



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 36 241 T2** 2007.06.14

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 875 759 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 36 241.1**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 401 455.5**

(96) Europäischer Anmeldetag: **15.06.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **04.11.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **25.10.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.06.2007**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/68** (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/538 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

79622 P **27.03.1998** **US**

70131 **29.04.1998** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Transition Therapeutics Inc., Toronto, Ontario, CA

(72) Erfinder:

**Hindsgaul, Ole, Edmonton, Alberta T6C 0X3, CA;
Schriemer, David C., Edmonton, Alberta T5M 2G8,
CA**

(74) Vertreter:

**Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183
Wiesbaden**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Sichtung einer Bibliothek von chemischen Verbindungen**

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

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

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft Verfahren zum Screenen von Verbindungsbibliotheken, wie Verbindungsbibliotheken, die unter Verwendung von Techniken der kombinatorischen Chemie erzeugt wurden. Die Verfahren dieser Erfindung verwenden Frontalchromatographie in Kombination mit Massenspektrometrie zum Screenen einer Bibliothek von Verbindungen, um diejenigen Mitglieder der Bibliothek, die an einen Zielrezeptor binden, zu identifizieren und zu klassifizieren. Die Verfahren dieser Erfindung erlauben auch das rasche Screenen einer Verbindungsbibliothek, um zu bestimmen, ob irgendein Mitglied der Bibliothek eine stärkere Affinität für den Zielrezeptor relativ zu einer zuvor ausgewählten Indikatorverbindung hat.

Literaturstellen

[0002] Die folgenden Veröffentlichungen, Patente und Patentanmeldungen werden in dieser Anmeldung mit hochgestellten Zahlen zitiert:

- ¹ K.S. Lam, *Anti-Cancer Drug. Des.* 1997, 12, 145-167.
- ² P.M. Sweetnam et al., In *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, M.E. Wolff, Hrsg., John Wiley & Sons: New York, 1995, S. 697-731.
- ³ R.H. Griffey et al., In *Proceedings of the 45th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Palm Springs, CA, 1.-5. Juni 1997, S. 40
- ⁴ L. Fang et al., In *Proceedings of the 45th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Palm Springs, CA, 1.-5. Juni 1997, S. 401.
- ⁵ Y.-H. Chu et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 7827-7835.
- ⁶ Y.-Z. Zhao et al., *J. Med. Chem.* 1997, 40, 4006-4012.
- ⁷ Y.F. Hsieh et al., *J. Mol. Div.* 1996, 2, 189-196.
- ⁸ R.W. Nelson et al., *Anal. Chem.* 1995, 67, 1153-1158.
- ⁹ D.C. Schriemer und L. Li, *Anal. Chem.* 1996, 68, 3382-3387.
- ¹⁰ PCT/US97/07964 (internationale Veröffentlichungsnr. WO 97/43641), veröffentlicht am 20. November 1997, mit dem Titel "Molecular Diversity Screening Device and Method".
- ¹¹ R. Wieboldt et al., *Anal. Chem.* 1997, 69, 1683-1691.
- ¹² R.B. van Breemen et al., *Anal. Chem.* 1997, 69, 2159-2164.
- ¹³ M.L. Nedved et al., *Anal. Chem.* 1996, 68, 4228-4236.
- ¹⁴ PCT/US95/03355 (internationale Veröffentlichungsnr. WO 95/25737), veröffentlicht am 28. September 1995, mit dem Titel "Method for Identifying Members of Combinatorial Libraries".
- ¹⁵ PCT/EP97/02215 (internationale Veröffentlichungsnr. WO 97/43301), veröffentlicht am 20. November 1997, mit dem Titel "Identification of Members of Combinatorial Libraries by Mass Spectrometry".

[0003] Alle der obigen Veröffentlichungen, Patente und Patentanmeldungen sind durch Bezugnahme in gleichem Maße vollständig hierin aufgenommen, als ob zu jeder einzelnen Veröffentlichung, jedem einzelnen Patent oder jeder einzelnen Patentanmeldung speziell und individuell durch Bezugnahme festgestellt worden wäre, daß sie bzw. es vollständig hierin aufgenommen ist.

Stand der Technik

[0004] In den letzten Jahren wurde eine große Zahl von Techniken der kombinatorischen Chemie entwickelt, die die rasche Synthetisierung enormer Bibliotheken diverser chemischer Verbindungen erlauben.¹ In der kombinatorischen Chemie wird typischerweise eine Reihe chemischer Reaktionen durchgeführt, wobei in jeder Stufe eine Mehrzahl von Reagenzien verwendet wird, um eine Bibliothek von Verbindungen zu erzeugen. Solche Techniken können die Entdeckung neuer Verbindungen mit biologisch nützlichen Eigenschaften potentiell stark beschleunigen, indem sie große Sammlungen diverser chemischer Verbindungen für das biologische Screenen bereitstellen.

[0005] Diese Fähigkeit, unter Verwendung von Techniken der kombinatorischen Chemie rasch große Sammlungen von Verbindungen zu erzeugen, hat einen Bedarf nach neuen Verfahren zum Screenen von Verbindungsbibliotheken geschaffen. Der traditionelle Ansatz des einzelnen Screenens jeder Verbindung in einem Test, um die Verbindungen mit der gewünschten biologischen Aktivität zu identifizieren, ist aufgrund von Be-

schränkungen hinsichtlich Zeit und Ressourcen nicht mehr praktikabel. Somit besteht ein Bedarf nach neuen Verfahren, die das rasche Screenen von Verbindungsbibliotheken erlauben.

[0006] In dieser Hinsicht wurde über verschiedene Verfahren zum Screenen von Verbindungsbibliotheken berichtet. Typischerweise umfassen diese Screeningverfahren die Verwendung von Zielrezeptoren, die mit fluoreszierenden oder anderen Reportergruppen markiert wurden.² In diesen Verfahren wird die Verbindungsbibliothek, die typischerweise an eine Harzperle gebunden ist, dem markierten Zielrezeptor ausgesetzt, und diejenigen Mitglieder, die an den markierten Zielrezeptor binden, werden identifiziert und physikalisch getrennt. Der bestimmte Ligand, der an den Zielrezeptor bindet, wird dann identifiziert. In vielen dieser Techniken sind komplizierte Verfahren erforderlich, um einzelne Mitglieder der Bibliothek zu verfolgen. Beispielsweise werden während der Synthese der kombinatorischen Bibliothek oft codierte Markierungen hinzugefügt, um die anschließende Bestimmung der Struktur der einzelnen Mitglieder zu ermöglichen. Alternativ können kombinatorische Bibliotheken in einem Array hergestellt werden, und die einzelnen Mitglieder der Bibliothek können anschließend anhand ihrer Position in dem Array identifiziert werden. Obwohl solche Verfahren effektiv sein können, ist das Erfordernis, einzelne Mitglieder der Bibliothek während ihrer Synthese und dem Screening zu verfolgen, recht aufwendig und beschränkt oft den Typ der Syntheseverfahren, die verwendet werden können. Zusätzlich erfordern viele dieser Techniken, daß die Syntheseverfahren auf einer Festphase durchgeführt werden, wodurch die Syntheseverfahren und Reagenzien, die verwendet werden können, weiter beschränkt werden.

[0007] Alternativ dazu entwickelt sich die Massenspektrometrie als ein wichtiges Werkzeug für die Untersuchung kombinatorischer Bibliotheken. Bislang wurde die Massenspektrometrie verwendet, um die Qualität von Bibliotheken zu bestimmen^{3,4} und hat in Verbindung mit molekularen Erkennungstechniken einigen Erfolg bei der Isolation und Charakterisierung aktiver Bibliotheksverbindungen ermöglicht.⁵⁻¹⁵ Typischerweise wird beim Screenen von Verbindungsbibliotheken hinsichtlich biologisch aktiver Mitglieder Massenspektrometrie in Kombination mit einem "Einfang- und Freisetzung-" Verfahren verwendet. In diesem Verfahren werden dem Zielrezeptor, der oft auf einem festen Träger immobilisiert ist, Verbindungsgemische präsentiert, und die resultierenden Ligand-Rezeptor-Komplexe werden von den ungebundenen Mitgliedern der Bibliothek getrennt. Nach der Trennung werden die Ligand-Rezeptor-Komplexe typischerweise denaturiert, beispielsweise mit einem Lösungsmittel, und das Lösungsmittelgemisch, welches die zuvor gebundenen starker Affinität zu erlauben.

[0008] Beispielsweise wurde Ultrafiltration in Kombination mit Elektrospray-Massenspektrometrie verwendet, um kombinatorische Bibliotheken zu screenen.¹⁰⁻¹² In diesem Verfahren wird es in einer Verbindungsbibliothek vorliegenden Liganden ermöglicht, an einen Rezeptor zu binden, und die resultierenden Ligand-Rezeptor-Komplexe werden durch Ultrafiltration gereinigt. Die Ligand-Rezeptor-Komplexe werden dann unter Verwendung eines Lösungsmittels, wie Methanol, getrennt, und die zuvor gebundenen Liganden werden mit einem Elektrospray-Massenspektrometer detektiert.

[0009] Auch die Affinitäts-Kapillarelektroforese (ACE) wurde mit der Massenspektrometrie kombiniert, um kombinatorische Bibliotheken zu screenen.⁵ In diesem Verfahren wird ACE verwendet, um Ligand-Rezeptor-Komplexe von ungebundenen Liganden zu trennen, und Massenspektrometrie wird verwendet, um die Liganden mit starker Affinität zu identifizieren.

[0010] In ähnlicher Weise wurden Verbindungsbibliotheken unter Verwendung von Affinitätschromatographie in Kombination mit Massenspektrometrie gescreent. Beispielsweise beschreibt die WO 907/43301 ein Verfahren zum Charakterisieren der Mitglieder einer kombinatorischen Bibliothek, wobei das Verfahren Affinitätsselektion in Kombination mit Massenspektrometrie verwendet. Insbesondere werden die Mitglieder der Bibliothek mit einer interessierenden Domäne in Kontakt gebracht, um Bindung, d.h. die Bildung eines Komplexes, zu ermöglichen. Nach dem Binden wird der Komplex von den ungebundenen Mitgliedern der Bibliothek getrennt, typischerweise durch Auswaschen der ungebundenen Mitglieder aus der die Komplexe enthaltenden Säule. Die Komplexe werden dann behandelt, um die gebundenen Komponenten der Bibliothek zu eluieren, und die eluierten Komponenten werden mittels Massenspektrometrie analysiert. Die beschriebenen Elutionsverfahren umfassen die Verwendung von Verdrängern, chaotropen Mitteln, pH-Elution, Salzgradienten, Temperaturgradienten, organischen Lösungsmitteln, selektiven Denaturierungsmitteln und Detergenzien. Unter Verwendung solcher Verfahren werden die schwach gebundenen Mitglieder der Bibliothek wie man sagt erst eluiert und mittels Massenspektrometrie analysiert, gefolgt von der Elution der stärker gebundenen Mitglieder.

[0011] Mit den "Einfang- und Freisetzung-" Verfahren zum Screenen von Verbindungsbibliotheken, über die zuvor berichtet wurde, sind mehrere Nachteile verknüpft. Erstens kann das Verfahren, das zum "Freisetzen" der gebundenen Liganden aus den Ligand-Rezeptor-Komplexen verwendet wird, das Bindungsprofil für die

verschiedenen gebundenen Liganden verändern, was zu einer falschen Angabe der Bindungsstärke führt. Beispielsweise kann unter Verwendung eines pH-Gradienten zur Freisetzung der gebundenen Mitglieder aus der Bibliothek der elektronische Charakter der Bindungsstelle auf dem Rezeptor verändert werden, was dazu führt, daß Liganden, die unter physiologischen Bedingungen stark gebunden sind, vorzeitig freigesetzt werden. So kann die Charakterisierung der Bindungsstärke für verschiedene Liganden auf Basis ihrer relativen Freisetzungzeit irreführend sein, wenn sich die Freisetzungsbedingungen von den Bindungsbedingungen unterscheiden. Dementsprechend können diese Verfahren die aktivsten Mitglieder einer Verbindungsbibliothek möglicherweise nicht exakt identifizieren. Zusätzlich können bestimmte Bedingungen, die für die Freisetzung von Verbindungen verwendet werden, wie z.B. pH-Gradienten, den Rezeptor irreversibel denaturieren, wodurch seine nachfolgende Verwendung zum Screenen von Verbindungsbibliotheken verhindert wird.

[0012] Darüber hinaus wird, wenn "Einfang- und Freisetzungs-" Verfahren verwendet werden, jeder gebundene Ligand typischerweise über eine relativ kurze Zeitdauer freigesetzt, was beispielsweise zu einem Elutionspeak oder einer "-spitze" für jeden Liganden führt. Dementsprechend wird der unter Verwendung solcher Verfahren erzeugte Ablauf beispielsweise durch Massenspektrometrie kontinuierlich überwacht, so daß kein bestimmter Elutionspeak ausgelassen wird. Somit ist die Zahl an Analysen, die unter Verwendung irgendeines bestimmten Massenspektrometers durchgeführt werden kann, beschränkt. Dementsprechend ist es wünschenswert, Verfahren zum Screenen von Verbindungsbibliotheken zu entwickeln, die nicht auf "Einfang- und Freisetzungs-" Verfahren zurückgreifen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0013] Diese Erfindung betrifft Verfahren zum Screenen von Verbindungsbibliotheken. Die Verbindungsbibliotheken können durch irgendwelche Mittel, einschließlich beispielsweise Techniken der kombinatorischen Chemie, oder aus Fermentationsbrühen, Pflanzenextrakten, zellulären Extrakten und dergleichen erzeugt oder erhalten werden. Die Verfahren dieser Erfindung verwenden die Frontalchromatographie (FC) in Kombination mit Massenspektrometrie (MS) zum Screenen der Bibliothek von Verbindungen, um diejenigen Mitglieder der Bibliothek, die an einen Zielrezeptor binden, zu identifizieren und zu klassifizieren.

[0014] Bei der Frontalchromatographie ist ein Zielrezeptor typischerweise auf einem geeigneten festen Trägermaterial immobilisiert und in eine Säule gepackt. Ein mutmaßliche Liganden enthaltendes Gemisch wird dann kontinuierlich durch die Säule infundiert. Liganden mit einer Affinität für den Zielrezeptor binden an die Säule, doch schließlich wird die Kapazität der Säule für jeden Liganden überschritten und die Liganden eluieren bei ihrer Infusionskonzentration oder "brechen durch". Sobald ein Ligand aus der Säule zu eluieren beginnt, ist er kontinuierlich im Ablauf vorhanden. Verbindungen mit geringer oder überhaupt keiner Affinität für den Zielrezeptor brechen im Vergleich zu Liganden mit einer stärkeren Affinität für den Rezeptor früher in den Ablauf durch.

[0015] In der vorliegenden Erfindung wird Massenspektrometrie (MS) verwendet, um den FC-Ablauf kontinuierlich oder intermittierend zu überwachen. Unter Verwendung von MS können die Identität und die Durchbruchzeit für jeden Liganden auf der Säule bestimmt werden. So erlaubt FC-MS die Bestimmung der relativen Affinität jedes Mitglieds der Bibliothek für den Zielrezeptor gegenüber anderen Mitgliedern der Bibliothek unter Ligand-Rezeptor-Bindungsbedingungen. Unter Verwendung der vorliegenden Verfahren kann eine exakte Einstufung der relativen Affinität jedes Mitglieds der Verbindungsbibliothek für den Zielrezeptor sichergestellt werden.

[0016] Da Liganden unter FC-Bedingungen kontinuierlich eluieren, sobald sie die Säule durchbrochen haben, erfordert FC-MS keine konstante Überwachung des Ablaufs. Daher wird eine Mehrzahl von FC-MS-Analysen unter Verwendung eines einzigen Massenspektrometers gleichzeitig durchgeführt, um jede Säule intermittierend zu überwachen.

[0017] Dementsprechend liefert die Erfindung in einem ihrer Verfahrensaspekte ein Verfahren zum Screenen einer Mehrzahl von Verbindungsbibliotheken, um die relative oder absolute Affinität einer Mehrzahl mutmaßlicher Liganden in jeder Bibliothek für einen Zielrezeptor zu bestimmen, wobei das Verfahren folgendes umfaßt:

- (a) Bereitstellen einer Mehrzahl von Verbindungsbibliotheken, wobei jede Bibliothek eine Mehrzahl von mutmaßlichen Liganden umfaßt,
- (b) kontinuierliches Applizieren jeder Verbindungsbibliothek auf eine getrennte Säule, die einen Zielrezeptor umfaßt, unter Frontalchromatographiebedingungen, wodurch der Zielrezeptor kontinuierlich mit der Verbindungsbibliothek in Kontakt gebracht wird, wobei ein Ablauf von jeder Säule erhalten wird, wobei jede Säule 1 pmol bis 10 nmol aktive Stellen des Zielrezeptors pro Säule umfaßt,

(c) intermittierendes Applizieren des Ablaufs von jeder Säule in ein einziges Massenspektrometer zur Bereitstellung von Massenspektren der in dem Ablauf vorhandenen und einen Teil desselben bildenden mutmaßlichen Liganden und

(d) Auswerten der Massenspektren zur Bestimmung einer Durchbruchzeit für jeden der mutmaßlichen Liganden in jeder Verbindungsbibliothek.

[0018] Vorzugsweise umfaßt jede Säule 1 pmol bis 250 pmol aktive Stellen des Zielrezeptors pro Säule.

[0019] In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt das obige Verfahren weiterhin die Stufe, bei der man:
(e) die relative Affinität für jeden der mutmaßlichen Liganden in jeder Bibliothek gegenüber dem Zielrezeptor durch Vergleichen der Durchbruchzeit auf der Säule für jeden der mutmaßlichen Liganden in jeder Bibliothek relativ zu den anderen mutmaßlichen Liganden in derselben Bibliothek bestimmt.

