

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-513345

(P2004-513345A)

(43) 公表日 平成16年4月30日(2004.4.30)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/62	GO 1 N 27/62	V
GO 1 N 27/447	GO 1 N 27/62	F
GO 1 N 33/53	GO 1 N 27/62	H
GO 1 N 33/566	GO 1 N 27/62	K
	GO 1 N 27/62	L
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 42 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-539814 (P2002-539814)	(71) 出願人	503159276 キアディス ビー. ブイ. オランダ国、ライデン、ニールス ボール ベクタ 11-13
(86) (22) 出願日	平成13年10月30日 (2001.10.30)	(74) 代理人	100066692 弁理士 浅村 皓
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月30日 (2003.4.30)	(74) 代理人	100072040 弁理士 浅村 肇
(86) 国際出願番号	PCT/NL2001/000794	(74) 代理人	100088926 弁理士 長沼 暉夫
(87) 国際公開番号	W02002/037111	(74) 代理人	100102897 弁理士 池田 幸弘
(87) 国際公開日	平成14年5月10日 (2002.5.10)	(72) 発明者	イルス、フベルトゥス オランダ国 アムステルダム、 ルーズベ ルトラーン 112 - ザ セカンド 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	00203776.0		
(32) 優先日	平成12年10月30日 (2000.10.30)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

(54) 【発明の名称】 既知リガンドの質量分析による検出に基づく、連続フロー方式の均一系生化学的分析方法

## (57) 【要約】

本発明は、相互作用、特に質量スペクトル法を使用する測定法における生体特異的相互作用に関する。さらに詳しくは本発明は、均一系の生化学的分析法において特異的相互作用を測定することを可能にする。本発明のオンライン検出法は、分画工程の流出物と一緒に一定量の親和性分子を含み、この親和性分子は、流出物中に存在することが推定される試験対象物質に結合する。この工程の後に、一定量の既知リガンドを添加する工程（このリガンドは親和性分子に結合する）が続き、この工程により、リガンド/親和性分子複合体が形成される。本発明では、質量スペクトル計を使用して、リガンド/親和性分子複合体の存在下で遊離のリガンドが検出される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

分画手段からの流出物に、一定量の親和性分子を接触させる工程と、該親和性分子を、該流出物中に存在することが想定される分析対象物に結合させる工程と、一定量の既知リガンドを添加する工程と、該リガンドを親和性分子に結合させて、リガンド/親和性分子複合体を形成する工程と、質量分析計を用いて、該リガンド/親和性分子複合体の存在下で、遊離のリガンドを検出する工程、とを含んでなるオンライン検出方法。

## 【請求項 2】

前記分画手段が、液体クロマトグラフィー分離、毛細管電気泳動手段、又はコンビナトリアル化学システムである、請求項 1 の方法。

10

## 【請求項 3】

前記液体クロマトグラフィー分離手段が、HPLC、逆相HPLC、CE、CEC、IEF、又はMEKCによる手段である、請求項 2 の方法。

## 【請求項 4】

電子噴霧イオン化型、大気圧イオン化型、四重極型、磁気セクター型、飛行時間型、MS/M<sup>s</sup>、MS<sup>n</sup>、FTMS型、イオン捕捉型、及びこれらの組合せよりなる群から選択される質量分析計を使用する、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記親和性分子が、2つ以上の異なる種類の親和性分子の混合物中に存在し、かつ前記既知リガンドが、異なるリガンドの混合物中に存在し、それら各リガンドが、該各親和性分子の 1 つに結合することが知られている、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

複数入り口ユニットを有する質量スペクトル計が使用され、この複数入り口ユニットに、異なる分画ラインが接続され、各分画ラインが、一定量の親和性分子と既知リガンドを前記請求項のそれぞれに記載のように添加した流出物を含むオンライン検出方法。

## 【請求項 7】

前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法により検出される化合物。

## 【請求項 8】

親和性分子のリガンドとしての請求項 7 の化合物の使用。

## 【発明の詳細な説明】

30

## 【0001】

本発明は、生体に特異的な相互作用の測定方法に関し、特に、質量分析を用いる分析により生体に特異的な相互作用を測定する方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、均一系の生化学的な分析法で、生体に特異的な相互作用を測定することを可能にする。具体的な態様においては、この検出手段は、既知のリガンドを使用する生化学的な分析のモニタリング手法として使用される。さらにまた、本発明は、新たに検出された化合物の親和性分子のリガンドとしての使用に関する。

## 【0002】

生化学的な分析は、生体に特異的な相互作用を測定するための高感度な検出手段である。親和性分子（例えば、抗体、受容体または酵素のような親和性タンパク質）を求めて試験されるリガンドの親和性は、一般的に、レポーター分子として、標識リガンド（すなわち、放射能標識物、蛍光物質、または酵素のような検出可能な部位を含み、タンパク質などの親和性分子に対して既知の親和性を有する化合物）を使用して試験される。

40

## 【0003】

生化学的測定法は、バッチ式（例えば、マイクロタイタープレート中）または連続フロー方式で行われる。一般的に、親和性分子は、試料および適当な標識物とインキュベートされ、一定時間のインキュベーション後、遊離標識または結合標識の量を測定する。遊離標識および結合標識の検出特性が同じ場合には、検出前に両方の画分を分離する必要がある。いくつかの均一系による測定法の形態が知られており、これらは、遊離標識物と結合標識物との検出較差（例えば、異なる蛍光量収率）を利用する。そのような場合、ある画分

50

は他の画分の存在下で測定でき、時間がかかり手間のかかる分離工程を避けることができる。

【0004】

特定の標識を使用する生化学的な分析法の欠点は、スクリーニングされる親和性分子（例えば、タンパク質）にとって適当な標識を見つける必要があることである。一方で高感度な検出特性を有しながら、他方で好ましい高い結合親和特性を保持する標識の合成は、困難な課題であり、特に、既知のリガンドへの蛍光物質または酵素の付着が、しばしば合成された標識の結合親和性を大幅に低下させる場合があり、その場合には受容体の検出が困難である。

【0005】

特殊な化学的または生化学的なレポーター分子（例えば、蛍光物質または酵素）を必要としない検出器が使用されるなら、新しい標識の合成を回避できる。質量分析計（MS）は、そのままの状態ですら要求される感度による化合物の測定が可能、即ち、化合物を化学的な修飾をすることなく検出できる検出器の例である。従って、生化学的な分析における検出手段として質量分析を使用することにより、測定法を開発し使用する前に、新たな標識を合成する必要性が無くなる。

【0006】

セイフェルト（Seiffert）ら（*J. Anal. Chem.*, 363（1999）767-770）は、固定化受容体カラムを使用して、試料から活性リガンドを単離する質量分析に基づくスクリーニング法を提唱している。後に、結合画分が脱着され、液体クロマトグラフィー質量分析法により測定されるものである。この方法は、質量分析を用いて活性分子を直接検出する方法を提示するものである。これは、質量分析を、やや低感度の総イオン流（TIC）モードで実行する必要があるため、新規の未知のリガンドを検出しなければならない応用には特に不利である。さらに、受容体の固定化は、立体障害のためにタンパク質を部分的または完全に不活性化することがある。また、結合した活性リガンドを放出するための脱着条件は、しばしば受容体の不可逆的変性を引き起こしており、固定化受容体カラムの頻繁な交換が必要となっている。

【0007】

ネドベド（Nedved）ら（*Analytical Chemistry*, 68（1996）4226-4236）は、逆相液体クロマトグラフィーに連結された固定化免疫親和性カラムとイオン噴霧質量分析計を使用して、小分子のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングする類似の方法を記載する。この方法でもやはり、活性化化合物は、フルスキャンモードで直接検出される。固定化抗体カラムの使用は、上記のセイフェルト（Seiffert）らの方法と同一であり、この分析形態におけるすべての欠点を有する。

【0008】

シー（Hsieh）ら（*Molecular Diversity*, 2（1996）, 189-196）は、検出のために質量分析計を使用する多次元クロマトグラフィースクリーニング法を記載する。親和性タンパク質を、スクリーニングされる化合物とインキュベーションした後、サイズ排除クロマトグラフィーを使用して、結合画分を非結合画分から分離する。次に、タンパク質結合画分を、質量スペクトルと連結した逆相液体クロマトグラフィーカラムに送り、親和性タンパク質に結合した小分子を測定する。セイフェルト（Seiffert）らとネドベド（Nedved）らの方法とは異なり、シー（Hsieh）らは、リガンドと受容体との相互作用が溶液中で起きる、すなわち、受容体は固定化されていない生化学的測定法を記載する。しかし、1次インキュベーション工程後、活性化化合物の直接的な検出を可能とするに際して、2つのクロマトグラフィーを適用する必要がある。さらに、活性化化合物の構造は未知であるため、質量分析計は、非選択的TICモードで運転しなければならない。

【0009】

未公開のEP-A-1048951号（アース（Irth）とバンデルグリーフ（Van

10

20

30

40

50

der Greef))は、生体に特異的な相互作用を測定するための検出手段として、質量分析の使用を記載する。試料中の活性化化合物の存在を検出するために、標識を使用せずに、良好な質量分析検出特性を有する既知リガンドをレポーター分子として使用するものである。記載の方法は、試料を親和性タンパク質とインキュベートし、次いで、残存する未結合部位を滴定するために、既知リガンドを加える、一連の生化学的工程を含んでいる。最後の工程で、中空繊維分離モジュールまたは制限アクセスカラム(restricted access column)を使用して、既知リガンドの遊離画分を、タンパク質結合画分から分離する。遊離画分のみを質量スペクトル計に送り、その一方で、タンパク質画分を廃棄する。従って、EP-A-1048951号の方法は、タンパク質結合画分から検出分子を分離することを要する不均一系での分析形態である。

10

**【0010】**

本発明は、遊離レポーター分子及びタンパク質結合レポーター分子の分離を必要とする不均一系の分析法より、実施がより容易な方法の提供を目的とする。さらに詳しくは、本発明は読取り手段として質量分析を使用する均一系の生化学的測定方法である。この測定方法は、アース(Irth)及びバンデルグリーフ(Vander Greef)によって記載されているような遊離標識と結合標識の分離を必要としない。アース(Irth)及びバンデルグリーフ(Vander Greef)の方法と本発明の方法との相違を、スキーム1に示す。

**【0011】**

本発明に基づく、分画工程の流出物に、一定量の親和性分子を接触させる工程と、次いで、親和性分子を、流出物中に存在すると想定される分析対象物に結合させる工程と、次いで、一定量の既知リガンドを添加する工程と、次いで、リガンドを親和性分子に結合させて、リガンド/親和性分子複合体を形成する工程と、次いで、リガンド/親和性分子複合体の存在下で、質量スペクトル計を使用して遊離のリガンドを検出する工程とを含んでなるオンライン検出法は、上記問題を克服できることがわかった。

