

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
18. Mai 2017 (18.05.2017)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2017/080906 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 21/64 (2006.01) *G01N 35/02* (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2016/076546
- (22) Internationales Anmeldedatum:
3. November 2016 (03.11.2016)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2015 221 969.0
9. November 2015 (09.11.2015) DE
- (71) Anmelder: TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN
[DE/DE]; Helmholtzstr. 10, 01069 Dresden (DE).
- (72) Erfinder: DIEZ, Stefan; Ermelstr. 15, 01277 Dresden
(DE). KORTEN, Till; Wittenberger Str. 64, 01309
Dresden (DE). TAVKIN, Jelena; Dürerstr. 96, 01307
Dresden (DE). RUHNOW, Felix; Georgenstr. 2a, 01097
Dresden (DE).
- (74) Anwalt: PFENNING, MEINIG & PARTNER MBB; An
der Frauenkirche 20, 01067 Dresden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,
KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG,
KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)

(54) Title: METHOD FOR THE AUTOMATED DETECTION OF AN ACTIVITY OF ACTIVE SUBSTANCES IN A SOLUTION

(54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUR AUTOMATISIERTEN DETEKTION EINER AKTIVITÄT VON WIRKSTOFFEN IN
EINER LÖSUNG

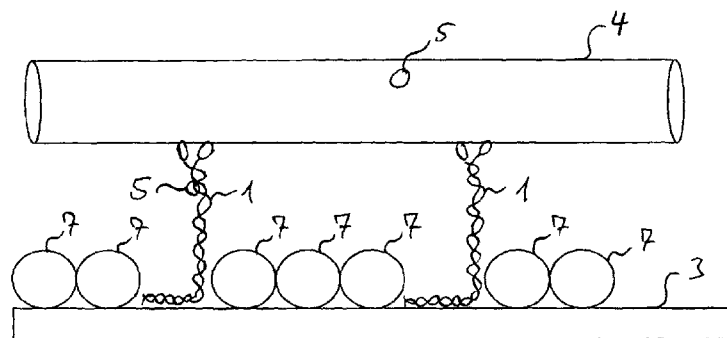


Fig. 1

(57) Abstract: The present invention relates to a method for the automated detection of an activity of active substances in a solution, according to which a motor protein (1) is automatically deposited on a surface (3) of a cavity (9) in at least one sample-receiving container (2), and a cytoskeletal filament (4) corresponding to the motor protein (1) is deposited on the motor protein (1), or the cytoskeletal filament (4) is deposited on the surface (3) of the cavity (9) in the sample-receiving container (2) and the motor protein (1) corresponding to the cytoskeletal filament (4) is deposited on the cytoskeletal filament (4). The cytoskeletal filament (4) and/or the motor protein (1) are marked with a fluorescent dye (5) and the active substance to be examined and an enzyme for improving fluorescence properties are added to the solution. In addition, adenosine triphosphate is added for triggering a movement of the motor protein (1) and the cytoskeletal filament (4) arranged thereon, and a movement of the cytoskeletal filament (4) caused by the motor protein (1) is detected by optical detection of the fluorescent dye.

(57) Zusammenfassung:

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 2017/080906 A1



Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur automatisierten Detektion einer Aktivität von Wirkstoffen in einer Lösung, bei dem automatisiert auf eine Oberfläche (3) in einer Vertiefung (9) mindestens eines Probenaufnahmebehälters (2) ein Motorprotein (1) sowie auf das Motorprotein (1) ein zu dem jeweiligen Motorprotein (1) korrespondierendes Filament (4) eines Zytoskeletts aufgebracht wird oder auf die Oberfläche (3) der Vertiefung (9) des Probenaufnahmebehälters (2) das Filament (4) des Zytoskeletts und auf das Filament (4) des Zytoskeletts das zu dem Filament (4) des Zytoskeletts korrespondierende Motorprotein (1) aufgebracht werden. Das Filament (4) des Zytoskeletts und/oder das Motorprotein (1) ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff (5) markiert und der zu untersuchende Wirkstoff und ein Enzym zur Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften werden der Lösung zugegeben. Außerdem wird Adenosintriphosphat zum Auslösen einer Bewegung des Motorproteins (1) sowie des daran angeordneten Filaments (4) des Zytoskeletts zugegeben und eine durch das Motorprotein (1) verursachte Bewegung des Filaments (4) des Zytoskeletts durch optisches Detektieren des Fluoreszenzfarbstoffs (5) detektiert.

Verfahren zur automatisierten Detektion einer Aktivität von Wirkstoffen in
einer Lösung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur automatisierten Detektion einer Aktivität von Wirkstoffen in einer Lösung und ein System zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

10 Motorproteine sind an vielen Prozessen in der Zellbiologie beteiligt und beispielsweise essenziell für Zellteilung, Transport von Neurotransmittern, Mitochondrien, Zellorganellen, Boten-RNA oder Zellbewegung. Dementsprechend spielen Motorproteine eine zentrale Rolle bei vielen Krankheiten wie Krebs, Neuropathie oder Ciliopathie.

15 Um neue Medikamente zu finden bedient man sich meist sogenannter "high throughput screening"-Techniken, die Hunderttausende oder Millionen von Molekülen auf eine therapeutische Wirkung hin untersuchen. Bei Motorproteinen wird hierbei ein Verbrauch an Adenosintriphosphat (ATP) gemessen. Ist

der Verbrauch an ATP niedriger als normal, geht man von einer inhibitorischen Wirkung des Wirkstoffs aus, wenn der Verbrauch höher ist, wird auf eine aktivatorische Wirkung geschlossen.

5 Nachteilig an dieser Lösung ist, dass nicht die eigentliche Funktion des Motorproteins gemessen wird, sondern nur eine indirekte Messung erfolgt. Hierbei können leicht Wirkstoffe übersehen oder missinterpretiert werden, die nicht direkt eine ATPaseaktivität, sondern anderweitig den molekularen Transport beeinflussen.

