

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2000-2078**
(22) Přihlášeno: **11.12.1998**
(30) Právo přednosti: **12.12.1997 US 1997/990168**
(40) Zveřejněno: **13.09.2000**
(Věstník č. 9/2000)
(47) Uděleno: **29.09.2008**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **05.11.2008**
(Věstník č. 45/2008)
(86) PCT číslo: **PCT/US1998/026465**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1999/030154**

(11) Číslo dokumentu:

299 740

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
EP 63810; WO 9716569; WO 9402515.

(73) Majitel patentu:
ABBOTT LABORATORIES, Abbott Park, IL, US

(72) Původce:
Beutel Bruce A., Libertyville, IL, US
Schurdak Mark E., Antioch, IL, US
Voorbach Martin J., Vernon Hills, IL, US
Burns David J., Round Lake Park, IL, US
Joseph Mary K., Libertyville, IL, US

(74) Zástupce:
Ing. Ivana Jirotková, Nad Štolou 12, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:
**Kontinuální systém vysoce výkonného
screeningu s použitím planárních matic**

(57) Anotace:
Způsob současného testování množství vzorků různých látek
na jejich způsobilost zesilovat nebo inhibovat biologický
proces, zahrnuje

- (g) uložení malého objemu každého z více než 96 vzorků
rozdílných látek v uspořádání na matici tak, že každá
jednotlivá látka je soustředěna na své vlastní odlišné místo a
identita každé látky může být určena z jejího místa uložení,
(h) uvedení této matrice do styku s první porézní maticí
obsahující nebo nesoucí rovnoměrně rozptýlené zkušební
čínidlo a umožnění, aby část z každé látky difundovala do
uvedené porézní matrice takovým způsobem, že prostorové
umístění každé difundované látky může být korelováno s
místem na uvedené matici, na kterém byla uvedená látka
původně uložena, a
(i) provedení testu pro stanovení způsobilosti každé
difundované látky zesilovat nebo inhibovat uvedený
biologický proces pozorováním interakce každé látky s
uvedeným zkušebním činidlem,

kde uvedenou maticí je planární matrice.

CZ 299740 B6

Kontinuální systém vysoce výkonného screeningu s použitím planárních matic

Oblast techniky

5

Kontinuální systém vysoce výkonného screeningu (CF-HTS), používající nejméně jednu porézní matici, ve farmaceutickém průmyslu umožňuje, aby se prozkoumávalo velké množství chemických jedinců na široký rozsah biologické nebo biochemické účinnosti současně. CF-HTS je mimo to užitečný při provádění vícestupňových analytických testů (esejů).

10

Dosavadní stav techniky

15

Biochemické a biologické analytické eseje jsou určeny k testování aktivity v širokém rozpětí systémů v rozmezí od protein-protein interakcí, enzymové katalýzy, vazeb malých molekul na proteiny až do buněčných funkcí. Při „vysoce výkonném screeningu“ (HTS) se tyto druhy analytických esejů používají k testování velkého množství chemických jedinců, aby se odhalily dříve neznámé biologické nebo biochemické účinnosti chemických entit.

20

Homogenní versus heterogenní eseje

25

Všechny různé druhy biologických esejů mohou být rozděleny do dvou větších tříd: homogenních a heterogenních esejů. Při homogenních esejích jsou všechny reagenty přidávány společně a výsledky ze změří nebo interpretují bez jakékoliv dodatečné manipulace. Například buňky pěstované na Petriho misce mohou být vystaveny chemikálii. Jestliže je chemikálie pro buňky toxická, bude při prostém pozorování indikovat toxicitu vyjasňující se zóna. V jiném příkladě se mohou použít buňky, jež exprimují protein, který mění barvu buněk. V případě buněk exprimujících β -galaktosidázu, rostoucích na agaru obsahujícím x-gal, se buňky více nebo méně zabarvují modře v závislosti na tom, kolik β -gal proteinu je exprimováno. Takto se může provést homogenní esej pro jakýkoliv biologický krok, který ovlivňuje expresi reporter genu tak, jako je gen β -galaktosidázy. Ještě jiný příklad homogenního eseye používá substrát, který mění barvu nebo fluorescenci, když se zpracuje enzymem. Konečně technologie jako Amershamovy „Scintillation Proximity Assays“ (SPA) měří přímo vazbu radiačně značkováního ligandu na protein nebo jakékoliv ligandové substance fixované na perle obsahující zářič. Všechny z předcházejících příkladů jsou homogenními esejí, protože nevyžadují jiné kroky než přidání reagentů před konečnou detekcí, měřením nebo záznamem signálu.

40

Na druhé straně heterogenní eseje vyžadují nejméně dva kroky, které nemohou být spojeny do kroku jednoho, protože jsou do určitého stupně inherentně nekompatibilní. Mnohé heterogenní eseje vyžadují na příklad přidávání reagentů podle určitého pořádku (např. když by některé reagenty interferovaly s dřívějšími kroky eseye a jsou však požadovány pro splnění kroků pozdějších). Obecné příklady tohoto druhu zahrnují eseje, při kterých se přidávají reagenty signalizující průběh, aby nepřímě poskytovaly údaj o přítomnosti nebo koncentraci reakčního produktu. Jiný obecný krok při heterogenních esejích je vypírání stupeň. Často musí být v počátcích eseye přidáván nadbytek činidel pro esej a ten je nezbytné před následujícími kroky vymýt, aby reakce mohly probíhat bez vysokého signálu pozadí. Na příklad u eseye vazby s radiačním ligandem je značkováný ligand nejprve inkubován s proteinem, který je vázán na pevný povrch, avšak ve skutečnosti se pouze malá frakce ligandu váže na omezený počet vazebných míst proteinu. Po inkubaci se musí vymýt přebytek nesvázaného ligandu předem, aby mohlo být provedeno přesné stanovení vázaného radioaktivního ligandu. Vymytí lze dosáhnout různými alternativními metodami, včetně filtrace, opakovaného promývání a dekantace, oddělování precipitátů a fáze a/nebo centrifugace.

50

Mnohé biologické a biochemické procesy mohou být zkoumány pouze heterogenními metodami. Dále, navzdory existenci cest pro adaptaci jiných biologických a biochemických procesů na

55

homogenní metody, tyto jiné procesy pracují při heterogenních metodách s efektivnějšími náklady a/nebo se snadněji dostupnými reagenty. Komerčně jsou dostupné různé metody a soup-
 5 ravy pro homogenní techniky jako SPA (Amersham), fluorescenční polarizace (Jolley a jiní) a časově rozkládaná fluorescence (Packard a jiní), aby byly vyjmenovány jen některé. Užití těchto druhů metod vždy vyvolává dodatečné náklady a spotřebu času. Heterogenní metody se pro mno-
 ho esejů více osvědčují a jsou snadnější pro rychlé zavedení. Z tohoto důvodu pokračuje rozšiřo-
 vání heterogenních metod jako je ELISA, vazba na filtrech, RIA, buněčné eseje s luciferázou atd.
 Některé z těchto metod budou detailněji popsány níže.

10 Vysoce výkonný screening (HTS)

Pro vyhledávání kandidátů na léčiva se farmaceutický průmysl po léta stále více spoléhal na HTS souborů chemických sloučenin. HTS popisuje metodu, kdy se mnohé jednotlivé sloučeniny testu-
 15 jí paralelně tak, že se velký počet testovaných sloučenin prozkoumává na biologickou aktivitu simultánně nebo skoro simultánně. Nejrozšířeněji používané techniky běžně využívají mikro-
 titrační desky s 96 jamkami. V této úpravě se provádí 96 nezávislých testů současně na jednotlivé
 8 cm x 12 cm plastové desce, která obsahuje 96 jamek pro reakci. Typicky vyžadují tyto jamky
 objemy eseje v rozsahu 50 až 500 µl. Vedle desek jsou komerčně dostupné mnohé nástroje, mate-
 riály, pipetovače, automatické techniky, myčky desek a odečítače desek vhodné pro 96 jamkovou
 20 úpravu pro širokou řadu homogenních a heterogenních esejů.

Až dosud byly snahy zlepšovat HTS soustředěny na zmenšování jamek (miniaturizace). Když je
 zmenšována velikost jamek, může se zvyšovat počet jamek na každé desce pro uskutečnění více
 paralelních testů. Dále se snižováním objemů eseje se snižují náklady na reagenty pro testování.
 25 Kromě toho, protože je možné paralelně provádět testy s menšími objemy eseje, je také možné
 současně testovat více sloučenin pro vyhledávání kandidátů na léčiva. Až dosud miniaturizace
 výrazně zlepšila 96-ti jamkovou technologii poskytnutím úpravy s 384 jamkami (96 x 4). Viz
 Comley a spol., J. Biomol. Screening, sv. 2(3), str. 171-78 (1997). Ve skutečnosti byly publiko-
 vány i úpravy s vyšší hustotou, včetně úpravy s 9 600 jamkami. Miniaturizace má však neodmys-
 30 litelné náklady a komplikace.

Tyto náklady a komplikace se přímo vztahují na tři primární součásti miniaturizace screeningové
 úpravy. Za prvé se musí zvládnout udělání menších nádobek pro testování (trubičky, jamky, důl-
 ky, atd.). Za druhé se musí zvládnout přesné rozdělování všech pro esej potřebných reagentů do
 35 více a menších jamek (zpravidla prováděné pomocí automatických zařízení pro kapaliny, která
 simultánně rozděluje reagenty do mnoha jamek). Za třetí se musí zvládnout „přečtení“ výsledků
 testů u souboru s vysokou hustotou.

Za daných požadavků na souběžně prováděné nezávislé eseje, každá složka určuje úkoly
 40 a omezení nakolik je miniaturizace vhodná nebo efektivní z hlediska nákladů. Na příklad novější
 zmenšení úprava může vyžadovat úplně odlišnou metodu rozdělování reagentů, nebo vyžaduje
 čtecí instrument, který má rozlišení, citlivost a technické provedení, které jsou s novější zmen-
 šenou úpravou kompatibilní. Když se zredukuje velikost každé jamky, stává se způsobilost
 vyrobit řadu nádobek, rozdělit reagenty po malých kvantech a přečíst každý vzorek testu, také
 45 nesnadnější, časově náročnou a nákladnou. Menší velikost vzorku dále také zvyšuje statistické
 kolísání od vzorku ke vzorku kvůli nepřesnostem tkvícím v rozdělování malých objemů reagentů
 a v zaznamenávání slabších signálů vzorku. Kromě toho jakmile velikost vzorku klesne za určitý
 bod, přispějí k větším nákladům a složitosti realizace novější, miniaturizované úpravy i faktory
 jako je odpařování a povrchové napětí. Pro zásadní pokrok v HTS technologii si průmysl
 50 toužebně přeje možnost „esejů s volnou úpravou“ nebo esejů, u nichž nejsou fyzikální bariéry
 mezi vzorky. Ve skutečnosti nikdo nepopsal použití volné úpravy při HTS se standardními
 kolekcemi oddělených sloučenin předpovídané typicky jako testování malých kapiček v úpravě
 postrádající jakékoliv jamky.

Kombinatorní screeningové soubory – metody gelové permeace

S nástupem kombinatorní chemie mohou být na pevných podkladech (obvykle perličkách) produkovány miliony chemických entit. Přestože 96-ti jamková úprava byla použita k prozkoumávání souborů na bázi perliček, je tato úprava obecně považována jako neefektivní, protože (1) každá perle nese pouze malá množství chemického jedince; (2) počet sloučenin, které mají být testovány je enormně veliký; a (3) s perličkami se nesnadno manipuluje na mikrotitračních deskách s 96 jamkami.

Aby se vyhnuli problémům vlastní při screeningu kombinatorních souborů v úpravě s 96 jamkami, uvádějí někteří použití jednoduchých homogenních esejů, které by mohly být popsány jako „volná úprava“. Jako příklad byl Jayawickremem a spol. v Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), sv. 191, str. 1614–18 (březen 1994) publikován esej používající pigmentové buňky (melanocyty) v jednoduchém homogenním esejí pro kombinatorní peptidovou sbírku. Autoři umístili do petri misek buňky pod agarózu, potom na povrch agarózy umístili perle, které nesly kombinatorní sloučeniny a potom sloučeniny z perel částečně uvolnili. Aktivní sloučeniny byly vidět jako oblasti tmavého pigmentu, protože aktivní sloučeniny způsobily, že buňky měnily barvu, jakmile sloučeniny místně difundovaly do matrice gelu.

Jiným recentním příkladem je práce Daniela Chelsky–ho „Strategies for Screening Combinatorial Libraries“ publikovaná na First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening ve Filadelfii, PA (listopad 7–10 1995). Chelsky umístil jednoduchý homogenní enzymový esej pro uhličitou anhydrátu dovnitř agarózového gelu tak, aby enzym v gelu způsobil změnu barvy gelu. Na to pak byly dovnitř gelu umístěny perle nesoucí kombinatorní sloučeniny cestou fotocitlivých spojů a sloučeniny byly částečně uvolněny UV–světlem. Sloučeniny, které inhibovaly enzym byly zaznamenávány jako místní zóny inhibice vykazující menší změnu barvy. Konečně v Molecular Diversity, sv. 2, str. 57–63 (1996) popisuje Salmon a spol. metodu podobnou metodě Jayawickreme–ho a spol., při níž jsou kombinatorní soubory prozkoumávány na sloučeniny, které mají cytotoxické účinky na rakovinové buňky rostoucí na agaru.

Všechny tři příklady jsou variace dlouhodobých testů gelových esejů pro antibakteriální nebo protirakovinná činidla a jsou také podobné běžným imunologickým esejům, při kterých se v gelu zjišťují interakce antigen / protilátka. I když tyto gelové permeační esejí byly velmi vhodné pro screening kombinatorních souborů na bázi perel, nikdo nepublikoval rozšíření této úpravy na heterogenní esejí nebo na soubory, které nejsou na perlách založeny. Konvenční rozumová úvaha odrazovala výzkumníky od testování vzorků v kontinuální úpravě, která by dovozovala smíchávání vzorků. Mezi omezenými druhy publikovaných esejů a záležitostí, kdy vzorky byly společně zkoumány v kontinuální úpravě, byly analyzovány pouze soubory založené na perlách. Díky těmto omezením výzkumníci věřili, že 96-ti jamková úprava byla vhodnější pro heterogenní screening souborů a nikoliv screening založený na perlách. Bylo by žádoucí provádět heterogenní esejí v rámci volné úpravy. Bylo by dále žádoucí testovat individuální sloučeniny v rámci volné úpravy.

45 Podstata vynálezu

Zde popisovaný vynález, kontinuální úprava vysoce výkonného screeningu (CF–HTS), úspěšně uskutečňuje koncept volné úpravy pro každý homogenní nebo heterogenní esej, který může být provádět v 96-ti jamkové úpravě. Vedle toho je CF–HTS rovněž užitečný k prozkoumávání kombinatorních souborů pomocí heterogenních esejů a nejen esejů homogenních. Navíc dále se mohou při CF–HTS analyzovat individuální sloučeniny bez nákladů a komplikací, které jsou spojeny s miniaturizací. Obavy týkající se možnosti, že reagenty a výsledky testování budou spolu probíhat společně během následujících kroků se ukázaly jako neopodstatněné.

Předmětem vynálezu je způsob současného testování množství vzorků různých látek na jejich způsobilost zesilovat nebo inhibovat biologický proces, zahrnující

- 5 (a) uložení malého objemu každého z více než 96 vzorků rozdílných látek v uspořádání na matici tak, že každá jednotlivá látka je soustředěna na své vlastní odlišené místo a identita každé látky může být určena z jejího místa uložení,
- 10 (b) uvedení této matrice do styku s první porézní maticí obsahující nebo nesoucí rovnoměrně rozptýlené zkušební činidlo a umožnění, aby část z každé látky difundovala do uvedené porézní matrice takovým způsobem, že prostorové umístění každé difundované látky může být korelováno s místem na uvedené maticí, na kterém byla uvedená látka původně uložena, a
- 15 (c) provedení testu (eseje) pro stanovení způsobilosti každé difundované látky zesilovat nebo inhibovat uvedený biologický proces pozorováním interakce každé látky s uvedeným zkušebním činidlem,

přičemž podstata vynálezu spočívá v tom, že uvedenou maticí je planární matrice.

