



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 35 537 T2 2007.08.09

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 038 179 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 35 537.7

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US98/26465

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 963 130.4

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1999/030154

(86) PCT-Anmeldetag: 11.12.1998

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 17.06.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 27.09.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 09.08.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 09.08.2007

(51) Int Cl.⁸: G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

990168 12.12.1997 US

(73) Patentinhaber:

Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill., US

(74) Vertreter:

Schieber · Farago, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, NL, PT, SE

(72) Erfinder:

BEUTEL, A., Bruce, Libertyville, IL 60048, US;
SCHURDAK, E., Mark, Antioch, IL 60002, US;
VOORBACH, J., Martin, Vernon Hills, IL 60061, US;
BURNS, J., David, Round Lake Park, IL 60073, US;
JOSEPH, K., Mary, Libertyville, IL 60048, US

(54) Bezeichnung: SCREENINGSYSTEM MIT HOHEM DURCHFLUSS UNTER VERWENDUNG PLANARER FESTPHASEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet der Erfindung

[0001] Kontinuierliches Screening mit hohem Durchsatz („Continuous Format High Throughput Screening“, CF-HTS), das mindestens eine poröse Matrix verwendet, ermöglicht es der pharmazeutischen Industrie, große Mengen chemischer Objekte auf eine große Bandbreite biologischer oder biochemischer Aktivität hin zu untersuchen. Außerdem ist CF-HTS nützlich bei der Durchführung von Assays mit mehreren Schritten.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Biochemische und biologische Tests dienen zum Testen von Aktivität in einer großen Bandbreite von Systemen, von Protein-Protein-Interaktionen, Enzymkatalyse, Bindung kleiner Moleküle an Proteine bis hin zu Zellfunktionen. Im „High Throughput Screening“ (HTS) wird diese Art von Tests zum Testen einer großen Anzahl chemischer Objekte verwendet, um zuvor unbekannte biologische oder biochemische Aktivitäten der chemischen Objekte zu erkennen.

Homogene versus heterogene Tests (Assays)

[0003] Alle verschiedenen Arten von biologischen Tests können in zwei Hauptklassen unterteilt werden: homogene Tests und heterogene Tests. Bei homogenen Tests werden alle Reagenzien addiert, und die Ergebnisse werden ohne zusätzliche Manipulation gemessen oder interpretiert. Zum Beispiel können in einer Petrischale gezüchtete Zellen einer Chemikalie ausgesetzt werden. Wenn die Chemikalie toxisch für die Zellen ist, wird eine Lichtungszone (clearing zone) durch einfache Beobachtung Toxizität anzeigen. In einem anderen Beispiel können Zellen verwendet werden, die ein Protein exprimieren, welches die Farbe der Zelle verändert. Im Fall von beta-Galaktosidase(β -gal)-exprimierenden Zellen, die in Agar wachsen, das x-gal enthält, werden die Zellen mehr oder weniger blau, je nachdem, wie viel des β -gal-Proteins exprimiert wird. So kann ein homogener Test für jeden biologischen Schritt erstellt werden, der die Expression eines Reportergens, wie des beta-Galaktosidase-Gens, beeinflusst. In einem weiteren Beispiel für homogene Tests wird ein Substrat verwendet, das seine Farbe oder Fluoreszenz verändert, wenn es von einem Enzym verarbeitet wird. Technologien wie Scintillation Proximity Assays (SPA) von Amersham schließlich messen direkt die Bindung eines radioaktiv markierten Liganden an ein Protein oder eine beliebige sich an Liganden bindende Substanz, die an Kugelchen befestigt ist, welche einen szintillierenden Stoff enthalten. Alle obigen Beispiele sind homogene Tests, weil sie vor dem endgültigen Nachweis, der Messung oder dem Ablesen des Signals keine weiteren Schritte als das Hinzufügen von Reagenzien erfordern.

[0004] Heterogene Tests hingegen erfordern mindestens zwei Schritte, die, weil sie bis zu einem gewissen Grad inhärent inkompatibel sind, nicht zu einem einzigen Schritt kombiniert werden können. Zum Beispiel erfordern viele heterogene Tests das Hinzufügen der Reagenzien in einer bestimmten Reihenfolge (z. B. wenn manche Reagenzien frühe Schritte des Tests behindern, aber notwendig sind, um spätere Schritte abzuschließen). Bekannte Beispiele hierfür schließen Tests ein, in denen Signalentwicklungs-Reagenzien hinzugefügt werden, um das Vorhandensein oder die Konzentration eines Reaktionsprodukts indirekt nachzuweisen. Ein anderer häufiger Schritt in heterogenen Tests ist ein Waschschnitt. Überschüssige Testreagenzien müssen häufig früh in einem Test hinzugefügt werden, aber vor späteren Schritten fortgewaschen werden, so dass Reaktionen ohne starkes Untergrundsignal fortgesetzt werden können. In einem Radioliganden-Bindungs-Assay z. B. wird ein markierter Ligand zunächst mit einem Protein inkubiert, das an eine feste Oberfläche gebunden ist, aber nur eine kleine Fraktion des Liganden bindet sich tatsächlich an die begrenzte Anzahl von Protein-Stellen. Nach der Inkubation muss der Überschuss an ungebundenem Liganden fortgewaschen werden, bevor eine präzise Messung des gebundenen radioaktiven Liganden vorgenommen werden kann. Das Waschen kann durch eine Vielzahl alternativer Verfahren durchgeführt werden, einschließlich Filtration, Zyklen von Waschen/Abgießen, Abscheiden/Phasentrennung und/oder Zentrifugierung.

[0005] Viele biologische und biochemische Vorgänge können nur durch heterogene Verfahren gemessen werden. Weiterhin arbeiten, trotz des Vorhandenseins von Möglichkeiten, andere biologische und biochemische Vorgänge für homogene Verfahren anzupassen, diese anderen Vorgänge kosteneffektiver und/oder mit schnelleren verfügbaren Reagenzien durch heterogene Verfahren. Eine Vielzahl von Verfahren und Kits für homogene Verfahren, wie z.B. SPA (Amersham), Fluoreszenzpolarisation (Jolley u. a.) und zeitaufgelöste Fluoreszenz (Packard u. a.), um nur einige wenige zu nennen, ist im Handel erhältlich. Die Anwendung dieser Art von Verfahren erfordert jedoch immer zusätzliche Kosten und Zeit. Für viele Tests sind die heterogenen Verfahren besser etabliert und einfacher und schneller zu entwickeln. Aus diesem Grund ist die Verwendung he-

terogener Verfahren, wie z. B. ELISA, Filterbindung, RIA, Luciferase-Zellassays usw., nach wie vor weit verbreitet. Einige dieser Verfahren werden unten detaillierter beschrieben.

[0006] Zum Beispiel ist aus WO 97 16569 ein Verfahren zum Testen von feste-Träger basierten Bibliotheken von Verbindungen, insbesondere basierte Bibliotheken, auf eine biologische oder biochemische Aktivität bekannt. Die Kugelchen werden auf eine poröse Matrix aufgetragen, mit einer oder mehreren Testkomponenten in Kontakt gebracht, und ihre Interaktion wird bestimmt, vorzugsweise durch direkte visuelle Sichtbarmachung oder unter Verwendung eines chemischen Markers.

[0007] Gemäß einer weiteren Ausführungsform in diesem Bezugsdokument können die Kugelchen, welche die Testverbindungen tragen, in einem geordneten Muster auf eine feste Schablone aufgetragen werden, die kegig verjüngte Löcher hat, welche es nur einzelnen Kugelchen gestatten, sich in ihnen festzusetzen, um so einen Abstand zwischen den Kugelchen herzustellen.

[0008] WO 94 02515 A offenbart ähnliche Verfahren, die Mehrfach-Kopien einzelner oligomerer Moleküle auf Kugelchenbasis verwenden. Die Identität eines im Test aktiven Moleküls nach Diffusion in ein Substrat wird visuell bestimmt, wie im obigen Bezugsdokument, in Kombination mit einem Signal.

[0009] EP-A-0 063 810 offenbart ein Verfahren zur Untersuchung von Hybridomzellen, die monoklonale Antikörper bilden, wo Antigene oder Immunglobuline als eine Anordnung (array) von Punkten auf einen Träger aufgetragen werden. Ihre Interaktion im Test erzeugt ein Signal auf der Grundlage einer Farbreaktion, die zur Analyse visuell untersucht wird.

[0010] Das visuelle Bildgebung oder die Untersuchung einer Anordnung mit hoher Dichte in Verbindung mit chemischen Markern, wie in den obigen Bezugsdokumenten, würde die Bestimmung der Identität einzelner Substanzen in solchen Anordnungen außerordentlich erschweren.

High Throughput Screening (HTS)

[0011] Über die Jahre hat sich die pharmazeutische Industrie zunehmend auf das HTS von Bibliotheken chemischer Verbindungen gestützt, um potentielle Arzneimittel zu finden. HTS beschreibt ein Verfahren, wo viele einzelne Verbindungen parallel getestet werden, so dass eine große Anzahl von Testverbindungen gleichzeitig oder nahezu gleichzeitig auf biologische Aktivität hin untersucht werden kann. Aktuell verwenden die am weitesten verbreiteten Verfahren Mikrotiter-Platten mit 96 Vertiefungen. In diesem Format werden 96 unabhängige Tests gleichzeitig auf einer einzigen 8 cm × 12 cm großen Kunststoffplatte durchgeführt, die 96 Reaktionsvertiefungen enthält. Diese Vertiefungen erfordern typischerweise Testvolumen im Bereich von 50 bis 500 µl. Zusätzlich zu den Platten sind zahlreiche Instrumente, Materialien, Pipettoren, Roboter, Plattenwascher und Plattenleser im Handel erhältlich, um das Format mit 96 Vertiefungen für eine große Bandbreite homogener und heterogener Tests anzupassen.

[0012] Bis zu diesem Zeitpunkt haben sich die Bemühungen, HTS zu verbessern, darauf konzentriert, die Vertiefungen kleiner zu machen (Miniaturisierung). Durch Reduzierung der Vertieungsgröße kann die Anzahl der Vertiefungen auf jeder Platte erhöht werden, um mehr parallele Testvorgänge zu ermöglichen. Weiterhin werden durch Reduzierung der Testvolumen auch die Kosten der Reagenzien pro Test reduziert. Außerdem ist es möglich, da mehr parallele Tests mit geringeren Testvolumen durchgeführt werden können, mehr Verbindungen gleichzeitig zu testen, um potentielle Arzneimittel zu finden. Bis heute hat die Miniaturisierung die 96-Vertiefungen-Technologie durch Bereitstellung eines Formats mit 384 Vertiefungen (96 × 4) marginal verbessert. Siehe Comley u. a., J. Biomol. Screening, Band 2 (3), S. 171-78 (1997). Es ist sogar über Formate mit noch höherer Dichte berichtet worden, einschließlich eines 9600-Vertiefungen-Formats. Die Miniaturisierung hat jedoch inhärente Kosten und Komplexitäten.

[0013] Diese Kosten und Komplexitäten hängen direkt mit den drei Hauptfaktoren der Miniaturisierung eines Screening-Formats zusammen. Erstens muss es möglich sein, die Testbehälter (Röhrchen, Vertiefungen, Deli-Len usw.) kleiner zu machen. Zweitens muss es möglich sein, all die notwendigen Testreagenzien präzise in mehr und in kleinere Vertiefungen zu dispensieren (was normalerweise erreicht wird durch Roboter, die Flüssigkeiten handhaben und die Reagenzien gleichzeitig in viele Vertiefungen dispensieren). Drittens muss es möglich sein, die Ergebnisse der Tests im High Density Array „abzulesen“.

[0014] Aufgrund der Erfordernisse parallelisierter unabhängiger Tests ist jeder Faktor mit Herausforderungen und Begrenzungen im Hinblick auf die Frage verbunden, wie viel Miniaturisierung machbar oder kosteneffektiv

ist. Zum Beispiel kann ein neueres, kleineres Format ein gänzlich anderes Verfahren zum Dispensieren von Reagenzien oder ein Ableseinstrument erfordern, das die Auflösung, Empfindlichkeit und Technik hat, die mit dem neueren, miniaturisierten Format kompatibel ist. Während die Größe jeder Vertiefung reduziert wird, wird es auch schwieriger, zeitaufwendiger und kostspieliger, die Behälter-Anordnung herzustellen, Reagenzien in geringeren Mengen zu dispensieren und jede Untersuchungsprobe zu lesen. Weiterhin erhöht eine geringere Probengröße auch die statistische Variabilität von Probe zu Probe aufgrund der inhärenten Ungenauigkeiten beim Dispensieren geringerer Volumen der Reagenzien und beim Messen schwächerer Probensignale. Darüber hinaus erzeugen Faktoren wie Verdunstung und Oberflächenspannung noch höhere Kosten und Komplexität beim Einsatz der neueren, miniaturisierten Formate.

[0015] Zum Zweck eines „Quantensprungs“ in der HTS-Technologie wartet die Industrie sehnstüchtig auf die Möglichkeit von „Freiformat-Assays“, oder Assays, bei denen keine physischen Barrieren zwischen den Proben bestehen. Typischerweise wird dies als das Testen kleiner Tröpfchen in einem Format gesehen, das keinerlei Vertiefungen hat; es hat jedoch noch niemand tatsächlich über die Verwendung eines Freiformat-Assays in HTS mit Standardsammlungen einzelner Verbindungen berichtet.

Screening von kombinatorischen Bibliotheken – Gelpermeationsverfahren

[0016] Seit der Einführung kombinatorischer Chemie können Millionen chemischer Objekte schnell auf festen Trägern (im Allgemeinen Kugelchen) erzeugt werden. Obwohl das 96-Vertiefungen-Format verwendet wird, um Bibliotheken auf Kugelchengrundlage zu untersuchen, wird dieses Format allgemein als ineffizient betrachtet, da (1) jedes Kugelchen nur geringe Mengen eines chemischen Objekts trägt, (2) die Anzahl zu testender Verbindungen außerordentlich groß ist und (3) die Kugelchen schwierig in Mikrotiter-Platten mit 96 Vertiefungen zu befördern sind.

[0017] Zur Vermeidung der Probleme, die der Untersuchung kombinatorischer Bibliotheken mit dem 96-Vertiefungen-Format inhärent sind, haben einige über die Verwendung einfacher homogener Tests berichtet, die als „Freiformat“ bezeichnet werden können. Zum Beispiel wurde über einen Test, der Pigmentzellen (Melanozyten) in einem einfachen homogenen Test für kombinatorische Peptidbibliotheken verwendet, von Jayawickreme u. a. in Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA), Band 91, S. 1614-18 (März 1994) berichtet. Den Autoren zufolge platzierten sie Zellen unter Agarose in Petrischalen, platzierten dann Kugelchen, die kombinatorische Verbindungen trugen, auf die Oberfläche der Agarose und setzten dann die Verbindungen teilweise von den Kugelchen frei. Die aktiven Verbindungen wurden als dunkle Pigmentbereiche sichtbar, da die aktiven Verbindungen, während sie lokal in die Gelmatrix diffundierten, die Zellen veranlassten, die Farbe zu ändern.

[0018] Ein anderes neueres Beispiel ist Daniel Chelskys „Strategies for Screening Combinatorial Libraries: Novel and Traditional Approaches“, vorgestellt auf der First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening in Philadelphia, PA (7.-10. November 1995). Chelsky plazierte einen einfachen homogenen Enzytest auf Kohlensäureanhydrase in ein Agarosegel, so dass das Enzym im Gel eine Farbänderung im gesamten Gel verursachte. Danach wurden Kugelchen, die mittels eines Photolinkers kombinatorische Verbindungen trugen, in das Gel platziert, und die Verbindungen wurden durch UV-Licht teilweise freigesetzt. Verbindungen, die das Enzym hemmten, wurden als lokale Hemmzonen mit geringerer Farbänderung beobachtet. Schließlich berichteten in Molecular Diversity, Band 2, S. 57-68 (1996), Salmon u. a. über ein Verfahren ähnlich demjenigen von Jayawickreme u. a., worin kombinatorische Bibliotheken auf Verbindungen getestet wurden, die zytotoxische Auswirkungen auf in Agar wachsende Krebszellen hatten.

[0019] Alle drei Beispiele sind Variationen der bewährten Geltests für antibakterielle oder Antikrebsmittel, und sie haben auch Ähnlichkeit mit den bekannten immunologischen Tests, in denen eine Antigen-Antikörper-Interaktion in einem Gel gemessen wird. Obwohl diese Gelpermeationstests zur Untersuchung kombinatorischer Bibliotheken auf Kugelchengrundlage gut geeignet waren, hat noch niemand über die Ausweitung dieses Formats auf heterogene Tests oder Bibliotheken auf Nicht-Kugelchen-Grundlage berichtet. Das herkömmliche Wissen hielt die Forscher davon ab, die Proben in einem kontinuierlichen Format zu testen, das das Mischen der Proben gestatten könnte. Zwischen der begrenzten Art der genannten Tests und den Sorgen, dass sich die Proben in einem kontinuierlichen Format mischen könnten, wurden nur Bibliotheken auf Kugelchenbasis getestet. Aufgrund dieser Begrenzungen nahmen die Forscher an, dass das 96-Vertiefungen-Format besser für heterogene Tests und Tests mit nicht auf Kugelchengrundlage beruhenden Bibliotheken geeignet sei. Es wäre wünschenswert, heterogene Tests in einer Umgebung mit freiem Format durchzuführen. Weiterhin wäre es wünschenswert, einzelne Verbindungen in einer Umgebung mit freiem Format zu testen.