10 Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, das die genannten Nachteile vermeidet, mit dem also eine direkte Messung der Aktivität von Wirkstoffen zeiteffizient mit hohem Durchsatz ermöglicht wird. Es soll daher ein Verfahren bereitgestellt werden, mit dem auf schnelle Art und Weise der Einfluss eines Wirkstoffs auf die Aktivität eines Motorproteins geprüft werden kann, wobei auch Einflüsse erfasst werden können, die sich nicht auf die ATPase-Aktivität des Motorproteins auswirken.

15 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren nach Anspruch 1 und ein System nach Anspruch 17. Vorteilhafte Ausgestaltungen und Weiterbildungen sind in den abhängigen Ansprüchen beschrieben.

20 Die Lösung der Aufgabe basiert auf der Idee, einen automatisierten und für einen hohen Durchsatz geeigneten *In-vitro*-Motilitätsassay mit einer verbesserten Entfernung von Sauerstoff aus dem Reaktionsmilieu bereitzustellen und diesen in einem System zur automatisierten Aufnahme und Auswertung von Fluoreszenzbildern zu integrieren.

25 Erfindungsgemäß wird ein Verfahren zur automatisierten Detektion einer Aktivität von Wirkstoffen in einer Lösung bereitgestellt. Das Verfahren weist einen Verfahrensschritt auf, bei dem automatisiert auf eine Oberfläche in einer Vertiefung mindestens eines Probenaufnahmebehälters ein Motorprotein sowie auf das Motorprotein ein zu dem jeweiligen Motorprotein korrespondierendes Filament eines Zytoskeletts aufgebracht wird. Alternativ wird automatisiert auf die Oberfläche der Vertiefung des Probenaufnahmebehälters

30

35

das Filament des Zytoskeletts und auf das Filament des Zytoskeletts das zu dem Filament des Zytoskeletts korrespondierende Motorprotein aufgebracht. Das Filament des Zytoskeletts und bzw. oder das Motorprotein sind mit einem Fluoreszenzmarker, typischerweise einem Fluoreszenzfarbstoff, markiert, außerdem werden der zu untersuchende Wirkstoff und ein Enzym der Lösung zugegeben oder sind bereits in der Lösung enthalten. Das Enzym dient hierbei einer Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften der Lösung. Daran anschließend wird Adenosintriphosphat (ATP) zum Auslösen einer Bewegung des Motorproteins sowie des daran angeordneten Filaments des Zytoskeletts zugegeben oder ist der Lösung bereits zugefügt sowie eine durch das Motorprotein verursachte Bewegung des Filaments des Zytoskeletts durch optisches Detektieren des Fluoreszenzmarkers detektiert.

Durch das automatisierte Einbringen der Lösung in die Vertiefung des Probenaufnahmebehälters können zeiteffizient die Lösungen vorbereitet und anschließend eingebracht und ebenfalls automatisiert die Bewegung des Motorproteins detektiert werden, da eine manuelle Vorbereitung eines Assays entfällt. Der Probenaufnahmebehälter weist hierzu typischerweise mehrere Vertiefungen auf, so dass in einem einzelnen Probenaufnahmebehälter verschiedene Wirkstoffe in den verschiedenen Vertiefungen angeordnet sein können und auf ihre Aktivität bzw. inhibitorische Wirkung untersucht werden können.

Unter dem Begriff „Wirkstoff“ wird erfindungsgemäß ein Stoff verstanden, der auf die Motorfunktion des zu untersuchenden Motorproteins eine aktivierende oder inhibierende Wirkung hat.

Der direkte Nachweis der Bewegung des Motorproteins erfolgt hierbei durch das optische Detektieren der Fluoreszenz, also eine orts aufgelöste Messung des Fluoreszenzmarkers.

Das Enzym sorgt hierbei dafür, dass eine negative Beeinflussung der Fluoreszenz beispielsweise durch Sauerstoff gehemmt wird und somit eine Auflösung aufgrund der erhöhten Signalstärke des Fluoreszenzsignals erhöht ist. Da Sauerstoff in Verbindung mit für die Fluoreszenzmessung benötigter intensiver Beleuchtung nicht nur Farbstoffe, sondern auch Motorproteine schädigen kann, werden Verfälschungen der Messung durch Schäden an den Motorpro-

teinen bzw. Filamenten durch Zugabe des Enzyms vermieden.

Durch die automatisierte Vorbereitung der Messung kann der Probenaufnahmebehälter, der typischerweise mehrere Vertiefungen aufweist, um parallel oder nacheinander mehrere Wirkstoffe untersuchen zu können, schneller vermessen werden und ein Durchsatz des Verfahrens wird drastisch erhöht.

Als Fluoreszenzmarker kann ein Quantenpunkt, der auch als "quantum dot" bezeichnet wird, verwendet werden. Typischerweise ist der Fluoreszenzmarker ein Fluoreszenzfarbstoff wie Rhodamin, Fluoreszein, Alexa 488 und bzw. oder Cy5. Zum Markieren des Motorproteins bzw. der Motorproteine kann ein fluoreszentes Protein wie grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein, GFP), aber auch ein Protein-Tag wie beispielsweise ein Snap-Tag verwendet werden.

Als Enzym wird vorzugsweise Glucose-Oxidase und/oder Pyranose-Oxidase der Lösung zugegeben. Optional wird der Lösung entweder Glucose-Oxidase oder Pyranose-Oxidase zugegeben. Während Glucose-Oxidase zwar ebenfalls die beabsichtigte Wirkung entfaltet, jedoch einen Abfall des pH-Werts über der Zeit aufweist, bleibt der pH-Wert bei Pyranose-Oxidase über der Zeit konstant, so dass hier bei zeitlich stabilen Versuchsbedingungen die Aktivität besonders gut untersucht werden kann. Pyranose-Oxidase sorgt dafür, dass Sauerstoff aus dem System entfernt wird. Somit wird eine Schädigung der beteiligten Proteine und Fluoreszenzfarbstoffe durch Licht während der Fluoreszenzmessungen verringert.

