対電荷比を、20 ppm, 19 ppm, 18 ppm, 17 ppm, 16 ppm, 15 ppm, 14 ppm, 13 ppm, 12 ppm, 11 ppm, 10 ppm, 9 ppm, 8 ppm, 7 ppm, 6 ppm, 5 ppm, 4 ppm, 3 ppm, 2 ppm, 1 ppm または <1 ppmまでの範囲で決定することを含む。好ましくは、前記第1の分子における質量対電荷比を正確に決定する前記工程は、前記第1の分子における質量対電荷比を、15-20 ppm, 10-15 ppm, 5-10 ppm または 1-5 ppmまでの範囲で決定することを含む。好ましくは、前記第1の分子における質量対電荷比を正確に決定する前記工程は、前記第1の分子における質量対電荷比を、0.01 マスユニット, 0.009 マスユニット, 0.008 マスユニット, 0.007 マスユニット, 0.006 マスユニット, 0.005 マスユニット, 0.004 マスユニット, 0.003 マスユニット, 0.002 マスユニット, 0.001 マスユニット または <0.001 マスユニットまでの範囲で決定することを含む。

30

【0056】

前記第1の分子は、前記第1の物理化学的性質、例えば、溶出 / 保持時間の効力によって前記混合物中における他の分子から分離しても良い。

【0057】

前記第1の分子は、時間的におよび / または空間的に、前記混合物中における他の分子と分離しても良い。

40

【0058】

好ましくは、前記第1の分子は、(i) 高速液体クロマトグラフィー ("HPLC"); (ii) 陰イオン交換; (iii) 陰イオン交換クロマトグラフィー; (iv) 陽イオン交換; (v) 陽イオン交換クロマトグラフィー; (vi) イオン対逆相クロマトグラフィー; (vii) クロマトグラフィー; (viii) 一次元電気泳動法; (ix) 多次元電気泳動法; (x) サイズ排除; (xi) アフィニティー; (xii) 逆相クロマトグラフィー; (xiii) キャピラリー電気泳動クロマトグラフィー ("CEC"); (xiv) 電気泳動法; (xv) イオン移動度分離法 (ion mobility separation); (xvi) 電界非対称性イオン移動度分離法 (Field Asymmetric Ion Mobility Separation) ("FAIMS"); または (xvii) キャピラリー電気泳動法により前記混合物中における他の分子から分離する。

50

【 0 0 5 9 】

実施形態は、さらに、前記第 1 の物理化学的性質（例えば、正味電荷(net charge)、荷電状態(charge state)、イオン電荷または複合的な実測荷電状態）を、前記混合物中における分子のマススペクトルから決定することを企図する。

【 0 0 6 0 】

前記方法は、

前記混合物中における前記第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 2 の物理化学的性質を測定する工程をさらに含んでも良く、前記第 2 の物理化学的性質は前記第 1 の物理化学的性質とは異なり、かつ、

前記第 1 の分子を同定する前記工程は、前記第 1 の分子を、少なくとも、前記第 1 の分子における前記第 1 および第 2 の物理化学的性質ならびに前記決定した質量対電荷比に基づき同定することをさらに含んでも良い。

10

【 0 0 6 1 】

前記方法は、

前記混合物中における前記第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 3 の物理化学的性質を測定する工程をさらに含んでも良く、前記第 3 の物理化学的性質は前記第 1 および第 2 の物理化学的性質とは異なり、かつ、

前記第 1 の分子を同定する前記工程は、前記第 1 の分子を、少なくとも、前記第 1 の分子における前記第 1、第 2 および第 3 の物理化学的性質ならびに前記決定した質量対電荷比に基づき同定することをさらに含んでも良い。

20

【 0 0 6 2 】

前記方法は、

前記混合物中における前記第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 4 の物理化学的性質を測定する工程をさらに含んでも良く、前記第 4 の物理化学的性質は前記第 1、第 2 および第 3 の物理化学的性質とは異なり、かつ、

前記第 1 の分子を同定する前記工程は、前記第 1 の分子を、少なくとも、前記第 1 の分子における前記第 1、第 2、第 3 および第 4 の物理化学的性質ならびに前記決定した質量対電荷比に基づき同定することをさらに含んでも良い。

【 0 0 6 3 】

前記方法は、

前記混合物中における前記第 1 の分子の、質量対電荷比以外の第 5 のまたはさらなる物理化学的性質を測定する工程をさらに含んでも良く、前記第 5 のまたはさらなる物理化学的性質は前記第 1、第 2、第 3 および第 4 の物理化学的性質とは異なり、かつ、

前記第 1 の分子を同定する前記工程は、前記第 1 の分子を、少なくとも、前記第 1 の分子における前記第 1、第 2、第 3、第 4、第 5 のまたはさらなる物理化学的性質ならびに前記決定した質量対電荷比に基づき同定することをさらに含んでも良い。

30

【 0 0 6 4 】

前記第 1 のおよび / または第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質は、(i) 溶出時間(elution time)、疎水性、親水性、移動時間(migration time)、またはクロマトグラフィー保持時間(chromatographic retention time); (ii) 溶解度; (iii) 分子体積またはサイズ; (iv) 正味電荷(net charge)、荷電状態(charge state)、イオン電荷または複合的な実測荷電状態; (v) 等電点(pI); (vi) 解離定数(pKa); (vii) 抗体親和力; (viii) 電気泳動移動度; (ix) イオン化ポテンシャル; (x) 双極子モーメント; (xi) 水素結合可能性(hydrogen-bonding capability) または水素結合能力(hydrogen-bonding capacity); および (xii) 気相中におけるイオン移動度(ion mobility)からなる群から選択されても良い。

40

【 0 0 6 5 】

1 もしくはそれ以上の内因性(endogenous)および / または 1 もしくはそれ以上の外因性(exogenous)分子を内部標準として用いても良い。前記内部標準は、少なくとも前記第 1 の物理化学的性質を、ならびに任意に前記第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第

50

4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質を較正する (calibrate) ために使用しても良い。

【 0 0 6 6 】

前記第 1 の分子を同定する前記工程は、前記第 1 の分子の、前記第 1 の物理化学的性質、ならびに、任意に前記第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のしくはさらなる物理化学的性質、および前記決定された質量対電荷比を、分子のインデックス (index of molecules) と比較する工程を含んでいても良く、前記インデックスが、

(i) 掲載された (indexed) 各分子の個性 (identity);

(ii) 掲載された各分子の、実験的に決定されたまたは予想された第 1 の物理化学的性質; および

(iii) 掲載された各分子の、実験的に決定されたまたは予想された、正確な質量または質量対電荷比を含んでいても良い。

【 0 0 6 7 】

前記第 1 の分子はペプチドを含み、かつ、前記分子のインデックスはペプチドのインデックスを含む。

【 0 0 6 8 】

前記ペプチドのインデックスは、1 またはそれ以上のタンパク質が、どのようにして断片化または消化され、複数のペプチドを生じることが可能であるかを決定することにより生成されたものであっても良い。

【 0 0 6 9 】

前記第 1 の分子はペプチドを含んでいても良く、そして、前記分子のインデックスはタンパク質のインデックスを含んでいても良い。

【 0 0 7 0 】

好ましくは、前記第 1 の分子は、

(i) 前記第 1 の分子の、決定した質量対電荷比を、掲載された分子の質量または質量対電荷比と比較した際の近似性; および / または

(ii) 前記第 1 の分子の、前記第 1 の物理化学的性質を、掲載された分子における前記第 1 の物性値と比較した際の近似性; および / または

(iii) 前記第 1 の分子の、第 2 の物理化学的性質を、掲載された分子における前記第 2 の物性値と比較した際の近似性; および / または

(iv) 前記第 1 の分子の、第 3 の物理化学的性質を、掲載された分子における前記第 3 の物性値と比較した際の近似性; および / または

(v) 前記第 1 の分子の、第 4 の物理化学的性質を、掲載された分子における前記第 4 の物性値と比較した際の近似性; および / または

(vi) 前記第 1 の分子の、第 5 のしくはさらなる物理化学的性質を、掲載された分子における前記第 5 のしくはさらなる物性値と比較した際の近似性に基づき同定する。

【 0 0 7 1 】

好ましくは、前記第 1 の分子を同定する前記工程は、前記第 1 のおよび / または第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のしくはさらなる物理化学的性質を分子のインデックスから計算する工程を含み、前記インデックスは、

(i) 掲載された各分子の個性; および

(ii) 掲載された各分子の、実験的に決定されたまたは予想された、正確な質量または質量対電荷比を含む。

【 0 0 7 2 】

前記インデックスは、タンパク質もしくはプロテオーム (proteome) のシーケンスデータベース、発現シーケスタグ (Expressed Sequence Tag) (EST) のデータベース、または遺伝子もしくはゲノムのデータベースを含んでいても良い。

【 0 0 7 3 】

10

20

30

40

50

他の一側面によれば、本発明は、生物由来分子をマスペクトル測定により同定するために使用するインデックスを生成させる方法であり、

生物由来分子の質量または質量対電荷比を正確に決定する工程、

前記生物由来分子における、質量または質量対電荷比以外の第 1 の物理化学的性質を決定する工程、および

任意に、前記生物由来分子における第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質を決定する工程を含む方法を提供する。

【 0 0 7 4 】

他の一側面によれば、本発明は、生物由来分子をマスペクトル測定により同定するために使用するインデックスを生成させる方法であり、

ポリペプチドまたはタンパク質の消化または断片化により生じるペプチドを含む分子の質量または質量対電荷比を正確に決定する工程、

前記ペプチドを含む分子における、質量または質量対電荷比以外の第 1 の物理化学的性質を決定する工程、および

任意に、前記ペプチドを含む分子における第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質を決定する工程を含む方法を提供する。

【 0 0 7 5 】

他の一側面によれば、本発明は、生物由来分子をマスペクトル測定により同定するために使用するインデックスを生成させる方法であり、

ポリペプチドまたはタンパク質の消化または断片化により生じるペプチドを含む分子の質量または質量対電荷比を正確に決定する工程、

前記ペプチドが由来する 1 またはそれ以上のタンパク質における、質量または質量対電荷比以外の第 1 の物理化学的性質を決定する工程、および

任意に、前記タンパク質における第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質を決定する工程を含む方法を提供する。

【 0 0 7 6 】

好ましくは、前記分子における前記質量対電荷比は、20 ppm, 19 ppm, 18 ppm, 17 ppm, 16 ppm, 15ppm, 14 ppm, 13 ppm, 12 ppm, 11 ppm, 10 ppm, 9 ppm, 8 ppm, 7 ppm, 6 ppm, 5 ppm, 4 ppm, 3 ppm, 2 ppm, 1 ppm または <1 ppm までの範囲で決定する。好ましくは、前記分子における前記質量対電荷比は、15-20 ppm, 10-15 ppm, 5-10 ppm または 1-5 ppm までの範囲で決定する。好ましくは、前記分子における前記質量対電荷比は、0.01 マスユニット, 0.009 マスユニット, 0.008 マスユニット, 0.007 マスユニット, 0.006 マスユニット, 0.005 マスユニット, 0.004 マスユニット, 0.003 マスユニット, 0.002 マスユニット, 0.001 マスユニット または <0.001 マスユニットまでの範囲で決定する。

【 0 0 7 7 】

前記第 1 のおよび / または第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質は、(i) 溶出時間(elution time)、疎水性、親水性、移動時間(migration time)、またはクロマトグラフィー保持時間(chromatographic retention time); (ii) 溶解度; (iii) 分子体積またはサイズ; (iv) 正味電荷(net charge)、荷電状態(charge state)、イオン電荷または複合的な実測荷電状態; (v) 等電点(pI); (vi) 解離定数(pKa); (vii) 抗体親和力; (viii) 電気泳動移動度; (ix) イオン化ポテンシャル; (x) 双極子モーメント; (xi) 水素結合可能性(hydrogen-bonding capability) または水素結合能力(hydrogen-bonding capacity); および (xii) 気相中におけるイオン移動度(ion mobility)からなる群から選択しても良い。

【 0 0 7 8 】

比較的低い(lower)閾値以下に質量または質量対電荷比を有する分子に対し、相対的に

10

20

30

40

50

低い優先順位を割り当てても良い。実際には、そのような分子は事実上無視しても良い。前記比較的低い閾値は、(i) <500 ダルトン；(ii) 500-1000 ダルトン；(iii) 1000-1500 ダルトン；(iv) 1500-2000 ダルトン；(v) 2000-2500 ダルトン；(vi) 2500-3000 ダルトン；および (vii) 3000-3500 ダルトンの範囲であっても良い。前記比較的低い閾値は、例えば、6, 7, 8, 9, 10, 11 または 12 よりも少ないアミノ酸を有するペプチドにおける質量または質量対電荷比に相当しても良い。比較的高い(upper)閾値以上に質量または質量対電荷比を有する分子に対してもまた、相対的に低い優先順位を割り当てても良い。前記比較的高い閾値は、(i) 5000-5500 ダルトン；(ii) 5500-6000 ダルトン；(iii) 6000-6500 ダルトン；(iv) 6500-7000 ダルトン；(v) 7000-7500 ダルトン；(vi) 7500-8000 ダルトン；(vii) 8000-8500 ダルトン；(viii) 8500-9000 ダルトン；(ix) 9000-9500 ダルトン；(x) 9500-10000 ダルトン；(xi) 10000-10500 ダルトン；(xii) 10500-11000 ダルトン；(xiii) 11000-11500 ダルトン；(xiv) 11500-12000 ダルトン；(xv) 12000-12500 ダルトン；(xvi) 12500-13000 ダルトン；(xvii) 13000-13500 ダルトン；(xviii) 13500-14000 ダルトン；(xix) 14000-14500 ダルトン；(xx) 14500-15000 ダルトン；(xxi) 15000-15500；(xxii) 15500-16000；(xxiii) 16000-16500；および (xiv) >16500 ダルトンの範囲であっても良い。

10

【 0 0 7 9 】

前記第 1 のおよび / または第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のおよびさらなる物理化学的性質は、計算しても良い。

20

【 0 0 8 0 】

他の一側面によれば、本発明は、
質量分析計であって、

前記第 1 の分子における質量対電荷比を正確に決定する質量分析装置(mass analyser)を含み、

使用において、少なくとも、前記第 1 の分子における質量対電荷比以外の第 1 の物理化学的性質を測定し、そして、任意に、第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のもしくはさらなる物理化学的性質を測定し、

かつ、前記質量分析計は、少なくとも、前記第 1 の分子における前記第 1 の物理化学的性質および前記正確に決定した質量対電荷比に基づき、そして、任意に、前記第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のしくはさらなる物理化学的性質に基づき、前記第 1 の分子を同定する手段をさらに含む、質量分析計を提供する。

30

【 0 0 8 1 】

前記第 1 のおよび / または第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のしくはさらなる物理化学的性質は、(i) 液体クロマトグラフィーもしくは高速液体クロマトグラフィー("HPLC")カラム；(ii) 逆相高速液体クロマトグラフィーカラム；(iii) 超高压液体クロマトグラフィーカラム；(iv) サイズ排除クロマトグラフィーカラム；(v) アフィニティークロマトグラフィーカラム；(vi) キャピラリー電気泳動("CE")カラム；(vii) イオンクロマトグラフィーカラム；(viii) 1 次元もしくは多次元電気泳動デバイス；または (ix) ガスを含むドリフトチューブを用いて測定しても良い。

40

【 0 0 8 2 】

前記第 1 のおよび / または第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のしくはさらなる物理化学的性質は、付加的に / 択一的に、前記第 1 の分子のマススペクトルから計っても良い。例えば、正味電荷(net charge)、荷電状態(charge state)、イオン電荷または複合的な実測荷電状態を、測定するか、または、マススペクトルピークにおける質量対電荷比分離の効力により、マススペクトルから決定しても良い。

【 0 0 8 3 】

前記第 1 のおよび / または第 2 のおよび / または第 3 のおよび / または第 4 のおよび / または第 5 のしくはさらなる物理化学的性質は、(i) 溶出時間(elution time)、疎水性、親水性、移動時間(migration time)、またはクロマトグラフィー保持時間(chromatographic retention time)；(ii) 溶解度；(iii) 分子体積またはサイズ；(iv) 正味電荷(net

50

charge)、荷電状態(charge state)、イオン電荷または複合的な実測荷電状態；(v) 等電点(pl)；(vi) 解離定数(pKa)；(vii) 抗体親和力；(viii) 電気泳動移動度；(ix) イオン化ポテンシャル；(x) 双極子モーメント；(xi) 水素結合可能性(hydrogen-bonding capability) または水素結合能力(hydrogen-bonding capacity)；および (xii) 気相中におけるイオン移動度(ion mobility)からなる群から選択されても良い。

【0084】

前記第1の分子における質量対電荷比は、好ましくは、20 ppm, 19 ppm, 18 ppm, 17 ppm, 16 ppm, 15 ppm, 14 ppm, 13 ppm, 12 ppm, 11 ppm, 10 ppm, 9 ppm, 8 ppm, 7 ppm, 6 ppm, 5 ppm, 4 ppm, 3 ppm, 2 ppm, 1 ppm または <1 ppmまでの範囲で決定する。好ましくは、前記第1の分子における質量対電荷比は、15-20 ppm, 10-15 ppm, 5-10 ppm または 1-5 ppmまでの範囲で決定する。好ましくは、前記第1の分子における質量対電荷比は、0.01 マスユニット, 0.009 マスユニット, 0.008 マスユニット, 0.007 マスユニット, 0.006 マスユニット, 0.005 マスユニット, 0.004 マスユニット, 0.003 マスユニット, 0.002 マスユニット, 0.001 マスユニット または <0.001 マスユニットまでの範囲で決定する。

【0085】

前記質量分析計は、フーリエ変換("FT")質量分析計、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴("FTICR")質量分析計、飛行時間("TOF")質量分析計、直交加速式(orthogonal acceleration)飛行時間("oaTOF")質量分析計、磁気セクタ質量分析計、四重極質量分析装置(quadrupole mass analyser)、イオントラップ質量分析装置またはフーリエ変換オービトラップ(orbitrap)、静電氣的イオンサイクロトロン共鳴質量分析計または静電氣的フーリエ変換質量分析計を含んでいても良い。

【0086】

前記質量分析計は、好ましくは、主として分子イオンまたは擬分子イオン(molecular or pseudo-molecular ions)を生成するイオン源をさらに含む。前記イオン源は、大気圧イオン化源(atmospheric pressure ionization source)、例えば、電子スプレーイオン化(Electrospray ionisation) ("ESI")イオン源、大気圧化学イオン化(Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) ("APCI")イオン源、大気圧光イオン化(Atmospheric Pressure Photo Ionisation) ("APPI")イオン源または、大気圧マトリクス補助レーザー脱着イオン化(Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) ("MALDI")イオン源を含んでいても良い。その他、前記イオン源は、非大気圧イオン化源(non-atmospheric pressure ionization source)、例えば、高速原子衝突 ("FAB")イオン源、液体二次イオン質量分析(Liquid Secondary Ions Mass Spectrometry) ("LSIMS")イオン源、マトリクス補助レーザー脱着イオン化(Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) ("MALDI")イオン源、マトリクス補助レーザー脱着イオン化(Matrix Assisted Laser Desorption) ("MALDI")イオン源と、衝突冷却イオン(collisionally cooling ions)のための衝突セルとの組み合わせ、または、レーザー脱着イオン化(Laser Desorption Ionisation) ("LDI")イオン源を含んでいても良い。

【0087】

他の一側面によれば、本発明は、
質量分析計であって、

前記質量分析計により分析される第1の分子を同定するための同定手段を含み、前記同定手段は、使用時に分子のインデックスを参照し、

前記インデックスが、

- (i) 掲載された(indexed)各分子の個性(identity)；
- (ii) 掲載された各分子の、実験的に決定されたまたは予想された第1の物理化学的性質；
- (iii) 掲載された各分子の、実験的に決定されたまたは予想された、正確な質量または質量対電荷比；および
- (iv) 任意に、掲載された各分子の、実験的に決定されたまたは予想された、第2のおよび / または第3のおよび / または第4のおよび / または第5のもしくはさらなる物理化学

的性質を含む、
質量分析計を提供する。

【0088】

好ましくは、前記インデックスは、少なくとも部分的に、前記質量分析計により保存されもしくは生成され、および/または、前記インデックスは、少なくとも部分的に、遠隔的に、好ましくはインターネットにより、保存されもしくは生成される。

【0089】

他の一側面によれば、本発明は、
質量分析計であって、

前記質量分析計により分析される第1の分子を同定するための同定手段を含み、前記同定手段は、使用時に分子のインデックスを参照し、

前記インデックスが、

(i) 掲載された(indexed)各分子の個性(identity);および

(ii) 掲載された各分子の、実験的に決定されたまたは予想された質量または質量対電荷比を含み、

かつ、前記同定手段は、前記インデックス中における前記分子の、質量または質量対電荷比以外の第1の物理化学的性質をさらに決定し、そして、任意に、前記インデックス中における前記分子の、第2のおよび/または第3のおよび/または第4のおよび/または第5のもしくはさらなる物理化学的性質をさらに決定する、
質量分析計を提供する。

【0090】

好ましくは、前記インデックスは、(i) タンパク質またはプロテオーム(proteome)のシーケンスデータベース; (ii) 発現シーケンスタグ (Expressed Sequence Tag) (EST) のデータベース; または (iii) 遺伝子もしくはゲノムのデータベースを含む。

【0091】

他の一側面によれば、本発明は、
タンパク質混合物を準備する工程、

少なくとも前記タンパク質のうちいくつかに由来するペプチド混合物を準備する工程、
前記タンパク混合物中における少なくとも1つのタンパク質および/または前記ペプチド混合物中におけるペプチドを含む第1の分子の、質量または質量対電荷比以外の第1の物理化学的性質を測定する工程、

任意に、前記タンパク混合物中における少なくとも1つのタンパク質および/または前記ペプチド混合物中における前記ペプチドを含む第1の分子の、質量または質量対電荷比以外の第2のおよび/または第3のおよび/または第4のおよび/または第5のもしくはさらなる物理化学的性質を測定する工程、

前記ペプチドを含む第1の分子の質量対電荷比を正確に決定する工程、および

前記ペプチドを含む第1の分子を、少なくとも、前記測定した、前記タンパク混合物中における少なくとも1つのタンパク質および/または前記ペプチド混合物中におけるペプチドを含む第1の分子の質量または質量対電荷比以外の第1の物理化学的性質、ならびに前記正確に決定した前記第1のペプチドの質量対電荷比に基づき、ならびに任意に前記第2のおよび/または第3のおよび/または第4のおよび/または第5のもしくはさらなる物理化学的性質に基づき同定する工程を含む、
マススペクトル測定方法を提供する。

【0092】

好ましい実施形態は、混合物中に存在するバイオポリマーを同定および/または定量する分析方法を提供する。前記バイオポリマーは、タンパク質であっても良い。調査する混合物は、各成分の保持時間を記録している間、1またはそれ以上の分離工程により分画しても良い。前記バイオポリマーがタンパク質である場合は、各フラクションは、ペプチド混合物を得るために、続いて酵素消化にかけても良い。これらペプチドプールは、続いて、各成分の保持時間を記録している間、1またはそれ以上の分離工程により分画しても良

10

20

30

40

50

い。各フラクションは、続いて、前記ペプチドの質量および面積(areas)を決定するために、質量分析にかけても良い。これら処理工程を通じて、種々の内部標準および校正用物質(calibrants)を、前記工程の性能および再現性をモニターするために前記サンプル内に導入しても良い。

【0093】

調査するサンプルについて、適切なデータベースを計算により構築しても良い。このデータベースは、調査するサンプルに含まれると仮定されるタンパク質のシーケンスを収集したものを含んでいても良く、そして、公知のおよび/または仮定される翻訳後修飾を含んでいても良い。前記データベースは、続いて、(a) 用いた実験的パラメータに基づき、タンパク質の保持時間を、(b) 用いた実験的パラメータに基づき、酵素消化により生成したペプチドを、(c) 用いた実験的パラメータに基づくペプチドの保持時間を、および(d) 前記ペプチドの質量を、予測することにより拡張しても良い。

10

【0094】

前記実験データは、生成させたデータベースと比較する。各データポイントは、前記混合物中のタンパク質を同定する相関関係の統計学的有意性に基づき、1つのペプチドに帰属する。さらに、前記帰属したペプチドの面積は、ペプチドおよび/または翻訳後修飾ペプチドの相対変化を決定するために、タンパク質混合物と比較する。最終的に、この分析から得られた定量的情報を、前記タンパク質帰属を検証するために用いても良い。

【0095】

マスペクトル測定方法は、混合物中の複数の生物学的分子における正確な質量のキャラクタリゼーションのために用い、特に、1またはそれ以上の前記生物学的分子をキャラクタライズする場合、そのようにして前記混合物における成分のうち1またはそれ以上を同定および/または定量しても良い。

20

【0096】

一揃いのバイオポリマー候補のうち、どのメンバーが、サンプルであるバイオポリマーの混合物中に存在するかを決定するために、1つの方法を提供する。前記方法は、(a) 任意に、前記サンプルバイオポリマーの混合物を1またはそれ以上の分画工程にかけ、複数のサンプルバイオポリマーフラクションを得る工程、(b) 複数の前記サンプルバイオポリマーを選択的に消化し、サンプル断片の混合物を含む消化物を得る工程、(c) 前記消化物を1またはそれ以上の文各工程にかけ、複数のサンプル断片フラクションを得る工程、(d) 1またはそれ以上のフラクション中に存在するこのサンプル断片における正確な質量を決定する工程、(e) 各個のサンプル断片が分画された特定のサンプル断片フラクションに基づき、1またはそれ以上の物理化学的性質を個々のサンプル断片に帰する工程、(f) 任意に、前記サンプルバイオポリマーが分画された特定のサンプルバイオポリマーフラクションに基づき、1またはそれ以上の物理化学的性質を、前記サンプル断片が由来した前記サンプルバイオポリマーに帰する工程、および(g) 前記サンプル断片における前記正確な質量および帰した物理化学的性質を、前記サンプル中にいくらかの可能性をもって存在することが知られている一揃いの候補バイオポリマーに由来する候補断片における、前記正確な質量および帰した物理化学的性質と比較することにより、個々のサンプル断片を同定する工程を含む。

30

40

【0097】

任意に、前記サンプル断片が由来した前記サンプルバイオポリマーにおいて帰した物理化学的性質は、前記候補バイオポリマーにおける物理化学的性質と比較し、そして、前記断片の混合物中における1またはそれ以上の断片の工程(g)における同定に基づき、前記サンプル中に1つの候補バイオポリマーが存在すると同定する。

【0098】

好ましくは、候補断片における前記正確な質量および物理化学的性質は、前記サンプル

50

中にいくらかの可能性をもって存在することが知られている一揃いの候補バイオポリマーに由来する、計算された断片マップ中に保存する。

【0099】

一実施形態においては、前記方法は、個々のサンプル断片における前記正確な質量を前記個々のサンプル断片における前記帰した物理化学的性質と相関関係付けるサンプル断片マップを生成する工程を含む。前記個々のサンプル断片の同定は、前記サンプル断片マップを計算された断片マップと比較することにより行なう。

【0100】

任意に、既知の量の1またはそれ以上の参照用バイオポリマーを、前記サンプル断片における前記正確な質量を決定する前における任意の時点で添加する。好ましくは、前記参照用バイオポリマーは、前記複数のサンプルバイオポリマーの選択的消化に先立ち添加する。好ましくは、前記参照用バイオポリマーの物理化学的性質は公知であり、そして、前記サンプルバイオポリマーが分画された前記特定のサンプルバイオポリマーフラクションに帰した前記物理化学的性質を評価するために使用する。

10

【0101】

他の一実施形態では、個々のサンプル断片および参照用バイオポリマー断片の相対量を決定する。好ましくは、1またはそれ以上の参照用バイオポリマーを、複数のサンプルバイオポリマー混合物、サンプルバイオポリマーフラクション、消化物、またはサンプル断片フラクション中に加える。

【0102】

上述の方法では、前記正確な質量は、好ましくは、マスペクトル測定により決定する。好ましくは、前記方法は、測定したフラグメントイオンから第二次MS/MSマスペクトルを得ることなく行なう。

20

【0103】

物理化学的性質の中では、好ましい実施形態にしたがって採用されるのは、pI、クロマトグラフィー保持時間、電気泳動移動度、イオン電荷、イオン化ポテンシャル、親水性、疎水性、双極子モーメント、サイズ、水素結合可能性、および抗体親和力である。

【0104】

好ましくは、前記好ましい実施形態の前記方法において採用される少なくとも1の工程は、逆相クロマトグラフィーである。

30

【0105】

前記好ましい実施形態における方法は、前記バイオポリマーがタンパク質である場合に特に好適である。前記方法は、好ましくは、少なくとも100, 1000 もしくは 5,000またはそれ以上のタンパク質を含む混合物に適用される。

【0106】

好ましい実施形態は、複雑なタンパク質混合物中に存在するタンパク質を同定および定量するための分析方法を提供する。この実施形態においては、前記方法は、

タンパク質混合物を、それに関係する保持時間および/または移動時間を記録している間に、1またはそれ以上の分離工程にかける工程、

得られたフラクション中に存在するタンパク質を選択的に消化し、タンパク質断片の混合物を得る工程、

40

得られた混合物を、それに関係する保持時間および/または移動時間を記録している間に、1またはそれ以上の分離工程にかける工程、

得られたフラクション中における個々のタンパク質断片の質量をマスペクトル測定により正確に測定する工程、および、

個々のタンパク質断片を、前記タンパク質断片における前記測定した質量および保持時間および/または移動時間を計算値と比較することにより同定する工程を含む。

【0107】

好ましい実施形態においては、前記方法は、個々のタンパク質断片の相対量をマスペクトル応答に基づき決定する工程を含む。他の一実施形態では、前記個々のタンパク質の

50

相対量は、前記タンパク質の同定を補助するために使用する。

【0108】

上述の実施形態では、保持時間および/または移動時間は、好ましくは、高速クロマトグラフィー、電気泳動、およびイオン移動度マスペクトルの適切なモードから得る。

【0109】

一実施形態によれば、アミノ酸修飾およびその相対量を同定および測定しても良い。一実施形態を、タンパク質混合物の分析について、以下にさらに詳しく述べる。調査する特定のバイオポリマーに対し適切であると知られている修飾とともに、前記好ましい実施形態における方法は、RNA、DNAおよびポリサッカライドにも適用可能である。