[0020] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt das obige Verfahren weiterhin die Stufe, bei der man:

(f) eine Dissoziationskonstante K_d für einen mutmaßlichen Liganden in einer Verbindungsbibliothek und den Zielrezeptor bestimmt.

[0021] Vorzugsweise werden in dem Verfahren dieser Erfindung, welches eine Mehrzahl von Säulen verwendet, 2 bis etwa 100 Säulen verwendet. Bevorzugter werden 2 bis etwa 50 Säulen verwendet, und noch bevorzugter werden 2 bis etwa 10 Säulen verwendet.

[0022] Vorzugsweise umfaßt jede der Verbindungsbibliotheken, die in dem obigen Verfahren verwendet werden, unabhängig von den anderen weniger als 10.000 mutmaßliche Liganden. Bevorzugter umfaßt die Verbindungsbibliothek 5 bis 100 mutmaßliche Liganden.

[0023] In einer Ausführungsform dieser Erfindung umfaßt jede Verbindungsbibliothek unabhängig von den anderen vorzugsweise mutmaßliche Liganden, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Kohlehydraten, Monosacchariden, Oligosacchariden, Polysacchariden, Aminosäuren, Peptiden, Oligopeptiden, Polypeptiden, Proteinen, Nukleosiden, Nukleotiden, Oligonukleotiden, Polynukleotiden, Lipiden, Retinoiden, Steroiden, Glycopeptiden, Glycoproteinen, Proteoglycanen, synthetischen Analogen oder Derivaten davon, und dergleichen.

[0024] In einer weiteren Ausführungsform umfaßt jede Verbindungsbibliothek unabhängig von den anderen mutmaßliche Liganden, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus synthetischen organischen Kleinmolekülverbindungen.

[0025] Vorzugsweise ist der Zielrezeptor unabhängig von den anderen aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus Proteinen, Glycoproteinen, Glycosaminglycanen, Proteoglycanen, Integrinen, Enzymen, Lectinen, Selectinen, Zelladhäsionsmolekülen, Toxinen, Bakterienpili, Transportproteinen, an der Signalumwandlung oder der Hormonbindung beteiligten Rezeptoren, Hormonen, Antikörpern, Haupthistokompatibilitätskomplexen, Immunglobulin-Superfamilien, Cadherinen, DNA oder DNA-Fragmenten, RNA und RNA-Fragmenten, Vollzellen, Geweben, Bakterien, Pilzen, Viren, Parasiten, Prionen und synthetischen Analogen oder Derivaten davon.

[0026] Weiterhin ist der Zielrezeptor vorzugsweise an einen Festphasenträger gebunden. Bevorzugter ist der Zielrezeptor kovalent an den Festphasenträger gebunden oder er ist über eine Biotin-Avidin- oder Biotin-Streptavidin-Bindung gebunden.

[0027] Vorzugsweise ist der in dieser Erfindung verwendete Festphasenträger aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus Harzperlen, Glasperlen, Siliciumdioxidchips, Siliciumdioxidkapillaren und Agarose.

[0028] In den Verfahren dieser Erfindung wird der Ablauf aus der Säule vor der Analyse durch Massenspektrometrie vorzugsweise mit einem ergänzenden Verdünnungsmittel verdünnt. Vorzugsweise umfaßt das ergänzende Verdünnungsmittel eine große Menge eines organischen Lösungsmittels und eine geringe Menge eines wäßrigen Puffers. Das organische Lösungsmittel ist vorzugsweise aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus Acetonitril, Methanol und Isopropanol.

[0029] Vorzugsweise ist das in den Verfahren dieser Erfindung verwendete Massenspektrometer ein Elektrospray-Massenspektrometer.

[0030] Es kann auch eine Mehrzahl von Säulen verwendet werden, wenn eine Indikatorverbindung verwendet wird. Dementsprechend liefert die Erfindung in noch einem weiteren ihrer Verfahrensaspekte ein Verfahren zum Screenen einer Mehrzahl von Verbindungsbibliotheken, um die relative Affinität einer Mehrzahl mutmaßlicher Liganden für einen Zielrezeptor, bezogen auf eine oder mehrere Indikatorverbindungen, zu bestimmen, wobei das Verfahren folgendes umfaßt:

- (a) Bereitstellen einer Mehrzahl von Verbindungsbibliotheken, die eine Mehrzahl mutmaßlicher Liganden umfassen,
- (b) kontinuierliches Applizieren jeder Verbindungsbibliothek auf eine getrennte Säule, die einen Zielrezeptor umfaßt, unter Frontalchromatographiebedingungen, um die Säule mit der Verbindungsbibliothek ins Gleichgewicht zu setzen, wobei jede Säule 1 pmol bis 10 nmol aktive Stellen des Zielrezeptors pro Säule umfaßt,
- (c) Bereitstellen mindestens einer Indikatorverbindung mit vorbestimmter Affinität für den Zielrezeptor und mit einer vorbestimmten Durchbruchzeit auf jeder Säule in Abwesenheit der Verbindungsbibliothek,
- (d) kontinuierliches Applizieren (i) eines Gemischs, umfassend die Verbindungsbibliothek und die Indikatorverbindung, oder (ii) der Indikatorverbindung auf jede Säule unter Frontalchromatographiebedingungen, um einen Ablauf bereitzustellen,
- (e) Analysieren des Ablaufs aus jeder Säule durch Massenspektrometrie zur Bestimmung einer Durchbruchzeit für die Indikatorverbindung.

[0031] Unter Verwendung dieser Ausführungsform können Verbindungsbibliotheken rasch gescreent werden, um diejenigen Bibliotheken zu identifizieren, die Liganden mit einem vorbestimmten Mindestniveau an Affinität für den Zielrezeptor enthalten.

[0032] Vorzugsweise umfaßt jede Säule 1 pmol bis 250 pmol aktive Stellen des Zielrezeptors pro Säule.

[0033] In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt das obige Verfahren weiterhin die Stufe, bei der man: (f) bestimmt, ob irgendeiner der mutmaßlichen Liganden der Verbindungsbibliothek eine stärkere Affinität für den Zielrezeptor aufweist als die Indikatorverbindung, indem die Durchbruchzeit für die Indikatorverbindung aus Stufe (e) mit der vorbestimmten Durchbruchzeit für die Indikatorverbindung in Abwesenheit der Verbindungsbibliothek verglichen wird.

[0034] Vorzugsweise umfaßt, wenn eine Indikatorverbindung verwendet wird, die Verbindungsbibliothek weniger als etwa 50.000 mutmaßliche Liganden. Bevorzugter umfaßt die Verbindungsbibliothek etwa 5 bis etwa 100 mutmaßliche Liganden.

[0035] Vorzugsweise hat die in den Verfahren dieser Erfindung verwendete Indikatorverbindung eine vorbestimmte Durchbruchzeit in Abwesenheit der Verbindungsbibliothek von weniger als etwa 5 Minuten.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0036] [Fig. 1](#) veranschaulicht eine repräsentative Vorrichtung zum Screenen von Verbindungsbibliotheken unter Verwendung von Frontalchromatographie in Kombination mit einem Massenspektrometer.

[0037] [Fig. 2](#) veranschaulicht eine repräsentative Vorrichtung zum Screenen von Verbindungsbibliotheken unter Verwendung einer Mehrzahl von Frontalchromatographiesäulen in Kombination mit einem Massenspektrometer.

[0038] [Fig. 3](#) veranschaulicht eine weitere repräsentative Vorrichtung zum Screenen von Verbindungsbibliotheken unter Verwendung einer Mehrzahl von Frontalchromatographiesäulen in Kombination mit einem Massenspektrometer.

[0039] [Fig. 4](#) veranschaulicht eine repräsentative Vorrichtung für das sequentielle Screenen von Verbindungsbibliotheken mit einer Indikatorverbindung unter Verwendung einer Mehrzahl von Frontalchromatographiesäulen in Kombination mit einem Massenspektrometer.

[0040] [Fig. 5A](#) zeigt ein Gesamtionenchromatogramm (TIC) aus einer FC-MS, die unter Verwendung von sechs repräsentativen Oligosacchariden mit variierender Affinität für einen Kohlehydratbindenden Antikörper, der das 3,6-Didesoxy-D-galactose(-abequose-) Epitop in Salmonella paratyphi B-O-Antigenen erkennt, durchgeführt wurde.

[0041] [Fig. 5B](#) zeigt Massenfragmentogramme für die sechs Oligosaccharide, rekonstruiert aus dem in

[Fig. 5A](#) gezeigten TIC.

[0042] Die [Fig. 5C](#), [Fig. 5D](#) und [Fig. 5E](#) zeigen Massenspektren, die aus Zeitintervallen des in [Fig. 5A](#) gezeigten TIC erzeugt wurden.

[0043] [Fig. 6](#) zeigt eine graphische Darstellung von $([A]_0(V-V_0))^{-1}$ gegenüber $[A]_0^{-1}$ für $\alpha\text{Gal}(1-2)[\alpha\text{Abe}(1-3)]\alpha\text{Man-OCH}_3$.

[0044] [Fig. 7A](#) zeigt ein Massenfragmentogramm aus einer FC-MS, die unter Verwendung einer Indikatorverbindung in Abwesenheit einer Verbindungsbibliothek durchgeführt wurde.

[0045] [Fig. 7B](#) zeigt ein Massenfragmentogramm aus einer FC-MS, die unter Verwendung einer Indikatorverbindung in Gegenwart einer Verbindungsbibliothek durchgeführt wurde.

[0046] [Fig. 8](#) zeigt ein Massenfragmentogramm aus einer FC-MS, die unter Verwendung von vier repräsentativen Oligosacchariden mit variierender Affinität für die Cholera toxin B-Untereinheit durchgeführt wurde.

[0047] [Fig. 9](#) zeigt ein Massenfragmentogramm aus einer FC-MS, die unter Verwendung eines synthetisch hergestellten GM₁-Analogen durchgeführt wurde.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0048] Die vorliegende Erfindung liefert Verfahren zum Screenen von Verbindungsbibliotheken unter Verwendung von Frontalchromatographie in Kombination mit Massenspektrometrie. In der Beschreibung der Verfahren dieser Erfindung haben die nachfolgenden Begriffe die nachfolgende Bedeutung, wenn es nicht anders angegeben ist. Alle hier nicht definierten Begriffe haben die Bedeutung, wie sie auf dem Gebiet üblicherweise anerkannt ist.

Definitionen

[0049] Der Begriff "Durchbruchzeit" bezieht sich auf den Zeitraum zwischen der Elution des Hohlraumvolumens und der Front entsprechend der Elution einer bestimmten Verbindung während der Frontalchromatographie.

[0050] Der Begriff "Verbindungsbibliothek" bezieht sich auf ein Gemisch oder eine Sammlung aus einem oder mehreren mutmaßlichen Liganden, die in irgendeiner Weise hergestellt oder erhalten wurden. Vorzugsweise enthält die Bibliothek mehr als einen mutmaßlichen Liganden bzw. mehr als ein Mitglied.

[0051] Der Begriff "Elektrospray" bezieht sich auf die Erzeugung von Gasphasenionen aus einer fließenden Lösung. Das Elektrosprayen wird typischerweise bei Atmosphärendruck in einem elektrischen Feld mit oder ohne unterstützte Zerstäubung oder Lösungsmittelverdampfung durchgeführt.

[0052] Der Begriff "Ablauf" bezieht sich auf das Lösungsmittel oder die Lösung, das bzw. die aus der Frontalchromatographiesäule hervorgeht oder austritt.

[0053] Der Begriff "Frontalchromatographiebedingungen" bezieht sich auf Chromatographiebedingungen, bei denen eine Lösung aus mutmaßlichen Liganden bei konstanter Konzentration kontinuierlich auf eine Säule, die einen Zielrezeptor enthält, aufgebracht oder durch sie infundiert wird, so daß der Zielrezeptor während der Chromatographie kontinuierlich mit den mutmaßlichen Liganden in Kontakt gebracht wird.

[0054] Der Begriff "Indikatorverbindung" bezieht sich auf eine Verbindung mit einer bekannten Affinität oder Spezifität für den Zielrezeptor und einer meßbaren Durchbruchzeit unter Frontalchromatographiebedingungen.

[0055] Der Begriff "Ligand" bezieht sich auf ein Molekül oder eine Gruppe von Molekülen, das bzw. die an eine oder mehrere spezifische Stellen auf einem Rezeptor bindet bzw. binden. Repräsentative Liganden umfassen beispielsweise Kohlehydrate, Monosaccharide, Oligosaccharide, Polysaccharide, Aminosäuren, Peptide, Oligopeptide, Polypeptide, Proteine, Nukleoside, Nukleotide, Oligonukleotide, Polynukleotide, einschließlich DNA und DNA-Fragmenten, RNA und RNA-Fragmenten und dergleichen, Lipide, Retinoide, Steroide, Glycopeptide, Glycoproteine, Proteoglycane und dergleichen, und synthetische Analoge oder Derivate davon, ein-

schließlich Peptidmimetika, organische Kleinmolekülverbindungen und dergleichen, und Gemische davon. Der Begriff "mutmaßlicher Ligand" bezieht sich auf einen Liganden, dessen Affinität oder Spezifität für einen Zielrezeptor, falls vorhanden, nicht bestimmt wurde.

[0056] Der Begriff "Mikrosäule" bezieht sich auf eine Säule mit einem Innendurchmesser von weniger als oder gleich etwa 1 mm.

[0057] Der Begriff "Massenfragmentogramm" bezieht sich auf eine graphische Darstellung des Ionenvorkommens gegenüber der Zeit, die aus der Intensität eines einzelnen Ions konstruiert wurde. Ein Massenfragmentogramm kann aus einem Scan- oder einem Massenfragmentographiemodus hergestellt werden.

[0058] Der Begriff "Massenfragmentographie" bezieht sich auf die Detektion einiger vorausgewählter Ionen unter Verwendung eines Massenspektrometers (z.B. Quadrupole).

[0059] Der Begriff "fester Träger" oder "Festphasenträger" bezieht sich auf ein inertes Material oder Molekül, an welches ein Zielrezeptor entweder direkt oder durch einen Verknüpfungsarm gebunden oder gekoppelt sein kann.

[0060] Der Begriff "synthetische organische Kleinmolekülverbindungen" bezieht sich auf organische Verbindungen mit einem Molekulargewicht von im allgemeinen weniger als etwa 1000 und bevorzugt weniger als etwa 500, die durch organische Synthesetechniken, wie durch Techniken der kombinatorischen Chemie, hergestellt werden.

[0061] Der Begriff "ergänzendes Verdünnungsmittel" oder "Zusatzfluß" bezieht sich auf eine Lösung oder ein Lösungsmittel, welches) mit dem Ablauf aus einer Säule vereinigt wird, ehe der Ablauf in ein Elektrospray-Massenspektrometer übergeht.

[0062] Der Begriff "Zielrezeptor" oder "Rezeptor" bezieht sich auf ein Molekül oder eine Gruppe von Molekülen, das bzw. die einen Liganden an einer spezifischen Stelle binden kann bzw. können. Repräsentative Beispiele von Zielrezeptoren umfassen beispielsweise Proteine, Glycoproteine, Glycosaminoglycane, Proteoglycane, Integrine, Enzyme, Lectine, Selectine, Zelladhäsionsmoleküle, Toxine, Bakterienpili, Transportproteine, an der Signalumwandlung oder der Hormonbindung beteiligte Rezeptoren, Hormone, Antikörper, Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHCs), Immunglobulin-Superfamilien, Cadherine, DNA oder DNA-Fragmente, RNA und RNA-Fragmente, Vollzellen, Gewebe, Bakterien, Pilze, Viren, Parasiten, Prionen und dergleichen, oder synthetische Analoge oder Derivate von irgendwelchen der obigen.

[0063] Der Begriff "aktive Stelle des Zielrezeptors" bezieht sich auf die interessierende Bindungsstelle auf einem bestimmten Zielrezeptor.

[0064] Der Begriff "Gesamtionenchromatogramm" bezieht sich auf eine graphische Darstellung des Ionenvorkommens gegenüber der Zeit, konstruiert aus einer Addition aller Ionenintensitäten in einem Scan. In einem Gesamtionenchromatogramm ist die Anzahl von Scans linear mit der Zeit verbunden.

[0065] Der Begriff "Hohlraumvolumen" oder " V_0 " bezieht sich auf das Volumen an Lösung, welches vom Punkt der Infusion bis zum Punkt der Detektion durch eine Frontalchromatographiesäule hindurchtritt. Mutmaßliche Liganden ohne Affinität für den Zielrezeptor eluieren typischerweise bei dem Hohlraumvolumen aus der Säule.

[0066] Die in dieser Erfindung verwendeten Verbindungsbibliotheken können durch irgendwelche Mittel, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf Techniken der kombinatorischen Chemie, Fermentationsverfahren, Pflanzen- und Zellextraktionsverfahren und dergleichen, hergestellt oder erhalten werden. Verfahren zur Herstellung kombinatorischer Bibliotheken sind auf dem Gebiet gut bekannt. Siehe beispielsweise E.R. Felder, *Chimia* 1994, 48, 512-541, Gallop et al., *J. Med. Chem.* 1994, 37, 1233-1251, R.A. Houghten, *Trends Genet.* 1993, 9, 235-239, Houghten et al., *Nature* 1991, 354, 84-86, Lam et al., *Nature* 1991, 354, 82-84, Carell et al., *Chem. Biol.* 1995, 3, 171-183, Madden et al., *Perspectives in Drug Discovery and Design* 2, 269-282, Cwirla et al., *Biochemistry* 1990, 87, 6378-6382, Brenner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 5381-5383, Gordon et al., *J. Med. Chem.* 1994, 37, 1385-1401, Lebl et al., *Biopolymers* 1995, 37, 177-198, und dort zitierte Literaturstellen. Jede dieser Literaturstellen ist durch Bezugnahme vollständig hierin aufgenommen.