20

**【0012】**

驚くべきことに、リガンド/親和性タンパク質複合体の存在下で、遊離リガンドを検出するのに、MSを使用することができ、従って面倒な分離工程の必要が無くなった。本発明はさらに、アース(Irth)とバンデルグリーフ(Vander Greef)の方法のような先行技術の方法に必要な、分離手段(例えば、中空繊維モジュールまたは制限アクセス相)表面へのタンパク質の非特異結合による分離工程に伴う問題を克服する。さらに、分離手段の再生が不要となり、測定系の連続操作を可能にする。さらにまた、分離条件を検討したり最適化する必要が無い場合、新しいスクリーニング法の測定系の開発時間が大幅に短縮される。

30

**【0013】**

本発明は、生化学的反応モジュールに、液体クロマトグラフィーのような分画工程を、オンラインで連結することによって行なわれる。分画工程の流出物に、一定量の親和性分子(例えば、受容体、抗体または酵素のようなタンパク質)が添加される。短い反応時間(最大、約3分)後、一定量の既知リガンドが反応混合物に添加され、短時間(例えば、2~3分)相互作用させられる。全反応混合物を、あらかじめ既知の遊離リガンドと結合リガンドとを分離することなく、質量スペクトル計に導入する。質量分析により検出された既知リガンドの量の変化は、流出物中の親和性分子に結合する化合物の存在を示す。アース(Irth)とバンデルグリーフ(Vander Greef)が記載した不均一系の測定法とは異なり、遊離既知リガンドの量は、結合したリガンド-親和性タンパク質複合体の存在下で検出される。親和性分子との複合体中の結合リガンドの量とは独立に、遊離リガンドが質量分析により検出されることは驚くべきことである。

40

**【0014】**

本発明の方法は、特定の質量対電荷比で、既知リガンドの濃度の変化を観測することにより、混合物中の活性化化合物の存在を検出することを可能にする。さらに活性化化合物の分子量は、既知リガンドのピーク極大が起きる時に、総イオン流クロマトグラムを観測するこ

50

とにより同時に測定することができる（スキーム 2 を参照）。

【0015】

連続フロー系に、分析対象物を注入した時に得られる質量分析データと、一定量の親和性分子及び検出可能なリガンドを導入した時に得られるシグナルとを比較すると、分画工程の流出物中に存在する分析対象物により占領された結合部位の割合に関する情報が得られる。当業者は、その検出方法から得られたデータを処理し評価する知識を持っている。流出物中に存在する分析対象物により占領される結合部位の割合は、既知の親和性分子と相互作用を示す新しい化合物を見つけるのに使用することができる。この情報は、例えば薬物の発見において、本発明のオンラインでの分離 / 親和性分子検出プロセスを実施する可能性を提供する。

10

【0016】

例えば、薬物発見で使用されるハイスループットスクリーニングのシステムは、次の工程からなる。例えば、上流コンビナトリアル化学システムにより生成される複雑な試料は、例えば、固相抽出手段や電気泳動による試料処理原理を使用して、極性の似た化合物を含有する画分に、予備分画される。各画分はさらに、分析または予備スケールの液体クロマトグラフィー分離カラムを使用して、分離される。前記液体クロマトグラフィーカラムから溶出する化合物は、適切な親和性分子検出手段を使用して、オンラインで検出される。予備スケールの分離カラムが適用される場合、ポストカラムフロープリット (post-column flow-split) を生じさせるであろう。2つの流れのうちの1つは、親和性分子検出手段を使用して検出され、他の流れは、フラクションコレクターに送られる。親和性分子検出器から得られる信号にしたがって、肯定応答を生じる化合物を含有する画分が採取され、否定応答を生じる画分は廃棄されるであろう。この完全なスクリーニング法は、既知のパルススイッチング法を使用して、自動化することができる。

20

【0017】

本発明の方法で使用される適当な分画手段としては、液体クロマトグラフィー分離または毛細管電気泳動工程を含む。しかし、当業者に公知であり、比較的連続的に流れを生じることが可能な他の分離手段や分画手段も同様に使用できる。

【0018】

好適な実施態様において、液体クロマトグラフィー分離手段は、逆相 HPLC である。

【0019】

本発明によれば、異なる化合物の混合物が注入されるフロー注入の流出物もまた、分画工程の流出物として理解されるべきである。質量分析の選択的な追跡性が得られるように質量分析を行なうことにより、必要な選択性を得ることができる。

30

【0020】

フロー注入法は、柔軟で迅速なスクリーニング法を提供するため、本発明の好適な実施態様である。

【0021】

質量分析操作のすべてのモードは、フロー注入モードで可能であるが、高いバックグラウンドのために、特に、選択された単一の  $m/z$  トレース ( $m/z$  trace) または選択された複数の  $m/z$  トレースのイオンを検出することを含む非常に選択的なモードが適している。

40

【0022】

すでに記載したように、分画手段は、液体クロマトグラフィー分離、毛細管電気泳動法工程、またはコンビナトリアル化学システムとすることができる。好適な液体クロマトグラフィー分画手段としては、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、逆相高速液体クロマトグラフィー (reversed phase HPLC)、毛細管電気泳動法 (CE)、毛細管電気クロマトグラフィー (CEC)、等電点電気泳動 (IEF)、またはミセル電気動学的クロマトグラフィー (MEKC) があり、これらのすべては、当業者に公知である。

【0023】

50

当該分野で公知の質量分析手段におけるすべての可能な変更は、本発明により利益を受けるであろう。好ましくは、質量分析は、電子噴霧イオン化型、大気圧イオン化型、四重極型、磁気セクター型、飛行時間型、MS/MS、MS<sup>n</sup>、FTMS型、イオン捕捉型、およびこれらの組合せよりなる群から選択される型である。

【0024】

例えば、化合物を追跡するためのスキニングモードにおいては、質量分析のすべての可能な計測設計を持つ低分解能質量分析を使用することができ、特に四重極、磁気セクター、飛行時間、FTMS、およびイオン捕捉を使用することができる。これによれば、一般的に、まずまずの質量精度を持つ分子量データが得られる。

【0025】

高分解能質量分析が適用される場合には、すべての可能な高分解計測設計、特に、磁気セクター、飛行時間、FTMS、およびイオン捕捉を使用すれば、化合物の元素組成と結び付けられる高い質量精度を持つ分子量データが得られる。

【0026】

他の公知の質量分析手段としては、タンデムMS（例えば、MS/MSまたはMS<sup>n</sup>（例えばMS<sup>3</sup>））がある。これらの手段の適用は、本発明の好適な実施態様であるリガンドの構造情報の収集を可能にする。スキニングモードのデータは、自動的に観測された各ピークについて、タンデムMS測定が行われることを意味するデータ依存性モードで得られる。これ以外に、タンデムMS測定で誘導される断片化は、より進んだ方法（例えば、ブロードバンド励起、これも、天然の生成物スクリーニングにおいて[プロトン化分子 - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>ピークのような、あまり必要ではない予測される断片を断片化する）と組み合わせることができる。

【0027】

質量分析はまた、単一/複数イオンモニタリングモードで操作することができ、このモードは、高い選択性を持つ検出に使用することができる。

【0028】

単一/複数イオンモニタリングモードは、高い選択性を有する検出に使用することができる。すべての可能な低分解装置設計、特に、四重極、磁気セクター、飛行時間、FTMS、およびイオン捕捉を用いる、単一/複数イオンモニタリングモードの低分解質量分析を使用すれば、予め測定したm/zトレースのモニタリングに基づく選択的な検出が得られる。高分解質量分析を適用する場合には、質量分析のすべての可能な装置設計、特に、四重極、磁気セクター、飛行時間、FTMS、およびイオン捕捉を使用することができる。これは、通常、予め測定したm/zトレースの高い分解特性でのモニタリングに基づく、非常に選択的な検出を可能にする。タンデム質量分析が適用される場合には、すべての可能な装置設計、特に、イオン捕捉、四重極-飛行時間(Q-TOF)、三重四重極(QQ)、FTMSおよびセクター装置と四重極およびイオン捕捉との組合せを使用することができる。これは、MS/MSおよび/またはMS<sup>n</sup>測定で生じるピークをモニタリングすることに基づく、非常に選択的な検出を可能にする。

【0029】

質量分析を走査モードで行なうことも可能である。こうして、予め測定したシグナルの低下は、他のシグナルの上昇と相関し、同じサイクルの中で活性化化合物を解析することを可能にする。

【0030】

本発明の分析法により、例えば、生物学的流体又は抽出物；天然産物の抽出物；バイオテクノロジー、コンビナトリアル技術および方法などの化学的な実験からの溶液または抽出物等の複合的な性質を有する溶液中における（生物）活性化化合物の追跡を、高い効率性、選択性、及び柔軟性をもって行うことができる。さらに本発明は、バックグランド化合物の妨害を制限する可能性を提示する。

【0031】

本発明はさらに、従来の質量スペクトル、高分解データまたはMS<sup>n</sup>に基づく質量分析

10

20

30

40

50

による化合物の同定を可能にする。

【0032】

本発明の方法により、様々な質量分析の実験手法に基づいて、ライブラリー検索を行うことができ、多系列の試料をスクリーニングし、これらスクリーニングした試料を、化合物の完全な同定を要することなく同様の活性を有する化合物を基準とするクラス分けが可能となる。

【0033】

本発明の分析方法は、チップ技術に基づくスクリーニングシステムなど、分析システムを小型化した形態にも応用することができる。

【0034】

本発明の方法において、他の分子との相互作用または結合が可能なすべての分子は、親和性分子として使用することができる。親和性分子としては、例えば、エストロゲン、糖質コルチコイド受容体等のサイトゾル受容体；受容体等の可溶化膜結合受容体；抗体、酵素、アビジン等の親和性タンパク質；ポリヌクレオチドおよび多糖よりなる群から選択される。

【0035】

流出物に添加される「一定量の親和性分子」は、既知の濃度および既知の流量 (flow rate) のものと理解される。

【0036】

本願の詳細な説明および請求項における「既知リガンド」は、上記親和性分子と相互作用または反応することができ、質量分析により検出できるリガンドを意味する。検出可能なリガンドの例としては、親和性分子が結合可能な、既に見い出されている分析対象となる物質 (analyte) である。

【0037】

本発明は、標識の調製を要しないという大きな利点を有する。これは、既知リガンドの標識が、例えば、立体障害による親和性の劇的な低下を生じさせる場合に、そのような親和性分子にとって特に有利となる。レポーター分子として標識の無い既知の天然のリガンドを使用する分析法は、非常に迅速に開発することができる。

【0038】

本発明の方法で使用されるオンラインによる連結は、余分なカラムバンドの広がりを最小にするのに、高速の反応時間が必要である。これは、反応時間が時間のオーダーではなく分のオーダーを有する親和性分子-リガンド相互作用を考慮すべきことを意味する。

