



(10) **DE 10 2017 123 744 A1** 2019.04.18

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2017 123 744.5**

(22) Anmeldetag: **12.10.2017**

(43) Offenlegungstag: **18.04.2019**

(51) Int Cl.: **C40B 40/00** (2006.01)

C40B 50/00 (2006.01)

C40B 20/04 (2006.01)

C40B 20/08 (2006.01)

(71) Anmelder:

Bundesrepublik Deutschland, vertreten durch die Bundesministerin für Wirtschaft und Energie, diese vertreten durch den Präsidenten der Bundesanstalt für Materialforschung und-prüfung (BAM), 12205 Berlin, DE; Humboldt-Universität zu Berlin, 12489 Berlin, DE

(72) Erfinder:

Weller, Michael, Dr., 15834 Rangsdorf, DE; Schwaar, Timm, 12437 Berlin, DE; Remmler, Dario, 12353 Berlin, DE; Börner, Hans, Prof. Dr., 12489 Berlin, DE

(74) Vertreter:

Zimmermann & Partner Patentanwälte mbB, 80331 München, DE

(56) Ermittelter Stand der Technik:

WO 2012/ 109 460 A1

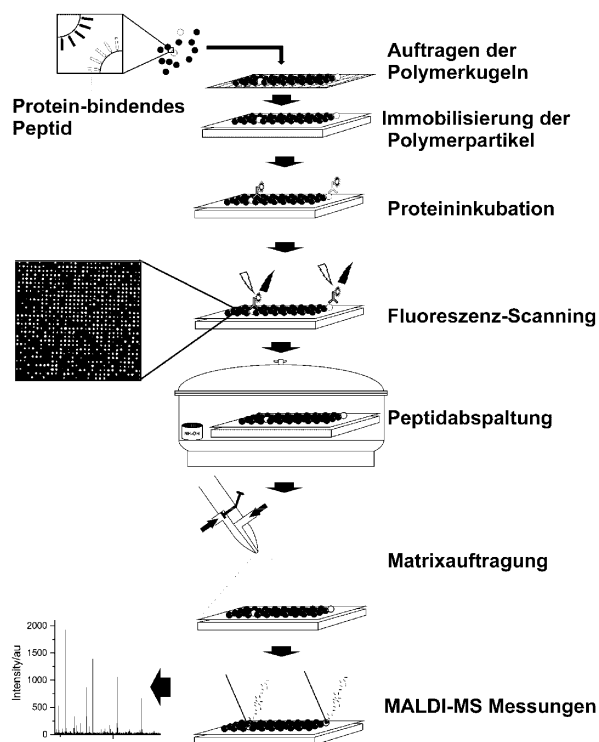
Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.

(54) Bezeichnung: **High-Throughput-Screening-Methode von kombinatorischen Bibliotheken mittels optischer on-chip-Detektion und massenspektrometrischer Sequenzierung**

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Herstellung eines Arrays von Mikropartikeln einer kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek auf einer Grundplatte, umfassend:

- Anpressen eines Siebes auf die Grundplatte, wobei eine Maschenweite des Siebes so ausgewählt ist, dass je Masche genau ein Mikropartikel der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek in das Sieb eindringen kann;
- Auftragen der Mikropartikel der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek auf das Sieb, sodass die aufgetragenen Mikropartikel in die Maschen des Siebes eingetragen werden;
- Fixieren der in die Maschen des Siebes eingetragenen Mikropartikel der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek auf der Grundplatte; und
- Abnehmen des Siebes von der Grundplatte.



Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die Erfindung liegt auf dem Gebiet des Hochdurchsatz-Screenings von partikelbasierten Sequenzbibliotheken und betrifft insbesondere die kombinatorische partikelgestützte Peptidsynthese, die Handhabung einer partikelbasierten Peptidbibliothek in einem Biointeraktionstest, beispielsweise einem Immunoassay, sowie die individuelle Analyse von Einzelpartikeln einer mittels kombinatorischer Synthese erstellten partikelgestützten Peptid-Bibliothek mittels Massenspektrometrie. Die Erfindung betrifft insbesondere einen Partikelträger zur Verknüpfung eines Biointeraktionstests einer partikelbasierten Peptidbibliothek mit der massenspektrometrischen Sequenzanalyse der Peptide eines im Biointeraktionstest als zielführend identifizierten Partikels.

[0002] In diesem Zusammenhang werden unter einem Partikel solche Polymerkügelchen (beads) verstanden, die als feste Phase zur kombinatorischen Peptidsynthese zwecks Herstellung von Sequenzbibliotheken verwendet werden. Typischerweise weisen die genannten Partikel eine regelmäßige Kugelform auf und liegen bevorzugt monodispers vor. Die Begriffe Mikropartikel, Bead und Kügelchen werden nachfolgend synonym behandelt. Typische Partikelgrößen (mittlerer arithmetischer Durchmesser) liegen im Bereich von 10-1000 µm.

Vorbekannter Stand der Technik

[0003] Die übliche Methode zur Analyse von derartigen kombinatorischen Bibliotheken ist die Beobachtung und Auswahl spezifischer fluoreszenzmarkierten Beads unter einem Fluoreszenzmikroskop, die manuelle Isolierung eines als positiv identifizierten Beads, die Abspaltung des Peptids von dem isolierten Bead in einem Reaktionsgefäß und die massenspektrometrische Untersuchung des Überstandes aus diesem Reaktionsgefäß. Häufig werden, um die uneindeutige Identifikation eines Partikels zu ermöglichen, die verwendeten Partikel individuell kodiert. Beispielsweise kann eine bestimmte Art von Partikeln, die eine bestimmte kombinatorisch erzeugte Nukleotidsequenz als Zielsubstanz tragen, mit Hilfe einer Peptidsequenz nachvollziehbar kodiert sein. Ebenso können eine bestimmte Peptid-Bibliothek als Zielsubstanz tragende Mikropartikel individuell unter Verwendung einer spezifischen Oligonukleotidsequenz markiert (kodiert) sein. Das Auslesen dieser Kodierung erfolgt in der Regel mit einem Verfahren, das unabhängig von dem Verfahren ist, welches zur Ermittlung der Sequenz dient und erfordert somit einen hohen Aufwand. Wie nachfolgend noch erläutert kann bei Verwendung der hier beschriebenen One-Bead-One-Compound-Bibliotheken vorteilhaft auf eine individuelle Kodierung der Partikel verzichtet werden.

Nachteile des Standes der Technik

[0004] Die vorbekannten Lösungen sind somit nur teilweise zufriedenstellend und erfordern beispielsweise einen hohen manuellen Aufwand zur gezielten Isolation (Picken) der in einem Biointeraktionstest jeweils als positiv befundenen Beads. Zudem liefern die üblicherweise verwendeten massenspektrometrischen Tandem-Methoden (MS/MS) nur schwache Signale, da nur ein Bead pro Sequenz zur Verfügung steht. Gewonnene Sequenzen weisen, bedingt durch eine teilweise unvollständige Fragmentierung der in der Bibliothek vorliegenden Peptide, unvermeidliche Lücken auf.

Problemstellung

[0005] Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Methodenkombination zur Herstellung und zum Screening von partikelbasierten Peptidbibliotheken bereitzustellen, die diese Nachteile überwindet. Dabei sollen die bisher voneinander getrennten Schritte „Identifikation eines positiven Beads mittels Fluoreszenzanalyse“ und „Sequenzanalyse des auf dem Partikel vorliegenden (positiven) Peptids“ automatisierbar gestaltet und deren Trennung voneinander überwunden werden. Die erwähnte Trennung der beiden Schritte betrifft die bisherige Notwendigkeit, das jeweils interessierende positive Bead manuell oder automatisch aus einer Vielzahl anderer, nicht als positiv befundeter Beads herauszusortieren und isolieren zu müssen, um es einer individuellen massenspektrometrischen Analyse unterziehen zu können. Mit anderen Worten formuliert, besteht die Aufgabe darin, ein schnelles und effizientes Screening (Durchsuchen) von sehr großen Split-and-Mix-Peptid-Bibliotheken zu ermöglichen.

[0006] In diesem Zusammenhang wird unter einem positiven Bead ein solches Bead verstanden, auf dessen Oberfläche ein die jeweilige Zielsubstanz bindendes Peptid vorliegt. Wird also beispielsweise eine Peptidbibliothek erstellt, um ein Bindermolekül (Peptid) zu identifizieren, das mit der Zielsubstanz (z.B. einem Antikörper, einem pharmakologischen Wirkstoff o.ä.) spezifisch interagiert, so ist die Aminosäuresequenz des kombi-

natorisch erstellten (und deshalb zunächst unbekannten) Peptids auf genau diesem einen Partikel von praktischem Interesse. Genau dieses eine (diese wenigen) Beads wird/werden z.B. mittels Fluoreszenzmarkierung nach den Prinzipien eines Immunoassays im Rahmen eines Biointeraktionstests (Screening) an Hand ihrer Fluoreszenz identifiziert.

Erfindungsgemäße Lösung

[0007] Vor diesem Hintergrund wird ein Verfahren zur Herstellung eines Arrays von Mikropartikeln einer kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek auf einer Grundplatte nach Anspruch 1 vorgeschlagen. Weitere Ausführungsformen, Modifikationen und Verbesserungen ergeben sich anhand der folgenden Beschreibung und der beigelegten Ansprüche.

[0008] Unter einer One-Bead-One-Compound-Bibliothek wird in diesem Zusammenhang hier die jeweils auf einem Mikrokügelchen bzw. Mikropartikel (bead) vorliegende Gesamtheit aller Moleküle verstanden, die gemäß einem von Lam et al. (1991) beschriebenen Konzept mittels kombinatorischer Synthese erzeugt werden (Lam, K. S.; Salmon, S. E.; Hersh, E. M.; Hruby, V. J.; Kazmierski, W. M.; Knapp, R. J. Nature 1991, 354, 82). One-Bead-One-Compound-Bibliotheken auf Mikropartikeln und darauf basierende Screening-Verfahren sind beispielhaft erläutert von Lam et al. (1997) in Kit. S. Lam, Michal Lebl, and Viktor Krchnak: The „One-Bead-One-Compound“ Combinatorial Library Method“ Chem. Rev. 1997, 97, 411-448. Entscheidend bei einer One-Bead-One-Compound-Bibliothek ist (im Falle von Peptid-Bibliotheken) das Charakteristikum, dass ein einzelnes Bead viele Moleküle eines einzigen Peptids trägt. Dadurch liefert ein einzelnes Bead genug Peptid, um eine Sequenzierung zu ermöglichen. Ausnahmen von dieser Regel sind meist ungewollte Nebenprodukte oder Abbruchsequenzen, die aber immer nur einen kleineren Anteil der Peptidgesamtmenge auf einem Bead ausmachen sollen. Bei der Kopplung der nächsten Aminosäure wird typischerweise jede Bead-Fraktion nur mit einer einzelnen Aminosäure umgesetzt, jede Bead-Fraktion mit einer anderen Aminosäure. Nach der Kopplung und werden alle Beads wieder vereinigt und in neue Fraktionen aufgeteilt. Diese werden wieder mit einzelnen Aminosäuren umgesetzt. Bei jedem Kopplungsschritt wächst das Peptid um eine Aminosäure. Je nach Anzahl der Beads in der Ausgangsmenge, gibt es nach den kombinatorischen Regeln zu Beginn viele Beads mit identischen Sequenzen. Mit zunehmender Länge der Peptide nimmt diese Anzahl stark ab, bis bei einem bestimmten, rechnerisch ermittelbaren Schritt, die Anzahl der Beads nicht mehr ausreicht, um jede kombinatorisch mögliche Sequenz zu realisieren. Ab diesem Punkt der kombinatorischen Synthese entspricht die Anzahl der Beads der Anzahl der vorhandenen Sequenzen. Dieser Punkt kann, aber muss nicht erreicht werden. Je nach Ausführungsform beginnen nach der Ankopplung der letzten Aminosäure die Unterschiede in der konventionellen Bearbeitung und der Bearbeitung nach der vorgestellten Erfindung. In der konventionellen Form werden nach Erreichen der gewünschten Länge der Peptide die Schutzgruppen der Seitenketten abgespalten. Dann liegen die Beads für die Interaktionstestung bereit. Oft werden fluoreszenzmarkierte Interaktionspartner verwendet, die mittels Bestrahlung mit kurzwelligem Licht auf den Beads visuell nachgewiesen werden können. Diese positiven Beads werden dann einzeln manuell herausgepickt, das Peptid vom Polymer („Harz“) abgespalten und einer Sequenzanalyse unterworfen, meist mittels Massenspektrometrie.