Mindestens ein Mikrotubulus und/oder ein Aktinfilament wird typischerweise als Filament des Zytoskeletts eingesetzt, wobei Kinesin, Dynein und/oder Myosin als Motorprotein verwendet werden kann. Diese Kombination erlaubt eine zuverlässige Messung der Aktivität aufgrund zueinander korrespondierender Moleküle. Da das Motorprotein Myosin mit dem Filament Aktin zusammenwirkt und das Motorprotein Dynein und/oder das Motorprotein Kinesin mit dem Filament Mikrotubulus zusammenwirkt wird vorteilhafterweise die Kombination Myosin und Aktin bzw. die Kombination Dynein und/oder Kinesin mit Mikrotubulus eingesetzt.

Das Motorprotein und/oder das Filament kann über unspezifische Adsorption oder eine spezifische Bindung auf der Oberfläche der Vertiefung des Proben-
aufnahmebehälters angeordnet werden. Bevorzugt wird das Motorprotein
und/oder das Filament über unspezifische nicht-kovalente Wechselwirkungen,
über spezifische nicht-kovalente Wechselwirkungen oder über mindestens
eine chemisch kovalente Bindung auf der Oberfläche der Vertiefung des Pro-
benaufnahmebehälters angeordnet. Besonders bevorzugt wird das Motorpro-
tein oder das Filament über einen Antikörper auf der Oberfläche der Vertie-
fung des Probenaufnahmebehälters angeordnet, wobei der Antikörper optio-
nal über ein Adapterprotein ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Prote-
in A, Protein G und Derivate und Kombinationen hiervon an der Oberfläche (3)
immobilisiert wird. Hierbei ist aufgrund der zuverlässigeren Bindung die Ver-
wendung von Antikörpern zwar bevorzugt, allerdings liefert auch die unspezi-
fische Adsorption den gewünschten Effekt. Alternativ oder zusätzlich können
auch Polymere und eine kovalente Kopplungschemie bzw. andere Proteine
verwendet werden, die spezifisch an das Filament bindet.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Oberfläche durch eine
Silanisierung mit einer Silanverbindung, vorzugsweise Dichlordimethylsilan,
beschichtet.

Um die Aktivität des Motorproteins zu verbessern, kann die Oberfläche vor
dem Aufbringen des Motorproteins oder des Filaments des Zytoskeletts durch
bereichsweises Aufbringen eines Moleküls, vorzugsweise eines Moleküls aus-
gewählt aus der Gruppe bestehend aus Polyol, Polyethylenglycol, Derivate von
Polyethylenglycol, Albumin, Casein und Mischungen hiervon, insbesondere
Casein, vorbehandelt werden. Dieses Molekül kann insbesondere nach einer
Beschichtung der Oberfläche mit einer Silanverbindung aufgebracht werden.

Die Oberfläche kann auch mit Polymer, zum Beispiel Polyethylenglycol, PEG,
bereichsweise vorbehandelt werden. Somit kann nur auf bestimmten, nicht
geblockten Bereichen eine Detektion erfolgen und definierte räumliche Mess-
bereiche gegeben sein.

Vorzugsweise wird eine der Oberfläche der Vertiefung des Probenaufnahme-
behälters gegenüberliegende Außenseite des Probenbehälters oder die Ober-

fläche der Vertiefung selbst durch eine Silanisierung mit einer Silanverbindung, vorzugsweise Dichlordimethylsilan oder 1H,1H,2H,2H-Perfluorodecyltrichlorosilan, beschichtet, um eine Immersionsmikroskopie durchführen zu können, da auf silanisierten Oberflächen Flüssigkeitstropfen stabiler sind.

Vor dem Aufbringen des Motorproteins oder des Filaments des Zytoskeletts kann die Oberfläche durch Spülen mit einem alkalischen Reiniger, Ethanol und bzw. oder destilliertem Wasser gereinigt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das optische Detektieren des Fluoreszenzfarbstoffs

- i) eine orts aufgelöste Messung des Fluoreszenzmarkers, bevorzugt eine interne Totalreflexionsmikroskopie und/oder Inversionsmikroskopie; und/oder
- ii) die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs mit einem Laser.

Der Fluoreszenzfarbstoff kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus anorganischen Fluoreszenzfarbstoffen, organischen Fluoreszenzfarbstoffen und Mischungen hiervon, bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Quantum Dot, organisches Fluoreszenzmolekül mit einer molaren Masse von $\leq 1,2$ kDa und fluoreszierendes Protein, besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Rhodamin, Fluorescein, Alexa 488, Cy5, GFP und Kombinationen hiervon.

Der Fluoreszenzfarbstoff kann über mindestens eine chemisch kovalente Bindung mit dem Filament des Zytoskeletts und/oder dem Motorprotein verbunden sein.

Das Filament des Zytoskeletts kann mit einem ersten Fluoreszenzfarbstoff und das Motorprotein mit einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff markiert sein, wobei der erste und zweite Fluoreszenzfarbstoff optional ein FRET-Paar bilden und das optische Detektieren des Fluoreszenzfarbstoffs eine FRET-Messung umfasst.

Der Lösung kann ferner ein Reduktionsmittel, bevorzugt Dithiothreitol, zugegeben werden.

5 Darüberhinaus ist es bevorzugt, wenn der Lösung eine Pyranose, insbesondere Glukose, zugegeben wird.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform wird der Lösung ferner mindestens ein Abbauinhibitor eines Filaments des Zytoskeletts, bevorzugt ein Abbauinhibitor von Mikrotubuli und/oder Aktinfilamenten, besonders bevorzugt ein Abbauinhibitor ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Taxol, Taxol-Derivate, Phallotoxin, Phallotoxin-Derivate und Mischungen hiervon, zugegeben. Wird als Filament des Zytoskeletts ein Mikrotubulus eingesetzt, ist die Zugabe von Taxol und seinen Derivaten bevorzugt. Wird als Filament des Zytoskeletts Aktin eingesetzt, ist die Zugabe von Phallotoxin und seinen Derivaten (z.B. Phalloidin) bevorzugt.

