



HU000228578B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **228 578**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 01 00207**(22) A bejelentés napja: **1998. 12. 11.**(40) A közzététel napja: **2001. 06. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2013. 04. 29.**(51) Int. Cl.: **G01N 33/50** (2006.01)(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:
PCT/US 98/26465(87) A nemzetközi közzétételi szám:
WO 9930154

(30) Elsőbbségi adatok: 08/990,168 1997. 12. 12. US	(73) Jogosult(ak): Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois (US)
(72) Feltaláló(k): Beutel, Bruce A., Libertyville, Illinois (US) Schurdak, Mark E., Antioch, Illinois (US) Voorbach, Martin J., Vernon Hills, Illinois (US) Burns, David J., Round Lake Park, Illinois (US) Joseph, Mary K., Libertyville, Illinois (US)	(74) Képviselő: Svingor Ádám, DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) **Folyamatos formájú, nagy teljesítményű szűrővizsgálati eljárás**

(57) Kivonat

A találmány tárgyát képezi eljárás vizsgálati minták biológiai vagy biokémiai aktivitásának szűrővizsgálatára, amely során a vizsgálati mintákat egy porózus szűrővizsgálati hordozó anyagra (mátrixra) viszik fel, és legalább egy mátrixot alkalmaznak egy vagy több szűrővizsgálati komponensnek a szűrővizsgálati eljárásba történő bevitelére, majd végrehajtják a vizsgálati minták és/vagy a szűrővizsgálati komponensek feleslegének eltávolítását szolgáló mosási lépésből és/vagy a szűrővizsgálati eljárás láthatóvá tételét célzó lépésből álló szűrővizsgálati eljárást.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás nagyszámú minta azon képességére történő egyidejű vizsgálatára, hogy egy biológiai folyamatot serkent vagy gátol. Az eljárás során a nagyszámú minta kis mennyiségeit egy sík, porózus mátrixra viszik oly módon, hogy az anyagok azonossága az elrendezési helyükből megállapítható legyen, végrehajtják a szűrővizsgálatot, és kiértékelik az anyagok azon képességét, hogy a biológiai folyamatot serkentik vagy gátolják.

A találmány szerinti folyamatos formájú, nagy teljesítményű szűrővizsgálati eljárással bármilyen, 96-lyukú mikrotiterlemez alkalmazásával végrehajtható szűrővizsgálati eljárás elvégezhető.

FOLYAMATOS FORMÁJÚ, NAGY TELJESÍTMÉNYŰ SZŰRŐVIZSGÁLATI ELJÁRÁS

A találmány tárgyát képezi eljárás vizsgálati minták biológiai vagy biokémiai aktivitásának szűrővizsgálatára, továbbá nagyszámú minta - adott biológiai folyamatot serkentő vagy gátló képessége szempontjából történő - egyidejű vizsgálatára.

A találmány szerinti, folyamatos formájú, nagy teljesítményű szűrésre (CF-HTS, "continuous format high throughput screening") alkalmas eljárás legalább egy porózus hordozó anyag (mátrix) alkalmazásával nagy számú kémiai entitás biológiai vagy biokémiai aktivitásának széles körére történő egyidejű szűrővizsgálatát teszi lehetővé a gyógyászati iparban.

Biokémiai és biológiai szűrővizsgálati eljárásokat aktivitási vizsgálatok („test”) széles körére terveznek a fehérje-fehérje kölcsönhatásoktól, enzimkatalizistól, kismolekula-fehérje kötéstől kezdve a sejt működéséig. Egy nagy teljesítményű szűrés (HTS; „high throughput screening”) során ilyen szűrővizsgálati eljárások („assay”) nagy számú kémiai entitás vizsgálatára alkalmazhatók, hogy a kémiai entitások korábban nem ismert biológiai vagy biokémiai aktivitásait felismerjük.

Homogén és heterogén szűrővizsgálati eljárások

Az összes, különböző fajta biológiai szűrővizsgálati eljárás két nagy csoportra osztható: homogén és heterogén szűrővizsgálati eljárásokra. Homogén szűrővizsgálati eljárásokban az összes reagenst együtt adjuk és az eredményt minden további manipuláció nélkül mérjük vagy értelmezzük. A Petri-csészén szaporodó sejtek például egy kémiai anyaggal hozhatók kapcsolatba. Ha a kémiai anyag toxikus a sejtre, egy egyszerűen megfigyelhető tiszta zóna jelzi a toxicitást. Egy másik példa szerint sejteket alkalmazunk, amelyek egy olyan fehérjét expresszálnak, amely megváltoztatja a sejt színét. Béta-galaktozidázt (β -gal) expresszáló sejtek esetében az α -gal-t tartalmazó agaron szaporodó sejtek erősebben vagy gyengébben lesznek kékek attól függően, hogy mennyi β -gal-fehérje expresszálódik. Ily módon homogén szűrővizsgálati eljárás készíthető bármilyen biológiai lépésre, amely egy riportergén, például a bétagalaktozidáz-gén expressziójára hat. A homogén szűrővizsgálati eljárás még egy másik példájában olyan szubsztátot alkalmazunk, amely egy enzim aktivitásának következtében megváltoztatja a színét vagy a fluoreszcenciáját. Végül az olyan technológiák, mint például a szcintillációs közelségi szűrővizsgálati eljárás (SPA, "Scintillation Proximity Assay") az Amershamtól közvetlenül méri egy radioaktívan jelölt ligand kötődését egy fehérjéhez vagy bármilyen, szcintillációs anyagot tartalmazó gyöngökhöz rögzített ligandkötő anyaghoz. Az előzőekben felsorolt példák mind homogén szűrővizsgálati eljárások, mivel nem igényelnek más lépést, mint a reagensek hozzáadását a végső kimutatás, mérés vagy a jel leolvasása előtt.

A heterogén szűrővizsgálati eljárások viszont legalább két lépést igényelnek, amelyek mivel lényegüket tekintve bizonyos mértékig összeférhetetlenek, nem egyesíthetők egyetlen lépésbe. Például sok heterogén szűrővizsgálati eljárásban egy bizonyos meghatározott sorrendben kell adni a reagenseket (pl. ha némelyik reagens gátló a szűrővizsgálati eljárás első lépéseit, de szükséges a későbbi lépésekhez). Ilyen általánosan ismert példák az olyan szűrővizsgálati eljárások, amelyekben szignálkifejlesztő reagenseket adunk, hogy közvetetten kimutassuk egy reakciótermék jelenlétét vagy koncentrációját. A heterogén szűrővizsgálati eljárásokban egy másik általánosan előforduló lépés a mosási lépés. Szűrővizsgálati eljárások elején gyakran feleslegben kell adni a reagenseket, de a következő lépések előtt ki kell mosni, hogy a reakciók magas háttérszignál nélkül men-

jenek végbe. Radioaktívan jelölt ligand esetében például a radioaktívan jelölt ligandot először egy fehérjével inkubáljuk, amely egy szilárd felülethez van kötve, de a ligand csak egy kis része kötődik aktuálisan a korlátozott számú fehérjehelyekre. Inkubáció után a meg nem kötött ligandot ki kell mosni a megkötött, radioaktívan jelölt ligand pontos mérése előtt. A mosási lépés többféle módon végrehajtható, például szűréssel, mosás/elöntés, kicsapás/fázisszétválasztás és/vagy centrifugálás ciklusokkal.

Sok biológiai és biokémiai folyamat csak heterogén eljárásokkal mérhető. Továbbá, annak ellenére, hogy van lehetőség más biológiai és biokémiai folyamatokat homogén eljárásokra adaptálni, ezek a más folyamatok heterogén eljárásokkal gazdaságosabban működnek és/vagy könnyebben hozzáférhető reagensekkel. Sokféle eljárás és reagenskészlet kapható kereskedelmi forgalomban homogén technológiákhoz, mint például az SPA-hoz (Amersham), fluoreszcens polarizációhoz (Jolley és mások) és időfelbontásos ("time resolved") fluoreszcenciához (Packard és mások) hogy csak néhányat említsünk. Az ilyen eljárások alkalmazása azonban további költséget von maga után és több időt igényel. Sok szűrővizsgálati eljáráshoz a heterogén eljárások jobban kialakultak és ilyeneket könnyebb gyorsan kifejleszteni. Ez okból kifolyólag az olyan heterogén eljárások, mint például az ELISA, filterkötés, RIA, luciferáz sejtes szűrővizsgálati eljárás, stb. továbbra is széles körben alkalmazottak. Ezen eljárások közül néhányat az alábbiakban részletesen tárgyalunk.

Nagy teljesítményű szűrés (HTS)

A gyógyászati éveken keresztül ipar egyre növekvő mértékben támaszkodik a kémiai vegyületek könyvtárainak nagy teljesítményű szűrésére (HTS), hogy hatóanyag esélyes vegyületeket találjon. A HTS egy olyan eljárás, amelyben sok, különálló vegyület vizsgálható egymás mellett, így vizsgálati vegyületek biológiai aktivitása nagy számban vizsgálható egyidejűleg vagy közel egyidejűleg. Mostanában a legszélesebb körben kialakított technológiák 96-lyukú mikrotiterlemezeket alkalmaznak. Ebben a formában 96 független vizsgálat végezhető el egyidejűleg egy 8 cm x 12 cm műanyag lemezen, amely 96 reakciólyukat tartalmaz. Ezekben a lyukakban a szűrővizsgálati térfogat jellemzően 50 µl és 500 µl között van. A lemezeken kívül sokféle eszköz, anyag, pipetázó, automatizált eszközök, lemezmosók és lemezolvasók kaphatók kereskedelmi forgalomban a 96-lyukú formához igazodva, homogén és heterogén szűrővizsgálati eljárások széles köréhez.

Jelenleg a HTS továbbfejlesztésére irányuló erőfeszítések a lyukak kisebb méretűvé tételét célozzák meg (miniatürizálás). Amennyiben csökken a lyuk mérete, növelhető a lyukak száma a lemezen, amely több egymás melletti vizsgálati lehetőséget biztosít. A szűrővizsgálati eljárások térfogatának csökkentésével továbbá csökken az egy vizsgálatra jutó reagens költsége is. Ezen kívül, mivel több egymás melletti vizsgálat végezhető kisebb térfogattal, egyidejűleg több vizsgálati vegyület tesztelhető hatóanyag esélyes vegyületek azonosítása céljából. A miniatürizálás eddig kis mértékben javította a 96-lyukú technológiát a 384-lyukú forma (96 x 4) előállításával. Lásd, Comley és mtsai., J. Biomol. Screening 2(3), 171-78 (1997). Még nagyobb sűrűségű formáról is jelentek meg közlemények, például 9600-lyukú formáról. A miniatürizálásnak azonban megvannak a velejáró költségbeli és bonyolultsági vonzatai.

Ezek a költségbeli és bonyolultsági tényezők közvetlenül kapcsolatosak a szűrővizsgálati eljárási forma miniatürizálásának három elsődleges összetevőjéből. Az első az, hogy a vizsgálati edényeket (csöveket, lyukakat, gödröket) kisebbé kell tenni. A második, hogy az összes, szükséges szűrővizsgálati reagenst pontosan kell tudni adagolni több és kisebb lyukakba (általában folyadékadagoló robotokkal végzik, amelyek egyidejűleg adagolják a reagenseket több lyukba). A harmadik, hogy a vizsgálati eredményeket nagy sűrűségű elrendezés-

ben („array”) le kell tudni olvasni.

Figyelembe véve az egymás melletti, független szűrővizsgálati eljárások követelményeit, azok minden összetevője kihívást jelent és meghatározza annak korlátait, hogy a miniatürizálás mennyire megvalósítható és mennyire gazdaságos. Például egy újabb, kisebb forma a reagensek adagolásának teljesen más módját kívánja, vagy olyan leolvasó készüléket igényel, amelynek felbontása, érzékenysége és működése összefér az újabb, miniatürizált formával. Amint csökken a lyukak mérete, bonyolultabbá, időigényesebbé és költségesebbé válik a reakcióedények elrendezése, a reagensek kisebb mennyiségekben történő adagolása, és a vizsgálati minták leolvasása. Továbbá, a kisebb mintaméret növeli a minták közötti statisztikai variabilitást a reagensek kisebb mennyiségeinek adagolásából és a gyengébb mintajelek méréséből következő pontatlanságok miatt. Ezenkívül, amint a mintaméret egy bizonyos pont alá csökken, az olyan tényezők, mint párolgás vagy felületi feszültség, még nagyobb költséggel és bonyolultsággal terheli az újabb, miniatürizált formák megvalósítását.

A HTS-technológiában mennyiségi ugrást jelentene, amelyre az iparban nagy igény mutatkozik, a „szabad formájú szűrővizsgálati eljárás” vagy a minták közötti fizikai korlát nélküli szűrővizsgálati eljárás lehetősége. Általában olyan formát képzelnek el, amelyben kis cseppeket vizsgálnak lyukak nélkül, azonban jelenleg senki sem számolt be HTS-ben szabad formájú szűrővizsgálati eljárás alkalmazásáról hagyományos, különálló vegyületkészlettel.

Kombinatorikus könyvtárak szűrővizsgálata, gélpermeációs eljárások

A kombinatorikus kémia beköszöntével kémiai entitások milliói állíthatók elő gyorsan szilárd hordozókon (általában gyöngyökön). Habár a 96-lyukas formát alkalmazzák gyöngy alapú könyvtárak szűrővizsgálatára, ezt a formát általában nem tartják hatékonyknak, mivel (1) minden gyöngy a kémiai entitás csak kis mennyiségét tartalmazza, (2) a vizsgálandó vegyületek száma rendkívül magas, és (3) a gyöngyökkel nehéz dolgozni 96-lyukú mikrotiterlemezekben.

A kombinatorikus könyvtárak 96-lyukú formában történő szűrővizsgálatával járó problémákat elkerülendő, néhányan beszámoltak egyszerű, homogén szűrővizsgálati eljárások alkalmazásáról, amelyek „szabad formájúként” jellemezhetők. Például Jayawickreme és munkatársai [Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 191, 1614-18 (1994)] leírtak egy egyszerű, homogén szűrővizsgálati eljárást pigmentsejtek (melanociták) alkalmazásával kombinatorikus peptidkönyvtárak vizsgálatára. A szerzők sejteket helyeztek agaróz alá Petri-csészébe, majd a kombinatorikus vegyületeket hordozó gyöngyöket rakták az agar felületére, és a gyöngyökből részlegesen felszabadították a vegyületeket. Az aktív vegyületek sötét, pigmentált területtel figyelhetők meg, mivel ahogy a vegyületek lokálisan a gélmátrixba diffundálnak, az aktív vegyületek a sejteket színváltozásra készítetik.

Egy másik, új példáról Daniel Chelsky számolt be „Strategies for Screening Combinatorial Libraries: Novel and Traditional Approaches”, First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening, Philadelphia, PA (1995 november 7-10). Chelsky karbon-anhidráz kimutatására egy egyszerű, homogén, enzimes szűrővizsgálati eljárást agaróz gélen belülre helyezett oly módon, hogy a gélben lévő enzim színváltozást okoz az egész gélben. Ezek szerint a kombinatorikus vegyületeket egy fockapcsolón keresztül hordozó gyöngyöket a gélen belülre helyezte és a vegyületeket UV fénnel részlegesen felszabadította. Az enzimet gátló vegyületek gyengébb színváltozást mutató, helyi, gátlási zónaként figyelhetők meg. Végül pedig Salmon és munkatársai [Molecular Diversity 2, 57-63 (1996)] közöltek egy, Jayawickreme és munkatársaiéhoz hasonló eljárást, amelyben kombinatorikus könyvtárakat vizsgáltak olyan vegyületek után, amelyeknek citotoxikus hatásuk van

agarban növő rákos sejtekre.

Mindhárom példa az antibakteriális vagy rákellenes hatóanyagok kimutatására szolgáló, bevált gél szűrővizsgálati eljárások variációja és hasonló a közismert immunológiai szűrővizsgálati eljárásokhoz, amelyekben egy antigén/ellenanyag kölcsönhatást mérnek a gélben. Ezek a gélpermeációs szűrővizsgálati eljárások jól alkalmazhatók gyöngy alapú kombinatorikus könyvtárak szűrővizsgálatára, azonban ennek a formának heterogén szűrővizsgálati eljárássá vagy nem gyöngy alapú könyvtárak szűrővizsgálatára történő kiterjesztéséről nem jelent meg közlemény.

A hagyományos tapasztalat elbátortalanította a kutatókat a minták folyamatos formában történő vizsgálatától, amely a minták keveredését tenné lehetővé. A korlátozott fajtájú, leírt szűrővizsgálati eljárások közül, többek között a folyamatos formában a minták összefutásától való félelem miatt, csak gyöngy alapú könyvtárakat vizsgálnak. Ezen korlátoknak köszönhetően a kutatók úgy vélik, hogy a 96-lyukú forma alkalmasabb heterogén és nem gyöngy alapú könyvtár szűrővizsgálatára. Kíváncos lenne heterogén szűrővizsgálati eljárásokat szabad formájú felállításban kivitelezni. Továbbá kíváncos lenne különálló vegyületeket szabad formájú felállításban vizsgálni.

A következőkben röviden összefoglaljuk a találmányt.

A találmány tárgyát képező folyamatos formájú, nagy teljesítményű szűrővizsgálati eljárás (CF-HTS) sikeresen alkalmazza a szabad formájú elvet bármilyen szűrővizsgálati eljárásra, homogénre vagy heterogénre, amely 96-lyukú formában végrehajtható. A CF-HTS továbbá alkalmas kombinatorikus könyvtárak heterogén szűrővizsgálati eljárással történő szűrővizsgálatára, nem pedig csak homogén szűrővizsgálati eljárásokkal. A CF-HTS-sel továbbá különálló vegyületeket vizsgálhatók a miniatürizációval járó költségek és bonyolultság nélkül. A reagenseknek és a vizsgálati eredményeknek az egymás után következő lépések során történő összefutásának lehetőségével kapcsolatos aggodalmak alaptalannak bizonyultak.