Kurze Zusammenfassung der Erfindung

[0020] Die hierin beschriebene Erfindung, Continuous-Format High Throughput Screening (CF-HTS), setzt erfolgreich das Konzept des Freiformats für jeden Test, homogen oder heterogen, um, der im 96-Vertiefungen-Format durchgeführt werden kann. Außerdem ist CF-HTS nützlich zum Testen kombinatorischer Bibliotheken mit heterogenen Tests, nicht nur homogenen Tests. Weiterhin kann CF-HTS einzelne Verbindungen ohne die mit Miniaturisierung verbundenen Kosten und Komplexitäten testen. Befürchtungen bezüglich der Möglichkeit, dass Reagenzien und Testergebnisse sich während späterer Schritte vermischen könnten, erwiesen sich als unbegründet.

[0021] Eine Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren zum gleichzeitigen Testen einer Vielzahl von Proben verschiedener Substanzen auf ihre Fähigkeit hin, einen biologischen Vorgang zu verstärken oder zu hemmen, Folgendes umfassend:

- a) Auftragen, in einer Anordnung, eines geringen Volumens von jeder von mehr als 96 Proben unterschiedlicher Substanzen auf eine Matrix, so dass jede einzelne Substanz an ihrer eigenen separaten Stelle zentriert ist und die Identität jeder Substanz aus ihrer Auftragungsstelle bestimmt werden kann,
 - b) In-Kontakt-Bringen der Matrix mit einer ersten porösen Matrix, die ein erstes gleichmäßig dispersiertes Assay-Reagenz enthält oder trägt und es einem Teil jeder Substanz ermöglicht, so in die poröse Matrix zu diffundieren, dass die räumliche Position jeder diffundierten Substanz mit der Stelle auf der Matrix korreliert werden kann, auf welche die Substanz ursprünglich aufgetragen wurde, und
 - c) Durchführung eines Assays, um die Fähigkeit jeder diffundierten Substanz, den biologischen Vorgang zu fördern oder zu hemmen, zu bestimmen, durch Beobachten der Interaktion jeder Substanz mit dem Assay-Reagenz,
- dadurch gekennzeichnet, dass die Matrix eine ebene Matrix ist.

[0022] Eine andere Ausführungsform betrifft ein Verfahren wie oben dargelegt, das weiter folgenden Schritt umfasst:

- b1) In-Kontakt-Bringen der ersten porösen Matrix mit einer zweiten Matrix, die ein zweites gleichmäßig dispersiertes Assay-Reagenz trägt oder enthält und es dem zweiten Assay-Reagenz ermöglicht, in die erste poröse Matrix zu diffundieren, oder die es jeder Substanz und dem ersten Reagenz ermöglicht, in die zweite Matrix zu diffundieren, wobei im letzteren Fall sichergestellt wird, dass die Diffusion so stattfindet, dass die Position jeder Substanz in der zweiten Matrix mit der Stelle auf der ebenen Matrix korreliert werden kann, auf der die Substanz ursprünglich aufgetragen wurde, und
- c1) Durchführen des Schrittes (c).

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0023] [Fig. 1](#) zeigt gELISA-Untersuchungsproben auf einer nicht porösen Matrix, die Kontakt hat mit einer Seite einer porösen Gelmatrix, welche Test-Reagenz enthält und wiederum Kontakt mit einer nicht porösen Matrix hat, die ein weiteres Test-Reagenz trägt.

[0024] [Fig. 2](#) zeigt das Entfernen der gELISA-Untersuchungsprobenmatrix und der porösen Gelmatrix, gefolgt von Waschen und Hinzufügen von Flüssigkeit oder Lösungsreagenzien, um auf der nicht porösen Reagenzmatrix den Reporterkomplex zu bilden.

[0025] [Fig. 3](#) zeigt das Sichtbarmachen des gELISA-Assays durch In-Kontakt-Bringen der Reporterkomplex-Matrix mit einer porösen Gelmatrix, die das Reportersubstrat enthält.

[0026] [Fig. 4](#) zeigt, wie eine Ligandenmatrix auf die Filteroberfläche gegenüber derjenigen der Filteroberfläche aufgetragen wird, welche die Zellen trägt.

[0027] [Fig. 5](#) zeigt, was eine Zellen tragende Filteroberfläche erzeugen kann, wenn der Test sichtbar gemacht wird.

[0028] [Fig. 6](#) zeigt das Ergebnis eines VanA-Tests unter Verwendung verschiedener Konzentrationen eines bekannten dosisabhängigen Inhibitors.

[0029] [Fig. 7](#) zeigt das Ergebnis eines EF-3-Tests unter Verwendung verschiedener Konzentrationen eines bekannten Inhibitors.

[0030] **Fig. 8** zeigt ein Kontrollexperiment für einen gELISA-Test auf Protein-Protein-Interaktion.

[0031] **Fig. 9** zeigt das gELISA-Ergebnis der "Hemmung" der Protein-Protein-Interaktion.

[0032] **Fig. 10** zeigt die dosisabhängige Bindung von radioaktiv markiertem ITAM an immobilisiertes LCK.

[0033] **Fig. 11** zeigt die Pixelwerte im Verhältnis zur ITAM-Konzentration, um eine typische Rezeptor-Ligand-Bindungskurve darzustellen.

[0034] **Fig. 12** zeigt ein Kontrollexperiment zur Ligand-Zellen-Interaktion von radioaktiv markiertem IL-8.

[0035] **Fig. 13** zeigt die "Hemmung" der IL-8-Ligand-Zellen-Interaktion.

[0036] **Fig. 14** zeigt einen Test auf Inhibitoren von Neuraminidase.

[0037] **Fig. 15** zeigt einen gleichzeitigen Test von 10.080 separaten Verbindungen auf Neuraminidase-Inhibition.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0038] Der zentrale Gedanke, der hinter CF-HTS steht, ist die Platzierung von Untersuchungsproben in den Kontext einer porösen Matrix. Das Verfahren umfasst die Platzierung eines oder mehrerer Testbestandteile in, auf oder auf den Boden einer Matrix, wie z. B. eines Gel, einer Kunststofffolie, eines Filters oder anderer Arten von leicht handhabbaren festen Trägern. Wenn Proben auf die poröse Matrix aufgetragen werden, diffundieren sie langsam genug, dass die Tests durchgeführt werden können, ohne dass die Untersuchungsproben zusammenlaufen. Somit trennt das CF-HTS-Format die Untersuchungsproben durch Diffusion und nicht durch eine undurchlässige Schicht. Wenn die Tests über einen zu langen Zeitraum durchgeführt werden, werden sich die Untersuchungsproben und Ergebnisse schließlich vermischen. Bei genauer Zeitplanung ermöglicht es CF-HTS jedoch, eine sehr hohe Dichte von Verbindungen gleichzeitig und doch individuell zu testen, ohne dass es nötig ist, einzelne Vertiefungen oder Reaktionsbehälter mit Lösungsmitteln oder Testkomponenten zu füllen. Weiterhin ist es möglich, durch die Behandlung von Matrizen, welche die Reaktionsbestandteile tragen, sogar komplexe heterogene Tests in diesem Format durchzuführen. Die Behandlung von Matrizen für heterogene Tests ist völlig neuartig und macht CF-HTS so flexibel wie das 96-Vertiefungen-Format in seiner Fähigkeit, eine große Bandbreite an biologischen oder biochemischen Vorgängen zu testen. Außerdem erzielt CF-HTS die Art von Vorteilen, die bereits bei der Miniaturisierung bestehen, ohne die damit verbundenen Nachteile, und hat einzigartige Vorteile.

[0039] CF-HTS nutzt eine große Bandbreite an Matrizen und Testkomponenten. Die Matrizen schließen Folgendes ein, sind aber nicht darauf beschränkt: Gele, die aus Agarose, Acrylamid oder anderen gelatineartigen Materialien bestehen, Membranen, Filter und Kunststoffe. Matrizen können aus Materialien bestehen, die Folgendes einschließen, aber nicht darauf beschränkt sind: Polystyrol, Polypropylen, andere Kunststoffe, Papierfaser, Glas, Glasfaser, Siliciumdioxid, Polycarbonat, Polyester, Polyvinylidenchlorid und Polyethylen. Matrizen können undurchlässige Feststoffe, poröse Feststoffe, wie z. B. Filter, oder Gele sein. Testkomponenten schließen Folgendes ein, sind aber nicht darauf beschränkt: Makromoleküle, wie z. B. Nukleinsäuren, Proteine und andere synthetische oder natürliche Makromoleküle; Zellen, Zellsäfte, biologische Extrakte, Organellen und andere komplexe biologische Einheiten und Mischungen; und kleine Moleküle, wie z. B. Puffer, Salze, Inhibitoren, Substrate, Peptide, Farbstoffe, Nukleotide, Cofaktoren, Ionen und Lösungsmittel.

[0040] Ein CF-HTS-Test ist ein Test, in dem mehrere Untersuchungsproben oder Verbindungen nicht durch undurchlässige Barrieren, sondern durch Diffusion getrennt werden. Die entscheidende Komponente ist die Einführung mehrerer (mehr als 1) Untersuchungsproben in oder auf eine poröse Testmatrix, die wahlweise eine oder mehrere Testkomponenten enthält. Poröse Testmatrizen, die Testkomponente(n) enthalten, werden hergestellt durch das Hinzugeben, Mischen, Gießen, Dispensieren oder Tränken von Komponenten in die Matrix. Poröse Matrizen werden auch hergestellt durch Kopplung, Beschichtung, Bindung, Fixierung, Vernetzung, Konjugierung oder Befestigung von Testkomponenten in oder auf einer Oberfläche einer Matrix. Weiterhin wird eine poröse Matrix auch hergestellt durch Bilden einer dünnen Schicht einer Lösung oder Flüssigkeit auf einer Zellschicht, einem Enzym oder einer anderen immobilisierten Testkomponente. Die porösen Testmatrizen werden benutzt, um die Reihenfolge und/oder die Dauer des Hinzufügens der Komponenten sowie das Ausmaß des Mischens und Diffundierens, wenn die Testkomponenten kombiniert werden, zu steuern.

[0041] CF-HTS kann auch nicht poröse Matrizen verwenden. Die nicht porösen Matrizen werden hergestellt durch Koppeln, Beschichten, Binden, Fixieren, Vernetzen, Konjugieren oder Befestigen von Testkomponenten oder Untersuchungsproben auf einer Oberfläche der nicht porösen Matrix. Die Verwendung nicht poröser Matrizen in CF-HTS fixiert eine oder mehrere der Testkomponenten im Raum.

[0042] Wenn die Testkomponenten auf die Oberfläche einer Matrix aufgetragen werden, werden sie durch kovalente oder nicht kovalente, spezifische oder unspezifische Interaktionen mit Matrizen befestigt, die nicht derivatisiert, derivatisiert oder anderweitig vorbehandelt sind, um das Befestigen von Testkomponenten zu erleichtern. Nach dem Befestigen wird die Testkomponente räumlich fixiert, so dass sie für die Zwecke dieses Tests immobilisiert wird. In diesem Fall müssen entweder die Untersuchungsproben durch eine Matrix diffundieren können, um die Testkomponenten zu erreichen, und/oder Unterkomponenten oder Produkte der Testkomponenten müssen durch eine Matrix diffundieren können, um zu den Untersuchungsproben zu gelangen.

[0043] Mindestens eine poröse Matrix, die die Untersuchungsproben enthält, wird in irgendeinem oder mehreren der folgenden Schritte verwendet.

- (1) In-Kontakt-Bringen der Oberfläche der porösen Matrix mit mindestens einer anderen (porösen oder nicht porösen) Matrix, so dass die Proben und/oder eine oder mehrere der Testkomponenten über die Schnittstelle hinweg diffundieren können.
- (2) Trennen zweier oder mehrerer Matrizen, um die Interaktion von Komponenten und/oder Proben anzuhalten.
- (3) In-Kontakt-Bringen der Oberfläche zweier oder mehrerer Matrizen, so dass die Testkomponenten interagieren können.
- (4) Waschen, Spülen oder Eluieren einer Matrix mit flüssigen Puffern oder anderen Lösungsmitteln, um ungebundene und/oder unspezifisch gebundene Testkomponenten zu entfernen.
- (5) Dispensieren, Gießen, Hinzugeben oder Tränken von Testkomponenten in Lösung auf eine Matrix oder Filtern der Komponenten durch eine Matrix.
- (6) Bildgebung, Lesen, Scannen, Nachweisen oder anderweitiges Sichtbarmachen der radiometrischen, fluoreszenten, spektralphotometrischen oder elektromagnetischen Signale, die auf oder in einer oder mehreren Matrizen vorhanden sind.

[0044] CF-HTS bietet zahlreiche Vorteile gegenüber dem Stand der Technik. Das Fehlen separater Vertiefungen beseitigt die Notwendigkeit, Testkomponenten oder Reagenzien gleichzeitig und präzise in die Vertiefungen zu dispensieren. Stattdessen werden die Testkomponenten durch homogene Massenbehandlung dispesiert und gemischt. Da die Testkomponenten als homogene Gesamtlösung oder -matrix hergestellt werden, bestehen nur minimale statistische Schwankungen zwischen den Proben. Das Vorhandensein von Vertiefungen im 96-Vertiefungen-Format hingegen erzeugt große Schwankungen zwischen den Proben.

[0045] Weiterhin bietet CF-HTS das extrem hohe Dichte -Screening großer Mengen von Verbindungen. Selbst wenn die beobachteten Treffer bis zu einem gewissen Grade "zusammenlaufen", müssen nur die Verbindungen erneut getestet werden, die sich in der Nähe des Treffers befinden. Wenn also 10.000 Untersuchungsproben auf 50 Kandidaten um einen sichtbar gemachten Bereich herum reduziert werden könnten, könnten die 50 Kandidaten selbst mit der alten 96-Vertiefungen-Technologie leicht auf die aktive(n) Verbindung(en) reduziert werden.

[0046] Durch Dispensieren und Trocknen separater Verbindungen auf Kunststofffolien in dicht gepackten Anordnungen und dann Auftragen dieser Verbindungen auf CF-HTS, werden alle wichtigen Miniaturisierungsprobleme angegangen. Dieses Format benötigt keine Innovationen in Bezug auf Kunststoffe oder andere Materialien, um die Miniaturisierung durchzuführen, da die Miniaturisierung einfach durch Begrenzung der Probenmenge erreicht wird, die in die Matrix diffundiert. Dieses Format benötigt auch keine Mikrofluid-Technik zum Dispensieren von Test-Reagenzien, da der gesamte Test im Wesentlichen in „einer großen Vertiefung“ stattfindet, in der Reagenzien und Lösungen als eine Gesamtmenge behandelt werden. Nur die Untersuchungsproben müssen durch Mikrofluid-Technik dispesiert werden. Außerdem finden in diesem Format deutlich weniger statistische Schwankungen statt, da nur lokalisierte Zonen von Heterogenität in der ansonsten homogenen Matrix gesucht werden müssen. Es ist nicht nötig, viele verschiedene Vertiefungen abzulesen und zu vergleichen. Zusätzlich zu allen erwarteten Vorteilen der Miniaturisierung (Kosten, Durchsatz, Verwendung des Reagenz, Verwendung der Testverbindung) bietet CF-HTS auch überraschende Vorteile, wie z.B. die Möglichkeit, die meisten Schritte des Tests in einer Gesamtheit durchzuführen.

[0047] Ein zentraler Aspekt von CF-HTS ist die Beobachtung, dass Testkomponenten und Untersuchungsproben nicht schnell lateral diffundieren, selbst an Schnittstellen zwischen Matrizen. Wenn z.B. ein Agarosegel

auf eine Kunststoffplatte platziert wird, befindet sich eine signifikante Flüssigkeitsmenge an der Schnittstelle auf der Oberfläche des Gels. Wenn eine Interaktion zwischen einer Testkomponente im Gel und einer Testkomponente auf der Platte notwendig ist (wie im ELISA-Beispiel), ist entscheidend, dass die Komponente im Gel aus dem Gel und auf die Platte diffundieren kann. CF-HTS erfordert jedoch, dass die gleichzeitige laterale Diffusion erheblich langsamer ist, so dass die Interaktion auf der Platte nahe dem ursprünglichen Ort der gelbasierten Komponente stattfindet. Dieselben Grundsätze gelten für jede Matrix-Matrix-Schnittstelle zwischen Gelen, Filtern oder Oberflächen (oder jeder anderen Matrix) in beliebiger Kombination. Die Erkenntnis, dass dieses Diffusionsverhalten steuerbar und allgemein auf alle Matrixoberflächen anwendbar ist, ist erstmalig und widerspricht herkömmlichem Wissen.

[0048] Ein bevorzugtes Verfahren zum Einführen von Untersuchungsproben oder Verbindungen in eine Matrix (wie z. B. ein Gel oder einen benetzten Filter) besteht darin, geringe Volumen jeder Probe auf eine Oberfläche, wie z. B. die Oberfläche einer Kunststofffolie, in einer Anordnung zu dispensieren und zu trocknen, so dass sich keine zwei Proben mischen oder überlappen können und jede sich an einer bestimmten Stelle befindet. Wenn die Kunststofffolie auf eine Matrix platziert wird, lösen sich die Proben auf und diffundieren in die Matrix an Stellen, die ihren vordefinierten Stellen in der ursprünglichen Anordnung entsprechen.

[0049] Ein alternatives Verfahren zum Dispensieren von Proben in eine Anordnung ist das Dispensieren der Proben auf eine poröse Matrix, wie z. B. einen Filter, wo das Volumen jeder dispesierten Probe klein genug ist, dass Proben sich in der Matrix nicht überschneiden. Bei Kontakt mit einer anderen porösen Matrix, die mehr Flüssigkeit enthält, diffundieren die Verbindungen und leiten so den Test ein.