15 Der Probenaufnahmebehälter kann ein Material enthalten oder daraus bestehen, das für Licht im Wellenlängenbereich von 400 nm bis 780 nm transparent ist, bevorzugt in diesem Wellenlängenbereich transparentes Glas und/oder transparenter Kunststoff.

25 Ferner wird erfindungsgemäß ein System zur automatisierten Detektion einer Aktivität von Wirkstoffen in einer Lösung bereitgestellt. Dieses System weist eine Befüllvorrichtung und eine optische Aufnahmeeinrichtung auf. Die Befüllvorrichtung ist dazu ausgebildet, mindestens einen Probenaufnahmebehälter automatisiert zu befüllen und ist vorzugsweise ein Pipettierroboter. Die optische Aufnahmeeinrichtung ist eingerichtet, den Fluoreszenzmarker in der Lösung automatisiert zu detektieren. Typischerweise ist die optische Aufnahmeeinrichtung zum Durchführen einer internen Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie mit einem Immersionsobjektiv ausgestattet, um eine möglichst hohe Auflösung zu erreichen und auch einzelne Moleküle abbilden zu können.

35 Insbesondere enthält das erfindungsgemäße System zur automatisierten Detektion einer Aktivität von Wirkstoffen in einer Lösung eine Befüllvorrichtung, wobei die Befüllvorrichtung einen ersten Vorratsbehälter für ein Filament des Zytoskeletts und ein Motorprotein enthält, wobei das Filament des

Zytoskeletts und/oder das Motorprotein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist,

wobei die Befüllvorrichtung einen zweiten Vorratsbehälter für einen Wirkstoff enthält;

5 wobei die Befüllvorrichtung einen dritten Vorratsbehälter für ein Enzym zur Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften der Lösung enthält;

wobei die Befüllvorrichtung einen vierten Vorratsbehälter für Adenosintri-
phosphat enthält; und

10 wobei die Befüllvorrichtung dazu konfiguriert ist, Motorprotein, das zu dem jeweiligen Motorprotein korrespondierendes Filament eines Zytoskeletts, Wirkstoff, Enzym und Adenosintri-
phosphat automatisiert und sequenziell auf eine Oberfläche in einer Vertiefung mindestens eines Probenaufnahmebehäl-
ters aufzubringen.

15 Ferner enthält das System eine optische Aufnahmeeinrichtung zum automati-
sierten Detektieren des Fluoreszenzfarbstoffs in der Lösung.

In einer bevorzugten Ausgestaltungsform enthält der dritte Vorratsbehälter ein Enzym, bevorzugt Glucose-Oxidase und/oder Pyranose-Oxidase, optional
entweder Glucose-Oxidase oder Pyranose-Oxidase.

20

Der erste Vorratsbehälter der Befüllvorrichtung kann eine erste Kammer und eine zweite Kammer aufweisen, wobei die erste Kammer das Motorprotein enthält und die zweite Kammer das Filament des Zytoskeletts enthält.

25

Das System ist vorzugsweise dazu konfiguriert, automatisiert auf eine Oberfläche in einer Vertiefung mindestens eines Probenaufnahmebehälters

i) erst ein Motorprotein (1) und anschließend ein zu dem jeweiligen Motor-
protein (1) korrespondierendes Filament (4) eines Zytoskeletts aufzubrin-
gen; und/oder

30

ii) erst ein Filament (4) eines Zytoskeletts und anschließend das zu dem Fi-
lament (4) des Zytoskeletts korrespondierende Motorprotein (1) aufzu-
bringen; und

dann den Wirkstoff und das Enzym zur Verbesserung der Fluoreszenzeigen-
schaften der Lösung zuzugeben und anschließend Adenosintri-
phosphat zuzu-
35 geben.

Das System kann

- i) dazu konfiguriert sein, eine orts aufgelöste Messung eines Fluoreszenzfarbstoffs, bevorzugt eine interne Totalreflexionsmikroskopie und/oder Inversionsmikroskopie, durchzuführen; und/oder
- ii) einen Laser zur Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffs enthalten.

Die optische Aufnahmeeinrichtung kann zum Durchführen einer internen Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie mit einem Immersionsobjektiv ausgebildet sein.

Das System kann eine Steuer- und Auswerteeinheit (14) zum automatisierten Ansteuern, Messen und Auswerten enthalten.

Das System enthält bevorzugt eine Laserstrahlungsquelle zum Anregen des Fluoreszenzfarbstoffs mit einem Laserstrahl.

Das System kann dadurch gekennzeichnet sein, dass der

- i) erste Vorratsbehälter ein Filament des Zytoskeletts und ein Motorprotein enthält; und/oder
- ii) zweite Vorratsbehälter einen Wirkstoff enthält; und/oder
- iii) vierte Vorratsbehälter Adenosintriphosphat enthält.

Die Befüllvorrichtung kann einen fünften Vorratsbehälter für ein Reduktionsmittel aufweisen, wobei der fünfte Vorratsbehälter bevorzugt ein Reduktionsmittel, vorzugsweise Dithiotreitol, und/oder eine Pyranose, vorzugsweise Glucose, enthält.

Der Probenaufnahmebehälter weist vorzugsweise mehr als eine Vertiefung zur Aufnahme der Lösung auf, so dass automatisiert mit hohem Durchsatz die Aktivität der Wirkstoffe gemessen werden kann.