A találmány egyik megvalósítási módja szerint a találmány tárgyát képezi minták biológiai vagy biokémiai aktivitásának vizsgálata oly módon, hogy

a) több vizsgálati mintát felviszünk egy porózus szűrővizsgálati hordozó anyagba (mátrixba) vagy hordozó anyagra (mátrixra), amely adott esetben egy vagy több szűrővizsgálati komponenst tartalmaz,

b) legalább egy hordozó anyagot (mátrixot) alkalmazunk egy vagy több szűrővizsgálati komponensnek a szűrővizsgálati eljárásba juttatására, ahol a hordozó anyag (mátrix) lehet porózus szűrővizsgálati hordozó anyag (mátrix) vagy nem porózus szűrővizsgálati hordozó anyag (mátrix), és

c) a következő lépéseket hajtjuk végre

i) mossuk a szűrővizsgálati eljárásban alkalmazott, bármilyen hordozó anyagot (mátrixot), hogy eltávolítsuk a vizsgálati minta, a szűrővizsgálati komponens vagy ezek kombinációjának felesleges mennyiségét, vagy

ii) kapcsolatba hozzuk a vizsgálatban alkalmazott, bármilyen hordozó anyagot (mátrixot) egy további, egy térfogatban lévő („bulk”) oldat vagy folyadék formában lévő reagenssel.

Másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgyát képezi minták biológiai vagy biokémiai aktivitásának vizsgálata oly módon, hogy több vizsgálati mintát felviszünk egy porózus szűrővizsgálati mátrixba vagy mátrixra, amely adott esetben egy vagy több szűrővizsgálati komponenst tartalmaz, és legalább két, további mátrixot alkalmazunk a szűrővizsgálati eljárás végrehajtására.

Még egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgyát képezi 96-nál több vizsgálati minta biológiai vagy biokémiai aktivitásának vizsgálata oly módon, hogy 96-nál több vizsgálati mintát felviszünk egy porózus szűrővizsgálati mátrixba vagy mátrixra, amely adott esetben egy vagy több szűrővizsgálati komponenset tartalmaz, és végrehajtjuk a szűrővizsgálati eljárást.

A következőkben az ábrák rövid leírását ismertetjük.

Az 1. ábrán gELISA vizsgálati mintákat mutatunk be egy nem porózus mátrixon, amely kapcsolatban áll a szűrővizsgálati reagenst tartalmazó, porózus gélmátrix egyik oldalával, amely viszont egy további szűrővizsgálati reagenst hordozó, nem porózus mátrixszal érintkezik.

A 2. ábrán a gELISA vizsgálatiminta-mátrix és a porózus gélmátrix eltávolítását mutatja, amelyet mosás és folyadék vagy oldatban lévő reagensek hozzáadása követ, hogy kialakuljon a riporterkomplex a nem porózus reagensmátrixon.

A 3. ábrán a gELISA szűrővizsgálati eljárás láthatóvá tételét mutatjuk be a riporterkomplex-mátrixnak a riportersubsztrátot tartalmazó porózus gélmátrixszal történő kapcsolatba kerülésével.

A 4. ábrán azt mutatjuk be, hogy hogyan alkalmazunk egy ligandmátrixot a filter felületén a sejteket hordozó filterfelülettel ellentétes oldalon.

Az 5. ábrán azt mutatjuk be, hogy milyen a sejteket hordozó filter felülete, amikor a szűrővizsgálati eljárást láthatóvá tesszük.

A 6. ábrán a VanA szűrővizsgálati eljárás eredményét mutatjuk be egy ismert, dózisfüggő inhibitor különböző koncentrációinak alkalmazásával.

A 7. ábrán egy EF-3 szűrővizsgálati eljárás eredményét mutatjuk be egy ismert inhibitor különböző koncentrációinak alkalmazásával.

A 8. ábrán fehérje-fehérje kölcsönhatás gELISA szűrővizsgálati eljárásának kontrollkísérletét mutatjuk be.

A 9. ábrán fehérje-fehérje kölcsönhatás gátlásának gELISA eredményét mutatjuk be.

A 10. ábrán radioaktívan jelölt ITAM dózisfüggő kötődését mutatjuk be immobilizált LCK-hoz.

A 11. ábra grafikonján a pixelértékeket mutatjuk be az ITAM koncentrációval szemben, hogy egy jellemző receptor-ligand kötési görbét szemléltessünk.

A 12. ábrán radioaktívan jelölt IL-8 ligand-sejt kölcsönhatásának kontrollkísérletét mutatjuk be.

A 13. ábrán az IL-8 ligand-sejt kölcsönhatás gátlását mutatjuk be.

A 14. ábrán neuraminidáz inhibitorok szűrővizsgálati eljárását mutatjuk be.

A 15. ábrán 10080 különálló vegyület neuraminidáz inhibitorok utáni, egyidejű szűrővizsgálati eljárását mutatjuk be.

A következőkben részletesen ismertetjük a találmányt.

A CF-HTS alapjául szolgáló központi elv az, hogy a vizsgálati mintákat egy porózus mátrixba ágyazzuk. Az eljárás szerint egy vagy több szűrővizsgálati komponenst egy mátrix, például gél, műanyag lap, filter vagy más, könnyen manipulálható formájú, szilárd hordozó belsejébe, tetejére vagy az aljára helyezünk. Amikor a mintákat a porózus mátrixhoz juttatjuk, elég lassan diffundálnak ahhoz, hogy a szűrővizsgálati eljárás elvégezhető legyen a vizsgálati minták összefutása nélkül. A CF-HTS forma tehát a vizsgálati mintákat inkább diffúzióval választja el, mint átjárhatatlan akadállyal. Ha a vizsgálatokat túl sokáig végezzük a vizsgálati minták és eredmények végül is összefutnak. Megfelelőképpen időzítve azonban a CF-HTS vegyületek egyidejű

szűrővizsgálatát teszi lehetővé nagyon magas sűrűséggel, de mégis egyedileg anélkül, hogy egyedi lyukakat vagy reakcióedényeket oldószerekkel vagy szűrővizsgálati komponensekkel meg kellene tölteni.

Továbbá a reakciókomponenseket tartalmazó mátrixok manipulálásával még összetettebb heterogén szűrővizsgálati eljárások is elvégezhetők ebben a formában. Heterogén szűrővizsgálati eljárásokhoz mátrixok manipulálása teljesen új, és a CF-HTS-t ugyanolyan rugalmassá teszi, mint a 96-lyukas formát biológiai vagy biokémiai folyamatok széles körének szűrővizsgálatában. A CF-HTS továbbá biztosítja a miniaturizálással járó előnyöket a velejáró hátrányok nélkül, és vannak sajátos előnyei.

A CF-HTS mátrixok és szűrővizsgálati komponensek széles körét alkalmazza. Mátrixok például, de nem kizárólag agarózból, akrilamidból vagy más zselatinos anyagokból álló gélek, membránok, filterek és műanyagok. A mátrixok anyaga például, de nem kizárólag polisztirol, polipropilén, más műanyagok, papírost, üveg, üvegszál, kova, polikarbonát, poliészter, polivinilidén-klorid és polietilén. A mátrixok lehetnek átjárhatatlan szilárd anyagok, porózus szilárd anyagok, mint például filterek vagy gélek. A szűrővizsgálati komponensek például, de nem kizárólag makromolekulák, mint például nukleinsavak, fehérjék és más szintetikus vagy természetes makromolekulák, sejtek, sejtmembránok, biológiai kivonatok, sejtstruktúrák és más, összetett biológiai entitás vagy keverék, és kis molekulák, mint például pufferek, sók, inhibitorok, szubsztrátok, peptidok, festékek, nukleotidok, kofaktorok, ionok és oldószerek.

A CF-HTS szűrővizsgálati eljárás olyan szűrővizsgálati eljárás, amelyben a több vizsgálati minta vagy vegyület inkább diffúzió útján van elválasztva, mintsem átjárhatatlan akadállyal. A kritikus lépés a több (egynél nagyobb számú) vizsgálati minta felvitele a porózus szűrővizsgálati mátrixba vagy mátrixra, amely adott esetben egy vagy több szűrővizsgálati komponens is tartalmaz. A szűrővizsgálati komponenseket tartalmazó porózus szűrővizsgálati mátrixokat a komponenseknek a mátrixhoz történő hozzáadásával, keverésével, öntésével, szétadagolásával vagy áztatásával készítjük. A porózus mátrixok a szűrővizsgálati komponenseknek a mátrix felületére vagy felületére történő kapcsolásával, borításával, kötésével, rögzítésével, csatolásával, egyesítésével is készíthetők. A porózus mátrix továbbá oldat- vagy folyadékfilm formájában is elkészíthető a sejtek, az enzim vagy más immobilizált szűrővizsgálati komponens felett. A porózus szűrővizsgálati mátrixot a komponens hozzáadásának rendje és/vagy időtartama ellenőrzésére, és a szűrővizsgálati komponensek egyesítésekor a keveredés és a diffúzió mértékének ellenőrzésére alkalmazzuk. A CF-HTS nem porózus mátrixokat is alkalmazhat. A nem porózus mátrixot a szűrővizsgálati komponenseknek vagy a vizsgálati vegyületeknek a nem porózus mátrix felületére történő kapcsolásával, borításával, kötésével, rögzítésével, csatolásával vagy egyesítésével készítjük. A CF-HTS-ben a nem porózus mátrixok térben rögzítenek egy vagy több szűrővizsgálati komponens.

Amikor a szűrővizsgálati komponenseket egy mátrix felületére visszük, a szűrővizsgálati komponensek kovalensen vagy nem kovalensen, specifikus vagy nem specifikus kölcsönhatásokkal kapcsolódnak a mátrixszal, amelyet származékképezés nélkül vagy származékot képezve vagy más módon előkezelve alkalmazunk a szűrővizsgálati komponensek kapcsolódásának elősegítése céljából. A hozzákapcsolás után a szűrővizsgálati komponensek térben rögzítettek, így módon immobilizáltak a szűrővizsgálati eljárás céljára. Ebben az esetben vagy a vizsgálati mintáknak kell a mátrixon keresztüldiffundálni ahhoz, hogy a szűrővizsgálati komponenseket elérjék, és/vagy a szűrővizsgálati komponensek alkomponenseinek vagy termékeinek kell tudni keresztüldiffundálni a mátrixon, hogy elérjék a vizsgálati mintákat.

Legalább egy, a vizsgálati mintákat tartalmazó porózus mátrixot alkalmazunk a következő lépések bármelyikében vagy többjében:

(1) A porózus mátrix felületét kapcsolatba hozzuk legalább egy másik (porózus vagy nem porózus) mátrixszal úgy, hogy a minták és/vagy a szűrővizsgálati komponensek egyike vagy többje az érintkező felületen keresztül tudjon diffundálni.

(2) Elválasztjuk a két vagy több mátrixot, hogy a komponensek és/vagy a minták kölcsönhatását leállítsuk.

(3) Két vagy több mátrix felületét kapcsolatba hozzuk úgy, hogy a szűrővizsgálati komponensek kölcsönhatásba tudjanak lépni.

(4) Mossuk, öblítjük vagy eluáljuk a mátrixot folyékony pufferekkel vagy más oldószerekkel, hogy a nem kötődött és/vagy nem specifikusan kötődött szűrővizsgálati komponenseket eltávolítsuk.

(5) Az oldatban lévő szűrővizsgálati komponenseket hozzáadagoljuk, öntjük, hozzáadjuk a mátrixhoz vagy a mátrixszal áztatjuk vagy a komponenseket keresztülszűrjük a mátrixon.

(6) Az egy vagy több mátrixon vagy mátrixban lévő radiometriás, fluoreszcens, spektrofotometriás vagy elektromagnetikus szignálokat képzalkotással, leolvasással, letapogatással, detektálással vagy más módon láthatóvá tesszük.

A CF-HTS-nek sok előnye van a technika eddigi állása szerinti technológiákkal szemben. A különálló lyukak hiánya szükségtelenné teszi a szűrővizsgálati komponensek vagy reagensek egyidejű és pontos szétosztását a lyukakba. Ehelyett a szűrővizsgálati komponenseket homogén módon, egy térfogatban kezeljük, osztjuk szét és keverjük. Mivel a szűrővizsgálati komponenseket homogén, egy térfogatban lévő („bulk”) oldat vagy mátrix formájában készítjük, minimális a minták közötti statisztikai variáció. Összehasonlításképpen a 96-lyukú formában a lyukak jelenléte nagy minták közötti eltérést eredményez.

A CF-HTS továbbá nagyszámú vegyület különösen nagy sűrűségű szűrővizsgálatát teszi lehetővé. Még ha a megfigyelt találat bizonyos mértékig össze is fut, csak a találat körül elhelyezkedő vegyületeket kell újra vizsgálni. Ily módon, ha 10000 vizsgálati vegyületet sikerül a láthatóvá tett terület körüli 50 esélyes vegyületre csökkenteni, az 50 esélyes vegyület könnyen tovább csökkenthető az aktív vegyület(ek)re akár a régi 96-lyukas technológiával.

A különálló vegyületeknek egy műanyag lapon, igen szoros elrendezésben történő szétosztásával és száritásával, majd CF-HTS-hez alkalmazásával, a miniaturizálás minden kritikus pontját megcélazzuk. Ez a forma nem kíván újítást a műanyagokban vagy más anyagokban, hogy a miniaturizálást végre lehessen hajtani, mivel a miniaturizálást egyszerűen a mátrixba diffundáló minta mennyiségének korlátozásával érjük el. Ez a forma nem kíván mikrofolyadék-adagolókat a szűrővizsgálati reagensek szétosztására, mivel az egész szűrővizsgálati eljárás gyakorlatilag egyetlen „óriási lyukban” megy végbe, amelyben a reagenseket és az oldatokat egyetlen térfogatban kezeljük. Csak a vizsgálati mintákat kell mikrofolyadék-adagolókkal szétosztani. Továbbá sokkal kevesebb statisztikai eltérés lép fel ennél a formánál, mivel csak helyi heterogenitási zónákat kell keresni a máskülönböen homogén mátrixban. Nem szükséges sok különböző lyukat leolvasni és összehasonlítani. A miniaturizálás előrevetített összes előnyén túl (költség, teljesítőképesség, reagenshasználat, vizsgálati vegyület alkalmazása), a CF-HTS olyan meglepő előnyöket is biztosít, mint az, hogy a szűrővizsgálat legtöbb lépése egy térfogatban kezelhető.

A CF-HTS központi elve az a megfigyelés, miszerint a szűrővizsgálati komponensek és a vizsgálati minták oldalirányban nem diffundálnak gyorsan, még a mátrixok közötti érintkező felületeken sem. Például, amikor egy agaróz gél helyezünk egy műanyag lemezre, jelentős mennyiségű folyadék található a gél felületén az érintkező felületeknél. Ha a gélben és a lemezen lévő szűrővizsgálati komponens között kölcsönhatás szükséges (mint az ELISA példában), fontos, hogy a gélben lévő komponens ki tudjon diffundálni a gélből a lemezre. A CF-HTS azonban megköveteli, hogy a kísérő, oldalirányú diffúzió számottevően lassabb legyen, így a lemezen fellépő kölcsönhatás a gél alapú komponens eredeti helyzete köré korlátozódjon. Ugyanezeket az elveket alkalmazzuk gélek, filterek vagy bármilyen kombinációban lévő felületek (vagy bármilyen más mátrixok) közötti bármilyen mátrix-mátrix érintkező felületekre. Annak a felismerése, hogy ez a diffúziós viselkedés ellenőrizhető és általánosságban minden mátrix határfelületre alkalmazható példa nélkül álló és a hagyományos ismeretekkel ellentétes.

Egy előnyös eljárás a vizsgálati mintáknak vagy vegyületeknek egy mátrixra (például egy gélre vagy megnedvesített filterre) történő felvitelére minden minta kis mennyiségeinek egy felületen, például egy műanyag lap felületén történő szétadagolása és szárítása olyan elrendezésben, hogy két minta ne keveredjen vagy ne fedjen át, és mindegyiknek egy meghatározott helye legyen. Amikor a műanyag lapot egy mátrix felületére helyezzük, a minták feloldódnak és a mátrixba diffundálnak az eredeti elrendezés szerint meghatározott elhelyezkedésnek megfelelően.

Egy más módszer a mintáknak egy elrendezés szerint történő szétosztására az, hogy a mintákat egy porózus mátrixra, például filterre szétadagoljuk, ahol a szétadagolt minták mennyisége elég kicsi ahhoz, hogy ne fedjenek át a mátrixban. Egy másik, több folyadékot tartalmazó porózus mátrixszal történő kapcsolatba kerülés esetén a vegyületek diffundálnak, és megkezdődik a szűrővizsgálati eljárás.

Egy előnyös eljárás gyöngy alapú kombinatorikus vegyületeknek egy mátrixra történő felvitelére oly módon történik, hogy a gyöngyöket véletlenszerűen vagy egy meghatározott sorrendben egy felületre, például egy műanyag lemez felületére szétadagoljuk. A gyöngyöket azután kezeljük (hasítjuk), hogy a vizsgálati vegyületek felszabaduljanak, ha kovalensen vannak kötve a gyöngyökhöz egy instabil kapcsolóval (fotohasítás és gáz fázisú savas hasítás ismert a technika állása szerint). Ezután a vegyületek nem kovalensen kapcsolódnak azzal a területtel, amelyet a származási gyöngy elfoglalt, és a száraz vegyületek azután egy mátrixra vagy mátrixba vihetők.

Egy másik eljárás különálló vegyületeknek egy mátrixba történő juttatására oly módon történik, hogy áztatjuk vagy más módon nem kovalensen kapcsolunk minden vegyületet a gyöngyökhöz vagy gyöngyökre. Ezzel az eljárással nagy számú vegyület keverhető egymással amikor a gyöngyökhöz vannak úgy, hogy mindegyik gyöngyön egy egyedi vegyület van. A gyöngykeverék azután könnyen szét teríthető egy felületen, egy mátrixba történő felvitel érdekében. Ez az eljárás teljesen szükségtelenné teszi kis mennyiségű folyadékok kezelését.

