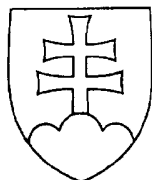


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

286095

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2006):

G01N 33/50

- (21) Číslo prihlášky: **836-2000**
(22) Dátum podania prihlášky: **11. 12. 1998**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **5. 3. 2008**
Vestník ÚPV SR č.: **3/2008**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **08/990 168**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **12. 12. 1997**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **9. 10. 2000**
Vestník ÚPV SR č.: **10/2000**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **20. 2. 2008**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/US98/26465**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO99/30154**
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

(73) Majiteľ: **ABBOTT LABORATORIES, Abbott Park, IL, US;**

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

(74) Zástupca: **ROTT, RŮŽIČKA & GUTTMANN, v. o. s., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob súčasného testovania množstva vzoriek rôznych látok**

(57) Anotácia:
Kontinuálna úprava vysokovýkonného skríningu (CF-HTS) využívajúca najmenej jednu poréznu maticu umožňuje vo farmaceutickom priemysle, aby sa súčasne preskúmavalo veľké množstvo chemických jedincov na široký rozsah biologickej alebo biochemickej účinnosti. CF-HTS je okrem toho užitočný pri uskutočňovaní viacstupňových analytických testov.

SK 286095 B6

Oblasť techniky

Kontinuálna úprava vysokovýkonného skríningu (CF-HTS), používajúca najmenej jednu poréznu maticu, vo farmaceutickom priemysle umožňuje, aby sa skúmalo veľké množstvo chemických entít súčasne na široký rozsah biologickej alebo biochemickej účinnosti. CF-HTS je okrem toho užitočný pri uskutočňovaní viacstupňových analytických testov.

Doterajší stav techniky

Biochemické a biologické analytické testy sú určené na testovanie aktivity v širokom rozpätí systémov v rozmedzí od interakcií proteín-proteín, enzýmovej katalýzy, väzieb malých molekúl na proteíny až do bun-
kových funkcií. Pri „vysokovýkonnom skríningu“ (HTS) sa tieto druhy analytických testov používajú na tes-
tovanie veľkého množstva chemických entít, aby sa zistili predtým neznáme biologické alebo biochemické
účinnosti chemických entít.

Homogénne verus heterogénne testy

Všetky rôzne druhy biologických testov môžu byť rozdelené do dvoch väčších tried: homogénnych a he-
terogénnych testov. Pri homogénnych testoch sú všetky reagenty pridávané spoločne a výsledky sa zmerajú
alebo interpretujú bez akejkoľvek dodatočnej manipulácie. Napríklad na Petriho miske môžu byť rastúce
bunky vystavené chemikálii. Ak je chemikália pre bunky toxická, bude pri jednoduchom pozorovaní indiko-
vať toxicitu, vyjasňujúca sa zóna. V inom prípade sa môžu použiť bunky, ktoré exprimujú proteín, ktorý
mení farbu buniek. V prípade buniek exprimujúcich β -galaktosidázu, rastúcich na agare obsahujúcom x-gal,
sa bunky viac alebo menej zafarbia modro v závislosti od iných biologických a biochemických procesov na
homogénne metódy, tieto iné procesy pracujú pri heterogénnych metódach s efektívnejšími nákladmi a/alebo
s ľahšie dostupnými reagentmi. Komerčne sú dostupné rôzne metódy a súpravy na homogénne techniky, ako
SPA (Amersham), fluorescenčné polarizácie (Jolley a iní) a časovo rozkladaná fluorescencia (Packard a iní),
aby boli vymenované len niektoré. Použitie týchto druhov metód vždy vyvoláva dodatočné náklady a spotre-
bu času. Heterogénne metódy sa pre mnoho testov viac osvedčujú a sú ľahšie pre rýchle zavedenie. Z týchto
dôvodov pokračuje rozširovanie heterogénnych metód, ako je ELISA, väzba na filtre, RIA, bunkové testy s
luciferázou atď. Niektoré z týchto metód budú detailnejšie opísané.

Vysokovýkonný skrining (HTS)

Na vyhľadávanie kandidátov na liečivá sa farmaceutický priemysel po dlhý čas stále viac spoliehal na
HTS knižnice chemických zlúčenín. HTS opisuje metódu, kde sa mnohé jednotlivé zlúčeniny testujú paralel-
ne tak, že sa veľký počet testovaných zlúčenín skúma na biologickú aktivitu simultánne alebo skoro simul-
tánne. Najrozšírenejšie používané techniky bežne využívajú mikrotitračné platne s 96 jamkami. V tejto úpra-
ve sa vykonáva 96 nezávislých testov súčasne na jednotlivých 8 cm x 12 cm plastovej platni, ktorá obsahuje 96
jamiek na reakciu. Typicky vyžadujú tieto jamky objemy testu v rozsahu 50 až 500 μ l. Okrem platní sú ko-
merčne dostupné mnohé nástroje, materiály, pipetovače, automatické techniky, umývačky platní a odpočítacie
platní vhodné pre 96 jamkovú úpravu pre široký rad homogénnych a heterogénnych testov.

Až dosiaľ boli snahy zlepšovať HTS sústredené na zmenšovanie jamiek (miniaturizácia). Keď je zmenšo-
vaná veľkosť jamiek, môže sa zvyšovať počet jamiek na každej platni na uskutočnenie viac paralelných tes-
tov. Ďalej sa znižovaním objemov testu znižujú náklady na reagenty na testovanie. Okrem toho, pretože je
možné paralelne vykonávať testy s menšími objemami testu, je tiež možné súčasne testovať viac zlúčenín na
vyhľadávanie kandidátov na liečivá. Až dosiaľ miniaturizácia výrazne zlepšila 96 jamkovú technológiu po-
skytnutím úpravy s 384 jamkami (96 x 4). Pozri Comley a spol., J. Biomol. Screenine. sv. 2(3), str. 171-78
(1997). V skutočnosti boli publikované aj úpravy s vyššou hustotou, vrátane úpravy s 9600 jamkami. Minia-
turizácia má však neodmysliteľné náklady a komplikácie.

Tieto náklady a komplikácie sa priamo vzťahujú na tri primárne súčasti miniaturizácie skriningovej úpra-
vy. Po prvé sa musí zvládnuť realizácia menších nádobiek na testovanie (trubičky, jamky atď.). Po druhé sa
musí zvládnuť presné rozdeľovanie všetkých na test potrebných reagentov do viac a menších jamiek (spravid-
la uskutočňované pomocou automatických zariadení na kvapaliny, ktoré simultánne rozdeľujú reagenty do
mnohých jamiek). Po tretie sa musí zvládnuť „prečítanie“ výsledkov testov v súbore s vysokou hustotou.

Za daných požiadaviek na súbežne uskutočňované nezávislé testy, každá zložka určuje úlohy a obmedze-
nia, nakoľko je miniaturizácia vhodná alebo efektívna z hľadiska nákladov. Napríklad novšia zmenšená úpra-
va môže vyžadovať úplne odlišnú metódu rozdeľovania reagentov, alebo vyžaduje čítací inštrument, ktorý
má rozlíšenie, citlivosť a technické uskutočnenie, ktoré sú s novšou zmenšenou úpravou kompatibilné. Keď
sa zredukujú veľkosť každej jamky, stáva sa spôsobosť vyrobiť rad nádobiek, rozdeliť reagenty po malých
kvantách a prečítať každú vzorku testu, tiež problematickou, časovo náročnou a nákladnou. Menšia veľkosť

vzorky ďalej tiež zvyšuje štatistické kolísanie od vzorky ku vzorke kvôli nepresnostiam spočívajúcim v rozdeľovaní malých objemov reagentov a v zaznamenávaní slabších signálov vzorky. Okrem toho sotva veľkosť vzorky klesne za určitý bod, prispievajú k väčším nákladom a zložitosti realizácie novšie, miniaturizované úpravy i faktory, ako je odparovanie a povrchové napätie. Na zásadný pokrok v HTS technológii si priemysel vyžaduje možnosť „testov s voľnou úpravou“ alebo testov, v ktorých nie sú fyzikálne bariéry medzi vzorkami. V skutočnosti nikto neopísal použitie voľnej úpravy pri HTS so štandardnými kolekciami oddelených zlúčenín predpovedané typicky ako testovanie malých kvapiek v úprave, v ktorej chýbajú akékoľvek jamky.

Kombinatórne skriningové súbory - metódy gélovej permeácie

S nástupom kombinátornej chémie môžu byť na pevných podkladoch (obvykle perličkách) produkovaných milióny chemických entít. Aj keď 96 jamková úprava bola použitá na preskúvanie súborov na báze perličiek, je táto úprava všeobecne považovaná ako neefektívna, pretože (1) každá perla nesie iba malé množstvo chemickej entity; (2) počet zlúčenín, ktoré majú byť testované je enormne veľký; a (3) s perličkami sa komplikovane manipuluje na mikrotitračných platnách s 96 jamkami.

Aby sa vyhlí problémom vlastným pri skriningu kombinatórnych súborov v úprave s 96 jamkami, uvádzajú niektorí použitie jednoduchých homogénnych testov, ktoré by mohli byť opísané ako „voľná úprava“. Ako príklad bol Jayawickremom a spol. v Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA), sv. 191. str. 1614-18 (marec 1994) publikovaný test používajúci pigmentové bunky (melanocyty) v jednoduchom homogénnom teste pre kombinatórnu peptidovú zbierku. Autori umiestnili do petriho misiek bunky pod agarózu, potom na povrch agarózy umiestnili perly, ktoré niesli kombinatórne zlúčeniny a potom zlúčeniny z perál čiastočne uvoľnili. Aktívne zlúčeniny bolo vidieť ako oblasti tmavého pigmentu, pretože aktívne zlúčeniny spôsobili, že bunky menili farbu, len čo zlúčeniny miestne difundovali do matrice gélu.

Iným recentným príkladom je práca Daniela Chelsky-ho „Strategies for Screening Combinatorial Libraries“ publikovaná na First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening vo Filadelfii, P A (november 7-10 1995). Chelsky umiestnil jednoduchý homogénny enzýmový test na uhličitú anhydrázu dovnútra agarózového gélu tak, aby enzým v géli spôsobil zmenu farby gélu. Na to potom boli dovnútra gélu umiestnené perly nesúce kombinatórne zlúčeniny cestou fotocitlivých spojov a zlúčeniny boli čiastočne uvoľnené UV-svetlom. Zlúčeniny, ktoré inhibovali enzým, boli zaznamenávané ako miestne zóny inhibície majúce menšiu zmenu farby. Konečne v Molecular Diversity. sv. 2, str. 57-63 (1966) opisuje Salmon a spol. metódu podobnú metóde Jayawickreme-ho a spol., pri ktorej sú kombinatórne súbory skúmané na zlúčeniny, ktoré majú cytotoxické účinky na rakovinové bunky rastúce na agare.

Všetky tri príklady sú variácie dlhodobých gélových testov na antibakteriálne alebo protirakovinové činidlá a sú také podobné bežným imunologickým testom, pri ktorých sa v géli zisťujú interakcie antigén/protilátka. Aj keď tieto gélové permeačné testy boli veľmi vhodné na skrining kombinatórnych súborov na báze perál, nikto nepublikoval rozšírenie tejto úpravy na heterogénne testy alebo na súbory, ktoré nie sú na perlách založené. Konvenčná rozumová úvaha odradzovala výskumníkov od testovania vzoriek v kontinuálnej úprave, ktorá by dovoľovala zmiešavanie vzoriek. Medzi obmedzenými druhmi publikovaných testov a záležitosťami, kde vzorky boli spoločne skúmané v kontinuálnej úprave, boli analyzované iba súbory založené na perlách. Vďaka týmto obmedzeniam výskumníci verili, že 96 jamková úprava bola vhodnejšia na heterogénny skrining súborov a nie skrining založený na perlách. Bolo by žiaduce vykonávať heterogénne testy v rámci voľnej úpravy. Bolo by ďalej žiaduce testovať individuálne zlúčeniny v rámci voľnej úpravy.

Podstata vynálezu

Tu opisovaný vynález, kontinuálna úprava vysokovýkonného skriningu (CF-HTS), úspešne uskutočňuje koncept voľnej úpravy pre každý homogénny alebo heterogénny test, ktorý môže byť uskutočňovaný v 96 jamkovej úprave. Okrem toho je CF-HTS takisto užitočný na preskúvanie kombinatórnych súborov pomocou heterogénnych testov a nielen testov homogénnych. Navyše ďalej sa môžu pri CF-HTS analyzovať individuálne zlúčeniny bez nákladov a komplikácií, ktoré sú spojené s miniaturizáciou. Obavy týkajúce sa možnosti, že reagenty a výsledky testovania budú spolu prebiehať spoločne počas nasledujúcich krokov, sa ukázali ako neopodstatnené.

Jedno z uskutočnení vynálezu sa týka spôsobu súčasného testovania množstva vzoriek rôznych látok na ich spôsobilosť zosilňovať alebo inhibovať biologický proces, zahŕňajúci

(a) uloženie malého objemu každej z viac než 96 vzoriek rozdielnych látok v usporiadaní na maticu tak, že každá jednotlivá látka je sústredená na svoje vlastné odlišené miesto a identita každej látky môže byť určená z jej miesta uloženia;

(b) uvedenie tejto matrice do styku s prvou poréznou maticou obsahujúcou alebo nesúcou rovnomerne rozptýlené prvé skúšobné činidlo a umožnenie, aby časť z každej látky difundovala do uvedenej poréznej matri-

ce takým spôsobom, že priestorové umiestnenie každej difundovanej látky môže byť korelované s miestom na uvedenej matici, na ktorom bola uvedená látka pôvodne uložená, a

(c) uskutočnenie testu na stanovenie schopnosti každej difundovanej látky zosilňovať alebo inhibovať uvedený biologický proces pozorovaním interakcie každej látky s uvedeným skúšobným činidlom,

pričom uvedená matrica je planárna matrica.

Iné uskutočnenie sa týka uvedeného spôsobu, ktorý ďalej zahŕňa stupeň

(b1) uvedenia uvedenej prvej poréznej matrice do styku s druhou maticou nesúcou alebo obsahujúcou druhú rovnomerne rozptýlené skúšobné činidlo a umožnenia, aby druhé skúšobné činidlo difundovalo do prvej poréznej matrice, alebo umožnenia, aby každá látka a prvé činidlo difundovali do druhej matrice, pričom sa v poslednom uvedenom prípade zaistí, aby difúzia prebiehala tak, že priestorové umiestnenie každej látky v druhej matici môže byť korelované s miestom na uvedenej planárnej matici, na ktorom bola uvedená látka pôvodne uložená, a

(c1) uskutočnenia stupňa (c).