Es kann auch vorgesehen sein, dass die Befüllvorrichtung in einem ersten Schritt die Vertiefungen nur mit der Lösung sowie Motorproteinen und Filamenten füllt, und nachfolgend in einem separaten zweiten Schritt den Wirkstoff sowie das Enzym zu dieser Lösung hinzugibt.

Ausführungsbeispiele der Erfindung sind in den Zeichnungen dargestellt und werden nachfolgend anhand der Figuren 1 bis 6 erläutert.

Es zeigen:

5

Fig. 1 eine schematische seitliche Ansicht einer mit Casein blockierten Oberfläche mit darauf aufgebrachtem Motorprotein und an einem Motorprotein angeordnetem Filament des Zytoskeletts;

10

Fig. 2 eine Figur 1 entsprechende Ansicht, bei dem das Motorprotein über Antikörper und ein Verbindungsprotein auf der Oberfläche angeordnet ist;

15

Fig. 3 eine Figur 1 entsprechende Ansicht, bei dem das Filament über Antikörper auf der Oberfläche angebracht ist und das Motorprotein an dem Filament angeordnet ist;

Fig. 4 eine Mikrotiterplatte als Probenaufnahmebehälter;

20

Fig. 5 ein schematisch dargestelltes automatisiertes Befüllen des Probenaufnahmebehälters und

Fig. 6 ein schematisch dargestelltes automatisiertes optisches Vermessen des Probenaufnahmebehälters.

25

30

Figur 1 zeigt in einer schematischen seitlichen Ansicht eine Oberfläche 3 einer Vertiefung eines Probenaufnahmebehälters, die bereichsweise mit Casein 7 blockiert ist. Auf den nicht durch das Casein 7 blockierten Bereichen der Oberfläche 3 ist durch unspezifische Adsorption ein Motorprotein 1, im dargestellten Ausführungsbeispiel Kinesin, angeordnet. An dem Ende des Motorproteins 1, das dem auf der Oberfläche 3 angeordneten Ende des Motorproteins 1 entgegengesetzt ist, steht das Motorprotein 1 mit einem Filament 4 eines Zytoskeletts in Kontakt. Im dargestellten Ausführungsbeispiel ist das Filament 4 ein Mikrotubulus. Das Filament 4 korrespondiert zu dem verwendeten Motorprotein 1, so dass unter Zugabe bzw. Verbrauch von Adenosintriphosphat eine durch das Motorprotein 1 initiierte Bewegung des Filaments 4 erfolgt.

35

Um diese Bewegung detektieren zu können, ist in dem dargestellten Ausführungsbeispiel an dem Filament 4 ein Fluoreszenzfarbstoff 5 angeordnet. Da diese Fluoreszenzfarbstoffe 5 ortsfest an ihrem jeweiligen Träger fixiert sind, kann aus der Detektion dieser fluoreszierenden Punkte auf eine Bewegung des Filaments 4 geschlossen werden. In weiteren Ausführungsbeispielen kann, wie in Figur 1 beispielhaft ebenfalls dargestellt, der Fluoreszenzfarbstoff 5 alternativ oder zusätzlich auch an dem Motorprotein 1 angeordnet sein.

Der in Figur 1 dargestellte Gleitassay kann in dem dargestellten Ausführungsbeispiel für eine ganze Mikrotiterplatte mit 384 Näpfchen erhalten werden, indem zum Aufbringen der Caseinbeschichtung zunächst 288 µl von 10 mg/ml Casein 7, 57,80 µl von 100mM Adenosintriphosphat sowie 5414,40 µl von 80 mM PIPES pH 6.9, 1 mM EGTA, 1mM MgCl₂ (BRB80, Brinkley's Reconstitution Buffer) als Puffer auf die Oberfläche 3 aufgebracht werden. Die gesamten 15 µl dieser Caseinlösung werden in ein einzelnes Näpfchen der Mikrotiterplatte gegeben und verbleiben für eine Inkubationszeit von 3 Minuten darin. Anschließend wird die Caseinlösung aus den Näpfchen entfernt. Die hier und im Folgenden wiedergegebenen Konzentrationsangaben beziehen sich auf eine Mikrotiterplatte mit 384 Näpfchen ohne Berücksichtigung des Totvolumens.

Kinesin als Motorprotein 1 wird aufgebracht, indem 11,5 µl von 10 mg/ml Casein 7, 115,2 µl von 0,2 mg/ml Kinesin-1, 115,2 µl von 1M Dithiotreitol (DTT), 57,6 µl von 1mM Adenosintriphosphat und 5460,5 µl BRB80 aufgebracht werden. Diese Kinesinlösung wird ebenfalls in jedes der Näpfchen eingebracht und verbleibt dort für 3 Minuten, bevor sie entfernt wird. Anschließend kann nochmals je 16512 µl Caseinlösung zweimal in die Näpfchen eingebracht werden und wird ohne Inkubationszeit aus diesen wieder entfernt.

Durch Aufbringen einer "motility solution" wird schließlich das Filament 4 des Zytoskeletts auf dem Motorprotein 1 angeordnet. Hierzu wird 115,2 µl von 10 mg/ml Casein 7, 292,3 µl 0,67 µM Mikrotubuli, 230,4 µl 2M Glucose, 28,8 µl 2 mg/ml Catalase, 230,4 µl 1M Dithiotreitol, 57,6 µl 1mM Taxol, 987,7 µl BRB80 und 57,6 µl von 100 mM Adenosintriphosphat aufgebracht.

Nach dem Einbringen in die Nöpfchen verbleibt diese Lösung auch darin.

Schließlich wird in dem gezeigten Ausführungsbeispiel noch Pyranose-Oxidase (PO) beigefügt, indem 147,2 µl 27 mg/ml PO, 3116,8 µl BRB80 und 576 µl insgesamt oder 1,5 µl in jedes der Nöpfchen von verschiedenen Konzentrationen eines Inhibitors als Wirkstoff zugefügt werden. Auch die Inhibitorlösung verbleibt zusammen mit der Beweglichkeitslösung oder "motility solution" in den Nöpfchen. Zusätzlich wird abschließend noch Mineralöl in die Nöpfchen pipettiert. Alle Pipettierschritte werden automatisiert durchgeführt.