[0067] Jeder Typ von Molekül, das an einen Zielrezeptor binden kann, kann in der Verbindungsbibliothek vorliegen. Beispielsweise können Verbindungsbibliotheken, die unter Verwendung dieser Erfindung gescreent

werden, natürlich vorkommende Moleküle, wie Kohlehydrate, Monosaccharide, Oligosaccharide, Polysaccharide, Aminosäuren, Peptide, Oligopeptide, Polypeptide, Proteine, Nukleoside, Nukleotide, Oligonukleotide, Polynukleotide, einschließlich DNA und DNA-Fragmenten, RNA und RNA-Fragmenten und dergleichen, Lipide, Retinoide, Steroide, Glycopeptide, Glycoproteine, Proteoglycane und dergleichen, oder Analoge oder Derivate von natürlich vorkommenden Molekülen, solcher Peptidmimetika und dergleichen und nicht natürlich vorkommende Moleküle, wie organische "Kleinmolekül"-Verbindungen, die beispielsweise unter Verwendung von Techniken der kombinatorischen Chemie erzeugt wurden, und Gemische davon enthalten. Der Begriff "organische Kleinmolekülverbindung" bezieht sich auf organische Verbindungen, die im allgemeinen ein Molekulargewicht von weniger als etwa 1000 und bevorzugt von weniger als etwa 500 haben.

[0068] Ein besonderer Vorteil des vorliegenden Verfahrens besteht darin, daß Verbindungsbibliotheken, die razemische Gemische enthalten, gescreent werden können, um z.B. zu bestimmen, ob nur ein Isomer (z.B. ein Enantiomer oder Diastereomer) an den Zielrezeptor bindet oder ob die Isomere unterschiedliche Affinitäten für den Zielrezeptor haben. In dieser Hinsicht wird, wenn die Isomere unterschiedliche Affinitäten für den Zielrezeptor haben, für jedes Isomer eine andere Durchbruchzeit beobachtet.

[0069] Die in dieser Erfindung verwendeten Verbindungsbibliotheken enthalten typischerweise eine Mehrzahl von Mitgliedern oder mutmaßlichen Liganden. Wenn eine Indikatorverbindung verwendet wird, enthält die Verbindungsbibliothek bevorzugt weniger als etwa 50.000 Mitglieder, und bevorzugter enthält die Verbindungsbibliothek weniger als etwa 10.000 Mitglieder. Wenn keine Indikatorverbindung verwendet wird, enthält die Verbindungsbibliothek bevorzugt weniger als etwa 10.000 Mitglieder, bevorzugter von etwa 1 bis etwa 1.000 Mitglieder und noch bevorzugter von etwa 5 bis etwa 100 Mitglieder.

[0070] Das vorliegende Verfahren ist geeignet zum Analysieren der Affinität von Mitgliedern einer Verbindungsbibliothek für irgendeinen Zielrezeptor oder eine Domäne, der bzw. die an einen Liganden bindet oder einen Komplex mit diesem bildet. Beispielsweise kann der Zielrezeptor unter Proteinen, Glycoproteinen, Glycosaminglycanen, Proteoglycanen, Integrinen, Enzymen, Lectinen, Selectinen, Zelladhäsionsmolekülen, Toxinen, Bakterienpili, Transportproteinen, an der Signalumwandlung oder der Hormonbindung beteiligten Rezeptoren, Hormonen, Antikörpern, Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHCs), Immunglobulin-Superfamilien, Cadherinen, DNA oder DNA-Fragmenten, RNA und RNA-Fragmenten, Vollzellen, Geweben, Bakterien, Pilzen, Viren, Parasiten, Prionen und dergleichen oder synthetischen Analogon oder Derivaten von irgendwelchen der obigen ausgewählt sein, ist jedoch nicht hierauf beschränkt.

[0071] Bei Verwendung der Verfahren dieser Erfindung ist der Zielrezeptor optional an einen festen Träger gebunden oder mit diesem gekoppelt. Vorzugsweise ist der Zielrezeptor kovalent an den festen Träger gebunden oder mit diesem gekoppelt. In einigen Fällen, wie beispielsweise wenn Vollzellen oder Organismen als Zielrezeptor verwendet werden, können die Zellen oder Organismen jedoch in der Säule enthalten sein, indem beispielsweise eine poröse Fritte am Auslassende der Säule verwendet wird. Träger für Rezeptoren sind auf dem Gebiet gut bekannt und viele sind kommerziell erhältlich. Jeder solche konventionelle Träger kann in dieser Erfindung verwendet werden. Repräsentative Träger umfassen beispielsweise Harzperlen, Glasperlen, Siliciumdioxidchips und -kapillaren, Agarose und dergleichen. Wenn Siliciumdioxidkapillaren als fester Träger verwendet werden, ist der Zielrezeptor direkt an die Wände der Säule gebunden. Bevorzugte feste Träger zur Verwendung in dieser Erfindung umfassen poröse Harzperlen. Ein besonders bevorzugter fester Träger sind poröse Polystyren-Divinylbenzen-Polymerperlen, wie POROS-Perlen (erhältlich von Perseptive Biosystems, Framingham, MA).

[0072] Der Zielrezeptor kann unter Verwendung irgendeines auf dem Gebiet anerkannten Verfahrens an den Träger gebunden oder mit diesem gekoppelt werden. Beispielsweise kann der Zielrezeptor unter Verwendung von Direktimmobilisierungstechniken (d.h. kovalente Bindung über eine Sulfhydryl-, Amino- oder Carboxylgruppe und dergleichen), kovalenter Bindung durch einen Verknüpfungs- oder Abstandshalterarm, Biotin-Avidin-Bindung, Biotin-Streptavidin-Bindung, Antikörperbindung, GST-Glutathion-Bindung, Ionenaustauschabsorption, hydrophober Wechselwirkung, Expression des Zielrezeptors als ein mit Maltose-Bindungsprotein fusioniertes rekombinantes Protein, Fusion des Zielrezeptors mit einem Peptid, welches selektiv an eine Affinitätssäule bindet, und dergleichen gebunden werden. Solche Verfahren sind auf dem Gebiet gut bekannt, und Kits für die Ausführung vieler dieser Verfahren sind kommerziell erhältlich. Siehe beispielsweise Stammers et al., FEBS Lett. 1991, 283, 298-302, Herman et al., Anal. Biochemistry 1986, 156, 48, Smith et al., FEBS Lett. 1987, 215, 305, Kilmartin et al., J. Cell. Biol. 1982, 93, 576-582, Skinner et al., J. Biol. Chem. 1991, 266, 14163-14166, Hopp et al., Bio/Technology 1988, 6, 1204-1210, H.M. Sassenfeld, TIBTECH 1990, 8, 88-93, Hanke et al., J. General Virology 1992, 73, 654-660, Ellison et al., J. Biol. Chem. 1991, 267, 21150-21157, U.K. Pati, Gene 1992, 114, 285-288, Wadzinski et al., J. Biol. Chem. 1992, 267, 16883-16888, Field et al., Mol. Cell.

Biol. 1988, 8, 2159-2165, Gerard et al., Biochemistry 1990, 29, 9274-9281, Ausselbergs et al., Fibrinolysis 1993, 7, 1-13, Hopp et al., Biotechnology 1988, 6, 1205-1210, Blanar et al., Science 1992, 256, 1014-1018, Lin et al., J. Org. Chem. 1991, 56, 6850-6856, Zastrow et al., J. Biol. Chem. 1992, 267, 3530-3538, Goldstein et al., EMBO Jml. 1992, 11, 0000-0000, Lim et al., J. Infectious Disease 1990, 162, 1263-1269, Goldstein et al., Virology 1992, 190, 889-893, und die Artikel in IBI LFAG Epitope Band 1: Nr. 1, Sept. 1992, und dort zitierte Literaturstellen. Jede dieser Literaturstellen ist durch Bezugnahme vollständig hierin aufgenommen.

[0073] In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung ist der Zielrezeptor unter Verwendung einer Biotin-Avidin-, Biotin-Streptavidin- oder einer verwandten Bindung an den festen Träger gebunden oder mit diesem gekoppelt. In diesem Verfahren wird der Zielrezeptor typischerweise mit einem Biotinreagens, welches einen Abstandshalterarm enthält, biotinyliert. Der biotinylierte Zielrezeptor wird dann mit einem Avidin enthaltenden festen Träger in Kontakt gebracht. Der resultierende Biotin-Avidin-Komplex bindet den Zielrezeptor an den festen Träger.

[0074] Verfahren zum Biotinylieren von Biomolekülen sind auf dem Gebiet gut bekannt, und verschiedene Biotinreagenzien sind kommerziell erhältlich. Siehe beispielsweise E.A. Bayer et al., Meth. Enzymol. 1990, 184, 51, U. Bickel et al., Bioconj. Chem. 1995, 6, 211, H. Hagiwara et al., J. Chromatog. 1992, 597, 331, "Avidin-Biotin Chemistry Handbook" (erhältlich von Pierce, Rockford, IL, Katalogposten Nr. 15055) und dort zitierte Literaturstellen. Ein bevorzugtes Biotinreagens ist NHS-LC-Biotin (erhältlich von Pierce). Das Ausmaß der Biotinaufnahme unter Verwendung solcher Reagenzien kann beispielsweise durch matrixunterstützte Laserdesorption/-ionisation, wie es in D.C. Schriemer und L. Li, Anal. Chem. 1996, 68, 3382-3387, beschrieben ist, oder durch andere auf dem Gebiet anerkannte Verfahren, wie sie im "Avidin-Biotin Chemistry Handbook" (Pierce) beschrieben sind, überwacht werden. Vorzugsweise werden durchschnittlich etwa 1 bis etwa 50 Biotine pro Zielrezeptor aufgenommen, bevorzugter etwa 1 bis etwa 10 Biotine pro Zielrezeptor.

[0075] Der biotinylierte Zielrezeptor ist typischerweise mit einem Avidin oder Streptavidin enthaltenden festen Träger oder einem verwandten Material gekoppelt. Solche Träger sind kommerziell erhältlich oder können durch auf dem Gebiet anerkannte Verfahren hergestellt werden. Bevorzugte Avidin enthaltende Träger umfassen immobilisiertes Ultralink-Avidin (erhältlich von Pierce) und mit POROS 20 immobilisiertes Streptavidin (erhältlich von Perseptive Biosystems). Der biotinylierte Zielrezeptor wird typischerweise durch Inkontaktbringen des Rezeptors mit dem Träger in einem geeigneten Puffer, wie phosphatgepufferter Kochsalzlösung (pH 7), für etwa 0,5 bis 4 Stunden bei einer Temperatur im Bereich von etwa 4°C bis etwa 37°C mit dem Avidin enthaltenden Träger gekoppelt. Vorzugsweise werden nach dem Koppeln des biotinylierten Zielrezeptors mit dem Avidin enthaltenden Träger alle noch verbleibenden Avidin-Bindungsstellen auf dem Träger blockiert, indem man den festen Träger mit einem Überschuß an freiem Biotin in Kontakt bringt.

[0076] Der Zielrezeptor kann entweder vor oder nach dem Einbringen eines festen Trägermaterials in eine Säule an den festen Träger gebunden oder mit diesem gekoppelt werden. Beispielsweise kann der biotinylierte Zielrezeptor mit dem Avidin oder Streptavidin enthaltenden festen Träger in Kontakt gebracht oder inkubiert werden, und der resultierende feste Träger, der den Zielrezeptor enthält, kann anschließend in eine Säule eingebracht werden. Alternativ kann der Avidin oder Streptavidin enthaltende feste Träger zuerst in die Säule eingebracht werden und der biotinylierte Zielrezeptor kann dann durch die Säule zirkulieren, wodurch der feste Träger, der den Zielrezeptor enthält, in der Säule gebildet wird. Jedes dieser Verfahren kann auch mit irgendeinem der anderen zuvor erwähnten Verfahren zum Koppeln des Zielrezeptors mit dem festen Träger verwendet werden.

[0077] Das feste Trägermaterial kann unter Verwendung irgendeines konventionellen Verfahrens in die Säule eingebracht werden. Typischerweise wird der feste Träger in einem geeigneten Verdünnungsmittel aufgeschlämmt, und die resultierende Aufschlämmung wird unter Druck in die Säule geladen oder hineingepumpt. Geeignete Verdünnungsmittel umfassen beispielsweise Puffer, wie phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), die vorzugsweise ein Konservierungsmittel, wie Natriumazid, enthalten und dergleichen.

[0078] Im allgemeinen bestimmt die Aktivität des Zielrezeptors die Größe der in dieser Erfindung verwendeten Säule, d.h. ein kleineres Säulenvolumen kann verwendet werden, wenn der Zielrezeptor mehr Aktivität pro Säulenvolumeneinheit hat. Typischerweise hat die in dieser Erfindung verwendete Säule einen Innendurchmesser (Id.) im Bereich von etwa 10 µm wie etwa 4,6 mm. Bevorzugt liegt der Innendurchmesser der Säule im Bereich von etwa 100 µm bis etwa 250 µm. Die Länge der Säule liegt typischerweise im Bereich von etwa 1 cm bis etwa 30 cm, bevorzugt von etwa 2 cm bis etwa 20 cm. Vorzugsweise enthält die Säule etwa 1 pmol bis etwa 10 nmol aktive Stellen des Zielrezeptors pro Säule, bevorzugter etwa 10 pmol bis etwa 250 pmol aktive Stellen des Zielrezeptors pro Säule.

[0079] Wenn eine Indikatorverbindung verwendet wird, sind die Länge der Säule und ihr I_d auch von der K_d der Indikatorverbindung abhängig (d.h. es kann eine kleinere Säule verwendet werden, wenn der Indikator eine stärkere Affinität für den Zielrezeptor hat). Wenn ein Indikator verwendet wird, werden die Säulenlänge und ihr I_d vorzugsweise so ausgewählt, daß die Indikatorverbindung nach dem Hohlraumvolumen eine meßbare Menge eluiert.

[0080] Der Körper der in dieser Erfindung verwendeten Säule kann aus irgendeinem herkömmlichen Säulenkörpermaterial bestehen, einschließlich beispielsweise Poly(etheretherketon) (PEEK), Quarzglas, Siliciumkrosplänen, rostfreiem Stahl, Nylon, Polyethylen, Polytetrafluorethylen (Teflon) und dergleichen. Vorzugsweise besteht der Säulenkörper aus Poly(etheretherketon).

[0081] Nachdem der feste Träger, der den Zielrezeptor enthält, in die Säule eingebracht oder in dieser ausgebildet wurde, wird die Säule typischerweise mit einem geeigneten Verdünnungsmittel gespült, um jegliche ungebundenen Zielrezeptoren oder Verunreinigungen zu entfernen. Geeignete Verdünnungsmittel zum Spülen der Säule umfassen beispielsweise phosphatgepufferte Kochsalzlösung, TRIS-Puffer und dergleichen. Falls es gewünscht ist, kann auch ein Detergens in dem Puffer enthalten sein, um die Entfernung von ungebundenen Zielrezeptoren oder Verunreinigungen zu erleichtern.

[0082] Nachdem die Säule gespült wurde, wird die Säule typischerweise mit einem Puffer, der für Frontalchromatographie geeignet und mit Massenspektrometrie kompatibel ist, äquilibriert. Flüchtige Puffer sind im allgemeinen zur Verwendung mit der Massenspektrometrie bevorzugt. Für die Frontalchromatographie wird ein Puffer typischerweise so ausgewählt, daß er die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung fördert. Geeignete Puffer zur Verwendung in der FC-MS umfassen beispielsweise Ammoniumacetat, Ammoniumformiat und dergleichen.

[0083] Nachdem die Säule äquilibriert wurde, wird dann die Verbindungsbibliothek unter Frontalchromatographiebedingungen kontinuierlich auf die Säule appliziert. Typischerweise umfaßt die Verbindungsbibliothek, wenn sie auf die Säule appliziert wird, eine Lösung von Bibliotheksmitgliedern oder mutmaßlichen Liganden in einem geeigneten Verdünnungsmittel. Typischerweise ist das Verdünnungsmittel die Pufferlösung, die zum Äquilibrieren der Säule verwendet wurde. Im allgemeinen liegt die Konzentration der Bibliotheksmitglieder in dem Verdünnungsmittel im Bereich von etwa 0,01 μM bis etwa 50 μM . Vorzugsweise liegt die Konzentration der Bibliotheksmitglieder im Bereich von etwa 0,1 μM bis etwa 10 μM .

[0084] Verfahren zur Durchführung der Frontalchromatographie sind auf dem Gebiet gut bekannt. Siehe beispielsweise K.-I. Kasai et al., Journal of Chromatography 1986, 376, 33-47, D.S. Hage et al., Journal of Chromatography B. 1997, 669, 449-525, und dort zitierte Literaturstellen. Die Offenbarungen dieser Literaturstellen sind durch Bezugnahme vollständig hierin aufgenommen. Typischerweise wird die Verbindungsbibliothek kontinuierlich auf die Säule, die den Zielrezeptor enthält, appliziert oder in diese infundiert. Unter diesen Bedingungen wird der Zielrezeptor kontinuierlich mit jedem der Mitglieder der Verbindungsbibliothek in Kontakt gebracht oder herausgefordert. Die Säule wird durch kontinuierliches Applizieren der Verbindungsbibliothek auf die Säule zu einem dynamischen Gleichgewicht gebracht. Bibliotheksmitglieder mit verschiedenen Bindungskonstanten zum Zielrezeptor zeigen verschiedene Durchbruchzeiten oder Haltevolumen auf der Säule, d.h. diejenigen Mitglieder mit einer stärkeren Affinität für den Zielliganden haben eine längere Durchbruchzeit auf der Säule oder ein größeres Haltevolumen, ehe sie bei ihrer anfänglichen Infusionskonzentration aus der Säule zu eluieren oder diese zu durchbrechen beginnen. Anders als bei zonenbezogenen chromatographischen Verfahren wird unter Verwendung von Frontalchromatographie keine physikalische Trennung der Bibliotheksmitglieder erzielt.