Podrobný opis vynálezu

Ústrednou myšlienkou CF-HTS je umiestniť testované vzorky do kontextu s poréznu maticou. Metóda zahŕňa umiestnenie jednej alebo viacerých zložiek testu dovnútra, navrch alebo naspodok matrice, ako je gél, plastová fólia, filter alebo iné formy ľahko manipulovateľného pevného podkladu. Keď sa do poréznej matrice zavedú vzorky, difundujú dostatočne pomaly tak, že testy je možné vykonávať bez toho, aby testované vzorky prebiehali spolu. Takto CF-HTS úprava rozdeľuje testované vzorky difúziou, skôr než nepriechodnou bariérou. Ak sa nechajú bežať testy príliš dlho, budú eventuálne testované vzorky a výsledky prebiehať spoločne. Ale pri dôkladnom načasovaní dovoľuje CF-HTS simultánny skríning veľmi vysokej hustoty zlúčenín ešte individuálne, bez potreby plniť jednotlivé jamky alebo reakčné nádoby rozpúšťadlami alebo zložkami testu. K tomu navyše sa v tejto úprave môžu manipuláciou s maticami, ktoré nie sú reakčné komponenty, vykonávať aj zložité heterogénne testy. Manipulácia s maticami na heterogénne testy je úplne bezprecedentná a robí CF-HTS vo svojej schopnosti preskúmať široký rozsah biologických a biochemických procesov tak flexibilný ako 96 jamkovú úpravu. CF-HTS dosahuje ďalej druhy výhod predpokladaných pre miniaturizáciu, bez závažných nevýhod a má jedinečné výhody. CF-HTS využíva široký rad matic a komponent pre testy. Matrice zahŕňajú, ale neobmedzujú sa len na gély zložené z agarózy, akrylamidu alebo iných želatínových materiálov, membrány, filtre a plasty. Matrice môžu byť zložené z materiálov vrátane, ale nielen, z polystyrénu, polypropylénu, iných plastov, papierových vlákien, skla, sklenených vlákien, kremeliny, polykarbonátu, polyesteru, polyvinylidénchloridu a polyetylénu. Maticami môžu byť impermeabilné tuhé látky, porézne tuhé látky ako filtre alebo gély. Zložky testov zahŕňujú, ale neobmedzujú sa len na makromolekuly ako nukleové kyseliny, proteíny a iné syntetické alebo prírodné makromolekuly; bunky, lyzáty buniek, biologické extrakty, orgány a iné zložité biologické entity a zmesi; a malé molekuly ako pufrý, soli, inhibitory, substráty, peptidy, farbivá, nukleotidy, kofaktory, ióny a rozpúšťadla.

CF-HTS test je testom, v ktorom sa mnohopočetné testované vzorky alebo zlúčeniny rozdeľujú difúziou skôr než nepriechodnou bariérou. Kritickou zložkou je zavedenie viacpočetných (viac než 1) testovacích vzoriek dovnútra alebo na poréznu maticu testu, ktorá prípadne obsahuje jednu alebo viac zložiek testu. Porézne matrice testu, obsahujúce komponent(y) na test, sa pripravujú pridávaním, miešaním, liatím, rozmiešovaním alebo namáčaním komponentov testu do matrice. Porézne matrice sa pripravujú tiež spojovaním, natieraním, väzbou, fixovaním, napojením, konjugáciou alebo prichycovaním komponentov testu dovnútra alebo na povrch matrice. Okrem toho sa porézna matrica pripravuje ďalej tiež vytváraním tenkého filmu roztoku alebo kvapaliny na bunkovom podklade, enzýmu alebo inej imobilizovanej zložke testu. Porézne matrice na test sa používajú, aby sa kontrolovalo poradie a/alebo čas pridávania komponentu a rozsah miešania a difúzie, keď sa komponenty testu kombinujú. CF-HTS môže využívať aj matrice neporézne. Neporézne matrice na test sa pripravujú spojovaním, natieraním, viazaním, fixovaním, napojením, konjugáciou alebo prichycovaním komponentov alebo testovaných vzoriek do vnútra alebo na povrch matrice. Použitie neporéznych matic pri CF-HTS fixuje priestorovo jednu alebo viac zložiek testu.

Keď sa zložky testu zavedú na povrch matrice, sú komponenty testu pripojené kovalentne alebo nekovalentne, špecifickými alebo nešpecifickými interakciami s maticami, ktoré sú nederivatizované, derivatizované alebo inak vopred upravené, aby sa pripojenie zložiek testu uľahčilo. Zložka testu je po pripojení priestorovo fixovaná, takže je na účely testu imobilizovaná. V tomto prípade budú musia byť testované vzorky schopné difundovať maticou, aby dosiahli na komponenty testu a/alebo subkomponenty, alebo produkty testu musia byť schopné difundovať maticou, aby dosiahli na testované vzorky.

V jednom alebo niektorom z viac nasledujúcich krokov sa používa najmenej jedna porézna matrica obsahujúca vzorky testu.

(1) Uvedenie povrchu poréznej matrice do kontaktu s najmenej jednou inou (poréznu alebo neporéznu) maticou tak, že vzorky a/alebo viac zložiek testu môžu difundovať cez rozhranie.

- (2) Oddelenie dvoch alebo viac matric, aby sa zastavila interakcia medzi komponentmi a/alebo vzorkami.
 (3) Uvedenie povrchu dvoch alebo viac poréznych matric do kontaktu tak, že môžu zložky testu interagovať.
 (4) Premytie, prepláchnutie alebo eluovanie matrice kvapalnými puframi alebo inými rozpúšťadlami, aby sa odstránili nenaviazané a/alebo nešpecificky viazané zložky testu.

5 (5) Rozdeľovanie, nalievanie, pridávanie alebo namáčanie zložiek testu je v roztoku na matrici alebo filtrovanie uvedených komponentov cez matricu.

(6) Zobrazenie, prečítanie, skenovanie, detegovanie alebo iné zviditeľnenie rádiometrických, fluorescenčných, spektrofotometrických alebo elektromagnetických signálov prítomných na alebo v jednej, alebo viacerých matriciach.

10 CF-HTS poskytuje proti skoršiemu spôsobu mnohé výhody. Neprítomnosť oddelených jamiek eliminuje nutnosť súčasne a presne rozdeľovať do jamiek zložky testu alebo reagenty. Miesto toho sa zložky testu rozdeľujú a miesia homogénnou manipuláciou dohromady. Vzhľadom na to, že zložky testu sa pripravujú pohromade ako homogénny roztok alebo ako matrica, existuje minimálne štatistické kolísanie od vzorky ku vzorke. Na porovnanie, prítomnosť jamiek v 96 jamkovej úprave spôsobuje veľké štatistické kolísanie od

15 vzorky ku vzorke.
 CF-HTS ďalej zaisťuje pre veľký počet zlúčenín skríning s mimoriadne vysokou početnosťou. Dokonca aj keď zaznamenávané zásahy „prebiehajú spoločne“ v obmedzenom rozsahu, je potrebné iba znovu otestovať zlúčeniny, ktoré sú umiestnené blízko zásahu. Tak ako bolo 10 000 testovaných vzoriek sa schopných zredukovať na 50 kandidátov v okolí zviditeľnenej oblasti, je potom ľahké zredukovať 50 kandidátov na aktívnu zlúčeninu(y) i pomocou starej technológie s 96 jamkami.

20 Rozdelením a vysušením jednotlivých zlúčenín na plastových fóliách vo vysoko naplnených súboroch a potom ich aplikovaním v CF-HTS sa odstránia všetky kritické problémy miniaturizácie. Táto úprava nevyžaduje na miniaturizáciu inováciu plastov alebo iných materiálov, pretože miniaturizácia je dosiahnutá jednoducho obmedzením množstva vzorky, ktorá difunduje do matrice. Táto úprava tiež nevyžaduje mikrofluidiká na rozdeľovanie činidiel pre test, pretože celý test prebieha v podstate v „jednej obre jamke“, kde sú reagenty a roztoky manipulované vo veľkom množstve. Rozdeľovanie pomocou mikrofluidík vyžadujú iba testované vzorky. Okrem toho pri tejto úprave existuje omnoho menej štatistických výkyvov, pretože je iba potrebné vyhľadať lokalizované zóny heterogenity v inak homogénnej matrici. Nemusí sa prečítať a porovnávať mnoho rozdielných jamiek. Okrem toho ku všetkým predpokladaným blahodarným stránkam miniaturizácie (náklady, výkon, využitie reagentov, využitie testovaných zlúčenín), poskytuje CF-HTS tiež prekvapujúce výhody, ako je schopnosť uskutočniť väčšinu krokov testov pohromade.

25 Ústredným hľadiskom CF-HTS je pozorovanie, že zložky testu a testované vzorky stranovo nedifundujú rýchlo ani na rozhraniach medzi matricami. Keď sa na príklad agarózový gél umiestni na plastovú platňu, objaví sa výrazná kvapalina na rozhraní povrchu gélu. Keď sa vyžaduje interakcia medzi zložkou testu v géli a zložkou testu na platni (ako v prípade ELISA), je kritické, že komponent v géli je schopný difundovať z gélu von a na dosku. Ale CF-HTS vyžaduje, aby sprievodná stranová difúzia bola značne pomalšia, takže interakcia na platni je lokalizovaná do blízkosti pôvodného umiestnenia zložky z gélu. Tie isté princípy sa týkajú každého rozhrania matrica-matrica medzi gélmi, filtrami alebo povrchmi (alebo každej inej matrice) v akejkoľvek kombinácii. Predstava, že toto difúzne správanie je kontrolovateľné, a že je všeobecne aplikovateľné

40 na rozhranie všetkých matric, je bezprecedentná a protichodná konvenčným predstavám.

Preferovanou metódou zavádzania testovaných vzoriek alebo zlúčenín do matrice (ako gélu alebo navlhčeného filtra) je rozmiestňovanie a sušenie malých objemov každej vzorky na povrchu, ako je povrch plastovej fólie, v takom usporiadaní, že sa dve vzorky nemôžu zmiešať alebo prekryvať a každá je špecificky umiestnená. Keď sa plastová fólia umiestni na matricu, vzorky sa rozpustia a difundujú do matrice v miestach zodpovedajúcich ich vopred definovaným umiestneniam v počiatočnom usporiadaní.

45 Alternatívnym spôsobom rozdeľovania testovaných vzoriek alebo zlúčenín do súboru je rozmiestňovať vzorky na poréznu matricu ako filter, kde objem každej oddelenej vzorky je dostatočne nízky, takže vzorky sa vnútri matrice neprekývajú. Po kontakte s inou poréznou matricou, ktorá obsahuje viac kvapaliny, zlúčeniny difundujú, aby naštartovali test.

50 Preferovanou metódou zavádzania kombinatórnych zlúčenín na báze perál do matrice je rozmiestňovanie perál náhodne alebo v pravidelnom usporiadaní na povrch, ako je povrch plastovej fólie. Perly môžu byť potom spracované tak, aby uvoľnili (odštípili) testované zlúčeniny, pokiaľ sú na perly viazané kovalentne labilným spojom (v praxi je dobre známe fotolytické štiepenie a štiepenie kyselinou v plynnej fáze). Každá zlúčenina je potom nekovalentne spojená s oblasťou obsadenou jej pôvodnou perlou a suché zlúčeniny potom môžu byť zavedené dovnútra alebo na povrch matrice.

55 Alternatívnym spôsobom na zavedenie jednotlivých zlúčenín do matrice je namáčanie alebo iný spôsob nekovalentného pripojenia každej zlúčeniny do alebo na perly. Pri použití tohto spôsobu môže byť veľké množstvo zlúčenín naraz zmiešaných dohromady s perlami tak, že každá perla má na sebe stále jediný komponent. Potom môže byť zmes perál ľahko rozprestrená na povrch na zavedenie do matrice. Tento postup úplne eliminuje nutnosť manipulácie s malým objemom kvapaliny.

Keď počiatočný súbor vzoriek zavedených do matrice pri CF-HTS skúmaní má vysokú hustotu, takže jednotlivé zóny aktivity priestorovo pokrývajú počiatočné umiestnenie viac než jednej vzorky, potom je každá z týchto vzoriek potenciálnym zdrojom pozorovanej aktivity. Pri vyšších počiatočných hustotách, podľa rozmanitosti zlúčenín, ktoré budú v jednotlivých zónach prítomné, bude viac zlúčenín kandidátmi na každú zónu. Zlúčeniny môžu navzájom difundovať, ale budú mať stále svoj vlastný priestorový gradient a nebudú sa kvantitatívne miešať v žiadnom mieste. Preto stred zóny bude stále korelovať s presným umiestnením aktívneho komponentu v počiatočnom súbore. V praxi sú dosť vzácne zásahy, že je bežné opakované testovanie mnohých vzoriek, aby sa zaručila identifikácia aktívnych zlúčenín pre každú aktívnu zónu.

Alternatívnym uskutočnením vynálezu je zavedenie fyzikálnej bariéry (teda v prísnom slova zmysle uskutočnenie nekontinuálnej úpravy) do matric testov, aby sa obmedzila vzdialenosť, po ktorú by mohli vzorky difundovať. Napríklad každý z dvoch gélov obsahujúcich enzým respektíve substrát môže byť pokrývaný pletivom („krájac sušienok“) tak, že každý gél je ďalej rozčlenený na mnoho oddelených polôh. Potom sa ešte uvedú oba gély do kontaktu tak, aby substrát a enzým mohli spolu difundovať dovnútra každého rozčleneného kúska gélu. Potom sa do každého rozčleneného kúska gélu zavedú vzorky tak, aby testy mohli prebiehať úplne nezávisle bez difúzie medzi testami. Toto uskutočnenie efektívne eliminuje niektoré z výhod CF-HTS tým, že zanaša štatistické odchýlky medzi testovanými vzorkami a fixuje objem, a teda obmedzuje signál pri súboroch s vysokou hustotou. Ale toto uskutočnenie bude ešte znamenať výhodu heterogénneho testu založeného na matrici, pri ktorom komponenty testu nepotrebujú byť rozdeľované do veľkého množstva paralelných reakčných nádobiek a eliminuje čiastočné miešanie vzoriek.

gELISA

Enzýmom spojované imunosorpčné testy (ELISA) sú heterogénne testy, ktoré detegujú väzbu medzi Ugandami v roztoku a imobilizovanými receptormi. ELISA vyžaduje mnoho krokov miešania reagentov a vypieranie, ktoré sú ťažko realizované v 96 jamkovej úprave a je možné predstaviť si aj väčší problém, keď sa jamky redukujú z 96 jamkovej úpravy na 384-jamkovú úpravu. Autori vynálezu aplikovali CF-HTS metódu na detekciu inhibície väzby medzi Ugandami a imobilizovanými cieľovými receptormi (gELISA).

Receptorom je každá molekula, ktorá môže viazať inú molekulu. Neobmedzujúcimi príkladmi sú proteíny, peptidy, nukleové kyseliny, sacharidy a komplexy predchádzajúcich príkladov. Receptor je imobilizovaný na jednej z niekoľkých matric (receptorová matrica) vrátane, neobmedzujúci sa však len na plastové povrchy [napr. petriho miska alebo plastová platňa (Nunc)], membrány alebo filtre, ktoré majú vysokú cieľovú väzbovú kapacitu [napr. nitrocelulóza, nylón alebo PVDF (Millipore, Corning Costar, Schleicher & Schuell, BioRad) alebo derivatizované membrány ako SAM membrány (Promega)]. Porézna ligandová matrica (napr. agarózový gél alebo porézna membrána) sa pripraví tak, že sa ligand pre imobilizovaný receptor rozdelí dovnútra alebo na matrici. Testované zlúčeniny alebo vzorky sa rozmiestňujú priamo na ligandovú maticu alebo alternatívne na alebo dovnútra matrice pre testované vzorky [napr. polystyrén (Tekra)], polyvinylidén (napr. od Dow Brands) alebo iné flexibilné plastové fólie, alebo membrány. Testovaná matrica sa uvedie do styku s ligandovou maticou a vzorky sa nechajú difundovať do ligandovej matrice. Po vhodnej inkubačnej perióde sa ligandová matrica uvedie do kontaktu s receptorovou maticou a umožňuje sa, aby ligand a vzorky prišli do kontaktu a potenciálne difúziou reagovali s receptorom (obrázok 1 ukazuje väzbu imobilizovaného receptora R na biotinylizovaný ligand Lβ). Počas inkubácie sa budú ligandy viazať na imobilizovaný receptor, pokiaľ zlúčenina vzorky neinhibuje väzbu ligand/receptor.