20

Detailní popis vynálezu

Ústřední ideou CF-HTS je umístit testované vzorky do kontextu s porézní maticí. Metoda zahrnuje umístění jedné nebo více složek eseje dovnitř, navrch nebo naspod matrice jako je gel, 25 plastová fólie, filtr nebo jiné formy snadno manipulovatelného pevného podkladu. Když se do porézní matrice zavedou vzorky, difundují dostatečně pomalu tak, že eseje je možné provádět, aniž by testované vzorky probíhaly spolu. Takto CF-HTS úprava rozděluje testované vzorky difuzí, spíše než neprůchodnou bariérou. Jestliže se nechají běžet testy příliš dlouho, budou eventuálně testované vzorky a výsledky probíhat společně. Avšak při pečlivém načasování 30 dovoluje CF-HTS simultánní screening velmi vysoké hustoty sloučenin ještě individuálně, bez potřeby plnit jednotlivé jamky nebo reakční jímky rozpouštědly nebo složkami eseje. K tomu navíc, se v této úpravě mohou manipulací s maticemi, které nesou reakční komponenty, provádět i složité heterogenní eseje. Manipulace s maticemi pro heterogenní eseje je zcela bezprecedentní a činí CF-HTS ve své schopnosti prozkoumávat široký rozsah biologických a biochemických 35 procesů tak flexibilní jako 96-ti jamkovou úpravu. CF-HTS dosahuje dále druhý výhod předpokládaných pro miniaturizaci bez závažných nevýhod a má jedinečné výhody. CF-HTS využívá širokou řadu matic a komponent pro eseje. Matrice zahrnují, ale neomezuji se jen na gely složené z agarózy, akrylamidu nebo jiných želatinóznych materiálů, membrány, filtry a plasty. Matrice mohou být složeny z materiálů včetně, ale nejenom, z polystyrenu, polypropy- 40 lenu, jiných plastů, papírových vláken, skla, skleněných vláken, křemelin, polykarbonátu, polyesteru, polyvinylchloridu a polyethylenu. Maticemi mohou být impermeabilní tuhé látky, porézní tuhé látky jako filtry nebo gely. Složky esejů zahrnují, ale neomezuji se jen na makromolekuly jako nukleové kyseliny, proteiny a jiné syntetické nebo přírodní makromolekuly; buňky, lyzáty buněk, biologické extrakty, orgány a jiné složité biologické entity a směsi; a malé 45 molekuly jako pufr, soli, inhibitory, substráty, peptidy, barviva, nukleotidy, kofaktory, ionty a rozpouštědla.

CF-HTS esej je esejem, v němž se mnohočetné testované vzorky nebo sloučeniny rozdělují 50 difuzí spíše než neprůchodnou bariérou. Kritickou složkou je zavedení vícečetných (více než 1) testovacích vzorků dovnitř nebo na porézní maticí eseje, která případně obsahuje jednu nebo více složek eseje. Porézní matrice eseje, obsahující komponentu(y) pro esej, se připravují přidáváním, mísením, litím, rozmísťováním nebo namáčením komponent eseje do matrice. Porézní matrice se připravují také spojováním, natíráním, vazbou, fixováním, napojením, konjugací nebo přichycováním komponent eseje do vnitřku nebo na povrch matrice. Mimo to se porézní matrice 55 připravuje dále také vytvářením tenkého filmu roztoku nebo kapaliny na buněčném podkladu,

enzymu nebo jiné imobilizované složce eseje. Porézní matrice pro esej se používají, aby se kontrolovalo pořadí a/nebo doba přidávání komponent a rozsah mísení a difuze, když se komponenty eseje kombinují. CF-HTS může využívat i matrice neporézní. Neporézní matrice pro esej se připravují spojováním, natíráním, vázáním, fixováním, napojením, konjugací nebo přichycováním komponent nebo testovaných vzorků do vnitřku nebo na povrch matrice. Použití neporézních matric při CF-HTS fixuje prostorově jednu nebo více složek eseje.

Když se složky eseje zavedou na povrch matrice, jsou komponenty eseje připojeny kovalentně nebo nekovalentně, specifickými nebo nespecifickými interakcemi s matricemi, které jsou nederivatizovány, derivatizovány nebo jinak předem upraveny, aby se připojení složek esejí usnadnilo. Složka eseje je po připojení prostorově fixována, takže je pro účely eseje imobilizována. V tomto případě buď musí být testované vzorky schopny difundovat matricí, aby dosáhly na komponenty eseje a/nebo subkomponenty nebo produkty eseje musí být schopny difundovat matricí, aby dosáhly na testované vzorky.

V jednom nebo některém z více následujících kroků se používá nejméně jedna porézní matrice obsahující vzorky testu.

- (1) Uvedení povrchu porézní matrice do kontaktu s nejméně jednou jinou (porézní nebo neporézní) matricí tak, že vzorky a/nebo více složek eseje mohou difundovat přes rozhraní.
- (2) Oddělení dvou nebo více matric, aby se zastavila interakce mezi komponentami a/nebo vzorky.
- (3) Uvedení povrchu dvou nebo více porézních matric do kontaktu tak, že mohou složky eseje interagovat.
- (4) Promytí, propláchnutí nebo eluování matrice kapalnými pufry nebo jinými rozpouštědly, aby se odstranily nenavázané a/nebo nespecificky vázané složky eseje.
- (5) Rozdělení, nalévání, přidávání nebo namáčení složek eseje v roztoku na matrici nebo filtrování uvedených komponent skrze matrici.
- (6) Zobrazení, přečtení, skenování, detekování nebo jiné zviditelnění radiometrických, fluorescenčních, spektrofotometrických nebo elektromagnetických signálů přítomných na nebo v jedné nebo více matricích.

CF-HTS poskytuje proti dřívějšímu způsobu mnohé výhody. Nepřítomnost oddělených jamek eliminuje nutnost současně a přesně rozdělovat do jamek složky eseje nebo reagenty. Místo toho se složky eseje rozdělují a mísí homogenní manipulací dohromady. Vzhledem k tomu, že složky eseje se připravují pohromadě jako homogenní vzorek nebo jako matrice, existuje minimální statistické kolísání od vzorku ke vzorku. Pro srovnání přítomnost jamek v 96-ti jamkové úpravě způsobuje velké statistické kolísání od vzorku ke vzorku.

CF-HTS dále zajišťuje pro veliký počet sloučenin screening s mimořádně vysokou četností. Dokonce i když zaznamenávané zásahy „probíhají společně“ v omezeném rozsahu, je zapotřebí pouze znovu otestovat sloučeniny, které jsou umístěny blízko zásahu. Tak jestliže bylo 10 000 testovaných vzorků schopno zredukovat se na 50 kandidátů v okolí zviditelněné oblasti, je pak snadné zredukovat 50 kandidátů na aktivní sloučeninu(y) i pomocí staré technologie s 96-ti jamkami.

Rozdělením a vysušením jednotlivých sloučenin na plastových fóliích ve vysoce naplněných souborech a potom jejich aplikováním v CF-HTS, se odstraní všechny kritické problémy miniaturizace. Tato úprava nevyžaduje pro miniaturizaci inovaci co do plastů nebo jiných materiálů,

protože miniaturizace je dosaženo jednoduše omezením množství vzorku, který difunduje do matice. Tato úprava také nevyžaduje mikrofluidika pro rozdělování činidel pro esej, protože celý esej probíhá v podstatě v „jedné obří jamce“, kde jsou reagenty a roztoky manipulovány ve velkém množství. Rozdělování pomocí mikrofluidik vyžadují pouze testované vzorky. Vedle toho při této úpravě existuje mnohem méně statistických výkyvů, protože je pouze zapotřebí vyhledat lokalizované zóny heterogenity v jinak homogenní matici. Nemusí se přechítat a srovnávat mnoho rozdílných jamek. Vedle toho ke všem předpokládaným blahodárným stránkám miniaturizace (náklady, výkon, využití reagentů, využití testovaných sloučenin), poskytuje CF-HTS také překvapující výhody jako je schopnost uskutečnit většinu kroků eseje pohromadě.

Ústředním hlediskem CF-HTS je pozorování, že složky eseje a testované vzorky stranově nedifundují rychle ani na rozhraních mezi maticemi. Když se na příklad agarózový gel umístí na plastovou desku, objeví se výrazná kapalina na rozhraní povrchu gelu. Když se vyžaduje interakce mezi složkou eseje v gelu a složkou eseje na desce (jako v příkladu ELISA), je kritické, že komponenta v gelu je schopna difundovat z gelu ven a na desku. Avšak CF-HTS vyžaduje, aby průvodní stranová difuze byla značně pomalejší, takže interakce na desce je lokalizována do blízkosti původního umístění složky z gelu. Tytéž principy se týkají každého rozhraní matrice-matrice mezi gely, filtry nebo povrchy (nebo každé jiné matrice) v jakékoliv kombinaci. Představa, že toto difuzní chování je kontrolovatelné, a že je obecně aplikovatelné na rozhraní všech matic, je bezprecedentní a protichůdná konvenčním představám.

Preferovanou metodou zavádění testovaných vzorků nebo sloučenin do matrice (jako gelu nebo navlhčeného filtru) je rozmísťování a sušení malých objemů každého vzorku na povrchu, jako je povrch plastové fólie, v takovém uspořádání, že se dva vzorky nemohou smísit nebo překrývat a každý je specificky umístěn. Když se plastová fólie umístí na matici, vzorky se rozpustí a difundují do matrice v místech odpovídajících jejich předem definovaným umístěním v počátečním uspořádání.

Alternativním způsobem rozdělování testovaných vzorků nebo sloučenin do souboru je rozmísťovat vzorky na porézní matici jako filtr, kde objem každého odděleného vzorku je dostatečně nízký, takže vzorky se uvnitř matrice nepřekrývají. Po kontaktu s jinou porézní maticí, která obsahuje více kapaliny, sloučeniny difundují, aby nastartovaly esej.

Preferovanou metodou zavádění kombinatních sloučenin na bázi perel do matrice je rozmísťování perel náhodně nebo v pravidelném uspořádání na povrch jako je povrch plastové fólie. Perle mohou být potom zpracovány tak, aby uvolnily (odštěpily) testované sloučeniny, pokud jsou na perly vázány kovalentně labilním spojem (v praxi je dobře známé fotolytické štěpení a štěpení kyselinou v plynné fázi). Každá sloučenina je pak nekovalentně spojena s oblastí obsazenou její původní perlou a suché sloučeniny pak mohou být zavedeny dovnitř nebo na povrch matrice.

Alternativním způsobem pro zavedení jednotlivých sloučenin do matrice je namáčení nebo jiný způsob nekovalentního připojení každé sloučeniny do nebo na perly. Při použití tohoto způsobu může být velké množství sloučenin najednou smíšeno dohromady s perlami tak, že každá perle má na sobě stále jedinou komponentu. Potom může být směs perel snadno rozprostřena na povrch pro zavedení do matrice. Tento postup zcela eliminuje nutnost manipulace s malým objemem kapaliny.

Když počáteční soubor vzorků zavedených do matrice při CF-HTS zkoumání má vysokou hustotu, takže jednotlivé zóny aktivity prostorově pokrývají počáteční umístění více než jednoho vzorku, potom je každý z těchto vzorků potenciálním zdrojem pozorované aktivity. Při vyšších počátečních hustotách, podle rozmanitosti sloučenin, které budou v jednotlivých zónách přítomny, bude více sloučenin kandidáty pro každou zónu. Sloučeniny mohou navzájem difundovat, avšak budou mít stále svůj vlastní prostorový gradient a nebudou se kvantitativně mísit v žádném místě. Proto střed zóny bude stále korelovat s přesným umístěním aktivní komponenty

v počátečním souboru. V praxi jsou dosti vzácné zásahy, že je běžné opakované testování mnoha vzorků, aby se zaručila identifikace aktivních sloučenin pro každou aktivní zónu.

Alternativním provedením vynálezu je zavedení fyzikální bariéry (tedy v přísném slova smyslu provedení nekontinuální úpravy) do matic esejů, aby se omezila vzdálenost, po kterou by mohly vzorky difundovat. Na příklad každý ze dvou gelů obsahujících enzym respektive substrát může být pokrájen pletivem („kráječ sušenek“) tak, že každý gel je dále rozčleněn na mnoho oddělených poloh. Potom se ještě uvedou oba gely do kontaktu tak, aby substrát a enzym mohly spolu difundovat dovnitř každého rozčleněného kousku gelu. Potom se do každého rozčleněného kousku gelu zavedou vzorky tak, aby eseje mohly probíhat zcela nezávisle bez difuze mezi esejí. Toto provedení efektivně eliminuje některé z výhod CF-HTS tím, že zanáší statistické odchylky mezi testovanými vzorky a fixuje objem, a tudíž omezuje signál u souborů o vysoké hustotě. Ale toto provedení bude ještě sklízet dobrodiní heterogenního eseje založeného na matici, při němž komponenty eseje nepotřebují být rozdělovány do velkého množství paralelních reakčních nádobek a eliminuje částečné mísení vzorků.

g ELISA

Enzymem spojované imunosorpční eseje (ELISA) jsou heterogenní eseje, které detekují vazbu mezi ligandy v roztoku a imobilizovanými receptory. ELISA vyžaduje mnoho kroků mísení reagentů a vypírání, které jsou nesnadno proveditelné v 96-ti jamkové úpravě a je možné představit si i větší nesnáz, když se jamky redukuje z 96-ti jamkové úpravy na 384-jamkovou úpravu. Autoři vynálezu aplikovali CF-HTS metodu pro detekci inhibice vazby mezi ligandy a imobilizovanými cílovými receptory (gELISA).

Receptorem je každá molekula, která může vázat jinou molekulu. Neomezuujícími příklady jsou proteiny, peptidy, nukleové kyseliny, sacharidy a komplexy předchozích příkladů. Receptor je imobilizován na jedné z několika matic (receptorová matrice) včetně, neomezuující se však jen na plastové povrchy [např. petri miska nebo plastová deska (Nunc)], membrány nebo filtry, které mají vysokou cílovou vazebnou kapacitu [např. nitrocelulóza, nylon nebo PVDF (Millipore, Corning Costar, Schleicher & Schuell, BioRad) nebo derivatizované membrány jako SAM membrány (Promega)]. Porézní ligandová matrice (např. agarózový gel nebo porézní membrána) se připraví tak, že se ligand pro imobilizovaný receptor rozdělí dovnitř nebo na matrice. Testované sloučeniny nebo vzorky se rozmísťují přímo na ligandovou matrici nebo alternativně na nebo dovnitř matrice pro testované vzorky [např. polystyren (Tekra)], polyvinyliden (např. od Dow Brands) nebo jiné flexibilní plastové fólie nebo membrány. Testovaná matrice se uvede do styku s ligandovou matricí a vzorky se nechají difundovat do ligandové matrice. Po vhodné inkubační periodě se ligandová matrice uvede do kontaktu s receptorovou matricí a umožňuje se, aby ligand a vzorky přišly do kontaktu a potenciálně difuzí reagovaly s receptorem (obrázek 1 ukazuje vazbu imobilizovaného receptoru R na biotinylizovaný ligand Lβ). Během inkubace se budou ligandy vázat na imobilizovaný receptor pokud sloučenina vzorku neinhibuje vazbu ligand / receptor.