【0110】

混合物中におけるバイオポリマーの同定および定量のための方法を開示する。前記バイオポリマーは、タンパク質もしくはペプチド、核酸、またはポリサッカライドであっても良く、好ましくはタンパク質もしくはペプチドまたは核酸であり、そして、最適にはタンパク質またはペプチドである。前記方法は、非常に複雑な混合物に由来する1またはそれ以上の生体分子、例えばゲノム中に存在する核酸およびプロテオーム中に存在するタンパク質を同定および定量することが可能である。

【0111】

一実施形態によれば、高分子の選ばれた部分のみを開裂させる、試薬による高分子の選択的開裂、例えば、制限酵素による核酸の開裂、選択的ペプチダーゼによるタンパク質の開裂、および、グリコシダーゼによるポリサッカライドの開裂を提供する。ペプチダーゼの中では、採用可能なのは、トリプシン、エンドプロテアーゼ - LysC、エンドプロテアーゼ - ArgC、エンドプロテアーゼ GluC、およびキモトリプシンである。好ましくは、前記選択的開裂に続いて、得られた断片の、少なくとも第1の物理化学的性質に基づく分離、および、任意に、第2の、第3のまたはさらなる物理化学的性質に基づくさらなる分離を行なう。続いて、前記断片の質量を高精度で測定し、そして、その結果を、予期される断片の正確な質量および物理化学的性質についての情報を含むデータベースと比較することにより、前記方法は前記断片の同定に到達する。前記断片の個性(identity)および量(quantity)から、前記バイオポリマーの個性および初期量(original quantity)を決定することができる。

【0112】

タンパク質のケースでは、前記方法は、ペプチド断片を同定し、およびそれらを公知のタンパク質に帰属するために、前記ペプチド断片の前記正確な質量を、前記ペプチド断片の1またはそれ以上の物理化学的性質と併用する。この方法は、プロテオーム中におけるタンパク質の詳細なイオンマップを創造するために用いられる。これらイオンマップは、同時に、前記プロテオーム中のタンパク質に関する正確な同定および定量的な情報を生成する。

【0113】

酵素的にまたは化学的に誘導されたペプチドの質量は、好ましくは約10 ppmの正確性で、最適には約5 ppmまでの正確性で、そして、特に好ましくは、約1~約5 ppmまでの、またはそれより少量の正確性で、測定または決定する。

【0114】

前記イオンマップに含まれるのは、それら酵素的にまたは化学的に誘導したペプチドの、前記実験的パラメータの範囲内で定義した1またはそれ以上の物理化学的性質に関する情報である。この物理化学的情報は、前記正確な質量、疎水性/親水性、および正味電荷を含んでいても良いが、これに限定されない。さらに、前記サンプル混合物中の前記タンパク質は、あらかじめ分画しても良く、または、サイズ排除、陽イオン交換、陰イオン交換、ヘパリン、セファロース等の、しかしこれらに限定されないカラムマトリクスの使用を通じることを含む、任意の数の異なる方法により分画しても良い。この分画は、前記タンパク質混合物の酵素的または化学的消化に先立ちおよび/またはそれに続き起こっても良い。この分画は、そのようにして帰属した特徴とともに、1またはそれ以上のサブフラ

10

20

30

40

50

クションを生成させるために用いても良く、それを、続いて消化および／またはさらに分画しても良い。この分画および分離工程は、追加の情報を提供し、それは前記イオンマップに追加され、そして同定および定量アルゴリズムにインプットされ、それにより、研究の嚴重さがさらに増すであろう。

【0115】

内部標準の任意の混合は、タンパク質またはペプチドの存在量の定量手段を提供し、それにより、サンプル中におけるタンパク質またはペプチドの絶対的な定量を達成する。複雑な混合物中におけるタンパク質存在量の相対的な定量は、異なった条件下（例えば、疾患 vs 非疾患、治療済 vs 未治療）で生成されたイオンマップの比較により達成される。

【0116】

そのように、混合物、特に複雑な混合物中におけるタンパク質および／またはペプチドを同定および定量するための総合的な方法を提供し、それにより、実験的に誘導された高精度の分子質量のシリーズを、理論的分子質量から構成されたデータベースと関連付け、比較する。分子質量に加え、前記タンパク質および／またはペプチドにおける１またはそれ以上の物理化学的性質または特徴を、前記タンパク質／ペプチド混合物をデータベースまたはタンパク質データセットと関連付け、および検証するために用いる。

【0117】

分析される、前記サンプル混合物中におけるタンパク質は、一次元もしくは多次元電気泳動および／またはクロマトグラフィー、例えばサイズ排除、陰イオン交換、陽イオン交換、アフィニティーまたはそれらの任意の組み合わせにより分離し、そして、得られた各サブセット(subset)を、特別な意図を持って酵素的または化学的処理にかけ、そのようにして得られるペプチドから意図するサブシーケンスを生成させても良い。各サブセットから得られたペプチドは、続いて、分離装置が好ましくは直接または間接的に連結された質量分析計により、質量分析にかけても良い。さらに詳しくは、電子スプレーイオン化マスペクトル測定に関しては、分離／濃縮装置における溶出経路は、前記質量分析計のイオン源に直接連結されていても良い。ナノ電子スプレーイオン化マスペクトル測定に関しては、分離／濃縮装置からの溶出物は、ナノ電子スプレーエミッター内に、またはその流体表示部(fluid registration)における任意の結合部品内に直接投入しても良い。MALDIマスペクトル測定に関しては、分離／濃縮装置からの溶出物は、時間で分離したフラクション内に、または、MALDI標的に対するUVもしくは蛍光等の方法によるピーク検出によって選択したフラクション内に、直接投入しても良い。全ての事例において、究極の成果は、実験的に誘導した複数の質量対電荷値を生成することであり、溶出／検出時間は、ペプチドのイオン化に先立ち用いる予備分離／濃縮装置により指示された、溶出のための強制力に基づいている。ピークピッキングアルゴリズムは、酵素的にまたは化学的に処理されたタンパク質またはタンパク質プールの各サブセットにおける計算された分子質量マップを再構成し、その中に含まれるのは、前記サブセットの生成に関して、直接関係のある全ての情報のリストである。より詳しくは、含まれるのは、少々例を挙げれば、１または複数の無傷のタンパク質における分子質量範囲、１または複数の無傷のタンパク質における正味電荷、および、１または複数の無傷のタンパク質における親和力である。さらに、イオン化に先立ち酵素的にまたは化学的に処理したペプチドプールから分離した各サブシーケンスの正味電荷、疎水性、親水性、および電気泳動移動度を含む性質が含まれていても良いが、これらに限定されない。

【0118】

さらに、既知の濃度の１または複数の対照を、任意に、選択した分離緩衝器内にペプチドのイオン化に先立ち直接、または、予備分離／濃縮したペプチドサブセット内に直接、含ませ配置しても良い。好ましくは、前記対照は、ほぼ等モルであり、および、分離／濃縮補助マトリクスと相互作用しないタイプである。前記対照の既知濃度での添加は、同定したタンパク質の定量を容易にするであろう。

【0119】

同定は、多数の異なる非重複的なタンパク質またはヌクレオチドのシーケンスデータベ

10

20

30

40

50

ース、例えばGenbank, SWISS-PROT, EMBLE, TREMBLE, Pdb, Genseq等のようなもののうち任意のものを用いて達成しても良い。これらデータベースは、酵素的または化学的に消化された多数の異なるタンパク質のうち任意のものにおける高正確性の分子質量マップを予想し、実験的に誘導されたデータと比較するために用いても良い。一実施形態においては、分子質量が計算された、統計学的に直接関係する多数のペプチドを有するタンパク質は、前記方法における予想が候補タンパク質であると同定されたものと実質的に等しい。各候補タンパク質に対し、ランク付けされた予想されるタンパク質リストを生じる前記方法の予想に対するそれらの正確性に基づき、複数のペプチド分子質量が同定される。前記ランク付けされたタンパク質リストにおいて同定したペプチドは、続いて、例えば前記ペプチドの親水性 / 疎水性、塩基性 / 酸性値を含むキャラクタライズされた物理化学的性質との比較におけるそれらの近似性により、交差相関させる。一実施形態においては、分析における多段階式反復工程を提供し、その場合、質量の正確性は第1の分析で評価し、続いて、前記サンプル混合物がどのように分画されまたはキャラクタライズされたかに依存する、親水性、正味電荷、およびタンパク質正味電荷またはサイズを含む種々の決定した物理化学的性質により相関関係を評価する。

10

【0120】

異なる条件下における、または異なる供給源に由来する混合物のキャラクタリゼーションにより、本発明における前記方法は、非等モルの不均一複雑タンパク質混合物から、タンパク質の濃度、アップおよび / またはダウンレギュレーション、複合体形成、翻訳後修飾、およびタンパク質プロセッシングを決定する手段を提供する。技術のある熟練者は、続いて、治療的にまたは診断的に関連する標的を、研究、スクリーニングまたは調整(intervention)のために決定および / または同定するために、得られた情報を利用しても良い。

20

【0121】

好ましい実施形態は、代謝の、またはプロテオームの、または他のライフサイエンス上の比較実験の分野内にエンカウントされても良いような、2またはそれ以上の複雑な化学混合物に含まれる化学成分の相対レベルを定量的に比較する手段を提供する。少なくとも一の実施形態においては、本発明における前記方法は、各化学混合物内における1またはそれ以上の化学成分を定性的に同定するために使用できる情報を提供する。

【0122】

一実施形態は、混合物内における各化学成分の2またはそれ以上の物理化学的性質を測定する工程を含み、それらの性質のうち1つは、マスマススペクトル測定により決定したその正確な質量である。他の物理化学的性質は、例えば、1またはそれ以上の特別に定義したクロマトグラフィー分離における溶出順序(order of elution)、正味電荷、pI、pKa、および抗体親和力を含む。各成分について測定した情報における前記正確な質量および物理化学的性質のコレクションは、各混合物中の各成分に対し顕著な特徴(distinguishing signature)を提供する。最後に、本発明における前記方法は、各混合物中の各化学成分におけるマスマススペクトルシグナル強度またはクロマトグラフィーピーク面積を測定する工程を含む。好ましくは、この強度またはピーク面積測定は、正確な質量に基づく。

30

【0123】

前述の通り、比較的ライフサイエンス実験における高度に望ましい課題は、生物由来サンプルの2またはそれ以上の混合物中における任意の化学成分が、各混合物に共通な他の化学成分に対する相対的なそれらの存在量において、変化したかどうかを決定することである。本発明における前記方法は、各サンプル混合物に共通な化学成分が、それらの物理化学的性質の顕著な特徴に基づき符号することを可能にする。符号を達成するためには、各成分の化学的個性が公知であることは必要としない。各化学成分における前記正確な質量および物理化学的性質の特徴により、その化学成分を前記混合物中における他の化学成分から一意的に区別できることのみが必要である。符号した各化学成分における相対存在量の決定は、第1に、化学成分の存在量を、第2の内因性(endogenous)化学成分の存在量に対して相対的に決定することにより達成される。前記第2の内因性化学成分は、両方の混合物に共通で、前記2のサンプルの状態を比較した場合に、その相対存在量レベルにお

40

50

いて、統計的に有意な方法により、変化していないと決定されたものである。それらの性質を有する内因性化学成分は、内部標準として働く。各混合物中において符号した各化学成分の、各混合物中における同一の内因性内部標準に対する相対的な比は、続いて、各混合物中における各化学成分の相対存在量レベルの相違を提供するために比較する。いくつかの例では、各化学混合物に対する、内部標準としての外因性(exogenous)化学種の添加が、回収(recovery)、適用可能な場合は酵素的消化の効果、正確な質量の測定、およびクロマトグラフィーにおける溶出時間の補正(correction)に対する評価を容易にする。

【0124】

いくつかのライフサイエンス実験においては、前記混合物中における化学成分は、化学成分の、十分にキャラクタライズされたリストに強制的に帰属される(constrained)ことが知られている。例えば、プロテオームの実験においては、研究しようとするタンパク質は、特定の組織から発せられると知られているもの、または、十分にキャラクタライズされたフラクション、または、特定の組織におけるプロテオームのサブセットでも良い。そのようなサンプルまたはサンプルのサブフラクション中に含まれている可能性のあるタンパク質は、多くのケースでは実質的に公知である。それゆえに、選択的ペプチダーゼを用いてそのようなタンパク質混合物を酵素的に消化した場合に生産されるポリペプチドを予想しても良く、そして、それらポリペプチドにおける正確な質量および多数の物理化学的性質を計算しても良い。好ましい方法は、混合物中における未知な各ポリペプチドの、経験的に測定した正確な質量および物理化学的性質を、前記混合物中において理論的に含まれている可能性がある各ポリペプチドの、前記計算した正確な質量および物理化学的性質と比較することを可能にする。未知の混合物中におけるポリペプチドの化学的個性は、それを、前記混合物中に理論的に含まれている可能性があるポリペプチドの正確な質量および物理化学的性質と比較した際の、近似性により確かめても良い。一般的に、あるポリペプチドは、特定のタンパク質について特有である。したがって、特定のポリペプチドの同定は、一般的に、そのポリペプチドの母体であるタンパク質の独自の同定をも提供する。あるタンパク質の同定は、そのタンパク質に特有な複数のポリペプチドが同定された場合、さらに確実になる。

【0125】

タンパク質研究においては、本発明における他の一実施形態が、研究しようとする混合物中に理論的に含まれている可能性がある、強制的に帰属された(constrained)タンパク質のグループまたはそのサブセットの翻訳後修飾形態の検出を可能にする。この方法は、さらに、前記混合物中に理論的に含まれている可能性がある前記強制的に帰属されたタンパク質のグループ、または1もしくはそれ以上のアミノ酸置換から生じるそれらのサブセットにおける修飾形態の検出を提供する。この実施形態は、測定したポリペプチドの正確な質量および物理化学的性質のデータセット(data set)の全体を、質量が正確な量において異なり、その差異が、翻訳後修飾、または、前記強制的に帰属された各タンパク質から理論的に発せられる可能性のあるポリペプチドのアミノ酸置換、または研究しようとする未知混合物中に理論的に含まれる可能性のあるそれらのサブセットにおける質量の差に対応する、追加のポリペプチドについて試験する。それら候補物質である、この初期タンパク質の翻訳後修飾およびアミノ酸置換形態のそれぞれのデータセットにおける個性は、その、計算による他の物理化学的性質との一致によりさらに確認しても良い。例えば、ポリペプチドのリン酸化形態は、リン酸基の付加に一致する正確な質量の差を示すだけでなく、それは、哺乳類の系中では、前記ポリペプチドの非リン酸化形態が、セリン、チロシン、またはトレオニンのうち1つのアミノ酸を含む場合にのみ起こりやすい傾向がある。細菌(バクテリア)の傾注では、このアミノ酸リストは、ヒスチジンを含むように拡張可能である。最後に、前記ポリペプチドのリン酸化形態は、非リン酸化形態よりも親水性であることが予期され、そして、それゆえに、逆相クロマトグラフィー分離においてわずかに短い溶出時間を示すことが予期される。

【0126】

前記好ましい実施形態における前記方法は、混合物中における異なる化学成分が、第1

10

20

30

40

50

に、１次元または多次元の明確に定義されたクロマトグラフィーで、分離され、または部分的に分離され、それにより成分が連続的にかつ再現性のある方法で流出し、混合物の分析に好適である。

【 0 1 2 7 】

本発明の方法には、種々のマスペクトル測定システムを採用することができる。理想的には、質量における高正確性、高感度および高分解能を有する質量分析計を採用する。そのような質量分析計における質量分析装置(mass analyzer)は、四重極、飛行時間、イオントラップ、磁気セクタもしくはFT-ICRまたはそれらの組合わせを含むが、これらに限定されない。理想的には、前記質量分析計におけるイオン源は、主としてサンプルの分子イオンまたは擬分子イオンを、および少しのフラグメントイオンを発生する。そのようなイオン源の例は、対既達イオン化源（例えば、電子スプレーおよび大気化学イオン化(atmospheric chemical ionization)）およびマトリクス補助レーザー脱着イオン化("MALDI")を含む。

10

【 0 1 2 8 】

理想的には、前記質量分析計は、化学種の質量を、その正確なまたは計算された質量から20 ppmの範囲内の正確性で、より好ましくは、その正確なまたは計算された質量から10 ppmの範囲内の正確性で、最適には、その正確なまたは計算された質量から5 ppmの範囲内の正確性で、正確に測定することが重要である。

【 0 1 2 9 】

理想的には、前記質量分析装置は、マスペクトルのシグナル強度またはピーク面積が量的に対応していることを確実にするために、全てのマスペクトルを、同時に、および、前記混合物中の複数の成分について十分なスペクトルが得られる周波数で、サンプリングおよび記録するのが良い。このことは、全ての質量について得られた溶出時間が、前記質量分析装置により修正されまたは歪められていないことをも確実にするであろうし、そして、そのことは、定量的測定が、過渡信号の存在量を測定する必要性により妥協されていないということを確認にすることを助けるであろう。

20

【 0 1 3 0 】

好ましい実施形態は、複雑な化学混合物中における各化学成分が、その正確な質量および１またはそれ以上の追加の物理化学的性質の測定により、高度に特異的な方法でキャラクタライズできるという事実を利用する。この高度に特異的な情報は、異なる化学的混合物に共通の化学成分を符号させ、そして量的に比較することを可能にする。いくつかの実験においては、サンプル混合物中における化学成分が、十分にキャラクタライズされた化学成分リストに強制的に帰属されることが知られており、前記化学成分中における前記化学成分を定性的に同定することも可能である。

30

【 0 1 3 1 】

前記好ましい実施形態における前記方法は、種々の広範なライフサイエンス実験に適用できるが、タンパク質混合物の定性的または定量的キャラクタリゼーションに対するその適用についての記述は例示である。前記タンパク質混合物の組成はシンプルでも良いが、少なくとも100のタンパク質または1,000以上のタンパク質を含んでいても良い。

【 0 1 3 2 】

前記方法の一実施形態は、下記工程、すなわち、
タンパク質混合物を１またはそれ以上の分離工程により分離すると同時に、採取した各フラクションの物理化学的性質を記録する工程、

40

得られたフラクション中に存在するタンパク質を、選択的ペプチダーゼにより消化し、タンパク質断片またはポリペプチドの混合物を得る工程、

得られたポリペプチド混合物を１またはそれ以上のクロマトグラフィー分離工程にかけると同時に、関連するクロマトグラフィー溶出時間を記録する工程、

得られたフラクション中における個々のポリペプチドの質量をマスペクトル測定により正確に測定する工程、

個々のポリペプチドを、それらの測定した正確な質量および１またはそれ以上の物理化

50

学的性質を、研究しようとするサンプルに対応する強制的に帰属されたタンパク質リストと理論的に関連付けることができるポリペプチドの計算した正確な質量および物理化学的性質と比較することにより同定する工程を含む。

【0133】

いくつかの状況では、2の異なる生物由来サンプル混合物中における各タンパク質の相対レベルを定量的に比較することが重要である。例えば、前記2のタンパク質混合物は、疾患対正常または治療済対未治療等の、生物体における2の異なる状態に対応していても良い。上記により得られた情報は、そのような定量的評価を容易にする。同様の生物に由来し、そして、良い分析手法に従い、ほぼ同じ方法で調製されたこのタイプの混合物は、化学組成のほとんどの部分において定性的および定量的に非常に似ている。一般的に、そのような混合物中におけるほとんどのタンパク質は、定性的に同じであり、そして、それらは同じ相対存在量で存在する。それらタンパク質に由来するポリペプチドは、内因性の内部標準に相当し、それは、ポリペプチドの、および、それゆえに、比較される2のサンプル中におけるそれらの相対存在量に変化したタンパク質の、発見および定量的測定を容易にする。

10

【0134】

一実施形態によれば、前記方法は、比較される1またはそれ以上の混合物に共通なポリペプチドを、それらの際立って特徴的である正確な質量および物理化学的性質に基づき、符号させることを含む。符号を達成するためには、各ポリペプチドの化学的個性が公知であることは必要でない。各ポリペプチドにおける物理化学的性質の特徴が、混合物中における他のポリペプチドと一意的に区別できることのみが必要である。いくつかの内因性ポリペプチドは、それらが内部標準としての確であるかどうか決定するためにテストしても良い。ポリペプチドは、前記混合物中における他の特定のポリペプチドに対するその相対存在量レベルが、他の重要なサンプル状態の混合物における同じポリペプチド存在量の割合と比較した場合に、統計学的に有意な方法において異ならなければ、内部標準としての確である。各混合物中における各ポリペプチドの存在量の、各混合物に共通である意図した内部標準の存在量と比較した割合を、決定しても良い。この割合は、混合物間において符号した各ポリペプチドについて、その相対発現レベルが、比較しようとするサンプル状態間で変化したかどうかを決定するために、比較しても良い。

20

【0135】

複雑なサンプル混合物は、例えば、遠心分離等のような種々の物理的工程を用いて、または、1次元もしくは多次元カラムクロマトグラフィー、例えば、サイズ排除、陰イオン交換、陽イオン交換、ゲル電気泳動、順相、逆相もしくはそれらの組み合わせ等の使用を通じて分離しても良い。これら分離工程は、マススペクトル測定工程において、オフラインまたはオンラインで行なっても良い。バイオポリマー、例えばタンパク質の調査において、前記分離は、任意に、酵素消化に先立ち無傷のタンパク質について、および、タンパク質消化生成物について行なっても良い。前記分離工程の第1の目標は、明確に定義された、かつ再現性のある方法で、フラクションを生産することである。多くのケースでは、これら分離工程は、定義可能な物理化学的性質を有するサンプルフラクションを生産するであろう。

30

40

【0136】

一実施形態は、混合物中における各化学成分の2またはそれ以上の物理化学的性質を測定する工程を含み、それらの性質のうち1つは、マススペクトル測定により決定されたその正確な質量である。2の異なる混合物に共通な化学成分を、この正確な質量および物理化学的性質情報の顕著な特性に基づき、符号させ、そして、定量的に比較することが可能になる。これら化学成分は、さらに、それらの測定された正確な質量および物理化学的性質を、研究しようとする化学混合物に対応すると知られている強制的に帰属された化学種のリストにおける計算された正確な質量および物理化学的性質と符号させることができる場合は、定量的に同定することができる。

【0137】

50

生物由来の多くの化学混合物中における複数の化学種が、それら自体においていくらかの質量許容差範囲内で一意的である、計算された分子質量を有する。一意的な特徴を、正確な質量測定のみに基づいて混合物中の化学成分に帰属することは、マスマススペクトル測定工程が内在するマスマエラーが、その成分と、質量において同じである混合物中の他の成分とを区別するのに十分な場合は、可能である。

生物由来の複雑な混合物中の化学成分における一意的で特徴的な情報を提供できる追加の物理化学的性質は、例えば、溶解度、疎水性、親水性、正味電荷、 pI 、 pKa 、分子体積、および抗体親和力である。これらのパラメータのいくつかは、クロマトグラフィー分離において測定された化学成分の溶出順序と関連付けることができる。そのような顕著に特徴的な物理化学的性質の1つは、逆相クロマトグラフィー分離における溶出順序であり、それは、化学成分の疎水性の基準である。クロマトグラフィー保持時間または相対保持時間と正確な質量との組み合わせは、しばしば、複雑な代謝産物混合物またはタンパク質消化物混合物中における化学成分を一意的に区別するのに十分であり、したがって、その相対存在量を、第2の混合物中における類似の成分と定量的に比較することが可能となる。このコンセプトは、未知サンプルにおける成分が特定のタンパク質リストに強制的に帰属されると知られている場合は、タンパク質消化物混合物中におけるポリペプチドの実際の定量的同定を含むところまで拡張することができる。このケースでは、公知のポリペプチド標準に対する未知ポリペプチドの溶出順序を、その疎水性を評価するために用いる。この疎水性の測定値は、続いて、前記混合物中に理論上含まれる可能性がある全てのポリペプチドにおける理論上の疎水性と比較することができる。この疎水性強制力(constraint)と正確な質量との組み合わせは、前記未知ポリペプチドを一意的に同定するために使用しても良い。

10

20

【0138】

他の一例では、顕著な化学的特徴として有用な物理化学的性質は、等電点(pI)である。無傷のタンパク質は、(pI)に基づき、電気泳動的に分画しても良い。小分子およびポリペプチドは、 pI に基づき、交換クロマトグラフィーにより、適切な条件下で分画しても良い。未知の化学種における pI の測定値は、重要な混合物中に理論的に含まれている可能性のある化学種における pI の計算値と比較することができる。

【0139】

さらに他の一例では、顕著な化学的特徴として有用な物理化学的性質は、マスマススペクトル測定工程において確認された荷電状態である。これは、ポリペプチドの顕著な特徴として特別な数値である。本発明者らは、ポリペプチドイオンの荷電状態(2^+ , 3^+ , 4^+ , 等)が、そのシーケンスの長さおよびそのシーケンスに含まれる塩基性アミノ酸の数から評価可能であるということを経験的に決定した。例えば、そのような情報は、前記重要な混合物中に理論的に含まれている可能性のある1以上のポリペプチドが、前記未知ポリペプチドの測定した正確な質量と一致する場合に、正確なポリペプチドが同定されることを可能にする。

30

【0140】

ここで、本願を通じて使用するいくつかの用語の意味を定義する。「AEX」とは、陰イオン交換高速液体クロマトグラフィー(Anion Exchange High Performance Liquid Chromatography)を表す。「面積」とは、測定したポリペプチド断片に対して時間で積分したマスマススペクトルシグナルである。「面積比」とは、与えられたサンプル(実験用等)におけるあるペプチドに由来する前記面積を、他の1のサンプル(対照用等)におけるあるペプチドに由来する面積で割り算した商である。「B&B」とは、ブルアンドブリーズ値(Bull and Breese value)であり、疎水性の基準である。H.B. Bull, K. Breese, Hydrophobicity estimates for proteins and peptides, Arch. Biochem. Biophys. 161:665-670 (1974)を参照のこと。「カリブレーションロックマス」とは、質量の正確性を向上させるために、質量測定におけるデータ取得中の揺らぎを補正するために分析物を用いる場所のことである。「CAM」とは、カルボキサミドメチル基を表し、通常、タンパク質またはペプチドを、メルカプトエタノールまたはジチオトレイトール等の還元剤で、続いてアルキル化剤

40

50

2-ヨードアセトアミドで処理することにより、スルフヒドリル基に結合される化学的部分である。「候補タンパク質」とは、それに対し、統計学的に有意な数のペプチドが質量のみにより帰属できるタンパク質である。「CEX」とは、陽イオン交換高速液体クロマトグラフィー(Cation Exchange High Performance Liquid Chromatography)を表す。「荷電状態」とは、質量分析計のイオン源中におけるイオン化(イオン形成)工程中において、ペプチド分子に結合したプロトン数である。「複合イオンマップ」とは、イオンマッピング実験において、同定および定性分析された(qualified)全てのペプチドおよび全てのタンパク質の、全ての測定された物理化学的性質および面積のリストである。「複合UML」とは、任意のタイプの一意的マスリスト(Unique Mass Lists) (UMLs)の比較により生成された、非重複的なリストである。前記複合UMLには、各ペプチドの状態が、それらのUMLsの関数として含まれる。この工程は、さらなる複合UMLsを生成するために繰り返すことができる。「圧縮UML」とは、1の複合UMLにおいて分割された(intersected)部分であり、その1または複数の領域は、メジアン値である。「データベース」とは、研究しようとするプロテオーム中に存在すると仮定されたタンパク質および/またはペプチドのシーケンスのコレクションであり、それら各々の物理化学的性質を全て含む。「内因性参照タンパク質」とは、全てのサンプル中に存在すると仮定される内因性のタンパク質であり、実験パラメータを標準化するために用いられる。「HPLCインデックス」とは、疎水性の基準のことである。Biochemistry, 25:5425 (1986)を参照のこと。「強度値」とは、イオン検出の最小閾値を越える任意のイオンの、全ての荷電状態における全ての同位体についての、全ての質量中心マススペクトルシグナル(centroided mass spectral signals)の合計である。「内部参照タンパク質(Internal Reference Protein) (IRP)」とは、研究するサンプル内に導入される外因性(exogenous)タンパク質であり、実験パラメータを標準化するために用いる。「内部標準(Internal Standard) (IS)」とは、既知の分子量および濃度を有する外因性のペプチドであり、最終分離に先立ち、ペプチドフラクションに直ちに添加される。「イオンマップ」とは、イオンマッピング実験において、同定および定性分析された(qualified)、単一のタンパク質に由来する全てのペプチドの、全ての測定された物理化学的性質および面積のリストである。「物理化学的性質」とは、タンパク質、ペプチドまたは他の生物学的分子において、その分離または記述の基礎として働く、それらにおける任意の測定可能な特徴である。「翻訳後修飾(Post-Translational Modification(s)) (PTM)」とは、タンパク質において、その個々のアミノ酸からのアセンブリ(assembly)に続いて起こる全ての変化である。「翻訳後修飾(PTM)候補」とは、翻訳後修飾の仮説を支持する物理化学的性質が変化するペプチドである。「プロテオーム」とは、生細胞中において、適切な時点で任意の所定の地点に存在するタンパク質である。「定性分析アルゴリズム(Qualification Algorithm)」とは、任意のUML、複合UML、イオンマップ、および/または複合イオンマップに含まれる実験値を用いる計算ツールであり、そして、それを、1または複数のデータベースに由来する計算値と比較し、それによって、1または複数の混合物中におけるペプチド、およびそれによりタンパク質を同定する。「定性分析タンパク質(Qualified Protein)」とは、それに対し、質量以外の物理化学的性質により、統計学的に有意な数のペプチドがさらに帰属できるタンパク質である。「特徴的ペプチド(Signature peptide)」とは、質量のみに基づき、あるタンパク質に対し帰属できるペプチドである。「一意的マスリスト(Unique Mass List) (UML)」とは、質量、面積、保持時間、荷電状態等のような、イオンマッピング実験から得られた数値の、非重複的なリストである。「一意的マスリストブラウザ(UMLB)」とは、任意の2のUMLs、複合UMLsまたは複合イオンマップを、それらの相対的状态を決定するために比較および標準化するようにデザインされたソフトウェアツールである。「一意的マスリストジェネレータ(UMLG)」とは、データポイントの非重複的なリストを抽出するために、イオンマッピング実験から生成された生データに応答し(interrogates)、そして整理する(reduces)、ユーザが定義可能なソフトウェアツールである。「アップレギュレーション、ダウンレギュレーション」とは、2の生理学的状態間におけるペプチドまたはタンパク質の存在量の変化である。「検証タンパク質(Validated protein)」とは、2の実験間においてそのペプチドが全て定量的に追跡