【0039】

親和性分子が試験対象物質に結合する適当な結合条件には、接触時間があり、これは同様のオーダーの時間である。適当な結合条件は、親和性分子とアナライトとの最適の結合を提供する条件である。温度、保持時間、化学組成等の精密な条件は、分析方法の種類やそれに用いられるタンパク質に強く依存することが理解される。バックグラウンド緩衝溶液が、主に不揮発性のリン酸塩またはトリス緩衝液からなる蛍光標識、放射性標識又は酵素標識による生化学的な分析法とは対照的に、本明細書に記載の均一系の質量分析による生化学的な分析法は、蟻酸アンモニウム又は酢酸アンモニウム等の中性 pH 揮発性緩衝液を使用して行われる。さらに、既知リガンドのイオン化特性を改良するために、少量のメタノール (2.5 ~ 10%) がバックグラウンド緩衝液に添加される。

【0040】

他の好ましい実施態様において、親和性タンパク質と既知リガンドとの組合せを使用して、いろいろな生体分子標的を同時にスクリーニングすることができる (スキーム3を参照)。

【0041】

この目的のために、親和性タンパク質の混合物を調製し、これを、分画手段における流出物に加える。次いで、親和性タンパク質1つ当たり少なくとも1つの既知リガンドを含有する既知リガンドの混合物を加える。反応混合物が、質量分析に供せられる。質量分析に

10

20

30

40

50

において、各活性既知リガンドが、選択イオンモニタリング (SIM) によりモニタリングされる。分画流出物中の活性化化合物の存在は、質量分析計において対応する既知リガンドトレースのシグナルに変化をもたらす。本発明の好ましい実施態様によれば、各親和性分子は、2つ以上の異なる種類の親和性分子の混合物中に存在し、各既知リガンドは異なるリガンドの混合物中に存在する。一方、各リガンドは、当該各親和性分子の1つに結合することが知られている。

【0042】

他の好ましい実施態様において、オンラインによる生化学的な分析系は、質量スペクトル計に向け複数入り口ユニットに連結している (スキーム4を参照)。複数入り口ユニットは、1つの質量スペクトル計と複数 (例えば8つ) の異なる分画ラインへの連結を可能にする。各ラインで、個別の既知リガンドによる分析が行われる。この方法は、類似親和性タンパク質のスクリーニングに特に有用である。これは、複数の分析を、互いに影響することなく、同時に実施することを可能にする (例えば、いくつかの親和性タンパク質と反応する活性化化合物による)。こうして、オンライン生化学的測定法は、単一の質量スペクトル計を検出器として使用して、平行して行うことができる。

10

【0043】

スキーム1は、アース (Irth) 及びバンデルグリーフ (Van der Greef) の方法 (EP-A-1048951号) と比較した、本発明のオンライン測定法の略図である。

【0044】

スキーム2は、本発明の方法で得られる典型的なクロマトグラムを示す。上のクロマトグラム (MSシグナル対保持時間) は、選択イオンモニタリングモード (SIM) の流出物をスクリーニングすることにより得られ、すなわちMSは、既知リガンド (L) に典型的な  $m/z$  値についてのみスクリーニングする。クロマトグラムは、ある保持時間での遊離リガンド濃度 [L] の上昇を示し、これは、親和性分子に結合する化合物 (アナライト) の存在を示す。このピークはまた、総イオン流モード (スキーム2の真ん中の図) で測定される。[L] 中のピークに対応する保持時間での完全な質量スペクトルは、スキーム2の下の図に示す。このスペクトルから、アナライトについての構造情報を得ることができる。

20

【0045】

スキーム3は、本発明の好適な実施態様を示し、親和性タンパク質と既知リガンドの組合せを使用して、いくつかの生物学的分子標的が同時にスクリーニングされることを示す。

30

【0046】

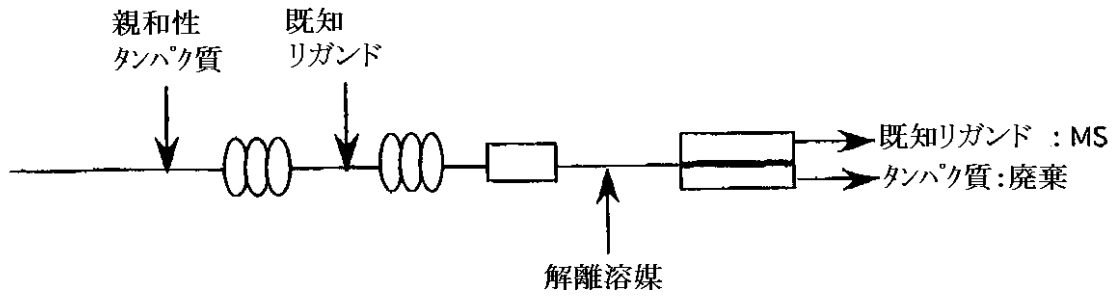
スキーム4は、質量スペクトル計の複数入り口ユニットを使用する好適な実施態様である。