[0009] Nach der hier beschriebenen Erfindung werden die Seitenketten-Schutzgruppen der Beads der fertig synthetisierten Peptidbibliothek abgespalten und die Beads auf einer Grundplatte immobilisiert. Alle weiteren Schritte werden mit den immobilisierten Beads auf der Grundplatte durchgeführt.

[0010] Beispielsweise wird im Falle einer kombinatorischen Peptidsynthese auf ein und demselben Bead mit Beginn der kombinatorischen Synthese bei einem geringen Anteil, z.B. jeweils etwa 5 %, der ausgebildeten Peptidstränge, die Synthese mit dem aktuellen Syntheseschritt durch Blockierung mittels 5% Boc-Aminosäuren abgebrochen. Auf jedem Partikel liegen somit die Produkte aller kombinatorischen Synthese-Schritte als vor. Die vom Partikel jeweils an ihrem ersten Glied (der Ankergruppe) gelösten Peptidketten sind somit unterschiedlich lang und erlauben es, auch ohne eine zusätzliche Fragmentierung vornehmen zu müssen, die gesamte Sequenz lückenlos abzulesen. In jedem Kupplungsschritt wird also bevorzugt eine kleine Menge an Abbruchsequenzen auf jedem Polymerbead eingebaut, woraus sich ein charakteristisches Muster aus Abbruchsequenzen für jede Peptidsequenz ergibt. Das erlaubt es, die Analyse der Peptidsequenz zu beschleunigen und zuverlässiger zu gestalten, da - selbst bei unvollständiger Fragmentierung während der Massenspektrometrie - die sonst messtechnisch auf Grund dieser unzureichenden Fragmentierung unvermeidlichen Lücken gefüllt werden können.

[0011] Gemäß einer Ausführungsform wird ein Verfahren zur Herstellung eines Arrays von Mikropartikeln einer kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek auf einer Grundplatte vorgeschlagen, dass die folgenden Schritte umfasst: - Anpressen eines Siebes auf die Grundplatte, wobei eine Maschenweite des Siebes

so ausgewählt ist, dass je Masche genau ein Mikropartikel der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek in das Sieb eindringen kann; - Auftragen der Mikropartikel der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek auf das Sieb, sodass die aufgetragenen Mikropartikel in die Maschen des Siebes eingetragen werden; - Fixieren der in die Maschen des Siebes eingetragenen Mikropartikel der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek auf der Grundplatte; und - Abnehmen des Siebes von der Grundplatte.

[0012] Vorteilhaft weist das so erzeugte Array typischerweise eine in Zeilen und Spalten auf einer Seite der Grundplatte vorliegende regelmäßige Anordnung der sphärischen Partikel in Form eines Rasters auf, wobei eine Höhe und eine Breite der Spalten des Rasters einer Breite und einer Höhe der Zeilen des Rasters gleicht, sodass zueinander benachbarte sphärische Partikel auf der Grundplatte in einer x-Richtung und in einer y-Richtung zueinander typischerweise jeweils einen gleichen Abstand aufweisen. Vorteilhaft erlaubt die regelmäßige Anordnung eine eindeutige Identifikation einzelner Partikel an Hand ihrer über Koordinaten beschreibbaren Position. Einmal erfasste und bestimmten Koordinaten zugeordnete Partikel können mit einem entsprechend ausgestatteten System wiederholt aufgesucht (in einer entsprechenden Optik zentriert) und, beispielsweise, optisch inspiziert werden. Ebenso können die jeweils auf ihnen gebunden vorliegenden Moleküle der One-Bead-One-Compound-Bibliothek analysiert werden. Besonders wichtig ist die regelmäßige Anordnung der Beads für die massenspektrometrische Analyse, um ein Vermischen von abgespaltenen, benachbarten Peptiden zu reduzieren und eine Überlappung des Analysen-Laserstrahls im MALDI-TOF-MS mit mehreren Beads zu vermeiden. Die Immobilisierung an sich ist vorteilhaft, um eine parallele Prozessierung der Beads zu ermöglichen, ohne ihre Zuordnung zu verlieren. Dies ist insbesondere bei wiederholten Bindungsassays, Regenerationsschritten und der Anwendung von komplementären Biointeraktionsverfahren von erheblichem Vorteil.

[0013] Gemäß einer weiteren Ausführungsform umfasst das vorgeschlagene Verfahren weiterhin den Schritt: - Entfernen von nicht fixierten Mikropartikeln der kombinatorischen One- Bead-One-Compound-Bibliothek.

[0014] Vorteilhaft weist die Grundplatte damit nur fest auf der Grundplatte fixierte Mikropartikel auf. Lose Mikropartikel könnten bei der nachfolgend noch beschriebenen optischen Detektion stören.

[0015] Gemäß einer weiteren Ausführungsform erfolgt das Fixieren durch ein Andrücken der in die Maschen des Siebes eingetragenen Mikropartikel an die Grundplatte oder mit Hilfe eines zwischen Grundplatte und Mikropartikeln angeordneten Klebers oder das Fixieren umfasst ein Erwärmen der Grundplatte während der Anwesenheit der Mikropartikel.

[0016] Vorteilhaft kann mit dieser Ausführungsform erreicht werden, dass die Mikropartikel fest und ortsstabil auf der Grundplatte befestigt sind.

[0017] Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird vorgeschlagen, dass der vorstehend erwähnte Kleber in Form eines Klebefilmes oder in Form eines auf der Grundplatte angeordneten doppelseitigen Klebandes bereitgestellt wird.

[0018] Vorteilhaft lässt sich so die gewünschte Fixierung der Partikel auf der Grundplatte erreichen, ohne dabei einen zu großen Anteil der Oberfläche der Mikropartikel und damit die dort vorliegenden kombinatorisch synthetisierten Moleküle zu verdecken oder mit kriechendem Kleber zu maskieren.

[0019] Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird ein mikropartikeltragendes Substrat zur synchronen Handhabung einer Vielzahl von Mikropartikeln einer kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek vorgeschlagen. Das Substrat ist gemäß zumindest einer der vorstehend beschriebenen Ausführungsformen herstellbar. Das vorgeschlagene Substrat umfasst eine Grundplatte mit darauf befestigten Mikropartikeln der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek. Hierbei bilden die Mikropartikel der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek auf der Grundplatte zumindest abschnittsweise ein Array aus. Dabei entspricht ein Abstand der Mikropartikel zueinander zumindest einem Durchmesser eines Drahtes oder eines Polymerfadens, der die Maschen des Siebes ausbildet, das bei der Herstellung des Arrays verwendet wurde.

[0020] Dies erleichtert insbesondere die massenspektrometrische Analyse, da sich etwaig aus verschiedenen Beads nach der Abspaltung ausblutende Peptide nicht vermischen und der Laserstrahl jeweils nur ein Bead zur Sequenzierung erfasst. Ansonsten käme es zu schwer interpretierbaren Überlappungen bzw. Vermischungen.

[0021] Gemäß einer weiteren Ausführungsform haften die Mikropartikel des vorgeschlagenen mikropartikeltragenden Substrats selbstklebend auf der Grundplatte.

[0022] Mit Hilfe selbstklebender Mikropartikel kann die auf Grund des Kontakts zur Grundplatte einer nachfolgenden Reaktion und Detektion verlorengelassene Oberfläche der Mikropartikel minimiert werden. Das Ankleben der Mikropartikel kann sowohl durch die Vorbehandlung der Grundplatte (z.B. Silanisierung) verstärkt werden, als auch durch die Variation bzw. Modifikation der Polymere des Beads selbst. Thermoplastische Beads oder Bead basierend auf Elastomeren können auch durch leicht erhöhte Temperaturen zum Anbacken gebracht werden.

[0023] Gemäß einer weiteren Ausführungsform haften die Mikropartikel der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek vermittelt über eine Kleberschicht auf der Grundplatte. Das mikropartikeltragende Substrat umfasst also gemäß dieser Ausführungsform die Mikropartikel, die Kleberschicht und die Grundplatte

[0024] Kleber haben den Vorteil, dass die Klebeeigenschaft inhärent vorhanden ist. Insbesondere Sprühkleber können vorteilhaft verwendet werden. Bei der Verwendung von MALDI-TOF-MS zur Sequenzierung ist eine elektrische Mindestleitfähigkeit notwendig, so dass die Gesamtheit Grundplatte plus Kleber nicht einen elektrischen Isolator darstellt. Dies kann z.B. durch Verwendung einer metallischen Grundplatte mit einer dünnen Klebeschicht erreicht werden.

[0025] Gemäß einer weiteren Ausführungsform weist die Grundplatte Kantenmaße eines Mikroskopie-Objektträgers oder Kantenmaße einer Mikrotiterplatte auf.

[0026] Vorteilhaft sind gängige Apparaturen (z.B. Mikroskopie-Tische, Scanner, Platten-Reader) an die Kantenmaße von Mikroskopie-Objektträgern und Mikrotiterplatten angepasst. Es gibt weiterhin ein großes Arsenal von Laborrobotern, die an die automatisierte Handhabung von Objektträgern und von Mikrotiterplatten angepasst sind.

[0027] Gemäß einer weiteren Ausführungsform ist die Grundplatte ein Mikroskopie-Objektträger, insbesondere ein Mikroskopie-Objektträger aus Glas.

[0028] Somit erreichbare Vorteile wurden bereits benannt. Beispielsweise kann der Mikroskopieobjektträger aus Flachglas und damit inert bei allen nachfolgenden Inkubationen und nicht störend bei der Analyse sein.

[0029] Gemäß einer weiteren Ausführungsform umfasst die Kleberschicht ein doppelseitiges Klebeband.

[0030] Vorteilhaft sind dünne und zugleich zuverlässig klebende doppelseitige Klebebänder kommerziell erhältlich.

[0031] Gemäß einer weiteren Ausführungsform ist das doppelseitige Klebeband elektrisch leitfähig.

[0032] Ein besonderer Vorteil bestimmter Klebebänder (z.B. 3M™ XYZ-Axis Electrically Conductive Tape 9713) ist deren elektrische Leitfähigkeit, sodass eine entsprechend ausgerüstete Grundplatte mit einem elektrischen Potential beaufschlagt werden kann und bei der massenspektrometrischen Analyse (MALDI-TOF) die entsprechend ausgerüstete Grundplatte unmittelbar als Target dienen kann und so unmittelbar zur Probeneinführung nützlich ist.

[0033] Gemäß einer weiteren Ausführungsform sind die Mikropartikel der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek sphärische und bevorzugt monodispers vorliegende Mikropartikel.