10

20

30

40

50

される定性分析タンパク質である。

【0141】

ここで、本発明の種々の実施形態について、単なる例示により、そして、添付図面を参照しながら記述する。

【0142】

図1A～1Fは、特異なタンパク質発現をイオンマッピングにより分析する方法のフローチャートを示す。

【0143】

図2は、内部標準として使用可能なウシ血清アルブミン(BSA)におけるトリプシンのフラグメントを採集するための、逆相HPLCカラムにおける、疎水性対保持時間を示す。

10

【0144】

図3は、3の断片ペプチドイオンについて、イオン強度対スペクトロメータに導入されたBSA量のプロットを示す。

【0145】

図4は、2の混合物の組成を詳述する。

【0146】

図5は、混合物B/混合物Aについての、存在量の、測定値対理論値のヒストグラムを示す。

【0147】

図6は、BSAの一意的マスリストを示す。

20

【0148】

図7Aは、ウシ血清アルブミンについて掲載したタンパク質データベースを示し、図7Bに続く。

【0149】

図8は、BSAタンパク質消化物について、測定および計算による符号の結果を示す。

【0150】

図9A～9Fは、タンパク質の定性的符号について詳述する。そして、

図10は、ラットの尿代謝の比較研究を示す。

【0151】

[大腸菌(E. COLI)]

30

それらの中におけるある程度の質量許容値範囲内で、計算された分子質量が一意的である実質的数のペプチドが存在する。明らかに、測定用デバイスがより正確であれば、それらのタイプのペプチドの多数における同定のチャンスはより良くなる。測定デバイスにおいて、内在するマスエラーの範囲内に隣接物がないペプチドは、それらに対応する親タンパク質に対し、正確質量サインイオン(Accurate MassSignature Ions)として参照される。この点について説明するために、大腸菌におけるプロテオームの非重複的なタンパク質データベースを、下記のインデックスアルゴリズム(Indexing Algorithm)を用いて掲載する。大腸菌プロテオームの全体をシリカ中で分析したところ、トリプシン消化において期待される生成物について、191,777の理論的ペプチドが生成された。これらのペプチドのうち、分子質量が500から5000の間であり、開裂ミス(missed cleavage)が1つまでであるもののみをレポートするために、インデкса(Indexer)をセットした。計算される理論的な物理化学的性質は、予想保持時間および予想荷電状態を含むが、これらに限定されない。掲載されたデータベースは、これらのペプチドについて、それらに対応する正確な質量の5 ppmの範囲内で一意的である(すなわち、前記データベース内で5 ppmの範囲内の質量を有するペプチドがない)かどうか照会する。この照会の結果として、非重複的な大腸菌データベース中において、4234の注釈付タンパク質のうち4023(95%)を同定する20,455のペプチドのリストが得られた。

40

【0152】

前記シリカ中分析は、各個のタンパク質からサインイオンの正確な質量測定を生成させることにより、大腸菌プロテオーム中タンパク質の95%を定性的に同定できるという能力

50

を示す。しかしながら、これは、細胞溶解物全体の実験的な酵素消化により、前記プロテオーム中の全てのタンパク質から全ての理論的サインペプチド(signature peptides)が生産できるということを意味しない。典型的には、酵素的または化学的に断片かされたタンパク質における任意のタイプのマスペクトル分析は、シーケンスの20から60%の範囲をカバーすることにつながり、それゆえに、プロテオーム中における可能な限り多数のタンパク質を定性的に同定することが目標であるならば、タンパク質あたりのサインイオン数を増加させることが重要となる。トリプシン処理した大腸菌プロテオーム(開裂ミスが1まで)のケースでは、ペプチドの10.6%しかサインイオンではない。したがって、サンプルがさらに複雑になった場合、タンパク質あたりのサインイオン数をどのようにして増加させられるかが問題となる。

10

【0153】

タンパク質あたりのサインイオン数を増加させるために、好ましい実施形態における方法は、追加の物理化学的性質、好ましくは疎水性を利用した第2の分画方法を採用する。各アミノ酸が定義された分子質量を有するように、各々は、定義された疎水性をも有し、そして、適切なクロマトグラフィーカラムおよび溶媒システム、典型的には逆相液体クロマトグラフィーを用いて、この性質に従い分離できる。ペプチドの疎水性は、ペプチドシーケンス中の各アミノ酸における疎水性値を合計して計算しても良い。いくつかの例では、前記数値は、前記合計に、ペプチド長に直接関係する補正係数を掛けることにより補正する。そのように、ペプチドの疎水性は、第2の物理化学的定数、すなわち第2の物理化学的性質であると考えられる。無傷参照タンパク質(Intact Reference Protein)の正確な質量分析から生成される疎水性曲線を用いることにより、非重複的な大腸菌データベースに掲載された各理論的ペプチドを、計算された疎水性および理論的保持時間について帰属することができる。次に、前記データベースを、イオンについて、それが、いくらかの保持時間ウィンドウ内において一意的(疎水性サインイオン)であるかどうか照会することができる。例えば、前記保持時間ウィンドウを ± 2.5 分にセッティングし、そして、全ての正確質量サインイオンを前記データベースから除き、そして次に、前記掲載された非重複的な大腸菌データベースについて照会すると、結果として74,239の疎水性サインイオン(38.7%)が得られた。質量および疎水性の2の物理化学的性質を組み合わせることにより、それらが由来するタンパク質について一意的である94,671のペプチドが同定される。掲載された非重複的な大腸菌データベースに対するそれら94,671のイオンについて照会すると、結果として、前記4234のタンパク質のうち100%が同定された。研究しようとするプロテオームの複雑性(大腸菌では4,234、酵母では6,173、ヒトでは35,000以上)に依存して、最小シーケンスカバー範囲(minimum sequence coverage)を一定の許容可能なユーザ定義レベルまで上げるために、タンパク質あたりのサインイオン数をさらに増加させることが必要な可能性がある。

20

30

【0154】

これが必要な場合、好ましい実施形態は、第3の物理化学的性質、例えば等電点(pI)を採用する。各アミノ酸が定義された分子質量および疎水性を有するように、各々は、定義されたpIをも有し、そして、適切な溶出度(elution gradient)およびバッファ組成を有するイオン交換クロマトグラフィーにより分離できる。例えば、ペプチドのpIを物理化学的性質として採用する場合、酵素的に誘導したペプチドプールは、第1にイオン交換クロマトグラフィーにより分離する。正確な質量および物理化学的性質の分析は、ペプチドイオンを、各塩フラクション内に存在する1または複数の無傷参照タンパク質と識別し、それにより、各々についてpI範囲を提供する。PI許容値ウィンドウは、続いて、各フラクションについて帰属することができる。次に、前記掲載された非重複的な大腸菌タンパク質データベースを、イオンについて、それが、いくらかのpI許容値ウィンドウ内において、それら自体に対して一意的(pIサインイオン)であるかどうか照会することができる。例えば、前記pI許容値ウィンドウを ± 2 pIユニットまでにセッティングし、全ての正確な質量および疎水性サインイオンを除き、そして次に、掲載された非重複的な大腸菌データベースを照会したところ、結果として、16,470の pIサインイオン(8.6%)が得られた。前記

40

50

3の物理化学的性質を組合わせたところ、それらが由来するタンパク質に対して一意的な111,141のペプチドが得られた。これら111,141のイオンを、前記掲載された非重複的な大腸菌データベースに対して検証したところ、4234のタンパク質(100%)が同定された。

【0155】

3の物理化学的性質を採用することによっても所望のレベルのシーケンスカバー範囲に届かなければ、例えばペプチドの荷電状態等の第4の物理化学的性質を用いることができる。正確質量LCMS分析のために特定のバッファシステム(典型的には $\text{pH} < 2$)を与えると、ペプチドイオンにおける1または複数の荷電状態を、ペプチド長、組成およびシーケンスにより決定できるであろう。多数の異なる参照タンパク質に由来する多数のペプチドの、マスペクトルのおよび物理化学的性質の分析を通じて、本発明者らは、ペプチドイオンの荷電状態(2^+ , 3^+ , 4^+ 等)がシーケンスおよび長さから予測できることを経験的に決定した。一例として、前記シーケンスが18を超えるアミノ酸長を有し、かつ、内部塩基性残基を9位に含む場合、それに伴う、そのペプチドの重み付けされた荷電状態は、 2.5 ± 0.2 と予測される。この、経験的に誘導された荷電状態法則を用いると、前記好ましい実施形態における前記方法は、前記掲載された非重複的大腸菌タンパク質データベース中における191,777の理論的なペプチドの各々に対して理論的な荷電状態を帰属し、そして、荷電状態サインイオンのリストを生成する。

【0156】

好ましい実施形態は、任意に、タンパク質あたりのサインイオン数をさらに増加させるために、追加の分離方法論を採用する。タンパク質およびペプチド分画分野の熟練者には、複雑なサンプルをさらに分画するために種々の異なるクロマトグラフィー分離テクノロジーを採用できることは自明である。そのような分離テクノロジーは、ゲル透過(サイズ排除)クロマトグラフィー、陽イオンおよび陰イオン交換クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動、等電点電気泳動法(isoelectric focusing)、ならびに多数の形態のアフィニティークロマトグラフィーを含むが、これらに限定されない。前記分離方法は、無傷タンパク質およびそれから誘導されるペプチド断片の両方に対して適用できる。好ましくは、分離の各連続的ラウンドは、調査しようとするプロテオーム中の全てのタンパク質が十分なサインイオンを有し、ペプチド同定の望ましいレベルを達成するまで、それらが発せられるタンパク質に一意的なサインイオン数を増加させる。

【0157】

質量分析計の分解能が低下すると、与えられたレベルのサインイオンを維持するために、物理化学的性質の数および/またはそれらが測定もしくは計算される分析のレベルが上昇しなければならないことは自明である。この理由のために、前記質量分析計は、費用および処理量における実用的な制約条件の範囲内で、可能な限り最高の分解能を有していることが好ましい。

【0158】

[イオンマッピング工程]

ここで、好ましいイオンマッピングの一例を、「シリカ中の」タンパク質消化に関して述べる。分析しようとする混合物を形成する重要なタンパク質のアミノ酸シーケンスを、任意のいくつかの公知の自動化方法により試験し、用いる酵素が前記タンパク質をその場所で開裂すると見込まれる開裂部位を同定する。プログラムは、消化により得られると予期されるペプチド断片の質量を計算する目的でワールドワイドウェブにより入手可能であり、例えば、MS-Digestは(<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.4/msdigest.htm>)にある。前記重要なタンパク質は、ある生物のゲノムの全体であっても良く、そして、そのシーケンスは、容易に入手可能なゲノムのおよびプロテオームのデータベースから誘導しても良い。用いられる1または複数の酵素により生成されると予期される前記ペプチド断片は、「オンザフライ(on the fly)」で計算し、そして、イオンマッピング実験において保存されている結果と比較しても良く、および/または、前記予期されるフラグメントにおけるデータをあらかじめ計算し、さらに保存し、そして、イオンマッピング実験の結果得られたデータを、前記保存したデータと、それが生成される速度とほぼ同じ速度で比

10

20

30

40

50

較しても良い。

【0159】

本発明の一実施形態においては、少なくとも1のポリペプチドの理論的イオンマップを創造する方法は、下記工程のうち1以上を含む。すなわち、

任意に、データベース中のシーケンスを翻訳する工程（例えば、DNAデータベースを取得し、そして、それをタンパク質またはESTデータベースに翻訳する工程）、

ペプチドが誘導される天然タンパク質について予期される分子重量およびpIを計算する工程、

各ペプチドを、前記天然の親タンパク質におけるMWおよびpIに対し関連付ける工程、

公知のトリプシン基質パターンを用いてシリカ中トリプシン消化を行なう工程（予期されるトリプシンパターンについてリファレンスを提供する）、

任意に、得られた各断片について、理論的な、正確な質量および/または1もしくは複数の質量対電荷比を計算する工程、

任意に、「質量分析可能な(Mass Scrutable)」質量の閾値をセットする工程（例えば、 $>8,000$ ダルトンおよび <500 ダルトンである。約8,000ダルトンを大きく超える質量は、アミノ酸組成物の同定に必要な分解能に関係して、計ることが難しい。約5のアミノ酸よりも短いペプチドは、多くの診断的使用において普遍的すぎる。）、

任意に、計算された開裂ミスについて閾値をセットする工程（開裂ミスについてリファレンスを提供する）、

任意に、全てのまたはいくつかのペプチドについて疎水性インデックスを計算する工程（例えば、ブルアンドブリーズ法によって）、

任意に、全てのまたはいくつかのペプチドについてpIを計算する工程、

任意に、全てのまたはいくつかのペプチドについて理論的電荷を計算する工程、

任意に、前記データベース中の各天然親タンパク質について注釈を維持する工程（例えば、タンパク質データベースは、翻訳後修飾、スプライス変異体(splice variants)等の知識を組み込んで良い）、

任意に、天然タンパク質のリン酸化部位の全てを計算する工程（これは、ワールドワイドウェブ経由で、例えば、www.expasy.org/prosite/ (<http://> プロトコール使用)でプロサイトリソースを用いることにより、または、同様のプログラムをローカルコンピュータで作動させることにより、行なっても良い）、

任意に、天然タンパク質の全てのグリコシル化部位を計算する工程（これは、ワールドワイドウェブ経由で、例えば、www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/ (<http://> プロトコール使用)でnetOglycリソースを用いることにより、行なっても良い）、である。

【0160】

図1は、前記イオンマッピング工程中で着手した工程のフローダイアグラムを示す。

【0161】

図1で示した工程は、対照サンプル、および、1または複数の無傷参照タンパク質サンプルを伴う実験用サンプルの評価を含む。

【0162】

この工程の各側面について、以下でさらに詳しく述べる。

【0163】

[対照サンプル/実験用サンプル]

イオンマッピングは、複雑な混合物中のタンパク質を同定するために、ならびに/または、1もしくはそれ以上の対照および実験用サンプル源から採取されるタンパク質の相対発現レベルを定量的に比較するために用いても良い。

【0164】

[無傷タンパク質混合物の単離および予備分画]

イオンマッピング研究の目標が、2の異なるサンプル中におけるタンパク質の相対発現レベルを定量的に比較することであれば、続いて、同量の複雑なタンパク質混合物が1またはそれ以上の対照および実験用サンプル源から単離されるであろう。それら無傷タンバ

10

20

30

40

50

ク質混合物は、任意の数の供給源、少々例を挙げれば、細胞溶解物全体、部分的分画タンパク質複合物、および細胞レベル下の細胞小器官(sub-cellular organelles)を含む供給源から誘導しても良い。1またはそれ以上の対照および実験用供給源から採取した無傷タンパク質混合物は、この技術分野において公知である多数の異なる方法論、例えば、1次元ゲル電気泳動法、キャピラリー電気泳動法、液相等電点電気泳動法(liquid phase isoelectric point focusing)、アフィニティークロマトグラフィー、1次元または多次元の陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、および分割遠心分離(partitioning centrifugation)を含むがこれらに限られない方法論のうち任意の数の方法論により分画しても良い。複雑な無傷タンパク質混合物の分画は、前記好ましい実施形態における1または複数の方法を用いて同定および/または定量的に比較できるタンパク質のダイナミックレンジを向上させる1つの方法である。

10

【0165】

[既知量の無傷タンパク質混合物サンプル]

同量の無傷複雑タンパク質混合物は、続いての定量的比較を単純化するために、未処理のおよび/または分画した対照および実験用サンプル源から単離するのが良い。

【0166】

[1または複数の、無傷(外因性)タンパク質内部標準の添加]

研究しようとする複雑なタンパク質混合物に天然に含まれていないことが知られている、同量の、1またはそれ以上の無傷タンパク質を、対照および実験用サンプルに、1または複数の内部標準として添加しても良い。それら無傷タンパク質内部標準は、イオンマッピング研究において、いくつかの有用な精度管理チェック(quality control checks)を提供する。内部標準タンパク質および天然タンパク質の消化により生産されたペプチドの相対レベルは、前記対照および実験用の複雑なタンパク質混合物が、同様の効率で消化、還元、および誘導されたことの基準を提供する。1または複数の内部標準タンパク質の消化により生産された前記ペプチドは、続いてのペプチド分離工程においてクロマトグラフィー保持時間の再現性をモニターし、および質量測定の正確性をモニターするマーカーとしても働く。

20

【0167】

[無傷タンパク質内部標準ブランクサンプル(Intact Protein Internal Standard(s) Blank Sample)の創造]

30

前記対照および実験用サンプル中において1または複数の内部標準として用いる、1または複数の無傷タンパク質サンプルのそれぞれは、前記対照および実験用サンプルのイオンマッピング分析に組み込まれた、同じ消化、還元、および誘導化工程に、ならびに、同じクロマトグラフィーおよびイオン化条件にかけると良い。このことは、前記内部標準に関連するペプチドの同定を可能にする。それは、続いての定性的同定および/または定量的比較工程から排除すべきバックグラウンドイオンの同定をも可能にする。

【0168】

[タンパク質混合物の化学的/酵素的消化]

前記対照および実験用の複雑な無傷タンパク質混合物から、および前記内部標準無傷タンパク質混合物から、ペプチド断片を生成させるために、任意の数の前述の方法論を用いることができる。タンパク質断片化におけるそのような方法論は、酵素的または化学的消化を含んでいても良いが、これらに限定されない。

40

【0169】

[任意の1次元または多次元クロマトグラフィー分離]

マススペクトル分析に先立ち、前記対照、実験用および内部標準/バックグラウンドタンパク質混合物の消化において生産された前記ペプチド混合物の複雑性を減少させるために、1次元または多次元液相クロマトグラフィー分離方法論を適用しても良い。それら液相クロマトグラフィー分離方法論は、陰イオンもしくは陽イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動クロマトグラフィー("CEC")、またはそれらの任意の組合わせ、または他の、前述した、非等モル不均一複雑混合物中に含まれ

50

るペプチドのクロマトグラフィー分離に関連する先行技術を含んでいても良い。それら液体クロマトグラフィー分離方法論は、前記ペプチドプールのサブフラクションを生産することと、直接連結しているか、または独立に用いても良い。典型的には、最終の液体クロマトグラフィー分離は、正確な質量測定が可能な質量分析計におけるイオン源と、直接インターフェースで連続しているのが良い。

【0170】

[任意の、注入量補正のための内部標準Bの添加]

液体クロマトグラフィーマススペクトル測定(LC-MS)分析に先立ち、同量の1またはそれ以上の内部標準化合物を各サンプル混合物に添加しても良い。この、任意の1または複数の内部標準における第1の目的は、クロマトグラフィー注入量の変動を補正することであるが、しかし、それは、さらに、クロマトグラフィー保持時間標準および質量正確性確認標準としても働くことができる。

10

【0171】

[液体クロマトグラフィーによる正確な質量の分析]

前記対照、実験用、そして内部標準ブランクタンパク質サンプルの消化から生産されたペプチドプールの液体クロマトグラフィー分離における最終段階は、正確な質量の測定が可能な質量分析計と直接連結している。理論的に計算された質量に対し、 $10 \times$ 百万分の一(ppm)以内の質量分析正確性をルーチンに沿って(routinely)提供可能な質量分析計が良い。しかしながら、ルーチンの質量測定正確性は、理論的に計算された質量に対し5 ppmに等しいかまたはそれ未満が望ましい。この正確な質量分析工程が可能なタイプの質量分析計としては、少々例を挙げれば、飛行時間、フーリエ変換イオンサイクロトロンレゾナンス、または磁気セクタを含む。

20

【0172】

[一意的マスリストジェネレータを用いた工程の結果]

液体クロマトグラフィーによる正確な質量の情報は、一意的マスリストジェネレータ(Unique Mass List Generator)を用いて処理する。それは、他のLC-MS分析から同様の方法により誘導されたリストと比較可能な一意的イオンのリストを生成させるために、数ある中でも特に、質量正確性、荷電状態、クロマトグラフィーピーク強度および面積、ならびに、計算された疎水性に基づく閾値基準(threshold criteria)を用いる。

30

【0173】

[内部標準成分の同定および定量]

前記任意の1または複数の無傷タンパク質内部標準、ならびに、前記対照物、実験用および内部標準/ブランクサンプルに添加した前記任意の1または複数の消化後"B"内部標準に由来するペプチド消化生成物の両方は、それらサンプルの各々について生成された一連の一意的マスリスト情報内において同定し、そして、天然ペプチドの候補イオンとして考慮しないようにフラグを付ける。

【0174】

[天然ペプチドピーク面積における内部標準B補正]

前記一意的マスリストジェネレータによって同定した各成分のピーク面積は、前記任意の"B"内部標準におけるピーク面積との比率を見ることにより、LC-MS注入量偏差について補正する。

40

【0175】

[一意的マスリストブランク補正についての、バックグラウンドイオンリストの編集]

無傷タンパク質内部標準ブランクサンプル(Intact Protein Internal Standard(s) Blank Sample)中において同定された全ての非内部標準イオンは、バックグラウンドイオンとして企図し、そして、排除リスト内に編集する。

【0176】

[一意的マスリストからの、バックグラウンドイオンの除去]

前記無傷タンパク質内部標準ブランクサンプル中において同定したバックグラウンドイオンは、対照および実験用サンプルの一意的マスリスト中において、天然ペプチド候補イ

50

オンとしての考慮から除去する。

【 0 1 7 7 】

〔 タンパク質内部標準からの相対消化効率の評価 〕

消化に先立ち前記対照および実験用サンプルに添加した、前記 1 または複数の無傷タンパク質内部標準(Intact Protein Internal Standard(s))に関係したペプチドイオンのピーク面積は、前記対照および実験用サンプル中における多数の天然ペプチドイオンのピーク面積と比較し、両方のサンプルが比較可能な効率で消化されていることを決定する。

【 0 1 7 8 】

〔 対照サンプルおよび実験用サンプル由来のポリペプチドについての、内部標準補正した正確な質量のクロマトグラフィーピーク面積の比較 〕

前記対照サンプル中におけるバックグラウンド補正後に残った一意的マスリストペプチドイオンについての、内部標準補正した正確な質量のピーク面積は、前記実験用サンプル中の一意的マスリストペプチドイオンについて同様に補正した正確な質量のピーク面積と比較する。比較したペプチドイオンは、ユーザの定義による正確な質量、およびクロマトグラフィー保持時間閾値基準に従って符号させる。実験用サンプルペプチドイオンについて、対照用サンプルペプチドと符号させた際のピーク面積比値が、ユーザ定義による発現レベル閾値基準よりも高いかまたは低い場合、または、実験用サンプルペプチドイオンが対照サンプルペプチドイオンに対して符合しない場合、続いて、前記実験用サンプルペプチドイオンは、それが由来するタンパク質を定性的に同定するためのさらなる努力のために、フラグを付ける。実験用サンプルペプチドイオンについて、対照サンプルペプチドイオンと符合させた際のピーク面積比値が、ユーザ定義による発現レベル閾値基準の範囲内である場合は、続いて、それが由来するタンパク質を定性的に同定するためのさらなる努力を続けても良いし、続けなくても良い。

【 0 1 7 9 】

〔 生物学的に重要な定性的同定 〕

実験用サンプルペプチドイオンについて、対照サンプルペプチドイオンと符合させた際のピーク面積比値が、ユーザ定義による発現レベル閾値基準の範囲内である場合は、続いて、それが由来するタンパク質を定性的に同定するためのさらなる努力を、その情報が生物学的に重要であるか、または、そうでなくともこの研究の目標に関係すると考えられる場合は、続けても良い。そうでない場合は、前記実験用サンプルペプチドイオンについて決定された分析情報は、データベース中に記録し、それが由来するタンパク質を定性的に同定するためのさらなる努力は行なわない。

【 0 1 8 0 】

〔 一意的マスリストイオンについての、高度な質量正確性のペプチドマスフィンガープリント(PMF)データベースサーチの実行 〕

定性的同定にかけた実験用サンプルペプチドイオンは、非重複的タンパク質データベースに対してサーチする。データベースサーチは、前記実験用サンプルペプチドイオンにおける質量測定の正確性により、および、前記実験用サンプル中に含まれるタンパク質の供給源について公知であっても良い 1 またはそれ以上の物理化学的性質により、制限される。関連する物理化学的性質は、少々例を挙げれば、サンプル源の生物体、細胞レベル下のサンプルフラクション、タンパク質分子量の範囲、およびタンパク質のpIを含んでいても良い。

【 0 1 8 1 】

〔 各仮試験的PMFタンパク質同定と一致する全ての一意的マスリストペプチドについての、重複的リストのタブュレートまたは形成 〕

PMFデータベースサーチを通じて仮試験的に同定し、同じタンパク質と関連付けた実験用サンプルの一意的マスリストペプチドは、各仮試験的に同定したタンパク質について重複的リストを形成するために、一まとめにする。

【 0 1 8 2 】

〔 各仮試験的ペプチドマスフィンガープリントタンパク質同定と一致する全てのペプチ

10

20

30

40

50

ドについて、何らかの発現レベルシフトがある場合の決定]

同一のタンパク質同定と一致すると同定した、各実験用サンプルペプチドの発現レベルシフトを比較する。全ての前記ペプチドについて前記発現レベルシフトが一致する場合、続いて、追加の定性的同定確認、例えば保持時間の二重チェックを行なっても良い。前記発現レベルシフトが不一致の場合、続いて、全ての前記ペプチド、または、少なくとも発現レベルシフトにおいて不一致である1もしくは複数の前記ペプチドは、LC-MS/MS分析のためにフラグを付けても良い。

【0183】

[ブルアンドブリーズ校正曲線の生成]

仮試験的PMF同定について確認するための任意のテストは、各実験用サンプルペプチドについて測定したブルアンドブリーズ疎水性/親水性が、前記PMF同定が正しい場合に前記ペプチドが有すべきである理論的なブルアンドブリーズ疎水性/親水性と一致するかどうかに基づく。このために、公知の内部標準ペプチドの理論的ブルアンドブリーズインデックスを、LC-MS保持時間に対してプロットし、各実験用サンプルペプチドについて測定したブルアンドブリーズインデックスをそれにより決定できる校正曲線を生成させる。

10

【0184】

[仮試験的ペプチドマスフィンガープリント同定の、定性分析アルゴリズム(Qualifying Algorithm)の適用を通じてのテスト]

前記PMF同定結果のさらなる検証に用いることのできる種々の情報を関連付ける。全体的にまたは部分的に前記PMFデータベースサーチを制限するために、多数の中でも、サンプル源生物体、細胞レベル下サンプルフラクション、タンパク質分子量範囲、およびタンパク質のpI等の情報を用いても良い。各仮試験的PMF同定をさらに検証するために、追加の物理化学的性質情報を、定性分析アルゴリズム(qualifying algorithm)の使用を通じて試験しても良い。例えば、前記アルゴリズムは、各一意的マスリストペプチドについてのブルアンドブリーズインデックスの測定値対理論値の一致のスコアを付けるために用いても良く、各一意的マスリストペプチドについてのpIの測定値対理論値の一致のスコアを付けるために用いても良く、開裂ミスおよびペプチド荷電状態情報の一致のスコアを付けるために用いても良く、ヒスチジン含有ペプチドおよび荷電状態情報の一致のスコアを付けるために用いても良く、システイン含有ペプチドおよび測定された修飾システインアミノ酸含有関連ペプチドの存在の一致のスコアを付けるために用いても良く、ならびに/または、メチオニン含有ペプチドおよび測定された酸化メチオニン含有関連ペプチドの存在の一致のスコアを付けるために用いても良い。

20

30

【0185】

[一意的マスリストからの、仮試験的に同定した質量の除去、および、仮試験的同定タンパク質リストの創造]

ここで、データ整理工程(data reduction process)において、全てのバックグラウンドおよび任意の内部標準関連イオンを、前記実験用サンプル一意的マスリストから除去する。この研究の目標によれば、前記実験用サンプル一意的マスリストは、前記対照サンプル一意的マスリストイオンと比較して明白な発現レベル差異を有し、それがユーザ定義による閾値基準よりも上または下であるイオンのみを含むように、さらに制限しても良い。どちらのケースにおいても、残った実験用サンプル一意的マスリストイオンは、前記定性分析アルゴリズム基準を満足するもの、および前記定性分析アルゴリズム基準を満足しないものに細分する。前記定性分析アルゴリズム基準を満足しないイオンは、仮試験的同定タンパク質リスト(Tentatively Identified Protein List)に移動する。それらのイオンは、一般的には、LC-MS/MS分析によりさらに定性分析しない。