【0047】

スキーム1

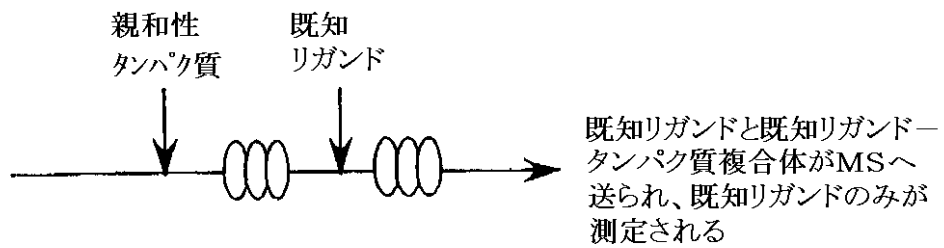
Irth/van der Greefと新発明の差

Irth/Van der Greef



10

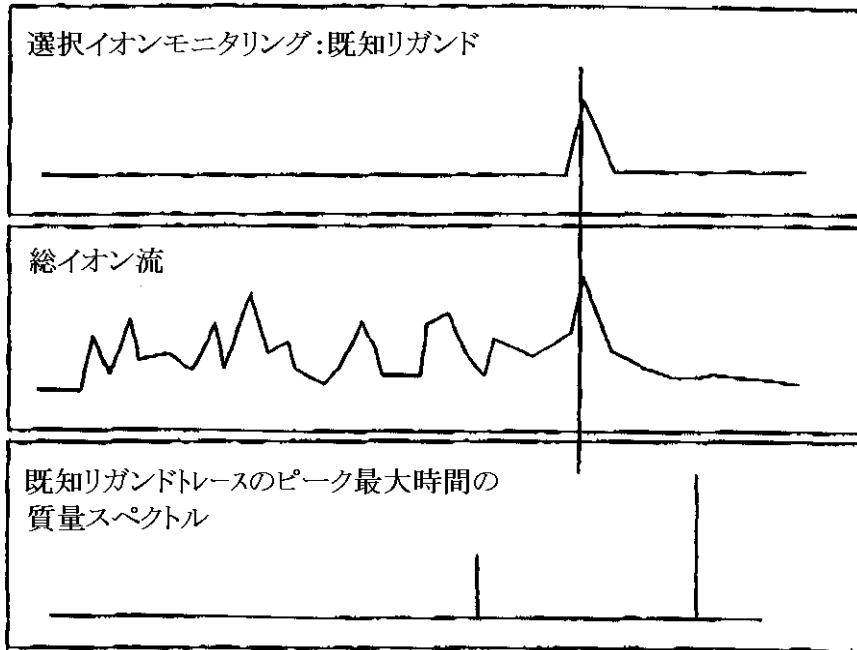
新発明



20

【 0 0 4 8 】

30



10

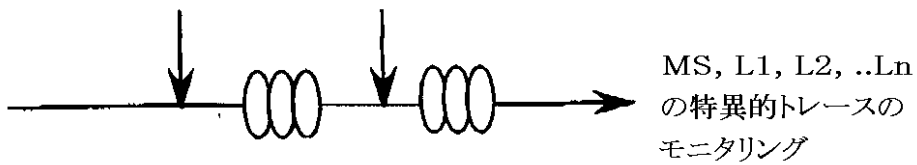
20

スキーム2

【 0 0 4 9 】

親和性	既知
タンパク質	リガンド
P1, P2..Pn.	L1, L2..Ln

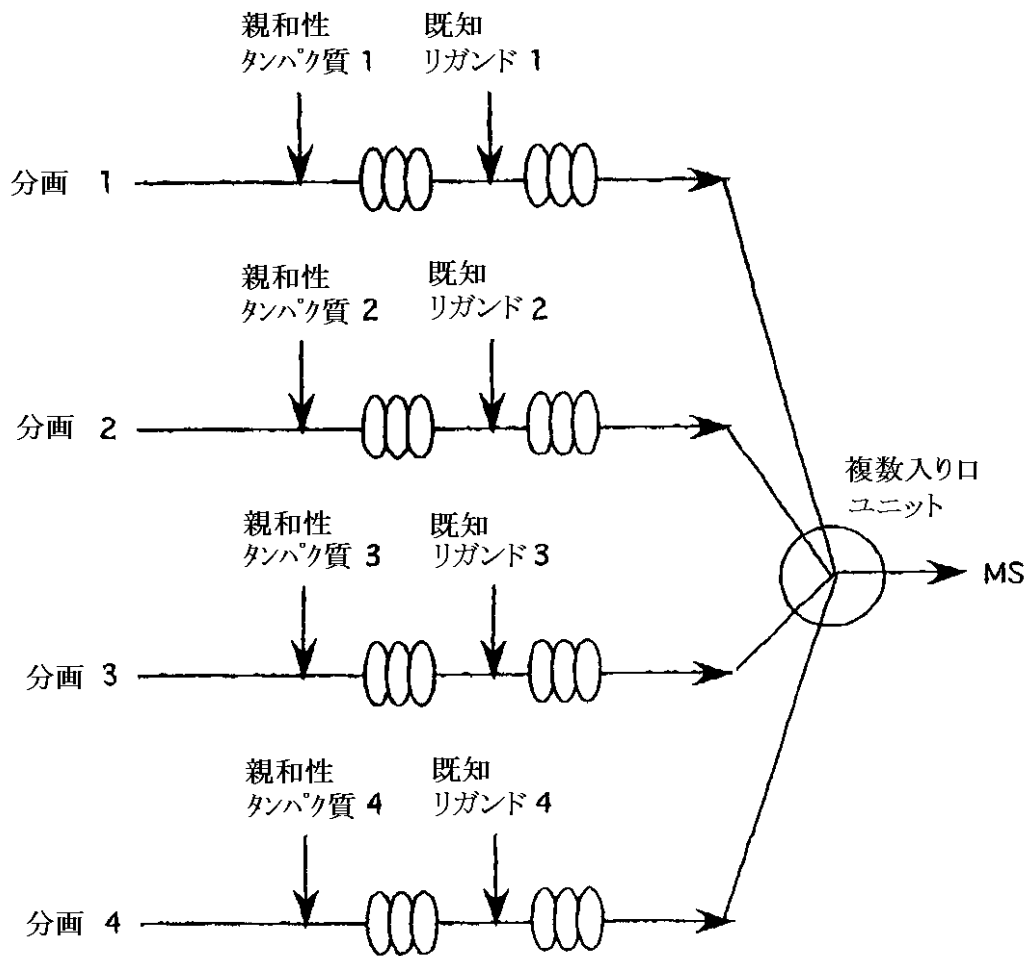
30



40

スキーム3

【 0 0 5 0 】



10

20

スキーム4

30

【0051】

【実施例】

実施例 1

親和性タンパク質としてストレプトアビジン、レポーター分子としてフルオレセイン - ビオチン、検体としてビオチン化合物を使用して、均一系のオンライン質量分析による生化学的分析法の実効性を実証した。ストレプトアビジンは、ビオチンとビオチン化合物に対して高親和性を有する、よく知られた親和性タンパク質である。50  $\mu$ l / 分の流量で輸送された 10 mmol / l の蟻酸アンモニウム / メタノール (90 : 10、v / v) からなる担体溶液に、10 mmol / l の蟻酸アンモニウムに溶解された 32 nmol / l のストレプトアビジンの溶液を、50  $\mu$ l / 分の流量で加えた。混合物を、内部容量が 17  $\mu$ l の内径 300 mm のポリ (テトラフルオロエチレン) 反応コイル中を輸送した。次に、10 mmol / l の蟻酸アンモニウム / メタノール (90 : 10、v / v) に溶解した 96 nmol / l フルオレセイン - ビオチンの溶液を、流量 100  $\mu$ l / 分で添加された。次に、混合物を、内部容量が 33  $\mu$ l で内径 300 mm のポリ (テトラフルオロエチレン) 反応コイル中を輸送し、次に、電子噴霧イオン化 (ESI) 源を備えた質量スペクトル計中に導入した。質量分析計は、 $[M + H]^+$  及び 1 つ以上の強いフラグメントイオンによる陽イオン (PI) モードの選択イオンモニタリング (SIM) で運転した。

40

【0052】

ストレプトアビジン / ビオチン系のための ESI 光源条件

光源温度 : 80

毛細管電圧 : 3.2 kV

50

サンプリングコーン電圧は、ビオチンとフルオレセイン標識ビオチンに対して、それぞれ、30と60Vであった。

【0053】

図1は、全反応結果を確認できる実験結果を示す。P1では、担体緩衝液のみが、質量スペクトル計中にポンプで供給され、対象バックグラウンドシグナルを与える。P2では、フルオレセイン-ビオチンポンプのスイッチが入れられ、 $m/z$ 399で選択イオンモニタリングMSシグナルが上昇した。P3では、ストレプトアビジンポンプのスイッチが入れられた。親和性タンパク質であるストレプトアビジンの添加により、遊離のフルオレセイン-ビオチンの濃度が低下し、選択イオンモニタリングMSシグナルが低下した。P4では、ビオチンの注入により、遊離のストレプトアビジンの結合部位が減少し、遊離のフルオレセイン-ビオチン濃度が上昇し、これは、 $m/z$ 399で選択イオンモニタリングMSシグナルのピークとして見られる。

10

【0054】

図2は、スクリーニング法が、ビオチン化された分析対象物質について選択的であることを示す。等しい濃度のビオチン( $m/z$ 245)、N-ビオチニル-6-アミノカプロン酸ヒドラジド( $m/z$ 372)、ビオチン-ヒドラジド( $m/z$ 259)、およびN-ビオチン-L-リジン( $m/z$ 373)の注入により、フルオレセイン-ビオチン( $m/z$ 390)でほとんど同じシグナルが得られ、すべての化合物が、レポーター分子であるフルオレセイン-ビオチンの、ストレプトアビジンへの結合を防止できることを示す。さらに、活性化化合物の分子量を、選択条件下でイオン化された化合物について同定することができるであろう。

20

【0055】

実施例2

親和性タンパク質として抗ジゴキシゲニン抗体のfab断片(fab抗ジゴキシゲニン)、レポーター分子としてジゴキシゲニン、およびアナライトとしてジゴキシゲニンを使用して、ストレプトアビジン/ビオチンより弱い相互作用の分析に対する、均一系のオンライン質量分析生化学的分析法の実効性を証明した。50 $\mu$ l/分の流量で輸送された10mmol/lの蟻酸アンモニウム/メタノール(90:10、v/v)からなる担体溶液に、10mmol/lの蟻酸アンモニウムに溶解された100nmol/lのfab抗ジゴキシゲニンの溶液を、50 $\mu$ l/分の流量で添加した。混合物を、内部容量が65 $\mu$ lの内径300mmのポリ(テトラフルオロエチレン)反応コイル中を輸送した。次に、10mmol/lの蟻酸アンモニウム/メタノール(90:10、v/v)に溶解した200nmol/lジゴキシゲニンの溶液を、流量100 $\mu$ l/分で加えた。次に混合物を、内部容量が33 $\mu$ lの内径300mmのポリ(テトラフルオロエチレン)反応コイル中を輸送し、次に電子噴霧イオン化(ESI)源を備えた質量スペクトル計中に導入した。質量スペクトル計は、 $[M+H]^+$ 及び1つ以上の強度フラグメントによるイオン陽性イオン(PI)モードで選択イオンモニタリング(SIM)において運転した。

30

【0056】

図3は、全反応結果を確認できる実験結果を示す。P1では、担体緩衝液のみが、質量分析計中にポンプで供給され、対象バックグラウンドシグナルを与える。P2では、ジゴキシゲニンポンプのスイッチが入れられ、 $m/z$ 408(ジゴキシゲニンのアンモニウム付加物)で選択イオンモニタリングMSシグナルが上昇した。P3では、fab抗ジゴキシゲニンポンプのスイッチが入れられた。親和性タンパク質であるfab抗ジゴキシゲニンを添加すると、遊離のジゴキシゲニンの濃度が低下し、選択イオンモニタリングMSシグナルが低下した。P4では、ジゴキシゲニンの注入が行われ、遊離のfab抗ジゴキシゲニンの結合部位が減少し、遊離のジゴキシゲニン濃度が上昇した。これは、 $m/z$ 408で選択イオンモニタリングMSシグナルのピークとして見ることができた。

40

【0057】

【図面の簡単な説明】

【図1】

50

図 1 は、実施例 1 で得られる結果を示す (  $m/z$  390 での MS シグナルの時間 ) 。

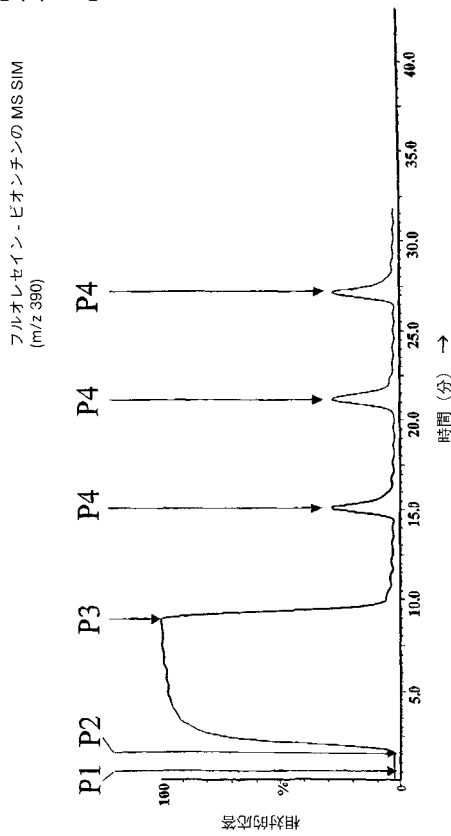
【 図 2 】

図 2 は、ビオチン化された検体について得られた結果を示す ( 実施例 1 ) 。

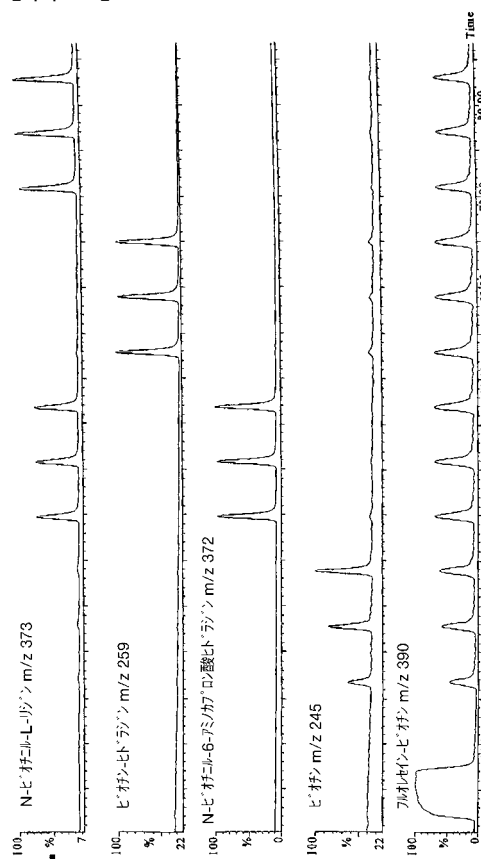
【 図 3 】

図 3 は、 $m/z$  408 での MS シグナルの選択イオンモニタリングを示す ( 実施例 2 ) 。

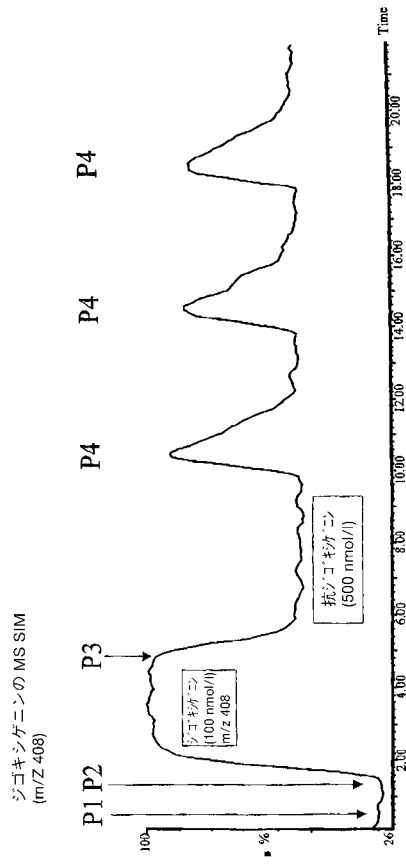
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



## 【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
10 May 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/37111 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/566
- (21) International Application Number: PCT/NL01/00794
- (22) International Filing Date: 30 October 2001 (30.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
00203776.0 30 October 2000 (30.10.2000) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): **VRJJE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM** [NL/NL], De Boelelaan 1105, NL-1081 HV Amsterdam (NL).
- (72) Inventor; and  
(75) Inventor/Applicant (for US only): **IRTH, Hubertus** [NL/NL]; Rooseveltlaan 112-II, NL-1078 NP Amsterdam (NL).
- (74) Agent: **PRINS, A. W.**, c/o Vereenigde, Nieuwe Parklaan 97, 2587 BN The Hague (NL).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/37111 A2

(54) Title: CONTINUOUS-FLOW HOMOGENEOUS BIOCHEMICAL ASSAYS BASED ON MASS SPECTROMETRIC DETECTION OF KNOWN LIGANDS

(57) Abstract: The present invention relates to the measurement of interactions, and especially biospecific interactions in an assay using mass spectrometry. More in particular, the present invention makes it possible to measure specific interactions in a homogeneous biochemical assay. The on-line detection method of the present invention comprises an effluent of a fractionation step with a controlled amount of affinity molecules, which affinity molecules bind with analytes suspected to be present in the effluent. This step is followed by the addition of a controlled amount of known ligands, which ligands bind to the affinity molecules, by which ligand/affinity molecule-complexes are formed. In accordance with the invention, the free ligands are detected in the presence of the ligand/affinity molecule-complexes, using a mass spectrometer.