[0034] Vorteile ergeben sich mit der guten Dispergierbarkeit der Partikel während der kombinatorischen Synthese und den damit verbundenen Waschschritten, sowie der Möglichkeit ein hochregelmäßiges Partikelarray zu erhalten. Monodisperse Partikel haben auch den Vorteil einer einfacheren Auswertung der Biointeraktionsassays und der problemlosen Anordnung im Gitter (Sieb) zu einem regelmäßigen Array. Ansonsten könnten ggf. zwei Partikel in ein Gitterkompartiment (Masche) geraten.

[0035] Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird die Verwendung eines mikropartikeltragenden Substrates nach einer der vorstehend beschriebenen Ausführungsformen in einem Bindungsassay zur Identifikation von solchen Mikropartikeln der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek vorgeschlagen, die mit einer Zielsubstanz eine Bindung eingehen, wobei ein die Zielsubstanz bindendes Mikropartikel der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek im Ergebnis des Bindungsassays eine Markierung trägt und an Hand der Markierung im Array erkennbar ist.

[0036] Besondere Vorteile ergeben sich aus dem erreichbar hohen Grad der Parallelisierung von Inkubationen, Waschschritten und Analysen die zeitgleich an einer Vielzahl von Mikropartikeln und damit an einer Vielzahl von auf den Partikeln vorliegenden Substanzen vorgenommen werden können.

[0037] Gemäß einer weiteren Ausführungsform ist bei der vorgeschlagenen Verwendung die Markierung ausgewählt unter: einer optisch messbaren, einer fluoreszenzspektrometrisch messbaren, einer radiologisch messbaren, einer Raman-spektroskopisch messbaren, einer Lumineszenz-basierenden, einer Chemolumineszenz-basierenden, einer Biolumineszenz-basierenden, einer enzymverstärkten, und/oder einer Partikel-basierten Markierung.

[0038] Die Vorteile dieser Markierungsarten umfassen vor allem deren hohe Empfindlichkeit. Kommerziell ist eine Vielzahl von Markierungssubstanzen und Nachweisreagenzien verfügbar. Beispielsweise sind Mikroskopie- und Scanner-Optiken an die spezifischen Absorptions- und Emissionswellenlängen von Fluoreszenzfarbstoffen angepasst.

[0039] Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird das auf der Grundplatte befestigte und eine Markierung aufweisende Mikropartikel der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen.

[0040] Vorteilhaft können moderne Massenspektrometer eingerichtet sein, das Massenspektrum der von einem diskreten Partikel innerhalb eines Partikelarrays stammenden kombinatorisch erzeugten Substanz zu erfassen. Moderne MALDI-Imaging-Systeme können eine Ortsauflösung von 5 µm und darunter erreichen.

[0041] Gemäß einer weiteren Ausführungsform umfasst die massenspektrometrische Analyse eine Sequenzanalyse einer auf dem Partikel kombinatorisch synthetisierten Verbindung.

[0042] Traditionell geht der Sequenzanalyse typischerweise eine massenspektrometrische Fragmentierung der vorliegenden Peptide voraus. Das betreffende Peptid wird dabei massenspektrometrisch fragmentiert. In einem zweiten Schritt werden die dabei erhaltenen Fragmente einer massenspektrometrischen Analyse (Auftrennung) unterzogen, in deren Ergebnis die Sequenz des betreffenden Peptids hergeleitet werden kann. Um die Sequenzanalyse zu vereinfachen, können synchron in jedem Syntheseschritt die vorstehend bereits beschriebenen Boc-Abbruchsequenzen erzeugt werden. Beispielsweise kann durch Verwendung eines geringen Anteils von, beispielsweise jeweils etwa 5%, Boc-Aminosäuren an der im jeweiligen Syntheseschritt verwendeten Aminosäuremenge, eine zur massenspektrometrischen Analyse ausreichende Menge des dem jeweiligen Syntheseschritt entsprechende Peptids erzeugt werden. Somit wird, ohne eine zusätzliche Fragmentierung vornehmen zu müssen, die gesamte Sequenz lückenlos ablesbar. Das erlaubt es, die Analyse der Peptidsequenz zu beschleunigen und zuverlässiger zu gestalten, da an Stelle eines aufwendigen MALDI-TOF/TOF-Gerätes ein einfacheres und billigeres MALDI-TOF-Gerät für die Sequenzierung verwendet werden kann.

[0043] Gemäß einer weiteren Ausführungsform umfasst die kombinatorische One-Bead-One-Compound-Bibliothek Peptide, Peptidanaloga, Nukleotide oder Nukleotidanaloga oder andere Monomer-Sequenz-definierte Polymere. Monomer-Sequenz-definierte Polymere sind beispielsweise beschrieben in Hartmann, L. and Börner, H. G. (2009), Precision Polymers: Monodisperse, Monomer-Sequence-Defined Segments to Target Future Demands of Polymers in Medicine. Advanced Materials, 21: 3425-3431.

[0044] Derartige Moleküle kommen als Zielsubstanzen für die Wirkstoffforschung oder für Anwendungen in der Biotechnologie in Betracht.

[0045] Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird vorgeschlagen, das oben beschriebene mikropartikeltragende Substrat zu verwenden: in einem Bindungsassay bzw. einem Biointeraktionsassay; während eines Waschschrittes; während eines markierungsspezifischen Scans; während eines Abspaltens der kombinatorisch synthetisierten Verbindung vom Partikel; während einer Abscheidung einer massenspektrometrisch genutzten Matrix auf und/oder in der Nähe einer Vielzahl von Mikropartikeln der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek; und/oder während einer massenspektrometrischen Analyse eines die Markierung tragenden Mikropartikels der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek.

[0046] Vorteilhaft ist hierbei besonders, dass die Position jedes Partikels auf der Grundplatte über den gesamten Prozess gleich bleibt. Einzelne Partikel können somit an Hand ihrer Position, die ggf. durch die Verwendung exakter Koordinatenangaben automatisch wiederauffindbar ist, während des gesamten Prozesses analysiert werden. Ebenfalls können ein und dieselben Partikelarrays nach entsprechenden Spülschritten wieder-

holt in unterschiedlichen Bindungsassays getestet werden. So können einfache Bindungsassays, kompetitive Assays mit unterschiedlichen Inhibitoren, Assays zur Identifizierung unspezifischer Binder, Assays zur Identifizierung von unerwünschten Bindern gegen das Label, gegen Linker oder andere nachträglich eingeführte Strukturen durchgeführt werden. Aufgrund der hohen Stabilität der Peptide können auch harsche Regenerationslösungen verwendet werden, so chaotrope Lösungen (z.B. Guanidiniumhydrochlorid, Harnstoff), Lösungsmittel (z.B. DMSO, DMF, Acetonitril, Methanol) und deren Mischungen mit Wasser oder wässrigen Puffern, hohe oder niedrige pH-Werte, Tenside (z.B. Natriumdodecylsulfat SDS) oder konzentrierte Salzlösungen (z.B. Natriumsulfat, Ammoniumsulfat, Natriumchlorid).

[0047] Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird eine Screening-Methode für eine kombinatorische One-Bead-One-Compound-Bibliothek mittels optischer Onchip-Detektion und massenspektrometrischer Sequenzierung vorgeschlagen. Diese Screening-Methode umfasst die Schritte: - Bereitstellen der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek in Form eines mikropartikeltragenden Substrates wie oben beschrieben; - Inkubieren des mikropartikeltragenden Substrates mit einer Lösung, umfassend ein fluoreszenzmarkiertes Molekül (z.B. ein fluoreszenzmarkiertes Protein, insbesondere ein Enzym, einen fluoreszenzmarkierten Antikörper, einen fluoreszenzmarkierten Rezeptor, oder einen anderen fluoreszenzmarkierten Biomarker). Die Screening-Methode kann eine gezielte Inkubation der Mikropartikel vor deren Immobilisierung umfassen, umfasst aber ebenso die Inkubation der auf der Grundplatte immobilisierten Mikropartikel, also „on-chip“. Die vorgeschlagene Screening-Methode umfasst weiter die Schritte: - fluoreszenzoptisches Screening der mit dem partikeltragenden Substrat bereitgestellten Mikropartikel, umfassend die kombinatorische One-Bead-One-Compound-Bibliothek; - Identifizieren einer Position eines das fluoreszenzmarkierte Protein aufweisenden Mikropartikels; und - individuelles massenspektrometrisches Ermitteln einer Sequenz einer kombinatorisch synthetisierten Verbindung an einer Position des identifizierten fluoreszenzmarkierten Mikropartikels.

[0048] Vorteile dieser Ausführungsform wurden bereits beschrieben. Insbesondere vorteilhaft ist, dass keine separate Codierung der Sequenzen notwendig ist und keine manuelle oder robotische Manipulation der Partikel notwendig ist.

[0049] Gemäß einer weiteren Ausführungsform umfasst die vorgeschlagene Screening-Methode weiterhin die Schritte: - Erkennen einer Autofluoreszenz eines Mikropartikels auf dem mikropartikeltragenden Substrat vor der Inkubation mit der Lösung des fluoreszenzmarkierten Moleküls (Proteins).

[0050] Durch das Erkennen einer Autofluoreszenz können falsch-positive Befunde zuverlässig ausgeschlossen werden und preisgünstige Partikel verwendet werden.

[0051] Gemäß einer weiteren Ausführungsform umfasst die vorgeschlagene Screening-Methode weiterhin den Schritt: - Untersuchen der Mikropartikel des mikropartikeltragenden Substrats hinsichtlich des Vorliegens einer Mehrfachmarkierung oder eines Signalverhältnisses unterschiedlicher Markierungen.

[0052] Mehrfachmarkierungen und das Erfassen von Signalverhältnissen (beispielsweise bei unterschiedlichen Wellenlängen) sind dem Fachmann bekannte Verfahren zur Steigerung der Selektivität für eine gesuchte Zielsubstanz. Auch können auf diese Weise gleichzeitig mehrere Assays durchgeführt werden (sog. Multiplexing) oder Normierungen vorgenommen werden.

[0053] Gemäß einer weiteren Ausführungsform umfasst die vorgeschlagene Screening-Methode weiterhin den Schritt: - Regenerieren einer Oberfläche von Mikropartikeln des mikropartikeltragenden Substrats und erneutes Inkubieren des mikropartikeltragenden Substrats mit einer weiteren Lösung eines fluoreszenzmarkierten Moleküls (mit anderen Reagenzien).

[0054] Vorteilhaft kann so ein einmal erzeugtes Array in verschiedenen Tests nach unterschiedlichen Kriterien bzw. in Hinsicht auf das Vorliegen verschiedener Zielsubstanzen durchsucht werden. Oligonukleotide und Oligopeptide bzw. deren Analoga sind chemisch so stabil, dass sie ohne weiteres in zahlreichen Tests wiederholt inkubiert und erneut gewaschen bzw. regeneriert werden können. Unter Regeneration soll hier verstanden werden, dass möglichst alle während eines Bindungsassays an das Partikel gebundene Substanzen bzw. Reagenzien nach Abschluss der Messungen wieder abgelöst werden. Damit werden die Partikel so gereinigt, dass ein erneuter Bindungstest ohne Störung durch vorherige Reaktionsschritte durchgeführt werden kann. Die Regeneration der Partikel soll unter Bedingungen durchgeführt werden, die die Oligopeptide bzw. Oligonukleotide nicht chemisch verändern oder abspalten. Derartige Reagenzlösungen sind aus der Literatur hinlänglich bekannt.