[0050] Wenn die ursprüngliche Anordnung von Proben, die in eine Matrix in einem CF-HTS-Screen eingeführt werden, eine hohe Dichte hat, so dass eine bestimmte Aktivitätszone räumlich die ursprüngliche Position von mehr als einer Probe abdeckt, dann ist jede dieser Proben potentiell die Quelle für die beobachtete Aktivität. Bei höheren Ausgangsdichten gibt es mehr Kandidat-Verbindungen für jeden Bereich, da mehrere Verbindungen in einem bestimmten Bereich vorhanden sind. Verbindungen können zusammendiffundieren, aber jede wird nach wie vor ihren eigenen räumlichen Gradienten haben, und sie werden an keiner Stelle quantitativ gemischt werden. Daher wird das Zentrum des Bereichs weiterhin der genauen Position der aktiven Verbindung in der ursprünglichen Anordnung entsprechen. In der Praxis sind Treffer selten genug, so dass erneutes Testen mehrerer Proben zur Sicherstellung der Bestimmung aktiver Verbindungen für jeden aktiven Bereich unbedeutend ist.

[0051] Eine alternative Ausführungsform der Erfindung besteht darin, physische Barrieren in die Matrizen eines Tests einzuführen, um die Entfernung zu begrenzen, über die Proben diffundieren können (wodurch das Format nicht mehr im engeren Sinne kontinuierlich wäre). Zum Beispiel können zwei Gele, die ein Enzym bzw. ein Substrat enthalten, jeweils mit einem Gitternetz (mesh) („cookiecutter“) so geschnitten werden, dass jedes Gel in viele separate Stücke unterteilt wird. Dann können die beiden Gele nach wie vor in Kontakt gebracht werden, so dass das Substrat und das Enzym in jedem einzelnen Gelstück zusammendiffundieren können. Dann könnten Untersuchungsproben in jedes separate Gelstück eingeführt werden, so dass die Tests völlig unabhängig sind, ohne Diffusion zwischen den Tests. Diese Ausführungsform beseitigt effektiv einige der Vorteile von CF-HTS durch Einführung statistischer Abweichungen zwischen Untersuchungsproben und durch Festlegung des Volumens und folglich Begrenzung des Signals für Anordnungen mit hoher Dichte. Diese Ausführungsform hat jedoch immer noch den Vorteil matrixbasierter heterogener Tests, in denen Testkomponenten nicht in eine große Anzahl paralleler Reaktionsgefäße dispesiert werden müssen, und sie beseitigt das partielle Mischen von Proben.

gELISA

[0052] ELISAs (enzyme linked immunosorption assays) sind heterogene Tests, welche die Bindung zwischen Liganden in Lösung und immobilisierten Rezeptoren nachweisen. ELISA erfordert zahlreiche Schritte des Mischens und Waschens von Reagenzien, die im 96-Vertiefungen-Format schwierig durchzuführen sind, und noch größere Schwierigkeiten sind zu ahnen, wenn die Vertiefungen vom 96-Vertiefungen-Format auf das 384-Vertiefungen-Format reduziert werden. Die Erfinder haben das CF-HTS-Verfahren zum Nachweis der Hemmung der Bindung zwischen Liganden und immobilisierten Rezeptor-Targets(gELISA) angewandt.

[0053] Ein Rezeptor ist ein beliebiges Molekül, das sich an ein anderes Molekül binden kann. Nicht einschränkende Beispiele sind Proteine, Peptide, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate und Komplexe der vorhergehenden Beispiele. Ein Rezeptor wird auf einer von mehreren möglichen Matrizen (der Rezeptormatrix) immobilisiert, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Kunststoffoberflächen (z. B. Petrischale oder Kunststoffplatte (von

Nunc)), Membranen oder Filter mit hoher Target-Bindungs-Kapazität (z. B. Nitrozellulose, Nylon oder PVDF (Millipore, Corning Costar, Schleicher & Schuell, BioRad) oder derivatisierte Membranen, wie z. B. SAM-Membranen (Promega)). Eine poröse Ligandenmatrix (z. B. Agarosegel oder poröse Membran) wird so hergestellt, dass der Ligand für den immobilisierten Rezeptor auf oder in die Matrix gegeben wird. Testverbindungen oder Proben werden direkt auf die Ligandenmatrix oder alternativ auf oder in eine Untersuchungsprobenmatrix (z. B. Polystyrol (Tekra), Polyvinyliden (z. B. von Dow Brands) oder eine andere flexible Kunststofffolie oder Membran) dispesiert. Die Testmatrix wird mit der Ligandenmatrix in Kontakt gebracht, und die Proben werden in die Ligandenmatrix diffundieren gelassen. Nach einer geeigneten Inkubationszeit wird die Ligandenmatrix mit der Rezeptormatrix in Kontakt gebracht, was es dem Liganden und den Proben ermöglicht, durch Diffusion in Kontakt mit dem Rezeptor zu kommen und potentiell mit ihm zu reagieren ([Fig. 1](#) zeigt den immobilisierten Rezeptor R, der sich an den biotinylierten Liganden L β bindet). Während der Inkubation binden sich Liganden an den immobilisierten Rezeptor, außer wenn eine Probenverbindung die Bindung zwischen Ligand und Rezeptor hemmt.

[0054] Nach einer geeigneten Inkubationszeit wird die Rezeptormatrix entfernt und mit einem geeigneten Puffer gewaschen, um ungebundenen und nicht spezifisch gebundenen Liganden und Proben zu entfernen. Die Rezeptormatrix wird dann in eine Lösung getränkt, die Test-Reagenzien enthält, die mit dem Liganden (z.B. einem Antikörper, Avidin oder Streptavidin im Falle eines biotinylierten Liganden) interagieren, und die Fähigkeit hat, entweder direkt (z. B. durch Fluoreszenz oder Radioaktivität) oder indirekt (z. B. Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase, HRP), alkalische Phosphatase (AP) oder Betagalactosidase-Konjugat) nachgewiesen zu werden ([Fig. 2](#) zeigt ein Avidin-HRP-Konjugat, AHRP, gebunden an die biotinylierten Liganden). Nach geeigneter Inkubation wird die Rezeptormatrix aus der Lösung entfernt und zum Entfernen von ungebundenem und nicht spezifisch gebundenem Reagenz gewaschen. Im Falle einer direkten Signalerfassung wird die Matrix mit Hilfe des geeigneten Verfahrens (z. B. spektrophotometrische Scanner, ladungsgekoppelte Kameras, Film, Phosphorimager oder Szintillationsdetektoren) sichtbar gemacht. Indirekte Signale (z.B. HRP oder AP) erfordern eine zusätzliche Signalentwicklungsreaktion, die erzielt wird durch Dispensieren von Substraten oder anderen notwendigen Reaktionskomponenten in oder auf eine poröse Substratmatrix und Platzieren dieser Matrix in Kontakt mit der Rezeptormatrix. Das Enzym (z. B. HRP oder AP) reagiert dann mit dem Substrat ([Fig. 3](#)). Alternativ wird ein präzipitierendes Substrat in eine Lösung anstatt in eine Matrix gegeben. Mit jedem Verfahren der Sichtbarmachung werden die Ligand/Rezeptor-Bindungsstellen eine sichtbare Reaktion erzeugen, während die Stellen, an denen die Ligand/Rezeptor-Bindung gehemmt wurde, keine sichtbare Reaktion erzeugen wird.

Zell/Liganden-Bindung

[0055] CF-HTS kann auch genutzt werden, um die Hemmung von Ligand/Zellrezeptor-Bindung nachzuweisen. Im herkömmlichen Test werden eine Testverbindung, radioaktiv markierte Liganden und Zellen kombiniert, die den entsprechenden Rezeptor in einem Behälter, wie z. B. einer Vertiefung, exprimieren. Dann verstreicht ausreichend Zeit, um es dem Rezeptor zu ermöglichen, sich an den Liganden zu binden, wenn eine solche Bindung nicht von der Testverbindung gehemmt wurde. Alle ungebundenen und nicht spezifisch gebundenen Komponenten werden aus den Zellen entfernt, und die mit den Zellen verbundene Menge an Radioaktivität wird gemessen. Die Erfinder haben das CF-HTS-Verfahren eingesetzt, um die Hemmung der Bindung von Liganden an Zellen nachzuweisen.

[0056] Zellen, die den gewünschten Rezeptor exprimieren, werden auf einer Matrix (Zellmatrix), wie z. B. Gelen, Filtern oder Membranen (z. B. Transwell-Gewebekulturmembranen (Corning Costar) oder Chemotaxis-Membranen (Neuro Probe)), aber nicht darauf beschränkt, gezüchtet oder geschichtet. Eine poröse Matrix (z. B. Agarosegel oder poröse Membran) wird hergestellt, so dass markierter Ligand für den Rezeptor auf oder in die Matrix (Ligandenmatrix) dispesiert wird. Testverbindungen oder Proben werden direkt auf die Liganden- oder Zellmatrix oder alternativ auf oder in eine andere Matrix (z. B. Polystyrol (Tekra), Polyvinyliden oder eine andere flexible Kunststofffolie oder -membran; Probenmatrix) dispesiert. Die Probenmatrix wird mit der Ligandenmatrix in Kontakt gebracht, wodurch es der Probe ermöglicht wird, in die Ligandenmatrix zu diffundieren. Nach einer geeigneten Inkubationszeit wird die Ligandenmatrix in Kontakt mit der Zellmatrix gebracht, vorzugsweise auf der Nicht-Zellen-Seite der Matrix, und es wird dem Liganden und der Probe ermöglicht, durch Diffusion in Kontakt mit dem Rezeptor zu kommen und mit ihm zu reagieren ([Fig. 4](#)). Während der Inkubation binden sich die markierten Liganden an die immobilisierten Zellen, außer wenn eine Probe die Liganden-Zell-Bindung hemmt.

[0057] Nach der Inkubation wird die Zellmatrix von der Ligandenmatrix getrennt und zum Entfernen ungebundener und nicht spezifisch gebundener Liganden und Proben mit einem geeigneten Puffer gewaschen. Die

Zellmatrix wird mit dem entsprechenden Verfahren (z. B. spektrophotometrischen Scannern, ladungsgekoppelten Kameras, Film, Phosphorimagern oder Szintillationsdetektoren) sichtbar gemacht ([Fig. 5](#) zeigt die Entwicklung des Tests auf einem Film).

[0058] Wie oben gezeigt, erzielt CF-HTS alle Vorteile, die für die „Freiformat“-Tests vorhergeschen werden, und kann auf alle verschiedenen Arten biologischer oder biochemischer Tests, mit allen verschiedenen Arten von Formaten und mit allen verschiedenen Reagenzien und Arten von Ausrüstung angewandt werden. Aufgrund seiner breiten Anwendbarkeit wird es am besten durch die folgenden Beispiele verdeutlicht. Diese Beispiele stellen jedoch die bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung dar und schränken die Ansprüche oder die Beschreibung nicht ein. Der durchschnittliche Fachmann wird schnell erkennen, dass Änderungen und Modifikationen der angegebenen Ausführungsformen durchgeführt werden können, ohne vom Schutzzumfang der Erfindung abzuweichen.

BEISPIELE

Referenzbeispiel 1: Ein kolorimetrischer Geltest in zwei Schritten zum Nachweis von Phosphat, das vom Vancomycinresistenten Enzym VanA erzeugt wird

[0059] VanA ist ein Schlüsselenzym in der Vancomycin-Resistenz und katalysiert die Bindung von D-Alanin an D-Alanin oder D-Alanin an D-Laktat. Herkömmlicherweise wird dieses Enzym nachgewiesen durch die Erzeugung von Farbe aus Phosphat, das freigesetzt wird, wenn das Enzym aktiv ist (VanA-Aktivität hydrolysiert ATP zu ADP und Phosphat). Forscher wissen, dass D-Cycloserin VanA auf dosisabhängige Art und Weise hemmt, und nutzen diesen Inhibitor als Positivkontrolle im Vergleich zu anderen potentiellen Inhibitoren.

Enzymgel

[0060] Ein Enzymgel wurde hergestellt durch Zugabe von VanA-Enzym zu geschmolzener 1%iger Agarose (hochschmelzender Agarose, Gibco BRL) bei 45°C in 50 mM HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piprazin-N'-(2-ethansulfonsäure]), 20 mM MgCl₂, 20 mM KCl, pH 7,3, bis zu einer VanA-Endkonzentration von 2µM. Diese Agarmischung wurde dann in eine BioRad-Gel-Gussvorrichtung gegossen und bei 2-8°C 30 Minuten lang erstarrten gelassen.

Substratgel

[0061] Ein Substratgel wurde hergestellt durch Zugabe von ATP, D-Alanin und D-Laktat zu geschmolzener Agarose, um jede Komponente auf 1mM, 1,5mM bzw. 1,75mM zu bringen, und Herstellung des Gels wie für das Enzymgel beschrieben.

Probenmatrix

[0062] Eine Reihe von 1-µl-Aliquoten serieller Verdünnungen von 5000, 2000, 1000, 500, 200, 100 µM D-Cycloserin, einem bekannten Inhibitor, der als Kontrollprobe verwendet wurde, in 1:1 Ethanolwasser wurde auf ein Stück Polyvinylidenchloridfilm (PVDC) aufgetragen und 10 Minuten lang trocknen gelassen.

Inkubation des Enzyms mit dem Substrat in Anwesenheit des Inhibitors

[0063] Das Enzymgel wurde für einen Zeitraum von 5 Minuten mit der Probenmatrix in Kontakt gebracht. Dann wurde das Substratgel auf das Enzymgel platziert und 15-20 Minuten lang inkubieren gelassen. Anschließend wurden die zwei Gele getrennt. Es wird erwartet, dass während der Inkubation im gesamten Gel Phosphat erzeugt wird, da das Enzym die Bindung der Substrate katalysiert, mit Ausnahme der Bereiche, in denen D-Cycloserin ausreichend stark konzentriert war, um die Reaktion zu hemmen.

Sichtbarmachung des Tests

[0064] Eine Phosphatnachweis-Mischung, die aus frisch hergestelltem 0,15%igem Malachitgrün und 1,4%igem Ammoniummolybdat in 1,33N HCl bestand, wurde auf die Enzym- und Substratgele gegossen und gleichmäßig verteilt. Diese Reagenzien reagieren mit Phosphat und erzeugen zunehmend dunkle Grünschattierungen, abhängig von zunehmenden Phosphatkonzentrationen. Die Farbe wurde 5-10 Minuten lang sich entwickeln gelassen ([Fig. 6](#) zeigt die Farbentwicklung auf dem Gel, wo Inhibitormengen von 5 Nanomol bis 0,5 Nanomol variierten). Die grünen Gele wurde mit einer ladungsgekoppelten Stratagene Eagle Eye-Kamera fo-

tografiert. Wie erwartet, entsprach der Grad, in dem Inhibitorbereiche weniger grün aussahen, der Konzentration hinzugegebenen Inhibitors. Dieser Test kann daher verwendet werden, um VanA-Inhibitoren durch die Anordnung kombinatorischer Kugelchen oder Verbindungen nachzuweisen, die auf eine beliebige andere Oberfläche dispensiert werden, die dann mit dem Geltest in Kontakt gebracht wird.

[0065] Dieser Test zeigt auch, dass das Gel-Testformat für Reaktionen mit mehreren Schritten geeignet ist. Diese Eigenschaft ist notwendig, damit dieses Format für eine große Bandbreite von Tests nützlich ist, da viele Tests mehrere Schritte erfordern. In diesem Fall ist der VanA-Test ein aus zwei Schritten bestehender Test enzymatischer Aktivität, gefolgt von Farbentwicklung. Homogene (Einzelschritt-)Versionen dieses Tests sind nicht gut durchführbar, da die Farbentwicklungsreagenzien und -bedingungen die VanA-Aktivität behindern und außerdem mit der Zuführung in einem Agargel inkompatibel sind. Daher ist die räumliche und zeitliche Trennung dieser zwei Schritte durch einen ersten Enzymgeltest, gefolgt von einem Farbentwicklungsschritt in der Lösungsphase, wünschenswert.

Referenzbeispiel 2: Ein Geltest in zwei Schritten zum Nachweis von Phosphat, das erzeugt wird von *S. Cerevisiae* Elongationsfaktor 3, ATPase-Aktivität, stimuliert durch Ribosombindung

[0066] Wenn der Pilz-Elongationsfaktor 3 (EF-3) mit Ribosomen interagiert, wird die Phosphatase-Aktivität stimuliert. Die Erfinder haben CF-HTS auf den Test für diese Aktivität angewandt.

[0067] Ein Enzymgel, das EF-3 (ein hochgradig temperaturempfindliches Enzym) und Heferibosomen in EF-3-Testpuffer enthielt, wurde hergestellt. Ein Substratgel, das 1 mM ATP in Testpuffer enthielt, wurde ebenfalls hergestellt. Beide Gele enthielten 2% Dimethylsulfoxid in niedrig schmelzender Agarose (Gibco BRL) und wurden bei 37°C hergestellt und 30 Minuten lang bei 4°C sich setzen gelassen. Serielle Verdünnungen von Poly-L-lysin, einem Inhibitor von EF-3, der als Kontrollprobe verwendet wird, wurden auf PVDC-Film aufgetüpft und getrocknet (Probenmatrix). Der Test wurde dann durchgeführt wie in Beispiel 1 durch Vorinkubieren des Enzymgels mit den Inhibitoren auf der Probenmatrix. Dann wurde das Enzymgel 20 Minuten lang in Kontakt mit dem Substratgel gebracht. Wie in Beispiel 1 wurden das Enzym- und das Substratgel mit einer Farbentwicklungs-Mischung aus Malachitgrün und Ammoniummolybdat gefärbt. Dann wurde das Enzymgel mit einer ladungsgekoppelten Kamera sichtbar gemacht. Die Inhibitorflecken erscheinen als hellere Bereiche vor einem grünen Hintergrund. [Fig. 7](#) zeigt die Farbentwicklung auf dem Gel, wo Inhibitormengen von 5 Picomol bis 200 Picomol variierten. Die Ergebnisse zeigen das dosisabhängige Signal des Inhibitors, was darauf hinweist, dass Verbindungen in diesem Test untersucht werden können, um neue EF-3-Inhibitoren zu finden. Beispiel 2 belegt die Nützlichkeit von CF-HTS selbst bei der Komplexität, die durch das Vorhandensein von Organellen oder anderen biologischen Rohmischungen oder -extrakten gegeben ist.