Ha a mátrixba vitt minták eredeti elrendezése egy CF-HTS szűrővizsgálati eljárásban olyan nagy sűrűségű, hogy egy bizonyos aktivitási zóna térben egynél több minta kezdeti helyét fedi át, akkor ezen minták mindegyikét a megfigyelt aktivitás forrásának tartjuk. Nagyobb kezdeti sűrűségnél több esélyes vegyület jut mindegyik zónára, mivel több vegyület lesz egy bizonyos zónában. A vegyületek egymásba diffundálhatnak, de mindegyiknek megvan a saját térbeli gradiense, és egyetlen helyen sem keverednek kvantitatívan. A zóna kö-

zép pontja ezért megfelel az aktív vegyület pontos helyének a kezdeti elrendezésben. Gyakorlatilag a találatok elég ritkák ahhoz, hogy az aktív vegyület azonosítása érdekében minden egyes aktív zónában több minta újra vizsgálata ne legyen nagy feladat.

A találmány egy másik megvalósítási módja szerint fizikai akadályokat viszünk egy szűrővizsgálati mátrixba (így nem folytonossá alakítjuk a formát a szó szigorú értelmében), hogy korlátozzuk a távolságot, amelyre a minták diffundálhatnak. Például egy enzimet és egy szubsztrátot tartalmazó két gél egy rácsozattal (süteményvágó) oly módon felvágunk, hogy mindegyik gél sok, különálló elhelyezkedésű részre osztjuk. Ezután a két gél kapcsolatba hozható, hogy a szubsztrát és az enzim együtt tudjon diffundálni minden egyes feldarabolt gél részben. A vizsgálati minták minden feldarabolt gél részbe bejuttathatók oly módon, hogy a szűrővizsgálatok teljesen függetlenek legyenek, a szűrővizsgálatok között ne legyen diffúzió. Ez a megvalósítási mód a CF-HTS előnyei közül néhányat tönkre tesz, mivel minták közötti statisztikai eltéréseket visz be és a térfogatot rögzíti, ezáltal korlátozza a jelet a nagy sűrűségű elrendezéseknél. Ez a megvalósítási mód azonban még hordozza a mátrix alapú heterogén szűrővizsgálati eljárások előnyeit, amelyekben a szűrővizsgálati komponenseket nem kell nagyszámú párhuzamos reakcióedényekbe szétosztani, és megszünteti a minták részleges keveredését.

gELISA

Az enzimmel kapcsolt immunológiai kötődéses szűrővizsgálati eljárások (ELISA) heterogén szűrővizsgálati eljárások, amelyek oldatban lévő ligandok és immobilizált receptorok közötti kötődést mutatják ki. Az ELISA sok reagenskeverési és mosási lépést kíván, amelyet 96-lyukas formában nehéz kivitelezni, és el lehet képzelni a még nagyobb nehézségeket, amelyek a lyukak 96-lyukas formájából 384-es formába történő csökkentésénél fellépnek. A CF-HTS eljárást alkalmazzuk ligandok és immobilizált célreceptorok közötti kötődés gátlásának kimutatására (gELISA).

Receptor bármilyen molekula, amely egy másik molekulát köt. Nem korlátozó példák a fehérjék, a peptidok, a nukleinsavak, a szénhidrátok és az előzőekben említett példák komplexei. A receptort a többféle lehetséges mátrix egyikén immobilizáljuk (receptormátrix) például, de nem kizárólag műanyag felületeken [pl. Petri-csésze vagy műanyag lemez (Nunc)], membránokon vagy filtereken, amelyeknek nagy célt kötő kapacitása van [pl. nitrocellulóz, nylon, vagy PVDF (Millipore, Corning Costar, Schleicher & Schuell, BioRad) vagy származékos membránok, mint SAM-membránok (Promega)]. Egy porózus ligandmátrixot készítünk (pl., agaróz gél vagy porózus membrán) úgy, hogy az immobilizált receptor ligandját kimérjük a mátrixba vagy mátrixon. A vizsgálati vegyületeket vagy mintákat közvetlenül a ligandmátrixra adagoljuk, vagy egy más módon egy vizsgálatiminta-mátrixon/mátrixra [pl., polisztrén (Tekra), polivinilidén (pl., Dow Brandstől) vagy más hajlékony műanyag lapra vagy membránra visszük. A vizsgálati mátrixot kapcsolatba hozzuk a ligandmátrixszal és a mintákat hagyjuk a ligandmátrixba diffundálni. Megfelelő inkubációs idő után a ligandmátrixot kapcsolatba hozzuk a receptormátrixszal, lehetővé tesszük, hogy a ligand és a minták kapcsolatba kerüljenek és diffúzió útján lehetőség szerint reagáljanak a receptorral (Az 1. ábra azt mutatja, hogy az immobilizált R-receptor köti a biotinilált L β -ligandot). Az inkubáció alatt a ligandok kötődnek az immobilizált receptorhoz, ha egy vizsgálati vegyület nem gátolja a ligand/receptor kötést.

Megfelelő inkubációs idő után a receptormátrixot eltávolítjuk és egy megfelelő pufferrel mossuk a nem kötődött vagy nem specifikusan kötődött ligand és minták eltávolítása érdekében. A receptormátrixot a szűrő-

vizsgálati reagenseket tartalmazó oldatba áztatjuk, amely kölcsönhatásba lép a liganddal (pl., egy ellenanyag, avidin vagy streptavidin biotinilált ligand esetében) és kimutatható akár közvetlenül (pl., fluoreszcenciával vagy radioaktivitással) vagy indirekt módon [pl., toma peroxidázzal (HRP), alkalikus-foszfátázzal (AP) vagy béta-galaktoszidáz konjugátummal] (A 2. ábra egy avidin-HRP konjugátumot, AHRP, mutat be a biotinilált ligandhoz kötődve.) Megfelelő inkubáció után a receptormátrixot eltávolítjuk az oldatból és mossuk a nem kötődött és nem specifikusan kötődött reagensek eltávolítása céljából. Közvetlen szignálimutatás esetén a mátrixot egy megfelelő eljárással leképezzük (pl., spektrofotometriás leolvasó, CCD-kamera, film, foszforos képleolvasó vagy szcintillációs kimutatási eszközökkel). Indirekt szignálok (pl., HRP vagy AP) további szignálkifejlesztő reakciót igényelnek, amelyet a szubsztátoknak vagy más szükséges reakciókomponenseknek egy porózus szubsztátmátrixba vagy mátrixra történő adagolásával és ennek a mátrixnak a receptormátrixszal történő kapcsolatba hozásával hajtunk végre. Az enzim (pl., HRP vagy AP) reagál a szubsztátal (3. ábra). Egy más módon egy kicsapó szubsztátot oldatban viszünk be és nem mátrixban. Bármilyen láthatóvá tételi eljárással a ligand/receptor kötődési területek látható reakciót adnak, míg azok a területek, ahol a ligand/receptor kötődés gátolva van, nem mutatnak látható reakciót.

Sejt/ligand kötődés

A CF-HTS ligand/sejtes receptor kötődése gátlásának kimutatására is alkalmazható. A hagyományos szűrővizsgálati eljárásban a vizsgálati vegyületet, a radioaktívan jelölt ligandokat és a megfelelő receptort expresszáló sejteket egy edényben, például egy lyukban összekeverjük. Elegendő időt hagyunk a receptornak a ligand megkötésére, amennyiben a kötődést nem gátolja a vizsgálati vegyület. A nem kötődött és nem specifikusan kötődött komponenseket a sejtekből eltávolítjuk, és a sejtekkel kapcsolatos radioaktivitás mennyiségét mérjük. A CF-HTS eljárást alkalmazzuk ligandok sejtekhez történő kötődésének gátlási vizsgálatára is.

A kívánt receptort expresszáló sejteket egy mátrixon (sejtmátrixon) például, de nem kizárólag géleken, filtereken vagy membránokon [pl., Transwell szövettenyésztő membránok (Corning Star) vagy kemotaxis membránokon (Neuro Probe)] szaporítjuk vagy terítjük. Egy porózus mátrixot készítünk (pl., agaróz gél vagy porózus membrán) oly módon, hogy a receptor jelölt ligandját a mátrixon vagy a mátrixban eloszlatjuk (ligandmátrix). A vizsgálati vegyületeket vagy mintákat közvetlenül a ligand- vagy sejtmátrixra adagoljuk, vagy egy más módon, egy másik mátrixon vagy mátrixban [pl., polisztiirén (Tekra), polivinilidén vagy más rugalmas műanyag lapon vagy membránon, mintamátrix] adagoljuk. A mintamátrixot kapcsolatba hozzuk a ligandmátrixszal, így lehetővé tesszük, hogy a minták a ligandmátrixba diffundáljanak. Megfelelő inkubációs idő elteltevel a ligandmátrixot kapcsolatba hozzuk a sejtmátrixszal, előnyösen a mátrixnak nem a sejteket tartalmazó oldalán, és hagyjuk a ligandot és a mintát diffúzió útján a receptorral kapcsolatba lépni és reagálni (4. ábra). Az inkubáció alatt a jelölt ligandok az immobilizált sejtekhez kötődnek, hacsak a minta nem gátolja a ligand/sejt kötődést.

Az inkubációs idő után a sejtmátrixot a ligandmátrixtól elválasztjuk és egy megfelelő pufferrel mossuk a nem kötődött vagy nem specifikusan kötődött ligandok és minták eltávolítása céljából. A sejtmátrixról egy megfelelő eljárással képet alkotunk (pl., spektrofotometriás leolvasó, CCD-kamera, film, foszforos képalkotó vagy szcintillációs kimutatási eszköz) (Az 5. ábra a szűrővizsgálati eljárásnak egy filmen történt kifejlesztését szemlélteti.)

Mint a fentiekben bemutatjuk, a CF-HTS beváltja a "szabad formájú" szűrővizsgálati eljárásokhoz fi-

zöti minden előnyt, és biológiai és biokémiai szűrővizsgálati eljárások összes különböző típusához, az összes különböző formátípushoz és az összes különböző reagenssel és felszereléssel alkalmazható. Széleskörű alkalmazhatósága miatt leginkább a következő példákkal tudjuk szemléltetni. Ezek a példák azonban a találmány előnyös megvalósítási módjait szemléltetik, és nem korlátozzák a szabadalmi igénypontokat vagy a leírást. A szakember számára nyilvánvaló, hogy a meghatározott megvalósítási módok változtatásai és módosításai a találmány oltalmi körétől és alapgondolatától való eltérés nélkül elkészíthetők. Végül pedig az összes hivatkozás a leírás részét képezi.

1. példa

Kétlépéses kolorimetriás gél szűrővizsgálati eljárás a vankomicin rezisztens enzim, a VanA által előállított foszfát kimutatására

A VanA a vankomicin rezisztencia kulcsfontosságú enzime, és D-alaninnak D-alaninhoz vagy D-alaninnak D-laktáthoz történő kapcsolódását katalizálja. Ezt az enzimet hagyományosan az aktív enzim által felszabadított foszfát által kiváltott szín alapján mérik (a VanA aktivitása az ATP-t ADP-vé és foszfáttá hidrolizálja). A kutatók előtt ismeretes, hogy D-cikloserin dózisfüggően gátolja a VanA-t, és ezt az inhibítort alkalmazzák pozitív kontrollként más, lehetséges inhibitorokkal szemben.

Enzimgél

Egy enzimgél készítettünk a VanA enzimnek 1%-os agarózhoz (magas olvadáspontú agaróz, Gibco BRL) történő hozzáadásával, 45°C-on 50 mmol HEPES (N-[2-hidroxi-etil]-piperazin-N'-[2-etánszulfonsav]), 20 mmol magnézium-klorid, 20 mmol kálium-klorid, pH 7,3 pufferben 2 µmol VanA végkoncentrációban. Az agarkeveréket *BioRad* gélkészítőbe öntöttük és 2-8°C-on 30 percen keresztül hagytuk megszilárdulni.

Szubsztrátgél

Egy szubsztrátgél készítettünk ATP-nek (1 mmol végkoncentrációban), D-alaninnak (1,5 mmol végkoncentrációban) és D-laktátnak (1,75 mmol végkoncentrációban) felolvasztott agarózhoz történő hozzáadásával, és az enzimgélnél leírtak szerint készítettük a gél.

Mintamátrix

Kontrollmintaként egy ismert inhibitor, a D-cikloserin sorozhígításainak (5000, 2000, 1000, 500, 200, 100 µmol) 1 µl-es mennyiségeit 1:1 etanol-víz keverékben egy polivinilidén-klorid (PVDC) filmdarabra adagoltuk és 10 percig száradni hagytuk.

Az enzimnek a szubsztráttal történő inkubációja az inhibitor jelenlétében

Az enzimgél 5 percre kapcsolatba hoztuk a mintamátrixszal. A szubsztrátgél ezután helyeztük az enzimgél felületére és 15-20 percen keresztül inkubáltuk. Ezt követően a két gél szétválasztottuk. Az inkubáció alatt várhatóan foszfát képződik a gélben mindenhol, amint az enzim katalizálja a szubsztrátok kapcsolódását, kivéve azokat a területeket, ahol a D-cikloserin elegendő koncentrációban van jelen ahhoz, hogy gátolja a reakciót.

A szűrővizsgálati eljárás láthatóvá tétele

Foszfát kimutatásához használt oldatot (0,15% frissen készített malachitzöld és 1,4% ammónium-molibdenát 1,33 N sósavban) öntöttünk és egyformán eloszlatunk az enzim- és a szubsztrátgélben. Ezek a reagentsek reakcióba lépnek a foszfáttal és a foszfát növekvő koncentrációinak függvényében egyre sötétebb zöld árnyalatot hoznak létre. A színt 5-10 percig hagytuk kifejlődni (A 6. ábra szemlélteti a szín kifejlődését a gélben,

ahol az inhibitor mennyisége 5 nanomóltól 0,5 nanomólig változott). A zöld színű géleket *Stratagene Eagle Eye* CCD-kamerával fényképeztük. Az elvárások szerint az inhibitoros zónák gyengébben zöld színének mérteke megfeleltethető volt a beadagolt inhibitor koncentrációjával. Ez a szűrővizsgálati eljárás tehát VanA inhibitorok szűrővizsgálatára alkalmazható, kombinatorikus gyöngyöknél vagy vegyületeknek bármilyen más felületre történő adagolásával és elrendezésével, amelyet azután kapcsolatba hozunk a gél szűrővizsgálattal.

Ez a szűrővizsgálati eljárás azt bizonyítja, hogy a gél szűrővizsgálati forma megfelelő többszöri reakciólépések kezelésére. Ez a tulajdonság szükséges ahhoz, hogy ez a forma sokféle szűrővizsgálati eljáráshoz alkalmazható legyen, mivel sok szűrővizsgálati eljárás több lépést igényel. Ebben az esetben a VanA szűrővizsgálati eljárás két lépéses enzimaktivitási szűrővizsgálati eljárás, amelyet a szín kifejlesztése követ. Ennek a szűrővizsgálati eljárásnak homogén (egy lépéses) változata nem hajtható végre könnyen, mivel a színekfejllesztő reagensek és körülmények gátolják a VanA aktivitást, és egy agargélbe történő bevittel sem férnek össze. Ennek a két lépésnek egy oldatfázisú színekfejllesztő lépés előtt egy enzimaktivitási gél szűrővizsgálati eljárásként történő térbeli és időbeli elválasztása tehát kívánatos.

2. példa

Kétlépéses gél szűrővizsgálati eljárás *S. cerevisiae* elongációs faktor-3 enzimének riboszómakötődéssel kiváltott ATP-áz aktivitásával előállított foszfát kimutatására

Amikor a gombaeredetű elongációs faktor-3 (EF-3) a riboszómákkal kölcsönhatásba lép, foszfátáz aktivitás indukálódik. A CF-HTS-t ennek az aktivitásnak a szűrővizsgálatára is alkalmazzuk. Egy, az EF-3-at (egy hőmérsékletre erősen érzékeny enzimet) és élesztő riboszómákat EF-3-pufferben tartalmazó enzimgél készítettünk. Egy, 1 mmol ATP-t a szűrővizsgálati pufferben tartalmazó szubsztrátgél is készítettünk. Mindkét gél 2% dimetil-szulfidot tartalmazott alacsony olvadáspontú agarózban (Gibco BRL), és 37°C-on készítettük, majd 30 percen keresztül 4°C-on állni hagytuk. Kontrollmintaként az EF-3 egy inhibitorának a poli-L-lizinnek sorozathígításait foltokban PVDC-filmre vittük és száradni hagytuk (mintamátrix). A szűrővizsgálati eljárást azután az 1. példában leírtak szerint hajtottuk végre, az enzimgélnek a mintamátrixon lévő inhibitorokkal történő előinkubálásával. Az enzimgél ezután 20 percen keresztül kapcsolatba hoztuk a szubsztrátgéllel. Mint az 1. példában, az enzim- és a szubsztrátgél malchitzöld/ammónium-molibdenát színekfejllesztő oldattal festettük, utána az enzimgélről CCD-kamerával képet készítettünk. A gátlási foltok a zöld háttérben tiszta területekként jelennek meg. A 7. ábra a szín kifejlődését szemlélteti a gélen, ahol az inhibitorok mennyisége 5 pikomóltól 200 pikomólig változott. Az eredmények az inhibitor dóziszfüggő jelét mutatják, amely jelzi, hogy ebben a szűrővizsgálati eljárásban új EF-3 inhibitorok felismerésére lehet vizsgálni a vegyületeket. A 2. példa a CF-HTS hasznosságát bizonyítja még sejtszervek vagy más, nyers, biológiai keverékek vagy kivonatok jelenlétével bevitt komplexitás esetében is.