[0055] Gemäß einer weiteren Ausführungsform umfasst die vorgeschlagene Screening-Methode weiterhin den Schritt: - Untersuchen der Mikropartikel des mikropartikeltragenden Substrats mittels Dissoziations- oder Inhibitionsversuchen und differentieller Auswertung von Markierungssignalen. Für viele Anwendungen sind die Bindungskonstanten bzw. Bindungskinetiken der zu identifizierenden Substanzen von entscheidender Bedeutung. Daher ist eine direkte Beobachtung einer Bindung (Assoziation, Dissoziation, Inhibition) von hoher Relevanz. Wenn dies hoch parallelisiert on-chip durchgeführt werden kann ist dies sehr vorteilhaft.

[0056] Die vorstehend beschriebenen Ausführungsformen können beliebig miteinander kombiniert werden.

[0057] Kombinatorische Bibliotheken sind seit Jahrzehnten bekannt, jedoch ist die Handhabung von sehr großen Bibliotheken praktisch kaum möglich. Der Wert einer Bibliothek steigt allerdings stark mit ihrer Größe an. Die Erfindung ermöglicht es nun, die Partikel (Beads) der kombinatorischen Bibliothek räumlich geordnet auf einer Substratoberfläche abzulegen, zu fixieren, einem Biointeraktionstest zu unterwerfen, positive Substanzen mittels Microarray-Scan, d.h. Screening, zu identifizieren und diese beispielsweise in einem MALDI-TOF-Massenspektrometer zu sequenzieren (Identifikation). Im Gegensatz zu allen anderen Methoden muss hier in keinem Fall ein einzelnes Bead isoliert und aufwendig behandelt werden.

[0058] Nachteilig an bekannten Verfahren ist, dass jedes Bead einzeln bearbeitet werden muss, was die Geschwindigkeit des Screenings stark limitiert. Zudem begrenzt die manuelle Bearbeitung die Beadgröße nach unten. Zusätzlich muss je Partikel eine bestimmte Peptidmenge abgespalten werden, um im Überstand noch eine sequenzierbare Konzentration zu erreichen. Auch dies begrenzt die Beadgröße nach unten. Große Beads bedeuten aber dann zwangsläufig kleine Bibliotheken, da ansonsten die Gesamtmasse der Beads zu hoch wird, und die Kosten für Handhabung der Beads steigen.

[0059] Erfindungsgemäß werden die Beads einer Bibliothek oder ein Aliquot der Beads einer Bibliothek geordnet, beispielsweise auf einem Glas-Chip, immobilisiert. Die Immobilisierung der Beads erfolgt beispielsweise mit Hilfe eines doppelseitigen (und elektrisch leitfähigen) Klebebandes unter Verwendung eines als Schablone zur Selbstjustage der Beads auf dem Klebeband dienenden hochregelmäßigen Siebes. Das Sieb wird temporär auf das Klebeband aufgelegt. Die Maschenweite des Siebes ist genau so bemessen, dass jeweils ein (getrocknetes/trockenes oder feuchtes) Bead durch eine Masche des Siebes passt und so in Kontakt mit der Grundplatte oder einem auf der Grundplatte angeordneten Kleber oder Klebeband aufgenommen und gehalten werden kann. Wird nun das Sieb entfernt, so liegt eine arrayartige Anordnung von zueinander regelmäßig beabstandeten Beads auf der Kleberschicht und also auf dem Glas-Chip (Grundplatte) vor. Nachfolgend wird der Begriff Glas-Chip beispielhaft für eine mögliche Ausführungsform der Grundplatte verwendet. Andere Grundplatten, beispielsweise aus Plastik, Metall, oder Verbundwerkstoffen sind ebenso verwendbar. Die Begriffe Substrat und Grundplatte werden hierbei als Synonyme behandelt.

[0060] Die weiteren Schritte werden alle an den auf der Grundplatte immobilisierten Beads durchgeführt. Das stellt vorteilhaft eine erhebliche Parallelisierung der durchgeführten Tests dar. Einerseits werden alle Beads des jeweiligen Arrays unter völlig identischen Bedingungen im Biointeraktionstest getestet. Dazu wird die Grundplatte mit den darauf arrayartig angeordneten Beads der Bibliothek in einer Lösung der Zielsubstanz (z.B. einem monoklonalen Maus-Antikörper) inkubiert. Es können sich weitere Inkubationen (z.B. mit einem heterogenen fluoreszenz- oder enzymmarkierten anti-Maus Antikörper) anschließen. Die Durchführung von Immunoassays nach dem Prinzip eines Enzymimmunoassays oder eines ELISA ist dem Fachmann bekannt und bedarf hier keiner weiteren Erläuterungen. Wesentlich ist, dass diejenigen Beads, welche auf ihrer Oberfläche ein gesuchtes Bindermolekül tragen, nach dem Biointeraktionstest eine Fluoreszenzmarkierung tragen. Mit Hilfe dieser Fluoreszenz (z.B. vermittelt durch einen Fluoreszenzfarbstoff wie Atto 633) sind positive (zielführende) Beads unschwer als solche erkennbar.

[0061] Im Fluoreszenzmikroskop oder mittels Fluoreszenzscanner kann also ein positives Bead eindeutig als solches erkannt und seine Position auf der Grundplatte eindeutig ermittelt werden. Da das Bead unter geeigneten Bedingungen an Hand seiner vom Hintergrund deutlich verschiedenen Fluoreszenz erkennbar ist, kann bei der anschließenden massenspektrometrischen Analyse der Laserstrahl eines MALDI-TOF-MS auch genau auf ein jeweils interessierendes Bead gerichtet werden, sodass in der sich ausbildenden Desorptionswolke (plume) genau die bevorzugt vorher chemisch abgespaltenen Peptide von diesem einen Bead vaporisiert werden. Da nun das Klebeband gemäß einer beispielhaften Ausführungsform elektrisch leitfähig ist, kann es gleichzeitig als Elektrode zur Erzeugung des für die MALDI-TOF-MS wesentlichen elektrischen Feldes dienen, das die ionisierten Spezies dem Analysator des TOF-MS zuführt.

[0062] Erfindungswesentlich ist die unveränderte Anordnung der Beads auf genau der Grundplatte, die im Bio-interaktionstest verwendet wird und anschließend einer Fluoreszenzanalyse unterzogen wird. Dabei werden die Koordinaten der als positiv befundenen Beads, bzw. ein Muster der als positiv an Hand ihrer Fluoreszenz erkennbaren Bead-Anordnung vermerkt. Nachfolgend wird mit genau derselben Anordnung der Beads auf der Grundplatte (z.B. Mikroskopie-Objektträger mit doppelseitigem Klebeband) unmittelbar die massenspektrometrische Sequenzanalyse angeschlossen. Moderne MALDI-MS-Instrumente sind mit einem Mikroskop-Kamerasystem ausgestattet, mit dessen Hilfe das interessierende Partikel wiedergefunden und selektiv mit dem Laser beschossen werden kann, sodass die hier wesentliche Ein-Partikel-Sequenzierung von Peptiden genau des interessierenden Beads ermöglicht wird und kein langwieriges und teures MS-Imaging des Chips notwendig wird.

[0063] Eine zusätzliche Verbesserung ermöglicht auch die Verwendung von Abbruchsequenzen für die Sequenzierung gemäß **Fig. 3**. Da die Sequenzierung als sogenannte De-novo-Sequenzierung extrem hohe Ansprüche stellt, reicht die Signalintensität der üblichen MS/MS-Sequenzierung für diesen Zweck zumeist nicht aus oder führt zu Lücken in der Sequenz. Gemäß der vorgeschlagenen Methode wird auf ein und demselben Bead mit Beginn der kombinatorischen Synthese bei einem geringen Anteil, z.B. jeweils etwa 5 %, der ausgebildeten Peptidstränge die Synthese mit dem aktuellen Syntheseschritt durch Blockierung z.B. mittels Boc-Modifizierung abgebrochen. Auf jedem Partikel liegen somit die Produkte aller kombinatorischen Syntheseschritte als Abbruchsequenzen vor. Die vom Partikel jeweils an ihrem ersten Glied (Ankergruppe) gelösten Peptidketten sind unterschiedlich lang und erlauben es somit, auch ohne eine zusätzliche Fragmentierung vornehmen zu müssen, die gesamte Sequenz lückenlos abzulesen („Leitersequenzierung“, **Fig. 7**). In jedem Kupplungsschritt wird eine kleine Menge an Abbruchsequenzen auf jedem Polymerbead eingebaut, woraus sich ein charakteristisches Muster aus Abbruchsequenzen für jede Peptidsequenz ergibt. Das erlaubt es, die Analyse der Peptidsequenz zu beschleunigen und zuverlässiger zu gestalten, da keine Fragmentierung der Peptide notwendig ist und keine MS/MS-Analyse durchgeführt werden muss. Die Sequenzierung findet schon in der ersten MS-Stufe statt („Leitersequenzierung“), so dass auch kein teures MALDI-TOF/TOF sondern ein einfacheres und billigeres MALDI-TOF-Gerät für die Sequenzierung ausreicht. Zudem ist vorteilhaft, dass in der ersten MS-Stufe die Intensitäten noch höher sind, als in einer zweiten MS-Stufe nach einer etwaigen Fragmentierung. Daher kann man kleinere Partikel sequenzieren, was größere Peptidbibliotheken ermöglicht.

[0064] Der split-and-mix-Syntheseansatz und die split-and-mix-Synthese mit Fmoc-Strategie sind in den **Fig. 2** und **Fig. 3** dargestellt. Die beiliegenden Zeichnungen veranschaulichen damit Ausführungsformen und dienen zusammen mit der Beschreibung der Erläuterung der Prinzipien der Erfindung. Die Elemente der Zeichnungen sind relativ zueinander und nicht notwendigerweise maßstabsgetreu.

Figuren

[0065] **Fig. 1** zeigt den allgemeinen Ablauf der Festphasenpeptidsynthese. Zunächst wird an alle funktionellen Gruppen auf dem (Harz)Kügelchen eine Ankergruppe eingeführt, an die die erste Aminosäure gebunden wird. Von dieser wird die temporäre Schutzgruppe (Fmoc oder Boc) abgespalten und in einer Kondensationsreaktion die aktivierte zweite Aminosäure (Fmoc oder Boc-geschützt) unter Ausbildung einer Amidbindung, auch Peptidbindung gebunden. So können beliebig viele Aminosäuren gekuppelt werden bis die gewünschte Peptidlänge erreicht ist. Dann werden alle permanenten Schutzgruppen, die nach orthogonaler Schutzgruppenstrategie während vorhergehender Syntheseschritte stabil sind, abgespalten und das Peptid wird vom Partikel abgespalten. Um die Anzahl an möglichen Nebenprodukten durch Reaktion mit nicht-reagierten Aminogruppen oder freien Seitenketten der Aminosäuren zu verringern, ist es einerseits empfehlenswert, eine orthogonale Schutzgruppenstrategie anzuwenden und andererseits nach jeder Kupplung Capping-Schritte einzubauen. Hierbei werden freie, reaktive Stellen beispielsweise durch Acetylierung inaktiviert.

[0066] Verschiedene Mikropartikel unterscheiden sich in der Größe, der relativen Beladung, der Kompatibilität mit verschiedenen Substraten (polaren und unpolaren) und dem Quellverhalten in verschiedenen Lösungsmitteln. Vorteilhaft ist das gewählte Partikelmaterial chemisch inert gegen alle eingesetzten Chemikalien und Lösungsmittel, wie auch mechanisch stabil in allen Prozessschritten. Ein Mikropartikel-Material mit gutem Quellverhalten in einer großen Bandbreite an Lösungsmitteln sowie hoher mechanischen Stabilität ist das Tentagel-Harz, welches aus einem Kern aus vernetztem Polystyrol und einer Hülle aus polaren Polyethylenglykol-Ketten, die unterschiedliche funktionelle Gruppe tragen, besteht. Ebenfalls kann beispielsweise auf ein komplett Polyethylenglykol-basierendes ChemMatrix-Harz zurückgegriffen werden, welches auf einen Polystyrolkern verzichtet und damit unspezifische, hydrophobe Interaktionen vermeidet. Dieses Harz zeichnet sich zudem ebenfalls durch gute Quelleigenschaften in polaren und unpolaren Lösemitteln aus.

