

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2003-3143

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

G 01 N 33/68

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21.05.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.05.2001 24.10.2001**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/292548 2001/334901**
(33) Země priority: **US US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:
(Věstník č: 4/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/US2002/016098**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/095356**

(71) Přihlašovatel:

ACLARA BIOSCIENCES, INC., Mountain View, CA,
US

(72) Původce:

Singh Sharat, San Jose, CA, US
Salimi-Moosavi Hossein, Sunnyvale, CA, US
Tahir Syed Hasan, Foster City, CA, US
Wallweber Gerald J., La Honda, CA, US
Kirakossoan Hrair, San Jose, CA, US
Matray Tracy J., San Lorenzo, CA, US
Hernandez Vincent S., San Lorenzo, CA, US

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000

E je elektroforetický indikátor a k je celé číslo větší nebo rovno 1, přičemž každé odlišné T se pojí k různému E a takové E má optické znaky a/nebo elektroforetické pohyblivosti odlišné od ostatních E.

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob a prostředky pro analýzu proteinů

(57) Anotace:

Způsob stanovení přítomnosti nebo nepřítomnosti jednoho nebo několika cílových polypeptidů ve vzorku tyto polypeptidy obsahujícím spočívá v tom, že se připojí klasifikačně specifické činidlo mající skupinu indukující štěpení v účinné blízkosti a základní činidlo specifické pro posttranslační modifikace na jednom nebo několika cílových polypeptidech a že se připojí pomocí štěpitelné vazby jedna nebo několik elektroforetických sond majících vazebnou skupinu specifickou pro cílový polypeptid a jeden nebo několik elektroforetických indikátorů a že se smíchá vzorek, klasifikačně specifické činidlo a jedna nebo několik elektroforetických sond a tím se naváže klasifikačně specifické činidlo a jedna nebo několik elektroforetických sond k jednomu nebo několika cílovým polypeptidům a že se uvolní alespoň jeden nebo několik elektroforetických indikátorů po odštěpení štěpitelné vazby jedné nebo několika elektroforetických sond v blízkosti skupiny indukující štěpení a že se elektroforeticky oddělí uvolněné elektroforetické indikátory a že se určí přítomnost nebo nepřítomnost jednoho nebo několika cílových polypeptidů na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti uvolněných elektroforetických indikátorů. Prostředek pro detekci jednoho nebo několika cílových polypeptidů obsahuje řadu elektroforetických sond definovaných vzorcem $T - (L - E)_k$, kde T je vazebná skupina specifická pro cílový polypeptid, L je oxidačně labilní vazba,

Způsoby a prostředky na analýzu proteinů

Oblast techniky

Předložený vynález se týká oddělitelných prostředků, způsobů a souprav používaných k detekci a stanovení množství peptidů. Vynález nalézá konkrétní uplatnění v oblasti několikanásobných kvantitativních rozborů polypeptidů, zahrnující proteiny účastnící se posttranslačních dějů.

Dosavadní stav techniky

Potřeba stanovit mnoho analytů včetně polypeptidů a sekvencí nukleových kyselin v krvi nebo ostatních biologických tekutinách se stává stále více samozřejmostí v mnoha odvětvích medicíny. Většina kvantitativních rozborů pro několik analytů, jakými jsou kvantitativní rozborů v oblasti genomiky, které detekují rozmanité sekvence nukleových kyselin, zahrnují mnoho kroků, mají nízkou citlivost, omezený dynamický rozsah (typicky 2 až 100 odlišností, z nichž některé vyžadují náročné přístrojové vybavení). Některé z doposud známých klasických metod pro kvantitativní rozborů několika analytů se skládají z následujících položek:

- a) použití dvou různých radioizotopových značek pro odlišení dvou rozdílných analytů
- b) použití dvou nebo několika různých fluorescenčních značek pro odlišení dvou nebo několika analytů
- c) použití chelátů lanthanidu, kde jak poločas rozpadu tak vlnová délka jsou použity k odlišení dvou nebo několika analytů
- d) použití fluorescenčních a chemiluminiscenčních značek pro odlišení dvou nebo několika analytů
- e) použití dvou různých enzymů pro odlišení dvou nebo několika analytů
- f) použití enzymu a esterů akridinia pro odlišení dvou nebo několika analytů
- g) prostorové rozlišení různých analytů, například u rozborů pro identifikaci a určení množství několika analytů
- h) použití značek esterů akridinia, kde poločas nebo tvorba dioxetanonu jsou použity k určení množství dvou odlišných virových cílových molekul

Proteomika přišla v úvahu během několika posledních let. Protože je proteomika více komplexní než genomika, analýza proteinů dává přesnější obrázek o buněčné biologii než studium mRNA. Oblast proteomiky je velmi široká a zahrnuje takové oblasti jako například analýzu proteinů pomocí dvourozměrné gelové elektroforézy a hmotnostní spektrometrii ke studiu: proteinů exprimovaných v buňce, interakcí protein-protein s využitím alespoň dvouhybridních metod, analýzy syntetických drah, aby bylo porozuměno signálům transdukce a ostatním komplexním buněčným pochodům - velkorozměrové skládání proteinu, trojrozměrné strukturní analýzy, exprese s vysokou účinností a purifikace proteinů, buněčné exprese během metabolismu, mitózy, meiózy, jako odpovědi na vnější podnět,

tj. léčivo, vir, změnu fyzikálních nebo chemických podmínek zahrnující nadbytek nebo nedostatek živin a kofaktorů, stres, věk, přítomnost konkrétních kmenů daného organismu a identifikace organismu a kmene, několikanásobné rezistence vůči léčivům, interakce protein – DNA, interakce protein – peptid a podobně. Je nezbytné mít prostředky k identifikaci velkého počtu proteinů v jednotlivém vzorku stejně jako zajistit různé proteiny, které jsou k identifikaci určené.

S tím jak dochází k objasňování lidského genomu, přibývá stále více možností, jak provést diagnostické postupy, týkající se kódujících sekvencí genů. Jednou z hlavních funkcí genů je vytváření proteinů, které hrají důležitou roli v činnostech uskutečňovaných buňkou. Protože funkce proteinů v buňce jsou dynamické, struktura, koncentrace, lokalizace konkrétního proteinu se v konkrétním časovém období mění. Analýza modelů exprese proteinů je předmětem probíhajících genomických projektů. Studie fyziologicky aktivních forem proteinů a jejich prostorových a časových interakcí v buňce je důležitým hlediskem všech výzkumů. Jednou z posttranslačních modifikací proteinů je přidání nebo odstranění fosfátové skupiny. Fosorylace nebo defosforylace proteinu byly shledány jako hlavní součásti metabolické regulace a přenosu signálů v metabolických drahách. Různorodost fosforylace proteinů zajišťuje hlavní prostředky enzymatické regulace známé v biologických systémech, zvláště v regulaci přenosu signálů z receptorů buněčného povrchu. Reverzibilní fosforylace je důležitá pro přenos regulačních signálů, včetně proliferačních signálů ve všech živých buňkách. K porozumění molekulárního základu těchto regulačních mechanismů je nezbytné identifikovat specifické aminokyselinové zbytky, které byly fosforylovány. Identifikováním substrátů a míst fosforylace mohou být vyvinuty diagnostické nástroje

pro dané nádory a modifikace samotného postupu může být cílovým místem pro léčebný zásah.

Polypeptidy jakými jsou růstové faktory, diferenciacní faktory a hormony jsou rozhodující součástí regulačního systému, který koordinuje vývoj mnohobuněčného organismu. Mnoho z těchto faktorů zprostředkovává pleiotropické děje pomocí vazby a aktivace receptorů buněčného povrchu s vnitřní tyrosin kinázovou aktivitou. Změny v chování buňky indukované extracelulárními signalizačními molekulami jakými jsou růstové faktory a cytokiny vyžadují provedení souhrnného postupu transkripčních kroků. K aktivaci nebo represi transkripce musí být umístěny transkripční faktory v jádře, musí vázat DNA a vzájemně reagovat se základním transkripčním aparátem. V souladu s tím pak mohou extracelulární signály regulující aktivitu transkripčních faktorů ovlivnit jeden nebo více takových procesů. Nejvíce běžná je regulace dosažená pomocí reverzibilní fosforylace. Fosforylace transkripčního faktoru pomocí několika různých kináz (nebo pomocí kinázy propojené s více než jednou metabolickou dráhou) je jednoduchým mechanismem, který dovoluje různým signálům se spojit se stejným faktorem.

V literatuře existuje řada přístupů, které směřují k analýze fosforylace. Jednou z takových metod je dvourozměrné mapování fosfopeptidu v proteinech značených ^{32}P . Další přístup využívá hmotnostní spektrometrie k analýze neradioaktivně značených fosfoproteinů. V dalším přístupu (Cao, et al., Rapid Commun Mass Spectrom.(2000)14:1600-1606) jsou místa fosforylace proteinů mapována s použitím on-line (za sebou řazené) afinitní chromatografie s imobilizovaným kovem (IMAC)/kapilární elektroforézy (CE)/hmotnostní spektrometrie (MS) tandemově uspořádané s několikastupňovou „elektrospray“ ionizací. IMAC pryskyřice zadrží a zahustí fosforylované proteiny a peptidy, CE oddělí fosfopeptidy vymyté ze směsi z IMAC pryskyřice a MS poskytne informaci včetně fosforylačních míst každé podjednotky.

Postup mikropurifikace fosforylovaných peptidů jako první část analýzy hmotnostní spektrometrie je popsána v Posewitz, et al., Anal. Chem. (1997) 71:2883-2892. Afinitní chromatografie s imobilizovaným kovem v mikrotipovém formátu a konkrétně je použita v kombinaci s ionty galia III. Fosfopeptidy jsou získány téměř kvantitativním a vysoce selektivním způsobem, tím je získán koncentrovaný vzorek pro přímou analýzu pomocí měření doby letu částic v matrix laserové desorpci/ionizaci a hmotnostní spektrometrie s nanoelektrospray ionizací.

Nicméně stále jsou třeba postupy k identifikaci, určení aktivity a nebo určení přítomnosti nebo množství polypeptidů účastnících se posttranslačních modifikačních postupů. Způsoby jsou schopné identifikovat uskutečněnou modifikaci, místo nebo místa modifikace a lokalizovat místa modifikace. Způsoby by měly využívat klasifikačně specifických činidel tam, kde je třeba a jsou schopné detekovat rozmanité peptidy v jednom kvantitativním rozboru, tj. mají vysoký stupeň multiplexní kapacity. Způsoby poskytují stanovení v reálném čase a umožňují určení významu určitých peptidů v biologických drahách. Nejdůležitější je, aby způsob umožňoval multiplexování za účelem stanovení zda je konkrétní dráha aktivována.

Podstata vynálezu

Jedním z předmětů předloženého vynálezu je způsob určení přítomnosti a nebo určení množství jednoho nebo několika cílových polypeptidů ve vzorku, u nějž se předpokládá, že obsahuje cílové peptidy. Vytvořená směs obsahuje (i) vzorek, (ii) základní činidlo (v tomto dokumentu také označované jako „klasifikačně specifické činidlo“) obsahující skupinu indukující štěpení a základní vazebné činidlo specifické za posttranslační modifikaci na jednom nebo více cílových peptidech a (iii) jeden nebo několika elektroforetických indikátorů, které jsou k tomu všemu připojeny pomocí štěpitelné vazby. Tato směs je vystavena podmínkám, při kterých se dosáhne spojení odpovídajícího vazebného činidla s danými skupinami. Interakce mezi prvním vazebným činidlem a posttranslační modifikací způsobí, že se skupina se štěpitelnou vazbou dostane do blízkosti (v tomto dokumentu také označované jako „účinná blízkost“) štěpitelné vazby, která je na sondě připojené k polypeptidu a štěpení přístupná pouze pokud je v blízkosti skupiny indukující štěpení. Tímto způsobem mohou být pro každý z polypeptidů uvolněny z elektroforetické sondy elektroforetické indikátory a to pouze v případě dojde-li k vazbě. Uvolněné elektroforetické indikátory jsou potom odděleny a přítomnost a nebo množství cílových polypeptidů jsou stanoveny na základě shodnosti a množství odpovídajících indikátorů. Každý elektroforetický indikátor má jedinečný optický a nebo nábojově množstevní znak.

Jiným provedením předloženého vynálezu je způsob provedení multiplexního kvantitativního rozboru na stanovení velkého množství cílových polypeptidů ve vzorku, ve kterém byly polypeptidy podrobeny fosforylaci. Vzorek je smíchán s prvním činidlem obsahujícím skupinu indukující štěpení a základní vazebné

čínidlo obsahující afinitní nosič a velké množství elektroforetických sond. Každá z elektroforetických sond obsahuje vazebnou skupinu k danému cílovému polypeptidu a štěpitelný nebo uvolnitelný elektroforetický indikátor. Směs je vystavena podmínkám, při kterých se naváže základní vazebné čínidlo k cílovým polypeptidům. Elektroforetický indikátor v každé elektroforetické sondě obsahuje i) štěpitelnou vazbu, která je přístupná štěpení pouze v blízkosti skupiny indukující štěpení a ii) detekční skupinu, která má jedinečné elektroforetické a nebo optické vlastnosti. Interakce mezi základním vazebným čínidlem a cílovými polypeptidy přenesou skupinu indukující štěpení do těsné blízkosti štěpitelné vazby. Elektroforetické indikátory jsou z elektroforetických sond, které jsou navázány na cílové polypeptidy, uvolněny rozštěpením štěpitelné vazby. Uvolněné indikátory jsou identifikovány pomocí způsobu separace a optických znaků, které jsou pro daný indikátor jedinečné a je tak určena přítomnost cílového polypeptidu ve vzorku. Elektroforetické indikátory mají jedinečné elektroforetické pohyblivosti a nebo fluorescenční znaky.

Jiným provedením předloženého vynálezu je prostředek používáný k detekci přítomnosti, množství a nebo aktivity každého z jakkoli velkých množství cílových polypeptidů v předem stanovené posttranslační třídě, jakými jsou fosforylované proteiny, glykoproteiny, od lipidů odvozené proteiny a podobně. Směs se skládá z klasifikačně specifického čínidla, které obsahuje skupinu indukující štěpení a základního vazebného čínidla pro vazebné místo posttranslační modifikace cílového polypeptidu. Stanovit lze buď samotný cílový polypeptid nebo čínidlo účastnící se posttranslační modifikace cílového polypeptidu. Prostředek může být součástí sady, která také obsahuje kombinaci velkého množství elektroforetických sond, kdy každá z těchto sond obsahuje další vazebné čínidlo k danému cílovému polypeptidu a štěpitelný elektroforetický indikátor. Štěpitelný indikátor v každé elektroforetické sondě zahrnuje štěpitelnou skupinu, která je přístupná štěpení pouze je-li v blízkosti skupiny indukující štěpení a alespoň jedné detekční skupiny mající jedinečné elektroforetické a nebo optické znaky.

Stručný popis obrázků

Obrázek 1 znázorňuje jeden z možných syntetických přístupů začínající s komerčně dostupným 6-karboxyfluoresceinem, kde jsou pomocí anhydridu chráněny

fenohydroxylové skupiny. Při zpracování pomocí standardní extrakce bylo získáno 95 % produktu. Tento materiál byl podroben fosfitylaci a vznikl tak monomeru fosforamiditu.

Obrázek 2 znázorňuje použití symetrického bis-aminoalkoholového linkeru, jako aminalkoholu se sekundárním aminem, které jsou spojeny s velkým množstvím derivátů karboxylové kyseliny.

Obrázek 3 znázorňuje strukturu několika derivátů kyseliny benzoové, které slouží jako látky modifikující pohyblivost.

Obrázek 4 znázorňuje použití alternativního přístupu, který používá 5-aminofluoresceinu jako počátečního materiálu a stejného počtu kroků k jeho přeměně na příslušný chráněný monomer fosforamiditu.

Obrázek 5 znázorňuje několik látek modifikujících pohyblivost, které lze použít pro přeměnu amino-barviva na monomery e-indikátor fosforamiditu.

Obrázek 6 A-B znázorňuje deriváty fluoresceinu, které mohou být použity pro konstrukci elektroforetického indikátoru podle předloženého vynálezu.

Obrázek 7 znázorňuje použití předloženého vynálezu k proteomickým studiím.

Obrázek 8 je kresba znázorňující hlavní fáze buněčného cyklu, aktivní molekuly a procesy každé z fází.

Obrázky 9 A-C jsou kresby elektroforegramů, znázorňující cílový objev a validaci využívající kvantitativních rozborů na buněčném základě s činidlem obsahujícím e-indikátor a přírodními produkty. Obrázek 9A ukazuje hypotetické výsledky z nesynchronizované buněčné populace, obrázek 9B ukazuje výsledky získané z buněk zachycených v rané fázi G1, obrázek 9C ukazuje výsledky získané z buněk zachycených v pozdní G1 fázi.

Obrázky 10 A-F znázorňují oxidačně labilní vazby a jejich odpovídající štěpící reakce zprostředkované díky singletovému kyslíku.

Obrázek 11 je kresba znázorňující použití činidel tohoto vynálezu k detekci účinku interakcí mezi ligandem a povrchovým receptorem buněk.

Obrázek 12 je kresba znázorňující podrobný popis použití činidel vynálezu k detekci účinku interakcí mezi ligandem a povrchovým receptorem buněk.

Obrázek 13A je kresba znázorňující analýzu protein-protein interakce v buněčném řetězci.

Obrázek 13 B znázorňuje hypotetické výsledky účinku po ošetření léčivem u šesti navržených proteinových interakcí.

Obrázek 14 A-B znázorňuje obecnou metodologii pro připojení skupiny e-indikátoru k protilátce za vytvoření sondy s e-indikátorem a reakce takto vzniklé sondy se singletovým kyslíkem za vzniku sulfinilové skupiny jako uvolněného reportéru e-indikátoru.

Obrázek 15 A-J znázorňuje struktury skupin e-indikátorů, které byly navrženy a vytvořeny. (Pro 1 je komerčně dostupný od Molecular Probes, Inc.)

Obrázek 16 A-I znázorňuje chemickou syntézu skupin e – indikátorů znázorněných na obrázku 15.

Obrázek 17 A-C jsou schematické ilustrace přístroje CE² LabCard™, který je používán v předloženém způsobu. Obrázek 17B a 17C znázorňují typickou vysoko voltovou konfiguraci používanou v přístroji pro injektáž a separaci.

Obrázek 18 znázorňuje dva elektroforegramy popisující analýzu s reportérem e-indikátoru s použitím CE² LabCard™.

Obrázek 19 znázorňuje několik elektroforegramů popisujících analýzu s reportérem e-indikátoru s použitím CE² LabCard™.

Obrázek 20 znázorňuje lineární kalibrační křivku pro uvolňování reportérů e-indikátoru jako funkci koncentrace korálků s fotosenzibilizátorem.

Obrázek 21 znázorňuje datovou křivku účinku koncentrace značeného aminodextranu na uvolňování reportéru e-indikátoru.

Obrázek 22 znázorňuje elektroforetickou separaci 8 reportéru e-indikátoru na ABI310.

Obrázek 23 je kresba znázorňující sendvičový kvantitativní rozbor kvantifikace cytokinů IL-4 a IL-5.

Obrázek 24 znázorňuje sérii elektroferogramů ukazující analýzu reportéru e-indikátoru (Pro1) v IL-4 titrační studii.

Obrázek 25 znázorňuje sérii elektroferogramů ukazující analýzu reportéru e-indikátoru (Pro10) v IL-6 titrační studii.

Obrázek 26 znázorňuje sérii elektroforegramů ukazující analýzu reportéru e-indikátoru (Pro 8) v IFN γ titrační studii.

Obrázek 27 znázorňuje sérii elektroforegramů ukazující analýzu reportéru e-indikátoru (Pro7) v TFN α titrační studii.

Obrázek 28 znázorňuje sérii elektroforegramů ukazující analýzu reportéru e-indikátoru (Pro 4) v IL-10 titrační studii.

Obrázek 29 znázorňuje sérii elektroforegramů ukazující analýzu reportéru

e-indikátoru (Pro2) v IL-8 titrační studii.

Obrázek 30 znázorňuje sérii elektroforegramů ukazující analýzu reportéru e-indikátoru v jednoduchých a duplexních cytokinových studiích.

Obrázek 31 znázorňuje sérii elektroforegramů ukazující analýzu reportéru e-indikátoru v multiplexních studiích s pěti cytokiny.

Obrázek 32 znázorňuje sérii elektroforegramů ukazující analýzu reportéru e-indikátoru v multiplexních cytokinových studiích.

Obrázek 33 je kresba znázorňující homogenní rozbor pro přímou kvantifikaci humánního IgG.

Obrázek 34 znázorňuje elektroforegramy ukazující analýzu reportéru e-indikátoru v titrační studii humánního IgG.

Obrázek 35 znázorňuje kalibrační křivku obsahující výsledky obrázku 34.

Definice

Výraz „alkyldiyl“ se vztahuje k nasycenému nebo nenasycenému, větvenému, přímému nebo cyklickému dvojbaznému uhlovodíkovému radikálu, který vzniká odstraněním jednoho vodíkového atomu z každého ze dvou odlišných uhlíkových atomů původního alkanu, alkenu nebo alkinu nebo odstraněním dvou vodíkových atomů z jednoho atomu vodíku původního alkanu, alkenu nebo alkinu. Dvě monovalentní radikálová centra nebo každé mocenství dvojbazného radikálového centra může tvořit vazby se stejným nebo odlišným atomem. Typické alkyldiily obsahují následující skupiny, ale nejsou tímto výčtem omezeny: methandiyl, ethyldiyl, jako například ethan-1,1-diyl, ethan-1,2-diyl, ethen-1,1-diyl, ethen-1,2-diyl, ethen-1,1-diyl, propyldiyl jako je propan-1,1-diyl, propan-1,2-diyl, propan-2,2-diyl, propan-1,3-diyl, cyklopropan-1,1-diyl, , cyklopropan-1,21-diyl, prop-1-en-1,1-diyl, prop-1-en-1,2-diyl, prop-en-1,2-diyl, prop-1-en-1,3-diyl, cycloprop-1-en-1,2-diyl, cykloprop-en-1,2-diyl, cykloprop-en-1,1-diyl, prop-yn-1,3-diyl, atd., butyldiily jako například butan-1,1-diyl, butan-1,2-diyl, butan-1,3-diyl, butan-1,4-diyl, butan-2,2-diyl, 2-methylpropan-1,1-diyl, 2-methylpropan-1,2-diyl, cyklobutan-1,1-diyl, cyklobutan-1,2-diyl, cyklobutan-1,3-diyl, but-1-en-1,1-diyl, but-1-en-1,2-diyl, but-1-en-1,3-diyl, but-1-en-1,4-diyl, 2-methylprop-1-en-1,1-diyl, 2-methanylidenpropan-1,1-diyl, buta-1,3-dien-1,1-diyl, buta-1,3-dien-1,2-diyl, buta-1,3-dien-1,3-diyl, buta-1,3-dien-1,4-diyl, cyklo-1-en-1,2-diyl, cyklobut1-en-1,3-diyl, cyklobuten-

1,2-diyl, cyklobuta-1,3-dien-1,2-diyl, cyklobuta-1,3-dien-1,3-diyl, butyn-1,3-diyl, butyn-1,4-diyl, buta-1,3-diyn-1,4-diyl a podobně.

„Protilátka“ znamená imunoglobulin, ke kterému se specificky váže a proto je definována jako komplementární molekula vůči určité místní a polaritní organizaci jiné molekuly. Protilátka může být monoklonální nebo polyklonální a může být připravena pomocí postupů, které jsou v oboru dobře známé jako je imunizace hostitele a sběr séra (polyklonálního) nebo příprava hybridních buněčných linií a sběr vyloučených proteinů (monoklonální) nebo klonování a exprese nukleotidové sekvence nebo jejich mutagenizovaných verzí kódujících alespoň sekvenci aminokyselin vyžadovaných ke specifickému navázání přirozených protilátek. Protilátky mohou zahrnovat kompletní imunoglobulin nebo jeho fragment, kdy do imunoglobulinů zahrnujeme různé třídy a izotypy jakými jsou IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b a IgG3, IgM atd. Jejich fragmenty mohou být například Fab, Fv a F(ab')₂, Fab' a podobně. Kromě toho lze použít agregáty, polymery a konjugáty imunoglobulinů nebo jejich fragmentů, pokud je to vhodné a pokud je udržena vazebná afinita k danému polypeptidu.

Výrazem „protilátku vázající prostředek“ je popsána molekula nebo komplex molekul, který obsahuje jednu nebo více protilátek a odvozuje se od něj vazebná specifika dané protilátky. Protilátku vázající prostředek zahrnuje, ale není výčtem omezen dvojicí protilátek, ve kterých se první protilátka specificky váže na cílovou molekulu a druhá protilátka se specificky váže na stejnou oblast první protilátky, biotinem ošetřenou protilátku, která se specificky váže k cílové molekule a derivátu streptavidinu, který obsahuje skupiny jako elektroforetický indikátor nebo fotosenzibilizátory, protilátky specifické pro cílovou molekulu a připojené k polymeru, jakým je dextran, který pro změnu obsahuje skupiny jako elektroforetické indikátory nebo fotosenzibilizátory, protilátky specifické pro cílovou molekulu, jež jsou připojeny ke kuličce, nebo mikrokuličce nebo k jinému nosiči na bázi pevné fáze, která naopak obsahuje skupiny jako jsou elektroforetické indikátory nebo fotosenzibilizátory nebo polymery tyto skupiny obsahující.

„Kapilární elektroforéza“ znamená elektroforézu v kapilární trubičce nebo v kapilární destičce, kde je průměr separační kolonky nebo tloušťka separační destičky mezi 25 až 500 mikrony, což umožňuje účinnou teplotní dissipaci skrze separační médium s následně nízkým tepelným vedením uvnitř média.

„Prosévací matrix “ nebo „prosévací médium“ označuje elektroforetické médium, které obsahuje síťovitě nebo nesíťovitě spojené polymery, které jsou schopné účinně zpomalovat elektroforetickou pohyblivost nabitých forem v matrixu.

„Specifický“ ve vztahu k vazbě dvou molekul nebo molekuly a molekulového komplexu znamená specifické rozpoznání jedné molekuly druhou a vytvoření stabilního komplexu ve srovnání se značně menším rozpoznáním ostatních molekul a neschopnosti vytvořit stabilní komplex s těmito ostatními molekulami. Dále „specifický“ ve vztahu k vazbě znamená, že rozsah v jakém molekula tvoří komplexy s jinými molekulami nebo komplexy je tvořen aspoň padesáti procenty komplexy s molekulou nebo komplexem pro které má specifitu. Obecně mají molekuly nebo komplexy plochy na svém povrchu nebo dutiny, které způsobují specifické rozpoznání mezi molekulami. Ukázkou specifické vazby jsou interakce protilátka-antigen, enzym-substrát, interakce mezi polynukleotidy, interakce buněčných receptorů s ligandy a podobně.

Výraz „spektrálně analyzovatelný“ ve vztahu k množství fluorescenčních značek znamená, že fluorescentně emisní pásy značek jsou dostatečně odlišné, tj. dostatečně se nepřekrývají, takže elektroforetické indikátory, ke kterým jsou příslušné značky vázány mohou být rozlišeny na základě fluorescenčního signálu, který vznikl pomocí odpovídajících značek a standardního fotodetekčního systému, tj. využitím systému filtrů skrze které prochází pásy, trubiček fotonásobičů nebo systémy popsanými v U.S. patentech číslo: 4 230 558, 4 811 218 nebo v Wheelless, et al., 21-76, Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis (Academic Press, New York, 1985).

Popis provedení vynálezu

Předložený vynález se zaměřuje na způsoby stanovení přítomnosti a/nebo množství podjednotek ze skupiny cílových polypeptidů ve vzorku, u nějž se předpokládá že takové polypeptidy obsahuje. Skupiny proteinů, které jsou předmětem kvantitativních rozborů vynálezu zahrnují proteiny mající běžné fyzické, funkční nebo chemické vlastnosti, které umožňují fyzikální nebo chemickou identifikaci. Vhodnou skupinou proteinů jsou membránově vázané proteiny, proteiny mající obecné vazebné vlastnosti jako například DNA vázající proteiny a proteiny mající specifický druh posttranslační modifikace jako je fosforylace, glykosilace, ribosylace a podobně. Vhodnou skupinou cílových polypeptidů jsou ty polypeptidy, které prošly posttranslační modifikací.

U vynálezu je požadováno určení, která místa na polypeptidu, která byla modifikována, kolik modifikací se na modifikovaném polypeptidu vyskytuje, kde na



polypeptidu dané modifikace jsou, lokalizace polypeptidů a tak dále. Na druhou stranu přítomnost a/nebo množství cílového polypeptidu může být využito ke stanovení přítomnosti a/nebo množství a/nebo aktivity činidla, které způsobuje posttranslační modifikaci cílového polypeptidu. V tomto provedení je cílem zjistit zda je činidlo přítomné a/nebo aktivní. Činidlem může být například polypeptid tj. enzym, receptor, komplex, tj. multimerní protein nebo několika podjednotkový holoenzym, protein-nukleová kyselina a podobně.

Polypeptidy jsou skupinou sloučenin složených z aminokyselinových zbytků, které jsou chemicky vázány dohromady díky amidové vazbě mezi karboxylovou skupinou jednoho aminokyselinového zbytku a amino skupinou druhého aminokyselinového zbytku za odštěpení vody. Polypeptid je polymer aminokyselinových zbytků, které obsahují velký počet takových zbytků. Peptidy jsou podobné polypeptidům s výjimkou toho, že obecně obsahují menší počet aminokyselin. Peptidy jsou někdy označovány za oligopeptidy. Neexistuje jednoznačný rozdíl mezi polypeptidy a peptidy. Pro ulehčení v tomto vynálezu a nárocích bude výraz „polypeptid“ obecně používán pro peptidy a polypeptidy. Aminokyselinové zbytky mohou být přírodní nebo syntetické. Proteiny jsou polypeptidové řetězce složené do definované troj rozměrné struktury. Jsou komplexem velkých polymerů obsahujících uhlík, vodík, dusík a síru a sestávají z lineárních řetězců aminokyselin spojených peptidovými vazbami. Proteiny mají molekulární hmotnost 5 000 až 5 000 000, často od 5 000 do 1 000 000. Kvůli velké rozmanitosti proteinů mluvíme o skupinách (rodinách) proteinů majících podobné strukturní rysy, o proteinech mající zvláštní biologickou funkci, o proteinech spojených s určitými mikroorganismy, zvláště těmi, které způsobují nemoci atd. Takové proteiny zahrnují pro ilustraci například cytokiny, interleukiny, enzymy jako kinázy, proteázy, galaktooxidázy atd. protaminy, histony, albuminy, immunoglobuliny, skleroproteiny, fosfoproteiny, mukoproteiny, chromoproteiny, lipoproteiny, nukleoproteiny, glykoproteiny, receptory T-buněk, proteoglykany, nezařazené proteiny, tj. somatotropin, prolaktin, insulin, pepsin, proteiny nalezené v lidské plazmě, faktory srážlivosti krve, krevní typické faktory, proteinové hormony, rakovinné antigeny a syntetické peptidy.

Předložený vynález se zaměřuje na polypeptidy, které obsahují aminokyselinové sekvence modifikované přirozeným způsobem, jakým jsou posttranslační úpravy. Takové modifikace jsou velmi dobře popsány jak v základních literatuře nebo více podrobných monografiích, tak i v obsáhlé vědecké literatuře. Modifikace se mohou vyskytovat kdekoli v polypeptidu včetně základní struktury polypeptidu,



v aminokyselinových postranních řetězcích nebo na aminovém nebo karboxylovém konci. Výhodné je pokud je stejný druh modifikace přítomen na stejné nebo podobné úrovni na několika místech daného polypeptidu. Také může daný polypeptid obsahovat různé druhy modifikací. Polypeptidy jsou větvené jako výsledek ubiquitinace, jsou cyklické, s řetězcem nebo bez řetězců. Cyklické, větvené a cyklické větvené polypeptidy mohou vznikat posttranslační přirozenou úpravou. V kompetenci předloženého vynálezu je také to, že modifikace je výsledkem nepřirozené aktivity jakou je chemická modifikace. Modifikace zahrnují acetylaci, acylaci, ADP-rybosylaci, amidaci, kovalentní navázání flavinu, kovalentní navázání heme-skupiny, kovalentní navázání nukleotidu nebo derivátu nukleotidu, kovalentní navázání lipidu nebo derivátu lipidu, kovalentní navázání fosfatidylinositolu, siťování, cyklizaci, tvorbu disulfidové vazby, demethylaci, tvorbu kovalentních křížových vazeb, tvorbu cytosinu, tvorbu pyroglutamátu, formylaci, gamma – karboxylaci, glykosilaci, tvorbu GPI kotvy, hydroxylaci, iodinaci, methylaci, miristoylaci, oxidaci, proteolytickou úpravu, fosforylaci, prenylaci, racemizaci, selenoylaci, sulfataci, t-RNA zprostředkované připojení aminokyseliny k proteinu jako je arginylace a ubiquitace (viz *Proteins-Structure and Molecular Properties*. 2nd E., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York, 1993, Wold F., *Post translational Covalent Modification of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983, Seifter et al., „Analysis for protein modification and non-protein cofactors“ *Meth Enzymol* (1990) 182:626-646 a Rattan et al., *Protein synthesis:Post transaltional Modification and aging*“, *Ann NY Acad Sci* (1992) 663:48-62).

Vzorkem pro stanovení posttranslační modifikační aktivity je většinou materiál odvozený od buněk. Vzorek může být získán lýzí buněk, ze séra, z plazmy, slin, krve nebo jiných tělních tekutin. Biologická dráha může být analyzována v pufru, tj. detekce posttranslační modifikace receptoru pomocí enzymu nebo jiného receptoru.

Skupinově specifická činidla

Jedním činidlem pro provedení způsobů podle předloženého vynálezu je klasifikačně specifické činidlo nebo obecně použitelné činidlo, které obsahuje skupinu indukující štěpení a vazebné činidlo a vazebná místa na všech a/nebo téměř všech zástupců ze skupiny cílových polypeptidů. Toto činidlo je obecně použitelné v tom smyslu, že se vazebné činidlo váže na všechny a nebo téměř všechny zástupce určité skupiny proteinů. S výhodou je vybráno vazebné činidlo klasifikačně specifického činidla

tak, aby se nenavázaný materiál snadno oddělil od navázaného materiálu pokud je to požadováno.

V jednom z provedení je použita afinitní chromatografie s imobilizovaným kovem (IMAC) k zachycení všech fosforylovaných proteinů obsažených ve vzorku na pevné fázi (např. buněčný lyzát), tj. jak je popsáno v Holmes, J. *Liquid Chromatography and Rel. Technol.*, 20:123-142 (1997), Posewitz et al., *Anal. Chem.*, 71:2883-2892 (1999) atd. Po navázání jsou kuličky promyty filtrací. Provedení promývacích kroků slouží k zakoncentrování fosfoproteinů a odstranění kontaminujících nefosforylovaných proteinů a ostatních buněčných zbytků z kvantitativního rozboru. Proteiny navázané na kuličky jsou resuspendovány v roztoku obsahujícím protilátku k proteinu (proteinům), o který je zájem. Protilátka je specifická pro jeden nebo několik jmenovaných proteinových cílů nebo může jít o činidlo polyklonní protilátky proti celému buněčnému lyzátu. S výhodou se používá souboru monoklonálních protilátek, kdy jedna nebo několik různých monoklonálních protilátek je specifických ke každému fosforylovanému proteinu v předem určené sadě těchto proteinů. Činidlo protilátky má jednu nebo několik skupin e-indikátorů k sobě navázaných štěpitelnou vazbou, kdy je tato vazba přístupná štěpení díky skupině indukující štěpení na IMAC pryskyřici, jako je IMAC-24 DNP. Činidla obsahující několik protilátek, každé specifické pro odlišný protein a každé vázané k dané skupině e-indikátoru, která je přiřazená pouze k danému proteinu, je kombinována pro multiplexní, cílově specifické stanovení. Po navázání protilátky je vazba skupiny e-indikátoru štěpena a dojde k uvolnění odpovídajícího reportéru e-indikátoru, což je signálem o zachycení daného cíle pomocí 24 DNP korálku. Protein specifické nebo epitop specifické monoklonální protilátky mohou mít přímo navázanou skupinu e-indikátoru nebo může být e-indikátor navázán na sekundární protilátku specifickou pro určitou oblast monoklonální protilátky navázané k danému proteinu.

Vazebné místo na polypeptidu je obvykle výsledkem posttranslačních modifikací zmiňovaných výše. Vazebné činidlo k vazebnému místu na polypeptidu je proto závislé na povaze vazebného místa nebo modifikaci. Běžně je vazebné činidlo afinitním činidlem, které je schopné specifického rozpoznání modifikace. Následující tabulka (Tabulka 1a) ukazuje různé posttranslační modifikace a odpovídající vazebná činidla:

Tabulka 1a

Fosforylace	Kovově afinitní činidlo+kov Protilátky Biotin Kovalentní modifikace $-O-PO_3^-$
Glykosylace	Činidlo obsahující kyselinu boritou Lecitiny Protilátky
Lipidace	Protilátky Cyklodeschiny Lectiny
Tvorba disulfidických můstků	Protilátky
Nitrotyrosin	Protilátky
Ubiquitace	Protilátky

Kov-afinitní činidlo

V jednom z provedení vynálezu lze použít jako vazebné činidlo kov-afinitní činidlo v kombinaci s vhodným kovem. Kov-vazebné činidlo je jedním, které bylo navrženo k vychytávání určitého kovového iontu, který je selektivní k určitým skupinám. Proto může být použit jakýkoliv ligand mající afinitu k iontu kovu, který se váže k vazebnému místu a vede k posttranslační modifikaci. Tímto způsobem závisí povaha chelatačního ligandu na iontu kovu, který je zase závislý na posttranslační modifikaci. Výraz „iont kovu“ znamená ionty odvozené od jednoduchých solí (tj. $AlCl_3$, $NiCl_2$ atd.), komplexních nebo smíšených solí obsahující jak organické tak anorganické ligandy a komplexy kovů. Ionty kovů využitě v předloženém vynálezu zahrnují například hlavní skupinu iontů kovů, přechodné ionty kovů, ionty lanthanidu atd. Prekursory kovů mající nulovou valenci jsou také zahrnuty v této definici. Příklady uvedených kovů jsou ionty galia, hliníku, železa, olova, rtuťi, niklu, kadmia, thalia, antimonu, stříbra, chrómu, manganu,



platiny, zlata, bismutu, mědi, zinku, kobaltu, molybdenu, selenu, vanadu, vápníku, Eu, Gd, Tb, Sm a tak dále.

Pro skupiny obsahující fosfát (například takové, které vznikly fosforylací peptidů) jsou vhodné takové ionty kovů, které mají valenci 2 nebo 3. Zvláště jsou výhodné ionty kovů galia III, hliníku III, železa III, CO^{3+} , EU^{3+} , Gd^{3+} , SM^{3+} , Tb^{3+} .

Chelatačním ligandem je obvykle ligand dvojbazný, trojbazný a nebo čtyřbazný a takový chelatační ligand obsahuje 2 nebo 4 koordinační místa kovu. Koordinační místa mohou obsahovat dusík v imino, nitrilo, pyridinyl, pyrazoyl, imidazolyl, isokyanidyl formě a podobně, kyslík v karboxy, hydroxy, ether, keto formě a podobně, fosfor ve formě fosfinu atd., arsen ve formě arsinu, stibium ve formě stibinu atd., síru v thioether, thioketo formě atd., selen ve formě selenoetheru atd., tellurium ve formě teluroetheru atd., a podobně. Také jsou zahrnuty kombinace výše zmíněných látek, jedná se především o skupiny thiokarboxylovou a fosfiniminovou, oxazoly, oxazolin, thiofeny, thiazoly, isoxazoly, isothrazoly a podobně. Jsou také zahrnuty organické skupiny jako jsou areny, acetyleny, olefiny atd. Specifické příklady chelatačních ligandů obsahující výše zmíněné skupiny zahrnují iminodiacetát, tris(karboxymethyl)ethylendiamin, nitrilotrioctovou kyselinu, obvykle substituovanou v α pozici alkylem (1 až 30 atomů uhlíku), karboxymethylasparagová kyselina, 2-hydroxy3[N-pyridylmethyl]glycin]propyl a podobně.

Chelatační ligand může být kov vázající peptid jako je například (GHHPH) n G, kde n je 1 (SEQ ID NO:1), 2 (SEQ ID NO:2), 3 (SEQ ID NO:3) nebo 5 (SEQ ID NO: 4) (viz. Hutchens, et al., J.Chromatogr. (1992)604:125-132 a 133-141) atd.

Mnoho z výše uvedených chelatačních ligandů je komerčně dostupných, ostatní jsou syntetizovány a jejich syntéza je součástí literatury. Ostatní chelatační ligandy kovů mohou být vyrobeny podle postupů odborníkům dobře známým.

Činidlo obsahující kyselinu boritou

V jednom provedení tohoto vynálezu je vazebným činidlem skupina kyseliny borité, která má alespoň jeden atom bóru substituovaný skupinami, které umožňují tvorbu komplexu s interaktivními funkčními skupinami vazebného místa na polypeptidu. Obvykle je skupina kyseliny borité odvozena od takové kyseliny borité, která je substituována organickou skupinou mající alespoň dva atomy z následující skupiny obsahující uhlík, kyslík, dusík, síru a fosfát. Obvykle má organická skupina dva atomy uhlíku, které mohou být substituované nebo nesubstituované. Organická skupina může



být alifatická nebo aromatická. Důležitou vlastností u skupiny kyseliny borité je její kyselost. Obecně platí čím vyšší kyselost skupiny kyseliny borité, tím lepší schopnost tvořit komplex s interaktivními funkčními skupinami vazebného místa. Je nutné, aby pKa skupiny kyseliny borité bylo pod hodnotou 11, lépe okolo 9, nejlépe pod hodnotou 8,75. Čím nižší pKa skupiny kyseliny borité, tím lepší je schopnost vázat se do vazebného místa polypeptidu. Proto je lépe vybírat substituenty bóru, které zvyšují kyselost kyseliny borité. Aromatické substituenty, které jsou na bóru preferovány jsou například fenyl a substituovaný fenyl (substituovaný jednou nebo více funkčními skupinami jako jsou skupiny amino, nitro a podobně). Pro zvýšení kyselosti skupiny kyseliny borité obsahují aromatické substituenty jeden nebo více elektron zachycujících skupiny jako jsou například skupiny nitro atd. Specifické příklady organických skupin pro skupinu kyseliny borité zahrnují fenyl, aminfenyl a podobně. Specifické skupiny kyseliny borité zahrnují kyseliny fenyloboritou a kyselinu (3-aminfenyl)boritou. Ostatní příklady mohou být nalezeny v patentu US č. 5 623 055, 5 876 938, 6 013 783 a 5 831 045. Důležité informace jsou v tomto dokumentu uvedeny pod příslušnými odkazy.

Mnoho z výše uvedených činidel obsahujících kyselinu boritou je komerčně dostupných, ostatní byly vyrobeny a dané syntézy jsou součástí literatury. Ostatní činidla obsahující kyselinu boritou mohou být vyrobena pomocí postupů, které jsou v oboru známé.

Lecitinové činidlo

V dalším provedení tohoto vynálezu lze využít lecitinu jako vazebného činidla. Lecitiny jsou proteiny nebo glykoproteiny, které mají receptorové místo specifické pro určitý cukr nebo cukry, ale ne pro nic jiného. Proto mohou být lecitiny využity jako vazebná činidla k detekci glykosilace. Například konkanavalin A (Con A) má specifitu k α -D-glukóze a α -D-manóze. Pokud je ligand jako glukóza přítomen na polypeptidu. ConA se váže k tomuto glukosylovanému peptidu. Lecitiny mohou pocházet z jakéhokoli vhodného zdroje jako například z rostlin, savců, mikroorganismů atd. Seznam všech známých lecitinů je příliš rozsáhlý na to, aby zde byl jmenován. Jak je naznačeno výše lecitiny jsou specifické k určitému cukru nebo cukrům. Proto je lecitin vybrán ne základě očekávané glykosilace skupiny pro polypeptid. Příklady lecitinů zahrnují konkanavalin A, aglutininy, jako například aglutinin choroboplodných zárodků pšenice, *Sambucus* aglutinin z šedé hmoty mozkové (SNA), *Arachis Hypogaea* aglutinin, *Bauhinia Purpurea* aglutinin, *Galanthus nivalis* aglutinin (GNA), *Datura*



stramionium agglutinin (DSA), *Maacia amurensis* agglutinin (MAA), agglutinin z podzemnice olejné atd., agglutinin z kůry bezu, *Ulex Europeus* (UEA I), *Limulus Polyhemus* (LPA), *Lotus Tetragonolobus* (Lotus A) atd.

Činidlo protilátky

V jednom z provedení může být vazebným činidlem protilátka pro modifikaci polypeptidu. Například mohou být použity protilátky, které rozeznávají fosfátové skupiny fosforylovaných polypeptidů nebo protilátky, které rozeznávají cukernou skupinu glykosylovaných polypeptidů nebo mohou být využity protilátky rozeznávající acetylaci u acetylovaných polypeptidů atd. Protilátka může být monoklonální nebo polyklonální. Mnoho vhodných protilátek je v oboru známo a mohou být připraveny technikami v oboru také dobře známými. Tyto techniky zahrnují imunizaci hostitele a sběr séra (polyklonální) dále přípravu kontinuálních hybridních buněčných linií a izolování vyloučeného proteinu (monoklonální) nebo klonování a expresi nukleotidové sekvence nebo její mutagenní formy kódující aminokyselinovou sekvenci nutnou pro navázání přírodních protilátek. Protilátky zahrnují kompletní imunoglobuliny včetně různých tříd a izotypů jako jsou IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b a IgG3, IgM atd. Jejich fragmenty mohou být například Fab, Fv a $F(ab')_2$, Gab' atd. Kromě toho lze použít agregáty, polymery a konjugáty imunoglobulinů nebo jejich fragmentů, pokud je to vhodné a pokud je udržena vazebná afinita k danému polypeptidu.

V jednom z přístupů k přípravě vhodné protilátky, je získáno antisérum obsahující protilátky (polyklonální) pomocí dobře definovaných technik zahrnující imunizaci zvířete, jakým je zajíc, morče nebo koza vhodným imunogenem a získání antiséra z krve takto imunizovaného zvířete po dostatečně dlouhé čekací době. Přehledy s dosavadním stavem techniky jsou k dispozici od Parker, Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds, Prentice-Hall, (Englewood Cliffs, N.J., U.S., 1976), Butler, J. Immunol. Meth, 7:1-24 (1975), Broughton and Strong, Clin. Chem. 22:726-732 (1976) a Playfair, et al., Br. Med. Bul. 30:24-31 (1974). Protilátky mohou být také získány technikou hybridizace somatických buněk, takové protilátky jsou v textu zmiňované jako monoklonální protilátky. Monoklonální protilátky mohou být vyrobeny podle standardních metod podle Kohler a Milstein, Nature 265:495-467, 1975. Přehledy technik produkce monoklonálních látek jsou popsány v Lymphocyte Hybridomas, ed. Melchers et al., Springer-Verlag (New York 1978), Nature 266:495 (1977), Science

208:692 (1980) a *Methods of Enzymology* 73 (Part B):3-46 (1981). Různé metody jsou používány i pro zvýšení výtěžku monoklonálních protilátek, například injekce hybridních buněk do peritoneální dutiny savčích hostitelů, kteří dané buňky přijmou a získání nahromaděné tekutiny z peritoneální dutiny. Pokud je v této tekutině nedostačující množství monoklonální protilátky je protilátka získána z krve hostitele. Další možností je kultivování buněk produkujících danou protilátku v zařízení s dutými vlákny nebo v zařízení s rotujícími baňkami. Oba způsoby jsou v oboru dobře známy. Různé vhodné způsoby existují pro izolaci a purifikaci monoklonálních protilátek od proteinů a ostatních kontaminantů (viz. Kohler a Milstein, supra). V jiném přístupu pro přípravu protilátek může být vystřižena sekvence kódující vazebné místo protilátky z chromozomální DNA a vložena do klonovacího vektoru, ten je exprimován v bakteriích, tak aby byly produkovány rekombinantní proteiny mající odpovídající vazebná místa daných protilátek. Obecně může být protilátka purifikována pomocí technik mezi které patří chromatografie, tj. DEAE chromatografie, ABx chromatografie a podobně, dále filtrace atd.

Biotinové činidlo

V jednom z provedení jsou fosfátové skupiny fosfoproteinů biotinylovány a pak jsou takové proteiny izolovány pomocí streptavidinu, Goshe et al., *Anal. Chem.*, 73:2578 (2001).

Skupina indukující štěpení

Štěpení indukující skupina je taková, která produkuje aktivovanou vazbu formu, která je schopna štěpení vazby, především oxidací. Aktivovaná vazba je chemická vazba, která vykazuje krátkodobou aktivitu tak, aby její štěpení indukující účinek byl pouze v blízkosti místa svého vzniku. Aktivovaná vazba je buď krátkodobá, aby nevytvářela významné pozadí kvůli těsné blízkosti svého vzniku nebo je použita látka účinně odstraňující aktivovanou vazbu tak, aby nebyla schopná reagovat se štěpitelnou vazbou v blízké vzdálenosti od místa svého vzniku. Ukázkové aktivované vazby zahrnují singletový kyslík, peroxid vodíku, NADH a hydroxylové radikály, fenoxylradikál, superoxid a podobně. Ukázkové zhaščeče k aktivovaným vazbám, které způsobují oxidaci zahrnují polyeny, karotenoidy, vitamin E, vitamin C, aminokyselinové pyrol-N

konjugáty tyrosinu, histidinu a glutathion atd., viz. Beutner et al., Meth. Enzymol., 319:226-241 (2000).