In Figur 2 ist in einer Figur 1 entsprechenden Darstellung ein weiteres Ausführungsbeispiel gezeigt, bei dem nun das Motorprotein 1 nicht direkt, also in unmittelbarem berührendem Kontakt auf der Oberfläche 3 angeordnet ist, sondern auf der Oberfläche 3 ein Verbindungsprotein 12, nämlich Protein A/G, und darauf ein Antikörper 6 angeordnet ist. Das Motorprotein 1 selbst ist an den Antikörper 6 gebunden. Wiederkehrende Merkmale sind in dieser Figur wie auch in den folgenden Figuren mit identischen Bezugszeichen versehen.

Diese Konfiguration kann beispielsweise für eine Mikrotiterplatte mit 384 Nöpfchen erreicht werden, indem zunächst die Nöpfchen mit 5760 µl BRB80 gefüllt und dieses wieder daraus entfernt wird sowie anschließend eine Protein A/G-Lösung aus 5644,8 µl BRB80 und 115,2 µl Protein A/G für 3 Minuten Inkubationszeit in den Nöpfchen verbleibt. In einem nächsten Schritt wird mit der bereits beschriebenen Caseinlösung zwei Mal gespült und eine Antikörperlösung aus 5356,8 µl BRB80 und 288 µl Anti-his-Antikörper sowie 115,2 µl Casein 7 für 3 Minuten einwirken gelassen.

Nach weiterem zweimaligem Spülen mit je 16512 µl Casein 7 wird eine Kinesinlösung für wiederum 3 Minuten in die Nöpfchen aufgebracht und mit Caseinlösung zwei Mal gespült. Diese Kinesinlösung umfasst im beschriebenen Ausführungsbeispiel 11,5 µl Casein 7, 91 µl 0,76 mg/ml gekürztes Kinesin-1 (mit His-tag), 115,2 µl Dithiotreitol, 57,6 µl von 1mM Adenosintriphosphat und 5484,7 µl BRB80.

Schließlich wird auch hier wiederum die "motility solution", dann der Inhibitor

samt Pyranose-Oxidase und Mineralöl zum Verhindern einer Verdampfung in die Näpfchen pipettiert und untersucht.

5 Statt des gentechnisch hergestellten Fusionsproteins A/G können auch die bakteriellen Proteine A und G verwendet werden. Diese Proteine haben die Funktion, antikörperspezifisch zu binden und so Bakterien vor dem Immunsystem zu tarnen. In weiteren Ausführungsbeispielen kann das Verbindungsprotein auch weggelassen werden und die Antikörper 6 direkt an die Oberfläche 3 gebunden werden. Durch die Verwendung von Protein A/G wird jedoch die Dichte der Antikörper und somit der Motorproteine auf der Oberfläche 3 erhöht.

10 In dem in Figur 2 dargestellten Ausführungsbeispiel ist ein Fluoreszenzfarbstoff 5' wie in dem in Figur 1 gezeigten Ausführungsbeispiel an dem Filament 4, also dem Mikrotubulus, angebracht, während ein Fluoreszenzfarbstoff 5'' an dem Motorprotein befestigt ist.

20 Während die in den Figuren 1 und 2 dargestellten Anordnungen als sogenannte "Gleitassays" oder "gliding assays" bezeichnet werden, kann auch ein "Schrittassay" oder "stepping assay" realisiert werden und ist in Figur 3 in einer Figur 1 entsprechenden Ansicht dargestellt. In dem gezeigten Ausführungsbeispiel ist das Filament 4 mit daran angebrachtem Fluoreszenzfarbstoff 5' über direkt auf der Oberfläche 3 angeordnete Antikörper 6 mit der Oberfläche 3 verbunden, die aus Glas oder einem im optischen Wellenlängenbereich transparenten Kunststoff sein kann. Auf dem Filament 4 ist das Motorprotein 1 mit daran angebrachtem Fluoreszenzfarbstoff 5'' angeordnet, wobei verschiedene Farbstoffe (5'' und 5') für das Filament 4 und das Motorprotein 1 verwendet werden. Das Filament 4 ist im dargestellten Ausführungsbeispiel mit Rhodamin 5' markiert, während das Motorprotein 1 mit GFP 5'' versehen ist. Dieses Motorprotein 1 "schreitet" nun nach Zugabe von Adenosintriphosphat entlang des Filaments 4. Zur Vorbereitung der ganzen Mikrotiterplatte wird auf der Oberfläche 3 eine Silanschicht 8 abgeschieden. Nachfolgend die bereits beschriebene Antikörperlösung für 3 Minuten Inkubationszeit in die Näpfchen eingebracht und mit BRB80 nach Entfernen der Antikörperlösung gespült. Zum Blockieren der Oberfläche 3 wird nun eine Blockierlösung aus 5760 µl BRB80 und 0,58 g F127, einem Polyol, hergestellt und in die Näpfchen

eingbracht. F127 scheidet sich dann als zusätzliche Schicht 16 auf der Silanschicht 8 ab. Nach 20 Minuten wird diese Blockierlösung entfernt und nach Waschen mit 16347 µl BRB80 samt 165 µl 1M Taxol eine Lösung der Mikrotubuli für 5 Minuten eingebracht. Die letztgenannte Lösung ist nun jedoch aus 292,3 µl Mikrotubuli als Filamente 4, 57,6 µl 1M Taxol und 5410,1 µl BRB80 hergestellt. Nachdem diese Lösung entfernt wurde und wiederum mit 16347 µl BRB80 samt 165 µl 1M Taxol gespült wurde, wird eine Beweglichkeits-Kinesin-Lösung und die bereits beschriebene Inhibitorlösung sowie Mineralöl eingebracht. Die Beweglichkeits-Kinesin-Lösung setzt sich zusammen aus 76,8 µl Casein 7, 0,13 µl 0,076 mg/ml gekürztem Kinesin-1, 230,4 µl Glukose, 38,4 µl Catalase, 38,4 µl Dithiotreitol, 38,4 µl Taxol, 38,4 µl von 100mM Adenosintriphosphat und 3417,47 µl BRB80.