Referenzbeispiel 3: indirekter gELISA-Farbnachweis von Protein-Protein-Interaktions-Inhibitoren

[0068] Wie oben erwähnt, wird ELISA im Allgemeinen verwendet, um eine Hemmung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen nachzuweisen, wo die Rezeptoren in Mikrotiter-Vertiefungen immobilisiert sind. "Ligand-Rezeptor"-Paare, die in ELISA verwendet werden, können jedes beliebige Paar von Bindungsmolekülen umfassen, von Proteinen oder anderen Makromolekülen bis hin zu kleinen Molekülen. Diese Tests sind komplexe Tests mit mehreren Schritten, die das Immobilisieren des Rezeptors, die Inkubation des Rezeptors mit einem Liganden, das Waschen zum Entfernen von unerwünschtem, unspezifisch zurückgehaltenem Liganden, der ansonsten ein starkes Untergrundsignal erzeugen würde, die Bindung von Sichtbarmachungs-Reagenzien (z. B. einem Ligandspezifischen Antikörper, konjugiert an ein Reporterenzym) an den Rezeptor-gebundenen Liganden und die Erzeugung eines sichtbaren Signals durch die Bereitstellung von Substraten für das Reporterenzym erfordern. Es ist offensichtlich, dass die Komplexität von ELISA die HTS-Industrie zu dem Schluss geführt hat, dass ELISA nicht zu einem Freiformat-Test umgewandelt werden kann. Die Erfinder haben jedoch diesen komplexen Test mit mehreren Schritten für das CF-HTS-Format angepasst, um eine Vielzahl von Protein-Protein-, Protein-Ligand- und anderen Ligandenbindungs-Interaktionen zu testen.

[0069] Urokinase-ähnlicher Plasminogen-Aktivator (uPA) bindet sich an seinen entsprechenden Rezeptor (uPAR). Die uPA/uPAR-Interaktion wird mit der Metastase verschiedener Arten von Krebs in Verbindung gebracht. Die Erfinder haben unter Verwendung gereinigter Rezeptoren und Liganden einen herkömmlichen uPA/uPAR-ELISA für CF-HTS angepasst.

uPAR-Matrix

[0070] Kunststoffplatten (7,5 cm × 11,5 cm; von Nunc, Inc., Naperville, IL) wurden über Nacht mit 15 ml von

118 nM gereinigtem uPAR in phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) (Life Technologies, Grand Island, NY) bei einem pH von 7,4 und 4° C beschichtet. Nach dem Beschichten der Kunststoffplatte über Nacht wurde die uPAR-Lösung dekantiert, und die restlichen Bindungsstellen auf der Kunststoffplatte wurden blockiert durch Zugabe von 15 ml PBS, die 1% (m/v) Casein enthielt, und zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT). Nach der Blockierung wurde die Blockierungslösung dekantiert, und die Kunststoffplatte wurde fünfmal mit 20 ml Waschpuffer gewaschen, der aus 0,05 Tween-20 (Polyoxyethylensorbitan-monolaurat) in PBS bestand. Nach dem Waschen wurde die Kunststoffplatte 10 Minuten lang bei RT getrocknet. Diese Zeit wurde gewählt, damit die Kunststoffplatte kurz darauf in dem unten beschriebenen Test verwendet werden konnte, um ein Übertrocknen der Matrix zu vermeiden, das zu einem Aktivitätsverlust führen kann.

β-uPA-Matrix

[0071] Zum Zwecke des Tests wird der verwendete uPA mit Biotin markiert (β-uPA). Gele, die β-uPA enthielten, wurden hergestellt durch Tränken von β-uPA in Agar zum Vermeiden hoher Temperaturen (im Gegensatz zum Gießen von β-uPA in geschmolzenes Agar in den Beispielen 1 und 2). Das Agar wurde hergestellt, indem zunächst 0,1 g Agarose (Sigma, St. Louis, MO) mit 10 ml PBS gemischt wurde, die Mischung bis zum Schmelzen erhitzt und dann in eine 8 × 7 × 0,075 cm³-Gelgießapparatur (Bio-Rad, Hercules, CA) gegossen wurde. Nach der Erstarrung (entweder bei Raumtemperatur oder bei 4°C) wurden die Gele über Nacht bei 4°C in 15 ml β-uPA (ungefähr 10 nM) in Testpuffer getränkt, der aus PBS, 0,05% Tween-20 und 0,1% Casein (beides von Sigma, St. Louis, MO) bestand. Das Gel wurde direkt vor dem Gebrauch 20 Minuten lang bei RT getrocknet.

Probenmatrix

[0072] In Abwesenheit eines bekannten Inhibitors für kleine Moleküle für die uPA/uPAR-Bindung wurde ein nicht biotinylierter uPA (Pro-uPA) als Kontrollproben-Inhibitor von β-uPA/uPAR-Bindung verwendet. Fünf Mikroliter-Aliquoten von 0, 0,03, 0,1, 0,3, 1 und 3 μM Pro-uPA in Testpuffer wurden auf einen PVDC-Film (Dowbrands L.P., Indianapolis, IN) dispesierte und 2 Stunden lang bei RT getrocknet.

Inkubation des uPAR mit Pro-uPA und β-uPA

[0073] Die Probenmatrix wurde auf eine Seite des β-uPA-Gels platziert, wobei die trockenen Pro-uPA-Flecken in Kontakt mit der β-uPA-Geloberfläche standen. Der Pro-uPA wurde 10 Minuten bei RT in das Gel diffundieren gelassen. Anschließend wurde die andere Seite des β-uPA-Gels in die Kunststoffplatte platziert, um es dem β-uPA (der als Ligand wirkte) und dem Pro-uPA (der als kompetitiver Inhibitor wirkte) zu ermöglichen, mit dem uPAR auf der Oberfläche der Kunststoffplatte zu interagieren. Die Bindungs-/Konkurrenzreaktion wurde 20 Minuten lang bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Kunststoffplatte vom Gel getrennt und schnell 4mal mit 20 ml Waschpuffer gewaschen. Eine Avidin-Meerrettichperoxidase-(Avidin-HRP)-Konjugatlösung wurde hergestellt durch Verdünnung von Avidin-HRP (Sigma, St. Louis, MO) 1 zu 25.000 in Testpuffer und Zugabe von 15 ml auf die Kunststoffplatte. Die Reaktion wurde 10 Minuten lang bei RT inkubiert, gefolgt von Dekantieren der Avidin-HRP-Lösung und Waschen der Kunststoffplatte wie oben. Die Kunststoffplatte wurde 20 Minuten trocknen gelassen.

[0074] Das Avidin in Avidin-HRP bindet sich spezifisch an Biotin, so dass nur die Bereiche der Matrix, die "Ligand-Rezeptor"-Bindung aufweisen, schließlich eine Farbentwicklung aufweisen. Die Bereiche der Matrix, in denen die "Ligand-Rezeptor"-Bindung kompetitiv durch Pro-uPA gehemmt wird, weisen keine Farbe auf.

Farbentwicklung

[0075] Das farbentwickelnde Gel, das ein kolorimetrisches HRP-Substrat (OPD-Gel) enthielt, wurde hergestellt durch Auflösen von 2 o-Phenyldiamin-HCl-(OPD)-Tabletten in 7 ml Verdünnungsmittel (beides von Abbott Kit Nr. 6172-30, Abbott Labs, Abbott Park, IL) und Kombinieren dieser Lösung mit einer Agaroselösung, die hergestellt wurde durch Schmelzen von 0,1 g Agarose in 3 ml Wasser. Die endgültige 10-ml-Mischung wurde in eine 8 × 7 × 0,075-cm-Mini-Protein II-Gelgießapparatur gegossen und bei 4°C 15 Minuten lang erstarrten gelassen. Das Gel wurde von den Glasplatten des Gelgießstands entweder auf PVDC oder auf eine flexible Kunststofffolie übertragen und 10 Minuten bei RT lufttrocknen gelassen. Das Gel wurde dann auf eine andere PVDC- oder Kunststofffolie übertragen, um die andere Seite 10 Minuten lang trocknen zu lassen. Dann wurde das OPD-Gel in die Kunststoffplatte platziert, um die Farbentwicklung einzuleiten. Zu verschiedenen Zeitpunkten während der OPD-Inkubation wurde die Kunststoffplatte auf einen 440 nm-Bandpassfilter (Omega Optical, Inc., Brattleboro, VT) platziert, der sich wiederum auf einer Faseroptik-Diffusionsplatte befand, die von einer

Fiber-Lite-Lichtquelle beleuchtet wurde (beide von Dolan-Jenner Industries, Inc., Lawrence, MA). Die resultierenden Bilder wurden mit einer ladungsgekoppelten Kamera (Eagle Eye system, Stratagene, La Jolla, CA) aufgenommen.

Kontrollexperiment

[0076] **Fig.** 8 stellt ein Kontrollexperiment für Beispiel 3 dar. Was [Fig. 8A](#) betrifft, wurden Agarose-Quadrat (1 cm²) in Lösungen mit verschiedenen β-uPA-Konzentrationen getränkt, wie unter jedem Quadrat angegeben (außer der 50 nM-Lösung, die links vom Agarose-Quadrat markiert ist). Nachdem die Agarose-Quadrat auf einer uPAR immobilisierten Kunststoffplatte inkubiert wurden, wurden sie entfernt. Dann wurde die Kunststoffplatte gewaschen, und die Bereiche der Matrix, wo β-uPA/uPAR-Bindung stattfand, wurden sichtbar gemacht wie oben beschrieben. [Fig. 8B](#) zeigt ein Diagramm des durchschnittlichen Pixelwerts (minus Hintergrund) für jedes Quadrat (wie ermittelt durch Analyse des digitalisierten Bildes der ladungsgekoppelten Kamera mit NIH Image Analysis-Software) im Verhältnis zur Konzentration von β-uPA in jedem Agarose-Quadrat zu verschiedenen Zeitpunkten während der OPD-Farbentwicklung. Der aus dem Agarosegel freigesetzte β-uPA zeigte eine typische Rezeptor-Ligand-Bindungskurve mit halbmaximaler Bindung (Kd) bei ungefähr 3-5 nM, was übereinstimmt mit berichteten Werten für diese Reaktion in Standard-ELISA und anderen Tests, die diesen Parameter messen. **Fig. 8** zeigt, dass das mit gELISA erzeugte indirekte kolorimetrische Signal quantitativ vom Grad der Ligand-Rezeptor-Interaktion abhängt.

Ergebnisse der Pro-uPA/β-uPA-Konkurrenzreaktion

[0077] **Fig.** 9 zeigt die Hemmung der β-uPA/uPAR-Bindung durch Pro-uPA. Die Punkte in [Fig. 9A](#) zeigen Bereiche an, in denen die β-uPA/uPAR-Bindung gehemmt wurde. Dementsprechend ging die Avidin-HRP in diesen Bereichen keine Bindung ein. Folglich reagierte die HRP nicht mit den Substraten im OPD-Gel, um eine Farbentwicklung herbeizuführen. [Fig. 9B](#) ist eine alternative Möglichkeit, dieselben Bilddaten der ladungsgekoppelten Kamera darzustellen, welche die Fähigkeit des menschlichen Auges verbessert, die quantitative Titration zu erkennen.

Referenzbeispiel 4: direkter radiometrischer Nachweis von Inhibitoren von Protein-Protein-Interaktionen

[0078] T-Zell-Aktivierung ist ein Bestandteil der Immunreaktion des Körpers. Damit während der T-Zell-Aktivierung nachgeordnete (stromabwärts) Ereignisse stattfinden können, muss p56lck (LCK, ein Protein) mit dem ITAM-Bereich (immunoglobulin related tyrosine based activation motif) der Zytoplasmabezirke des T-Zellen-Antigenrezeptors interagieren. Verbindungen, die diese Protein-Protein-Interaktion hemmen, sind potentielle Immunsuppressoren. Die Erfinder haben CF-HTS angewandt, um diese Protein-Protein-Interaktion zu testen, worin das LCK an eine Membran immobilisiert ist.

LCK-Matrix

[0079] Biotinyliertes LCK wird auf einer Biotin-Einfangmembran (SAM-Membran) (Promega Corp., Madison, WI) durch 10-minütiges Fluten bei RT eines 11 cm × 2 cm großen Streifens mit 5 ml von 3 μM LCK in PBS, enthaltend 5 mM DTT (Dithiothreitol), immobilisiert, wonach der Puffer entfernt wird. Diese Zeitplanung dient dazu, dass die SAM-Membran kurz darauf (innerhalb von Minuten) in dem unten beschriebenen Test verwendet werden kann.

ITAM*-Matrix

[0080] Ein Agarosegel, das radioaktiv markiertes ITAM-Peptid (ITAM*) enthält, wird hergestellt durch Mischen von 0,1 g Agarose mit 10ml Puffer, Erhitzen bis zum Schmelzen und anschließendes Gießen in einer 8 × 7 × 0,075 cm großen Gelgießapparatur. Das ITAM* wird entweder direkt vor dem Gießen hinzugegeben oder alternativ nach der Erstarrung bis zu einer endgültigen Konzentration von 10 nM in das Gel getränkt.

Probenmatrix

[0081] Zu testende Untersuchungsproben werden auf eine Kunststoffoberfläche oder auf PVDC dispesiert und getrocknet, um die Probenmatrix zu bilden.

Inkubation des ITAM*, LCK und der Untersuchungsproben und Sichtbarmachung

[0082] Die Probenmatrix wird in Kontakt mit einer Seite des ITAM*-Gels gebracht, so dass die Untersuchungsproben in das ITAM*-Gel diffundieren können. Anschließend wird die andere Seite des ITAM*-Gels in Kontakt mit der SAM-Membran gebracht, auf der das LCK immobilisiert wurde. Nach 15-45-minütiger Inkubation wird die SAM-Membran entfernt, gewaschen und mit einem Phosphorimager oder Film sichtbar gemacht. Inhibitoren der ITAM-LCK-Interaktion werden angezeigt durch Bereiche geringerer Radioaktivität, die auf dem Bild einer geringeren Signalstärke entsprechen.

Kontrollexperiment für ITAM*/LCK-Bindung

[0083] Agarosegele wurden hergestellt durch Mischen von 0,1 g Agarose mit 10 ml Puffer, Erhitzen bis zum Schmelzen und anschließendes Gießen in einer $8 \times 7 \times 0,075$ cm großen Gelgießapparatur. Nach der Erstarrung wurden Kreise mit einem Durchmesser von 1 cm aus dem Gel ausgestochen und über Nacht bei 4°C in 400 µl von 0,1, 0,3, 1,3, 10 und 20nM mit ^{125}I markiertem ITAM (Amersham, Arlington Heights, IL) in Puffer getränkt. Die Gelscheiben wurden aus der Lösung genommen und 20 Minuten lang bei RT trocknen gelassen. Dann wurden sie auf die LCK-immobilisierte SAM-Membran platziert und 45 Minuten lang bei RT inkubiert. Die Gele wurden entfernt und die Membranen 4-mal mit Puffer gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die SAM-Membranen mit einem Phosphorimager sichtbar gemacht.

[0084] [Fig. 10](#) zeigt eine dosisabhängige Bindung zwischen ^{125}I -ITAM und immobilisiertem LCK auf der SAM-Membran.

[0085] [Fig. 11](#) zeigt ein Diagramm des durchschnittlichen Pixelwerts (minus Hintergrund) für jedes ^{125}I -ITAM-Gel (wie ermittelt durch Analysieren des digitalisierten Bildes aus dem Phosphorimager mit Image-Quant-Software von Molecular Dynamics) im Verhältnis zur ^{125}I -ITAM-Konzentration in der Gelscheibe. Das ^{125}I -ITAM, das aus dem Gel an immobilisiertes LCK freigesetzt wurde, wies eine typische Rezeptor-Ligand-Bindungskurve auf.

Referenzbeispiel 5: Reporteren-Test einer ganzen Zelle unter Verwendung eines Gel/Filter-Kombinationsformats

[0086] Nierenzellen, bekannt als HEK-Zellen, werden mit einem Plasmid transfiziert, das einen Cyclic-AMP Response Element (CREB)-Promotor, kondensiert an ein Luciferase-Gen (Luciferase-Reporteren von Promega), enthält. Wenn die transfizierten Zellen mit Forskolin behandelt werden, wird Luciferase-Reporteren-Expression induziert. Danach wird, wenn ein biologischer Puffer, der das Luciferase-Substrat (Käfer-Luciferin von Promega) und entsprechende Cofaktoren (20 mM Tricin pH 7,8, 0,1 mM EDTA, 33 mM DTT, 0,3 mM Coenzym A, 0,5 mM Adenosintriphosphat und 1 mM MgCl₂) enthält, zu den HEK-Zellen gegeben wird, eine Photonenemission erzeugt, die durch herkömmliche Instrumente nachgewiesen werden kann. Die Erfinder haben diesen Test für CF-HTS angepasst.

Zellmatrix

[0087] Zellen in der Kultur werden mit Trypsin behandelt, in eine Corning/Costar TRANSWELL™-Membran (3-Mikron-Polycarbonatfilter mit einem Stützring aus Kunststoff) übertragen und über Nacht bei 37°C, 5% CO₂, in der Anwesenheit von Gewebekulturmedium inkubiert. Dann wird das Medium von der Membran entfernt, und der Filter, an den die Zellen gebunden sind, wird 15 Minuten lang luftgetrocknet und kurz darauf in den unten beschriebenen Schritten verwendet.