Zvláštní pozornost je věnována štěpení indukující skupině a štěpitelné vazbě protože obě nemohou být navzájem odstraněny, pokud jsou vázány k cílovému proteinu, které aktivovaná vazba vytvořila pomocí senzibilizátoru rozpuštěného a ztrácejícího svou aktivitu před tím, než může reagovat se štěpitelnou vazbou. V souladu s tím je štěpitelná vazba v rozmezí 1000 nm, nejlépe 20-100 nm od vazby skupiny indukující štěpení. Toto účinné rozmezí skupiny indukující štěpení je zde uváděno pod pojmem „účinná těsná blízkost“. Původci aktivované vazby jsou enzymy, jako glukoxidáza, xantenoxidáza, oxidáza D-aminokyselin, NADH-FMN oxidoreduktáza, galaktoxidáza, glycerylfosfát oxidáza, sarkosinoxidáza, cholinoxidáza a alkoholoxidáza, která produkuje peroxid vodíku, horse-radishperoxidáza, která produkuje hydroxylový radikál, různé dehydrogenázy, které produkují NADH nebo NADHP, ureázy, které produkují amoniak, což vede k zvýšení místního pH. Štěpitelná vazba může být založena na oxidaci síry nebo selenu, kde jsou thioether, sulfoxid nebo jejich analogy přítomny v α - nebo β -pozici ve vztahu k aktivované skupině, která přibližuje vodík α k aktivační skupině a ten je pak možno odstranit pomocí zásady, takže se uvolní oxidační skupina, ke které je připojen odštěpitelná část e-indikátoru nebo je předmětem oxidace s následným uvolněním e-indikátoru. Alternativně lze použít cheláty kovu, které jsou stabilní v jednom oxidačním stavu a nestabilní v jiném oxidačním stavu. Ostatní sloučeniny zahrnují α substituované methylquinony, které mají odštěpitelnou část díl činidla navázaného přes odstupující skupinu, jakou je skupina sulfonyl, oxy, amino atd.

Senzibilizátor je molekula, obvykle sloučenina, která může být indukována k výrobě reaktivního intermediátu nebo formy, obvykle singletového kyslíku. Senzibilizátorem použitým v souladu s předloženým vynálezem je fotosenzibilizátor. Nicméně mohou být použity i jiné senzibilizátory jako například chemicky aktivované (tj. enzymy a soli kovů) včetně ostatních látek a sloučenin, které jsou schopny produkovat singletový kyslík s a nebo lépe bez aktivace pomocí vnějšího světelného zdroje. Proto přeměnu peroxidu vodíku na singletový kyslík a vodu katalyzují například molybdaté soli (Mo_4^-) a chloroperoxidáza a myeloperoxidáza s bromidovým nebo chloridovým iontem. Pro výše uvedené příklady senzibilizátorů může být peroxid vodíku dodán jako pomocné činidlo, chloroperoxidáza může být navázána na povrchu nosiče a molybdát může být včleněn ve vodné fázi liposomu. Ostatní senzibilizátory, včetně těch

uvedených v tomto vynálezu, jsou sloučeninami, které nejsou skutečnými senzibilizátory, ale které po excitaci teplem, světlem, ionizačním zářením nebo chemickou aktivací uvolní molekulu singletového kyslíku. Nejznámějšími zástupci této skupiny látek jsou endoperoxidázy jako 1,4-biscarboxyethyl-1,4-naftalen-endoperoxidáza, 9,10-difenylnanthracen-9,10-endoperoxidáza a 5,6,11,12-tetrafenylnaftalen-5,12-endoperoxidáza. Po zahřátí nebo přímé absorpci světla tyto sloučeniny uvolní singletový kyslík. Další senzibilizátory jsou uvedeny v následující literatuře: Di Mascio et al., FEBS Lett., 355:287 (1994) (peroxidases and oxygenases), Kanofsky, J. Biol.Chem. 258:5991-5993 (1983) (laktoperoxidase), Pierlot et al., Meth. Enzymol., 319:3-20 (2000) (thermal lysis of endoperoxides) aj. Připojení vazebného činidla k štěpení indukující skupině může být přímé nebo nepřímé, kovalentní nebo nekovalentní a může být provedeno pomocí známých technik běžně dostupných v literatuře. Například v „Immobilized Enzymes“, Ichiro Chibata, Halsted Press, New York (1978), Cuatrecasas, J.Biol. Chem., 245:3059 (1970). Široký výběr funkčních skupin je dostupný nebo může být dodán. Funkční skupiny zahrnují karboxylové kyseliny, aldehydy, aminoskupiny, kyano skupiny, ethylen skupiny, hydroxyl skupiny, merkaptó skupiny a podobně. Způsob vazby široké řady sloučenin je dobře znám a dostatečně popsán v literatuře (viz. výše). Délka vazebné skupiny a vazebné činidlo mohou být velmi odlišné v závislosti na povaze sloučeniny, kterou chceme navázat a vlivu vzdálenosti na specifické vazebné vlastnosti atd.

Lecitiny mohou být připojeny k štěpení indukující skupině pomocí známých technik kovalentního spojení. Toto spojení je provedeno pomocí zesíťování lecitinu s štěpení indukující skupinou nebo spojením molekuly skrze bifunkční síťovadlo. Vhodné bifunkční sloučeniny jsou popsány v souhrnu od Peters, K. a Richards, F.M., (Ann. Rev. Biochem. 46 (1977) 523). Alkylimidáty vykazují vysoký stupeň specifity mezi funkčními skupinami představovanými proteinem. Reakce je specifická pro primární amino skupiny. Specifická spojovací činidla zahrnují amidoestery jako dimethylmalonimidát, azidy jako akrylazid tartryldiazidu, který reaguje s amino skupinami za tvorby amidové vazby, aryldihalidy (tj. 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzen nebo 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenyl sulfon), glutaraldehyd, dimaleimid, směsný anhidrid, směsný aromatický nebo alifatický dikarboxyl, ester N-hydroxyamidu kyseliny jantarové a ostatní známá síťovadla. Katalytická činidla jako hydrochlorid 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu mohou být použita k tvorbě kovalentní vazby mezi amino skupinami jedné molekuly a karboxylové skupiny jiné molekuly.

Klasifikačně specifické činidlo může být vytvořeno *in situ*. Za předchozích podmínek má klasifikačně specifické činidlo všechny své součásti navázané dohromady před použitím v předložených metodách. V pozdější situaci jsou alespoň nějaké ze součástí klasifikačně specifického činidla odděleně přidány do média, ve kterém jsou předložené metody prováděny. V jednom přístupu obsahuje vazebné činidlo skupinu k připojení štěpení indukující skupiny. Normálně tento krok zahrnuje druhou skupinu, která je přítomná na štěpení indukující skupině, kde tato druhá skupina reaguje se skupinou vazebného činidla a zajišťuje tak připojení štěpení indukující skupiny k vazebnému činidlu a tvorbu klasifikačně specifického činidla přímo na místě. Obecně skupiny interagují pomocí nekovalentních vazeb. Tato situace je ukázána pomocí jedné ze dvou skupin obsahující malou molekulu (s molekulovou hmotností okolo 100 až 1500) a další ze skupin obsahují vazebnou látku pro malou molekulu. Příkladem malé molekuly je biotin, digoxin, fluorescein, dinitrofenol a podobně a vazebné látky malé molekuly je avidin, protilátka pro digoxin, protilátka pro fluorescein, protilátka pro dinitrofenol a podobně. Je výhodné mít několikanásobně štěpení indukující skupiny připojené k vazebnému činidlu, aby se zvýšil počet vytvořených aktivních látek. V jednom z přístupů má vazebné činidlo množství míst pro připojení látek jakými jsou protilátka, lecitin atd. Pro další zvýšení počtu štěpení indukujících skupin je použita hlavní molekula nebo její jádro. Jádro hlavní molekuly je polyfunkční materiál, normálně polymerický, který má množství funkčních skupin pro připojení tj. skupiny hydroxy, amino, merkpto, karboxy, ethylen, aldehyd atd. Funkční skupiny na této hlavní molekule mají být takové, aby reagovaly se štěpení indukujícími skupinami nebo skupinami vazebného činidla, které má být připojeno. Diskuse o jádru hlavní molekuly je popsána níže s ohledem na ostatní činidla a mohou být také použity principy popsané níže v tomto příkladu.

V určitých provedení klasifikačně specifické činidlo obsahuje nosič, se kterým je klasifikačně specifické činidlo spojené. Nosič se skládá z organického nebo anorganického, pevného nebo kapalného ve vodě nerozpustného materiálu, který je průhledný nebo částečně průhledný. Nosič má jakýkoliv tvar, tj. částice je kuličkou, filmem, membránou, trubičkou, jamkou, proužkem nebo tyčinkou. Pro nosiče do kterých je včleněn fotosenzibilizátor je povrch nosiče nejlépe hydrofilní a vnitřek nosiče je nejlépe hydrofobní. Nosič je rozpustný v médiu, ve kterém je použit. Příklady takto rozpustných nosičů jsou polymerní materiály jako latex, lipidové dvojvrstvy, kapičky oleje, buňky a hydrogely. Ostatní sloučeniny nosičů zahrnují sklo, kovy, polymery, jako

například nitrocelulózu, acetátcelulózu, poly(vinylchlorid), polyakrylamid, polyakrylát, polyethylen, polypropylen, poly(4-methylbutan), polystyren, polymethakrylát, poly(ethyltereftalát), nylon, poly(vinylbutyrát) atd. Tyto sloučeniny jsou použity samostatně nebo ve spojení s jinými materiály. Připojení vazebných činidel k nosiči může být přímé nebo nepřímé, kovalentní nebo nekovalentní a je popsáno ve známých technikách, které jsou běžně dostupné v literatuře, například „Immobilized Enzymes“, Ichiro Chibata, *supra*. Povrch nosiče je často polyfunkční nebo je schopný být polyfunkční a nebo je schopný se vázat ke skupině vázající cílovou molekulu atd. pomocí kovalentních nebo specifických nebo nespecifických nekovalentních interakcí.

Štěpení indukující skupina je spojena s nosičem pomocí kovalentních nebo nekovalentních spojení k povrchu nosiče nebo včleněním do hlavní molekuly nosiče. Vazba k nosiči může být uskutečněna jak již bylo zmíněno výše. Štěpení indukující skupina může být včleněna do hlavní molekuly nosiče buď během přípravy nosiče nebo po ní. Obecně je štěpení indukující skupina spojena s nosičem v množství nezbytném k dosažení aktivní látky. Obecně je množství štěpení indukující skupiny určeno empiricky.

Fotosenzibilizátory jako štěpení indukující skupiny

Jak bylo zmíněno výše preferovaná štěpení indukující skupina podle předloženého vynálezu je fotosenzibilizátor, který produkuje singletový kyslík. Jak je v tomto dokumentu použito „fotosenzibilizátor“ je světlo pohlcující molekula, která když je aktivována světlem přeměňuje molekulární kyslík na singletový kyslík.

Fotosenzibilizátory mohou být spojeny přímo nebo nepřímo přes kovalentní nebo nekovalentní vazby k vazebnému činidlu klasifikačně specifického činidla. Návod jak sestavit takové sloučeniny, zvláště pro protilátky ve funkci vazebných činidel, jsou v literatuře, např. v oblasti fotodynamické terapie, imunodiagnostiky a podobně.

Následující přehled uvádí příklady některých odkazů: Ullman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5426-5430 (1994), Strong, et al., Ann. New York Acad. Sci. 745:297-320 (1994), Yarmush, et al., Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Syst., 10:197-252 (1993), Pease et al., US patent 5 709 994, Ullman, et al., US patent 5 340 716, Ullman, et al., US patent 6 251 581, McCapra, US patent 5 516 636 atd.

V literatuře jsou také návody vztahující se k vlastnostem a výběru fotosenzibilizátorů vhodných k použití v předloženém vynálezu. Následují příklady

literatury: Wasserman and R.W.Murray, Singlet Oxygen (Academic Press, New York, 1979), Baumstark, Singlet Oxygen, Vol.2 (CRC Press Inc., Boca Raton, FL 1983) a Turro, Modern Molecular Photochemistry (University Science Books, 1991).

Fotosenzibilizátory jsou senzibilizátory pro tvorbu singletového kyslíku pomocí excitace světlem. Fotosenzibilizátory zahrnují barviva a aromatické sloučeniny a jsou obvykle složeny z kovalentně vázaných atomů, většinou s několika dvojnými nebo trojnými vazbami. Sloučeniny obvykle absorbují světlo v rozmezí vlnové délky od 200 do 1100 nm, lépe od 300 do 1000 nm, a nejlépe od 450 do 950 nm s excitačním koeficientem v absorpčním maximu větším než $500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ lépe $5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a nejlépe $50\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ excitační vlnové délky. Doba existence excitovaného stavu, jež vznikl následnou absorpcí světla v nepřítomnosti singletového kyslíku je obvykle alespoň 100 nanosekund, lépe alespoň jednu milisekundu. Obecně musí být doba existence dostatečně dlouhá, aby umožnila štěpení vazby v činidle podle předloženého vynálezu. Toto činidlo je běžně přítomno v koncentraci, která je popsána níže. Excitovaný stav fotosenzibilizátoru má obvykle odlišné spinové kvantové číslo (S), než je jeho základní stav, a je tomu tak u tripletu ($S=1$) nebo u singletu ($S=0$). Lépe má-li fotosenzibilizátor vysoký mezisystémový výtěžek. Fotoexcitace fotosenzibilizátoru produkuje tripletový stav s účinností alespoň 10 %, lépe alespoň 40 % a nejlépe 80 %.

Vybrané fotosenzibilizátory jsou relativně fotostabilní a je lépe pokud nereagují se singletovým kyslíkem. Některé strukturní rysy jsou přítomny v nejvíc používaných fotosenzibilizátorech. Řada fotosenzibilizátorů má alespoň jednu a nejčastěji tři nebo více konjugovaných dvojných nebo trojných vazeb seskupených v rigidní většinou aromatické struktuře. Často obsahují alespoň jednu skupinu, která zvyšuje mezisystémový výtěžek, těmito skupinami jsou karbonylová nebo iminová skupina nebo těžký atom vybraný z třetí až šesté řady periodické tabulky, zvláště pak jod nebo brom nebo mají tyto sloučeniny rozsáhlou aromatickou strukturu.

Celá řada zdrojů světla je dostupná k provedení fotoaktivace fotosenzibilizátoru za účelem vzniku singletového kyslíku. Jsou použity jak polychromní tak monochromní zdroje, pokud má zdroj dostatečnou intenzitu k produkci dostatečného množství singletového kyslíku během skutečné doby trvání. Délka ozáření je závislá na povaze fotosenzibilizátoru, na povaze štěpitelné vazby, síle zdroje záření a na jeho vzdálenosti od vzorku atd. Obecně je doba ozáření mikrosekunda až 10 minut, většinou je rozmezí od 1 milisekundy do 60 sekund. Intenzita a délka ozáření by měla být dostatečná k excitaci alespoň 0,1 % molekul fotosenzibilizátoru, obvykle 30 % molekul

fotosenzibilizátoru a nejlépe všech molekul fotosenzibilizátoru. Příklady zdrojů světla zahrnují lasery, tj. helio-neonové lasery, argonové lasery, YAG lasery, He/Cd lasery a rubínové lasery, fotodiody, měďnaté, sodné a xenonové výbojky, zářivky jako například wolframovou nebo wolframovo-halogenovou, zábleskové lampy a podobně.

Příklady fotosenzibilizátorů, které lze použít v předloženém vynálezu jsou ty, které mají výše zmíněné vlastnosti a které jsou vyjmenovány v následující literatuře: Turro, Modern, Molecular Photochemistry (uvedený výše); Singh and Ullman, patent US 5 536 834; Li et al patent US 5 763 602; Ullman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5426-5430 (1994); Strong et al, Ann. New York Acad. Sci., 745: 297-320 (1994); Martin et al, Methods Enzymol., 186: 635-645 (1990); Yarmush et al, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Syst., 10: 197-252 (1993); Pease et al, patent US 5 709 994; Ullman et al, patent US 5 340 716; Ullman et al, patent US 6 251 581; McCapra, patent US 5 516 636; Wohrie, Chimia, 45: 307-310 (1991); Thetford, European patent publ. 0484027; Sessler et al, SPIE, 1426: 318-329 (1991); Madison et al. Brain Research 522: 90-98 (1990); Polo et al, Inorganica Chimica Acta, 192: 1-3 (1992); Demas et al, J. Macromol. Sci., A25: 1189-1214 (1988); atd.

Příklady fotosenzibilizátorů jsou uvedeny v tabulce 1b.

Tabulka 1b

Příklady fotosenzibilizátorů

Hypokrelin A	Tetrafenylporfyrin
Hypokrelin B	Halogenované deriváty barviv rhodaminu
Hypericin	Metaloporfyriny
Halogenované deriváty fluorescenčních barviv	Ftalokyaniny
Bengálská růžová	Naftalokyaniny
Merokyanin 540	Makrocikly texafyrinového typu
Methylenová modř	Hematoforfyrin
9-thioxanton	9,10-dibromanthracen
Chlorofyly	Benzofenon
Fenaleon	Chlorin e6
Protoporfyrin	Perylen
Benzoporfyrin A monacid	Benzoporfyrin B monacid

V určitých provedení obsahuje skupina fotosenzibilizátoru nosič, jak již bylo popsáno dříve s odpovídající štěpení indukující skupinou. Fotosenzibilizátor je k povrchu nosiče spojen pomocí kovalentní nebo nekovalentní vazby nebo je včleněn do hlavní molekuly nosiče, jak bylo zmíněno výše. Obecně je fotosenzibilizátor navázán k nosiči v množství nezbytném k dosažení nezbytného množství singletového kyslíku. Obvykle je množství fotosenzibilizátoru určeno empiricky. Fotosenzibilizátory jsou nejlépe nepolární povahy, aby byla zajištěno rozpuštění v lipofilní části, pokud je do ní fotosenzibilizátor včleněn, například částičky latexu k výrobě korálků s fotosenzibilizátorem, například v Pease et al., US patent 5 709 994. Dále lze fotosenzibilizátor – barvivo bengálská růžová kovalentně připojit na 0,5 mikronu velkému korálku pomocí chlormethylových skupin k latexu, čímž vznikne esterová vazebná skupina, toto je popsáno v J.Amer. Chem.Soc., 97:3741 (1975).

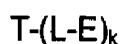
Jeden z přístupů předloženého vynálezu obsahuje klasifikačně specifické činidlo základního vazebného činidla, které je protilátkou a štěpení indukující skupinu, kterou je fotosenzibilizátor, ten je kovalentně připojen k protilátce, například pomocí známých technik, které jsou popsány v Strong et al., (citovaný výše), Yarmush et al., (citovaný výše) atd. Dále může klasifikačně specifické činidlo obsahovat nosič na bázi pevné fáze, tj. korálek, ke kterému je fotosenzibilizátor připojen kovalentně nebo nekovalentně a protilátka je navázána nejlépe kovalentně, buď přímo nebo pomocí polymeru s funkčními skupinami, jakým může být například aminodextran atd.

Sloučeniny elektroforetických sond

Kvůli důležitému rysu předloženého vynálezu, je zajištěna řada elektroforetických sond, z nichž každá má jedinečnou skupinu vázající polypeptid a je připojena ke skupině e-indikátoru, která má jedinečný poměr náboj-hmotnost a/nebo optický znak. Pro usnadnění je jedinečný poměr náboj-hmotnost skupiny e-indikátoru kvůli chemické struktuře látkou modifikující pohyblivost, kdežto detekční skupina a zbytek vazebné skupiny (pokud je) je běžně v jakékoliv sadě elektroforetických sond. Nicméně je jasné, že jedinečný náboj a/nebo hmotnostní příspěvek k reportérům e-indikátoru může být také detekční skupinou. Například sada elektroforetických sond může být vytvořena z první podmnožiny mající skupinu látek modifikující pohyblivost, která uděluje jedinečnou elektroforetickou pohyblivost podmnožině v kombinaci s detekční skupinou

mající jeden definovaný náboj a/nebo hmotnost a druhé podmnožiny mající stejnou látek modifikujících pohyblivost v kombinaci s druhou detekční skupinou s odlišným nábojem a/nebo hmotností, aby udělila elektroforetické pohyblivosti, které jsou jedinečné mezi oběma podmnožinami.

V jednom z přístupů zahrnuje vynález sloučeniny obsahující vazebnou skupinu specifickou k cílovému polypeptidu a k jednomu nebo několika elektroforetickým indikátorům. Elektroforetické indikátory mohou být připojeny k vazebné skupině přímo nebo nepřímo pomocí další vazebné molekuly, která se speciálně váže k vazebné skupině, touto sloučeninou je například sekundární protilátka specifická ke konstantní oblasti primární protilátky. Lépe pokud je vazebnou skupinou elektroforetické sondy protilátka. Obvykle je elektroforetická sonda definována pomocí následujícího vzorce:



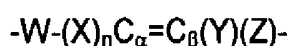
kde T je vazebná skupina, nebo přesněji polypeptid vázající skupina, L je štěpitelná vazba a E je elektroforetický indikátor nebo e-indikátor. Štěpitelná vazba L je oxidačně labilní vazba a nejlépe je to vazba, která může být štěpena singletovým kyslíkem. Skupina „-(L-E)_k“ naznačuje, že je jednotlivá vazebná skupina může mít jeden nebo více elektroforetických indikátorů připojených přes štěpitelnou vazbu. k je celé číslo větší nebo rovno 1 a lépe je-li z rozmezí 1 až 500 a nejlépe z rozmezí 1 až 100 nebo 1 až 50. Vůbec nejlepší je pokud je k z intervalu 1 až 10. Výhodně je počet elektroforetických indikátorů alespoň 5, lépe alespoň 10. Nejlépe pokud je počet z rozmezí 5 až 200, lépe 5 až 100 a nejlépe 5 až 50 nebo 5 až 30. Nejlépe má-li v tomto počtu každá odlišná vazebná skupina, T, odlišný elektroforetický indikátor E. Oxidačně labilní vazby a indikátory E jsou připojeny k T pomocí běžných chemických vazeb. Pokud je T polypeptid připojení lze provést díky běžným reakčním skupinám jakými jsou aminová, sulfidická a karboxylová skupina atd.

Výhodně je vazebná skupina protilátka nebo obsahuje protilátku specifickou k cílovému proteinu nebo polypeptidu. V posledně uvedeném případě T může obsahovat množství vazebných částí, které fungují společně tak, aby držely elektroforetický indikátor v blízkosti cílového proteinu. Například T může být protilátka se sekundární protilátkou mající připojený e-indikátor, haptenzovaná protilátka společně s sekundární anti-hapten protilátkou mající připojený e-indikátor, biotinylovaná protilátka společně se streptavidinem majícím připojený e-indikátor, protilátka derivatizovaná polymerem s funkčními skupinami, který má připojený e-indikátor atd.

Množství elektroforetických sond je použito v postupech předloženého vynálezu a každá sonda má odlišnou vazebnou skupinu T.

Výhodně je L je thioether nebo jeho selenový analog, nebo olefin, který obsahuje uhlík-uhlík dvojně vazby, kdy štěpení dvojně vazby na oxo skupinu vede k uvolnění e-indikátoru E. Příklady olefinů zahrnují sulfidy vinylu, vinylethery, enaminy, iminy substituované na uhlíkovém atomu α -methinem (CH, uhlíkový atom mající alespoň jeden atom vodíku), kdy vinylová skupina může být cyklická, heteroatom může být cyklický nebo substituovaný na cyklickém uhlíkovém atomu olefinu a kde bude jeden až čtyři heteroatomy navázané na uhlíkový atom olefinu. Výsledný dioxetan se může rozložit samovolně, pomocí zvýšení okolní teploty obvykle pod 75 °C, pomocí reakce s kyselinou nebo zásadou nebo pomocí fotoaktivace v nepřítomnosti nebo přítomnosti fotosenzibilizátoru. Takové reakce jsou popsány v následující literatuře: Adam a Liu, J. Amer. Chem. Soc. 94,1206-1209, 1972, Ando, et al., J.C.S. Chem. Commun. 1972,477-8, Ando, et al. Tetrahedron 29,1507-13,1973, Ando, et al., J. Amer. Chem. Soc. 96,6766-8, 1974, Ando a Migita, ibid. 97, 5028-9, 1975, Wasserman a Terao, Tetra. Lett. 21,1735-38,1975, Ando a Watanabe, ibid. 47,4127-30,1975, Zaidika, et al.. Photochemistry and Photobiology 30, 35-44,1979, a Adam, et al., Tetra.20 Lett. 36, 7853-4, 1995. See also, patent USč. 5 756 726.

Dioxetany jsou tvořeny pomocí reakce singletového kyslíku s aktivovaným olefinem substituovaným skupinou e-indikátoru na jednom uhlíkovém atomu a vazebnou skupinou na dalším uhlíkovém atomu daného olefinu. Viz například US patent 5 807 675. Tyto štěpitelné vazby mohou být zobrazeny pomocí následujícího vzorce:



kde W je vazba, heteroatom, například O, S, N, P, M (myslí se kov, který tvoří stabilní kovalentní vazbu) nebo funkční skupina jako karbonyl, imino atd. a dále může být navázán k X nebo C_{α} , kdy alespoň jeden její zbytek X alifatický, aromatický, alicyklický nebo heterocyklický obvykle aromatický nebo aromaticky heterocyklický a kdy X společně s Y tvoří kruh, obvykle heterocyklický kruh s atomy uhlíku s kterými je spojen, pokud jsou jiné než vodík a pokud mají od 1 do 20, obvykle od 1 do 12 a lépe od 1 do 8 atomů uhlíku a dané X má od 0 do 6, obvykle od 0 do 4 heteroatomů, kdežto ostatní X mají alespoň jeden až 6 heteroatomů, kdežto další X má alespoň jeden až 6 heteroatomů, obvykle 1 až 4 heteroatomy.

Y je zařazen definicí X, obvykle je navázán k C_{β} přes heteroatom a jak je naznačeno společně s X tvoří heterocyklický kruh.

Z je obvykle aromatický zbytek, včetně zbytku heterocyklicky aromatického, skládající se z 4 až 12, obvykle 4 až 10 atomů uhlíku a 0 až 4 heteroatomů, jak je uvedeno výše, a který je přímo vázán k C_{β} nebo přes heteroatom jak je uvedeno výše.

n je 1 nebo 2, v závislosti na tom, zda skupina e-indikátoru je vázána k $C\alpha$ nebo k X a kde jedno z Y a Z má funkční skupinu pro navázání k vazebné skupině nebo je k vazebné skupině navázán, tj. slouží jako vazebná skupina nebo zahrnuje vazebnou skupinu pro navázání vazebné skupiny, T .

S výhodou jsou W , X , Y a Z vybrány na základě štěpitelného elektroforetického indikátoru, E , takže jsou v rozmezí velikostí popsaných níže. Pokud není uveden vzorec, lze používat mnoho zbytků e-indikátorů na jedné molekule tak, že je jeden nebo více zbytků e-indikátorů připojen k jednomu nebo k oběma X .

Příklady štěpitelných vazeb zahrnují S-3-thiolakrylovou kyselinu, -N,N-methyl-4-amino-4-butenovou kyselinu, -O,3-hydroxyakrolein, N-(4-karboxyfenyl)-2-imidazol, oxazol a thiazol. Také jsou zajímavé N-alkylakridinyl deriváty substituované v pozici 9 divalentní skupinou obecného vzorce :



kde X^1 je heteroatom vybraný ze skupiny sestávající z O, S, N a Se, obvykle jeden z prvních třech a A je řetězec o alespoň dvou uhlíkových atomech a obvykle ne více než 6 uhlíkových atomech substituovaných reportérem e-indikátoru, kde jiné valence A jsou uskutečněny díky vodíku, přestože je řetězec substituován dalšími skupinami jako alkyl, aryl, heterocyklickými skupinami atd. Obecně tyto skupiny nemají více než 10 uhlíkových atomů.

Také jsou používány heterocyklické sloučeniny např. diheterocyklopentadieny a jako příklady slouží substituované imidazoly, thiazoly, oxazoly atd., kde kruhy jsou obvykle substituovány alespoň jednou aromatickou skupinou a v některých případech hydrolyzy je nezbytné uvolnit reportér e-indikátoru.

Dále jsou zajímavé deriváty teluria (Te), kde Te je navázáno k ethylenové skupině mající vodíkový atom β u Te atomu, kdy ethylenová skupina je součástí alicyklického nebo heterocyklického kruhu, který má oxo skupinu, s výhodou splývající s aromatickým kruhem a další valence Te jsou navázány k reportéru e-indikátoru. Kruhy jsou kumarin, benzoxazin, tetralin atd.

Některé výhodné štěpitelné vazby a jejich produkty štěpení jsou znázorněny na obrázcích 10 A-F. Thiazolová štěpitelná vazba „-CH₂-thiazol-(CH₂)_n-C(=O)-NH-protein“ zobrazená na obrázku 10A je výsledkem elektroforetického indikátoru se vazebnou skupinou „-CH₂-C(=O)-NH-CHO“. n je v rozmezí od 1 do 12, lépe od 1 do 6. Thiazolová štěpitelná vazba „-CH₂-oxazol-(CH₂)_n-C(=O)-NH-protein“ zobrazená na obrázku 10B je

výsledkem elektroforetického indikátoru s vazebnou skupinou „-CH₂-C(=O)-O-CHO“. Štěpitelná vazba olefinu (obr.10C) je ukázána v provedení spojení s elektroforetickou sondou „T-L-M-D“, která je popsána výše a s D, které je fluorescenční barvivo.

Štěpitelné vazby olefinu lze použít i v jiných provedeních. Štěpení znázorněné vazby olefinu je výsledkem elektroforetického indikátoru, která má obecný vzorec: „R-(C=O)-M-D“, kde R je substituent obecně popisující elektroforetické indikátory, E, poskytnuté výše. R je skupina poskytující elektrony, viz. Ullman et al., US patent 6 251 581, Smith and March, March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure, 5th Edition (Wiley-Interscience, New York, 2001) atd. R je skupina poskytující elektrony mající 1 až 8 uhlíkových atomů a od 0 do 4 heteroatomů vybraných ze skupiny O, S a N. Dále je

R –N(Q)₂-OQ, p-[C₆H₄N(Q)₂], furanyl, n-alkylpyrolyl, 2-indoyl atd., kde D je alkyl nebo aryl. Dále s odkazem na štěpitelnou vazbu olefinu na obr.10C, jsou substituenty „X“ a „R“ rovnocenné se substituenty „X“ a „Y“ výše uvedeného vzorce popisujícího štěpitelnou vazbu. Zvláště X na obrázku 10C je morfolino, OR' nebo SR", kde R' nebo R" jsou alifatické, aromatické alicyklické nebo hetrocyklické zbytky mající od 1 do 8 uhlíkových atomů a od 0 do 4 heteroatomů vybraných ze skupiny sestávající z O, S a N. S výhodou je rozmezí od 2 do 6. Štěpitelná vazba thioetherového typu znázorněná na obrázku 10D je připojena k vazebné skupině T, a k elektroforetickému indikátoru E pomocí prekursorové sloučeniny zobrazené na obrázku 10E a 10F. Pro připojení k amino skupině vazebné skupiny T je koncový hydroxyl přeměněn na NHS-ester pomocí běžných chemických metod. Po reakci s amino skupinou a připojení je Fmoc chránící skupina odstraněna za vzniku volného aminu, který pak reaguje s NHS esterem e-indikátoru, jehož sloučeniny vznikly dle schémat na obrázcích 1, 2 a 4, s tou výjimkou, že poslední reakční krok je přidavek NHS-esteru namísto fosoramiditové skupiny.

Elektroforetický indikátor je ve vodě rozpustná organická sloučenina, která je stabilní s ohledem na aktivní látku, zvláště singletový kyslík a proto zahrnuje detekční nebo reportérovou skupinu. Jinak se může E široce lišit jak ve velikosti tak struktuře. S výhodou E nese náboj při neutrálním pH a má molekulovou hmotnost v rozmezí od 150 do 10 000 Da a lépe od 150 do 5000 Da a nejlépe od 150 do 2500 Da. Výhodná struktura E je popsána podrobněji níže. Detekční skupina vytváří fluorescentní signál. Sloučeniny vynálezu zahrnují množství elektroforetických indikátorů, které jsou použity společně k uskutečnění několikanásobných rozborů daného vynálezu. Množství

elektroforetických indikátorů v prostředí je 5 a lépe 10. Ještě lépe pokud je množství v rozmezí 5 až 200, 5 až 100, 5 až 75 a/nebo 5 až 50 a nebo 5 až 30. I přes velké množství elektroforetických indikátorů v prostředí má každý e-indikátor buď jedinečný poměr náboj-hmotnost a/nebo jedinečnou optickou vlastnost s ohledem na ostatní e-indikátory stejného prostředí. Výhodnou optickou vlastností je fluorescenční vlastnost, jako je například emisní spektrum. Například každý elektroforetický indikátor z velkého množství takových indikátorů má stejné vlastnosti fluorescenční emise, ale všechny se od sebe liší jedinečným poměrem náboj-hmotnost. Na druhou stranu dva a nebo několik elektroforetických indikátorů z velkého množství e-indikátorů má identický náboj vzhledem k hmotnostnímu poměru, ale má jedinečné fluorescenční vlastnosti, tj. spektrálně rozlišitelná emisní spektra, takže všechny indikátory z velké skupiny jsou odlišitelné pomocí kombinace elektroforetické separace a fluorescenčního měření.

Elektroforetické indikátory ve velké skupině jsou detekovány pomocí elektroforetické separace a fluorescence. Elektroforetické indikátory mající značně identické fluorescenční vlastnosti mají odlišnou elektroforetickou pohyblivost, takže jsou vytvořeny odlišné píky na elektroferogramu za podmínek separace. Měření distinkce nebo nedostatku překrytí přilehlého píku je elektroforetickým rozlišením, které je vzdáleností mezi maximem přilehlého píku děleno čtyři krát větší hodnotou získanou ze standardních odchylek obou píků. Výhodně má přilehlý pík rozlišení alespoň 1,0, lépe 1,5 s nejlépe 2,0. V daném separačním a detekčním systému lze požadovaného rozlišení dosáhnout výběrem skupiny elektroforetických indikátorů, jejíž části mají takovou elektroforetickou pohyblivost, která se liší alespoň množstvím na úrovni jednoho píku, toto množství závisí na několika faktorech a odborníkům jsou tyto faktory dobře známy. Jedná se o detekci signálu, povahu fluorescenčního zbytku, difúzní koeficient indikátorů, přítomnost nebo nepřítomnost prosévací matrice, povahu elektroforetické aparatury, tj. přítomnost nebo nepřítomnost kanálů, délky separačního kanálu atd. Množství elektroforetických indikátorů vynálezu jsou odděleny pomocí běžné aparatury pro kapilární elektroforézu buď v přítomnosti nebo nepřítomnosti běžné prosévací matrice. Příklady aparatury kapilární elektroforézy zahrnují modely Applied Biosystems (Foster City, CA) – 310, 3100 a 3700, Beckman (Fullerton, CA) model P/ACE MDQ, Amersham Biosciences (Sunnyvale, CA) Mega BACE 10000 nebo 4000, SpectruMedix systém pro genetickou analýzu atd. V takto běžných aparaturách se liší elektroforetické pohyblivosti jednotlivých elektroforetických indikátorů ve skupině alespoň jedním procentem, lépe 1 až 10 procenty.

Elektroforetická pohyblivost je úměrná $q/M^{2/3}$, kde q je náboj molekuly a M je hmotnost molekuly. Požadovaný rozdíl mezi pohyblivostmi za podmínek stanovení mezi nejbližšími elektroforetickými hladinami je přinejmenším 0,001, obvykle 0,002, lépe 0,01 a může být i 0,02 a více.

Preferovaná struktura e-indikátoru, E, je (M,D), kde M je skupina modifikující pohyblivost a D je detekční skupina. Zápis „(M,D)” se používá pro označení toho, že pořadí M a D skupin je takové, aby byly přizpůsobitelné štěpitelné vazbě L. Tak například „T-L-(M, D)” naznačuje elektroforetickou sondu dvou forem: „T-L-M-D” nebo „T-L-D-M”.

Detekční skupina, D, je fluorescenční značkou nebo barvivem, chromogenní značkou nebo barvivem, elektrochemickou značkou nebo barvivem atd. Výhodněji je D fluorescenčním barvivem. Příklady fluorescenčních barviv pro použití v předloženém vynálezu zahrnují ve vodě rozpustná barviva na bázi rhodaminu, fluoresceiny, 4,7-chlorfluoresceiny, benzoxanthenová barviva, energii přenášející barviva atd. popsaná v následující literatuře: Handbook of Molecular Probes and Research Reagents, 8th ed., (Molecular Probes, Eugene, 2002); Lee et al, patent US 6 191 278; Lee et al, patent US 6 372 907; Menchen et al, patent US 6 096 723; Lee et al, patent US 5 945 526; Lee et al, Nucleic Acids Research, 25: 2816-2822 (1997); Hobb, Jr., patent US 4 997 928; Khanna et al., patent US 4 318 846; Reynolds, patent US 3 932 415; Eckert et al. patent US 2 153 059; Eckert et al, patent US 2 242 572; Taing et al, International patent publication WO 02/30944; atd.

Nejlépe je D fluorescein nebo jeho derivát. Příklady nejvíce preferovaných barviv pro použití v daném vynálezu jsou ukázány na obrázcích 6A a 6B.

M je obecně chemická skupina nebo zbytek, který má a nebo je navržen tak, aby měl jedinečný poměr náboj-hmotnost a tím měl i zvláštní elektroforetickou pohyblivost v definovaném elektroforetickém systému. Příklady typů skupin schopných modifikovat pohyblivost jsou rozebrány níže. V sadě N elektroforetických sond, má každá jedinečná látka modifikující pohyblivost, která je označena M_j , kde $j=1$ až n a n má hodnotu popsanou níže. Skupina modifikující pohyblivost zahrnuje hmotnost modifikující část a/nebo náboj modifikující část nebo jednotlivou část, která funguje jako obojí – hmotnost i náboj modifikující část. V sadě sond použitých ve vynálezu má pohyblivost modifikující skupina jednu nebo více z následujících znaků:

1. jedinečný poměr náboj-hmotnost vzhledem k odlišnostem v hmotnosti, ale ne v náboji
2. jedinečný poměr náboj-hmotnost vzhledem k odlišnostem jak v hmotnosti, tak v náboji
3. jedinečný poměr náboj-hmotnost v rozmezí od $-0,0001$ a $0,5$, obvykle $-0,001$ a $0,1$. Jak je uvedeno výše, D je běžné mezi sadou nebo skupinou různých elektroforetických sond, ale liší se také mezi sadami sond, které přispívají k unikátní elektroforetické pohyblivosti uvolněného e-indikátoru

Velikost a složení skupiny modifikující pohyblivost, M , se může lišit ve vazbě 100 atomů v řetězci, obvykle ne více než 60 atomů, výhodněji ne více než 30 atomů, kde atomy jsou uhlík, kyslík, dusík, fosfor, bor a síra. Pokud jde o jinou vazbu, skupina modifikující pohyblivost může mít od 0 do 40, lépe od 0 do 30 heteroatomů, které kromě atomů uvedených výše zahrnují halogen nebo jiný heteroatom. Celkový počet atomů odlišných od vodíku je obecně méně než 200 atomů, obvykle méně než 100 atomů. Pokud jsou přítomny kyselé skupiny, závisí na pH média, ve které je pohyblivost modifikující skupina přítomna, protože různé kationty mohou být připojeny ke kyselé skupině. Kyseliny jsou organické nebo anorganické, zahrnují skupiny karboxylovou, thionokarboxylovou, thiokarboxylovou, hydroxamovou, fosforečnou, fosforitou, fosfonátovou, fosfinátovou, sírovou, siřičitanovou, boritou, dusičnou, dusitou atd. Pro pozitivní náboje zahrnují substituenty skupiny amino (včetně amoniaku), fosfonia, sulfonia, oxonia atd., kde jsou obecně substituenty alifatické od 1 do 6 uhlíkových atomů, celkový počet uhlíkových atomů na heteroatom je obvykle méně než 12, popřípadě méně než 9. Postranní řetězce zahrnují aminy, amoniové sole, hydroxylové skupiny, včetně fenolové skupiny, karboxylové skupiny, esterů, amidů, fosfátů, heterocyklů. M je homo-oligomer nebo hetero-oligomer mající různé monomery stejné nebo odlišné chemické povahy, například nukleotidy a aminokyseliny.

Skupiny modifikující náboj mají pouze záporné nebo kladné náboje, ačkoliv mohou mít i kombinaci nábojů, zvláště je-li náboj v části, kde je připojena skupina modifikující pohyblivost, kdy skupina modifikující pohyblivost nese opačný náboj. Skupiny modifikující pohyblivost jsou jednoduchými monomery, které poskytují různé funkční skupiny pro oligomeraci a nesou náboj a nebo jsou použity dva monomery. Lze také použít substituované dioly, kde substituenty nesou náboj nebo lze použít dibazické kyseliny. Příklady takových oligomerů jsou sloučeniny diolů nebo diaminů jako například

2,3-dihydroxypropanová kyselina, 2,3-dihydroxyjantarová kyselina, 2,3-diaminojantarová kyselina, 2,4-dihydroxyglutarová kyselina atd. Diolové nebo diaminové sloučeniny mohou být spojeny dibazickými kyselinami, které zahmují anorganické dibazické kyseliny vyjmenované výše, ale také dibazické kyseliny jako je kyselina oxalová, malonová, jantarová, maleinová, fumarová, uhličitá atd. Místo používání esterů lze použít amidy a lze použít také aminokyseliny nebo diaminy a dikyseliny. Popřípadě lze spojit hydroxyly nebo aminy s alkylovou nebo arylovou skupinou.

Při použití monomerů, které mají substituenty, jež poskytují náboj nebo které mohou být pozměněny tak, aby náboj poskytovaly lze získat skupiny modifikující pohyblivost s požadovaným poměrem náboj-hmotnost. Například použitím serinu nebo threoninu lze modifikovat hydroxylové skupiny fosfátu a získá se tak negativně nabitá skupina modifikující pohyblivost. Oligomerace je provedena pomocí běžných metod a poskytuje skupinu modifikující pohyblivost o vhodné velikosti. Různé skupiny modifikující pohyblivost mají různé pořadí oligomerů, obecně od 1 do 20 monomerních jednotek, lépe od 1 do 12, kde jednotka znamená opakující se jednotku, která má od 1 do 2 různých monomerů. Nejvíce jsou používány oligomery s jinými oblastmi než jsou cílové oblasti vázající nukleové kyseliny. Polyfunkčnost monomerních jednotek poskytuje funkční skupiny na konci, které jsou použity pro konjugaci s ostatními skupinami, takže lze použít dostupnou funkční skupinu pro reakci zajišťující různou funkční skupinu. Například lze nechat reagovat karboxylovou skupinu s aminoethylthiolem, čím se odstraní karboxylová skupina s thiolovou funkční skupinou pro reakci s aktivovaným olefinem. Pomocí monomerů, které mají od 1 do 3 nábojů lze použít nízký počet monomerů a zajistit různé pohyblivosti se změnou molekulové hmotnosti. Zvláště je výhodné použít polyolpolykarboxylové kyseliny mající od dvou do čtyř funkčních skupin jako je kyselina vinná, 2,3-dihydroxyterftalová kyselina, 3,4-dihydroxyftalová kyselina, Δ_5 -tetrahydro-3,4-dihydroxyftalová kyselina atd. K zajištění dodatečného záporného náboje jsou tyto monomery podrobeny oligomeraci s dibazickou kyselinou, jakou je derivát kyseliny fosforečné a vzniká fosfodiester. Popřípadě lze použít kyselinu uhličitou s diaminem, což dá vznik polyamidu, kdežto hydroxylové skupiny lze použít k tvorbě esterů, jako je fosfoester nebo ethery jako např. etherglykolové kyseliny atd. Pro změnu pohyblivosti lze použít různé alifatické skupiny o různé molekulové hmotnosti jako například polymethyleny, polyoxyalkyleny, polyhaloalifatické nebo aromatické skupiny, polyoly, tj. cukry, kde se bude pohyblivost liší alespoň o 0,01, obvykle o 0,02 a nejlépe o 0,5.

V jiném přístupu jsou sestrojeny skupiny (M,D) z jednoho nebo několika stejných nebo odlišných běžných nebo komerčně dostupných spojovacích, sířovacích a značených činidel, které umožňují snadné sestavení, zvláště s pomocí komerční DNA nebo peptid syntetizátoru pro celou syntézu nebo její určitou část. V jiném přístupu jsou (M,D) skupiny vyrobeny z podjednotek obvykle spojených pomocí fosfodiesterové nebo amidové vazby. Příklady prekursorů zahrnují dimethoxytrityl (DMT)-chráněný hexaethylenglykolfosforamidit, 6-(4-monomethoxytritylamino)hexyl-(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-fosforamidit, 12-(4-monomethoxytritylamino)dodecyl-(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-fosforamidit, 2-[2-(4-monomethoxytrityl)aminoethoxy]ethyl-(2-kyanoethyl),N,N-diisopropyl)-fosforamidit, (S-trityl-6-merkaptohexyl)-(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-fosforamidit, 5'-fluorescein-fosforamidit, 5'-hexachloro-fluorescein-fosforamidit, 5'-tetrachloro-fluorescein-fosforamidit, 9-O-dimethoxytrityltriethyleneglykol, 1-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-fosforamidit, 3(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyl-1-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-fosforamidit, 5'-O-dimethoxytrityl-1',2'-dideoxyribosa-3'-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-fosforamidit, 18-O-dimethoxytritylhexaethyleneglykol, 1-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-fosforamidit, 12-(4,4'-dimethoxytrityloxy)dodecyl-1-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-fosforamidit, 1,3-bis-[5-(4,4'-dimethoxytrityloxy)pentylamido]propyl-2-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-fosforamidit, 1-[5-(4,4'-dimethoxytrityloxy)pentylamido]-3-[5-fluorenomethoxykarbonyloxypentylamido]-propyl-2-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-fosforamidit, tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyloxymethyl]ethyl-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-fosforamidit, sukcinimidyl-trans-4-(maleimidylmethyl)-cyklohexan-1-karboxylát (SMCC), sukcinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionát (SPDP), sukcinimidylacetylthioacetát, Texas Red-X-sukcinimidylester, 5- a 6-karboxytetramethylrhodaminsukcinimidylester, bis-(4-karboxypiperidiny)lsulfonrhodamin-di(sukcinimidylester), 5- a 6-((N-(5-aminopentyl)aminokarbonyl)tetramethylrhodamin, sukcinimidyl-4-(p-maleimidofenyl)butyrát (SMPB); N-y-maleimidobutyryl-oxysukcinimidester (GMBS); p-nitrofenyljodoacetát (NPIA); hydrazid kyseliny 4-(4-N-maleimidofenyl)-máselné (MPBH); atd. Výše uvedená činidla jsou komerčně dostupná například od Glen Research (Sterling, VA), Molecular Probes (Eugene, OR), Pierce Chemical a podobných dodavatelů činidel. Použití výše uvedených činidel v běžných syntetických reakcích je odborníkům dobře známé, viz. Hermanson, Bioconjugate

Techniques (Academic Press, New York, 1996). Speciálně lze M sestavit z následujících činidel: dimethoxytrityl (DMT)-chráněný hexaethylenglykol fosforamidit, 6-(4-monomethoxytritylamino)hexyl-(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-fosforamidit, 12-(4-monomethoxytritylamino)dodecyl-(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-fosforamidit, 2-[2-(4-monomethoxytrityl)aminoethoxy]ethyl-(2-kyanoethyl),N,N-diisopropyl)-fosforamidit, (S-trityl-6-merkaptohexyl)-(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-fosforamidit, 9-O-dimethoxytrityltriethylenglykol,1-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-fosforamidit,3(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyl-1-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-fosforamidit, 5'-O-dimethoxytrityl-1',2'-dideoxyribosa-3'-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-fosforamidit, 18-O-dimethoxytritylhexaethylenglykol, 1-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-fosforamidit, 12-(4,4'-dimethoxytrityloxy)dodecyl-1-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-fosforamidit,1,3-bis-[5-(4,4'-dimethoxytrityloxy)pentylamido]propyl-2-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-fosforamidit, 1-[5-(4,4'-dimethoxytrityloxy)pentylamido]-3-[5-fluorenomethoxykarbonyloxypentylamido]-propyl-2-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-fosforamidit, tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyloxymethyl]ethyl-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-fosforamidit, succinimidyl-trans-4-(maleimidylmethyl)cyklohexan-1-karboxylát (SMCC), sukcinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionát (SPDP), sukcinimidylacetylthioacetát, sukcinimidyl-4-(p-maleimidofenyl)butyrát (SMPB); N-y-maleimidobutyryloxysukcinimidester (GMBS); p-nitrofenyljodoacetát (NPIA) a hydrazid kyseliny 4-(4-N-maleimidofenyl)-máselné (MPBH). M také obsahuje polymerní řetězce připravené pomocí dobře známých metod syntézy polymerů z jednotlivých podjednotek, jsou dobře známy postupy přípravy řetězců obsahujících polyethylenoxid o definované délce viz. Grossman et al, patent US 5 777 096. S výhodou lze u těchto metod využít vzájemné spojování několika velikostně definovaných podjednotek obsahující polymerní jednotky přímo přes vazebné skupiny, což je aplikovatelné na širokou řadu polymerů, jakými jsou polyethery (tj. polyethylenoxid a polypropylenoxid), polyestery (tj. polyglykolová kyselina, polyoctová kyselina), polypeptidy, oligosacharidy, polyuretáty, polyamidy, polysulfonamidy, polysulfoxidy, polyfosfonáty, a jejich blokové kopolymery včetně polymerů sestavených z jednotek nebo několika podjednotek spojených vazebnými skupinami nesoucími nebo postrádajícími náboj. Kromě homopolymerů lze použít i kopolymery o definované délce, tj. kopolymery jednotek polyethylenoxidu střídavě spojené s jednotkami polypropylenu. Dalším příkladem homopolzmerů nebo směsných

polymerů jsou polypeptidy definované délky a aminokyselinové sloučeniny (tj. takové, které obsahují přirozeně se vyskytující nebo uměle vyrobené aminokyselinové zbytky).

