



(11) Número de Publicação: **PT 1038179 E**

(51) Classificação Internacional:
G01N 33/543 (2006.01) **G01N 33/53** (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **1998.12.11**

(30) Prioridade(s): **1997.12.12 US 0990168**

(43) Data de publicação do pedido: **2000.09.27**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.08.09**
012/2006

(73) Titular(es):

ABBOTT LABORATORIES
CHAD 0377 AP6D-2, 100 ABBOTT PARK ROAD
ABBOTT PARK, IL. 60064-3500 **US**

(72) Inventor(es):

BRUCE A. BEUTEL **US**
MARK E. SCHURDAK **US**
MARTIN J. VOORBACH **US**
DAVID J. BURNS **US**
MARY K. JOSEPH **US**

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **RASTREIO DE ALTO RENDIMENTO EM FORMATO CONTÍNUO UTILIZANDO MATRIZES PLANARES**

(57) Resumo:

RESUMO

"Rastreio de alto rendimento em formato contínuo utilizando matrizes planares"

O rastreio de alto rendimento em formato contínuo (CF-HTS) utilizando pelo menos uma matriz porosa permite à indústria farmacêutica rastrear simultaneamente grandes números de entidades químicas em relação a uma vasta gama de actividade biológica ou bioquímica. Adicionalmente, o CF-HTS é útil para realizar ensaios em múltiplos passos.

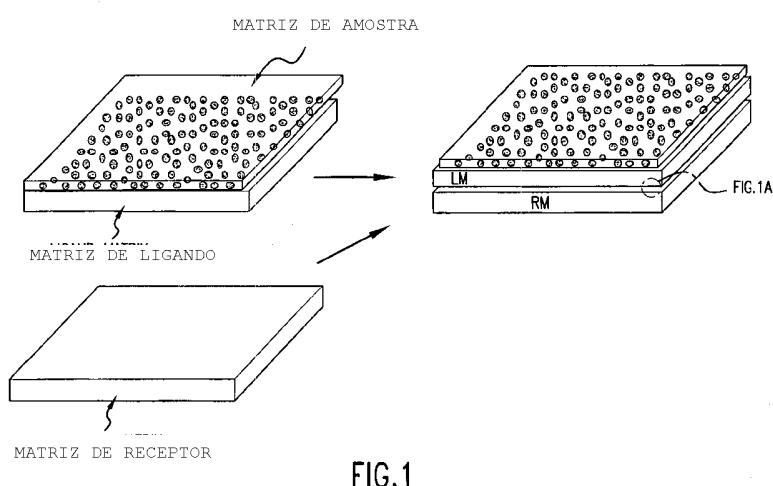


FIG.1

DESCRIÇÃO

"Rastreio de alto rendimento em formato contínuo utilizando matrizes planares"

Campo técnico do invento

O rastreio de alto rendimento em formato contínuo (CF HTS) utilizando pelo menos uma matriz porosa permite à indústria farmacêutica rastrear simultaneamente grandes números de entidades químicas em relação a uma vasta gama de actividade biológica ou bioquímica. Adicionalmente, o CF-HTS é útil para realizar ensaios em múltiplos passos.

Antecedentes do invento

Os ensaios bioquímicos e biológicos são desenhados para testar a actividade numa vasta gama de sistemas que vão desde interacções proteína-proteína, catálise enzimática, ligação molécula pequena-proteína, até funções celulares. Em rastreio de alto rendimento (HTS, "High Throughput Screening"), utilizam-se estes tipos de ensaios para testar um grande número de entidades químicas de modo a descobrir actividades biológicas e bioquímicas das entidades químicas anteriormente desconhecidas.

Ensaios homogéneos vs. heterogéneos

A totalidade dos diferentes tipos de ensaios biológicos pode ser dividida em duas classes principais: ensaios homogéneos e ensaios heterogéneos. Nos ensaios homogéneos, todos os reagentes são adicionados em conjunto e os resultados são medidos ou interpretados sem qualquer manipulação adicional. Por exemplo, células cultivadas numa placa de Petri podem ser expostas a um químico. Se o químico for tóxico para as células, uma zona sem células indicará toxicidade por simples observação. Como outro exemplo, podem-se utilizar células que exprimem uma proteína que modifica a cor da célula. No caso de células exprimindo beta-galactosidase (β -gal) cultivadas em ágar contendo x-gal , as células tornam-se mais ou menos azuis dependendo de quanta proteína β -gal é expressa. Assim, pode-se construir um ensaio homogéneo para qualquer passo biológico que afecte a expressão de um gene repórter tal como o gene da beta-galactosidase. Ainda outro exemplo de um ensaio homogéneo utiliza um substrato que

muda de cor ou de fluorescência quando é processado por uma enzima. Finalmente, tecnologias tais como ensaios de proximidade de cintilação (SPA, "Scintillation Proximity Assays") da Amersham medem directamente a ligação de um ligando radiomarcado a uma proteína ou a qualquer substância de ligação a ligando fixada a esferas que contêm o cintilante. Todos os exemplos anteriores são ensaios homogéneos porque não requerem quaisquer outros passos para além da adição de reagentes antes da detecção, medição ou leitura finais do sinal.

Os ensaios heterogéneos, por outro lado, requerem pelo menos dois passos que, por serem inherentemente de algum modo incompatíveis, não podem ser combinados num passo. Por exemplo, muitos ensaios heterogéneos requerem a adição de reagentes numa certa ordem (e.g., quando alguns reagentes interferem com os passos iniciais do ensaio mas são requeridos para completar passos posteriores). Exemplos comuns disto incluem ensaios nos quais se adicionam reagentes de desenvolvimento de sinal para reportar indirectamente a presença ou a concentração de um produto de reacção. Outro passo comum em ensaios heterogéneos é um passo de lavagem. Reagentes de ensaio em excesso têm frequentemente de ser adicionados inicialmente num ensaio, mas necessitam de ser removidos por lavagem antes de passos subsequentes tal que as reacções possam prosseguir sem um sinal de fundo elevado. Por exemplo, num ensaio de ligação de radioligando, incuba-se primeiro um ligando marcado com uma proteína que está ligada a uma superfície sólida, mas apenas uma pequena fracção do ligando se liga realmente ao número limitado de locais de proteína. Após incubação, o excesso de ligando não ligado tem de ser removido por lavagem antes de se poder efectuar uma medição exacta do ligando radioactivo ligado. A lavagem pode ser efectuada por uma variedade de métodos alternativos, incluindo filtração, ciclos de lavagem/decantação, precipitação/separação de fase, e/ou centrifugação.

Muitos processos biológicos e bioquímicos apenas podem ser medidos por métodos heterogéneos. Adicionalmente, apesar da existência de formas para adaptar outros processos biológicos e bioquímicos a métodos homogéneos, estes outros processos funcionam mais eficientemente em termos de custo e/ou com reagentes mais prontamente disponíveis por métodos heterogéneos. Estão disponíveis comercialmente vários métodos e "kits" para técnicas homogéneas tais como o SPA (Amersham),

polarização de fluorescência (Jolley e outros), e fluorescência resolvida no tempo (Packard e outros), para nomear apenas alguns. Contudo, a utilização destes tipos de métodos incorre sempre em custo e tempo adicionais. Para muitos ensaios, os métodos heterogéneos estão melhor estabelecidos e são mais fáceis de desenvolver rapidamente. Por esta razão, a utilização de métodos heterogéneos, tais como ELISA, ligação a filtro, RIA, ensaios de células com luciferase, etc., continua a estar generalizada. Alguns destes métodos serão a seguir descritos em maior detalhe.

É conhecido, por exemplo da WO 97 16569, um método para testar bibliotecas de compostos baseadas num suporte sólido em bibliotecas baseadas particulares, em relação a uma actividade biológica ou bioquímica. As esferas são introduzidas numa matriz porosa, postas em contacto com um ou mais componentes de ensaio e a sua interacção é identificada, preferivelmente, via observação visual directa ou utilizando uma etiqueta química.

De acordo com uma concretização adicional desta referência, as esferas transportando os compostos de teste podem ser dispostas num arranjo ordenado sobre uma matriz rígida possuindo orifícios cónicos que permitem que apenas uma esfera individual assente no seu interior, de modo a espaçar as esferas afastadas umas das outras.

A WO 94 02515 A revela métodos similares utilizando múltiplas cópias de moléculas oligoméricas individuais baseadas em esferas. No ensaio, a identidade de uma molécula activa é determinada, após difusão para o interior de um substrato, tal como na referência anterior, visualmente, combinada com um sinal.

A EP-A-0 063 810 revela um método para rastreio de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais onde抗原s ou imunoglobulinas estão fixados a um suporte como uma série de pontos. A sua interacção no ensaio gera um sinal baseado numa reacção de cor que é inspeccionada visualmente para análise.

A observação ou exame visuais de uma série de alta densidade em combinação com etiquetas químicas, tal como nas referências anteriores, tornaria extremamente difícil

determinar a identidade de substâncias individuais em tais séries.

Rastreio de alto rendimento (HTS, "High Throughput Screening")

Ao longo dos anos, a indústria farmacêutica tem confiado cada vez mais no HTS de bibliotecas de compostos químicos para encontrar candidatos a drogas. O HTS descreve um método onde muitos compostos discretos são testados em paralelo tal que um grande número de compostos de teste é rastreado, simultaneamente ou quase simultaneamente, quanto a actividade biológica. Actualmente, as técnicas mais amplamente estabelecidas utilizam placas de microtitulação de 96 poços. Neste formato, são realizados em simultâneo 96 testes independentes numa única placa de plástico de 8 cm x 12 cm que contém 96 poços de reacção. Estes poços requerem tipicamente volumes de ensaio que variam de 50 a 500 µl. Para além das placas, estão disponíveis comercialmente muitos instrumentos, materiais, pipetadores, robôs, lavadores de placas e leitores de placas para ajustar o formato de 96 poços a uma vasta gama de ensaios homogéneos e heterogéneos.

Até à data, os esforços para melhorar o HTS têm-se centrado na redução do tamanho dos poços (miniaturização). À medida que se reduz o tamanho do poço, pode-se aumentar o número de poços em cada placa para proporcionar mais testes em paralelo. Adicionalmente, ao diminuir os volumes de ensaio, também se diminui o custo dos reagentes por teste. Para além disso, porque se podem realizar mais testes em paralelo com volumes de ensaio mais pequenos, podem-se também testar simultaneamente mais compostos para encontrar candidatos a drogas. Até agora, a miniaturização tem melhorado marginalmente a tecnologia de 96 poços proporcionando um formato de 384 poços (96 x 4). Ver Comley et al., J. Biomol. Screening, vol. 2(3), págs. 171-78 (1997). De facto, têm sido noticiados formatos de densidade ainda maior, incluindo um formato de 9600 poços. Contudo, a miniaturização tem custos e complexidades inerentes.

Estes custos e complexidades estão directamente relacionados com os três componentes principais da miniaturização de um formato de rastreio. Em primeiro lugar, tem de ser possível fabricar os contentores de teste (tubos, poços, cavidades, etc.) mais pequenos. Em segundo lugar, tem de ser possível entregar com exactidão todos os reagentes de

ensaio necessários em poços mais pequenos e em maior número (usualmente realizado por robôs de manipulação de líquidos que distribuem os reagentes em vários poços simultaneamente). Em terceiro lugar, tem de ser possível "ler" os resultados dos testes na série de alta densidade.

Considerando os requisitos dos ensaios independentes em paralelo, cada componente proporciona desafios e limites sobre quanta miniaturização é exequível ou eficaz em termos de custos. Por exemplo, um formato mais recente, mais pequeno, pode requerer um método completamente diferente de distribuição dos reagentes, ou requerer um instrumento de leitura que tenha a resolução, a sensibilidade e a engenharia compatível com o novo formato miniaturizado. À medida que se reduz o tamanho de cada poço, a capacidade de fabricar a série de contentores, de distribuir reagentes em quantidades mais pequenas, e de ler cada amostra de teste, torna-se também mais difícil, morosa e dispendiosa. Adicionalmente, uma amostra de tamanho mais pequeno aumenta também a variabilidade estatística de amostra para amostra devido às incertezas inerentes à distribuição de volumes mais pequenos de reagentes e à medição de sinais de amostra mais fracos. Além do mais, à medida que a dimensão da amostra diminui para além de um certo ponto, factores tais como a evaporação e a tensão superficial adicionam ainda maior custo e complexidade à implementação dos novos formatos miniaturizados.

Para um salto quantitativo na tecnologia HTS, a indústria anseia desejadamente pela possibilidade de "ensaios de formato livre" ou ensaios que não tenham qualquer barreira física entre amostras. Tipicamente visionado como o teste de pequenas gotículas num formato desprovido de quaisquer poços, ninguém reportou actualmente a utilização de um ensaio de formato livre em HTS com colecções padrão de compostos discretos.

Rastreio de bibliotecas combinatórias - Métodos de permeação em gel

Com o advento da química combinatória, podem ser produzidos rapidamente milhões de entidades químicas sobre suportes sólidos (geralmente esferas). Ainda que o formato de 96 poços esteja a ser utilizado para rastrear bibliotecas baseadas em esferas, este formato é geralmente considerado como ineficaz porque (1) a esfera transporta apenas pequenas quantidades de uma entidade química; (2) o número de compostos

a ser testado é extremamente grande; e (3) as esferas são difíceis de manipular em placas de microtitulação de 96 poços.

Para evitar os problemas inerentes em rastreio de bibliotecas combinatórias pelo formato de 96 poços, tem sido noticiada a utilização de ensaios homogéneos simples que poderiam ser descritos como de "formato livre". Como exemplo, um ensaio utilizando células de pigmento (melanócitos) num ensaio homogéneo simples para bibliotecas combinatórias de péptido foi reportado por Jayawickreme *et al.* em Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA), vol. 91, págs. 1614-18 (Março de 1994). De acordo com os autores, eles colocaram células sob agarose em placas de Petri, depois colocaram esferas que transportavam compostos combinatórios sobre a superfície da agarose e depois libertaram parcialmente os compostos a partir das esferas. Os compostos activos foram visualizados como áreas de pigmento escuro porque, à medida que os compostos se difundiam localmente para o interior da matriz de gel, os compostos activos faziam com que as células mudassem de cor.

Outro exemplo recente é o das "Strategies for Screening Combinatorial libraries: Novel and Traditional Approaches" de Daniel Chelsky, apresentado na First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening em Philadelphia, PA (7-10 de Novembro de 1995). Chelsky colocou um ensaio enzimático homogéneo simples para a anidrase carbónica no interior de um gel de agarose tal que a enzima no gel causasse uma mudança de cor em todo o gel. Depois, colocaram-se esferas transportando compostos combinatórios ligados via um fotoligador no interior do gel e os compostos foram parcialmente libertados por luz UV. Os compostos que inibiram a enzima foram observados como zonas locais de inibição com menos alteração de cor. Finalmente, em Molecular Diversity, v. 2, págs. 57-63 (1996), Salmon, *et al.* reportaram um método similar ao de Jayawickreme *et al.*, onde bibliotecas combinatórias foram rastreadas em relação a compostos que tinham efeitos citotóxicos sobre células de cancro em desenvolvimento em ágar.