Po příslušné inkubační periodě se receptorová matrice odstraní a promyje vhodným pufrem, aby se odstranil nenavázaný nebo nespecificky vázaný ligand a vzorky. Receptorová matrice se potom namočí v roztoku obsahujícím reagenty eseje, které budou interagovat s ligandem (např. antilátka, avidin nebo streptavidin v případě biotinylizovaného ligandu) a schopnými být detekovány buď přímo (např. fluorescencí nebo radioaktivitou) nebo nepřímo [např. peroxidázou křenu (HRP), alkalickou fosfatázou (AP) nebo konjugátem β-galaktosidázy]. (Obrázek 2 ukazuje konjugát avidin-HRP, AHRP, připojený na biotinylizované ligandy). Po příslušné inkubační periodě se receptorová matrice odstraní z roztoku a promyje se vhodným pufrem, aby se odstranil nenavázaný nebo nespecificky vázaný reagent. V případě přímé detekce signálu se matrice zobrazí za použití vhodné metody (např. fotometrickými skenery, CCD kamerami, filmem, vyvolávací fosforescence nebo přístroji pro detekci scintilace). Nepřímé signály (např. HRP nebo AP) vyžadují dodatečnou reakci pro vyvinutí signálu, dosahovanou rozdělením substrátů nebo

jiných nezbytných reakčních komponent do nebo na porézní substrátovou matici a umístění této matrice do kontaktu s matricí receptoru. Enzym (např. HRP nebo AP) pak reaguje se substrátem. (Obrázek 3). Alternativně se precipitující substrát zavede do roztoku namísto do matrice. Při každé zobrazovací metodě oblasti vazby ligand / receptor budou vytvářet viditelnou reakci, poně-
 5 vadž oblasti, v nichž byla vazba ligand / receptor inhibována viditelnou reakcí vytvářet nebude.

Vazba buňka / ligand

CF-HTS může být rovněž užíván pro detekování inhibice vazby ligand / buněčný receptor. Při
 10 tradičním eseji se kombinuje testovaná sloučenina, radiočně značkové ligandy a buňky, které exprimují odpovídající receptor v nádobce jako je jamka. Potom se poskytne dostatečná doba, aby se dovolilo receptoru vázat se na ligand, pokud nebyla taková vazba inhibována testovanými sloučeninami. Jakékoliv z nenavázaných nebo nespecificky vázaných komponent jsou z buněk odstraněny a měří se množství radioaktivity připadající na buňky. Autoři vynálezu přizpůsobili
 15 CF-HTS metodu pro detekci inhibice vazby ligandů na buňky. Buňky exprimující žádaný receptor jsou pěstovány nebo navrstveny na matici (buněková matrice) jako jsou, ale neomezuje se to jen na ně, gely, filtry nebo membrány [např. Transwell membrány tkáňových kultur (Corning Costar) nebo chemotaxní membrány (Neuroprobe)]. Porézní matrice (např. agarózový gel nebo porézní membrána) se připraví tak, že se značkový ligand pro receptor rozdělí na
 20 nebo do matrice (matrice s ligandem). Testované sloučeniny se rozdělí přímo na ligandovou nebo buňkovou matici nebo alternativně na nebo do jiné matrice [např. polystyren (Tekra), polyvinyliden nebo jinou plastovou fólii nebo membránu; membrána se vzorky]. Membrána se vzorky se uvede do kontaktu s ligandovou maticí a takto se umožní vzorku difundovat dovnitř ligandové matrice. Po příslušné inkubační periodě se ligandová matrice uvede do kontaktu s buň-
 25 kovou maticí, nejlépe na straně matrice bez buněk a umožní se, aby docházelo ke styku ligandu a vzorku a difuzi k reakci s receptorem (Obrázek 4). Během inkubace se budou značkové ligandy vázat na imobilizované buňky pokud vzorek neinhibuje vazbu ligand / buňka.

Po inkubaci se buňková matrice oddělí od ligandové matrice a promyje se vhodným pufrům aby
 30 se odstranil nenavázaný nebo nespecificky vázaný ligand a vzorek. Buňková matrice se zobrazí za použití vhodné metody (např. fotometrickými skenery, CCD kamerami, filmem, fosforografy nebo přístroji pro detekci scintilace). (Obrázek 5 ilustruje vyvolání eseje na film).

Jak je shora ukázáno, CF-HTS dosahuje všech výhod předpokládaných pro eseje s „volnou úpra-
 35 vou“ a může být aplikován pro všechny různé druhy biologických nebo biochemických esejí, při všech různých typech úprav a se všemi různými reagenty a zařízeními. Vzhledem k široké aplikovatelnosti je nejlépe ilustrován pomocí následujících příkladů. Avšak tyto příklady ilustrují preferovaná provedení předkládaného vynálezu a neomezuji patentové nároky a specifikace. Běžný pracovník si snadno uvědomuje, že změny a modifikace specifických provedení mohou
 40 být provedeny bez odchýlení se od rozsahu a ducha vynálezu. Na všechny citace se zde nakonec odkazuje.

Přehled obrázků na výkresech

45 Obrázek 1 ukazuje vzorky gELISA testu na neporézní matici stýkající se s jednou stranou porézní gelové matrice obsahující reagent eseje, která pak se stýká s neporézní maticí nesoucí další reagent eseje. Obr. 1A znázorňuje ve větším přiblížení oblast označenou na obr. 1 „OBR. 1A“ a ukazuje imobilizované receptory R vázající se na biotinylované ligandy Lβ.

50 Obrázek 2 ukazuje odstranění matrice vzorků gELISA testu a porézní gelové matrice, následované promytím a přidáním kapalných reagentů nebo roztoků reagentů pro vytvoření reportního komplexu na neporézní matici reagentu. Oblast označená na obr. 2 jako „OBR. 2A“ znázorňuje ve větším přiblížení rozhraní mezi ligandovými a receptorovými maticemi (LM a RM) a ukazuje

konjugáty avidin–HRP (AHRP) napojené na biotinylované ligandy L β , které pak jsou napojeny na imobilizované receptory R.

5 Obrázek 3 ukazuje vizualizaci gELISA eseje spojením matrice s reportním komplexem s porézní gelovou matricí obsahující reportní substrát. Oblast označená na obr. 3 jako „OBR. 3A“ znázorňuje ve větším přiblížení rozhraní mezi matricí substrátu HRP a receptorovou matricí RM a ukazuje konjugáty avidin–HRP (AHRP), napojené na biotinylované ligandy L β , které pak jsou napojeny na imobilizované receptory R.

10 Obrázek 4 ukazuje, jak je ligandová matrice aplikována na povrch filtru protilehlý tomu povrchu filtru, který nese buňky. Oblast označená na obr. 4 jako „OBR. 4A“ znázorňuje ve větším přiblížení rozhraní mezi matricí značeného ligandu a matricí buněčné monovrstvy a ukazuje uspořádání buněk vzhledem k pórům filtru a ligandové matrici.

15 Obrázek 5 ukazuje, co se může vytvořit na povrchu filtru nesoucího buňky, když se esej vizualizuje.

Obrázek 6 ukazuje výsledek VanA eseje za použití různých koncentrací známého na dávce závisícího inhibitoru.

20 Obrázek 7 ukazuje výsledek EF–3 eseje za použití různých koncentrací známého inhibitoru.

Obrázek 8 ukazuje kontrolní experiment gELISA eseje pro interakci protein–protein.

25 Obr. 8A znázorňuje vizualizaci vazby β –uPA/uPAR na agarózových čtvercích napuštěných uvedenými koncentracemi β –uPA. Obr. 8B představuje graf průměrné hodnoty v pixelech pro každý čtverec z obr. 8A.

30 Obrázek 9 ukazuje gELISA výsledek „inhibice“ pro interakci protein–protein. Obr. 9A znázorňuje výsledek experimentu, kde se zabraňuje, aby Pro–uPa vázal β –uPA/uPAR. Obr. 9B znázorňuje výsledky obr. 9A v kvantitativní grafice.

Obrázek 10 ukazuje na dávce závisící vazbu radiačně značené ITAM na imobilizovaném LCK.

35 Obrázek 11 mapuje hodnoty pixelů proti ITAM koncentraci pro znázornění typické vazebné křivky vazby ligandu na receptor.

Obrázek 12 ukazuje kontrolní experiment pro interakci ligand–buňka u radiačně značeného IL–8.

40 Obrázek 13 ukazuje „inhibici“ interakce ligandu IL–8 s buňkou.

Obrázek 14 ukazuje esej pro inhibitory neuraminidázy.

45 Obrázek 15 ukazuje simultánní esej 10 080 jednotlivých sloučenin na inhibici neuraminidázy.

Příklady provedení vynálezu

50 Příklad 1

Kolorimetrický dvoustupňový gelový esej pro stanovení fosfátu generovaného rezistentním vankomycin enzymem VanA

VanA je klíčovým enzymem při vankomycinové rezistenci a katalyzuje připojení D-alaninu k D-alaninu nebo D-alaninu k D-laktátu. Tento enzym se obvykle analyzuje vyvoláváním barvy z fosfátu, který se uvolňuje, když je enzym aktivní (aktivita VanA způsobuje hydrolýzu ATP na ADP a fosfát). Vědcům je známo, že D-cykloserin inhibuje VanA způsobem závislejícím na dávce, a že se tento inhibitor používá jako pozitivní kontrola proti jiným potencionálním inhibitorům.

Gel s enzymem

Gel s enzymem byl připraven přidáním enzymu VanA k roztavené 1% agaróze (vysokotající agaróza Gibco BRL) při 45 °C v 50 mM HEPES (kyselina N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonová]), 20 mM MgCl₂, 20 mM KCl, pH 7,3 do konečné koncentrace VanA 2 μM. Tato agarová směs byla potom nalita do BioRad aparátu pro formování gelu a při 2 až 8 °C ponechána 30 minut ztuhnout.

Gel se substrátem

Gel se substrátem byl připraven přidáním ATP, D-alaninu a D-laktátu k roztavené agaróze tak, aby jednotlivé z komponent měly 1mM, 1,5 mM respektive 1,75 mM a přípravou gelu jak bylo popsáno pro gel s enzymem.

Matrice se vzorkem

Řady 1 μl alikvotních podílů série ředění 5000, 2000, 1000, 500, 200, 100 μM D-cykloserinu, známého inhibitoru použitého jako kontrolní vzorek, v 1 : 1 směsi ethanolu a vody, byly rozděleny na kousek polyvinylidenchloridového (PVDC) filmu a 10 minut ponechány k usušení.

Inkubace enzymu se substrátem v přítomnosti inhibitoru

Gel s enzymem byl na 5 minut uveden do styku s matricí vzorku. Potom byl navrch gelu s enzymem umístěn gel se substrátem a ponechán k inkubaci po 15 až 20 minut. Poté byly oba gely odstraněny odděleny. Má se za to, že se během inkubace, kdy enzym katalyzuje spojení substrátů, vytvoří fosfát v celém gelu s výjimkou těch zón, v nichž byl D-cykloserin v dostatečné koncentraci, aby inhiboval reakci.

Vizualizace eseje

Na gely s enzymem a substrátem byla nalita a stejnoměrně rozdělena směs pro detekci fosfátu sestávající z čerstvě připraveného roztoku 0,15 % Malachitové zeleně a 1,4 % molybdenanu amonného v 1,33 N HCl. Tato činidla reagují s fosfátem a jako funkci zvyšujících se koncentrací fosfátu vyvolávají stoupající měrou tmavnoucí odstíny zelené. Zbarvení se nechalo vyvolávat po 5–10 minut (Obrázek 6 ukazuje vývoj zbarvení gelu, když se množství inhibitoru měnilo od 5 nanomol do 0,5 nanomol). Zeleně zbarvené gely byly fotografovány CCD kamerou „StratageneEagle Eye“. Stupeň, při němž inhibované zóny byly méně zelené, koreloval podle očekávání s koncentrací přidaného inhibitoru. Proto může být tento esej použit pro zkoumání inhibitorů VanA při řazení kombinatorních perel nebo sloučenin rozdělovaných na jakýkoliv jiný povrch, který je potom uveden do styku s gelem eseje.

Tento esej také ukazuje, že úpravu gelového screeningu lze přizpůsobit vícestupňovým reakcím. Takové provedení je potřebné, aby tato úprava byla užitečná pro širokou řadu esejí, protože mnoho esejí více stupňů vyžaduje. V tomto případě VanA esej je dvoustupňovým esejem enzymové aktivity následovaným vyvoláním zbarvení. Homogenní (jednotlivý stupeň) verze tohoto eseje nejsou snadno proveditelné, protože zbarvení vyvolávající reagenty a podmínky interferují s aktivitou VanA a jsou tudíž inkompatibilní s jejich dodáváním do agarového gelu. Proto je tedy

žádoucí prostorové a časové oddělení těchto dvou stupňů, obsahující nejprve esej gelu s enzymem, následovaný vyvoláním zbarvení ve fázi roztoku.

5 Příklad 2

Dvoustupňový esej detekce fosfátu generovaného *S. cerevisiae*. Elongační faktor aktivity 3 ATPázy stimulovaná vazbou ribosomů

- 10 Když s ribosomy interaguje fungální elonganční faktor 3 (EF-3) stimuluje se aktivita fosfatázy. Autoři vynálezu aplikovali pro tuto aktivitu CF-HTS. Byl připraven gel s enzymem obsahující EF-3 (vysoce teplotně citlivý enzym) a kvasinkové ribosomy v pufru EF-3 eseje. Připraven byl také gel substrátu obsahující 1 mM ATP v pufru eseje. Oba gely obsahovaly 2 % dimethylsulf-oxidu v nízkotající agaróze (Gibco BRL) a byly připraveny při 37 °C a ponechány 30 minut stát při 4 °C. Na PVDC film byly natečkovány a vysušeny (matrice se vzorkem) série ředění poly-L-lysinu, inhibitoru EF-3 použitého jako kontrolního vzorku. Potom po předcházející inkubaci gelu enzymu s inhibitory na matrici vzorku, byl jako v příkladě 1 proveden esej. Potom byl gel s enzymem na 20 minut umístěn do styku s gelem se substrátem. Jako v příkladu 1 byly gely s enzymem a substrátem obarvovány barvu vyvolávající směsí Malachitové zeleně s molybdenanem amonným. Gel s enzymem byl potom zobrazen CCD kamerou. Skvrny inhibitoru se objevují jako světlejší zóny v zeleném pozadí. Obrázek 7 ukazuje vývoj zbarvení na gelu, kde se množství inhibitoru měnilo od 5 pikomol do 200 pikomol. Výsledky ukazují na dávce závisící signál inhibitoru, indikující, že při tomto esaji mohou být prozkoumávány sloučeniny, aby se odhalily nové EF-3 inhibitory. Příklad 2 demonstruje užitečnost CF-HTS spolu s komplikovaností způsobenou přítomností organel nebo jiných surových biologických směsí nebo extraktů.

Příklad 3

- 30 Nepřímá gELISA detekce zbarvení inhibitorů interakce protein – protein

- Jak bylo diskutováno shora, je ELISA obvykle používán k detekci inhibice ligand – receptor, kdy jsou receptory imobilizovány v mikrotitračních jamkách. Páry „ligand – receptor“ užívané při ELISA mohou obsahovat každý pár vazajících se molekul od proteinů nebo jiných makromolekul až do malých molekul. Tyto eseje jsou komplexními, vícestupňovými esaji, jež vyžadují imobilizování receptoru, inkubování receptoru s ligandem, promytí k odstranění nechtěného nespecificky zadržovaného ligandu, který by jinak mohl způsobovat vysoký signál pozadí, vázání zviditelnějících činidel (např. specifické protilátky ligandu konjugované s reportním enzymem) na ligand vázaný k receptoru a generování viditelného signálu poskytnutím substrátu pro reportní enzym. Je zřejmé, že komplexnost ELISA vedla HTS průmysl k závěru, že ELISA nemůže být adaptován pro eseje s volnou úpravou. Přesto však autoři vynálezu adaptovali tento komplexní, vícestupňový esej na CF-HTS úpravu pro analýzu různých interakcí protein – protein, protein – ligand a vazeb jiných ligandů.

- 45 Aktivátor plazminogenu urokinázového typu (uPA) se váže na jemu odpovídající receptor (uPAR). Interakce uPA / uPAR byla prokázána při metastáze různých typů rakoviny. Autoři vynálezu adaptovali tradiční uPA / uPAR ELISA na CF-HTS za použití vyčištěných receptorů a ligandů.