Detekční skupina (M,D) vytváří fluorescentní signál pomocí mechanismu přenosu energie. D má formu D_1 -g- D_2 , kde D_1 a D_2 jsou akceptro-donorovými páry molekul, viz. Wu et al., Anal.Biochem., 218:1-13 (1994) a g je rigidní linker, který udržuje D_1 a D_2 v konstantní vzdálenosti. Postup výběru rigidního linkeru, g, lze najít v We et al., (citovaný výše) a v patentu US 5 863 727, patentu US 5 800 996, patentu US 5 945 526 a patentu US 6 008 379. Jak D_1 a D_2 jsou buď akceptorové nebo donorové molekuly v páru. Příklady použití skupin schopných detkovat přenos energie v daném vynálezu je popsán v Lee et al., patentu US 5 945 526, Lee et al., Nucleic Acid Research, 25:2816-2822 (1997), Taing et al., International patent publication WO 02/30944 a další literatuře. Výhodně je rigidní linker vybrán tak, aby vzdálenost mezi D_1 a D_2 byla držena v podstatě konstantní vzdálenosti v rozmezí 10-100 Angstrom. Široká řada vazebných skupin je použita s podmínkou, že vazba je stálá v přítomnosti singletového kyslíku. Výhodně jsou D_1 a D_2 vybrány ze sady sestávající z fluoresceinu, rhodaminu, rhodaminu 6G, rhodaminu 110, rhodaminu X, tetramethylrhodaminu a jeho halogenovaných derivátů. Lépe jsou jak D_1 tak D_2 fluorescenční barviva.

Z dalšího hlediska lze g vybrat z jakékoliv sloučeniny R_1 - R_2 - R_1 a R_1 - R_2 -C(=O)- X_1 - R_3 , které budou popsány později s ohledem na D_1 a D_2 , kde X_1 je O, S nebo NH, R_1 je (C_1 - C_5) alkylidyl, X_1 , C(=O)), přičemž jakákoliv ze tří skupin v závorkách je uspořádána v lineárním pořadí, R_2 je 5 až 6-ti členný kruh vybraný ze skupiny obsahující cyklopenten, cyklohexen, cyklopentydien, cyklohexadien, furan, pyrol, isopyrol, isoazol, pyrazol, isoimidazol, pyran, pyron, benzen, pyridin, pyridazin, pyrimidin, pyrazin, oxazin, inden, benzofuran, thionafte, indol a naftalen, R_2 je, C_1 - C_2 alkylidyl.

Po uvolnění je definován elektroforetický indikátor, E, obecným vzorcem:



kde A je -C(=O)R, kde R je alifatická, aromatická, alicyklická nebo heterocyklická skupina mající od 1 do 8 uhlíkových atomů a od 0 do 4 heteroatomů vybraných ze skupiny obsahující O, S a N, -CH₂-C(=O)-NH-CHO, -SO₂H, -CH₂-C(=O)O-CHO, -C(=O)NH-(CH₂)_n-NH-C(=O)C(=O)-(C₆H₅), kde n je v rozmezí od 2 do 12, D je fluorescenční barvivo a M je popsáno výše s tou podmínkou, že molekulární hmotnost

A-M-D je v rozmezí od 150 do 5000 Da. S výhodou je ve formě D „D₁-g-D₂“, jak je popsáno výše.

V některých provedeních potřebuje být e-indikátor nabitý a zcela se lišit v hmotnosti. Proto lze použít stejné nebo podobné monomery, kde funkční skupiny budou neutrální nebo tak budou vytvořeny, jako je tomu například u esterů a amidů karboxylových kyselin. Také lze pozměnit skupinu e-indikátoru pomocí isotopické substituce, jako je ²H, ¹⁸O, ¹⁴C atd. Skupiny elektroforetických indikátorů zahrnují oligopeptidy pro zajištění náboje, zvláště oligopeptidy mající od 2 do 6, obvykle od 2 do 4 monomerů, ať pozitivně nabitých, jak je tomu u lysinu, argininu a histidinu nebo záporně nabitých, jak je tomu u kyseliny aspartamové nebo glutamové. Samozřejmě lze použít i v přírodě se nevyskytující aminokyseliny, ať nepřírozené nebo uměle připravené aminokyseliny jako je například taurin, fosfátem substituovaný serin nebo threonin, S-α-sukcinylcystein, kopolyomery diaminů a aminokyselin atd.

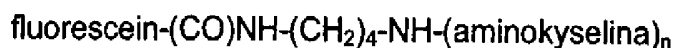
V jednom z provedení předloženého vynálezu je náboj nesoucí skupina vhodně složena především z aminokyselin, ale také může obsahovat thiokyseliny a ostatní karboxylové kyseliny mající od jednoho do pěti uhlíkových atomů. Náboj nesoucí skupina má od 1 do 30, lépe od 1 do 20 a nejlépe od 1 do 10 aminokyselin na skupinu a obsahuje také 1 až 3 thiokyseliny nebo jiné karboxylové kyseliny. Pokud je používána s nenabitou podjednotkou, má nabitá podjednotka obvykle od 1 do 4, častěji od 1 do 3 aminokyselin. Jak je uvedeno výše může být použita jakákoliv aminokyselina, ať se vyskytuje přirozeně nebo je syntetická.

V dalším provedení lze popsat T-L-M-D obecným vzorcem:



kde L' je vazba nebo vazebná skupina mající 1 až 20 atomů jiných než je vodík, n je 1 až 20 a L je štěpitelná vazba na polypeptid vázající skupině. V tomto provedení je T připojeno ke koncové aminokyselině pomocí štěpitelné vazby. V příkladu tohoto provedení je použit jako fluorescer fluorescein, L' je vazba ve formě amidové vazby zahrnující meta-karboxylfluoresceinu a terminální aminovou skupinu lysinu a T je polypeptid vázající skupina.

Příklady elektroforetických indikátorů na bázi značených konjugátů jsou popsány následovně:



kde jsou obecné vzorce a náboje při neutrálním pH pro specifické sloučeniny jsou uvedeny v tabulce 2.



Tabulka 2

číslo	(aminokyselina) _n	Náboj (q)	Molekulární hmotnost (M)	$q/M^{2/3}$
1	žádná	-1	446	-.0178
2	lysin	-1	591	-.0148
3	(lysin) ₂	neutrální	737	-.0128
4	alanin	-2	534	-.0298
5	aspartamová kyselina	-3	578	-.0423
6	(aspartamová kyselina) ₂	-4	711	-.0491
7	(aspartamová kyselina) ₃	-5	844	-.0877
8	(aspartamová kyselina) ₄	-6	977	-.0595
9	(aspartamová kyselina) ₅	-7	1110	-.0638
10	(aspartamová kyselina) ₆	-8	1243	-.0675
11	(aspartamová kyselina) ₇	-9	1376	-.0710
12	alanin/lysin	-2	680	-.0253
13	aspartamová kyselina-lysin	-2	724	-.0243
14	(aspartamová kyselina) ₂ -lysin	-3	857	-.0325
15	(aspartamová kyselina) ₃ -lysin	-4	990	-.0393
16	(aspartamová kyselina) ₄ -lysin	-5	1123	-.0452
17	(aspartamová kyselina) ₅ -lysin	-6	1256	-.0503
18	(aspartamová kyselina) ₆ -lysin	-7	1389	-.0549
19	(aspartamová kyselina) ₇ -lysin	-8	1522	-.0590
20	(aspartamová kyselina) ₈ -lysin	-9	1655	-.0627
21	(lysin) ₄	+2	1029	.0192
22	(lysin) ₅	+3	1170	.0264

kde q je náboj, M je hmotnost a pohyblivost je úměrná $q/M^{2/3}$.

V jiném provedení je pohyblivost modifikující skupina, M , závislá na použitém alkylenu nebo aralkylenu (obsahující bivalentní alifatickou skupinu mající od 1 do 2 alifatických částí, obvykle jde o benzen), kde jsou skupiny substituované nebo nesubstituované, většinou nesubstituované, 2 až 19 nejlépe 2 až 12 atomy uhlíku a kde skupina modifikující pohyblivost poskytuje stejnou nebo odlišnou fluorescenci na danou monomerní jednotku, tj. nukleotid. Pohyblivost modifikující skupina, která je zakončena skupinami karboxy, hydroxy nebo amino, je přítomna jako ester nebo amid. Použitím různých substituentů na fluoroforu lze měnit hmotnost jednotek alespoň 5 krát a více,

obvykle 9 krát a tím lze získat uspokojující separaci při kapilární elektroforéze. Při zajištění dalších obměn lze použít thiosukcimidovou skupinu ke spojení alkylenové nebo aralkylenové skupiny s dusíkem a sírou, takže se docílí celkového počtu atomů uhlíku v rozmezí 2 až 30, lépe 2 až 20. Místo výše uvedených skupin s cílem posílit hydrofilitu lze použít alkylenoxy skupiny.

Kromě povahy skupiny modifikující pohyblivost, jak bylo naznačeno, lze rozdílnosti také dosáhnout pomocí chemických a optických znaků použité značky, použitím komplexů pro přenos energie, obměnami v chemické povaze skupiny modifikující pohyblivost, což ovlivňuje pohyblivost, takto funguje například skládání, interakce s rozpouštědly a ionty v rozpouštědlech atd. V jednom z provedení vynálezu je skupinou modifikující pohyblivost oligomer, kde je skupina modifikující pohyblivost syntetizována na nosiči nebo je vytvořena klonováním nebo expresí ve vhodném hostiteli. Běžně lze vytvářet polypeptidy, pokud je koncová skupina jiná než cystein nebo serin/threonin/tyrosin, aspartamová/glytamová kyselina nebo lysin/arginin/histidin, takže pak existuje unikátní funkční skupina, která je odlišně využívána. Použitím chránících skupin lze odlišit funkční skupinu postranního řetězce od koncové funkční skupiny aminokyseliny. Také lze vhodným návrhem zajistit preferovanou reakci mezi stejnými funkčními skupinami na různých místech skupiny modifikující pohyblivost. Zda se pro přípravu oligopeptidů použije syntézy nebo klonování závisí na délce skupiny modifikující pohyblivost.

Substituované aryl skupiny slouží jako části modifikující jak hmotnost tak náboj. Různé funkční skupiny jsou substituovány na aromatické skupině, tj. fenyly a poskytují tak hmotnost stejně jako náboj e-indikátoru. Aryl skupina je koncovou skupinou, kde je vyžadována pouze vazebná skupina, takže volná hydroxyl skupina je acylována a může být připojena jako postraní řetězec k přítomnému hydroxylu na reportérovém řetězci e-indikátoru nebo může mít dvě funkční skupiny, například fenolové hydroxyly, které slouží k tvorbě esteru kyseliny fosforité a ostatních substituentů jako jsou halo, haloalkyl, nitro, kyano, alkoxykarbonyl, alkylthio skupiny atd., kde tyto skupiny nesou náboj nebo jsou bez náboje. Konjugáty značení jsou připraveny použitím konjugačních technik, které jsou v oboru velmi dobře známy. M lze syntetizovat z malých molekul, které mají funkční skupiny, které zajišťují spojení molekul k jinému, obvykle lineárnímu řetězci. Takové funkční skupiny zahrnují karboxylové skupiny, aminy a hydroxy nebo thiol skupiny. V souladu s předloženým vynálezem skupina nesoucí náboj má jednu nebo více postranních skupin vyčnívajících z hlavního řetězce. Postranní skupiny mají

funkční skupiny, které zajišťují spojení se značkou nebo spojení s jinou molekulou skupiny nesoucí náboj. Běžné funkční skupiny vznikají reakcemi použitých funkčních skupin a jsou důkazem vytvoření kovalentní vazby mezi molekulami, které mají být spojeny. Příklady těchto funkčních skupin jsou disulfid, amid, thioamid, dithiol, ether, močovina, thiomčovina, guanidin, azo, thioether, karboxylát a estery a amidy obsahující síru a fosfor jako například sulfonát, estery kyseliny fosforečné, sulfonamidy, thioestery atd.

Spojení částí skupiny e-indikátoru jsou prodiskutovány výše. Spojení mezi detekční skupinou a skupinou modifikující pohyblivost je obvykle stabilní vůči působení skupiny indukující štěpení, takže skupina modifikující pohyblivost a detekční skupina jsou uvolněny jako neporušená jednotka ze sondy e-indikátoru během štěpení jako reportér e-indikátoru ze sondy e-indikátoru.

Většinou je skupina modifikující pohyblivost vazba, kde je detekční skupina nebo značka přímo navázána na skupinu vázající cílovou molekulu nebo připojena přes 1 až 500 nebo více atomů, lépe 1 až 300 atomů nejlépe 2 až 100 atomů v řetězci. V tomto provedení podstatnou mírou závisí celkový počet atomů v řetězci na rozmanitosti nutné pro rozeznání všech cílových molekul, které mají být určeny. Řetězec skupiny modifikující pohyblivost je z větší části složen z uhlíku, dusíku, kyslíku, fosforu, boru a síry. Různé substituenty přítomné na skupině modifikující pohyblivost, se vyskytují přirozeně jako monomery nebo jsou navázány pomocí reakcí chemické syntézy. Funkční skupiny, které se mohou vyskytovat v řetězci jsou amidy, fosfáty, estery, ethery, thioestery, disulfidy, estery kyseliny borité, estery kyseliny fosforečné, estery kyseliny sírové atd. Postranní řetězce zahrnují aminy, amoniové sole, hydroxylové skupiny, včetně fenolové skupiny, karboxylové skupiny, estery, amidy, fosfáty, heterocykly, částečně dusíkaté heterocykly, jako jsou nukleosidové báze a řetězce aminokyselin, jako např. imidazol a quinolin, thioethery, thioly nebo jiné zajímavé skupiny způsobující změnu pohyblivosti elektroforetického indikátoru.

Skupina modifikující pohyblivost je homooligomer nebo heterooligomer mající odlišné monomery stejných nebo různých vlastností, tj. nukleotidy a aminokyseliny. V provedení mají skupiny e-indikátorů linker, který zajišťuje spojení mezi skupinou modifikující pohyblivost a molekulou detekční značky, obvykle fluorescenční nebo funkční skupiny, které lze použít pro spojení s molekulou detekční značky. Tím, že má e-indikátor různé funkční skupiny může být samostatně navázán na molekulu detekční značky, což zvzšuje různorodost e-indikátorů. Použitím různých fluorescenčních látek –

fluorescerů- pro připojení k různým funkčním skupinám lze tímto zajistit rozdíly v emisi světla a poměry náboje k hmotnosti daných elektroforetických indikátorů.

Připojení několika elektroforetických indikátorů k vazebným skupinám

V rozbořech týkajících se polypeptidů je výhodné zajistit uvolnění několika reportérů e-indikátoru pro případ navázání cílové molekuly. Jinak řečeno je nutné zajistit amplifikaci signálu. Je třeba, aby pro každý případ vazby bylo uvolněno 6×10^3 až 6×10^{10} , lépe 6×10^4 až 6×10^8 reportérů e-indikátoru. Tam, kde má skupina vázající polypeptid množství míst pro připojení je například u aminokyseliny, kde je značné množství vazebných míst pro připojení skupin e-indikátorů. Pokud se skupina vázající polypeptid elektroforetické sondy váže na polypeptid a první vazebná skupina základního vazebného činidla se váže k indukovanému vazebnému místu na polypeptidu přenáší a tím skupinu indukující štěpené do těsné blízkosti štěpitelné vazby a je uvolněno množství reportérů e-indikátoru pro případ vazby jednotlivých peptidů. Například připojení skupin e-indikátoru k protilátce je výsledkem 2 až 10 molekul skupin e-indikátoru na jednu molekulu protilátky.

Pro další zvýšení počtu uvolněných reportérů e-indikátoru lze připojit skupiny e-indikátoru k hlavní molekule, ke které je také připojena polypeptid vázající skupina sondy e-indikátoru a to poměrně stabilním způsobem. U polypeptid vázající skupiny, která má velké množství vazebných míst, lze obdobně navázat velké množství hlavních molekul k polypeptid vázající skupině, kde každá hlavní molekula má množství skupin e-indikátorů, které mohou být uvolněny. Jádru hlavní molekuly je proto polyfunkčním materiálem, obvykle polymerním, majícím množství funkčních skupin, tj. hydroxy, amino, merkpto, karboxy, ethylen, aldehyd atd., která jsou místy vazby. Funkční skupiny celkové molekuly mohou být ty, které jsou reaktivní společně s těmi funkčními skupinami, které jsou připojeny ke skupině e-indikátoru nebo jsou připojeny ke skupině vázající polypeptidový řetězec. Některé funkční skupiny jsou preferovány oproti jiným, protože jsou schopné odolat různým nechtěným vedlejším reakcím. Jádru hlavní molekuly je ve vodě rozpustné nebo nerozpustné. Jádru hlavní molekuly má obvykle molekulární hmotnost od 35 000 do 10 miliónů nebo více, ale obvykle je molekulární hmotnost pod hranicí 600 000, lépe pod 300 000. Příklad jádra hlavní molekuly zahrnuje polysacharidy, polypeptidy, polynukleotidy, iontově výměnné pryskyřice atd. Jádru hlavní molekuly je větvený linker, který má několik vazebných míst pro skupiny e-

indikátorů. Linkery s několika vazebnými místy mají vazebné místo pro připojení polypeptid vázající skupiny a množství míst pro připojení množství skupin e-indikátorů. Samozřejmě, že skupiny e-indikátorů musí být připojeny takovými způsoby připojení, které obsahují funkční skupinu, která je štěpitelná pomocí skupiny indukující štěpení v souladu s předloženým vynálezem.

V jednom z provedení je jádro hlavní molekuly hydrofilní polymer, obvykle adiční nebo kondenzační polymer s několika funkčními skupinami, které umožňují připojení několika skupin. Jednou skupinou polymerů, které jsou použity pro činidla předloženého vynálezu jsou polysacharidové polymery. Použité polysacharidy zahrnují dextrany, sefarózu, polyribózu, polyxylózu, atd. Další skupinou jsou takové polymery, které jsou výsledkem adiční polymerace substituovaných monomerů ethylenu nebo butadienu, včetně krátkých řetězců nenasyčených monomerů jako je propylen, kde tyto monomery mají substituenty, které jsou hydrofilními skupinami nebo mohou být na hydrofilní skupiny změněny. Vhodné hydrofilní skupiny jsou takové, které jsou připojeny ke ethylenu včetně hydroxy, karboxy skupin a jejich esterům a amidům, aminům atd. Pokud jsou použity monomery kyseliny akrylové, kyselinu lze derivovat na vhodnou reaktivní skupinu před následnou polymerací. Tak lze například z esteru vytvořeného z ethylenglykolu a kyseliny akrylové získat hydroxylovou skupinu pro přeměnu části sondy e-indikátoru. Ostatní vhodné polymery zahrnují polyalylaminy a alkoholy jako například polyvinylalkohol. Navíc lze použít polymery odvozené od jednoduchého monomeru a směsné polymery. V tomto případě lze hydrofilitu zajistit pomocí nereaktivních složek jako je poethylenglykol, který je pak dále polymerován na monomery, které nesou vhodné funkční skupiny k reakci se složkami sondy e-indikátoru. Na takovém polymeru je kopolymer polyethylglykolu s polyvinylalkoholem. Konkrétním případem jádra hlavní molekuly je dextran, kdy k jeho jedné molekule je připojeno 10 až 300 molekul skupin e-indikátoru.

Pro zvýšení počtu skupin e-indikátoru lze použít částici přítomnou v sondě e-indikátoru. Částičky mohou být pevné (tj. sestavené z organických a anorganických polymerů nebo latexu), kapky oleje (tj. uhlovodíky, fluoruhlík, silikonová kapalina) nebo měchýřky (tj. uměle připravené jako je fosfolipid nebo přírodní jako buňky nebo organely). Pevné částičky jsou obecně polymery buď adiční nebo kondenzační, které lze snadno rozptýlit v analyzovaném médiu. Skupiny e-indikátoru jsou připojeny k částičce pomocí štěpitelné vazby v souladu s předloženým vynálezem. Takto může být připojeno od 100 do 10^5 skupin e-indikátorů k jediné částičce. Částička má na

sobě připojenou obvykle alespoň jednu skupinu vázající polypeptid. V rozsahu daného vynálezu je také přichycení několika molekul dextranu k částěčce a navázání několika skupin e-indikátoru k dextranu pomocí štěpitelných vazeb, které byly popsány výše.

V konkrétním provedení sondy e-indikátoru je polypeptid vázající skupinou protilátka. Počet různých reakcí lze použít pro kovalentní připojení sloučeniny a protilátky. To je provedeno pomocí reakce aminokyselinových zbytků molekuly protilátky, zahrnující aminové skupiny lysinu, volné skupiny karboxylových kyselin kyseliny glutamové a aspartamové, sufhydrolové skupiny cysteinu a různé skupiny aromatických aminokyselin. Konjugace k protilátce je náhodná nebo místně řízená. Pro místně řízenou konjugaci je jakýmkoli vhodným způsobem připojen linker nebo skupina modifikující pohyblivost ke skupině vázající cílovou molekulu, jako je například Fc část protilátky nebo disulfidy v oblasti ohybu. Pro náhodnou konjugaci lze použít amino skupin (tj. N konec nebo lysin). Popřípadě lze použít karboxylové skupiny (tj. C konec, aspartamová kyselina, glutamová kyselina). Ostatní příklady zahrnují thiolové skupiny. Hlavním hlediskem připojení k protilátce je udržení vlastností rozpoznané protilátky nebo její specifity nebo aktivity. Jsou známy konkrétní přístupy pro připojení protilátky. Jedním takovým přístupem je karboimidová reakce, která spojuje karboxy (nebo amino) skupinu sloučeniny a amino (nebo karboxy) skupinu protilátky. Navíc lze použít bifunkční činidla jakými jsou aldehydy nebo imidoestery ke spojení amino skupin sloučeniny a amino skupin molekuly protilátky. V jiném přístupu je použita reakce Schiffovy báze ke spojení sloučenin a molekul protilátek. Tato metoda vyžaduje oxidaci jodistanu sloučeniny, která má být navázána. Tato sloučenina musí proto obsahovat glykolovou nebo hydroxylovou skupinu, čímž se vytvoří aldehyd, který potom reaguje s molekulou protilátky. Dále jako lze spojovacího činidla použít isokyanáty, které kovalentně připojí sloučeninu k protilátce. Vhodné linkery pro danou reakci s oxidovanými protilátkami nebo fragmenty oxidovaných protilátek jsou takové, které obsahují amino skupinu např. to jsou skupiny primárních aminů, sekundárních aminů, hydrazinu, hydrazidu, hydroxylaminu, fenyhydrazinu, semikarbazidu a thiokarbazidu. Takové reakční funkční skupiny existují jako součást struktury linkeru nebo mohou být do linkeru včleněny pomocí vhodné chemické modifikace linkeru, který tyto skupiny neobsahuje.

V konkrétním přístupu je protilátka obsahující polysacharidový řetězec oxidována a vzniká reaktivní aldehydová skupina. Této oxidace lze dosáhnout například pomocí jodistanu, jak je v oboru známo. Jádro hlavních molekul jako je například amino-

dextranová molekula mající na sebe připojeny skupiny e-indikátoru pomocí štěpitelné vazby jsou připojeny ke skupině aldehydu na protilátce pomocí redukční aminace vytvářející tak vazbu sekundárního aminu.

Jeden nebo více jader hlavních molekul lze připojit k protilátce pomocí jednoho z výše zmíněných postupů tak, aby bylo dosaženo relativně stálé vazby za podmínek použitých v daných postupech. Samozřejmě v souladu s předloženým vynálezem jsou skupiny e-indikátoru připojeny ke jádru hlavní molekuly pomocí štěpitelné vazby nebo jsou připojeny přímo k protilátce pomocí této štěpitelné vazby. Po navázání polypeptidu pomocí základního činidla a pomocí sondy e-indikátoru, obsahující protilátku, která přenáší sondu do blízkosti činidla indukujícího štěpení, jsou reportéry e-indikátorů uvolněny pro následnou detekci a pro následné zjištění přítomnosti a/nebo množství přítomných polypeptidů.

Výraz "navázaný ligand" vyjadřuje skupinu, která se obvykle řadí mezi část skupiny vázající cílovou molekulu sondy e-indikátoru a je schopná specifické vazby k „navázanému činidlu“ nebo receptoru. Interakce mezi navázaným ligandem a odpovídajícím navázaným činidlem je použita při separaci neštěpených e-indikátorů z uvolněných reportérů e-indikátorů. Pokud je třeba lze použít receptor k fyzikálnímu oddělení molekul, ke kterým se váže a zcela odstranit intaktní sondy e-indikátorů obsahující oblasti vázající protein nebo modifikující oblasti vázající protein zachycováním ligandu. Tyto modifikované oblasti vázající polypeptid jsou výsledkem degradace počátečního materiálu, kontaminace během přípravy, aberantních štěpení (tj. štěpení na jiných než požadovaných místech) atd., nebo ostatních produktů nespécifické degradace polypeptid vázající skupiny. Jak je uvedeno výše ligand, například biotin, je připojen k oblasti vázající polypeptid a tak ho lze oddělit od reportéru e-indikátoru po štěpení.

Také lze použít receptor pro daný ligand. Takové reportéry zahrnují přírodní nebo uměle připravené receptory jako imunoglobuliny, lecitiny, enzymy atd., avidin atd. Výhodně má receptor pozitivní náboj, jak je tomu přirozeně u avidinu nebo je tento náboj vytvořen přidáním pozitivně nabitě skupiny nebo skupin, jakými jsou amoniové skupiny, základní skupiny kyselin atd. Avidin se váže na biotin připojený k detekční sondě a jejím degradačním produktům. Avidin nese kladný náboj, kdežto štěpený elektroforetický indikátor nese náboj záporný. Tak je dosaženo způsobu snadné separace štěpeného elektroforetického indikátoru nejen od nenaštěpené sondy, ale také od ostatních degradačních produktů. Receptor lze navázat také na pevný nosič

nebo makromolekulu o vysoké molekulární hmotnosti, jakou je například stěna měchýřků, částice tj. magnetické částice, celulóza, agaróza atd. a pak ho lze separovat pomocí fyzikální separace nebo centrifugace, dialýzy atd. Tato metoda dále zvyšuje specifitu rozboru a dovoluje vyšší multiplexní stupeň.

Pokud to povaha skupiny vázající polypeptid dovoluje lze použít dva ligandy. Jak již bylo popsáno výše jeden ligand je použit pro oddělení skupin e-indikátoru navázaných k oblasti vázající polypeptid, zachycujících první ligand od produktů první ligand postrádajících. Pak je provedena izolace a zakoncentrování skupin e-indikátoru navázaných v modifikované oblasti vázající polypeptid postrádající první ligand. Při použití dvou ligandů se nejdříve spojí reakční směs s prvním ligandem pro odstranění oblasti zachycující první ligand. Lze také oddělit první receptor od směsi nebo lze první receptor v této směsi zachytit, jak bylo popsáno výše. To může být provedeno díky smíchání výsledných směsí, ve kterých se váže oblast vázající polypeptid obsahující první ligand k prvnímu receptoru s druhým receptorem, který slouží k izolaci nebo zakoncentrování modifikované oblasti vázající polypeptid postrádající první ligand, ale zachycující druhý ligand. Druhý ligand je detekční značka, malá molekula, pro kterou je receptor dostupný, tj. jako druhý ligand slouží hapten nebo část sondy e-indikátoru. Potom co je produkt izolován nebo zakoncentrován je reportér e-indikátoru uvolněn pomocí denaturace receptoru, přemístěním produktu, vysokou koncentrací solí a/nebo organickými rozpouštědly atd.

V závislosti na činidle, ke kterému je připojena skupina e-indikátoru mohou existovat jednotlivé skupiny e-indikátoru nebo velké množství e-indikátorů, běžně se vyskytují v rozmezí od 1 do 300, $I=pe$ od 1 do 20 v závislosti na tom, zda je použito jádro hlavní molekuly nebo ne. Počet skupin e-indikátorů navázaných na jednotlivou oblast vázající cílovou molekulu závisí na požadované citlivosti, rozpustnosti skupiny e-indikátoru, vlivu na rozbor množství skupin e-indikátorů atd.

Syntéza sond e-indikátorů

Chemický postup typů syntéz pro vytvoření skupin nesoucích náboj nebo látky modifikující pohyblivost jako peptidový řetězec je v oboru dostatečně známa. Viz například Margli, et al., Ann. Rev. Biochem (1970) 39:841-866. Obecně tyto syntézy zahrnují sestavování bloků s pomocí vhodné chránící skupiny, která není v dané reakci

funkční skupinou. Volné funkční skupiny potom reagují a vytvářejí požadované vazby. Peptid může být vytvořen na pryskyřici, je to popsáno v syntéze podle Merrifielda (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. (1980) 85:2149-2154 a Houghteen et al., Int. J. Pep. Prot. Res. (1980) 16:311-320. Peptid je potom odstraněn z pryskyřice podle dostupných postupů.

Souhrn postupů dostupných pro syntézu peptidů lze najít v J.M.Stewart et al., „Solid Phase Peptide Synthesis“, W.H.Freeman Co, San Francisco (1969) aj. Meienhofer „Hormonal Proteins and Peptides“ (1973), vol.2, p.46, Academic Press (New York) pro syntézu peptidu na pevné fázi a E. Schroder, et al., „The Peptides“ vol.1, Academic Press (New York), 1965 pro syntézu v roztoku.

Obecně tyto metody obsahují postupné přidávání jedné nebo více aminokyselin nebo vhodně chráněných aminokyselin na rostoucí peptidový řetězec. Vhodné chránící skupiny chrání jak amino tak karboxylový konec první aminokyseliny. Chráněná nebo odvozená aminokyselina může pak být buď připojena nebo vložena na inertní pevný nosič nebo lze použít roztok a za podmínek vhodných pro vytvoření amidové vazby se přidá další aminokyselina do sekvence s vhodně chráněnou komplementární (amino nebo karboxyl) skupinou. Chránící skupina je pak odstraněna z tohoto nově navázaného aminokyselinového zbytku a další vhodně chráněná aminokyselina je přidána. Celý postup se opakuje. Potom co jsou navázány v dané sekvenci požadované aminokyseliny jsou jakékoli zbývající ochranné skupiny (a jakýkoli pevný nosič) odstraněny postupně nebo najednou a je získán finální peptid. Chránící skupiny jsou pokud je to vyžadováno odstraněny známými postupy v závislosti na konkrétní použité chránící skupině. Například lze odstranit chránící skupinu redukcí vodíkem a palladiem na aktivním uhlí, sodíkem v kapalném amoniaku atd., hydrolýzou s kyselinou trifluoroctovou, fluorovodíkovou atd.

Pro syntézu sond e-indikátorů s použitím fosforamiditu nebo látek podobných je k dispozici literatura: Handbook of Molecular Probes and research Products, 8th edition (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR, 2002)Beaucage a Iyer, Tetrahedron, 48:2223-2311 (1992), Molko et al., patent US 4 725 677, Caruthers et al., patent US 4 415 732, 4 458 066 a 4 973 679 atd. Mnoho z těchto postupů obsahuje části elektroforetických sond, které se běžně syntetizují na automatických syntetizátorech, tj. Applied Biosystems, Inc. (Foster City, California) model 392 nebo 394 DNA/RNA Synthesizer atd.

Syntézy činidel e-indikátorů obsahující nukleotidy jako součást skupiny modifikující pohyblivost lze snadno a účinně vytvořit použitím nosiče na pevné bázi a použitím standardních derivátů fosforamiditu. Výsledná skupina modifikující pohyblivost je pak spojena se značkou a/nebo skupinou vázající polypeptid jak bylo popsáno výše.

Výše uvedené konjugáty značek s různými elektroforetickými pohyblivostmi umožní několikanásobnou detekci několika polypeptidů, u kterých jsou indukovaná vazebná místa. Samozřejmě příprava různých konjugátů značek k uskutečnění několikanásobného stanovení je v rozsahu tohoto vynálezu.

Příklady syntetických postupů pro elektroforetické indikátory

Jeden postup syntetické přípravy je ukázán na obr.1. Vychází se z komerčně dostupného 6-karboxyfluoresceinu, jehož fenolové hydroxylové skupiny jsou chráněny pomocí anhydridu. Byl použit anhydrid kyseliny máselné v pyridinu, ale jsou možné i ostatní varianty. Je důležité zdůraznit důležitost výběru esterové funkční skupiny jako chránící skupiny. Tato skupina zůstává intaktní při syntéze fosforamiditového monomeru stejně jako při syntéze oligonukleotidu. Tyto skupiny jsou odstraněny až potom, co je z nasyntetizovaného oligonukleotidu pomocí amoniaku odstraněna chránící skupina. Po navázání chránící skupiny je počáteční materiál aktivován *in situ* přes vytvoření esteru N-hydroxysuckinimidu (NHS-ester) s použitím DCC jako spojovacího činidla. Vzniklý DCU je odfiltrován a je přidán aminoalkohol. Mnoho aminoalkoholů je komerčně dostupných a některé jsou odvozeny z redukováných aminokyselin. Pokud má aminoalkohol obecný vzorec „ $H_2N-(CH_2)_n-OH$ “ n je v rozmezí 2 až 12 a lépe od 2 do 6. Pouze amin je dostatečně reaktivní, aby nahradil N-hydroxysuckinimid. Při standardním zpracování pomocí extrakce je získán výtěžek 95 %. Tento materiál je fosfitylován a vzniká monomer fosforamiditu. K syntéze dalších skupin e-indikátoru je jako aminoalkohol použit symetrický bis-aminoalkoholový linker (obr.2). Takto je před vlastní fosfitylací sekundární amin spojen s množstvím derivátů karboxylové kyseliny (příklady několika možných derivátů kyseliny benzoové jsou na obr.3). S použitím tohoto postupu lze vyrobit stovky nebo tisíce skupin e-indikátorů lišících se poměrem náboj-hmotnost během syntézy v DNA syntetizátoru s použitím běžných chemikálií.

Dále jsou skupiny e-indikátorů získány jiným postupem, který využívá

5-aminofluoresceinu jako počátečního materiálu (obr.4). Přidání 5-aminofluoresceinu k nadbytku dichloridu ve velkém objemu rozpouštědla umožňuje přednostní vznik monoacylovaného produktu přes tvorbu dimeru. Fenolová skupina není za těchto podmínek reaktivní. V provedení s vodou se přemění koncový kyselý chlorid na karboxylovou skupinu. Tento produkt je analogem 6-karboxyfluoresceinu a pomocí stejných kroků je přeměněn na chráněný monomer fosforamiditu. Je mnoho komerčně dostupných dichloridů a kyselin, které mohou být přeměněny na dichloridy pomocí SOCl_2 nebo acetylchloridu. Tyto postupy jsou velmi atraktivní v tom, že je použita druhá látka modifikující pohyblivost. Pokud lze použít 10 komerčních modifikovaných fosforamiditů, 10 dichloridů a 10 aminoalkoholů existuje možnost vytvořit 1000 různých skupin e-indikátorů. Existuje mnoho komerčních dichloridů a aminoalkoholů (obr.5). Tyto syntetické postupy jsou velmi vhodné pro kombinatorní chemii.

Elektroforetické indikátory sestrojené podle schémat na obrázcích 1, 2 a 4 jsou dále podrobeny reakci buď před nebo po fosfitylaci s cílem připojit štěpitelnou vazbu, tj. použitím chemických postupů popsaných níže.

Skupina e-indikátoru je sestrojena tak, že má funkční skupiny na jednom konci skupin vázajících polypeptid. Lze použít celou řadu funkčních skupin. Funkční skupiny normálně se vyskytující v peptidu jako jsou skupiny karboxy, amino, hydroxy a thiol jsou cílovými místy reakční funkční skupiny, která s nimi vytváří kovalentní vazbu. Skupiny e-indikátoru jsou spojeny podle chemie dané vazebné skupiny a podle dostupnosti funkčních skupin na skupině vázající polypeptid. Například jak již bylo popsáno dříve pro protilátky a jejich fragmenty jako jsou Fab' fragmenty, specifické k danému proteinu, je thiolová skupina dostupná pro použití aktivního olefinu, tj. maleimidu pro vytvoření thioetheru. Pokud je dostupný lysin, lze použít aktivované estery schopné reakce ve vodě, jako jsou nitrofenylestery nebo pentafluorfenylestery nebo směsné anhidridy karboimidu a poloviny esteru kyseliny uhlíčitě. V literatuře existuje řada chemických postupů pro konjugaci, takže pro každou konkrétní situaci existuje v literatuře příklad dané konjugace.

Jako příklad syntézy je použit diol. Příklady takových diolů zahrnují alkyldiol, polyalkyldiol, kde se alkylen skládá z 2 až 3 uhlíkových atomů, alkylenamin nebo poly(alkylenamin)diol, kde se alkyleny skládají z 2 až 3 uhlíkových atomů a dusíky jsou substituovány například chránícími skupinami nebo alkylovými skupinami majícími 1 až 6 uhlíkových atomů, kde je jeden z diolů chráněn běžnou chránící skupinou, jakou je dimethyltrityl skupina. Tato skupina slouží jako část modifikující hmotnost společně

s aminoskupinou, která slouží jako část modifikující náboj. Lze také připojit látku modifikující hmotnost použitím úseků, které jsou spojeny přes fosforamidit. Tímto způsobem je látka modifikující náboj vmíšena mezi látku modifikující hmotnost. Takto lze například připravit řadu molekul poethylenoxidu majících 1, 2, 3 n jednotek. Pro zavedení řady záporných nábojů lze použít malou jednotku polyethylenoxidu. Část modifikující hmotnost a náboj lze sestrojít pomocí velkého množství polyethylenoxidových jednotek spojených přes jednotky fosfátu. Popřípadě lze použít velký spacer (mezerník), pak je přítomno menší množství fosfátových jednotek, takže bez velkých odlišností v hmotnosti lze získat velké rozdíly v poměrech hmotnost-náboj. Použitý postup je běžným chemickým postupem, který se používá v syntéze oligonukleotidů, kde jsou však místo nukleotidů používány jiné úseky, ale k uskutečnění reakce se používá běžná látka fosforamidit a jako chránící skupina se používá běžná dimethoxytrityl skupina. Jsou samozřejmě používány i jiné látky slučitelné s automatickým syntetizátorem. Nicméně je nutné minimalizovat složitost postupu. Jak bylo uvedeno výše v jednom z provedení je jádro hlavní molekuly hydrofilní polymer většinou polymer s několika funkčními skupinami pro umožnění připojení několika skupin. Jedním typem polymerů jsou dextransy, sefaróza, polyribóza, polyxylóza atd. Například hlavní molekulou je dextran, ke kterému je připojeno několik reportérů e-indikátoru pomocí štěpitelné vazby v souladu s předloženým vynálezem. Zůstává pouze několik aldehydových skupin dextranu, které lze použít k připojení molekul dextranu k amino skupině oligonukleotidu pomocí redukční aminace. Jiným příkladem použití dextranu jako jádra hlavní molekuly je při pokrytí dextranu molekulami sukcinátanhydridu a výsledný materiál se naváže na amin obsahující nukleotidy prostřednictvím tvorby amidu. Vedle povahy linkeru a skupiny modifikující pohyblivost lze dosáhnout různosti pomocí chemických a optických znaků fluoresceru, použitím energy přenášejících komplexů, obměnami v chemické povaze linkeru, což ovlivňuje pohyblivost, stejně jako skládání, interakce s ionty rozpouštědla atd. Jak již bylo navrženo v jednom z provedení je linker oligomer a může být sestrojen na nosiči nebo ho lze vytvořit klonováním nebo expresí ve vhodném hostiteli. Běžně lze polypeptidy vytvořit pokud existuje aspoň jedna skupina cysteinu nebo serinu/threoninu/tyrosinu, aspartamové/glutamové kyseliny nebo lysinu/argininu/histidinu, která je odlišná od koncové skupiny, takže existuje jedinečná funkční skupina, která může být různě využívána. Použitím chránících skupin lze odlišit funkční skupiny postranních řetězců od koncové funkční skupiny. Také lze vhodným návrhem umožnit průběh chtěné reakce

mezi stejnými funkčními skupinami, které jsou na různých místech vazebné skupiny. Zda použít syntézu nebo klonování pro přípravu oligopeptidu značně závisí na délce linkeru. Pro 20 různých reportérů e-indikátorů je třeba pouze 5 částí modifikujících hmotnost, jedna štěpitelná vazba a čtyři různé detekční části. Pro 120 různých reportérů e-indikátorů je třeba pouze 10 částí modifikujících hmotnost, 3 různé části modifikující náboj a čtyři různé detekční části. Pro 500 různých reportérů e-indikátorů je třeba pouze 25 částí modifikujících hmotnost, 5 různých částí modifikující náboj a čtyři různé detekční části.

Způsoby použití činidla e-indikátoru

Následující obecná diskuse způsobů a příkladů konkrétních rozborů je včleněna pro ilustraci a není míněna jako omezení daného vynálezu. Odborník je schopný použít dané technologie k rozboru různých analytů, konkrétně rozborů proteinů a rozborů v oblasti chemické genetiky.

Pro provedení těchto rozborů jsou složky, tj. vzorek, základní činidlo a elektroforetické sondy smíchány v médiu v jakémkoli pořadí, nejlépe současně. Popřípadě lze smíchat jedno nebo několik činidel a potom přidat směs zbývajících činidel. Prvně vzniklá směs se inkubuje. Pak jsou přidána zbývající činidla nebo jejich směs a vše je inkubováno. Množství činidel je většinou určeno empiricky. Obecně platí, že se má použít alespoň stejného množství základního činidla a elektroforetické sondy jako je nejvyšší očekávané množství polypeptidů, které mají být stanoveny, obvykle se používá 1,5 násobný přebytek, lépe 2 až 10 násobný přebytek. Složky jsou smíchány za vazebných podmínek, většinou ve vodném médiu, obvykle při pH v rozmezí 5 až 10, s pufrům o koncentraci v rozmezí 10 až 200 mM. Tyto podmínky jsou běžné a při rozboru se používají pufrý jako například fosfátový pufr, uhličitanový pufr, HEPES, MOPS, Tris, borátový pufr atd., lze použít také běžných přísad jako solí, stabilizátorů, organických rozpouštědel atd. Vodné médium může být pouze voda nebo lze přidat 0,01 až 80 objemových procent ko-solventu.

Smíchaná činidla jsou inkubována po danou dobu a teplotě, která umožňuje uskutečnění značného množství vazebných událostí. Obecně je čas inkubace po smíchání všech složek činidel alespoň 5 minut, lépe 15 minut před ozáření směsi nebo před přidáním zbývajících činidel. Běžně jsou pro inkubaci používány mírné teploty, které jsou většinou konstantní. Inkubační teploty jsou v rozmezí 5 °C až

99 °C, obvykle 15 °C až 70 °C a nejlépe 20 °C až 45 °C. Teploty během měření jsou od 10 °C do 70 °C, obvykle od 20 °C do 45 °C a nejlépe od 20 °C do 25 °C. Po vhodné inkubační době a potom co byla přidána všechna činidla nutná k vytvoření směsi obsahující základní činidlo nebo činidlo indukující štěpení, vzorek a elektroforetickou sondu nebo sondu e-indikátoru, je směs ošetřena tak, aby byla aktivována skupina indukující štěpení. Povaha aktivace závisí samozřejmě na povaze štěpení indukující skupiny.

Předložený vynález používá různých systémů činidel, kde uskutečnění vazby má za následek uvolnění skupiny e-indikátoru. Cílem štěpení indukující skupiny je přerušení vazby pomocí fyzikálních, chemických a enzymatických prostředků. Každý z produktů odlišných elektroforetických sond nebo sondy e-indikátoru, které obsahují polypeptid vázající část jsou snadno detekovány a tím určena je určena přítomnost provedené vazby, což vyžaduje indukci vazebného místa. Po provedení vazby se vytvoří jeden nebo několik produktů, které vykazují odlišné pohyblivosti než sonda e-indikátoru nebo sondy, ze kterých jsou produkty odvozeny. Uvolněná forma e-indikátoru, označovaná jako reportér e-indikátoru vykazuje odlišnou pohyblivost a/nebo hmotnost než sonda e-indikátoru, ze které byl odvozen. Vynález poskytuje vysoký stupeň univerzálnosti pro vyhledávání známých i neznámých materiálů. Elektroforetické zařízení lze použít pro separaci a detekci reportéru e-indikátoru. Elektroforetické zařízení může být připojeno k počítači a rovnou tak lze získaná data zpracovávat, popřípadě lze přes počítač elektroforetické zařízení také řídit.

Systémy jsou založeny na získaných knihovnách sestávajících z velkého množství činidel e-indikátorů, které obsahují množství různých pohyblivostí modifikujících skupin, takže je lze separovat pomocí elektroforézy společně s částí, ke které jsou pohyblivost modifikující skupiny připojeny. Pohyblivost modifikující skupiny jsou zadrženy jako produkty reakce, ve které je tento produkt modifikován získáním a/nebo ztrátou skupiny, která mění hmotnost a může také měnit náboj produktu ve srovnání s počátečním materiálem. Pohyblivost modifikující skupina je spojena s částí vázající polypeptid přes štěpitelnou vazbu, takže pohyblivost modifikující skupina je uvolněna pro analýzu, která následuje po navázání na indukované vazebné místo základního vazebného činidla.

Jak je uvedeno výše, předložený vynález má použít v oblasti posttranslačních modifikací. Lze určit odpověď hostitelských buněk, organel apod. na změny v chemickém a fyzikálním prostředí ve vztahu k množství drah, změny v populaci

povrchových proteinů, změny způsobené stářím, neoplazií, aktivací nebo jiné přirozeně se vyskytující jevy, kde může být stanoveno množství proteinů. Postupy, které lze použít mohou být heterogenní nebo homogenní. Heterogenní postupy zahrnují separační krok, ve kterém je nenavázaná značka oddělena od značky navázané. Oproti tomu homogenní způsoby nevyžadují separační krok, ale mohou ho použít.

V mnoha heterogenních rozborech je nutné, aby nenavázané značku obsahující činidlo bylo odděleno od navázaného značku obsahujícího činidla. Toho lze dosáhnout různými postupy, z nichž každý vyžaduje činidlo navázané na pevný nosič, který rozezná mezi komplexem značku obsahujícího činidla a polypeptidem. Pevným nosičem je stěna měchýřku, tj. jamka mikrotitrační destičky, kapilára, miska, destička, korálky, včetně magnetických korálků, liposomy atd. Hlavním znakem pevného nosiče je to, že umožňuje segregaci konkrétních značených navázaných částí od nenavázané sondy a takto nosič neovlivňuje tvorbu vazebného komplexu ani ostatní operace stanovení.

Komplex může být k pevnému nosiči navázán přímo i nepřímo. Pro přímou vazbu lze použít základní činidlo nebo sondu e-indikátoru kovalentně nebo nekovalentně navázanou k nosiči. Povrch je aktivován různými funkčními skupinami, které tvoří kovalentní vazbu se základním činidlem. Tyto skupiny zahrnují iminohalidy, aktivované karboxylové skupiny, tj. směsné anhidridy nebo acylhalidy, amino skupiny, α -halo nebo pseudohaloketony atd. Konkrétní vazebná část navázaná k povrchu nosiče je použita k navázání části komplexu.

V heterogenním způsobu je nenavázané značku obsahující činidlo nebo sonda e-indikátoru odstraněna promytím navázaného materiálu. Pokud jsou použity částičky nebo korálky, je nutno výše zmíněné látky oddělit ještě před promytím a to pomocí filtrace, centrifugace, magnetické separace atd. Po promytí je nosič smíchán s tekutinou, ve které se uvolní reportéry e-indikátoru a/nebo budou reagovat funkční skupiny e-indikátoru s detekční značkou, po nichž bude následovat a/nebo jim bude předcházet uvolnění. Podle povahy štěpitelné vazby a způsobu štěpení je v tekutině přísada pro dané štěpení. Pokud nejsou činidla pro štěpení nutná, je tekutinou elektroforetický pufr. Příklady, kdy štěpitelná vazba je fotolabilní je médium ozářeno světlem odpovídající vlnové délky, aby došlo k uvolnění reportéru e-indikátoru. Pokud nejsou na skupinách e-indikátoru přítomny detekční značky, nechá se reagovat reportér e-indikátoru s detekční značkou. V některých případech je detekční značka součástí činidla štěpícího štěpitelnou vazbu, tj. disulfid s thiolem. Tam kde je řada různých

funkčních skupin na různých vazebných částech pro reakci se značkou, mají různé značky funkční skupiny, které reagují z jednou z funkčních skupin. Různé značky mohou být přidány společně nebo postupně jedna za druhou.

Příklady takových funkčních skupin zahrnují thiohy, karboxylové skupiny, aldehydy a olefiny, značky mohou mít aktivované olefiny, alkoholy, aminy a thiolové skupiny. Pomocí odstranitelné chránící skupiny pro jednu nebo několik funkčních skupin lze tyto skupiny odstranit postupně a značky přidat také postupně. Tímto způsobem lze zabránit nechtěné reaktivitě. Pokud je detekční značka přítomna hned na začátku nebo je přidána během procesu není důležité pro provedení vynálezu a řídí se tím, zda je polypeptid štěpen skupinou indukující štěpení nebo na základě povahy polypeptidu, základního vazebného činidla a elektroforetických sond.

V určitých provedeních je nutné oddělit reportéry e-indikátoru od roztoku činidla, kde činidlo ovlivňuje elektroforetickou analýzu. V závislosti na povaze reportéru e-indikátoru a činidla lze oddělit reportéry e-indikátoru od činidla pomocí iontově výměnné kolony, kapalně chromatografie, pomocí počáteční elektroforetické separace atd. Popřípadě lze použít zachycený navázaný ligand ke skupině e-indikátoru nebo zachytit část oblasti vázající cílovou molekulu pro oddělení reportéru e-indikátoru a tím odstranit veškeré interferující součásti dané směsi. Jakmile je připraven roztok reportérů e-indikátoru bez jakýchkoli interferujících součástí může být roztok elektroforetický analyzován. K analýze se používá kapilárně-elektroforetických zařízení, mikrofluidních zařízení nebo jiných zařízení, které mohou elektroforetický oddělit množství sloučenin a poskytnout rozlišitelné pásy jednotlivých reportérů e-indikátoru.

S výhodou je rozbor prováděn homogenním způsobem. Protokoly pro homogenní rozbor jsou obdobou postupů pro analogický heterogenní způsob. Tyto protokoly používají systém produkující signál, který zahrnuje značku sondy e-indikátoru, štěpitelnou vazbu spojenou se sondou e-indikátoru nebo polypeptid, elektromagnetické záření nebo jiné činidlo zajišťující reakci nebo vylučující signál pozadí. V rozborech, kde se uplatňuje singletový kyslík, je nutné mít v roztoku molekulu, která degraduje peroxid vodíku a tím redukuje jeho dobu existence, což vede k ochraně reakce mezi peroxidem vodíku, který je navázáním vytvořen nebo nenavázáním činidla obsahujícího značku.