Po príslušnej inkubačnej perióde sa receptorová matrica odstráni a premyje vhodným pufrom, aby sa odstránil nenaviazaný alebo nešpecificky viazaný ligand a vzorky. Receptorová matrica sa potom namočí v roztoku obsahujúcom reagenty testu, ktoré budú interagovať s ligandom (napr. antilátka, avidín alebo streptavidín v prípade biotinylizovaného ligandu) a schopnými byť detegované buď priamo (napr. fluorescenciou alebo rádioaktivitou), alebo nepriamo [napr. peroxidázou krenu (HRP), alkalickou fosfatázou (AP) alebo konjugátom β-galaktosidázy]. (Obrázok 2 ukazuje konjugát avidín-HRP, AHRP, pripojený na biotinylizované ligandy). Po príslušnej inkubačnej perióde sa receptorová matrica odstráni z roztoku a premyje sa vhodným pufrom, aby sa odstránil nenaviazaný alebo nešpecificky viazaný reagent. V prípade priamej detekcie signálu sa matrica zobrazí s použitím vhodnej metódy (napr. fotometrickými skenermi, CCD kamerami, filmom, vyvolávacími fosforescencie alebo prístrojmi na detekciu scintilácie). Nepriame signály (napr. HRP alebo AP) vyžadujú dodatočnú reakciu na vyvinutie signálu, dosahovanú rozdelením substrátov alebo iných nevyhnutných reakčných komponentov do alebo na poréznú substrátovú maticu a umiestnenie tejto matrice do kontaktu s maticou receptora. Enzým (napr. HRP alebo AP) potom reaguje so substrátom (obrázok 3). Alternatívne sa precipitujúci substrát zavedie do roztoku namiesto do matrice. Pri každej zobrazovacej metóde oblasti väzby ligand/receptor budú vytvárať viditeľnú reakciu, pretože oblasti, v ktorých bola väzba ligand/receptor inhibovaná, viditeľnú reakciu vytvárajú nebudú.

Väzba bunka/ligand

CF-HTS môže byť taktiež používaný na delegovanie inhibície väzby ligand/bunkový receptor. Pri tradičnom teste sa kombinuje testovaná zlúčenina, radiačne značkové ligandy a bunky, ktoré exprimujú zodpovedajúci receptor v nádobke, ako je jamka. Potom sa poskytne dostatočný čas, aby sa dovolilo receptoru viazať sa na ligand, pokiaľ nebola takáto väzba inhibovaná testovanými zlúčeninami. Akékoľvek z nenaviazaných alebo nešpecificky viazaných komponentov sú z buniek odstránené a meria sa množstvo rádioaktivity pripadajúcej na bunky. Autori vynálezu prispôsobili CF-HTS metódu na detekciu inhibície väzby ligandov na bunky. Bunky exprimujúce žiadaný receptor sú pestované alebo navrstvené na maticu (bunková matica) ako sú, ale neobmedzuje sa to len na ne, gély, filtre alebo membrány [napr. Transwell membrány tkanivových kultúr (Corning Costar) alebo chemotaxné membrány (Neuroprobe)]. Porézne matrice (napr. agarózový gél alebo porézna membrána) sa pripravujú tak, že sa značkový ligand pre receptor rozdelí na alebo do matrice (matrice s ligandom). Testované zlúčeniny sa rozdelia priamo na ligandovú alebo bunkovú maticu alebo alternatívne na alebo do inej matrice [napr. polystyrén (Tekra), polyvinylidén alebo inú plastovú fóliu alebo membránu; membrána so vzorkami]. Membrána so vzorkami sa uvedie do kontaktu s ligandovou maticou a takto sa umožní vzorke difundovať dovnútra ligandovej matrice. Po príslušnej inkubačnej perióde sa ligandová matica uvedie do kontaktu s bunkovou maticou, najlepšie na strane matrice bez buniek a umožní sa, aby dochádzalo ku styku ligandu a vzorky a difúziou k reakcii s receptorom (obrázok 4). Počas inkubácie sa budú značkové ligandy viazať na imobilizované bunky, pokiaľ vzorka neinhibuje väzbu ligand/bunka.

Po inkubácii sa bunková matica oddelí od ligandovej matrice a premyje sa vhodným pufróm, aby sa odstránil nenaviazaný alebo nešpecificky viazaný ligand a vzorka. Bunková matica sa zobrazí s použitím vhodnej metódy (napr. fotometrickými skenermi, CCD kamerami, filmom, fosforografmi alebo prístrojmi na detekciu scintilácie). (Obrázok 5 ilustruje vyvolanie testu na film).

Ako je ukázané CF-HTS, dosahuje všetky výhody predpokladané pre testy s „voľnou úpravou“ a môže byť aplikovaný na všetky rôzne druhy biologických alebo biochemických testov, pri všetkých rôznych typoch úprav a so všetkými rôznymi reagentmi a zariadeniami. Vzhľadom na široké aplikovateľnosti je najlepšie ilustrovaný pomocou nasledujúcich príkladov. Ale tieto príklady ilustrujú preferované uskutočnenie predkladaného vynálezu a neobmedzujú patentové nároky a špecifikácie. Bežný pracovník si ľahko uvedomuje, že zmeny a modifikácie špecifických uskutočnení môžu byť uskutočnené bez odchýlenia sa od rozsahu a ducha vynálezu. Na všetky citácie sa tu nakoniec odkazuje.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1 ukazuje vzorky gELISA testu na neporéznej matrici stýkajúcej sa s jednou stranou poréznej gélovej matrice obsahujúcej reagent testu, ktorá naopak sa stýka s neporéznou maticou nesúcou ďalší reagent testu.

Obrázok 2 ukazuje odstránenie matrice vzoriek gELISA testu a poréznu gélovú maticu, nasledované premytím a prídáním kvapalných reagentov alebo roztokov reagentov na vytvorenie reportného komplexu na neporéznej matrici reagentu.

Obrázok 3 ukazuje predstavu gELISA testu spojením matrice s reportným komplexom s poréznu gélovú maticu obsahujúcou reportný substrát.

Obrázok 4 ukazuje, ako je ligandová matica aplikovaná na povrch filtra protiľahlý tomu povrchu filtra, ktorý nesie bunky.

Obrázok 5 ukazuje, čo sa môže vytvoriť na povrchu filtra nesúceho bunky, keď sa prejaví test.

Obrázok 6 ukazuje výsledok VanA testu s použitím rôznych koncentrácií známeho, od dávky závislého inhibítora.

Obrázok 7 ukazuje výsledok EF-3 testu s použitím rôznych koncentrácií známeho inhibítora.

Obrázok 8 ukazuje kontrolný experiment gELISA testu pre interakciu proteín - proteín.

Obrázok 9 ukazuje gELISA výsledok „inhibície“ pre interakciu proteín - proteín.

Obrázok 10 ukazuje od dávky závislú väzbu radiačne značkovej ITAM na imobilizovanom LCK.

Obrázok 11 mapuje hodnoty pixelov proti ITAM koncentrácií na znázornenie typickej väzbovej krivky väzby ligandu.

Obrázok 12 ukazuje kontrolný experiment pre interakciu ligand-bunka pri radiačne značenom IL-8.

Obrázok 13 ukazuje „inhibíciu“ interakcie ligandu IL-8 s bunkou.

Obrázok 14 ukazuje test pre inhibítory neuraminidázy.

Obrázok 15 ukazuje simultánny test 10 080 jednotlivých zlúčenín na inhibíciu neuraminidázy.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

- 5 Kolorimetrický dvojstupňový gélový test na stanovenie fosfátu generovaného rezistentným vankomycín enzýmom VanA

VanA je kľúčovým enzýmom pri vankomycínovej rezistencii a katalyzuje pripojenie D-alanínu k D-alanínu alebo D-alanínu k D-laktátu. Tento enzým sa obvykle analyzuje vyvolávaním farby z fosfátu, ktorý sa uvoľňuje, keď je enzým aktívny (aktivita VanA spôsobuje hydrolýzu ATP na ADP a fosfát). Vedcom je známe, že D-cykloserín inhibuje VanA spôsobom závislým od dávky, a že sa tento inhibítor používa ako pozitívna kontrola proti iným potencionálnym inhibítorom.

Gél s enzýmom

15 Gél s enzýmom bol pripravený pridaním enzýmu VanA k roztavenej 1 % agaróze (vysokotopiaca sa agaróza Gibco BRL) pri 45 °C v 50 mM HEPES (kyselina N-[2-hydroxyetyl]piperazín-N'-[2-etánsulfónová]), 20 mM MgCl₂, 20 mM KCl, pH 7,3 do konečnej koncentrácie VanA 2 mM. Táto agarová zmes bola potom naliata do BioRad aparátu na formovanie gélu a pri 2 - 8 °C ponechaná 30 minút stuhnúť.

Gél so substrátom

20 Gél so substrátom bol pripravený pridaním ATP, D-alanínu a D-laktátu k roztavenej agaróze tak, aby jednotlivé komponenty mali 1 mM, 1,5 mM, respektíve 1,75 mM a pripravením gélu ako bolo opísané pre gél s enzýmom.

Matrica so vzorkou

25 Rady 1 µl alikvotných podielov série riedení 5000, 2000, 1000, 500, 200, 100 µM D-cykloserínu, známeho inhibítora použitého ako kontrolná vzorka, v 1 : 1 zmesi etanolu a vody, boli rozdelené na kúsok polyvinylidénchloridového (PVDC) filmu a 10 minút ponechané na usušenie.

Inkubácia enzýmu so substrátom v prítomnosti inhibítora

30 Gél s enzýmom bol na 5 minút uvedený do styku s matricou vzorky. Potom bol navrch gélu enzýmom umiestnený gél so substrátom a ponechaný na inkubáciu počas 15 - 20 minút. Potom boli oba gély odstránené a oddelené. Počas inkubácie, kde enzým katalyzuje spojenie substrátov, vytvorí fosfát v celom géli s výnimkou tých zón, v ktorých bol D-cykloserín v dostatočnej koncentrácii, aby inhiboval reakciu.

35 Vizualizácia testu

Na gély s enzýmom a substrátom bola naliata a rovnomerne rozdelená zmes na detekciu fosfátu pozostávajúca z čerstvo pripraveného roztoku 0,15 % Malachitovej zelene a 1,4 % molybdénanu amónneho v 1,33 N HCl. Tieto činidlá reagujú s fosfátom a ako funkciu zvyšujúcich sa koncentrácií fosfátu vyvolávajú stúpajúcou mierou tmavnuce odtiene zelenej. Sfarbenie sa nechalo vyvolávať počas 5 - 10 minút (obrázok 6 ukazuje vývoj sfarbenia gélu, keď sa množstvo inhibítora menilo od 5 nanomol do 0,5 nanomol). Zeleno sfarbené gély boli fotografované CCD kamerou „Stratagene Eagle Eye“. Stupeň, pri ktorom inhibované zóny boli menej zelené, koreloval podľa očakávania s koncentráciou pridaného inhibítora. Preto môže byť tento test použitý na skúmanie inhibítorov VanA pri razení kombinatórnych perál alebo zlúčenín rozdeľovaných na akýkoľvek iný povrch, ktorý je potom uvedený do styku s gélom testu.

45 Tento test tiež ukazuje, že úpravu gélového skriningu je možné prispôsobiť viacstupňovým reakciám. Takéto uskutočnenie je potrebné, aby táto úprava bola použiteľná na široký rad testov, pretože mnoho testov viac stupňov vyžaduje. V tomto prípade VanA test je dvojstupňovým testom enzýmovej aktivity nasledovaným vyvolaním sfarbenia. Homogénne (jednotlivý stupeň) verzie tohto testu nie sú ľahko realizovateľné, pretože sfarbenie vyvolávajúce reagenty a podmienky interferujú s aktivitou VanA a sú teda inkompatibilné s ich dodávaním do agarového gélu. Preto je teda žiaduce priestorové a časové oddelenie týchto dvoch stupňov, obsahujúce najprv test gélu s enzýmom, nasledovaný vyvolaním sfarbenia vo fáze roztoku.

Príklad 2

Dvojstupňový test detekcie fosfátu generovaného *S. cerevisiae*.

55 Elongačný faktor aktivity 3 ATPázy stimulovanej väzbou ribozómov

Keď s ribozómami interaguje fungálny elongačný faktor 3 (EF-3), stimuluje sa aktivita fosfatázy. Autori vynálezu aplikovali pre túto aktivitu CF-HTS. Bol pripravený gél s enzýmom obsahujúci EF-3 (vysoko teplotne citlivý enzým) a kvasinkové ribozómy v pufre EF-3 testu. Pripravený bol tiež gél substrátu obsahujúci 1 mM ATP v pufre testu. Obidva gély obsahovali 2 % dimetylsulfoxidu v nízkotopiackej sa agaróze (Gibco

BRL) a boli pripravené pri 37 °C a ponechané 30 minút stáť pri 4 °C. Na PVDC film boli nabodkované a vysušené (matrica so vzorkou) série riedení poly-L-lyzínu, inhibítora EF-3 použitého ako kontrolná vzorka. Potom po predchádzajúcej inkubácii gélu enzýmu s inhibítormi na matrici vzorky, bol ako v príklade 1 uskutočnený test. Potom bol gél s enzýmom na 20 minút umiestnený do styku s gélom so substrátom. Ako v príklade 1 boli gély s enzýmom a substrátom odfarbované farbou vyvolávajúcou zmesou Malachitovej zelene s molybdénanom amónnym. Gél s enzýmom bol potom zobrazený CCD kamerou. Škvry inhibítora sa objavujú ako svetlejšie zóny v zelenom pozadí. Obrázok 7 ukazuje vývoj sfarbenia na géli, kde sa množstvo inhibítora menilo od 5 pikomol do 200 pikomol. Výsledky ukazujú od dávky závislý signál inhibítora, indikujúci, že pri tomto teste môžu byť preskúvané zlúčeniny, aby sa odhalili nové EF-3 inhibítory. Príklad 2 demonštruje užitočnosť CF-HTS spolu s komplikovanosťou spôsobenou prítomnosťou organel alebo iných surových biologických zmesí alebo extraktov.

Príklad 3

15 Nepriama gELISA detekcia sfarbenia inhibítorov interakcie proteín - proteín

Ako bolo diskutované, je ELISA obvykle používaná na detekciu inhibície ligand - receptor, kde sú receptory imobilizované v mikrotitračných jamkách. Páry „ligand - receptor“ používané pri ELISA môžu obsahovať každý pár viažucich sa molekúl od proteínov alebo iných makromolekúl až do malých molekúl. Tieto testy sú komplexnými, viacstupňovými testami, ktoré vyžadujú imobilizovanie receptora, inkubovanie receptora s ligandom, premytie na odstránenie nechceného nešpecificky zadržovaného ligandu, ktorý by inak mohol spôsobovať vysoký signál pozadia, viazanie zviditeľňujúcich činidiel (napr. špecifické protilátky ligandu konjugované s reportným enzýmom) na ligand viazaný k receptoru a generovanie viditeľného signálu poskytnutím substrátu pre reportný enzým. Je zrejmé, že komplexnosť ELISA viedla HTS priemysel k záveru, že ELISA nemôže byť adaptovaná pre test s voľnou úpravou. Napriek tomu však autori vynálezu adaptovali tento komplexný, viacstupňový test na CF-HTS úpravu na analýzu rôznych interakcií proteín - proteín, proteín - ligand a väzieb iných ligandov.