WO 02/37111

PCT/NL01/00794

Continuous-flow homogeneous biochemical assays based on mass spectrometric detection of known ligands

The present invention relates to the measurement of interactions, and especially biospecific interactions in an assay using mass spectrometry. More in particular, the present invention makes it possible to measure specific interactions in a homogeneous biochemical assay. In a particular embodiment  
5 this detection technique is used as monitoring method for biochemical assays using a known ligand. Furthermore, this invention relates to the use of newly detected compounds as ligand for affinity molecules.

Biochemical assays are highly sensitive detection techniques for the measurement of biospecific interactions. The affinity of ligands to be tested for  
10 an affinity molecule, *e.g.* an affinity protein such as an antibody, receptor or enzyme is typically tested using a labeled ligand - *i.e.* a compound with known affinity for the affinity molecule such as a protein containing a detectable moiety such as a radiolabel, fluorophor or an enzyme - as reporter molecule.

Biochemical assays are carried out in batch - for example in a  
15 microtiterplate - or in continuous-flow. Typically, the affinity molecule is incubated with the sample and a suitable label, and after a certain incubation time, the amount of free or bound label is determined. If the detection properties of free and bound label are identical, both fractions have to be separated before detection. Several homogenous assay formats are known  
20 which exploit detection differences between free and bound label, *e.g.* a different fluorescence quantum yield. In such a case, one fraction can be detected in presence of the other avoiding time-consuming and laborious separation steps.

A disadvantage of biochemical assays based on the use of particular labels, is the necessity to find a suitable label for the affinity molecule, such as  
25 a protein, to be screened. The synthesis of labels that have sensitive detection properties on the one hand and retain their preferably high binding affinity on the other hand is a difficult task, particularly for receptors where the attachment of a fluorophor or an enzyme to a known ligand often significantly decreases the binding affinity of the label synthesized.

30 The synthesis of new labels can be avoided if detectors are used that do not require specific chemical or biochemical reporting molecules such as fluorophors or enzymes. A mass spectrometer (MS) is an example of a detector

WO 02/37111

PCT/NL01/00794

2

that can measure a compound at the required sensitivity in its native state, *viz.* the compound can be detected without requiring chemical modification. The use of mass spectrometry as a detection technique in biochemical assays therefore overcomes the need to synthesize new labels before the assay can be developed and used.

5 Seiffert *et al.* (J. Anal. Chem., **363** (1999) 767-770) propose an MS based screening method wherein active ligands are isolated from the sample using an immobilized receptor column. Subsequently, the bound fraction is desorbed and measured by liquid chromatography mass spectrometry. This method represents the direct detection of the active molecule using mass spectrometry. This is particularly disadvantageous for applications wherein novel, unknown ligands have to be detected, since the MS has to be operated in the rather unsensitive total ion current (TIC) mode. Moreover, the immobilization of receptors may lead to a partial or complete deactivation of the protein due to sterical hindrance. Also, the desorption conditions for the release of the bound active ligands are often leading to an irreversible denaturation of the receptor requiring a frequent exchange of the immobilised receptor column.

Nedved *et al.* (Analytical Chemistry, **68** (1996) 4226-4236) describe a similar technique wherein combinatorial libraries of small molecules are screened using an immobilized immunoaffinity column coupled to reversed-phase liquid chromatography and ion spray mass spectrometry. Again, active compounds are detected directly in the full scan mode. The use of an immobilized antibody column is identical to the above-described method of Seiffert *et al.* with all disadvantages of this assay format.

25 Hsieh *et al.* (Molecular Diversity, **2** (1996), 189-196) describe a multidimensional chromatographic screening method using mass spectrometry for detection. After incubation of the affinity protein with the compound(s) to be screened, the bound fraction is separated from the unbound fraction using size-exclusion chromatography. Subsequently, the protein-bound fraction is directed towards a reversed-phase liquid chromatography column coupled to mass spectrometry and the small molecules bound to the affinity protein are determined. In contrast to Seiffert *et al.* and Nedved *et al.*, Hsieh *et al.* describe a biochemical assay wherein the interaction of ligands and receptors takes

WO 02/37111

PCT/NL01/00794

3

place in solution, that is the receptor is not immobilized. However, after the primary incubation step, two chromatographic methods have to be applied before the active compound can be detected directly. Moreover, since the structure of the active compound is not known, the mass spectrometer has to be run in the nonselective TIC mode.

The not prepublished EP-A-1 048 951 (Irth and Van der Greef) describes the use of mass spectrometry as a detection technique for measuring biospecific interactions. Rather than using a label, a known ligand with good MS detection properties is used as a reporter molecule to detect the presence of active compounds in a sample. The method described comprises a sequential biochemical reaction, wherein the sample is incubated with an affinity protein, and subsequently a known ligand is added to titrate the remaining free binding sites. In a final step the free fraction of the known ligand is separated from the protein-bound fraction using a hollow-fibre separation module or a restricted access column. Only the free fraction is directed towards the mass spectrometer whereas the protein fraction is discarded. The method of EP-A-1 048 951, hence, is a heterogeneous assay format requiring the separation of the detectable molecule from the protein bound fraction.

The present invention seeks to provide a method that is easier to carry out than heterogeneous assays, which require the separation of free and protein-bound reporter molecules. More particularly, the present invention is aimed at a homogeneous biochemical assay using mass spectrometry as readout method. The assay does not require the separation of free and bound label as described by Irth and Van der Greef. The differences in the method of Irth and Van der Greef and the method of the present invention are shown in Scheme 1.

In accordance with the present invention, it was found that an on-line detection method wherein an effluent of a fractionation step is contacted with a controlled amount of affinity molecules; followed by a step wherein the affinity molecules are allowed to bind with analytes suspected to be present in the effluent; followed by addition of a controlled amount of known ligands; followed by a step wherein ligands are allowed to bind to the affinity molecules by which ligand/affinity molecule-complexes are formed; and followed by detection of free ligands in the presence of the ligand/affinity molecule-

WO 02/37111

PCT/NL01/00794

4

complexes using a mass spectrometer can overcome the aforementioned problems.

Surprisingly, the MS can be used to detect free ligands in the presence of the ligand/affinity protein-complexes, thus obviating the need for cumbersome separation steps. The present invention additionally overcomes a problem associated with separation steps, which problem lies in the non-specific binding of proteins to surfaces of separation devices such hollow-fiber modules or restricted access phases, which are required in prior art methods, such as the method of Irth and Van der Greef. Moreover, no regeneration of separation devices is required, which allows a continuous operation of assay systems. Furthermore, the time of assay development for new screening assays is significantly reduced since there is no need to study and optimize separation conditions.

The current invention is based on the on-line coupling of an fractionation step such as liquid chromatography to a biochemical reaction module. To the effluent of the fractionation step, a controlled amount of an affinity molecule, *e.g.* a protein such as a receptor, antibody or enzyme is added. After a short reaction time (maximum about 3 minutes) a controlled amount of a known ligand is added to the reaction mixture and allowed to interact for a short time, *viz.* 2-3 minutes. The entire reaction mixture is introduced into a mass spectrometer without prior separation of free and bound known ligand. The change of amount of known ligand as detected by the MS indicates the presence of an affinity-molecule binding compound in the effluent. In contrast to the heterogeneous assays described by Irth and Van der Greef, the amount of free known ligands is detected in the presence of the bound ligand-affinity protein complex. It is very surprising that free ligand is detected by MS independent from the amount of ligand bound in complexes with affinity molecules.

The method of the present invention makes it possible to detect the presence of an active compound in a mixture by monitoring the changes of the concentration of a known ligand at its specific mass to charge ratio. Moreover, the molecular mass of the active compound can be measured simultaneously by monitoring the total ion current chromatogram at the time where the peak maximum for the known ligand occurs (see scheme 2).

WO 02/37111

PCT/NL01/00794

5

A comparison of the MS data obtained when analytes are injected with the signal obtained when only the controlled amounts of affinity molecule and detectable ligand are introduced in the continuous-flow system, provides information in respect of the percentage of the binding sites occupied by  
5 analytes present in the effluent of the fractionation step. The person skilled in the art possesses the knowledge to process and evaluate the data obtained from the detection method. The percentage binding sites occupied by an  
10 analyte present in the effluent can be used to find new compounds which show an interaction with a known affinity molecule. This information provides the possibility to implement the on-line separation/affinity molecule detection  
15 process of the present invention in, *e.g.*, drug discovery.

A system of high-throughput screening to be used in drug discovery, for instance, consists of the following steps. Complex samples generated for instance by an upstream combinatorial chemistry system are prefractionated  
15 in fractions containing compounds of similar polarity using, *e.g.*, a solid-phase extraction technique or electrophoretic sample handling principles. Each fraction may additionally be separated using, *e.g.*, either analytical or preparative-scale liquid chromatographic separation columns. The compounds  
20 eluting from said LC column are on-line detected using a suitable affinity molecule detection technique. Where preparative-scale separation columns are applied, a post-column flow-split will be made. One of the two flow streams is subjected to detection using the affinity molecule detection technique; the  
25 other stream is directed to a fraction collector. Dependent on the signal obtained from the affinity molecule detector, fractions containing compounds causing a positive response will be collected while fractions causing a negative  
30 response will be discarded. This complete screening method can be automated using known valve-switching processes.

A suitable fractionation method to be used in the methods of the present invention comprises a liquid chromatography separation or a capillary  
30 electrophoresis step. Other separation or fractionation techniques which are known to the person skilled in the art and which allow a relatively continuous output stream can, however, be used as well.

In a preferred embodiment, the liquid chromatography separation step is a reversed phase HPLC step.

WO 02/37111

PCT/NL01/00794

6

It will be understood that according to the present invention as the effluent of a fractionation step is also to be understood the effluent of a flow injection, in which a mixture of different compounds is injected. The required selectivity can be obtained by operating the MS such, that selectively tracing  
5 of the MS is obtained.

Since the flow injection technique provides a flexible and fast screening method, it is a preferred embodiment of the present invention.