- 50 Matrice uPAR

- Plastové desky (7,5 cm x 11,5 cm od Nunc, Inc. Naperville, IL) byly přes noc pokryty 15 ml 118 nM vyčištěného uPAR ve fosfátem pufované solance (PBS) (Life Technologies, Grand Island, NY) při pH 7,4 a 4 °C. Po pokrytí plastových desek přes noc byl roztok uPAR dekantován a zbylá vazebná místa na plastové desce byla blokována přidáním 15 ml PBS, obsahujícími

- 1 % (hm./obj.) kaseinu a inkubována 2 hodiny při teplotě místnosti (RT). Po blokování byl blokační roztok dekantován a plastová deska byla pětkrát promyta 20 ml pracího pufru sestávajícího z 0,05 % Tween 20 (monolaurát polyoxyethensorbitanu) v PBS. Po promytí byla plastová deska sušena 10 minut při RT. Bylo to načasováno tak, že krátce na to mohla být plastová deska použita v eseji popsaném níže, aby se zabránilo přeschnutí matrice, které by mohlo vést ke ztrátě aktivity.

Matrice β - uPA

- Pro účely eseje byla používána uPA označena biotinem (β -uPa). Gely obsahující β -uPA byly připraveny namáčením β -uPA do agaru kvůli vyhnutí se vysokým teplotám (což je opakem liti do roztaveného agaru z příkladů 1 a 2). Agar byl připraven nejprve mísením 0,1 g agarózy (Sigma, St. Louis MO) s 10 ml PBS, zahřátím dokud neroztála a potom odlitím do přístroje pro gel $8 \times 7 \times 0,075 \text{ cm}^3$ (Bio-Rad, Hercules, CA). Po ztuhnutí (buď při pokojové teplotě nebo 4°C) byly gely při 4°C přes noc namočený do 15 ml β -uPA (kolem 10nM) v pufru eseje sestávajícím z PBS, 0,05 % Tween-20 a 0,1 % kaseinu (obojí od Sigma, St. Louis, MO). Rovnou před použitím byl gel 20 minut sušen při RT.

Matrice se vzorkem

- Jako kontrolní vzorek inhibitoru β -uPA / uPAR vazby byl za nepřítomnosti známého inhibitoru vazby uPA / uPAR o malé molekule, použit nebiotinylovaný uPA (Pro-uPA). Pětimikrolitrové alikvotní podíly 0, 0,03, 0,1, 0,3, 1 a $3 \mu\text{M}$ pro-uPA v pufru eseje byly rozmístěny na PVDC film (Dowbrands L. P., Indianapolis, IN) a 2 h sušeny při RT.

- Inkubace uPAR s pro-uPa a β -uPA

- Matrice se vzorkem byla umístěna na jednu stranu gelu obsahujícího β -uPA se suchými tečkami pro-uPA do styku s povrchem gelu s β -uPA. 10 minut bylo při RT ponecháno, aby pro-uPA do gelu difundoval. Na to potom druhá strana gelu s β -uPA byla umístěna do plastové desky, aby se β -uPA (působící jako ligand) a pro-uPA (působící jako kompetitivní inhibitor) nechaly interagovat s uPAR na povrchu plastové desky. Vazba / kompetitivní reakce byly inkubovány při RT po 20 minut. Po inkubaci byla plastová deska oddělena od gelu a rychle 4krát promyta 20 ml vypíracího pufru. Roztok konjugátu avidin-peroxidáza křenu (avidin-HRP) byl připraven rozředěním avidin-HRP (Sigma, St. Louis, MO) 1 až 25.000 v pufru eseje a přidáním 15 ml k plastové desce. Reakce byla 10 minut inkubována při RT s následujícím dekantováním roztoku avidin-HRP a promytím plastové desky jako nahoře. Plastová deska byla 20 minut sušena.

- Avidin se v avidin-HRP váže na biotin specificky tak, že pouze ty oblasti matrice, kde se projeví vazba „ligand / receptor“, budou eventuálně vykazovat vývoj zbarvení. Ty oblasti matrice, kde je vazba „ligand / receptor“ kompetitivně inhibována účinkem pro-uPA, zbarvení vykazovat nebudou.

Vyvolání zbarvení

- Gel pro vyvolání zbarvení obsahující kolorimetrický HRP substrát (OPD gel) byl připraven rozpouštěním dvou tablet hydrochloridu o-fenylendiaminu (OPD) v 7 ml rozpouštědla (oboje z „Abbot kit no.6172-30“, Abbot Labs., Abbot Park, IL) a spojením tohoto roztoku s roztokem agarózy získaném roztavením 0,1 agarózy v 1 ml vody. 10 ml vzniklé směsi bylo odlito do miniprotein II přístroje pro gel $8 \times 7 \times 0,075 \text{ cm}$ a 15 minut při 4°C ponecháno ztuhnout. Gel byl ze skleněných desek odlévacího stojánu přenesen na PVDC film nebo flexibilní plastovou fólii a při RT byl 10 minut ponechán sušit se na vzduchu. Potom byl přenesen na jiný PVDC film nebo flexibilní plastovou fólii, aby se 10 minut ponechala sušit druhá strana. Potom byl OPD gel umístěn na plastovou desku k zahájení vývoje zbarvení. Během inkubace OPD, v různých časech, byla plastová deska umístěna navrch filtru propouštějícího pás 440 nm (Omega Optical, Inc.,

Brattleboro, VT), který střídavě byl navrchu difuzní desky s optickými vlákny osvětlované světelným zdrojem Fiber-Lite (oboje od Dolan-Jenner Industries, Inc., Lawrence, MA). Vznikající obrázky byly získány CCD kamerou (systém „Eagle Eye“, Stratagene, La Jolla CA).

5 Kontrolní pokus

Obrázek 8 ukazuje kontrolní pokus pro příklad 3. V obrázku 8A byly čtverečky agarózy (1 cm^2) namočené do roztoků s různými β -uPA koncentracemi, jak je naznačeno pod každým čtverečkem (s výjimkou 50 nM roztoku, který je označen nalevo od čtverečku agarózy). Poté, když byly
10 čtverečky agarózy inkubovány na plastové desce s imobilizovaným uPAR, byly odstraněny. Plastová deska byla potom omyta a oblasti matrice, kde došlo k β -uPA / uPAR vazbě byly zviditelněny jak je shora popsáno. Obrázek 8B ukazuje křivku průměrných hodnot pixelů (bez pozadí) pro každý čtvereček (jak bylo určeno analýzou digitálního obrázku z digitální kamery pomocí software „NIH Image Analysis“) proti koncentraci β -uPA v každém čtverečku agarózy
15 v různém čase během vyvíjení zbarvení OPD. β -uPA získané z agarózového gelu vykázaly typickou vazebnou křivku receptor – ligand s půlmaximem vazby (K_d) kolem 3–5 nM, což je konzistentní s publikovanými hodnotami pro tuto reakci při standardní ELISA a jiných esejích, které tento parametr měří. Obrázek 8 ukazuje, že nepřímý kolorimetrický signál generovaný při gELISA je kvantitativně závislý na rozsahu interakce ligand–receptor.

20

Výsledky kompetice pro-uPA / β -uPA

Obrázek 9 ukazuje inhibici β -uPA / uPAR vazby pomocí pro-uPA. Skvrny v obrázku 9A vyznačují oblasti, kde byla inhibována β -uPA / uPAR vazba. Tudíž se v těchto oblastech avidin–HRP
25 nevázal. V důsledku toho HRP se substráty v OPD gelu na generování vývoje zbarvení nereagoval. Obrázek 9B je alternativní cestou zobrazení dat téhož CCD obrázku, která zvyšuje schopnost lidského oka vidět kvantitativní titraci.

30 Příklad 4

Přímá radiometrická detekce inhibitorů interakce protein – protein

Aktivace T–buněk je součástí imunitní odezvy těla. Aby nastaly během aktivace T–buněk přípa-
35 dy v tomto směru, musí p56lck (LCK protein) interagovat s ITAM oblastí (s imunoglobulinem související aktivační jednotka na bázi tyrosinu) cytoplazmatických domén receptoru antigenu T–buněk. Sloučeniny, které inhibují tuto interakci protein – protein jsou potenciálními imunosupresivy. Autoři vynálezu použili CF–HTS pro analýzu této interakce protein – protein, při níž je LCK imobilizován na membráně.

40

LCK matrice

Biotinylovaný LCK se imobilizuje na biotin zadržující membráně (SAM membrána) (Promega Corp., Madison, WI) přelitím proužku $11\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 5 ml 3 μM LCK v PBS obsahujícím 5 mM
45 DTT (dithiothreitol) na 10 minut při RT, po čemž se pufr odstraní. Je to načasováno tak, aby SAM membrána mohla být v níže popsaném esejí použita krátce na to (během minut).

ITAM* matrice

Agarózový gel obsahující radiačně značený ITAM peptid (ITAM*) se připraví smísením 0,1 g
50 agarózy s 10 ml pufru, zahříváním dokud nedojde k roztavení a potom odlitím do přístroje pro gel $8 \times 7 \times 0,075\text{ cm}$. ITAM* se do finální koncentrace 10 nM přidává právě před odléváním nebo alternativně namáčením po ztuhnutí gelu.

Matrice se vzorky

Vzorky, které mají být podrobeny screeningu, se rozdělí na plastový povrch nebo PVDC a vysuší, aby vznikla matrice se vzorky.

5

Inkubace a vizualizace ITAM*, LCK a testovaných vzorků

Matrice se vzorky se uvede do styku s jednou stranou gelu s ITAM* tak, že testované vzorky mohou difundovat do gelu s ITAM*. Nato se druhá strana gelu s ITAM* uvede do styku se SAM membránou, na které byl imobilizován LCK. Po 15 – 45minutové inkubaci se SAM membrána odstraní, promyje a zobrazí fosforografem nebo filmem. Inhibitory interakce ITAM – LCK jsou indikovány zónami nižší radioaktivity, což na zobrazení odpovídá nižší intenzitě signálů.

10

Kontrolní pokus pro vazbu ITAM* / LCK

15

Agarózové gely se připraví smísením 0,1 g agarózy s 10 ml pufru, zahříváním dokud nedojde k roztavení a potom odlitím do přístroje pro gel 8 x 7 x 0,075 cm. Po ztuhnutí se z gelu vypíchají kolečka o průměru 1 cm a přes noc se při 4 °C namočí do 400 µl pufru s 0,1, 0,3, 1,3, 10 a 20 nM ITAM značkováným s ^{125}I (Amersham, Arlington Heights, IL). Gelová kolečka se potom z roztoku vyjmou a ponechají po 20 minut při RT k usušení. Potom se umístí na LCK – imobilizovanou SAM membránu a inkubuje 45 minut při RT. Gely se odstraní a membrány se čtyřikrát promyjí pufrům. Po vysušení se SAM membrány zobrazí pomocí fosforografu.

20

Obrázek 10 naznačuje na dávce závisící vazbu mezi ^{125}I – ITAM a imobilizovaným LCK na SAM membráně.

25

Obrázek 11 ukazuje diagram průměrných hodnot pixelů (bez pozadí) pro každý ^{125}I – ITAM gel (jak bylo stanoveno analýzou digitalizovaného obrazu z fosforografu pomocí software ImageQuant od Molecular Dynamics) proti ^{125}I – ITAM koncentraci v gelovém kolečku ^{125}I – ITAM poskytnutý z gelu do imobilizovaného LCK vykázal typickou vazebnou křivku receptor – ligand.

30

Příklad 5

35

Esej reportního genu celých buněk za použití úpravy gel / filtr

40

Ledvinové buňky, známé jako HEK buňky, byly transfikovány plazmidem, který obsahuje promotor základní složky cyklické AMP odezvy (CREB), spojený s genem luciferázy (reportní gen luciferázy od Promega). Když jsou transfikované buňky podrobeny působení forskolinu, indukuje se exprese reportního genu luciferázy. Potom pak, když se k HEK buňkám přidá biologický pufr, obsahující substrát luciferázy (hmyzí luciferin od Promega) a vhodné kofaktory (20 mM Tricinu pH 7,8, 0,1 mM EDTA, 33 mM koenzymu A, 0,5 mM adenosin trifosfátu a 1 mM MgCl_2), generuje se emise fotonů, která může být pomocí běžné instrumentace detekována.

45

Matrice s buňkami

50

Buňky byly v kultuře podrobeny působení trypsinu, přeneseny do Corning / Costar TRANSWELL™ membrány (3 mikronový polykarbonátový filtr s plastovou prstěncovou podložkou) a přes noc inkubovány při 37 °C, 5 % CO_2 v přítomnosti média pro kultivaci tkáně. Potom bylo médium z membrány odstraněno a filtr, k němuž byly buňky přichyceny, byl 15 minut na vzduchu sušen a krátce potom použit v níže uvedených krocích.

Matrice s vyvolávačem

5 Gel obsahující vyvolávač exprese luciferázy se připraví přidáním 12 μ l 10 mM výtažku forskolinu (Sigma, výtažek v ethanolu) do 6 ml 1% nízkotajícího agarózového gelu. Gel se při teplotě místnosti ztuhne forskolinem na konečnou koncentraci 20 μ M.

Matrice se vzorky

10 Vzorky, které by mohly blokovat indukci forskolinem se rozmístí a suší na oddělených místech na PVDC s vysokou hustotou.

Inkubace reagentů a detekce inhibice

15 Strana PVDC s inhibitorem se inkubuje s gelem obsahujícím vyvolávač. Pak se gel obsahující forskolinový vyvolávač umístí na bezbuněčnou stranu matrice s buňkami, připravené jak uvedeno shora. Ty se spolu inkubují při 37 °C a 5 % CO₂ 20 minut. Potom se gel s forskolinem odstraní a matrice s buňkami se inkubuje při 37 °C a 5 % CO₂ další čtyři hodiny kvůli maximální expresi konstruktů luciferázy. K detekci enzymatické aktivity (nebo její inhibice), se buňková matrice filtru fyzicky odstraní od svého podložního prstence a umístí do petri misky. Petri miska se zaplaví substrátem luciferázy (hmyzí luciferin od Promega) v biologickém pufru s příslušnými kofaktory, aby se vyvolalo světlo jako signál. Protože signál je lokalizován uvnitř imobilizovaných buněk exprimujících luciferázu, výsledkem inhibitorů počátečního indukčního kroku budou zóny s nižší emisí fotonů.

25

Příklad 6

CF-HTS gel / filtr pro přímé stanovení inhibitorů interakcí ligand – buňka

30 Vazba ligand – receptor na površích buněk iniciuje v buňkách signální cesty, které na konci vedou k funkčním odezvám (např. proliferace nebo sekvence biologicky aktivních substancí). Pro regulaci biologických odezev buněk při chorobných stavech se často usiluje o inhibici ligandových vazeb na povrchu buněk. Obecnou metodou pro vyhodnocení inhibitorů vazby ligand / buněčný receptor je zhodnocení schopnosti inhibitoru redukovat vazbu mezi přírodním, radiačně značeným ligandem a buňkami. To zahrnuje inkubaci buněk s radiačně značeným ligandem a inhibitorem, následovanou odstraněním nenavázaného a nespecificky vázaného, radiačně značeného ligandu promytím a pak změřením množství vázané radioaktivity.

40 Interleukin-8 (IL-8) je chemotaktický chemický druh, vyskytující se při zánětech ve vazbě na receptory na různých typech buněk. Autoři vynálezu vyvinuli CF-HTS esej ligand – buněčný receptor pro hodnocení inhibitorů této interakce.