[0067] Die Aufgabe der Ankergruppe (auch Linker genannt) ist es, eine reversible Bindung zwischen dem synthetisierten Peptid und der festen Phase zu bilden sowie einen Schutz der C-terminalen Carboxylgruppe im gesamten Prozess der Kettenverlängerung zu bieten. Die Wahl hängt von der generellen Schutzgruppenstrategie der Peptidsynthese (permanente und temporäre Schutzgruppen) ab und richtet sich auch danach, welche Funktionalität am C-Terminus nach Abspaltung gewünscht ist.

[0068] Als temporäre Schutzgruppen werden in der Regel Fmoc- oder Boc-Schutzgruppen verwendet. Im Fall der Boc-Schutzgruppe ist ein weiterer Neutralisierungsschritt nach der Abspaltung notwendig. Um Nebenreaktionen wie zweimaliges Kuppeln zu vermeiden, kann vor Wiederholung der Schritte 3 und 4 ein Capping-Schritt eingefügt werden. Der Ansatz kann in drei Schritte unterteilt werden: Aufteilen (split), Kuppeln und Vermischen (mix). Zu jedem Kupplungsschritt in der Synthese der festphasengebundenen Peptidbibliothek wiederholt man die Distribution der Polymerbeads in die verschiedenen Reaktionskammern, sodass am Ende jedes Polymerbead Peptide mit genau einer Sequenz trägt. Man nennt festphasengebundene, kombinatorische Bibliotheken auch „one-bead-one-compound“ (OBOC) Bibliotheken. Statistisch ergibt sich eine Bibliothek mit einer Größe von m^n Peptiden, wobei m die Anzahl der eingesetzten verschiedenen Aminosäuren und n die Länge des Peptids ist, sofern die Anzahl der zu Verfügung stehenden Beads nicht überschritten wird.

[0069] **Fig. 2** zeigt typische Schritte im split-and-mix-Syntheseansatz mit A, B, C als variable Aminosäuren an festen Phasen. In jedem Schritt wird der Ansatz aufgeteilt, eine weitere Aminosäure gekuppelt und die Teile erneut vereint. Nach zwei Kupplungsschritten mit drei verschiedenen Aminosäuren ergibt sich somit eine festphasengebundene Bibliothek mit 9 verschiedenen Peptiden (3^2) an unterschiedlichen Beads.

[0070] **Fig. 3** illustriert die Split-and-mix-Synthese mit Fmoc-Strategie und Boc-Abbruchsequenzen (5 % je Syntheseschritt) mit A, B, C als variable Aminosäuren an festen Phasen. Auf jedem Bead befindet sich eine sequenzspezifische Familie von Peptiden.

[0071] Die Peptide interessierender Beads werden einer Matrix-gestützten Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) -TOF (time-of-flight) MS (Massenspektrometrie) unterzogen. Die als Matrix verwendete Substanz wird vorteilhaft in unmittelbare Nähe zu den Beads gebracht. Zum Auftrag der Matrix haben sich Sprühtechniken bewährt, die eine Ortsveränderung des immobilisierten Analyten (Peptids) verhindern. Dazu wird die Matrix in einem leicht flüchtigen Lösungsmittel gelöst und mittels einer Sprühapparatur, beispielsweise einem Airbrush-System oder einem Aufprall-Zerstäuber, auf dem Partikelträger aufgetragen.

[0072] **Fig. 4** zeigt schematisch die erfindungsgemäße Auftragung der MALDI-Matrix durch pneumatisches Zerstäuben mit Hilfe eines Airbrush (AT-Airbrush-Pistole-Kit AT-AK-02, Agora-Tec GmbH, Schmalkalden; Düse mit Nadel: 0,03 mm; Arbeitsdruck: 1,0 bis 3,5 bar). Ziel war es, eine Kokristallisation der verwendeten Matrix (α -Cyano-4-hydroxymethylsäure) mit den Analyten zu erreichen, ohne dabei die auf den Beads vorliegenden Peptide zu stark zu mobilisieren.

[0073] Um diese Kokristallisation zu ermöglichen, müssen die Peptide zunächst vom Partikel abgespalten werden. Das erfolgt erfindungsgemäß in einer Ammoniak-Atmosphäre in einer gasdichten Kammer. Das gesamte partikeltragende Substrat umfassend die auf dem Klebeband immobilisierten Partikel wird der Ammoniak-Atmosphäre ausgesetzt und erst danach wie beschrieben mit der Matrix besprüht.

[0074] Der gesamte Verfahrensablauf des mithin vorgeschlagenen Screening-Verfahrens ist in **Fig. 5** und **Fig. 6** schematisch gezeigt.

[0075] Das Screening-Verfahrens einer OBOC-Bibliothek umfasst die folgenden Schritte:

1. Immobilisierung der Partikel mit festphasengebundenen Peptiden;
2. Messung der Fluoreszenz vor der Inkubation;
3. Inkubation mit monoklonalen Anti-FLAG® M2 Antikörpern;
4. Inkubation mit polyklonalen, fluoreszenzmarkierten Anti-Maus Antikörpern;
5. Messung der Fluoreszenz nach der Inkubation;
6. Abwaschen der Antikörper;
7. Messung der Fluoreszenz nach dem Waschen;

8. Abspaltung der Peptide vom Harz;
9. Auftragung der MALDI-Matrix;
10. Aufnahmen des MALDI-TOF-MS Spektrums und direkte Sequenzierung.

[0076] Fig. 7 zeigt ein Massenspektrum, wie es typischerweise bei der Sequenzierung eines Kügelchens erhalten wird.

[0077] Es gibt also mehrere Innovationen in der vorliegenden Beschreibung:

1. Geordnete Immobilisierung von Beads mittels eines Siebs auf einem klebrig gemachten elektrisch leitfähigen Substrat (z.B. Glas-Chip); 2. Kombiniertes Screening und MS-Sequenzierung auf dem Substrat; 3. Gasphasenabspaltung der Peptide auf dem Substrat; 4. Einführung von absichtlichen Abbruchsequenzen zur sicheren und empfindlichen De-novo-Sequenzierung; 5. Applikation von Matrixsubstanz auf dem Substrat mittels Airbrush-Technologie.

Ausführungsbeispiel

[0078] Nach dem Split-and-Mix-Verfahren wurde eine mit ein mit 4-(Hydroxymethyl)benzoesäure (HMBA) und Linker-Peptidsequenz modifiziertes Harz (Tentagel HL NH₂, Partikelgröße: 75 µm, 100 mg) in fünf Reaktions-spritzen aufgeteilt. Es wurde je eine Lösung aus tert-Butoxycarbonyl-Aminosäure (Boc-AS-OH): Fluorenylmethoxycarbonyl-Aminosäure (Fmoc-AS-OH) (5:95, 8 Äq.), 2-(6-Chlor-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium-hexafluorophosphat (HCTU) (8 Äq.), N-Methyl-2-pyrrolidon (NMM) (16 Äq.) in N,N-Dimethylformamid (DMF) in den Reaktionsspritzen zugegeben, je 60 Minuten geschüttelt, filtriert und gewaschen. Anschließend wurden die Reaktionsansätze wieder vereint, filtriert, gewaschen und anschließend die temporäre Schutzgruppe abgespalten. Der Reaktionsansatz wurde wieder auf 5 Reaktionsspritzen verteilt. Die simultane Kupplung in fünf separaten Reaktionsspritzen und anschließender Abspaltung der temporären Schutzgruppen wurde insgesamt 8-mal wiederholt. Zum Abspalten der permanenten Schutzgruppen wurde eine Lösung aus Trifluoressigsäure (TFA): Triisopropylsilan (TIS):H₂O (95:2,5:2,5, 4 ml) zu den vereinten Produkten gegeben und 2 Stunden geschüttelt.

[0079] Die getrockneten Kügelchen (Beads) der Peptidbibliothek wurden durch ein feinmaschiges Sieb (100 µm) auf einen mit doppelseitig-klebendem, elektrisch-leitfähigem Klebeband (3M™ elektrisch leitfähiges Klebeband XYZ-Achse 9713) beschichteten Glasobjektträger aufgetragen, sodass sich ein regelmäßiges Muster aus immobilisierten Beads ergibt.

[0080] Der Objektträger mit den immobilisierten Partikeln der Peptidbibliothek wurde mit 1:10.000 verdünntem Anti-FLAG®-M2-Antikörper in PBS/BSA-Puffer (10 ml) über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die immobilisierten Peptide mit PBST/BSA-Pufferlösung gewaschen. Im zweiten Schritt wurden die Peptide mit 1:1.000 verdünntem Anti-Maus markiert mit Atto-633 in PBST/BSA-Puffer (10 ml) 2 Stunden inkubiert und anschließend mit PBST/BSA-Pufferlösung gewaschen (10 Minuten).

[0081] Die Bestimmung der Fluoreszenz wurde mittels eines Microarray-Scanners (λ_{ex} = 635 nm, Red-Emission-Filter, λ_{ex} = 532 nm, Green-Emission-Filter) durchgeführt. Es wurde die Fluoreszenz nach Inkubation des primären und sekundären Antikörpers, wobei letzterer den Fluoreszenzmarker trägt, analysiert.

[0082] Nachdem die Fluoreszenz der mit Atto-633 markierten, gebundenen Antikörper gemessen wurde, wurde der Objektträger in Acetonitril/Trifluoressigsäure AcN:TFA (0,1%ig in H₂O, 3:7) geschüttelt, sodass die Antikörper abgewaschen wurden. Abschließend wurde mit der AcN:TFA-Lösung und dann mit H₂O gewaschen und der Objektträger getrocknet. Als MALDI-Matrix wurde in allen Versuchsdurchführungen α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (CHCA) verwendet. Eine CHCA-Lösung (5 ml, 10 µg/ml in AcN:TFA, 0,1%ig in H₂O, 2:1) wurde mittels Airbrush-Pistole auf den trockenen Objektträger mit immobilisierten Beads aufgetragen und auskristallisiert. Der Sprühkopf war ca. 14 cm von dem Träger entfernt und die Sprühstärke wurde in allen Versuchsdurchführungen mit einem Druck von 2,5 bar gleich eingestellt. Die immobilisierten Peptide wurden für 2 Stunden in Ammoniak-Atmosphäre vom Harz (den Mikropartikeln) abgespalten.

[0083] In einem MALDI-TOF-MS Experiment wurden Spektren im Massenbereich (m/z) 700 bis 2.000, ausgewählter Peptide aufgenommen. Es wurden positive Binder und negative Binder anhand der zuvor gemessenen Fluoreszenz identifiziert, wobei erstere nach stärkster Fluoreszenzintensität und letztere randomisiert ausgewählt wurden. Die Sequenzierung erfolgte über die Signalzuordnung der Abbruchsequenzen.

[0084] Unten folgt nun eine Auflistung aller Peptidsequenzen der gefundenen Proteinbinder vom N-Terminus zum C-Terminus: Fett markiert sind das Strukturmotiv des Epitops DYKXXD, ein Teilmotiv (3/4 des Strukturmotivs) oder ein inverses

[0085] Teilmotiv. Peptidsequenzen, die weder das Strukturmotiv noch ein Teilmotiv beinhalten, sind eingerückt.