[0085] Während der Frontalchromatographie hat die Säule typischerweise eine Temperatur im Bereich von etwa 0°C bis etwa 90°C, bevorzugt von etwa 4°C bis etwa 60°C und bevorzugter von etwa 20°C bis etwa 40°C.

[0086] Wenn ein Ligand eine sehr starke Affinität für den Zielrezeptor hat, kann es wünschenswert sein, die Säule vor der Durchführung der FC-MS-Analyse zunächst mit der Verbindungsbibliothek vorzuäquilibrieren. Die Säule kann entweder durch Infundieren der Verbindungsbibliothek durch die Säule für eine Zeitdauer, die ausreichend ist, damit die Säule ein Gleichgewicht erreichen kann, d.h. für etwa 0,25 bis 24 Stunden, oder durch Infundieren der Verbindungsbibliothek in die Säule, Stoppen des Flusses und Zulassen, daß das System ein Gleichgewicht erreicht, für einen Zeitraum von bis zu einem Tag vor Durchführung der Analyse voräquilibriert werden. Falls es gewünscht ist, kann auch eine Abfolge von Stop-Flow-Zyklen durchgeführt werden.

[0087] In den Verfahren dieser Erfindung ist ein einziges Massenspektrometer mit jeder Säule gekoppelt, um

den Ablauf zu analysieren. Massenspektrometrie ist in der vorliegenden Erfindung besonders geeignet, da sie sowohl die Detektion als auch die Identifikation der in dem Ablauf vorliegenden Bibliotheksmitglieder ermöglicht. In dieser Hinsicht ermöglicht die Massenspektrometrie das Identifizieren von eluierenden Mitgliedern der Bibliothek auf Basis ihres Masse/Ladung-Verhältnisses.

[0088] Vor der Analyse des Ablaufs aus der Säule mittels Massenspektrometrie wird der Ablauf optional mit einem ergänzenden Verdünnungsmittel oder "Zusatzfluß" verdünnt, und der vereinigte Strom wird beispielsweise in das Elektrospray-Massenspektrometer geleitet. Typischerweise umfaßt das ergänzende Verdünnungsmittel eine große Menge eines organischen Lösungsmittels und eine geringe Menge eines wäßrigen Puffers. Das organische Lösungsmittel ist so ausgewählt, daß ein stabiles und effizientes Elektrosprayen gefördert wird. Repräsentative organische Lösungsmittel, die zur Verwendung in dem ergänzenden Verdünnungsmittel geeignet sind, umfassen beispielsweise Acetonitril, Methanol, Isopropanol und dergleichen. Ein bevorzugtes organisches Lösungsmittel ist Acetonitril. Typischerweise wird die Menge des verwendeten ergänzenden Verdünnungsmittels so eingestellt, daß die kombinierte Fließgeschwindigkeit des Ablaufs und des ergänzenden Verdünnungsmittels weniger als etwa 100 µl/Min. beträgt. Vorzugsweise liegt die in das Massenspektrometer einströmende kombinierte Fließgeschwindigkeit im Bereich von etwa 100 nl/Min. bis etwa 20 µl/Min.

[0089] Verfahren zum Analysieren von Abläufen unter Verwendung von Massenspektrometrie sind auf dem Gebiet gut bekannt. In dieser Erfindung kann jeder Typ von Massenspektrometrie, der die in einer Lösung vorliegenden Komponenten direkt oder indirekt analysieren kann, verwendet werden, einschließlich beispielsweise Elektrospray-Massenspektrometrie (ES-MS), chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI), Membran-Einlaß-Massenspektrometrie (MIMS), Fast-Atom-Bombardment bei kontinuierlichem Fluß (cf-FAB), Thermospray-Techniken, Teilchenstrahl, Moving-Belt-Interface und dergleichen. Die Elektrospray-Massenspektrometrie ist besonders bevorzugt. Eine Vorrichtung sowie Techniken zum Durchführen von Elektrospray-Massenspektrometrie-Analyse sind beispielsweise in S.J. Gaskell, "Electrospray: Principles and Practice", J. Mass. Spectrom. 1997, 32, 677-688, und den dort zitierten Literaturstellen beschrieben. Das Massenspektrometer kann jeder Typ sein (d.h. scannend oder dynamisch), einschließlich beispielsweise Quadrupol-, Flugzeit-, Ioneneinfang-, FTICR-Massenspektrometer und dergleichen.

[0090] Typischerweise sind die Parameter des Massenspektrometers so eingestellt, daß sie die höchste Empfindlichkeit für die eluierten Verbindungen liefern. Im allgemeinen umfassen solche Einstellungen, wenn ein Elektrospray-Massenspektrometer verwendet wird, die Optimierung beispielsweise des Zerstäuberdruks, der Fließgeschwindigkeit des Trockengases, der Ionenübertragung und der Elektrospray-Nadelposition. Beispielsweise liegt der Zerstäuberdruk typischerweise im Bereich von etwa 0 psi bis etwa 60 psi und die Fließgeschwindigkeit des Trockengases liegt im Bereich von etwa 0 l/Min. bis etwa 50 l/Min. Ein Gesamtionenchromatogramm wird typischerweise in Echtzeit gemessen und überwacht. Die Größe der Säule, die Konzentration der Verbindungsbibliothek und die Fließgeschwindigkeit bestimmen im allgemeinen die Laufzeit. Typische Laufzeiten liegen im Bereich von etwa 1 Min. bis etwa 60 Min.

[0091] Nach Beendigung der Frontalchromatographie wird die Säule typischerweise durch Waschen mit einer großen Menge des Bindungspuffers mit einem oder ohne einen kompetitiven Liganden regeneriert. In dieser Hinsicht besteht ein besonderer Vorteil des vorliegenden Verfahrens darin, daß zu keinem Zeitpunkt während des Verfahrens ein Denaturieren des Zielrezeptors erforderlich ist. Dementsprechend können die Säulen viele Male wiederverwendet werden, ohne daß es zu einem sichtbaren Verlust an Aktivität oder einem Auswaschen des Zielrezeptors kommt.

[0092] Geeignete Vorrichtungen zur Durchführung der Frontalchromatographie sind in der US-Patentanmeldung Nr. 09/069,656, veröffentlicht als US-91-6,191,418, mit dem Titel "Apparatus for Screening Compound Libraries" beschrieben. Eine repräsentative Vorrichtung zum Durchführen der Screeningverfahren dieser Erfindung ist in [Fig. 1](#) gezeigt. Wie in [Fig. 1](#) zu erkennen ist, sind ein erstes Reservoir **1**, welches eine Pufferlösung enthält, und ein zweites Reservoir **2**, welches eine Lösung einer Verbindungsbibliothek in einem Puffer enthält, über eine Leitung **3** mit dem Ventil **4** verbunden. In [Fig. 1](#) sind die Reservoirs **1** und **2** Spritzen, obwohl auch irgendein ähnliches Reservoir verwendet werden kann. Das Ventil **4** ermöglicht es, die Lösungen aus den Reservoirs **1** und **2** in einen Abwasserbehälter **5** oder in das Einlaßende der Säule **6** zu leiten. Die Säule **6** enthält den Zielrezeptor, der an einen Festphasenträger oder die Säulenwand gebunden ist oder auf andere Weise in der Säule gehalten wird. Das Auslaßende der Säule **6** ist an ein T-Stück **7** zum Mischen angeschlossen, welches über die Leitung **9** auch mit dem Reservoir **8**, das ein ergänzendes Verdünnungsmittel enthält, verbunden ist. Der Ablauf aus der Säule **6** wird in dem T-Stück **7** zum Mischen mit dem ergänzenden Verdünnungsmittel aus dem Reservoir **8** gemischt, und der Ausfluß wird über die Leitung **10** zu einem Elektrospray-Massenspektrometer **11** geleitet. Um den Fluß aus den Reservoirs **1**, **2** und **8** zu kontrollieren, wird auf

die Kolben **12** beispielsweise mittels einer Pumpe Druck aufgebracht.

[0093] In einer weiteren Ausführungsform liefert diese Erfindung ein Verfahren zum Screenen einer Verbindungsbibliothek, um zu bestimmen, ob irgendein Mitglied der Bibliothek eine Affinität für einen Zielrezeptor hat, die die Bindung einer zuvor ausgewählten Indikatorverbindung oder eines Gemischs von Indikatorverbindungen stört. In dieser Ausführungsform wird die Durchbruchzeit einer Indikatorverbindung mit einer bekannten Affinität für den Zielrezeptor bestimmt, nachdem die Säule mit der Verbindungsbibliothek äquilibriert wurde, und mit der Durchbruchzeit für die Indikatorverbindung in Abwesenheit der Verbindungsbibliothek verglichen. Wenn die Indikatorverbindung nach der Äquilibrierung mit der Verbindungsbibliothek eine kürzere Durchbruchzeit hat, enthält die Verbindungsbibliothek einen oder mehrere Liganden mit einer Gesamtaffinität für den Zielrezeptor, die stärker ist als die der Indikatorverbindung. Da eine Indikatorverbindung so ausgewählt werden kann, daß sie auf der Säule eine relativ kurze Durchbruchzeit hat, besteht ein bedeutender Vorteil dieser Ausführungsform darin, daß Verbindungsbibliotheken schnell, z.B. in weniger als 5 Minuten, gescreent werden können, um diejenigen Bibliotheken zu identifizieren, die ein vorbestimmtes Mindestniveau an Affinität für den Zielrezeptor haben. Wenn herausgefunden wird, daß eine Bibliothek das vorbestimmte Mindestniveau an Affinität für den Zielrezeptor hat, kann die Bibliothek unter Verwendung von FC-MS weiter analysiert werden, um die Liganden, die an den Zielrezeptor binden, zu identifizieren.

[0094] Ein Vorteil der Verwendung einer Indikatorverbindung besteht darin, daß die Screeningzeit für jede Bibliothek signifikant reduziert wird, da nur die Indikatorverbindung überwacht werden muß. Weiterhin wird, da die Indikatorverbindung an der interessierenden aktiven Stelle an den Zielrezeptor bindet, eine Veränderung in der Durchbruchzeit für den Indikator nur beobachtet, wenn ein Mitglied der Bibliothek an die gleiche aktive Stelle bindet wie die Indikatorverbindung. Dementsprechend liefert die nicht-spezifische Bindung der Bibliothek an den Zielrezeptor keine falschen Schlüsse.

[0095] Die in dieser Ausführungsform der Erfindung verwendete Indikatorverbindung wird typischerweise so ausgewählt, daß sie eine relativ schwache Affinität für den Zielrezeptor hat. Dies erlaubt es der Indikatorverbindung, schnell aus der Säule zu eluieren oder diese zu durchbrechen, wodurch die für die Überwachung des Ablaufs erforderliche Zeit verkürzt wird. Eine Indikatorverbindung mit einer Durchbruchzeit auf der Säule von weniger als etwa 5 Minuten in Abwesenheit der Verbindungsbibliothek ist bevorzugt. Alternativ kann ein Indikator mit einer starken Affinität für den Zielrezeptor verwendet werden, was die Verwendung kleinerer Säulen ermöglicht. Wenn eine Indikatorverbindung mit einer starken Affinität verwendet wird, wird die Verbindungsbibliothek typischerweise in einer höheren Konzentration auf die Säule appliziert. Die Durchbruchzeit für die Indikatorverbindung auf der Säule in Abwesenheit der Verbindungsbibliothek wird unter Verwendung der hier beschriebenen FC-MS-Verfahren bestimmt. Die Affinität der Indikatorverbindung für den Zielrezeptor kann unter Verwendung konventioneller Techniken, wie Mikrokolorimetrie und dergleichen, oder unter Verwendung der FC-MS-Verfahren dieser Erfindung bestimmt werden. Vorzugsweise hat die Indikatorverbindung auch eine im Vergleich zu den Mitgliedern der Verbindungsbibliothek eindeutige Masse, so daß die Indikatorverbindung durch Massenspektrometrie eindeutig identifiziert werden kann. Im allgemeinen wird bei Verwendung einer Indikatorverbindung und eines Quadrupol-Massenspektrometers nur die Masse der Indikatorverbindung überwacht, um eine bessere Empfindlichkeit bereitzustellen.

[0096] Repräsentative Beispiele von Indikatorverbindungen, die zur Verwendung mit spezifischen Zielrezeptoren geeignet sind, umfassen beispielsweise α Abe(1-3) α Tal-OCH₃ ($K_d = 0,2$ mM) zur Verwendung mit einem monoklonalen Antikörper, der das 3,6-Didesoxy-D-galactose-(-abequose-) Epitop in Salmonella paratyphi B-O-Antigenen erkennt, Phytinsäure ($K_d = 1$ μ M) zur Verwendung mit L-Selectin und dergleichen. Zusätzlich kann mehr als eine Indikatorverbindung verwendet werden. Der Indikator kann auch mit einem anderen Molekül gekoppelt oder an ein solches konjugiert sein oder er kann ein Atom oder Isotop enthalten, welches seine Detektion erleichtert. Beispielsweise kann die Indikatorverbindung an Polyethylenglycole (PEGs) gekoppelt sein, so daß die Massenspektren Peaks enthalten, die sich um 44 Einheiten unterscheiden, wodurch die Detektion der Indikatorverbindung erleichtert wird.

[0097] Bei Verwendung einer Indikatorverbindung wird die Durchbruchzeit für die Indikatorverbindung zuerst bestimmt, indem man die Indikatorverbindung unter Frontalchromatographiebedingungen auf die Säule, die den Zielrezeptor enthält, appliziert. Die Säule wird dann typischerweise mit der zu screenenden Verbindungsbibliothek äquilibriert. Im allgemeinen wird die Verbindungsbibliothek für eine Zeitdauer, die ausreichend ist, damit alle Bibliotheksmitglieder die Säule durchbrechen können, auf die Säule appliziert oder in diese infundiert. In einigen Fällen, wie z.B. wenn sehr starke Bindungsliganden vorliegen, erreichen nicht alle Mitglieder der Bibliothek ein Gleichgewicht. Der Ablauf während dieser Periode kann dem Massenspektrometer zur Analyse präsentiert werden, oder kann zum Rezyklieren oder Wegwerfen gesammelt werden. Sobald die Säule

mit der Verbindungsbibliothek äquilibriert (oder teilweise äquilibriert) wurde, wird ein Gemisch, welches die Verbindungsbibliothek und die Indikatorverbindung umfaßt, unter Verwendung der hier beschriebenen Frontalchromatographiebedingungen auf die Säule appliziert oder in diese infundiert. Vorzugsweise liegt die Indikatorverbindung in dem Gemisch in einer Menge im Bereich von etwa 1 nM bis etwa 10 µM, bevorzugter von etwa 10 nM bis etwa 100 nM vor. Der Ablauf aus der Säule wird analysiert, um die Durchbruchzeit für die Indikatorverbindung auf der mit der Verbindungsbibliothek äquilibrierten Säule zu bestimmen, und diese Zeitdauer wird mit der vorbestimmten Durchbruchzeit für die Indikatorverbindung verglichen, um festzustellen, ob die Verbindungsbibliothek, bezogen auf die Indikatorverbindung, eine stärkere Affinität für den Zielrezeptor hat.

[0098] Alternativ kann die Indikatorverbindung nach Äquilibrieren der Säule mit der Verbindungsbibliothek alleine auf die Säule appliziert oder in diese infundiert werden. Diese Technik erlaubt eine Detektion von sehr stark gebundenen Liganden oder denjenigen mit geringen Abgangsgeschwindigkeiten.

[0099] Zusätzlich zur Detektion der Indikatorverbindung unter Verwendung von Massenspektrometrie, wird in Betracht gezogen, daß auch andere Verfahren zur Detektion verwendet werden können. Beispielsweise kann eine Indikatorverbindung in dem Ablauf aus der Säule unter Verwendung von beispielsweise Fluoreszenz, Infrarotabsorption, UV-Absorption im sichtbaren Bereich, Kernmagnetresonanz (NMR), Atomspektroskopie (d.h. AAS, ICP-OES usw.), Flußzytometrie und dergleichen, detektiert werden.

[0100] Die Verfahren dieser Erfindung ermöglichen die gleichzeitige Durchführung einer Mehrzahl von FC-MS-Analysen unter Verwendung eines einzigen Massenspektrometers, um jede Säule intermittierend zu überwachen. Anders als bei "Einfang- und Freisetzungs-" Verfahren, die typischerweise einen Elutionspeak oder eine "-spitze" für jeden Liganden liefern, erfordert FC-MS keine konstante Überwachung des Ablaufs, da, sobald ein Bibliotheksmitglied die Säule durchbricht, dieses Mitglied kontinuierlich im Ablauf vorhanden ist und mit dem Massenspektrometer detektiert werden kann. Daher kann eine Mehrzahl von FC-MS-Analysen unter Verwendung eines einzigen Massenspektrometers gleichzeitig durchgeführt werden, um jede Säule intermittierend zu überwachen. Beispielsweise können unter Verwendung der Verfahren dieser Erfindung wenigstens etwa 100 Säulen gleichzeitig durchgeführt werden.