In Figur 4 ist in einer perspektivischen Ansicht der Probenaufnahmebehälter 2 gezeigt. Der Probenaufnahmebehälter 2 ist eine Mikrotiterplatte oder "microwell plate", die auch "microtiter plate" bezeichnet wird, und die typischerweise zwischen 6 und 1536 Näpfchen als Vertiefungen 9 zur Aufnahme einer einen zu untersuchenden Wirkstoff enthaltenden Lösung aufweist. Die Vertiefungen 9 haben hierbei ein Füllvolumen von zwischen 0,01 ml und 5 ml. Der Probenaufnahmebehälter 2 ist aus Kunststoff, der vorzugsweise zumindest an seiner Unterseite oder auch insgesamt transparent in dem Wellenlängenbereich des elektromagnetischen Spektrums ist, der zur Fluoreszenzanregung und Detektion verwendet wird. Typischerweise ist dies ein sichtbarer Bereich mit Wellenlängen zwischen 400 nm und 780 nm. Auf einer den Öffnungen der Vertiefungen 9 entgegengesetzten Außenseite des Probenaufnahmebehälters 2 ist die Silanschicht 8 aus Dichlordimethylsilan oder 1H,1H,2H,2H-Perfluorodecyltrichlorosilan aufgebracht, um einen Tropfen einer Immersionsflüssigkeit darauf aufbringen und stabil halten zu können.

Bevor die Näpfchen des dargestellten Probenaufnahmebehälters 2 mit der zu untersuchenden Lösung gefüllt werden, kann eine Reinigung derselben vorgesehen sein. In einem möglichen Beispiel dieser Reinigung werden alle Vertiefungen 9, d. h. die Näpfchen, mit Mucisol®, einem alkalischen Reiniger, gefüllt, der im Verhältnis 1:20 in destilliertem Wasser (dH₂O) verdünnt wurde. Nachfolgend wird der gefüllte Probenaufnahmebehälter 2 für 15 Minuten mit Ultraschall behandelt und mit destilliertem Wasser gespült. Die Vertiefungen

9 werden danach mit reinem Ethanol gefüllt und wiederum für 10 Minuten dem Ultraschall ausgesetzt. Durch zweiminütiges Spülen mit destilliertem Wasser und zweiminütiges Spülen mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) wird eine hinreichende Reinigung für die nachfolgende automatisierte Untersuchung der Wirkstofflösung erlangt.

Figur 5 zeigt den in Figur 4 dargestellten Probenaufnahmebehälter 2, während er automatisiert von einem Pipettierroboter 10 mit einer Lösung befüllt wird. Der Pipettierroboter 10 fährt hierbei mit einer Pipette oberhalb der Öffnungen der Vertiefungen 9 über den Probenaufnahmebehälter 2 und nacheinander einzelne der Vertiefungen 9, sobald er Ihnen fluchtend gegenüber steht, mit der Lösung, die den zu untersuchenden Wirkstoff sowie Adenosintriphosphat und ein Enzym enthält. Dabei können in der Lösung bereits vor dem Befüllen die genannten Bestandteile enthalten sein, es können aber auch sequenziell nacheinander einzelne Bestandteile in die Vertiefungen 9 eingebracht werden.

Der Pipettierroboter 10 fährt typischerweise parallel, also mit gleichbleibendem Abstand, über den Probenaufnahmebehälter 2, kann aber auch zum Befüllen näher an den Probenaufnahmebehälter 2 bewegt werden. Das Enzym in der Lösung ist Glucose-Oxidase oder Pyranose-Oxidase, um während der nachfolgenden Detektion der Bewegung des Filaments 4 gleichbleibende Bedingungen, insbesondere eine Sauerstoffreduzierung und bzw. oder bei der Verwendung von Pyranose-Oxidase einen stabilen pH-Wert gewährleisten zu können. An einer Unterseite des Probenaufnahmebehälters 2 ist ein Glasboden 16 angebracht, auf dem die Silanschicht 8 angeordnet ist.

In Figur 6 ist die optische Aufnahmeeinrichtung 11 dargestellt, die die in den einzelnen Vertiefungen 9 enthaltene Lösung untersucht. Auf dem Probenaufnahmebehälter 2 ist ein Tropfen 13 einer Immersionsflüssigkeit angeordnet, und die optische Aufnahmeeinrichtung 11, im dargestellten Ausführungsbeispiel ein Mikroskop, das interne Totalreflexionsmikroskopie durchführt, misst nacheinander jede der in den einzelnen Vertiefungen 9 enthaltene Flüssigkeit. Hierzu wird, beispielsweise über einen Laser, zunächst der Fluoreszenzfarbstoff 5 zur Fluoreszenz angeregt und nachfolgend die Bewegung des Farbstoffs örtlich und zeitlich aufgelöst detektiert. Figur 6 gibt den Messvorgang

nur schematisch wieder, es kann im Gegensatz zur Darstellung auch eine Inversionsmikroskopie angewandt werden. Die erhaltenen Daten werden von der optischen Aufnahmeeinrichtung 11 an eine Steuer- und Auswerteeinheit 14 weitergeleitet, die die optische Aufnahmeeinrichtung 11 zum automatisierten Messen ansteuert. Außerdem werden die ausgewerteten Daten von der Steuer- und Auswerteeinheit 14 an eine Anzeigeeinheit 15 übergeben und dort für einen Benutzer dargestellt. Die Steuer- und Auswerteeinheit 14 ist typischerweise ein einzelner Computer, es kann aber auch vorgesehen sein, dass eine einzelne Steuereinheit zum Steuern der optischen Aufnahmeeinrichtung 11 und eine davon separierte Auswerteeinheit, typischerweise ein Rechencluster mehrerer Rechner, vorgesehen ist.