Fortlaufende Nummer	Peptidsequenz des Proteinbinders
*1	DYKDTDID
*2	YDDYKDYD
*3	DDYKTKDY
4	TYKDIDYY
5	DYIDYDYK
*6	YDDYKTDD
7	YYDIDITY
8	YYKDYDTD
9	YYDYYIID
10	DYKDYKDT
11	IYIDYKDI
12	YKDTDTTY
*13	DYKKYDII
14	DYKDYYYYD
15	IYDIITTI
16	YKYDDIKT
17	DYDIYIYD
*18	DYKYDDYD
19	DYDIIYID
20	YYDYIIID
*21	DYKYYDYT
22	DYDIYIDT
*23	DYKDYDKD
*24	YTDYKYID
25	YYDIYITD
26	YYDIIYD
*27	IDYKDTDY
28	YYDIDIIT
29	YYDIDIYI
30	YYDIIYDT
31	IYDYIYTD
32	YYDYYTID
33	DYDYITIT

[0086] Nun folgt eine Auflistung aller Peptidsequenzen der Nicht-Binder vom N-Terminus zum C-Terminus. X bezeichnet eine Position die unbekannt ist.

Fortlaufende Nummer	Peptidsequenz des Nicht-Binders
34	YKITDYKT
35	IYYKKDDY
36	YDIYYTTT
37	TDIYDIDT
38	ITYYTKKK
39	DKDIYKYD
40	IDIDTDYY
41	KYTDDKYX
42	IYIIIDDI
43	TTYDDIY
44	DDIKTTKY
45	TDIKTKYY
46	YDKITDKI
47	ITITTTYK
48	IDKYIIKI
49	YDITIYYI
50	IYIDIDII
51	KYDKIYIY
52	XXIYITY
53	DITTDYI
54	XXTYTTTT
55	KIYDTYIY
56	IYTYTIKD
57	YKKDTKKY
58	IYIKKKTD
59	IYTDDDTK
60	YYYKDKKY
61	TYDKYKDI

[0087] Das Strukturmotiv DYKXXD, welches kritisch für die FLAG-Peptid-Antikörper-Interaktion ist, kam 10-mal (mit * markiert) in den 33 Proteinbindern vor. Das Strukturmotiv DYKD kam 7-mal in den 33 Proteinbindern vor. Als Teilmotiv wurden alle Struktur motive gewertet, die mind. 3 von 4 der kritischen Bindungspositionen des Strukturmotivs DYKXXD beinhalteten. In Summe zeigten 14 Proteinbinder ein oder auch zwei Teilmotive in der Peptidsequenz. Das Teilmotiv DYK kam dabei 5-mal vor, wovon 2-mal durch Wiederholung in einer Sequenz und einmal in einer Sequenz, in der auch das Teilmotiv DYXXD vorkam. Das Teilmotiv YKXXD kam ebenfalls 4-mal vor und das Teilmotiv DYXXD kam insgesamt 5-mal in den Sequenzen der Proteinbinder vor.

[0088] Es konnten ca. 12.000 Peptide in zwei Bindungsassays zur Untersuchung ihrer Peptid-Protein-Interaktion mit Anti-FLAG® M2 Antikörpern aufgenommen werden und 33 Peptide als Binder identifiziert und sequenziert werden. Unter den sequenzierten Proteinbindern trugen 30% das komplette Strukturmotiv des Epitops DYKXXD, wohingegen bei der Negativkontrolle keines der Peptide das Strukturmotiv beinhaltete.

Vorteile

[0089] 1. Wissenschaftlich: Es können sehr schnell und einfach selektive Bindungsmoleküle gefunden werden. Diese sind für zahllose Anwendungen geeignet, die hier nicht aufzählbar sind.

[0090] 2. Wirtschaftlich: Abgesehen von den aus den wissenschaftlichen Anwendungen indirekt abgeleiteten wirtschaftlich verwertbaren Produkten, erscheint die Generierung von pharmakologisch interessanten Wirkstoffen am wichtigsten. Ein neues Pharmaprodukt kann theoretisch Milliardenumsätze generieren. Auch die Entwicklung von Bindemolekülen für das sog. „Downstream-Processing“ in der Biotechnologie, also die Aufreinigung von Kulturüberständen und Bioreaktorflüssigkeiten könnte eine lukrative Anwendung sein. Da inzwischen rund 50% aller neuen Medikamente Antikörper (Proteine) darstellen, wird deren technische Aufreinigung immer wichtiger.

[0091] Wenngleich hierin spezifische Ausführungsformen dargestellt und beschrieben worden sind, liegt es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, die gezeigten Ausführungsformen geeignet zu modifizieren, ohne vom Schutzbereich der vorliegenden Erfindung abzuweichen. Die nachfolgenden Ansprüche stellen einen ersten, nicht bindenden Versuch dar, die Erfindung allgemein zu definieren.

Bezugszeichenliste

AcOH	Essigsäure
AcN	Acetonitril
Äq.	Äquivalent
AS	Aminosäure
Boc	tert-Butoxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin
CHCA	α -Cyano-4-hydroxycimtsäure
Da	Dalton
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMAP	N,N-Dimethylpyridin-4-amin
DMF	N,N-Dimethylformamid
EtOH	Ethanol
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1, 1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HCTU	2-(6-Chlor-1H-benzotriazol-1-yl)-1, 1,3,3-tetramethylaminium-hexafluorophosphat
HMBA	4-(Hydroxymethyl)benzoesäure
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MS	Massenspektrometrie
NMM	4-Methylmorpholin
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
OBOC	One-bead-one-compound
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBST	PBS mit 0,1 Vol-% Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
tBu	tert-Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
TIS	Triisopropylsilan
TOF	Time-of-flight
Aminosäuren	sind nach IUPAC-IUB Ein- und Dreibuchstabencode benannt

**Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO ST.25. Dieses kann sowohl
in DEPATISnet als auch im DPMAregister aufgerufen werden.**

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Lam, K. S.; Salmon, S. E.; Hersh, E. M.; Hruby, V. J.; Kazmierski, W. M.; Knapp, R. J. Nature 1991, 354, 82 [0008]
- Kit. S. Lam, Michal Lebl, and Viktor Krchnak: The „One-Bead-One-Compound“ Combinatorial Library Method“ Chem. Rev. 1997, 97, 411-448 [0008]
- Hartmann, L. and Börner, H. G. (2009), Precision Polymers: Monodisperse, Monomer-Sequence-Defined Segments to Target Future Demands of Polymers in Medicine. Advanced Materials, 21: 3425-3431 [0043]

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Arrays von Mikropartikeln einer kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek auf einer Grundplatte, umfassend:
 - Anpressen eines Siebes auf die Grundplatte, wobei eine Maschenweite des Siebes so ausgewählt ist, dass je Masche genau ein Mikropartikel der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek in das Sieb eindringen kann;
 - Auftragen der Mikropartikel der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek auf das Sieb, sodass die aufgetragenen Mikropartikel in die Maschen des Siebes eingetragen werden;
 - Fixieren der in die Maschen des Siebes eingetragenen Mikropartikel der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek auf der Grundplatte; und
 - Abnehmen des Siebes von der Grundplatte.
2. Verfahren nach Anspruch 1, weiter umfassend
 - Entfernen von nicht fixierten Mikropartikeln der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Fixieren durch ein Andrücken der in die Maschen des Siebes eingetragenen Mikropartikel an die Grundplatte erfolgt oder mit Hilfe eines zwischen Grundplatte und Mikropartikeln angeordneten Klebers erfolgt oder ein Erwärmen der Grundplatte umfasst.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der Kleber in Form eines Klebefilmes oder in Form eines auf der Grundplatte angeordneten doppelseitigen Klebebandes bereitgestellt wird.
5. Mikropartikeltragendes Substrat zur synchronen Handhabung einer Vielzahl von Mikropartikeln einer kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek, umfassend eine Grundplatte mit darauf befestigten Mikropartikeln der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek, wobei die Mikropartikel der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek auf der Grundplatte zumindest abschnittsweise ein Array ausbilden, wobei ein Abstand der Mikropartikel zueinander zumindest einem Durchmesser von die Maschen eines Siebes ausbildenden Drähten entspricht.
6. Mikropartikeltragendes Substrat nach Anspruch 5, wobei die Mikropartikel der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek selbstklebend auf der Grundplatte haften.
7. Mikropartikeltragendes Substrat nach Anspruch 5, wobei die Mikropartikel der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek vermittelt über eine Kleberschicht auf der Grundplatte haften.
8. Mikropartikeltragendes Substrat nach einem der Ansprüche 5 bis 7, wobei die Grundplatte Kantenmaße eines Mikroskopie-Objektträgers oder Kantenmaße einer Mikrotiterplatte aufweist.
9. Mikropartikeltragendes Substrat nach einem der Ansprüche 7 oder 8, wobei die Grundplatte ein Mikroskopie-Objektträger ist.
10. Mikropartikeltragendes Substrat nach Anspruch 7 bis 9, wobei die Kleberschicht ein doppelseitiges Klebeband umfasst.
11. Mikropartikeltragendes Substrat nach Anspruch 10, wobei das doppelseitige Klebeband elektrisch leitfähig ist.
12. Mikropartikeltragendes Substrat nach einem der Ansprüche 5 bis 11, wobei die Mikropartikel der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek sphärische und bevorzugt monodispers vorliegende Mikropartikel sind.
13. Verwendung eines mikropartikeltragenden Substrates nach einem der Ansprüche 5 bis 12 in einem Bindungsassay zur Identifikation von solchen Mikropartikeln der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek, die mit einer Zielsubstanz eine Bindung eingehen, wobei ein die Zielsubstanz bindendes Mikropartikel der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek im Ergebnis des Bindungsassays eine Markierung trägt und an Hand dieser Markierung im Array erkennbar ist.
14. Verwendung eines mikropartikeltragenden Substrates nach Anspruch 13, wobei die Markierung ausgewählt ist unter: einer optisch messbaren, einer fluoreszenzspektrometrisch messbaren, einer radiologisch

messbaren, einer Raman-spektroskopisch messbaren, einer Lumineszenz-basierenden, einer Chemolumineszenz-basierenden, einer Biolumineszenz-basierenden, einer enzymverstärkten, und/oder einer Partikel-basierenden Markierung.

15. Verwendung eines mikropartikeltragenden Substrates nach Anspruch 13 oder 14, wobei das auf der Grundplatte befestigte und eine Markierung aufweisende Mikropartikel der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen wird.

16. Verwendung eines mikropartikeltragenden Substrates nach Anspruch 15, wobei die massenspektrometrische Analyse eine Sequenzanalyse einer auf dem Partikel kombinatorisch synthetisierten Verbindung umfasst.

17. Verwendung eines mikropartikeltragenden Substrates nach einem der Ansprüche 13 bis 16, wobei die kombinatorische One-Bead-One-Compound-Bibliothek Peptide, Peptidanaloga, Nukleotide, Nukleotidanaloga oder andere Monomer-Sequenz-definierte Polymere umfasst.

18. Verwendung eines mikropartikeltragenden Substrates nach einem der Ansprüche 5 bis 12 in einem Bio-interaktionsassay; während eines Waschschruttes; während eines markierungsspezifischen Scans; während eines Abspaltens der kombinatorisch synthetisierten Verbindung vom Partikel; während einer Abscheidung einer massenspektrometrisch genutzten Matrix auf und/oder in der Nähe einer Vielzahl von Mikropartikeln der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek; und/oder während einer massenspektrometrischen Analyse eines die Markierung tragenden Mikropartikels der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek.