Induktormatrix

[0088] Ein Gel, das den Induktor von Luciferase-Expression enthält, wird hergestellt durch Zugabe von 12 µl einer 10 mM-Vorratslösung von Forskolin (Sigma-Vorratslösung in Ethanol) zu 6 ml eines 1%igen niedrig schmelzenden Agarosegels. Das Gel wird mit einer Endkonzentration von 20 µM Forskolin bei Raumtemperatur erstarrten gelassen.

Probenmatrix

[0089] Proben, die die Forskolin-Induktion blockieren können, werden auf getrennten Stellen mit hoher Dichte auf PVDC dispesiert und getrocknet.

Inkubation der Reagenzien und Nachweis der Inhibition

[0090] Die Inhibitor-Seite des PVDCs wird mit dem Induktorgel inkubiert. Als Nächstes wird das Gel, das den Forskolin-Induktor enthält, auf die Nicht-Zell-Seite der oben hergestellten Zellmatrix platziert. Diese werden zusammen bei 37°C und 5% CO₂ 20 Minuten lang inkubiert. Dann wird das Forskolin-Gel entfernt, und die Zellmatrix wird zwecks maximaler Expression des Luciferase-Konstrukts weitere vier Stunden lang bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Um die Enzymaktivität (oder Hemmung davon) der Luciferase zu bestimmen, wird der Zellmatrixfilter physikalisch von seinem Kunststoff-Stützring entfernt und in eine Petrischale gelegt. Die Petrischale wird mit dem Luciferase-Substrat (Käfer-Luciferin von Promega) in einem biologischen Puffer mit entsprechenden Cofaktoren geflutet, um Licht als Signal zu erzeugen. Da das Signal in immobilisierten Zellen lokalisiert ist, die Luciferase exprimieren, resultieren Inhibitoren des ursprünglichen Induktionsschritts in Bereichen mit geringerer Photonenemission.

Referenzbeispiel 6: Gel/Filter-CF-HTS zum direkten Nachweis von Inhibitoren von Ligand-Zell-Interaktionen

[0091] Ligand-Rezeptor-Bindung auf Zelloberflächen initiiert Signalwege in Zellen, die schließlich zu funktionalen Reaktionen (z. B. Zellproliferation oder Sekretion biologisch aktiver Substanzen) führen. Zum Regulieren der biologischen Reaktion von Zellen bei Krankheitszuständen wird oftmals versucht, die Ligandenbindung an Zelloberflächen zu hemmen. Ein gebräuchliches Verfahren, um Inhibitoren von Ligand-Zellrezeptor-Bindung zu bewerten, besteht in der Bewertung der Fähigkeit des Inhibitors, die Bindung zwischen dem radioaktiv markierten natürlichen Liganden und den Zellen zu reduzieren. Dies beinhaltet die Inkubation der Zellen mit Radioligand und Inhibitor, gefolgt vom Entfernen von ungebundenem und nicht spezifisch gebundenem Radioligand durch Waschen und anschließendem Messen der Menge gebundener Radioaktivität.

[0092] Interleukin-8 (IL-8) ist ein chemotaktisches Chemokin, das an Entzündungsvorgängen beteiligt ist, indem es sich an Rezeptoren auf verschiedenen Arten von Zellen bindet. Die Erfinder haben einen CF-HTS-Ligand-Rezeptor-Zellassay entwickelt, um Inhibitoren dieser Interaktion zu bewerten.

Zellmatrix

[0093] HEK-Zellen (ATCC, Bethesda, MD), die den IL-8a-Rezeptor exprimieren, wurden mit einer Dichte von ungefähr 20 Millionen Zellen pro Platte auf einen Transwell-Membranfilter (Corning Costar Corp, Cambridge, MA) mit einem Durchmesser von 75mm aufgetragen. Sie wurden über Nacht in Puffer (RPMI von Life Technologies, Grand Island, NY), der 10 mM Hepes (Sigma, St Louis, MO) enthielt, bei pH 7,2 und 37°C an den Membranfilter binden gelassen. Nachdem sich die Zellen an den Filter gebunden hatten, wurde das Medium entfernt, und die Zellen wurden mit frischem Puffer gewaschen, um eventuell ungebundene Zellen zu entfernen. Die Filter wurden umgedreht, so dass die Zellseite nach unten zeigte, und in einem Winkel platziert, um das Ablaufen von überschüssigem Medium zu ermöglichen, und anschließend 20 Minuten lang getrocknet. Die Zeitplanung hierfür war so, dass die Zellmatrix direkt in dem unten beschriebenen Assay verwendet werden konnte.

Ligandenmatrix

[0094] Die Ligandenmatrix wurde hergestellt durch Tränken von mit ¹²⁵I markiertem IL-8 (Amersham, Inc., Arlington Heights, IL) in ein Agarosegel, hergestellt durch Mischen von 0,1 g Agarose mit 10 ml Puffer, Erhitzung bis zum Schmelzen und anschließendes Gießen in einer 8 × 7 × 0,075 cm großen Gelgießapparatur. Die Gele wurden über Nacht bei RT getränkt und gleichzeitig langsam auf einer sich drehenden Plattform (New Brunswick Scientific Co., Inc, Edison, NJ) gemischt. Nach dem Tränken wurden die Gele direkt vor dem Gebrauch 20 Minuten lang bei RT getrocknet. Die Zeitplanung hierfür war so, dass das Gel direkt im Assay verwendet werden konnte.

Probenmatrix

[0095] In der Abwesenheit eines bekannten Inhibitors der IL-8-Zellrezeptor-Bindung wurde nicht radioaktiv markiertes IL-8 (Genzyme Corp., Cambridge, MA) als Kontrollproben-Inhibitor verwendet, um die Inhibition der ¹²⁵I-IL-8-Bindung an HEK-Zellen zu beobachten. Ein Mikroliter von 0, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 und 100 µM IL-8 wurde auf eine Kunststofffolie, wie z. B. PVDC, dispesierte und 1 Stunde lang unter Vakuum bei RT getrocknet.

Inkubation

[0096] Die Probenmatrix wurde auf eine Seite der Ligandenmatrix platziert, so dass die getrockneten IL-8-Punkte in Kontakt mit der Geloberfläche kamen. Das Gel wurde umgedreht, damit die andere Seite 10 Minuten lang bei RT trocknen und der "Inhibitor" in das Gel diffundieren konnte. Anschließend wurden die Gele auf die Nicht-Zellen-Seite der Zellmatrix platziert. Die Bindungsreaktion wurde 45 Minuten lang bei RT inkubieren gelassen. Danach wurden die Gele entfernt, und die Nicht-Zellen-Seite der Membran wurde 4mal mit Puffer gewaschen. Die Membranen wurden vollständig trocknen gelassen, bevor sie von ihrem Kunststoff-Stützring entfernt wurden. Dann wurden die Membranen entweder mit Röntgenfilm oder einem Phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) sichtbar gemacht.

[0097] [Fig. 12](#) zeigt eine Dosiswirkung für ^{125}I -IL-8 in Agarosegelen, die durch eine Zellmatrix diffundieren, um sich an HEK-Zellen zu binden, die den IL-8a-Rezeptor exprimieren. Mehrere 1 cm^2 große Agarosequadrate wurden in Lösungen mit verschiedenen ^{125}I -IL-8-Konzentrationen getränkt wie angegeben. Anschließend wurden die in Ligand getränkten Quadrate in Kontakt mit der Zellmatrix gebracht wie oben beschrieben. Nach der Inkubation wurden die Quadrate von der Zellmatrix entfernt, und die Nicht-Zellen-Seite der Membran wurde mit Puffer gewaschen. Ein Phosphorimager wurde verwendet, um das zellgebundene ^{125}I -IL-8 zu lokalisieren. Die Daten zeigen, dass ein direktes radiometrisches Auslesen in diesem gelbasierten Zellassay quantitativ vom Grad der Ligand-Rezeptor-Interaktion abhängt. [Fig. 12](#) zeigt auch, dass die Bindungsstellen eine klare Form behalten, und bestätigt, dass Querdiffusion des Signals in dem Assay kein Problem ist.

[0098] [Fig. 13](#) stellt die Ergebnisse des Experiments über kompetitive Hemmung dar. Die Hemmung der Bindung zwischen ^{125}I -IL-8 und den HEK-Zellen wird durch die hellen Punkte angezeigt. Es ist auch schnell erkennbar, dass die Hemmung durch nicht markiertes IL-8 quantifizierbar dosisabhängig ist. Diese Daten deuten darauf hin, dass Inhibitoren, in diesem Fall beispielhaft dargestellt durch nicht markiertes IL-8, die Zellmatrix durchqueren können, um die Bindung zwischen ^{125}I -IL-8 und den Zellen zu reduzieren.

Referenzbeispiel 7: Filterbasierter, gelfreier Zellfunktions-Assay

[0099] Änderungen in der Zellfunktion werden häufig gemessen durch Beobachtung der Wirkung von Testverbindungen oder Proben auf Reporter-Systeme, die in Zellen eingeschleust werden. Beispiele schließen die Beobachtung des Effekts auf die Synthese fluoreszenter intrazellulärer Proteine, wie z. B. grün fluoreszierendem Protein (GFP), extrazellulärer Proteine, wie z.B. einem Rezeptor- oder Adhäsionsmolekül, oder spezifischer Enzyme, wie z. B. Luciferase, Chloramphenikolacetyltransferase oder β -Galaktosidase (Promega), ein. Zunächst werden die Testverbindungen mit den Zellen inkubiert. Danach können die Zellen das Reporterprotein über einen geeigneten Zeitraum (Minuten, Stunden oder Tage) exprimieren. Dann wird der Spiegel des Reporterproteins durch direkte Verfahren (z. B. GFP) oder indirekte Verfahren (z. B. ELISA-Verfahren mit membrangebundenen Proteinen) getestet. Weiterhin kann im Fall von Enzymen zum Extrahieren des Reporterproteins und Testen der Enzymaktivität die Zelle zerstört werden. Andere Zellfunktions-Assays messen das Verhalten oder die Position spezifischer Moleküle, wie z. B. Farbstoffe oder radioaktiv markierter Metabolite, als Reaktion auf die Stimulation eines Rezeptors oder Veränderungen der Zellphysiologie, wie z. B. des Membranpotentials.

[0100] Ein ELISA-Assay, der die Wirkung von Verbindungen auf die Expression von Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) misst, kann für CF-HTS formatiert werden wie folgt. Endothelzellen, die ICAM-1 exprimieren, werden mit einer Dichte von ungefähr 5.000 Zellen/mm^2 auf eine Polycarbonat-Chemotaxis-Membran (Neuro Probe) geschichtet. Die Zellen werden über Nacht bei 37°C in Medium inkubiert. Das Medium wird entfernt, und die Membranen werden 10 Minuten lang bei RT teilweise trocknen gelassen. Proben oder Verbindungen, die auf die Induktion von ICAM-1 hin getestet werden, werden auf Kunststofffolien aufgetrocknet und mit der Nicht-Zellen-Seite der feuchten Membran in Kontakt gebracht. Die Verbindungen können mit den Zellen 1 Stunde lang bei 37°C in einer feuchten Kammer interagieren, und danach werden die Zellen in Medium gewaschen und 5 Stunden lang bei 37°C inkubiert.

[0101] Nachdem die Zelle Zeit gehabt hat, das induzierte Protein zu synthetisieren, wird das Medium von der Membran entfernt, und die Zellen werden in Puffer inkubiert, der Anti-ICAM-1-Antikörper (Genzyme, R&D systems) enthält, entweder nicht konjugiert oder konjugiert mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) oder Biotin. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei RT wird der Puffer entfernt, und die Zellen werden zum Entfernen von unbundenem Anti-ICAM-1 mehrmals gewaschen. Im Falle von FITC-konjugiertem Antikörper wird die Membran mit Hilfe einer ladungskoppelten Kamera (Stratagene, Imaging Research) mit 485 nm Anregung und 520 nm Emission sichtbar gemacht. Verbindungen, die ICAM-1-Expression stimulieren, resultieren in einem Bereich

mit erhöhter Fluoreszenz aufgrund der Bindung des FITC-Anti-ICAM-1-Antikörpers. Im Falle von Biotin-konjugiertem Antikörper werden die Zellen in Puffer, der Avidin-HRP enthält, 10 Minuten lang bei RT inkubiert. Der Puffer wird entfernt, und die ungebundene Avidin-HRP wird fortgewaschen. Die Membranen werden dann in Puffer gewaschen, der ein präzipitierendes HRP-Substrat, wie z.B. Diaminobenzidintetrachlorid (Pierce) enthält, und auf Farbentwicklung in Bereichen, in denen die darunter liegenden Zellen zur Expression von ICAM-1 induziert wurden, beobachtet. Im Falle des unkonjugierten Anti-ICAM-1-Antikörpers wird ein konjugierter sekundärer Anti-Anti-ICAM-1-Antikörper mit den Zellen zur Reaktion gebracht, gefolgt von Signalentwicklung mit dem entsprechenden Substrat für das Konjugat. Bilder werden von einer ladungsgekoppelten Kamera erfasst. Alle diese Varianten (FITC, Avidin-HRP und Anti-Anti-ICAM-1) sind alternative Reportersysteme, die zu denselben qualitativen Ergebnissen führen sollten, nämlich, dass Proben, die die ICAM-1-Expression beeinflussen, mit Bereichen von verstärktem oder abgeschwächtem Signal korreliert werden können.

[0102] Es ist anzumerken, dass die Matrizen mit kontinuierlichem Format in diesem Fall eine Membran und eine Kunststofffolie sind. Ein Gel ist für CF-HTS nicht notwendig.

Beispiel 8: CF-HTS-Assay von diskreten Verbindungen für Neuraminidase-Hemmung

Probenmatrix

[0103] Eine Bibliothek von 528 separaten, strukturell verwandten Verbindungen wurde durch CF-HTS getestet. Ein Packard Multiprobe MP204 DT wurde verwendet, um die Verbindungen aus Phiolen in Platten mit 96 Vertiefungen zu verdünnen und die Verbindungen auf Kunststofffolien zu übertragen. Die Verbindungen wurden zunächst von 40 mM in DMSO in Phiolen auf 4 mM in DMSO in Platten mit 96 Vertiefungen verdünnt. Dann wurden sie von 4 mM in DMSO auf 200 μ M in 50% EtOH/H₂O in Platten mit 96 Vertiefungen verdünnt. Diese Proben wurden in Duplikaten von 1 μ l auf 8 cm \times 8 cm große Kunststofffolien übertragen, mit einem Abstand, der durchschnittlich 5 mm zwischen den Proben betrug (Bio-Rad Kat.# 165-2956), bei insgesamt 192 Proben pro Folie. Jeder 1 μ l-Punkt enthielt daher ungefähr 200 pmol einer bestimmten Verbindung aus der Bibliothek. Als Kontrolle wurde eine Verdünnungsreihe von 2,3-Dehydro-2-deoxy-N-acetylneuraminsäure (DANA), einem bekannten Neuraminidase-Inhibitor (Boehringer Mannheim #528544), manuell neben den Verbindungen auf jeder Folie dispensiert. Die Folien wurden in einem Vakuumtrockenschrank getrocknet, so dass jede Verbindung an ihrer eigenen Stelle auf den Kunststoff auftrocknete.

Enzymmatrix

[0104] Vor dem Test wurde Influenza-Neuraminidase-Enzym 1500fach bei 40° C aus 25% Glycerol, phosphatgepufferter Salzlösung, in verflüssigtem Agargel verdünnt, das aus 1% Agarose, 50 mM Natriumcitrat pH 6,0, 10 mM Kalziumchlorid bestand. Ein 8 cm \times 8cm \times 0,75 mm Enzymgel wurde gegossen und durch Reduzierung der Temperatur auf 4°C zum Erstarren gebracht.

Substratmatrix

[0105] Ein synthetisches Influenza-Neuraminidase-Substrat, 2'-(4Methylumbiferyl)-alpha-D-N-acetylneuraminsäure (Sigma Kat.#M-8639), wurde von 3 mM in DMSO auf 30 μ M in verflüssigtem Agargel verdünnt und ähnlich gegossen wie das oben beschriebene Enzymgel.

Inkubation und Nachweis

[0106] Die Enzymmatrix wurde auf die Probenmatrix auf die Seite platziert, wo die betreffenden Verbindungen getrocknet wurden. Dann wurde die Substratmatrix oben auf die Enzymmatrix platziert. Die Matrizen wurden 30 Minuten lang bei RT inkubiert. Während dieser Zeit diffundierte das abgelöste-fluoreszierende Substrat und das Enzym zwischen den beiden Gelen zusammen, und das Substrat wurde vom Enzym gespalten, um die Fluoreszenzintensität zu erhöhen. Dies wurde durch Anregung bei 340 nm und Emission bei 450 nm beobachtet. Verbindungen, die die Enzymaktivität hemmen können, minimierten den Anstieg der Fluoreszenzintensität. Während die Fluoreszenzintensität der Gele an den meisten Stellen zunahm, waren die Bereiche, die Enzyminhibitoren enthielten, welche von der Kunststofffolie in das Gel diffundierten, als dunklere Stellen mit geringerer Fluoreszenz sichtbar. Dies war leicht mit Hilfe einer ladungsgekoppelten Kamera mit geeigneten Filtern zur Kontrolle der Emissions- und der Anregungs-Wellenlänge zu beobachten. Die Identität von Verbindungen, die Hemmzonen aufwiesen, wurde bestimmt durch die Position der Zone im Verhältnis zur Inhibitormatrix. Durch Vergleichen der Fluoreszenz der DANA-Kontrolle mit den bekannten Mengen jedes getesteten Inhibitors wurde eine quantitative Abschätzung des IC₅₀ für jede Verbindung vorgenommen.