Veškeré koncentrace různých činidel uplatňujících se v systému produkce signálu se liší podle koncentrace jednotlivých polypeptidů ve vzorcích, které jsou určeny

k analýze. Běžné koncentrace jsou od 10 nM do 10 mM. Pufry jsou použity v koncentracích od 10 mM do 200 mM. Koncentrace jednotlivých polypeptidů jsou od 1 pM do 100 μM, většinou od 100 pM do 10 μM. V konkrétní situaci mohou být koncentrace nižší nebo vyšší, v závislosti na povaze analytu, afinitě reciproční vazebné části, účinnosti uvolnění reportérů e-indikátoru, citlivosti se kterou je detekován reportér e-indikátoru a v závislosti na počtu polypeptidů a dalších faktorech.

V souladu s předloženým vynálezem je skupina polypeptidů monitorována v multiplexní reakci. V tomto případě množství párů sond e-indikátoru odpovídajících různým oligopeptidům je smícháno se vzorkem v jediné nádobce za podmínek, kdy je uvolněn reportér e-indikátoru z činidla, když se příslušný polypeptid váže na vazebné činidlo v médium vzniká singletový kyslík. Reportéry e-indikátoru jsou buď označeny k detekci nebo je značka přidána prostřednictvím reaktivní funkční skupiny přítomné na skupině e-indikátoru. Označené reportéry e-indikátoru reakce jsou navzájem rozlišitelné v elektroforetickém zařízení a jsou opětovně monitorovány při průchodu detektorem. Úroveň možného znásobení v tomto systému je omezena pouze stupněm rozlišení, které může být získáno mezi navrženou sadou reportérů e-indikátorů v elektroforetickém zařízení.

Dalšího stupně flexibility, kterého lze u daného rozboru dosáhnout je ve stádiu, kdy jsou značeny skupiny e-indikátoru. Jak je uvedeno výše, každá skupina e-indikátoru může obsahovat detekční značku, již když vstupuje do reakce. Skupina e-indikátoru může také obsahovat funkční skupiny umožňující její navázání k značce potom, co je provedena reakce se vzorkem. V tomto provedení je sonda e-indikátoru obsahující funkční skupinu pro navázání k detekční značce smíchána se vzorkem. Po reakci modifikující pohyblivost sondy e-indikátoru je-li jeho cílový polypeptid přítomen ve vzorku, jsou do nádoby přimíchána další činidla a smíchána s produkty první reakce, které reagují s modifikovaným reportérem e-indikátoru za současného přidání detekční značky.

Ke stanovení množství lze použít kontroly, které poskytují signál vztažený na množství cílové molekuly, která je přítomna nebo přidána. Kontrola pro umožnění konverze relativního fluorescentního signálu na absolutní hodnoty je uskutečněna přidáním známého množství fluoroforu ke každému vzorku před separací od reportérů e-indikátoru na elektroforéze. Lze použít jakýkoli fluorofor, který neovlivňuje detekci signálů reportéru e-indikátoru pro normalizaci fluorescenčního signálu. Kontrolní signál má elektroforetickou pohyblivost odlišnou od pohyblivostí reportéru e-indikátoru ve

vzorku a může mít odlišnou nebo stejnou emisní vlnovou délku. Příklady fluorescenčních molekul jsou ROX, FAM a fluorescein.

V příkladu rozboru v souladu s předloženým vynálezem se uplatňuje detekce fosforylace polypeptidu. Vzorek obsahuje buněčný materiál a posttranslační modifikací je fosforylace konkrétního polypeptidu, který je označován jako cílový polypeptid. Vzorek je smíchán se základním činidlem obsahující fotosenzibilizátor připojený ke kov-afinitnímu činidlu, ke kterému se váže iont kovu. Pokud je přítomen fosforylovaný cílový polypeptid, fosfátová skupina se váže ke komplexu obsahujícím kov/kov-afinitní činidlo. Elektroforetická sonda je smíchána s výše popsanou směsí. Elektroforetická sonda obsahuje protilátku daného cílového polypeptidu, ke které je štěpitelnou vazbou připojen reportér e-indikátoru. Štěpitelná vazba obsahuje skupinu, která je štěpitelná singletovým kyslíkem. Po přidání elektroforetické sondy a vhodné inkubační době je reakční směs ozářena světlem, aby došlo k excitaci fotosenzibilizátoru, který vytvoří singletový kyslík. Štěpitelná skupina je štěpena singletovým kyslíkem, protože štěpitelná skupina je v blízkosti fotosenzibilizátoru a aktivní látky, jmenovitě singletového kyslíku udržuje si dostatečnou aktivitu ke štěpení štěpitelné skupiny a uvolňuje reportér e-indikátoru. Z elektroforetické sondy, která nebyla navázána k cílovému polypeptidu z důvodu nepřítomnosti cílového polypeptidu nebo nadbytku elektroforetické sondy nebo z elektroforetické sondy, která se navázala k polypeptidu, který nebyl fosforylován nevznikne reportér e-indikátoru, protože aktivita singletového kyslíku má velmi krátkou dobu existence a štěpitelná skupina v jakékoli elektroforetické sondě není navázána k základnímu činidlu na základě přítomnosti fosforylovaného cílového polypeptidu nedá vznik odštěpenému reportéru e-indikátoru. Uvolněný reportér e-indikátoru je oddělen na základě odlišné pohyblivosti a detekován na základě detekční skupiny, která zůstává připojena k pohyblivost modifikující skupině reportéru e-indikátoru. Přítomnost a/nebo nepřítomnost množství uvolněného reportéru e-indikátoru ukazuje přítomnost a/nebo množství cílového polypeptidu.

Předložený vynález nalézá konkrétní použití v multiplexních rozbořech cílových polypeptidů. V příkladu takového rozboru v souladu s hlediskem daného vynálezu se uplatňuje detekce fosforylace několika polypeptidů. Vzorek obsahuje buněčný materiál a posttranslační modifikací je fosforylace určitých polypeptidů, označovaných jako cílové polypeptidy. Vzorek je smíchán se základním činidlem obsahující fotosenzibilizátor připojený ke kov-afinitnímu činidlu, ke kterému se váže iont kovu. Základní činidlo je klasifikačně specifické činidlo, které se váže k jakékoli fosfátové

skupině přítomné v reakční směsi. Pokud je přítomen fosforylovaný cílový polypeptid, fosfátová skupina se váže ke komplexu obsahujícím kov/kov-afinitní činidlo. Množství elektroforetických sond je smícháno s výše popsanou směsí. Každá z elektroforetických sond obsahuje protilátku daného cílového polypeptidu, ke které je štěpitelnou vazbou připojen reportér e-indikátoru, který je pro konkrétní cílový polypeptid jedinečný. Štěpitelná vazba obsahuje skupinu, která je štěpitelná singletovým kyslíkem. Po přidání elektroforetické sondy a vhodné inkubační době je reakční směs ozářena světlem, aby došlo k excitaci fotosenzibilizátoru, který vytvoří singletový kyslík. Štěpitelná skupina ještěpena singletovým kyslíkem, protože štěpitelná skupina je v blízkosti fotosenzibilizátoru a aktivní látky, jmenovitě singletového kyslíku a udržuje si dostatečnou aktivitu ke štěpení štěpitelné skupiny a uvolňuje reportéry e-indikátoru ze všech elektroforetických sond, které jsou navázány k cílovému polypeptidu navázanému ke klasifikačně specifickému činidlu. Elektroforetické sondy, které nebyly navázány k cílovým polypeptidům, z již uvedených důvodů, nedají vznik odštěpenému reportéru e-indikátoru. Uvolněný reportér e-indikátoru je oddělen na základě odlišné pohyblivosti a detekován na základě detekční skupiny, která zůstává připojena k pohyblivost modifikující skupině reportéru e-indikátoru. Přítomnost a/nebo nepřítomnost množství uvolněného reportéru e-indikátoru ukazuje přítomnost a/nebo množství konkrétního cílového polypeptidu. Tímto způsobem jsou studovány různé dráhy v reálném čase. Fosforylace proteinů a defosforylační reakce jsou studovány k získání nových informací o metabolické regulaci a transdukci signálů různých drah. Výše popsaný způsob lze zopakovat během různých fází životního cyklu buňky s cílem pochopit celý vývoj buňky.

Jiné použití předloženého vynálezu spočívá v detekci násobných fosforylací cílového oligopeptidu. Například ke zjištění zda byl polypeptid fosforylován jednou dvakrát nebo několikrát. V příkladu rozboru se uplatňuje detekce stupně fosforylace cílového polypeptidu. Vzorek, který obsahuje buněčný materiál je smíchán se základním činidlem obsahující několik molekul fotosenzibilizátoru připojených k hlavní molekule, ke které je připojeno několik molekul kov-afinitního činidla, ke kterému se také váže iont kovu. Vhodnou titrací klasifikačně specifického činidla je určena hladina fosforylace cílového polypeptidu. Pokud je přítomen fosforylovaný cílový polypeptid, fosfátová skupina se váže ke komplexu obsahujícím kov/kov-afinitní činidlo. Elektroforetická sonda je smíchána s výše popsanou směsí. Elektroforetická sonda obsahuje protilátku daného cílového polypeptidu, ke které je štěpitelnou vazbou



připojen reportér e-indikátoru pro konkrétní cílový polypeptid. Štěpitelná vazba obsahuje skupinu, která je štěpitelná singletovým kyslíkem. Po přidání elektroforetické sondy a vhodné inkubační době je reakční směs ozářena světlem, aby došlo k excitaci fotosenzibilizátoru, který vytvoří singletový kyslík. Štěpitelná skupina je štěpena singletovým kyslíkem, protože štěpitelná skupina je v blízkosti fotosenzibilizátoru. Aktivní látka, jmenovitě singletový kyslík si udržuje dostatečnou aktivitu ke štěpení štěpitelné skupiny a uvolňuje reportér e-indikátoru z elektroforetické sondy, která je navázána k cílovému polypeptidu a ke klasifikačně specifickému činidlu. Elektroforetické sondy, které nebyly navázány k cílovému polypeptidu, který byl navázán ke klasifikačně specifickému činidlu nedají, z důvodu výše uvedeného, vznik odštěpenému reportéru e-indikátoru. Uvolněný reportér e-indikátoru je oddělen na základě odlišné pohyblivosti a detekován na základě detekční skupiny, která zůstává připojena k pohyblivost modifikující skupině reportéru e-indikátoru. Přítomnost a/nebo nepřítomnost množství uvolněného reportéru e-indikátoru ukazuje přítomnost a/nebo množství cílového polypeptidu.

Předložený vynález lze použít ke stanovení místa nebo míst fosforylace na cílovém polypeptidu. V příkladu rozboru vzorku, který obsahuje buněčný materiál je smíchán se základním činidlem obsahující chemickou proteázu připojenou ke kov-afinitnímu činidlu, ke kterému se také váže iont kovu. Pokud je přítomen fosforylovaný cílový polypeptid, fosfátová skupina se váže ke komplexu obsahujícím kov/kov-afinitní činidlo. Chemická proteáza je aktivována ozářením světlem a nastává místně specifické štěpení na cílovém polypeptidu, jehož fosfátová skupina je navázána ke komplexu obsahujícím kov/kov-afinitní činidlo. Produkty štěpení představují jedinečné skupiny nebo skupiny e-indikátoru, které mohou být přímo analyzovány například elektroseparací. Oproti tomu jednu nebo několik elektroforetických sond lze smístit s výše uvedenou reakční směsí a zajistit tak detekční skupinu pro jedinečné skupiny. Každá elektroforetická sonda se skládá z protilátky pro danou štěpenou skupinu, ke které je připojena detekční skupina. Uvolněný reportér e-indikátoru je oddělen na základě odlišné pohyblivosti a detekován na základě detekční skupiny, která zůstává připojena k pohyblivost modifikující skupině reportéru e-indikátoru. Přítomnost reportéru e-indikátoru ukazuje místo fosforylace cílového polypeptidu.

Dalším příkladem rozboru v souladu s hlediskem daného vynálezu se uplatňuje detekce glykosilace několika polypeptidů. Vzorek obsahuje buněčný materiál a posttranslační modifikací je glykosilace určitých polypeptidů, označovaných jako cílové

polypeptidy. Vzorek je smíchán se základním činidlem obsahující fotosenzibilizátor připojený činidlu obsahujícím kyselinu boritou. Základní činidlo je klasifikačně specifické činidlo, které se váže ke karboxylové skupině přítomné v reakční směsi. Pokud jsou přítomny glykosilované cílové polypeptidy, karboxylová skupina se váže k činidlu obsahujícímu kyselinu boritou. Množství elektroforetických sond je smícháno s výše popsanou směsí. Každá z elektroforetických sond obsahuje protilátku daného cílového polypeptidu, ke které je štěpitelnou vazbou připojen reportér e-indikátoru, který je pro konkrétní cílový polypeptid jedinečný. Štěpitelná vazba obsahuje skupinu, která je štěpitelná singletovým kyslíkem. Po přidání elektroforetické sondy a vhodné inkubační době je reakční směs ozářena světlem, aby došlo k excitaci fotosenzibilizátoru, který vytvoří singletový kyslík. Štěpitelná skupina je štěpena singletovým kyslíkem, protože štěpitelná skupina je v blízkosti fotosenzibilizátoru a aktivní látky, jmenovitě singletového kyslíku udržuje si dostatečnou aktivitu ke štěpení štěpitelné skupiny a uvolňuje reportéry e-indikátoru ze všech elektroforetických sond, které jsou navázány k cílovému polypeptidu navázanému ke klasifikačně specifickému činidlu.

Elektroforetické sondy, které nebyly navázány k cílovým polypeptidům, z již uvedených důvodů, nedají vznik odštěpeným reportérům e-indikátoru. Uvolněný reportér e-indikátoru je oddělen na základě odlišné pohyblivosti a detekován na základě detekční skupiny, která zůstává připojena k pohyblivost modifikující skupině reportéru e-indikátoru. Přítomnost a/nebo množství uvolněného reportéru e-indikátoru ukazuje přítomnost a/nebo množství konkrétních cílových polypeptidů, tj. glykosilovaných polypeptidů. Výše popsaný způsob lze zopakovat během různých fází životního cyklu buňky s cílem pochopit celý vývoj buňky.

Předložený vynález má řadu použití při studiu buněčných signálů u různých drah, například dráhy MAP kinázy, dráhy Ras/ERK MAPK, dráhy JNK/SAPK a ostatních drah MAP kinázy, JAK/STAT dráhy, signály u dráhy NF-B dorzální a NF-AT duální, regulace funkce lymfocytů, u vedení signálu receptoru antigenu T buněk, u různých přenašečů signálů a aktivátorů transkripce, u kontrolních bodů dělení buněčného cyklu atd.

Mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) pomáhají porozumět signalizaci buněčných dějů u růstových faktorů a cytokinových receptorů. MAP kinázy (také označované jako extracelulární signál regulující proteinkinázy nebo ERK) jsou terminální enzymy v trojkinázové kaskádě. Opakování trojkinázové kaskády pro související, ale odlišné signály drah dává možnost učinit MAPK dráhu jako modulový,

multifunkční signalizační prvek, který funguje v jedné dráze, kde každý enzym fosforyluje a takto aktivuje další člen dráhy, který je v pořadí. Současná identifikace různých MAPK kaskád, které jsou konzervovány u všech eukaryot naznačuje, že MAPK modul byl přizpůsoben vysvětlení odlišného rozboru extracelulárních signálů. Rodina MAPK enzymů je důležitou součástí centrálního uzlu, který koordinuje přichozí signály vytvořené řadou extracelulárních a intracelulárních mediátorů. Specifická fosforylace a aktivace enzymů v modulu MAPK přenáší signál dolů po kaskádě a výsledkem je fosforylace mnoha proteinů se značnou regulační funkcí v celé buňce, včetně jiných proteinkináz, transkripčních faktorů, cytoskeletálních proteinů a dalších enzymů (Cobb, et al., *Promega notes Magazine* (1996)59:37, et seq).

V další řadě rozborů se uplatňuje spojení činidla fotosenzibilizátoru a buněčné studie, například u posttranslačních modifikací, u malých molekul, které mění a/nebo regulují funkci a/nebo expresi proteinů, ke kterým se váží, u identifikace nových proteinů používajících malé molekuly, u vyhledávání určitých cílových molekul, jako jsou kinázy a peptidy atd., při vyhledávání funkčních tříd proteinů k identifikaci nových cílových molekul, tj. kináz, fosfatáz, DNA nebo RNA vazebných proteinů peptidů, proteáz atd. Příkladem může být malá molekula vázající se k cílové molekule, která je připojena k molekule fotosenzibilizátoru a tím vytváří komplex malá molekula-senzibilizátor. Protilátka, která se váže k různým cílovým molekulám je označena různými skupinami e-indikátoru a dává vznik komplexu protilátka-e-indikátor. Přítomnost nebo nepřítomnost konkrétní cílové molekuly může být zkoumána a kvantifikována vytvořením komplexu e-indikátor-protilátka::cílová molekula::malá molekula-senzibilizátor. Spojení protilátky s malou molekulou s cílovou molekulou přenese skupinu e-indikátoru a fotosenzibilizátor do těsné blízkosti a umožní tak uvolnění reportéru e-indikátoru. Fotosenzibilizátor je pak připojen k malé molekule, peptidu, inhibitoru, lipidu, uhlovodíku, protilátce, oligonukleotidu atd. Fotosenzibilizátor je také připojen k povrchu mikroorganismů nebo buněk, které mají jednu z výše uvedených struktur, což umožňuje monitorovat interakce mezi molekulami buněčného povrchu dvou oddělených buněk. Pro studie buněčného povrchu je činidlo fotosenzibilizátoru smícháno s buňkou pomocí připojení ke specifické skupině buněčnému povrchu nebo nespecifického včlenění do buněčné membrány způsobem, kterým fotosenzibilizátor volně difunduje přes membránu.

Konkrétní rozbor interakcí kinázy je příkladem mnoha typů rozborů, které mohou být vyvinuty. Specifické kinázové interakce lze studovat s použitím sendvičového

rozboru. Například primární anti-kinázová protilátka je označena skupinou e-indikátoru a sekundární protilátka, která váže fosforylovanou molekulu je označena fotosenzibilizátorem. Po vzniku imunního komplexu je skupina e-indikátoru uvolněna díky ozáření světlem vhodné vlnové délky a pak oddělena kapilární elektroforézou. V jiné úpravě lze zkoumat kinázy s různými specifitami. Anti-kinázové protilátky jsou označeny stejným fotosenzibilizátorem (tj. fotoenzibilizátor₁-anti-kináza₁-fotosenzibilizátor₂-antikináza₂), kdežto specifický substrát kinázy nebo inhibitor je označen specifickou skupinou e-indikátoru (tj. substrát₁-e-indikátor₁, substrát₂-e-indikátor₂, substrát₃-e-indikátor₃). Vytvoří se vazebné komplexy buď dočasné nebo stabilní. Po ozáření a elektroforetické separaci jsou vytvořeny konkrétní modely, které označí různé hladiny vybraných cílových kináz ve vzorku a najednou je stanoví. Jakmile je vytvořen signální model lze vyhodnotit účinky různých léčiv, léčebných procedur nebo genetických změn jako odchylek od daného modelu.

Příklad využití vynálezu v proteomice je znázorněn na obrázku 7. V tomto provedení je rozbor uskutečněn nejprve lyzí vzorku buněk. Všechny proteiny v buněčném lyzátu jsou označeny skupinou indukující štěpení. Značení je provedeno s cílem získat aspoň jednu štěpení indukující skupinu na jeden protein. Jak je ukázáno na obr.7 proteiny jsou smíchány s anti-proteinovým ligandem (APL), který je receptorem nebo protilátkou. APL jsou označeny specifickým reportérem e-indikátoru skrze štěpitelnou vazbu, každý ligand má k sobě navázaný jedinečný reportér e-indikátoru. Po navázání jsou skupiny indukující štěpení aktivovány a uvolní různé reportéry (Y). Štěpení indukující skupina a štěpitelná vazba musí být v blízkosti, aby mohl být uvolněn reportér e-indikátoru. Reportéry jsou pak odděleny kapilární elektroforézou a kvantifikovány. Technika umožňuje získání multiplexních profilů proteinů, malých molekul, systému enzym-substrátů a povrchových buněčných receptorů v úpravě homogenního rozboru.

Určení buněčné funkce proteinu vyžaduje prostředky ke změně funkce. Jedním z přístupů je genetický způsob, ve kterém se uplatňuje použití inaktivujících nebo aktivujících mutací v genech kódujících proteiny. Inaktivace zahrnuje delecí nebo-li „knock-out“ přístupy a aktivace nebo zvýšená exprese zahrnuje onkogenické přístupy. Jiný přístup spočívá v použití malých molekul, které mění funkci proteinů, ke kterým se váží. Existují ligandy, které jsou schopné buď inaktivovat nebo aktivovat funkci proteinu. Bylo popsáno, že u některých přírodně se vyskytujících produktů lze dosáhnout specifity pomocí delecí (Schreiber, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 6 (1999) 71-83). Malé

molekuly přírodních produktů napomohly rozuzlení různých buněčných dějů, které ovlivňují synchronizaci populace buněk. Jakmile je zavedena specifická vazebná interakce, buněčnou stěnu permeabilizující přírodní produkt je použit k porozumění funkce jejich cílových proteinů v živé buňce. Některé přírodní produkty inhibují dráhu přenosu signálů, která je nutná pro přechod z klidové fáze do přechodné fáze G1. Malé molekuly mohou ovlivnit posttranslační děje jakými jsou proteinová glykosilace, methylace, lipidace, isoprenylace, ubiquitinace, fosforylace a acetylce.

Vstup a výstup z buněčného cyklu se vyskytuje při přechodu mezi aktivní proliferací do klidové fáze nebo fáze G0, ve kterém je základní metabolismus buňky potlačen, včetně mnoha jindy aktivních funkcí jakými je transkripce a syntéza proteinů. Úbytek růstových faktorů může zapříčinit, že buňka vstoupí do klidové fáze, kde stimulace růstovými faktory signalizuje opětovný vstup do aktivního cyklu. Buňka může také vystoupit z buněčného cyklu, aby podstoupila proces diferenciacce nebo naprogramované buněčné smrti (apoptózy). Prvek zodpovědný za řízení buněčného cyklu z jedné fáze do druhé je soubor proteinkináz a fosfatáz, které aktivují a deaktivují sebe navzájem. Cyklin dependentní kinázy jsou zodpovědné za fosforylaci různých substrátů podstatných ve vývoji buněčného cyklu. Hladiny cyklin- dependentních kináz jsou neměnné v celém buněčném cyklu, ale jejich aktivity jsou regulovány jinou sadou proteinů nazývaných cykliny, jejichž hladiny kolísají. Kromě toho mnoho receptorů na plasmatické membráně buňky se řadí mezi tyrosinkinázy, které po aktivaci iniciují intracelulární dráhu přenosu signálu, jehož cílovým bodem je buněčná proliferace.

Způsoby a metody vynálezu jsou vhodné pro výše uvedené studované oblasti analýzy. Řada malých molekul zapříčiňuje ztrátu funkce jejich příbuzných cílových molekul, včetně kináz, fosfatáz, membránových receptorů, proteáz, isoprenyltransferáz a polymeráz. Jako výsledek tohoto vynálezu může být zkoumána proteinová funkce ve svém intracelulárním prostředí. Mohou být stanovena množství požadovaných proteinů. Vliv na hladinu „downstream“ proteinů jako jsou cykliny, lze studovat s pomocí činidel tohoto vynálezu. Lze měřit aktivní a neaktivní cyklin dependentní kinázy (Cdk) během exprese cyklinů. Lze stanovit množství Cdk-cyklinového komplexu. S pomocí činidel vynálezu lze analyzovat dráhy přenášející signály.

Fáze G1 je kritickým bodem, ve kterém se buňky rozhodují zda vstoupit do dalšího kola dělení. Proteiny v progresivní fázi G1 fáze jsou často mutovány v případě lidských rakovin a jsou atraktivními zásahovými místy terapeutických prostředků. Je nutné se zaměřit pouze na rannou fázi G1 nebo pozdní fázi G1 pro zjištění sloučenin,

kteře mohou být terapeutickými prostředky. Různé fáze, které se v cyklu uplatňují jsou na obr.8.

V jednom provedení mohou být buňky kultivovány na dně vhodné nádoby. Po upevnění buněk mohou být zkoušeny různé protilátky konkrétního antigenu pomocí vyhledávacích metod. Činidlo fotosenzibilizátoru je použito tak, že se vloží do buněčné membrány nebo toto činidlo obsahuje fotosenzibilizátor připojený k protilátce antigenu nebo skupiny proteinů na povrchu buňky. Činidlo e-indikátoru lze použít pokud je protilátka daného antigenu navázána pomocí štěpitelné vazby ke skupině e-indikátoru. Činidlo fotosenzibilizátoru je přidáno k upevněným buňkám ve vhodném médiu za podmínek optimálních pro včlenění do buněčné membrány nebo navázání na antigen, pokud je přítomen. Potom se přidá sonda e-indikátoru a médium je upraveno tak, aby došlo k navázání protilátky daného antigenu k tomuto antigenu, pokud je přítomen. Dále se aktivuje fotosenzibilizátor pomocí ozáření světlem, aby došlo k tvorbě například singletového kyslíku, který štěpí štěpitelnou vazbu v sondě e-indikátoru pouze tehdy je-li antigen přítomen v buňce, aby mohl přenést štěpitelnou vazbu do blízkosti fotosenzibilizátoru v buněčné membráně. Médium je potom zkoumáno z hlediska uvolněných reportérů e-indikátoru a jejich přítomnost ukazuje na přítomnost antigenu. Několik antigenů může být vyhledáváno najednou, když se použije několikanásobná sonda e-indikátorů, kdy každá má protilátku specifickou ke konkrétnímu antigenu napojenému pomocí štěpitelné vazby ke skupině e-indikátoru, který obsahuje skupinu modifikující pohyblivost, která odlišuje reportér e-indikátoru vytvořený v možné přítomnosti ostatních antigenů. Médium je pak podrobeno separačnímu kroku, ve kterém jsou reportéry e-indikátorů odděleny na základě svých konkrétních rozdílů v pohyblivostech. Tímto způsobem lze analyzovat expresi proteinů v buňkách.

Hypotetické výsledky rozborů provedených způsobem popsáním výše jsou zobrazeny na obr. 9A, 9B a 9C. Jedná se rozborů na základě buněk pro najednou prováděný monitoring hladin Cdk (aktivace kinázy s použitím olomoucinen značeného činidla indukujícího uvolnění) tj., fotosenzibilizátoru) a cyklínů A-E. Činidla elektroforetických sond použijí protilátku specifickou k jednomu exprimovanému proteinu, ve kterém je jeden nebo několik jedinečných e-indikátorů připojeno k protilátce. S odkazem na obrázky 9A, pro kontrolní buňky, tj. buňky v nepřítomnosti testované sloučeniny, lze získat osm píků představujících Cdk2, Cdk6, Cdk4, Cdc2 a cyklíny A, D, E a B. Výsledkem testování sloučeniny v zastavené rané G1 fázi (obr. 9B) byly tři píky Cdk6, Cdk4 a cyklín D. Výsledkem testování sloučeniny v zastavené pozdní



G1 fázi (obr. 9C) bylo pět píků Cdk2, Cdk6, Cdk4, cyklin D a cykli E. V obou pokusech by testované látky mohli být účinným léčivem k léčení pacienta.

Jiný rozbor se uplatňuje při studiu posttranslačních regulací proteinů s použitím knihovny malých molekul jako regulátorů reversibilně kovalentní modifikace proteinů. Sada sond e-indikátorů je připravena a každá sonda e-indikátoru obsahuje protilátku k danému proteinu v jeho modifikovaném nebo nemodifikovaném stavu, která je štěpitelně navázána ke skupině e-indikátoru, která je jedinečná v celé sadě sond. Činidlo fotosenzibilizátoru je včleněno do buňky nebo do membrány, cytosolu nebo jiných vhodných oblastí. Sondy jsou smíchány s buňkami ve vhodné nádobě. Každá z malých molekul knihovny je přidána do konkrétní nádoby. Médium je potom ozářeno jak již bylo popsáno. Médium z každé z nádob je odděleno a jsou zjišťovány reportéry e-indikátoru. Přítomnost jednoho nebo několika reportérů e-indikátoru je vztažena ke schopnosti určité malé molekuly regulovat kovalentní modifikaci proteinů.

V jiném rozboru pro studium posttranslačních modifikací proteinů je připravena sada sond e-indikátoru, v níž je jedna z malých molekul knihovny štěpitelně připojena ke skupině e-indikátoru pro každou sondu e-indikátoru. Buňky jsou ve vhodných nádobách smíchány s činidlem fotosenzibilizátoru tak, aby byl fotosenzibilizátor včleněn na vhodné buněčné místo. Celá sada nebo její část je přidána do nádoby za podmínek, kdy malé molekuly provedou požadovanou modifikaci. Pouze ty malé molekuly, které se uplatňují při modifikaci přenesou štěpitelnou vazbu do blízkost fotosenzibilizátoru. Médium z nádoby je podrobena separaci a identifikaci reportérů e-indikátoru. Přítomnost jednoho nebo několika reportérů e-indikátoru se vztahuje ke schopnosti konkrétní malé molekuly regulovat kovalentní modifikaci proteinu.

Výše uvedeným způsobem lze studovat dráhy v kontextu kaskádovitých dějů, které jsou měněny malými molekulami, které fungují jako inhibitory, aktivátory, potenciální léčivo, hormon, enzymový kofaktor nebo jiný typ regulačního faktoru. Vliv malých molekul na genovou expresi a funkci proteinu lze studovat tak, že jsou malé molekuly použity k identifikaci nových proteinů. Použití malých molekul je specifické stejně jako delece. Vynález lze použít při objevování malých molekul, které okamžitě mění funkci, což není možné v klasické genetice. Malé molekuly mohou být použity k regulaci funkce proteinů a vyhledávacích rozborech, jakými je vyhledávání kináz, peptidů, náhodné vyhledávání kináz, peptidů, proteáz, GPCR atd. Vyhledávací rozbor pro malé molekulové supresory k zastavení buněčného cyklu zajišťují předkládaná činidla.

Jiným způsob použití elektroforetických sond podle tohoto vynálezu je zobrazen na obr. 11. Buněčná membrána má na svém povrchu rozmanité receptory včetně receptoru R. Ke vzorku je přidán antigen specificky se vázající k receptoru R a pokud je receptor R přítomen, naváže se stejně jako kofaktor Co. Enzym Ea váže výše uvedený komplex, který aktivuje Ea a ten pak mění P1 na jeho fosforylovanou formu P1a. Kináza P2 váže P1a a vytváří aktivní komplex. Tento systém lze použít pro vyhledávání inhibitorů, jakými jsou malé molekuly nebo léčiva, aktivovaného komplexu. Činidla tohoto rozboru zahrnují inhibitor ke každé molekule, která má být vyhledána, a každá taková molekula je navázána k činidlu, které indukuje uvolnění. Elektroforetickou sondou je protilátka komplexu (Ab), tj. protilátka k P1a komplexu, ve kterém kde je tato protilátka štěpitelně spojena s rozmanitými elektroforetickými skupinami. Jestliže se nějaká z molekul, která má být vyhledána váže a inhibuje aktivitu komplexu, uvolnění indukující činidlo je přeneseno do blízkosti elektroforetických sond a skupina e-indikátoru je uvolněna, detekována a/nebo je stanoveno její množství.

Výše uvedený způsob lze použít také k vyhledávání proteinů a jejich vazebných schopností ke konkrétnímu receptoru. V tomto způsobu popsáném na obr. 11 jsou použita léčiva s dobře definovanými cílovými molekulami. Pouze je-li jedena nebo několik takových cílových molekul přítomno mohou být pomocí schopnosti proteinu vázat receptor R detekovány reportéry e-indikátoru. Jak je vidět způsoby vynálezu jsou univerzální ať je cíl známý nebo neznámý.

Obměny schématu obr. 11 jsou znázorněny na obr. 12. V tomto provedení je uvolnění indukující činidlo protilátka Ab1, která se specificky váže k aktivnímu komplexu P2a a P1a. Elektroforetickou sondou je protilátka Ab2, ke které se štěpitelně váží rozmanité skupiny e-indikátoru. Ligandy L lze studovat z hlediska jejich schopnosti vázat receptor R na buněčném povrchu. Pokud se L váže k R, vytvoří se aktivní komplex P2a a P1a. Protilátky Ab1 a Ab2 se naváží k aktivnímu komplexu a přenesou štěpitelnou vazbu do blízkosti činidla indukujícího uvolnění. Obr. 13A znázorňuje hypotetický příklad dráhy, kde se uplatňuje interakce protein-protein pomocí rozmanitých fosforylačních dějů, na které lze aplikovat předkládané způsoby a činidla. V tomto příkladu je interakce protein-protein zastoupena malými molekulami. FRAP je výsledkem interakce živných látek a mitogenů s receptory na buněčném povrchu. Jak je vidět z obr. 13A FKBP proteiny se váží k FRAP (vazebný děj č. 1) v přítomnosti rapamycinu, vzniká 4E-BP1, která se účastní regulace mRNA při iniciaci translace. PP2A je kináza aktivovaná FRAP (vazebný děj č. 2), v přítomnosti kalykulinu-A vzniká

p70S6K, který vede k navázání S6 proteinu (vazebný děj č.5). Tento protein se také účastní regulace mRNA při iniciaci translace. Jiný receptor buněčného povrchu, RTK, je aktivován růstovým faktorem a produkuje PI3K. V přítomnosti wortmanninu je PI3K přeměněn na PDK 1 (vazebný děj č.6), který dává vznik p70S6K a vede k S6 proteinu. PDK 1 také dává vznik PKB (vazebný děj č. 3), který pak dává vznik FRAP (vazebný děj č.4). Grafy na obr. 13B ukazují výsledky rozborů, když není přítomno žádné léčivo nebo když jsou přítomny wortmannin, rapamycin, kalykulin, každý připojený k uvolnění indukujícím činidlu a elektroforetické sondě, která se skládá z protilátky pro jeden z proteinů účastnících se vazebného děje, který je vázán k elektroforetické skupině. Výše popsany postup může napomáhat při vyhledávání různých v buňce přítomných vazebných dějů, při vyhledávání inhibitorů jednoho nebo několika takových dějů, při vyhledávání konkurenčních látek pro daný vazebný děj, při vyhledávání modulátorů kinázové aktivity atd. Díky způsobům a činidlům tohoto vynálezu lze monitorovat výše uvedené sloučeniny najednou v jediném rozboru a to díky použití rozmanitých elektroforetických sond.

Analýza reakčních produktů

Způsoby elektroforézy jsou dobře známy a popsány např. v Krylov et al., Anal. Chem., 72:111R-128R (2000), P.D.Grossman aj.C Colburn, Capillary Elektrophoresis: Theory and Practise, Academic Press, Inc., New York (1992), patent US 5 374 527, 5 624 800, 5 552 028, ABI PRISM 377 DNA Sequencer User's manual, Rev. A, january 1995, Chapter 2 (Applied Biosystems, Foster City, CA) atd. Řada různých foretických médií je komerčně dostupná od Applied Biosystems a ostatních prodejců, včetně nesíťovacích činidel, kterých se používá u automatických zařízení jako je Applied Biosystems „3700“ a „3100“ zařízení. Optimální podmínky pro elektroforézu, tj. koncentrace polymeru, pH, teplota, napětí, koncentrace denaturačního činidla závisí na mnoha faktorech, včetně velikostního rozpětí látek, které mají být odděleny, jejich sloučenin atd. Při použití předloženého vynálezu je nutné předchozí standardní otestování k dosažení optimálních podmínek pro konkrétní separaci.

Během elektroforetické separace jsou detekovány a identifikovány elektroforetické indikátory pomocí záznamu fluorescenčních signálů a migračních časů (nebo migračních vzdáleností) dělených sloučenin nebo pomocí konstrukce grafu relativní fluorescence a pořadí migrace elektroforetických indikátorů (tj.

elektroferogram). K provedení takové detekce je nutno ozářit elektroforetické indikátory pomocí známých prostředků, tj. výbojkou s výpary rtuti, parskem atd. Většinou jsou elektroforetické indikátory ozářeny světelným paprskem vytvořeným pomocí výboje He-Ne plynu nebo paprskem diody v pevném stavu. Fluorescenční signály mohou být detekovány pomocí detektoru citlivého vůči světlu, tj. fotonásobiče atd. Příklady systémů elektroforetické detekce jsou popsány v patentu US 5 543 026, 5 274 240, 4 879 012, 5 091 652, 6 142 162.

Po dokončení reakce lze danou směs analyzovat například pomocí změny signálu jakým je výše popsaná fluorescence nebo odebrání alikvót a stanovení množství všech volných e-indikátorů. V závislosti na zařízení se používají jeden až čtyři různé fluorescency aktivované stejným zdrojem světla a emitující při různých detekčních značkách. Pro zdokonalení lze použít pět a nebo více různých fluorescerů, ale je třeba dodat další zdroj světla. Elektrochemická detekce je popsána v patentu US 6 045 676. V jednom z provedení je přítomnost každého odštěpeného reportéru e-indikátoru stanoven pomocí fluorescenční značky, která je napojena na skupinu e-indikátoru. Separace směsi označené reportéry se provádí pomocí elektroseparace složek v kapalině použitím elektrického pole, elektrokinese (elektrokinetického toku) nebo elektroforetického toku nebo kombinací elektroforetického toku s elektroosmotickým tokem a separací směsi reportérů e-indikátoru do jednotlivých frakcí nebo pásů. Elektroseparace zahrnuje migraci a separaci molekul v elektrickém poli na základě jejich pohyblivosti. Různé formy elektroseparace zahrnují volnou „free zone“ elektroforézu, gelovou elektroforézu, isoelektrickou fokusaci, isotachoforézu, kapilární elektrochromatografii a micelární elektrokinetickou chromatografii. Kapilární elektroforéza zahrnuje elektroseparaci, elektrokinetický tok, včetně elektroforetického, dielektroforetického a/nebo elektroosmotického toku, vedeného trubicí nebo kanálkem o průměru 1 až 200 mikrometrů, obvykle 10 až 100 mikrometrů. Kapilára je dlouhá samostatná trubička nebo kanálek ve vodě nebo obsahující film složený ze silikonu, křemene, skla nebo plastu.

Při kapilární elektroseparaci jsou alikvotní části reakční směsi obsahující reportéry e-indikátoru podrobeny elektroseparaci vložení alikvotní části do elektroseparačního kanálku, který je součástí nebo je spojen s kapilárním zařízením, ve kterém je provedena amplifikace a jiné reakce. Elektrický potenciál je pak použit v elektricky vodivém médiu, které je spojeno s kanálkem, k uskutečnění migrace složek směsi. Použitý elektrický potenciál je dostatečný k dosažení elektroseparace

požadovaných složek podle praxe, která je v oboru známa. Odborník je schopen stanovit vhodný elektrický potenciál pro danou sadu činidel použitých v předloženém vynálezu s ohledem na povahu štěpené značky, povahu reakčního média atd. Parametry elektroseparace uplatňující se pro médium a elektrický potenciál jsou optimalizovány s cílem dosáhnout maximální separace daných složek. Toho je dosaženo empiricky a je to v kompetenci odborníka.

Pro homogenní rozbor jsou nejdříve vzorek, elektroforetické sondy a pomocná činidla smíchána v reakční směsi za podpory štěpení vazebné skupiny. Směs je podrobena oddělení reportérů e-indikátoru od ostatních složek směsi. Směs s reportéry e-indikátoru a nebo bez nich se přenesse do elektroforetického zařízení, většinou mikrofluidního nebo kapilárního elektroforetického zařízení a upraveného média pro elektroforetickou separaci. Pokud je třeba lze ze separačního kanálku odstranit intaktní molekuly reportérů e-indikátoru, naváže se ligand k reportéru e-indikátoru, který není uvolněn, když ostatní reportéry e-indikátoru uvolněny jsou. Popřípadě se přidá reciproční vazebná látka, která má opačný náboj než reportér e-indikátoru, takže celkový náboj je opačný než byl náboj reportéru e-indikátoru. Takové molekuly se pohybují směrem k opačné elektrodě oproti uvolněným molekulám reportérů e-indikátoru. Lze například použít biotin a streptavidin, kde streptavidin nese kladný náboj. V případě peptidového analytu je štěpení uskutečněno v místě, kde zůstává ligand s peptidovým analytem. Je možné mít skupinu e-indikátoru substituovanou methylovou skupinou nebo methioninem. Použitím pyrazolonu modifikovaného methioninu lze tuto látku potom navázat k dostupnému lysinu. Amino skupina pyrazolonu může být substituována biotinem. Štěpení lze dosáhnout pomocí bromkyanu, což má za následek uvolnění reportéru e-indikátoru, ale biotin zůstává s peptidem a skupinou e-indikátoru, která nebyla uvolněna z vazebné části. Avidin je potom použit ke změně polaroty nebo oddělení skupiny e-indikátoru spojené se skupinou vázající cílovou molekulu analytu nebo skupinu vázající cílovou molekulu.

Pro kapilární elektroforézu lze také použít jednu nebo několik detekčních zón pro oddělení odštěpených značek. V souladu s vynálezem je použití několika detekčních zón v závislosti na povaze reakce, skupiny modifikující pohyblivost atd. Existuje řada detekčních zón spojených jednoduchým kanálkem nebo několika kanálky. Vhodné detektory použité pro detekci zón zahrnují, fotonásobiče, fotodiody, seskupení fotodiod, lavinové fotodiody, čipy lineárně řazených nábojem spojených zařízení (CCD), moduly

CCD kamery, spektrofotometry atd. Zdroje excitace zahrnují lampy s filtrem, LED, paprskové diody, plyn, lasery v kapalném a pevném stavu atd. Detekci lze provést pomocí excitace skenovacím paprskem, CCD kamerou, optikou koaxiálních vláken, detekci zadní konfokální nebo přední konfokální fluorescence v jednoduchém provedení nebo řadě provedení.

Detekce může být provedena jakýmkoli známým způsobem spojeným s analýzou kolony kapilární elektroforézy včetně způsobů popsanych v patentech US 5 560 811, 4 675 300, 4 274 240 a 5 324 401 a ostatní důležité literatuře, která je zde včleněna pomocí odkazů. Odborníci na elektroforézu znají široké rozmezí elektrických potenciálů nebo síly polí, které lze použít například pole od 10 V/cm do 1000 V/cm, lépe 200 V/cm až 600 V/cm. Vyšší hranice napětí je pro komerční systémy a je 30 kV, s délkou kapiláry od 40 do 60 cm poskytne maximální pole 600 V/cm. Pro DNA je kapilára obalena s cílem snížit elektroosmotický tok a na injekčním konci kapiláry je udržován záporný potenciál.

Pro snadnost detekce je celá aparatura sestavena z plastického materiálu, který je opticky transparentní, což umožňuje světlu o vlnových délkách od 180 nm do 1500 nm, většinou od 220 nm do 800 nm a nejlépe od 450 do 700 nm mít malé transmisní ztráty. Vhodnými materiály jsou tavený křemen, plasty, křemen, sklo atd.

Sady používané pro čidla e-indikátorů

Výhodné je dodání předem stanovených množství čidel použitých v předkládaném vynálezu v sadě balené sestavy. Jeden příklad sady pro peptidovou analýzu obsahuje v balené sestavě základní čidlo k navázání na vazebné místo na polypeptidu, u kterého proběhla posttranslační modifikace. Sada může dále obsahovat jednu nebo několik elektroforetických sond obsahujících speciální vazebné čidlo pro konkrétní polypeptid štěpitelně spojený s reportérem e-indikátoru. Například každá z foretických sond obsahuje skupinu vázající polypeptid jakou je protilátka štěpitelně spojená se skupinou e-indikátoru. Pohyblivost modifikující skupina každé sondy e-indikátoru má pohyblivost, která umožňuje vzájemné rozlišení reportérů e-indikátoru a je jedinečná pro konkrétní polypeptid. Sada zahrnuje alespoň 1, obvykle ale 10, popřípadě 20 a často 50 nebo více různých sond, které tvoří reportéry e-indikátorů a které mohou být odděleny pomocí své pohyblivosti. Oproti tomu pokud je samotný polypeptid speciálně štěpen a poskytne skupinu e-indikátoru, sada obsahuje čidla

obsahující detekční skupinu spojenou se skupinou pro navázání specificky štěpené skupiny e-indikátoru.

Sada dále obsahuje zařízení pro provedení kapilární elektroforézy stejně tak obsahuje i činidla, která jsou nezbytná k aktivaci skupiny indukující štěpení činidla indukujícího štěpení. Sada dále obsahuje různá pufrální média, z nichž některá obsahují jedno nebo několik výše uvedených činidel.

Relativní množství různých činidel v sadě se široce liší s cílem zajistit nezbytné koncentrace činidel k dosažení předmětu daného vynálezu. Za určitých podmínek je jedno nebo několik činidel v sadě dodáváno jako suchý prášek, obvykle lyofilizovaný, včetně mastku, který po rozpuštění zajišťuje pro činidlo vhodné koncentrace pro provedení způsobu nebo rozboru v souladu s vynálezem. Každé činidlo je baleno v samostatné nádobě nebo jsou některá činidla spojena v jedné nádobě, kde mohou vzájemně reagovat a kde je lze skladovat.

Příklady provedení vynálezu

Vynález je dále popsán pomocí následujících syntéz a ilustrativních příkladů. Části a procenta jsou hmotnostní, pokud není uvedeno jinak. Teploty jsou ve stupních Celsia (°C), pokud není uvedeno jinak. Následné přípravy a příklady popisují vynález, ale žádným způsobem ho v jeho rozsahu nelimitují. Pokud není uvedeno jinak, peptidy použité v následujících příkladech byly připraveny pomocí syntézy s využitím automatického syntetizátoru a byly přečištěny pomocí gelové elektroforézy nebo HPLC.

Následující zkratky mají níže uvedené významy:

TrisHCl–Tris(hydroxy)aminomethan-HCl (10x roztok) od Bio Whittaker, Walkersville, MD

HPLC – vysoko frekvenční kapalná chromatografie

TLC – chromatografie na tenké vrstvě

BSA – bovin sérum albumin, tj. dostupný od Sigma Chemical Company (St.Louis, MO) nebo jiného dodavatele činidel

EDTA – ethylendiamintetraacetát od Sigma Chemical Company

g – gramy

mM – milimolární

FAM – karboxyfluorescein

EMCS – ester kyseliny N - ε-maleimidokaproyloxyjantarové

EDC – 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodimid

NHS – N-hydroxysukcinimid

DMF – dimethylformamid

Fmoc – N-(9-fluorenylmethoxykarbonyl)-

Příklad 1

Konjugace molekuly fotosenzibilizátoru k činidlům rozboru

Molekuly fotosenzibilizátoru jsou spojené s kov-afinitním činidlem, činidlem obsahujícím kyselinu boritou, hlavní molekulou atd. různými běžnými postupy a konfiguracemi. Například aktivovaný (NHS ester, aldehyd, sulfonylchlorid atd.) fotosenzibilizátor (bengálská růž, ftalokyanin atd.) reaguje s reaktivními skupinami obsahujícími amino skupinu (aminodextran, činidla obsahující amino skupinu (s vhodnou ochranou míst vazajících kov), ostatní malé a velké molekuly). Vytvořené konjugáty se přímo použijí (například konjugát protilátka-fotosenzibilizátor, biotin-LC-fotosenzibilizátor atd.) v různých rozbořech. Také mohou být vytvořené konjugáty dále spojeny s protilátkou (např. aminodextran-fotosenzibilizátor konjugát obsahující 20 až 200 fotosenzibilizátorů a 200 až 500 amino skupin může být spojen s předem oxidovanou molekulou protilátky a vznikne konjugát protilátka-dextran-senzibilizátor) nebo s protilátkou a částicí. Například konjugát aminodextran-senzibilizátor obsahující 20 až 200 fotosenzibilizátorů a 200 až 500 amino skupin je spojen s karboxylovanou polystyrenovou kuličkou pomocí chemické reakce EDC a vznikne konjugát fotosenzibilizátor-aminodextran-částice. Způsoby pro včlenění fotosenzibilizátoru do dané částice jsou popsány v patentu US 5 340 716. Potom je molekula protilátky oxidovaná jodistanem sodným podrobena reakci s amino skupinou molekuly aminodextranu v přítomnosti kyanoborohydridu sodného a vznikne konjugát protilátka-dextran-fotosenzibilizátor-částice, zde nazývaný jako „kulička nebo korálek s fotosenzibilizátorem“. Nutno poznamenat, že místo molekuly protilátky lze použít avidin nebo jiné molekuly.

Příklad 2

Konjugace skupiny e-indikátoru a uvolnění reportéru e-indikátoru

Obr.14 shrnuje postupy konjugace skupiny e-indikátoru k protilátce nebo ostatním vazebným skupinám s volnou amino skupinou a reakci výsledného konjugátu a singletového kyslíku, která dává vznik skupině kyseliny sulfinové a uvolňuje reportér e-indikátoru.

Obr.15 A-J ukazuje řadu činidel e-indikátoru, z nichž většina používá 5-karboxyfluorescein nebo 6-karboxyfluorescein (FAM) jako počáteční materiál.

Příklad 3

Příprava Pro2, Pro4 a Pro6 až Pro13

Schéma navržené na obr.16 znázorňuje pěti stupňový postup přípravy od karboxyfluoresceinu odvozených skupin e-indikátoru, jmenovitě Pro2, Pro4, Pro6, Pro7, Pro8, Pro9, Pro10, Pro11, Pro12 a Pro13. První krok zahrnuje reakci 5-nebo 6-FAM s N-hydroxysukcimidem (NHS) a 1,3-dicyklohexylkarboimidem (DOC) s DMF a poskytuje odpovídající ester, který je pak podroben reakci s různými diaminy a výsledkem je požadovaný amid, sloučenina1. Reakce sloučeniny1 a N-sukcimidylydoacetátu poskytuje očekávaný jodoacetamidový derivát, který není izolován, ale je podroben další reakci s 3-merkaptopropionovou kyselinou v přítomnosti triethylaminu. Nakonec je výsledná β -thiokyselina (sloučenina2) přeměněna na výše popsany NHS ester. Různé skupiny e-indikátorů byly syntetizovány z počátečního 5- nebo 6-karboxyfluoresceinu a různých diaminů. Diaminy jsou značeny v první reakci na obr.16A jako $H_2N^A X^A NH_2$. Regioizomer FAM a chemická látka „X“ coby diamin jsou označeny v tabulce uvedené níže a byly vyrobeny pro každou skupinu e-indikátoru. Diamin X může mít řadu dalších forem, jak bylo popsáno výše v diskusi.

skupina e-indikátoru	FAM	X
Pro2	5-FAM	C(CH ₃) ₂
Pro4	5-FAM	bez uhlíku
Pro6	5-FAM	C(CH ₂) ₈
Pro7	5-FAM	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OCH ₂
Pro8	5-FAM	CH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂
Pro9	5-FAM	1,4-fenyl
Pro10	6-FAM	C(CH ₃) ₂
Pro11	6-FAM	bez uhlíku
Pro12	6-FAM	CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OCH ₂
Pro13	6-FAM	CH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂

Syntéza sloučeniny1

K míchanému roztoku 5- nebo 6-karboxyfluoresceinu (0,5 mmol) ve vysušeném DMF (5 ml) byly přidány N-hydroxysukcinimid (1,1 ekvivalentu) a 1,3-dicyklohexylkarboimidu (1,1 ekvivalentu). Po 10 minutách se začala tvořit pevná bílá látka (dicyklohexylmočovina). Reakční směs byla míchána pod dusíkem při teplotě místnosti přes noc. TLC (9:1 CH₂Cl₂-MeOH) naznačuje kompletní spotřebování počátečního materiálu.