Matrice s buňkami

45 HEK buňky (ATCC, Bethesda, MD) exprimující IL-8 receptor byly nakladeny na membránový filtr o průměru 75 mm (Corning Costar Corp., Cambridge, MA) s hustotou kolem 20 milionů buněk na desku. Pro přichycení se k membránovému filtru byly ponechány přes noc v pufru (RPMI od Life Technologies, Grand Island, NY) obsahujícím 10 mM Hepes (Sigma, St. Louis, MO) při pH 7,2 a 37 °C. Potom, když byly buňky přichyceny na filtr, byla média odstraněna a buňky byly promyty čerstvým pufrem, aby se odstranily jakékoliv nepřichycené buňky. Filtry byly obráceny stranou s buňkami dolů a šikmo natočeny, aby mohl přebytek médií odtéci a pak byly 20 minut sušeny. Bylo to načasováno tak, že matrice s buňkami mohla být bezprostředně použita v níže popisovaném esaji.

Matrice s ligandem

Matrice s ligandem byla připravena nasáknutím IL-8 značeného ^{125}I (Amersham, Inc., Arlington Heights, IL) do agarózového gelu vytvořeného smísením 0,1 g agarózy s 10 ml pufru, zahříváním dokud nedojde k roztavení a potom odlitím do přístroje pro gel 8 x 7 x 0,075 cm. Gely byly namáčeny přes noc při RT, za pomalého míchání na rotující desce (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ). Po nasáknutí byly gely, právě před použitím, sušeny 20 minut při RT. Bylo to načasováno tak, že gel mohl být bezprostředně použit v esejí.

Matrice se vzorky

Radiačně neznačený IL-8 (Genzyme Corp., Cambridge, MA) byl za nepřítomnosti známého inhibitoru vazby IL-8 / buněčný receptor použit jako kontrolní vzorek inhibitoru pro sledování inhibice vazby ^{125}I -IL-8 na HEK buňky. Na plastovou fólii jako PVDC bylo rozděleno po jednom mikrolitru 0, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 a 100 μM IL-8 a sušeno bylo 1 h ve vakuu při RT.

Inkubace

Matrice se vzorkem byla umístěna na jednu stranu matrice s ligandem tak, že vysušené tečky s IL-8 přicházejí do styku s povrchem gelu. Gel byl otočen, aby se nechala 10 minut při RT sušit druhá strana, a aby mohl „inhibitor“ difundovat do gelu. Nato potom byly gely umístěny na tu stranu matrice s buňkami, kde buňky nebyly. Pro reakci vzniku vazby se nechalo inkubovat 45 minut při RT. Potom byly gely odstraněny a strana membrány bez buněk byla 4-krát promyta puftrem. Membrány se nechaly úplně vysušit předtím, než byly odstraněny ze své plastové prstenčové podložky. Potom byly membrány zobrazeny buď X-paprsky na film nebo fosforografem (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Obrázek 12 ukazuje odezvu dávky pro ^{125}I -IL-8 v agarózových gelech difundujících skrze matici s buňkami a tvořících vazbu s HEK buňkami exprimujícími receptor IL-8a. Jak je naznačeno, byly některé z agarózových čtverečků o jednom cm^2 nasáknuty roztoky s různými koncentracemi ^{125}I -IL-8. Následně byly ligandem nasáknuté čtverečky uvedeny do styku s maticí s buňkami jak je popsáno shora. Po inkubaci byly čtverečky z matrice s buňkami odstraněny a strana membrány bez buněk byla promyta puftrem. Pro lokalizaci na buňky vázaného ^{125}I -IL-8 byl použit fosforograf. Data ukazují, že přímé radiometrické odečítání při tomto, na gelu založeném esejí s buňkami, je kvantitativně závislé na rozsahu interakce ligand-receptor. Obrázek 12 také naznačuje, že vazebné oblasti zůstávají rozdílné ve tvaru a potvrzuje, že boční difuze signálu není při esejí problémem.

Obrázek 13 ilustruje výsledky pokusu kompetitivní inhibice. Inhibice vazby mezi ^{125}I -IL-8 a HEK buňkami je vyznačena světlými skvrnkami. Je také hned zřejmé, že inhibice neznačkováným IL-8 je kvantifikovatelně závislá na dávce. Tato data značí, že inhibitory, v tomto případě představované neznačkováným IL-8, mohou projít maticí s buňkami a redukovat vazbu mezi ^{125}I -IL-8 a buňkami.

Příklad 7

Esej gel – méně funkční buňky na filtru

Změny buněčných funkcí se často měří sledováním účinků testovaných sloučenin nebo vzorků na reportní systémy vmanipulované do buněk. Příklady zahrnují pozorování účinku na syntézu fluoreskujících intracelulárních proteinů jako zelený fluoreskující protein (GFP), extracelulární proteiny jako receptory nebo adhezni molekuly, nebo specifické enzymy jako luciferázu, chloramfenikolovou acetyltransferázu, nebo β -galaktosidázu (Promega). Nejprve se s buňkami inkubují testované sloučeniny. Potom se buňky ponechají, aby po vhodné dobu exprimovaly

reportní protein (mohou to být minuty, hodiny nebo dny). Potom se přímými metodami (např. GFP) nebo nepřímými metodami (např. ELISA techniky s proteiny vázanými na membránu) analyzuje úroveň reportního proteinu. Dále, v případě enzymů, může být buňka rozrušena, aby se mohl extrahovat reportní protein a analyzovat enzymová aktivita. Při jiných esejích funkčních buněk se měří chování nebo lokalizace specifických molekul jako barviv nebo radiačně značených metabolitů při odezvě na stimulaci receptoru nebo změnách fyziologie buněk jako je potenciál membrány.

ELISA esej měření účinku sloučenin na expresi intracelulární adhezni molekuly-1 (ICAM-1) může být pro CF-HTS upraven následovně. Endotelových buněk exprimujících ICAM-1 bylo kolem 5.000 buněk / mm² nakladeno na polykarbonátovou chemotaxní membránu (Neuroprobe). Buňky byly v médiu inkubovány přes noc při 37 °C. Médium bylo odstraněno a membrány se nechaly částečně usušit 10 minut při RT. Vzorky nebo sloučeniny, které byly testovány na indukci ICAM-1 byly sušeny na plastových fóliích a uvedeny do styku s tou stranou vlhké membrány, kde nebyly buňky. Sloučeniny se ponechaly 1 h při 37 °C interagovat s buňkami ve vlhké komoře a potom byly buňky smočeny v médiu a inkubovány 5 h při 37 °C.

Po poskytnutí času, v němž buňky indukovaný protein syntetizovaly, bylo médium z membrány odstraněno a buňky byly inkubovány v pufru obsahujícím anti-ICAM-1 protilátku (Genzyme, R&D systémy) buď nekonjugovanou nebo konjugovanou s fluorescein-izothiokyanátem (FITC) nebo biotinem. Po 30 minutách inkubace při RT byl pufr odstraněn a buňky byly několikrát promyty, aby se odstranil nenavázaný anti-ICAM-1. V případě konjugované FITC protilátky byla membrána zobrazena za použití CCD kamery (Stratagene, Imaging Research) s excitací při 485 nm a emisí při 520 nm. Sloučeniny, které stimulovaly expresi ICAM-1 budou rezultovat v zóně se zvýšenou fluorescencí díky vázání FITC-anti-ICAM-1 protilátky. V případě protilátky konjugované s biotinem se buňky inkubují při RT 10 minut v pufru obsahujícím avidin-HRP. Pufr se odstraní a nenavázaný avidin-HRP se vymyje. Membrány se potom namočí do pufru obsahujícího substrát precipitující HRP jako tetrachlorid diaminobenzidinu (Pierce) a pozoruje se vývoj zbarvení v místech, kde podložené buňky byly indukovány, aby exprimovaly ICAM-1. V případě nekonjugované anti-ICAM-1 protilátky se s buňkami nechá reagovat konjugovaná sekundární anti-anti-ICAM-1 protilátka a pak následuje vyvolání signálu příslušným substrátem pro konjugát. Obrázky se snímají CCD kamerou. Všechny z těchto variací (FITC, avidin-HRP a anti-anti-ICAM-1) jsou alternativními stanoveními, která by měla poskytovat tytéž kvalitativní výsledky – totiž vzorky, které ovlivňují expresi ICAM-1 mohou být korelovány k zónám zvýšeného nebo sníženého signálu.

Je třeba poznamenat, že matrice pro kontinuální úpravu v tomto případě jsou membrány a plastická fólie. Pro CF-HTS není gel nezbytný.

Příklad 8

CF-HTS esej jednotlivých sloučenin pro inhibici neuraminidázy

Matrice se vzorkem

Sbírka 528 jednotlivých, strukturně příbuzných sloučenin byla testována pomocí CF-HTS. Pro ředění sloučenin z lahviček do 96-jamkových desek a pro ředění a transfer sloučenin na plastové fólie byl použit Packard Multiprobe MP204 DT. Na začátku byly sloučeniny zředěny ze 40 mM v DMSO z lahviček na 4 mM v DMSO do 96-jamkových desek. Potom byly zředěny ze 4 mM v DMSO na 200 μM v 50% EtOH / H₂O v 96-jamkových deskách. Tyto vzorky byly v 1 μl duplikátech přeneseny na plastové fólie 8 cm x 8 cm, průměrně s 5 mm rozestupy mezi vzorky (Bio-Rad kat. č. 165 – 2965), pro celkem 192 vzorků na fólii. Každá 1 μl tečka tedy obsahovala přibližně 200 pmol jednotlivé sloučeniny ze sbírky. Jako kontrola byly na každou fólii blízko sloučeninám ručně rozděleny série ředění 2,3-dehydro-2-deoxy-N-acetylneuraminové kyseliny

(DANA), známého inhibitoru neuraminidázy (Boehringer Mannheim č. 528544). Fólie byly vysušeny ve vakuové sušárně tak, že každá sloučenina byla vysušena na svém vlastním místě na fólii.

5 Matrice s enzymem

Před esejem byl enzym chřipkové neuraminidázy 1500krát naředěn z fosfátem pufované solanky s 25 % glycerolu do zkapalněného agarového gelu sestávajícího z 1 % agarózy, 50 mM citrátu sodného pH 6,0 a 10 mM chloridu vápenatého při 40 °C. Bylo odlito 8 cm x 8 cm x 0,75 mm
10 enzymového gelu a ztuženo snížením teploty na 4 °C.

Matrice se substrátem

Syntetický substrát chřipkové neuraminidázy, 2'-(4-methylumbeliferyl)- α -D-N-acetylneuraminová kyselina (Sigma, kat. č. 8636), byl zředěn z 3 mM v DMSO na 30 μ M do zkapalněného agarového gelu a to bylo odlito podobným způsobem jako je shora popsáno pro gel s enzymem.
15

Inkubace a detekce

20 Matrice s enzymem byla umístěna na matici se vzorkem na tu stranu, kde byly usušeny sloučeniny, o něž se jedná. Potom byla matrice se substrátem naskládána navrch matrice s enzymem. Matrice byly inkubovány 30 minut při RT. Během této doby zhašený fluorescenční substrát a enzym difundovaly spolu mezi dvěma gely, substrát byl enzymem štěpen a způsoboval vzrůst intenzity fluorescence. Bylo to monitorováno excitací při 340 nm a emisí při 450 nm. Sloučeniny,
25 které jsou schopny inhibovat aktivitu enzymu, vzrůst intenzity fluorescence snižovaly na nejmenší míru. Jak u gelů vzrostla ve většině míst intenzita fluorescence, oblasti, které obsahovaly inhibitory enzymu, jež difundovaly do gelu z plastové fólie, byly vidět jako tmavější místa s nižší fluorescencí. To se snadno monitorovalo pomocí CCD kamery s vhodnými filtry pro kontrolu vlnových délek emise a excitace. Identita sloučenin vykazujících zóny inhibice byla stanovena
30 podle umístění zón vzhledem k matici s inhibitorem. Srovnáváním fluorescence DANA kontroly se známými množstvími každého testovaného inhibitoru, bylo pro každou sloučeninu provedeno kvantitativní stanovení IC_{50} .

Všech 528 sloučenin sbírky bylo testováno dvojmo. Celkový objem použitého gelu s enzymem
35 byl 33 ml nebo 31,25 μ l na test. Dále byly všechny sloučeniny testovány současně a podmínky eseje byly ve srovnání s tradičním 96-jamkovým esejem konstantní. Navíc dále, jak ukazuje obrázek 14, byl esej dostatečně citlivý, aby detekoval inhibitory o síle pouhých 100 μ M. IC_{50} hodnoty nalezené pro aktivní sloučeniny dobře souhlasí s těmi, které byly zjištěny pro tytéž
40 sloučeniny při nákladnějším 96-jamkovém esej, který na test vyžadoval 200 μ l. Viz tabulku „Výsledky kvantitativního gelového eseje“. Tyto příklady ukazují, že testování sloučenin ve skupinách s vysokou hustotou snižuje náklady a čas. Na příklad i menší redukce rozestupu sloučenin na 2,5 mm namísto 5 mm má za následek čtyřnásobný vzrůst počtu sloučenin
testovaných v jednotce objemu. U tohoto pokusu by to na testovanou sloučeninu přineslo snížení objemu pod 10 μ l. S reagenty se ještě zachází pohromadě, bez nutnosti mít zařízení pro manipu-
45 laci s malými objemy kapalin používaných při miniaturizovaném screeningu.

Jako příklad sledovaný pro demonstraci výhod této miniaturizace bylo pomocí CF-HTS testováno 10 080 jednotlivých sloučenin při celkovém objemu enzymového gelu 17 ml (méně než 2 μ l na test). Pro rozmístění 30 nl každého ze vzorků oddělených po 1 mm byla použita „Packard
50 Multipette“. Sloučeniny byly rozmísťovány v DMSO při koncentraci 5 mM tak, že přibližně 150 pmol každé sloučeniny bylo nanášeno na plast. Jako kontrolní inhibitor byl znovu použit DANA. Vedle obvyklé kontrolní titrace mimo soubor sloučenin, byl uvnitř samotného souboru zahrnut slepý pokus, při kterém byly kontrolní vzorky ošetřeny stejně jako 10 080 neznámých, když byly rozmísťovány na plast. Jako předtím byly fólie usušeny a použity v esejích s neuramini-

- dázou. Všechny 10 080 vzorků bylo touto metodou současně prozkoumáno za méně než jednu hodinu. Opět nebyla zapotřebí mikrofluidika a/nebo manipulace s malými objemy kromě okamžiku, když byly sloučeniny na počátku rozmístovány na fólii. Extrémně vysoká hustota při tomto esaji neinterferovala s detekcí inhibitoru. Navíc dále vysoká hustota nekomplikovala identifikaci aktivních sloučenin i když fluorescenční sloučeniny (snadno pozorovatelné v gelu jako jasnější skvrny) byly v nejbližším sousedství aktivních sloučenin. Viz obrázek 15.

Výsledky kvantitativního gelového esaje

Vzorek č.	Přibližné max. K_i (μM) z gelu	IC_{50} (μM) zjištěné při 96-jamkovém esaji
34	100	>100
35	80	>100
36	80	42
37	100	>100
38	100	>100
39	100	>100
40	40	32
41	100	>100
42	40	50
43	100	>100
44	>200	>100
45	100	>100
46	100	>100
47	10	7,5
48	100	>100
49	100	>100
50	100	>100

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob současného testování množství vzorků různých látek na jejich způsobilost zesilovat nebo inhibovat biologický proces, zahrnující
 - (a) uložení malého objemu každého z více než 96 vzorků rozdílných látek v uspořádání na matici tak, že každá jednotlivá látka je soustředěna na své vlastní odlišené místo a identita každé látky může být určena z jejího místa uložení,
 - (b) uvedení této matrice do styku s první porézní maticí obsahující nebo nesoucí rovnoměrně rozptýlené zkušební činidlo a umožnění, aby část z každé látky difundovala do uvedené porézní matrice takovým způsobem, že prostorové umístění každé difundované látky může být korelováno s místem na uvedené matici, na kterém byla uvedena látka původně uložena, a

- (c) provedení testu pro stanovení způsobilosti každé difundované látky zesilovat nebo inhibovat uvedený biologický proces pozorováním interakce každé látky s uvedeným zkušebním činidlem,

v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou maticí je planární matrice.