[0101] Typischerweise wird jede Säule für eine kurze Zeitdauer überwacht, ehe zur nächsten Säule gewechselt wird. Mit einem Quadrupol-Massenspektrometer wird beispielsweise jede Säule typischerweise für eine Zeitdauer von etwa 0,5 Sekunden bis etwa 10 Sekunden, bevorzugt für etwa 1 Sekunde bis etwa 5 Sekunden sequentiell überwacht, ehe zur nächsten Säule gewechselt wird. Der Ablauf aus jeder Säule wird unter Verwendung von Massenspektrometrie analysiert, wie es hier beschrieben ist. Im allgemeinen wird eine einzige laufende Datei verwendet, um alle Daten von der Mehrzahl von Säulen zu sammeln, wodurch ein zusammengesetztes Gesamtionenchromatogramm erzeugt wird. Anschließend werden erneut separate Gesamtionenchromatogramme für jede Säule erstellt, indem das Wechseln zwischen den Säulen mit dem Sammeln von Massenspektrometriedaten synchronisiert wird.

[0102] In einer bevorzugten Ausführungsform hat jede Säule eine einzelne Elektrospray-Nadel zum Einspritzen des Ablaufs der Säule in das Elektrospray-Massenspektrometer. Jede geometrische Anordnung mehrerer Elektrospray-Nadeln, die schnelle und wiederholte Sequenzen von Nadelvorschüben ermöglicht, kann verwendet werden. Eine geeignete Vorrichtung zum Einspritzen mehrerer Abläufe in ein Elektrospray-Massenspektrometer ist in der US-Patentanmeldung Nr. 09/069,656, veröffentlicht als US-91-6,131,148, mit dem Titel "Device for Delivery of Multiple Liquid Sample Streams to a Mass Spectrometer" beschrieben. Alternativ können eine lineare, sich bewegende Reihe von Elektrospray-Nadeln (Sprühern) und dergleichen verwendet werden. Siehe beispielsweise Q. Xue et al., Anal. Chem. 1997, 69, 426-430, und dort zitierte Literaturstellen, deren Offenbarung durch Bezugnahme vollständig hierin aufgenommen ist.

[0103] Eine repräsentative Vorrichtung zum Screenen von Verbindungsbibliotheken unter Verwendung einer Mehrzahl von Säulen ist in [Fig. 2](#) gezeigt. Wie in [Fig. 2](#) gezeigt ist, ist jede aus einer Mehrzahl von Säulen **13** über Leitungen **14** und ein T-Stück **15** zum Mischen mit einem ersten Reservoir **16**, welches eine Lösung einer Verbindungsbibliothek in einem Bindungspuffer enthält, und einem zweiten Reservoir **17**, welches den Bindungspuffer enthält, verbunden. In [Fig. 2](#) sind die Reservoirs **16** und **17** Spritzen, obwohl auch irgendein ähnliches Reservoir verwendet werden kann. Jede Säule **13** enthält einen an einen Festphasenträger gebundenen Zielrezeptor. Die Pufferlösung in dem Reservoir **17** wird verwendet, um die Säule **13** vor oder nach Einbringung der Verbindungsbibliothek zu waschen. Das Auslaßende jeder Säule **13** ist mit einem T-Stück **18** zum Mischen verbunden, welches über die Leitung **20** auch mit dem Reservoir **19**, das ein ergänzendes Verdünnungsmittel enthält, verbunden ist. Der Ablauf aus jeder Säule **13** wird in den T-Stücken **18** zum Mischen mit dem ergänzenden Verdünnungsmittel aus dem Reservoir **19** gemischt, und der Ausfluß wird durch ein elektronisch betä-

tigtes Auswahlventil **23** mit mehreren Anschlüssen über die Leitung **20** und Ventile **21** in ein Elektrospray-Massenspektrometer **22** oder in die Abfall/Gewinnungsbehälter **24** geleitet. Um den Fluß aus den Reservoirs **16**, **17** und **19** zu kontrollieren, wird Druck beispielsweise über Pumpen auf die Kolben **25** aufgebracht.

[0104] Alternativ kann in einer anderen Ausführungsform, die in [Fig. 3](#) gezeigt ist, der Ausfluß aus den T-Stücken **18** zum Mischen für die Massenspektrometernalyse über die Leitung **20** in einzelne Elektrospray-Nadeln **26** geleitet werden.

[0105] Bei Verwendung einer Mehrzahl von Säulen zum Auswerten von Verbindungsbibliotheken unter Verwendung einer Indikatorverbindung kann jede Säule, falls gewünscht, sequentiell durchgeführt werden, da die Laufzeit für jede der Säulen relativ kurz ist, d.h. typischerweise etwa 3 Minuten pro Säule. Bei Verwendung einer Indikatorverbindung können sequentielle Durchläufe mehrerer Säulen vorteilhaft sein, da dies eine präzisere Bestimmung der Retentionszeit für die Indikatorverbindung ermöglicht.

[0106] Eine repräsentative Vorrichtung für das sequentielle Screenen von Verbindungsbibliotheken mit einer Indikatorverbindung unter Verwendung einer Mehrzahl von Säulen ist in [Fig. 4](#) gezeigt. Wie es in [Fig. 4](#) gezeigt ist, wird eine Mehrzahl von Reservoirs **27** (z.B. Spritzen) mit einer Klammer **38** an Ort und Stelle gehalten. Jedes Reservoir **27** enthält ein Gemisch einer Verbindungsbibliothek und einer Indikatorverbindung in einem geeigneten Verdünnungsmittel (oder alternativ einfach dem Indikator). Das Ende jedes Reservoirs **27** ist über die Leitung **29** mit dem Einlaßende einer Säule **30**, die den an einen Festphasenträger gebundenen Zielrezeptor enthält, verbunden. Das Auslaßende jeder Säule **30** ist über die Leitung **31** mit einem elektronisch betätigten Mehrfachstrom-Auswahlventil **32** verbunden, welches den Fluß des Ablaufs aus den Säulen **30** kontrolliert. Unter Verwendung des Ventils **32** kann der Ablauf aus den Säulen über die Leitung **34** in einen Abwasserbehälter **33** oder über die Leitung **36** in das T-Stück **35** zum Mischen geleitet werden. Das T-Stück **35** zum Mischen ist über die Leitung **37** auch mit dem Reservoir **36**, welches ein ergänzendes Verdünnungsmittel enthält, verbunden. Der Ablauf aus jeder Säule **30** wird in dem T-Stück **35** zum Mischen mit dem ergänzenden Verdünnungsmittel aus dem Reservoir **36** gemischt, und der Ablauf wird über die Leitung **38** in ein Elektrospray-Massenspektrometer **39** geleitet. Um den Strom aus den Reservoirs **27** in die Säulen **30** zu kontrollieren, kann ein Abstandsblock **40** verwendet werden. Wenn beispielsweise über eine Pumpe Druck auf den Abstandsblock **40** aufgebracht wird, wird der Kolben **41** jedes Reservoirs **27** einzeln nacheinander hinuntergedrückt, wodurch der Inhalt des Reservoirs durch die Leitung **29** in die korrespondierende Säule **30** eingeleitet wird. Der aus jeder Säule **30** ausströmende Ablauf wird zur Analyse sequentiell in das Massenspektrometer **39** geleitet.

[0107] Die Verfahren dieser Erfindung ermöglichen auch eine einfache Bestimmung der absoluten Affinität oder der Dissoziationskonstante K_d für bestimmte einzelne Mitglieder einer Verbindungsbibliothek. In dieser Hinsicht durchbrechen Liganden mit einer Affinität für den Zielrezeptor die Säule mit Volumen (d.h. Durchbruchzeiten), bezogen auf ihre Konzentrationen und ihre K_d -Werte, entsprechend der folgenden Gleichung:

$$V_x - V_0 = \frac{B_t}{[X]_0 + (K_d)_x}$$

wobei B_t die dynamische Bindungskapazität der Säule repräsentiert, $[X]_0$ die Infusionskonzentration des Liganden in der Verbindungsbibliothek ist, K_d die Dissoziationskonstante für den Liganden ist, V_0 das Hohlraumvolumen ist und V_x das Volumen in der Mitte der Front, welches dem Durchbruch des Liganden entspricht, repräsentiert. Diese einfache Gleichung zeigt, daß, sobald B_t und die Konzentration des Liganden bekannt sind, die Dissoziationskonstante eines Liganden aus einer einzigen Messung seines $V_x - V_0$ bestimmt werden kann.

[0108] Um B_t zu bestimmen, wird eine repräsentative Verbindung, z.B. Verbindung X, bei verschiedenen Konzentrationen durch die Säule infundiert, und die korrespondierenden $V_x - V_0$ -Werte werden gemessen. Eine graphische Darstellung von $([X](V - V_0))^{-1}$ gegenüber $[X]^{-1}$ wird erzeugt, wobei der Schnittpunkt y die dynamische Bindungskapazität der Säule (B_t) angibt (analog zu einem Lineweaver-Burk-Diagramm).

[0109] Sobald die dynamische Bindungskapazität der Säule bestimmt wurde, können die Dissoziationskonstanten für einzelne Mitglieder der Verbindungsbibliothek aus einem einzigen FC-MS-Durchlauf bestimmt werden. Beispielsweise wird die K_d für Verbindungen, bei denen $[X] \ll (K_d)_x$ ist, einfach aus $B_t/(V - V_0)$ bestimmt. Für diejenigen Mitglieder der Bibliothek mit einer niedrigen Dissoziationskonstante ist eine Kenntnis ihrer Konzentration oder die Infusion der Verbindungsbibliothek bei stärkerer Verdünnung erforderlich, um K_d zu bestimmen.

[0110] Die folgenden Beispiele werden angegeben, um diese Erfindung zu veranschaulichen, und sie sollen

nicht so ausgelegt werden, daß sie den Schutzzumfang dieser Erfindung beschränken. Wenn es nicht anders angegeben ist, beziehen sich alle Gradangaben auf Grad Celsius.

BEISPIELE

[0111] In den untenstehenden Beispielen haben die folgenden Abkürzungen die folgenden Bedeutungen. Wenn eine Abkürzung nicht definiert ist, hat sie die allgemein anerkannte Bedeutung.

B_t	= dynamische Bindungskapazität
$^{\circ}\text{C}$	= Grad Celsius
cm	= Zentimeter
Äq.	= Äquivalente
FAB	= Fast-Atom-Bombardment
FC	= Frontalchromatographie
g	= Gramm
K_d	= Dissoziationskonstante
l	= Liter
MALDI	= matrixunterstützte Laserdesorption/-ionisation
mVal	= Milliäquivalent
mg	= Milligramm
ml	= Milliliter
mM	= Millimolar
mmol	= Millimol
MS	= Massenspektrometrie
m/z	= Masse-Ladungs-Verhältnis
N	= normal
PBS	= phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEEK	= Poly(etheretherketon)
pmol	= Picomol
TIC	= Gesamtionenchromatogramm
μg	= Mikrogramm
μl	= Mikroliter
μm	= Mikrometer
μM	= Mikromolar
V_0	= Hohlraumvolumen

Beispiel 1

Screenen einer Oligosaccharidbibliothek unter Verwendung von FC-MS

[0112] In diesem Beispiel wurde eine Verbindungsbibliothek, die ein Gemisch aus sechs Oligosacchariden enthält, unter Verwendung von Frontalchromatographie in Kombination mit einem Elektrospray-Massenspektrometer gescreent, um die relative Affinität der Oligosaccharide für einen monoklonalen Antikörper, der das 3,6-Dideoxy-D-galactose-(abequose-) Epitop in Salmonella paratyphi B-O-Antigenen erkennt, zu bestimmen.

[0113] Die Verbindungsbibliothek bestand aus den folgenden sechs Oligosacchariden: $\alpha\text{GalNAc}(1-3)\beta\text{Gal-OGr}$ (Verbindung 1), $\alpha\text{Gal}(1-3)[\alpha\text{Fuc}(1-2)]\beta\text{Gal-OGr}$ (Verbindung 2), $\alpha\text{Man}(1-3)[\alpha\text{Man}(1-6)]\beta\text{Man-OGr}$ (Verbindung 3), $\alpha\text{Abe}(1-3)\alpha\text{Tal-OCH}_3$ (Verbindung 4), $\alpha\text{Gal}(1-2)[\alpha\text{Abe}(1-3)]\alpha\text{Man-OCH}_3$ (Verbindung 5) und $\text{Glc}(1-4)\beta\text{Glc}(1-4)\alpha\text{Gal}(1-2)-[\alpha\text{Abe}(1-3)]\alpha\text{Man}(1-3)\alpha\text{Glc}(1-4)\beta\text{Glc-OCH}_3$ (Verbindung 6), wobei $\text{Gr} = \text{O}(\text{CH}_2)_8\text{CO}_2\text{CH}_3$. Die Verbindungen 1-3 wurden unter Verwendung der Verfahren erhalten, die beschrieben sind in dem US-Patent Nr. 4,362,720 von R.U. Lemieux et al., erteilt am 7. Dezember 1987, dem US-Patent Nr. 4,137,401 von R.U. Lemieux et al., erteilt am 30. Januar 1979, bzw. K.J. Kaur et al., "Use of N-Acetylglucosaminyltransferases I and II in the Preparative Synthesis of Oligosaccharides", Carbohydr. Res. 1991, 210, 145-153, deren Offenbarungen durch Bezugnahme vollständig hierin aufgenommen sind. Die Verbindungen 4-6 wurden unter Verwendung der Verfahren erhalten, die beschrieben sind in D.R. Bundle et al., "Modulation of Antibody Affinity by Synthetic Modifications of the Most Exposed Pyranose Residue of A Trisaccharide Epitope", Bioorg. Med. Chem. 1994, 2, 1221-1229, deren Offenbarung durch Bezugnahme vollständig hierin aufgenommen ist. Von den Verbindungen 1-3 ist bekannt, daß sie keine Spezifität für den Antikörper haben. Die Verbindungen 4-6 dagegen enthalten das Min-

desterfordernis für die Erkennung (Abequose) und überspannen einen Bereich von Affinität für den Antikörper. Die K_d -Werte für die Verbindungen 4-6, bestimmt durch Titrationsmikrokalorimetrie, sind in Tabelle 1 unten gezeigt.

[0114] Der in diesem Experiment verwendete monoklonale Antikörper wurde hergestellt, wie es in D.R. Bundle et al., "Molecular Recognition of a Salmonella Trisaccharide Epitope by Monoclonal Antibody Se155.4", *Biochem.* 1994, 33, 5172-5182, beschrieben ist. Der Antikörper (0,5 mg) wurde mit einem Biotinreagens, welches einen langkettigen Abstandshalterarm enthielt (NHS-LC-Biotin, Pierce), biotinyliert. Der Umfang der Biotinaufnahme wurde durch matrixunterstützte Laserdesorption/-ionisation überwacht, und die Reaktion wurde bei 14 Biotinen/IgG (Durchschnitt) beendet. Der biotinylierte Antikörper wurde dann mit einem zu Perlen geformten Träger gekoppelt, indem der Antikörper mit 25 μ l immobilisiertem Ultralink-Avidin (Pierce, Kat. Nr. 53119) in Bicarbonatpuffer (pH 8,5) für 1 Stunde inkubiert wurde. Die Perlen wurden dann gründlich mit dem Bicarbonatpuffer gewaschen. Eine UV-Quantifizierung zeigte, daß eine Immobilisierung von $\sim 45 \mu$ g Antikörper/25 μ l Perlen erhalten wurde. Die Perlen wurden dann in einen Säulenkörper mit einem Id. von 500 μ m mal 11,5 cm Poly(etheretherketon) (PEEK) eingeschlämmt ($\sim 23 \mu$ l Säulenvolumen).

[0115] In diesem Experiment spielte ein T-Stück zum Mischen eine doppelte Rolle als Anschlußstück am Säulenende und als Mischkammer für das Säulenelutionsmittel und den organischen Zusatzfluß. Die Säule wurde dann direkt an ein Elektrospray-Massenspektrometer angeschlossen (Hewlett-Packard Serie 1100 MSD, einzelner Quadrupol).

[0116] Für den Betrieb im Frontalchromatographiemodus wurde die Säule zuerst mit Ammoniumacetatpuffer (NH_4OAc , 2 mM, pH 6,7) gespült. Nach dem Spülen wurde der Fluß auf eine zweite Lösung umgeschaltet, die ein Gemisch der sechs Oligosaccharide, von denen jedes mit 1 μ M vorlag, in Ammoniumacetatpuffer enthielt. Alle Lösungen wurden gleichzeitig mit einer Pumpe mit mehreren Spritzen (PHD 200, Harvard Apparatus) bei einer Fließgeschwindigkeit von 8 μ l/Min. Spritze (1 cc Spritzen) infundiert. Ein Rheodyn-Ventil (Modell 9725) wurde für das Umleiten des Flusses verwendet. Der Säulenablauf vereinigte sich in dem T-Stück mit dem Zusatzfluß (10% 2 mM NH_4OAc -Puffer in Acetonitril), wodurch eine Fließgeschwindigkeit von 16 μ l/Min in das Massenspektrometer bereitgestellt wurde.

[0117] Für die Analyse dieses Gemischs wurde das Spektrometer von m/z 100-1500 gescannt. Daten wurden im Scanmodus mit Positiven-Detektion gesammelt. Ein Gesamtionenchromatogramm (TIC) wurde aus einer 50-minütigen Durchlaufzeit konstruiert, wie es in [Fig. 5A](#) gezeigt ist. Dieses repräsentierte den Verbrauch von nur 400 pmol von jedem Oligosaccharid. Dann wurden durch die Analyse der Massenspektren Peaks bei spezifischen m/z-Werten identifiziert, die das TIC ergaben, und Massenfragmentogramme für alle sechs Verbindungen wurden aus dem TIC rekonstruiert, wie es in [Fig. 5B](#) gezeigt ist. Die Verbindungen 1-3 durchbrechen die Säule gleichzeitig, wie es durch die durchgezogene Linie gezeigt ist. Dann wurden Massenspektren aus Zeitintervallen des TIC (zu den Zeitpunkten I, II und III) erzeugt, wie es in den [Fig. 5C](#), [Fig. 5D](#) und [Fig. 5E](#) gezeigt ist. Diese Massenspektren stellen graphisch den Verlauf der verschiedenen Oligosaccharide durch die Säule dar. Ein Spektrum, welches das Einsetzen von Verbindung 4 repräsentiert, ist nicht gezeigt.