All modes of MS-operation are possible in Flow Injection mode, however, due to the higher background, especially the very selective modes  
10 which comprise detecting ions of a selected single m/z trace or of selected multiple m/z traces are suitable.

As already mentioned, the fractionation step can be a liquid chromatography separation, a capillary electrophoresis step or a combinatorial chemistry system. Preferred liquid chromatography fractionation steps  
15 comprise HPLC, reversed phase HPLC, capillary electrophoresis (CE), capillary electrochromatography (CEC), isoelectric focusing (IEF) or micellar electrokinetic chromatography (MEKC), all of which techniques are known to the person skilled in the art.

All possible variations in MS techniques known in the art can be profited from according to the present invention. preferably, the MS is of the type chosen from the group consisting of electrospray ionization type, atmospheric pressure ionization type, quadrupole type, magnetic sector type, time-off-flight type, MS/MS, MS<sup>n</sup>, FTMS type, ion trap type and combinations thereof.  
20

For example, in scanning mode to trace compounds, low resolution MS with all possible instrumental designs of MS can be used, in particular quadrupole, magnetic sector, time-off-flight, FTMS and ion-trap. This generates typically molecular weight data with nominal mass accuracy.  
25

When high resolution MS is applied, using all possible high resolution instrumental designs, in particular magnetic sector, time-off-flight, FTMS and ion trap, molecular weight data with high mass accuracy combined with the elemental composition of the compound can be obtained.  
30

Other known MS techniques comprise tandem MS, such as MS/MS or MS<sup>n</sup> (for example MS<sup>3</sup>). Application of these techniques enables the

WO 02/37111

PCT/NL01/00794

7

collection of structural information of the ligands which is a preferred embodiment of the present invention. The data in scanning mode can be acquired in data-dependent mode which means that for each peak observed automatically the tandem MS measurement is performed. In addition to this  
5 the fragmentation induced in the tandem MS measurement can be coupled by more sophisticated procedures, for example a broad band excitation, which also fragments expected fragments of less importance, such as the [protonated molecule-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> peak in natural product screening.

The MS can also be operated in single/multiple ion monitoring mode,  
10 which can be used for highly selective detection.

Single/multiple ion monitoring mode can be used for highly selective detection. Using low resolution MS in single/multiple ion monitoring mode with all possible low resolution instrumental designs, in particular quadrupole, magnetic sector, time-off-flight, FTMS and ion trap, selective  
15 detection based on monitoring of previously determined m/z trace can be obtained. When high resolution MS is applied all possible instrumental designs of MS can be used, especially quadrupole, magnetic sensor, time-off-flight, FTMS and ion-trap. This enables typically very selective detection based on monitoring in high resolution previously determined m/z trace. When  
20 tandem MS is applied, all possible instrumental designs, in particular ion trap, quadrupole-time-off-flight (Q-TOF), triple quadrupoles (QQQ), FTMS and combinations of sector instruments with quadrupoles and ion traps, can be used. This enables the very selective detection based on monitoring a resulting peak or peaks in MS/MS and/or MS<sup>n</sup> measurements.

25 It is also possible to operate the MS in scanning mode. In this way the lowering of the pre-determined signal is correlated to the increase of other signals, enabling the active compound to be characterized in the same cycle.

With the assays according to the present invention the tracing of  
30 (bio-) active compounds in solutions of complex nature, for instance biological fluids or extracts, natural product extracts, solutions or extracts from biotechnological processes, resulting from chemical experiments, such as combinatorial technologies and processes and the like can be performed with a higher efficiency, selectivity and flexibility. Moreover, the present invention provides the possibility to limit the disturbance of background compounds.

WO 02/37111

PCT/NL01/00794

8

The present invention further enables the identification of compounds based on conventional mass spectra, high resolution data or MS<sup>n</sup> based spectra.

5 With the method of the present invention it is also possible to perform library searching, based on a variety of mass spectrometric experiments enabling the screening of large series of samples and classifying these in classes based on similar active compounds, without the need for full identification of the compounds.

10 The assay method of the present invention can be applied in miniaturized formats of assay-based systems, for instance with chip technology based screening systems.

In the methods of the present invention all molecules capable of interaction with or binding to other molecules can be used as affinity molecule. The affinity molecule can for example be selected from the group of cytosolic receptors, *e.g.*, the estrogen, glucocorticoid receptors; solubilized membrane bound receptor, *e.g.*, a  $\beta$ -receptor; affinity proteins, such as antibodies, enzymes, avidin; polynucleotides and polysaccharides.

15 By a "controlled amount of affinity molecule" that is added to the effluent is to be understood an amount of known concentration and of known flow rate.

20 The term "known ligand" as used in the present description and claims refers to a ligand which is capable of interacting or reacting with the above-defined affinity molecule, and which can be detected by the MS. An example of a detectable ligand is a previously found analyte capable of being bound by the affinity molecule.

25 The present invention has the great advantage that the preparation of any label is not required. This is particularly advantageous for those affinity molecules where labeling of a known ligand leads to a dramatic loss of affinity, for example due to steric hindering. Assays using known, natural, ligands without labels as reporter molecules are much faster to develop.

30 On-line coupling as used in the methods of the present invention requires fast reaction times in order to minimize extra-column band broadening. This means that affinity molecule-ligand interactions having reaction times in the order of minutes rather than hours should be considered.

WO 02/37111

PCT/NL01/00794

9

The suitable binding conditions under which the affinity molecules bind to the analyte comprise a contact time, which is in the same order of magnitude. Suitable binding conditions are conditions that provide optimal binding between the affinity molecules and the analyte. It will be understood that the precise conditions, such as temperature, residence time, chemical composition, will depend strongly on the type of assay and the proteins used therein. In contrast to biochemical assays based on fluorescent, radioactive or enzyme labels, where background buffer solutions are mainly composed of involatile phosphate or tris buffers the homogeneous mass spectrometric biochemical assays presented here are performed using volatile buffers such as ammonium formate or ammonium acetate at neutral pH. Moreover, to improve the ionization characteristics of the known ligand, small amounts of methanol (2.5-10%) are added to the background buffer.

In another preferred embodiment, combinations of affinity proteins and known ligands can be used to screen several biomolecular targets at the same time (see scheme 3). For this purpose, a mixture of affinity proteins is prepared and added to the effluent of the fractionation method. Subsequently a mixture of known ligands, containing at least one active known ligand per affinity protein, is added. The reaction mixtures is directed towards the MS. In the MS each active known ligand is monitored by selected ion monitoring (SIM). The presence of an active compound in the fractionation effluent leads to a change of signal of the corresponding known ligand trace in the mass spectrometer. According to this preferred embodiment of the method of the invention, the affinity molecules are thus present in a mixture of two or more different types of affinity molecules and the known ligands are present in a mixture of different ligands, while each of this ligands is known to bind to one of said affinity molecules.

In another preferred embodiment, the on-line biochemical assay is coupled to a multiple-inlet unit for the mass spectrometer (see scheme 4). The multiple-inlet unit allows the connection of one mass spectrometer to multiple (e.g. eight) different fractionation lines. In each line an individual known ligand assay is carried out. This methodology is particularly useful for the screening of similar affinity proteins. It allows a multitude of assays to be performed simultaneously without affecting each other (for example by active

WO 02/37111

PCT/NL01/00794

10

compounds which react with several affinity proteins). In this way on-line biochemical assays can be performed in parallel using a single mass spectrometer as detector.

5           **Brief description of the drawings**

Scheme 1 is a schematic representation of the on-line assay according to the invention, compared with the method of Irth and Van der Greef (EP-A-1 048 951).

10           Scheme 2 shows a typical chromatogram obtained with the method of the invention. The upper chromatogram (MS signal vs. retention time) is obtained by screening the effluent in selected ion monitoring mode (SIM), *viz.* the MS only screens for a value of  $m/z$  which is typical for the known ligand, L. The chromatogram indicates an increase in free ligand concentration, [L], at a certain retention time, which is indicative for the presence of a compound  
15 (analyte) that binds to the affinity molecule. This peak is also measured in total ion current mode (middle diagram of Scheme 2). The full mass spectrum at the retention time corresponding to the peak in [L] is given in the lower diagram of Scheme 2. From this spectrum structural information on the analyte can be obtained.

20           Scheme 3 shows a preferred embodiment of the invention, wherein combinations of affinity proteins and known ligands are used to screen several biomolecular targets at the same time.

Scheme 4 shows a preferred embodiment which uses a multiple-inlet unit for the mass spectrometer.

25           Figure 1 shows the results obtained with Example 1; the MS signal in time at  $m/z$  390.

Figure 2 shows the results obtained for biotinylated analytes (Experiment 1).

30           Figure 3 shows the selected-ion monitoring MS signal at  $m/z$  408 (Experiment 2).

**Example 1**

The feasibility of a homogeneous, on-line mass spectrometric biochemical assay was demonstrated using streptavidin as affinity protein,

WO 02/37111

PCT/NL01/00794

11

fluorescein-biotin as reporter molecules and biotinylated compounds as analytes. Streptavidin is a well-known affinity protein with a high affinity for biotin and biotinylated compounds. To a carrier solution consisting of 10 mmol/L ammonium formate/methanol (90:10, v/v) pumped at a flow rate of 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  a solution of 32 nmol/l streptavidin dissolved in 10 mmol/L ammonium formate was added at a flow rate of 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ . The mixture was pumped through a knitted 300 mm i.d. poly(tetrafluoroethylene) reaction coil with an internal volume of 17  $\mu\text{l}$ . Subsequently, a solution of 96 nmol/l fluorescein-biotin dissolved in 10 mmol/L ammonium formate/methanol (90:10, v/v) was added at a flow rate of 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ . The mixture was then pumped through a knitted 300 mm i.d. poly(tetrafluoroethylene) reaction coil with an internal volume of 33  $\mu\text{l}$  and subsequently introduced into a mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) source. Mass spectrometry was operated in selected-ion monitoring (SIM) in the positive-ion (PI) mode on  $[\text{M}+\text{H}]^+$  and on one or more intense fragment ions. The ESI source conditions for the streptavidin/biotin system: source temperature, 80°C; capillary voltage, 3.2 kV. The sampling cone voltage was 30 and 60 V for biotin and fluorescein-labeled biotin, respectively.

Figure 1 demonstrates an experiment, wherein the entire reaction sequence can be followed. At point 1, only carrier buffer was pumped into the mass spectrometer providing a reference background signal. At point 2, the fluorescein-biotin pump was switched on leading to an increase of the selected-ion monitoring MS signal at  $m/z$  390. At point 3, the streptavidin pump was switched on. The addition of the affinity protein streptavidin lead to a decrease of the concentration of free fluorescein-biotin, resulting in a decrease of selected-ion monitoring MS signal. At point 4, injections of biotin were performed, resulting in a decrease of free streptavidin binding sites and an increase of the free fluorescein-biotin concentration, which can be seen as a peak in selected-ion monitoring MS signal at  $m/z$  390.