Supernatant výše získané směsi byl po kapkách přidán k míchanému roztoku diaminu (2 až 5 ekvivalentů) v DMF (10 ml). Jak je zřejmé z TLC (40:9:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O) reakce proběhla okamžitě. Rozpouštědlo bylo odstraněno za sníženého tlaku. „Flash“ chromatografie zbylého zbytku na „latrobeads“ oxidu křemičitého poskytla požadovaný amin (sloučenina1) s výtěžkem 58 % až 89 %.

¹H NMR (300 Mhz, DMSO-d₆) sloučeniny1 bylo v souladu se stanovenou strukturou.

Syntéza sloučeniny2

K aminu (sloučenina1) (0,3 mmol) byl postupně přidán vysušený DMF (10 ml) a N-hydroxysukcinimidyljodoacetát (1,1 ekvivalentu). Výsledná směs byla míchána při teplotě místnosti dokud nebyl získán čirý roztok. TLC (40:9:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O) naznačuje kompletní proběhnutí reakce.

Výše získaný reakční roztok byl pak podroben reakci s triethylaminem

(1,2 ekvivalentu) a 3-merkaptopropionovou kyselinou (3,2 ekvivalentu). Směs byla míchána při teplotě místnosti přes noc. Následovalo odstranění zbytkového rozpouštědla za sníženého tlaku a "flash" chromatografie poskytující β -thiokyselinu (sloučenina2) ve výtěžku 62 % až 91 %. Struktura sloučeniny2 byla potvrzena na základě ^1NMR (300 Mhz, DMSO-d_6).

Syntéza Pro2, Pro4, Pro6 až Pro13

K míchanému roztoku β -thiokyseliny (sloučenina2) (0,05 mmol) ve vysušeném DMF (2 ml) byl přidán N-hydroxysukcimid (1,5 ekvivalentu) a 1,3-dicyklohexylkarboimidu (1,5 ekvivalentu). Reakční směs byla míchána pod dusíkem při teplotě místnosti 24 až 48 hodin. (dokavad' nezreagoval veškerý počáteční materiál). Reakční směs byla zakoncentrována za sníženého tlaku a přečištěna pomocí "flash" chromatografie a poskytla cílovou molekulu ve výtěžku 41 % až 92 %.

Příprava Pro1

Sloučeniny této reakce jsou znázorněny na obr.16B. K míchanému roztoku 5-jodoacetamidfluoresceinu (sloučenina4) (24 mg, 0,047 mmol) ve vysušeném DMF (2 ml) byly přidány triethylamin (8 μl , 0,057 mmol) a 3-merkaptopropionová kyselina (5 μl , 0,057 mmol). Výsledná reakční směs byla míchána při teplotě místnosti po dobu 1,5 hodin. TLC (40:9:1 CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O) naznačuje kompletní proběhnutí reakce. Následně byl přidán N-hydroxysukcinimid (9 mg, 0,078 mmol) a 1,3-dicyklohexylkarboimid (18 mg, 0,087 mmol). Reakční směs byla míchána pod dusíkem při teplotě místnosti 19 hodin v tomto bodě ukázala TLC kompletní spotřebování počátečního materiálu. Rozpouštědlo bylo odstraněno za sníženého tlaku a následovala "flash" chromatografie používající 25:1 a 15:1 CH_2Cl_2 -MeOH jako vymývacího rozpouštědla a poskytující Pro1 (23 mg, 83 %).

Příprava Pro5

Sloučeniny této reakce jsou znázorněny na obr. 16D.

Syntéza sloučeniny7

K míchanému roztoku 5-(brommethyl)fluoresceinu (sloučenina6) (40 mg,

0,095 mmol) ve vysušeném DMF (5 ml) byly přidány triethylamin (15 μ l, 0,108 mmol) a 3-merkaptopropionová kyselina (10 μ l, 0,115 mmol). Výsledná reakční směs byla míchána při teplotě místnosti po 2 dny. TLC (40:9:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O) naznačuje kompletní proběhnutí reakce. Reakční roztok byl odpařen za nízkého tlaku a nakonec byla provedena „flash“ chromatografie používající 30:1 a 25:1 CH₂Cl₂-MeOH jako vymývacího rozpouštědla a poskytující β -thiokyselinu (sloučenina7) (28 mg, 66 %).

Syntéza Pro5

K roztoku kyseliny (sloučenina7) (27 mg, 0,060 mmol) ve vysušeném DMF (5 ml) byly přidány N-hydroxysukcinimid (11 mg, 0,096 mmol) a 1,3-dicyklohexylkarboimidu (20 mg, 0,097 mmol). Reakční směs byla míchána pod dusíkem při teplotě místnosti 2 dny, kdy TLC (9:1 CH₂Cl₂-MeOH) ukázalo kompletní spotřebování počátečního materiálu. Rozpouštědlo bylo odstraněno za sníženého tlaku a následoval „flash“ chromatografie používající 30:1 CH₂Cl₂-MeOH poskytující Pro5 (24 mg, 73 %).

Příprava Pro14

Sloučeniny této reakce jsou znázorněny na obr. 16E.

Syntéza sloučeniny9

K 5-aminoacetamidofluoresceinu (sloučenina8) (49 mg, 0,121 mmol) byl postupně přidán vysušený DMF (4 ml) a N-sukcinimidyljodoacetát (52 mg, 0,184 mmol). Výsledný čirý roztok a TLC (40:9:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O) ukázaly kompletní spotřebování počátečního materiálu.

Výše získaný reakční roztok byl pak podroben reakci s triethylaminem (30 μ l, 0,215 mmol) a 3-merkaptopropionovou kyselinou (30 μ l, 0,344 mmol). Směs byla míchána 2 hodiny. Následovalo odstranění zbytkového rozpouštědla za sníženého tlaku a „flash“ chromatografie používající 20:1 CH₂Cl₂-MeOH a 15:1 CH₂Cl₂-MeOH poskytující β -thiokyselinu (sloučenina9) (41 mg, 62 %). Struktura byla potvrzena na základě ¹NMR (300 Mhz, DMSO-d₆).

Syntéza Pro14

K míchanému roztoku sloučeniny 9 (22 mg, 0,04 mmol) ve vysušeném DMF (2 ml) byly přidány N-hydroxysukcinimid (9 mg, 0,078 mmol) a 1,3-dicyklohexylkarboimidu (16 mg, 0,078 mmol). Reakční směs byla míchána pod dusíkem při teplotě místnosti 24 hodin. Reakční směs byla zakoncentrována za nízkého tlaku a zbytek byl přečištěn pomocí „flash“ chromatografie používající 30:1 a 20:1 CH_2Cl_2 -MeOH jako vymývacího rozpouštědla a poskytující Pro14 (18 mg, 70 %).

Syntéza Pro15, Pro20, Pro22 a Pro28

Schémat syntézy pro vytvoření NHS esterů elektroforetických indikátorů Pro15, Pro20, Pro22 a Pro28 jsou znázorněny na obr. 16 F-I. Všechna činidla a reakční podmínky jsou v technice běžné a vykazují podobnosti stejně jako reakce zde popsané.

Příklad 4

Rozbor reportérů e-indikátoru pro proteinovou analýzu

A. Značení aminodextranu (MW 500 000) skupinou e-indikátoru a biotinem

Aminodextran byl použit jako model pro ukázkou uvolnění reportéru e-indikátoru ve vztahu k molekule s vysokou molekulární hmotností, která také slouží jako model proteinů. Počet amino skupin na 10 mg aminodextranu byl vypočítán na 2×10^{-8} mol. Pro poměr biotin:skupina e-indikátoru 1:4, byl počet použitého NHS esteru biotinu $1,85 \times 10^{-6}$ mol a počet NHS esteru maleimidu $7,4 \times 10^{-6}$ mol. 10,9 mg aminodextranu bylo rozpuštěno v 6 ml 0,1% PBS pufru. 10 mg biotin-x-x NHS estru a 23,7 mg EMCS bylo společně rozpuštěno v 1 ml DMF a po částech 50 μl přidáno v 30 min. intervalech k roztoku aminodextranu za stálého míchání a za nepřístupu světla. Potom co byla přidána poslední část DMF, roztoku byla směs ponechána stát přes noc (opět za nepřístupu světla). Pak byla směs podrobena dialýze s použitím membrány a limitem molekulární hmotnosti 10 000 Da. Membrána byla za stálého míchání ponořena do kádinky obsahující 2 l vody. Voda byla vyměněna čtyřikrát vždy po dvou hodinách. Membrána byla ve vodě ponechána přes noc (stále mimo dosah světla a za stálého míchání). Potom byl roztok lyofilizován a lyofilizovaný prášek byl použit pro značení skupiny e-indikátoru.

B. Reakce biotinu a maleimidu s aminodextranem značeným skupinou SAMSA

SAMSA [5-(((2-(a-3)-S-acetylmerkaptosukcinoyl)amino)fluorescein)] byl použit jako skupina e-indikátoru pro reakci s maleimidem v molekule aminodextranu. Pro tento účel bylo rozpuštěno 0,3 mg (asi $5,3 \times 10^{-9}$ mol) biotinu a EMCS značeného aminodextranu v 10 μ l vody. 1,1 mg SAMSA (asi $1,2 \times 10^{-6}$ mol) bylo rozpuštěno ve 120 μ l 0,1M NaOH a inkubováno při teplotě místnosti 15 minut (pro aktivaci thiolové skupiny). Potom byl přebytek NaOH neutralizován přidáním 2 μ l 6M HCl a pH roztoku bylo upraveno na 7,0 přidáním 30 μ l fosfátového pufru (200 mM, pH 7,0). Roztok aktivované SAMSA byl přidán k 10 μ l roztoku značeného aminodextranu a inkubován 1 h. Skupina e-indikátoru-značený aminodextran byl přečištěn gelovou filtrací použitím Sephadex 25 (Amersham) a přečištěné vzorky byly uskladněny.

C. Uvolnění reportéru ze značeného aminodextranu

2 μ l korálků se streptavidin-značeným fotosenzibilizátorem (100 μ g/ml) byly opatrně přidány bez přístupu světla k 5 μ l přečištěného značeného aminodextranu a inkubovány bez přístupu světla 15 minut. Roztok byl ozářen 1 minutu při 680 nm. Uvolnění reportéru e-indikátoru bylo pomocí CE s využitím zařízení CE² LabCardTM (ACLARA Bio Sciences, Mountain View, CA). Jak je ukázáno na obr. 1A CE² LabCard^(tm) Lab Card1 sestává ze dvou částí : evaporačně kontrolní a injekčně/separační. Evaporačně kontrolní část spojuje evaporační kontrolní kanálek 2 (450 μ m široký a 50 μ m hluboký) s pufr doplňujícími nádobkami 3 (2 mm v průměru) a jamkou pro evaporačně-kontrolní vzorek 4 (1 mm v průměru) ve středu evaporačně kontrolního kanálku. Objem nádobek pro doplnění pufru je 4,7 μ l, ale objem vzorku pouze 1,2 μ l a objem kanálku 2 pod uprostřed umístěnou jamkou pro vzorek 40 nl. Druhá část CE² zařízení , která je používána k injektáži a separaci sestává z injekčního mikrokánálku 5 a separačního mikrokánálku 6, které se protínají v uzlu 7 a mají rozměry: 120 μ m šířka a 50 μ m hloubka. Oba konce separačního kanálku a jeden konec injekčního kanálku jsou spojeny s nádobkou na pufr 8, kdežto druhý konec injekčního kanálku je přímo veden do evaporačně-kontrolního jamky pro vzorek 4. Kanálky jsou uzavřeny pomocí vrstvy filmu (MT40) na LabCardTM. Detektor 9 je umístěn 10 mm od uzlu. Po naplnění CE² LabCardTM zařízení separačním pufrem (20 mM HEPES, pH 7,4 a 0,5% PEO), bylo přidáno 300 nl zkoumané směsi do jamky pro vzorek 4. Vzorek byl injektován do uzlu

mikrokanálku 7 pomocí napětí uplatňovaném v nádobkách na pufr jak je ukázáno na obr.17B. Vzorek byl potom rozdělen jak je ukázáno na obr. 17C.

Obr.18 znázorňuje elektroforegramy přečištěného značeného aminodextranu s a bez korálků fotosenzibilizátoru. Přidání korálků s fotosenzibilizátorem vedlo k uvolnění reportéru e-indikátoru z aminodextranu s použitím singletového kyslíku, který byl vytvořen fotosenzibilizátorem po ozáření při 680 nm. Experimentální podmínky: separační pufr 20 mM HEPES, pH 7,4 a 0,5% PEO, nastavené napětí viz. obr.17, zkoumaná směs měla 29 $\mu\text{g/ml}$ korálků streptavidin-značeným fotosenzibilizátorem a byla ozářena 1 minutu 680 nm s použitím filtru 680 nm ± 10 nm a 150 W lampy. Jak je vidět přidání korálků s fotosenzibilizátorem vede k uvolnění reportéru e-indikátoru z aminodextranu s využitím singletového kyslíku, který vzniká díky fotosenzibilizátoru po ozáření při 680 nm. S cílem optimalizovat čas ozáření, byla směs korálků obsahujících fotosenzibilizátor ozářena po různou dobu v rozmezí od 1 minuty do 10 minut. Není pozorován nárůst v uvolňování reportéru e-indikátoru při ozáření delším než jedna minuta.

Obr.19 ukazuje vliv koncentrace korálků s fotosenzibilizátorem na uvolnění reportéru e-indikátoru. Obrázek ukazuje separaci přečištěného značeného aminodextranu s použitím různých koncentrací korálků s fotosenzibilizátorem. Vyšší koncentrace korálků s fotosenzibilizátorem vede k vyššímu uvolňování reportéru e-indikátoru ze značeného aminodextranu. Experimentální podmínky: separační pufr 20 mM HEPES, pH 7,4 a 0,5% PEO, nastavené napětí viz. obr.17, zkoumaná směs byla ozářena 1 minutu 680 nm s použitím filtru 680 nm ± 10 nm a 150 W lampy.

Obr.20 ukazuje lineární kalibrační křivku pro uvolnění reportéru e-indikátoru jako funkci koncentrace korálků s fotosenzibilizátorem. Výsledky byly získány s použitím zařízení CE²LabCardTM. Experimentální podmínky: separační pufr 20 mM HEPES, pH 7,4 a 0,5% PEO, nastavené napětí viz. obr.17, zkoumaná směs byla ozářena 1 minutu 680 nm s použitím filtru 680 nm ± 10 nm a 150 W lampy.

Dále byl zkoumán vliv koncentrace značeného aminodextranu na uvolnění reportéru e-indikátoru s výsledky ukázanými na obr. 21. Jak je z tohoto obrázku vidět nižší koncentrace značeného aminodextranu na danou koncentraci korálků s fotosenzibilizátorem vedla k účinnějšímu uvolňování reportéru e-indikátoru (při vyšším poměru uvolněného reportéru e-indikátoru vůči množství značeného aminodextranu). Výsledky byly získány s použitím zařízení CE²LabCardTM. Experimentální podmínky:

separační pufr 20 mM HEPES, pH 7,4 a 0,5% PEO, nastavené napětí viz. obr.17, zkoumaná směs měla 29 $\mu\text{g/ml}$ korálek s fotosenzibilizátorem a byla ozářena 1 minutu 680 nm zkoumaná směs byla ozářena 1 minutu 680 nm s použitím filtru 680 nm $\pm$ 10 nm a 150 W lampy.

Příklad 5

Rozbor reportérů e-indikátoru pro proteinovou analýzu

A. Konjugace skupin e-indikátoru a protilátek

Byly použity dva různé přístupy pro konjugaci. První přístup uplatňoval přímé připojení skupin e-indikátoru k protilátce a druhý přístup uplatňoval připojení skupin e-indikátoru k dextranu, který byl potom připojen k protilátce.

(A1) Přímá konjugace skupin e-indikátoru k protilátkám

Skupiny e-indikátoru byly syntetizovány pomocí NHS esteru, který reaguje s primárními aminy protilátky a tvoří se tak stabilní amidová vazba. Toto je výsledkem náhodného připojení skupin e-indikátoru na povrchu protilátky. Modifikace s 6 až 12 NHS estery obsaženými na jedné molekule protilátky nesnižuje vazebnou aktivitu antigenu. I vyšší poměry NHS esterů na protilátku jsou možné a to s pouze nepatrnou ztrátou aktivity.

Protokol:

1. Přečištěný lidský IgG (zakoupený od Sigma-Aldrich) byl zředěn na 2 mg/ml v 1X PBS (0,1 M fosforečnan sodný, 0,15 M NaCl, pH 7,2).
2. NHS ester obsahující skupiny e-indikátoru byl rozpuštěn v DMF (dimethylformamid) na finální koncentraci mezi 10 až 20 mmol/ μl DMF.
3. 500 μl ředěného lidského IgG (6,5 nmol) bylo smícháno s buď 1, 5, 25 nebo 50 μl skupiny e-indikátoru (což odpovídá 14, 68, 340 a 680 nmol)
4. Roztok byl nechán reagovat 2 hodiny na ledu a v temnu.
5. Protilátka konjugovaná se skupinou e-indikátoru byla dialýzou přečištěna oproti 0,1 XPBS (10 mM fosforečnan sodný, 15 mM NaCl, pH 7,2) po dobu 20 hodin při 4 °C.

(A2) Konjugace skupina e-indikátoru-dextran k protilátkám

V tomto druhém příkladu byly nejdříve připojeny skupiny e-indikátoru k aminodextranu přes amidovou vazbu jak je to v zásadě popsáno výše. Polyklonální a některé monoklonální protilátky obsahují uhlovodíky v Fc části protilátky. Tyto polysacharidy mohou být oxidovány jodistanem a dávají pak vznik reaktivním aldehydovým zbytků. Skupina e-indikátoru obsahující aminodextran je spojena s aldehydovým zbytkem oxidované protilátky přes vytvoření Schiffovy báze. Vazba je dále stabilizována pomocí redukce na sekundární amin kyanoborohydrátem sodným. Extrémní velikost aminodextranu (molekulová hmotnost 500 000) obsahuje 50 až 500 dostupných amino skupin pro konjugaci se skupinami e-indikátoru, což umožňuje zvýšení počtu skupin e-indikátoru na protilátku a výsledkem je amplifikace signálu. Protože je dextran spojen s Fc částí protilátky přes uhlovodík, je dostatečně odstraněn z antigen vazebného místa aniž by snižoval aktivitu.

Protokol pro konjugaci skupin e-indikátoru s aminodextranem

1. Aminodextran (molekulární hmotnost 500 000 s 500 aminy na mol dextranu) byl rozpuštěn v 90 % DMF na finální koncentraci 2 mg/ml (2 nmol aminu/ μ l)
2. NHS ester obsahující skupiny e-indikátoru byl rozpuštěn v DMF (dimethylformamid) na finální koncentraci mezi 10 až 20 mmol/ μ l.
3. 500 μ l aminodextranu (1000 nmol aminu) bylo smícháno s buď 500, 1000 nebo 2000 nmol skupiny e-indikátoru.
4. Roztok byl ponechán reagovat 2 hodiny na ledu a v temnu.
5. Protilátka se skupinou e-indikátoru konjugovaná s aminodextranem byla dialýzou přečištěna oproti 0,1 XPBS (10 mM fosforečnan sodný 15 mM NaCl, pH 7,2) po dobu 20 hodin při 4 °C.
6. Sraženina byla odstraněna centrifugací při 14 000x g po dobu 5 minut.

Protokol pro oxidaci protilátky jodistanem sodným

1. 500 μ l (2,8 nmol) přečištěné anti-humánní IL-4 polyklonální protilátky (zakoupené od Pierce) bylo oxidováno v přítomnosti 10 mM jodistanu sodného (Aldrich)
2. Roztok byl nechán reagovat 30 minut při teplotě místnosti a v temnu.
3. Byl přidán ethylenglykol ve finální koncentraci 100 mM a nechán inkubovat 30 minut při teplotě místnosti.
4. Oxidovaná protilátka byla dialýzou přečištěna oproti 0,1 XPBS (10 mM fosforečnan sodný, 15 mM NaCl, pH 7,2) po dobu 20 hodin při 4 °C.

Protokol pro konjugaci jodistanem oxidované protilátky s aminodextranem obsahujícím skupiny e-indikátoru

1. 54 μ l (300 pmol) oxidované anti-humánní IL-4 polyklonální protilátky bylo smícháno s aminodextranem obsahujícím skupiny e-indikátoru v přítomnosti 200 mM uhličitanu sodného, pH 9,5.
2. Roztok byl nechán reagovat 2 hodiny při teplotě místnosti a v temnu.
3. Byl přidán kyanoborohydrid sodný (čerstvě připravený v 1 N NaOH) ve finální koncentraci 50 mM a nechán inkubovat 30 minut při teplotě místnosti.
4. Nezareagované aldehydy byly zablokovány přidáním 50 mM ethanolaminu, pH 9,6 a nechány reagovat 30 minut při teplotě místnosti.
5. Konjugát byl dialýzou přečištěn oproti 0,1 XPBS (10 mM fosforečnan sodný 15 mM NaCl, pH 7,2) po dobu 20 hodin při 4 °C.

B. Uvolnění reportéru e-indikátoru ze značeného aminodextranu

Použitý postup a zařízení byly již prodiskutovány výše pro SAMSA skupinu e-indikátoru. Celkem E reportérů e-indikátoru bylo odděleno použitím ABI30. Separační podmínky byly následující: 50 mikron kapilára, 47 cm dlouhá a 36 cm konec-detekce, separační pufr, POP-6 (PE Biosystems), injektáž

60 s při 3,0 kV, separační napětí 9,4 kV. Výsledky jsou znázorněny elektroforegramem na obr.22.

C. Imunologické testy s protilátkami připojenými ke skupinám e-indikátorů

Byly provedeny dva typy imunologických testů (přímý a nepřímý nebo sendvičový), které byly vyvinuty z konjugovaných skupin e-indikátoru popsaných výše.

(C1) Sendvičový imunologický test pro cytokiny

Byl proveden imunologický test sendvičového typu (obr.23). Rozbor umožňuje jak kvantifikaci tak kvalifikaci známých cytokinových antigenů. V tomto rozboru odpovídající dvojice protilátek vytváří jakýsi sendvič kolem cytokinového antigenu a přenáší tak tyto dvě protilátky do blízkosti. Jedna z těchto protilátek je konjugována se skupinou e-indikátoru, aby poskytla sondu e-indikátoru. Sondy e-indikátoru mají labilní vazbu štěpitelnou singletovým kyslíkem, která umožňuje uvolnění reportéru e-indikátoru po reakci se singletovým kyslíkem. Druhá protilátka je konjugována s fotosenzibilizátorem, který vytváří singletový kyslík po ozáření při 680 nm. Vzhledem k relativně krátké době existence singletového kyslíku, pouze pokud dvě protilátky vytvoří sendvič, štěpí singletový kyslík štěpitelnou vazbu sondy e-indikátoru.

Protokol pro sendvičový imunologický test pro cytokiny

1. 10 μ l zkušební pufru (0,1 X PBS, 40 mg/ml BSA) je smícháno s 1 μ l (100 nM) biotinem značenou anti-humání IL-4 monoklonální protilátkou (zakoupenou od Pierce, katalog číslo 450-B) a 1 μ l cytokinu IL-4 (Pierce, katalog číslo R-IL-4-5) mající rozmezí koncentrace od 0 do 500 nM.
2. Reakce byla nechána reagovat 30 minut při teplotě místnosti.
3. 5 μ l 100 μ g/ml streptavidinem značeného fotosenzibilizátoru uchyceném na korálku bylo přidáno a směs byla inkubována při teplotě místnosti po dobu 15 minut ve tmě.

4. K odstranění nespecifických interakcí sond e-indikátoru se streptavidinem, bylo přidáno 2 μ l 5 μ M biotin-DNP a inkubováno 10 minut při teplotě místnosti a ve tmě.
5. Bylo přidáno 1 μ l 400 nM anti-humánní IL-4 polyklonální protilátky spojené se skupinou e-indikátor-aminodextran a inkubováno 30 minut při teplotě místnosti a ve tmě.
6. Reakční směs byla potom ozářena 30 s použitím 150 W lampy a optickým filtrem 680 DF $\pm$ 20 nm.
7. Potom byl přidán 1 μ l ROX T8, 1:20 (od PE Biosystems) a uvolněný reportér e-indikátoru je oddělen pomocí kapilární elektroforézy nebo pomocí ABI310 nebo ACLARA plastic LabCard (ACLARA BioSciences, Inc. Mountain View, CA).
8. Separační podmínky uvolněných reportérů e-indikátorů na ABI310 byly následující: 50 mikron kapilára, 47 cm dlouhá a 36 cm konec-detekce, separační pufr, POP-6 (PE Biosystems), injektáž 60 s při 3,0 kV, separační napětí 9,4 kV. Výsledky pro IL-4 s reportérem e-indikátoru Pro1 jsou znázorněny na obr.24.

Výše uvedený postup byl zopakován pro různé cytokiny a různé skupiny e-indikátoru jako např. IL-6 byla zkoumána s použitím skupiny e-indikátoru Pro10 a výsledky jsou uvedeny na obr.25. IFN γ byla zkoumána s použitím skupiny e-indikátoru Pro8 a výsledky jsou uvedeny na obr.26. TNF α byla zkoumána s použitím skupiny e-indikátoru Pro7 a výsledky jsou uvedeny na obr.27. IL-10 byla zkoumána s použitím skupiny e-indikátoru Pro4 a výsledky jsou uvedeny na obr.28. IL-8 byla zkoumána s použitím skupiny e-indikátoru Pro2 a výsledky jsou uvedeny na obr.29. IL-4 byla zkoumána jako duplexní reakce s ostatními cytokiny jako jsou IL-4 a IL-6, IL-4 a IL-8, IL-4 a TNF α a IL-4 a IFN γ . Výsledky jsou uvedeny na obr.30. Multiplexní rozbor pro pět cytokinů (IL-4, IL-6, IL-8, TNF α a IFN γ) byl proveden a výsledky jsou uvedeny na obr. 31. Multiplexní rozbor pro 6 cytokinů (IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α a IFN γ) byl proveden a výsledky jsou uvedeny na obr. 32.

(C2) Přímý imunologický test pro IgG

V přímém imunologickém testu byl antigen IgG konjugován se skupinami e-indikátoru s cílem vytvořit sondu e-indikátoru. Sondy e-indikátoru mají labilní vazbu štěpitelnou singletovým kyslíkem, která umožňuje uvolnění reportéru e-indikátoru po reakci se singletovým kyslíkem. Protilátka je spojena s fotosenzibilizátorem, který produkuje po ozáření 680 nm singletový kyslík. Vzhledem k relativně krátké době existence singletového kyslíku, pouze pokud se naváží dvě protilátky, štěpí singletový kyslík štěpitelnou vazbu a reportér e-indikátoru se tak uvolní (obr.33)

Protokol pro přímý imunologický test pro IgG

1. 10 μ l zkušební pufru (0,1 X PBS, 40 mg/ml BSA) je smícháno s 1 μ l (100 nM) biotinem značené anti-humání IgG protilátkou a 1 μ l lidského IgG (od Sigma) značeného skupinou e-indikátoru mající rozmezí koncentrace od 0 do 500 nM.
2. Reakce byla nechána reagovat 30 minut při teplotě místnosti.
3. 5 μ l 100 μ g/ml streptavidinem značeného fotosenzibilizátoru uchyceném na korálku bylo přidáno a směs byla inkubována 15 minut při teplotě místnosti ve tmě.
4. Reakční směs byla potom ozářena 30 s použitím 150 W lampy a optickým filtrem 680 DF $\pm$ 20 nm.
5. Potom byl přidán 1 μ l ROX T8 standardu a uvolněný reportér e-indikátoru byl oddělen pomocí kapilární elektroforézy nebo pomocí ABI310 nebo ACLARA plastic LabCard.

Výsledky různých koncentrací lidského IgG jsou na obr. 34. Kalibrační křivka je zobrazena na obr. 35.

Je zřejmé z výsledků, že předmět vynálezu poskytuje výkonné způsoby přípravy prostředků pro použití při multiplexních stanoveních a způsoby pro provedení multiplexních stanovení s použitím těchto prostředků. Tyto způsoby poskytují homogenní a heterogenní protokoly, s proteiny jako příkladem skupiny sloučenin.

Je dále zřejmé z výše uvedených výsledků, že vynález poskytuje přesný, účinný a citlivý postup, stejně jako prostředky použité v tomto postupu k provedení multiplexních

reakcí. Protokoly poskytují velmi flexibilním způsob, jakým je stanovení provedeno a lze je aplikovat na širokou řadu látek jako jsou hapteny, antigeny, nukleové kyseliny, buňky atd., kdy lze najednou provést řadu stanovení na jednom nebo několika vzorcích a zjistit tak mnoho informací o daných sloučeninách. Výsledky stanovení pomocí elektroforézy nebo hmotnostní spektrometrie jsou snadno srozumitelné. Jsou dodávány systémy, ve kterých je celý proces po přidání vzorku a činidel proveden pod kontrolou počítače, který výsledky automaticky zaznamenává.

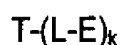
Všechny citované publikace a patentové přihlášky jsou zde včleněny pomocí odkazu.

Ačkoli předcházející vynález byl popsán dosti detailně, jsou uvedeny příklady provedení s cílem objasnit problematiku a zlepšit tak porozumění. Odborníkům bude snadno zřejmé, že lze provést určité změny a modifikace a přesto bude zachován rozsah připojených nároků.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob stanovení přítomnosti nebo nepřítomnosti jednoho nebo několika cílových polypeptidů ve vzorku tyto polypeptidy obsahujícím, vyznačující se tím, že se připojí klasifikačně specifické činidlo mající skupinu indukující štěpení v účinné blízkosti a základní činidlo specifické pro posttranslační modifikace na jednom nebo několika cílových polypeptidech a že se připojí pomocí štěpitelné vazby jedna nebo několik elektroforetických sond majících vazebnou skupinu specifickou pro cílový polypeptid a jeden nebo několik elektroforetických indikátorů a že se smíchá vzorek, klasifikačně specifické činidlo a jedna nebo několik elektroforetických sond a tím se naváže klasifikačně specifické činidlo a jedna nebo několik elektroforetických sond k jednomu nebo několika cílovým polypeptidům a že se uvolní aspoň jeden nebo několik elektroforetických indikátorů po odštěpení štěpitelné vazby jedné nebo několika elektroforetických sond v blízkosti skupiny indukující štěpení a že se elektroforeticky oddělí uvolněné elektroforetické indikátory a že se určí přítomnost nebo nepřítomnost jednoho nebo několika cílových polypeptidů na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti uvolněných elektroforetických indikátorů.
2. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že je jeden nebo několik polypeptidů velké množství cílových polypeptidů.
3. Způsob podle nároku 2, vyznačující se tím, že je štěpení indukující skupina senzibilizátorem, který produkuje aktivní látky.
4. Způsob podle nároku 3, vyznačující se tím, že je senzibilizátor fotosenzibilizátorem, štěpení indukující skupina oxidačně labilní vazba a aktivní látka se nachází ve skupině obsahující peroxid vodíku, hydroxylový radikál, superoxidový anion, fenoxý radikál a singletový kyslík.

5. Způsob podle nároku 4, vyznačující se tím, že je aktivní látka singletovým kyslíkem.
6. Způsob podle nároku 5, vyznačující se tím, že se vazebné činidlo klasifikačně specifického činidla nachází ve skupině obsahující protilátky, proteinové receptory, ligandy proteinových receptorů, lecitiny, skupiny obsahující biotin, skupiny obsahující kyselinu boritou, aptamery, substráty enzymů, kofaktory enzymů a enzymové podjednotky a vazebná skupina elektroforetické sondy je protilátka nebo prostředek protilátku obsahující.
7. Způsob podle nároku 5, vyznačující se tím, že se posttranslační modifikace nachází ve skupině obsahující fosforylaci, glykosilaci, ribosilaci, acetylaci, acylaci, methylaci, lipidaci, isoprenylaci a ubiquitinaci.
8. Způsob podle nároku 5, vyznačující se tím, že je velké množství cílových polypeptidů v rozmezí od 2 do 100.
9. Způsob podle nároku 8, vyznačující se tím, že je velké množství cílových polypeptidů v rozmezí od 5 do 50.
10. Způsob podle nároku 5, vyznačující se tím, že se fotosenzibilizátor nachází ve skupině obsahující porfyriny, halogenované deriváty fluorescenčního barviva, halogenované deriváty barviva rhodaminu a naftalokyaniny.
11. Způsob podle nároku 5, vyznačující se tím, že štěpitelná vazba obsahuje olefin, thioether, selenoether, thiazol, oxazol nebo imidazol.
12. Způsob podle nároku 5, vyznačující se tím, že se definuje elektroforetická sonda obecným vzorcem:



kde T je vazebná skupina specifická pro cílový polypeptid, L je oxidačně labilní vazba, E je elektroforetický indikátor a k je celé číslo větší nebo rovno 1.

13. Způsob podle nároku 12, vyznačující se tím, že se L nachází ve skupině obsahující olefiny, thioethery, selenoethery, thiazoly, oxazoly nebo imidazoly.
14. Způsob podle nároku 13, vyznačující se tím, že E je fluorescentní, ve vodě rozpustná sloučenina mající molekulární hmotnost v rozmezí od 150 Da do 2500 Da.
15. Způsob podle nároku 13, vyznačující se tím, že E má formu (M,D), kde E je fluorescentní barvivo a M je skupina modifikující pohyblivost, která je vazbou nebo organickou molekulou mající až 100 atomů odlišných od vodíku, které se nachází ve skupině obsahující uhlík, kyslík, dusík, fosfor, bor a síru.
16. Způsob podle nároku 12, vyznačující se tím, že se E definuje pomocí obecného vzorce:

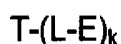


- kde A je $-C(=O)R$, kde R je alifatická, aromatická, alicyklická nebo heterocyklická skupina mající od 1 do 8 uhlíkových atomů a od 0 do 4 heteroatomů vybraných ze skupiny obsahující O, S a N a $-CH_2-C(=O)-NH-$
 $-CHO$, $-SO_2H$, $-CH_2-C(=O)O-CHO$, $-C(=O)NH-(CH_2)_n-NH-C(=O)C(=O)-(C_6H_5)$,
 kde n je v rozmezí od 2 do 12, D je fluorescenční barvivo a M je skupina vazba nebo organická molekula mající až 100 atomů odlišných od vodíku, které se nachází ve skupině obsahující uhlík, kyslík, dusík, fosfor, bor a síru,
 s podmínkou, že molekulární hmotnost E je v rozmezí od 150 do 5000 Da.
17. Způsob podle nároku 16, vyznačující se tím, že D je fluorescenční barvivo.
 18. Sada, vyznačující se tím, že se používá k detekci přítomnosti nebo nepřítomnosti množství cílových polypeptidů ve vzorku a že obsahuje
 klasifikačně specifické činidlo mající štěpení indukující skupinu a základní vazebné činidlo specifické pro posttranslační modifikace na jednom nebo několika cílových polypeptidech a že se připojí pomocí štěpitelné vazby jedna



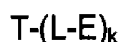
nebo několik elektroforetických sond majících vazebnou skupinu pro cílový polypeptid a elektroforetický indikátor.

19. Sada podle nároku 18, vyznačující se tím, že štěpení indukující skupina je senzibilizátorem a štěpitelná vazba je na oxidací labilní vazba.
20. Sada podle nároku 19, vyznačující se tím, že základní vazebné činidlo se nachází ve skupině obsahující prostředky vázající protilátky, proteinové receptory, ligandy proteinových receptorů, lecitiny, skupiny obsahující biotin, skupiny obsahující kyselinu boritou, aptamery, substráty enzymů, kofaktory enzymů a enzymové podjednotky.
21. Sada podle nároku 20, vyznačující se tím, že vazebné skupiny jednoho nebo několika elektroforetických sond jsou prostředky vázající protilátku.
22. Sada podle nároku 21, vyznačující se tím, že jedna nebo několik elektroforetických sond jsou ve velkém množství v rozmezí od 2 do 50.
23. Sada podle nároku 22, vyznačující se tím, že různé elektroforetické sondy jsou specifické k různým cílovým polypeptidům.
24. Sada podle nároku 23, vyznačující se tím, že se elektroforetické sondy definují pomocí obecného vzorce:



kde T je vazebná skupina specifická pro cílový polypeptid, L je oxidačně labilní vazba, E je elektroforetický indikátor a k je celé číslo větší nebo rovno 1.

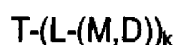
25. Prostředek, vyznačující se tím, že se detekují jeden nebo několik cílových polypeptidů a že prostředek obsahuje množství elektroforetických sond definovaných obecným vzorcem:



kde T je vazebná skupina specifická pro cílový polypeptid, L je oxidačně labilní vazba, E je elektroforetický indikátor a k je celé číslo větší nebo rovno 1 a každé

odlišné T z daného množství se pojí k různým E a taková E z daného množství mají optické znaky a/nebo elektroforetické pohyblivosti odlišné od ostatních E v daném množství.

26. Prostředek podle nároku 25, vyznačující se tím, že je L po oxidaci labilní vazbou a množství je rozmezí 2 až 500 a E má molekulární hmotnost v rozmezí od 150 do 10 000 Da.
27. Prostředek podle nároku 26, vyznačující se tím, že elektroforetická sonda se definuje pomocí obecného vzorce:



Kde T, L a k jsou definovány výše, D je detekční skupina a M je vazba nebo ve vodě rozpustná organická sloučenina mající od 1 do 100 atomů odlišných od vodíku, které se nachází ve skupině obsahující uhlík, kyslík, dusík, fosfor, bor a síru.

28. Prostředek podle nároku 27, vyznačující se tím, že D je fluorescenční značka, chromogenní značka nebo elektrochemická značka.
29. Prostředek podle nároku 28, vyznačující se tím, že M je polymer ze skupiny polyetherů, polyesterů, polypeptidů, oligosacharidů, polyurethánů, polyamidů, polysulfonamidů, polysulfoxidů, polyfosfonátů a jejich blokových kopolymerů.
30. Prostředek podle nároku 29, vyznačující se tím, že D je fluorescein.
31. Prostředek podle nároku 30, vyznačující se tím, že fluorescein se nachází ve skupině obsahující 5- karboxyfluorescein a 6-karboxyfluorescein, 5- a 6-karboxy-4,7-dichlorofluorescein, 2',7'- dimethoxy-5- a 6-karboxy-4,7-dichlorofluorescein, 2',7'-dimethoxy-4',5'-dichloro-5- a 6-karboxyfluorescein, 2',7'-dimethoxy-4',5'-dichloro-5- a 6-karboxy-4,7-dichlorofluorescein, 1',2',7',8'-dibenzo-4', 5'- a 6-karboxy-4,7-dichlorofluorescein, 1',2',7',8'-dibenzo-4',5'-dichloro-5- a 6-karboxy-4,7-

-dichlorofluorescein, 2',7'-dichloro-5- a 6-karboxy-4,7-dichlorofluorescein a 2',4',5',7-tetrachloro-5-a 6-karboxy-4,7-dichlorofluorescein.

32. Prostředek podle nároku 27, vyznačující se tím, že L se nachází ve skupině obsahující olefiny, thioethery, selenoethery, thiazoly, oxazoly nebo imidazoly.
33. Prostředek podle nároku 27, vyznačující se tím, že D je D_1 -g- D_2 , ve kterém je jedna z D_1 a D_2 akceptorová molekula přenášející energii a druhá z D_1 a D_2 donorová molekula přenášející energii a kde g je rigidní linker mající takovou délku, že se přenos energie koná mezi D_1 a D_2 .
34. Prostředek podle nároku 33, vyznačující se tím, že D_1 a D_2 se nacházejí ve skupině obsahující rhodaminy, fluoresceiny a jejich halogenované deriváty.
35. Prostředek podle nároku 27, vyznačující se tím, že T je prostředek vázající protilátku.
36. Prostředek podle nároku 35, vyznačující se tím, že T je protilátka.
37. Prostředek podle nároku 27, vyznačující se tím, že se M vyrobí spojením 2 až 10 sloučenin vybraných ze skupiny obsahující dimethoxytrityl (DMT)-chráněný hexaethylenglykolfosforamidit, 6-(4-monomethoxytritylamino)hexyl-(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-fosforamidit, 12-(4-monomethoxytritylamino)dodecyl-(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-fosforamidit, 2-[2-(4-monomethoxytrityl)aminoethoxy]ethyl-(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-fosforamidit, (S-trityl-6-merkaptohexyl)-(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-fosforamidit, 5'-fluorescein-fosforamidit, 5'-hexachloro-fluorescein-fosforamidit, 5'-tetrachloro-fluorescein-fosforamidit, 9-O-dimethoxytrityltriethyleneglykol, 1-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-fosforamidit, 3(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyl-1-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-fosforamidit, 5'-O-dimethoxytrityl-1',2'-dideoxyribosa-3'-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-fosforamidit,



18-O-dimethoxytritylhexaethyleneglykol, 1 -[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-
 -fosforamidit, 12-(4,4'-dimethoxytrityloxy)dodecyl-1-[(2-kyanoethyl)-(N,N-
 -diisopropyl)]-fosforamidit, 1,3-bis-[5-(4,4'-
 -dimethoxytrityloxy)pentylamido]propyl-2-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-
 -fosforamidit, 1-[5-(4,4'-dimethoxytrityloxy)pentylamido]-3-[5-
 -fluorenomethoxykarbonyloxypentylamido] -propyl-2-[(2-kyanoethyl)-(N,N-
 -diisopropyl)] -fosforamidit, tris-2,2,2-[3 -(4,4'-
 -dimethoxytrityloxy)propyloxymethyl]ethyl-[(2-kyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-
 -fosforamidit, sukcinimidyl-trans-4-(maleimidylmethyl)-cyklohexan-1-
 -karboxylát, sukcinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionát,
 sukcinimidylacetylthioacetát, Texas Red-X-sukcinimidylester,
 5- a 6-karboxytetramethylrhodaminsukcinimidylester,
 bis-(4-karboxypiperidiny)sulfonrhodamin-di(sukcinimidylester), 5- a 6-((N-(5-
 -aminopentyl)aminokarbonyl)tetramethylrhodamin, sukcinimidyl-4-(p-
 -maleimidofenyl)butyrát; N-y-maleimidobutyryl-oxysukcinimidester; p-
 -nitrofenyljodoacetát ; hydrazid kyseliny 4-(4-N-maleimidofenyl)-máselné.

38. Prostředek podle nároku 27, vyznačující se tím, že množství elektroforetických sond je v rozmezí od 5 do 100.
39. Prostředek podle nároku 38, vyznačující se tím, že množství elektroforetických sond je v rozmezí od 10 do 30.
40. Prostředek, vyznačující se tím, že se detekuje přítomnost nebo nepřítomnost cílové molekuly ve vzorku a že prostředek obsahuje množství elektroforetických indikátorů definovaných obecným vzorcem:

A-M-D

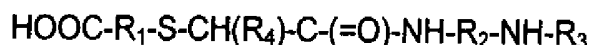
kde A je $-C(=O)R$, kde R je alifatická, aromatická, alicyklická nebo heterocyklická skupina mající od 1 do 8 uhlíkových atomů a od 0 do 4 heteroatomů vybraných ze skupiny obsahující O, S a N a $-CH_2-C(=O)-NH-$
 $-CHO$, $-SO_2H$, $-CH_2-C(=O)O-CHO$, $-C(=O)NH-(CH_2)_n-NH-C(=O)C(=O)-(C_6H_5)$,
 kde n je v rozmezí od 2 do 12, D je detekční skupina a M je vazba nebo organická molekula mající až 100 atomů odlišných od vodíku, které se nachází ve skupině obsahující uhlík, kyslík, dusík, fosfor, bor a síru, s podmínkou, že molekulární hmotnost A-M-D je v rozmezí od 150 do 5000 Da

41. Prostředek podle nároku 40, vyznačující se tím, že D je fluorescenční značka, chromogenní značka nebo elektrochemická značka.
42. Prostředek podle nároku 41, vyznačující se tím, že D je fluorescenční značka.
43. Prostředek podle nároku 42, vyznačující se tím, že D je fluorescein.
44. Prostředek podle nároku 42, vyznačující se tím, že D je D_1-g-D_2 , ve kterém je jedna z D_1 a D_2 akceptorová molekula přenášející energii a druhá z D_1 a D_2 donorová molekula přenášející energii a kde g je rigidní linker mající takovou délku, že se přenos energie koná mezi D_1 a D_2 .
45. Prostředek podle nároku 44, vyznačující se tím, že D_1 a D_2 se nacházejí ve skupině obsahující rhodaminy, fluoresceiny a jejich halogenované deriváty.
47. Prostředek podle nároku 40, vyznačující se tím, že D je fluorescenční značka a množství elektroforetických indikátorů je v rozmezí od 5 do 100.
48. Prostředek podle nároku 47, vyznačující se tím, že každý elektroforetický indikátor z daného množství má různý poměr náboj-hmotnost nebo různé optické znaky a elektroforetický indikátor tvoří po elektroforetické separaci detekovatelné píky.
49. Prostředek podle nároku 48, vyznačující se tím, že D je stejné pro každý elektroforetický indikátor z daného množství a kde každý elektroforetický indikátor

z daného množství má různý poměr náboj-hmotnost nebo různé optické znaky a elektroforetický indikátor tvoří po elektroforetické separaci detekovatelné píky.

50. Prostředek podle nároku 40, vyznačující se tím, že M je polymer ze skupiny polyetherů, polyesterů, polypeptidů, oligosacharidů, polyurethátů, polyamidů, polysulfonamidů, polysulfoxidů, polyfosfonátů a jejich blokových kopolymerů.
51. Prostředek podle nároku 40, vyznačující se tím, že D je fluorescein.
52. Prostředek podle nároku 51, vyznačující se tím, že fluorescein se nachází ve skupině obsahující 5- karboxyfluorescein a 6-karboxyfluorescein, 5- a 6-karboxy-4,7-dichlorofluorescein, 2',7'- dimethoxy-5- a 6-karboxy-4,7-dichlorofluorescein, 2',7'-dimethoxy-4',5'-dichloro-5- a 6-karboxyfluorescein, 2',7'-dimethoxy-4',5'-dichloro-5- a 6-karboxy-4,7-dichlorofluorescein, 1',2',7',8'-dibenzo-4', 5'- a 6-karboxy-4,7-dichlorofluorescein, 1',2',7',8'-dibenzo-4',5'-dichloro-5- a 6-karboxy-4,7-dichlorofluorescein, 2',7'-dichloro-5- a 6-karboxy-4,7-dichlorofluorescein a 2',4',5',7-tetrachloro-5-a 6-karboxy-4,7-dichlorfluorescein.

53. Prostředek, vyznačující se tím, že se připojí elektroforetický indikátor k vazebné skupině pomocí thioetherové štěpitelné vazby a že se definuje pomocí obecného vzorce:



kde R_1 je C_1 - C_{10} alkylidyl, R_2 je alkylidyl, R_3 je amino chránící skupina a R_4 je fenylyl nebo substituovaný fenylyl poskytující elektron.

54. Prostředek podle nároku 53, vyznačující se tím, že amino chránící skupina je Fmoc skupina a R_4 je fenylyl.

55. Prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje:

(a) množství elektroforetických sond, kde každá obsahuje elektroforetický indikátor k ní připojený pomocí štěpitelné vazby, schopné reagovat se singletovým kyslíkem a

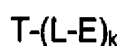
(b) klasifikačně specifické činidlo, které obsahuje fotosenzibilizátor se schopností aktivovat kyslík na singletový kyslík, pokud je v excitovaném stavu.

56. Prostředek podle nároku 55, vyznačující se tím, že klasifikačně specifické činidlo obsahuje jeden nebo několik korálků s fotosenzibilizátorem.

57. Prostředek podle nároku 56, vyznačující se tím, že jeden nebo několik korálků s fotosenzibilizátorem se váže se základním vazebným činidlem

58. Prostředek podle nároku 55, vyznačující se tím, že štěpitelná vazba obsahuje skupinu olefinu a jeden nebo několik substituentů poskytující elektron při konjugaci s danou skupinou olefinu.

59. Prostředek podle nároku 55, vyznačující se tím, že množství elektroforetických sond se definuje obecným vzorcem:



kde T je vazebná skupina specifická pro cílovou molekulu, L je štěpitelná vazba, E je elektroforetický indikátor a k je celé číslo větší nebo rovno 1 a každé odlišné T z daného množství se pojí k různým E a taková E z daného množství mají optické znaky a/nebo elektroforetické pohyblivosti odlišné od ostatních E v daném množství.

60. Prostředek podle nároku 55, vyznačující se tím, že klasifikačně specifické činidlo specificky váže fosforylované polypeptidy.

61. Prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje:

- (a) cílový polypeptid
- (b) elektroforetickou sondu specificky vázanou k cílovému polypeptidu a
- (c) klasifikačně specifické činidlo se skupinou indukující štěpení, která je v účinné blízkosti elektroforetické sondy po navázání klasifikačně specifického činidla.

62. Prostředek podle nároku 61, vyznačující se tím, že má cílový polypeptid skupinu fosforylu, ke které se specificky váže klasifikačně specifické činidlo.