40

【0186】

[一意的マスリスト中における未同定質量からの、孤立マスリストの創造]

前記定性分析アルゴリズム基準を満足しない実験用サンプル一意的マスリストイオンは、孤立マスリスト(Orphan Mass List)に移動する。

【0187】

50

[仮試験的に同定したタンパク質の翻訳後修飾 (PTM) 変異体についての、孤立マスリストのサーチ]

孤立マスリストイオンは、特に、それらが前記仮試験的に同定したタンパク質の翻訳後修飾変異体として計上できるかどうかを評価するために、PMFサーチに再度かける。

【 0 1 8 8 】

[定性分析したPTMヒットの、孤立マスリストから仮試験的同定タンパク質リストへの移動]

仮試験的同定タンパク質のPTM変異体基準を満足する孤立マスリストイオンは、定性分析アルゴリズムを用いて検証し、そして、前記孤立マスリストから前記仮試験的同定タンパク質リストへ移動する。

【 0 1 8 9 】

[残りの孤立マスの、LC-MS/MS分析のための算入リスト (Include List) への設置]

仮試験的同定タンパク質のPTM変異体基準または続いての定性分析基準を満足しない孤立マスリストイオンは、LC-MS/MS分析のためにフラグを付ける。

【 0 1 9 0 】

[さらなる検証を必要とする、未同定の孤立マス、および、仮試験的タンパク質IDペプチドマスについての、LC-MS/MS分析]

未同定孤立マス、および、さらなる検証のためにフラグを付けた任意の他のペプチドマスは、続いて、LC-MS/MSにより分析する。

【 0 1 9 1 】

[タンパク質シーケンスデータベースサーチまたはESTデータベースサーチまたはデ・ノボ (de novo) シーケンスのLC-MS/MS結果]

LC-MS/MS分析の結果は、前記MS/MS分析工程におけるペプチドシーケンス情報を利用したソフトウェアツールにより処理する。ソフトウェアツールは、少々例を挙げれば、タンパク質シーケンスデータベースサーチ用、発現シーケンスタグ (EST) データベースサーチ用、およびデ・ノボサーチ用のアルゴリズムを含む。

【 0 1 9 2 】

[仮試験的タンパク質IDリストおよびLC-MS/MS分析結果のアップデート]

前記LC-MS/MS分析から仮試験的に同定したタンパク質は、前記仮試験的同定タンパク質リストに加える。

【 0 1 9 3 】

[仮試験的に同定したタンパク質および孤立ペプチドマスリストについての、イオンマップおよびアーカイブ結果の生成]

前記仮試験的同定タンパク質、それらに対応するペプチド断片、および前記孤立ペプチドマスリストイオンについての、全ての物理化学的性質データおよび定量的発現レベルデータは、データベース中でアーカイブに入れられ、そして、研究する対照および実験用サンプルに含まれるタンパク質における差異を示す種々のイオンマップフォーマットをディスプレイするために好適な状態にする。

【 0 1 9 4 】

[定性分析 (Qualification)]

実験的に誘導した一意的マス (unique mass) は、任意の 1 または複数の内部参照タンパク質 (IRP) を単独で消化することにより定性分析できる。再度、前記 IRPs を、比較対象となる得られた各 UML について三段階で走らせ、そして、特定のユーザ定義パラメータおよび閾値を用いて圧縮する。ここで述べる大腸菌データセットについての一例では、それらのパラメータは、 ± 5 -ppm、2 分間、および ± 0.5 荷電状態にセットする。データ圧縮が多数の異なる重複的なチェックを提供する間、ずっと同じ IRPs を用いる。第 1 に、前記消化はどのようにして再現可能であるか；第 2 に、前記システイン変異はどのようにして再現可能であるか；および第 3 に、前記イオン化効率はどのようにして再現可能であるか。これらのパラメータの全ては、IRP 正確質量 LCMS 分析物におけるデータセットの前記圧縮データを、他のものにおけるそれらと比較することにより定性分析することができる

10

20

30

40

50

。

【0195】

正確な質量および荷電状態によりIRPペプチドと符合する全ての一意的マスの保持時間は、続いて、各ペプチドの理論的疎水性に対しプロットし、結果として、保持時間を疎水性と関連付ける線型方程式(linear equation)を得ても良い(図2参照)。この方程式を持つことは、前記複合UMLにおいて、実験的疎水性を、実験的に誘導した各一意的マスの保持時間について計算することを可能にする。さらに、すでに確立した前記荷電状態ルールを持つことは、前記掲載した非重複的タンパク質データベース中における各ペプチドの理論的荷電状態について計算することを可能にする。定性分析は、それゆえに、全ての実験的に誘導した物理化学的性質を、ある生物体のプロテオーム中の全てのペプチドにおけるそれらの理論的物理化学的性質に対しランク付けすることに関係していても良い。大腸菌データセットに関しては、それらの物理化学的性質は、正確な質量、疎水性および荷電状態であっても良い。前記定性分析アルゴリズムを適用する前に、前記複合UMLは、前記掲載した非重複的タンパク質データベースに対し、正確な質量についてサーチする。正確な質量についてのサーチは、ペプチドマスフィンガープリントであると考えられる。ここで、ユーザは、許容量値を、異なる正確質量サーチパラメータから選択し、そしてインプットする。大腸菌データセットに関しては、前記正確質量サーチパラメータは、質量正確性は ± 10 ppm、符合するペプチドの最小数は3、および開裂ミス = 0にセットした。他のパラメータとしては、少々例を挙げれば、シーケンスカバレッジ(sequence coverage)、無傷タンパク質分子量範囲、無傷タンパク質pI、ペプチドpI、ペプチド修飾すなわちリン酸化物、糖、および非特異的な開裂を含んでいても良い。さらに、ユーザは、減算的反復処理(subtractive reiteration)のセクションに示すように、異なるイテレーション(iterations)に対し、異なるパラメータを選択することができる。ここで、前記仮試験的同定アルゴリズムは、各イテレーションに対し、適切な正確質量サーチパラメータを適用する。

10

20

【0196】

[度数ジェネレータ]

度数ジェネレータ(Frequency Generator)は、第1に、各仮試験的同定(Tentative Identification (TID))に対し、前記ユーザ定義の許容値ウィンドウ下で前記分析工程の各物理化学的性質についてヒットしたタンパク質数に関して、注釈を付ける。大腸菌の実験については、それら度数値は、($Freq_{AM}$, $Freq_{HPLC_i}$, $Freq_{CS}$)であった。実験的に誘導した、RT 45.00分間において計算した MH^+ 1795.9523、かつ、計算した実験的荷電状態2.90の条件では、7の異なるタンパク質が、正確質量許容値10 ppmの範囲内でヒットした。しかしながら、3の許容値ウィンドウは、正確質量について、0-5 ppm, 5-7.5 ppm および 7.5 から 10 ppmから選択した。

30

【0197】

許容値 = 10 ppm

 $AM_{windows}$ に対する計数

x = 5 7.5 から 10 ppm

y = 2.5 5 から 7.5 ppm

z = 1 0 から 5 ppm

40

【0198】

この場合、前記許容値ウィンドウ0-5 ppm範囲内の5のTIDsについては、前記 $Freq_{AM}$ は5、前記許容値ウィンドウが5-7.5 ppmの間では6、そして、前記許容値ウィンドウが7.5-10 ppmの間では7であった。前記ランク付けをさらに分離するため、各仮試験的同定(TID)は、TIDがその中に収まる許容値ウィンドウに基づき、重み付けファクター(weighting factor)を受け取る。本実施例では、5ヒットおよび7ヒット間に多大な相違はなかったが、しかしながら、重み付けファクターを各許容値ウィンドウに帰属する場合、高い質の(<5 ppm)正確質量TIDを、低い質の(>7.5 ppm)それからさらに分離することが可能である。そのように、各許容値ウィンドウは、ユーザ定義の重み付けファクター $AM_{Weighted}$ に帰属される

50

(x, y, および z は前記の通りである)。本実施例では、1, 2.5 および 5の重み付けファクターは、許容値ウィンドウの0-5 ppm, 5-7.5 ppm および 7.5-10 ppmにそれぞれ帰属された。 $\text{Freq}_{\text{AM}} * \text{AM}_{\text{Window}}$ の積を採用すると、スコアが5,6,7 から 5,15,35に変化し、より低い質のTIDをより高い質のそれから明確に大きく隔てる。(後に、より低いスコアがより良い理由が明らかになる。) スコアリングをさらに調整するために、他の一の重み付けファクター $\text{TIDS}_{\text{WeightedAM}}$ を含めても良い。この計数は、各個のTIDにおける Freq_{AM} をその最大(Maximum) Freq_{AM} で割ることにより、スコアを補正する。本実施例については、計算された $\text{TIDS}_{\text{WeightedAM}}$ は、 Freq_{AM} が5であるものについては3.57であり、それが6であるものについては5.14であり、 Freq_{AM} が7であるものについては7であった。したがって、各許容値ウィンドウにおいて、どれだけの数のタンパク質が仮試験的に同定されたかという点において、大きな広がりはなく、係数 $\text{TIDS}_{\text{WeightedAM}}$ のスコアに対する影響は、 $\text{AM}_{\text{Window}}$ におけるそれと同程度でスコアに大きく影響しない。 $\text{Freq}_{\text{AM}} * \text{AM}_{\text{Window}} * \text{TIDS}_{\text{WeightedAM}}$ の積を採用すると、スコアは5,15,35 から 17.85, 77.1, 245に変化する。しかしながら、許容値ウィンドウ1の範囲内で1のTIDしか存在しない場合、データ整理のために選択したどの物理化学的性質においても、この係数は、それを集団(pack)の残りから明確に分離する。特定の物理化学的性質に対する最終のユーザ定義重み付けファクターは、その性質が最終スコア上に有する重みである。すなわち、全スコアの50%が正確質量に基づいていれば、 $\text{AM}_{\text{Weight}} = 1/5$ である。

10

【0199】

度数重み付け(frequency weighting)のための係数

20

- a = 6 AMの重み付け(Weight_AM)
- b = 2 HPLCの重み付け(Weight_HPLC)
- c = 2 CSの重み付け(Weight_CS)

【0200】

したがって、最終重み付けランク(final Weighted Rank)におけるAM値の式は、下記の通りである。

【0201】

$$1/(\text{AM} + \text{HPLC} + \text{CS}) = (\text{AM}_{\text{Weighted}} * \text{AM}_{\text{Freq}} * \text{TIDS}_{\text{Weighted}} * \text{AM}_{\text{Window}}).$$

【0202】

同じ論理が、データ整理に用いる、全ての選択された物理化学的性質に当てはまり、結果として、最終重み付けランクは、7のTIDsのうち2について0.1795となり、その次の最も隣接したスコアは0.156となる。前記2のTIDsのスコア0.1795は、同じタンパク質の2のアイソフォームから誘導された同じペプチドに由来するということは特記すべきである。この、仮試験的に同定した正確質量および物理化学的性質(Accurate Mass Physico-chemical Properties TID)を検証するために、前記正確質量および保持時間を、算入リスト中に置き、そして、MS/MSを行なった。このMS/MSサーチは、結果として、一意的マスを、明確に、かつ曖昧でなく、tufAおよびBに帰属した。

30

【0203】

もう1つ追加の重み付けファクターである「確率重み付けファクター(Probability Weighting Factor)」がある。これは、通常、デフォルトを1つ選択することによりセットされる係数である。全てのTIDsが、最も低い物理化学許容値ウィンドウ(Physico-chemical Tolerance Window)の範囲内でのみ符合した場合、下記重み付けファクターを採用し、高い確率で全てのTIDsが擬陽性であることを示す。

40

【0204】

- AM = 0.2
- HPLCi = 0.5
- CS = 0.33

【0205】

反復的サーチシステム(reiterative searching system)中では、これらは、開裂ミス、点変異、修飾等を含む一意的マスであっても良い。この条件が満たされる場合、前記確率

50

値に対しユーザ定義の係数を掛ける。

【0206】

この技術分野の熟練者にとっては、他の物理化学的性質も同様にランク付けできることは明白である。そのような他の物理化学的性質は、少々例を挙げれば、無傷タンパク質のMwおよびpI、ペプチドのpI、ならびに、ペプチド修飾に係する正確質量の相違であっても良い。

【0207】

前述の通り、前記度数ジェネレータは、結果として各TIDを重み付けランク(Weighted Rank)に帰属する、単なるランキングアルゴリズム(Ranking Algorithm)である。前記重み付けランクは、前記非重複的タンパク質データベース中における最も可能性の高い候補ペプチドシーケンスの、一定の保持時間での溶出における、一定の荷電状態を有する一定の正確質量に対し、確率を本質的に帰属する、確率スコアに外挿することもできる。TIDをさらに検証するために、ユーザは定性分析アルゴリズム(Qualification Algorithm)を走らせることが好ましい。

10

【0208】

[定性分析アルゴリズム]

前記定性分析アルゴリズムは、ユーザが、任意の2のサンプルセット、典型的には対照および実験用に由来する、度数を確定したTIDsを、比較および定性分析するために、一定のパラメータをセットすることを可能にする。前記アルゴリズムを活性化するために、前記ユーザは、第1に、符合のためにパラメータをセットアップする。大腸菌由来のtufA実施例では、定性分析パラメータ(qualification parameters)は、これらの符合ペア(matched pairs)においてのみ、マスエラーが5 ppm未満、保持時間の差異が2分間未満、ABS Freq ≤ 4 、および確率スコア $>70\%$ となるようにセットした。第1に、度数を確定したデータを、タンパク質により、次にMH+により、次にサンプルにより分類した。符合ペア(matching pairs)についてのそれらのみをパスした。これは、さらにシーケンスにより、次にサンプルにより分類することによって達成した。次に、質量および保持時間の差異および標準化面積比(normalized area ratios)について計算を行なった。計算は、常に、実験用の結果を対照用のそれで割ることに基づいている。

20

【0209】

一度これを達成すると、前記ソフトウェアは、各符合ペアについてABS Freqを生成する。このABS Freqは、Freq_{AM}、Freq_{HPLC_i}およびFreq_{CS}の最小値(Min Value)に等しい。前記ユーザ定義による定性分析パラメータをパスした全ての符合ペアは、イオンマップサマリレポート(IonMap Summary Report)に移す。

30

【0210】

[イオンマッピング実験に由来する孤立ペプチドイオンについてを目標とするタンデムマススペクトル測定]

前記好ましい実施形態において詳述した通りにイオンマップを生成させた後、典型的には、良い質量正確性を示すが、種々のタンパク質およびヌクレオチドデータベースに由来する公知のタンパク質と相関付けられないいくつかのイオンが存在する。これら「孤立(orphan)」ペプチドイオンについてリストを生成させる。そのリストは、続いて、算入リストとして一連のLC-MS/MS実験を行なうために提示しても良い。それらの実験は、孤立ペプチドイオンフラグメンテーション(fragmentation)データを提供するであろう。そのデータは、続いて、それらペプチドの個性(identity)を確認するために、デ・ノボ方法および/またはデータベースサーチソフトウェア(database searching software)を用いて試験しても良い。前記孤立ペプチドは、続いて、翻訳後修飾を伴うかまたは伴わずに、それらに対応する親タンパク質と相関付けても良い。

40

【0211】

[大域解析]

大域解析(global analysis)は、プロテオームまたはプロテオームサブセット中に置ける全てのタンパク質の同定を試みる。さらに、それは、2またはそれ以上のプロテオーム

50

またはプロテオームサブセット中におけるそれらタンパク質の相対レベルの測定手段を提供する。その最もシンプルな形態では、2またはそれ以上のタンパク質混合物を化学的または酵素的に、再現可能な方法で断片化し、対応するペプチド混合物を形成させる。それらペプチドは、続いて、分離し、そして、LC-MS分析工程で正確に質量測定する。前記一意的マスリストジェネレータのアルゴリズムは、それら混合物中のペプチドに関係する正確質量の総合的なリストを抽出し、そして、それらペプチドの相対強度を測定する。定性分析アルゴリズムは、前記初期混合物中の前記タンパク質を同定するために、物理化学的性質情報と組合わせた正確質量情報を用い、そして、各一意的マスリストペプチドを、それが由来する前記タンパク質に帰属する。さらに、この工程は、各ペプチドが示す相対レベルを測定する。それは、前記ペプチドが由来する前記タンパク質の相対レベルに比例する。

10

【0212】

これらのイオンのうち、ユーザが特定した重複性および閾値基準を満足しないものは、シーケンス情報を誘導するために、LC-MS/MSにより分析しても良い。そのシーケンス情報は、追加のタンパク質同定情報を提供するために、タンパク質もしくはDNAデータベースに対してサーチするか、または、デ・ノボシーケンシング方法を用いて分析しても良い。前記大域解析工程は、2またはそれ以上のプロテオームまたはプロテオームサブセットサンプル中における同定されたまたは未同定のタンパク質について、総合的かつ再現性のある記述を提供する。それは、前記サンプルにおけるタンパク質組成の定性的および定量的相違を示すために用いても良い。

20

【0213】

[アップ/ダウンレギュレーション]

このタイプの解析は、ユーザが、2のサンプル間におけるタンパク質またはペプチド発現レベルの差異に対して、閾値をセットし、そして、特に、前記ユーザ定義によるあらかじめセットした閾値から外れるペプチドイオンを同定および定性分析することを可能にする。このタイプの解析は、大域解析のサブセットである。

【0214】

[微分解析(Differential Analysis)]

このタイプの解析は、特に、ユーザが、2の条件(対照および実験用)のうち1に対して一意的であるペプチドイオンを同定および定性分析することを可能にする。このタイプの解析は、大域解析のサブセットである。

30

【0215】

[翻訳後修飾]

このタイプの解析は、特に、翻訳後修飾ペプチドイオンについて相対発現レベルを同定およびレポートするであろう。このタイプの解析は、大域解析のサブセットである。

【0216】

[タンパク質ファミリー]

このタイプの解析は、特に、ユーザが指示した、掲載されるサブセットデータベース(indexed subset database)の創造に働く1または複数のタンパク質について、相対発現レベルを同定およびレポートするであろう。このタイプの解析は、大域解析のサブセットである。

40

【0217】

[相対的化学量論]

前記大域解析工程は、同定および定性分析されたタンパク質の相対レベルを決定し、それらタンパク質の測定レベルは、これもまた同定および定性分析された任意のユーザ定義タンパク質に対して比較するために、選択することができる。さらに、相対的化学量論が得られると、レスポンスファクターの差異(response factor differences)測定における相対面積比(relative area ratio)補正に使用可能なMSイオン化レスポンスファクターを発展させるために、各タンパク質におけるサインペプチドを合成および分析することができる。

50

【0218】

この技術分野の熟練者にとっては、大域解析を行なうことができるのであれば、任意のタイプのサブセット解析を行なうことができることは自明であろう。

【0219】

[同定および定量アルゴリズムのセットアップ]

同定および定量アルゴリズムは、ユーザにより、単一のまたは反復的工程としてセットアップすることができる。ユーザインターフェースを通じて、ユーザは、MS（および、あればMS/MS）応答(interrogations)についての、厳重なサーチ（イテレーション）の数、および、PASSES（反復的分析(reiterative analysis)のサイクル）の数を選択しても良い。

10

【0220】

前記ユーザは、どれだけの数のPASSESが望ましいか、ならびに、各PASSについて、同定および定量アルゴリズムについてのイテレーションをどれだけの数を用いるかをインプットする。以下にリストするのは、各PASSの各イテレーションにおけるいくつかの物理化学的性質の例である。前記インターフェースは、好ましくは、各PASSの各イテレーションに対し厳重なパラメータをセッティングすることにより、ユーザがサーチアルゴリズムをコントロールすることを可能にする。

【0221】

[パラメータ]

[1または複数の例示]

供給源等

全ての分類、イースト、ヒト、大腸菌

20

タンパク質分解酵素

(ユーザ定義)

非重複的データベース

タンパク質、翻訳されたゲノムDMA

さいばうれべる下の位置

ER、ゴルジ体、細胞質等

タンパク質分子量範囲*

全部、0-50、50-100、>100、および閾値

タンパク質等電点範囲*

全部、0-4、4-8、8-12、および閾値

ペプチド分子範囲

全部、開始および停止質量範囲(kDa)、
ならびに閾値

ペプチド等電点範囲*

全部、0-4、4-8、8-12、および閾値

符合に必要なペプチド数

ユーザ定義

質量正確性

ユーザ定義

30

開裂ミス数

ユーザ定義

修飾

CAM、リン酸化等

非特異的開裂

yes / no

(yesの場合、サブチリシン(subtlisin)、キモトリプシン等を選択する)

点変異

yes / no

(ユーザ定義：置換、欠失等)

リストされていない、追加の物理化学的性質のうち、任意の、または全てのもの。*印は、ユーザ定義値である。示した値は単なる例示である。

【0222】

40

[開裂ミス数についてのルール]

トリプシンがペプチド結合をRおよびKの後において優先的に開裂するために、開裂ミスを有する任意のペプチドはN- およびC- 末端の間に余分な塩基性残基を有するであろうという事実に基づき、開裂ミスについてルールを定義しても良い。これによれば：

1. 1の2+ ペプチドイオンが存在し、3+ 対イオン(companion ion)が存在しない場合は、開裂ミスが存在しない可能性があり；
2. 1の2+ ペプチドイオンが存在し、3+ 対イオンが存在しない場合は、1の開裂ミスがあるかも知れず；
3. 1の2+ ペプチドイオンが存在し、3+ 対イオンが存在しない場合は、2の開裂ミスはありそうもなく；

50

4. 1の2+ ペプチドイオンが存在し、1の3+ 対イオンが存在する場合は、開裂ミスが存在しない可能性があり；
5. 1の2+ ペプチドイオンが存在し、同定したシーケンスがKPまたはRPを有する場合は、前記2+ペプチドイオンは、3+対イオンを有する可能性があり；
6. 1の3+ペプチドイオンが存在し、2+対イオンが存在しない場合は、1の開裂ミスが存在する可能性があり；
7. 1の3+ペプチドイオンが存在し、1の2+対イオンが存在する場合は、1または2の開裂ミスが存在する可能性が非常に高く；
8. 1の3+ペプチドイオンが存在し、1の2+対イオンが存在する場合は、開裂ミスが存在しない可能性がある。

10

【0223】

[リン酸化についてのルール]

リン酸化されたペプチドを定性分析するために算入する必要があるであろういくつかのパラメータを定義するために、ルールを公式化しても良い：

1. 前記ペプチドは、リン酸化可能なアミノ酸（セリン、セリン、チロシン、ヒスチジン、アスパラギン酸）を有していなければならない；
2. 前記ペプチドイオンは、79.9994原子質量ユニット(atomic mass units)よりも大きい、リン酸化された対イオンを有しているのが良く；
3. 前記ペプチドは、リン酸化モチーフ（例えば、...GXDP...）を有しているのが良く；
4. 前記リン酸化された対イオンは、逆相C₁₈-カラムから、より早く溶出するのが良く；および
5. 非リン酸化ペプチドイオンの疎水性がより高い場合に、リン酸化対(phosphorylated companion)と比較した際の保持時間の差異がより大きい。

20

【0224】

[その他のスコアリングアルゴリズム(Scoring Algorithm Alternative)]

さらなるアルゴリズム上のアプローチを以下に例示する。これにより、数値は、各々の符合した/相関付けられた特性に帰属され、公知ペプチド/タンパク質対実験用タンパク質/ペプチドの理論的/計算的データベースから、タンパク質/ペプチドについての符合スコア(match score)を誘導する。

30

【0225】

[アルゴリズム]

パート1 データセットの生成：

- * スムース、センター、およびロックマス補正
- * 荷電状態決定
- * 分子質量計算
- * 候補タンパク質/ペプチド対(matches)の初期ヒットリスト(initial hit list)を生成させるための、データベースのサーチ

40

パート2 スコアリング：

- * タンパク質Mwによる、ヒットリストのソート
タンパク質のMwがSEC許容値の範囲内である場合はスコアを2倍に増加させ、タンパク質のMwがSEC許容値の範囲外である場合は、スコアを0.5倍に減少させる
- * タンパク質pIによる、ヒットリストのソート
タンパク質のpIがCEX/AEX許容値の範囲内である場合はスコアを2倍に増加させ、タンパク質のpIがCEX/AEX許容値の範囲外である場合は、スコアを0.5倍に減少させる
- * ppm質量差異による、ペプチドヒット(Peptide Hits)のソート
ppm質量差異が、ロックマスにより補正した最も近接する内部標準における質量差異の範

50

囲内である場合、スコアを4倍に増加させる

ppm質量の正確性が5 ppmの範囲内である場合、スコアを3倍に増加させる

ppm質量の正確性が7.5 ppmの範囲内である場合、スコアを1.5倍に増加させる

ppm質量の正確性が10 ppmの範囲内である場合、スコアをそのまま残す

ppm質量の正確性が10 ppmの範囲外である場合、続いてスコアを0.5倍に減少させる

* ブランドブリーズ値による、ペプチドヒットのソート

B&Bが、内部標準の ± 1000 の範囲内である場合、スコアを3倍に増加させる

B&Bが、内部標準の ± 2000 の範囲内である場合、スコアを2倍に増加させる

B&Bが、内部標準の ± 3000 の範囲内である場合、スコアをそのまま残す

B&Bが、内部標準の ± 3000 の範囲外である場合、スコアを0.5倍に減少させる

10

* ペプチドpIの、内部標準に対する比較

pIが、CEX/AEX分離に関して、ユーザ定義の内部標準許容値の範囲内である場合、スコアを2倍に増加させる

pIが、CEX/AEX分離に関して、ユーザ定義の内部標準許容値の範囲外である場合、スコアを0.5倍に減少させる

* 開裂ミスによる、ペプチドヒットのソート

2+が存在し、それに対する、電荷が増加した(multiply charged)対イオンがなく、そして開裂ミスが0の場合、スコアを3倍に増加させる

2+が存在し、それに対する、電荷が増加した(multiply charged)対イオンがなく、そして開裂ミスが1の場合、スコアをそのまま残す

20

2+が存在し、それに対する、電荷が増加した(multiply charged)対イオンがなく、そして開裂ミスが2の場合、スコアを0.5倍に減少させる

2+イオンとともに3+の対イオンが存在し、そして開裂ミスが存在しない場合、スコアをそのまま残す

2+イオンとともに3+の対イオンが存在し、そしてK/PまたはRPが存在する場合、スコアを1.5倍に増加させる

2+イオンが存在し、3+の対イオンが存在せず、そしてK/PまたはRPが存在する場合、スコアをそのまま残す

3+イオンとともに1の開裂ミスが存在し、そして2+の対(counterpart)が存在しない場合、スコアをそのまま残す

30

3+イオンとともに1または2の開裂ミスが存在し、そして2+の対(counterpart)が存在する場合、スコアを2倍に増加させる

* ヒスチジン含有ペプチドによるソート

「ヒスチジン」が存在しない場合、スコアをそのまま残す

「ヒスチジン」が存在し、そして、異なる荷電状態の対イオンが存在する場合、スコアを1.5倍に増加させる

「ヒスチジン」が存在し、そして、異なる荷電状態の対イオンが存在し、かつ開裂ミスが存在しない場合、スコアを3倍に増加させる

「ヒスチジン」が存在し、そして、異なる荷電状態の対イオンが存在しない場合、スコアをそのまま残す

40

複数のヒスチジンが存在するか、またはヒスチジンが1もしくは複数の開裂ミスと共に存在し、そして、電荷が増加した(multiply charged)対イオンが存在しない場合、スコアを2倍に増加させる

* システイン含有ペプチドによるソート

「システイン」が存在し、そして修飾されている(modified)場合、スコアをそのまま残す

「システイン」が存在し、そして修飾されておらず(not modified)、かつ、溶出がより早く修飾型システインと符合する他のイオンも存在しない場合、スコアを0.5倍に減少させる

「システイン」が存在し、そして修飾されておらず(not modified)、かつ、溶出がより早く修飾型システインと符合する他のイオンが存在する場合、スコアを2倍に増加させる複

50

数のシステインが存在し、そして修飾されたものが存在しない場合、スコアを2倍に増加させる

* メチオニン酸化物 (Met Ox) のソート

1 またはそれ以上の「Met Ox」が存在し、そして、遅れて溶出する、1 またはそれ以上のメチオニンが酸化されていない同じシーケンスと質量が符合するイオンが存在する場合、スコアを2倍に増加させる

* 全てのスキャンから得られた、ユーザ定義によりあらかじめセットした閾値をパスする、ヒットを合計する

(すなわち、ユーザ定義によりあらかじめセットした閾値を越えるスコアのみがパスするであろう)

* リピートイオン (典型的なピーク幅を定義する、最も近接する2のスキャンまたは多数のスキャン) が存在する場合、最高スコアを有するヒットのみを算入する

* 最終スコアを、カバー範囲の増加 (coverage increases) として増加させる

* 得られた、タンパク質についての昇順でのサマリヒットリスト (Summary Hit List) をソートし、確率スコアを計算する

パート 3 定量:

* 全ての同位体について合計した強度を含む、同定した各タンパク質についての分子質量をプロットし、そして、結果として得られたイオンマップをセーブする

* 各イオンマップの相対強度を、対照タンパク質におけるそれに対し比較する

* 内部対照タンパク質と比較した擬濃度レベル (pseudo concentration level) を計算する

【 0 2 2 6 】

上記アルゴリズム中では、前記データベースは、技術のある熟練者に対し公知であり認められている、多数の方法またはプログラムのうち、任意のものによりサーチしても良い。そのような方法について例示すれば、K.R. Clauser et al., Anal. Chem. 71:2871-2882 (1999); M. Mann, M. Wilm, Anal. Chem. 66:4390-4399 (1994); P.A. Pevzner et al., Genome Res. 11:290-299 (2001); J.A. Taylor, R.S. Johnson, Rapid Comm. Mass Spec., 11:1067-1075 (1997); S. Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389-3402 (1997); および B.A. Gaeta, Biotechniques 28:436-440 (2000) により記述されている方法を含むが、これらには限定されない。