Todos estes três exemplos são variações dos ensaios de gel testados em tempo para agentes antibacterianos ou anticancerosos, e são também similares aos ensaios imunológicos familiares nos quais se mede uma interacção antigénio/anticorpo num gel. Ainda que estes ensaios de permeação em gel fossem adequados para poços para rastreio de bibliotecas combinatórias baseadas em esferas, ninguém

reportou a extensão deste formato para ensaios heterogéneos ou de bibliotecas não baseadas em esferas.

O senso comum convencional tem desencorajado os investigadores de testar amostras num formato contínuo que podia permitir que as amostras se misturassem. Entre os tipos limitados de ensaios reportados e as preocupações acerca das amostras serem ensaiadas em conjunto num formato contínuo, apenas têm sido ensaiadas bibliotecas baseadas em esferas. Devido a estas limitações, os investigadores acreditavam que o formato de 96 poços estava melhor adaptado para rastreio de bibliotecas heterogéneas e não baseadas em esferas. Seria desejável conduzir ensaios heterogéneos numa configuração de formato livre. Adicionalmente, seria desejável testar compostos discretos numa configuração de formato livre.

Breve sumário do invento

O invento aqui descrito, Rastreio de alto rendimento de formato contínuo (CF-HTS, "Continuous-Format High Throughput Screening"), implementa com sucesso o conceito de formato livre para qualquer ensaio, homogéneo ou heterogéneo, que pode ser realizado no formato de 96 poços. Adicionalmente, o CF-HTS é também útil para rastrear bibliotecas combinatórias com ensaios heterogéneos, não apenas com ensaios homogéneos. Para além disso, o CF-HTS pode ensaiar compostos discretos sem os custos e complexidades associadas com a miniaturização. As preocupações referentes à possibilidade de reagentes e resultados de testes serem processados em conjunto durante passos subsequentes provaram ser infundadas.

Uma concretização do invento refere-se a um processo para testar simultaneamente uma pluralidade de amostras de substâncias diferentes quanto à sua capacidade para melhorar ou inibir um processo biológico compreendendo,

a) depositar numa série um pequeno volume de cada uma de mais do que 96 amostras de substâncias distintas sobre uma matriz tal que cada substância distinta está centrada no seu próprio local distinto e a identidade de cada substância pode ser determinada a partir do seu local de deposição,

b) colocar a referida matriz em contacto com uma primeira matriz porosa contendo ou transportando um primeiro reagente de ensaio uniformemente disperso e permitir que parte de cada

substância se difunda para o interior da referida matriz porosa de um modo tal que a localização espacial de cada substância difundida possa ser correlacionada com o local sobre a referida matriz no qual a referida substância foi originalmente depositada, e

c) conduzir um ensaio para determinar a capacidade de cada substância difundida para melhorar ou inibir o referido processo biológico por observação da interacção de cada substância com o referido reagente de ensaio,

caracterizado por a referida matriz ser uma matriz planar.

Outra concretização refere-se a um processo conforme anteriormente enunciado compreendendo o passo adicional de

b1) colocar referida primeira matriz porosa em contacto com uma segunda matriz transportando ou contendo um segundo reagente de ensaio uniformemente disperso e permitir que o segundo reagente de ensaio se difunda para o interior da primeira matriz porosa ou permitir que cada substância e o primeiro reagente se difundam para o interior da segunda matriz, no último caso assegurando que a difusão ocorre de um modo tal que a localização de cada substância na segunda matriz pode ser correlacionada com o local sobre a referida matriz planar no qual a referida substância foi originalmente depositada, e

c1) conduzir o referido passo (c).

Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 ilustra amostras de teste de gELISA sobre uma matriz não porosa em contacto com um lado de uma matriz de gel porosa contendo reagente de ensaio que, por sua vez, está em contacto com uma matriz não porosa transportando um reagente de ensaio adicional.

A Figura 2 ilustra a remoção da matriz de amostra de teste gELISA e da matriz de gel porosa, seguida de lavagem e adição de reagentes líquidos ou em solução para formar o complexo de repórter sobre a matriz de reagente não porosa.

A Figura 3 ilustra a visualização do ensaio gELISA por contacto da matriz de complexo de repórter com uma matriz de gel porosa contendo o substrato de repórter.

A Figura 4 ilustra como uma matriz de ligando é aplicada sobre a superfície do filtro oposta à superfície do filtro transportando células.

A Figura 5 ilustra o que uma superfície de filtro transportando células pode produzir quando o ensaio é visualizado.

A Figura 6 mostra o resultado de um ensaio de VanA utilizando concentrações variáveis de um inibidor conhecido dependente da dose.

A Figura 7 mostra o resultado de um ensaio de EF-3 utilizando concentrações variáveis de um inibidor conhecido.

A Figura 8 ilustra uma experiência de controlo para o ensaio gELISA de interacção proteína-proteína.

A Figura 9 ilustra o resultado de gELISA de "inibição" da interacção proteína-proteína.

A Figura 10 mostra a ligação dependente da dose de ITAM radiomarcado a LCK imobilizada.

A Figura 11 representa graficamente os valores de pixéis em função da concentração de ITAM para mostrar uma curva de ligação receptor-ligando típica.

A Figura 12 ilustra uma experiência de controlo para interacção ligando-célula de IL-8 radiomarcada.

A Figura 13 ilustra a "inibição" da interacção ligando-célula de IL-8.

A Figura 14 ilustra um ensaio para inibidores de neuraminidase.

A Figura 15 ilustra um ensaio simultâneo de 10080 compostos discretos quanto à inibição de neuraminidase.

Descrição detalhada do invento

A ideia central subjacente ao CF-HTS é colocar amostras de teste no contexto de uma matriz porosa. O método comprehende colocar um ou mais componentes de ensaio dentro, por cima de, ou no fundo de uma matriz tal como um gel, uma folha de plástico, um filtro ou outras formas de suporte sólido facilmente manipuláveis. Quando se introduzem amostras na matriz porosa estas difundem-se de um modo suficientemente lento tal que os ensaios podem ser efectuados sem as amostras de teste serem analisadas em conjunto. Assim, o formato CF-HTS separa as amostras de teste por difusão em vez de por uma barreira impenetrável. Se se permitir que os testes durem demasiado tempo, as amostras de teste e os resultados serão eventualmente analisados em conjunto. Contudo, quando cuidadosamente temporizado, o CF-HTS permite o rastreio simultâneo, ainda que individualmente, duma densidade muito elevada de compostos, sem a necessidade de encher poços ou contentores reaccionais individuais com solventes ou componentes de ensaio. Adicionalmente, por manipulação de matrizes que transportam os componentes de reacção, podem-se realizar neste formato mesmo ensaios complexos. A manipulação de matrizes para ensaios heterogéneos é completamente sem precedentes e torna o CF-HTS tão flexível como o formato de 96 poços na sua capacidade para rastrear uma vasta gama de processos biológicos ou bioquímicos. Adicionalmente, o CF-HTS consegue os tipos de vantagens antecipadas pela miniaturização sem as desvantagens concomitantes, e tem vantagens únicas.

O CF-HTS emprega uma vasta gama de matrizes e componentes de ensaio. As matrizes incluem mas não estão limitadas a géis compostos de agarose, acrilamida, ou outros materiais gelatinosos, membranas, filtros e plásticos. As matrizes podem ser compostas de materiais incluindo mas não limitados a poliestireno, polipropileno, outros plásticos, fibras de papel, vidro, fibra de vidro, sílica, policarbonato, poliéster, poli(cloreto de vinilideno) e polietileno. As matrizes podem ser sólidos impermeáveis, sólidos porosos tais como filtros, ou géis. Os componentes de ensaio incluem mas não estão limitados a macromoléculas tais como ácidos nucleicos, proteínas, e outras macromoléculas sintéticas ou naturais; células, lisados de células, extractos biológicos, organelos, e outras entidades e misturas biológicas complexas; e moléculas pequenas tais como tampões, sais, inibidores,

substratos, péptidos, corantes, nucleótidos, cofactores, iões e solventes.

Um ensaio de CF-HTS é um ensaio onde múltiplas amostras de teste ou compostos são separados por difusão em vez de por barreiras impenetráveis. O componente crítico é a introdução de múltiplas (mais do que 1) amostras de teste no interior ou sobre uma matriz de ensaio porosa que contém opcionalmente um ou mais componentes de ensaio. Matrizes de ensaio porosas contendo componentes de ensaio são preparadas por adição, mistura, vazamento, distribuição ou impregnação de componentes no interior da matriz. As matrizes porosas são também preparadas por acoplamento, revestimento, ligação, fixação, junção, conjugação ou união de componentes de ensaio no interior ou sobre uma superfície de uma matriz. Adicionalmente, uma matriz porosa é também preparada por formação de uma película fina de solução ou líquido sobre um leito de células, enzimas ou outro componente de ensaio imobilizado. As matrizes de ensaio porosas são utilizadas para controlar a ordem e/ou a duração de adição dos componentes, e a extensão de mistura e difusão quando os componentes de ensaio são combinados. O CF-HTS pode também utilizar matrizes não porosas. As matrizes não porosas são também preparadas por acoplamento, revestimento, ligação, fixação, junção, conjugação ou união de componentes de ensaio ou amostras de teste sobre uma superfície de uma matriz não porosa. A utilização de matrizes não porosas em CF-HTS fixa espacialmente um ou mais dos componentes de ensaio.

Quando os componentes de ensaio são introduzidos sobre a superfície de uma matriz, os componentes de ensaio são ligados por interacções covalentes ou não covalentes, específicas ou não específicas, a matrizes que estão não derivatizadas, derivatizadas ou de outro modo pré-tratadas para facilitar a ligação dos componentes de ensaio. Após ligação, o componente de ensaio é fixado espacialmente tal que fica imobilizado para os fins do ensaio. Neste caso, ou as amostras de teste têm de ser capazes de se difundirem através de uma matriz para atingir os componentes de ensaio, e/ou os subcomponentes ou produtos dos componentes de ensaio têm de ser capazes de se difundirem através de uma matriz para atingir as amostras de teste.

Utiliza-se pelo menos uma matriz porosa contendo as amostras de teste é utilizada em qualquer um ou mais dos passos seguintes.

(1) Colocar a superfície da matriz porosa em contacto com pelo menos uma outra matriz (porosa ou não porosa) tal que as amostras e/ou um ou mais dos componentes de ensaio se podem difundir através da interface.

(2) Separar duas ou mais matrizes para interromper a interacção de componentes e/ou amostras.

(3) Colocar a superfície de duas ou mais matrizes em contacto tal que os componentes de ensaio possam interactuar.

(4) Lavar, enxaguar ou eluir uma matriz com tampões líquidos ou outros solventes para remover componentes de ensaio não ligados e/ou ligados não especificamente.

(5) Distribuir, vazar, adicionar ou impregnar componentes de ensaio em solução sobre uma matriz ou filtrar os referidos componentes através de uma matriz.

(6) Observar, ler, sondar, detectar, ou de outro modo visualizar os sinais radiométricos, fluorescentes, espectrofotométricos ou electromagnéticos presentes sobre ou dentro de uma ou mais matrizes.

O CF-HTS proporciona muitas vantagens em relação à especialidade anterior. A ausência de poços distintos elimina a necessidade de entregar simultaneamente e com exactidão componentes de ensaio ou reagentes dentro dos poços. Em vez disso, os componentes de ensaio são distribuídos e misturados por manipulação de um volume homogéneo. Dado que os componentes de ensaio são preparados como uma solução volumosa homogénea ou matriz, existe uma variação estatística mínima de amostra para amostra. Por comparação, a presença de poços no formato de 96 poços cria grandes variações de amostra para amostra.

Além do mais, o CF-HTS proporciona o rastreio com densidade extremamente elevada de grandes números de compostos. Mesmo se os êxitos observados "forem analisados em conjunto" numa extensão limitada, apenas é necessário testar de novo os compostos que estão localizados na proximidade do

êxito. Assim, se for possível restringir 10000 amostras de teste a 50 candidatos à volta de uma área visualizada, os 50 candidatos podem ser facilmente restringidos aos compostos activos, mesmo com a velha tecnologia dos 96 poços.

Por distribuição e secagem de compostos discretos sobre folhas de plástico em séries altamente compactadas, e depois aplicação destas ao CF-HTS, vai-se ao encontro das questões críticas da miniaturização. Este formato não requer quaisquer inovações em plástico ou outros materiais para conseguir a miniaturização, porque a miniaturização é conseguida simplesmente limitando a quantidade de amostra que se difunde no interior da matriz. Este formato também não requer manipulação de fluidos em microescala para distribuir os reagentes de ensaio porque todo o ensaio ocorre, essencialmente num "poço gigante" onde reagentes e soluções são manipuladas em quantidades volumosas. Apenas as amostras de teste necessitam de ser distribuídas por manipulação de fluidos em microescala. Para além disso, existe muito menos variação estatística neste formato porque apenas é necessário olhar para zonas localizadas de heterogeneidade na matriz em tudo o resto homogénea. Não é necessário ler e comparar muitos poços diferentes. Para além de todos os benefícios antecipados da miniaturização (custo, rendimento, utilização de reagentes, utilização de composto de teste), o CF-HTS proporciona também benefícios surpreendentes tais como a capacidade para manipular a maior parte dos passos do ensaio em quantidades volumosas.

Um aspecto central do CF-HTS é a observação de que componentes de ensaio e amostras de teste não se difundem lateralmente de um modo rápido mesmo nas interfaces entre matrizes. Por exemplo, quando um gel de agarose é colocado sobre uma placa de plástico, existe uma quantidade significativa de líquido na interface sobre a superfície do gel. Quando é requerida uma interacção entre um componente de ensaio no gel e um componente de ensaio sobre a placa (como no exemplo do ELISA), é crítico que o componente no gel seja capaz de se difundir para fora do gel e sobre a placa. Contudo, o CF-HTS requer que a difusão lateral concomitante seja consideravelmente mais lenta, tal que a interacção sobre a placa se localize perto da localização original do componente baseado no gel. Estes mesmos princípios aplicam-se a qualquer interface matriz-matriz entre géis, filtros ou superfícies (ou qualquer outra matriz) em qualquer combinação.

A percepção de que este comportamento de difusão é controlável e geralmente aplicável a todas as interfaces de matriz não tem precedentes e é contrária ao conhecimento convencional.

Um método preferido de introduzir amostras de teste ou compostos no interior de uma matriz (tal como um gel ou filtro molhado) consiste em distribuir e secar pequenos volumes de cada amostra sobre uma superfície, tal como a superfície de uma folha de plástico, numa série tal que quaisquer duas amostras não se possam misturar ou sobrepor e tal que cada uma esteja numa localização específica. Quando a folha de plástico é colocada sobre uma matriz, as amostras dissolvem-se e difundem-se para o interior da matriz em localizações correspondentes às suas localizações predefinidas na série inicial.