3. példa

ELISA fehérje-fehérje kölcsönhatás inhibitorainak indirekt színekimutatására

Mint a fentiekben megtárgyaltuk az ELISA-t ligand-receptor kölcsönhatások gátlásának kimutatására általánosan alkalmazzák, ahol a receptorok a mikrotiterlemez lyukaiban immobilizálva vannak. Az ELISA-nál alkalmazott "ligand-receptor" párok bármilyen kötőmolekula-párt tartalmazhatnak a fehérjéktől vagy más makromolekuláktól kezdve a kis molekuláig. Ezek a szűrővizsgálati eljárások komplexek, több lépéses szűrővizsgálati eljárások, amelyek a receptor immobilizálását, a ligandnak a receptorral történő inkubálását, a nem kívá-

natos, nem specifikusan megkötött ligandok mosását, amelyek máskülönben magas szignálhatteret okoznának, a láthatóvá tételt lehetővé tevő reagenseknek (pl., egy riporterenzimrel kapcsolt ligandspecifikus ellenanyag) a receptorhoz kötött ligandhoz történő kötését és a riporterenzim szubsztrátjának hozzáadásával a látható szignál előállítását kívánják meg. Az ELISA bonyolultsága a HTS-iparban dolgozókat nyilvánvalóan arra a következtetésre vezette, hogy az ELISA nem adaptálható szabad formájú szűrővizsgálati eljárássá. Azonban ezt a komplex, több lépéses szűrővizsgálati eljárást is alkalmazzuk CF-HTS formára különböző fehérje-fehérje, fehérje-ligand és más ligandkötő kölcsönhatások szűrővizsgálatára.

Az urokináz típusú plazminogén aktivátor (uPA) kötődik a receptorához (uPAR). Az uPA/uPAR-kölcsönhatás sokféle rák metasztázisában vesz részt. A hagyományos uPA/uPAR ELISA-t alkalmazzuk CF-HTS-re tisztított receptorok és ligandok alkalmazásával.

uPAR-mátrix

Műanyag lemezeket (7,5 cm x 11,5 cm, Nunc, Inc. Naperville, IL) borítottunk egy éjszakán keresztül 118 nmol tisztított uPAR 15 ml-ével foszfáttal pufferelt sóoldatban pH 7,4 (PBS) (Life Technologies, Grand Island, NY) 4°C-on. A műanyag lemezek egy éjszakán keresztül történő borítása után az uPAR-oldatot leöntöttük és a műanyag lemezen maradt kötőhelyeket 1% (s/tf) kazeint tartalmazó 15 ml PBS hozzáadásával gátoltuk, és szobahőmérsékleten 2 órán keresztül inkubáltuk. A kötőhelyek gátlása után a gátló oldatot leöntöttük és a műanyag lemezt ötször mostuk 20 ml mosó pufferrel, amely 0,05% Tween-20-at (polioxietilénszerbitán-monolaureát) tartalmazó PBS. Mosás után a műanyag lemezt 10 percen keresztül szobahőmérsékleten szárítottuk. A mátrix túlzott kiszáradását elkerülendő, ami az aktivitás elvesztéséhez vezethet, ezt úgy időztettük, hogy a műanyag lemez röviddel ezután az alább leírt szűrővizsgálati eljárásban alkalmazható legyen.

β -uPA-mátrix

A szűrővizsgálat céljára az uPA-t biotinnal jelöljük (β -uPA). A β -uPA-t tartalmazó géleket β -uPA-nak agarral történő áztatásával készítjük, hogy a magas hőmérsékletet elkerüljük (nem javasolt olvadt agarba keverni, mint az 1. és 2. példákban). Az agart a következőképpen készítjük, 0,1 g agarózt (Sigma, St. Louis, MO) 10 ml PBS-sel először elkevertünk, majd olvadásig melegítjük, végül $8 \times 7 \times 0,075 \text{ cm}^3$ gélkészítőbe öntjük (Bio-Rad, Hercules, CA). Megszilárdulás után (akár szobahőmérsékleten, akár 4°C-on) a géleket egy éjszakán keresztül 4°C-on 15 ml, körülbelül 10 nmol β -uPA-t tartalmazó szűrővizsgálati pufferbe áztatjuk, amely PBS-ből, 0,05% Tween-20-ból és 0,1% kazeinből áll (mindkettő Sigma, St. Louis, MO). A géleket 20 percen keresztül szobahőmérsékleten szárítjuk közvetlenül felhasználás előtt.

Mintamátrix

Az uPA/uPAR-kötés egy ismert kis molekulájú inhibitorának hiányában nem biotinilált uPA-t (Pro-uPA) alkalmaztunk a β -uPA/uPAR-kötés inhibitorának kontrollmintájaként. A szűrővizsgálati pufferben lévő 0, 0,03, 0,1, 0,3, 1 és 3 μmol pro-uPA 5 μl -es mennyiségeit PVDC-filmen szétadagoltuk (Dowbrands L.P., Indianapolis, IN) és 2 órán keresztül szobahőmérsékleten szárítottuk.

Az uPAR-nak Pro-uPA-val és β -uPA-val történő inkubációja

A mintamátrixot a β -uPA-gél egyik oldalára helyeztük úgy, hogy a száraz pro-uPA foltok kapcsolatba kerüljenek a β -uPA-gél felszínével. A pro-uPA-t 10 percen keresztül szobahőmérsékleten hagytuk a gélbe diffundálni. Ezt követően a β -uPA-gél másik oldalát helyeztük a műanyag lemezbe, hogy a β -uPA (mint ligand) és a pro-uPA (mint kompetitív inhibitor) kölcsönhatásba lépjen a műanyag lemez felületén lévő uPAR-ral. A

kötési/kompetíciós reakciót 20 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubáció után a műanyag lemezt elválasztottuk a géltől és négyszer gyorsan mostuk 20 ml mosó pufferrel. Avidin-tornaperoxidáz (avidin-HRP) oldatot készítettünk az avidin-HRP (Sigma, St. Louis, MO) 1:25000 arányú hígításával szűrővizsgálati pufferben és 15 ml-t adtunk a műanyag lemezhez. A reakciót 10 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd az avidin-HRP oldatot leöntöttük és a műanyag lemezt a fentiek szerint mostuk. A műanyag lemezt 20 percen keresztül száradni hagytuk.

Az avidin-HRP-ben lévő avidin specifikusan kötődik a biotinhoz, így a mátrixnak csak azok a területei mutatnak adott esetben szinkifejlődést, amelyekben "ligand/receptor" kötést történt. A mátrixnak azon területei, ahol a "ligand/receptor" kötést a pro-uPA kompetitíven gátolja nem mutatnak színt.

Szinkifejlődés

A kolorimetriás HRP-szubsztrátot tartalmazó szinkifejlesztő gélt (OPD-gél) 2 darab o-feniléndiamin-hidroklorid (OPD) tablettának 7 ml hígítószerben (mindkettő Abbott reagenskészlet, rendelési szám: 6172-30, Abbott Labs, Abbott Park, IL.) történő feloldásával és ennek az oldatnak egy agaróz oldattal — amelyet 0,1 g agaróznak 3 ml vízben történő olvasztásával készítettünk — történő egyesítésével készítettünk el. A 10 ml végtérfogatú keveréket 8 x 7 x 0,075 cm II-típusú minifehérje gélkészítőbe öntöttük és 4°C-on 15 percen keresztül szilárdulni hagytuk. A gélt a gélkészítő üveglemezéről áthelyeztük akár PVDC-re, akár egy rugalmas műanyag lapra és levegőn 10 percen keresztül szobahőmérsékleten száradni hagytuk. A gélt ezután egy másik PVDC vagy műanyag lapra helyeztük át, hogy a másik oldala is száradjon 10 percen keresztül. Ezután az OPD-gélt a műanyag lemezbe helyeztük, hogy elkezdődjön a szín kifejlődése. Az OPD inkubáció alatt különböző időpontokban a műanyag lemezt egy 440 nm-en sáváteresztő filterre (Omega Optical, Inc., Brattleboro, VT) helyeztük, amely viszont egy *Fiber-Lite* fényforrással megvilágított száloptikás diffúziós lemez tetején volt (mindkettő Dolan-Jenner Industries, Inc., Lawrence, MA). A képződő képet CCD-kamerával rögzítettük (*Eagle Eye* rendszer, Stratagene, La Jolla, CA).

Kontrollkísérlet

A 8. ábra szemlélteti a 3. példa egy kontrollkísérletét. A 8A ábránál agaróz négyzeteket (1 cm²) áztatunk különböző koncentrációjú β -uPA oldatokba, mint ez a négyzetek alatt fel van tüntetve (kivéve az 50 nmol oldatot, amelyet az agaróz négyzet bal oldalán jelöltünk). Az agaróz négyzeteket egy uPAR immobilizált műanyag lemezen történő inkubálás után eltávolítottuk. A műanyag lemezt ezután mostuk és a fentiek szerint láthatóvá tettük a mátrix azon területeit, ahol β -uPA/uPAR kötés előfordult. A 8B ábra az átlagos pixel értékek (a háttér levonásával) grafikonját mutatja minden négyzetre (ahogy a CCD-kamerából származó digitális képet a *NIH Image Analysis* szoftverrel elemeztük) az agaróz négyzetekben lévő β -uPA koncentrációval szemben az OPD színfejlődés alatt különböző időpontokban. Az agaróz gélből származó β -uPA jellemző receptor-ligand kötési görbét mutatott, a maximális kötés félértéke (K_d) körülbelül 3-5 nmol, amely megegyezik az erre a reakcióra közölt értékkel a hagyományos ELISA és más szűrővizsgálati eljárásokban, amelyek ezt a paramétert mérik. A 8. ábra bizonyítja, hogy a gELISA-val előállított indirekt kolorimetriás szignál kvantitatív módon függ a ligand-receptor kölcsönhatástól.

A Pro-uPA/ β -uPA kompetíció eredményei

A 9. ábra szemlélteti a β -uPA/uPAR-kötés gátlását Pro-uPA-val. A pontok a 9A ábrán azokat a helyeket jelölik, ahol a β -uPA/uPAR kötés gátlódott. Az avidin-HRP tehát nem kötődött ezekben a területekben. Követ-

kezőképpen a HRP nem reagált a szubsztrátjával az OPD-gélben, hogy kifejlődjön a szín. A 9B ábra egy más módot mutat be ugyanezen CCD képi adatoknak a megjelenítésére, amely növeli az emberi szemnek azt a képességét, hogy a kvantitatív titrálást megfigyelje.

4. példa

Fehérje-fehérje kölcsönhatások inhibitorainak direkt radiometriás kimutatása

A T-sejt aktiváció a szervezet immunválaszának egy alkotóeleme. Ahhoz, hogy a T-sejt aktiváció során az egymást követő események bekövetkezzenek, a p56lck-nak (LCK egy fehérje) kölcsönhatásba kell lépnie a T-sejt antigén receptor citoplazmás doménjének ITAM-szakaszával ("immunoglobulin related tyrosine based activation motif", immunoglobulinnal kapcsolatos tirozin alapú aktivációs minta). Az olyan vegyületek, amelyek ezt a fehérje-fehérje kölcsönhatást gátolják feltehetőleg immunszuppresszánsok. A CF-HTS-t alkalmazzuk ennek a fehérje-fehérje kölcsönhatásnak a szűrővizsgálatára is, ahol az LCK egy membránon van immobilizálva.

LCK-mátrix

Egy biotint rögzítő membránon (SAM-membrán) (Promega Corp., Madison, WI) immobilizáljuk a biotinilált LCK-t egy 11 cm x 2 cm csíknak 5 ml, 5 mmol DTT-t (ditiotritolt) és 3 µmol LCK tartalmazó PBS-be történő áztatásával 10 percen keresztül szobahőmérsékleten, ami után a puffert eltávolítjuk. Ezt úgy időzítjük, hogy a SAM-membrán közvetlenül ezután (percekben belül) az alább leírt szűrővizsgálati eljárásban alkalmazható legyen.

ITAM^{*}-mátrix

Radioaktívan jelölt ITAM-peptidet (ITAM^{*}) tartalmazó agaróz gél készítettünk 0,1 g agaróznak 10 ml pufferrel történő keverésével, olvadásig történő melegítésével, majd 8 x 7 x 0,075 cm gélkészítőbe történő öntésével. Az ITAM^{*}-ot közvetlenül a gélkészítőbe öntés előtt adjuk hozzá, vagy egy más módon a gél megszilárdulása után áztatással juttatjuk be a gélbe 10 nmol végkoncentrációban.

Mintamátrix

A vizsgálandó mintákat egy műanyag felületre vagy PVDC-re adagoljuk szét és szárítjuk, ezzel készítjük el a mintamátrixot.

Az ITAM^{*}, az LCK és a vizsgálati minták inkubációja és a láthatóvá tétel

A mintamátrixot kapcsolatba hozzuk az ITAM^{*}-gél egyik oldalával oly módon, hogy a vizsgálati minták az ITAM^{*}-gélbe diffundáljanak. Ezt követően az ITAM^{*}-gél másik oldalát hozzuk kapcsolatba a SAM-membránnal, amelyen az LCK van immobilizálva. Tizenöt-negyvenöt perces inkubálás után a SAM-membránt eltávolítjuk, mossuk, és foszforos képleolvasóval vagy filmmel képet készítünk. Az ITAM-LCK kölcsönhatás inhibitorait alacsonyabb radioaktivitási zónák jelzik, amelyek a képen alacsonyabb szignálintenzitásnak felelnek meg.

Az ITAM^{*}/LCK-kötés kontrollkísérlete

Agaróz gél készítettünk 0,1 g agaróznak 10 ml pufferrel történő elkeverésével, olvadásig történő melegítésével, majd 8 x 7 x 0,075 cm gélkészítőbe történő öntésével. Megszilárdulás után 1 cm átmérőjű köröket vágunk ki a gélből és 400 µl, pufferben lévő 0,1, 0,3, 1, 3, 10 és 20 nmol ¹²⁵I-dal jelölt ITAM-ba (Amersham, Arlington Heights, IL) áztattuk egy éjszakán keresztül 4°C-on. A gélköröket az oldatból kivettük és 20 percen keresztül szobahőmérsékleten száradni hagytuk. Ezek után a géldarabokat az immobilizált LCK-t tartalmazó SAM-membránra helyeztük és szobahőmérsékleten 45 percen keresztül inkubáltuk. A géleket eltávolítottuk és

a membránokat pufferrel négyszer mostuk. Száradás után a SAM-membránokról foszforos képleolvasóval képet alkottunk.

A 10. ábra dózisfüggő kötődést mutat a ^{125}I -ITAM és a SAM-membránon lévő immobilizált LCK között.

A 11. ábra az átlagos pixel értékek (a háttérrel levonva) grafikonját mutatja minden ^{125}I -ITAM-gélre (a foszforos képleolvasóból származó digitalizált képnek Molecular Dynamics *ImageQuant* szoftverével történő kiértékeléséből) a gélekörökben lévő ^{125}I -ITAM koncentrációval szemben. Az immobilizált LCK-hoz kötődött, gélből származó ^{125}I -ITAM egy jellemző receptor-ligand kötődési görbét mutat.

5. példa

Teljes sejt riportergeren szűrővizsgálati eljárás gél/filter forma kombinációjának alkalmazásával

HEK-sejteknek nevezett vesesejteket luciferázgénhez (luciferáz riportergeren a Promegától) fuzionált ciklikus AMP válaszelem promótert (CREB, "Cyclic-AMP Response element") tartalmazó plazmáddal transzfektálunk. Ha a transzfektált sejteket forskolinnal kezeljük luciferáz génexpresszió indukálódik. Azaz, ha a luciferáz szubsztlátot (éjbogár luciferin a Promegától) és megfelelő kofaktorokat (20 mmol tricin pH 7,8, 0,1 mmol EDTA, 33 mmol DTT, 0,3 mmol Koenzim A, 0,5 mmol adenosin-trifoszfát és 1 mmol magnézium-klorid) adunk a HEK-sejtekhez foton kibocsátás lép fel, amely a hagyományos eszközökkel kimutatható. A CF-HTS-t erre a szűrővizsgálati eljárásra is adaptáltuk.

Sejtmátrix

Tenyészetben lévő sejteket tripszinnel kezelünk, Corning/Costar TRANSWELL™-membránra visszük át (3 μ polikarbonát filter egy műanyag segédgyűrűvel) és egy éjszakán keresztül 37°C-on, 5% CO₂-ben és szövettenyésztő tápközegben inkubáljuk. Ezt a tápközeget azután eltávolítjuk a membránról és a filtert, amelyhez a sejtek kötődnek, levegőn 15 percen keresztül szárítjuk, majd közvetlenül ezután felhasználjuk az alábbi lépésekben.

Indukáló mátrix

Egy, a luciferáz expresszió indukálószerét tartalmazó gélt készítünk 10 mmol forskolin törzsoldat (Sigma törzsoldat etanolban) 12 μ l-ének 1%-os alacsony olvadáspontú agaróz gél 6 ml-éhez történő hozzáadásával. A 20 μ mol forskolin végkoncentrációjú gél szobahőmérsékleten megszilárdul.

Minimálmátrix

A forskolin indukciót feltehetőleg gátló mintákat szétadagoljuk és különálló elhelyezkedésben, nagy sűrűséggel PVDC-n szárítjuk.

A reagens inkubálása és a gátlás kimutatása

A PVDC inhibitoros oldalát inkubáljuk az indukáló géllal. Majd a forskolin indukálószeret tartalmazó gélt helyezzük a fentiek szerint elkészített sejtmátrixnak nem a sejteket tartalmazó oldalára. Együtt inkubáljuk őket 37°C-on 5% CO₂-ben 20 percen keresztül. Ezt követően a forskolin gélt eltávolítjuk és a sejtmátrixot 37°C-on 5% CO₂-ben további 4 órán keresztül inkubáljuk a luciferáz konstrukció maximális expressziója érdekében. A luciferáz enzimaktivitásának (vagy ennek gátlásának) kimutatása érdekében a sejtmátrix-filtert fizikailag eltávolítjuk a műanyag segédgyűrűjéről és Petri-csészébe helyezzük. A Petri-csészébe töltjük a luciferáz szubsztlátot (éjbogár luciferin a Promegától) a megfelelő kofaktorokkal kiegészített biológiai pufferben, hogy szignálként fény indukálódjon. Mivel a szignál a luciferázt expresszáló, immobilizált sejteken belül helyezke-

dik el, a kezdeti indukciós lépés inhibitorai alacsonyabb foton kibocsátási zónákat eredményeznek.