【 0 2 2 7 】

前記好ましい実施形態に従えば、通常の分子生物学、微生物学、および組換えDNA技術を、この分野における技術の範囲内で採用しても良い。そのような技術は、全て文献中で説明されている。例えば、Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volumes I-III [J. E. Celis, ed. (1994)]; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)] を参照のこと。

【 0 2 2 8 】

全てのアミノ酸残基シーケンスは、その中に式で示されており、その式における左から右向き方向は、アミノ末端からカルボキシ末端の通常方向に沿っている。アミノ酸残基シーケンスの始点または終点におけるダッシュまたは省略記号は、さらなる1またはそれ以上のアミノ酸残基シーケンスとのペプチド結合を示す。

【 0 2 2 9 】

[イオンマッピングの適用]

前記好ましい実施形態は、種々の適用方法、例えば、薬物の発見、患者の診断およびモニタリング等に用いても良い。

【 0 2 3 0 】

10

20

30

40

50

[単一のヌクレオチド多型(Single Nucleotide Polymorphism (SNP))の発見]

イオンマッピングは、2'-デオキシ-5'-リボ核酸(DNA)の多型の同定に用いることができる。重要なDNAを、重要な真核生物または原核生物の細胞の集団(populations)から採取し、そして、文献の記述に従って増幅にかけても良い(Genome Res 1999 May;9(5):499-505)。続いて、制限エンドヌクレアーゼの賢明な使用を通じて、結果として得られた断片は、分離し、そして、1次元または多次元高速液体クロマトグラフィーとマススペクトル測定との組み合わせにより、それらの正確な質量を記録しても良い。前記重要な集団から分けられた重要な断片は、全てのカラム流出物が直接質量分析計のソース(source)に直接入り込まないように、連続的に採取することもできる。それら採取したプールは、追加の増幅、消化、およびイオンマッピングのラウンドを通過し、最終的に、前記重要な集団に対し一意的な多型を含む特定の遺伝子またはその領域を同定するであろう。最終的には、前記多型の特定のシーケンス位置が望まれる場合、続いて、出発原料のシーケンス(例えば、ゲノム全体、1または複数の染色体全体、それらのサブセット、特定遺伝子、またはそれらのサブセット)についての知識の賢明な適用、1または複数の制限酵素の選択、一連の消化において生成された種々の断片の溶出時間、およびそれらの正確な質量を、観測された1または複数の保持時間および1または複数の質量における1または複数の断片を生成するための前記断片のオリジナルシーケンスが何であるかの計算に用いることができるであろう。

10

【 0 2 3 1 】

[遺伝子型の同定(Genotyping)]

20

イオンマッピングは、遺伝子型の同定に用いることができる。単一塩基拡張(single base extension) (SBE)アッセイを用いても良く、そして、これは、あらかじめ文献中に記述されている(Clin Chem. 2001 Feb;47(2):164-72)。しかしながら、この拡張テクノロジーに対するイオンマッピングの適用の利点は、工程の比較対応により明らかになるであろう。重要な多型遺伝子は、同時に増幅させても良い。しかし、1または複数の特定の対立遺伝子およびホモ接合体対ヘテロ接合体を決定するためのアッセイの数は、与えられた飛行時間機器(time of flight instrument)のマスウィンドウに、または、1もしくは複数の特定の抗体複合体の蛍光もしくは蛍光偏光(fluorescence polarization)に限定される。イオンマッピングは、同時に検出できるアッセイの数を劇的に増加させるであろう。それら核酸は、1次元または多次元の高速度液体クロマトグラフィー(HPLC)、例えば、陰イオン交換クロマトグラフィーに続き、イオン対逆相クロマトグラフィーとマススペクトル測定との組み合わせにより、分離しても良い。前記SBEアッセイが、正確に同じ質量(与えられたイオンマッピング工程における質量正確性の範囲内で)、および、1または複数の正確に同じクロマトグラフィー保持時間を有する2またはそれ以上の核酸を生成するポテンシャルを有していた場合のみ、前記2(またはそれ以上)のアッセイは、同時に分析することができない。そのような潜在的な対立は、あらかじめ、前記拡張した核酸について計算した1または複数の質量および1または複数の保持時間の賢明な使用を通じて、計算できる。したがって、それらの互いに抵触するアッセイを分離実験中において管理するか、または、増幅領域を、抵触しないアッセイを生成するように変えることができる。どのケースでも、質量分析計において各拡張した核酸から生成したシグナル強度は、定量分析

30

40

【 0 2 3 2 】

[転写プロファイリング]

イオンマッピングは、一般に転写プロファイリングと呼ばれる遺伝子発現のモニタリングに用いても良い。この技術は、すでに文献に記述されている((Science 270, 467-470, (1995))。そこでは、分離手段は、相補的に固定化された核酸の配列であり、そして、検出は、in vivoまたはin vitro系から生成した蛍光ラベルされた核酸が、それら配列と交雑し、そして、続いての非特異的結合パートナーの除去において蛍光を発するために背後に残されるときに終わる。イオンマッピングは、前記in vivoおよびin vitro系から生成した核酸の分離および同定の両方について、より優れた代替として用いることができる。

50

それら核酸は、1次元または多次元の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、例えば、陰イオン交換クロマトグラフィーに続き、イオン対逆相クロマトグラフィーとマスマススペクトル測定との組み合わせにより、分離しても良い。前記分子の1または複数の保持時間を、それらの正確な質量についての知識と組合わせて、どの写し(transcripts)が、および、各々がおよそどれだけの相対量で、前記サンプル中に存在していたかを同定するために用いても良い。各々から生成されたシグナル面積および/または強度は、サンプル間の定量的比較の基礎として用いても良い。それら核酸のタグを付したバージョンを生成させることが可能であり、それは、それらの分子をポジティブイオンモード質量分析により検出することを可能にするであろう。そして、このことは、信頼性および感度の両方を向上させるであろう。

10

【0233】

[代謝(Metabolomics)]

全ての異なるタイプの臨床サンプルに由来する代謝産物のプロフィールを同定および定量するための方法。代謝産物のイオンマッピングは、本出願の前記好ましい実施形態における記述と同様の技術を用いて行なうことができる。代謝産物を同定および定量するために、2またはそれ以上の臨床サンプルのセットを比較することができる。例えば、薬物代謝産物は、多くのクロマトグラフィー分離技術を用いて臨床サンプル(治療済対未治療)から抽出することができる。それらサンプルは、続いて、イオンマップを生成させるために、質量分析計にインターフェースにより接続された液体クロマトグラフィーにより分析し、前記サンプル中の全ての代謝産物についての、正確なクロマトグラフィー保持時間、および正確な質量についての情報を得ても良い。さらに、小分子代謝産物の物理化学的性質は、それら代謝産物イオンマップの生成を補助するために用いても良い。相対的および絶対的定量情報は、LC/MS実験により生成された選択イオンクロマトグラム(selected ion chromatogram (SIC))情報から抽出しても良い。代謝産物の相対的定量は、異なる条件(すなわち、疾患対非疾患、治療済対未治療、変異体対野生型)で生成された代謝産物イオンマップのSICピーク積分データを比較することにより行なうことができる。それらの各イオンマップに由来する代謝産物の絶対的定量を行なうために、公知の内部標準を組み込んでも良く、そして、校正曲線を生成させても良い。この情報は、続いて、そのイオンマップ中の全ての代謝産物の絶対的定量を得るために用いることができる。

20

【0234】

[ペプチド(Peptidomics)]

全ての異なるタイプの生物学的サンプルに由来する、対生物活性ペプチドのプロフィールを、同定および定量するための方法。前記ペプチドのイオンマッピングは、本出願の前記好ましい実施形態における記述と同様の技術を用いて行なうことができる。対生物活性ペプチドを同定および定量するために、2またはそれ以上の生物学的サンプルのセットを比較することができる。例えば、対生物活性ペプチドは、多くのクロマトグラフィー分離技術を用いて臨床サンプル(すなわち、疾患対非疾患、治療済対未治療、および野生型対変異体)から抽出することができる。それら対生物活性ペプチドサンプルは、続いて、ペプチドイオンマップを生成させるために、質量分析計にインターフェースにより接続された液体クロマトグラフィーにより分析し、前記サンプル中の全てのペプチドについての、正確なクロマトグラフィー保持時間、および正確な質量についての情報を得ても良い。さらに、それら対生物活性ペプチドの分子量、等電点等の物理化学的性質は、それらペプチドイオンマップの生成をさらに補助するために用いても良い。相対的および絶対的定量情報は、LC/MS実験により生成された選択イオンクロマトグラム(Selected Ion Chromatogram ("SIC"))情報から抽出しても良い。ペプチドの相対的定量は、異なる条件下(すなわち、疾患対非疾患、治療済対未治療、変異体対野生型)で生成されたペプチドイオンマップのSICピーク積分データを比較することにより行なうことができる。それらの各イオンマップに由来するペプチドの絶対的定量を行なうために、公知の内部標準を組み込んでも良く、そして、校正曲線を生成させても良い。この情報は、続いて、そのイオンマップ中の全ての対生物活性ペプチドの絶対的定量を得るために用いることができる。

30

40

50

【0235】

[タンパク質のプロファイリング]

全ての異なるタイプの生物学的サンプルに由来するタンパク質のプロフィールを同定および定量するための方法を企図する。無傷タンパク質のイオンマッピングは、本出願の前記好ましい実施形態における記述と同様の技術を用いて行なっても良い。無傷タンパク質を同定および定量するために、2またはそれ以上の生物学的サンプルのセットを比較しても良い。例えば、無傷タンパク質は、多くのクロマトグラフィー分離技術を用いて臨床サンプル（すなわち、疾患 対 非疾患、治療済 対 未治療、および野生型 対 変異体）から抽出しても良い。それら無傷タンパク質サンプルは、続いて、タンパク質イオンマップを生成させるために、質量分析計にインターフェースにより接続された液体クロマトグラフィーにより分析し、前記サンプル中の全てのタンパク質についての、正確なクロマトグラフィー保持時間、および正確な質量についての情報を得ても良い。さらに、それらタンパク質の分子量、等電点等の物理化学的性質は、それら無傷タンパク質イオンマップの生成をさらに補助するために用いても良い。相対的および絶対的定量情報は、LC/MS実験により生成された選択イオンクロマトグラム(Selected Ion Chromatogram ("SIC"))情報から抽出しても良い。無傷タンパク質の相対的定量は、異なる条件下（すなわち、疾患 対 非疾患、治療済 対 未治療、変異体 対 野生型）で生成されたタンパク質イオンマップのSICピーク積分データを比較することにより行なうことができる。それらの各イオンマップに由来するタンパク質の絶対的定量を行なうために、公知の内部標準を組み込んでも良く、そして、校正曲線を生成させても良い。この情報は、続いて、そのイオンマップ中の全ての無傷タンパク質の絶対的定量を得るために用いることができる。

10

20

【0236】

本発明は、下記の、非制限的な、単なる例示として提示する実施例を参照することにより、さらによく理解することができるであろう。この実施例は、本発明における前記好ましい実施形態をより完全に例示するために提示されており、そして、決して、本発明の範囲を限定するものと解釈すべきでない。

【実施例】

【0237】

[一般的手順]

全てのタンパク質および複雑タンパク質混合物は、8.0 Mの尿素を含む0.4 M炭酸水素アンモニウム緩衝液(pH 8.5)中に懸濁させた。タンパク質は、DTTを最終濃度4.5 mMまで添加して還元し、そして、摂氏50 で30分間インキュベートした。還元後、ヨードアセトアミドを最終濃度10 mMまで加え、そして、暗所中、室温で30分間インキュベートすることにより、システイン残基をアルキル化した(alkylated)。この反応は、水により、最終尿素濃度2Mまで希釈し、そして、トリプシンを最終濃度4% (w/w、酵素対タンパク質)まで加え、そして、摂氏37 で24時間インキュベートした。酢酸を最終濃度2%まで加え、このトリプシン消化を終了させた。

30

【0238】

正確質量LCMS分析は、インターフェースによりWaters CapLC HPLC Systemに接続された直交加速式飛行時間質量分析計(Q-TOF 2、Micromass Ltd.社、英国マンチェスター)により行なった。前記Q-TOF 2は、噴霧器の先端においてロックマススタンダードの溶液の共添加を容易にする、特別仕様の三軸噴霧器(triaxial sprayer)を取り付けた（内径：クロマトグラフィー溶出物、中径：ロックマス、外径：噴霧ガス）。ロックマススタンダードとしては、一般に、[Glu¹]-フィブリノペプチド Bの、1マイクロリットルあたり2.0ピコモルの溶液を用いた。前記機器は、W-オブティクスモードにおいて、17,000の分解能(FWHM定義)で操作した。前記Q-TOF 2は、300および2000の質量対電荷範囲を超えるデータを取得するようにセットした。スペクトル捕捉時間は1.9秒、内部スキャン遅延時間は0.1秒であった。

40

【0239】

各サンプルの100マイクロリットルを、セプタムでキャップしたバイアル内にピペット

50

で注入し、そして、CapLCの、冷やした(4)オートサンブラープレート内に設置した。注入の再現性をモニターするために、1.0 ピコモル/マイクロリットルのロイエンケファリン(Leu-Enkephalin)溶液を5マイクロリットル、各バイアル内に内部標準として加えた。移動相Aは、2% 酢酸 / 0.05% TFA / 5% アセトニトリルであり、移動相Bは、2% 酢酸 / 0.05% TFA / 95% アセトニトリルであった。オンラインペプチド分離には、0.320 × 150 mm のC₁₈ Waters Symmetry(商標)カラムを採用し、濃度勾配は、1-40% B で120 分間、50-90% B で1分間、90% Bの定組成で15 分間、続いて、次の注入に先立ち初期条件で30分間とした。前記濃度勾配は、毎分3.5マイクロリットルの流速で展開し、そして、前記ロックマス溶液は、毎分0.25マイクロリットルの流速で添加した。全てのサンプルは、注入から注入の間に持ち越しがないことを確実にするために、各注入後、ブランクを挿入して三重に走らせた。

10

【0240】

ロックマス補正、および、重要な混合物中における成分を+/- 5 ppmの範囲内で正確に質量測定するために、Q-TOF 2 MassLynxソフトウェアの、カスタマイズしたインプリメンテーションを用いた。各スペクトル中、各成分に関連する全ての荷電状態に由来する同位体クラスターシグナル強度は、その成分に対応するMH⁺単一同位体イオンに対応する強度数に崩壊させた。この正確質量単一同位体ピーク情報の強度は、各成分のクロマトグラフィー溶出プロファイルにわたって合計し、その存在量を定量した。この存在量測定は、前記サンプル中に加えた内部標準の存在量に対し、および/または、適切な内部標準であると決定された1もしくはそれ以上の内因性化学成分もしくはポリペプチドの存在量に対し、さらに補正した。内因性化学成分またはポリペプチドは、その存在量レベルが、前記混合物中における他の特定の化学成分またはポリペプチドに対して相対的に、統計学的に有意な方法で変化しない場合に、内部標準として適切であるとする。この場合、同じ化学成分またはポリペプチドの存在量比を、定量的に比較する他のサンプル混合物におけるそれと比較する。ある化学成分の、内因性内部標準としての適切性は、下記式にしたがって試験することができる。

20

【0241】

$$(A_{IS} / A_{CC})_{Control} / (A_{IS} / A_{CC})_{Experiment} \sim 1.0$$

【0242】

式中、A_{IS} は、前記対照サンプルおよび前記実験用サンプルの両方の中に見られる候補内因性内部標準の存在量であり、そして、A_{CC} は、これもまた前記対照および実験用サンプルの両方に共通な第2成分の存在量である。候補内因性内部標準の存在量を、前記対照および実験用サンプル中の複数の第2成分の存在量に対してテストしたとき、前記比がほぼ1に近い場合、それは十分な内因性内部標準である。

30

【0243】

結果として得られた正確質量、強度、荷電状態、およびクロマトグラフィー保持時間情報は、各化学成分またはポリペプチドについて、一意的マスリストと呼ばれるコンパイル中に記録した。同じ混合物についての繰り返し分析から得られた情報は、測定情報を統計的に妥当な方法で結合した、圧縮または複合的一意的マスリスト中に保持した。

40

【0244】

下記の定量的同定例において、未知のポリペプチド、およびそれゆえにそれが由来するタンパク質の個性を確認するために、2の物理化学的性質、疎水性および荷電状態を、正確質量測定とともに用いた。両方の物理化学的性質に対して、それらの性質の測定値および計算値を比較した場合の近似性を、対応する正確質量測定と組合わせて、与えられた未知ペプチドを同定するために用いた。図2は、前述のクロマトグラフィー条件下において分離された公知のトリプシン性BSAペプチド混合物について、観測された保持時間および対応する計算された疎水性測定の関係を示す。このサンプル中では、与えられたペプチドのHPLCインデックス値は、そのアミノ酸組成に基づくその疎水性の基準である。各サンプルについて内部標準としてBSAを用いる場合、疎水性関係が、複雑ペプチド混合物中における未知のペプチドのHPLC値を見積もるために用いられる。複雑混合物中における未知ペ

50

ペプチドの同定は、評価したHPLCインデックス値を、注釈が付けられたペプチドインデックス中における公知のペプチドの理論的HPLCインデックス値と比較し、測定した正確質量から許容範囲内のマズエラーで、最も良い一致に基づいて決定する。例えば、予期されるHPLCインデックス値から15ユニットの範囲内で一致するペプチドは、最も高い信頼性でスコアを付け、15~30ユニットの間で一致するものは、より低いスコアを付ける。

【0245】

未知ペプチドの同定が、予期される疎水性値および正確質量情報によりできない場合は、続いて、可能性のある候補ペプチド数を単一のペプチド同定まで減らすために、追加の物理化学的性質を用いることができる。そのような追加の物理化学的性質は、荷電状態である。より詳しくは、未知ペプチドについて測定した荷電状態を、注釈付ペプチドインデックスに由来する、与えられたペプチド候補について計算された荷電状態と比較することができる。ペプチドの荷電状態測定値（複合的に観測される荷電状態（composite observed charge state））は、下記式にしたがって計算される。

【0246】

Composite Observed Charge State = $(C_1 * I_{C1}) + (C_2 * I_{C2}) + (C_n * I_{Cn}) / (I_{C1} + I_{C2} + I_{Cn})$

【0247】

式中、 I_{Cn} は、各ペプチドに関連する各荷電状態 C_n の強度に等しい。

【0248】

重要な各サンプルに関連するプロテオームサブセット中の、各ペプチドに注釈付けられる荷電状態計算値は、下記法則に従って計算することができる。

【0249】

内部塩基性残基 / ユーザ定義が無いものに対しては、ペプチド長が<12である場合、荷電状態計算値を2.00-2.05の範囲とし、ペプチド長が>12および<17の場合、荷電状態計算値を2.00-2.20の範囲とし、ペプチド長が>18および<25の場合、荷電状態計算値を2.00-2.30の範囲とし、そして、ペプチド長が>25の場合、荷電状態計算値を2.50-3.00の範囲とする。

【0250】

内部塩基性残基 / ユーザ定義残基が1である（NまたはC末端における残基が4以内）ものに対しては、ペプチド長が<12である場合、荷電状態計算値を2.15-2.25の範囲とし、ペプチド長が>12および<25の場合、荷電状態計算値を2.00-2.25または2.75-3.00の範囲とし、そして、ペプチド長が>25の場合、荷電状態計算値を2.00-2.35または2.85-3.00の範囲とする。

【0251】

内部塩基性残基 / ユーザ定義残基が2である（NまたはC末端における残基が4以内）ものに対しては、ペプチド長が<12である場合、荷電状態計算値を2.00-2.20または2.50-2.70の範囲とし、ペプチド長が>12および<25の場合、荷電状態計算値を2.25-2.35または2.8-3.25の範囲とし、そして、ペプチド長が>25の場合、荷電状態計算値を2.30-2.50または3.00-4.00の範囲とする。

【0252】

内部塩基性残基 / ユーザ定義残基が3である（NまたはC末端における残基が4以内）ものに対しては、ペプチド長が<12である場合、荷電状態計算値を2.10-2.30または2.70-3.00の範囲とし、ペプチド長が>12および<25の場合、荷電状態計算値を2.25-2.50または3.00-3.50の範囲とし、そして、ペプチド長が>25の場合、荷電状態計算値を2.50-2.70または3.20-4.50の範囲とする。

【0253】

[実施例 1 単一タンパク質の分析 (BSA)]

[定性分析]

タンパク質を定性的に分析する能力を示すために、1ピコモルのウシ血清アルブミントリプシン消化物を、正確質量LC-MSにより三重に分析した。同じ溶液を、前記正確質量LC-

10

20

30

40

50

MS同定を検証するために、LC-MS-MS/MS獲得モードに依存する通常データにより操作するQ-TOF 2でも分析した。各ペプチドについての、正確質量、強度、荷電状態およびクロマトグラフィー保持時間は、三重の分析から達成された測定を表す複合一意的マスリスト(composite Unique Mass List)中にコンパイルした。図6に、このリストを示す。反復的注入においてペプチドの符合に用いた基準は、正確質量許容値が平均値から ± 5 ppmの範囲内でなければならない、保持時間許容値が平均値から ± 2 分、および荷電状態許容値は ± 0.35 とした。

【0254】

結果として得られた複合UMLは、続いて、タンパクウシ血清アルブミン(BSA)について生成された、掲載されたペプチドのデータベースに対して符合させた。図7Aおよび7Bに、このデータベースを示す。掲載したアルゴリズムは、Q-TOF 2において採用した質量測定範囲(m/z 300から2000)において質量対電荷比に矛盾が無く、かつ、開裂ミスが1または0であるトリプシン性ペプチドのみをレポートするためにセットした。掲載したアルゴリズムは、各ペプチドを、その MH^+ イオンの正確質量、その疎水性測定値としてのHPLCインデックス(Browne, C. A., Bennet, H. P. J. and Solomon S. (1982) Anal. Biochem. Vol. 124, pp. 201.)、ペプチドpI、開裂ミスの数および位置、塩基性残基の数および位置、ペプチド長、度数指標値(frequency index value)、およびアミノ酸シーケンス、ならびに、無傷タンパク質分子の重量およびpIについて掲載し、そして注釈を付けた。前記度数指標値は、そのペプチドの ± 5 ppmの範囲内の質量を有する、全掲載データベース(entire Indexed Database)におけるペプチド数を表した。BSAについての掲載データベースは、99のペプチドを含む。これらペプチドのいずれも、 ± 5 ppmレベルで同重体(isobaric)ではなかった。図8に、実験的に測定し、そしてBSAについて掲載されたデータベースと符合させた、 MH^+ イオンの一意的マスリストを示す。27のイオンの全てが、それらの正確質量、疎水性、および荷電状態に基づき、64%のシーケンスカバー範囲を与えて、BSAタンパク質と符合していた。それらの正確質量および物理化学的性質に基づき帰属した、それら27のペプチドのうち11の個性は、これもまたLC-MS-MS/MSにより確認した。

【0255】

サンプルの取扱いおよび分析工程におけるダイナミックレンジおよび定量的な再現性を評価するために、BSA単一タンパク質混合物をさらに用いた。それによれば、アンピック/尿素緩衝液(Ambic/Urea buffer)中に、無傷ウシ血清アルブミンを、1マイクロリットルあたり10, 100, 1000, 5000, および10,000フェムトモル濃度で懸濁させた。これら5のサンプルは、それぞれDTTで還元し、システインをヨードアセトアミドで誘導し、そして、各々を、前述のように、トリプシンにより37℃で終夜消化した。BSA消化物の濃度については、三重の注入を行なった。結果として得られたマスキロマトグラムは、前述のようにして処理し、そして、ペプチドの、質量1399.6931, 1502.6189および2491.2649の MH^+ イオンについてのシグナル強度は、濃度の関数として図3中にプロットした。各ペプチドのダイナミックレンジは、振幅の3倍以上において直線的であった。この応答の直線性もまた、消化化学および質量測定工程が再現可能であることを示す。

【0256】

[実施例2 14のペプチドの混合物の分析]

[定性分析 単一混合物]

前記方法における、中程度に複雑な混合物中の全てのタンパク質を定量的に同定する能力を示すために、図4中にリストした市販のタンパク質からなる14のタンパク質のモデル系を分析した。全てのタンパク質は、さらに精製することなく用いた。各タンパク質のストック溶液は、アンピック/尿素緩衝液中、150ピコモル/マイクロリットルの濃度(売主の秤量にしたがって)で調製した。続いて、それらストック溶液の一定体積を、図4に定義する2の異なる混合物を生成するために集めた。一旦集めた後、各混合物を種々の体積のアンピック/尿素で希釈し、最終的な一定体積値を保持した。各混合物は、DTTで還元し、システイン残基をヨードアセトアミドで誘導し、そして、各混合物を、それぞれ、前述のように、37℃で終夜消化した。各混合物は、前述と同様のLC-MS正確質量分析に

かけ、そして、データは前述と同様に処理した。開裂ミスが1までのものを集めると、総数487のペプチドが、前記14のタンパク質の混合物におけるトリプシン消化から理論的に可能であると計算された。混合物Aの正確質量分析は、総数125のペプチドを生成し、それは、その理論的データベースと符合した。シーケンスカバー範囲の高さは、前記混合物中のタンパク質において67%程度であった。図9 A ~ F に、それら125のペプチドの正確質量および物理化学的性質についての、測定値 対 計算値情報を示す。

【0257】

[定量分析 14のタンパク質の混合物]

図5に、混合物B(太線)およびA(影付)中におけるタンパク質の相対存在量の、測定値 対 理論値のヒストグラムフォーマットを示す。図4に、両混合物の理論的タンパク組成を示す。タンパク質フェチュイン(Fetuin)は、混合物AおよびBの両方で同じ濃度であった。フェチュインに関連するペプチドを、前記2の混合物の定量的比較を標準化するために、内因性内部標準として用いた。全ての相対存在量測定値は、理論的存在量の20%の範囲内であった。このことは、この方法により、比較的複雑な混合物中におけるタンパク質または他の化学種の相対存在量変化をモニタリングする際の正確性を示している。

10

【0258】

[実施例3 微生物(Bacterial)プロテオームの分析]

[菌株(Bacterial Strains)および成長条件]

大腸菌(*Escherichia coli*)株MC4100におけるそれぞれ2の1L培養物を、0.2%のグルコースを補充したM9最小培地(minimal medium)中、1つは許容温度の37 (MCLT)で、他方は非許容温度の42 (MCHT)で、同時に培養した。細胞は、中対数期(O.D. 450 nmで決定した)まで成長させ、そして、500 mLチューブ中、4 において、1000 × gで30分間遠心分離することにより収穫した。

20

【0259】

[細胞溶解(Cell Lysis)および消化]

細胞は、6M 尿素、10 mM トリス、1 mM DTTのpH 8.0混合物を用い、23 で20分間穏やかに攪拌して溶解させた。細胞の残骸は、続いて、4 において20,000 × gで20分間かけて遠心分離沈殿させ、その上清をピペットで収集した。その、タンパク質を含んだ上清を、Smithらのピシンコニン酸法(bicinchoninic acid method)(Anal. Biochem. 150:74-85, 1985)により、全タンパク質濃度についてアッセイした。このデータは、前記上清を、全タンパク質量が各々2.9 mgである部分標本(aliquot)サンプルに分けるために用いた。各サンプルに、2.2 μL の 30 mg/mL ウシ血清アルブミン(Sigma)、8 M 尿素および400 mM 炭酸水素アンモニウム、pH 8.0中を、HPLCインデックス値の計算を容易にするために、保持時間標準として添加した。ボルテックスで混合した後、各サンプルを4 に冷やし、そして、クロロホルム/メタノールで沈殿させた。それらのペレットを、8 M 尿素および400 mM 炭酸水素アンモニウム、pH 8.0中に溶解させ、そして、還元(ジチオトレイトール、Sigma)、アルキル化(ヨードアセトアミド、Sigma)にかけ、そして、200 μLに希釈した。前記サンプルは、20 μgのブタトリプシン(Promega)を加え、37 で終夜消化した。このサンプルは、続いて、水を加え、最終体積1000 μLまで希釈し、消化タンパク質の最終濃度~60 pmol/μL、およそ1 pmol/μL の BSAを含むようにした。それらサンプルは、プロピレンPCRチューブ中、各200 μLに等分し(aliquoted)、分析するまで、-80 で保存した。

30

40

【0260】

例示目的で、前記低温サンプルを対照、および前記高温サンプルを実験用とみなす。各サンプルは、三重に走らせ、結果として得られた一意的マスリスト(UML)を、前述のようにして1の複合UMLに圧縮した。

【0261】

圧縮後、前記対照および実験用サンプルについての前記複合UMLは、13,722および15,242の観測MH⁺イオンをそれぞれ含んでいた。それらポリペプチドの存在量は、両サンプルにおいて内因性であったタンパク質FTS1およびREC-Cに関連するポリペプチドについて標準

50

化し、そして、実験条件により変化していないと決定した。各複合UMLは、正確質量および物理化学的性質に基づき、掲載された非重複的大腸菌データベースと符合させた。この非重複的大腸菌データベースは、大腸菌プロテオームに含まれると信じられている4234のタンパク質に対応する約190,000のトリプシン性ペプチド（1の開裂ミスは許容）を含む。