Um método alternativo para distribuir amostras numa série consiste em distribuir as amostras sobre uma matriz porosa, tal como um filtro, onde o volume entregue de cada amostra é suficientemente baixo tal que as amostras não se sobreponham dentro da matriz. No contacto com outra matriz porosa que contém mais líquido, os compostos difundem-se para iniciar o ensaio.

Quando a série inicial de amostras introduzidas no interior de uma matriz num rastreio CF-HTS é de densidade elevada, tal que uma zona particular de actividade cobre espacialmente a localização inicial de mais do que uma amostra, então cada uma destas amostras é potencialmente a fonte da actividade observada. Para densidades espaciais mais elevadas, existirão mais compostos candidatos para cada zona uma vez que estarão presentes múltiplos compostos numa zona particular. Os compostos podem-se difundir em conjunto, mas terão ainda cada um o seu próprio gradiente espacial e não se misturarão quantitativamente em qualquer uma das localizações. Deste modo, o centro da zona ainda se correlacionará com a localização exacta do composto activo na série inicial. Na prática, os êxitos são suficientemente raros pelo que o novo teste de múltiplas amostras, para assegurar a identificação de compostos activos para cada zona activa, é trivial.

Uma concretização alternativa do invento consiste em introduzir barreiras físicas (tornando assim o formato não contínuo na utilização rigorosa da palavra) no interior das matrizes de um ensaio para limitar a distância que as amostras

se podem difundir. Por exemplo, dois géis contendo uma enzima e substrato, respectivamente, podem cada um ser cortados com uma rede ("formas para biscoitos") tal que cada gel é subdividido em muitas localizações discretas. Depois, podem-se ainda colocar os dois géis em contacto, tal que o substrato e enzima se possam difundir conjuntamente dentro de cada peça de gel subdividida. As amostras de teste podem depois ser introduzidas em cada peça de gel subdividida tal que os ensaios são completamente independentes sem qualquer difusão entre ensaios. Esta concretização elimina efectivamente algumas das vantagens do CF-HTS introduzindo desvios estatísticos entre amostras de teste e fixando o volume, e desse modo limitando o sinal para séries de alta densidade. No entanto, esta concretização colheria ainda o benefício dos ensaios heterogéneos baseados em matriz nos quais os componentes de ensaio não necessitam de ser entregues a um grande número de vasos reaccionais em paralelo, e elimina a mistura parcial de amostras.

gELISA

Os ensaios de imunossorção com enzima ligada (ELISA) são ensaios heterogéneos que detectam a ligação entre ligandos em solução e receptores imobilizados. O ELISA requer muitos passos de mistura de reagentes e de lavagem que são difíceis de realizar no formato de 96 poços, e poderia ser antevista uma dificuldade ainda maior quando os poços são reduzidos do formato de 96 poços para o formato de 384 poços. Os inventores têm aplicado o método CF-HTS para detectar a inibição da ligação entre ligandos e alvos de receptor imobilizados (gELISA).

Um receptor é qualquer molécula que se possa ligar a outra molécula. Exemplos não limitantes são proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono e complexos dos exemplos anteriores. Um receptor está imobilizado sobre uma de várias matrizes possíveis (a matriz de receptor) incluindo mas não limitadas a superfícies de plástico (e.g., placa de Petri ou placa de plástico (da Nunc)), membranas ou filtros que têm elevada capacidade de ligação por alvos (e.g., nitrocelulose, "nylon" ou PVDF (Millipore, Corning Costar, Schleicher & Schuell, BioRad) ou membranas derivatizadas tais como membranas SAM (Promega)). Uma matriz de ligando porosa (e.g., gel de agarose ou membrana porosa) é preparada tal que o ligando para o receptor imobilizado é distribuído sobre ou

no interior da matriz. Os compostos ou amostras de teste são distribuídos directamente sobre a matriz de ligando ou, alternativamente, sobre ou no interior de uma matriz de amostra de teste (e.g., poliestireno (Tekra), polivinilideno (e.g., da Dow Brands) ou outra membrana ou folha de plástico flexível. Coloca-se a matriz de teste em contacto com a matriz de ligando e deixam-se as amostras difundir para o interior da matriz de ligando. Após um período de incubação adequado, coloca-se a matriz de ligando em contacto com a matriz de receptor, permitindo que o ligando e as amostras fiquem em contacto com e reajam potencialmente com o receptor por difusão (a Figura 1 mostra a ligação de receptor R imobilizado a ligando biotinilado L β). Durante a incubação, os ligandos ligar-se-ão ao receptor imobilizado a não ser que um composto de amostra iniba a ligação ligando/receptor.

Após um período de incubação adequado, a matriz de receptor é removida e lavada com um tampão adequado para remover ligando não ligado, e ligando ligado não especificamente, e amostras. A matriz de receptor é depois impregnada numa solução contendo reagentes de ensaio que interactuarão com o ligando (e.g., um anticorpo, avidina ou estreptavidina no caso de um ligando biotinilado) e que têm a capacidade para ser detectados quer directamente (e.g., por fluorescência ou radioactividade) que indirectamente (e.g., conjugado de peroxidase de rábano (HRP), fosfatase alcalina (AP) ou beta-galactosidase) (a Figura 2 mostra um conjugado de avidina-HRP, AHRP, ligados aos ligandos biotinilados). Após incubação adequada, a matriz de receptor é removida da solução e lavada para remover reagente não ligado e ligado não especificamente. No caso da detecção de sinal directo, a matriz é visualizada utilizando o método apropriado (e.g., leitores espectrofotométricos, câmaras CCD, película, "PhosphorImager", ou dispositivos de detecção de cintilação). Os sinais indirectos (e.g., HRP ou AP) requerem uma reacção de desenvolvimento de sinal adicional, conseguida por distribuição de substratos, ou outros componentes de reacção necessários, ao interior ou sobre uma matriz de substrato porosa e colocação desta matriz em contacto com a matriz de receptor. A enzima (e.g., HRP ou AP) reage depois com o substrato (Figura 3). Alternativamente, é introduzido um substrato precipitante em solução em vez de no interior de uma matriz. Sob qualquer método de visualização, as áreas de ligação ligando/receptor produzirão uma reacção visível,

enquanto as áreas onde a ligação ligando/receptor foi inibida não produzirão uma reacção visível.

Ligação célula/ligando

Pode-se também utilizar o CF-HTS para detectar a inibição da ligação ligando/receptor celular. No ensaio tradicional, combinam-se um composto de teste, ligandos radiomarcados e células, que exprimem o receptor correspondente, num vaso tal como um poço. Depois, permite-se tempo suficiente para que o receptor se ligue ao ligando, se tal ligação não tiver sido inibida pelo composto de teste. Quaisquer componentes não ligados e ligados não especificamente são removidos das células, e mede-se a quantidade de radioactividade associada às células. Os inventores adoptaram o método CF-HTS para detectar a inibição da ligação de ligandos a células.

As células exprimindo o receptor desejado são cultivadas ou plaqueadas sobre uma matriz (matriz de células) tal como mas não limitada a géis, filtros ou membranas (e.g., membranas de cultura de tecido Transwell (Corning Costar) ou membranas de quimiotaxia (Neuro Probe)). Prepara-se uma matriz porosa (e.g., gel de agarose ou membrana porosa) tal que o ligando marcado para o receptor esteja distribuído sobre ou no interior da matriz (matriz de ligando). Os compostos de teste ou amostras são distribuídos directamente sobre a matriz de ligando ou de células, ou alternativamente sobre ou no interior doutra matriz (e.g., poliestireno (Tekra), polivinilideno ou outra folha de plástico flexível ou membrana; matriz de amostra). A matriz de amostra é posta em contacto com uma matriz de ligando permitindo-se desse modo que a amostra se difunda para o interior da matriz de ligando. Após um período de incubação adequado, a matriz de ligando é posta em contacto com a matriz de células, preferivelmente sobre o lado sem células da matriz, e permite-se que o ligando e a amostra entrem em contacto e reajam com o receptor por difusão (Figura 4). Durante a incubação, os ligandos marcados ligar-se-ão às células imobilizadas a não ser que uma amostra iniba a ligação ligando/célula.

Após incubação, a matriz de células é separada da matriz de ligando e lavada com um tampão adequado para remover ligandos não ligados, e ligados não especificamente, e amostras. A matriz de células é visualizada utilizando o método apropriado (e.g., leitores espectrofotométricos,

câmaras CCD, película, "PhosphorImager", ou dispositivos de detecção de cintilação) (a Figura 5 ilustra o desenvolvimento do ensaio sobre uma película).

Conforme anteriormente se mostrou, CF-HTS consegue todas as vantagens previstas para os ensaios de "formato livre", e pode ser aplicado a todos os diferentes tipos de ensaios biológicos ou bioquímicos, sob todos os diferentes tipos de formatos, e com todos os diferentes reagentes e equipamento. Por causa da sua ampla aplicabilidade, é melhor ilustrado pelos exemplos seguintes. Contudo, estes exemplos ilustram a concretização preferida do presente invento, e não limitam as reivindicações ou a descrição. O vulgar perito na especialidade apreciará facilmente que se podem efectuar alterações e modificações às concretizações especificadas sem sair do âmbito do invento.

EXEMPLOS

Exemplo de Referência 1: Um ensaio em gel colorimétrico em dois passos para detectar fosfato gerado por enzima resistente à vancomicina VanA

A VanA é uma enzima chave na resistência à vancomicina, e catalisa a ligação de D-alanina a D-alanina ou de D-alanina a D-lactato. Tradicionalmente, esta enzima é ensaiada por geração de cor a partir do fosfato que é libertado quando a enzima está activa (a actividade de VanA hidrolisa ATP em ADP e fosfato). Os cientistas sabem que a D-ciclo-serina inibe a VanA de um modo dependente da dose, e utilizam este inibidor como um controlo positivo em relação a outros inibidores potenciais.

Gel de enzima

Preparou-se um gel de enzima por adição de enzima VanA a agarose a 1% fundida (agarose de alto ponto de fusão, Gibco BRL) a 45°C em HEPES (ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-(2-etanossulfónico) 50 mM, MgCl₂ 20 mM, KCl 20 mM, pH 7,3, até uma concentração final de VanA de 2 µM. Verteu-se depois esta mistura de ágar num aparelho de vazamento de gel BioRad e deixou-se solidificar a 2-8 °C durante 30 minutos.

Gel de substrato

Preparou-se um gel de substrato por adição de ATP, D-alanina e D-lactato a agarose fundida para ajustar cada componente a 1 mM, 1,5 mM e 1,75 mM, respectivamente, tendo-se preparado o gel conforme descrito para o gel de enzima.

Matriz de amostra

Distribuiu-se uma série de aliquotas de 1 μ l de diluições consecutivas de 5000, 2000, 1000, 500, 200, 100 μ M de D-ciclo-serina, um inibidor conhecido usado como amostra de controlo, em etanol-água 1:1, sobre uma peça de película de poli(cloreto de vinilideno) (PVDC) e deixou-se secar durante 10 minutos.

Incubação da enzima com o substrato na presença de inibidor

Colocou-se o gel de enzima em contacto com a matriz de amostra durante 5 minutos. Depois, colocou-se o gel de substrato sobre o gel de enzima e deixou-se incubar durante 15-20 minutos. Subsequentemente, separaram-se os dois géis. Durante a incubação, é de esperar que seja produzido fosfato por toda a parte no gel na medida em que a enzima catalisa a fixação dos substratos, com a excepção das zonas onde a D-ciclo-serina estava suficientemente concentrada para inibir a reacção.

Visualização do ensaio

Verteu-se um "cocktail" de detecção de fosfato acabado de preparar consistindo de verde de malaquite a 0,15% e molibdato de amónio a 1,4% em HCl 1,33 N e distribuiu-se uniformemente sobre os géis de enzima e de substrato. Estes reagentes reagem com fosfato e geram manchas verdes cada vez mais escuras em função de concentrações crescentes de fosfato. Deixou-se a cor desenvolver durante 5-10 minutos (a Figura 6 ilustra o desenvolvimento de cor sobre o gel onde as quantidades de inibidor variaram de 5 nanomol a 0,5 nanomol). Os géis corados de verde foram fotografados utilizando uma câmara CCD Eagle Eye da Stratagene. Conforme esperado, a graduação de cor verde das zonas com inibição estava correlacionada com a concentração de inibidor adicionado. Pode-se assim utilizar este ensaio para rastrear inibidores de VanA dispondo esferas ou compostos combinatórios distribuídos sobre qualquer outra

superfície, que é depois posta em contacto com o ensaio em gel.

Este ensaio demonstra também que o formato de rastreio em gel é receptivo a reacções em múltiplos passos. Esta característica é necessária para que este formato seja útil com uma vasta gama de ensaios, porque muitos ensaios requerem múltiplos passos. Neste caso, o ensaio de VanA é um ensaio de actividade enzimática em dois passos seguido do desenvolvimento de cor. Versões homogéneas (único passo) deste ensaio não são facilmente exequíveis porque os reagentes e as condições de desenvolvimento de cor interferem com a actividade de VanA, e são também incompatíveis com a distribuição num gel de ágar. Deste modo, é desejável a separação espacial e temporal destes dois passos por se ter primeiro um ensaio de gel enzimático seguido por um passo de desenvolvimento de cor em fase de solução.

Exemplo de Referência 2: Um ensaio de gel em dois passos para detectar fosfato gerado por actividade de ATPase de factor 3 de alongamento de *S. cerevisiae* estimulada por ligação de ribossomas

Quando o factor de alongamento 3 (EF-3) fúngico interactua com ribossomas, a actividade de fosfatase é estimulada. Os inventores aplicaram CF-HTS ao ensaio para esta actividade.

Preparou-se um gel de enzima contendo EF-3 (uma enzima altamente sensível à temperatura) e ribossomas de levedura em tampão de ensaio de EF-3. Preparou-se também um gel de substrato contendo ATP 1 mM em tampão de ensaio. Ambos os géis continham 2% de dimetilsulfóxido em agarose de baixo ponto de fusão (Gibco BRL), e foram preparados a 37°C e deixados solidificar durante 30 minutos a 4°C. Séries de diluições de poli-L-lisina, um inibidor de EF-3 utilizado como uma amostra de controlo, foram manchadas sobre película de PVDC e secas (matriz de amostra). O ensaio foi depois conduzido como no Exemplo 1 por pré-incubação do gel de enzima com os inibidores sobre a matriz de amostra. Depois, colocou-se o gel de enzima em contacto com o gel de substrato durante 20 minutos. Como no Exemplo 1, os géis de enzima e substrato foram corados com "cocktail" de desenvolvimento de cor de verde de malaquite/molibdato de amónio. Depois, o gel de enzima foi visualizado com uma câmara CCD. As manchas de inibidor

aparecem como zonas mais claras num fundo verde. A Figura 7 ilustra o desenvolvimento de cor sobre o gel onde as quantidades de inibidor variaram de 5 picomole a 200 picomole. Os resultados mostram o sinal do inibidor dependente da dose, indicando que se podem rastrear compostos neste ensaio para descobrir novos inibidores de EF-3. O Exemplo 2 demonstra a utilidade do CF-HTS mesmo com a complexidade introduzida pela presença de organelos ou de outras misturas ou extractos biológicos em bruto.