6. példa

Gél/filter CF-HTS ligand-sejt kölcsönhatások inhibitorainak közvetlen kimutatására

A sejtfelületen a ligand/receptor kötődés kezdeményezi a szignál útvonalak elindulását a sejtekben, amely végül funkcionális válaszokhoz vezet (pl., sejtosztódás vagy biológiailag aktív anyagok szekréciója). Betegség állapotában a sejtek biológiai válaszána szabályozása érdekében gyakran a sejtfelülethez történő ligandkötődés gátlását keresik. A ligand/sejtes receptor kötődése inhibitorainak kiértékelésére szolgáló általános eljárások során az inhibitornak azt a képességét értékelik, hogy csökkenti a radioaktívan jelölt, természetes ligand és a sejtek közötti kötődést. Ez a sejteknek a radioaktívan jelölt liganddal és az inhibitorral történő inkubációját vonja maga után, amelyet a nem kötött és nem specifikusan kötött radioaktív ligand mosás útján történő eltávolítása követ, majd a kötött radioaktivitás mennyiségének a mérése.

Az interleukin-8 (IL-8) egy kemotaktikus kemokin, amely gyulladásban vesz részt különböző sejtípusokon lévő receptorokhoz történő kötődéssel. A CF-HTS szűrővizsgálati eljárást kifejlesztettük ligand-receptor sejtes szűrővizsgálati eljárásra is ezeknek a kölcsönhatásoknak a kiértékelésére.

Sejtmátrix

Az IL-8a receptort expresszáló HEK-sejteket (ATCC, Bethesda, MD) 75 mm átmérőjű transwell membránfilterre (Corning Costar Corp, Cambridge, MA) terítettük lemezenként körülbelül 20 millió sejt sűrűséggel. A sejteket egy éjszakán keresztül hagytuk a membránfilterhez kötődni (RPMI, Life Technologies-től, Grand Island, NY) 10 mmol HEPES-t (Sigma, St. Louis, MO) tartalmazó pH 7,2 pufferben 37°C-on. A sejteknek a filterhez történő kötődése után a tápközeget eltávolítottuk, és a sejteket friss pufferrel mostuk a meg nem kötődött sejtek eltávolítása érdekében. A filtereket a sejtes oldalukkal lefelé fordítottuk és ferdén helyeztük el, hogy a felesleges tápközeg leszivároгjon, és 20 percen keresztül szárítottuk. Ezt úgy időzítettük, hogy a sejtmátrixot rögtön alkalmazni tudjuk az alábbiakban ismertetett szűrővizsgálati eljárásban.

Ligandmátrix

A ligandmátrixot ^{125}I -dal jelölt IL-8-nak (Amersham, Inc., Arlington Heights, IL) agaróz géllel történő áztatásával készítettük, az agaróz gél pedig 0,1 g agaróznak 10 ml pufferrel történő elkeverésével, olvadásig történő melegítésével, majd $8 \times 7 \times 0,075$ cm gélkészítőbe történő öntésével készítettük. A gél egy éjszakán keresztül áztatjuk szobahőmérsékleten lassú keverés közben rázóasztalon (New Brunswick Scientific Co., Inc, Edison, NJ). Áztatás után a gél 20 percen keresztül szobahőmérsékleten szárítjuk közvetlenül felhasználás előtt. Ezt úgy időzítjük, hogy a gél azonnal alkalmazható legyen a szűrővizsgálati eljárásban.

Mintamátrix

Az IL-8/sejtes receptor kötődés ismert inhibitorának hiányában radioaktívan nem jelölt IL-8-at (Genzyme Corp., Cambridge, MA) alkalmaztunk a gátlás kontrollmintájaként, hogy a ^{125}I -IL-8-nak HEK-sejtekhez történő kötődésének gátlását megfigyeljük. Az IL-8 0, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 és 100 μmol koncentrációinak 1 μl -es mennyiségeit egy műanyag lapon, például PVDC-n szétadagoltuk, és 1 órán keresztül szobahőmérsékleten vákuum alatt szárítottuk.

Inkubáció

A mintamátrixot a ligandmátrix egyik oldalára helyeztük oly módon, hogy a szárított IL-8 foltok kerüljenek kapcsolatba a gél felszínével. A gél megfordítottuk és a másik oldalát is száradni hagytuk 10 percen ke-

resztül szobahőmérsékleten, és az "inhibítort" hagytuk a gélbe diffundálni. Ezt követően a gél a sejtmátrixnak nem a sejteket tartalmazó oldalára helyeztük. A kötési reakció érdekében 45 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáljuk. A gélit ezek után eltávolítottuk, és a membránnak nem a sejteket tartalmazó oldalát négyszer mosuk pufferrel. A membránokat hagytuk teljesen megszáradni, mielőtt eltávolítottuk volna a műanyag segédgyűrűből. A membránokról ezután képet készítettünk röntgenfilm vagy foszforos képleolvasó (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) segítségével.

A 12. ábra mutatja a ^{125}I -IL-8 dózishatását az agaróz gélben egy sejtmátrixon keresztüldiffundálva, hogy az IL-8a receptort expresszáló HEK-sejtekhez kötődjön. Több 1 cm^2 agaróznégyszetet áztattunk a feltüntetett, különböző ^{125}I -IL-8 koncentrációjú oldatokba. Ezt követően a liganddal átjárt négyszeteket kapcsolatba hoztuk a sejtmátrixszal a fentiekben leírtak szerint. Az inkubáció után a négyszeteket eltávolítottuk a sejtmátrixból, és a membránnak nem a sejteket tartalmazó oldalát pufferrel mosuk. Foszforos képleolvasói alkalmaztunk a sejthez kötött ^{125}I -IL-8 helyének meghatározására. Az adatok azt mutatják, hogy a direkt radiometriás leolvasás ebben a gélalapú sejtes szűrővizsgálati eljárásban kvantitatívan függ a ligand-receptor kölcsönhatás mértékétől. A 12. ábra azt is mutatja, hogy a kötési területek alakjukban elkülönültek, és ez bizonyítja, hogy a szignál oldalirányú diffúziója nem okoz problémát ebben a szűrővizsgálati eljárásban.

A 13. ábra mutatja a kompetitív inhibíciós kísérlet eredményeit. A ^{125}I -IL-8 és a HEK-sejtek közötti kötődés gátlását a világos foltok jelzik. Az is nyilvánvaló, hogy a nem jelölt IL-8-cal történő gátlás kvantitatívan dózisfüggő. Ezek az adatok azt is jelzik, hogy az inhibitorok, ebben az esetben a nem jelölt IL-8 szolgált példánál, keresztül tudnak haladni a sejtmátrixon, hogy csökkentsék a ^{125}I -IL-8 és a sejtek közötti kötődést.

7. példa

Filter alapú, gél nélküli, funkcionális sejtes szűrővizsgálati eljárás

A sejtes működésekben történt változások gyakran mérhetők a vizsgálati vegyületeknek vagy mintáknak biotechnológiai úton a sejtekbe juttatott riporter rendszerekre kifejtett hatásának megfigyelésével. Ilyen például a fluoreszcens intracelluláris fehérjék, például a zöld fluoreszcens fehérje (GFP, "green fluorescent protein"), az extracelluláris fehérjék, például receptor vagy adhéziós molekula, vagy specifikus enzimek, például luciferáz, kloramfenikol-acetiltranszferáz vagy β -galaktozidáz (Promega) szintézisére kifejtett hatások megfigyelése. Először is a vizsgálati vegyületeket a sejtekkel inkubáljuk. Ezt követően megfelelő ideig hagyjuk a sejteket a riporterfehérjét expresszálni (lehetnek percek, órák vagy napok). A riporterfehérje szintjét direkt eljárásokkal (pl., GFP) vagy indirekt eljárásokkal (pl., ELISA-technológia membránhoz kötött fehérjékkel) mérjük. Enzimek esetében a sejtek feltárhatóak, hogy a riporterfehérjét kivonjuk és az enzimaktivitást mérjük. Egy másik funkcionális szűrővizsgálati eljárás specifikus molekulák, például festékek vagy radioaktívan jelölt anyagcseretermékek viselkedését vagy elhelyezkedését méri egy receptor stimulálására vagy a sejt fiziológiájában történt változás, például membránpotenciál-változás hatására.

A vegyületeknek az intercelluláris adhéziós molekula-1 (ICAM-1) expressziójára való hatását mérő ELISA szűrővizsgálati eljárást alakítottunk CF-HTS-re a következők szerint. Az ICAM-1-et expresszáló endoteliális sejteket egy polikarbonát kemotaxis membránra (Neuro Probe) terítjük körülbelül 5000 sejt/mm^2 sűrűséggel. A sejteket egy éjszaka keresztül inkubáljuk 37°C -on tápközegben. A tápközeget eltávolítjuk és a membránokat részlegesen száradni hagyjuk 10 percen keresztül szobahőmérsékleten. Az ICAM-1 indukciójára vizsgálandó mintákat vagy vegyületeket műanyag lapokra szárítjuk és kapcsolatba hozzuk a nedves membrán-

nak nem a sejteket tartalmazó oldalával. A vegyületeket 1 órán keresztül hagyjuk kapcsolatba lépni a sejtekkel 37°C-on, nedveskamrában, és ezután a sejteket tápközegbe áztatjuk és 5 órán keresztül 37°C-on inkubáljuk.

Miután elegendő időt hagyunk a sejteknek, hogy az indukált fehérjét szintetizálják, a tápközeget eltávolítjuk a membránról és a sejteket ICAM-1 ellen termelt ellenanyagot (Genzyme, R&D rendszerek) tartalmazó pufferben inkubáljuk, akár nem konjugált formában, akár fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) vagy biotinnal konjugálva. Harminc perces szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a puffert eltávolítjuk és a sejteket többször mossuk a nem kötött ICAM-1 ellenanyag eltávolítása céljából. FITC-cel konjugált ellenanyag esetében a membránról CCD-kamera (Stratagene, Imaging Research) alkalmazásával készítünk képet 485 nm gerjesztéssel és 520 nm kibocsátással. Az ICAM-1 expresszióját stimuláló vegyületek fokozott fluoreszcenciát mutató területekként jelennek meg a FITC-ICAM-1-ellenanyag kötődésének köszönhetően. A biotinnal konjugált ellenanyag esetében a sejteket avidin-HRP-t tartalmazó pufferben inkubáljuk 10 percen keresztül szobahőmérsékleten. A puffert eltávolítjuk és a nem kötött avidin-HRP-t kimoszuk. A membránokat ezután egy precipitáló HRP szubsztátot, például diaminobenzidín-tetrakloridot (Pierce) tartalmazó pufferbe áztatjuk és megfigyeljük a szín kifejlődését azokon a területeken, ahol az alatta lévő sejtekben indukálódott az ICAM-1 expressziója. A nem konjugált ICAM-1 ellenanyag esetében egy konjugált, második, ICAM-1-ellenanyag ellen termelt ellenanyagot reagáltatunk a sejtekkel, amelyet a szignál kifejlesztése követ a konjugátum megfelelő szubsztátjával. A képet CCD-kamerával készítjük. Mindezek a változatok (FITC, avidin-HRP és anti-ICAM-1 ellenanyag) alternatív módszerek, amelyek ugyanazokat a kvalitatív eredményeket adják, nevezetesen azok a minták, amelyek hatnak az ICAM-1 expressziójára kapcsolatba hozhatók a megnövelt vagy csökkent szignállal.

Megjegyezzük, hogy a folyamatos formájú mátrix ebben az esetben egy membrán és egy műanyag lap. Gél nem szükséges a CF-HTS-hez.

8. példa

Különálló vegyületek neuraminidáz gátlásának CF-HTS szűrővizsgálati eljárása

Mintamátrix

Ötszázhuszonnyolc különálló, szerkezetileg rokon vegyület könyvtárát vizsgáljuk CF-HTS-sel. Packard MultiProbe MP204 DT-t alkalmaztuk a vegyületeknek a csövekből a 96-lyukú lemezekre történő hígítására és a vegyületeknek műanyag lapokra történő hígításához és átviteléhez. A vegyületeket először a csövekben lévő 40 mmol koncentrációról (DMSO-ban) 4 mmolra hígítottuk a 96-lyukú lemezekben. Majd DMSO-ban lévő 4 mmolról 200 µmolra hígítottuk 50% etanol/víz keverékében a 96-lyukú lemezekben. Ezeket a mintákat vittük át két 1 µl-es adagban 8 cm x 8 cm műanyag lapokra, a minták között átlagosan 5 mm távolsággal (Bio-Rad, katalógus szám: 165-2956), laponként összesen 192 mintával. Mindegyik 1 µl-es folt tehát körülbelül 200 pmol-t tartalmazott a könyvtár egy bizonyos vegyületéből. Kontrollként egy ismert neuraminidáz inhibitor, a 2,3-dehidro-2-deoxi-N-acetil-neuraminsav (DANA) (Boehringer Mannheim, katalógus szám: 528544) hígítási sorozatát kézzel vittük a vegyületek mellé minden lapra. A lapokat vákuumszáritóban szárítottuk oly módon, hogy minden vegyület a maga elhelyezkedésében száradjon a műanyag lapra.

Enzimnátrix

A szűrővizsgálat előtt influenza neuraminidáz enzimet hígítottunk 1500-szorosára 25%-os glicerin, foszfáttal pufferelt sóoldatból az 1% agarózt, 50 mmol nátrium-citrátot pH 6,0, 10 mmol kalcium-kloridot tartalmazó folyékony agargélbe 40°C-on. Egy 8 cm x 8 cm x 0,75 mm enzimgélt öntöttünk és 4°C-ra hűtve meg-

szilárdítottuk.

Szubsztrátmátrix

Egy szintetikus influenza neuraminidáz szubsztrátot, a 2'-(4-metilumbeliferil)-alfa-D-N-acetil-neuraminsavat (Sigma, katalógus szám: M-8639) hígítottunk 3 mmol/l DMSO-ban 30 μ mol a folyékony agargélbe és a fentiekben leírtakhoz hasonló módon öntöttük az enzimgél.

Inkubáció és kimutatás

Az enzimmátrixot a mintamátrixnak arra az oldalára helyeztük, ahol az érdeklődés tárgyát képező vegyületek száradtak. Ezután a szubsztrátmátrixot az enzimmátrix tetejére raktuk. A mátrixokat szobahőmérsékleten 30 percen keresztül inkubáltuk. Ez idő alatt a kioltott fluoreszcenciás szubsztrát és az enzim a két gél között együtt diffundál, és a szubsztrátot az enzim elhasítja, így a fluoreszcencia intenzitásában növekedést okoz. Ezt figyeljük meg 340 nm-en történő gerjesztéssel és 450 nm-es kibocsátással. Az enzimaktivitást csökkenteni képes vegyületek minimálisra csökkentik a fluoreszcencia intenzitás növekedését. Mivel a legtöbb helyen növekedett a gél fluoreszcencia intenzitása, a műanyag lapról a gélbe diffundált enziminhibitorokat tartalmazó területek kisebb fluoreszcenciával, sötétebb foltokként voltak láthatók. Ez CCD-kamerával, megfelelő szűrővel könnyen megfigyelhető a kibocsátási és a gerjesztő hullámhosszok szabályozásával. A gátlási zónákat mutató vegyületek azonosítása az inhibitoros mátrixnak megfelelő zóna helyzetével határozható meg. A DANA kontroll fluoreszcenciájának a vizsgált inhibitor ismert mennyiségeivel történő összehasonlítása kvantitatív becslést ad az IC_{50} értékre mindegyik vegyületnél.

A könyvtár mind az 528 vegyületét két párhuzamosban vizsgáltuk. A teljes, felhasznált enzimgél mennyiség 33 ml volt, 31,25 μ l vizsgálatonként. Továbbá az összes vegyületet egyidejűleg vizsgáltuk, és a szűrővizsgálati eljárás körülményei azonosak voltak a hagyományos 96-lyukas szűrővizsgálati eljárással. Mint a 14. ábrán bemutatjuk, a szűrővizsgálati eljárás elég érzékeny akár 100 μ mol koncentrációban lévő inhibitorok kimutatására. Az aktív vegyületekre becsült IC_{50} értékek jól megegyeznek az ugyanazoknál a vegyületeknél, a sokkal költségesebb, vizsgálatonként 200 μ l-t igénylő 96-lyukú szűrővizsgálati eljárással vizsgált értékekkel. Lásd a "Kvantitatív gél szűrővizsgálati eljárás eredményei" című táblázatot. Ezek a példák bizonyítják, hogy a vegyületek nagyobb sűrűségű elrendezésben történő vizsgálata csökkenti a költséget és az időt. Például a távolságnak csak egy kis csökkentése, 5 mm helyett 2,5 mm, térfogati egységenként a vizsgálati vegyületek számának négyszeres növekedését jelenti. Ebben a kísérletben ez a vizsgálati vegyületenkénti térfogatot 10 μ l alá csökkenti. Továbbá, a reagenseket egységes térfogatban kezeljük, amely a miniatürizált szűrővizsgálati eljárásokban a kis mennyiségű folyadékok kezelésére alkalmazott eszközöket feleslegessé teszi.