【0262】

正確質量、疎水性および荷電状態の符合基準の適用後、大腸菌プロテオーム中のタンパク質に一意的に帰属できる総数12,542および13,987のペプチドが、前記対照および実験用サンプル中にそれぞれ同定された。タンパク質を的確に同定するためには最低限2のペプチドが必要であるということに基づき、2,985のタンパク質（プロテオームの70.5%）を、前記対照サンプル中に仮試験的に同定し、そして、3,127のタンパク質（プロテオームの73.9%）を、前記実験用サンプル中に仮試験的に同定した。対照対実験用の比較を行なった結果、2,743のタンパク質が両条件に共通であり、242が対照に一意的であり、そして、384は実験用に一意的であった。両サンプルに共通であった2,743のタンパク質のうち、2,249のタンパク質は、それらの相対存在量において150%未満異なることが観測され、そして、331のタンパク質は、それらの相対存在量において150%を越えて、しかし450%未満異なることが観測された。両混合物に共通であった163のタンパク質の全ては、それらの相対存在量において450%を越えて異なることが観測された。

10

【0263】

本研究において特に重要なことは、タンパク質GroELおよびGroEsが、非許容温度で成長させた際にアップレギュレートされることが知られている、二つの十分にキャラクタライズされた大腸菌シャペロンタンパク質である、という事実である。これらタンパク質の両方は、前記混合物中において同定され、そして、それらの同定は、続いてのデータに依存するLC-MS-MS/MS分析により確認された。前記データは、前記実験用サンプル対前記対照サンプルで、GroELおよびGroEsタンパク質の存在量がそれぞれ3.0および6.1倍増加したことを示し、それは予期された変化と一致した。伸長因子タンパク質であるタンパク質TufAは、従来は、温度により影響されることは知られていなかった。しかしながら、それは、前記実験用サンプル中において、相対存在量で2.1倍の増加を示した。TufAは、さらに、前記方法により生成させることのできるデータの質の例として働く。8のペプチドの全てが、56%のシーケンスカバー範囲を提供するTufAペプチドであると同定された。それら各ペプチドの相対存在量は、発現において、わずか8%の変化係数のみで、2.1倍の変化を示した。

20

30

【0264】

[ラットにおける容量/応答代謝研究]

専売薬物候補(proprietary drug candidate)を投与した2匹のラットを用いて研究を行なった。1匹のラットは「低い」用量の前記薬物を与え、そして、第2のラットは、「高い」用量の同じ薬物を与えた。規定時間後、尿サンプルを両方のラットから収集した。尿サンプル調製は、正確質量のLC-MS分析に先立ち、際蒸留水で4倍に希釈することにより行なった。LC-MS分析条件は、前述の通りである。低用量および高用量の両方のサンプルを、三重に分析した。

40

【0265】

前記高用量および低用量のラット尿サンプルについての複合一意的マスリストは、2,674および2,827の一意的マスを、それぞれ含んでいた。それら一意的マスのうち1,164は、全て前記高用量および低用量サンプルに共通であることが見出され、そして、それらの正確質量および保持時間特性に基づき符合させることができた。全ての成分のレベルは、前述のように、内因性内部標準としての的確であるとされた共通化学成分に標準化した。前記高用量および低用量サンプル間で符合した全ての化学成分の相対存在量を、定量的に比較した。図10に、それら符合した代謝産物のうち、相対存在量において4倍を越える変化を示した27のサブセットリストを示す。前記三重の測定結果の統計的分析は、それら定量的測定が0.005未満のp-スコアを有していたことを示した。それらの結果は、本発明の方

50

法が、2の複雑な代謝サンプル中における化学成分の相対存在量を定量する効果的な手段であることを示す。さらに、本実施例は、前記重要な成分を、定量的比較に先立ち定性的に同定することが不必要であることを示す。

【図面の簡単な説明】

【0266】

【図1A】特異なタンパク質発現をイオンマッピングにより分析する方法のフローチャートを示す。

【図1B】特異なタンパク質発現をイオンマッピングにより分析する方法のフローチャートを示す。

【図1C】特異なタンパク質発現をイオンマッピングにより分析する方法のフローチャートを示す。

10

【図1D】特異なタンパク質発現をイオンマッピングにより分析する方法のフローチャートを示す。

【図1E】特異なタンパク質発現をイオンマッピングにより分析する方法のフローチャートを示す。

【図1F】特異なタンパク質発現をイオンマッピングにより分析する方法のフローチャートを示す。

【図2】内部標準として使用可能なウシ血清アルブミン(BSA)におけるトリプシンのフラグメントを採集するための、逆相HPLCカラムにおける、疎水性対保持時間を示す。

【図3】3の断片ペプチドイオンについて、イオン強度対スペクトロメータに導入されたBSA量のプロットを示す。

20

【図4】2の混合物の組成を詳述する。

【図5】混合物B/混合物Aについての、存在量の、測定値対理論値のヒストグラムを示す。

【図6A】BSAの一意的マスリストを示す。

【図6B】BSAの一意的マスリストを示す。

【図6C】BSAの一意的マスリストを示す。

【図7A】ウシ血清アルブミンについて掲載したタンパク質データベースを示す。

【図7B】ウシ血清アルブミンについて掲載したタンパク質データベースを示す。

【図7C】ウシ血清アルブミンについて掲載したタンパク質データベースを示す。

30

【図7D】ウシ血清アルブミンについて掲載したタンパク質データベースを示す。

【図8A】BSAタンパク質消化物について、測定および計算による符号の結果を示す。

【図8B】BSAタンパク質消化物について、測定および計算による符号の結果を示す。

【図9A】タンパク質の定性的符号について詳述する。

【図9B】タンパク質の定性的符号について詳述する。

【図9C】タンパク質の定性的符号について詳述する。

【図9D】タンパク質の定性的符号について詳述する。

【図9E】タンパク質の定性的符号について詳述する。

【図9F】タンパク質の定性的符号について詳述する。

【図9G】タンパク質の定性的符号について詳述する。

40

【図9H】タンパク質の定性的符号について詳述する。

【図9I】タンパク質の定性的符号について詳述する。

【図9J】タンパク質の定性的符号について詳述する。

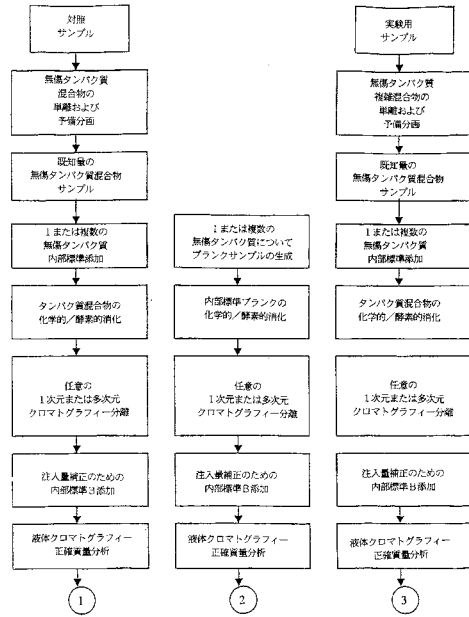
【図9K】タンパク質の定性的符号について詳述する。

【図9L】タンパク質の定性的符号について詳述する。

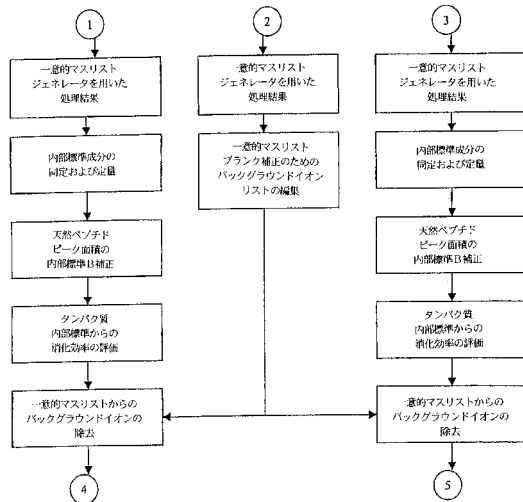
【図9M】タンパク質の定性的符号について詳述する。

【図10】ラットの尿代謝の比較研究を示す。

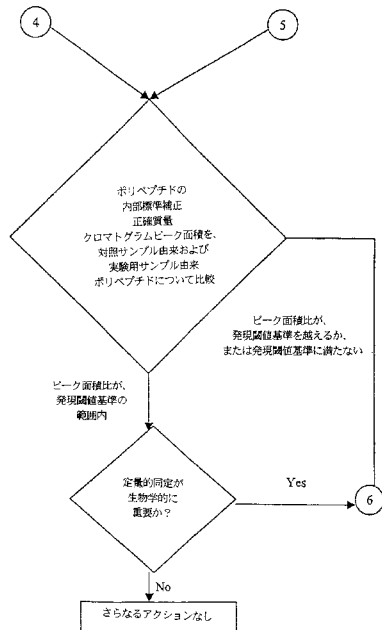
【図 1 A】



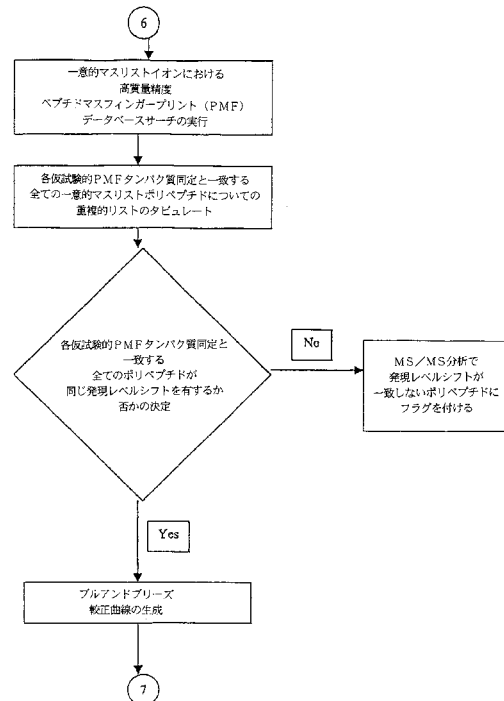
【図 1 B】



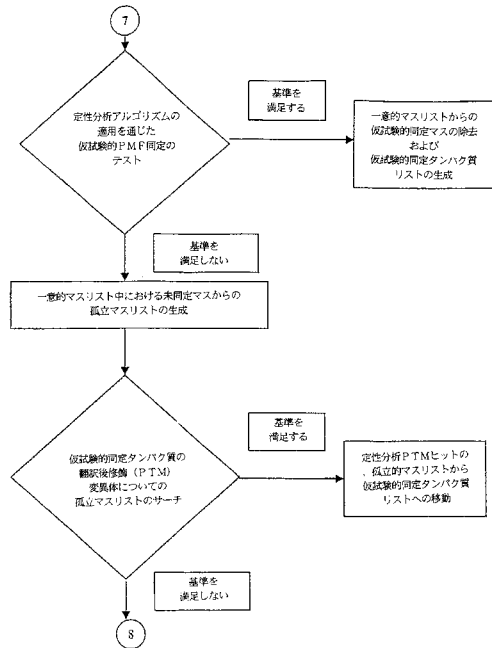
【図 1 C】



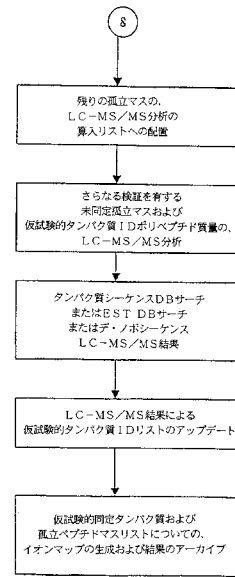
【図 1 D】



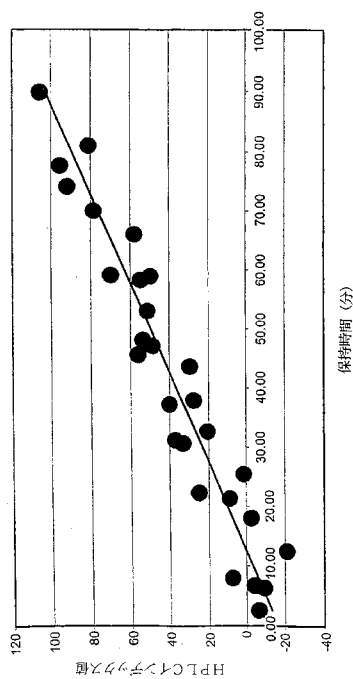
【図 1 E】



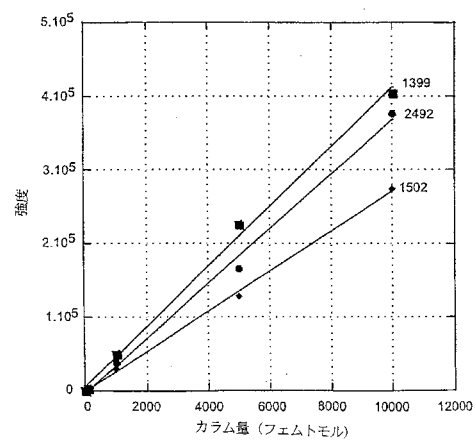
【図 1 F】



【図 2】



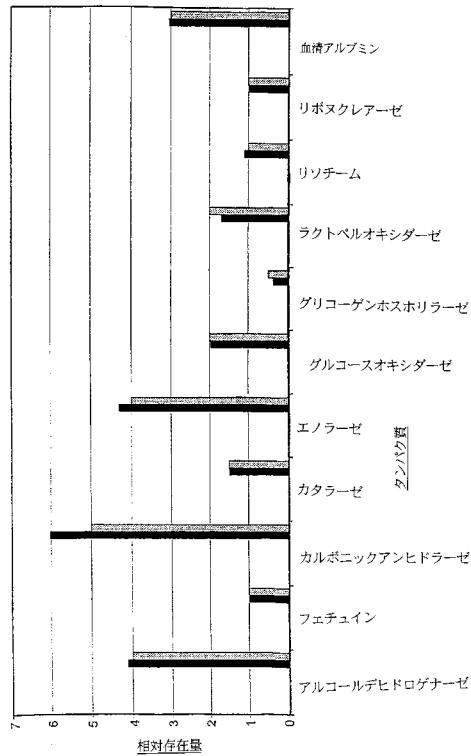
【図 3】



【図 4】

タンパク質	タンパク質 Mw	混合物 A (μL)	混合物 B (μL)
ラクトペルオキシダーゼ	80642	20	40
リゾチーム	16238	20	20
アルファ ラクトアルブミン	16246	20	0
ホスホリラーゼB	97158	20	10
リボヌクレアーゼA	16461	20	20
エノラーゼ	46671	20	80
カタラーゼ	57585	20	30
フェチエイン	36353	20	20
シトクロムC	11572	20	0
アルコールデヒドロゲナーゼ	36692	20	80
ペーダーカゼイン	25267	20	0
グルコースオキシダーゼ	65638	20	40
カルボニックアンヒドラーゼ	28508	20	100
血清アルブミン	66433	20	60

【図 5】



【図 6 A】

平均MH+	平均強度	平均面積	平均R T	平均CS
1072.5099	216	6.4	6.31	2
1163.6300	221	6.9	48.11	2
1249.6222	5141	174.6	31.25	2
1283.7119	2813	95.7	58.27	2
1291.6039	6894	233.3	21.37	2
1305.7171	45349	1548.8	37.26	2
1319.6482	662	22.1	36.94	2
1324.6014	1714	58	27.52	2
1335.5916	1019	33.9	29.01	2
1399.6592	1905	62.5	26.58	2
1399.6964	38120	1298.3	58.93	2
1419.6976	29525	1007	45.67	2
1439.8124	15776	538.7	53.03	2
1443.6453	24108	821.9	2.58	2
1456.6412	2332	79.4	60.68	2
1463.5944	6301	214.7	12.50	2
1467.7430	3021	102.3	30.17	2
1478.5275	11457	389.9	25.47	2
1479.7991	29123	993.4	59.13	2
1491.7571	8698	297.5	38.45	2
1502.6189	17836	607	18.03	2
1511.8494	1532	51.9	30.68	2
1527.6758	1856	63	41.93	2
1532.7874	8311	281.2	22.32	2
1537.8062	792	26.4	35.51	2
1553.6662	741	23.6	25.30	2
1554.6599	19122	647.7	32.70	2
1567.7465	24188	823.7	81.11	2
1592.6639	6558	223.3	6.11	2

【図 6 B】

平均MH+	平均強度	平均面積	平均R T	平均CS
1608.6331	645	21.5	7.03	2
1623.6019	17549	599.5	34.88	2
1624.6034	6791	231.4	16.69	2
1624.6051	7805	264.9	45.24	2
1625.6144	485	14.2	43.22	2
1627.6233	786	25.6	8.92	2
1627.6308	671	21.8	42.27	2
1639.9458	23842	810.9	43.65	2
1748.6952	9942	339.6	26.88	2
1749.6830	16643	567	27.05	2
1753.7942	1390	46.7	28.17	2
1778.8297	4295	145.6	28.01	2
1838.7457	2822	95.4	6.75	2
1862.8981	941	31.6	31.06	3
1880.9229	25542	870.1	47.12	2.13
1888.9339	2533	85.6	77.76	2.03
1889.9011	1395	47.2	36.98	3
1901.8675	5962	201.8	37.89	2.67
1902.8566	1210	40.7	27.54	2.98
1907.9214	35302	1205.2	70.08	2.56
1910.7877	13815	470.6	27.65	2
1927.7967	9553	325.8	8.00	2.63
1955.9760	3518	119.4	37.71	2
2045.0278	13939	475.6	74.20	2.71
2046.0386	1178	39.3	40.20	2.46
2106.8021	1329	44.7	6.75	2
2159.0352	4738	160.2	36.92	2.8
2458.1805	39033	1333	36.93	2.81
2459.2065	534	17.5	37.15	2

【図 6 C】

平均MH+	平均強度	平均面積	平均R T	平均CS
2467.2532	829	27.7	48.09	2.36
2487.5035	986	33.3	56.12	3
2487.5581	2109	70.9	27.76	3
2487.5999	1326	44.1	35.82	3
2487.6116	2038	64.7	51.20	3
2487.7130	1674	56.4	15.63	3
2487.9076	16456	561.6	53.42	3
2487.9321	18565	633.7	32.90	3
2487.9973	5182	176.4	15.82	3
2488.2505	502	16.6	43.38	3
2492.2704	17187	585.6	89.93	2.76
1659.0013	1208	39.8	52.94	2
1659.0133	695	23.3	56.74	2
1659.0434	1055	35.3	14.95	2
1659.5446	3103	105.6	52.69	2
1659.5541	972	32.8	16.23	2
1680.5279	663	22.1	48.07	2
1724.8437	38060	1295.9	66.08	2
1730.6864	8632	292.8	28.15	2
1747.7125	2624	67.8	6.74	2

【図 7 A】

種別	HLPLC	ベータ値	計算	HLs	XR R	長さ	シーケンス	タンパク質	Mw	pI	
MTI+	94										
1	1941.9227	21.0	4.35	2	1.0, 5	17	1	ADLAKYQNDQTSISK	69275	6.1	
2	922.4866	23	4.64	2	1.0, 5	8	1	AEFVEVTK	69275	6.1	
3	1952.9424	61.5	4.08	2	1.0, 8	15	1	AFDEKLTFLDQITPOTEK	69275	6.1	
4	2498.1913	91.3	4.41	2.5	1.0, 3	9	1	ALKAWSVAR	69275	6.1	
5	1001.5896	59.9	11.2	2	1.0, 3	19	1	ATEEQKTYMENFAVDK	69275	6.1	
6	2195.1037	59.7	4.41	2	1.0, 7	10	1	AWSVARLSQK	69275	6.1	
7	1345.8431	45.2	11.2	2	1.0, 9	10	1	CASQKQGER	69275	6.1	
8	1955.5893	10.5	8.63	2	1.0, 6	10	1	CASQKQGER	69275	6.1	
9	1927.7884	7.4	6.34	2	1.0, 7	9	1	CCTESLNNR	69275	6.1	
10	3000.4016	34.2	6.48	3.2	2.0, 9	25	1	CCTESLNNRPFCSALPQETVYRK	69275	6.1	
11	1165.4833	31.5	6.48	2	1.0, 4	9	1	CCTPESER	69275	6.1	
12	2872.3100	19.9	4.89	2.5	2.0, 4	23	1	CCTPESERMPCTEDYLSLNNR	69275	6.1	
13	1957.7433	81.1	4.32	2	1.0, 3	14	1	DAFLGSFLVEYSR	69275	6.1	
14	1723.8444	77.5	6.46	2	1.0, 3	14	1	DOPKACTSTVDK	69275	6.1	
15	1554.8934	20.6	4.34	2.15	1.0, 13	15	1	DOPKACTSTVDK	69275	6.1	
16	1745.9549	20.6	4.34	2.15	1.0, 13	15	1	DOPKACTSTVDK	69275	6.1	
17	374.555	55.9	4.11	2	2.0, 8	21	1	DPSDPKLPDNTLQDEK	69275	6.1	
18	974.4593	21.7	4.07	2	1.0, 6	8	1	DLGEHFHK	69275	6.1	
19	3447.7047	120.8	4.92	3.2	2.0, 6	1.0, 8	29	1	DLGEHFHKLGLVAFSQYLQCCPFDEHVK	69275	6.1
20	1193.6027	-4.3	7.52	2.25	2.3	1.0, 4	10	1	DTHKSEIAR	69275	6.1
21	1254.5788	-9.3	6.42	2	1.0, 4	10	1	DVKNYDEAK	69275	6.1	
22	1107.5144	20.7	4.54	2	1.0, 4	10	1	EACFAYGEGK	69275	6.1	
23	2091.0790	79.5	4.54	2	1.0, 10	20	1	EACFAYGEGKPLWSTQTALA	69275	6.1	
24	1291.0025	8.8	6.08	2.15	1.0, 9	10	1	ECCQKLEK	69275	6.1	
25	1749.0829	-3.5	4.05	2.15	1.0, 14	14	1	ECCQKLEKNCIAVEK	69275	6.1	
26	2247.9431	24.5	4.19	2.05	1.4	1.14, 0	19	1	ECCQKLEKNCIAVEK	69275	6.1
27	1478.5237	-17.1	3.84	2	1.0, 12	12	1	ETGDMADQCEK	69275	6.1	
28	2117.8213	-30.1	4.08	2.15	1.0, 12	17	1	ETGDMADQCEK	69275	6.1	

【図 7 B】

種別	MTI	インデックス	HLPLC	ベータ値	計算	HLs	XR R	長さ	シーケンス	タンパク質	Mw	pI
1502.6142	-2.8	4.09	2	1.0, 12	12	1	EYATLEECQAK	69275	6.1			
3038.2493	11.4	4.18	3.2	1.0, 12	25	1	EYATLEECQAKDHPACTVTPDK	69275	6.1			
1248.9217	37.2	5.60	2.15	1.0, 3	11	1	FRGAEVTK	69275	6.1			
1445.7991	72.2	8.93	2	1.0, 4	11	1	FRGAEVTK	69275	6.1			
1388.7394	47.2	8.93	2	1.0, 7	12	1	GACLLPKETMR	69275	6.1			
2492.2647	105.7	5.53	2.5	1.0, 19	21	1	GLVAFSQYLQCCPFDEHVK	69275	6.1			
1308.7275	12.1	9.09	2	1.0, 2	11	1	HKPATEEQK	69275	6.1			
1305.7187	40	5.63	2	1.0, 11	19	1	HLVDEPNLIK	69275	6.1			
2355.1403	39	4.77	2.15	1.0, 11	19	1	HLVDEPNLIK	69275	6.1			
1253.1112	11.1	8.35	2.15	1.0, 11	14	1	HPFYASVILRK	69275	6.1			
1888.9274	78.6	9.26	2.66	1.1, 11	15	1	HPFYASVILRK	69275	6.1			
905.4719	-1.9	6.56	2	1.0, 7	7	1	HPFYAPELLYAK	69275	6.1			
1142.7149	63.4	9.19	2	1.0, 1	10	1	KQALVELIK	69275	6.1			
1639.9383	29.5	9.34	2.15	1.0, 15	15	1	KYQVSTPLVEYSR	69275	6.1			
1814.8304	21	4.52	2	1.0, 3	15	1	KYQVSTPLVEYSR	69275	6.1			
1814.8304	21	4.52	2	1.0, 3	15	1	KYQVSTPLVEYSR	69275	6.1			
1937.9213	78.5	4.51	2.5	1.0, 7	16	1	LFTFHADQITPOTEK	69275	6.1			
2277.1589	81.1	5.58	2.15	1.0, 16	16	1	LFTFHADQITPOTEK	69275	6.1			
1479.7590	70	6.41	2	1.0, 13	13	1	LGEYFQNALVR	69275	6.1			
1900.0081	73.1	8.99	2	1.0, 13	16	1	LGEYFQNALVR	69275	6.1			
1532.7816	25.1	6.51	2.5	2.0, 2	12	1	LKECCDKPLEK	69275	6.1			
1546.8957	56.3	7.35	2.15	1.0, 2	13	1	LKHLVDEPNLIK	69275	6.1			
1576.7681	41.6	4.52	2	1.0, 2	13	1	LKHLVDEPNLIK	69275	6.1			
2019.9697	41.6	4.52	2	1.0, 2	13	1	LKHLVDEPNLIK	69275	6.1			
1745.9549	19.6	9.75	2	1.0, 8	8	1	LKLSAQK	69275	6.1			
1163.6312	53.8	4.54	2	1.0, 10	10	1	LYNELTEPAK	69275	6.1			
2008.2022	26.1	4.6	2.5	1.0, 10	23	1	LYNELTEPAK	69275	6.1			
1153.6545	42.8	9.19	2	1.0, 9	10	1	LYTELTVHK	69275	6.1			

【図 7 C】

タンパク質	Mw	pI	種別	シーケンス	長さ	HLPLC	ベータ値	計算	HLs	XR R	長さ	タンパク質	Mw	pI
1	69275	6.1	1	LWSTQTALA	10	1	1	2	1.0	2	10	1	69275	6.1
2	69275	6.1	1	MKWTFISLLIFSSAYSR	19	1	2.15	1.0, 2	1	1, 0, 2	14	1	69275	6.1
3	69275	6.1	1	MPCTEDYLSLNNR	14	1	4.32	2	1.19	1, 14, 0	21	1	69275	6.1
4	69275	6.1	1	MPCTEDYLSLNNR	21	1	5.66	3	2	1.7, 1	0	1	69275	6.1
5	69275	6.1	1	NECFLSHK	16	1	4.64	2.5	1.7	1, 0, 8	16	1	69275	6.1
6	69275	6.1	1	NECFLSHKSDPLK	16	1	5.98	2.15	1.0	8	16	1	69275	6.1
7	69275	6.1	1	NYEAKDFAKFSYLSR	16	1	4.68	2.5	1.0	8	16	1	69275	6.1
8	69275	6.1	1	QEPERNEQSLSK	13	1	2.65	1.12	1, 5, 0	1	13	1	69275	6.1
9	69275	6.1	1	QNDQFEK	8	1	4.32	2	1.0	8	8	1	69275	6.1
10	69275	6.1	1	QNDQFEKLGFEYFQNALVR	21	1	4.68	2.5	1.0	8	21	1	69275	6.1
11	69275	6.1	1	QNALVELIK	9	1	6.41	2	1.10	2, 0, 9	9	1	69275	6.1
12	69275	6.1	1	QNALVELIK	13	1	10.11	2.15	1.0	2, 0, 9	13	1	69275	6.1
13	69275	6.1	1	RHPFYAVNLVR	12	1	9.15	2.5	1.2	1, 1, 0	12	1	69275	6.1
14	69275	6.1	1	RHPFYAVNLVR	10	1	8.78	2.65	1.1	1, 1, 0	10	1	69275	6.1
15	69275	6.1	1	RHPFYAVNLVR	16	1	6.42	2.15	1.1	0	16	1	69275	6.1
16	69275	6.1	1	RHPFYAVNLVR	16	1	4.64	2.5	1.0	8	16	1	69275	6.1
17	69275	6.1	1	SEAHREK	9	1	9.35	2.25	1.5	1, 0, 9	9	1	69275	6.1
18	69275	6.1	1	SHQAEVEK	12	1	5.62	2	1.0	12	12	1	69275	6.1
19	69275	6.1	1	SLHITFGDELQK	12	1	5.53	2	1.3	1, 1, 3	12	1	69275	6.1
20	69275	6.1	1	SLHITFGDELQK	13	1	7.31	2.65	1.3	1, 0, 12	17	1	69275	6.1
21	69275	6.1	1	TCVADESHAGCEISLHITFGDELQK	25	1	4.92	3.2	1.5	1, 8	25	1	69275	6.1
22	69275	6.1	1	TPVSEKVTK	9	1	9.19	2	1.8	0	9	1	69275	6.1
23	69275	6.1	1	TYMENFAVDK	12	1	4.32	2	1.0	9	12	1	69275	6.1
24	69275	6.1	1	TYMENFAVDK	12	1	4.7	2.15	1.0	12	19	1	69275	6.1
25	69275	6.1	1	VASIRCTYGMADQCEK	13	1	8.45	2	1.0	13	13	1	69275	6.1
26	69275	6.1	1	VHKECCHDALECAADR	17	1	4.83	2.65	2.1	0, 3	17	1	69275	6.1
27	69275	6.1	1	VQVSTPLVEYSR	14	1	6.43	3.32	2	1, 0, 3	14	1	69275	6.1