Aktivátor plazminogénu urokinázového typu (uPA) sa viaže na jemu zodpovedajúci receptor (uPAR). Interakcia uPA/uPAR bola dokázaná pri metastáze rôznych typov rakoviny. Autori vynálezu adaptovali tradičný uPA/uPAR ELISA na CF-HTS s použitím vyčistených receptorov a ligandov.

30

Matrica uPAR

Plastové platne (7,5 cm x 11,5 cm od Nunc, Inc. Naperville, IL) boli cez noc pokryté 15 ml 118 nM vyčisteného uPAR vo fosfátom pufovej soľanke (PBS) (Life Technologies, Grand Island, NY) pri pH 7,4 a 4 °C. Po pokrytí plastových platní cez noc bol roztok uPAR dekantovaný a zvyšné väzbové miesta na plastovej platni boli blokovanie pridaním 15 ml PBS, obsahujúcom 1 % (hmotn./obj.) kazeínu a inkubovaná 2 hodiny pri teplote miestnosti (RT). Po blokovaní bol blokačný roztok dekantovaný a plastová platňa bola päťkrát premytá 20 ml pracieho pufru pozostávajúceho z 0,05 % Tween 20 (monolaurát polyoxyeténorbitanu) v PBS. Po premytí bola plastová platňa sušená 10 minút pri RT. Bolo to načasované tak, že krátko na to mohla byť plastová platňa použitá v opísanom teste, aby sa zabránilo preschnutiu matrice, ktoré by mohlo viesť ku strate aktivity.

40

Matrica β -uPA

Na účely testu bola používaná uPA označená biotínom (b-uPA). Gély obsahujúce β -uPA boli pripravené namáčaním β -uPA do agaru kvôli vyhnutiu sa vysokým teplotám (čo je opakom liatia do roztaveného agaru z príkladov 1 a 2). Agar bol pripravený najprv miešaním 0,1 g agarózy (Sigma, St. Louis, MO) s 10 ml PBS, zahriatím dokiaľ sa neroztopila a potom odliatím do prístroja na gél 8 x 7 x 0,075 cm³ (Bio-Rad, Hercules, CA). Po stuhnutí (buď pri izbovej teplote, alebo 4 °C) boli gély pri 4 °C cez noc namočené do 15 ml β -uPA (okolo 10nM) v pufré testu pozostávajúcom z PBS, 0,05 % Tween-20 a 0, 1 % kazeínu (obidvoje od Sigma, St. Louis, MO). Hneď pred použitím bol gél 20 minút sušený pri RT.

50

Matrica so vzorkou

Ako kontrolná vzorka inhibítora β -uPA/uPAR väzby bol za neprítomnosti známeho inhibítora väzby uPA/uPAR s malou molekulou, použitý nebiotinylovaný uPA (Pre-uPA). Päť mikrolitrové alikvotné podiely 0, 0,03, 0,1, 0,3, 1 a 3 μ M pro-uPA v pufré testu boli rozmiestnené na PVDC film (Dowbrands L. P, Indianapolis, IN) a 2 h sušené pri RT.

55

Inkubácia uPAR s pro-uPA a β -uPA

Matrica so vzorkou bola umiestnená na jednu stranu gélu obsahujúceho β -uPA so suchými bodkami pro-uPA do styku s povrchom gélu s β -uPA. 10 minút bolo pri RT ponechané, aby pro-uPA do gélu difundoval. Na to potom druhá strana gélu s β -uPA bola umiestnená na plastovú platňu, aby sa β -uPA (pôsobiaci ako li-

60

gand) a pro-uPA (pôsobiaci ako kompetitívny inhibítor) nechali interagovať s uPAR na povrchu plastovej platne. Väzba/kompetitívna reakcia boli inkubované pri RT počas 20 minút. Po inkubácii bola plastová platňa oddelená od gélu a rýchlo 4-krát premytá 20 ml výpieračieho pufru. Roztok konjugátu avidín-peroxidáza krenu (avidín-HRP) bol pripravený rozriedením avidín-HRP (Sigma, St. Louis, MO) 1 až 25 000 v pufré testu a pridáním 15 ml k plastovej platni. Reakcia bola 10 minút inkubovaná pri RT s nasledujúcim dekantovaním roztoku avidín-HRP a premytím plastovej platne ako hore. Plastová platňa bola 20 minút sušená.

Avidín sa v avidín-HRP viaže na biotín špecificky tak, že iba tie oblasti matrice, kde sa prejaví väzba „ligand/receptor“, budú eventuálne vykazovať vývoj sfarbenia. Tie oblasti matrice, kde je väzba „ligand/receptor“ kompetitívne inhibovaná účinkom pro-uPA, sfarbenie vykazovať nebudú.

Vyvolanie sfarbenia

Gél na vyvolanie sfarbenia obsahujúci kolorimetrický HRP substrát (OPD gél) bol pripravený rozpustením dvoch tabliet hydrochloridu o-fenyléndiamínu (OPD) v 7 ml rozpúšťadla (oboje z „Abbott kit no. 6172-30“, Abbott Labs., Abbott Park, IL) a spojením tohto roztoku s roztokom agarózy získanom roztavením 0,1 agarózy v 1 ml vody. 10 ml vzniknutej zmesi bolo odliatych do miniproteín II prístroja pre gél 8 x 7 x 0,075 cm a 15 minút pri 4 °C ponechaných stuhnúť. Gél bol zo sklenených platní odlievacieho stojana prenesený na PVDC film alebo flexibilnú plastovú fóliu a pri RT bol 10 minút ponechaný sušiť sa na vzduchu. Potom bol prenesený na iný PVDC film alebo flexibilnú plastovú fóliu, aby sa 10 minút ponechala sušiť druhá strana. Potom bol OPD gél umiestnený na plastovú platňu na začiatok vývoja sfarbenia. Počas inkubácie OPD, v rôznych časoch, bola plastová platňa umiestnená navrch filtra prepúšťajúceho pás 440 nm (Omega Optical, Inc., Brattleboro, VT), ktorý striedavo bol navrchu difúznej platne s optickými vláknami osvetľovanými svetelným zdrojom Fiber-Lite (oboje od Dolan-Jenner Industries, Inc., Lawrence, MA). Vznikajúce obrázky boli získané CCD kamerou (systém „Eagle Eye“, Stratagene, La Jolla CA).

Kontrolný pokus

Obrázok 8 ukazuje kontrolný pokus pre príklad 3. V obrázku 8A boli štvorčeky agarózy (1 cm²) namočené do roztokov s rôznymi β-uPA koncentráciami, ako je naznačené pod každým štvorčekom (s výnimkou 50 nM roztoku, ktorý je označený naľavo od štvorčeka agarózy). Potom, keď boli štvorčeky agarózy inkubované na plastovej platni s imobilizovaným uPAR, boli odstránené. Plastová platňa bola potom omytá a oblasti matrice, kde došlo k β-uPA/uPAR väzbe boli zviditeľnené, ako je opísané. Obrázok 8B ukazuje krivku priemerých hodnôt pixelov (bez pozadia) pre každý štvorček (ako bolo určené analýzou digitálneho obrázka z digitálnej kamery pomocou softvéru „NIH Image Analysis“) proti koncentrácii β-uPA v každom štvorčeku agarózy v rôznom čase počas vyvíjania sfarbenia OPD. β-uPA získané z agarózového gélu mali typickú väzbovú krivku receptor - ligand s polmaximom väzby (K_d) okolo 3 - 5 nM, čo je konzistentné s publikovanými hodnotami pre túto reakciu pri štandardnej ELISA a iných testoch, ktoré tento parameter merajú. Obrázok 8 ukazuje, že nepriamy kolorimetrický signál generovaný pri gELISA je kvantitatívne závislý od rozsahu interakcie ligand - receptor.

Výsledky kompetície pro-uPA/β-uPA

Obrázok 9 ukazuje inhibíciu β-uPA/uPAR väzby pomocou pro-uPA. Škvry v obrázku 9A vyznačujú oblasti, kde bola inhibovaná β-uPA/uPAR väzba. Teda sa v týchto oblastiach avidín-HRP neviazal. V dôsledku toho HRP sa substráty v OPD géli na generovanie vývoja sfarbenia nereagoval. Obrázok 9B je alternatívnou cestou zobrazenia dát toho istého CCD obrázka, ktorá zvyšuje schopnosť ľudského oka vidieť kvantitatívnu titráciu.

Príklad 4

Priama radiometrická detekcia inhibitorov interakcie proteín - proteín

Aktivácia T-buniek je súčasťou imunitnej odozvy tela. Aby nastali v priebehu aktivácie T-buniek prípady v tomto smere, musí p56lck (LCK proteín) interagovať s ITAM oblasťou (s imunoglobulínom súvisjúca aktivačná jednotka na báze tyrozínu) cytoplazmových domén receptora antigénu T-buniek. Zlúčeniny, ktoré inhibujú túto interakciu proteín - proteín, sú potenciálnymi imunosupresívami. Autori vynálezu použili CF-HTS na analýzu tejto interakcie proteín - proteín, pri ktorej je LCK imobilizovaný na membráne.

LCK matrica

Biotinylovaný LCK sa imobilizuje na biotín zadržujúcej membráne (SAM membrána) (Promega Corp., Madison, WI) preliatím prúžku 11 cm x 2 cm 5 ml 3 mM LCK v PBS obsahujúcom 5 mM DTT (ditiotreititol) na 10 minút pri RT, po čom sa pufr odstráni. Je to načasované tak, aby SAM membrána mohla byť v opísanom teste použitá krátko na to (počas minút).

ITAM* matrica

Agarózový gél obsahujúci radiačne značený ITAM peptid (ITAM*) sa pripraví zmiešaním 0,1 g agarózy s 10 ml pufru, zahrievaním dokiaľ nedôjde k roztaveniu a potom odliatím do prístroja na gél 8 x 7 x 0,075 cm. ITAM* sa do finálnej koncentrácie 10 nM pridáva práve pred odlieváním alebo alternatívne namáčaním po stuhnutí gélu.

Matrica so vzorkou

Vzorky, ktoré majú byť podrobené skriningu sa rozdelia na plastový povrch alebo PVDC a vysušia sa, aby vznikla matrica so vzorkami.

Inkubácia a vizualizácia ITAM*, LCK a testovaných vzoriek

Matrica so vzorkami sa uvedie do styku s jednou stranou gélu s ITAM* tak, že testované vzorky môžu difundovať do gélu s ITAM*. Na to sa druhá strana gélu s ITAM* uvedie do styku so SAM membránou, na ktorej bol imobilizovaný LCK. Po 15 - 45 minútovej inkubácii sa SAM membrána odstráni, premyje a zobrazí fosforografom alebo filmom. Inhibítory interakcie ITAM - LCK sú indikované zónami nižšej rádioaktivity, čo na zobrazení zodpovedá nižšej intenzite signálov.

Kontrolný pokus pre väzbu ITAM*/LCK

Agarózové gély sa pripravujú zmiešaním 0,1 g agarózy s 10 ml pufru, zahrievaním dokiaľ nedôjde k roztaveniu a potom odliatím do prístroja na gél 8 x 7 x 0,075 cm. Po stuhnutí sa z gélu vypichajú koliečka s priemerom 1 cm a cez noc sa pri 4 °C namočia do 400 ml pufru s 0,1, 0,3, 1, 3, 10 a 20 nM ITAM značkoványm s ^{125}I (Amersham, Arlington Heights, IL). Gélové koliečka sa potom z roztoku vyberú a ponechajú počas 20 minút pri RT na usušenie. Potom sa umiestni na LCK - imobilizovanú SAM membránu a inkubuje 45 minút pri RT. Gély sa odstránia a membrány sa štyrikrát premyjú pufrum. Po vysušení sa SAM membrány zobrazia pomocou fosforografu.

Obrázok 10 naznačuje na dávke závislej od väzby medzi ^{125}I - ITAM a imobilizovaným LCK na SAM membráne.

Obrázok 11 ukazuje diagram priemerných hodnôt pixelov (bez pozadia) pre každý ^{125}I -ITAM gél (ako bolo stanovené analýzou digitalizovaného obrazu z fosforografu pomocou softvéru ImageQuant od Molecular Dynamics) proti ^{125}I -ITAM koncentrácii v gélovom koliečku. ^{125}I -ITAM poskytnutý z gélu do imobilizovaného LCK mal typickú väzbovú krivku receptor - ligand.

Príklad 5

Test reportného génu celých buniek s použitím úpravy gél/filter

Obličkové bunky, známe ako HEK bunky, boli transfikované plazmidom, ktorý obsahuje promótor základnej zložky cyklickej AMP odozvy (CREB) spojený s génom luciferázy (reportný gén luciferázy od Promega). Keď sú transfikované bunky podrobené pôsobeniu forskolínu, indukuje sa expresia reportného génu luciferázy. Potom, keď sa k HEK bunkám pridá biologický pufr, obsahujúci substrát luciferázy (hmyzí luciferín od Promega) a vhodné kofaktory (20 mM Tricinu pH 7,8, 0,1 mM EDTA, 33 mM koenzýmu A, 0,5 mM adenosín trifosfátu a 1 mM MgCl_2), generuje sa emisia fotónov, ktorá môže byť pomocou bežnej inštrumentácie delegovaná.

Matrica s bunkami

Bunky boli v kultúre podrobené pôsobeniu trypsínu, prenesené do Corning/Costar TRANSWELL™ membrány (3 mikrónový polykarbonátový filter s plastovou prstencovou podložkou) a cez noc inkubované pri 37 °C, 5 % CO_2 v prítomnosti média na kultiváciu tkaniva. Potom bolo médium z membrány odstránené a filter, ku ktorému boli bunky prichytené, bol 15 minút na vzduchu sušený a krátko potom použitý v uvedených krokoch.

Matrica s vyvolávačom

Gél obsahujúci vyvolávač expresie luciferázy sa pripraví pridaním 12 ml 10 mM výťažku forskolínu (Sigma, výťažok v etanole) do 6 ml 1 % nízkotopiaceho agarózového gélu. Gél sa pri teplote miestnosti stuží forskolínom na konečnú koncentráciu 20 mM.

Matrica so vzorkami

Vzorky, ktoré by mohli blokovať indukciu forskolínom sa rozmiestnia a sušia na oddelených miestach na PVDC s vysokou hustotou.