Kvantitatív gél szűrővizsgálati eljárás eredményei

Minta szám	Körülbelüli max Ki (μ mol) a gélből	Becsült IC_{50} értékek (μ mol) a 96-lyukas szűrővizsgálatból
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

A miniatürizálás előnyeinek bemutatására egy következő lépésként 10080 különálló vegyületet vizsgáltunk CF-HTS-sel 17 ml teljes enzimgél térfogatban (kevesebb, mint 2 μ l vizsgálatonként). Packard Multipipette-t alkalmaztuk a minták 30 μ l-es mennyiségeinek szétmérésére egymástól 1 mm távolságra. A vegyületeket DMSO-ban mértük szét 5 mmol koncentrációban, így mindegyikből körülbelül 150 pmol mennyiséget mérünk a műanyagra. DANA-t alkalmaztuk ismét kontroll inhibitorként. A szokásos, a vegyületek elrendezési során kívüli kontrolltitráláson túl egy kontrolltitrálást az elrendezési sorban is elhelyeztünk, mintegy vak próbaként, amelyben a kontrollmintákat ugyanúgy kezeltük, mint a 10080 ismeretlen, amikor a műanyag lapra vittük fel. Mint korábban, a lapokat szárítottuk és a neuraminidáz szűrővizsgálati eljárásban alkalmaztuk. Mind a 10080 vegyületet egyidejűleg vizsgáltuk kevesebb mint egy óra alatt ezzel az eljárással. Még egyszer megjegyezzük, hogy mikrofolyadék-adagolók és/vagy kis mennyiségek kezelése nem szükséges, kivéve a kiindulási vegyületeknek a lapra történő szétmérésekor. Az ebben a szűrővizsgálati eljárásban alkalmazott rendkívül nagy sűrűség nem akadályozta az inhibitorok kimutatását. Továbbá a nagy sűrűség nem bonyolította az aktív vegyületek azonosítását, még ha fluoreszcens vegyületek (a gélen világos foltokként könnyen megfigyelhetők) voltak az aktív vegyületek legközelebbi szomszédai. Lásd 15. ábra.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás különböző anyagok nagyszámú mintáinak azon képességére történő egyidejű vizsgálatára, hogy egy biológiai folyamatot serkentenek vagy gátolnak, azzal jellemezve, hogy

a) az egyes anyagok több mint 96 mintájának kis térfogatú mennyiségeit adott elrendezésben felvisszük egy sík, porózus mátrixra, amely egy egyenletesen elosztatott szűrővizsgálati reagenst tartalmaz vagy hordoz oly módon, hogy minden egyes anyagot a saját, különálló helyének közepére helyezünk el és biztosítjuk, hogy minden egyes anyag azonosítható legyen elrendezési helye alapján, és a felvitt mintáknak a planáris, porózus mátrixban lassú diffúzióját tesszük lehetővé, miáltal szűrővizsgálatot végezhetünk a minták összefolyása nélkül,

b) megfigyeljük az egyes anyagok és a szűrővizsgálati reagens közötti kölcsönhatást és megfeleltetjük az anyag azon képességének, hogy serkenti vagy gátolja a biológiai folyamatot.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy

az a) lépésben, további intézkedésként

i) az egyes anyagok több mint 96 mintájának kis térfogatú mennyiségeit az adott elrendezésben sík mátrixra visszük fel oly módon, hogy minden egyes anyagot a saját, különálló helyének közepére helyezünk el és biztosítjuk, hogy minden egyes anyag azonosítható legyen elrendezési helye alapján, és

ii) kapcsolatba hozzuk a sík mátrixot a porózus mátrixszal, amely egy egyenletesen elosztatott szűrővizsgálati reagenst tartalmaz vagy hordoz, és az anyagok legalább egy részét hagyjuk a porózus mátrixba diffundálni oly módon, hogy biztosítjuk, hogy mindegyik diffundált anyag térbeli helyzete megfeleltethető legyen a sík mátrixon lévő helyével, ahová az anyagot eredetileg elhelyeztük, és

iii) végrehajtunk a b) lépést.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy

az a) lépésben, további intézkedésként

i) az egyes különálló anyagok több mint 96 mintájának kis térfogatú mennyiségeit adott elrendezésben sík mátrixra visszük fel oly módon, hogy minden egyes anyagot a saját, különálló helyének közepére helyezünk el, és biztosítjuk, hogy minden egyes anyag azonosítható legyen elrendezési helye alapján, és

ii) kapcsolatba hozzuk a sík mátrixot az első porózus mátrixszal amely az egyenletesen elosztatott első szűrővizsgálati reagenst tartalmazza vagy hordozza, és az anyagok legalább egy részét hagyjuk a porózus mátrixba diffundálni oly módon, hogy biztosítjuk hogy mindegyik diffundált anyag térbeli helyzete megfeleltethető legyen a sík mátrixon lévő helyével, ahová az anyagot eredetileg elhelyeztük,

iii) kapcsolatba hozzuk az első porózus mátrixot egy második mátrixszal, amely egy második egyenletesen elosztatott szűrővizsgálati reagenst tartalmaz vagy hordoz, és a második szűrővizsgálati reagenst hagyjuk az első porózus mátrixba diffundálni, vagy az egyes anyagokat és az első reagenst hagyjuk a második mátrixba diffundálni, ez utóbbi esetben biztosítva, hogy a diffúzió során mindegyik anyag második mátrixban lévő helyzete megfeleltethető legyen a sík mátrixon lévő helyével, ahová az anyagot eredetileg elhelyeztük, és

iv) végrehajtunk a b) lépést.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy

az a) lépésben, további intézkedésként

i) az egyes anyagok több mint 96 mintájának a kis térfogatú mennyiségeit az adott elrendezésben egy első, sík, porózus mátrixra visszük fel, amely egy egyformán elosztatott, első szűrővizsgálati reagenst tartalmaz

vagy hordoz oly módon, hogy minden egyes különálló anyagot a saját, különálló helyének közepére helyezzünk el, és biztosítjuk, hogy minden egyes anyag azonosítható legyen elrendezési helye alapján,

b) kapcsolatba hozzuk az első porózus mátrixot egy második, sík mátrixszal, amely egy második, egyenletesen elosztatott szűrővizsgálati reagenst tartalmaz vagy hordoz, és a második szűrővizsgálati reagenst hagyjuk az első porózus mátrixba diffundálni, vagy az egyes anyagokat és az első reagenst hagyjuk a második mátrixba vagy mátrixra diffundálni, ez utóbbi esetben biztosítva, hogy a diffúzió során mindegyik anyag második mátrixban vagy mátrixon lévő helyzete megfeleltethető legyen az első porózus mátrixon lévő helyével, ahová az anyagot eredetileg elhelyeztük, és

iii) végrehajtunk a b) lépést.

5. Az 1. vagy 2. vagy 3. vagy 4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egyenletesen elosztatott szűrővizsgálati reagensek egyike makromolekula.

6. Az 1. vagy 2. vagy 3. vagy 4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egyenletesen elosztatott szűrővizsgálati reagensek egyike enzim.

7. Az 1. vagy 2. vagy 3. vagy 4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egyenletesen elosztatott szűrővizsgálati reagensek egyike nyers biológiai kivonat.

8. Az 1. vagy 2. vagy 3. vagy 4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egyenletesen elosztatott szűrővizsgálati reagensek egyike sejtstruktúrákat tartalmaz.

9. Az 1. vagy 2. vagy 3. vagy 4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az egyenletesen elosztatott szűrővizsgálati reagensek egyike egész sejteket tartalmaz.

10. Az 1. vagy 2. vagy 3. vagy 4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egyformán elosztatott szűrővizsgálati reagenseként egy sík, porózus mátrix egyik felületén lévő egész sejteket alkalmazunk.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a b) lépésben a kölcsönhatást a porózus mátrixnak egy reagens oldatával vagy folyékony szuszpenziójával, vagy egy reagenst tartalmazó porózus mátrixszal történő érintkeztetése során figyeljük meg, amely reagens bármelyik esetben egy fehérje láthatóvá tételét segíti elő, és ahol biológiai folyamatként a fehérjének az egész sejtben történő expresszióját értékeljük ki.

12. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy első szűrővizsgálati reagenseként jelölt ligandot és második szűrővizsgálati reagenseként a ligand egy immobilizált receptorát alkalmazunk.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a második, sík mátrixot mossuk, miáltal eltávolítunk minden jelölt ligandot, amely a második, sík mátrixra vagy mátrixba diffundált, de nem kötődött az immobilizált receptorhoz.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a második, sík mátrixot egy reagens oldatával vagy folyadékszuszpenziójával, vagy egy reagenst tartalmazó porózus mátrixszal érintkeztetjük, amely reagens bármelyik esetben a mosási lépéssel el nem távolított, jelölt ligand láthatóvá tételét segíti elő.

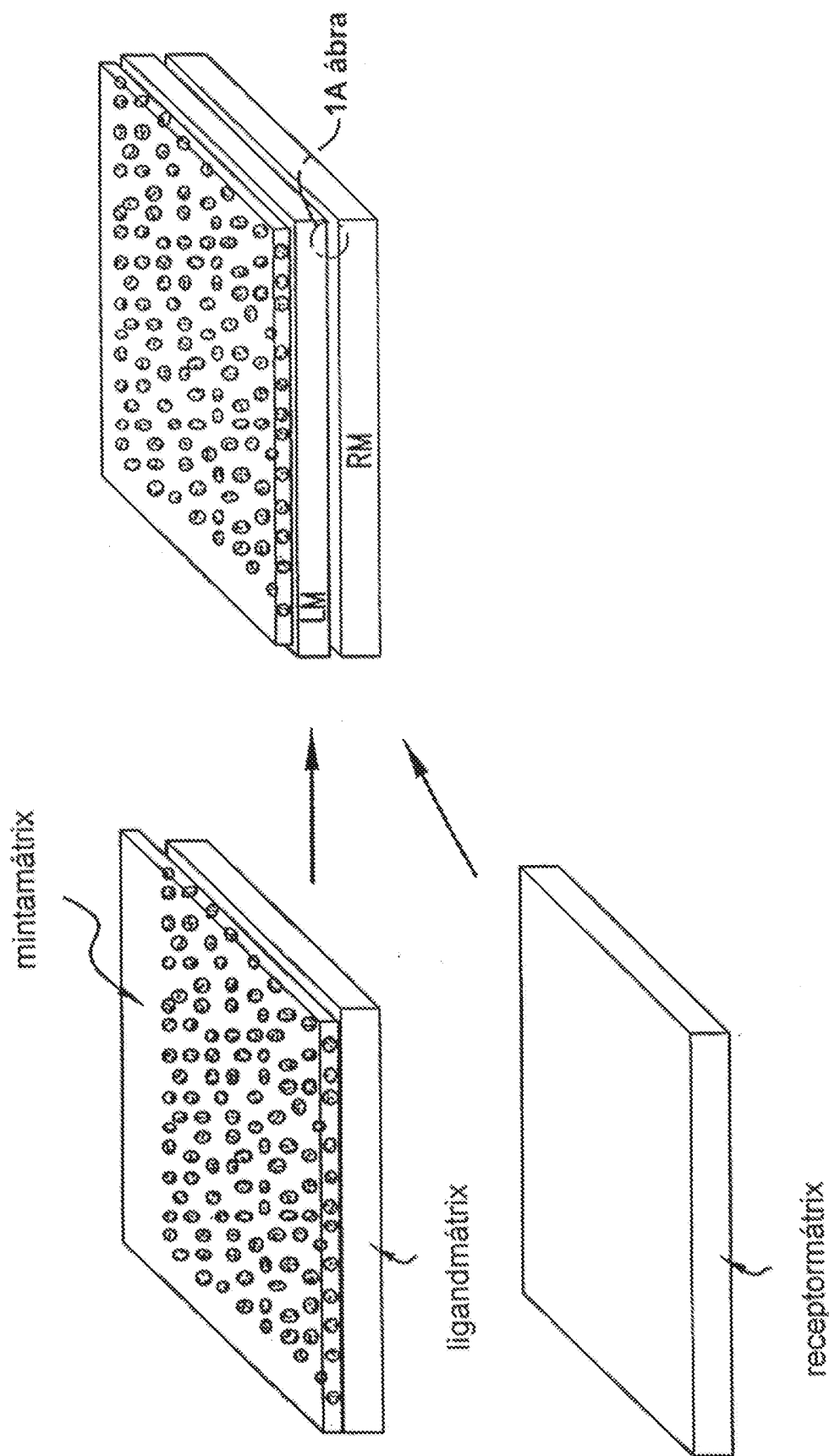
A meghatalmazott:

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

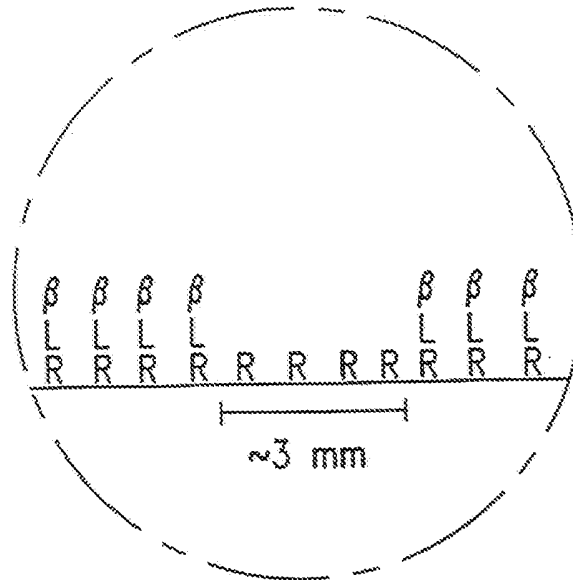
Dr. Svingor Ádám
szabadalmi ügyvivő

PCT/US98/26465

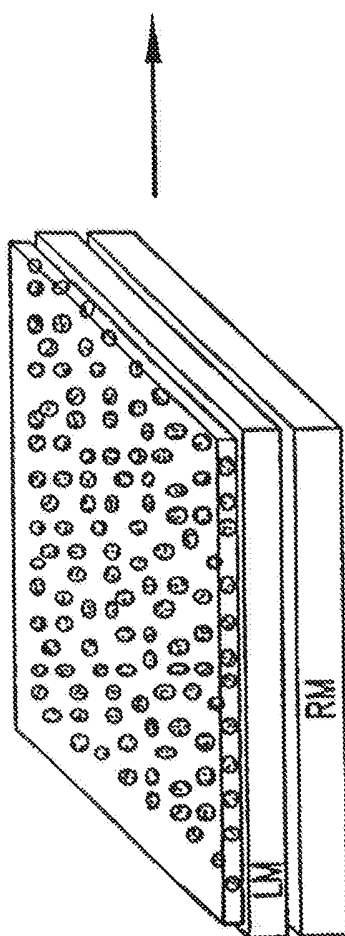
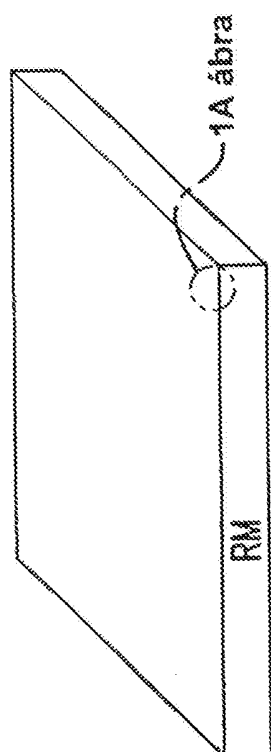
1/19



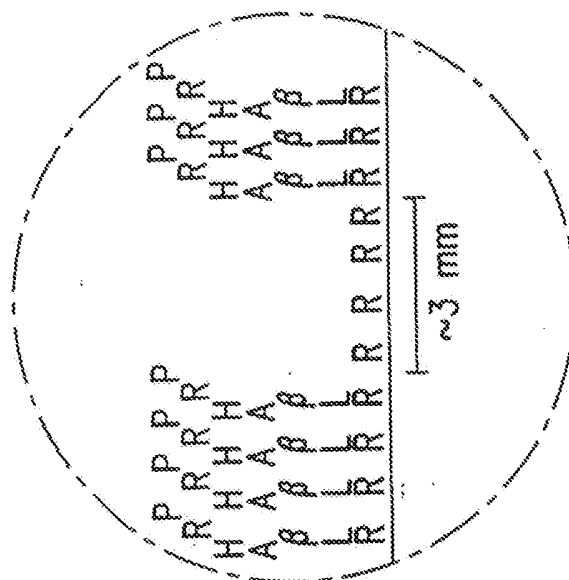
1. ábra



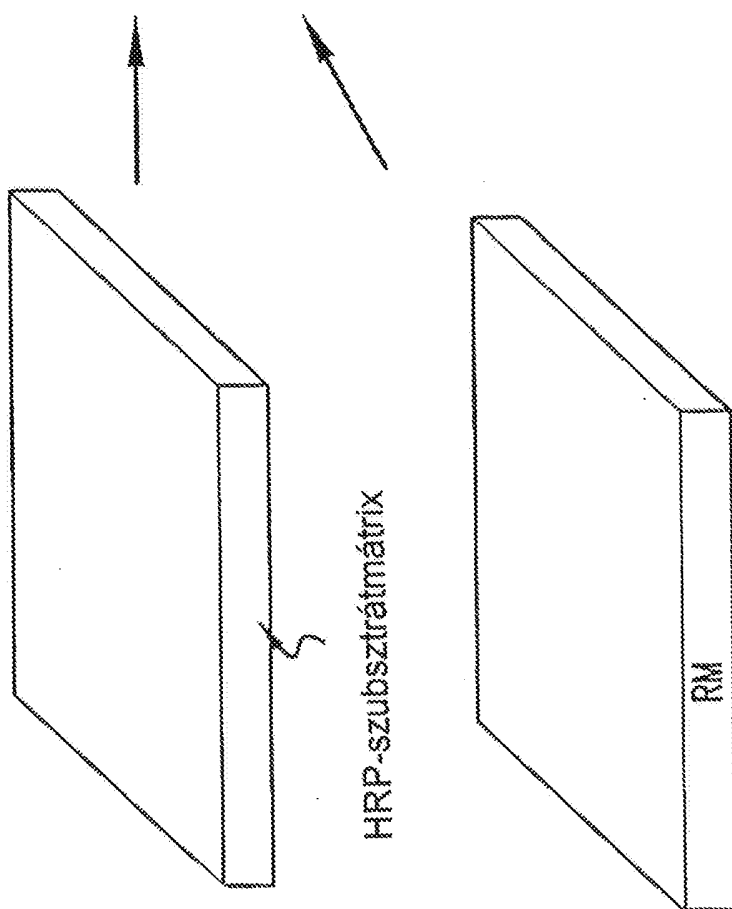
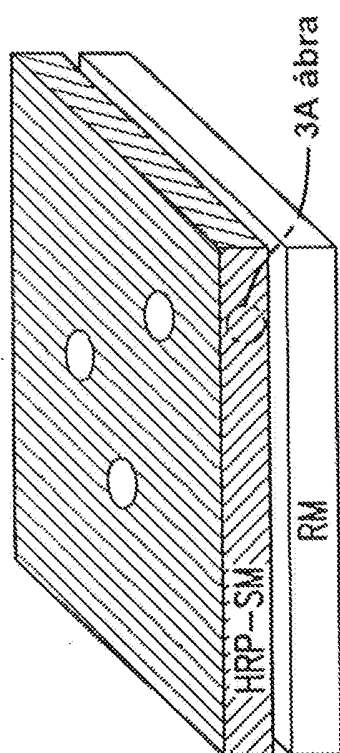
1A ábra