1/54

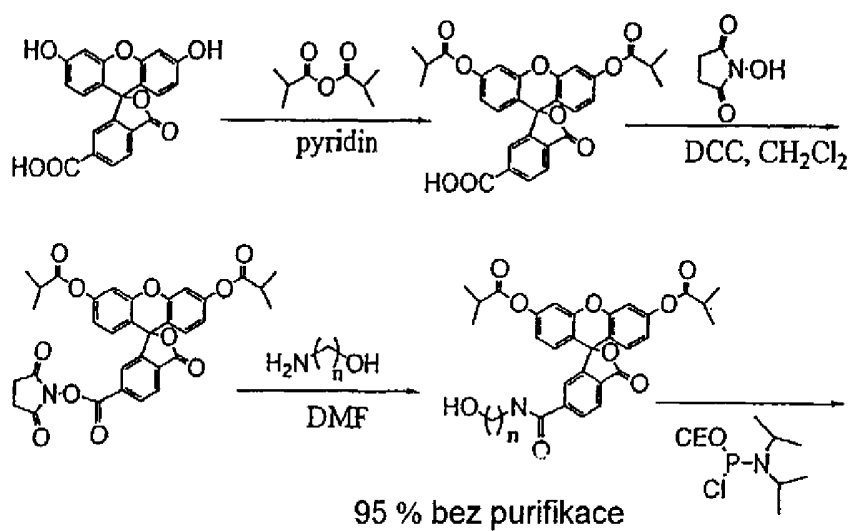


Fig. 1

2/54

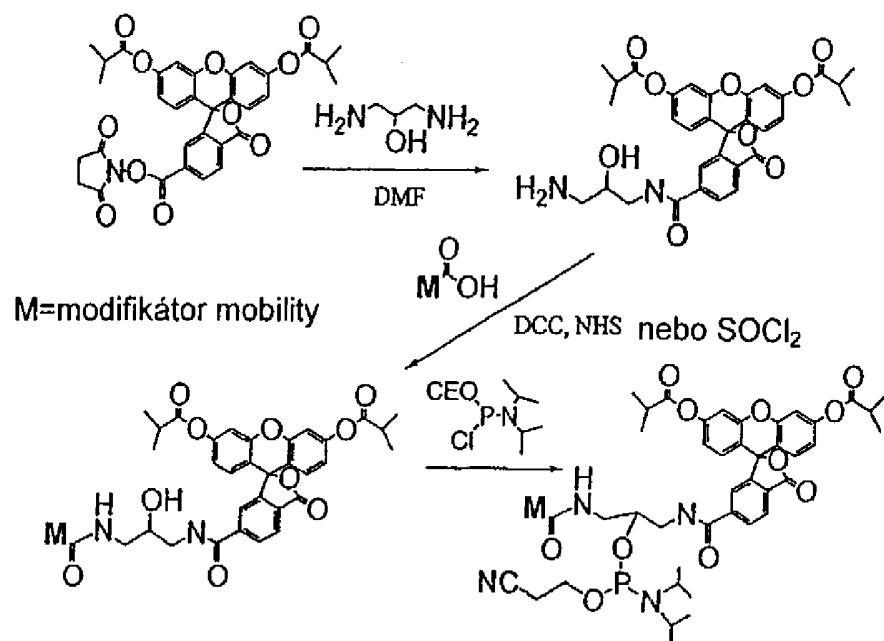


Fig. 2

3/54

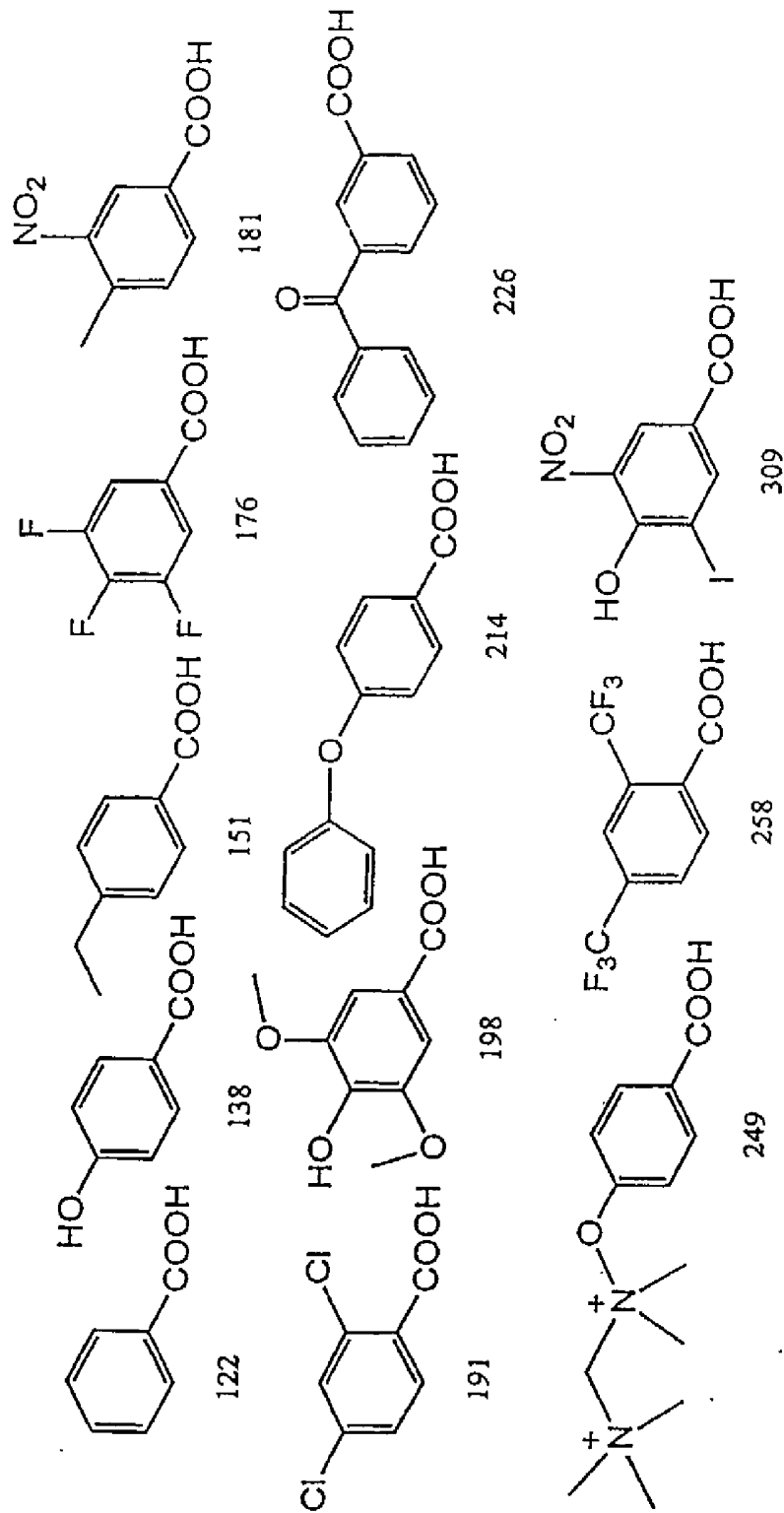


Fig. 3

4/54

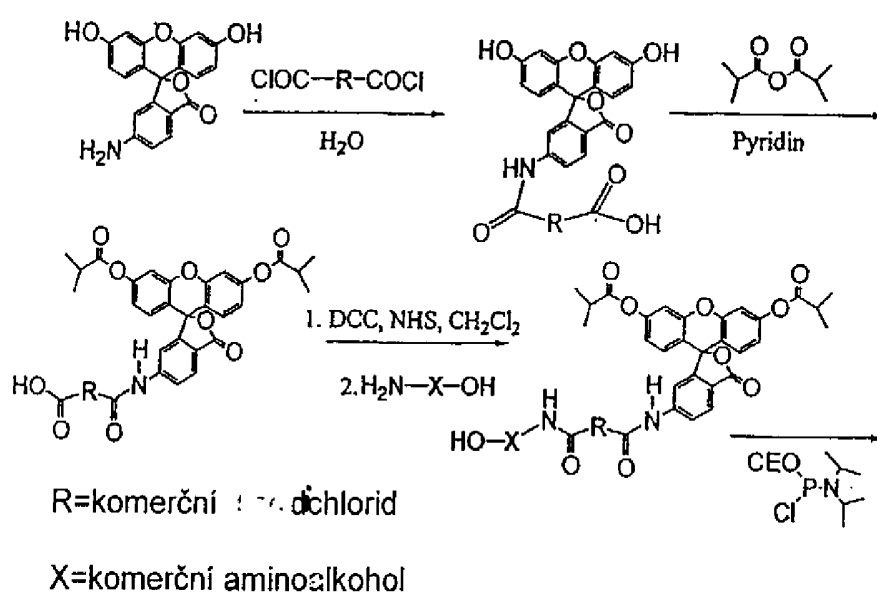
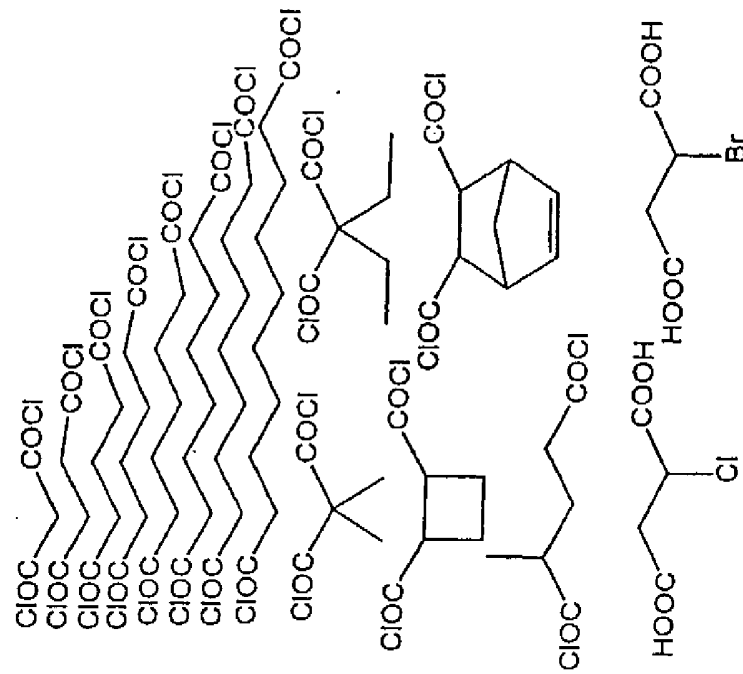


Fig. 4



ᠮᠤᠨᠤᠯᠤᠰᠤ

6/54

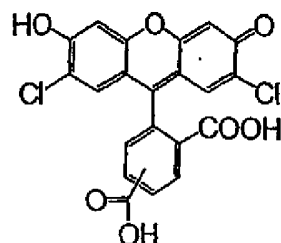
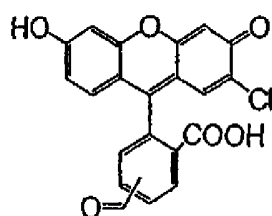
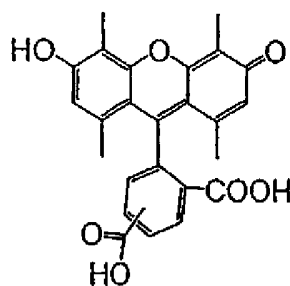
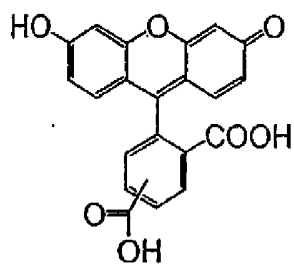
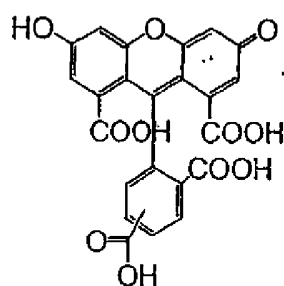
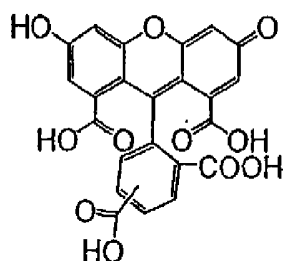
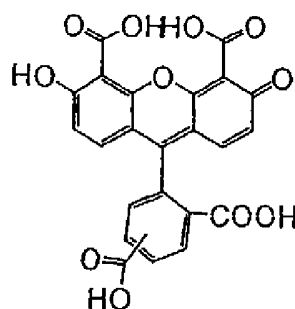
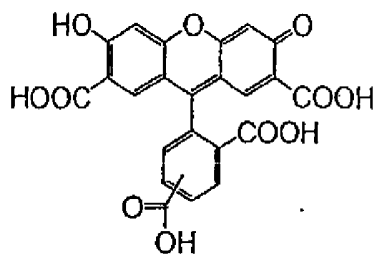


Fig. 6A

7/54

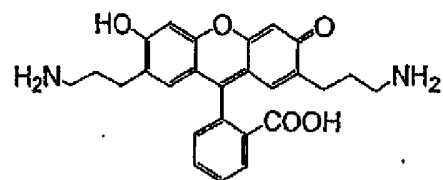
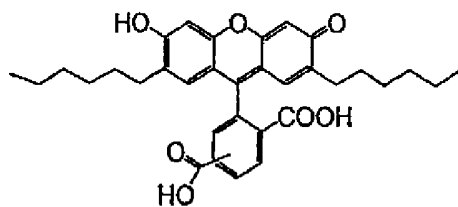
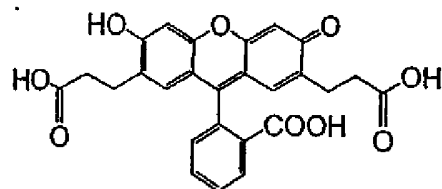
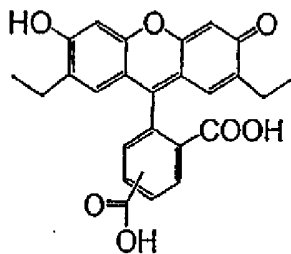
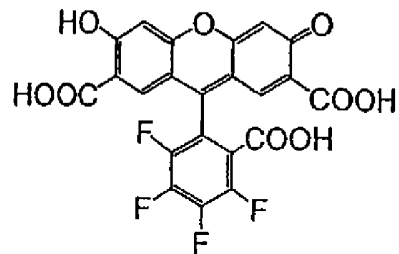
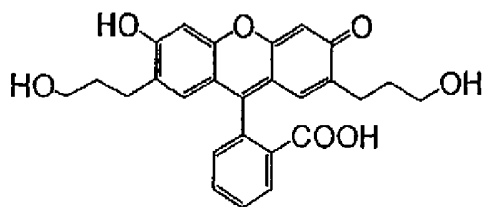
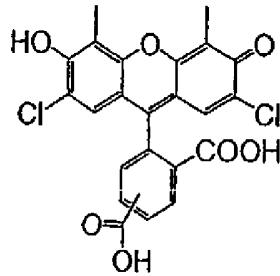
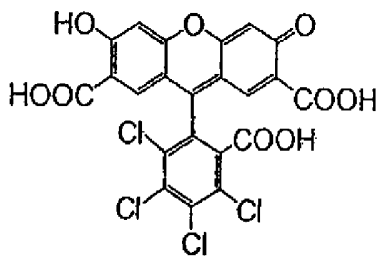
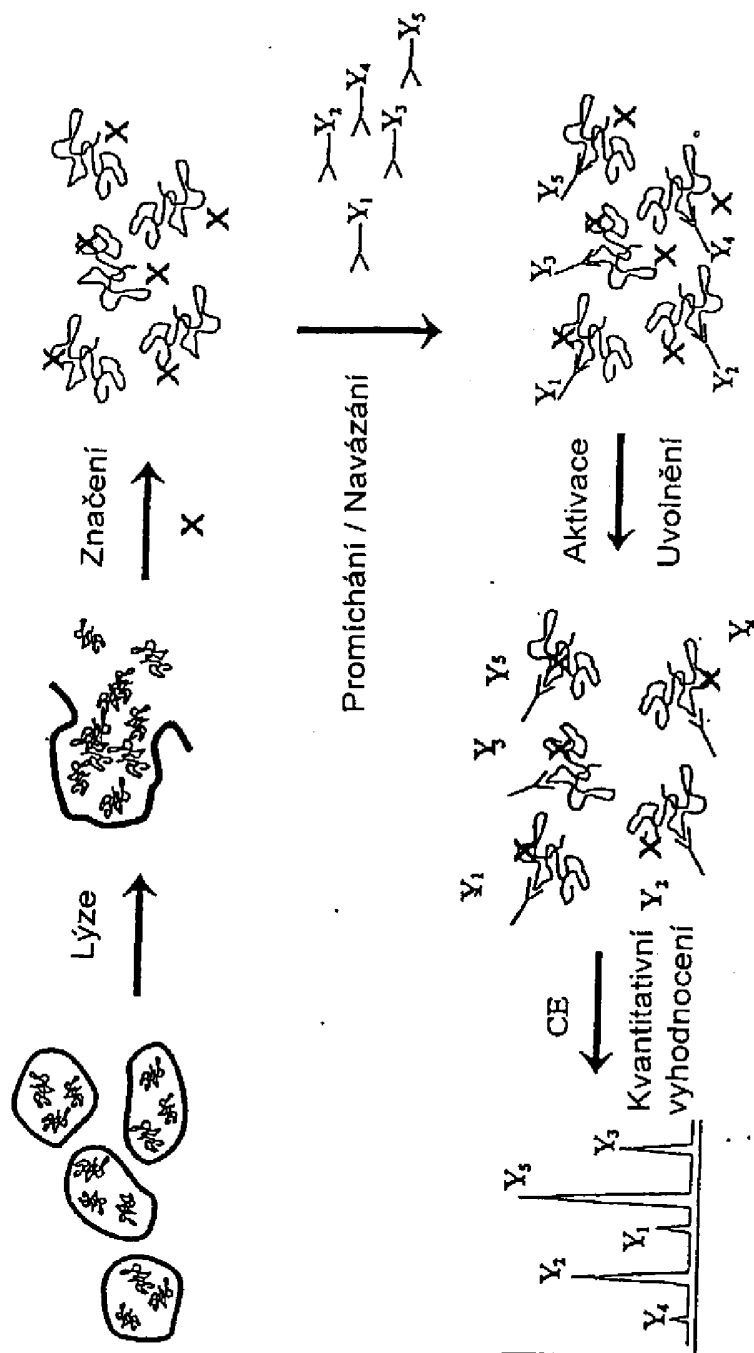


Fig. 6B

Figure 7



9/54

Figure 8

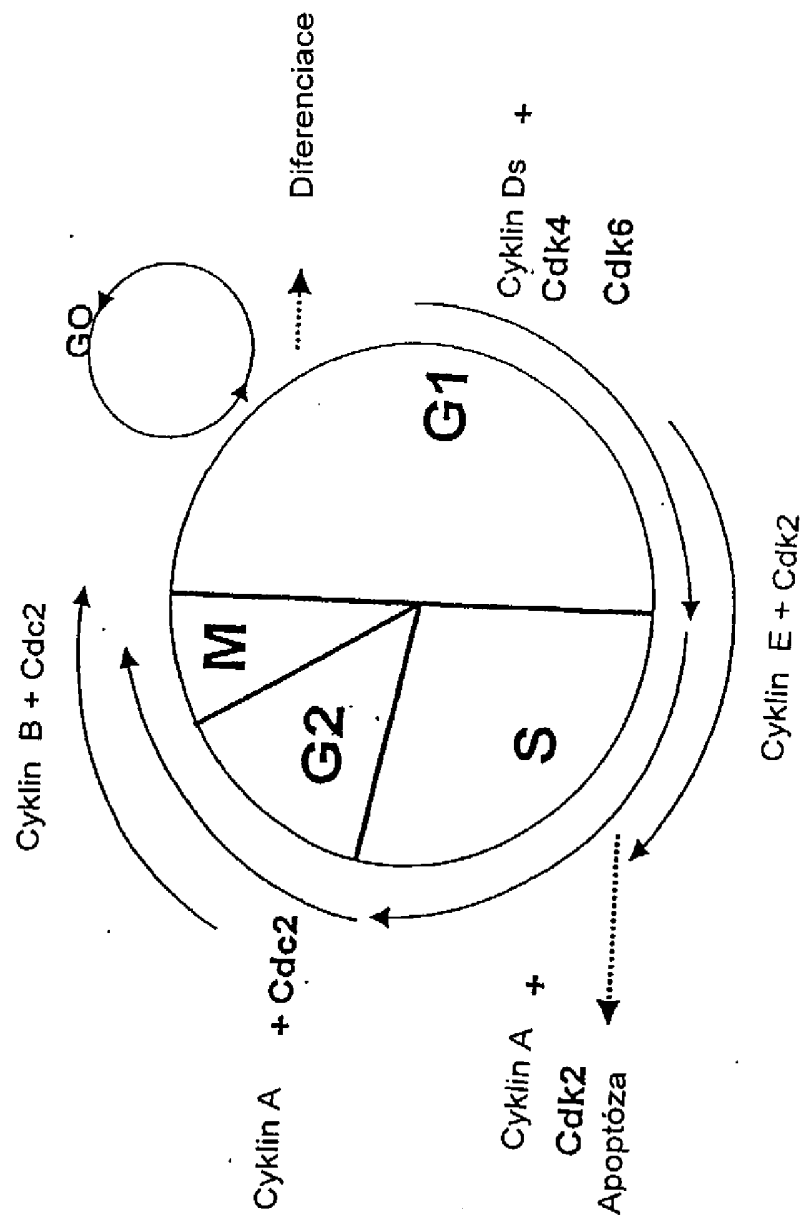
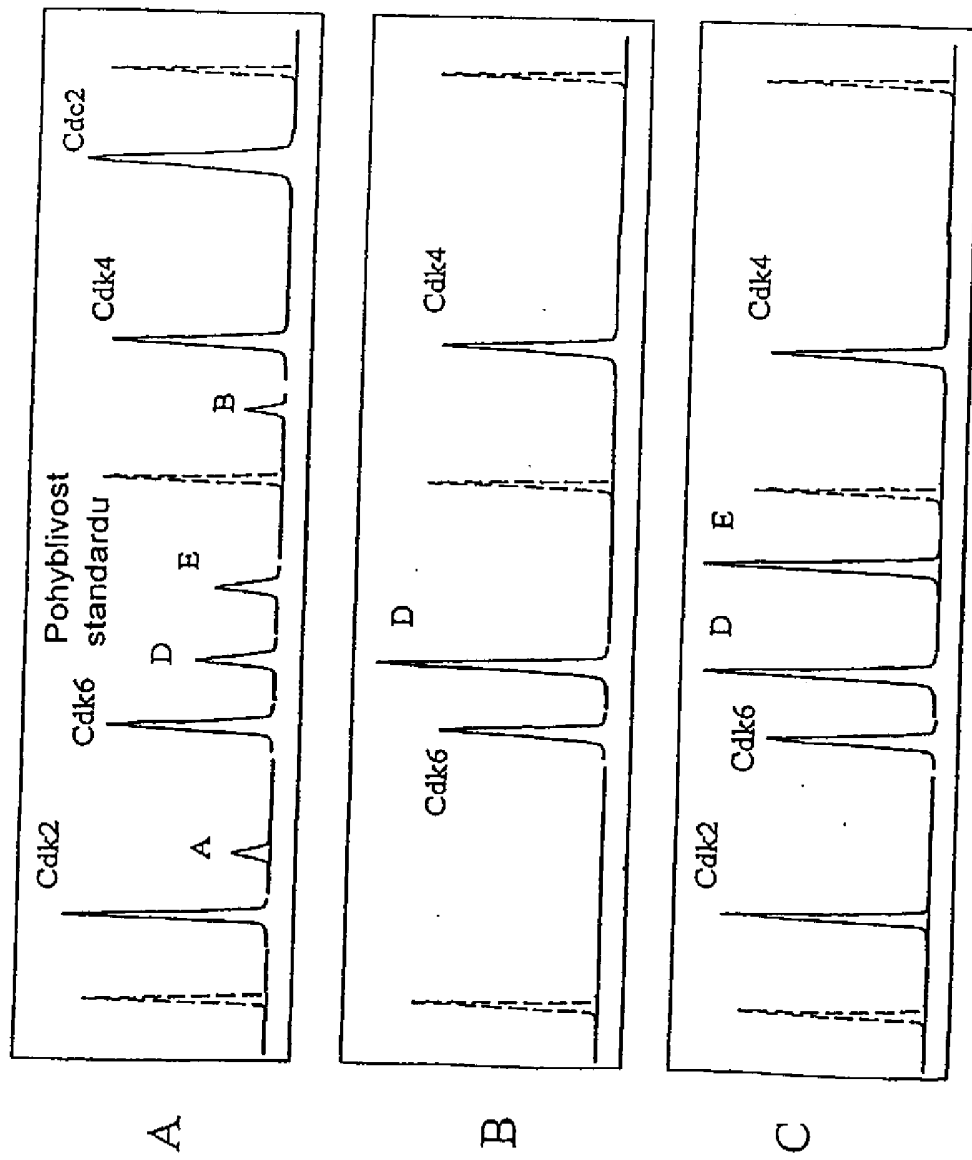
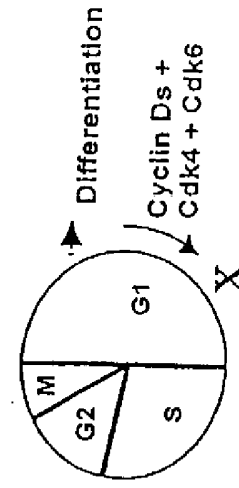


Figure 9

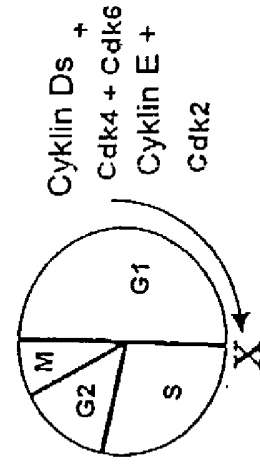


Kontrolní buňky

Zastavení rané G1 léčivem Orphan



Zastavení pozdní G1 léčivem Orphan



11/54

Thiazol štěpitelná vazba

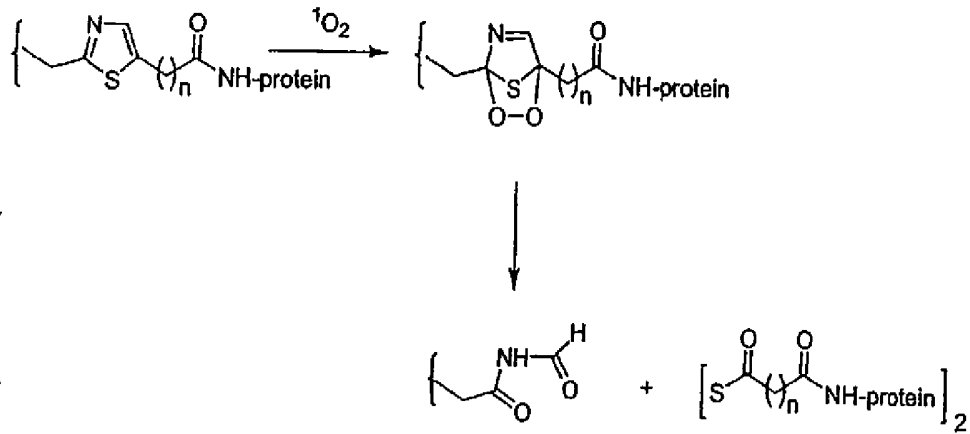


Fig. 10A

Oxazol štěpitelná vazba

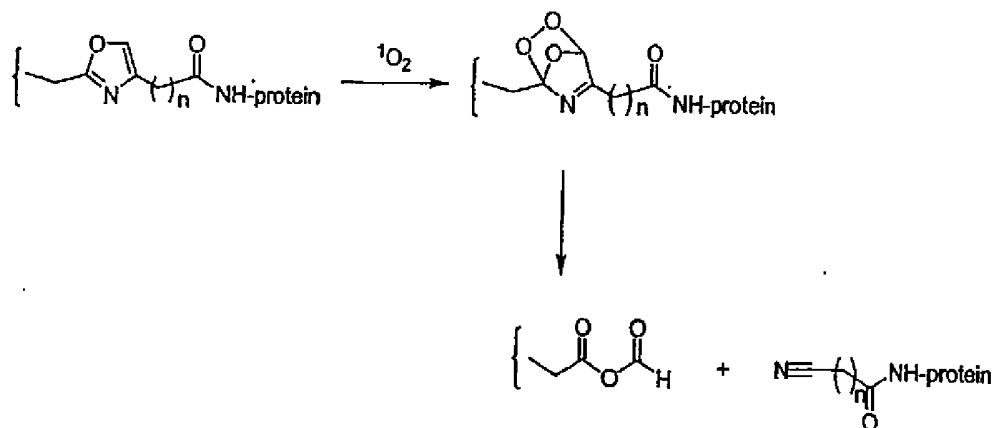


Fig. 10B

Olefin štěpitelná vazba 12/54

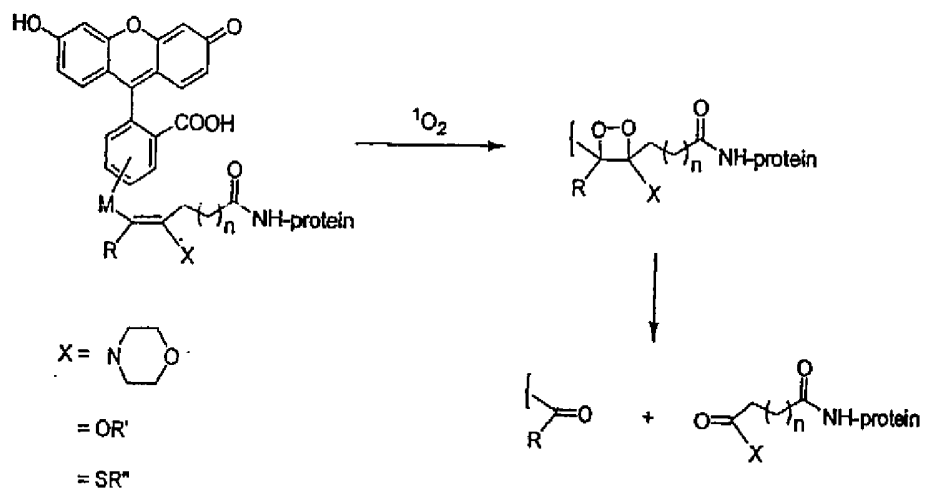
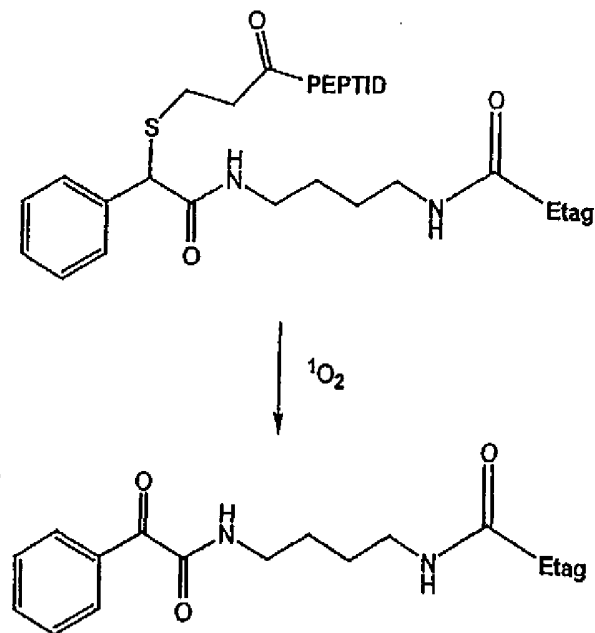


Fig. 10C

Thioether štěpitelná vazba



eTag = e-indikátor

Fig. 10D

13/54

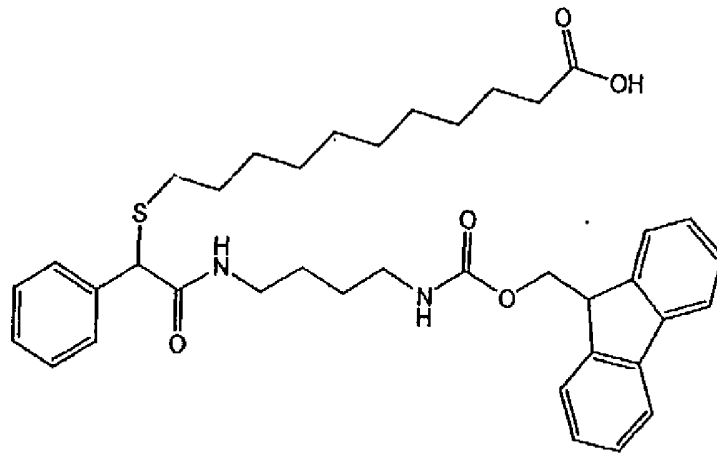


Fig. 10E

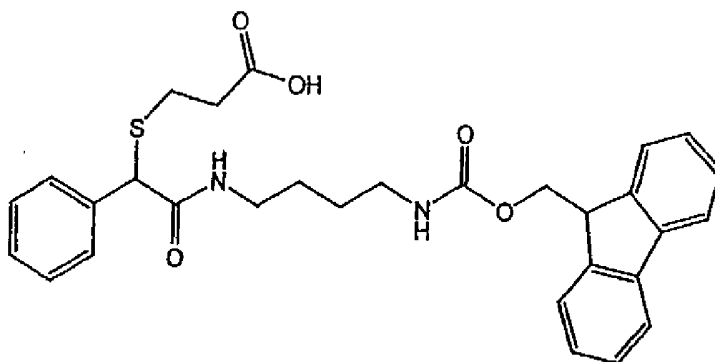


Fig. 10F

Figure 11

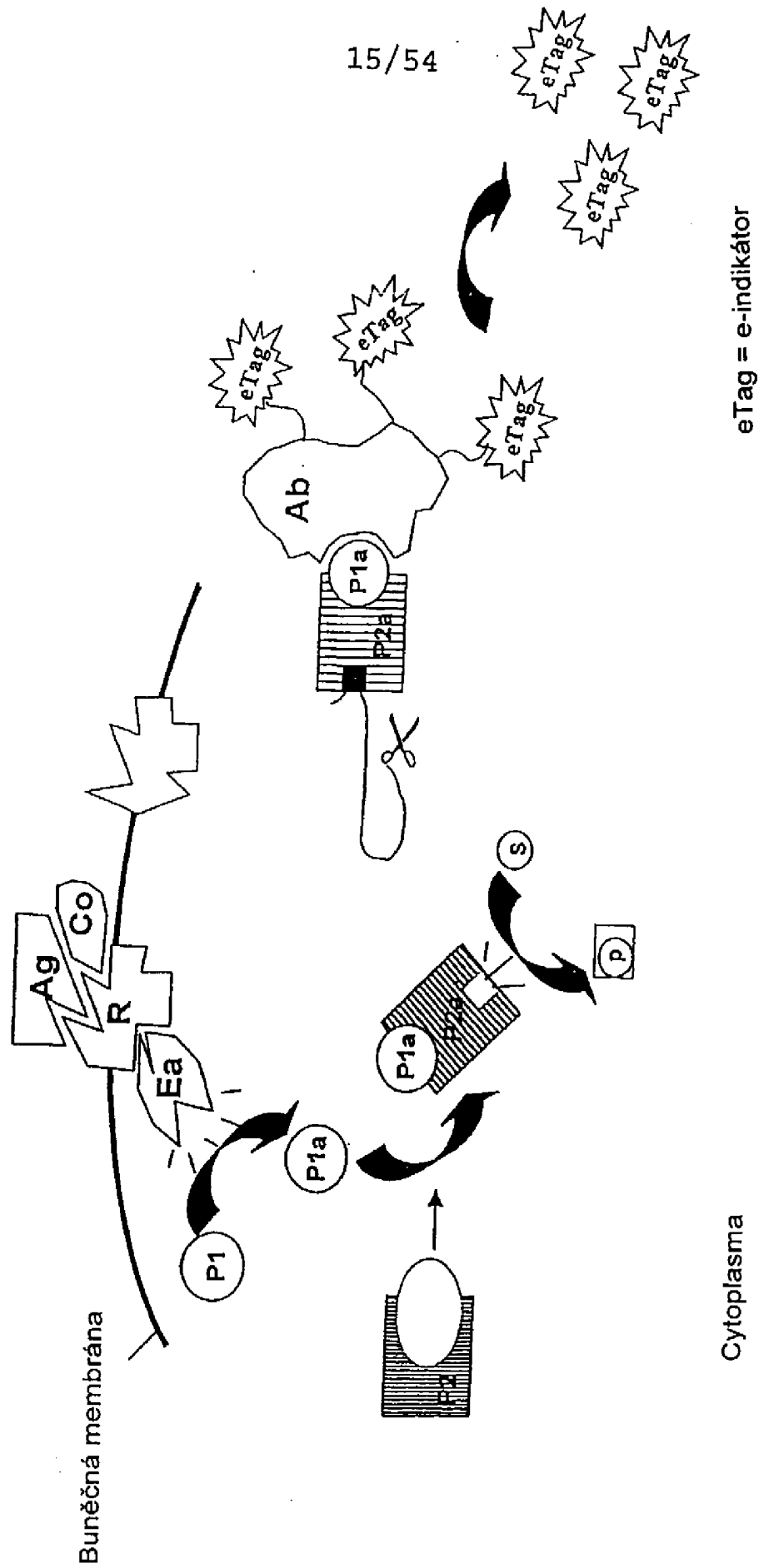
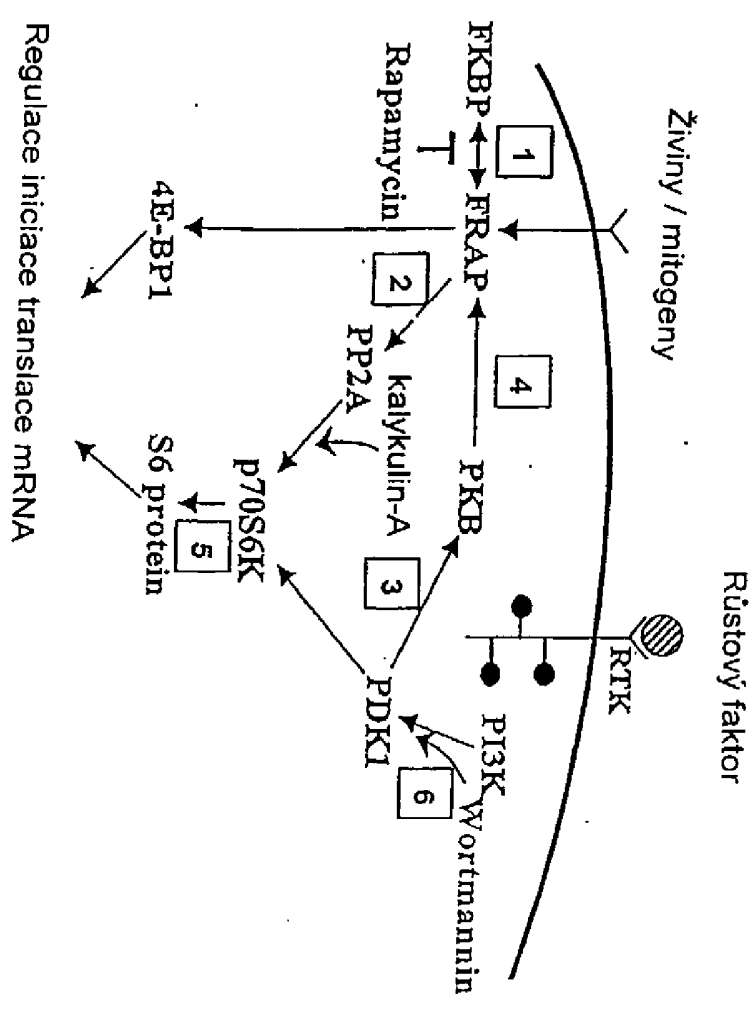
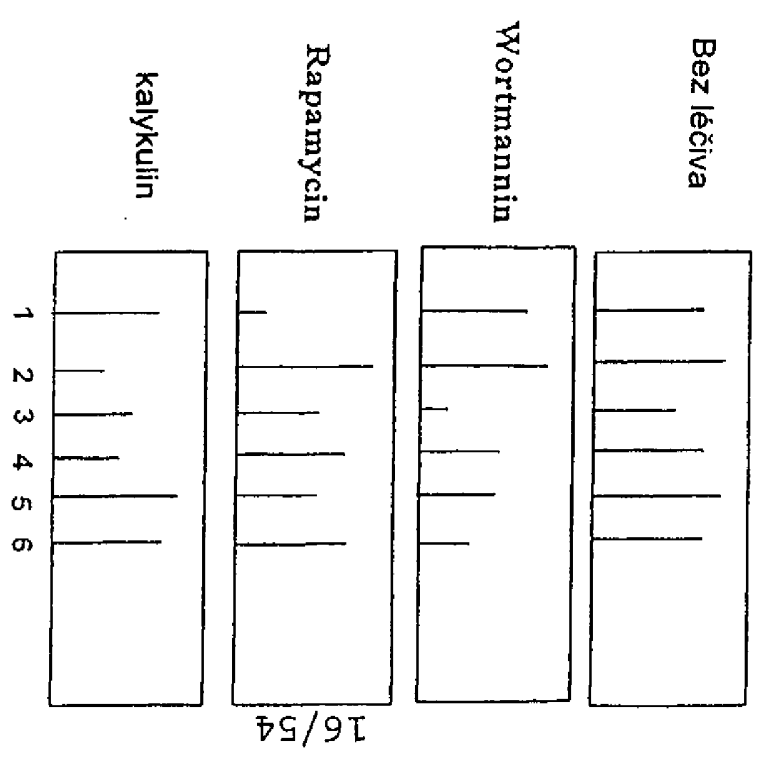


Figure 13



A

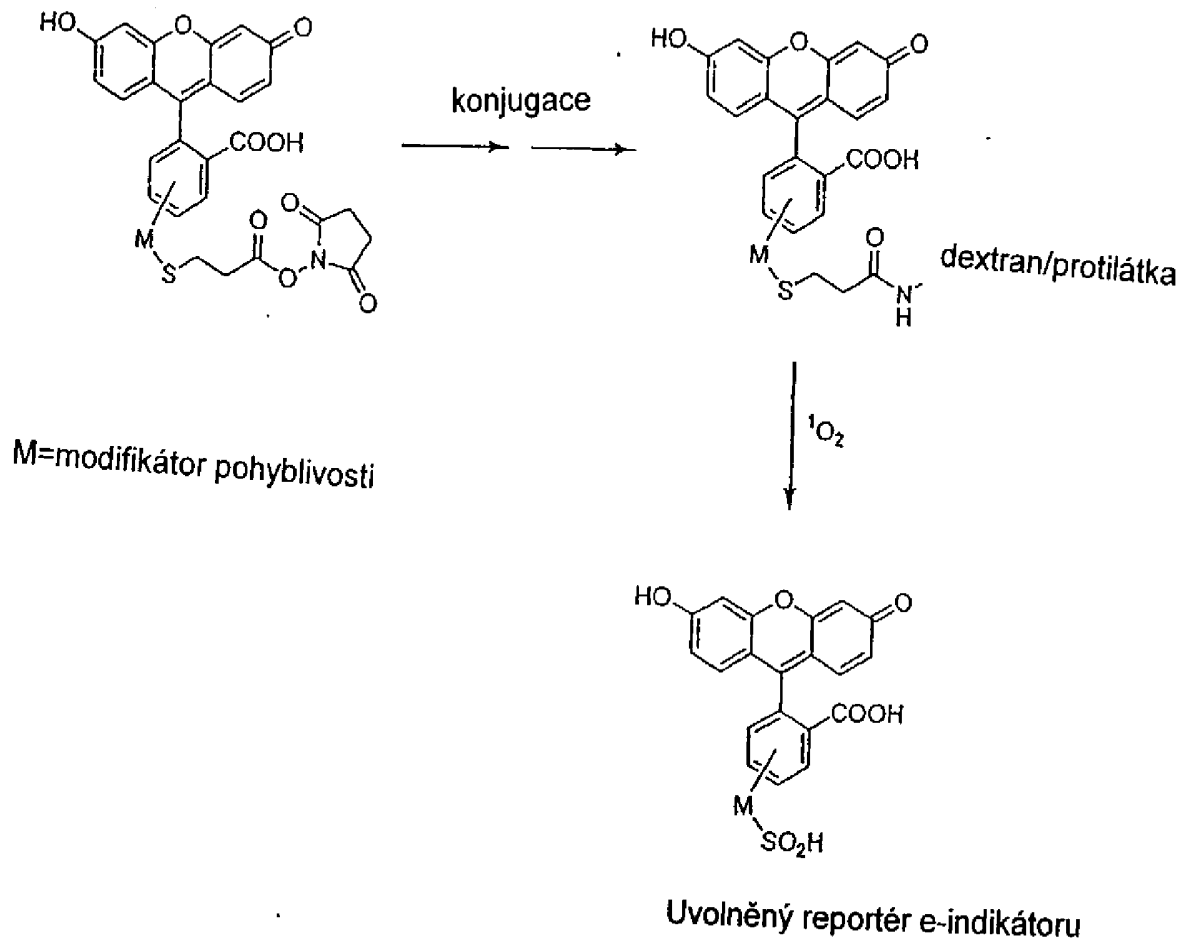
Multiplexní rozbor s použitím e-indikátoru



B

17/54

Figure 14A



18/54

Syntéza FAM-derivovaného e-indikátoru

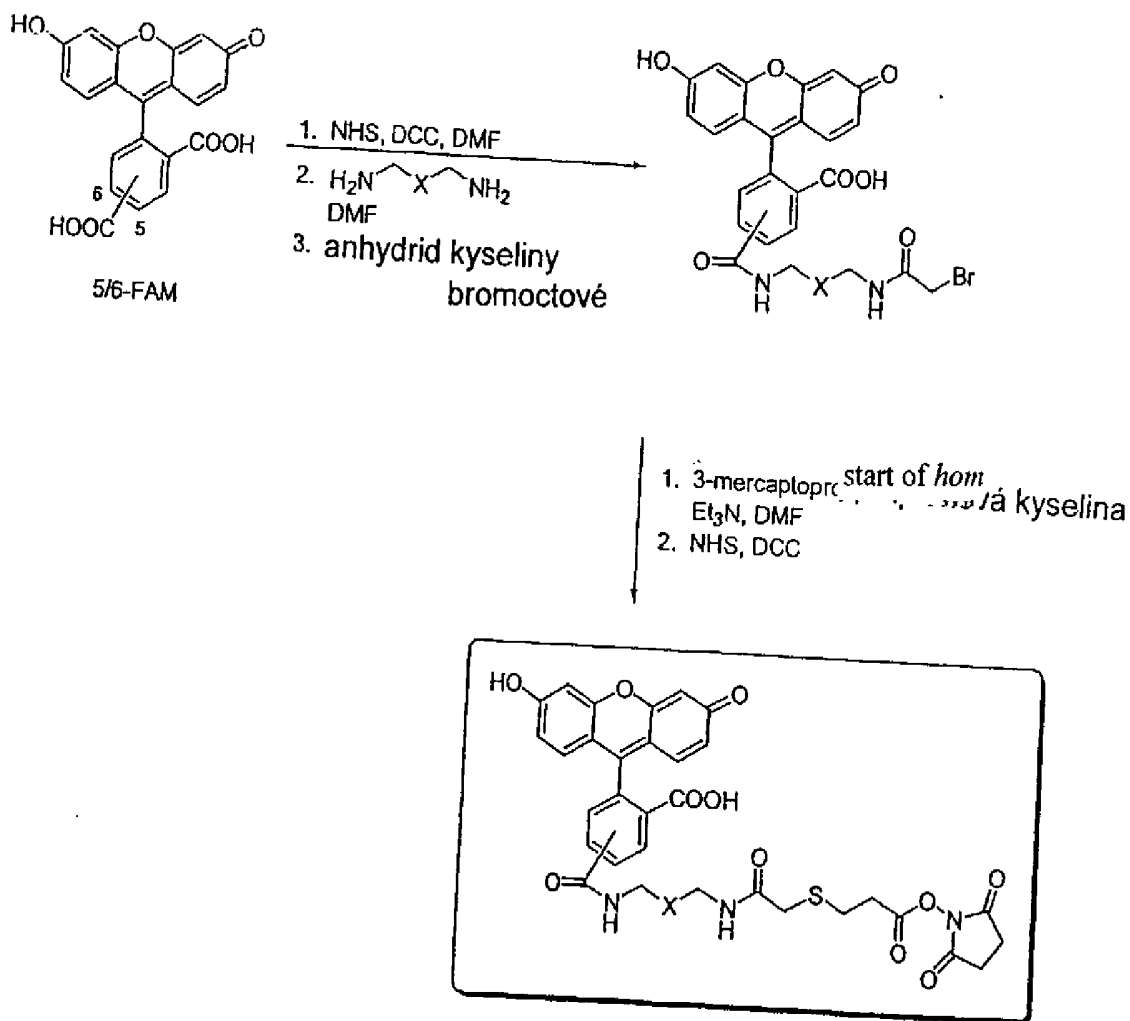
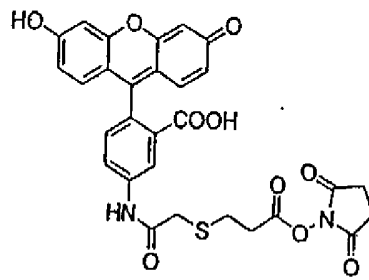
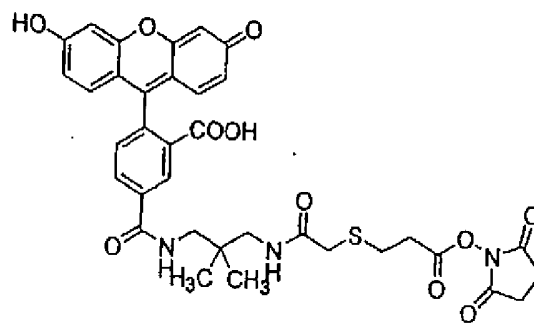