Inkubácia reagentov a detekcia inhibície

Strana PVDC s inhibítorom sa inkubuje s géлом obsahujúcim vyvolávač. Potom sa gél obsahujúci forskolinový vyvolávač umiestni na bezbunkovú stranu matrice s bunkami pripravenými, ako je uvedené. Tie sa spolu inkubujú pri 37 °C a 5 % CO₂ 20 minút. Potom sa gél s forskolínom odstráni a matrica s bunkami sa inkubuje pri 37 °C a 5 % CO₂ ďalšie štyri hodiny kvôli maximálnej expresii konštruktu luciferázy. Na detekciu enzymatickej aktivity (alebo jej inhibície), sa bunková matrica filtra fyzicky odstráni od svojho podložného prstenca a umiestni do petriho misky. Petriho miska sa zaplavi substrátom luciferázy (hmyzí luciferín od Promega) v biologickom pufre s príslušnými kofaktormi, aby sa vyvolalo svetlo ako signál. Pretože signál je lokalizovaný vnútri imobilizovaných buniek exprimujúcich luciferázu, výsledkom inhibítorov počiatočného indukčného kroku budú zóny s nižšou emisiou fotónov.

Príklad 6

CF-HTS gél/filter na priame stanovenie inhibítorov interakcií ligand - bunka

Väzba ligand - receptor na povrchoch buniek iniciuje v bunkách signálne cesty, ktoré na konci vedú k funkčným odozvám (napr. proliferácia alebo sekrécia biologicky aktívnych substancií). Pri regulácii biologických odoziev buniek pri chorobných stavoch sa často usiluje o inhibíciu ligandových väzieb na povrchu buniek. Všeobecnou metódou na vyhodnotenie inhibítorov väzby ligand/bunkový receptor je zhodnotenie schopnosti inhibítora redukovať väzbu medzi prírodným, radiačne značeným ligandom a bunkami. To zahŕňa inkubáciu buniek s radiačne značeným ligandom a inhibítorom, nasledovanou odstránením nenaviazaného a nešpecificky viazaného, radiačne značeného ligandu premytím a potom zmeraním množstva viazanej rádioaktivity.

Interleukín-8 (IL-8) je chemotaktický chemický druh, vyskytujúci sa pri zápaloch vo väzbe na receptory na rôznych typoch buniek. Autori vynálezu vyvinuli CF-HTS test ligand - bunkový receptor na hodnotenie inhibítorov tejto interakcie.

Matrica s bunkami

HEK bunky (ATCC, Bethesda, MD) exprimujúce IL-8 receptor boli nakladené na membránový filter s priemerom 75 mm (Corning Costar Corp., Cambridge, MA) s hustotou okolo 20 miliónov buniek na platňu. Na prichytenie sa k membránovému filtru boli ponechané cez noc v pufre (RPMI od Life Technologies, Grand Island, NY) obsahujúcom 10 mM Hepes (Sigma, St. Louis, MO) pri pH 7,2 a 37 °C. Potom, keď boli bunky prichytené na filter, boli médiá odstránené a bunky boli premyté čerstvým pufróm, aby sa odstránili akékoľvek neprichytené bunky. Filtre boli obrátené stranou s bunkami nadol a šikmo natočené, aby mohol prebytok médií otekať a potom boli 20 minút sušené. Bolo to načasované tak, že matrica s bunkami mohla byť bezprostredne použitá v opisovanom teste.

Matrica s ligandom

Matrica s ligandom bola pripravená nasiaknutím IL-8 značeného ¹²⁵I (Amersham, Inc., Arlington Heights, IL) do agarózového gélu vytvoreného zmiešaním 0,1 g agarózy s 10 ml pufru, zahrievaním dokiaľ nedôjde k roztaveniu a potom odliatím do prístroja na gél 8 x 7 x 0,075 cm. Gély boli namáčané cez noc pri RT, za pomalého miešania na rotujúcej doske (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ). Po nasiaknutí boli gély, práve pred použitím, sušené 20 minút pri RT. Bolo to načasované tak, že gél mohol byť bezprostredne použitý v teste.

Matrica so vzorkami

Radiačne neznačený IL-8 (Genzyme Corp., Cambridge, MA) bol za neprítomnosti známeho inhibítora väzby IL-8/bunkový receptor použitý ako kontrolná vzorka inhibítora na sledovanie inhibície väzby ¹²⁵I-IL-8 na HEK bunky. Na plastovú fóliu ako PVDC bolo rozdelených po jednom mikrolitry 0, 0, 03, 0, 1, 0, 3, 1, 3, 10 a 100 μM IL-8 a sušené bolo 1 h vo vákuu pri RT.

Inkubácia

Matrica so vzorkou bola umiestnená na jednu stranu matrice s ligandom tak, že vysušené bodky s IL-8 prichádzajú do styku s povrchom gélu. Gél bol otočený, aby sa nechala 10 minút pri RT sušiť druhá strana, a aby mohol „inhibítor“ difundovať do gélu. Na to potom boli gély umiestnené na tú stranu matrice s bunkami, kde bunky neboli. Na reakciu vzniku väzby sa nechalo inkubovať 45 minút pri RT. Potom boli gély odstránené a strana membrány bez buniek bola 4-krát premytá pufróm. Membrány sa nechali úplne vysušiť pred tým, než boli odstránené zo svojej plastovej prstencovej podložky. Potom boli membrány zobrazené buď X-lúčmi na film alebo fosforografom (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Obrázok 12 ukazuje odozvu dávky pre ¹²⁵I-IL-8 v agarózových géloch difundujúcich cez matricu s bunkami a tvoriacich väzbu s HEK bunkami exprimujúcimi receptor IL-8a. Ako je naznačené, boli niektoré z

Obrázok 13 ilustruje výsledky pokusu kompetitívnej inhibície. Inhibícia väzby medzi ^{125}I -IL-8 a HEK bunkami je vyznačená svetlými škvrkami. Je tiež hneď zrejmé, že inhibícia neznáčkovaným IL-8 je kvantifikovateľne závislá od dávky. Tieto dáta znamenajú, že inhibitory, v tomto prípade predstavované neznáčkovaným IL-8, môžu prejsť matricou s bunkami a redukovať väzbu medzi ^{125}I -IL-8 a bunkami.

Test gél - menej funkčné bunky na filtri

Zmeny bunkových funkcií sa často merajú sledovaním účinkov testovaných zlúčenín alebo vzoriek na reportné systémy vmanipulované do buniek. Príklady zahrnujú pozorovanie účinku na syntézu fluoreskujúcich intracelulárnych proteínov ako zelený fluoreskujúci proteín (GFP), extracelulárne proteíny ako receptory alebo adhézne molekuly, alebo špecifické enzýmy ako luciferázu, chlórámfenikolovú acetyltransferázu, alebo β -galaktosidázu (Promega). Najprv sa s bunkami inkubujú testované zlúčeniny. Potom sa bunky ponechávajú, aby vo vhodnom čase exprimovali reportný proteín (môžu to byť minúty, hodiny alebo dni). Potom sa priamymi metódami (napr. GFP) alebo nepriamymi metódami (napr. ELISA techniky s proteínmi viazanými na membránu) analyzuje úroveň reportného proteínu. Ďalej, v prípade enzýmov, môže byť bunka rozrušená, aby sa mohol extrahovať reportný proteín a analyzovať enzýmovú aktivitu. Pri iných testoch funkčných buniek sa meria správanie alebo lokalizácia špecifických molekúl ako farbív alebo radiačne značených metabolitov pri odozve na stimuláciu receptora alebo zmenách fyziológie buniek, ako je potenciál membrány.

ELISA test merania účinku zlúčenín na expresiu intercelulárnej adhéznejskej molekuly-1 (ICAM-1) môže byť pre CF-HTS upravený nasledovne. Endotelových buniek exprimujúcich ICAM-1 bolo okolo 5000 buniek/mm² nakladených na polykarbonátovú chemotaxnú membránu (Neuroprobe). Bunky boli v médiu inkubované cez noc pri 37 °C. Médium bolo odstránené a membrány sa nechali čiastočne usušiť 10 minút pri RT. Vzorky alebo zlúčeniny, ktoré boli testované na indukciu ICAM-1, boli sušené na plastových fóliách a uvedené do styku s tou stranou vlhkej membrány, kde neboli bunky. Zlúčeniny sa ponechali 1 h pri 37 °C interagovať s bunkami vo vlhkej komore a potom boli bunky zmočené v médiu a inkubované 5 h pri 37 °C.

Po poskytnutí času, v ktorom bunky indukovaný proteín syntetizovali, bolo médium z membrány odstránené a bunky boli inkubované v pufre obsahujúcom anti-ICAM-1 protilátku (Genzyme, R&D systémy) buď nekonjugovanú, alebo konjugovanú s fluoresceín-izotiokyanátom (FITC) alebo biotínom. Po 30 minútach inkubácie pri RT bol pufor odstránený a bunky boli niekoľkokrát premyté, aby sa odstránil nenaviazaný anti-ICAM-1. V prípade konjugovanej FITC protilátky bola membrána zobrazená s použitím CCD kamery (Stratagene, Imaging Research) s excitáciou pri 485 nm a emisiou pri 520 nm. Zlúčeniny, ktoré stimulovali expresiu ICAM-1, budú rezultovať v zóne so zvýšenou fluorescenciou vďaka viazaniu FITC-anti-ICAM-1 protilátky. V prípade protilátky konjugovanej s biotínom sa bunky inkubujú pri RT 10 minút v pufre obsahujúcom avidín-HRP. Pufor sa odstráni a nenaviazaný avidín-HRP sa vymyje. Membrány sa potom namočia do pufru obsahujúceho substrát precipitujúci HPR ako tetrachlorid diaminobenzidínu (Pierce) a pozoruje sa vývoj sfarbení v miestach, kde podložené bunky boli indukované, aby či sa exprimovanie ICAM-1. V prípade nekonjugovanej anti-ICAM-1 protilátky sa s bunkami nechá reagovať konjugovaná sekundárna anti-anti-ICAM-1 protilátka a potom nasleduje vyvolanie signálu príslušným substrátom pre konjugát. Obrázky sa snímajú CCD kamerou. Všetky z týchto variácií (FITC, avidín-HRP a anti-anti-ICAM-1) sú alternatívnymi stanoveniami, ktoré by mali poskytovať tie isté kvalitatívne výsledky - totiž vzorky, ktoré ovplyvňujú expresiu ICAM-1 môžu byť korelované k zónam zvýšeného alebo zníženého signálu.

Je treba poznamenať, že matrice na kontinuálnu úpravu v tomto prípade sú membrána a plastická fólia. Pre CF-HTS nie je gél nevyhnutný.

CF-HTS test jednotlivých zlúčenín na inhibíciu neuraminidázy

Zbierka 528 jednotlivých, štruktúrne príbuzných zlúčenín bola testovaná pomocou CF-HTS. Na riedenie zlúčenín z fľaštičiek do 96-jamkových platní a na riedenie a transfer zlúčenín na plastovej fólii bol použitý Packard Multiprobe MP204 DT. Na začiatku boli zlúčeniny zriedené zo 40 mM v DMSO z fľaštičiek na 4

mM v DMSO do 96-jamkových platní. Potom boli zriedené zo 4 mM v DMSO na 200 μ M v 50 % EtOH/H₂O v 96-jamkových platniach. Tieto vzorky boli v 1 μ l duplikátoch prenesené na plastové fólie 8 cm x 8 cm, priemerne s 5 mm rozstupmi medzi vzorkami (Bio-Rad kat. č. 165 - 2965), pre celkom 192 vzoriek na fólii. Každá 1 μ l bodka teda obsahovala približne 200 pmol jednotlivej zlúčeniny zo zbierky. Ako kontrola boli na každú fóliu blízko zlúčeninám ručne rozdelené série riedení 2,3-dehydro-2-deoxy-N-acetylneuraminovej kyseliny (DANA), známeho inhibitora neuraminidázy (Boehringer Mannheim č. 528544). Fólie boli vysušené vo vákuovej sušiarňi tak, že každá zlúčenina bola vysušená na svojom vlastnom mieste na fólii.

Matrica s enzýmom

Pred testom bol enzým chrípkovej neuraminidázy 1500-krát nariedený z fosfátom pufovej soľanky s 25 % glycerolu do skvapalneného agarového gélu pozostávajúceho z 1 % agarózy, 50 mM citrátu sodného pH 6,0 a 10 mM chloridu vápenatého pri 40 °C. Bolo odliatych 8 cm x 8 cm x 0,75 mm enzýmového gélu a stužené znížením teploty na 4 °C.

Matrica so substrátom

Syntetický substrát chrípkovej neuraminidázy, 2'-(4-metylbelferyl)- α -D-N-acetylneuraminová kyselina (Sigma, kat. č. 8636), bol zriedený z 3 mM v DMSO na 30 μ M do skvapalneného agarového gélu a to bolo odliate podobným spôsobom, ako je opísané pre gél s enzýmom.

Inkubácia a detekcia

Matrica s enzýmom bola umiestnená na matrici so vzorkou na tú stranu, kde boli usušené zlúčeniny, o ktoré ide. Potom bola matrica so substrátom naskladaná navrch matrice s enzýmom. Matrice boli inkubované 30 minút pri RT. V tomto čase zhášaný fluorescenčný substrát a enzým difundovali spolu medzi dvoma gélmi, substrát bol enzýmom štiepený a spôsoboval vzrast intenzity fluorescence. Bolo to monitorované excitáciou pri 340 nm a emisiou pri 450 nm. Zlúčeniny, ktoré sú schopné inhibovať aktivitu enzýmu, vzrast intenzity fluorescence znižovali na najmenšiu mieru. Ako pri géloch vzrástla vo väčšine miest intenzita fluorescence, oblasti, ktoré obsahovali inhibitory enzýmu, ktoré difundovali do gélu z plastovej fólie, boli vidieť ako tmavšie miesta s nižšou fluorescenciou. To sa ľahko monitorovalo pomocou CCD kamery s vhodnými filtrami na kontrolu vlnových dĺžok emisie a excitácie. Identita zlúčenín vykazujúcich zóny inhibície bola stanovená podľa umiestnení zón vzhľadom na matricu s inhibítorom. Porovnávaním fluorescence DANA kontroly so známymi množstvami každého testovaného inhibitora bolo pre každú zlúčeninu uskutočnené kvantitatívne stanovenie IC₅₀.

Všetkých 528 zlúčenín zbierky bolo testovaných dvojmo. Celkový objem použitého gélu s enzýmom bol 33 ml alebo 31,25 μ l na test. Ďalej boli všetky zlúčeniny testované súčasne a podmienky testu boli v porovnaní s tradičným 96-jamkovým testom konštantné. Navyše ďalej, ako ukazuje obrázok 14, bol test dostatočne citlivý, aby delegoval inhibitory so silou iba 100 μ M. IC₅₀ hodnoty nájdené pre aktívne zlúčeniny dobre súhlasia s tými, ktoré boli zistené pre tie isté zlúčeniny pri nákladnejšom 96-jamkovom teste, ktorý na test vyžadoval 200 μ l. Pozri tabuľku „Výsledky kvantitatívneho gélového testu“. Tieto príklady ukazujú, že testovanie zlúčenín v skupinách s vysokou hustotou znižuje náklady a čas. Napríklad aj menšia redukcia rozstupu zlúčenín na 2,5 mm namiesto 5 mm má za následok štvornásobný vzrast počtu zlúčenín testovaných v jednotke objemu. V tomto pokuse by to na testovanú zlúčeninu prinieslo zníženie objemu pod 10 μ l. S reagentami sa ešte zachádza pohromade, bez nutnosti mať zariadenie na manipuláciu s malými objemami kvapalín používaných pri miniaturizovanom skriningu.