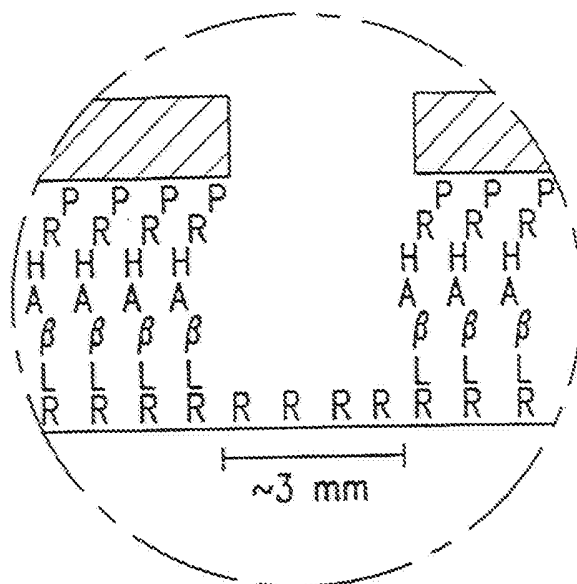
2. ábra



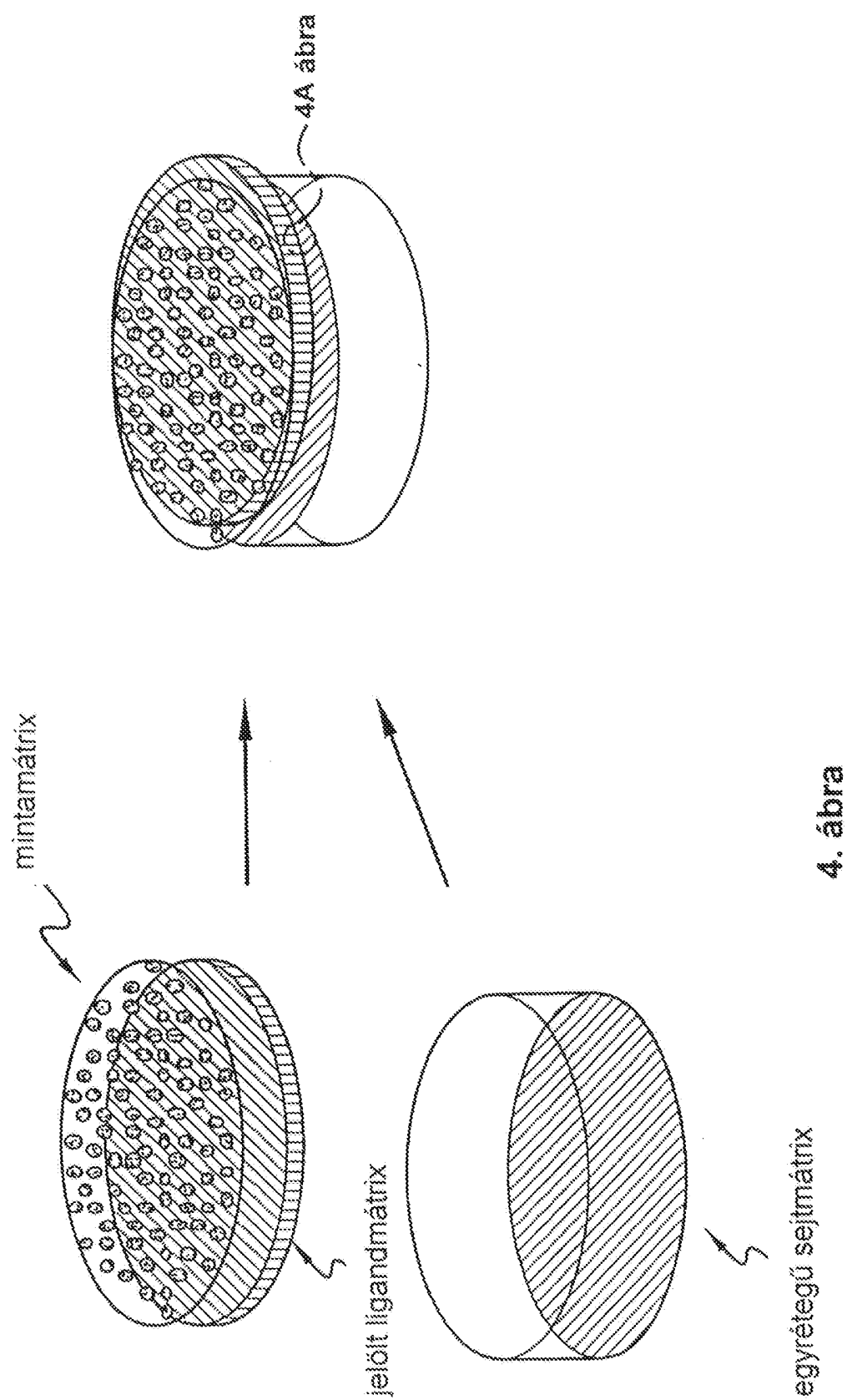
2A ábra

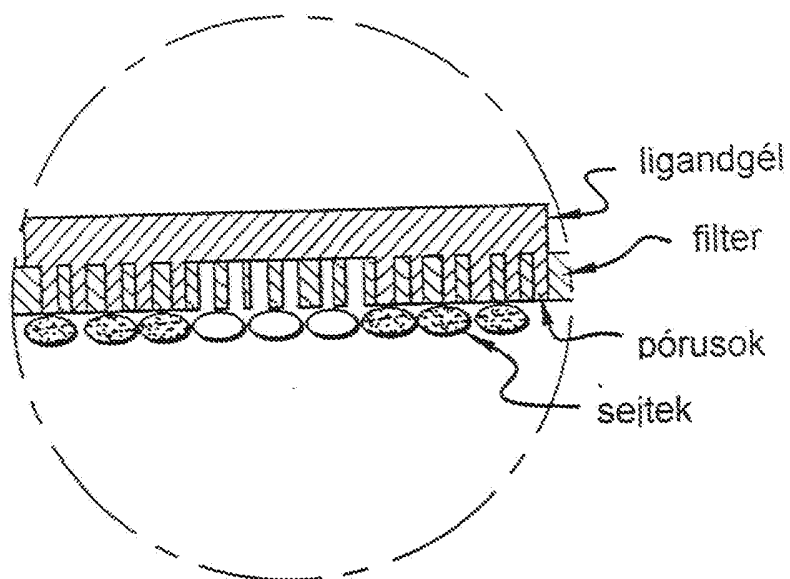


3. ábra

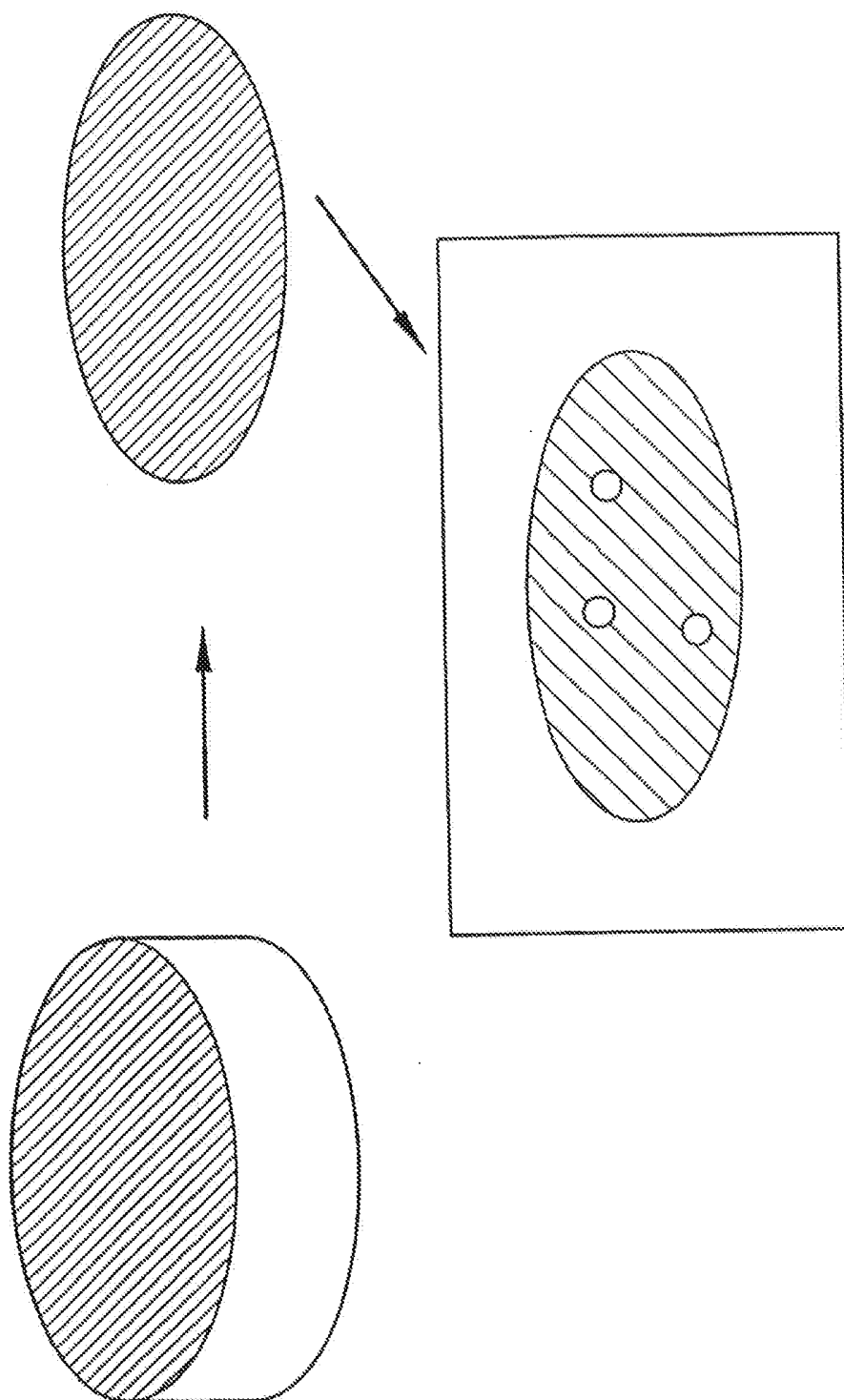


3A ábra

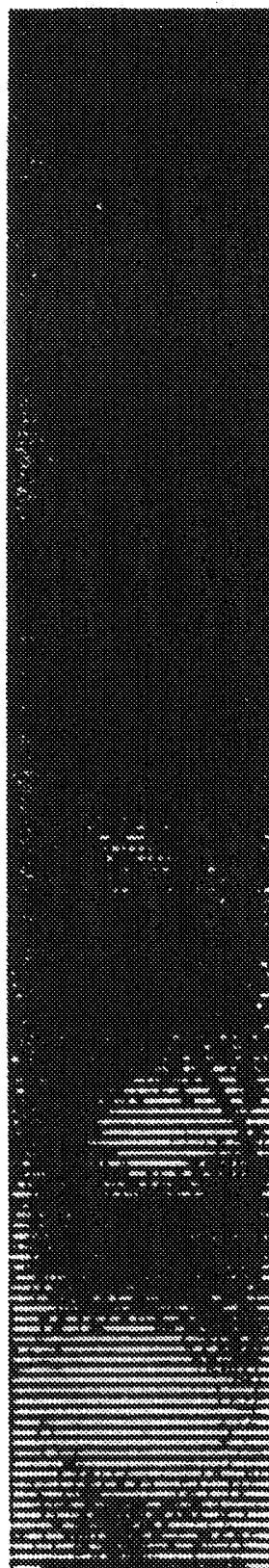




4A ábra



5. ábra



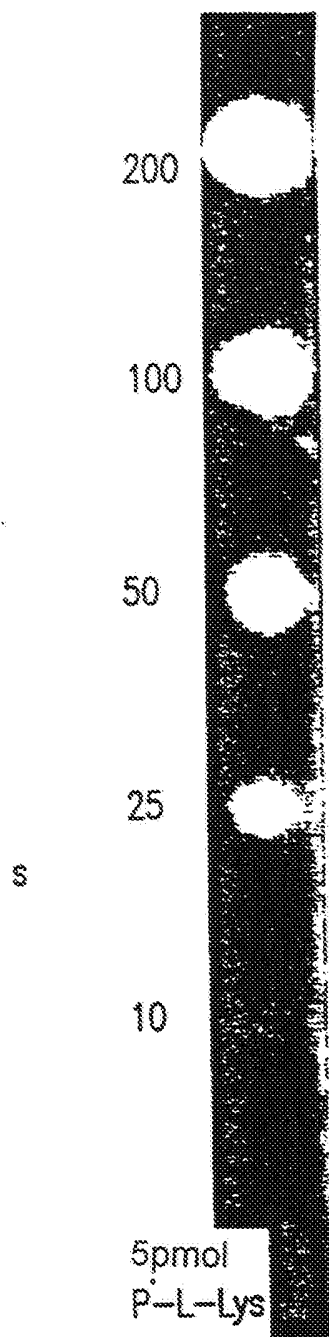
0,5 nmol

1 nmol

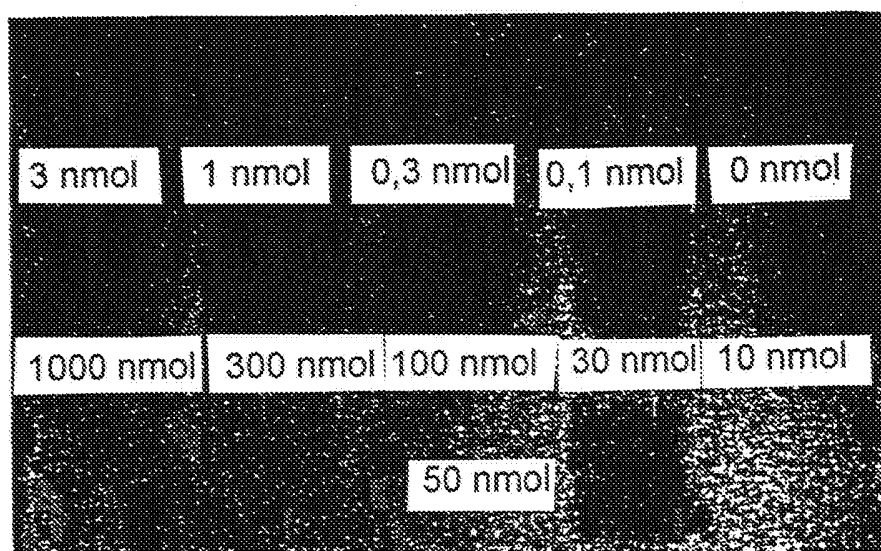
2 nmol

5 nmol

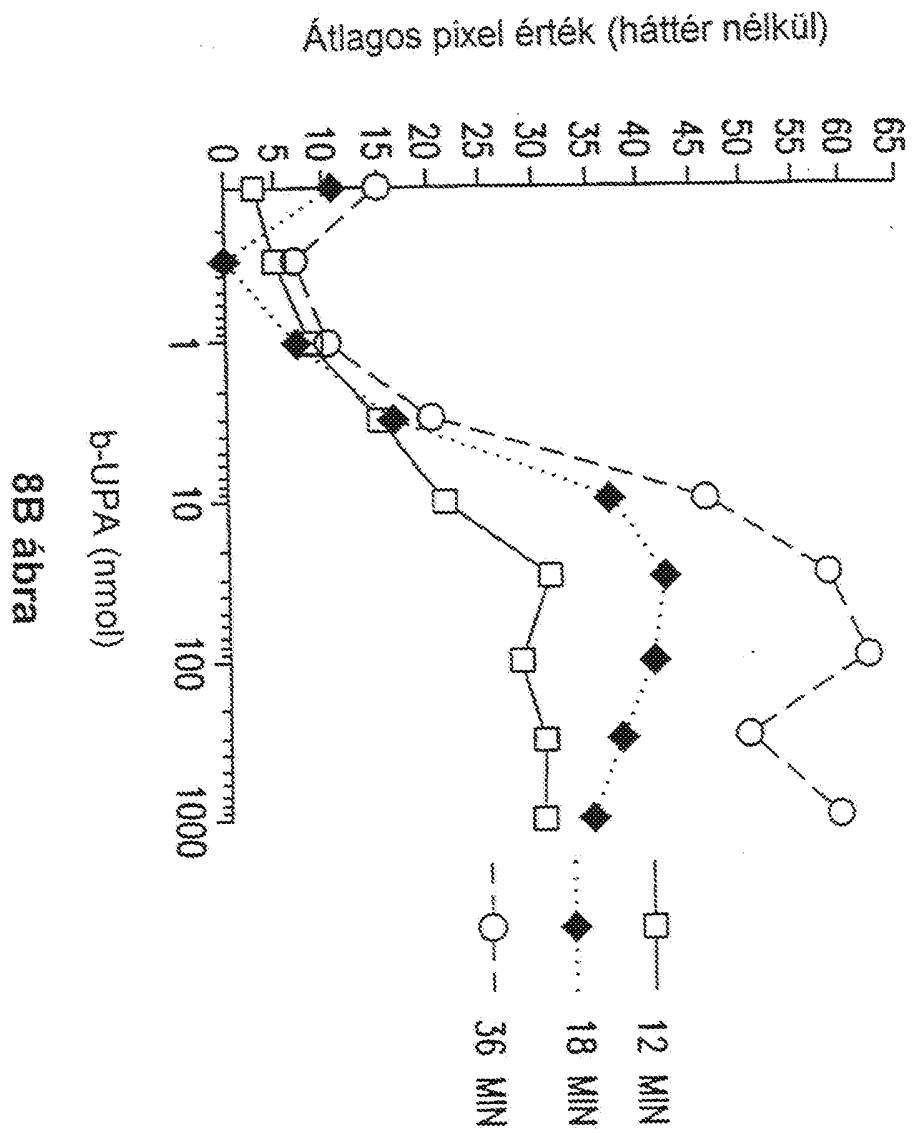
6. ábra