Exemplo de Referência 3: Detecção indirecta de cor de gELISA de inibidores de interacção proteína-proteína

Conforme anteriormente descrito, utiliza-se vulgarmente um ELISA para detectar a inibição de interacções ligando-receptor onde os receptores estão imobilizados em poços de microtitulação. Os pares "ligando-receptor" utilizados em ELISA podem compreender qualquer par de moléculas de ligação, desde proteínas ou outras macromoléculas até moléculas pequenas. Estes ensaios são ensaios complexos, em múltiplos passos, que requerem a imobilização do receptor, incubação do receptor com ligando, lavagem para remover ligando indesejado, não especificamente retido, que de outro modo causaria um sinal de fundo elevado, ligação de reagentes de visualização (e.g., um anticorpo específico de ligando conjugado a uma enzima repórter) ao ligando ligado ao receptor e geração de um sinal visível, proporcionando substratos para a enzima repórter. É evidente que a complexidade do ELISA conduziu a que a indústria de HTS tenha concluído que o ELISA não pode ser adaptado num ensaio de formato livre. Apesar disso, os inventores adaptaram este ensaio complexo em múltiplos passos ao formato de CF-HTS para ensaiar uma variedade de interacções proteína-proteína, proteína-ligando e outras interacções de ligação de ligando.

O activador de plasminogénio do tipo uroquinase (uPA) liga-se ao seu receptor correspondente (uPAR). A interacção uPA/uPAR tem sido implicada na metástase de vários tipos de cancros. Os inventores têm adaptado um ELISA de uPA/uPAR tradicional ao CF-HTS utilizando receptores e ligandos purificados.

Matriz de uPAR

Placas de plástico (7,5 cm x 11,5 cm; da Nunc, Inc. Naperville, IL) foram revestidos de um dia para o outro com 15 ml de uPAR purificado 118 nM em solução salina tamponada

com fosfato (PBS) (Life Technologies, Grand Island, NY), a pH 7,4 e 4°C. Após revestimento da placa de plástico de um dia para o outro, decantou-se a solução de uPAR e bloquearam-se os locais de ligação restantes sobre a placa de plástico, por adição de 15 ml de PBS contendo 1% (p/v) de caseína e incubação durante 2 h à temperatura ambiente (RT). Após bloqueio, decantou-se a solução de bloqueio e lavou-se a placa de plástico cinco vezes com 20 ml de tampão de lavagem consistindo de 0,05% de Tween-20 (polioxietileno-monolaurato de sorbitano) em PBS. Após lavagem, secou-se a placa de plástico durante 10 minutos à RT. Isto foi temporizado tal que a placa de plástico pudesse ser usada logo imediatamente depois no ensaio a seguir descrito, para evitar a sobresecagem da matriz que pode conduzir a perda de actividade.

Matriz de β-uPA

Para efeitos do ensaio, o uPA usado é marcado com biotina (β-uPA). Os géis contendo β-uPA foram preparados por impregnação de β-uPA em ágar para evitar temperaturas elevadas (em oposição a verter este em ágar fundido nos Exemplos 1 e 2). O ágar foi preparado primeiro por mistura de 0,1 g de agarose (Sigma, St. Louis, MO) com 10 ml de PBS, aquecimento até estar fundido e depois vazamento num aparelho de gel de 8 × 7 × 0,075 cm³ (Bio-Rad, Hercules, CA). Após solidificação (quer à temperatura ambiente quer a 4°C), impregnaram-se os géis de um dia para o outro a 4°C em 15 ml de β-uPA (cerca de 10 nM) em tampão de ensaio consistindo de PBS, 0,05% de Tween-20 e 0,1% de caseína (ambos da Sigma, St. Louis, MO). Secou-se o gel durante 20 minutos a RT imediatamente antes do uso.

Matriz de amostra

Na ausência de um inibidor de molécula pequena conhecido da ligação uPA/uPAR, utilizou-se um uPA não biotinilado (pro-uPA) como inibidor de amostra de controlo da ligação β-uPA/uPAR. Distribuíram-se aliquotas de cinco microlitros de pro-uPA 0, 0,03, 0,1, 0,3, 1 e 3 μM em tampão de ensaio sobre uma película de PVDC (Dowbrands L.P., Indianapolis, IN) e secou-se durante 2 h à RT.

Incubação de uPAR com pro-uPA e β-uPA

Colocou-se a matriz de amostra sobre um lado do gel de β-uPA com as manchas de pro-uPA secas em contacto com a

superfície do gel de β -uPA. Deixou-se o pro-uPA difundir para o interior do gel durante 10 minutos à RT. Subsequentemente, colocou-se o outro lado do gel de β -uPA na placa de plástico para permitir a interacção do β -uPA (actuando como ligando) e do pro-uPA (actuando como um inibidor competitivo) com o uPAR sobre a superfície da placa de plástico. Incubou-se a reacção de ligação/competição durante 20 minutos à RT. Após incubação, separou-se a placa de plástico do gel, e lavou-se rapidamente 4 vezes com 20 ml de tampão de lavagem. Preparou-se uma solução de conjugado de avidina-peroxidase de rábano (avidina-HRP) por diluição de avidina-HRP (Sigma, St. Louis, MO) de 1 para 25 000 em tampão de ensaio e adição de 15 ml à placa de plástico. Incubou-se a reacção durante 10 minutos à RT seguindo-se decantação da solução de avidina-HRP e lavagem da placa de plástico como anteriormente. Deixou-se a placa de plástico secar durante 20 minutos.

A avidina em avidina-HRP liga-se especificamente a biotina tal que apenas as áreas da matriz que exibem ligação de "ligando/receptor" exibirão eventualmente desenvolvimento de cor. As áreas da matriz onde a ligação "ligando/receptor" é inibida competitivamente por pro-uPA não exibirão cor.

Desenvolvimento de cor

O gel de desenvolvimento de cor contendo um substrato de HRP colorimétrico (gel de OPD) foi preparado por dissolução de 2 pastilhas de o-fenilenodiamina.HCl (OPD) em 7 ml de diluente (ambos da Abbott, kit n.º 6172-30, Abbott Labs, Abbott Park, IL) e combinação desta solução com uma solução de agarose preparada por fusão de 0,1 g de agarose em 3 ml de água. A mistura final de 10 ml foi vazada num aparelho de gel Mini-protein II de 8 x 7 x 0,075 cm e deixou-se solidificar a 4°C durante 15 minutos. Transferiu-se o gel das placas de vidro no suporte de vazamento de gel quer para PVDC quer para uma folha de plástico flexível, e deixou-se secar ao ar durante 10 minutos à RT. Transferiu-se depois o gel para outra folha de PVDC ou de plástico para permitir que o outro lado seque durante 10 minutos. Depois, colocou-se o gel de OPD na placa de plástico para iniciar o desenvolvimento de cor. Em vários momentos durante a incubação de OPD, colocou-se a placa de plástico por cima de um filtro de passagem da banda de 440 nm (Omega Optical, Inc., Brattleboro, VT) que, por sua vez, estava por cima de uma placa de difusão de fibra óptica iluminada por uma fonte de luz Fiber-Lite (ambos da Dolan-

Jenner Industries, Inc., Lawrence, MA). As imagens resultantes foram adquiridas com uma câmara CCD (sistema Eagle Eye, Stratagene, La Jolla, CA).

Experiência de controlo

A Figura 8 ilustra a experiência de controlo para o Exemplo 3. Para a Figura 8A, impregnaram-se quadrados de agarose (1 cm^2) em soluções de várias concentrações de β -uPA conforme indicado abaixo de cada quadrado (excepto para a solução 50 nM que está assinalada à esquerda do quadrado de agarose).

Após os quadrados de agarose serem incubados sobre uma placa de plástico de uPAR imobilizado, estes foram removidos. Depois, lavou-se a placa de plástico e as áreas da matriz onde ocorreu a ligação de β -uPA/uPAR foram visualizadas conforme anteriormente descrito. A Figura 8B mostra uma representação gráfica do valor médio de pixéis (menos o fundo) para cada quadrado (conforme determinado por análise da imagem digital a partir da câmara CCD, com suporte lógico Image Analysis da NIH) em função da concentração de β -uPA em cada quadrado de agarose, em vários instantes durante o desenvolvimento de cor de OPD. O β -uPA entregue a partir do gel de agarose mostrou uma curva típica de ligação receptor-ligando com metade da ligação máxima (K_d) à volta de 3-5 nM, o que é consistente com valores reportados para esta reacção em ELISA padrão e outros ensaios que medem este parâmetro. A Figura 8 demonstra que o sinal colorimétrico indirecto gerado por gELISA é quantitativamente dependente da extensão da interacção ligando-receptor.

Resultados da competição Pro-uPA/ β -uPA

A Figura 9 demonstra inibição da ligação β -uPA/uPAR por Pro-uPA. As manchas na Figura 9A mostram áreas onde a ligação β -uPA/uPAR foi inibida. Por conseguinte, a avidina-HRP não se ligou nestas áreas. Consequentemente, a HRP não reagiu com os substratos no gel de OPD para gerar o desenvolvimento de cor. A Figura 9B é um modo alternativo de apresentar estes mesmos dados de imagem de CCD que melhora a capacidade do olho humano para ver a titulação quantitativa.

Exemplo de Referência 4: Detecção radiométrica directa de inibidores de interacção proteína-proteína

A actividade de células T é um componente da resposta imunitária do corpo. Para que eventos a jusante ocorram durante a actividade de células T, a p56lck (LCK, uma proteína) tem de interactuar com a região ITAM (motivo de activação baseado em tirosina relacionado com imunoglobulina) dos domínios citoplasmáticos do receptor de抗énio de células T. Compostos que inibem esta interacção proteína-proteína são imunossupressores potenciais. Os inventores utilizaram o CF-HTS para ensaiar esta interacção proteína-proteína, onde a LCK é imobilizada numa membrana.

Matriz de LCK

Imobiliza-se LCK biotinilada sobre uma membrana de captura de biotina (membrana SAM) (Promega Corp., Madison, WI) encharcando uma tira de 11 cm × 2 cm com 5 ml de LCK 3 μM em PBS contendo DTT (ditiotreitol) 5 mM, durante 10 minutos à RT, após o que se remove o tampão. Isto é temporizado tal que a membrana SAM possa ser usada imediatamente depois (dentro de minutos) no ensaio a seguir descrito.

Matriz de ITAM*

Prepara-se um gel de agarose contendo péptido ITAM radiomarcado (ITAM*) por mistura de 0,1 g de agarose com 10 ml de tampão, aquecimento até estar fundido e depois vazamento num aparelho de gel de 8 × 7 × 0,075 cm. Adiciona-se o ITAM* ou imediatamente antes do vazamento ou, alternativamente, é impregnado no gel após solidificação até uma concentração final de 10 nM.

Matriz de amostra

A amostras de teste a ser rastreadas são distribuídas sobre uma superfície de plástico ou PVDC e secam-se para formar a matriz de amostra.

Incubação de ITAM*, LCK e amostras de teste, e visualização

A matriz de amostra é posta em contacto com um lado do gel de ITAM* de modo a que as amostras de teste se possam difundir para o interior do gel de ITAM*. Subsequentemente,

põe-se em contacto o outro lado do gel de ITAM* com a membrana SAM sobre a qual a LCK foi imobilizada. Após incubação durante 15-45 minutos, remove-se a membrana SAM, lava-se e visualiza-se com um PhosphorImager ou película. Os inibidores da interacção ITAM-LCK são revelados por zonas de radioactividade mais baixa que correspondem a uma intensidade de sinal inferior na imagem.

Experiência de controlo para a ligação ITAM*/LCK

Prepararam-se géis de agarose por mistura de 0,1 g de agarose com 10 ml de tampão, aquecimento até estar fundido, e depois vazamento num aparelho de gel 8 x 7 x 0,075 cm. Após solidificação, através de punção, cortam-se do gel círculos com 1 cm de diâmetro e impregnam-se em 400 µl de ITAM marcado com ¹²⁵I (Amersham, Arlington Heights, IL) 0,1, 0,3, 1, 3, 10 e 20 nM em tampão, de um dia para o outro a 4°C. Removeram-se os círculos de gel da solução e deixaram-se secar durante 20 minutos à RT. Colocaram-se depois sobre a membrana SAM com LCK imobilizada e incubaram-se durante 45 minutos à RT. Removeram-se os géis e lavaram-se as membranas 4 vezes com tampão. Após secagem, visualizaram-se as membranas SAM utilizando um PhosphorImager.

A Figura 10 mostra uma ligação dependente da dose entre ¹²⁵I-ITAM e LCK imobilizada sobre a membrana SAM.

A Figura 11 mostra uma representação gráfica do valor médio de pixéis (menos o fundo) para cada gel de ¹²⁵I-ITAM (conforme determinado por análise da imagem digitalizada a partir do PhosphorImager com suporte lógico ImageQuant da Molecular Dynamics) em função da concentração de ¹²⁵I-ITAM no círculo de gel. O ¹²⁵I-ITAM entregue a partir do gel à LCK imobilizada mostrou uma curva típica de ligação de receptor-ligando.

Exemplo de Referência 5: Ensaio de gene repórter de células inteiras utilizando formato de combinação gel/filtro

Células de rim, conhecidas como células HEK, são transfectadas com um plasmídeo que contém um promotor do elemento de resposta AMP cíclico (CREB) fundido com um gene de luciferase (gene repórter de luciferase da Promega). Quando se tratam células transfectadas com forskolina, é induzida a expressão do gene repórter de luciferase. Depois, quando se

adiciona um tampão biológico contendo o substrato de luciferase (luciferina de escaravelho da Promega) e cofactores apropriados (Tricina 20 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM, DTT 33 mM, Coenzima A 0,3 mM, trifosfato de adenosina 0,5 mM e MgCl₂ 1 mM) às células HEK, é gerada uma emissão de fotões que pode ser detectada por instrumentação convencional. Os inventores adaptaram este ensaio ao CF-HTS.

Matriz de células

Tratam-se células em cultura com tripsina, transferem-se para uma membrana TRANSWELLTM Corning/Costar (filtro de policarbonato de 3 micron com um anel de suporte de plástico) e incubam-se de um dia para o outro a 37°C, 5% de CO₂, na presença de meio de cultura de tecido. Depois, remove-se o meio da membrana e seca-se o filtro, ao qual as células estão ligadas, ao ar durante 15 minutos e utiliza-se imediatamente depois nos passos seguintes.