Ako príklad sledovaný na demonštráciu výhod tejto miniaturizácie bolo pomocou CF-HTS testovaných 10 080 jednotlivých zlúčenín pri celkovom objeme enzýmového gélu 17 ml (menej než 2 μ l na test). Na rozmiestnenie 30 nl každého zo vzoriek oddelených po 1 mm bola použitá „Packard Multipette“. Zlúčeniny boli rozmiestňované v DMSO pri koncentrácii 5 mM tak, že približne 150 pmol každej zlúčeniny bolo nanosených na plast. Ako kontrolný inhibitor bol znova použitý DANA. Okrem obvyklej kontrolnej titrácie mimo súbor zlúčenín, bol vnútri samotného súboru zahrnutý slepý pokus, pri ktorom boli kontrolné vzorky ošetrované rovnako ako 10 080 neznámych, keď boli rozmiestňované na plast. Ako predtým boli fólie usušené a použité v teste s neuraminidázou. Všetkých 10 080 vzoriek bolo touto metódou súčasne preskúmaných za menej než jednu hodinu. Opäť nebolo potrebné mikrofluidikim a/alebo manipulácia s malými objemami okrem okamihu, keď boli zlúčeniny na počiatku rozmiestňované na fóliu. Extrémne vysoká hustota pri tomto teste neinterferovala s detekciou inhibitora. Navyše ďalej vysoká hustota nekomplikovala identifikáciu aktívnych zlúčenín, aj keď fluorescenčné zlúčeniny (ľahko pozorovateľné v géli ako jasnejšie škvrny) boli v najbližšom susedstve aktívnych zlúčenín. Pozri obrázok 15.

Výsledky kvantitatívneho gélového testu

Vzorka č.	Približné max. Ki (μM) z gélu	IC ₅₀ (μM) zistené pri 96-jamkovom teste
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

5

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob súčasného testovania množstva vzoriek rôznych látok na ich spôsobilosť zosilňovať alebo inhibovať biologický proces, zahŕňajúci

10 (a) uloženie malého objemu každej z viac než 96 vzoriek rozdielnych látok v usporiadaní na maticu tak, že každá jednotlivá látka je sústredená na svoje vlastné odlišené miesto a identita každej látky môže byť určená z jej miesta uloženia;

15 (b) uvedenie tejto matrice do styku s prvou poréznuou maticou obsahujúcou alebo nesúcou rovnomerne rozptýlené prvé skúšobné činidlo a umožnenie, aby časť z každej látky difundovala do uvedenej poréznej matrice takým spôsobom, že priestorové umiestnenie každej difundovanej látky môže byť korelované s miestom na uvedenej maticu, na ktorom bola uvedená látka pôvodne uložená, a

(c) uskutočnenie testu na stanovenie schopnosti každej difundovanej látky zosilňovať alebo inhibovať uvedený biologický proces pozorovaním interakcie každej látky s uvedeným skúšobným činidlom, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že uvedená matica je planárna matica.

20 2. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že ďalej zahŕňa stupeň (b1) uvedenia uvedenej prvej poréznej matrice do styku s druhou maticou nesúcou alebo obsahujúcou druhé rovnomerne rozptýlené skúšobné činidlo a umožnenia, aby druhé skúšobné činidlo difundovalo do prvej poréznej matrice, alebo umožnenia, aby každá látka a prvé činidlo difundovali do druhej matrice, pričom sa v poslednom uvedenom prípade zaistí, aby difúzia prebiehala tak, že priestorové umiestnenie každej látky v druhej maticu môže byť korelované s miestom na uvedenej planárnej maticu, na ktorom bola uvedená látka pôvodne uložená, a (c1) uskutočnenia stupňa (c).

3. Spôsob podľa nároku 1 alebo 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že jedným z rovnomerne rozptýlených skúšobných činidiel je makromolekula.

30 4. Spôsob podľa nároku 1 alebo 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že jedným z rovnomerne rozptýlených skúšobných činidiel je enzým.

5. Spôsob podľa nároku 1 alebo 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že jedným z rovnomerne rozptýlených skúšobných činidiel je surový biologický extrakt.

6. Spôsob podľa nároku 1 alebo 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že jedným z rovnomerne rozptýlených skúšobných činidiel sú organely.

35 7. Spôsob podľa nároku 1 alebo 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že jedným z rovnomerne rozptýlených skúšobných činidiel sú celé bunky.

8. Spôsob podľa nároku 1 alebo 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že rovnomerne rozptýleným skúšobným činidlom sú celé bunky nesené na jednom povrchu planárnej poréznej matrice.

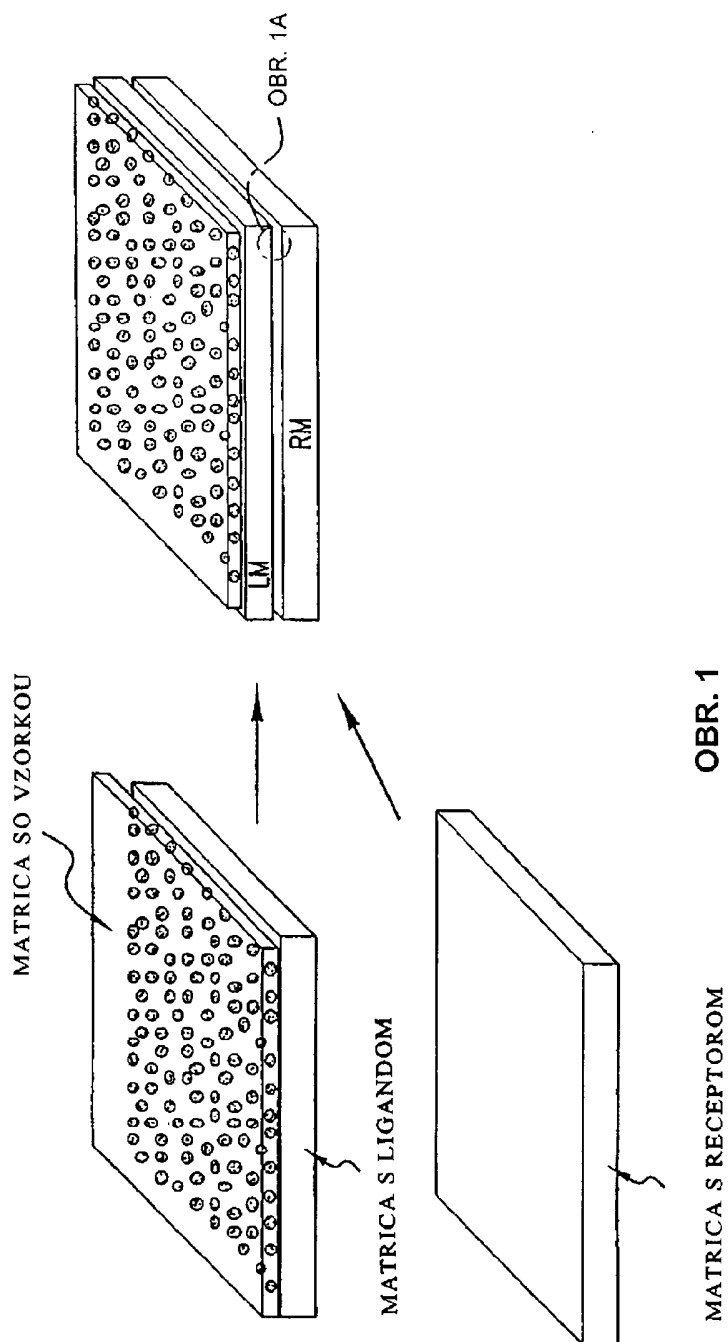
40 9. Spôsob podľa nároku 8, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa uvedená interakcia zaznamenáva stykom uvedenej poréznej matrice s roztokom alebo kvapalnou suspenziou činidla alebo s poréznuou maticou obsahujúcou činidlo, čo v jednom aj druhom prípade napomáha zviditeľneniu proteínu, ktorého expresia v uvedených celých bunkách je biologickým procesom, ktorý je hodnotený.

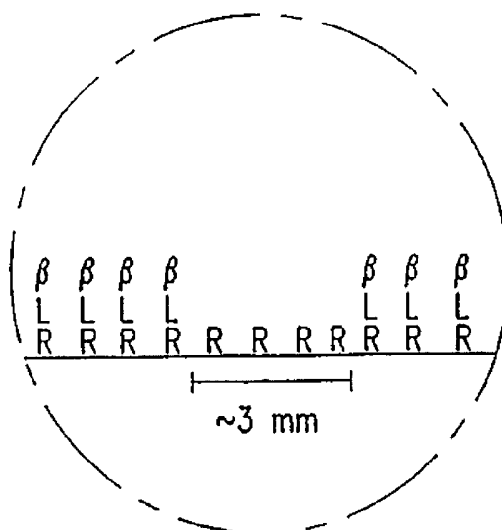
10. Spôsob podľa nároku 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že prvým skúšobným činidlom je značený ligand a druhým skúšobným činidlom je imobilizovaný receptor pre uvedený ligand.

5 11. Spôsob podľa nároku 10, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa druhá matrica vymýva na odstránenie celého značeného ligandu, ktorý difundoval na alebo do uvedenej druhej matrice, ale nenaviazal sa na uvedený imobilizovaný receptor.

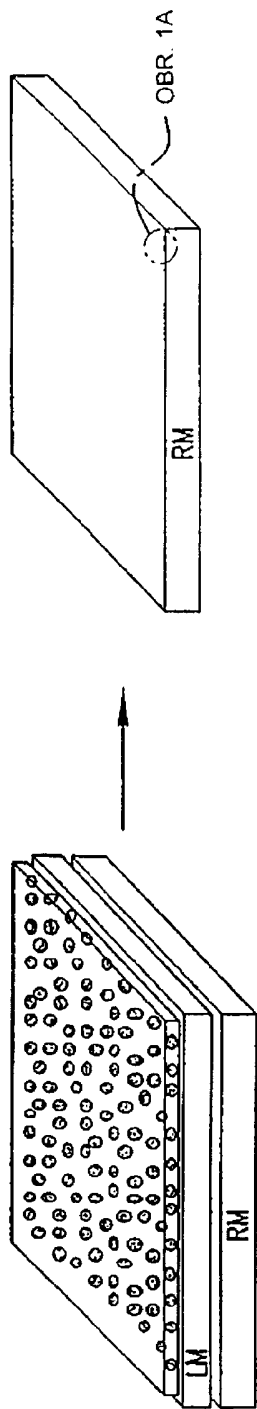
12. Spôsob podľa nároku 11, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa uvedená druhá matrica uvedie do styku s roztokom alebo kvapalnou suspenziou činidla alebo poréznou matricou obsahujúcou činidlo, čo v jednom i druhom prípade napomáha pri vizualizácii značeného ligandu, neodstráneného vo vymývacom stupni.