5

2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zahrnuje další stupeň

10

- (b1) uvedení uvedené první porézní matrice do styku s druhou maticí nesoucí nebo obsahující rovnoměrně rozptýlené druhé zkušební činidlo a umožnění, aby druhé zkušební činidlo difundovalo do první porézní matrice, nebo umožnění, aby každá látka a první činidlo difundovaly do druhé matrice, přičemž se v posledním případě zajistí, že difuze probíhá takovým způsobem, že umístění každé látky na druhé matici může být korelováno s místem na uvedené planární matici, na kterém byla uvedená látka původně uložena, a

15

- (d) provedení stupně (c).

20

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jedním z rovnoměrně rozptýlených zkušebních činidel je makromolekula.

4. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jedním z rovnoměrně rozptýlených zkušebních činidel je enzym.

25

5. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jedním z rovnoměrně rozptýlených zkušebních činidel je surový biologický extrakt.

6. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jedním z rovnoměrně rozptýlených zkušebních činidel jsou organely.

30

7. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jedním z rovnoměrně rozptýlených zkušebních činidel jsou celé buňky.

35

8. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jedním z rovnoměrně rozptýlených zkušebních činidel jsou celé buňky nesené na jednom povrchu planární porézní matrice.

40

9. Způsob podle nároku 8, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se uvedená interakce zaznamenává stykem uvedené porézní matrice s roztokem nebo kapalnou suspenzí činidla nebo porézní matrice obsahující činidlo, které v jednom i ve druhém případě napomáhá zviditelnění proteinu, jehož exprese v uvedených celých buňkách je biologickým procesem, který je hodnocen.

10. Způsob podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že prvním zkušebním činidlem je značený ligand a druhým zkušebním činidlem je imobilizovaný receptor pro uvedený ligand.

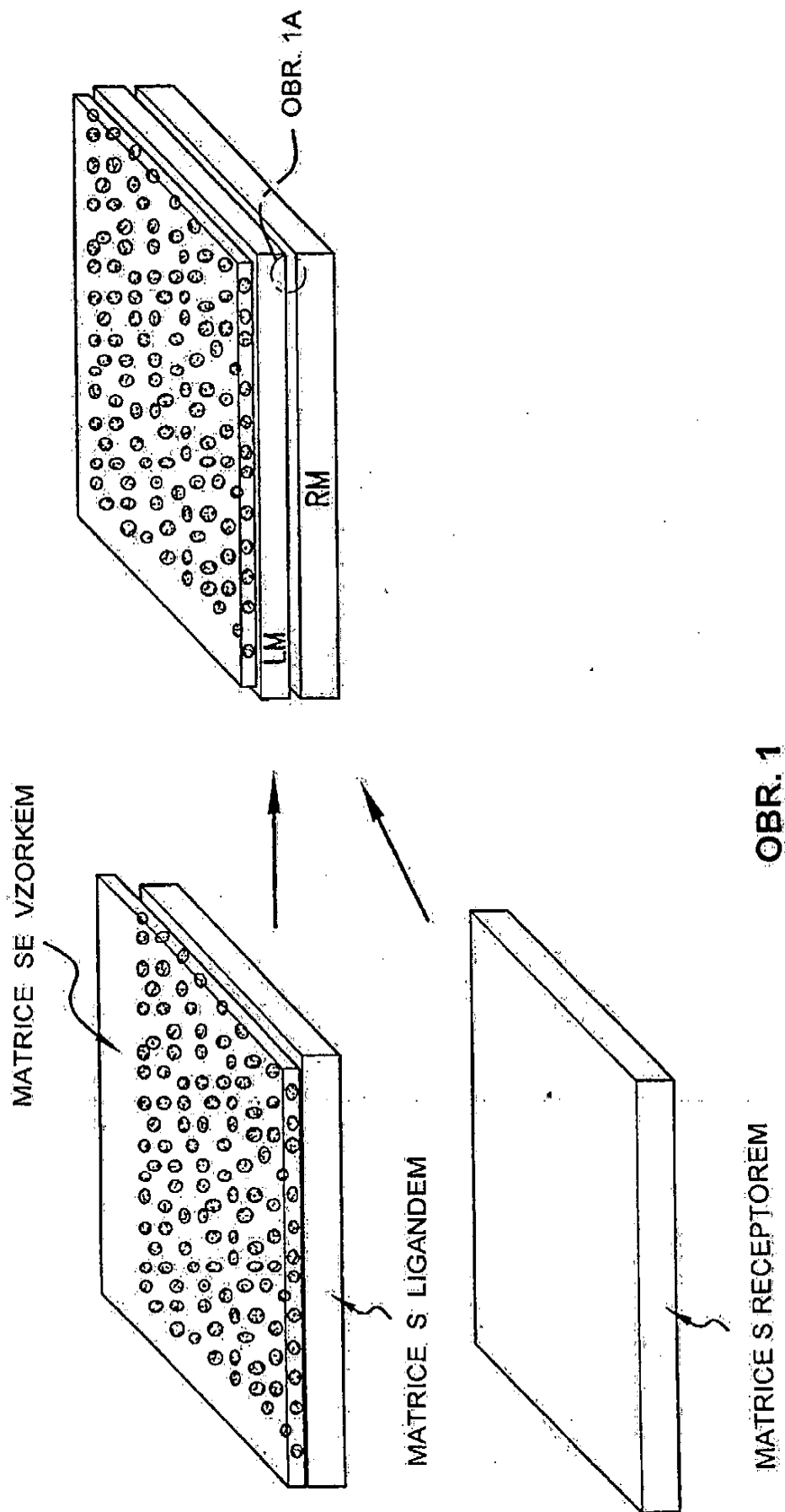
45

11. Způsob podle nároku 10, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se druhá planární matrice vymývá pro odstranění veškerého značeného ligandu, který difundoval na nebo do uvedené druhé planární matrice, ale nenavázal se na uvedený imobilizovaný receptor.

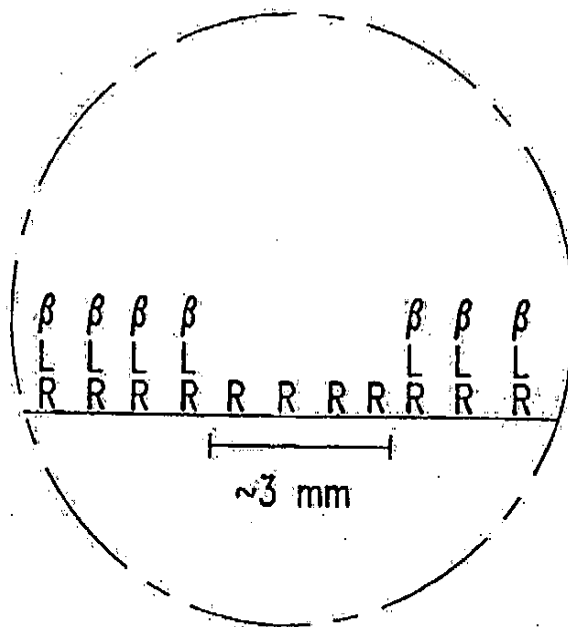
50

12. Způsob podle nároku 11, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se uvedená druhá matrice uvede do styku s roztokem nebo kapalnou suspenzí činidla nebo porézní matrice obsahující činidlo, které v jednom i druhém případě napomáhá při vizualizaci značeného ligandu, neodstraněného ve vymývacím stupni.

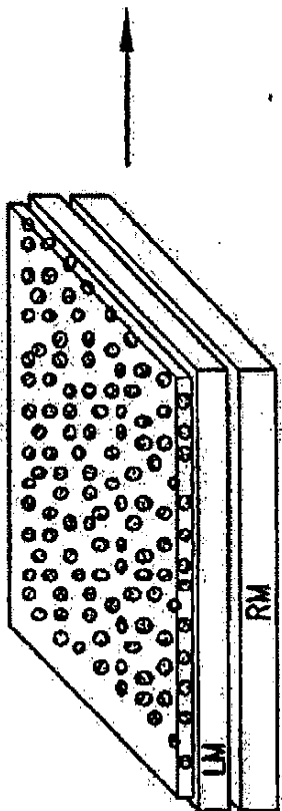
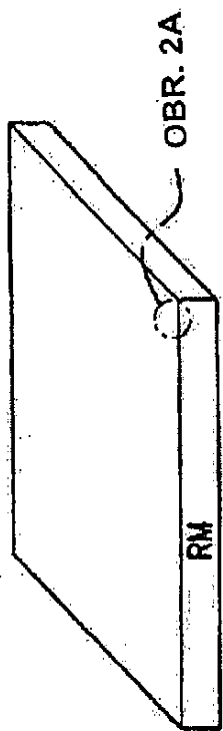
55



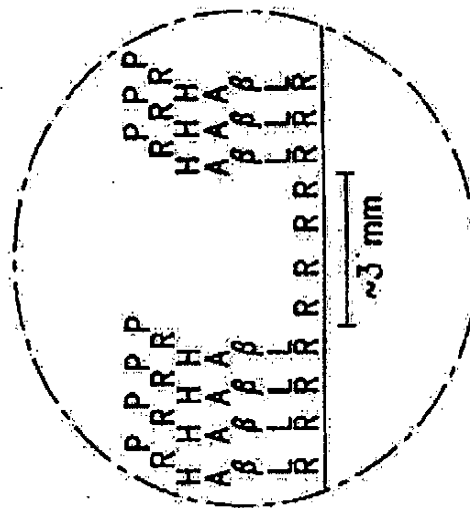
OBR. 1



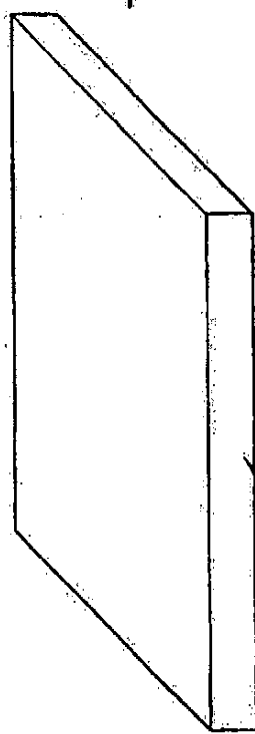
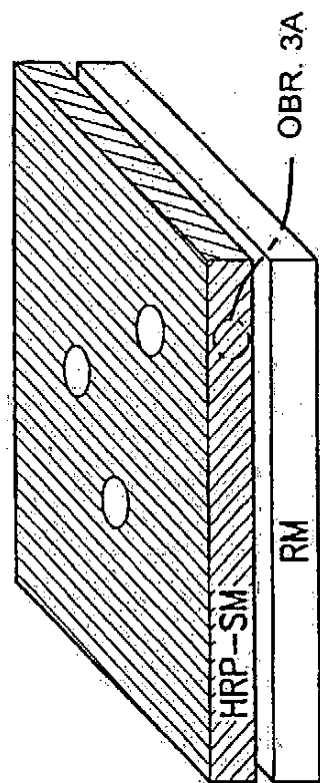
OBR. 1A