Matriz de indutor

Prepara-se um gel contendo o indutor da expressão de luciferase por adição de 12 µl de uma reserva de forscolina 10 mM (Sigma, reserva em etanol) em 6 ml de um gel de agarose de baixa temperatura de fusão a 1%. O gel é solidificado à temperatura ambiente com forscolina numa concentração final de 20 µM.

Matriz de amostra

Distribuem-se amostras que podem bloquear a indução forscolina e secam-se em localizações discretas sobre PVDC com densidade elevada.

Incubação dos reagentes e detecção de inibição

O lado de inibidor do PVDC é incubado com o gel de indutor. Em seguida, coloca-se o gel contendo o indutor forscolina sobre o lado sem células da matriz de células preparada anteriormente. Incubam-se estes em conjunto a 37°C com 5% de CO₂ durante 20 minutos. Depois, remove-se o gel de forscolina e incuba-se a matriz de células a 37°C com 5% de CO₂, durante quatro horas adicionais, para expressão máxima da construção de luciferase. Para detectar a actividade enzimática de luciferase (ou a sua inibição), o filtro de

matriz de células é removido fisicamente do seu anel de suporte de plástico e colocado numa placa de Petri. Inunda-se a placa de Petri com substrato de luciferase (luciferina de escaravelho da Promega) num tampão biológico com cofactores apropriados para gerar luz como sinal. Por o sinal se localizar no interior de células imobilizadas exprimindo luciferase, os inibidores do passo de indução inicial resultarão em zonas de menor emissão de fotões.

Exemplo de Referência 6: CF-HTS de gel/filtro para detectar directamente inibidores de interacção ligando-células

A ligação ligando/receptor sobre superfícies celulares inicia percursos de sinalização em células que, em última instância, conduzem a respostas funcionais (e.g., proliferação celular ou secreção de substâncias biologicamente activas). Para regular a resposta biológica de células em estados de doença, procura-se frequentemente inibir a ligação de ligando a superfícies celulares. Um método comum para avaliar inibidores da ligação ligando/receptor celular consiste em avaliar a capacidade do inibidor para reduzir a ligação entre o ligando natural radiomarcado e as células. Isto envolve incubação das células com radioligando e com inibidor, seguindo-se a remoção por lavagem de radioligando não ligado, e ligado não especificamente, e depois medição da quantidade de radioactividade ligada.

A interleucina-8 (IL-8) é uma quimoquina quimiotática envolvida na inflamação por ligação a receptores em vários tipos de células. Os inventores desenvolveram um ensaio CF-HTS de ligando-receptor celular para avaliar inibidores desta interacção.

Matriz de células

Plaquearam-se células HEK (ATCC, Bethesda, MD) exprimindo o receptor IL-8a sobre um filtro de membrana Transwell de 75 mm de diâmetro (Corning Costar Corp, Cambridge, MA) com uma densidade de cerca de 20 milhões de células per placa. Deixaram-se ligar ao filtro de membrana, de um dia para o outro, em tampão (RPMI da Life Technologies, Grand Island, NY) contendo Hepes 10 mM (Sigma, St. Louis, MO) a pH 7,2 e 37°C. Após as células estarem ligadas ao filtro, removeu-se o meio e lavaram-se as células com tampão fresco para remover quaisquer células não ligadas. Invertearam-se os filtros com o lado das

células para baixo, e colocaram-se com um ângulo de modo a permitir que o meio em excesso escorresse, e depois secaram-se durante 20 minutos. Isto foi temporizado tal que a matriz de células pudesse ser utilizada imediatamente no ensaio a seguir descrito.

Matriz de ligando

A matriz de ligando foi preparada por impregnação de IL-8 marcada com ^{125}I (Amersham, Inc., Arlington Heights, IL) num gel de agarose preparado por mistura de 0,1 g de agarose com 10 ml de tampão, aquecimento até estar fundido, e depois vazamento num aparelho de gel de $8 \times 7 \times 0,075$ cm. Impregnaram-se os géis de um dia para o outro à RT misturando-se lentamente sobre uma plataforma rotativa (New Brunswick Scientific Co., Inc, Edison, NJ). Após impregnação, secaram-se os géis durante 20 minutos à RT imediatamente antes do uso. Isto foi temporizado tal que o gel pudesse ser utilizado imediatamente no ensaio.

Matriz de amostra

Na ausência de um inibidor conhecido da ligação IL-8/receptor celular, utilizou-se IL-8 não marcada (Genzyme Corp., Cambridge, MA), como um inibidor de amostra de controlo, para observar a inibição da ligação de ^{125}I -IL-8 a células HEK. Distribuiu-se um microlitro de IL-8 0, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 e 100 μM sobre uma folha de plástico, tal como PVDC, e secou-se durante 1 h sob vácuo à RT.

Incubação

Colocou-se a matriz de amostra sobre um lado da matriz de ligando tal que as manchas de IL-8 secas ficassesem em contacto com a superfície do gel. O gel foi invertido para permitir ao outro lado secar durante 10 minutos à RT e para permitir que o "inibidor" se difundisse para o interior do gel. Subsequentemente, colocaram-se os géis sobre o lado sem células da matriz de células. Deixou-se a reacção de ligação incubar durante 45 minutos à RT. Depois, removeram-se os géis, e o lado sem células da membrana foi lavado 4 vezes com tampão. Deixaram-se as membranas secar completamente antes de serem removidas dos seus anéis de suporte de plástico. Depois, visualizaram-se as membranas quer com película de raios X quer com um PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

A Figura 12 mostra uma resposta à dose para ^{125}I -IL-8 em géis de agarose difundindo-se através de uma matriz de células para se ligar às células HEK exprimindo o receptor IL-8a. Impregnaram-se vários quadrados de agarose de 1 cm^2 em soluções de várias concentrações de ^{125}I -IL-8 conforme indicado. Subsequentemente, os quadrados impregnados em ligando foram postos em contacto com a matriz de células conforme anteriormente descrito. Após incubação, removeram-se os quadrados da matriz de células, e lavou-se com tampão o lado sem células da membrana. Utilizou-se um PhosphorImager para localizar a ^{125}I -IL-8 ligada às células. Os dados mostram que uma leitura radiométrica directa, neste ensaio de células baseado em gel, é quantitativamente dependente da extensão da interacção ligando-receptor. A Figura 12 mostra também que as áreas de ligação permanecem distintas em forma, e confirma que a difusão lateral de sinal não é um problema no ensaio.

A Figura 13 ilustra os resultados da experiência de inibição competitiva. A inibição da ligação entre ^{125}I -IL-8 e as células HEK é indicada pelos pontos de luz. É também facilmente evidente que a inibição por IL-8 não marcada é dependente da dose de modo quantificável. Esses dados mostram que inibidores, exemplificados neste caso pela IL-8 não marcada, podem atravessar a matriz de células para reduzir a ligação entre ^{125}I -IL-8 e as células.

Exemplo de Referência 7: Ensaio de célula funcional sem gel baseado em filtro

As alterações na função celular são frequentemente medidas observando o efeito de compostos de teste ou amostras em sistemas repórter introduzidos por engenharia no interior das células. Exemplos incluem observar o efeito na síntese de proteínas intracelulares fluorescentes, tais como a proteína fluorescente verde (GFP), proteínas extracelulares tais como um receptor ou molécula de adesão, ou enzimas específicas tais como luciferase, cloranfenicol-acetiltransferase ou β -galactosidase (Promega). Primeiro, incubam-se os compostos de teste com as células. Depois, deixam-se as células exprimir a proteína repórter durante um período de tempo adequado (pode ser minutos, horas ou dias). Depois, o nível da proteína repórter é ensaiado por métodos directos (e.g., GFP) ou por métodos indirectos (e.g., técnicas ELISA com proteínas ligadas a membrana). Ainda no caso de enzimas, a célula pode ser

lisada para extrair a proteína repórter e ensaiada quanto a uma actividade de enzima. Outros ensaios de célula funcional medem o comportamento ou localização de moléculas específicas, tais como corantes ou metabolitos radiomarcados, em resposta à estimulação de um receptor ou a modificações na fisiologia celular, tais como o potencial de membrana.

Um ensaio ELISA medindo o efeito de compostos na expressão de Molécula de Adesão Intercelular-1 (ICAM-1, "Intercellular Adhesion Molecule-1") pode ser formatado para CF-HTS como se segue. As células endoteliais exprimindo ICAM-1 são plaqueadas sobre uma membrana de quimiotaxia de policarbonato (Neuro Probe) com cerca de 5 000 células/mm². Incubam-se as células de um dia para o outro a 37°C em meio. Remove-se o meio e deixam-se as membranas secar parcialmente durante 10 minutos à RT. Amostras ou compostos que estão a ser testados em relação à indução de ICAM-1 são secos sobre folhas de plástico e colocados em contacto com o lado sem células da membrana húmida. Deixam-se os compostos interactuar com as células durante 1 h a 37°C numa câmara húmida, e depois banham-se as células em meio e incubam-se durante 5 h a 37°C.

Após dar tempo às células para sintetizar a proteína induzida, remove-se o meio da membrana e incubam-se as células em tampão contendo anticorpo anti-ICAM-1 (Genzyme, R&D Systems) quer não conjugado quer conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou biotina. Após uma incubação de 30 minutos à RT, remove-se o tampão e lavam-se as células várias vezes para remover anti-ICAM-1 não ligado. No caso de anticorpo conjugado com FITC, a membrana é visualizada utilizando uma câmara CCD (Stratagene, Imaging Research) com excitação a 485 nm e emissão a 520 nm. Compostos que estimularam a expressão de ICAM-1 resultarão numa zona com fluorescência aumentada devida à ligação da FITC-anticorpo anti-ICAM-1. No caso de anticorpo conjugado com biotina, incubam-se as células em tampão contendo avidina-HRP durante 10 minutos à RT. Remove-se o tampão e remove-se por lavagem a avidina-HRP não ligada. Depois, banham-se as membranas em tampão contendo um substrato de HRP precipitante, tal como tetracloreto de diaminobenzidina (Pierce), e observam-se quanto ao desenvolvimento de cor em áreas onde se induziram as células subjacentes a exprimirem ICAM-1. No caso do anticorpo anti-ICAM-1 não conjugado, faz-se reagir um anticorpo secundário anti-anti-ICAM-1 conjugado com as células seguindo-se o desenvolvimento do sinal com o substrato apropriado para

o conjugado. Capturam-se as imagens com uma câmara CCD. Todas estas variações (FITC, avidina-HRP, e anti-anti-ICAM-1) são repórteres alternativos que deverão dar os mesmos resultados qualitativos - nomeadamente, amostras que afectam a expressão de ICAM-1 podem ser correlacionadas com zonas de sinal aumentado ou diminuído.

Note-se que as matrizes de formato contínuo neste caso são uma membrana e uma folha de plástico. Não é necessário um gel para o CF-HTS.

Exemplo 8: Ensaio CF-HTS de compostos discretos em relação à inibição de neuraminidase

Matriz de amostra

Testou-se uma biblioteca de 528 compostos discretos, estruturalmente relacionados, por CF-HTS. Utilizou-se um Packard Multiprobe MP204 DT para diluir os compostos a partir de frascos em placas de 96 poços e para diluir e transferir os compostos para folhas de plástico. Diluíram-se inicialmente os compostos desde 40 mM em DMSO em frascos até 4 mM em DMSO em placas de 96 poços. Depois, diluíram-se desde 4 mM em DMSO até 200 μ M em 50% de EtOH/H₂O em placas de 96 poços. Transferiram-se estas amostras em duplicados de 1 μ l para folhas de plástico de 8 cm \times 8 cm com um espaçamento médio de 5 mm entre amostras (Bio-Rad cat.# 165-2956) para um total de 192 amostras por folha. Cada mancha de 1 μ l, por conseguinte, continha aproximadamente 200 pmol de um composto particular da biblioteca. Como controlo, uma série de diluições de ácido 2,3-desidro-2-desoxi-N-acetilneuramínico (DANA), um inibidor conhecido de neuraminidase (Boehringer Mannheim #528544) foi distribuído manualmente junto aos compostos sobre cada folha. Secaram-se as folhas numa estufa de vácuo tal que cada composto fosse seco na sua própria localização sobre o plástico.

Matriz de enzima

Antes do ensaio, diluiu-se enzima neuraminidase de influenza 1500 vezes a partir de solução salina tamponada com fosfato, 25% de glicerol, em gel de ágar liquefeito consistindo de 1% de agarose, citrato de sódio 50 mM, pH 6,0, cloreto de cálcio 10 mM a 40°C. Vazou-se um gel de enzima com

8 cm x 8 cm x 0,75 mm gel e solidificou-se por redução da temperatura até 4°C.

Matriz de substrato

Diluiu-se um substrato de neuraminidase de influenza sintético, ácido 2'-(4-metilumbeliferil)-alfa-D-N-acetilneuramínico (cat.#M-8639, Sigma), desde 3 mM em DMSO até 30 μ M em gel de ágar liquefeito e verteu-se de um modo similar para se obter um gel de enzima anteriormente descrito.

Incubação e detecção

Colocou-se a matriz de enzima sobre a matriz de amostra sobre o lado onde os compostos de interesse foram secos. Depois, empilhou-se a matriz de substrato por cima da matriz de enzima. Incubaram-se as matrizes à RT durante 30 minutos. Durante este tempo, o substrato fluorescente apagado e a enzima difundiram-se em conjunto entre os dois géis e o substrato foi clivado pela enzima para produzir um aumento em intensidade de fluorescência. Isto foi monitorizado por excitação a 340 nm e emissão a 450 nm. Compostos que são capazes de inibir a actividade da enzima minimizaram o aumento em intensidade de fluorescência. Como os géis aumentaram em intensidade de fluorescência na maioria das localizações, as áreas que continham inibidores de enzima que se difundiram para o interior do gel a partir da folha de plástico foram visíveis como áreas mais escuras com menor fluorescência. Isto foi facilmente monitorizado por uma Câmara CCD com filtros adequados para controlar os comprimentos de onda de emissão e excitação. A identidade de compostos exibindo zonas inibidoras foi determinada pela localização da zona em relação à matriz de inibidor. Realizou-se uma estimativa quantitativa da IC₅₀ para cada composto, por comparação da fluorescência do controlo de DANA com as quantidades conhecidas de cada inibidor testado.