[0107] Alle 528 Verbindungen einer Bibliothek wurden im Duplikat getestet. Das gesamte verwendete Enzymgel-Volumen betrug 33 ml, oder 31,25 µl pro Test. Weiterhin wurden alle Verbindungen gleichzeitig getestet, und die Testbedingungen waren konstant im Vergleich zum herkömmlichen 96-Vertiefungen-Assay. Außerdem war der Test, wie in [Fig. 14](#) dargestellt, empfindlich genug, um Inhibitoren nachzuweisen, die nur 100 µM hatten. Die geschätzten IC₅₀-Werte für aktive Verbindungen stimmten gut mit denjenigen überein, die bei denselben Verbindungen beobachtet wurden, wenn sie mit dem kostspieligeren 96-Vertiefungen-Test getestet wurden, der 200 µl pro Test benötigte. Siehe Tabelle "Quantitative Geltest-Ergebnisse". Diese Beispiele zeigen, dass das Testen von Anordnungen höherer Dichte von Verbindungen Zeit und Kosten spart. Zum Beispiel resultiert selbst eine geringe Verringerung des Abstands, 2,5 mm anstelle von 5 mm, in einer vierfachen Erhöhung der Anzahl von Verbindungen, die pro Volumeneinheit getestet werden. In diesem Experiment würde dies das Volumen pro getestete Verbindung unter 10 µl senken. Die Reagenzien werden jedoch einer Massenbehandlung unterzogen, ohne die Notwendigkeit von Handhabungsausrüstung für Flüssigkeiten mit geringem Volumen, die normalerweise in Miniatur-Screening verwendet wird.

Quantitative Gel-Assay-Ergebnisse

Probe #	Ungefähr max. Ki (µM) vom Gel	Geschätzte IC50s (µM) vom 96- Vertiefungen-Assay
34	100	> 100
35	80	> 100
36	80	42

Probe #	Ungefähr max. Ki (µM) vom Gel	Geschätzte IC50s (µM) vom 96- Vertiefungen-Assay
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

[0108] Als nachfolgendes Beispiel, um die Vorteile dieser Miniaturisierung zu verdeutlichen, wurden 10.080 einzelne Verbindungen durch CF-HTS in einem Enzymgel-Gesamtvolume von 17ml (weniger als 2 µl pro Test) getestet. Eine Packard-Multipette wurde benutzt, um 30 nl Volumen von jeder Probe, getrennt durch 1

mm, zu dispensieren. Die Verbindungen wurden in DMSO mit einer Konzentration von 5 mM dispesiert, so dass ungefähr 150 pmol von jeder Verbindung auf den Kunststoff dispesiert wurden. DANA wurde erneut als Kontrollinhibitor verwendet. Zusätzlich zu der normalen Kontrolltitration außerhalb der Verbindungsanordnung wurde eine Kontrolltitration innerhalb der Anordnung selbst als Blindversuch eingeschlossen, in dem die Kontrollproben ebenso wie die 10.080 unbekannten Proben behandelt wurden, als sie auf den Kunststoff dispesierte wurden. Wie zuvor wurden die Folien getrocknet und in einem Neuraminidase-Assay verwendet. Alle 10.080 wurden mit diesem Verfahren in weniger als einer Stunde gleichzeitig getestet. Auch hier waren keine Mikrofluide und/oder Handhabung geringer Volumen notwendig, außer beim Dispensieren der ursprünglichen Verbindungen auf die Folie. Die extrem hohe Dichte, die in diesem Test verwendet wurde, beeinträchtigte den Nachweis der Inhibitoren nicht. weiterhin verkomplizierte die hohe Dichte nicht die Identifizierung aktiver Verbindungen, selbst wenn fluoreszente Verbindungen (leicht als hellere Punkte im Gel zu erkennen) die nächsten Nachbarn aktiver Verbindungen waren.

Patentansprüche

1. Ein Verfahren, um eine Vielzahl von Proben verschiedener Substanzen gleichzeitig auf ihre Fähigkeit hin zu testen, einen biologischen Vorgang zu fördern oder zu hemmen, das folgendes umfasst:
 - a) Auftragen, in einer Anordnung, eines geringen Volumens von jeder von mehr als 96 Proben unterschiedlicher Substanzen auf eine Matrix, so dass jede unterschiedliche Substanz an ihrer eigenen unterschiedlichen Stelle zentriert ist und die Identität jeder Substanz aus ihrer Auftragungsstelle bestimmt werden kann,
 - b) In-Kontakt-Bringen der Matrix mit einer ersten porösen Matrix, die ein erstes gleichmäßig dispergiertes Assay-Reagenz enthält oder trägt, und Erlauben, dass ein Teil jeder Substanz so in die poröse Matrix diffundiert, dass die räumliche Position jeder diffundierten Substanz mit der Stelle auf der Matrix korreliert werden kann, auf welche die Substanz ursprünglich aufgetragen wurde, und
 - c) Durchführen eines Assays, um die Fähigkeit jeder diffundierten Substanz, den biologischen Vorgang zu fördern oder zu hemmen, zu bestimmen, durch Beobachten der Interaktion jeder Substanz mit dem Assay-Reagenz,
dadurch gekennzeichnet, dass die Matrix eine ebene Matrix ist.
2. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, das den weiteren folgenden Schritt umfasst:
 - b1) In-Kontakt-Bringen der ersten porösen Matrix mit einer zweiten Matrix, die ein zweites gleichmäßig dispergiertes Assay-Reagenz trägt oder enthält, und Erlauben, dass das zweite Assay-Reagenz in die erste poröse Matrix diffundiert, oder Erlauben, dass jede Substanz und das erste Reagenz in die zweite Matrix diffundiert, wobei im letzteren Fall sichergestellt wird, dass die Diffusion so stattfindet, dass die Position jeder Substanz in der zweiten Matrix mit der Stelle auf der ebenen Matrix korreliert werden kann, auf der die Substanz ursprünglich aufgetragen wurde, und
 - c1) Durchführen des Schrittes (c).
3. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin eines der gleichmäßig dispergierten Assay-Reagenzien ein Makromolekül ist.
4. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin eines der gleichmäßig dispergierten Assay-Reagenzien ein Enzym ist.
5. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin eines der gleichmäßig dispergierten Assay-Reagenzien ein biologischer Rohextrakt ist.
6. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin eines der gleichmäßig dispergierten Assay-Reagenzien Organellen sind.
7. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin eines der gleichmäßig dispergierten Assay-Reagenzien ganze Zellen sind.
8. Das Verfahren von Anspruch 1 oder 2, worin ein gleichmäßig dispergiertes Assay-Reagenz ganze Zellen sind, die auf einer Oberfläche einer ebenen porösen Matrix getragen werden.
9. Das Verfahren von Anspruch 8, worin die Interaktion beobachtet wird durch In-Kontakt-Bringen der porösen Matrix mit einer Lösung oder flüssigen Suspension eines Reagenz oder einer porösen Matrix, die ein Reagenz enthält, was in beiden Fällen das Sichtbarmachen eines Proteins unterstützt, dessen Expression in den ganzen Zellen der biologische Vorgang ist, der bewertet wird.

10. Das Verfahren von Anspruch 2, worin das erste Assay-Reagenz ein markierter Ligand ist und das zweite Assay-Reagenz ein immobilisierter Rezeptor für den Liganden ist.
11. Das Verfahren von Anspruch 10, worin die zweite Matrix gewaschen wird, um einen eventuellen markierten Liganden zu entfernen, der auf der oder in die zweite Matrix diffundiert ist, aber nicht an den immobilisierten Rezeptor gebunden wurde.
12. Das Verfahren von Anspruch 11, worin die zweite Matrix in Kontakt mit einer Lösung oder flüssigen Suspension eines Reagenz oder einer porösen Matrix gebracht wird, die ein Reagenz enthält, was in beiden Fällen das Sichtbarmachen von markiertem Liganden unterstützt, der nicht durch den Wasch-Schritt entfernt wurde.

Es folgen 19 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

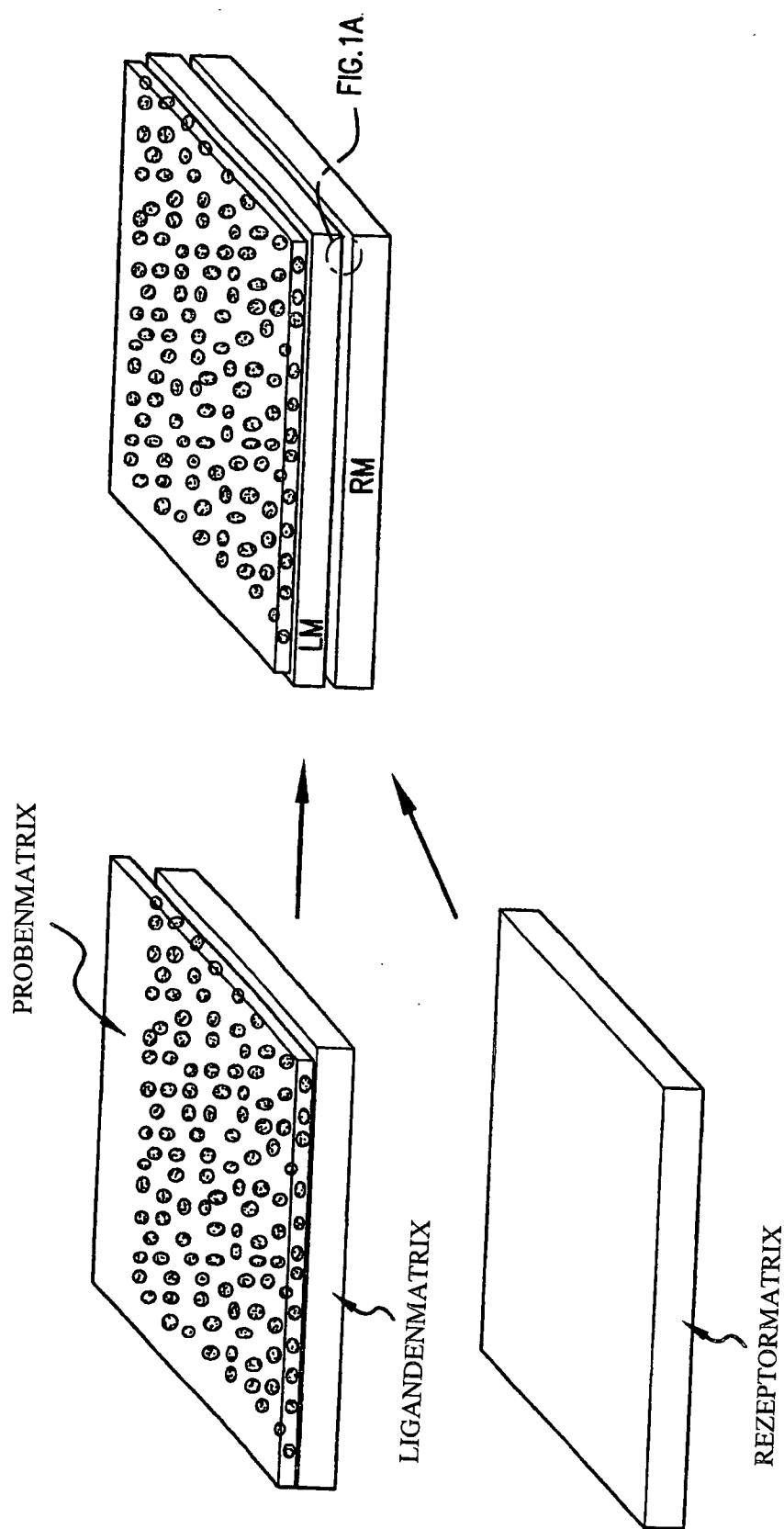


FIG. 1

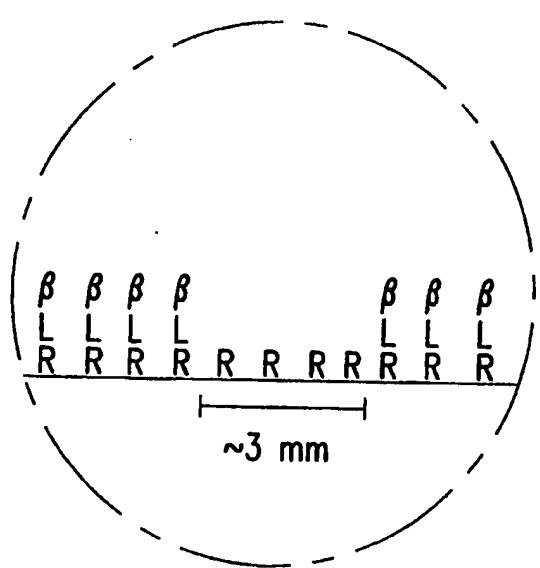
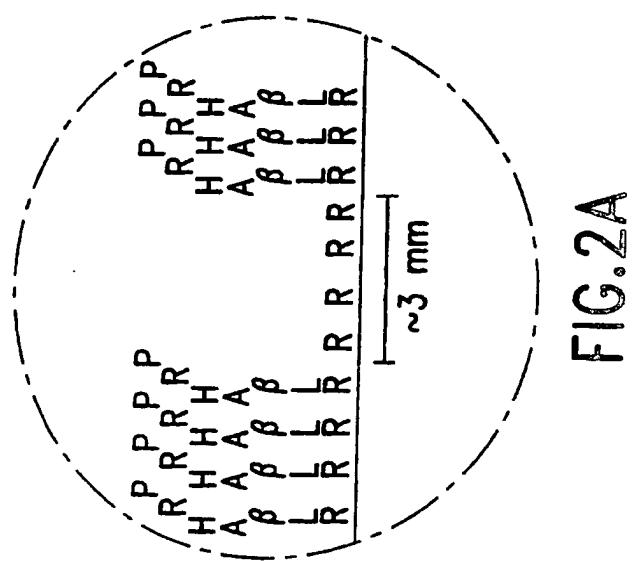
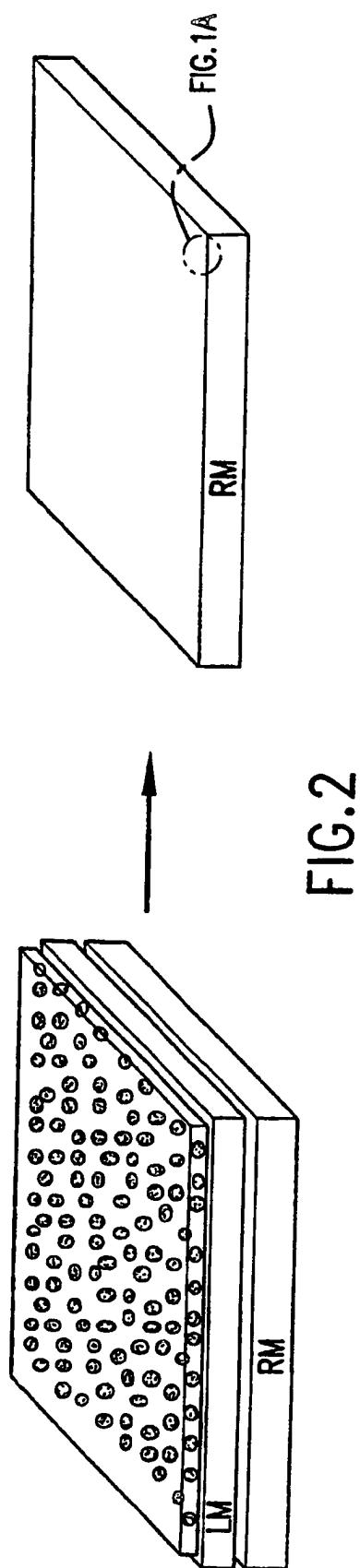