[0118] Wie es oben diskutiert wurde, brechen Liganden ohne Affinität für den Zielrezeptor beim Hohlraumvolumen (V_0) durch, während Verbindungen mit einer Affinität für den Zielliganden später, bei Volumen bezogen auf ihre Konzentrationen und K_d -Werte, durchbrechen, entsprechend der folgenden Gleichung:

$$V_x - V_0 = \frac{B_t}{[X]_0 + (K_d)_x}$$

wobei B_t die dynamische Bindungskapazität der Säule repräsentiert, $[X]_0$ die Infusionskonzentration des Liganden in der Verbindungsbibliothek ist, K_d die Dissoziationskonstante für den Liganden ist, V_0 das Hohlraumvolumen ist und V_x das Volumen in der Mitte der Front, das dem Durchbruch des Liganden entspricht, ist.

[0119] Um B_t zu bestimmen, wurde Verbindung 5 bei verschiedenen Konzentrationen durch die Säule infundiert und die korrespondierenden $V-V_0$ -Werte wurden gemessen. Eine graphische Darstellung von $([A]_0(V-V_0))^{-1}$ gegenüber $[A]_0^{-1}$ wurde erzeugt, wobei A Verbindung 5 ist, wie es in [Fig. 6](#) gezeigt ist. Der Schnittpunkt y zeigte eine B_t von 520 pmol. Jedes Antikörpermolekül enthält zwei Bindungsstellen, daher entspricht dies einer aktiven Kapazität von 260 pmol Protein (was 93% der Gesamtmenge an gebundenem Protein repräsentiert) entspricht. Der Schnittpunkt x zeigte eine K_d von 11,2 μ M für Verbindung 5, was sich in vorteilhafter Weise mit dem Wert vergleichen läßt, der durch Mikrokalorimetrie bestimmt wurde, wie es in Tabelle 1 gezeigt ist.

[0120] Die Kenntnis der Säulenkapazität vor dem Screenen eines Gemischs ermöglicht die Bestimmung der Dissoziationskonstanten aus einem einzigen Frontalchromatogramm. Für Verbindungen mit $[X] \ll (K_d)_x$ kann die K_d einfach aus $B_f/(V-V_0)$ bestimmt werden. Beispielsweise wurde gezeigt, daß Verbindung 4 eine K_d von 0,2 mM hat, wie es aus dem Chromatogramm von [Fig. 5B](#) bestimmt wurde. Verbindungen mit niedrigen Dissoziationskonstanten erfordern entweder die Kenntnis ihrer Konzentration oder die Infusion des Gemischs bei stärkerer Verdünnung für die Bestimmung der K_d . Die K_d von Verbindung 6 bei einer Konzentration von 1 μM wurde aus dem gleichen Chromatogramm mit 1,5 μM bestimmt.

[0121] Die Säule wurde im nicht angeschlossenen Zustand durch Waschen mit einem großen Volumen an Bindungspuffer regeneriert. Die in diesem Beispiel verwendete Säule wurde über 150 Durchläufen unterzogen, ohne daß es zu einem sichtbaren Verlust an Aktivität oder einem Auswaschen des Antikörpers kam.

[0122] Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

Nr.	Oligosaccharid ¹	(MNa) ⁺	K_d ²	
			Literatur	FC/MS
1	$\alpha\text{GalNAc}(1-3)\beta\text{Gal-OGr}$	576,3	-	-
2	$\alpha\text{Gal}(1-3)[\alpha\text{Fuc}(1-2)]\beta\text{Gal-OGr}$	681,3	-	-
3	$\alpha\text{Man}(1-3)[\alpha\text{Man}(1-6)]\beta\text{Man-OGr}$	697,3	-	-
4	$\alpha\text{Abe}(1-3)\alpha\text{Tal-OCH}_3$	347,0	$1,9 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-4}$
5	$\alpha\text{Gal}(1-2)[\alpha\text{Abe}(1-3)]\alpha\text{Man-OCH}_3$	509,2	$6,3 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-5}$
6	$\alpha\text{Glc}(1-4)\beta\text{Glc}(1-4)\alpha\text{Gal}(1-2)[\alpha\text{Abe}(1-3)]\alpha\text{Man}(1-3)\alpha\text{Glc}(1-4)\beta\text{Glc-OCH}_3$	1157,4	$8,8 \times 10^{-7}$	$1,5 \times 10^{-6}$

¹ Gr = $\text{O}(\text{CH}_2)_8\text{CO}_2\text{CH}_3$.

² K_d = Dissoziationskonstante.

[0123] Die Ergebnisse in Tabelle 1 zeigen, daß die Affinität verschiedener mutmaßlicher Liganden in einer Verbindungsbibliothek für einen Zielrezeptor relativ zu anderen mutmaßlichen Liganden in der Bibliothek bestimmt werden kann und daß die Dissoziationskonstante K_d für mutmaßliche Liganden und den Zielrezeptor bestimmt werden kann. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, daß es eine akzeptable Korrelation zwischen den K_d -Werten aus der Literatur und denjenigen, die durch FC-MS-Verfahren erzeugt wurden, gab.

Beispiel 2

Screenen einer Oligosaccharidbibliothek unter Verwendung von FC-MS und einer Indikatorverbindung

[0124] In diesem Beispiel wird die Verwendung einer Indikatorverbindung zum Screenen einer Verbindungsbibliothek demonstriert. Der in diesem Beispiel verwendete Antikörper war der gleiche wie derjenige, der in Beispiel 1 verwendet wurde, d.h. ein monoklonaler Antikörper, der das 3,6-Didesoxy-D-galactose(-abequose-) Epitop in Salmonella paratyphi B-O-Antigenen erkennt. Die Säule war ebenfalls im wesentlichen die gleiche wie in Beispiel 1, und sie wurde hergestellt und betrieben, wie es dort beschrieben ist.

[0125] In diesem Experiment wurden drei Lösungen hergestellt. Lösung A enthielt die folgenden vier Oligosaccharide in 2 mM NH_4OAc : $\alpha\text{GalNAc}(1-3)\beta\text{Gal-OGr}$ (Verbindung 1), $\alpha\text{Gal}(1-3)[\alpha\text{Fuc}(1-2)]\beta\text{Gal-OGr}$ (Verbindung 2), $\alpha\text{Man}(1-3)[\alpha\text{Man}(1-6)]\beta\text{Man-OGr}$ (Verbindung 3), $\alpha\text{Abe}(1-3)\alpha\text{Tal-OCH}_3$ (Verbindung 4), wobei Gr = $\text{O}(\text{CH}_2)_8\text{CO}_2\text{CH}_3$. Lösung B enthielt $\alpha\text{Gal}(1-2)[\alpha\text{Abe}(1-3)]\alpha\text{Man-OCH}_3$ (Verbindung 5) in 2 mM NH_4OAc und Lösung C enthielt die Verbindungen 1-5 in 2 mM NH_4OAc . In allen Lösungen lagen die Verbindungen 1, 2 und 3 mit 1 μM vor, Verbindung lag mit 0,16 μM vor und Verbindung 5 lag mit 15 μM vor. In diesem Beispiel wurde Verbindung 4 als Indikatorverbindung verwendet und Verbindung 5 wurde verwendet, um ein Mitglied einer Verbindungsbibliothek zu repräsentieren. Die verbleibenden Verbindungen wurden verwendet, um V_0 zu bestimmen.

[0126] Lösung A, die die Verbindungen 1-4 enthielt, wurde in die Säule infundiert, wie es in Beispiel 1 beschrieben ist. Ein Quadrupol-Massenspektrometer wurde verwendet, um den Ablauf zu überwachen. Das Massenspektrometer wurde im Massenfragmentographie-(SIM-) Modus betrieben, und zwar bei dem $(M+Na)^+$ -Peak jeder Verbindung. [Fig. 5A](#) zeigt die Massenfragmentogramme, die aus einer Infusion der Verbindungen 1-4 (d.h. Lösung A) erzeugt wurden. Das Durchbruchvolumen für Verbindung 4 betrug $3,0 \pm 0,1 \mu\text{l}$. Die Säule wurde durch Spülen mit dem Bindungspuffer (d.h. 2 mM NH_4OAc) für etwa 10 Min. regeneriert, woraufhin im wesentlichen alle Spuren von Verbindung 4 entfernt worden waren.

[0127] Unter Verwendung der Vorrichtung von [Fig. 1](#) wurden Lösung B (Verbindung 5) und Lösung C (Verbindungen 1-5) in separate Spritzen geladen. Lösung B wurde durch die Säule infundiert, bis ein dynamisches Gleichgewicht für Verbindung 5 erreicht worden war. An diesem Punkt wurde der Fluß auf die Spritze, die Lösung C enthielt, umgeleitet, und die Massenfragmentogramme von [Fig. 7B](#) wurden unter Verwendung des Quadrupol-Massenspektrometers erzeugt. Wie es in [Fig. 7B](#) gezeigt ist, führt die Voräquilibration der Säule mit Verbindung 5 zu einer meßbaren Verschiebung des Durchbruchvolumens der Indikatorverbindung 4 (zu $1,1 \pm 0,3 \mu\text{l}$). Dies stimmt mit der Tatsache überein, daß Verbindung 5 ein Ligand mit einer K_d für den Antikörper ist, die niedriger ist als die der Indikatorverbindung 4 (siehe Tabelle 1 oben). Daher war einfach durch Überwachen der Indikatorverbindung offensichtlich, daß die repräsentative Bibliothek eine Verbindung mit einer stärkeren Affinität für den Zielrezeptor enthielt.

[0128] Es sei angemerkt, daß, während die Indikatorverbindung (Verbindung 4) in diesem Experiment zu einer Lösung der repräsentativen Bibliothek (Verbindung 5) zugegeben wurde, dies nicht immer notwendig ist. In den Situationen, in denen die Bibliothek (Lösung B) eine stark zurückgehaltene Verbindung (d.h. mit einer geringen K_d oder Durchbruchgeschwindigkeit) enthält, kann Lösung C durch Lösung A ersetzt werden (d.h. der Indikator muß nicht mit der Bibliothek gemischt sein).

Beispiel 3

Screenen einer Oligosaccharidbibliothek unter Verwendung von FC-MS

[0129] In diesem Beispiel wurde eine Verbindungsbibliothek, die ein Gemisch aus vier Oligosacchariden enthielt, unter Verwendung von Frontalchromatographie in Kombination mit einem Elektrospray-Massenspektrometer gescreent, um die relative Affinität der Oligosaccharide für eine Cholera toxin B-Untereinheit zu bestimmen.

[0130] Die Verbindungsbibliothek bestand aus den folgenden vier Oligosacchariden: $\alpha\text{GalNAc}(1-3)\beta\text{Gal-OGr}$ (Verbindung 1), $\alpha\text{Gal}(1-3)[\alpha\text{Fuc}(1-2)]\beta\text{Gal-OGr}$ (Verbindung 2), $\alpha\text{Man}(1-3)[\alpha\text{Man}(1-6)]\beta\text{Man-OGr}$ (Verbindung 3) und GM_1 -Oligosaccharid (Verbindung 7), wobei $\text{Gr} = \text{O}(\text{CH}_2)_8\text{CO}_2\text{CH}_3$. Verbindung 7, die der natürliche Ligand für die Cholera toxin B-Untereinheit ist, wurde unter Verwendung der Verfahren erhalten, die beschrieben sind in A. Schön et al., "Thermodynamics of Intersubunit Interactions in Cholera Toxin upon Binding to the Oligosaccharide Portion of Its Cell Surface Receptor, Ganglioside $\text{G}_{\text{M}1}$ ", *Biochem.* 1989, 28, 5019-5024, deren Offenbarung durch Bezugnahme vollständig hierin aufgenommen ist. Die Cholera toxin B-Untereinheit wurde von LIST Biochemicals, Campbell, CA, erhalten.

[0131] Eine Säule wurde aus einem 12 cm-Abschnitt einer PEEK-Leitung mit einem Id. von 0,01" (250 μm) (Säulenvolumen etwa 6 μl) hergestellt. Die Säule wurde mit mit POROS 20 immobilisierten Streptavidinteilchen (erhältlich von Perseptive Biosystems, Framingham, MA) beladen.

[0132] Die Cholera toxin B-Untereinheit (ein pentameres Protein) wurde biotinyliert, so daß sie etwa 1-2 Biotine/Monomer lieferte, gemessen durch MALDI. Eine verdünnte Lösung dieses biotinylierten Proteins (4 μM) wurde durch die zuvor beladene Säule infundiert, so daß die Gesamtmenge an gebundener Cholera toxin B-Untereinheit nach dem Waschen ungefähr 200 pmol betrug (bestimmt durch UV-Quantifizierung).

[0133] Eine Lösung, die die Verbindungen 1-3 und 7 enthielt, wurde hergestellt. Alle Verbindungen lagen in einer Menge von 2 μM in 2 mM NH_4OAc (pH 6,9) vor. Unter Verwendung einer Vorrichtung ähnlich derjenigen, die in [Fig. 1](#) gezeigt ist, wurde die Säule zuerst mit dem Bindungspuffer (2 mM NH_4OAc) äquilibriert. Die Lösung, die die Verbindungen 1-3 und 7 enthielt, wurde dann mit 8 $\mu\text{l}/\text{Min}$. durch die Säule infundiert. Der Ablauf wurde mit einem typischen Zusatzfluß (10% 2 mM NH_4OAc in Acetonitril) vereinigt und in ein Elektrospray-Massenspektrometer mit einem einzigen Quadrupol geleitet. Daten wurden im Scanmodus mit Negationen-Detektion gesammelt.

[0134] Es wurde ein Gesamtionenchromatogramm erzeugt, gefolgt von der Rekonstruktion von Massenfragmentogrammen für jede der Verbindungen 1-3 und 7, wie es in [Fig. 8](#) gezeigt ist. Wie es in [Fig. 8](#) gezeigt ist, brachen die Verbindungen 1-3 in das Hohlraumvolumen des Systems durch ($\sim 4 \text{ Min.} \times 8 \mu\text{l/Min.} = 32 \mu\text{l}$), während Verbindung 7 (GM₁-Oligosaccharid) bei 300 μl durchbrach. Somit hat GM₁-Oligosaccharid ($K_d = 100 \text{ nM}$) eine stärkere Affinität für die Cholera toxin B-Untereinheit als die Verbindungen 1-3, die wenig oder keine Affinität für die Cholera toxin B-Untereinheit haben.

[0135] Ein zweites Gemisch wurde dann im Bindungspuffer hergestellt und in ähnlicher Weise mittels FC-MS analysiert. Dieses Gemisch enthielt ein synthetisch hergestelltes GM₁-Analoges, d.h. $\beta\text{Gal}(1-3)\beta\text{GalNAc}(1-)\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}(-2)\alpha\text{Neu5Ac}$ (Verbindung 8), in einer unreinen Form (d.h. es enthielt nicht identifizierte Zwischenprodukte und Reaktionsnebenprodukte). Verbindung 8 wurde durch die Verfahren hergestellt, die beschrieben sind in P. Fügedi et al., "A Novel Promoter for the Efficient Construction of 1,2-trans Linkages in Glycoside Synthesis, Using Thioglycosides as Glycosyl Donors", *Carbohydr. Res.* 1986, 149, C9-C12, A. Marra et al., "Stereoselective Synthesis of 2-Thioglycosides of N-Acetylneuraminic Acid", *Carbohydr. Res.* 1989, 187, 35-42, und L. Lay et al., "Synthesis of the Propyl Glycoside of the Trisaccharide $\alpha\text{-L-Fucp-(1-2)-}\beta\text{-D-Galp-(1-3)-}\beta\text{-D-GalpNAc}$. Components of a Tumor Antigen Recognized by the Antibody Mbr1", *Helv. Chim. Acta.* 1994, 77, 509-514, deren Offenbarungen durch Bezugnahme vollständig hierin aufgenommen sind. Das Gemisch wurde durch die Säule infundiert, und das Massenspektrometer wurde so eingestellt, daß es mit negativen Ionen, die für die Verbindungen 3 und 8 repräsentativ sind, im Massenfragmentographiemodus betrieben wurde. Massenfragmentogramme wurden für diese Ionen erzeugt, wie es in [Fig. 9](#) gezeigt ist. [Fig. 9](#) zeigt, daß Verbindung 3 in das Hohlraumvolumen durchbrach (m/z 673,2). Ein komplexeres Muster wurde für die Ionen mit einem Masse/Ladung-Verhältnis von 717,2 μ beobachtet. Ein bestimmter Bruchteil dieser Ionen ($\sim 25\%$) brach auch in das Hohlraumvolumen durch, während die verbleibenden 75% bedeutend später durchbrachen (nach etwa 11 Min.). Dieses Zwei-Fronten-Profil zeigt, daß auf dem Niveau von 25% eine isobare Verunreinigung vorhanden ist, die nicht an die Cholera toxin B-Untereinheit bindet. Somit kann FC-MS das Vorliegen von isobaren, nicht bindenden Verunreinigungen ermitteln. Eine geeignete präzise Quantifizierung dieser Verunreinigungen kann ebenfalls erzielt werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Screenen einer Mehrzahl von Verbindungsbibliotheken zur Bestimmung der relativen oder absoluten Affinität einer Mehrzahl von mutmaßlichen Liganden in jeder Bibliothek gegenüber einem Zielrezeptor durch:

- (a) Bereitstellen einer Mehrzahl von Verbindungsbibliotheken, wobei jede Bibliothek eine Mehrzahl von mutmaßlichen Liganden umfaßt;
- (b) kontinuierliche Applizieren jeder Verbindungsbibliothek auf eine getrennte Säule, die einen Zielrezeptor umfaßt, unter Frontalchromatographiebedingungen, wodurch der Zielrezeptor kontinuierlich mit der Verbindungsbibliothek in Kontakt gebracht wird, wobei ein Ablauf von jeder Säule erhalten wird, wobei jede Säule 1 pmol bis 30 nmol aktive Stellen des Zielrezeptors pro Säule umfaßt;
- (c) intermittierendes Applizieren des Ablaufs von jeder Säule in ein einziges Massenspektrometer zur Bereitstellung von Massenspektren der in dem Ablauf vorhandenen und einen Teil desselben bildenden mutmaßlichen Liganden; und
- (d) Auswerten der Massenspektren zur Bestimmung einer Durchbruchzeit für jeden der mutmaßlichen Liganden in jeder Verbindungsbibliothek.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei jede Säule 10 pmol bis 250 pmol aktive Stellen des Zielrezeptors pro Säule umfaßt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei welchem zusätzlich
(e) die relative Affinität für jeden der mutmaßlichen Liganden in jeder Bibliothek gegenüber dem Zielrezeptor durch Vergleichen der Durchbruchzeit auf der Säule für jeden der mutmaßlichen Liganden in jeder Bibliothek relativ zu den anderen mutmaßlichen Liganden in derselben Bibliothek bestimmt wird.