Testaram-se em duplicado todos os 528 compostos de uma biblioteca. O volume total de gel de enzima usado foi 33 ml, ou 31,25 μ l por teste. Adicionalmente, testaram-se todos os compostos simultaneamente, e as condições de ensaio foram constantes em comparação com o ensaio de 96 poços tradicional. Além disso, conforme ilustrado pela Figura 14, o ensaio foi suficientemente sensível para detectar inibidores tão fracos quanto 100 μ M. Os valores de IC₅₀ estimados para os compostos

activos estavam em boa concordância com os observados para os mesmos compostos, testados pelo ensaio de 96 poços mais dispendioso que requereu 200 μ l por teste. Ver, a tabela de "Resultados do ensaio em gel quantitativo". Este exemplo demonstra que testar séries de compostos com densidade mais elevada reduz custo e tempo. Por exemplo, mesmo uma redução diminuta no espaçamento de 2,5 mm em vez de 5 mm resulta num aumento de quatro vezes no número de compostos testado por unidade de volume. Nesta experiência, isto teria trazido o volume por composto testado para um valor bem inferior a 10 μ l. No entanto, os reagentes são manipulados em forma volumosa, sem a necessidade do equipamento de manipulação de baixos volumes de líquido vulgarmente utilizado em rastreio miniaturizado.

Resultados do ensaio em gel quantitativo

Amostra n.º	Ki máx. aproximado (μ M) a partir de gel	IC50 (μ M) est. a partir do ensaio de 96 poços
34	100	>100
35	80	>100
36	80	42
37	100	>100
38	100	>100
39	100	>100
40	40	32
41	100	>100
42	40	50
43	100	>100
44	>200	>100
45	100	>100
46	100	>100
47	10	7,5
48	100	>100
49	100	>100
50	100	>100

Como um exemplo de seguimento para demonstrar os benefícios desta miniaturização, testaram-se 10 080 compostos discretos por CF-HTS num volume total de gel de enzima de 17 ml (menos do que 2 μ l por teste). Utilizou-se uma Packard Multipette para distribuir um volume de 30 nl de cada amostra separada por 1 mm. Os compostos foram distribuídos em DMSO numa concentração de 5 mM, tal que foram distribuídos sobre o

plástico aproximadamente 150 pmol de cada um. Utilizou-se outra vez DANA como um inibidor de controlo. Para além da titulação de controlo usual fora da série de compostos, incluiu-se uma titulação de controlo na própria série como um teste cego, em que as amostras de controlo foram tratadas do mesmo modo que os 10 080 compostos desconhecidos quando estes foram distribuídos sobre o plástico. Como anteriormente, secaram-se as folhas e utilizaram-se num ensaio de neuraminidase. Rastrearam-se simultaneamente todos os 10080 compostos em menos de uma hora por este método. Uma vez mais, não foram requeridos manipulação de fluidos em microescala e/ou manuseamento de pequenos volumes excepto quando se entregaram os compostos iniciais sobre a folha. A densidade extremamente elevada usada neste ensaio não interferiu com a detecção de inibidores. Por conseguinte, a densidade elevada não complicou a identificação de compostos activos mesmo quando compostos fluorescentes (facilmente observados como pontos mais brilhantes no gel) eram os vizinhos mais próximos de compostos activos. Ver Figura 15.

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para testar simultaneamente uma pluralidade de amostras de substâncias diferentes quanto à sua capacidade para melhorar ou inibir um processo biológico compreendendo,

a) depositar numa série um pequeno volume de cada uma de mais de 96 amostras de substâncias distintas sobre uma matriz, tal que cada substância distinta está centrada no seu próprio local distinto e a identidade de cada substância pode ser determinada a partir do seu local de deposição,

b) colocar a referida matriz em contacto com uma primeira matriz porosa contendo ou transportando um primeiro reagente de ensaio uniformemente disperso e permitir que parte de cada substância se difunda para o interior da referida matriz porosa de um modo tal que a localização espacial de cada substância difundida possa ser correlacionada com o local sobre a referida matriz no qual a referida substância foi originalmente depositada, e

c) conduzir um ensaio para determinar a capacidade de cada substância difundida para melhorar ou inibir o referido processo biológico por observação da interacção de cada substância com o referido reagente de ensaio,

caracterizado por a referida matriz ser uma matriz planar.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1 compreendendo o passo adicional de

b1) colocar a referida primeira matriz porosa em contacto com uma segunda matriz transportando ou contendo um segundo reagente de ensaio uniformemente disperso e permitir que o segundo reagente de ensaio se difunda para o interior da primeira matriz porosa ou permitir que cada substância e o primeiro reagente se difundam para o interior da segunda matriz, no último caso assegurando que a difusão ocorre de um modo tal que a localização de cada substância na segunda matriz pode ser correlacionada com o local sobre a referida matriz planar no qual a referida substância foi originalmente depositada, e

c1) conduzir o referido passo (c).

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2 onde um dos reagentes de ensaio uniformemente dispersos é uma macromolécula.

4. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2 onde um dos reagentes de ensaio uniformemente dispersos é uma enzima.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2 onde um dos reagentes de ensaio uniformemente dispersos é um extracto biológico em bruto.

6. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2 onde um dos reagentes de ensaio uniformemente dispersos é organelos.

7. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2 onde um dos reagentes de ensaio uniformemente dispersos é células inteiras.

8. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2 onde um reagente de ensaio uniformemente disperso são células inteiras transportadas sobre uma superfície de uma matriz porosa planar.

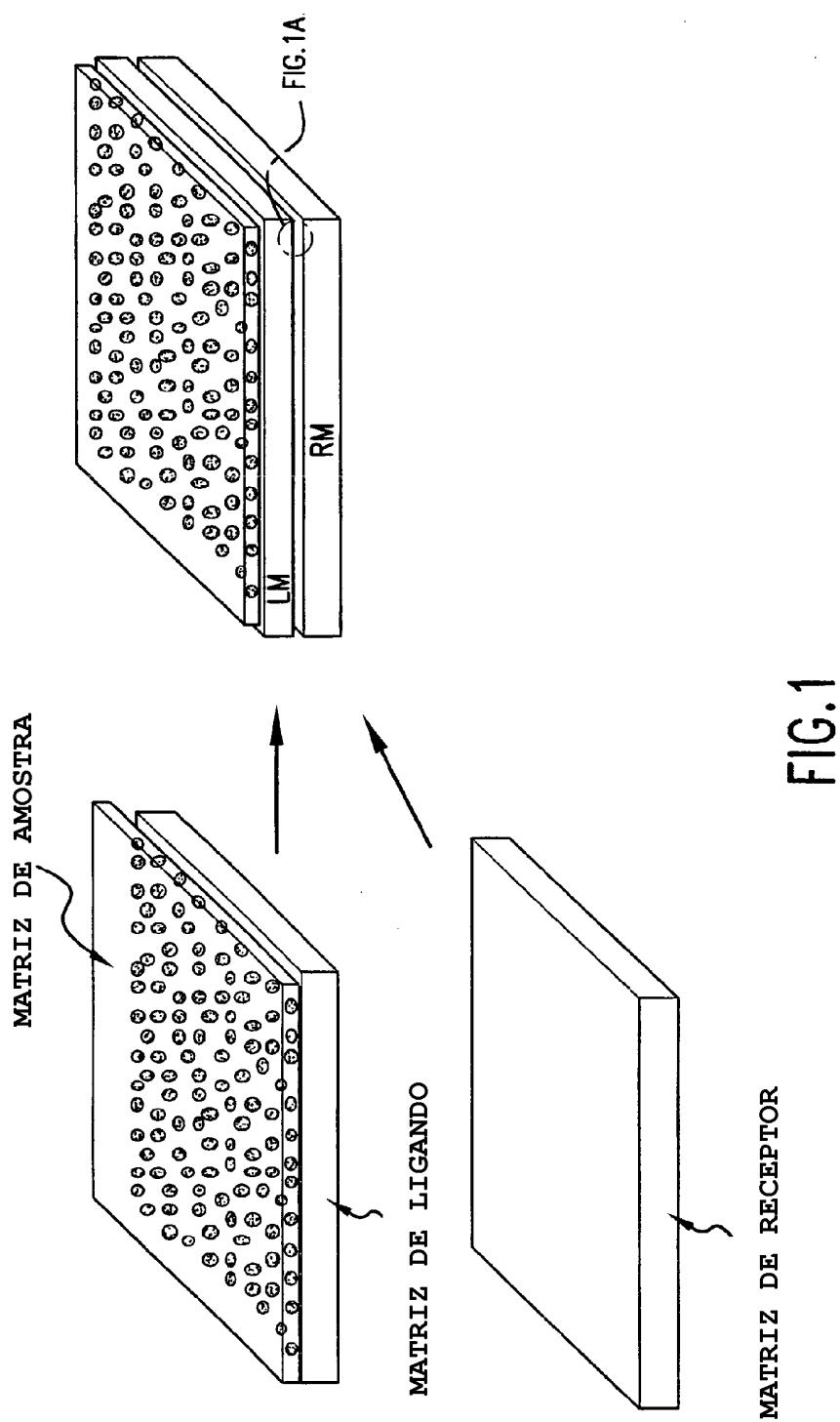
9. Processo de acordo com a reivindicação 8 onde a referida interacção é observada por contacto da referida matriz porosa com uma solução ou suspensão líquida de um reagente ou matriz porosa contendo um reagente que em qualquer caso ajuda na visualização de uma proteína cuja expressão nas referidas células inteiras é o processo biológico que está a ser avaliado.

10. Processo de acordo com a reivindicação 2 onde o primeiro reagente de ensaio é um ligando marcado e o segundo reagente de ensaio é um receptor imobilizado para o referido ligando.

11. Processo de acordo com a reivindicação 10 onde a segunda matriz é lavada para remover qualquer ligando marcado que se difundiu sobre ou para o interior da referida segunda matriz mas não ficou ligado ao referido receptor imobilizado.

12. Processo de acordo com a reivindicação 11 onde a referida segunda matriz é posta em contacto com uma solução ou suspensão líquida de um reagente ou uma matriz porosa contendo um reagente que em qualquer caso ajuda na visualização de ligando marcado não removido pelo passo de lavagem.

Lisboa,



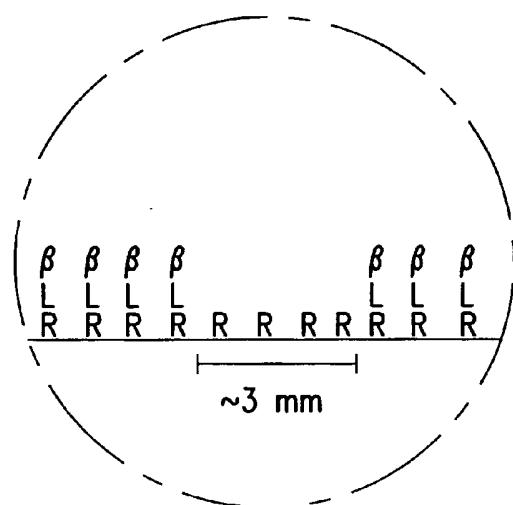
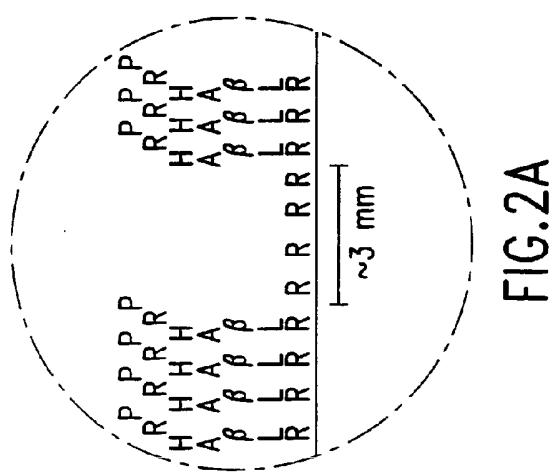
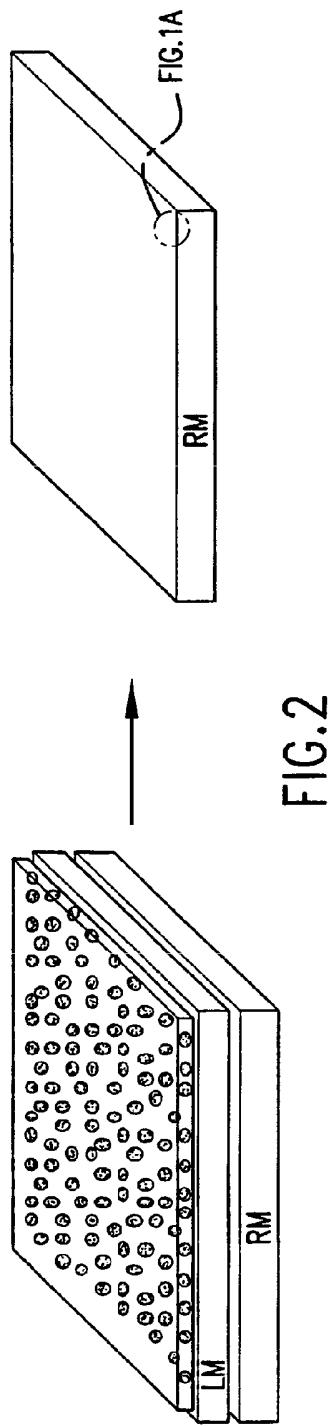
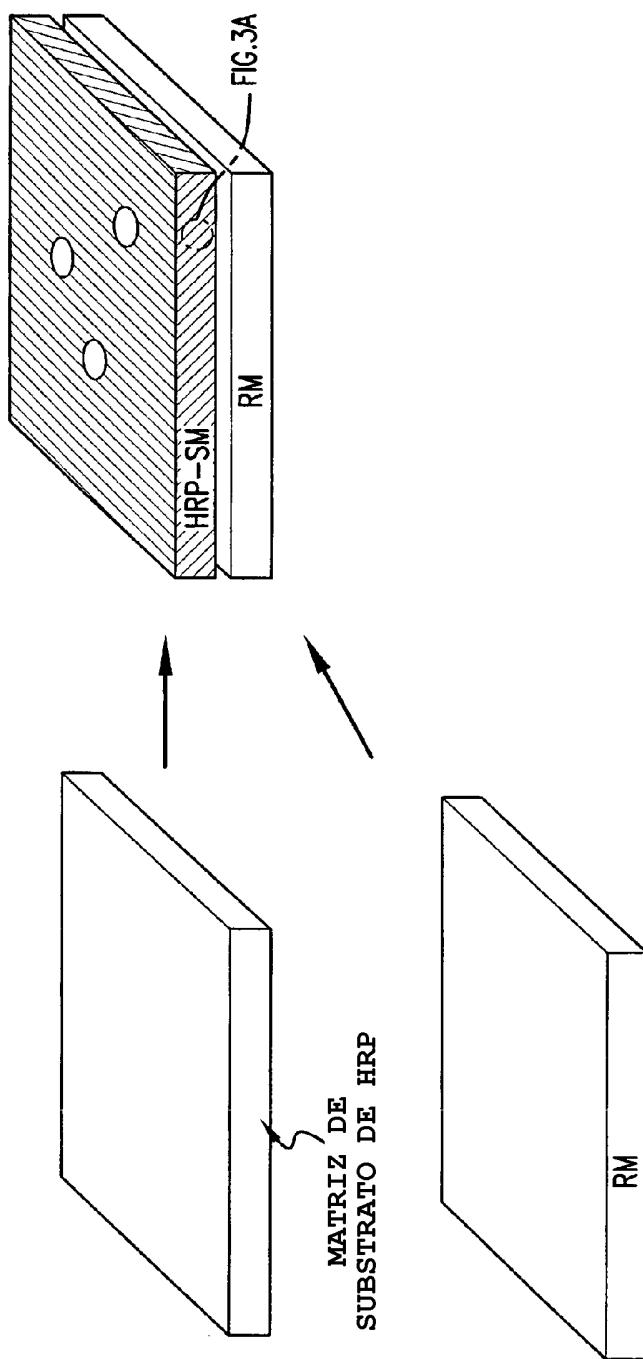