FIG.1A



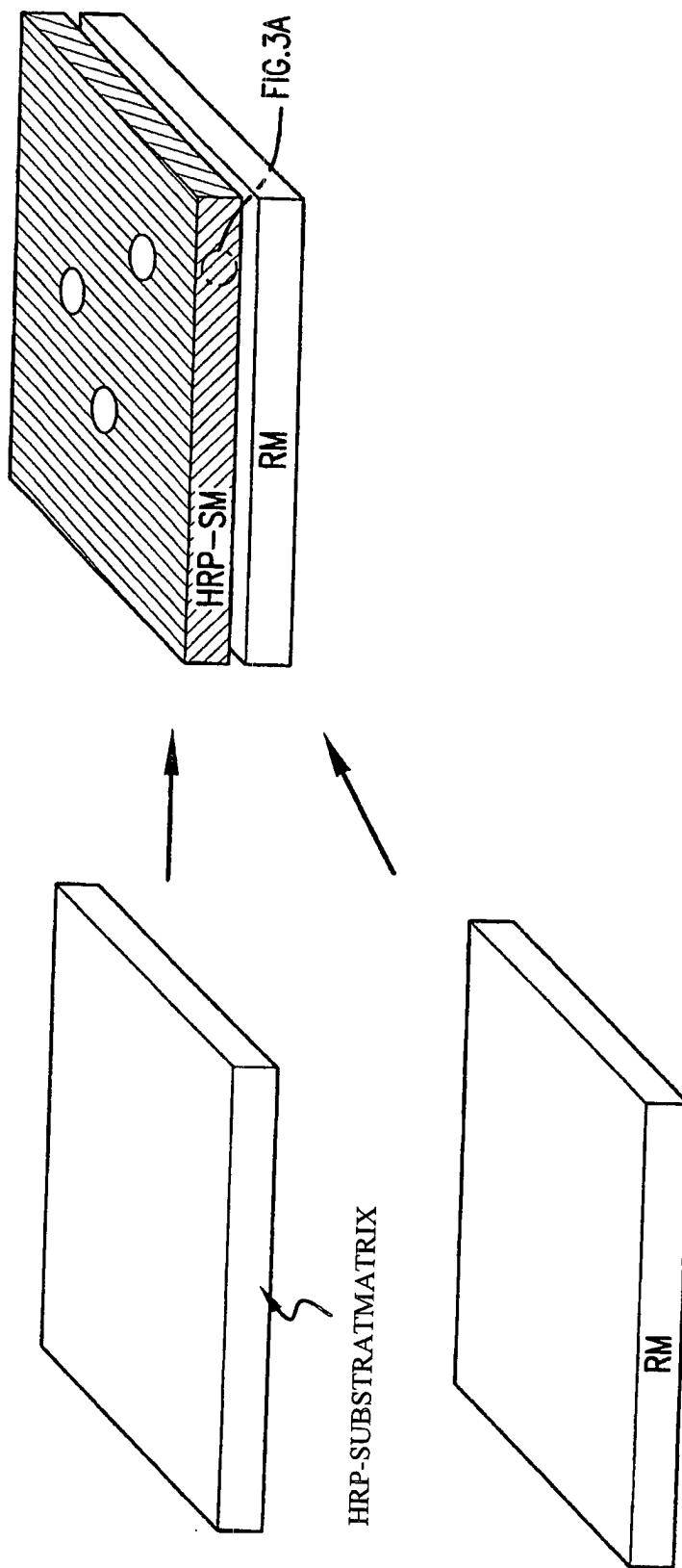


FIG.3

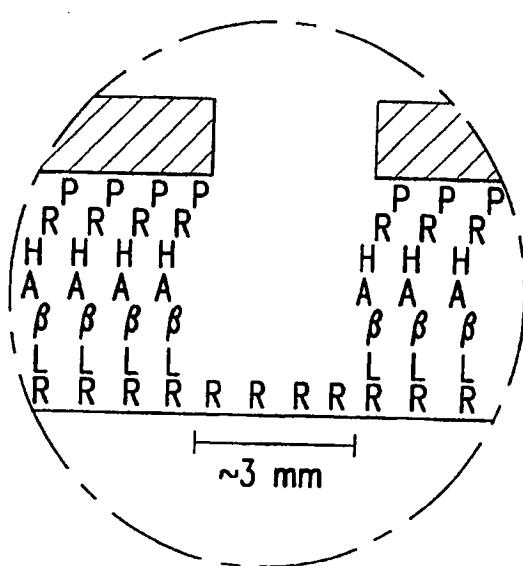
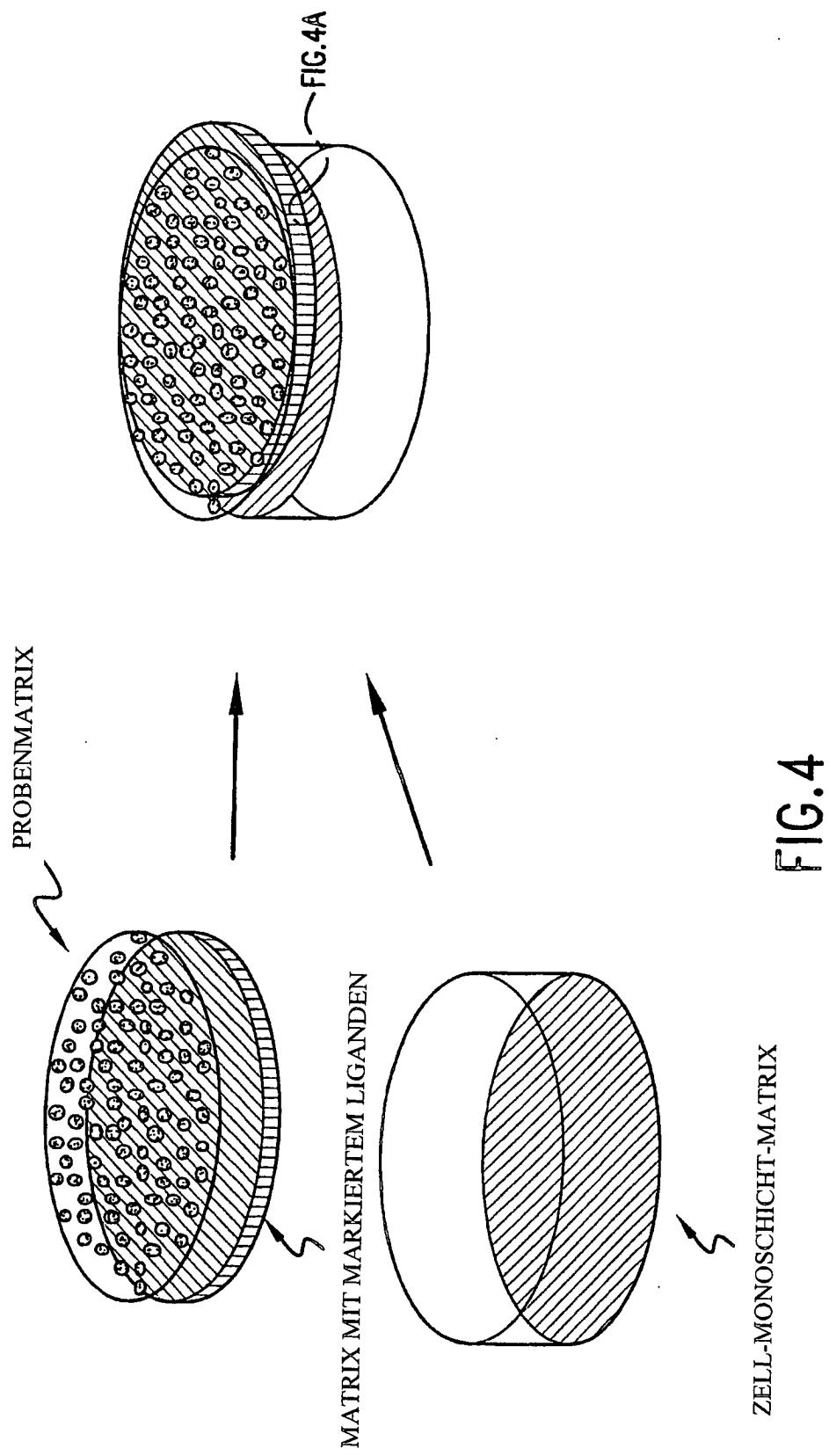


FIG.3A



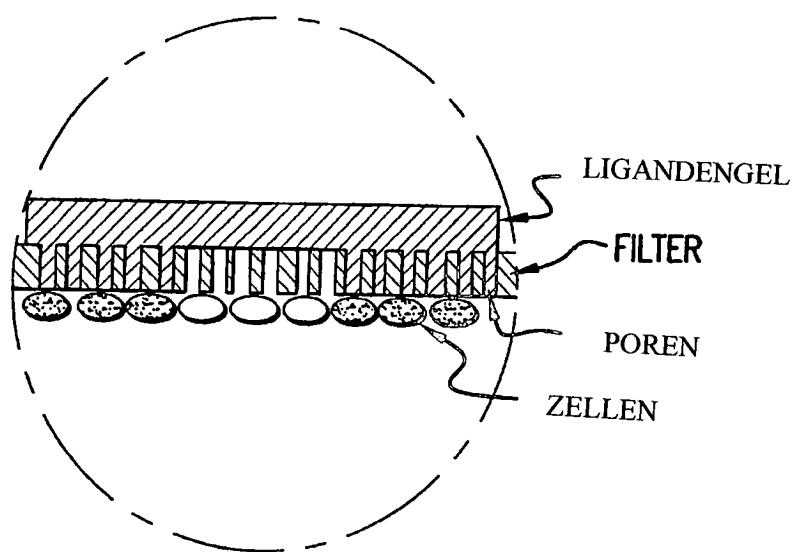


FIG.4A

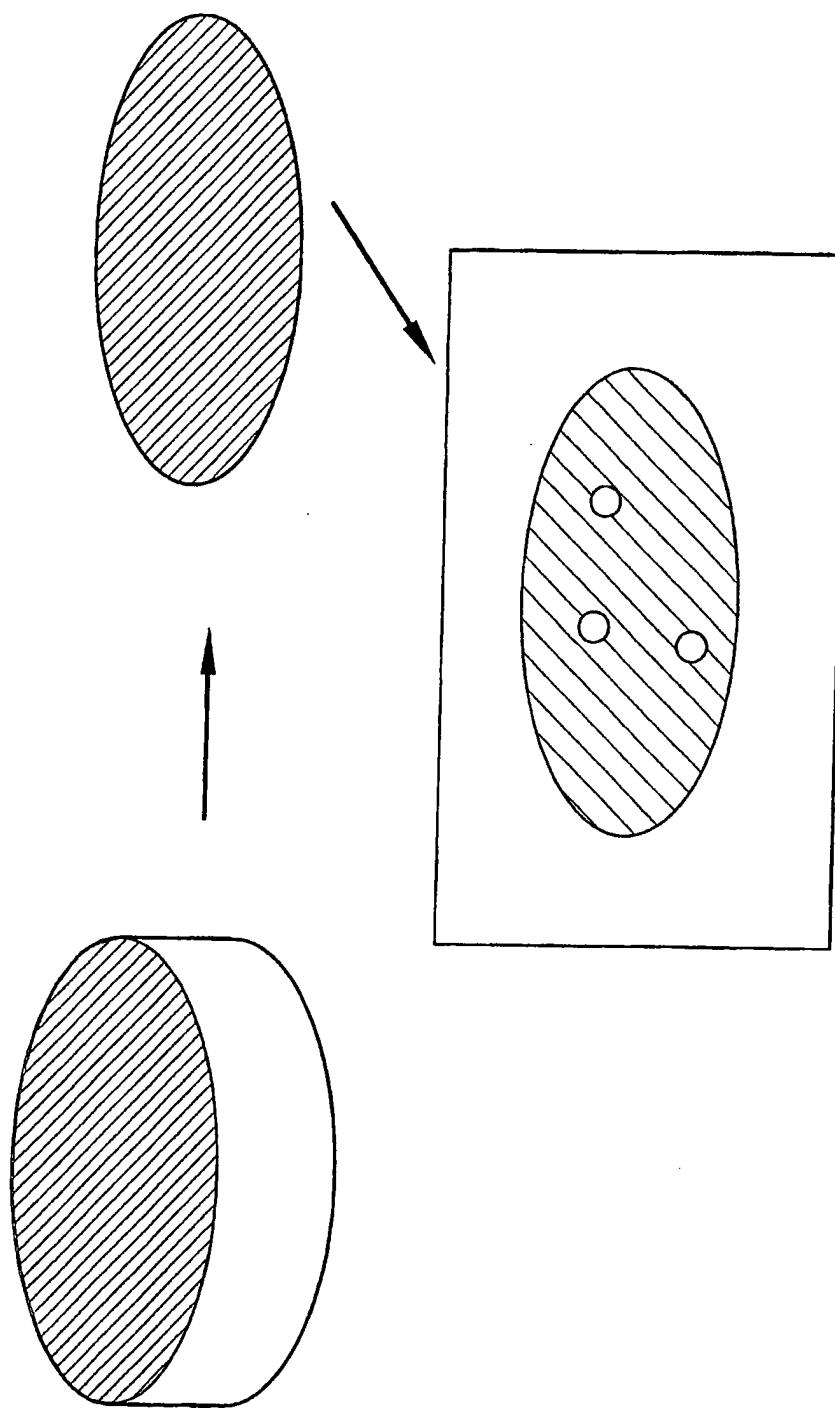


FIG.5

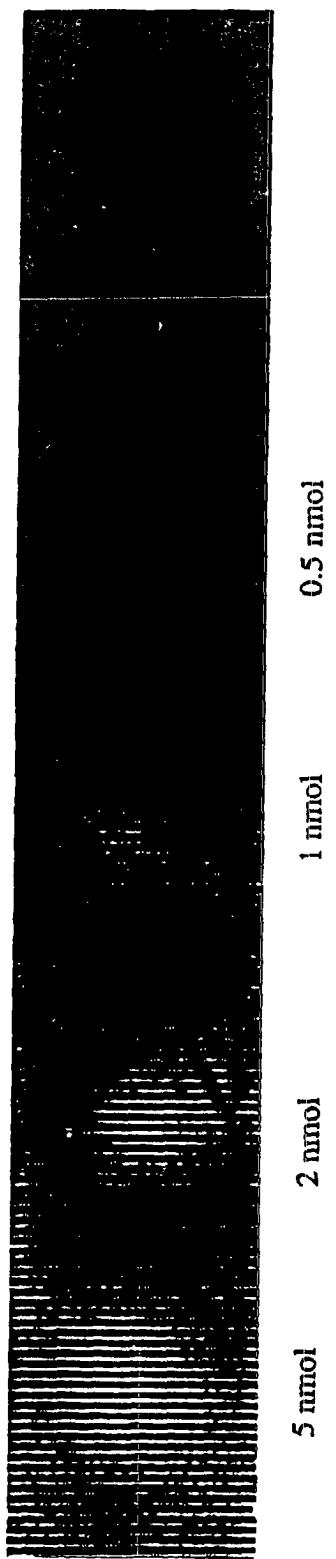


FIG. 6

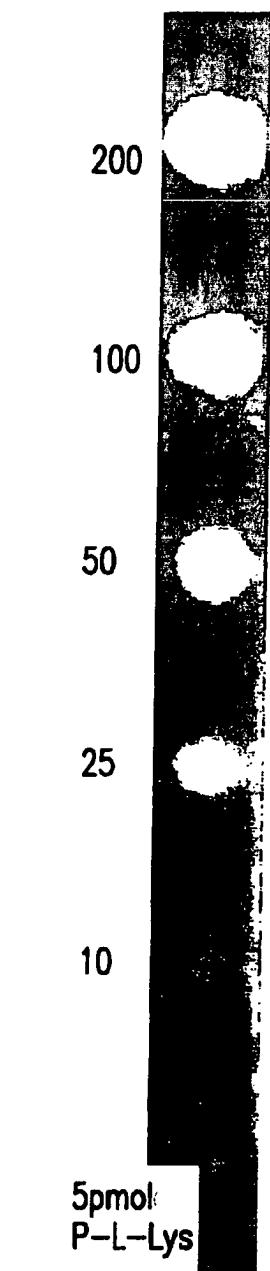


FIG.7

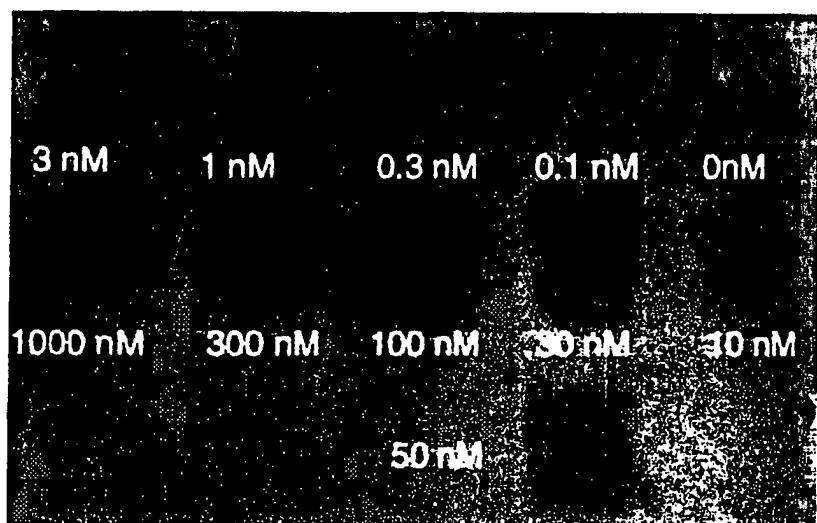
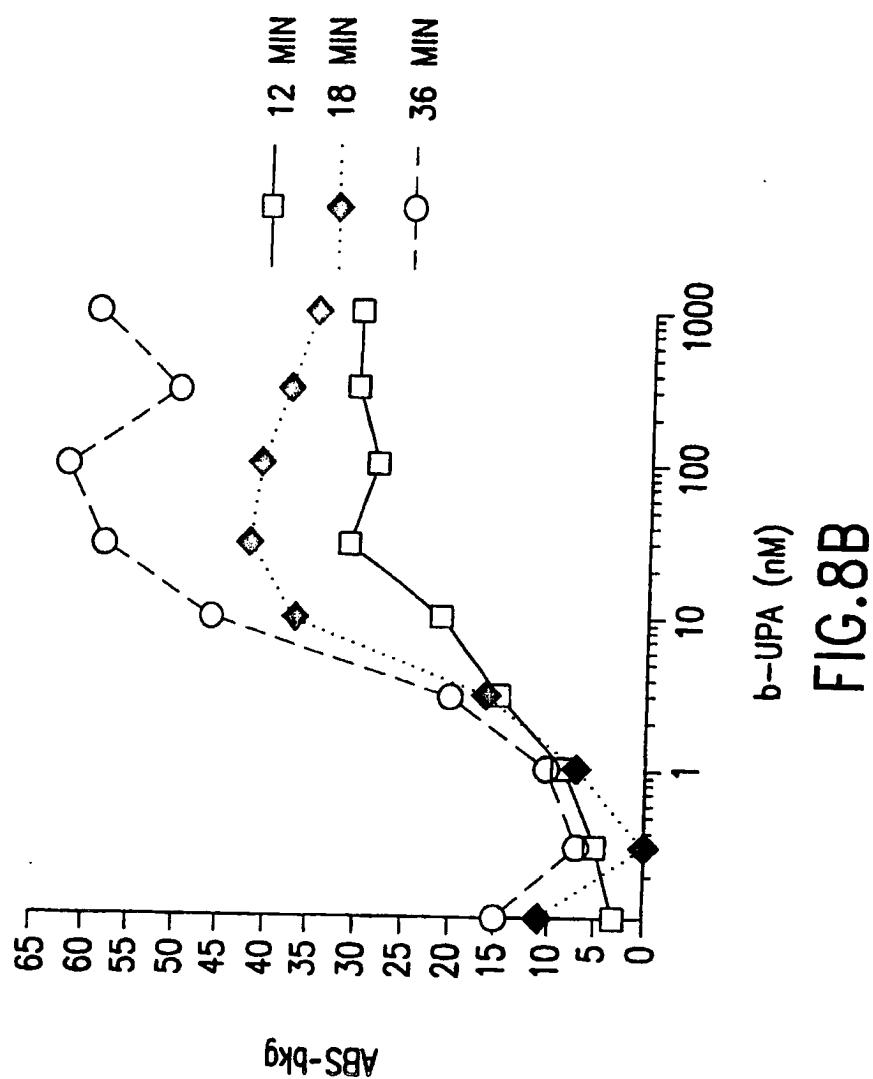