19. Screening-Methode für eine kombinatorische One-Bead-One-Compound-Bibliothek mittels optischer Onchip-Detektion und massenspektrometrischer Sequenzierung, umfassend:

- Bereitstellen der kombinatorischen One-Bead-One-Compound-Bibliothek in Form eines mikropartikeltragenden Substrates nach einem der Ansprüche 5 bis 12;
- Inkubieren des mikropartikeltragenden Substrates mit einer Lösung, umfassend ein fluoreszenzmarkiertes Molekül;
- fluoreszenzoptisches Screening der mit dem partikeltragenden Substrat bereitgestellten Mikropartikel, umfassend die kombinatorische One-Bead-One-Compound-Bibliothek;
- Identifizieren einer Position eines das fluoreszenzmarkierte Protein aufweisenden Mikropartikels;
- individuelles massenspektrometrisches Ermitteln einer Sequenz einer kombinatorisch synthetisierten Verbindung an einer Position des identifizierten fluoreszenzmarkierten Mikropartikels.

20. Screening-Methode nach Anspruch 19, weiter umfassend:

- Erkennen einer Autofluoreszenz eines Mikropartikels auf dem mikropartikeltragenden Substrat vor der Inkubation mit der Lösung des fluoreszenzmarkierten Moleküls.

21. Screening-Methode nach Anspruch 19 oder 20, weiter umfassend:

- Untersuchen der Mikropartikel des mikropartikeltragenden Substrats hinsichtlich des Vorliegens einer Mehrfachmarkierung oder eines Signalverhältnisses unterschiedlicher Markierungen

22. Screening-Methode nach einem der Ansprüche 19 bis 21, weiter umfassend:

- Regenerieren einer Oberfläche von Mikropartikeln des mikropartikeltragenden Substrats und erneutes Inkubieren des mikropartikeltragenden Substrats mit einer weiteren Lösung eines fluoreszenzmarkierten Moleküls (anderen Reagenzien)

23. Screening-Methode nach einem der Ansprüche 19 bis 22, weiter umfassend:

- Untersuchen der Mikropartikel des mikropartikeltragenden Substrats mittels Dissoziations- oder Inhibitionsversuchen und differentieller Auswertung von Markierungssignalen.