FIG.1A





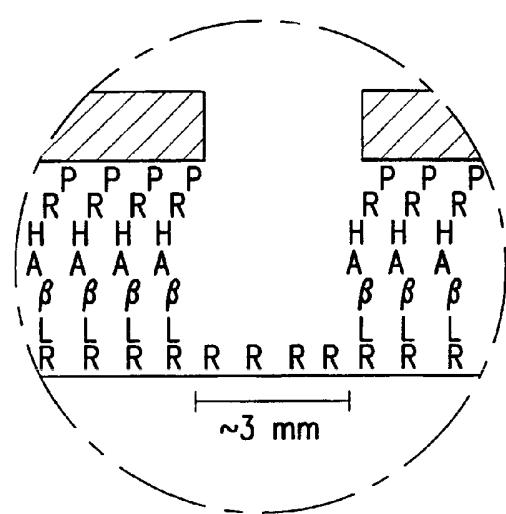
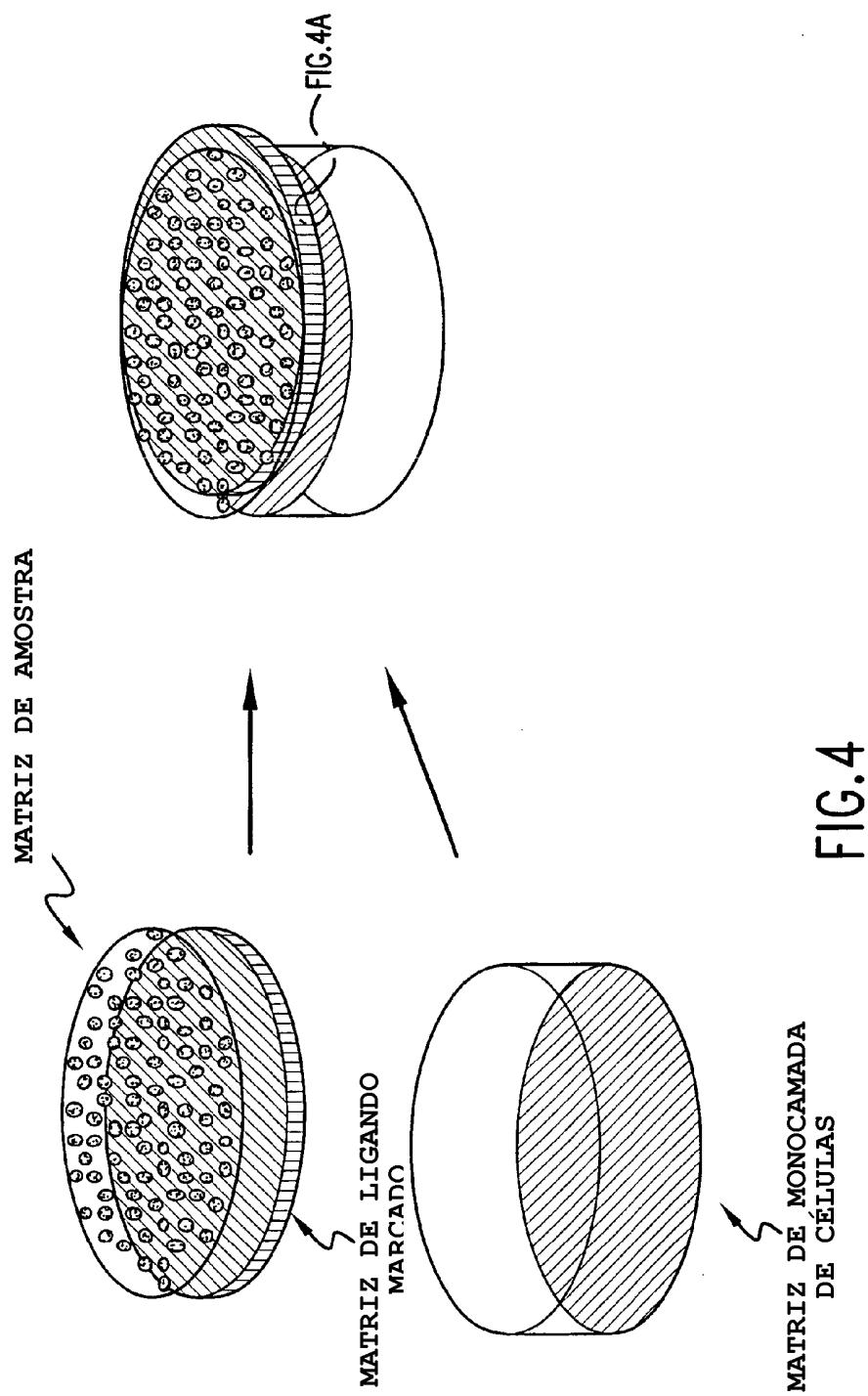