19 výkresov

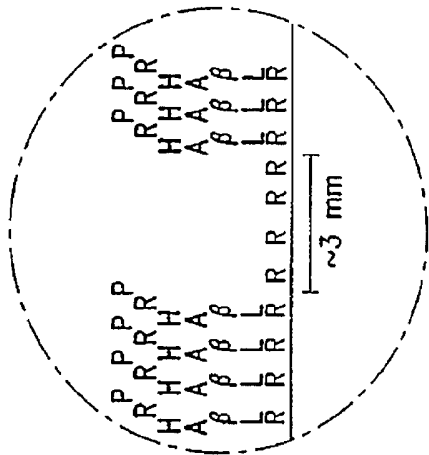




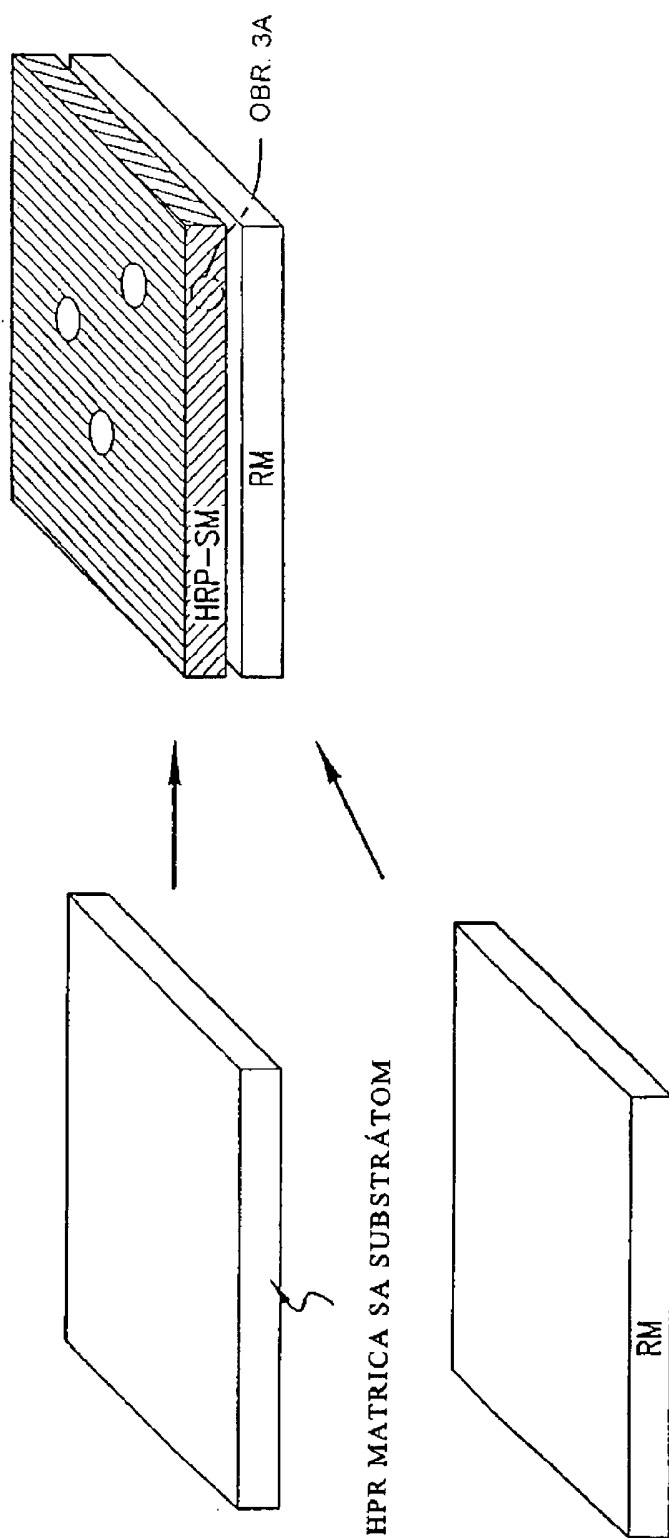
OBR. 1A



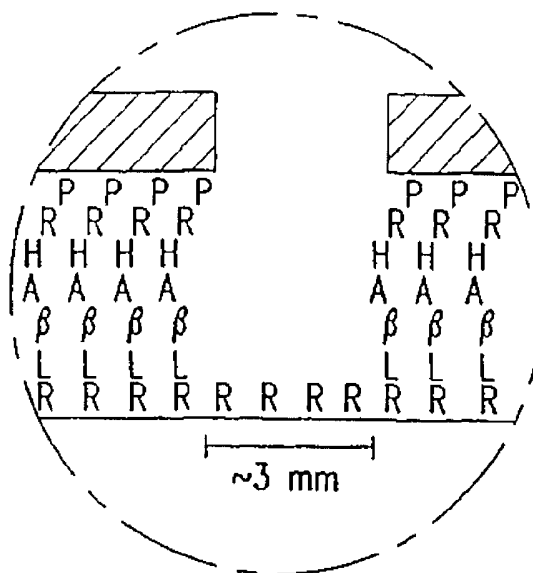
OBR. 2



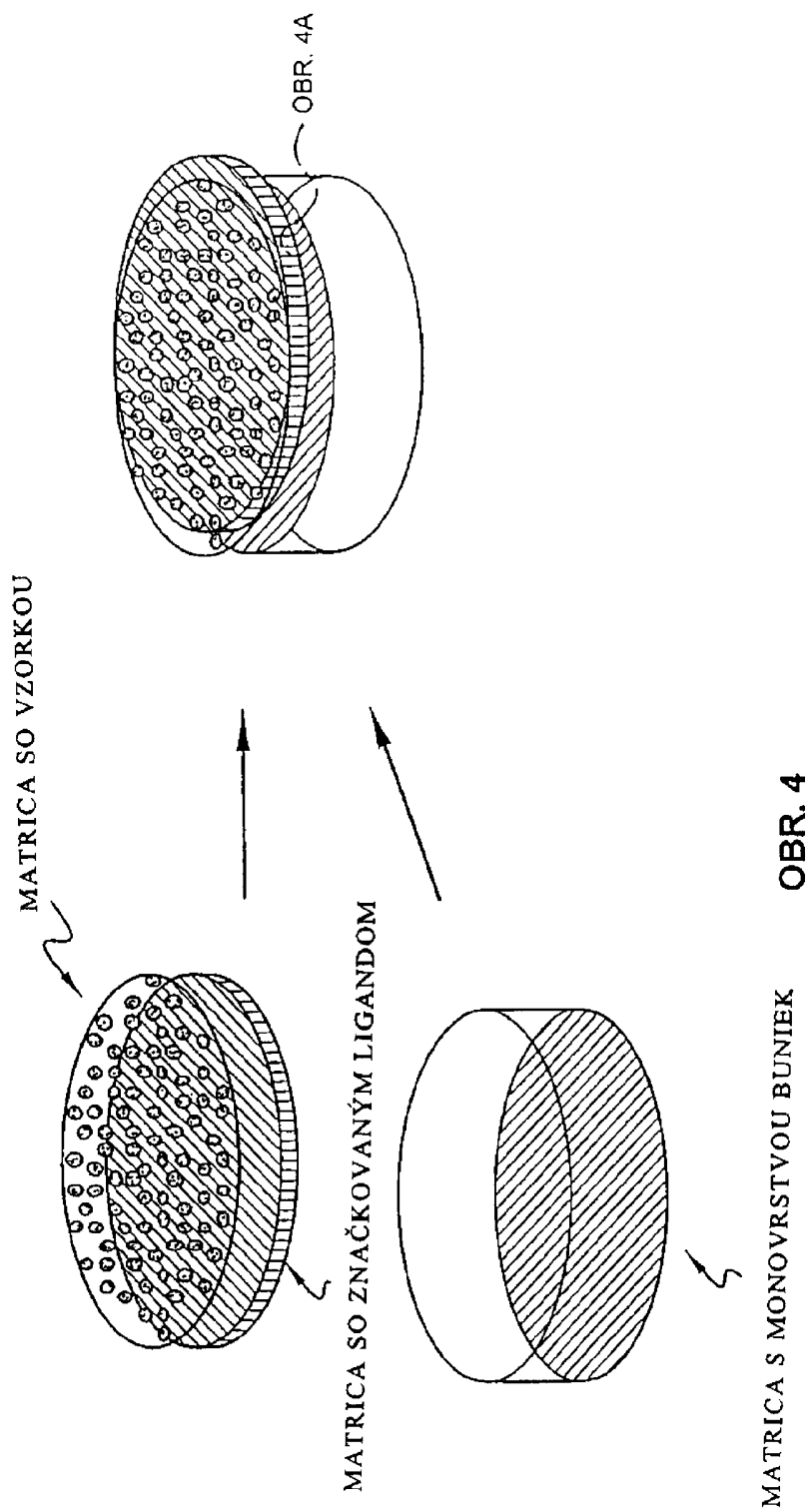
OBR. 2A



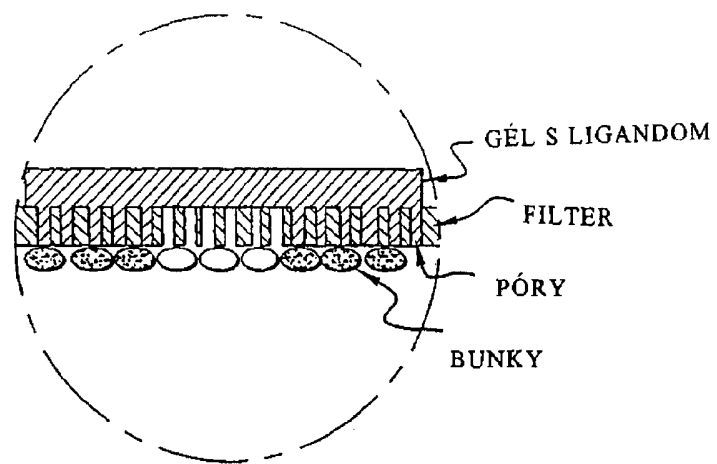
OBR. 3



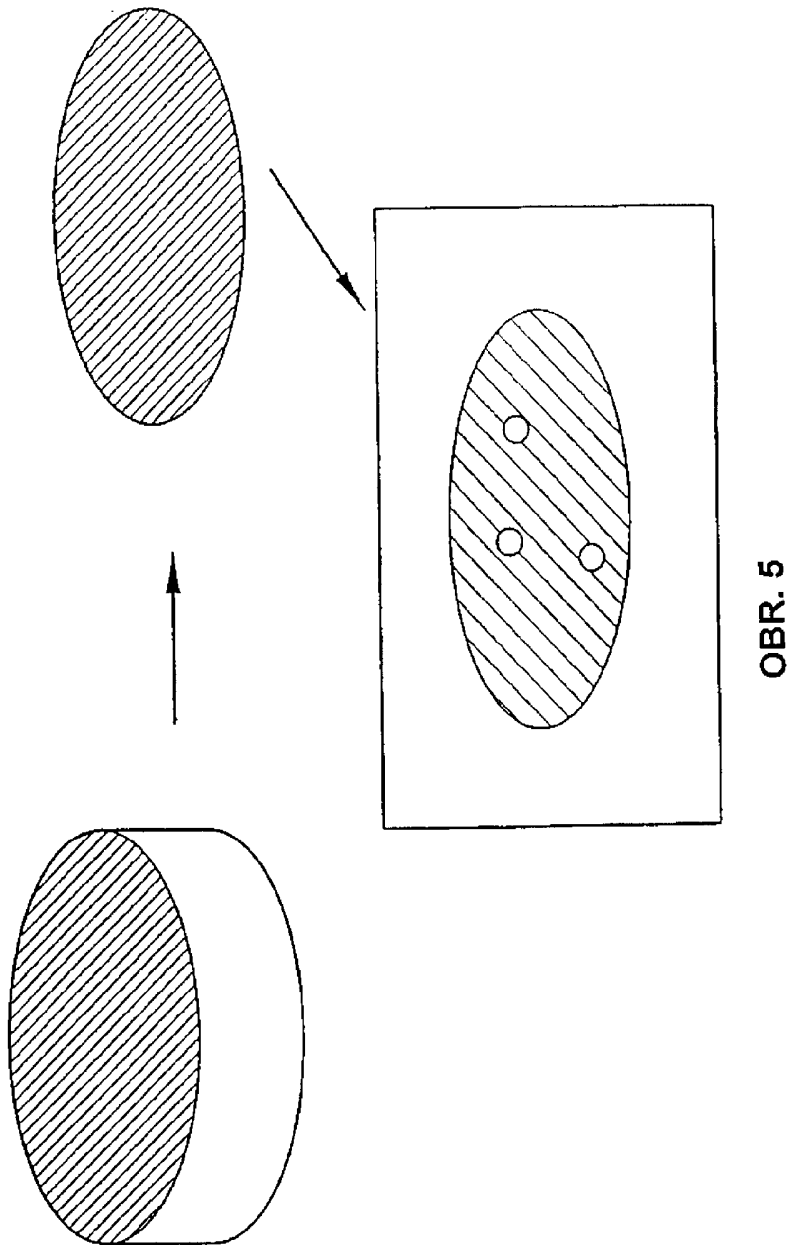
OBR. 3A

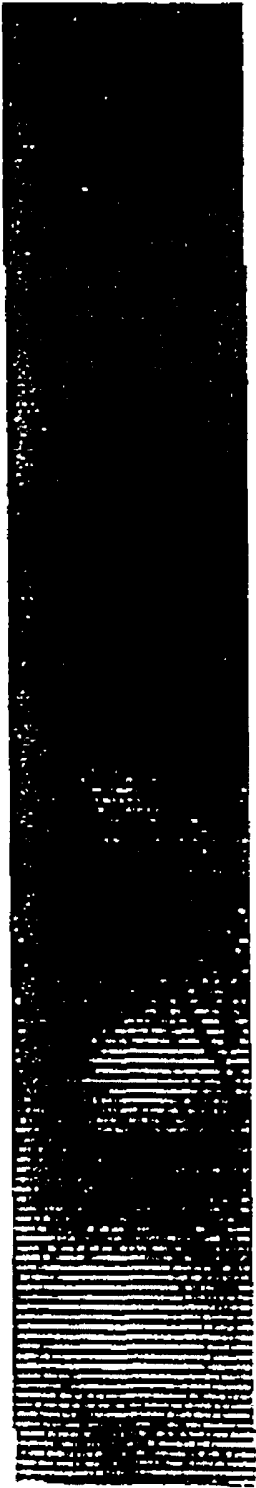


OBR. 4



OBR. 4A





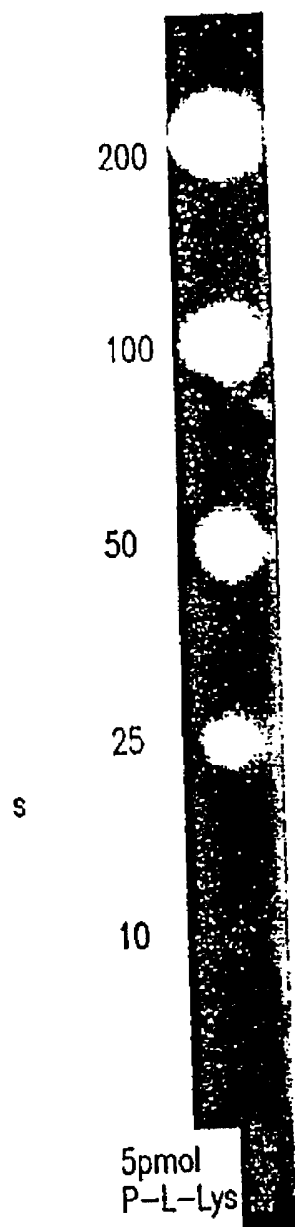
0.5 nmol

1 nmol

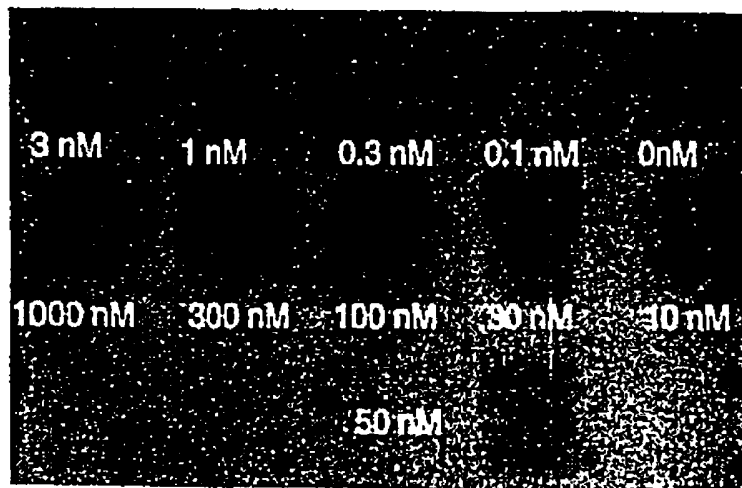
2 nmol