Fig. 14B

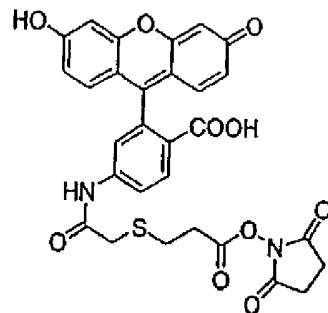
19/54



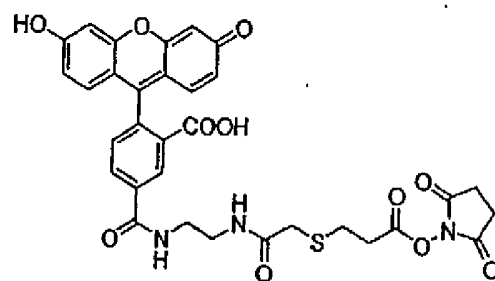
Pro1-NHS



Pro2-NHS



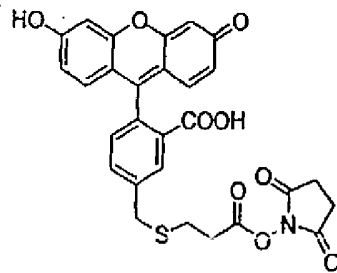
Pro3-NHS



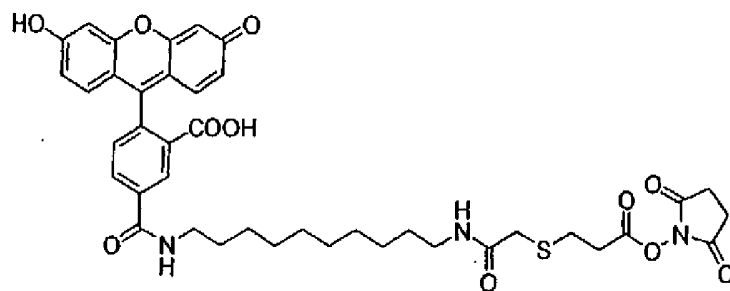
Pro4-NHS

Fig. 15A

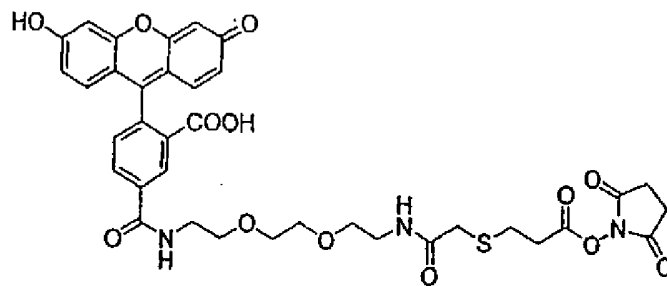
20/54



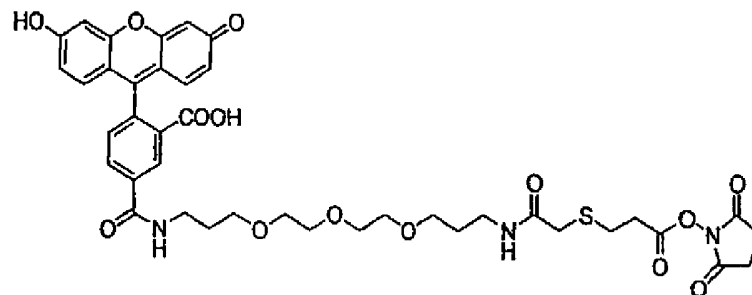
Pro5-NHS



Pro6-NHS



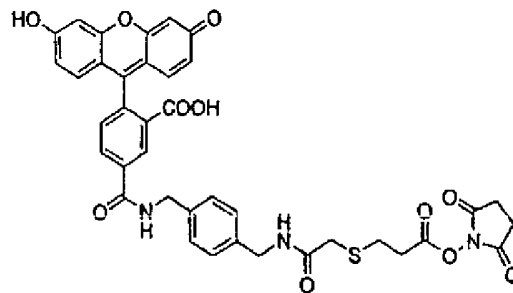
Pro7-NHS



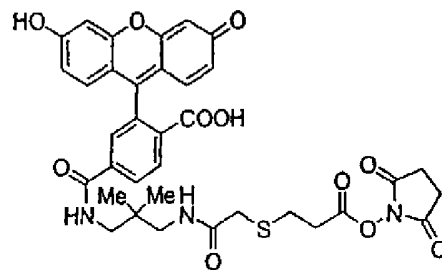
Pro8-NHS

Fig. 15B

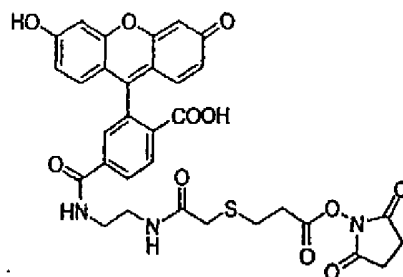
21/54



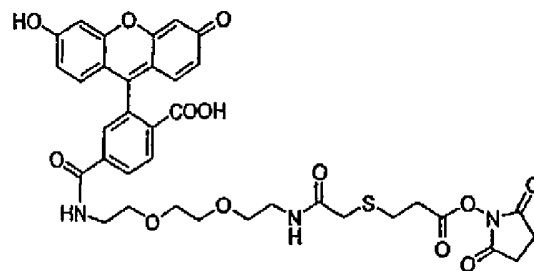
Pro9-NHS



Pro10-NHS



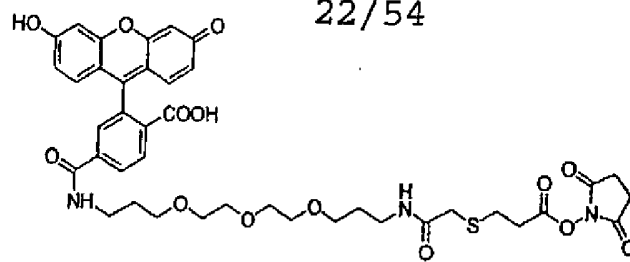
Pro11-NHS



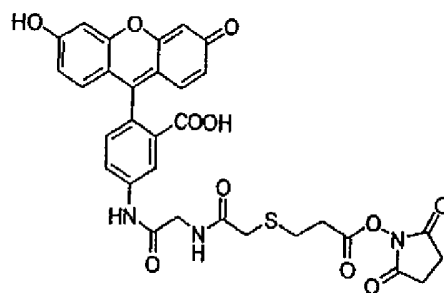
Pro12-NHS

Fig. 15C

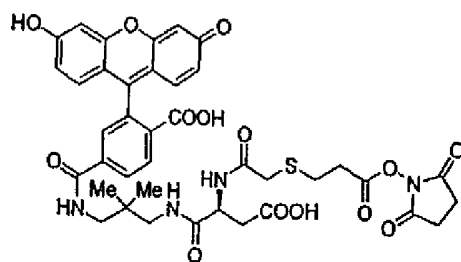
22/54



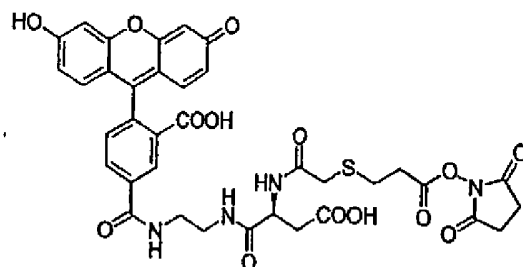
Pro13-NHS



Pro14-NHS



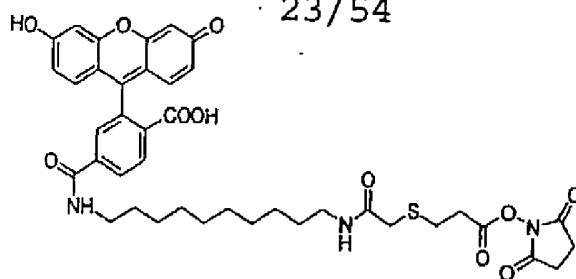
Pro15-NHS



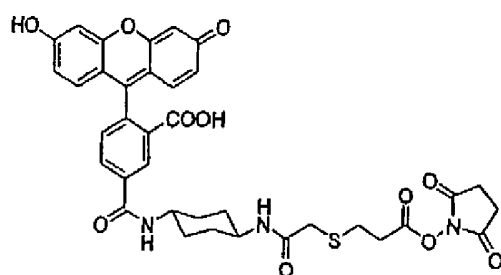
Pro16-NHS

Fig. 15D

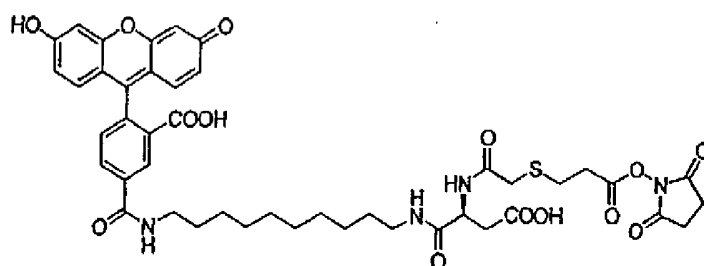
23/54



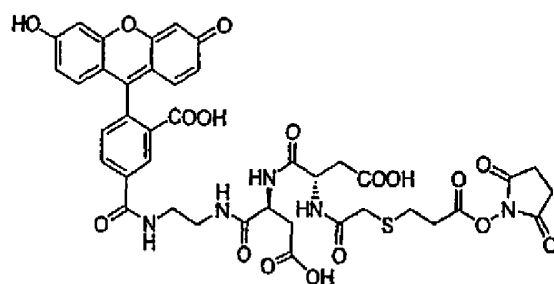
Pro17-NHS



Pro18-NHS



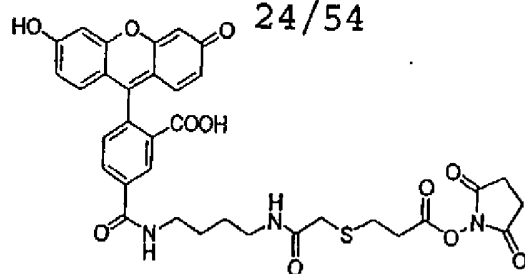
Pro19-NHS



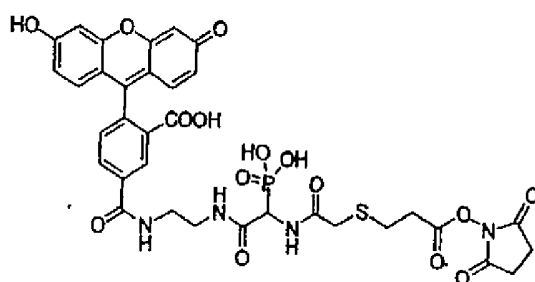
Pro20-NHS

Fig. 15E

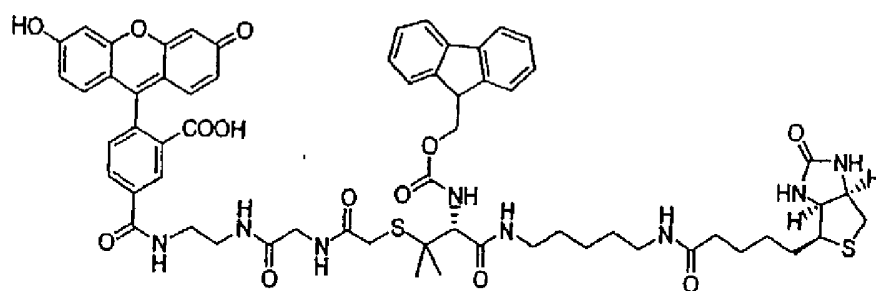
24/54



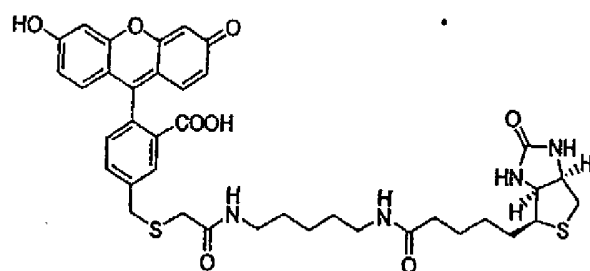
Pro21-NHS



Pro22-NHS



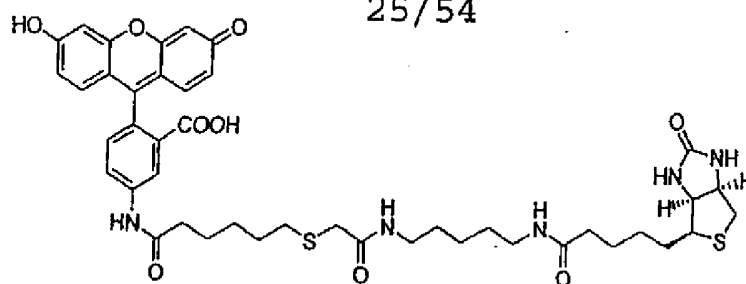
Pro23-biotin



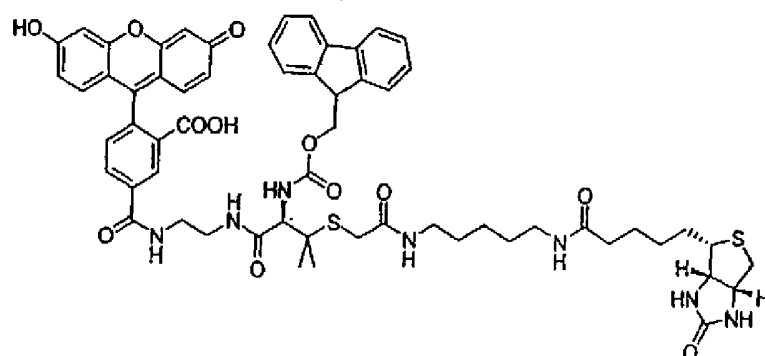
Pro24-biotin

Fig. 15F

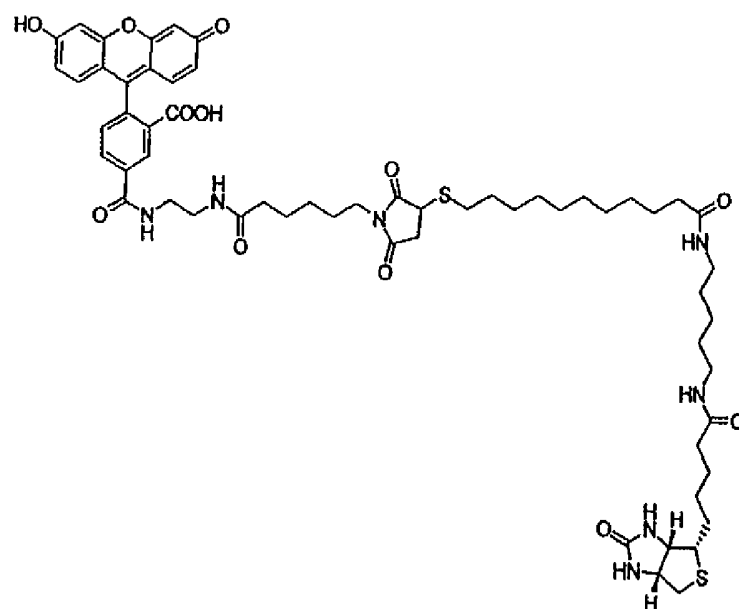
25/54



Pro25-biotin

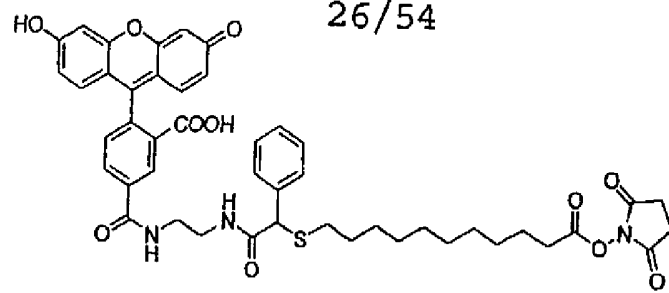


Pro26-biotin

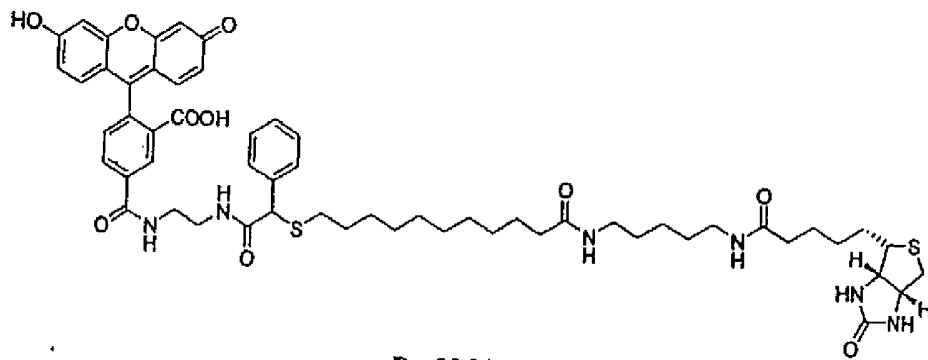


Pro27-biotin

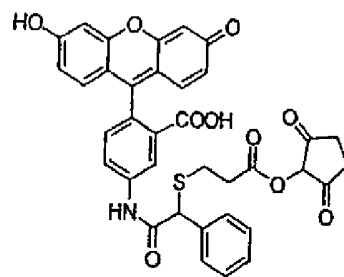
Fig. 15G



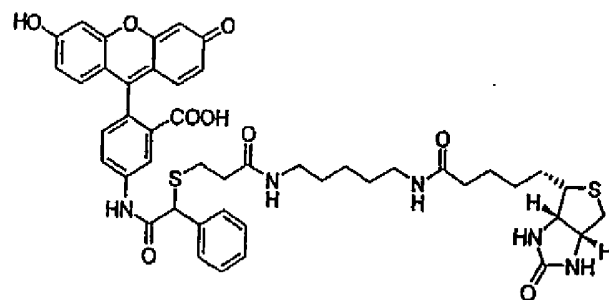
Pro28-NHS



Pro28-biotin

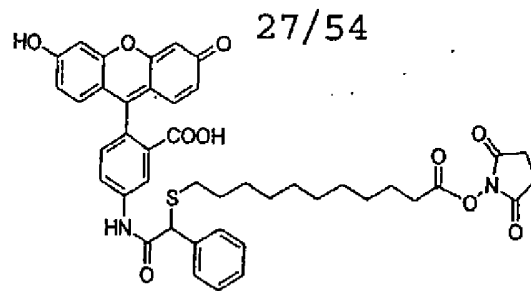


Pro29-NHS

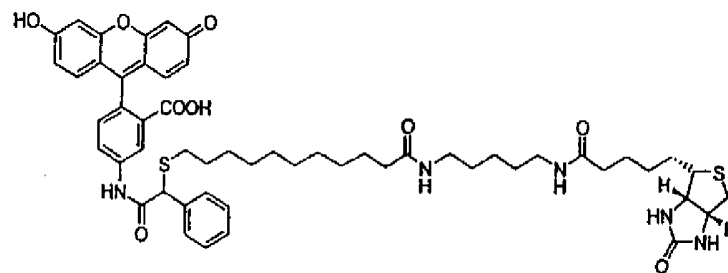


Pro29-biotin

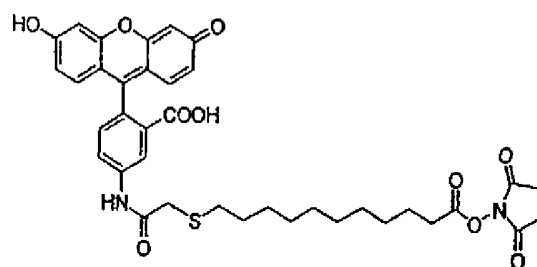
Fig. 15H



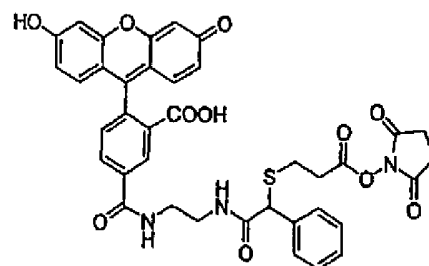
Pro30-NHS



Pro30-biotin



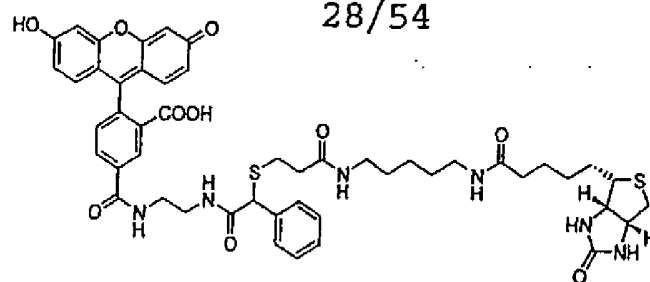
Pro31-NHS



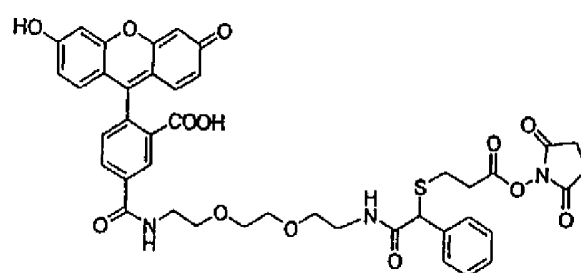
Pro32-NHS

Fig. 15I

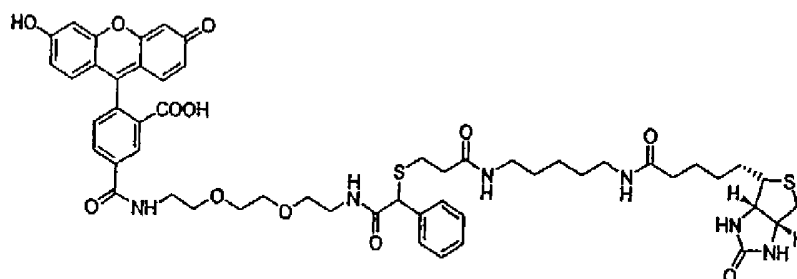
28/54



Pro32-biotin



Pro33-NHS

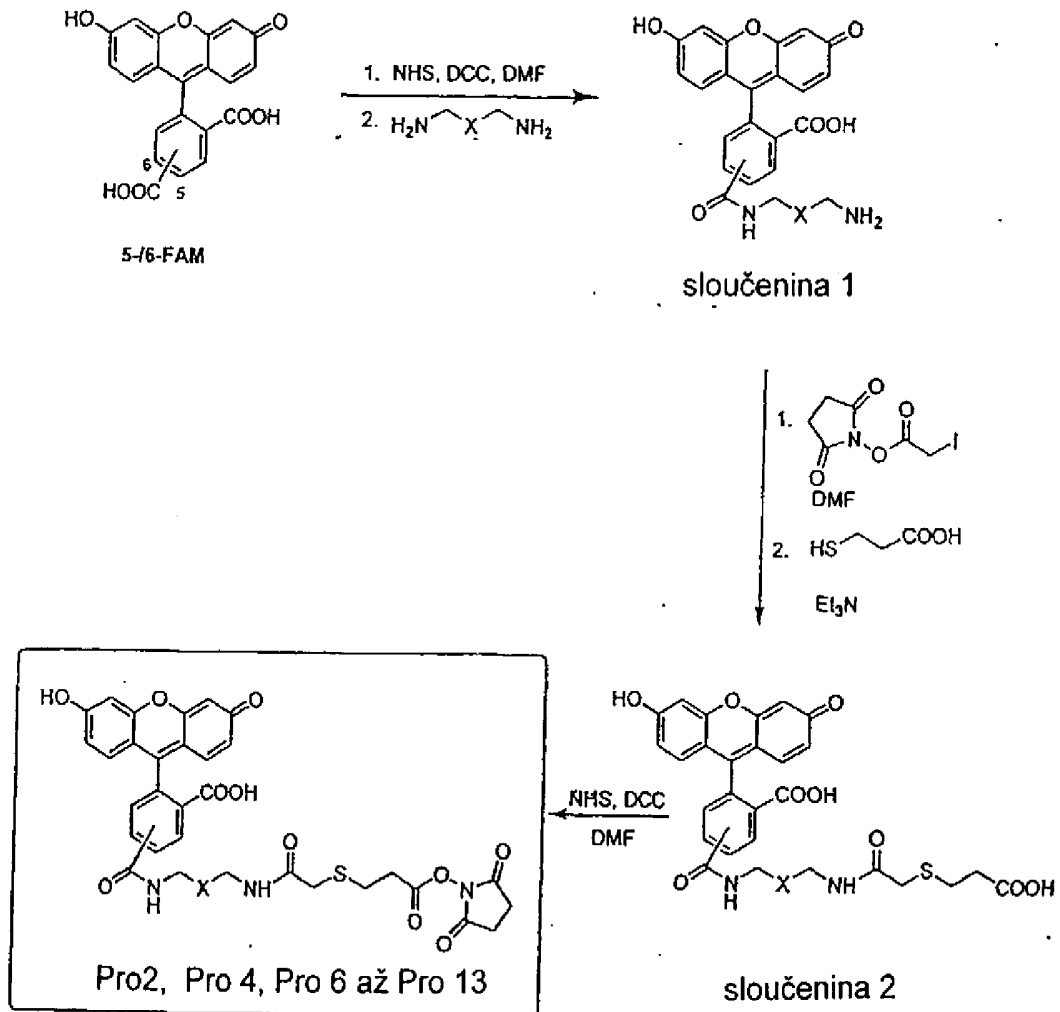


Pro33-biotin

Fig. 15J

29/54

Figure 16A



30/54

Figure 16B

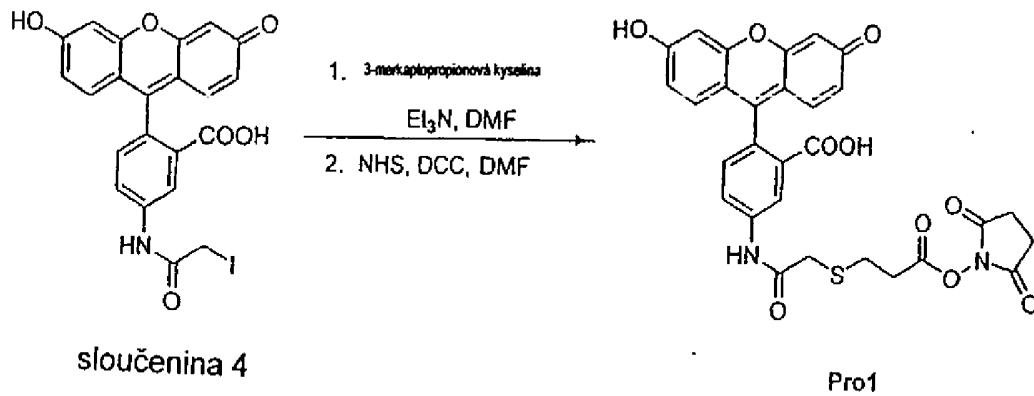


Figure 16C

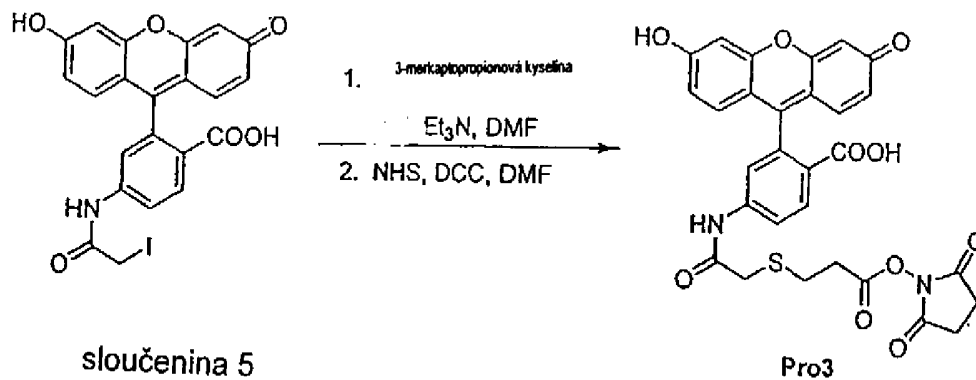
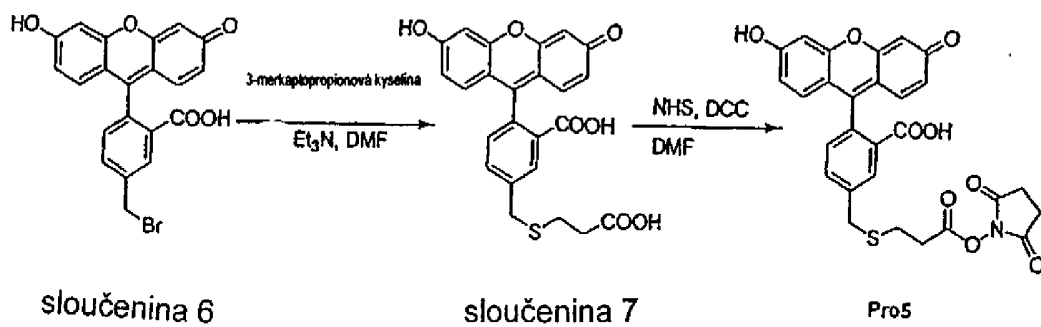
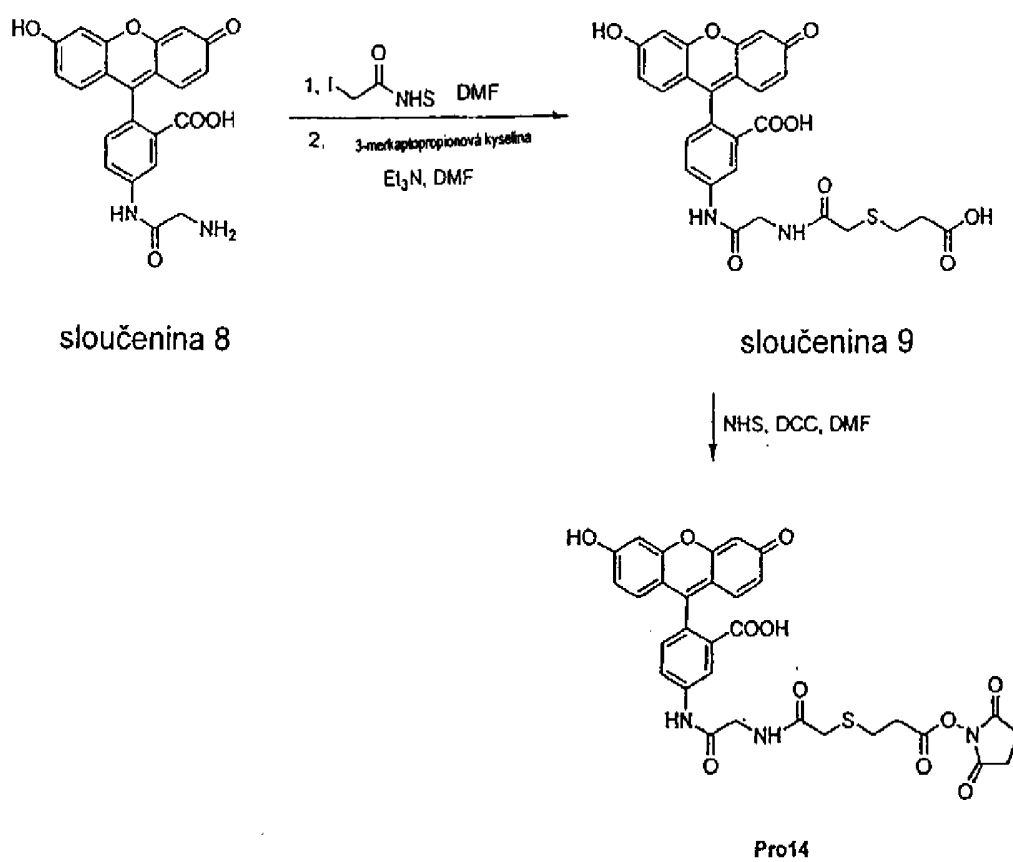


Figure 16D



31/54

Figure 16E



32/54

Syntéza Pro15

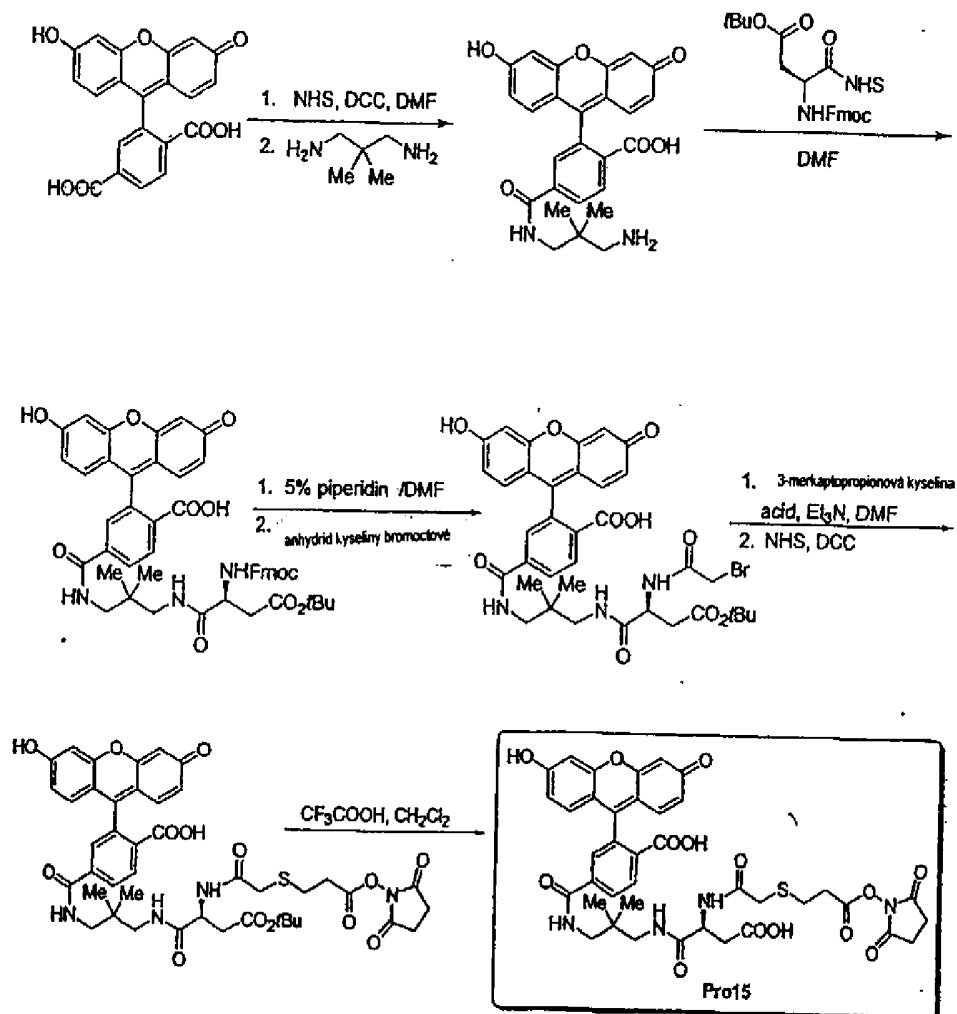


Fig. 16F

33/54

Syntéza Pro20

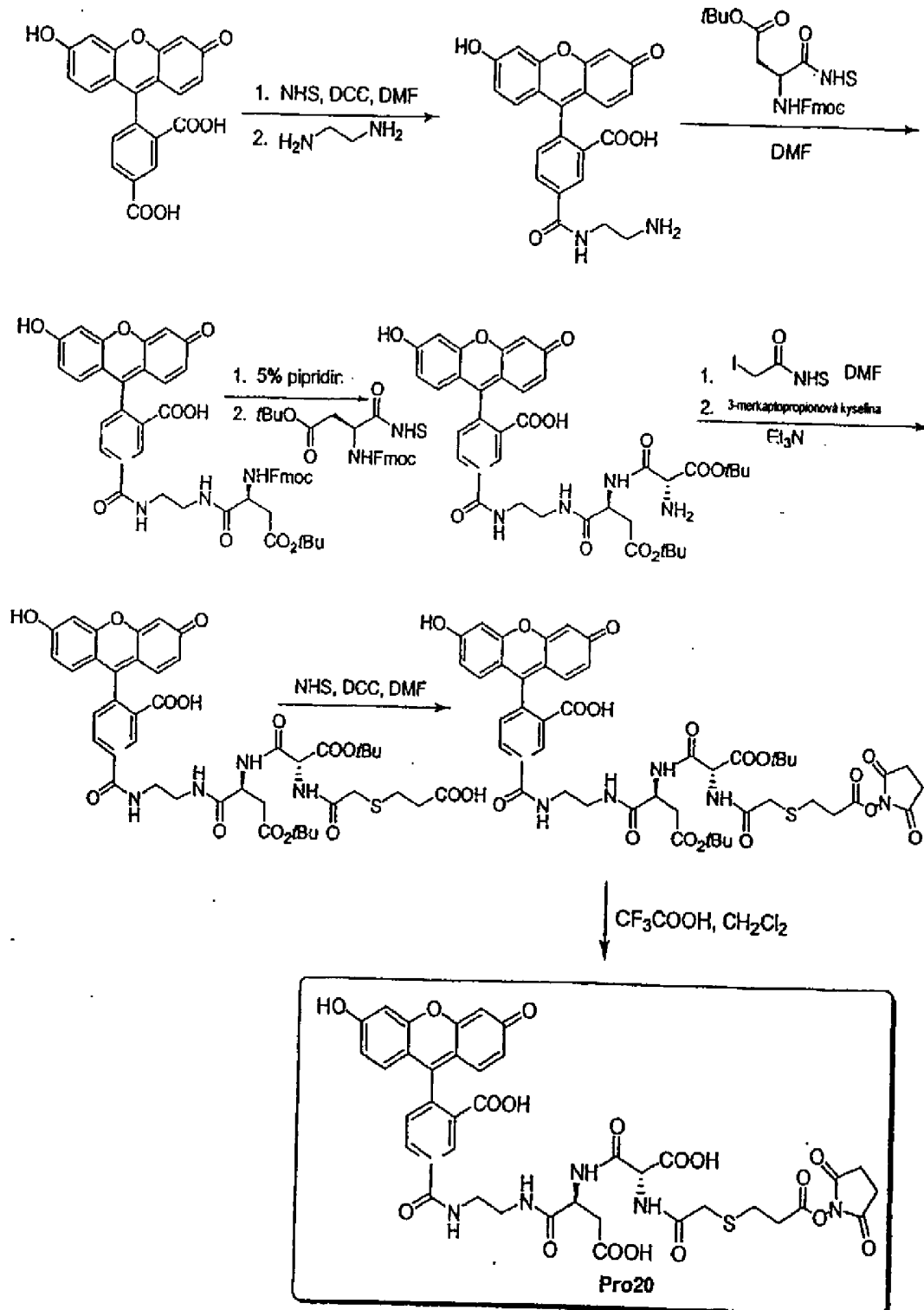


Fig. 16G

34/54

Syntéza Pro22

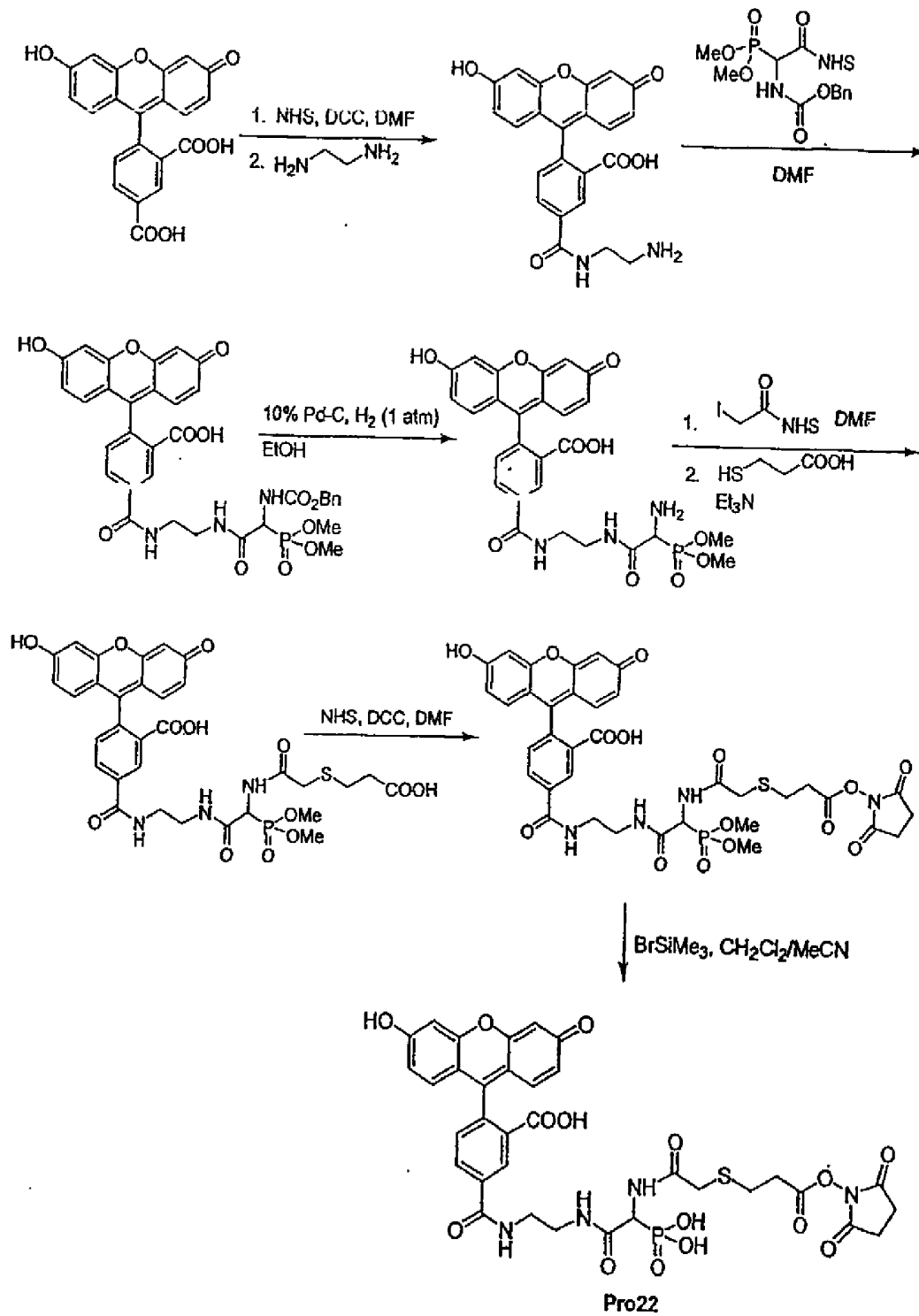


Fig. 16H

35/54

Syntéza Pro28

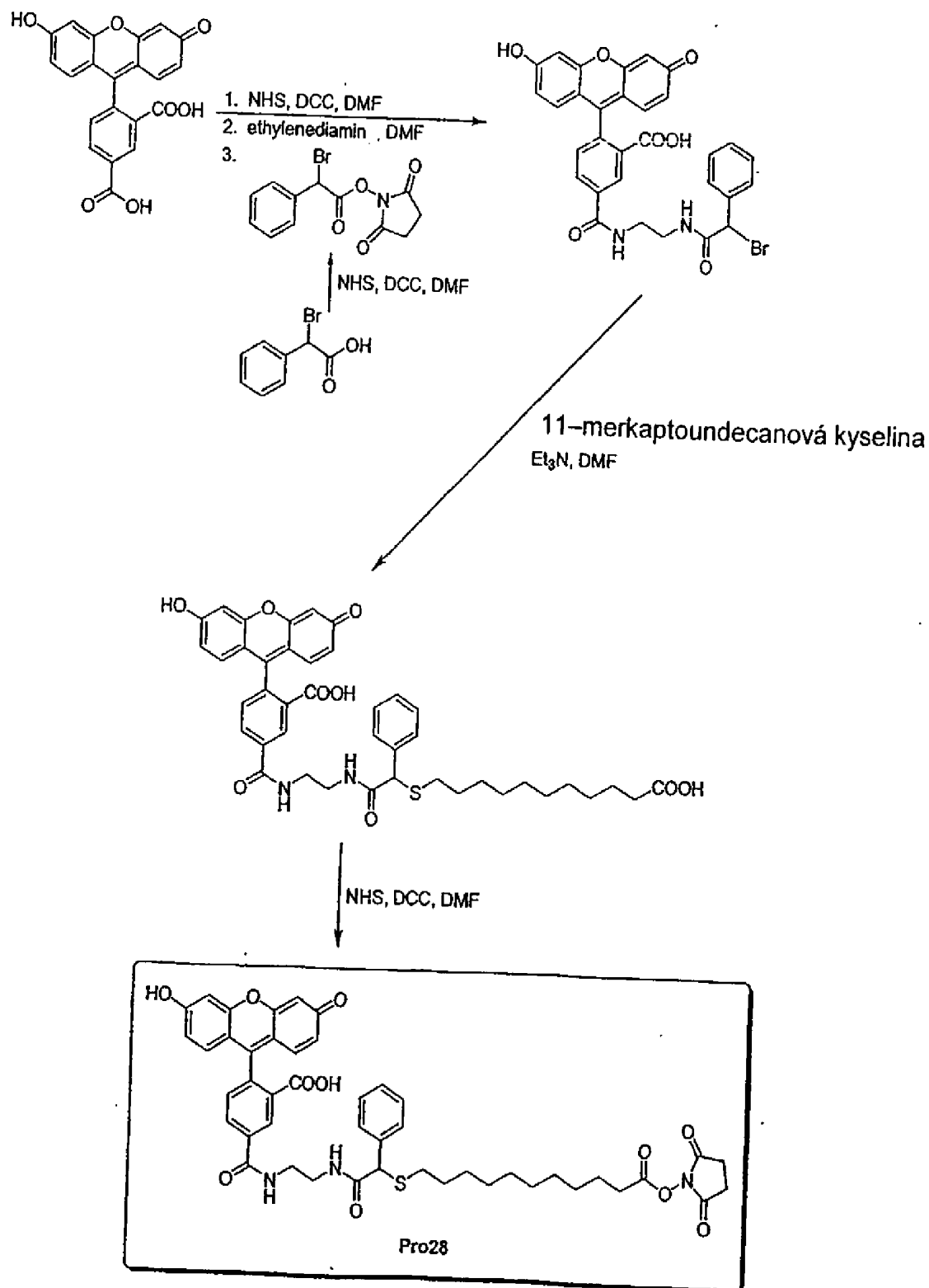


Fig. 16I

36/54

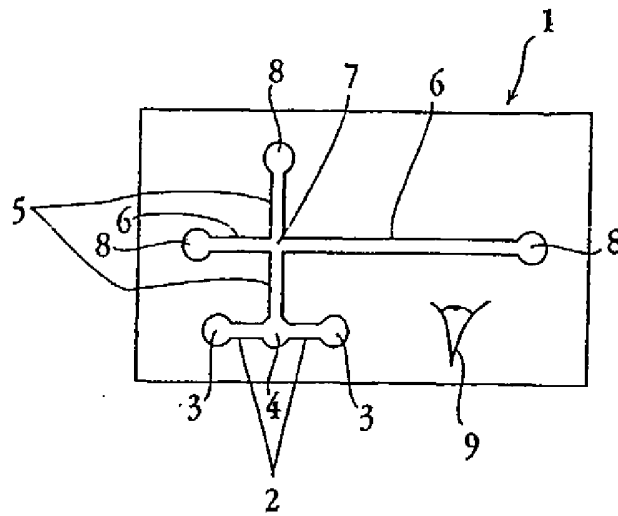


Fig. 17A

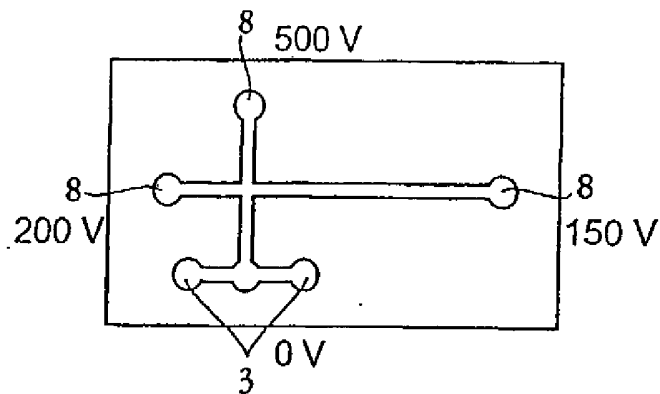


Fig. 17B

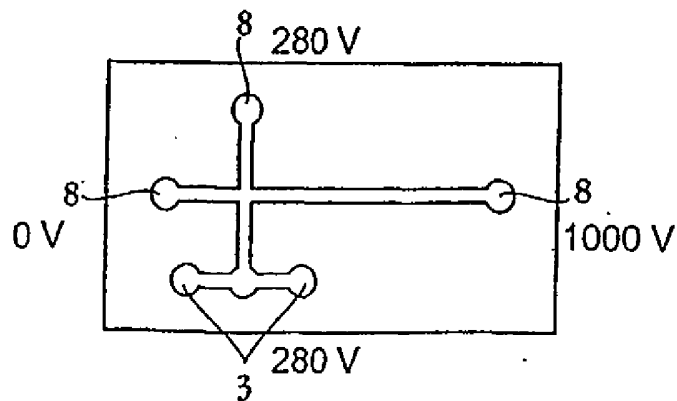
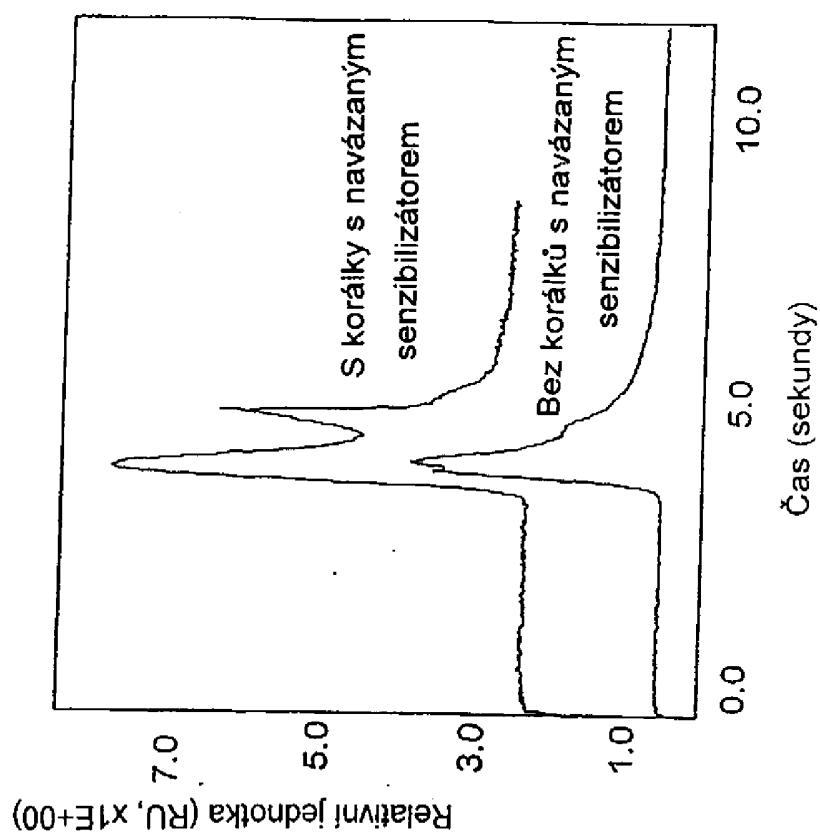