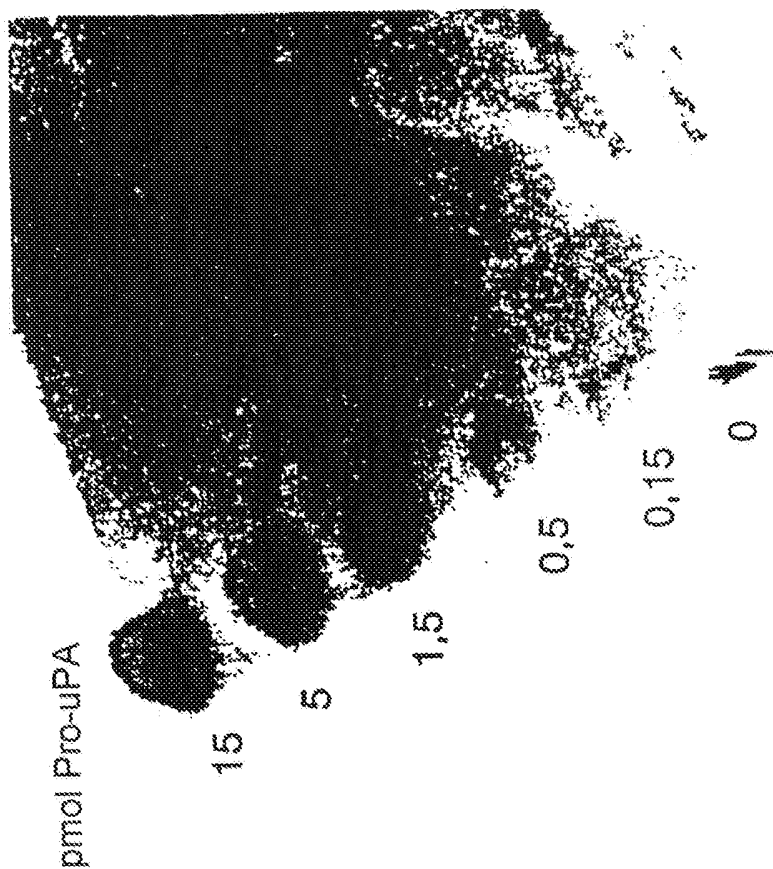


7. ábra

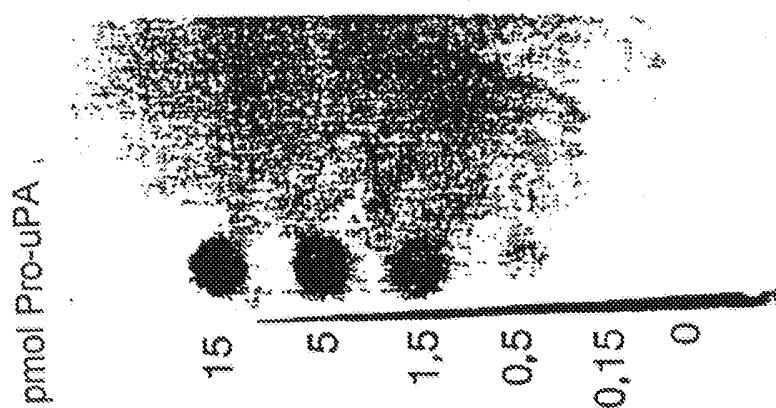


8A ábra





9A ábra



9B ábra

ITAM*
(nmol)

0,1

0,3

1,0

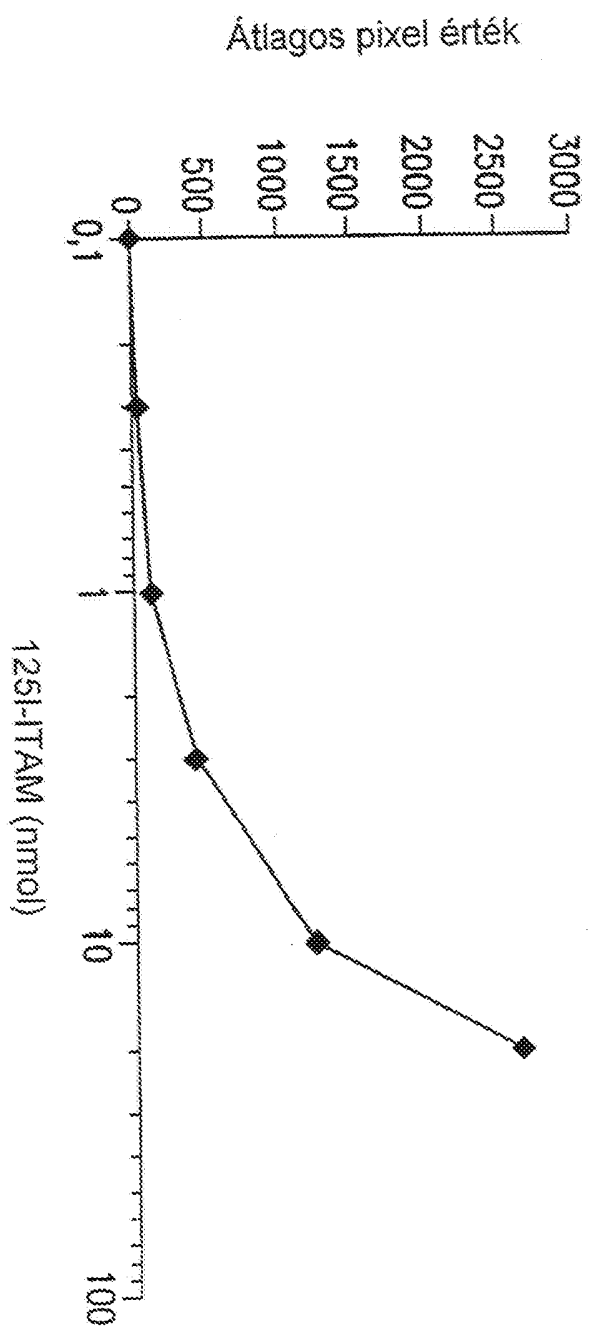
3,0

10

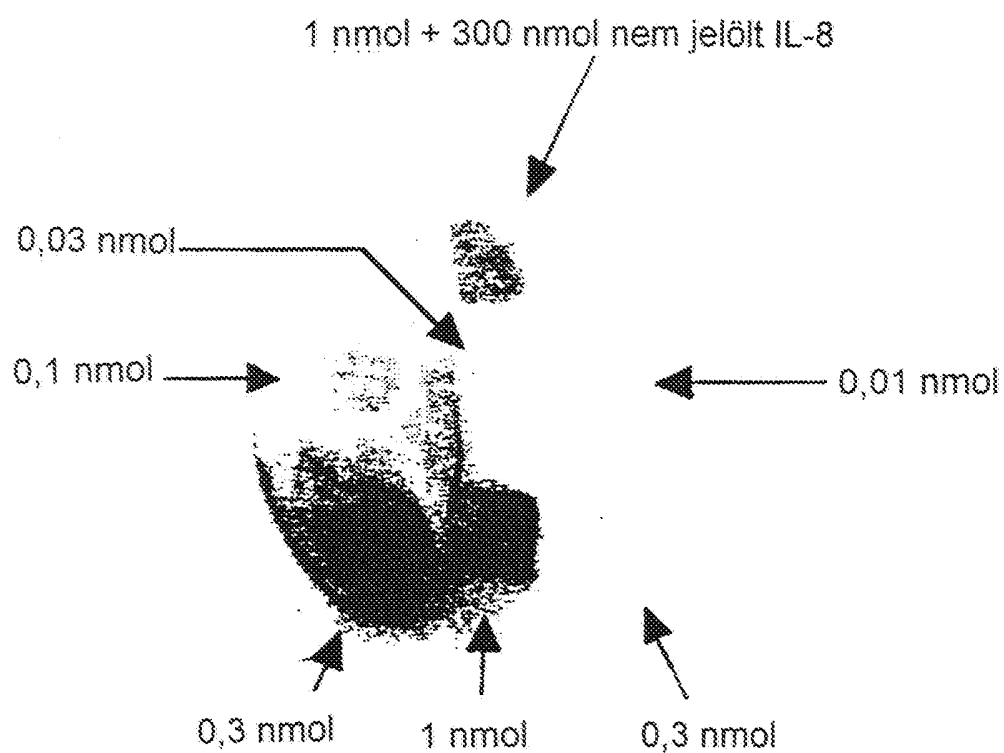
20



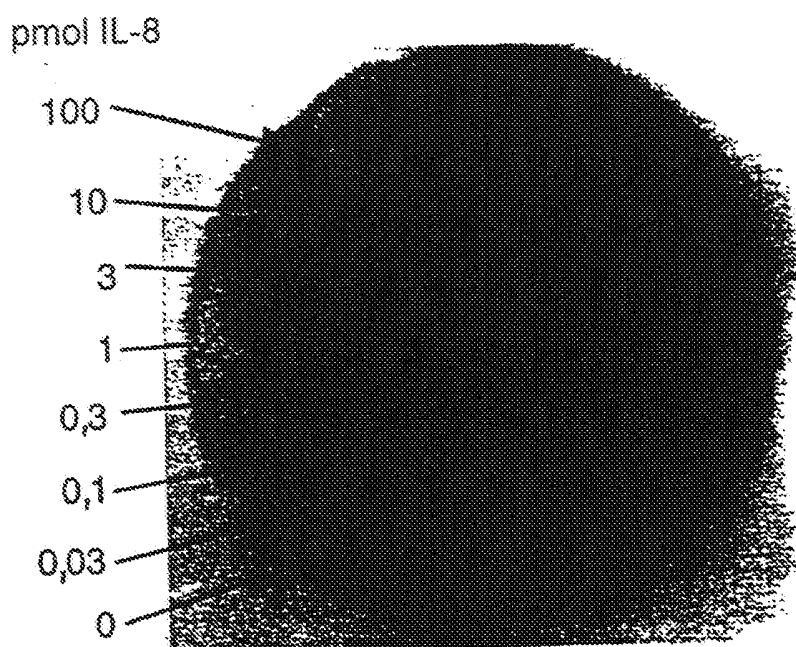
10. ábra



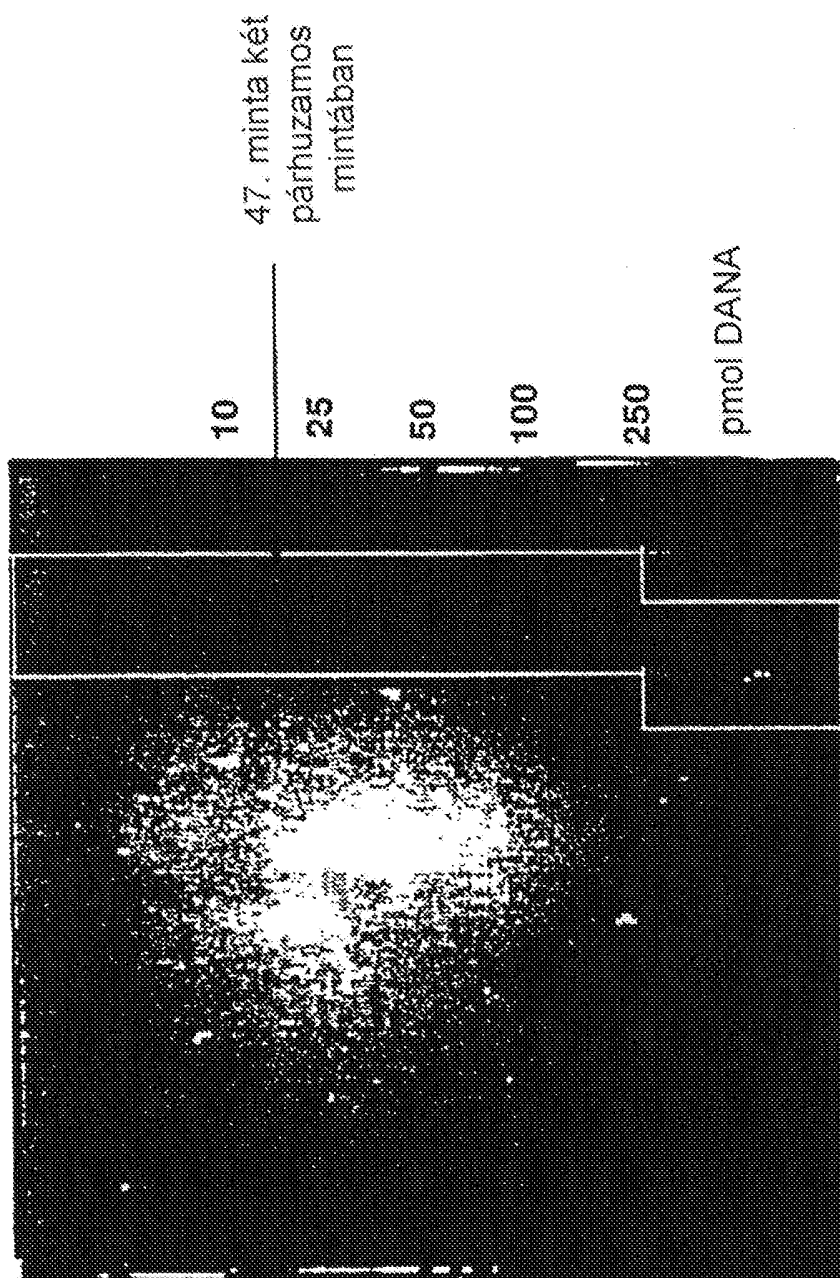
11. ábra



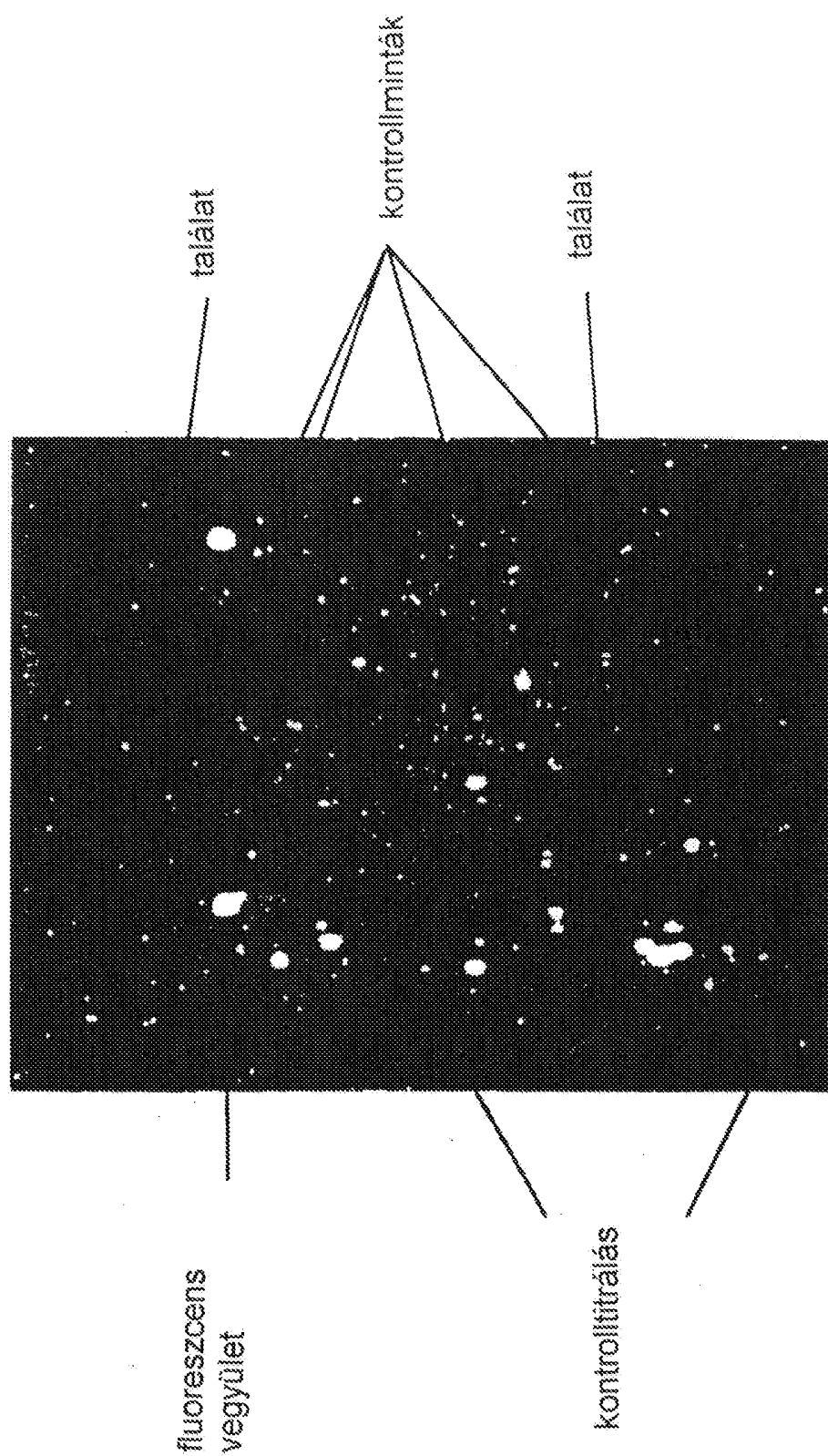
12. ábra



13. ábra



14. ábra



15. ábra