Figure 2 demonstrates the screening method was selective for biotinylated analytes. Injections of equal concentrations of biotin ( $m/z$  245), N-biotinyl-6-aminocaprioc hydrazide ( $m/z$  372), biotin-hydrazide ( $m/z$  259), and N-biotin-L-lysine ( $m/z$  373) lead to almost equal signals at the fluorescein-biotin ( $m/z$  390) trace, indicating that all compounds are capable to prevent the

WO 02/37111

PCT/NL01/00794

12

binding of the reporter molecule, fluorescein-biotin, to streptavidin. Furthermore, the molecular mass of the active compounds could be identified for those compounds which are ionized under the selected conditions.

5           **Example 2**

The feasibility of a homogeneous, on-line mass spectrometric biochemical assay for the measurement of weaker interactions than streptavidin/biotin was demonstrated using fab fragments of anti-digoxigenin antibodies (fab anti-digoxigenin) as affinity protein, digoxigenin as reporter molecules and digoxin as analytes. To a carrier solution consisting of 10 mmol/L ammonium formate/methanol (90:10, v/v) pumped at a flow rate of 50  $\mu$ l/min a solution of 100 nmol/l fab anti-digoxigenin dissolved in 10 mmol/L ammonium formate was added at a flow rate of 50  $\mu$ l/min. The mixture was pumped through a knitted 300  $\mu$ m i.d. poly(tetrafluoroethylene) reaction coil with an internal volume of 65  $\mu$ l. Subsequently, a solution of 200 nmol/l digoxigenin dissolved in 10 mmol/L ammonium formate/methanol (90:10, v/v) is added at a flow rate of 100  $\mu$ l/min. The mixture was then pumped through a knitted 300  $\mu$ m i.d. poly(tetrafluoroethylene) reaction coil with an internal volume of 33  $\mu$ l and subsequently introduced into a mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) source. Mass spectrometry was operated in selected-ion monitoring (SIM) in the positive-ion (PI) mode on  $[M+H]^+$  and on one or more intense fragment ions.

Figure 3 demonstrates an experiment, where the entire reaction sequence can be followed. At point 1, only carrier buffer was pumped into the mass spectrometer providing a reference background signal. At point 2, the digoxigenin pump was switched on leading to an increase of the selected-ion monitoring MS signal at m/z 408 (the ammonium adduct of digoxigenin). At point 3, the fab anti-digoxigenin pump was switched on. The addition of the affinity protein fab anti-digoxigenin lead to a decrease of the concentration of free digoxigenin, resulting in a decrease of selected-ion monitoring MS signal. At point 4, injections of digoxin were performed, resulting in a decrease of free fab anti-digoxigenin binding sites and an increase of the free digoxigenin concentration, which can be seen as a peak in selected-ion monitoring MS signal at m/z 408.

WO 02/37111

PCT/NL01/00794

13

Claims

1. On-line detection method comprising the steps of: contacting an effluent of a fractionation step with a controlled amount of affinity molecules; allowing the affinity molecules to bind with analytes suspected to be present in the effluent; addition of a controlled amount of known ligands; allowing  
5 ligands to bind to the affinity molecules by which ligand/affinity molecule-complexes are formed; and detection of free ligands in the presence of the ligand/affinity molecule-complexes using a mass spectrometer.
2. Method according to claim 1, wherein said fractionation step is a liquid chromatography separation, a capillary electrophoresis step or a combinatorial  
10 chemistry system.
3. Method according to claim 2, wherein the liquid chromatography separation step is an HPLC, a reversed phase HPLC, a CE, a CEC, an IEF or an MEKC step.
4. Method according to any one of the preceding claims, using a mass  
15 spectrometer selected from the group consisting of electrospray ionization type, atmospheric pressure ionization type, quadrupole type, magnetic sector type, time-of-flight type, MS/MS, MS<sup>n</sup>, FTMS type, ion trap type and combinations thereof.
5. Method according to any of the previous claims, wherein said affinity  
20 molecules are present in a mixture of two or more different types of affinity molecules and said known ligands are present in a mixture of different ligands, each of which ligand is known to bind to one of said affinity molecules.
6. On-line detection method, wherein a mass spectrometer with a multiple-inlet unit is used, to which multiple-inlet unit different fractionation  
25 lines are connected, wherein each fractionation line comprises an effluent to

WO 02/37111

PCT/NL01/00794

14

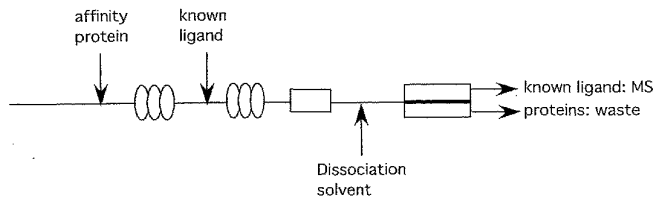
which controlled amounts of affinity molecules and known ligands are added as described in each of the previous claims.

7. Compound detected by the method of any one of the preceding claims.
8. Use of the compound of claim 7 as a ligand for affinity molecules.

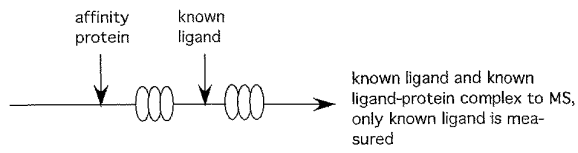
Scheme 1

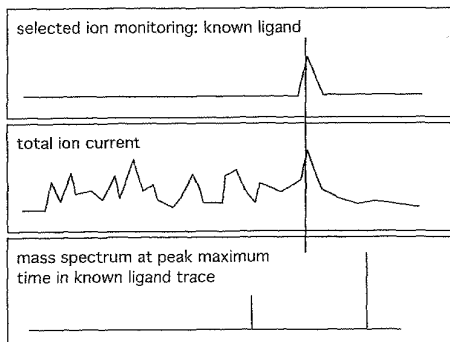
Difference between Irth/van der Greef and new invention

Irth/Van der Greef

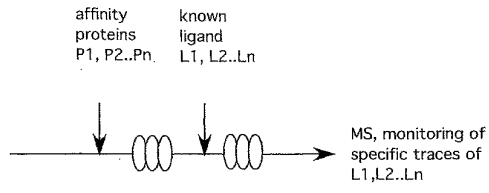


New invention

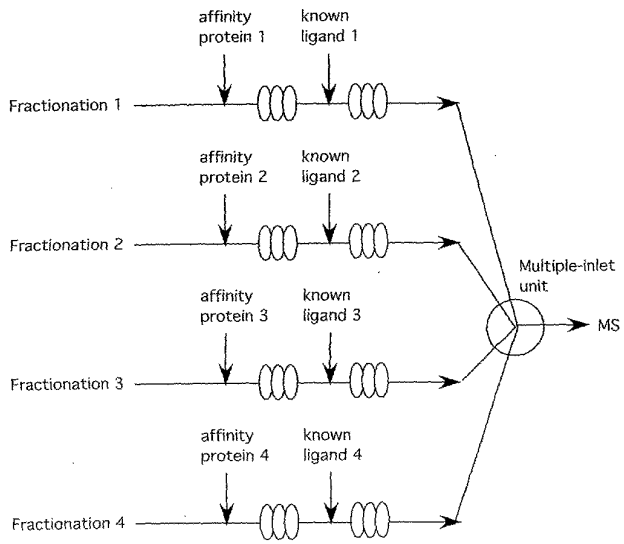




scheme 2



scheme 3



scheme 4

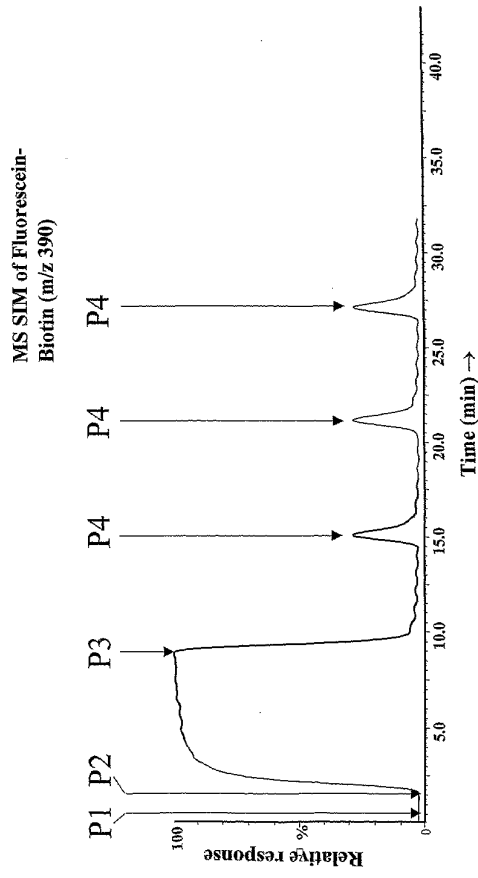
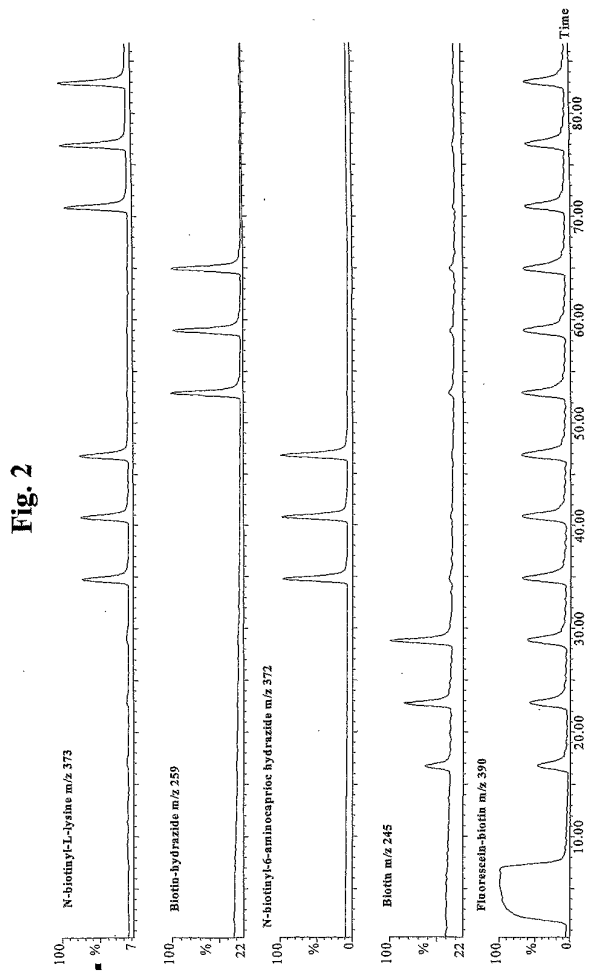