【図 7 D】

種別	MTI	インデックス	HLPLC	ベータ値	計算	HLs	XR R	長さ	シーケンス	タンパク質	Mw	pI
1697.0759	44.2	9.34	2.15	1.0, 18	18	1	VQVSTPLVEYSR	69275	6.1			
1466.7095	-7.4	8.42	2	1.0, 3	12	1	WYTFISLLIFSSAYSR	69275	6.1			
2003.1006	145.4	9.15	2	1.17, 0	21	1	WYTFISLLIFSSAYSR	69275	6.1			
1463.8425	-0.4	4.91	2	1.0, 12	12	1	YICDQNTISSKLIK	69275	6.1			
1694.8216	9.9	6.27	2	1.0, 12	14	1	YICDQNTISSKLIK	69275	6.1			
927.4940	41.6	6.4	2	1.0, 7	7	1	YLVEAR	69275	6.1			
1093.9551	38	8.98	2	1.0, 8	8	1	YLVEAR	69275	6.1			
1747.7055	-4.2	4.09	2	1.0, 14	14	1	YNGVFQCCQMDK	69275	6.1			
2487.1105	34.1	4.68	2	1.0, 14	21	1	YNGVFQCCQMDK	69275	6.1			

【 図 8 A 】

血清アルブミン				抗体価(カラム法) 範囲 0.4 2.4				シークエンス					
測定値	単位	エラー	P.D.H	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
1072.5099	1072.5097	-0.1866	6.31	-4.8	9.3	4.5	2.00	2.00	0.0	SHQAEVEK	0.0	SHQAEVEK	CS
11163.6300	1163.6312	1.0313	48.11	47.3	53.8	0.5	2.00	2.00	0.0	LYNELTEFAK	0.0	LYNELTEFAK	CS
1249.6222	1249.6217	-0.4061	33.27	35.2	10.9	2.00	2.15	0.0	PDQGEHFVK	0.0	PDQGEHFVK	CS	
1283.7119	1283.7112	-0.5465	58.27	59.3	37.5	4.9	2.00	2.00	0.0	HPEYAVSVLR	0.0	HPEYAVSVLR	CS
1281.6039	1281.6021	-1.0038	39.17	34.0	8.8	6.2	2.00	2.00	0.0	ECVDFEPLNK	0.0	ECVDFEPLNK	CS
1305.7191	1305.7107	-0.3063	37.26	33.8	4.0	6.2	2.00	2.00	0.0	HLDDKPNLIK	0.0	HLDDKPNLIK	CS
1359.6984	1359.6932	-2.2862	58.93	60.7	49.8	10.9	2.00	2.00	0.0	TWNEINFAVDFK	0.0	TWNEINFAVDFK	CS
1419.6976	1419.6942	-0.3949	45.07	44.2	56.3	12.1	2.00	2.00	0.0	SLUTLFGDELK	0.0	SLUTLFGDELK	CS
1439.8124	1439.8123	-0.0692	53.03	53.4	51.4	2.00	2.00	2.50	0.0	RHPEYAVSVLLR	0.0	RHPEYAVSVLLR	CS
1443.6425	1443.6425	-1.9392	2.58	-9.4	-4.0	3.0	2.00	2.00	0.0	YCDNDITRSK	0.0	YCDNDITRSK	CS
1463.5944	1463.5984	-3.4163	12.50	3.0	-21.1	24.1	2.00	2.15	0.0	TVADSEHAGCEK	0.0	TVADSEHAGCEK	CS
1478.5275	1478.5207	-2.5701	25.47	19.1	1.3	17.8	2.00	2.00	0.0	ETYGQFADCEK	0.0	ETYGQFADCEK	CS
1479.7991	1479.7950	-2.0945	55.13	61.0	70	9.0	2.00	2.00	0.0	LRGEYGFQNALVR	0.0	LRGEYGFQNALVR	CS
1502.6189	1502.6142	-3.1279	15.18	-9.8	-12.4	2.00	2.00	2.00	0.0	ETATLECECHK	0.0	ETATLECECHK	CS
1511.8494	1511.8433	-4.0548	30.68	25.6	33.2	7.6	2.00	2.00	0.0	VPQVSTPTLVEISR	0.0	VPQVSTPTLVEISR	CS
1532.7914	1532.7916	3.7860	32.32	25.1	25.1	9.5	2.00	2.50	0.5	KECCDQPLLEK	0.5	KECCDQPLLEK	CS
1554.0596	1554.0534	-4.1810	32.70	28.1	20.6	7.5	2.00	2.15	0.2	DDPHAXSVTFDK	0.2	DDPHAXSVTFDK	CS

【 図 9 A 】

	測定値 MIH	真の MH+	マス エラー ppm	RT 分	理論値 J/g	理論値 J/g	理論値 C/S	C/S 差	理論値 C/S	シークンス 差	シークンス 範囲
1	アルコール	デヒドロメナーゼ I								26%	
2	1013.5976	1013.5998	-2.2	42.9	40.7	41.8	1.1	2.00	2.00	0.0	ANELINVK
3	1017.6453	1017.6418	-3.3	40.6	37.9	38.9	9.0	2.00	2.00	0.0	EKDVGAIVK
4	1136.5729	1136.5738	0.9	33.3	28.8	22.4	6.4	2.00	2.00	0.0	GIFYESHGK
5	1312.6808	1312.6788	-1.5	64.4	67.6	42.3	25.3	2.00	2.00	0.0	SIGGEYFDFTK
6	1447.8038	1447.8048	0.7	60.1	62.2	48.8	13.4	2.00	2.00	0.0	VWGLSTLPEIKG
7	1618.8428	1618.8438	0.6	52.3	52.5	39.6	12.9	2.36	2.15	0.2	VLVDGGEGKEELFR
8	2019.0656	2019.0698	2.1	59.3	61.2	49.2	12.0	2.88	2.50	0.4	PLVGGHEGAGVVGMG
9											ENVK
10	アルコール	デヒドロメナーゼ II								16%	
11	1291.6136	1291.6108	-2.2	51.8	14.5	4.5	10.0	2.00	2.00	0.0	CSDFSHFNVKK
12	2019.0656	2019.0698	2.1	59.3	61.2	49.2	12.0	2.88	2.50	0.4	PLVGGHEGAGVVGMG
13	2477.1375	2477.1458	3.4	59.6	61.6	76.2	14.6	3.31	3.50	0.2	YSGVCHTDLHAHWGDWP
14	アルコール	デヒドロメナーゼ III								3%	
15	1154.6233	1154.6208	-2.2	21.9	14.7	19.2	4.5	2.00	2.00	0.0	GVIFYENKGK

【 図 8 B 】

[illegible]

【 図 9 B 】

[illegible]

【図 9 C】

測定値 MH+	真の MH+	マス エラー p.p.m	RT	理論値 ppm	測定値 ppm	誤差	理論値 ppm	測定値 ppm	誤差	CS	シーケンス
ベータ カゼイン											
1	1591.9470	1591.9420	-2.6	80.8	87.9	62.8	25.1	2.24	2.15	15%	VLPVPQKAVYPQQR
2	2186.1795	2186.1688	-4.9	89.2	98.5	118.1	19.6	2.07	2.00	0.1	DMIPQAFLLYQEPVLPQVR
シーケンスカバー範囲											
1	973.5648	973.5668	2.1	42.2	39.9	50.4	10.5	2.00	2.00	0.0	LDALDSIK
2	1581.8040	1581.8078	2.4	52.6	52.9	67.0	14.1	3.00	2.15	0.9	YAAELHLVHWNTK
3	1709.9058	1709.9128	4.1	50.8	50.6	63.3	12.7	2.89	2.50	0.4	KYAAELHLVHWNTK
4	2198.2252	2198.2188	-2.9	75.3	81.2	100.3	19.1	2.93	2.50	0.4	AVVDPAKPLALVYGEA
5	2253.1664	2253.1558	-4.7	82.9	90.6	114.3	23.7	2.12	2.50	0.4	YGDFGTAAQPDGLAVV
シーケンスカバー範囲											
1	1168.6202	1168.6228	2.2	50.4	50.2	56.7	6.5	2.00	2.00	0.0	TGNPLHGLFGR
2	1456.6732	1456.6708	-1.6	23.4	16.6	33.9	17.3	2.00	2.00	0.0	TGOAPGFSYTDANK
3	1584.7097	1584.7058	-2.5	22.4	15.3	30.2	14.9	2.00	2.00	0.0	KTGQAPGFSYTDANK

【図 9 E】

測定値 MH+	真の MH+	マス エラー p.p.m	RT	理論値		理論値 CS	理論値 CS	差異	シーケンス
				ppm	ppm				
エノラゼン									
1	1100.5217	1100.5268	4.6	36.2	32.4	34.4	2.0	2.00	0.0 DGRYDLDFK
2	1159.6101	1159.6108	0.6	22.9	15.9	18.7	2.8	2.00	0.0 IGSEVYHNLIK
3	1286.7108	1286.7108	0.0	52.5	52.7	44.6	8.1	2.00	0.0 NVNDVAPAFVK
4	1288.7073	1288.7108	2.7	40.4	37.7	17.9	19.8	2.00	0.0 VNIQIGTLSESIK
5	1373.6400	1373.6408	0.6	58.4	60.1	46.6	13.5	2.00	0.0 IGLDCASSEFFK
6	1412.8248	1412.8228	-1.4	61.2	63.6	86.0	22.4	2.00	0.0 LGANALGVSLAASR
7	1416.7245	1416.7218	-1.9	39.4	38.4	9.2	27.2	2.00	0.0 GNPTVEVLITTEK
8	1578.8048	1578.8018	-1.9	64.4	67.5	67.9	0.4	2.00	0.0 AVDDFLLSLDGTANK
9	1755.9415	1755.9488	4.2	59.9	61.9	52.2	9.7	2.00	0.0 TAGQIVADOLTVNPK
10	1789.8470	1789.8448	-1.2	60.0	62.1	64.4	2.3	2.30	0.1 SIVPSGASTGVHEALMR
11	1840.9287	1840.9228	-3.2	52.2	52.4	31.7	20.7	2.28	0.2 WLTGQLADLYHSLMK
12	1872.9659	1872.9678	1.0	83.7	91.6	113.3	21.7	2.70	0.0 IEELGLDNVAFGENFHH
13	2441.1447	2441.1368	-3.2	57.5	55.9	52.6	6.3	2.98	0.0 GSKL
14	2828.2985	2828.2888	-3.4	103	116.1	100.2	15.9	2.98	0.5 YPVSIEDPFAEDDWEAW
15	2984.3924	2984.3898	-0.9	99.6	111.4	96.6	14.8	3.03	0.0 RYPVSIEDPFAEDDWEA
シーケンスカバー範囲									
1	1100.5217	1100.5268	4.6	36.2	32.4	34.4	2.0	2.00	0.0 DGRYDLDFK
2	1159.6101	1159.6108	0.6	22.9	15.9	18.7	2.8	2.00	0.0 IGSEVYHNLIK
3	1286.7108	1286.7108	0.0	52.5	52.7	44.6	8.1	2.00	0.0 NVNDVAPAFVK
4	1288.7073	1288.7108	2.7	40.4	37.7	17.9	19.8	2.00	0.0 VNIQIGTLSESIK
5	1373.6400	1373.6408	0.6	58.4	60.1	46.6	13.5	2.00	0.0 IGLDCASSEFFK
6	1412.8248	1412.8228	-1.4	61.2	63.6	86.0	22.4	2.00	0.0 LGANALGVSLAASR
7	1416.7245	1416.7218	-1.9	39.4	38.4	9.2	27.2	2.00	0.0 GNPTVEVLITTEK
8	1578.8048	1578.8018	-1.9	64.4	67.5	67.9	0.4	2.00	0.0 AVDDFLLSLDGTANK
9	1755.9415	1755.9488	4.2	59.9	61.9	52.2	9.7	2.00	0.0 TAGQIVADOLTVNPK
10	1789.8470	1789.8448	-1.2	60.0	62.1	64.4	2.3	2.30	0.1 SIVPSGASTGVHEALMR
11	1840.9287	1840.9228	-3.2	52.2	52.4	31.7	20.7	2.28	0.2 WLTGQLADLYHSLMK
12	1872.9659	1872.9678	1.0	83.7	91.6	113.3	21.7	2.70	0.0 IEELGLDNVAFGENFHH
13	2441.1447	2441.1368	-3.2	57.5	55.9	52.6	6.3	2.98	0.0 GSKL
14	2828.2985	2828.2888	-3.4	103	116.1	100.2	15.9	2.98	0.5 YPVSIEDPFAEDDWEAW
15	2984.3924	2984.3898	-0.9	99.6	111.4	96.6	14.8	3.03	0.0 RYPVSIEDPFAEDDWEA

【図 9 D】

測定値 MH+	真の MH+	マス エラー p.p.m	RT	測定値 ppm	理論値 ppm	シーク エン ス カバ ー レ イ ン グ の 質 量 差	理論 値 CS	測定 値 CS	質量 差 CS	C.S. シーク エン ス	
カタラーゼ											
1	1046.4978	1046.5018	3.8	2.6	-9.4	15.9	25.3	2.00	0.0	THFGSDVQR	
2	1154.6038	1154.5988	-4.3	32.1	27.3	31.5	4.2	2.00	0.0	LCENAGHLK	
3	1285.6169	1285.6178	0.7	22.7	15.7	45.1	29.4	2.00	0.0	LAHEDPDYGLR	
4	1338.6464	1338.6468	0.3	21.9	14.7	24.3	9.6	2.00	0.0	LVNADGEAVYCK	
5	1407.6310	1407.6288	-1.6	22.9	15.9	9.5	6.4	2.00	0.0	NFSDYHPEYGSR	
6	1479.6797	1479.6828	2.1	21.8	14.5	10.0	4.5	2.00	0.0	FNSADNDVTVQR	
7	1483.7019	1483.7028	0.6	22.1	14.9	20.7	5.8	2.00	0.0	FSTVAGESSDATYR	
8	1502.8035	1502.8008	-1.8	67.3	71.2	68.6	15.6	2.00	0.2	DALLPFSHSQK	
9	1577.8359	1577.8378	1.2	60.3	62.4	68.6	4.2	3.00	0.75	QVPHGDYFLPVGK	
10	1688.9165	1688.9218	3.1	39.1	36.0	37.3	1.3	2.78	0.8	IQAALLDYNEEKPK	
11	1740.8381	1740.8348	-1.9	60.2	62.4	57.9	4.5	2.09	0.25	QAGAFGYEYHDTIR	
12	1803.9270	1803.9238	-1.9	60.1	62.2	58.1	4.1	2.00	0.0	LGPNYLGIVNCPYR	
13	1851.8871	1851.8838	-1.8	22.6	15.5	19.3	3.8	2.34	0.25	FSTVAGESSDATYRDR	
14	2189.0672	2189.0698	1.2	81.0	88.3	91.3	3.0	2.90	0.75	GPLVQDVFTDEMAHFD	
15	2519.2212	2519.2238	1.0	85.6	93.9	93.8	0.1	2.27	0.0	FYTEDGNWDLVGNNTPIF	
シーケンスカバー範囲											
16	3202.5331	3202.5338	0.2	90.2	99.7	77.7	22.0	2.96	3.20	0.2	NPVNYFAEVEQLAFDPSN
17	3209.5273	3209.5158	-3.6	103	116.2	134.9	18.7	3.36	3.20	0.2	MPPIEPSPDK
シーケンスカバー範囲											
1	1046.4978	1046.5018	3.8	2.6	-9.4	15.9	25.3	2.00	0.0	THFGSDVQR	
2	1154.6038	1154.5988	-4.3	32.1	27.3	31.5	4.2	2.00	0.0	LCENAGHLK	
3	1285.6169	1285.6178	0.7	22.7	15.7	45.1	29.4	2.00	0.0	LAHEDPDYGLR	
4	1338.6464	1338.6468	0.3	21.9	14.7	24.3	9.6	2.00	0.0	LVNADGEAVYCK	
5	1407.6710	1407.6288	-1.6	22.9	15.9	9.5	6.4	2.00	0.0	NFSDYHPEYGSR	
6	1479.6797	1479.6828	2.1	21.8	14.5	10.0	4.5	2.00	0.0	FNSADNDVTVQR	
7	1483.7019	1483.7028	0.6	22.1	14.9	20.7	5.8	2.00	0.0	FSTVAGESSDATYR	
8	1502.8035	1502.8008	-1.8	67.3	71.2	68.6	15.6	2.00	0.2	DALLPFSHSQK	
9	1577.8359	1577.8378	1.2	60.3	62.4	68.6	4.2	3.00	0.75	QVPHGDYFLPVGK	
10	1688.9165	1688.9218	3.1	39.1	36.0	37.3	1.3	2.78	0.8	IQAALLDYNEEKPK	
11	1740.8381	1740.8348	-1.9	60.2	62.4	57.9	4.5	2.09	0.25	QAGAFGYEYHDTIR	
12	1803.9270	1803.9238	-1.9	60.1	62.2	58.1	4.1	2.00	0.0	LGPNYLGIVNCPYR	
13	1851.8871	1851.8838	-1.8	22.6	15.5	19.3	3.8	2.34	0.25	FSTVAGESSDATYRDR	
14	2189.0672	2189.0698	1.2	81.0	88.3	91.3	3.0	2.90	0.75	GPLVQDVFTDEMAHFD	
15	2519.2212	2519.2238	1.0	85.6	93.9	93.8	0.1	2.27	0.0	FYTEDGNWDLVGNNTPIF	
シーケンスカバー範囲											
16	3202.5331	3202.5338	0.2	90.2	99.7	77.7	22.0	2.96	3.20	0.2	NPVNYFAEVEQLAFDPSN
17	3209.5273	3209.5158	-3.6	103	116.2	134.9	18.7	3.36	3.20	0.2	MPPIEPSPDK
シーケンスカバー範囲											
1	1046.4978	1046.5018	3.8	2.6	-9.4	15.9	25.3	2.00	0.0	THFGSDVQR	
2	1154.6038	1154.5988	-4.3	32.1	27.3	31.5	4.2	2.00	0.0	LCENAGHLK	
3	1285.6169	1285.6178	0.7	22.7	15.7	45.1	29.4	2.00	0.0	LAHEDPDYGLR	
4	1338.6464	1338.6468	0.3	21.9	14.7	24.3	9.6	2.00	0.0	LVNADGEAVYCK	
5	1407.6710	1407.6288	-1.6	22.9	15.9	9.5	6.4	2.00	0.0	NFSDYHPEYGSR	
6	1479.6797	1479.6828	2.1	21.8	14.5	10.0	4.5	2.00	0.0	FNSADNDVTVQR	
7	1483.7019	1483.7028	0.6	22.1	14.9	20.7	5.8	2.00	0.0	FSTVAGESSDATYR	
8	1502.8035	1502.8008	-1.8	67.3	71.2	68.6	15.6	2.00	0.2	DALLPFSHSQK	
9	1577.8359	1577.8378	1.2	60.3	62.4	68.6	4.2	3.00	0.75	QVPHGDYFLPVGK	
10	1688.9165	1688.9218	3.1	39.1	36.0	37.3	1.3	2.78	0.8	IQAALLDYNEEKPK	
11	1740.8381	1740.8348	-1.9	60.2	62.4	57.9	4.5	2.09	0.25	QAGAFGYEYHDTIR	
12	1803.9270	1803.9238	-1.9	60.1	62.2	58.1	4.1	2.00	0.0	LGPNYLGIVNCPYR	
13	1851.8871	1851.8838	-1.8	22.6	15.5	19.3	3.8	2.34	0.25	FSTVAGESSDATYRDR	
14	2189.0672	2189.0698	1.2	81.0	88.3	91.3	3.0	2.90	0.75	GPLVQDVFTDEMAHFD	
15	2519.2212	2519.2238	1.0	85.6	93.9	93.8	0.1	2.27	0.0	FYTEDGNWDLVGNNTPIF	
シーケンスカバー範囲											
16	3202.5331	3202.5338	0.2	90.2	99.7	77.7	22.0	2.96	3.20	0.2	NPVNYFAEVEQLAFDPSN
17	3209.5273	3209.5158	-3.6	103	116.2	134.9	18.7	3.36	3.20	0.2	MPPIEPSPDK
シーケンスカバー範囲											
1	1046.4978	1046.5018	3.8	2.6	-9.4	15.9	25.3	2.00	0.0	THFGSDVQR	
2	1154.6038	1154.5988	-4.3	32.1	27.3	31.5	4.2	2.00	0.0	LCENAGHLK	
3	1285.6169	1285.6178	0.7	22.7	15.7	45.1	29.4	2.00	0.0	LAHEDPDYGLR	
4	1338.6464	1338.6468	0.3	21.9	14.7	24.3	9.6	2.00	0.0	LVNADGEAVYCK	
5	1407.6710	1407.6288	-1.6	22.9	15.9	9.5	6.4	2.00	0.0	NFSDYHPEYGSR	
6	1479.6797	1479.6828	2.1	21.8	14.5	10.0	4.5	2.00	0.0	FNSADNDVTVQR	
7	1483.7019	1483.7028	0.6	22.1	14.9	20.7	5.8	2.00	0.0	FSTVAGESSDATYR	
8	1502.8035	1502.8008	-1.8	67.3	71.2	68.6	15.6	2.00	0.2	DALLPFSHSQK	
9	1577.8359	1577.8378	1.2	60.3	62.4	68.6	4.2	3.00	0.75	QVPHGDYFLPVGK	
10	1688.9165	1688.9218	3.1	39.1	36.0	37.3	1.3	2.78	0.8	IQAALLDYNEEKPK	
11	1740.8381	1740.8348	-1.9	60.2	62.4	57.9	4.5	2.09	0.25	QAGAFGYEYHDTIR	
12	1803.9270	1803.9238	-1.9	60.1	62.2	58.1	4.1	2.00	0.0	LGPNYLGIVNCPYR	
13	1851.8871	1851.8838	-1.8	22.6	15.5	19.3	3.8	2.34	0.25	FSTVAGESSDATYRDR	
14	2189.0672	2189.0698	1.2	81.0	88.3	91.3	3.0	2.90	0.75	GPLVQDVFTDEMAHFD	
15	2519.2212	2519.2238	1.0	85.6	93.9	93.8	0.1	2.27	0.0	FYTEDGNWDLVGNNTPIF	
シーケンスカバー範囲											
16	3202.5331	3202.5338	0.2	90.2	99.7	77.7	22.0	2.96	3.20	0.2	NPVNYFAEVEQLAFDPSN
17	3209.5273	3209.5158	-3.6	103	116.2	134.9	18.7	3.36	3.20	0.2	MPPIEPSPDK
シーケンスカバー範囲											
1	1046.4978	1046.5018	3.8	2.6	-9.4	15.9	25.3	2.00	0.0	THFGSDVQR	
2	1154.6038	1154.5988	-4.3	32.1	27.3	31.5	4.2	2.00	0.0	LCENAGHLK	
3	1285.6169	1285.6178	0.7	22.7	15.7	45.1	29.4	2.00	0.0	LAHEDPDYGLR	
4	1338.6464	1338.6468	0.3	21.9	14.7	24.3	9.6	2.00	0.0	LVNADGEAVYCK	
5	1407.6710	1407.6288	-1.6	22.9	15.9	9.5	6.4	2.00	0.0	NFSDYHPEYGSR	
6	1479.6797	1479.6828	2.1	21.8	14.5	10.0	4.5	2.00	0.0	FNSADNDVTVQR	
7	1483.7019	1483.7028	0.6	22.1	14.9	20.7	5.8	2.00	0.0	FSTVAGESSDATYR	
8	1502.8035	1502.8008	-1.8	67.3	71.2	68.6	15.6	2.00	0.2	DALLPFSHSQK	
9	1577.8359	1577.8378	1.2	60.3	62.4	68.6	4.2	3.00	0.75	QVPHGDYFLPVGK	
10	1688.9165	1688.9218	3.1	39.1	36.0	37.3	1.3	2.78	0.8	IQAALLDYNEEKPK	
11	1740.8381	1740.8348	-1.9	60.2	62.4	57.9	4.5	2.09	0.25	QAGAFGYEYHDTIR	
12	1803.9270	1803.9238	-1.9	60.1	62.2	58.1	4.1	2.00	0.0	LGPNYLGIVNCPYR	
13	1851.8871	1851.8838	-1.8	22.6	15.5	19.3	3.8	2.34	0.25	FSTVAGESSDATYRDR	
14	2189.0672	2189.0698	1.2	81.0	88.3	91.3	3.0	2.90	0.75	GPLVQDVFTDEMAHFD	
15	2519.2212	2519.2238	1.0	85.6	93.9	93.8	0.1	2.27	0.0	FYTEDGNWDLVGNNTPIF	
シーケンスカバー範囲											
16	3202.5331	3202.5338	0.2	90.2	99.7	77.7	22.0	2.96	3.20	0.2	NPVNYFAEVEQLAFDPSN
17	3209.5273	3209.5158	-3.6	103	116.2	134.9	18.7	3.36	3.20	0.2	MPPIEPSPDK
シーケンスカバー範囲											
1	1046.4978	1046.5018	3.8	2.6	-9.4	15.9	25.3	2.00	0.0	THFGSDVQR	
2	1154.6038	1154.5988	-4.3	32.1	27.3	31.5	4.2	2.00	0.0	LCENAGHLK	
3	1285.6169	1285.6178	0.7	22.7	15.7	45.1	29.4	2.00	0.0	LAHEDPDYGLR	
4	1338.6464	1338.6468	0.3	21.9	14.7	24.3	9.6	2.00	0.0	LVNADGEAVYCK	
5	1407.6710	1407.6288	-1.6	22.9	15.9	9.5	6.4	2.00	0.0	NFSDYHPEYGSR	
6	1479.6797	1479.6828	2.1	21.8	14.5	10.0	4.5	2.00	0.0	FNSADNDVTVQR	
7	1483.7019	1483.7028	0.6	22.1	14.9	20.7	5.8	2.00	0.0	FSTVAGESSDATYR	
8	1502.8035	1502.8008	-1.8	67.3	71.2	68.6	15.6	2.00	0.2	DALLPFSHSQK	
9	1577.8359	1577.8378	1.2	60.3	62.4	68.6	4.2	3.00	0.75	QVPHGDYFLPVGK	
10	1688.9165	1688.9218	3.1	39.1	36.0	37.3	1.3	2.78	0.8	IQAALLDYNEEKPK	
11	1740.8381	1740.8348	-1.9	60.2	62.4	57.9	4.5	2.09	0.25	QAGAFGYEYHDTIR	
12	1803.9270	1803.9238	-1.9	60.1	62.2	58.1	4.1	2.00	0.0	LGPNYLGIVNCPYR	
13	1851.8871	1851.8838	-1.8	22.6	15.5	19.3	3.8	2.34	0.25	FSTVAGESSDATYRDR	
14	2189.0672	2189.0698	1.2	81.0	88.3	91.3	3.0	2.90	0.75	GPLVQDVFTDEMAHFD	
15	2519.2212	2519.2238	1.0	85.6	93.9	93.8	0.1	2.27	0.0	FYTEDGNWDLVGNNTPIF	
シーケンスカバー範囲											
16	3202.5331	3202.5338	0.2	90.2	99.7	77.7	22.0	2.96	3.20	0.2	NPVNYFAEVEQLAFDPSN
17	3209.5273	3209.5158	-3.6	103	116.2	134.9	18.7	3.36	3.20	0.2	MPPIEPSPDK
シーケンスカバー範囲											
1	1046.4978	1046.5018	3.8	2.6	-9.4	15.9	25.3	2.00	0.0	THFGSDVQR	
2	1154.6038	1154.5988	-4.3	32.1	27.3	31.5	4.2	2.00	0.0	LCENAGHLK	
3	1285.6169	1285.6178	0.7	22.7	15.7	45.1	29.4	2.00	0.0	LAHEDPDYGLR	
4	1338.6464	1338.6468	0.3	21.9	14.7	24.3	9.6	2.00	0.0	LVNADGEAVYCK	
5	1407.6710	1407.6288	-1.6	22.9	15.9	9.5	6.4	2.00</			

【 図 9 G 】

測定値 MH+	真の MH+	マス エラー p pm	RT 分	測定値 H/C 分	理論値 H/C 分	理論値 C/S 分	理論値 C/S 分	シークエンス
グリコーゲンホスホリラーゼ								
1 1003.4925	1003.4968	3.3	6.1	5.0	5.7	10.7	2.00	0.0 GNTHNYAK
2 1044.5446	1044.5478	3.1	23.9	17.1	25.6	8.5	2.00	0.0 AVGVFEGTHK
3 1209.5640	1209.5638	-0.2	22.7	15.8	10.8	4.8	2.00	0.0 DTGDDYRIVK
4 1301.6447	1301.6488	3.1	40.3	37.5	43.1	5.6	2.00	0.0 LEWAEELAVK
5 1455.0694	1455.0679	-1.1	59.6	61.5	44.5	17.1	2.00	0.0 ISDAIEDYASMQ
6 1655.0122	1650.0118	-4.2	64.3	67.4	83.0	15.6	2.00	0.0 TVDHAGDGLTITTAAR
7 1990.9938	1991.0008	3.5	49.4	47.5	38.7	8.9	3.00	1.0 EMGWVDNAARVGVQ
8 2443.2984	2443.2909	-3.1	77.5	83.9	90.2	6.3	2.86	2.50 0.4 HEVLAAGASVPTILEYS
9 2615.1537	2615.1408	-4.9	55.8	56.8	42.1	14.7	3.17	3.20 0.0 DFQGGPHGVSMFPNTL
10 3077.6959	3077.6938	-0.7	92.9	103.0	122.3	19.3	2.85	3.20 0.4 SLEPLGDTVDLPVGLN
11 3342.5363	3342.5288	-2.2	85.9	94.3	82.1	12.2	2.90	3.20 0.3 AQVDSWETVFGNEGWN
								DINVAYSLOAER