Es folgen 7 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

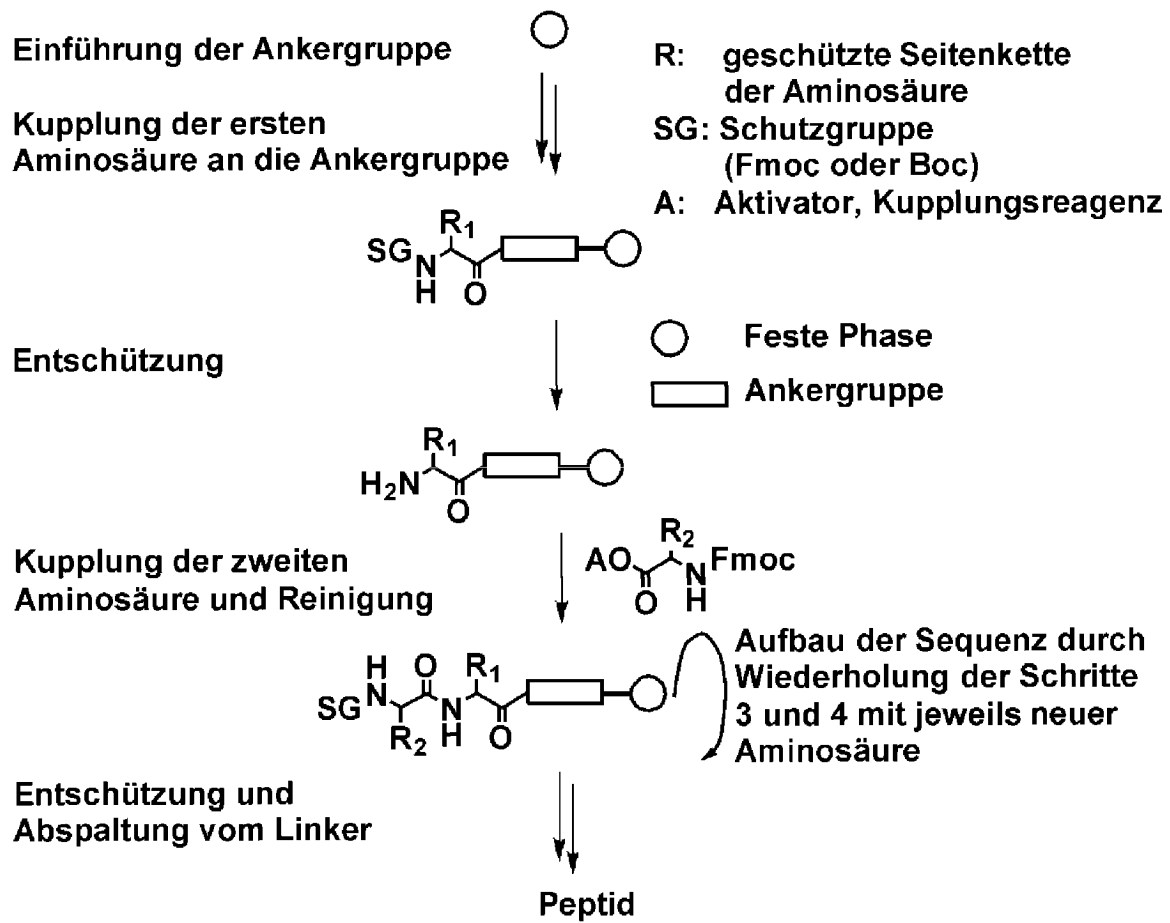


FIG. 1

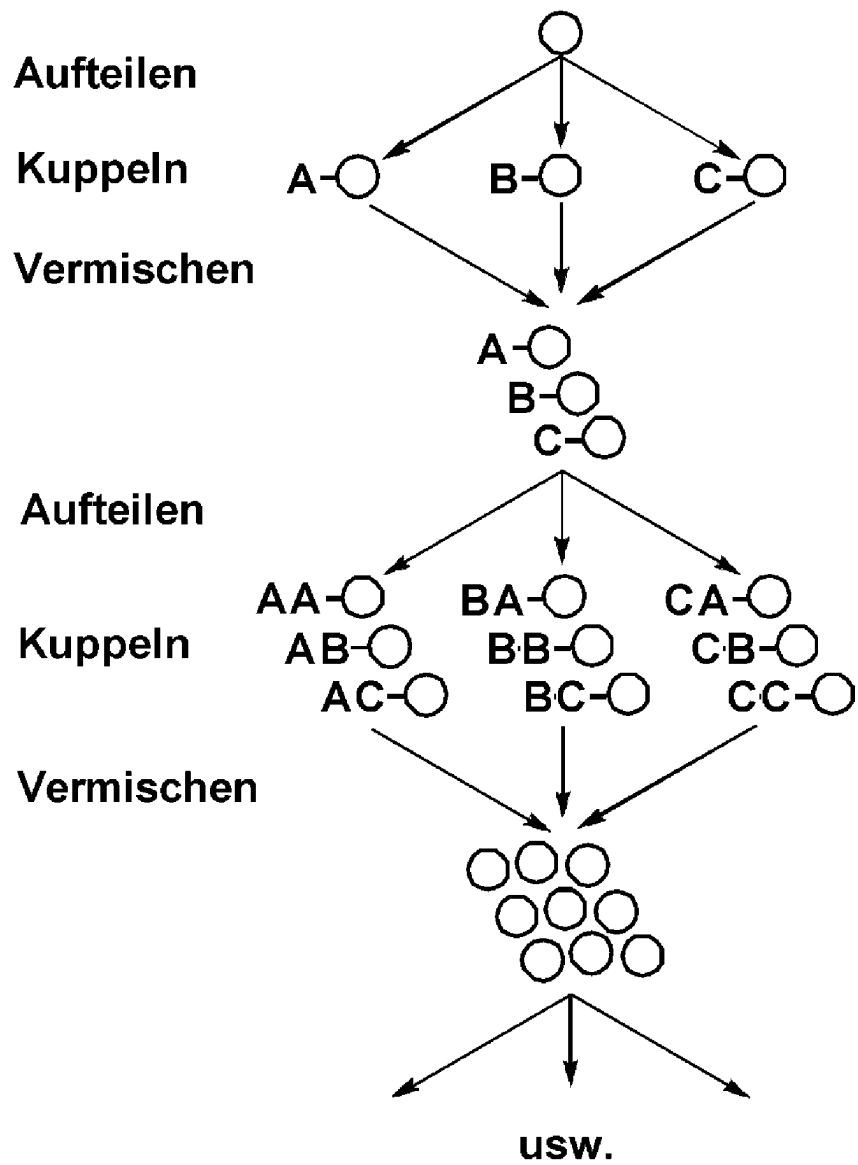


FIG. 2



FIG. 3

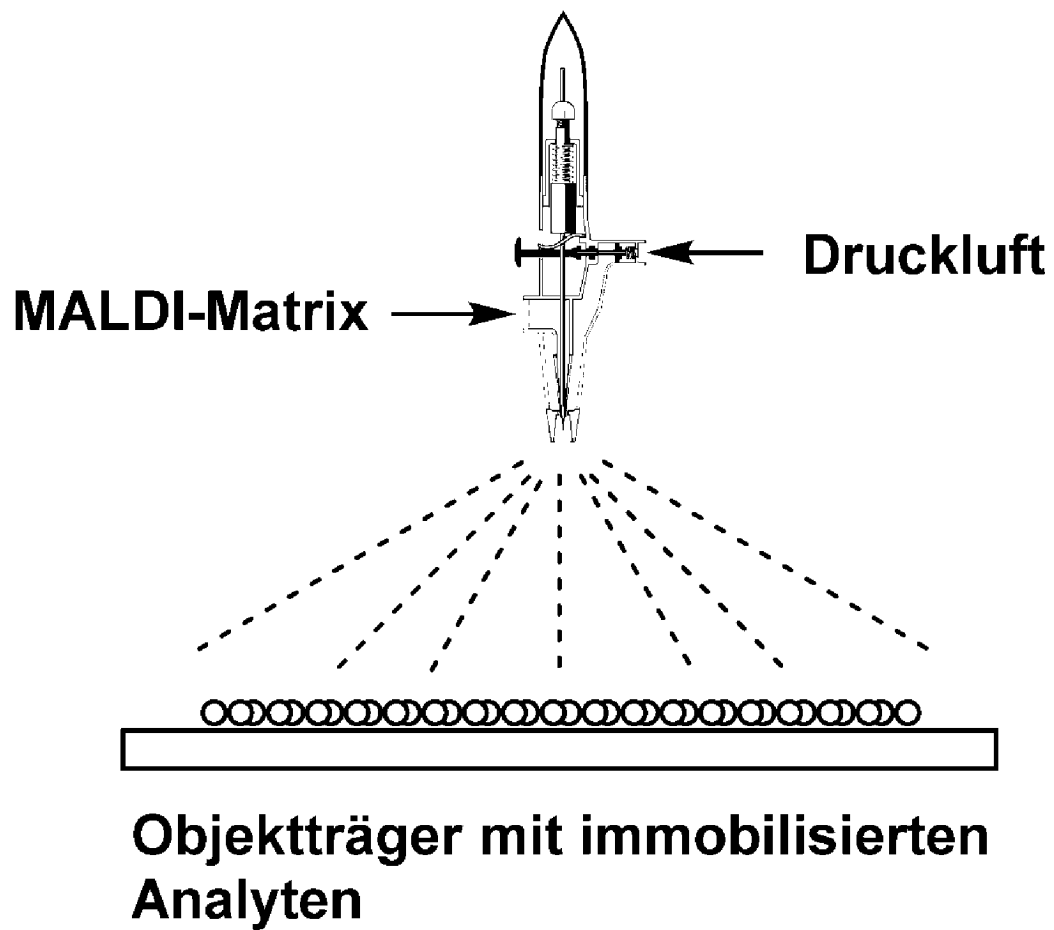


FIG. 4

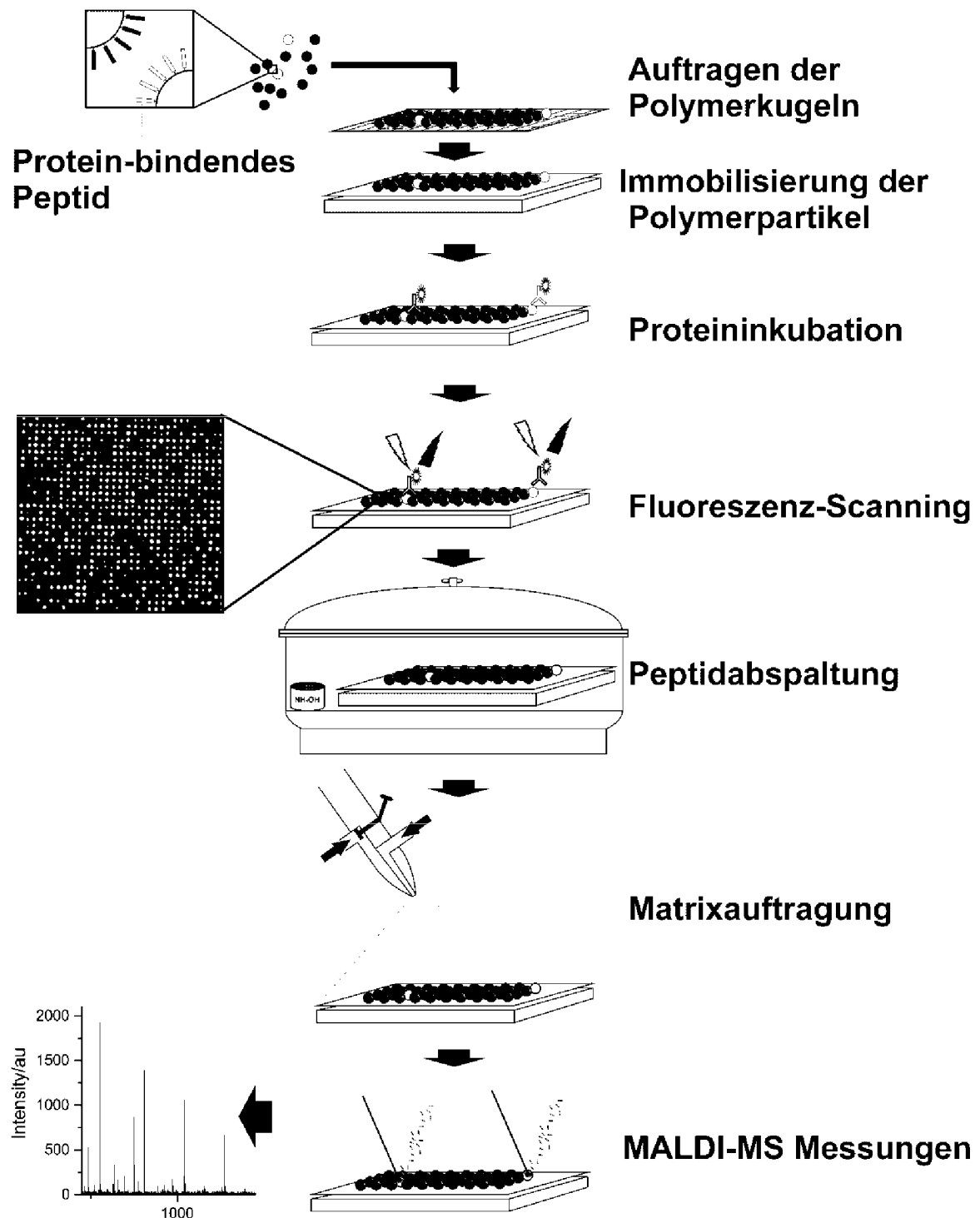


FIG. 5

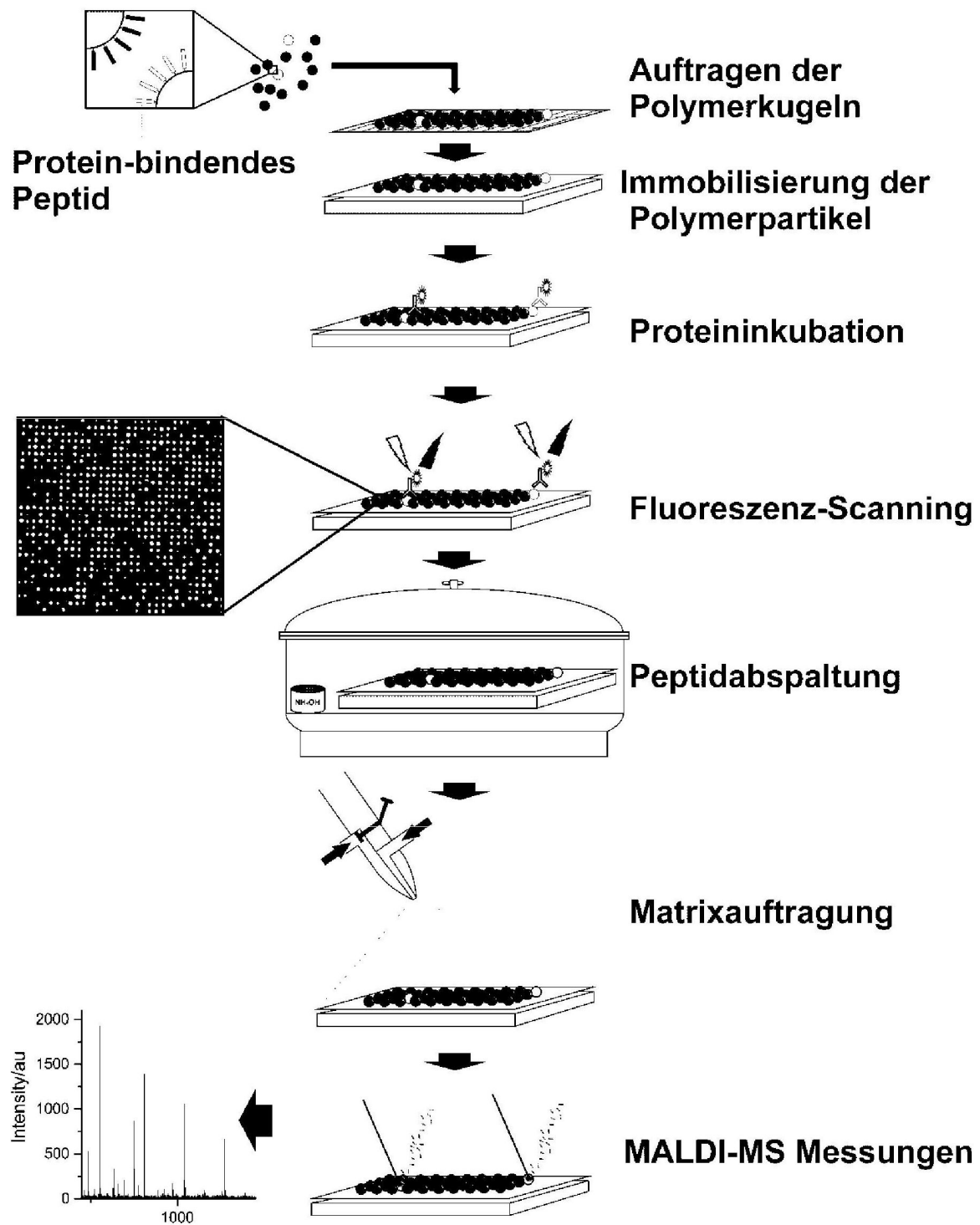


FIG. 5

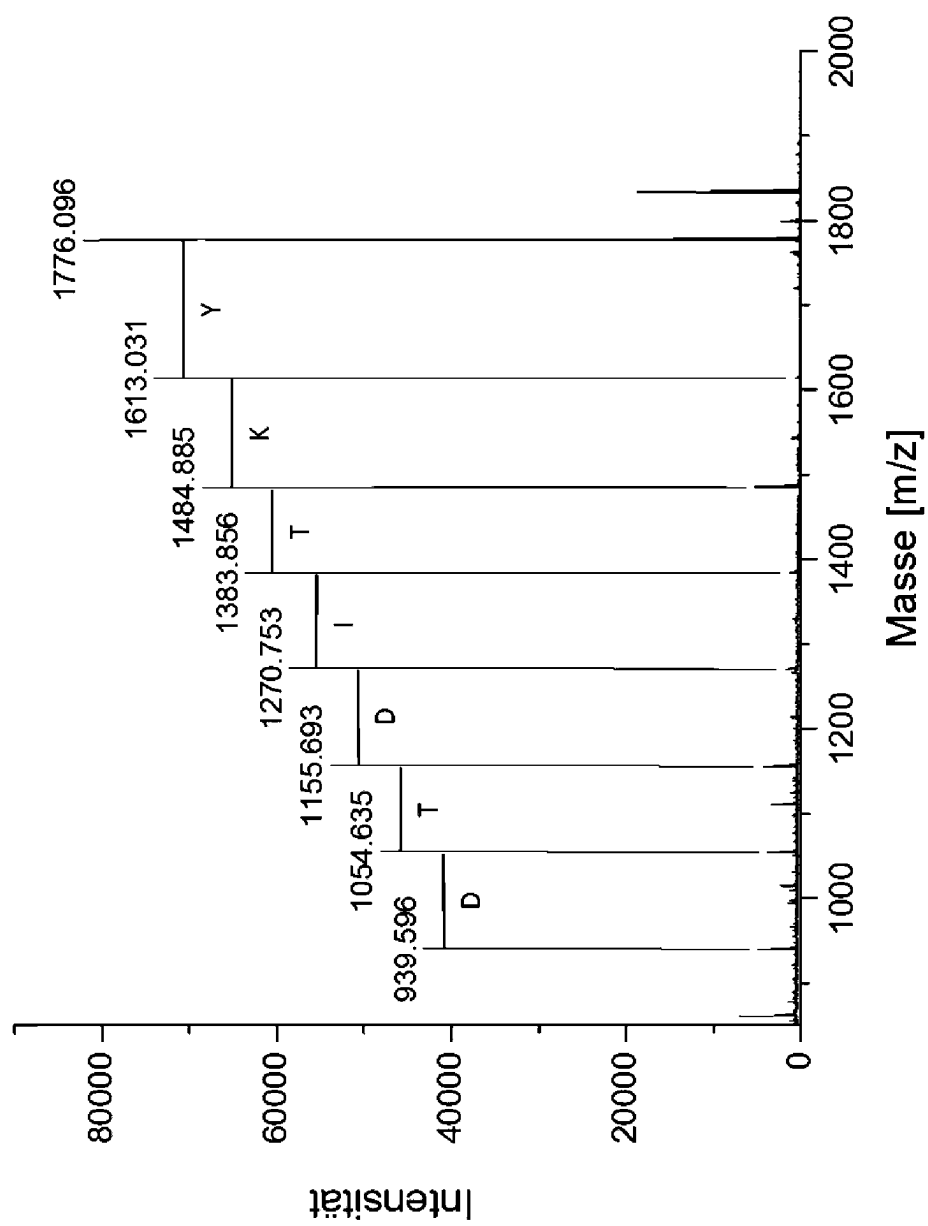


FIG. 7