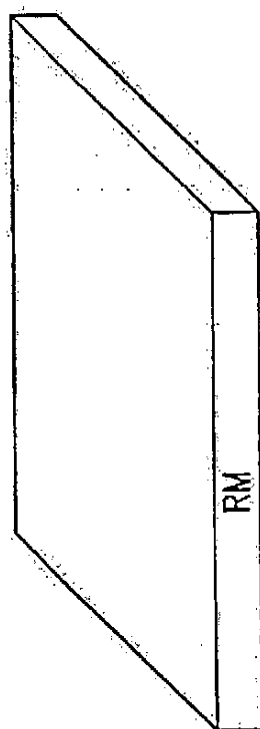
OBR. 2



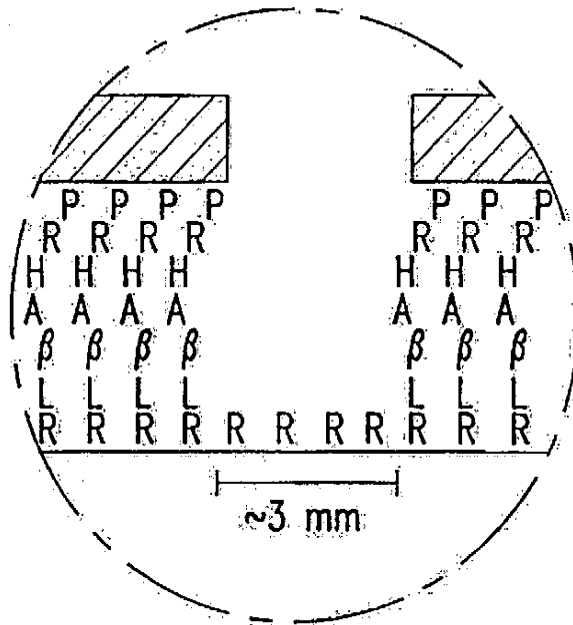
OBR. 2A



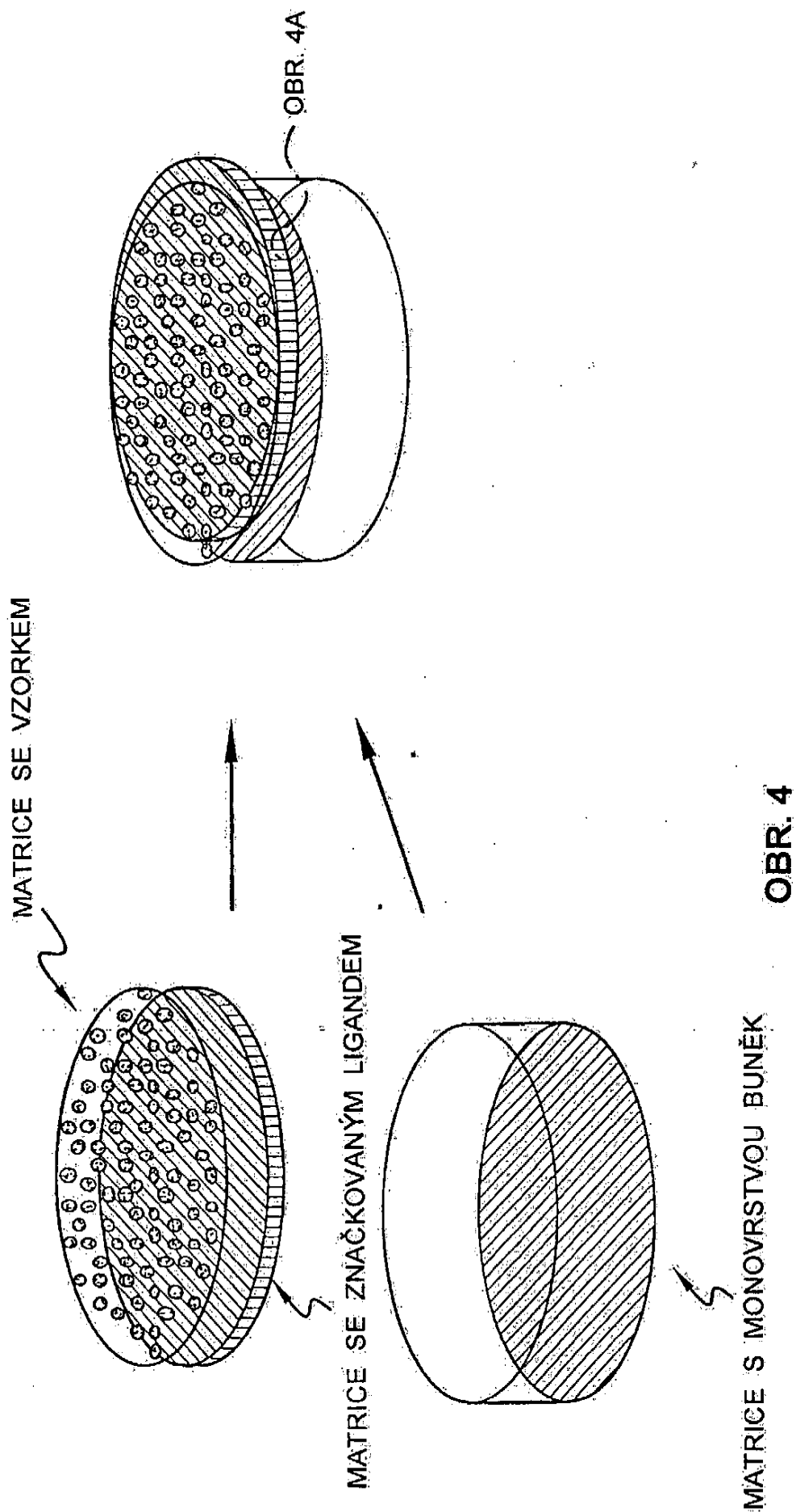
HPR MATRICE SE SUBSTRÁTEM



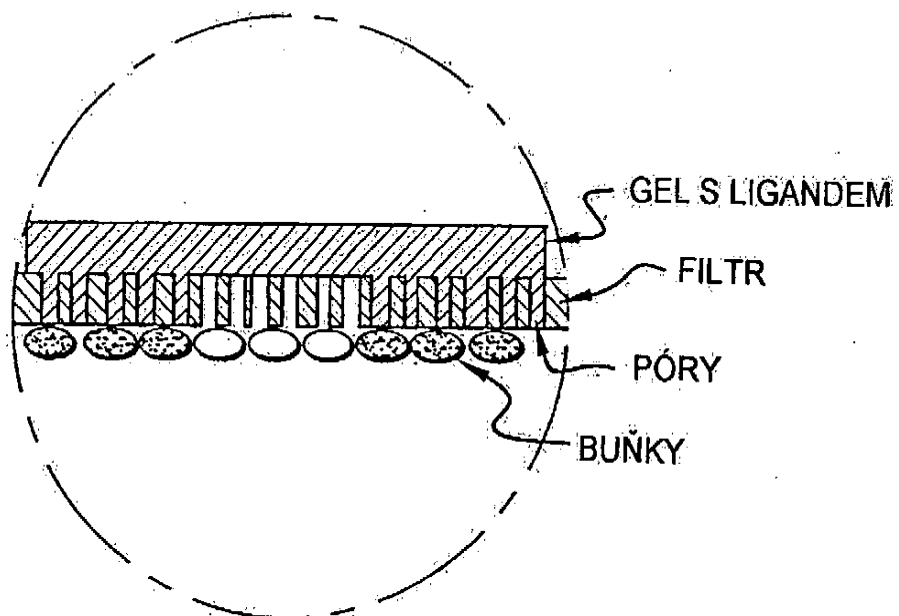
OBR. 3



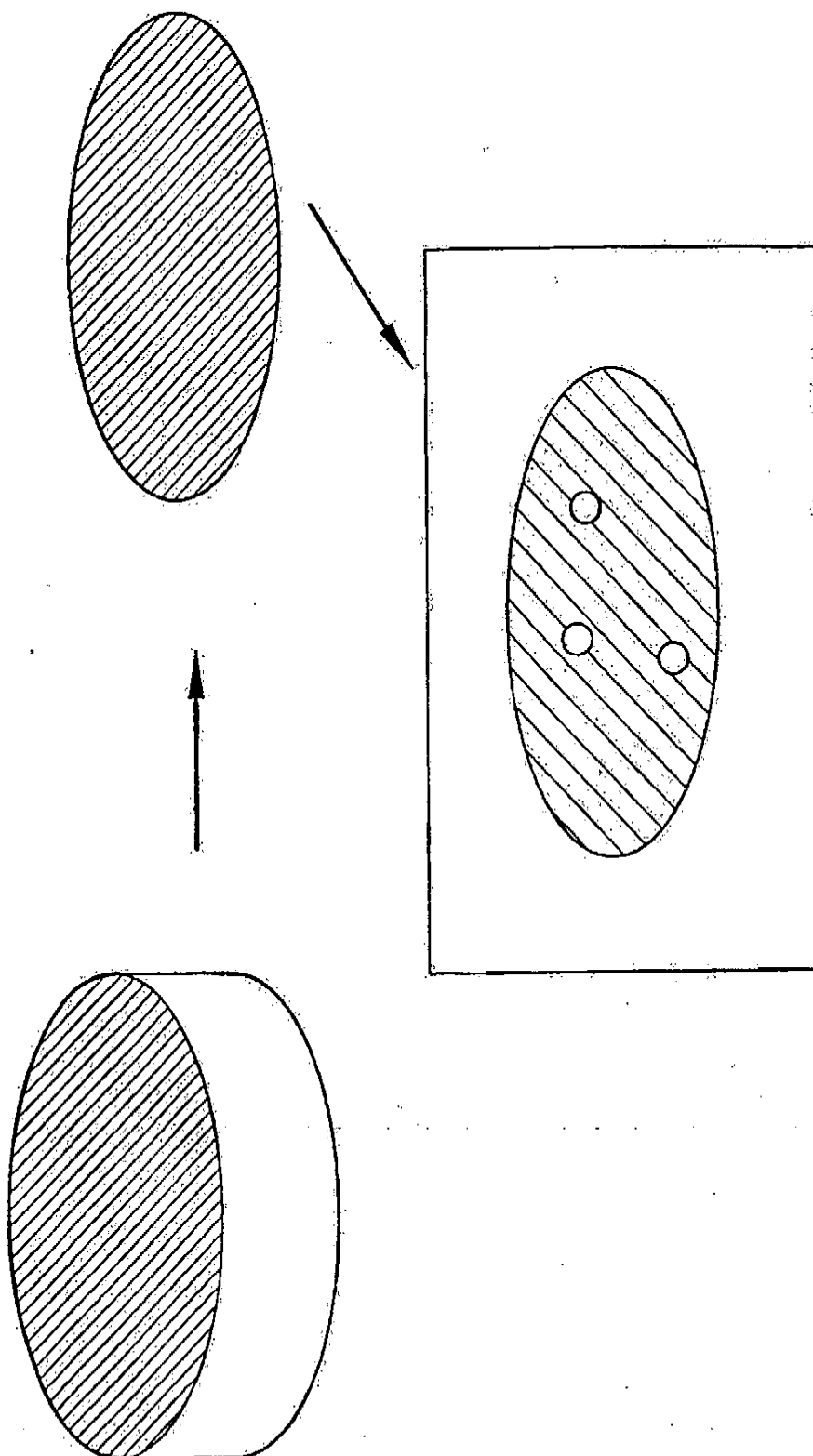
OBR. 3A



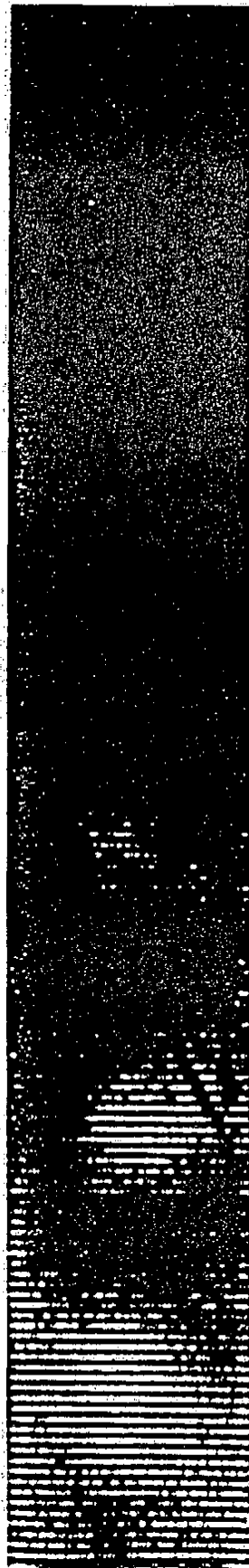
OBR. 4



OBR. 4A



OBR. 5



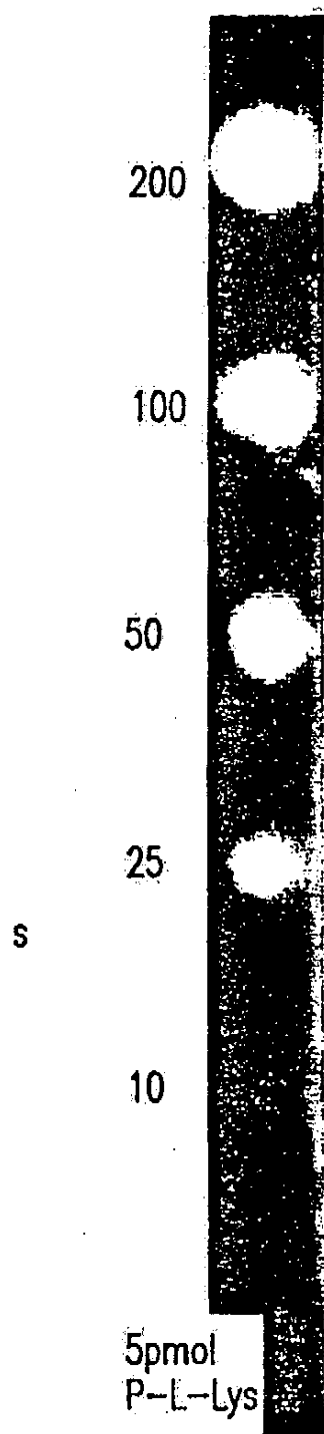
0.5 nmol

1 nmol

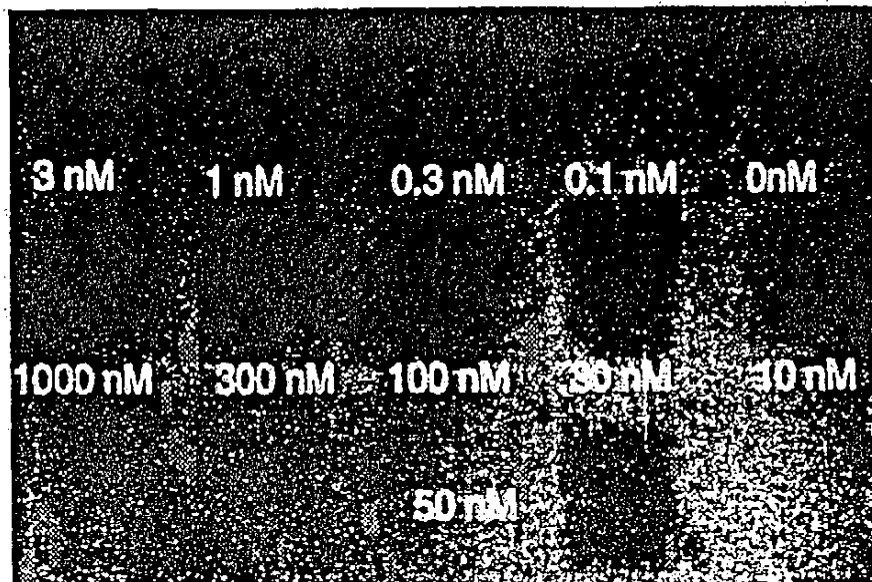
2 nmol

5 nmol

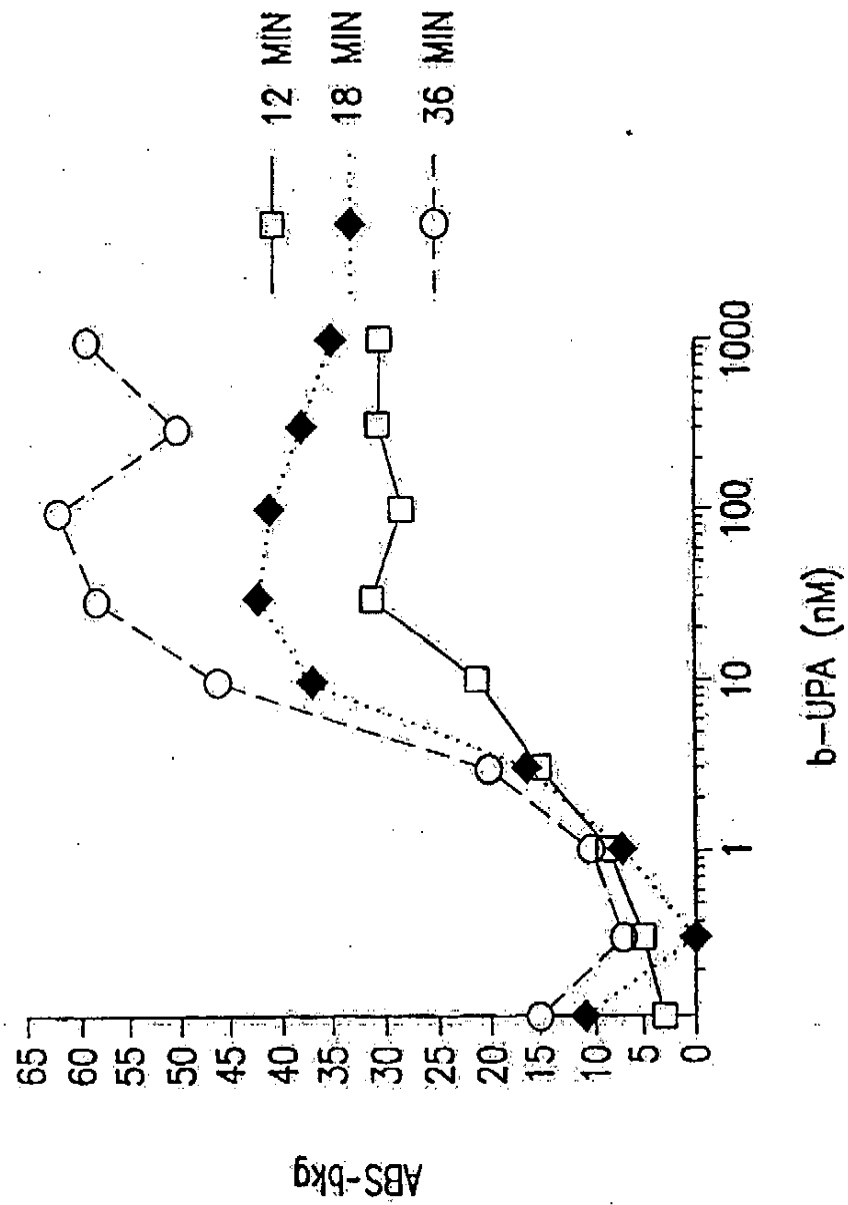
OBR. 6

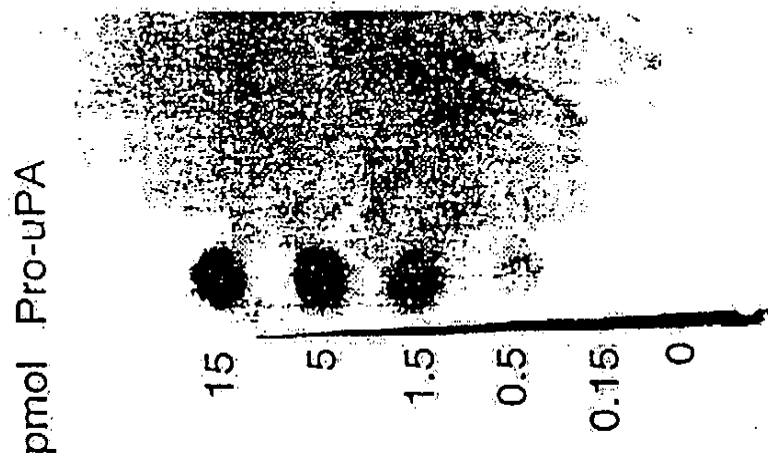
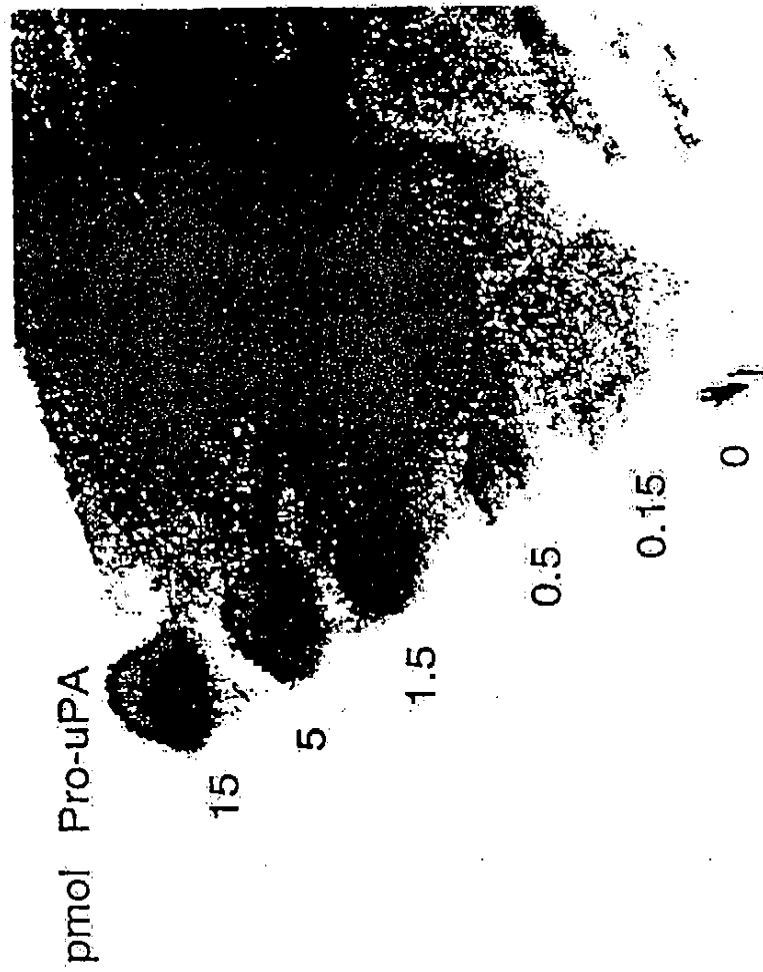