【 図 9 H 】

測定値 MH+	真の MH+	マス エラー p pm	RT 分	測定値 H/C 分	理論値 H/C 分	理論値 C/S 分	理論値 C/S 分	シークエンス
グリコーゲンホスホリラーゼ								
1 1053.5690	1053.5728	3.6	51.1	51.0	45.4	5.6	2.00	2.00 0.0 VIFENYR
2 1145.5619	1145.5628	0.8	55.2	56.2	39.5	16.7	2.00	2.00 0.0 YFEGFNQK
3 1177.5530	1177.5528	-0.2	39.0	35.9	33.9	2.0	2.00	2.00 0.0 DFYELPHK
4 1229.6724	1229.6738	1.1	42.5	40.3	35.7	4.6	2.00	2.00 0.0 GLAGVENYELK
5 1253.6402	1253.6408	0.5	40.5	37.8	15.3	22.5	2.05	2.00 0.0 COERYSALK
6 1263.5983	1263.5948	-3.4	43.3	41.3	31.1	10.2	2.00	2.00 0.0 VFADYEEYK
7 1278.5432	1278.5388	-5.4	21.7	14.5	10.8	3.7	2.00	2.00 0.0 GYNACEYDR
8 1355.6758	1355.6748	-0.7	53.0	53.3	67.9	14.6	2.00	2.00 0.0 DYFELATYR
9 1357.7584	1357.7588	0.3	40.3	37.5	32.0	5.5	2.00	2.00 0.0 GLAGVENYELK
10 1440.7373	1440.7378	0.3	59.9	61.9	85.5	6.6	2.00	2.00 0.0 HLYVDDEAFIR
11 1442.7004	1442.6958	-5.2	54.1	54.7	83.2	1.5	2.00	2.00 0.0 VLYPNDFEFGK
12 1473.3544	1473.3578	2.3	84.1	92.1	104.6	12.5	2.01	2.00 0.0 WPHLLLETLPR
13 1550.7702	1550.7698	-0.3	59.4	61.4	38.5	24.9	2.00	2.00 0.0 IGEYSIDDLR
14 1554.7035	1554.7068	2.1	80.7	87.9	79.7	8.2	2.00	2.00 0.0 IYLSLEYMGR
15 1609.8735	1609.8698	-2.3	60.7	62.9	43.5	19.4	2.00	2.15 0.2 VHNPNSLFDYQVK
16 1686.8411	1686.8478	4.0	60.5	62.7	56.8	5.9	2.80	2.75 0.0 TIFKDFEYELPHK
17 1689.8763	1689.8768	0.3	61.8	64.4	75.1	10.7	3.00	3.00 0.0 ARPEFTLPVHYGR
18 1756.9566	1756.9528	-2.2	66.5	70.2	76.8	6.6	2.46	2.50 0.0 QLNLHLVLYNR

【 図 9 I 】

測定値 MH+	真の MH+	マス エラー p pm	RT 分	測定値 H/C 分	理論値 H/C 分	理論値 C/S 分	理論値 C/S 分	シークエンス
グリコーゲンホスホリラーゼ								
20 1765.9608	1765.9688	4.5	59.6	61.6	73.1	11.5	2.89	3.00 0.1 QEYFVAATLODIR
21 1840.9287	1840.9238	-2.7	52.2	52.4	62.5	10.1	2.28	2.15 0.1 VLYPNDFEFGKELR
22 1854.0020	1853.9948	-3.9	83.5	91.4	85.4	6.0	2.00	2.00 0.0 WLVLNPLGLAEIAR
23 1865.8046	1865.8048	0.1	66.1	68.5	43.2	25.3	2.00	2.00 0.0 ICGWVMSDELDYLR
24 1874.9032	1874.9068	1.9	44.8	43.1	43.3	0.2	2.89	3.00 0.1 TQATNTLGLPEALR
25 1890.0078	1890.0088	0.5	59.7	61.7	44.5	17.2	2.68	3.00 0.3 LITAGDYVNHDPVYGDOR
26 1990.9938	1991.0008	3.5	48.4	47.6	46.7	0.9	3.00	2.50 0.5 INMAHLCAESRANGVAR
27 2033.0317	2033.0358	2.0	65.0	68.3	81.6	13.3	3.00	2.50 0.5 DYFELATLODHYLGR
28 2118.1411	2118.1378	-1.6	72.8	78.0	88.7	10.7	2.93	3.00 0.1 VAQLNTHPSLAPELMR
29 2307.1678	2307.1688	0.4	74.7	80.4	87.6	7.2	2.07	2.00 0.1 WYDQVYLAMPYDTPVP
30 2448.2091	2448.2028	-2.6	54.7	55.4	42.9	12.5	2.20	2.50 0.3 VYPAQLSEIGTAGTEAS
								GTGNMK

【 図 9 J 】

測定値 MH+	真の MH+	マス エラー p pm	RT 分	測定値 H/C 分	理論値 H/C 分	理論値 C/S 分	理論値 C/S 分	シークエンス
ラクトベルオキシダーゼ								
1 910.5061	910.5068	0.8	36.2	32.5	47.8	15.3	2.00	2.00 0.0 KLMDLYK
2 1168.6844	1168.6878	2.9	77.3	83.6	87.3	3.7	2.00	2.00 0.0 VGPLLAQLGR
3 1181.5736	1181.5778	3.6	59.7	61.7	64.0	2.3	2.00	2.00 0.0 VPCPLAGDGR
4 1201.6357	1201.6368	0.9	72.4	77.5	69.0	8.5	2.00	2.00 0.0 ISNVFTFAFR
5 1214.6183	1214.6198	1.2	21.7	14.4	17.8	3.4	2.02	2.00 0.0 LICDNTHTK
6 1319.5617	1319.5598	-2.2	35.9	32.1	18.7	13.4	2.00	2.00 0.0 DRGMPGYNYSWR
7 1345.6880	1345.6868	-0.9	44.4	42.7	13.6	29.1	2.00	2.00 0.0 NGQWVEESLR
8 1391.8452	1391.8418	-2.4	93.0	103.2	94.4	8.8	2.00	2.00 0.0 ILGAFQITFR
9 1467.8100	1467.8068	-2.2	62.2	64.8	77.8	13.0	2.00	2.15 0.2 IHGFLAAILNQR
10 1492.7750	1492.7718	-2.1	63.7	66.7	54.0	12.7	2.00	2.00 0.0 DYLPVLGSEMOK
11 1539.7279	1539.7268	-0.7	71.5	76.4	62.2	14.2	2.00	2.00 0.0 FWVENPGVFEK

【 図 9 K 】

	測定値 MH+	真の MH+	エラー ppm	R ²	決定係数 イデアル データ %	相対誤差 平均C S 差異	理論質量 C S	C S 残差	シーケンス	
	ラクトベルロキシゲナーゼ					シーケンスタンパラー範囲				
12	1663.89301	1663.8268	-2.0	51.4	51.4	67.5	16.1	2.00	2.00	33%
13	1719.86200	1719.8548	-4.2	51.0	50.8	34.1	16.7	2.00	2.00	AGVCPITPPYQSILAR
13	1719.86200	1719.8548	-4.2	51.0	50.8	34.1	16.7	2.00	2.00	IQGVTFDEEVLGNQR
14	2654.3463	2654.3408	-2.1	84.4	92.4	84.7	7.7	2.36	2.50	EQNATSFSLDASLVYSSE
14	2654.3463	2654.3408	-2.1	84.4	92.4	84.7	7.7	2.36	2.50	PISLAR
15	2674.24207	2674.2358	-1.8	54.3	55.0	65.4	10.4	3.27	3.20	VPLFAHCANYPHFVDVC
15	2674.24207	2674.2358	-1.8	54.3	55.0	65.4	10.4	3.27	3.20	STVKK
10	3443.64205	3443.6318	-2.5	102	114.3	111.3	3.0	3.56	3.20	SLLFPMGQIVDHOLDIFA
	リゾチームC					シーケンスタンパラー範囲				64%
1	993.4005	993.3998	-0.7	22.7	15.7	16.6	0.9	2.00	2.00	WWCNDRGR
2	1045.5410	1045.5428	1.7	42.0	39.6	33.1	6.5	2.00	2.00	GTDVQAWIR
3	1325.6338	1325.6308	-2.3	54.7	55.5	41.8	13.7	2.00	2.00	GYSLNGNCAAK
3	1325.6338	1325.6308	-2.3	54.7	55.5	41.8	13.7	2.00	2.00	VFGRGLAAAMK
4	1428.6503	1428.6508	0.3	22.3	15.1	21.7	6.6	2.00	2.00	FESNFNTQTNR
5	1753.8118	1753.8358	3.4	45.0	43.3	15.6	27.7	2.00	2.00	NIDTSQDYQLNSRR
6	1753.8118	1753.8358	3.4	45.0	43.3	15.6	27.7	2.00	2.00	KLNLPICALLSSDTIAY
7	2508.2044	2508.1998	-1.8	65.2	68.5	43.4	25.1	2.27	2.50	NNCKP

【 図 9 M 】

[illegible]

【 図 9 L 】

[illegible]

【 図 1 0 】

平均 R.T	平均日H+	累積低下量強度	注入1回目	注入2回目	注入3回目	注入1回目	注入2回目	注入3回目	存在量 変化	p-入欠p
48.85	319.1417	413.56	7938.03	6222.29	7410.21	16.77	0.0029			
48.65	192.9818	25.01	30.62	29.99	407.90	473.64	399.50	14.76	0.0016	
40.64	20.9986	25.01	28.23	23.32	392.38	302.09	324.09	13.30	0.0039	
36.07	433.1172	37.22	40.11	39.88	538.53	428.37	527.46	12.68	0.0028	
36.32	313.0882	24.91	32.27	29.78	352.14	363.40	324.56	11.97	0.0007	
44.83	287.1573	39.32	48.52	43.54	578.95	442.16	519.61	11.73	0.0040	
40.02	203.0540	87.28	120.92	119.06	1215.05	1208.65	1106.31	11.06	0.0001	
42.69	291.1976	25.31	25.53	20.91	300.09	245.49	245.77	11.03	0.0026	
43.82	215.0178	65.76	69.55	58.20	797.61	790.05	697.34	10.56	0.0074	
44.64	293.248	25.87	32.77	29.72	286.22	230.15	268.61	9.37	0.0029	
36.79	343.147	65.46	58.15	57.84	524.13	594.80	521.30	9.04	0.0013	
33.45	365.2370	68.52	53.99	52.56	565.95	511.89	495.80	8.68	0.0006	
43.07	431.1120	44.95	390.26	376.09	3240.02	2549.03	3122.30	7.36	0.0031	
36.14	193.0941	37.53	38.89	32.53	302.15	225.54	252.71	7.14	0.0050	
25.19	125.1620	161.33	118.37	95.68	952.30	831.84	769.74	6.80	0.0011	
41.27	331.2322	100.12	70.85	63.05	532.72	456.69	474.10	6.25	0.0005	
41.80	202.0556	200.51	170.14	143.72	999.28	803.61	844.09	5.15	0.0023	
34.34	326.1525	7986.64	51.66	52.70	45.74	229.91	221.25	5.02	0.0024	
34.02	260.3503	260.15	988.66	927.61	7612.38	1930.65	1880.74	0.25	0.0040	
33.23	234.0990	468.09	405.77	395.49	82.65	122.90	81.37	0.23	0.0041	
37.13	318.1936	448.31	448.82	391.68	85.22	71.97	74.37	0.18	0.0013	
37.07	232.2423	239.88	224.03	169.91	31.80	49.81	26.58	0.16	0.0034	
38.10	307.1462	373.78	225.03	363.31	61.80	62.91	56.32	0.16	0.0005	
39.18	298.1823	455.28	447.49	421.41	69.87	50.29	64.85	0.14	0.0005	
39.30	351.2019	359.03	404.05	341.35	29.78	36.24	23.12	0.08	0.0011	
35.65	437.2397	895.33	1015.08	976.73	65.54	48.35	65.95	0.06	0.0010	

【手続補正書】

【提出日】平成19年10月11日(2007.10.11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

第1の生物由来分子混合物を含む第1のサンプルを準備する工程であって、前記第1の生物由来分子混合物は複数の異なるタンパク質、ペプチド又はポリペプチドを含む工程、

前記第1の混合物中における第1の分子の質量対電荷比以外の第1の物理化学的性質を測定する工程、

第1の混合物中における第1の分子の質量を分析し、そして、第1の混合物中における第1の分子の質量対電荷比を20 ppmまでの範囲で正確に決定する工程、

第2の生物由来分子混合物を含む第2のサンプルを準備する工程であって、前記第2の生物由来分子混合物は複数の異なるタンパク質、ペプチド又はポリペプチドを含む工程、

前記第2の混合物中における第1の分子の、質量対電荷比以外の第1の物理化学的性質を測定する工程、

前記第2の混合物中における第1の分子の質量を分析し、そして、第2の混合物中における第1の分子の質量対電荷比を20 ppmまでの範囲で正確に決定する工程、

前記第1の混合物中における第1の分子の強度と前記第2の混合物中における第1の分子の強度とを決定する工程であって、前記第1の混合物中における第1の分子と前記第2の混合物中における第1の分子とは、実質的に等しい質量対電荷比を有し、かつ、実質的に等しい前記第1の物理化学的性質を有すると決定する工程、及び、ついで

前記第1の混合物中における第1の分子及び/又は第2の混合物中における第1の分子を、前記第1の混合物中における第1の分子の強度が、あらかじめ決定した量を超えて前記第2の混合物中の第1の分子の強度と異なる場合のみに、前記第1の混合物中における第1の分子及び/又は前記第2の混合物中における第1の分子を同定する工程を含み、

前記第1の混合物中における第1の分子及び/又は前記第2の混合物中における第1の分子を同定する工程は、前記第1の混合物中における第1の分子及び/又は前記第2の混合物中における第1の分子の前記第1の物理化学的性質及び前記決定された質量対電荷比を、分子のインデックスと比較することを含み、

前記インデックスが、

(i) 掲載された(indexed)各分子の個性(identity)；

(ii) 掲載された各分子の、実験的に決定された又は予想された第1の物理化学的性質；及び

(iii) 掲載された各分子の、実験的に決定された又は予想された正確な質量又は質量対電荷比を含む、

質量分析方法。

【請求項2】

前記あらかじめ決定した量が、(i) 1%；(ii) 2%；(iii) 5%；(iv) 10%；(v) 20%；(vi) 50%；(vii) 100%；(viii) 150%；(ix) 200%；(x) 250%；(xi) 300%；(xii) 350%；(xiii) 400%；(xiv) 450%；(xv) 500%；(xvi) 1000%；(xvii) 5000%；及び(xviii) 10000%からなる群から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記第1の混合物及び/又は前記第2の混合物が、異なる特性を有する、少なくとも2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300

、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、又は5000の分子を含む、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記第1の混合物及び／又は第2の混合物が、非等モルの不均一複雑混合物(heterogeneous complex mixture)を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記第1の混合物中における第1の分子の質量対電荷比及び／又は前記第2の混合物中における第1の分子の質量対電荷比を、19 ppm, 18 ppm, 17 ppm, 16 ppm, 15 ppm, 14 ppm, 13 ppm, 12 ppm, 11 ppm, 10 ppm, 9 ppm, 8 ppm, 7 ppm, 6 ppm, 5 ppm, 4 ppm, 3 ppm, 2 ppm, 1 ppm、又は<1 ppmまでの範囲で決定する、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記第1の混合物中における第1の分子の質量対電荷比及び／又は前記第2の混合物中における第1の分子の質量対電荷比を、15 - 20 ppm, 10 - 15 ppm, 5 - 10 ppm又は1 - 5 ppmまでの範囲で決定する、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記第1の混合物中における第1の分子の質量対電荷比及び／又は前記第2の混合物中における第1の分子の質量対電荷比を、0.01マスユニット、0.009マスユニット、0.008マスユニット、0.007マスユニット、0.006マスユニット、0.005マスユニット、0.004マスユニット、0.003マスユニット、0.002マスユニット、0.001マスユニット、又は<0.001マスユニットまでの範囲で決定する、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

下記の工程のうち少なくとも一つをさらに含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

- (i) 前記第1の混合物中における第1の分子の強度を、前記第1の混合物中における第2の分子の強度と比較する工程；
- (ii) 前記第1の混合物中における第1の分子の強度を、前記第2の混合物中における第1の分子の強度と比較する工程；
- (iii) 前記第1の混合物中における第2の分子の強度を、前記第2の混合物中における第2の分子の強度と比較する工程；
- (iv) 前記第2の混合物中における第1の分子の強度を、前記第2の混合物中における第2の分子の強度と比較する工程；及び
- (v) (a) 前記第1の混合物中における第1の分子の強度と前記第2の混合物中における第1の分子の強度との比を、(b) 前記第1の混合物中における第2の分子の強度と前記第2の混合物中における第2の分子の強度との比と比較する工程。

【請求項9】

前記第1の混合物中における第2の分子が、実質的に、前記第2の混合物中における第2の分子と同じである、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記第2の分子が、前記第1及び第2の混合物に対して、内因性(endogenous)又は外因性(exogenous)である、請求項8又は9に記載の方法。

【請求項11】

前記第1の物理化学的性質が、(i) 溶出時間(elution time)、疎水性、親水性、移動時間(migration time)、又はクロマトグラフィー保持時間(chromatographic retention time)；(ii) 溶解

度；(i i i) 分子体積又はサイズ；(i v) 正味電荷 (net charge)、荷電状態 (charge state)、イオン電荷又は複合的な実測荷電状態；(v) 等電点 (pI)；(v i) 解離定数 (pKa)；(v i i) 抗体親和力；(v i i i) 電気泳動移動度；(i x) イオン化ポテンシャル；(x) 双極子モーメント；(x i) 水素結合可能性 (hydrogen-bonding capability) 又は水素結合能力 (hydrogen-bonding capacity)；及び (x i i) 気相中におけるイオン移動度 (ion mobility) からなる群から選択される、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記第 1 の混合物中における第 1 の分子及び前記第 2 の混合物中における第 1 の分子の質量対電荷比以外の第 2 の物理化学的性質を測定する工程をさらに含み、

前記第 1 の混合物中における第 1 の分子及び前記第 2 の混合物中における第 1 の分子が、実質的に等しい第 2 の物理化学的性質を有すると決定される、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記第 2 の物理化学的性質が、(i) 溶出時間 (elution time)、疎水性、親水性、移動時間 (migration time)、又はクロマトグラフィー保持時間 (chromatographic retention time)；(i i) 溶解度；(i i i) 分子体積又はサイズ；(i v) 正味電荷 (net charge)、荷電状態 (charge state)、イオン電荷、又は複合的な実測荷電状態；(v) 等電点 (pI)；(v i) 解離定数 (pKa)；(v i i) 抗体親和力；(v i i i) 電気泳動移動度；(i x) イオン化ポテンシャル；(x) 双極子モーメント；(x i) 水素結合可能性 (hydrogen-bonding capability) 又は水素結合能力 (hydrogen-bonding capacity)；及び (x i i) 気相中におけるイオン移動度 (ion mobility) からなる群から選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記第 1 の混合物中における第 1 の分子及び前記第 2 の混合物中における第 1 の分子の質量対電荷比以外の第 3 の物理化学的性質を測定する工程をさらに含み、

前記第 1 の混合物中における第 1 の分子及び前記第 2 の混合物中における第 1 の分子が、実質的に等しい第 3 の物理化学的性質を有すると決定される、請求項 12 又は 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記第 3 の物理化学的性質が、(i) 溶出時間 (elution time)、疎水性、親水性、移動時間 (migration time)、又はクロマトグラフィー保持時間 (chromatographic retention time)；(i i) 溶解度；(i i i) 分子体積又はサイズ；(i v) 正味電荷 (net charge)、荷電状態 (charge state)、イオン電荷、又は複合的な実測荷電状態；(v) 等電点 (pI)；(v i) 解離定数 (pKa)；(v i i) 抗体親和力；(v i i i) 電気泳動移動度；(i x) イオン化ポテンシャル；(x) 双極子モーメント；(x i) 水素結合可能性 (hydrogen-bonding capability) 又は水素結合能力 (hydrogen-bonding capacity)；及び (x i i) 気相中におけるイオン移動度 (ion mobility) からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記第 1 の混合物中における第 1 の分子及び前記第 2 の混合物中における第 1 の分子の質量対電荷比以外の第 4 の物理化学的性質を測定する工程をさらに含み、

前記第 1 の混合物中における第 1 の分子及び前記第 2 の混合物中における第 1 の分子が、実質的に等しい第 4 の物理化学的性質を有すると決定される、請求項 14 又は 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記第4の物理化学的性質が、(i)溶出時間(elution time)、疎水性、親水性、移動時間(migration time)、又はクロマトグラフィー保持時間(chromatographic retention time);(ii)溶解度;(iii)分子体積又はサイズ;(iv)正味電荷(net charge)、荷電状態(charge state)、イオン電荷、又は複合的な実測荷電状態;(v)等電点(pI);(vi)解離定数(pKa);(vii)抗体親和力;(viii)電気泳動移動度;(ix)イオン化ポテンシャル;(x)双極子モーメント;(xi)水素結合可能性(hydrogen-bonding capability)又は水素結合能力(hydrogen-bonding capacity);及び(xii)気相中におけるイオン移動度(ion mobility)からなる群から選択される、請求項16に記載の方法。

【請求項 18】

前記第1の混合物中における第1の分子及び前記第2の混合物中における第1の分子の質量対電荷比以外の第5の又はさらなる物理化学的性質を測定する工程をさらに含み、

前記第1の混合物中における第1の分子及び前記第2の混合物中における第1の分子が、実質的に等しい第5の又はさらなる物理化学的性質を有すると決定される、請求項16又は17に記載の方法。

【請求項 19】

前記第5の又はさらなる物理化学的性質が、(i)溶出時間(elution time)、疎水性、親水性、移動時間(migration time)、又はクロマトグラフィー保持時間(chromatographic retention time);(ii)溶解度;(iii)分子体積又はサイズ;(iv)正味電荷(net charge)、荷電状態(charge state)、イオン電荷、又は複合的な実測荷電状態;(v)等電点(pI);(vi)解離定数(pKa);(vii)抗体親和力;(viii)電気泳動移動度;(ix)イオン化ポテンシャル;(x)双極子モーメント;(xi)水素結合可能性(hydrogen-bonding capability)又は水素結合能力(hydrogen-bonding capacity);及び(xii)気相中におけるイオン移動度(ion mobility)からなる群から選択される、請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

前記第1の混合物中における第1の分子の質量対電荷比及び/又は前記第2の混合物中における第1の分子の質量対電荷比を、(i)フーリエ変換“FT”質量分析計;(ii)フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴(“FTICR”)質量分析計;(iii)飛行時間(“TOF”)質量分析計;(iv)直交加速式(orthogonal acceleration)飛行時間(“oaTOF”)質量分析計;(v)磁気セクタ質量分析計;(vi)四重極質量分析装置(quadrupole mass analyzer);(vii)イオントラップ質量分析装置;及び(viii)フーリエ変換オービトラップ(orbitrap)、静電的イオンサイクロトロン共鳴質量分析計、又は静電的フーリエ変換質量分析計のいずれかにより質量分析する、請求項1から20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

(i)前記第1のサンプルを病気に罹った生物から採取し、かつ、前記第2のサンプルを病気に罹っていない生物から採取するか;

(ii)前記第1のサンプルを治療した生物から採取し、かつ、前記第2のサンプルを治療していない生物から採取するか;又は

(iii)前記第1のサンプルを変異体の生物から採取し、かつ、前記第2のサンプルを野生型の生物から採取する、請求項1から20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

1又はそれ以上のさらなる生物由来分子混合物を含む1又はそれ以上のさらなるサンプル

ルを準備する工程、

前記 1 又はそれ以上のさらなる混合物中における第 1 の分子の質量対電荷比以外の第 1 の物理化学的性質を測定する工程、

前記 1 又はそれ以上のさらなる混合物中における第 1 の分子の質量を分析し、そして、前記 1 又はそれ以上のさらなる混合物中における第 1 の分子の質量対電荷比を正確に決定する工程、及び、

前記 1 又はそれ以上のさらなる混合物中における第 1 の分子の強度を決定し、前記第 1 の混合物中における第 1 の分子、前記第 2 の混合物中における第 1 の分子及び前記 1 又はそれ以上のさらなる混合物中における第 1 の分子が、実質的に等しい質量対電荷比及び実質的に等しい物理化学的性質、並びに、任意に等しい第 2 及び / 又は第 3 及び / 又は第 4 及び / 又は第 5 若しくはさらなる物理化学的性質を有すると決定する工程をさらに含む、請求項 1 から 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記 1 又はそれ以上のさらなる混合物中における第 1 の分子を同定することを含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記第 1 の混合物中における第 1 の分子及び / 又は第 2 の混合物中における第 1 の分子がペプチドを含み、かつ、前記分子のインデックスがペプチドのインデックスを含む、請求項 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記ペプチドのインデックスが、1 又はそれ以上のタンパク質がどのようにして断片化され又は消化され、複数のペプチドを生じることが可能であるかを決定することにより生成されたものである、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記第 1 の混合物中における第 1 の分子及び前記第 2 の混合物中における第 1 の分子がペプチドを含み、前記分子のインデックスがタンパク質のインデックスを含む、請求項 1 から 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記第 1 の混合物中における第 1 の分子及び / 又は前記第 2 の混合物中における第 1 の分子を同定する工程が、分子のインデックスから前記第 1 の物理化学的性質を計算することを含み、前記インデックスが、

(i) 掲載された各分子の個性 ; 及び

(i i) 掲載された各分子の、実験的に決定された又は予想された、正確な質量又は質量対電荷比を含む、請求項 1 から 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記インデックスが、(i) タンパク質又はプロテオーム (p r o t e o m e) のシーケンスデータベース ; (i i) 発現シーケンスタグ (E x p r e s s e d S e q u e n c e T a g) (E S T) のデータベース ; 又は (i i i) 遺伝子若しくはゲノムのデータベースを含む、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記第 1 の混合物中における第 1 の分子及び / 又は前記第 2 の混合物中における第 1 の分子を、

(i) 前記第 1 の混合物中における第 1 の分子及び / 又は前記第 2 の混合物中における第 1 の分子の、決定した質量対電荷比を、掲載された分子の質量又は質量対電荷比と比較した際の近似性 ; 及び / 又は

(i i) 前記第 1 の混合物中における第 1 の分子及び / 又は前記第 2 の混合物中における第 1 の分子の、前記第 1 の物理化学的性質を、掲載された分子における第 1 の物理化学的性質と比較した際の近似性 ; 及び / 又は

(i i i) 前記第 1 の混合物中における第 1 の分子及び / 又は前記第 2 の混合物中における第 1 の分子の、第 2 の物理化学的性質を、掲載された分子における第 2 の物理化学的性質

質と比較した際の近似性；及び／又は

(i v) 前記第 1 の混合物中における第 1 の分子及び／又は前記第 2 の混合物中における第 1 の分子の、第 3 の物理化学的性質を、掲載された分子における第 3 の物理化学的性質と比較した際の近似性；及び／又は

(v) 前記第 1 の混合物中における第 1 の分子及び／又は前記第 2 の混合物中における第 1 の分子の、第 4 の物理化学的性質を、掲載された分子における第 4 の物理化学的性質と比較した際の近似性；及び／又は

(v i) 前記第 1 の混合物中における第 1 の分子及び／又は前記第 2 の混合物中における第 1 の分子の、第 5 の若しくはさらなる物理化学的性質を、掲載された分子における第 5 の若しくはさらなる物理化学的性質と比較した際の近似性に基づき同定する、請求項 1 から 28 のいずれか一項に記載の方法。

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 27/62 H

(72)発明者 ドングレ、アショク
アメリカ合衆国、0 8 6 4 8 ニュージャージー州、ローレンスヴィル、オニール センター 7
9

(72)発明者 オピテック、グレゴリー
アメリカ合衆国、0 8 6 4 8 ニュージャージー州、トレントン、タロン センター 4 0 7

(72)発明者 シルバ、ジェフリー
アメリカ合衆国、0 1 9 1 5 マサチューセッツ州、ピバリー、ヘイル ストリート 9 5

F ターム(参考) 2G041 CA01 CA02 EA03 EA04 EA12 EA13 FA12 GA02 GA03 GA05
GA06 GA08 GA09 HA01 HA02 JA02 LA07 LA08

专利名称(译)	质谱测量方法		
公开(公告)号	JP2008076403A	公开(公告)日	2008-04-03
申请号	JP2007265544	申请日	2007-10-11
[标]申请(专利权)人(译)	英国质谱公司		
申请(专利权)人(译)	微团英国有限公司		
[标]发明人	ジェロマノススコット ドングレアショク オピテックグレゴリー シルバジェフリー		
发明人	ジェロマノス、スコット ドングレ、アショク オピテック、グレゴリー シルバ、ジェフリー		
IPC分类号	G01N27/62 B01D59/44 C12Q1/68 G01N27/447 G01N30/72 G01N30/88 G01N33/483 G01N33/53 G01N33/68 H01J49/00 H01J49/04		
CPC分类号	G01N33/6848 C12Q1/6872 G01N33/6842 G01N33/6851 H01J49/0031 Y10T436/24		
FI分类号	G01N27/62.V G01N27/62.X G01N27/62.D G01N27/62.K G01N27/62.L G01N27/62.H G01N27/62.102		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/CA02 2G041/EA03 2G041/EA04 2G041/EA12 2G041/EA13 2G041/FA12 2G041/FA02 2G041/GA03 2G041/GA05 2G041/GA06 2G041/GA08 2G041/GA09 2G041/HA01 2G041/HA02 2G041/JA02 2G041/LA07 2G041/LA08		
优先权	60/340460 2001-12-08 US 60/364847 2002-03-14 US		
其他公开文献	JP4654230B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通过测量质谱来鉴定生物分子。基于分子的精确鉴定的质荷比和至少一种其他的物理化学性质（如洗脱时间或电荷状态）来鉴定分子。可以使用其他物理化学性质。然后通过信息查找表比较凭经验确定的精确质量和理化性质。可以生成查询表，或者可以计算已知数据库中数据的理化性质。识别并优选鉴定两个不同样品中的相同分子的能力决定了与对照样品相比，特定生物分子在实验样品中是否差异表达。它可能用于。[选型图]图1A