5 nmol

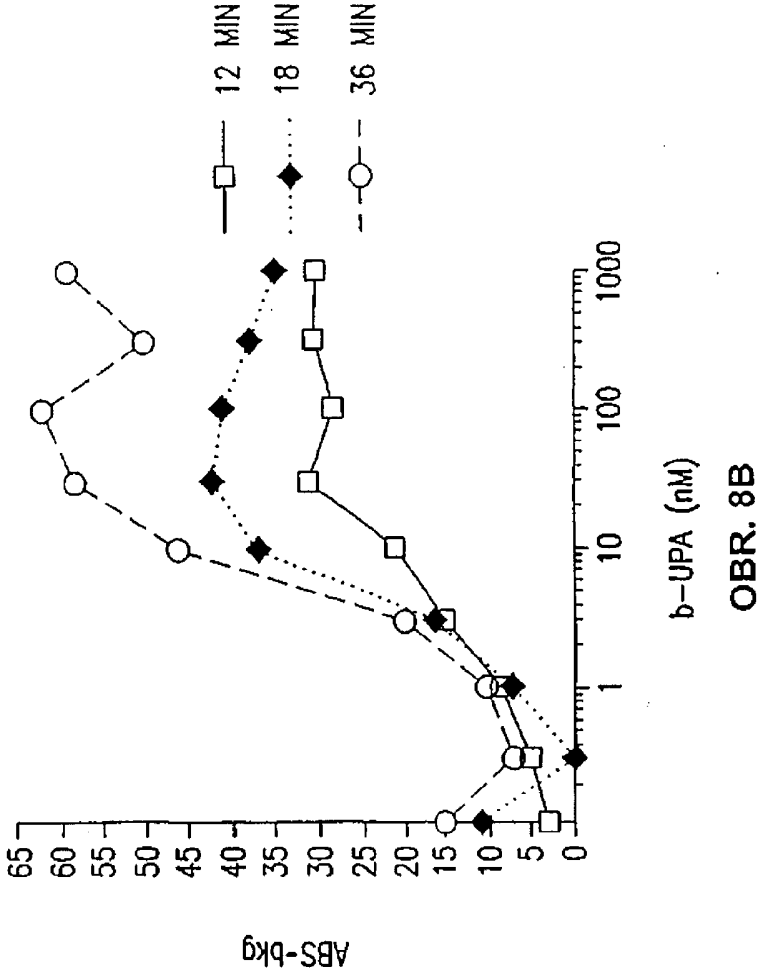
OBR. 6

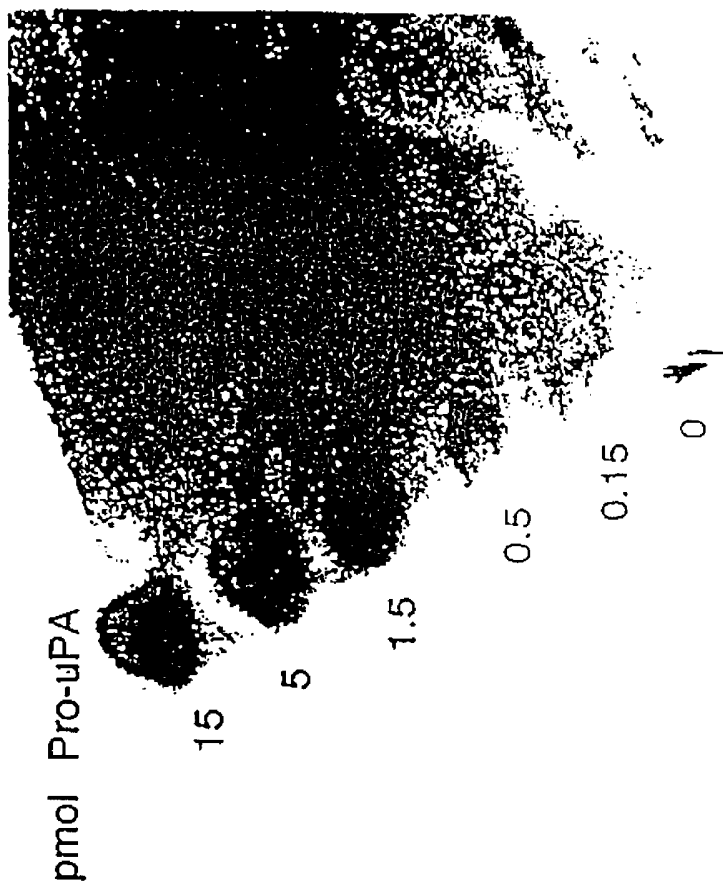


OBR. 7

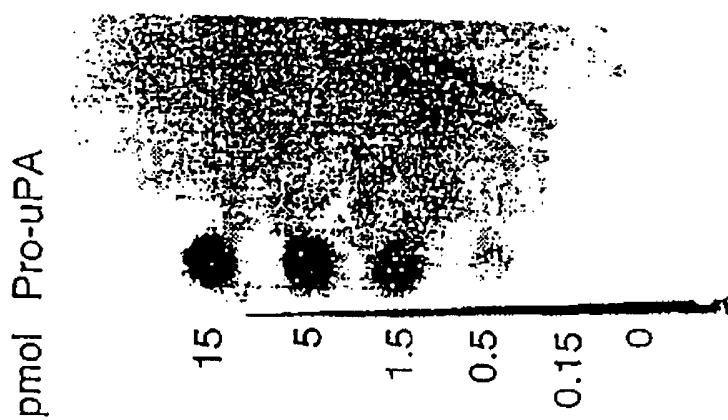


OBR. 8A





OBR. 9B



OBR. 9A

ITAM*
(nM)

0.1

0.3

1.0

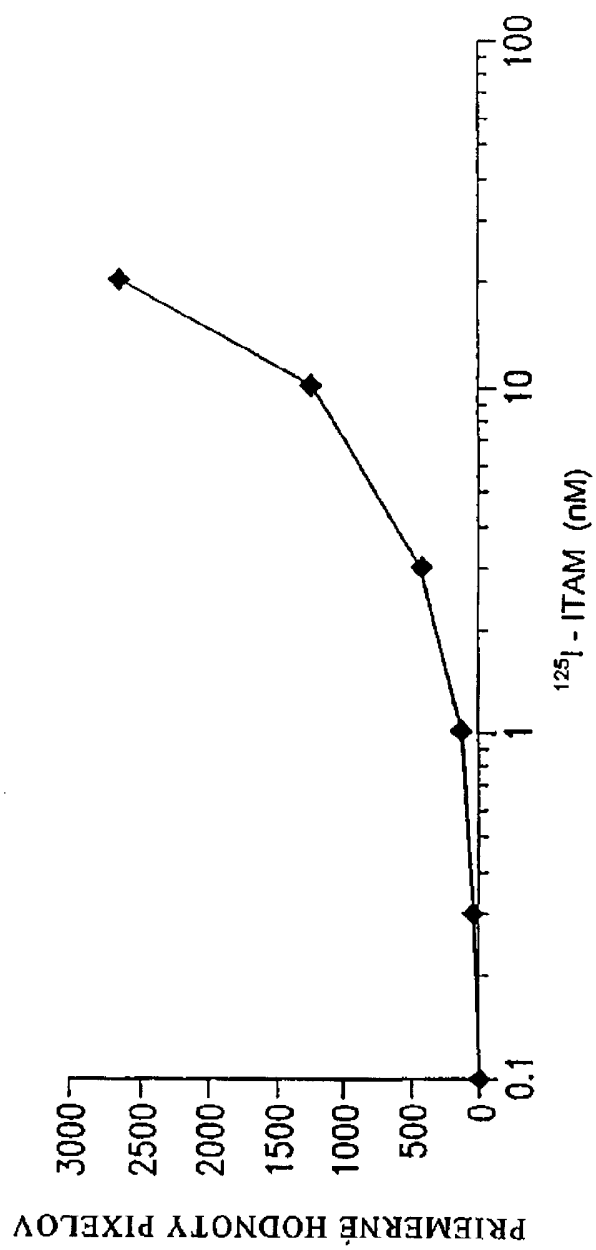
3.0

10

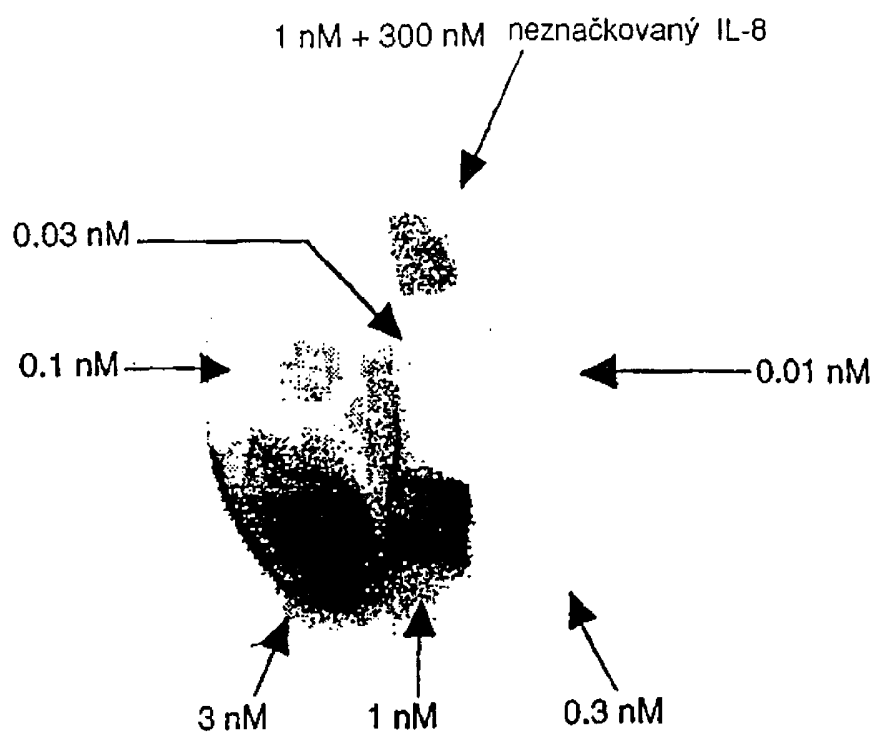
20



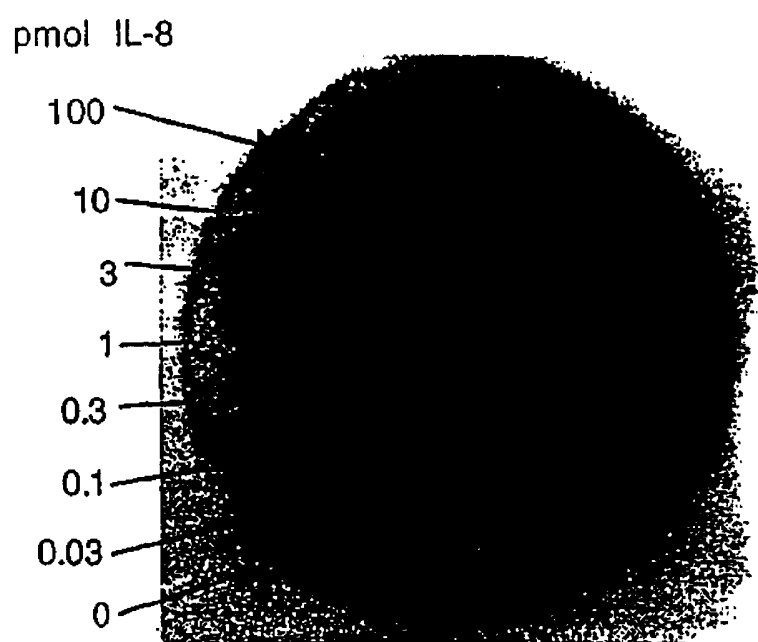
OBR. 10



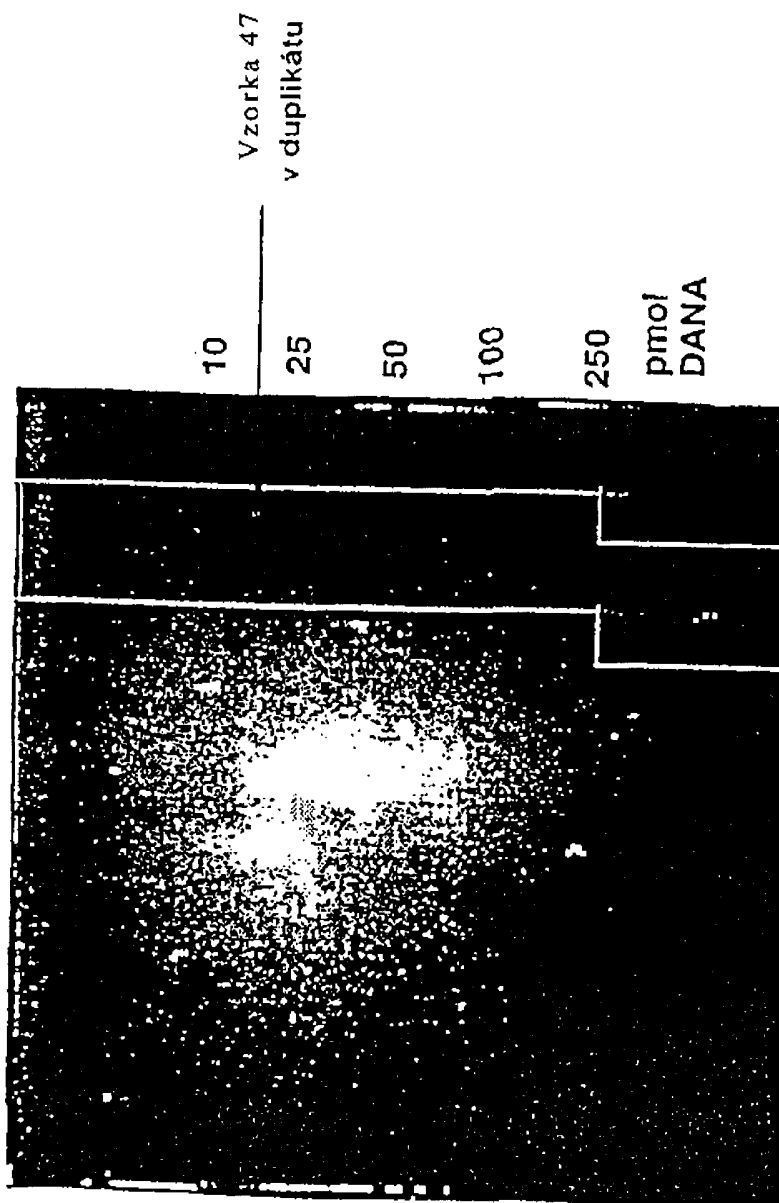
OBR. 11



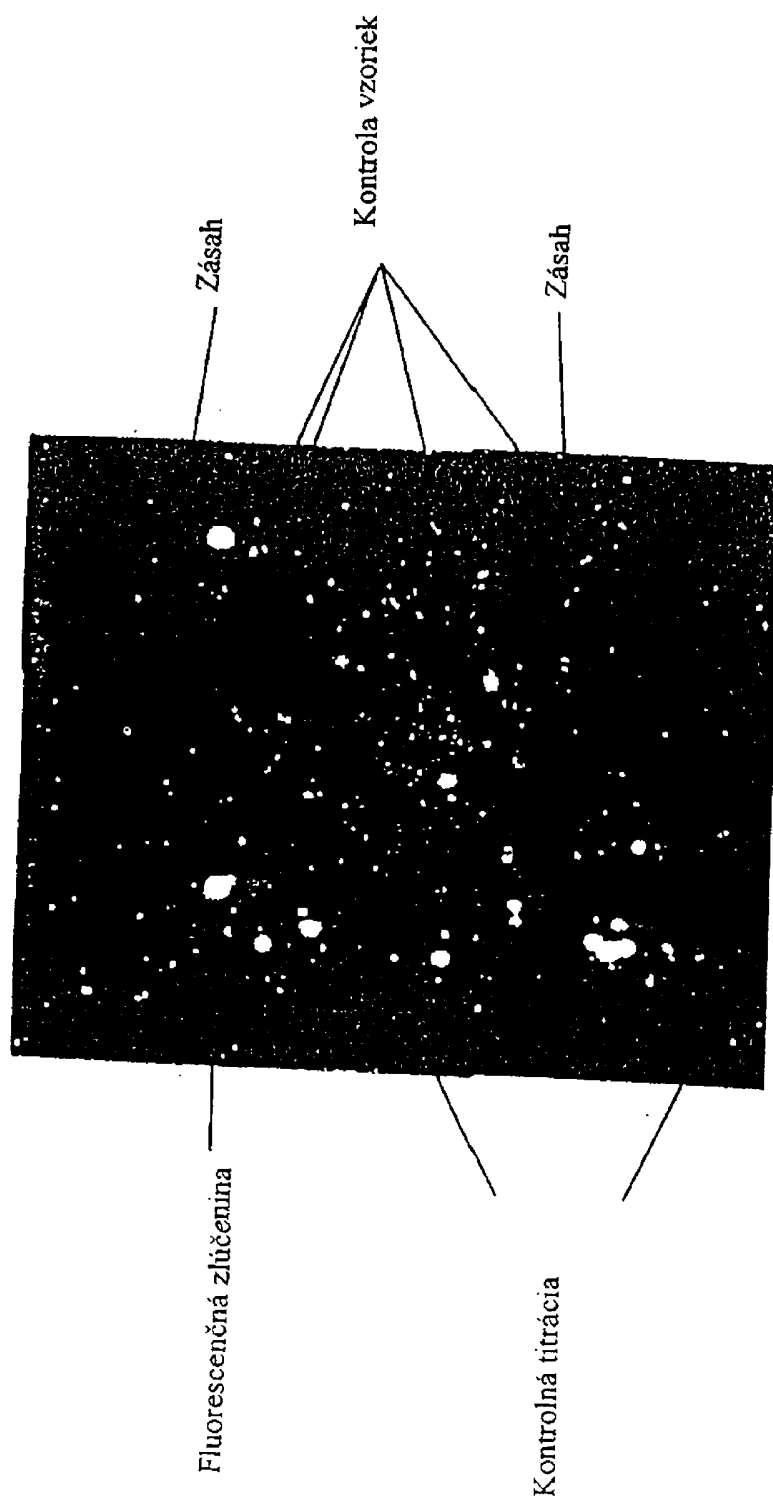
OBR. 12



OBR. 13



OBR. 14



OBR. 15