FIG.8A



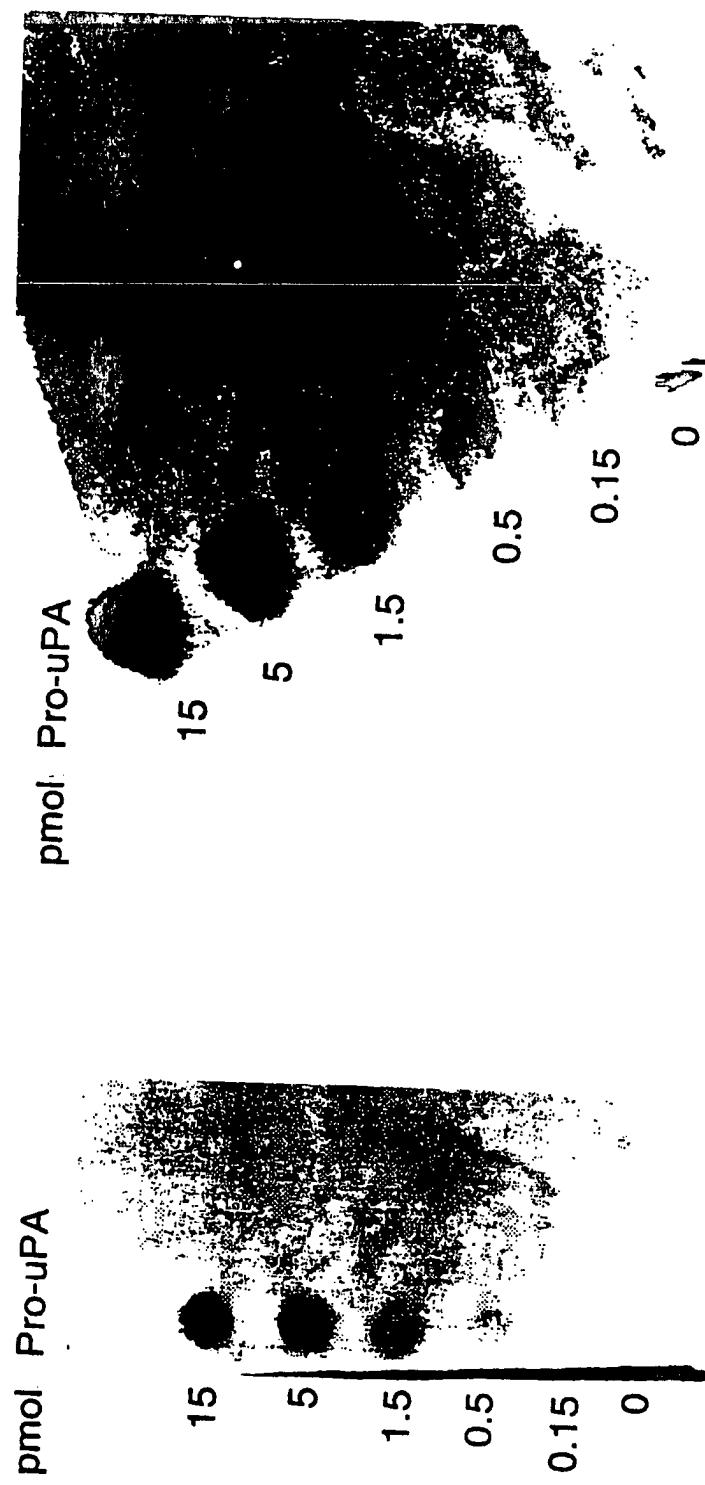


FIG. 9A

FIG. 9B

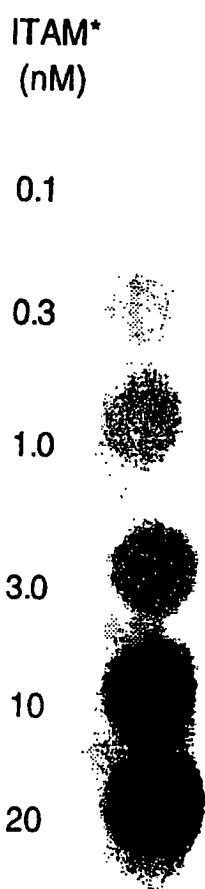


FIG.10

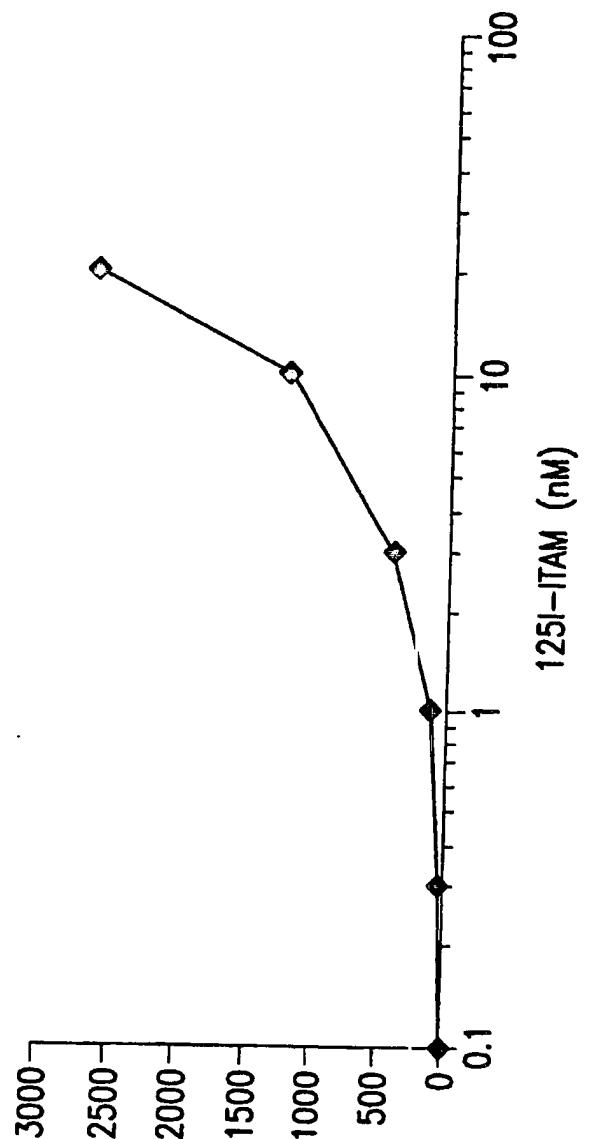


FIG. 11

DURCHSCHNITTL. PIXELWERT

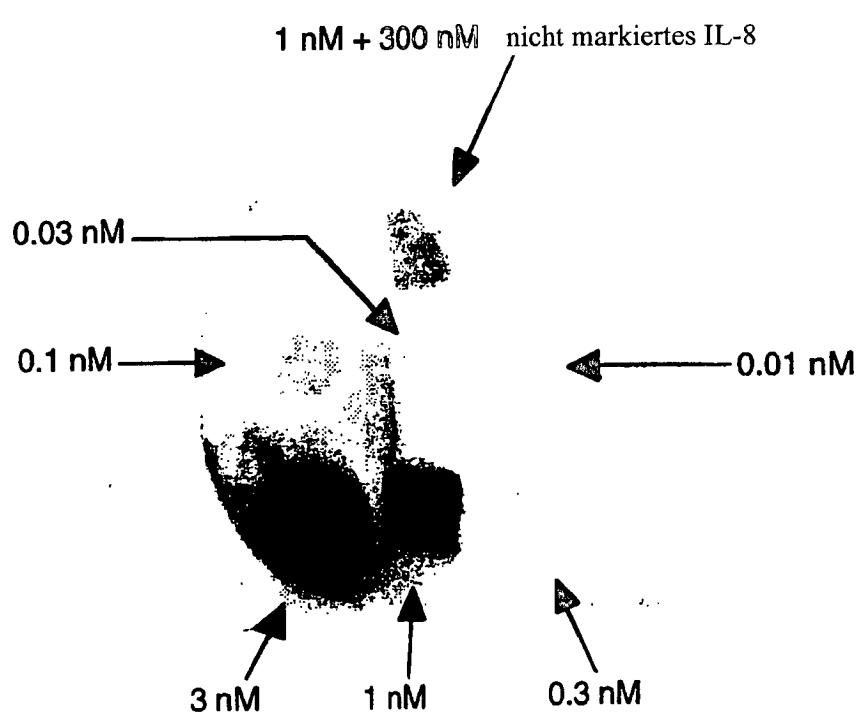


FIG.12

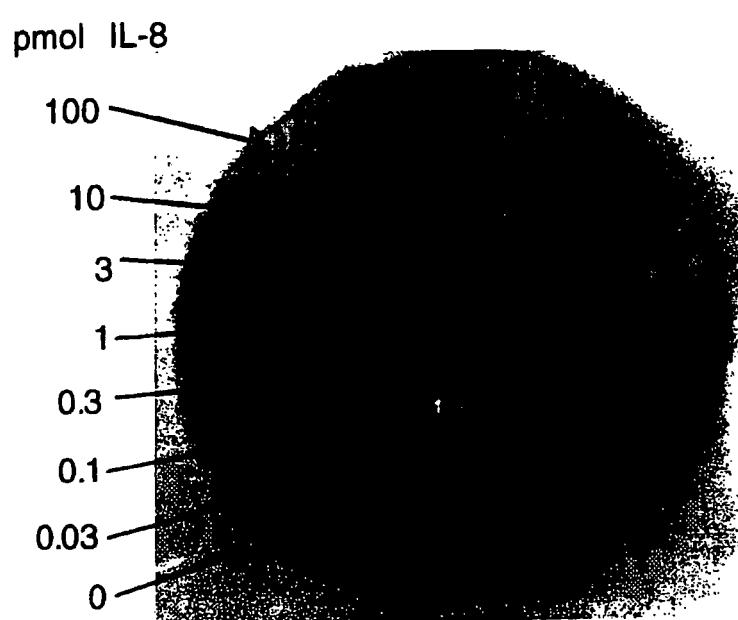


FIG.13

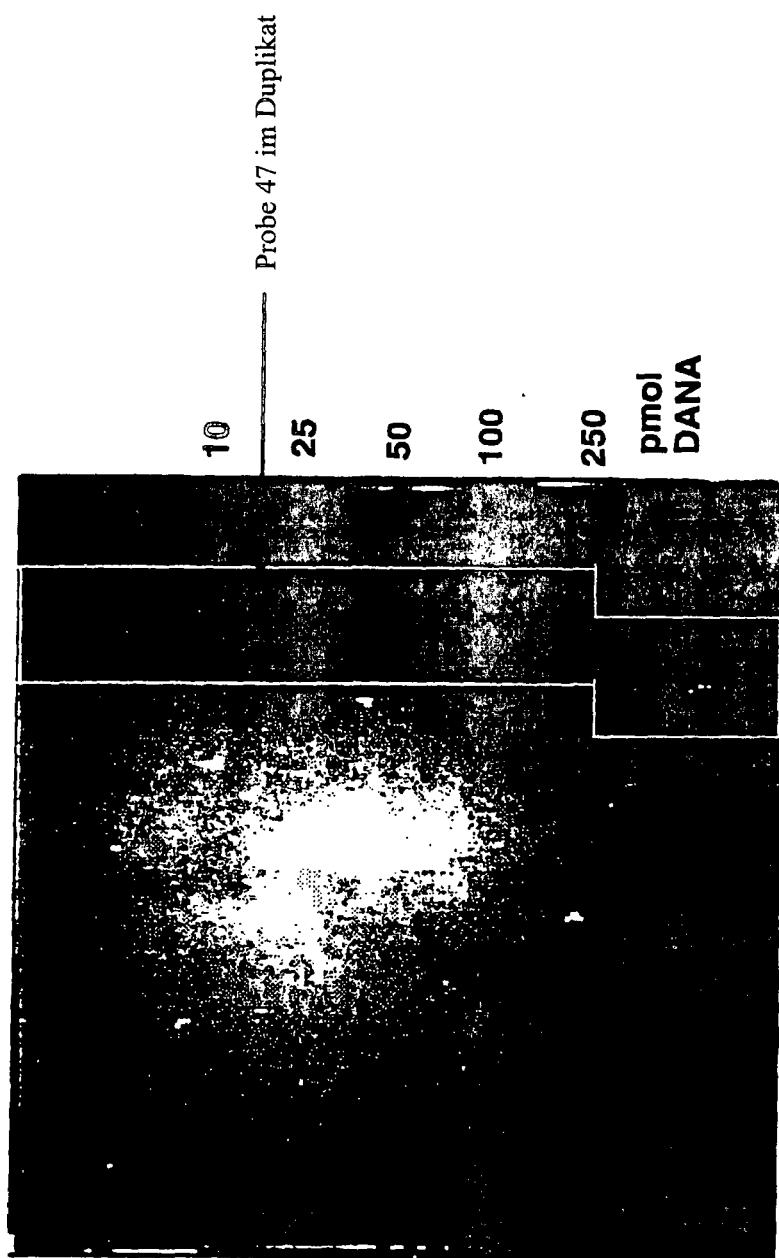


FIG. 14

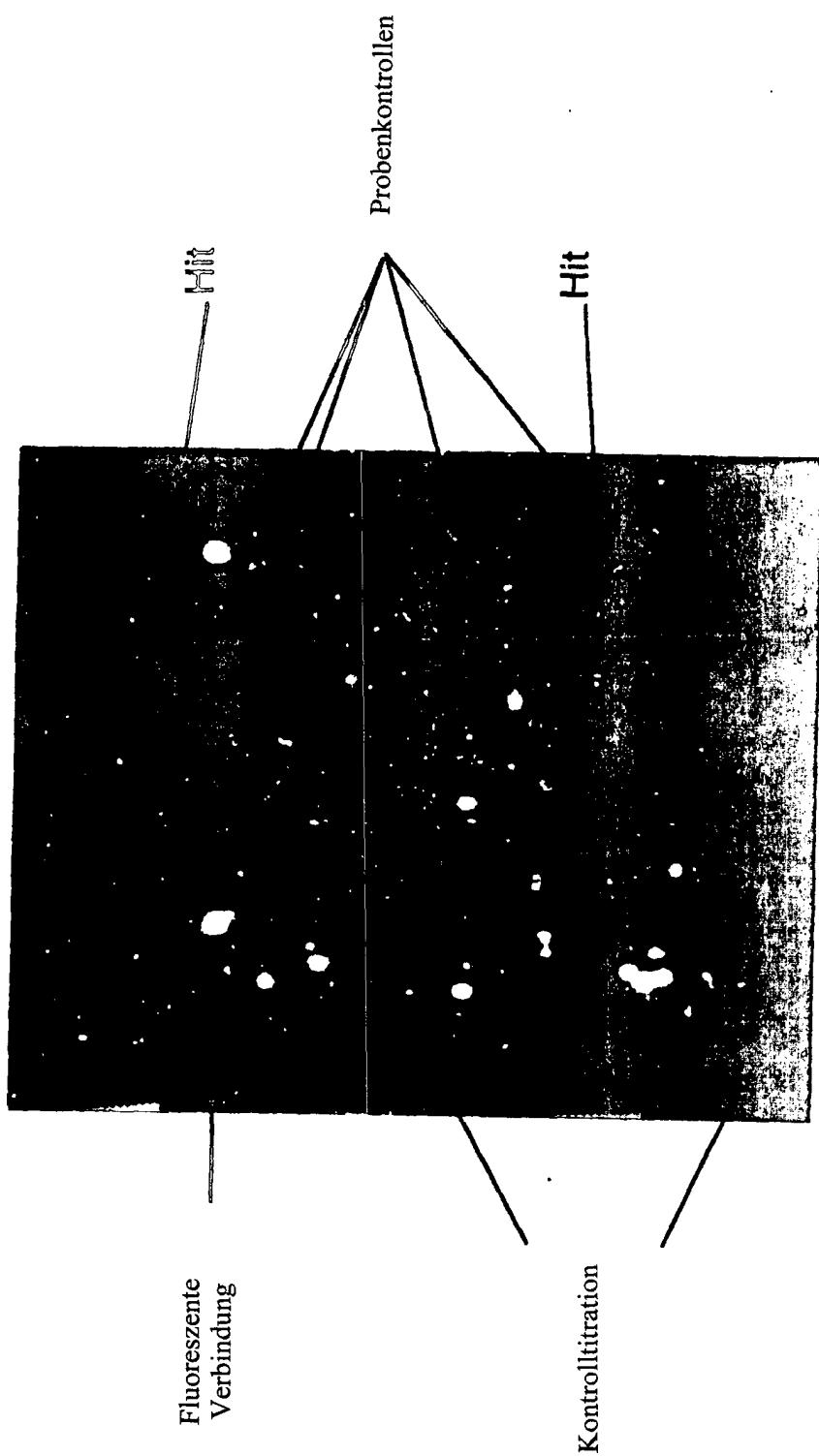


FIG. 15