4. Verfahren nach irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, bei welchem zusätzlich
(f) eine Dissoziationskonstante K_d für einen mutmaßlichen Liganden in einer Verbindungsbibliothek und den Zielrezeptor bestimmt wird.

5. Verfahren nach irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Mehrzahl der Säulen 2 bis 100 Säulen umfaßt.

6. Verfahren nach irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, wobei jede Verbindungsbibliothek unabhängig voneinander weniger als 10 000 mutmaßliche Liganden umfaßt.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei jede Verbindungsbibliothek unabhängig voneinander 5 bis 100 mutmaßliche Liganden umfaßt.
8. Verfahren nach irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, wobei jede Verbindungsbibliothek unabhängig voneinander mutmaßliche Liganden, ausgewählt aus der Gruppe von Kohlenhydraten, Monosacchariden, Oligosacchariden, Polysacchariden, Aminosäuren, Peptiden, Oligopeptiden, Polypeptiden, Proteinen, Nukleosiden, Nukleotiden, Oligonukleotiden, Polynukleotiden, Lipiden, Retinoiden, Steroiden, Glycopeptiden, Glycoproteinen, Proteoglycanen und synthetischen Analoga oder Derivaten hiervon, umfaßt.
9. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 7, wobei jede Verbindungsbibliothek unabhängig voneinander mutmaßliche Liganden, ausgewählt aus der Gruppe von synthetischen, kleine Moleküle darstellenden, organischen Verbindungen, umfaßt.
10. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 7, wobei jeder Zielrezeptor unabhängig voneinander aus der Gruppe von Proteinen, Glycoproteinen, Glycosaminoglycanen, Proteoglycanen, Integrinen, Enzymen, Lectinen, Selectinen, Zellhaftungsmolekülen, Toxinen, Bakterienpili, Transportproteinen, an der Signaltransduktion oder Hormonbindung beteiligten Rezeptoren, Hormonen, Antikörpern, Haupthistokompatibilitätskomplexen, Immunglobulinübertamilien, Cadherinen, DNA oder DNA-Fragmenten, RNA und RNA-Fragmenten, Vollzellen, Geweben, Bakterien, Pilzen, Viren, Parasiten, Prionen und synthetischen Analoga oder Derivaten hiervon ausgewählt ist.
11. Verfahren nach irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, wobei jeder Zielrezeptor an einen Festphasenträger gebunden ist.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei jeder Zielrezeptor kovalent an den Festphasenträger oder über eine Biotin-Avidin- oder Biotin-Streptavidin-Bindung gebunden ist.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, wobei der Festphasenträger aus der Gruppe von Harzperlen, Glasperlen, Siliciumdioxidchips, Siliciumdioxidkapillaren und Agarose ausgewählt ist.
14. Verfahren nach irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Ablauf aus der Säule vor Durchführung von Stufe (c) mit einem ergänzenden Verdünnungsmittel verdünnt wird.
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei das ergänzende Verdünnungsmittel eine Hauptmenge eines organischen Lösemittels und eine untergeordnete Menge eines wäßrigen Puffers umfaßt.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das organische Lösemittel aus der Gruppe von Acetonitril, Methanol und Isopropanol ausgewählt ist.
17. Verfahren nach irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es sich bei dem einzigen Massenspektrometer um ein Elektrospraymassenspektrometer handelt.
18. Verfahren nach Anspruch 1 zum Screenen einer Mehrzahl von Verbindungsbibliotheken zur Bestimmung der relativen Affinität einer Mehrzahl von mutmaßlichen Liganden gegenüber einem Zielrezeptor, bezogen auf eine oder mehrere Indikatorverbindungen, durch
- Bereitstellen einer Mehrzahl von Verbindungsbibliotheken, die eine Mehrzahl mutmaßlicher Liganden umfassen;
 - kontinuierliches Applizieren jeder Verbindungsbibliothek auf eine getrennte Säule, die einen Zielrezeptor umfaßt, unter Frontalchromatographiebedingungen, um die Säule mit der Verbindungsbibliothek ins Gleichgewicht zu setzen, wobei jeder Säule 1 pmol bis 10 nmol aktive Stellen des Zielrezeptors pro Säule umfaßt;
 - Bereitstellen mindestens einer Indikatorverbindung mit zuvor bestimmter Affinität für den Zielrezeptor und mit einer zuvor bestimmten Durchbruchzeit auf jeder Säule in Abwesenheit der Verbindungsbibliothek;
 - kontinuierliches Applizieren (i) eines Gemischs, umfassend die Verbindungsbibliothek und die Indikatorverbindung oder (ii) der Indikatorverbindung auf jede Säule unter Frontalchromatographiebedingungen, um einen Ablauf bereitzustellen;
 - Analysieren des Ablaufs aus jeder Säule durch Massenspektrometrie in einem einzigen Massenspektrometer zur Bestimmung einer Durchbruchzeit für die Indikatorverbindung.

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei jede Säule 10 pmol bis 250 pmol aktive Stellen des Zielrezeptors pro Säule umfaßt.
20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, bei welchem zusätzlich (f) bestimmt wird, ob irgendeiner der mutmaßlichen Liganden der Verbindungsbibliothek eine stärkere Affinität gegenüber dem Zielrezeptor aufweist als die Indikatorverbindung, indem die Durchbruchzeit für die Indikatorverbindung aus Stufe (e) mit der zuvor bestimmten Durchbruchzeit für die Indikatorverbindung in Abwesenheit der Verbindungsbibliothek verglichen wird.
21. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 18 bis 20, wobei jede Verbindungsbibliothek unabhängig voneinander weniger als 50 000 mutmaßliche Liganden umfaßt.
22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei jede Verbindungsbibliothek unabhängig voneinander 5 bis 100 mutmaßliche Liganden umfaßt.
23. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 18 bis 22, wobei jede Verbindungsbibliothek unabhängig voneinander mutmaßliche Liganden, ausgewählt aus der Gruppe von Kohlenhydraten, Monosacchariden, Oligosacchariden, Polysacchariden, Aminosäuren, Peptiden, Oligopeptiden, Polypeptiden, Proteinen, Nukleosiden, Nukleotiden, Oligonukleotiden, Polynukleotiden, Lipiden, Retinoiden, Steroiden, Glycopeptiden, Glycoproteinen, Proteoglycanen und synthetischen Analoga oder Derivaten hiervon, umfaßt.
24. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 18 bis 22, wobei jede Verbindungsbibliothek unabhängig voneinander mutmaßliche Liganden, ausgewählt aus der Gruppe von synthetischen, kleine Moleküle darstellenden, organischen Verbindungen, umfaßt.
25. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 18 bis 22, wobei jeder Zielrezeptor unabhängig voneinander aus der Gruppe von Proteinen, Glycoproteinen, Glycosaminoglycanen, Proteoglycanen, Integrinen, Enzymen, Lectinen, Selectinen, Zellhaftungsmolekülen, Toxinen, Bakterienpili, Transportproteinen, an der Signaltransduktion oder Hormonbindung beteiligten Rezeptoren, Hormonen, Antikörpern, Haupthistokompatibilitätskomplexen, Immunglobulinübertamilien, Cadherinen, DNA oder DNA-Fragmenten, RNA und RNA-Fragmenten, Vollzellen, Geweben, Bakterien, Pilzen, Viren, Parasiten, Prionen und synthetischen Analoga oder Derivaten hiervon ausgewählt ist.
26. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 18 bis 25, wobei jeder Zielrezeptor an einen Festphasenträger gebunden ist.
27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei jeder Zielrezeptor kovalent an den Festphasenträger oder über eine Biotin-Avidin- oder Biotin-Streptavidin-Bindung gebunden ist.
28. Verfahren nach Anspruch 26 oder 27, wobei der Festphasenträger aus der Gruppe von Harzperlen, Glasperlen, Siliciumdioxidchips, Siliciumdioxidkapillaren und Agarose ausgewählt ist.
29. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 18 bis 28, wobei die zuvor bestimmte Durchbruchzeit für die Indikatorverbindung in Abwesenheit der Verbindungsbibliothek weniger als 5 min beträgt.
30. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 18 bis 29, wobei der Ablauf aus jeder Säule vor Durchführung von Stufe (c) mit einem ergänzenden Verdünnungsmittel verdünnt wird.
31. Verfahren nach Anspruch 30, wobei das ergänzende Verdünnungsmittel eine Hauptmenge eines organischen Lösemittels und eine untergeordnete Menge eines wäßrigen Puffers umfaßt.
32. Verfahren nach Anspruch 31, wobei das organische Lösemittel aus der Gruppe von Acetonitril, Methanol und Isopropanol ausgewählt ist.
33. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 18 bis 32, wobei es sich bei dem einzigen Massenspektrometer um ein Elektrospraymassenspektrometer handelt.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

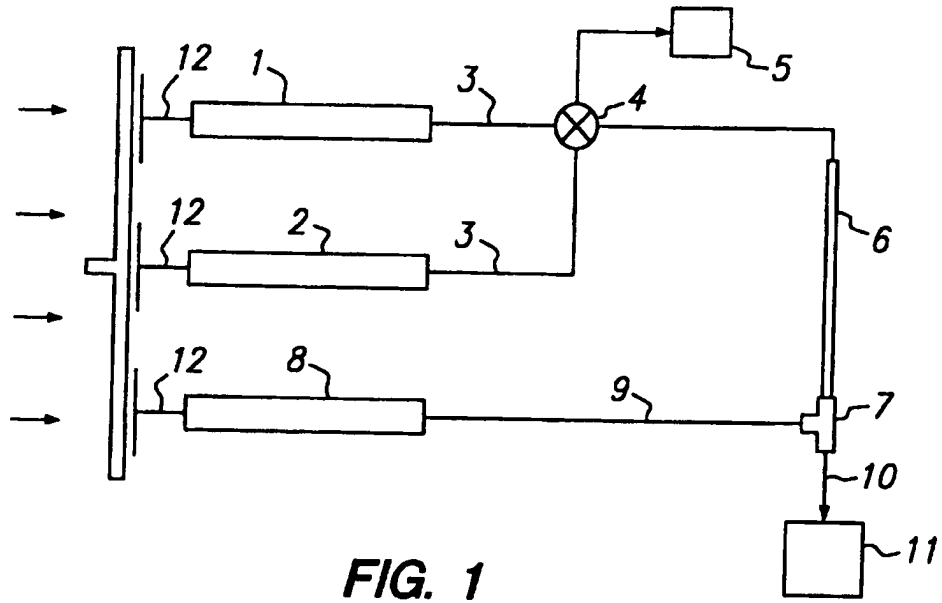


FIG. 1

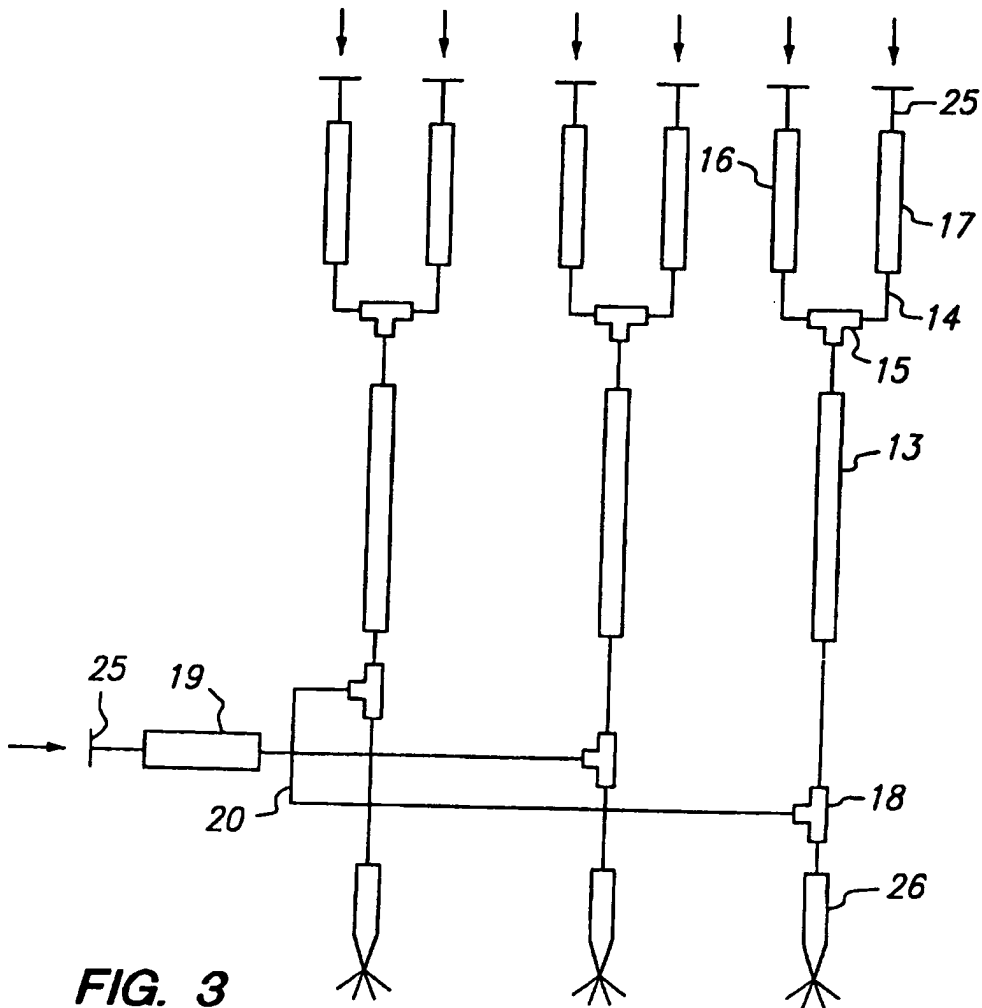
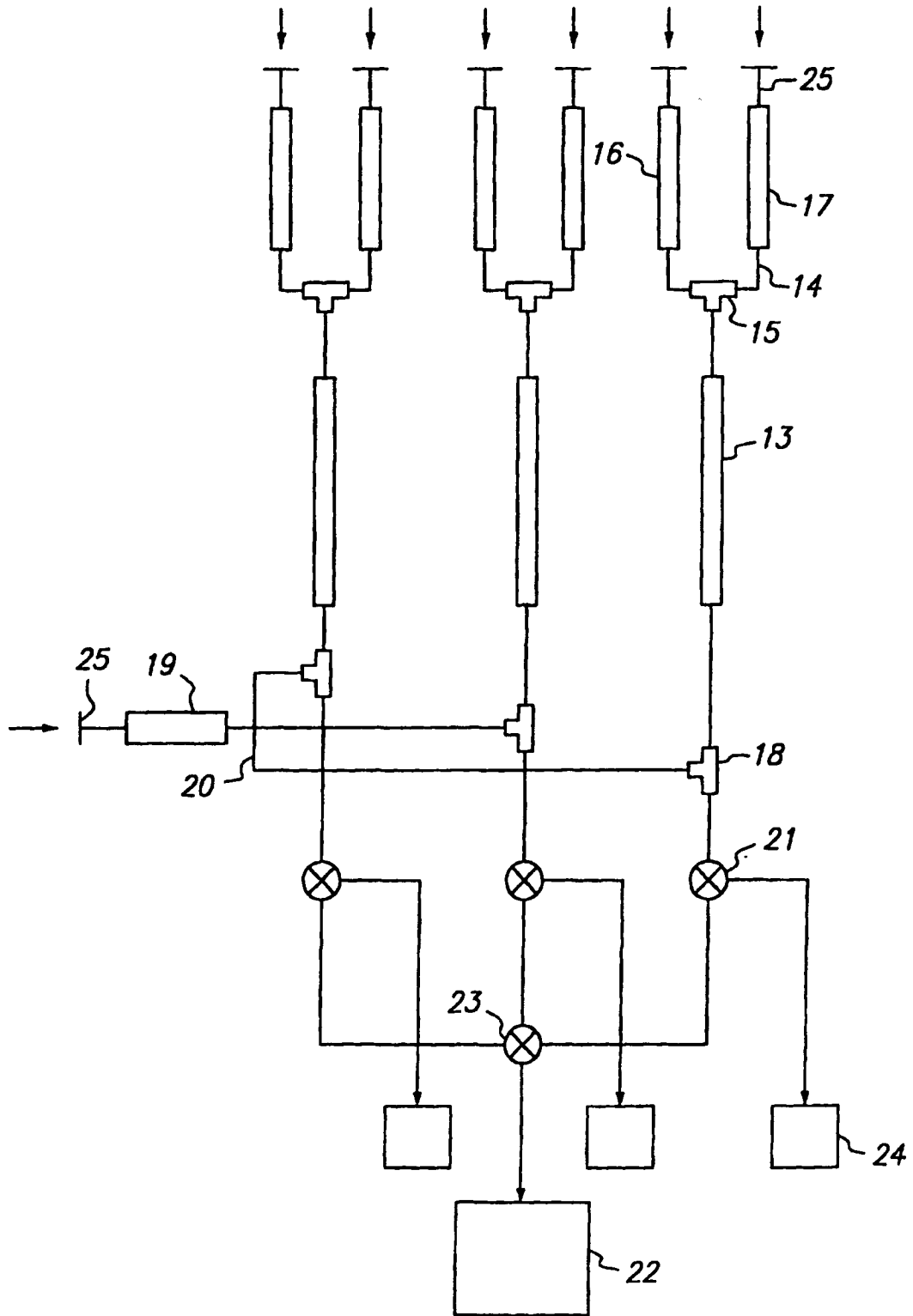
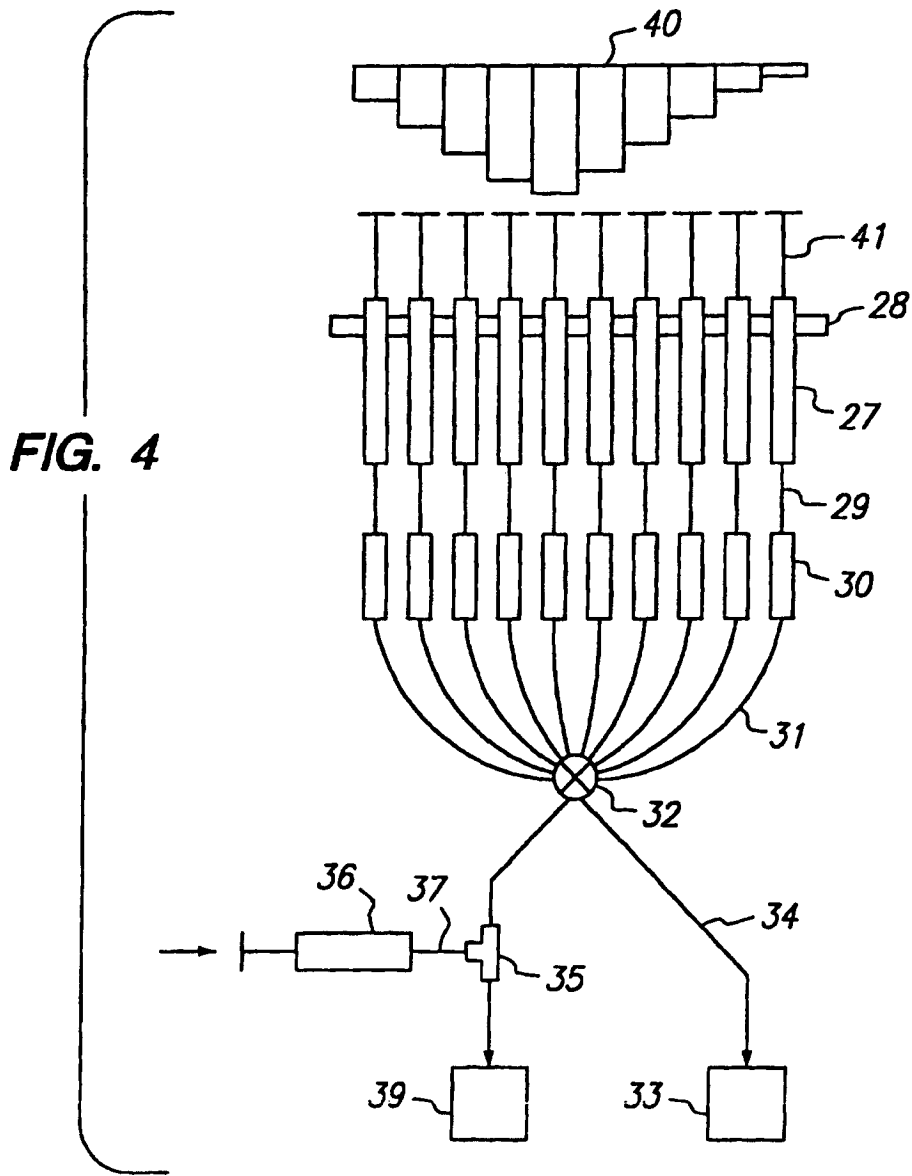