FIG.3A



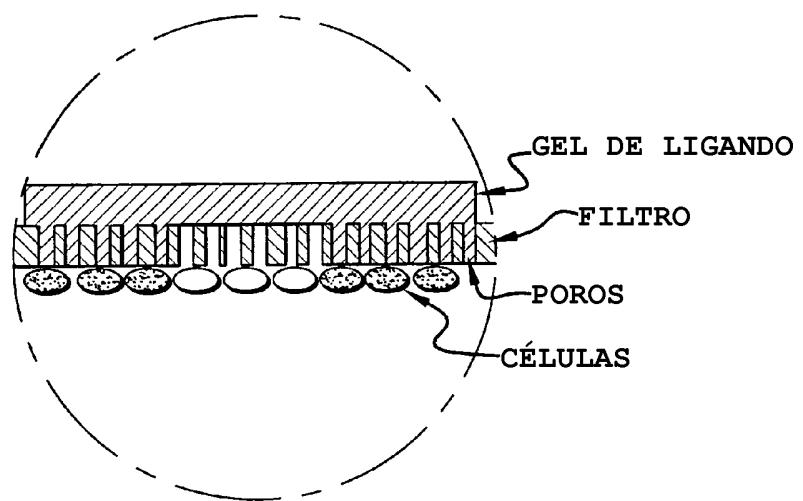


FIG.4A

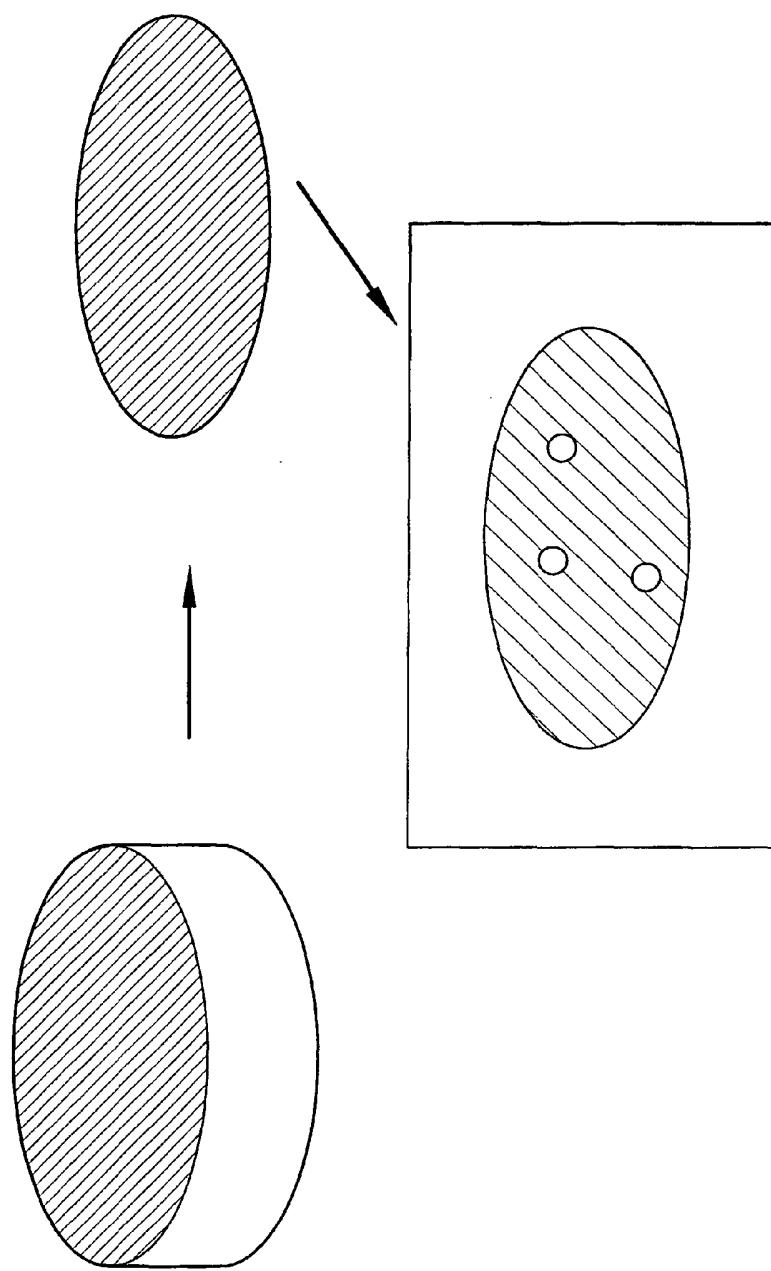


FIG.5

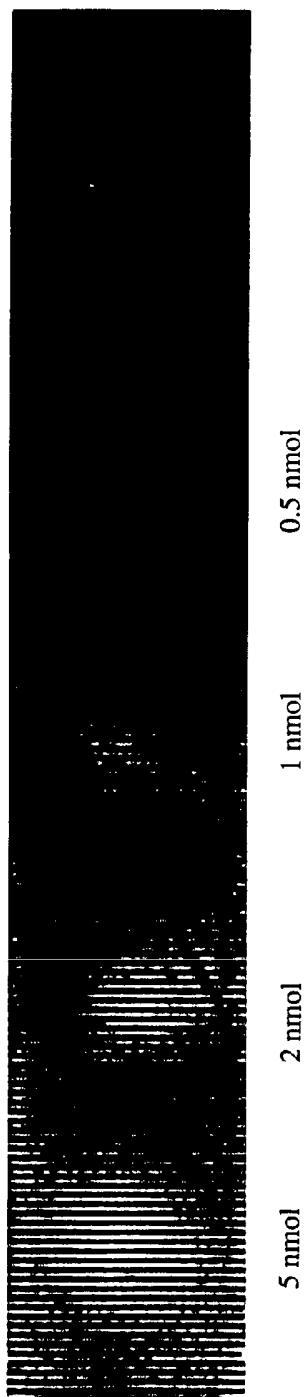


FIG. 6

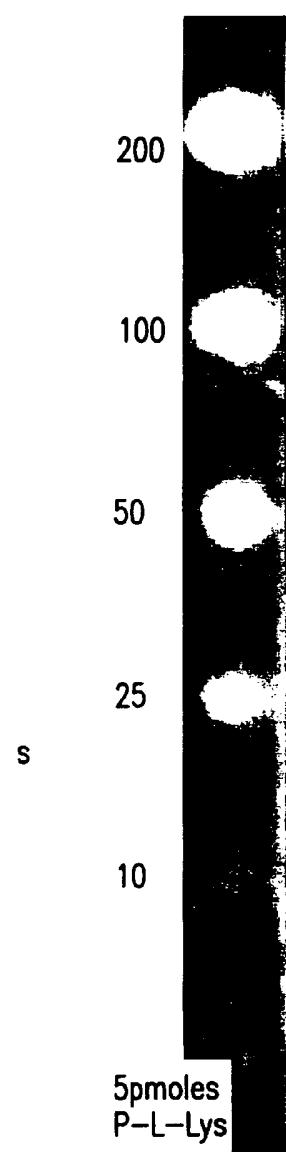


FIG.7

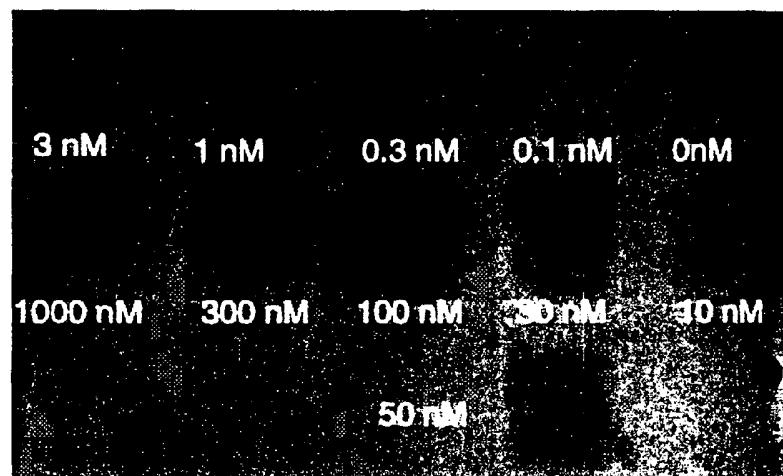


FIG.8A

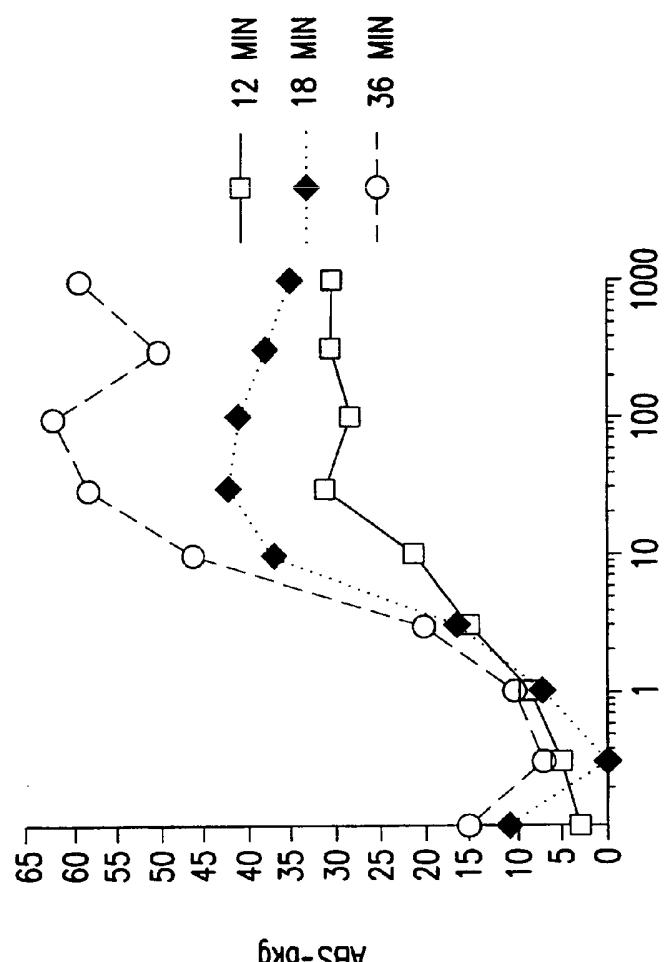


FIG.8B

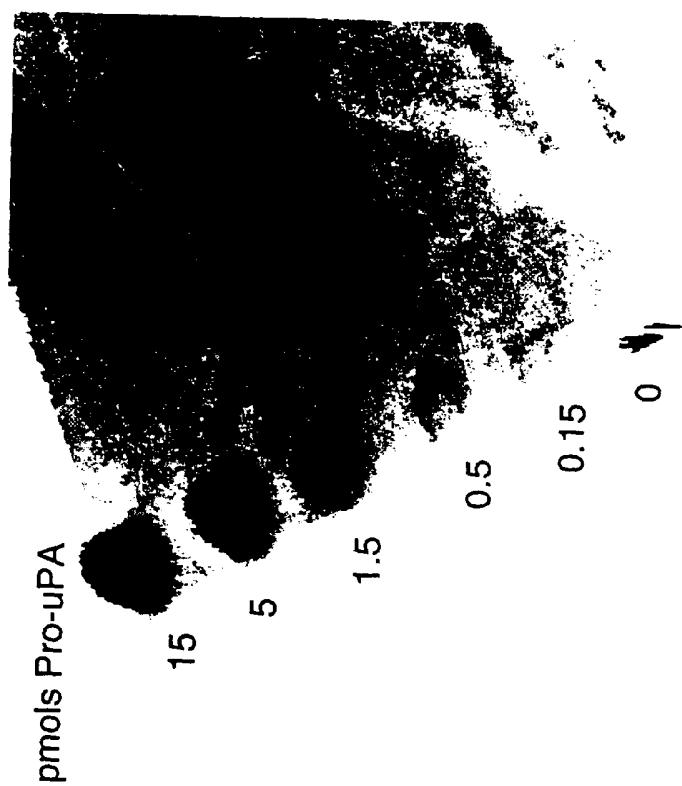


FIG. 9B

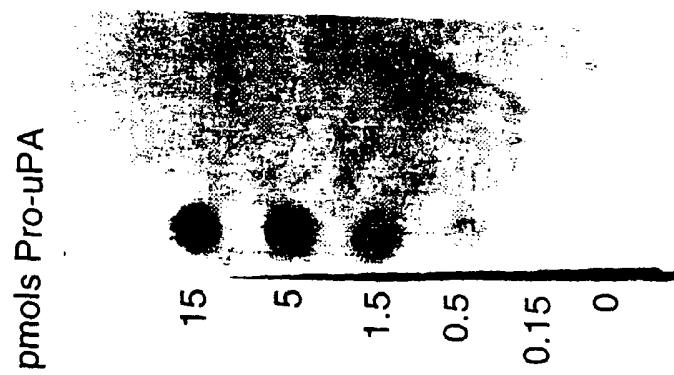


FIG. 9A

ITAM*
(nM)

0.1

0.3

1.0

3.0

10

20

FIG.10

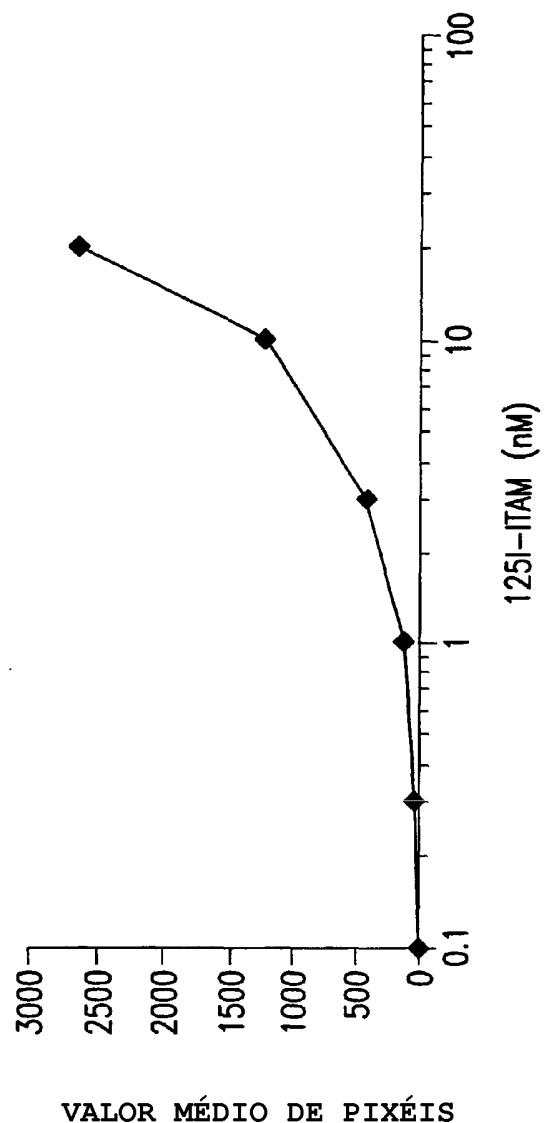


FIG. 11

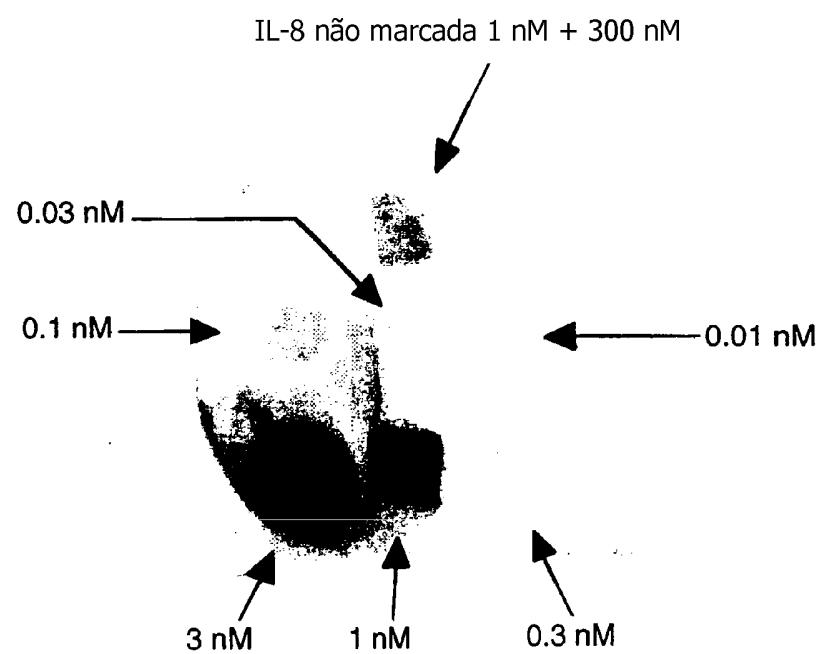


FIG.12

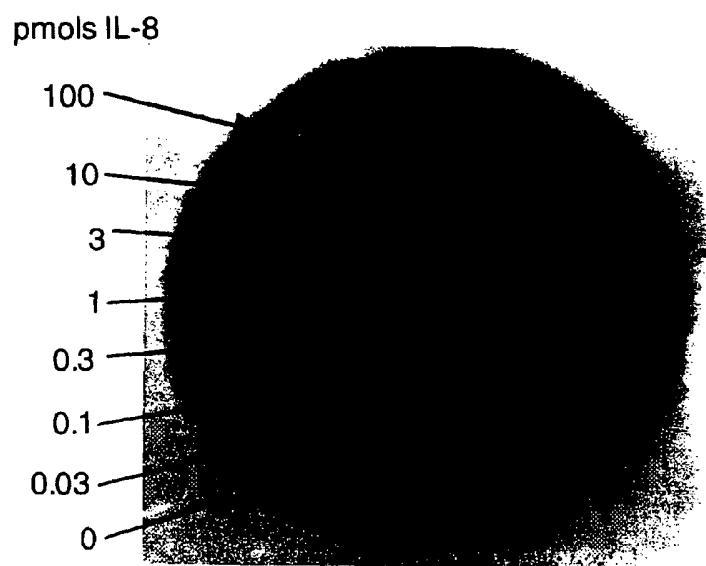


FIG.13

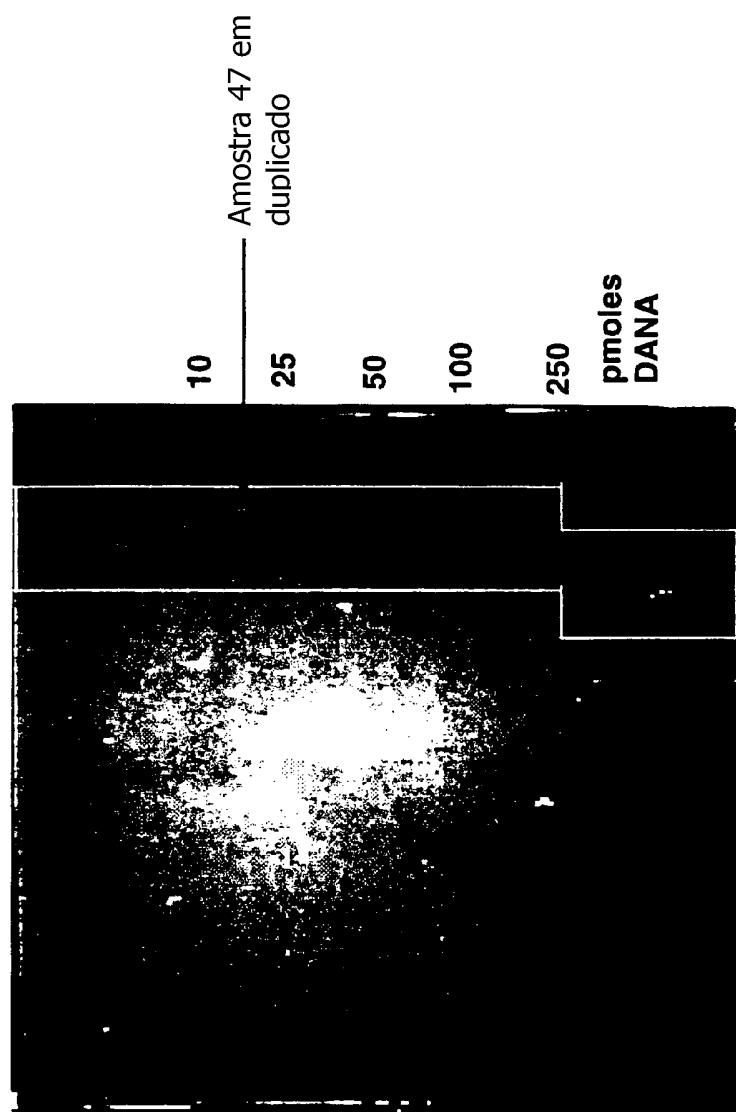


FIG. 14

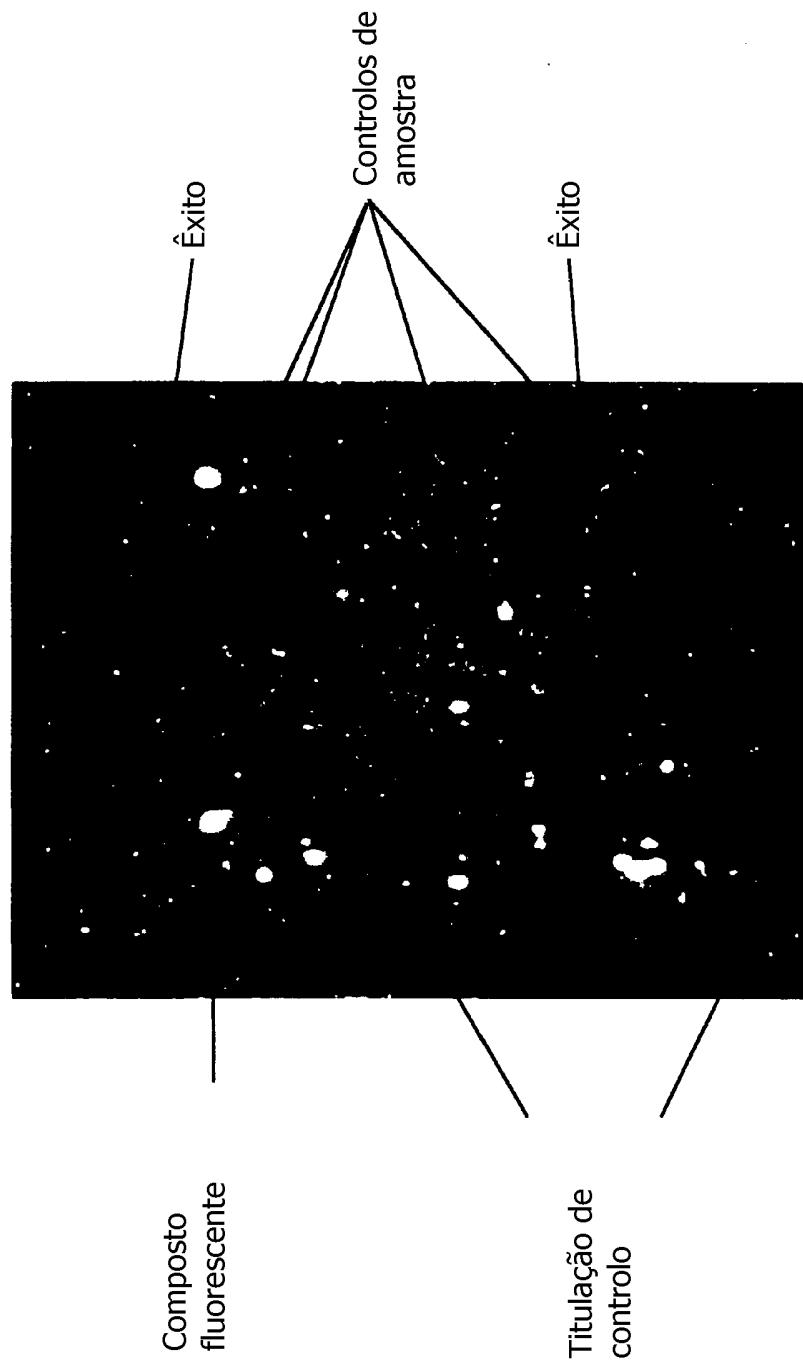


FIG. 15