OBR. 7



OBR. 8A





ITAM*
(nM)

0.1

0.3

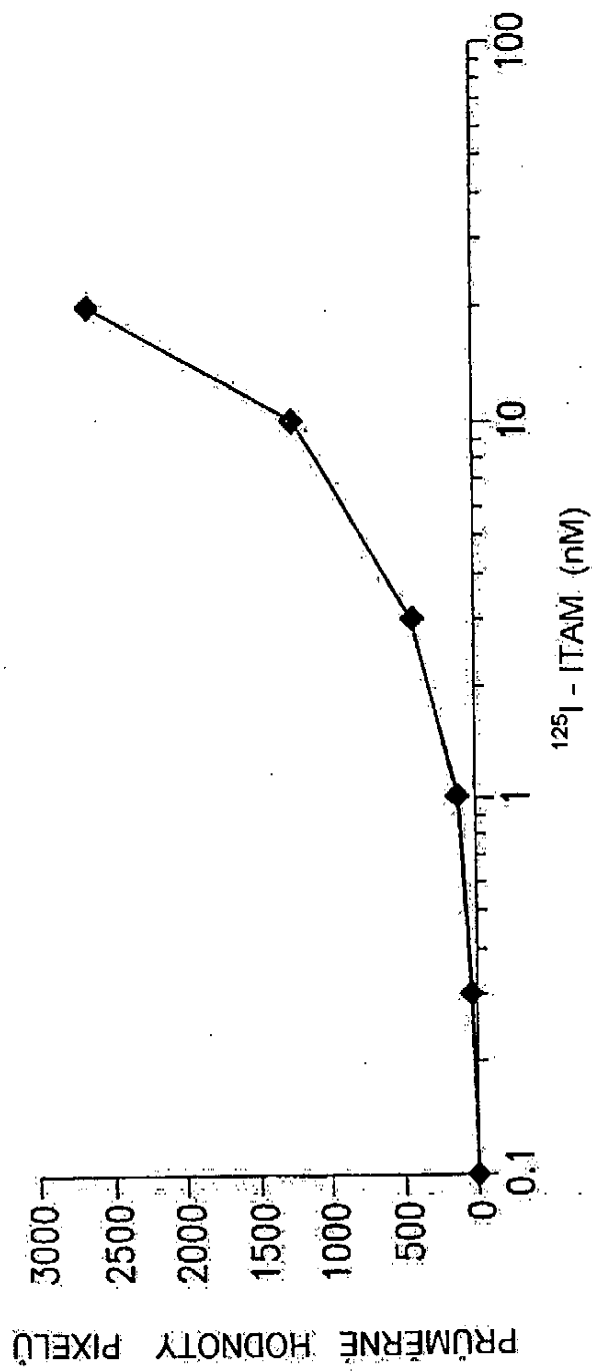
1.0

3.0

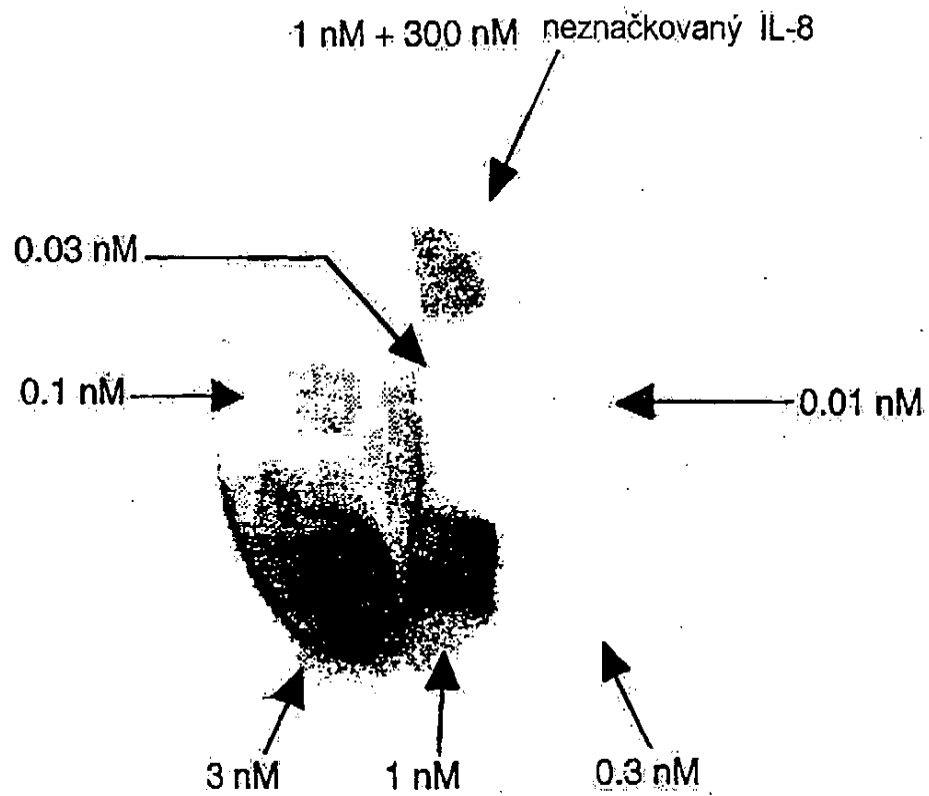
10

20

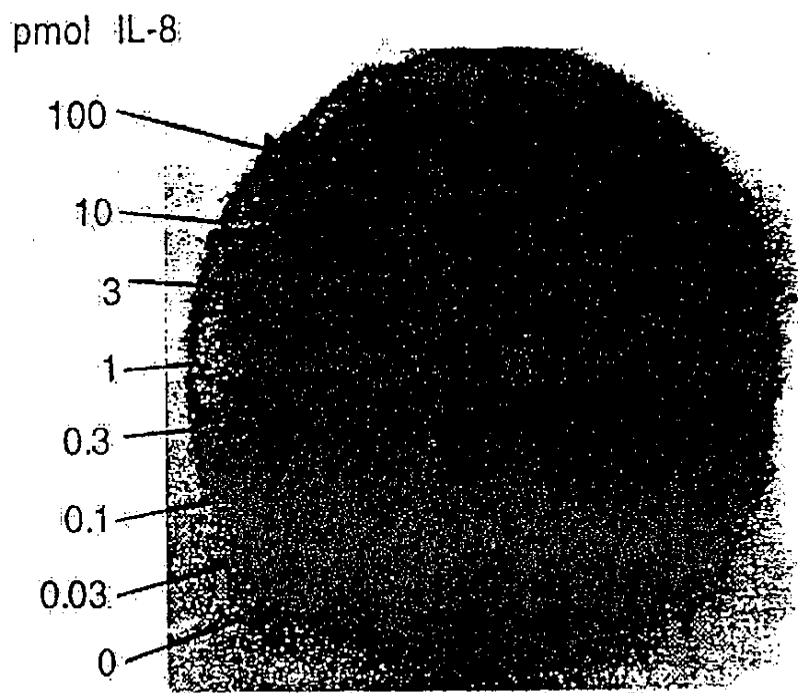
OBR. 10



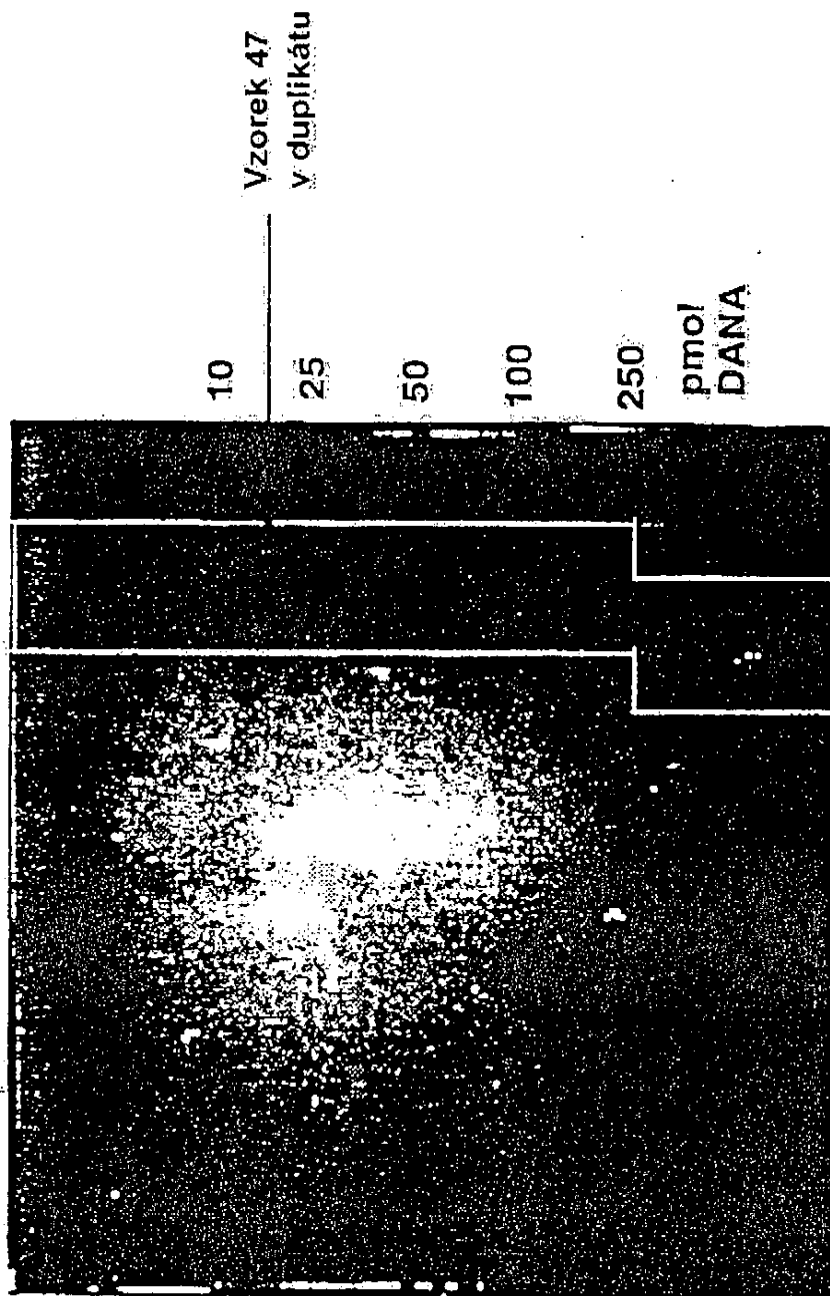
OBR. 11



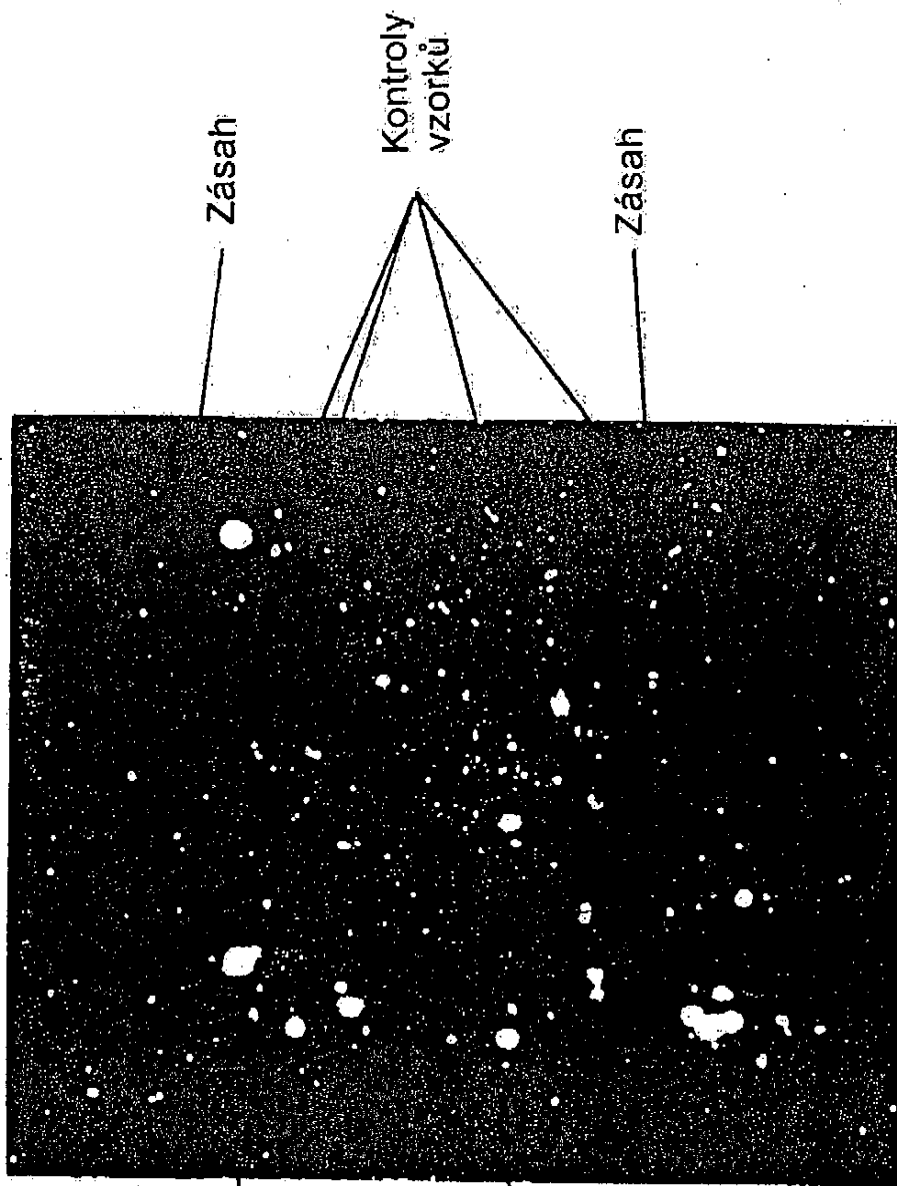
OBR. 12



OBR. 13



OBR. 14



OBR. 15

Fluorescenční
sloučenina

Kontrolní titrace

Konec dokumentu