FIG. 3

FIG. 2





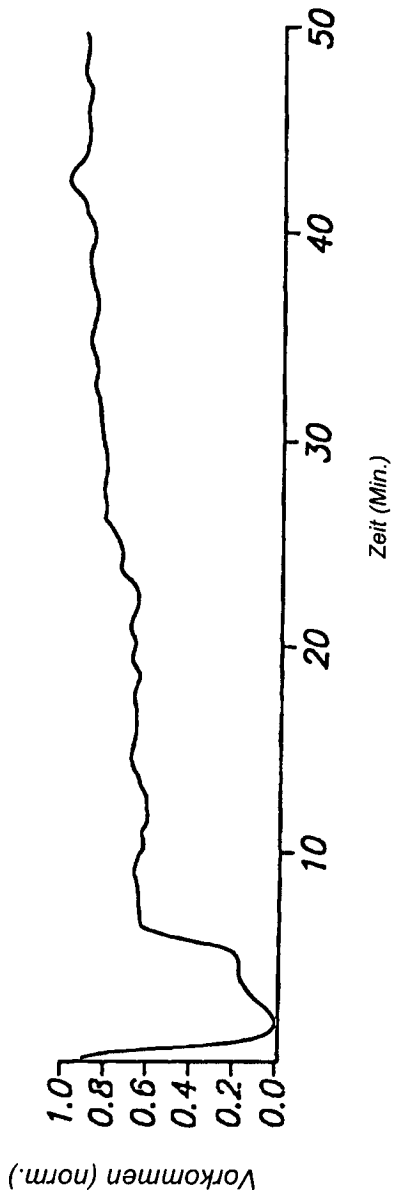


FIG. 5A

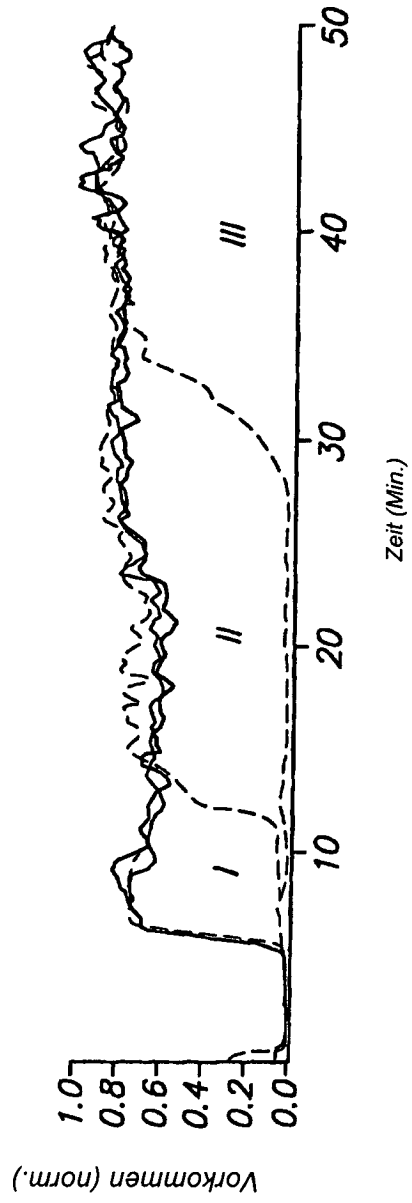


FIG. 5B

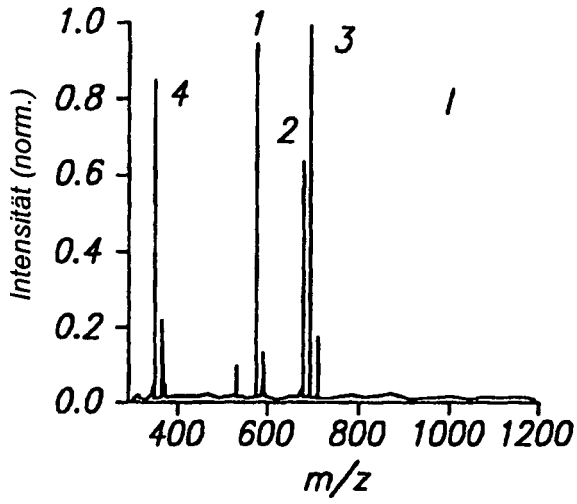


FIG. 5C

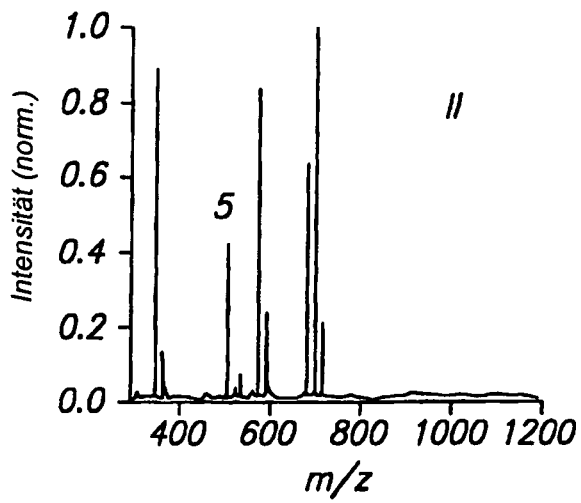


FIG. 5D

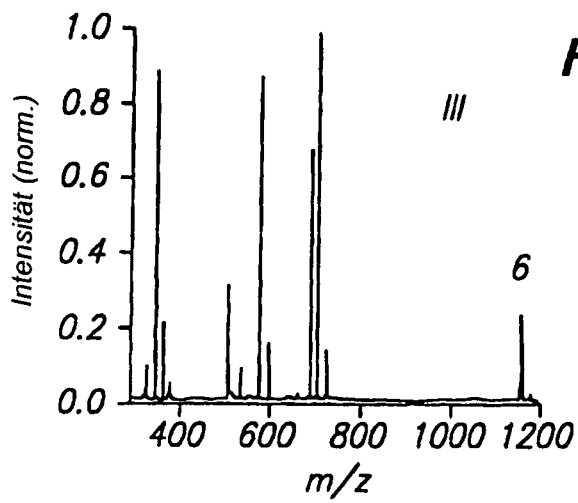


FIG. 5E

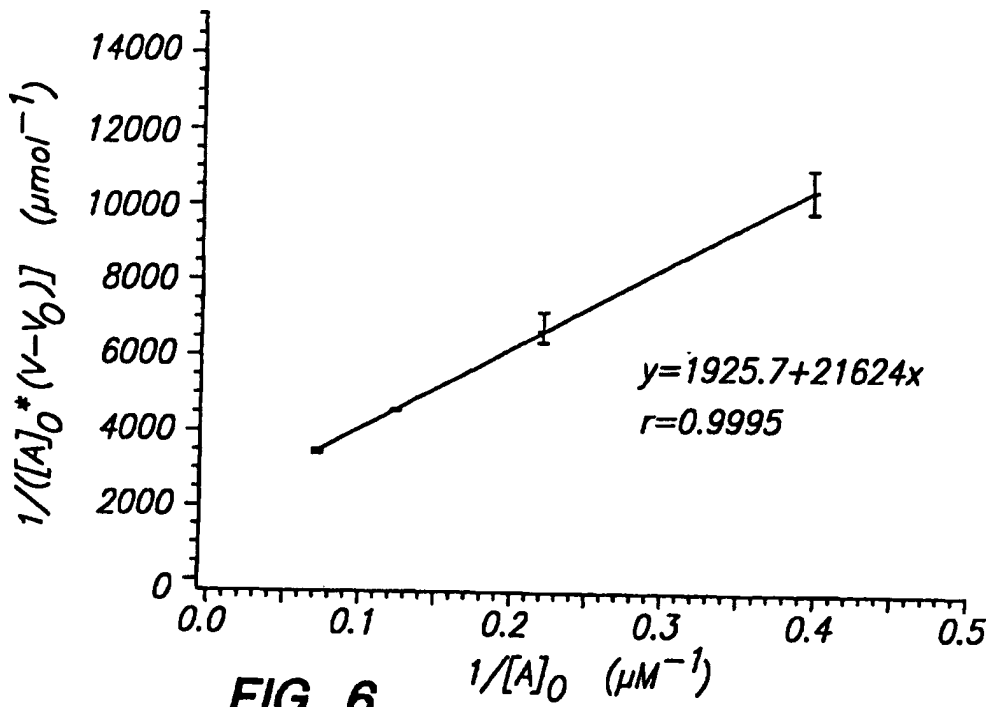


FIG. 6

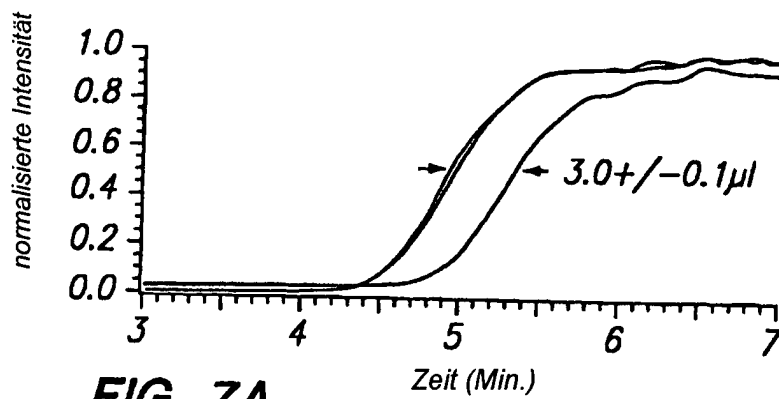


FIG. 7A

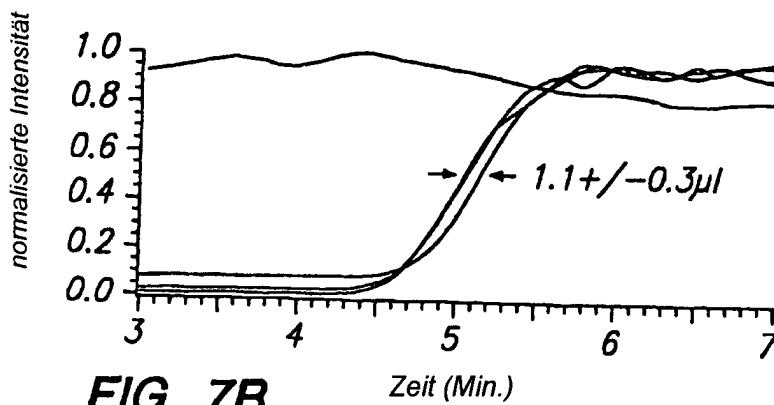


FIG. 7B

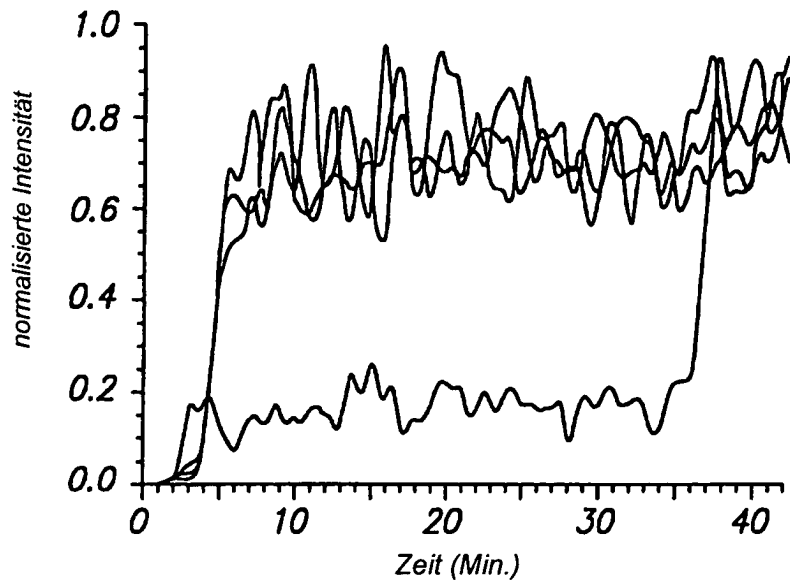


FIG. 8

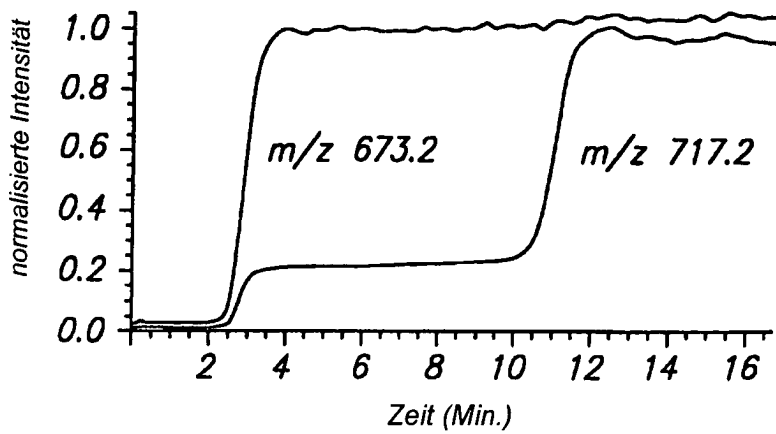


FIG. 9