figure 1

WO 02/37111

6/7

PCT/NL01/00794



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/37111

PCT/NL01/00794

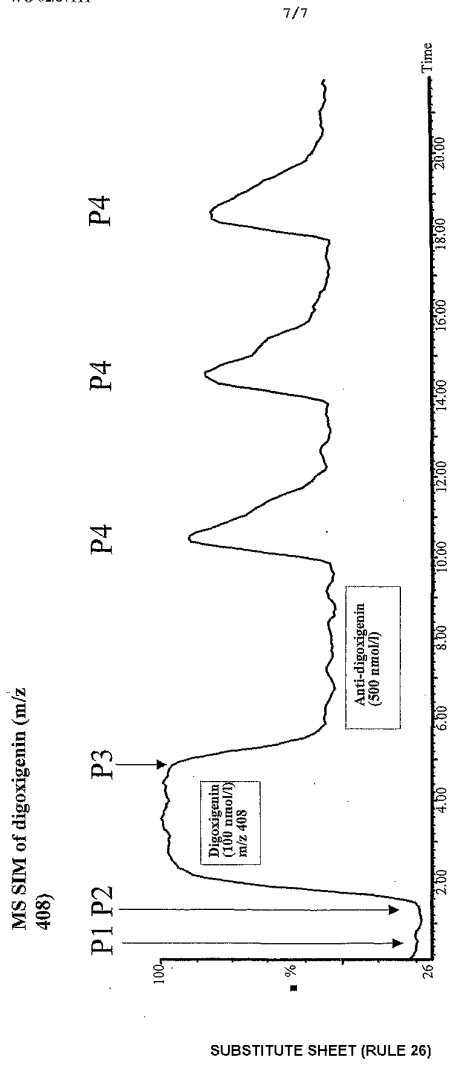


figure 3

## 【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
10 May 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/037111 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/50, 33/566
- (21) International Application Number: PCT/NL01/00794
- (22) International Filing Date: 30 October 2001 (30.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 00203776.0 30 October 2000 (30.10.2000) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): **VRJE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM** [NL/NL]; De Boelelaan 1105, NL-1081 HV Amsterdam (NL).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): **IRTH, Hubertus** [NL/NL]; Rooseveltlaan 112-II, NL-1078 NP Amsterdam (NL).
- (74) Agent: **PRINS, A. W.**, o/o Verenigde, Nieuwe Parklaan 97, 2587 BN The Hague (NL).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published: with international search report before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 8 August 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/037111 A3

(54) Title: CONTINUOUS-FLOW HOMOGENEOUS BIOCHEMICAL ASSAYS BASED ON MASS SPECTROMETRIC DETECTION OF KNOWN LIGANDS

(57) Abstract: The present invention relates to the measurement of interactions, and especially biospecific interactions in an assay using mass spectrometry. More in particular, the present invention makes it possible to measure specific interactions in a homogeneous biochemical assay. The on-line detection method of the present invention comprises an effluent of a fractionation step with a controlled amount of affinity molecules, which affinity molecules bind with analytes suspected to be present in the effluent. This step is followed by the addition of a controlled amount of known ligands, which ligands bind to the affinity molecules, by which ligand/affinity molecule-complexes are formed. In accordance with the invention, the free ligands are detected in the presence of the ligand/affinity molecule-complexes, using a mass spectrometer.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/NL 01/00794
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/50 G01N33/566		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LUTZ E S M ET AL: "Applying hollow fibres for separating free and bound label in continuous-flow immunochemical detection" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A,NL,ELSEVIER SCIENCE, vol. 755, no. 2, 6 December 1996 (1996-12-06), pages 179-187, XP004014703 ISSN: 0021-9673 abstract; figure 2 --- -/-	1-6
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*I* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 3 May 2002	Date of mailing of the international search report 31/05/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 21 651 epo.nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Goetz, M	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/NL 01/00794

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OOSTERKAMP A J ET AL: "Gradient reversed-phase liquid chromatography coupled on-line to receptor-affinity detection based on the urokinase receptor" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL SCIENCES & APPLICATIONS,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, vol. 715, no. 1, 11 September 1998 (1998-09-11), pages 331-338, XP004147005 ISSN: 0378-4347 abstract page 334, left-hand column, paragraph 3; figure 1 ---	1-6
A	KAUR S ET AL: "Affinity selection and mass spectrometry-based strategies to identify lead compounds in combinatorial libraries" JOURNAL OF PROTEIN CHEMISTRY,XX,XX, vol. 16, no. 5, July 1997 (1997-07), pages 505-511, XP002117171 ISSN: 0277-8033 abstract page 506, left-hand column, paragraph 3 -page 506, right-hand column, paragraph 2; figure 1 ---	1-6
A	WO 98 56028 A (ARQUE INC ;KYRANOS JAMES N (US); LI YU TYSR (US)) 10 December 1998 (1998-12-10) the whole document ---	1-6
A	MARTIN SEIFERT ET AL: "a new concept for the bioeffects-related analysis of xenoestrogens: hyphenation of receptor assays with LC-MS" FRESENIUS JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY,DE,SPRINGER, BERLIN, vol. 363, 11 April 1999 (1999-04-11), pages 767-770, XP002126676 ISSN: 0937-0633 abstract page 769, right-hand column, paragraph 2 -page 770, left-hand column, paragraph 2; figure 6 ---	1-6
X	US 5 807 879 A (ROSEBROUGH SCOTT F) 15 September 1998 (1998-09-15) column 1, line 15-27 ---	7,8
X	US 5 859 259 A (SINHA NANDA D ET AL) 12 January 1999 (1999-01-12) column 3, line 15-57; figure 1 ---	7,8
	-/-	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/NL 01/00794

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 3 804 825 A (LOESEL W ET AL) 16 April 1974 (1974-04-16) examples 1-15 ---	7,8
X	US 5 948 799 A (CROPP ANNE BARBARA) 7 September 1999 (1999-09-07) column 3, line 34-44 column 4, line 5-14; claims 6-8 -----	7,8

Form PCTISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			International Application No. PCT/NL 01/00794	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9856028	A	10-12-1998	AU 7713198 A	21-12-1998
			EP 0990255 A1	05-04-2000
			WO 9856028 A1	10-12-1998
US 5807879	A	15-09-1998	US 5326778 A	05-07-1994
			AT 160700 T	15-12-1997
			AU 672968 B2	24-10-1996
			AU 3737293 A	05-10-1993
			CA 2131382 A1	16-09-1993
			DE 69315565 D1	15-01-1998
			DE 69315565 T2	02-07-1998
			EP 0627939 A1	14-12-1994
			JP 7504661 T	25-05-1995
			WO 9317714 A1	16-09-1993
			US 5859259	A
WO 9529921 A1	09-11-1995			
US 3804825	A	16-04-1974	DE 2101595 A1	27-07-1972
			AT 317444 B	26-08-1974
			AU 465777 B	09-10-1975
			AU 3786872 A	19-07-1973
			BE 778014 A1	13-07-1972
			BG 18190 A3	02-09-1974
			BG 18877 A3	20-03-1975
			CA 962665 A1	11-02-1975
			CH 571025 A5	31-12-1975
			CH 575435 A5	14-05-1976
			CS 178403 B2	15-09-1977
			DK 126938 B	03-09-1973
			ES 398804 A1	16-08-1974
			ES 401836 A1	16-03-1975
			FI 51359 B	31-08-1976
			FR 2121851 A5	25-08-1972
			GB 1371937 A	30-10-1974
			HU 162743 B	28-04-1973
			IE 36060 B1	04-08-1976
			IL 38550 A	29-11-1974
			NL 7200446 A	18-07-1972
			PH 10692 A	10-08-1977
			RO 62477 A1	15-03-1978
RO 68217 A1	26-02-1982			
SE 379048 B	22-09-1975			
SU 511015 A3	15-04-1976			
US 3932626 A	13-01-1976			
ZA 7200241 A	26-09-1973			
US 5948799	A	07-09-1999	AU 713842 B2	09-12-1999
			AU 1630797 A	18-09-1997
			CA 2199888 A1	15-09-1997
			EP 0795327 A1	17-09-1997
			HU 9700588 A2	28-05-1999
			JP 2918512 B2	12-07-1999
			JP 10007566 A	13-01-1998
NZ 314411 A	23-06-2000			
ZA 9702228 A	14-09-1998			

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
	G 0 1 N 27/62	X
	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/566	
	G 0 1 N 27/26	3 1 5 K
	G 0 1 N 27/26	3 3 1 E

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

专利名称(译)	基于已知配体质谱检测的连续流动方法的均相生化分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004513345A</a>	公开(公告)日	2004-04-30
申请号	JP2002539814	申请日	2001-10-30
[标]申请(专利权)人(译)	起亚盘BV		
申请(专利权)人(译)	Kiadisu蜜蜂.浮标.		
[标]发明人	イルスフベルトウス		
发明人	イルス、フベルトウス		
IPC分类号	G01N27/62 G01N27/447 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/538 G01N33/566		
CPC分类号	G01N33/538		
FI分类号	G01N27/62.V G01N27/62.F G01N27/62.H G01N27/62.K G01N27/62.L G01N27/62.X G01N33/53.D G01N33/566 G01N27/26.315.K G01N27/26.331.E		
代理人(译)	池田幸		
优先权	2000203776 2000-10-30 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及使用相互作用，特别是质谱法的测定中的生物特异性相互作用。更具体地，本发明使得可以测量均相生化测定中的特定相互作用。本发明的在线检测方法包括一定量的亲和分子以及分馏过程的流出物，该亲和分子与假定存在于流出物中的测试物质结合。该步骤之后是添加一定量已知配体的步骤，该配体与亲和分子结合，这导致配体/亲和分子复合物的形成。在本发明中，使用质谱仪在配体/亲和分子复合物存在下检测游离配体。

		(43) 公表日 平成16年4月30日 (2004.04.30)
(51) Int. Cl. 7	F I	テーマコード (参考)
<b>G01N 27/62</b>	G01N 27/62	V
<b>G01N 27/447</b>	G01N 27/62	F
<b>G01N 33/53</b>	G01N 27/62	H
<b>G01N 33/566</b>	G01N 27/62	K
	G01N 27/62	L
	審査請求 未請求	予備審査請求 有 (全 42 頁) 最終頁
(21) 出願番号	特願2002-539814 (P2002-539814)	(71) 出願人
(86) (22) 出願日	平成13年10月30日 (2001.10.30)	キアディス ビー. ブイ.
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月30日 (2003.4.30)	オランダ国、ライデン、ニールス ヨ
(86) 国際出願番号	PCT/NL2001/000794	ベエト 11-13
(87) 国際公開番号	W02002/037111	(74) 代理人
(87) 国際公開日	平成14年5月10日 (2002.5.10)	弁理士 浅村 皓
(31) 優先権主張番号	00203776.0	(74) 代理人
(32) 優先日	平成12年10月30日 (2000.10.30)	弁理士 浅村 肇
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人
		弁理士 長沼 暉夫
		(74) 代理人
		弁理士 池田 幸弘
		(72) 発明者
		イルス、フベルトウス
		オランダ国 アムステルダム、ルー
		ルトラーン 112 - ザ セカ
		最終頁に付