Fig. 17C

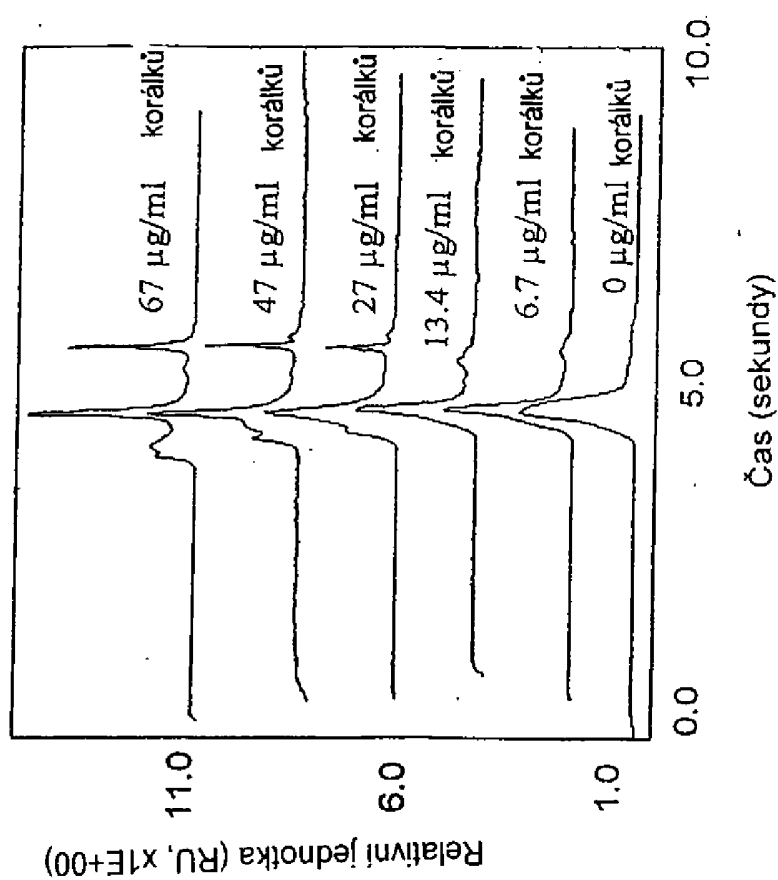
37/54

Figure 18



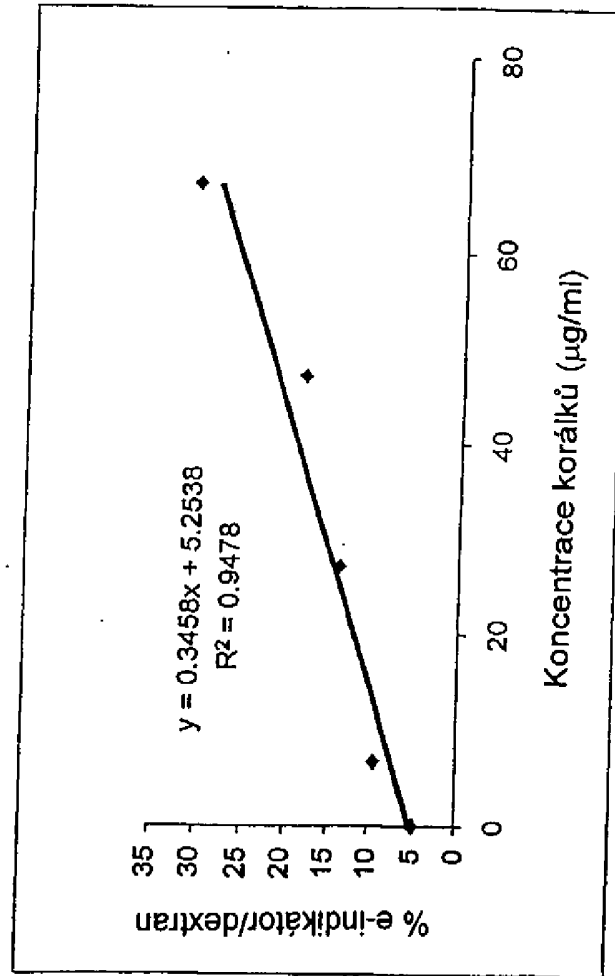
38/54

Figure 19



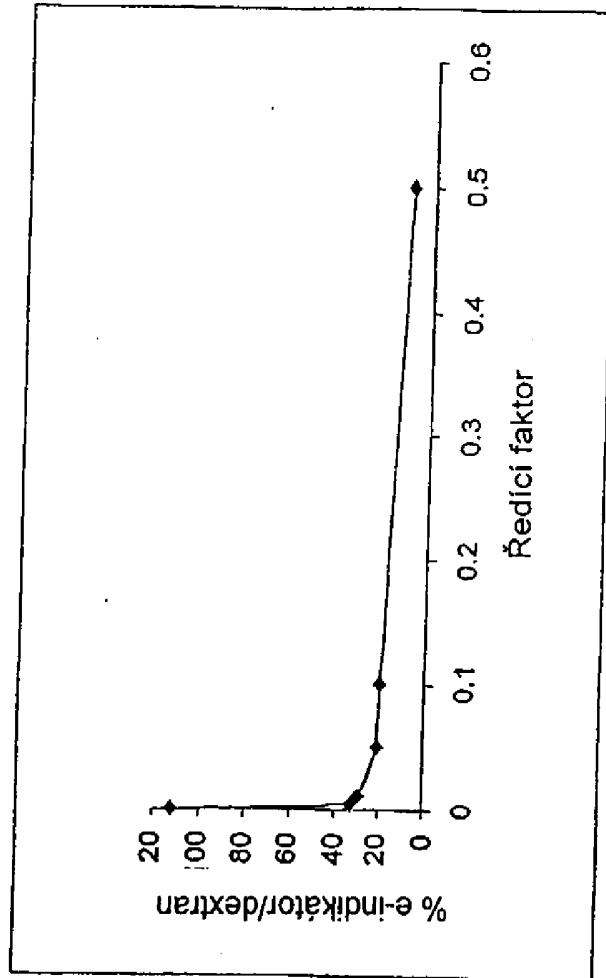
39/54

Figure 20



40/54

Figure 21



41/54

Figure 22

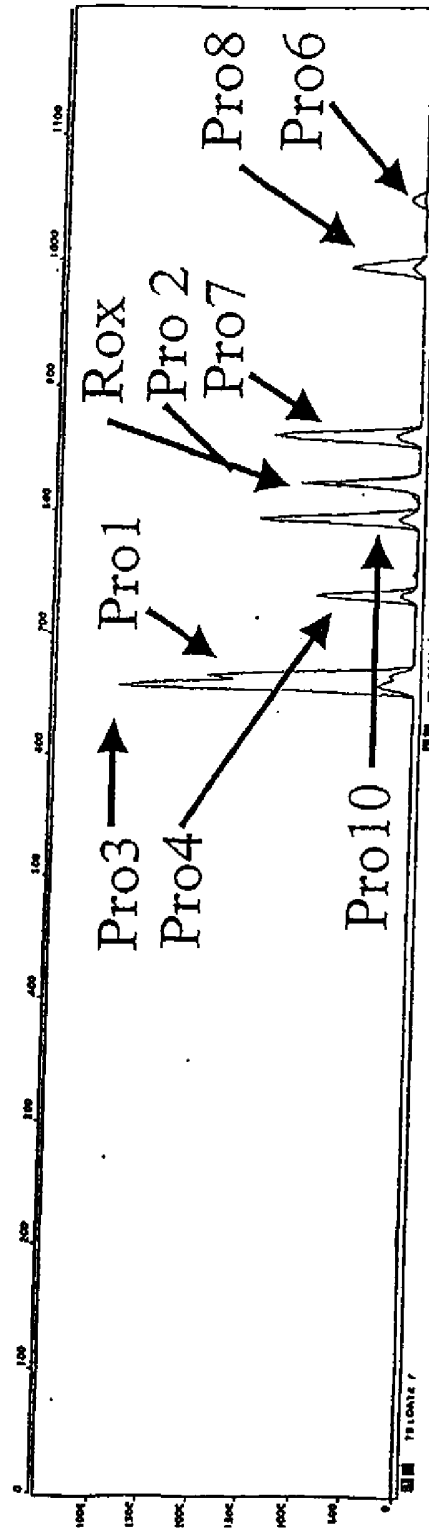
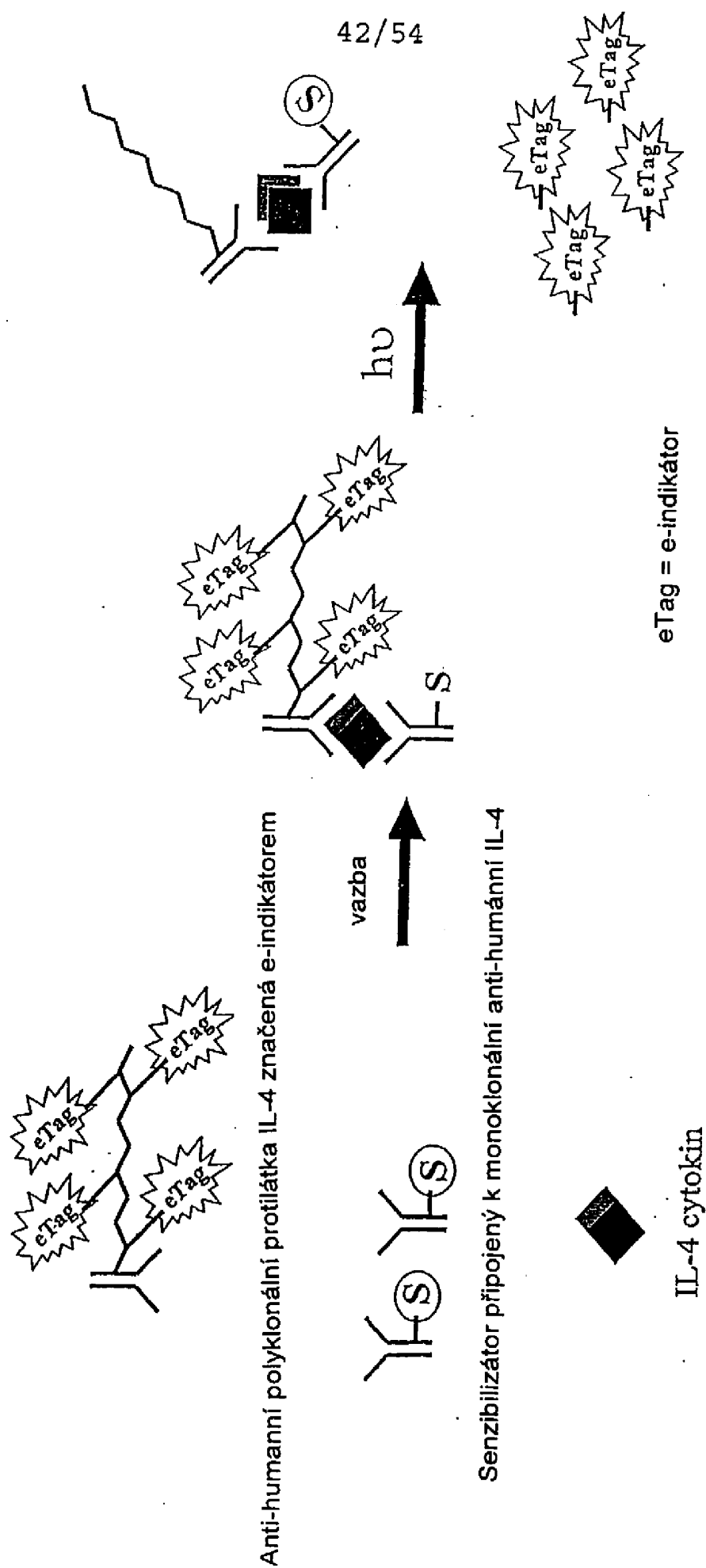
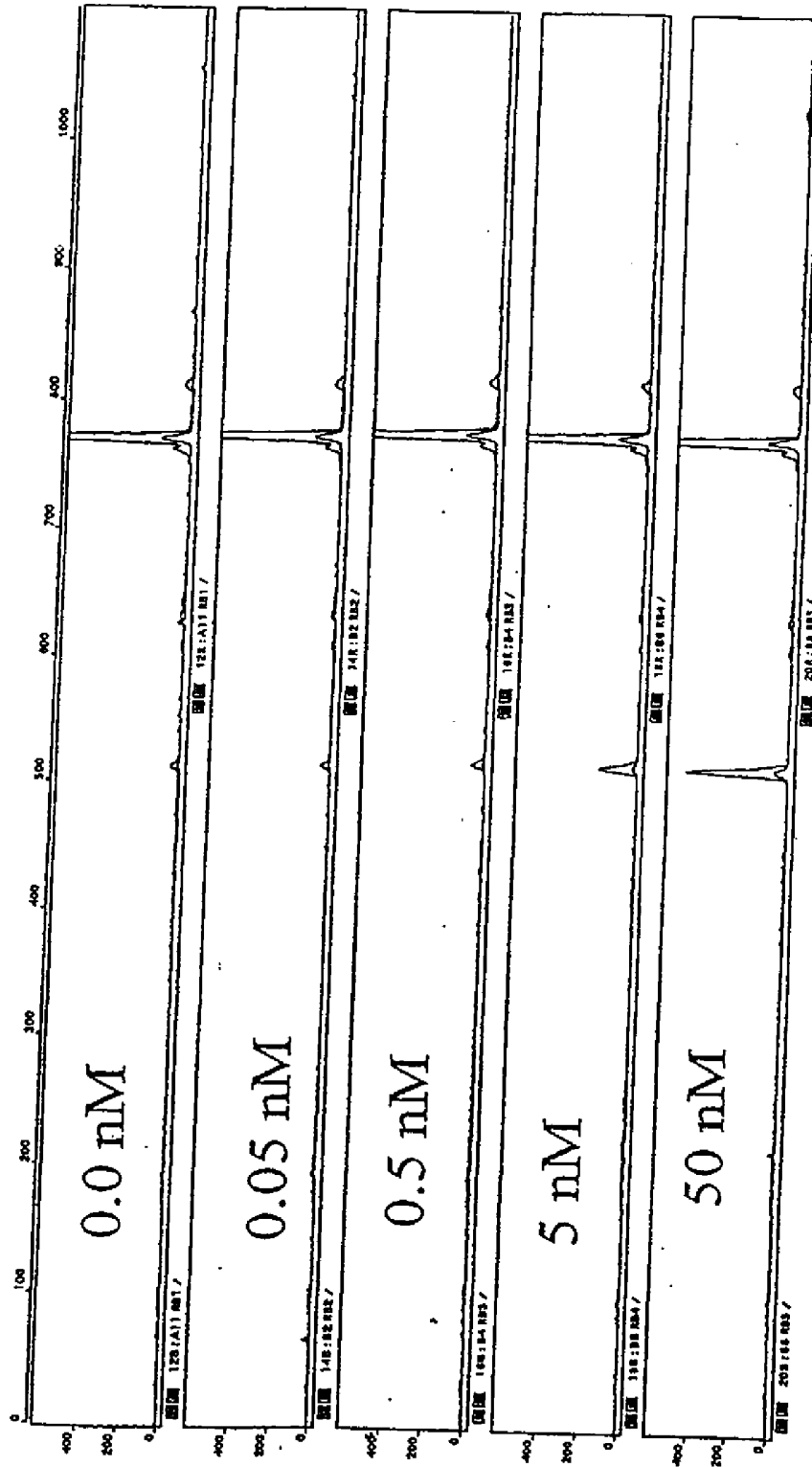


Figure 23



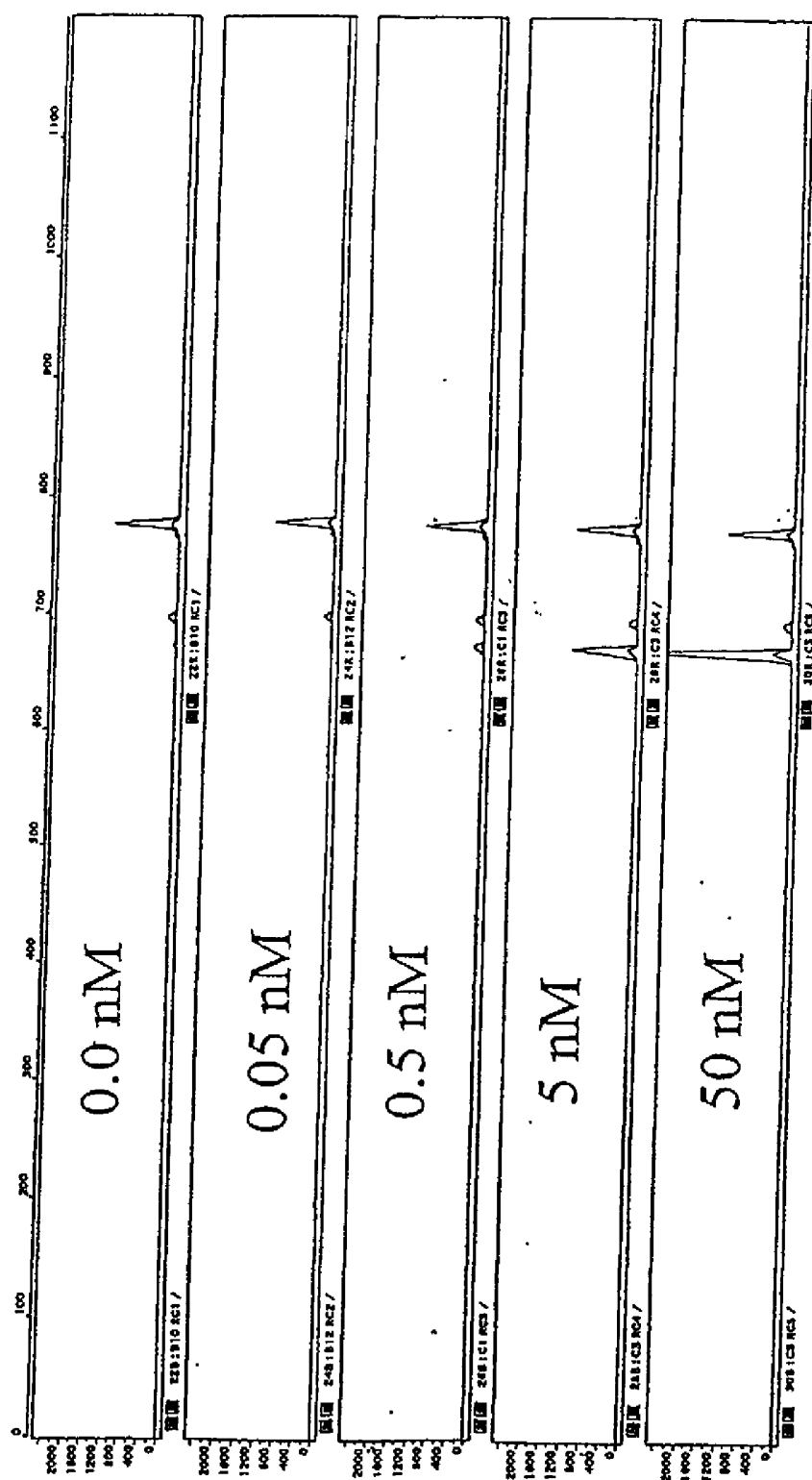
43/54

Figure 24



44/54

Figure 25



45/54

Figure 26

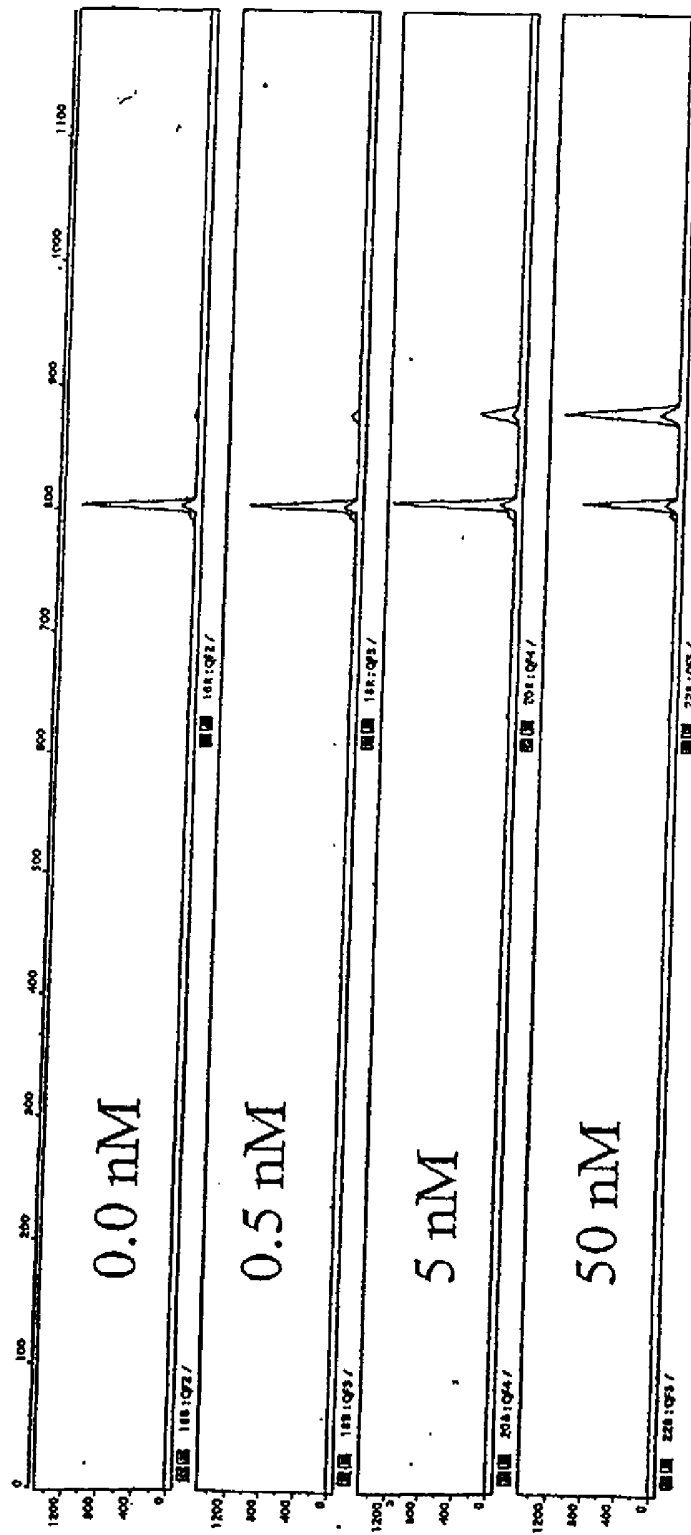
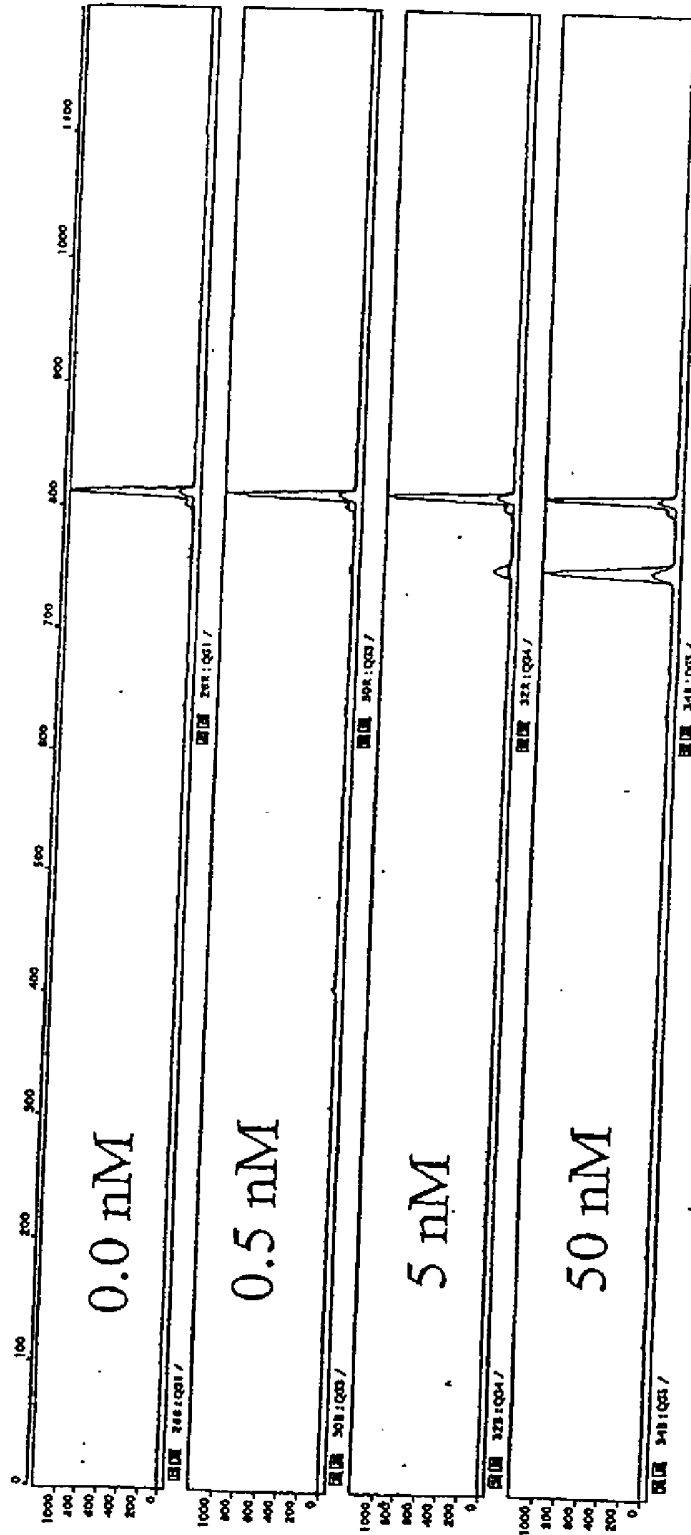
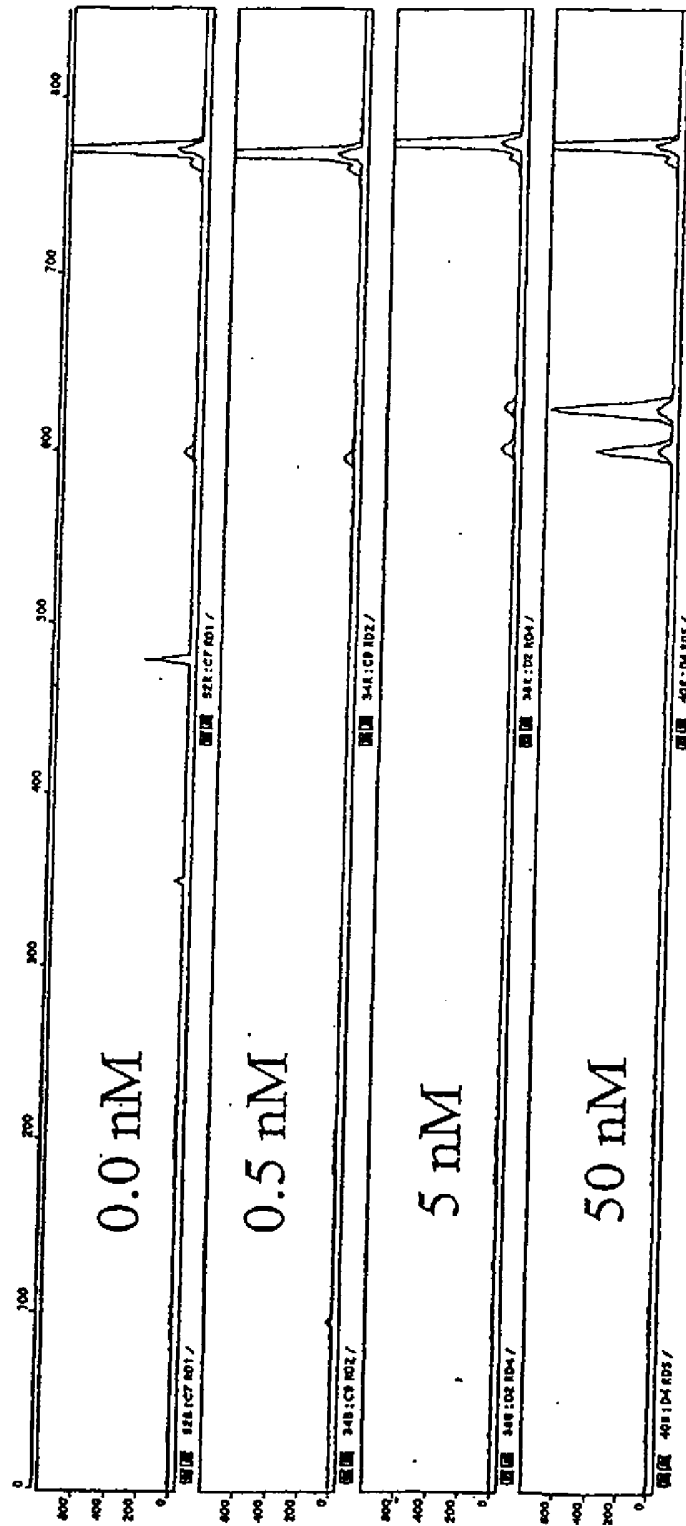


Figure 27



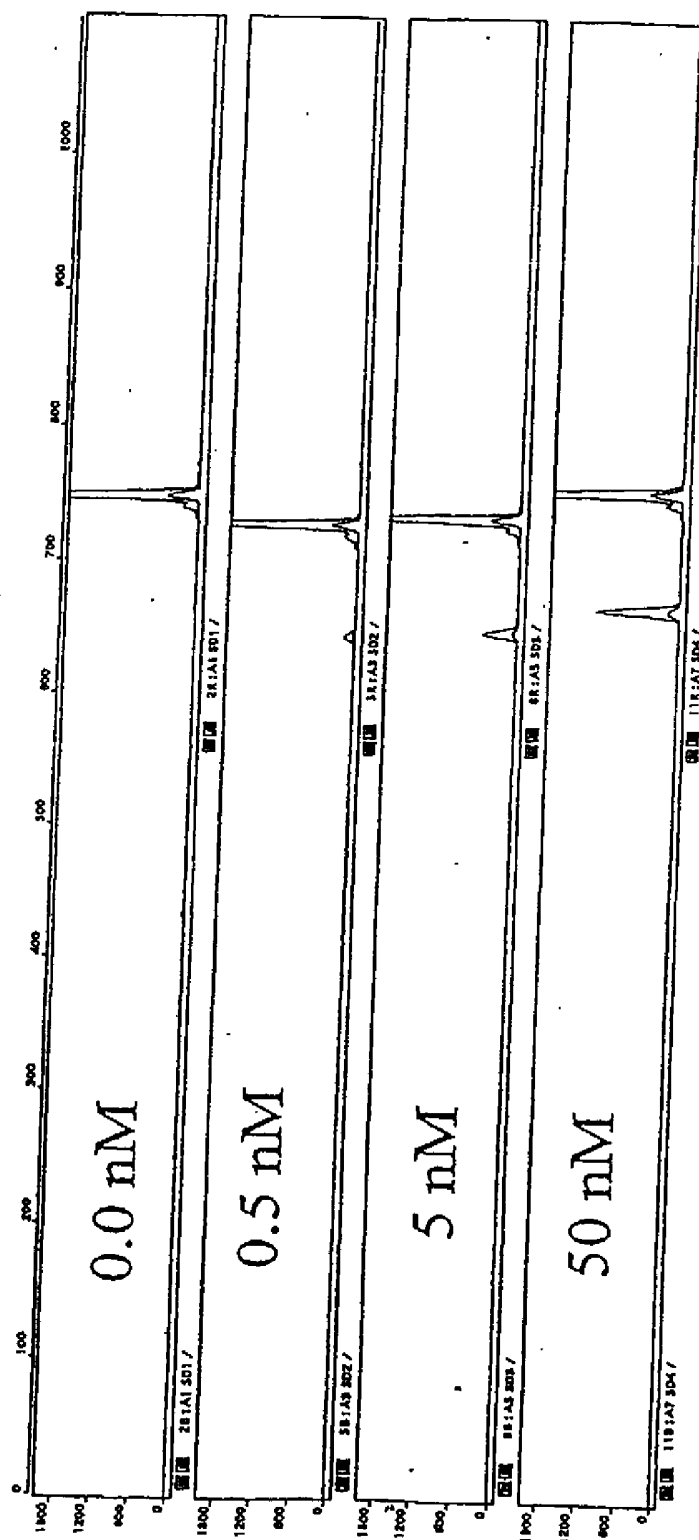
47/54

Figure 28



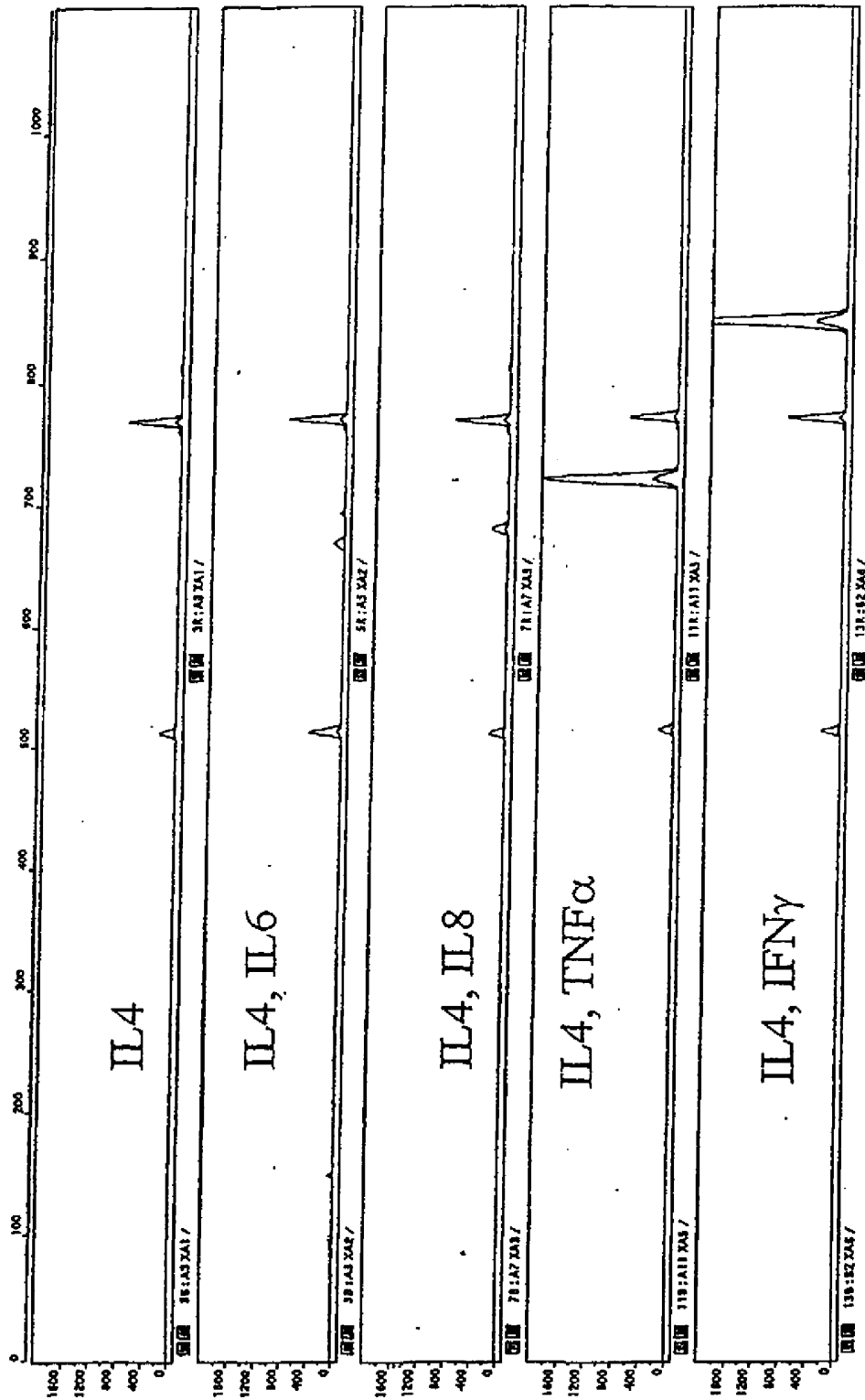
48/54

Figure 29



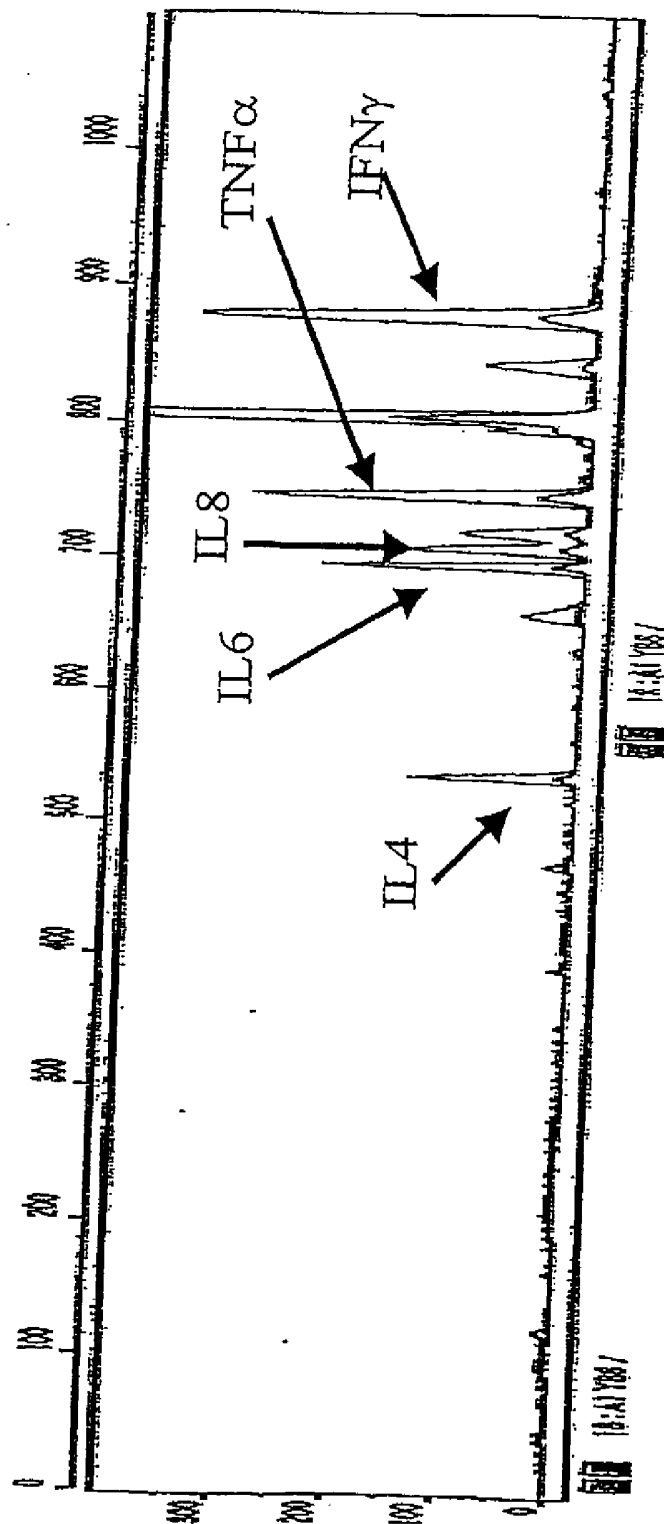
49/54

Figure 30



50/54

Figure 31



51/54

Figure 32

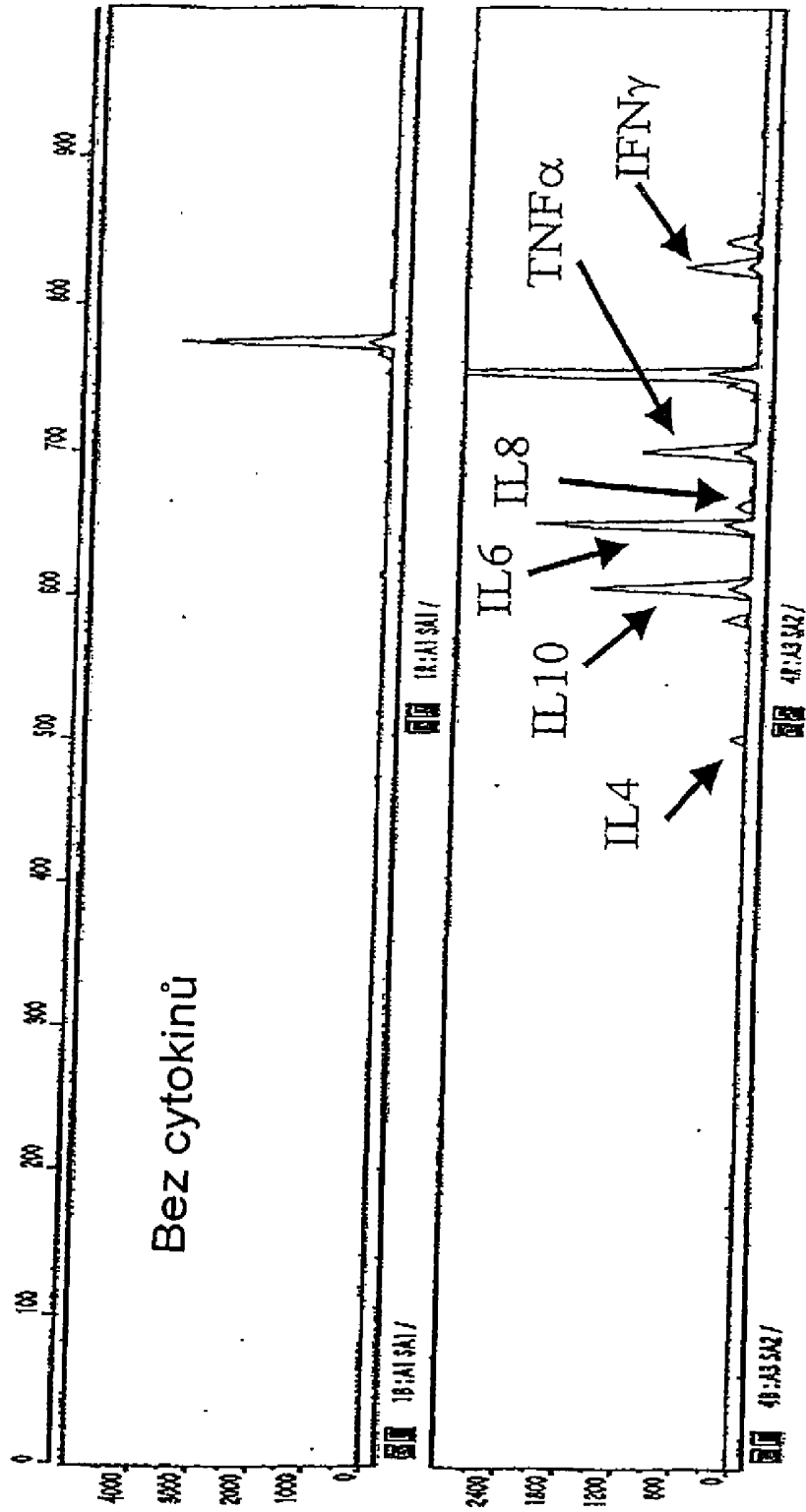
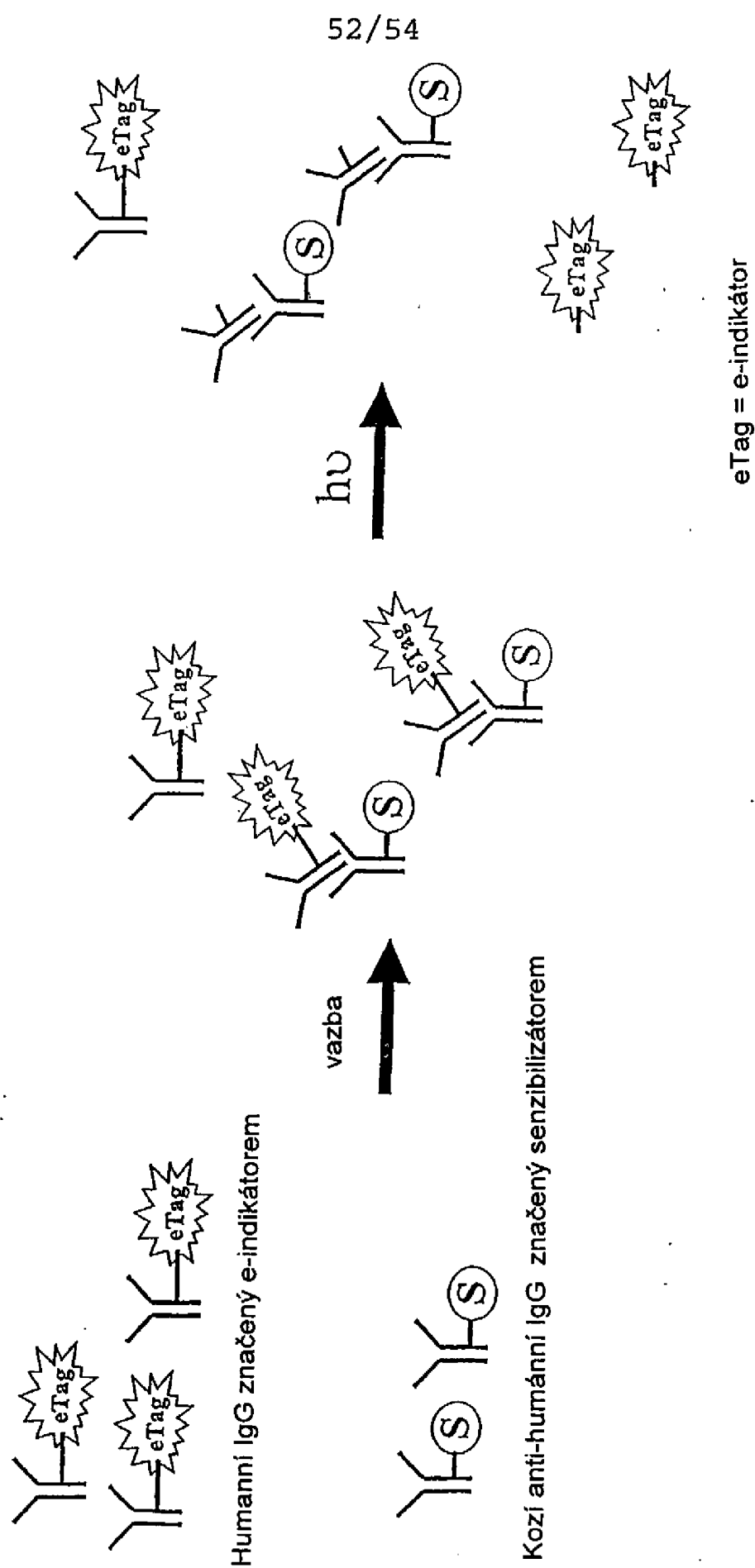


Figure 33



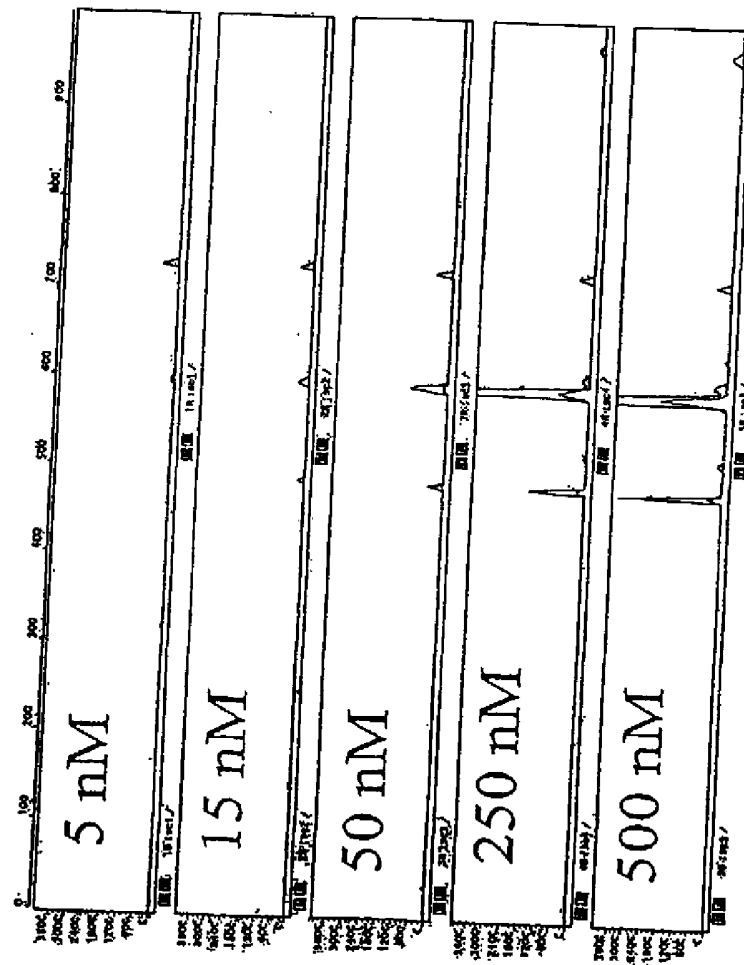
52/54

20.11.00

PV 200.3 - 3143

53/54

Figure 34



54/54

Figure 35