Die Silanschicht 8 kann beispielsweise aufgebracht werden, indem zunächst zum Reinigen eine Lösung aus Ammoniumhydroxid, Wasser und Wasserstoffperoxid (Verhältnis 1:1:1) für 30 Minuten auf einer Rückseite, beispielsweise dem Glasboden 16, des Probenaufnahmebehälters 2 einwirkt, nachfolgend mit doppelt destilliertem Wasser abgespült wird und Flüssigkeitsrückstände mit Stickstoff beseitigt werden. Zur Beschichtung werden entweder: 25 ml Trichlorethylen samt 12,5 µl Dichlorodimethylsilan auf die zu beschichtende Rückseite des Probenaufnahmebehälters 2 aufgebracht und für 60 Minuten dort belassen, oder: 20 µl 1H,1H,2H,2H-Perfluorodecyltrichlorosilan neben den Probenaufnahmebehälter in einen Exsikkator gegeben und im Vakuum (vorzugsweise < 50 mBar) für 3 h inkubiert. Anschließend erfolgt ein erstes Spülen mit Methanol für 5 Minuten sowie ein zweites Spülen mit Methanol für 15 Minuten. Der Probenaufnahmebehälter 2 wird wiederum mit doppelt destilliertem Wasser zwei Minuten gespült und mit Stickstoff durch Blasen restliche Flüssigkeit entfernt.

Die optische Aufnahmeeinrichtung 11 kann hierbei eine CCD (charge coupled device)-Kamera aufweisen mit einer Pixelgröße von 161 nm und mit einer Belichtungszeit von 300 ms und einer Objektivlinse mit 40-facher Vergrößerung Bilder mit einer Rate von 1,6 Bildern/Sekunde aufnehmen.

Die angegebenen Werte zum Herstellen der genannten Lösungen können natürlich, falls kleinere oder größere Mengen hergestellt werden sollen, entsprechend umgerechnet werden, geben mithin also in erster Linie Mengen-

verhältnisse zwischen den Ausgangsstoffen der Lösungen an.

Lediglich in den Ausführungsbeispielen offenbarte Merkmale der verschiedenen Ausführungsformen können miteinander kombiniert und einzeln beansprucht werden.

Patentansprüche

5

1. Verfahren zur automatisierten Detektion einer Aktivität von Wirkstoffen in einer Lösung, bei dem

10

- a) automatisiert auf eine Oberfläche (3) in einer Vertiefung (9) mindestens eines Probenaufnahmebehälters (2) ein Motorprotein (1) sowie auf das Motorprotein (1) ein zu dem jeweiligen Motorprotein (1) korrespondierendes Filament (4) eines Zytoskeletts aufgebracht wird; oder

15

- b) auf die Oberfläche (3) der Vertiefung (9) des Probenaufnahmebehälters (2) das Filament (4) des Zytoskeletts und auf das Filament (4) des Zytoskeletts das zu dem Filament (4) des Zytoskeletts korrespondierende Motorprotein (1) aufgebracht werden; und

20

wobei das Filament (4) des Zytoskeletts und/oder das Motorprotein (1) mit einem Fluoreszenzfarbstoff (5) markiert ist, sowie der zu untersuchende Wirkstoff und ein Enzym zur Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften der Lösung zugegeben werden,

wobei sich daran anschließend Adenosintriphosphat zum Auslösen einer Bewegung des Motorproteins (1) sowie des daran angeordneten Filaments (4) des Zytoskeletts zugegeben wird und

25

eine durch das Motorprotein (1) verursachte Bewegung des Filaments (4) des Zytoskeletts durch optisches Detektieren des Fluoreszenzfarbstoffs (5) detektiert wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Enzym Glucose-Oxidase und/oder Pyranose-Oxidase, optional entweder Glucose-Oxidase oder Pyranose-Oxidase, der Lösung zugegeben wird.

30

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Filament (4) des Zytoskeletts mindestens ein Filament eingesetzt wird, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

Aktinfilament, Mikrotubulus und Kombinationen hiervon, bevorzugt ein Mikrotubulus.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als Motorprotein(1) ein Motorprotein eingesetzt wird, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Kinesin, Dynein, Myosin und Kombinationen hiervon, bevorzugt ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Kinesin, Dynein und Kombinationen hiervon, besonders bevorzugt Kinesin.
5
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Motorprotein (1) und/oder das Filament (4) des Zytoskeletts über unspezifische Adsorption oder eine spezifische Bindung auf der Oberfläche (3) der Vertiefung (9) des Probenaufnahmebehälters (2) angeordnet wird, bevorzugt über unspezifische nicht-kovalente Wechselwirkungen, über spezifische nicht-kovalente Wechselwirkungen oder über mindestens eine chemisch kovalente Bindung auf der Oberfläche (3) der Vertiefung (9) des Probenaufnahmebehälters (2) angeordnet wird, besonders bevorzugt über einen Antikörper auf der Oberfläche (3) der Vertiefung (9) des Probenaufnahmebehälters (2) angeordnet wird, wobei der Antikörper optional über ein Adapterprotein ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Protein A, Protein G und Derivate und Kombinationen hiervon an der Oberfläche (3) immobilisiert wird.
10
15
20
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche (3) durch eine Silanisierung mit einer Silanverbindung (8), vorzugsweise Dichlordimethylsilan, beschichtet wird.
25
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche (3) vor dem Aufbringen des Motorproteins (1) oder des Filaments (4) des Zytoskeletts durch bereichsweise Aufbringen eines Moleküls (7), vorzugsweise eines Moleküls ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Polyol, Polyethylenglycol, Derivate von Polyethylenglycol, Albumin, Casein und Mischungen hiervon,
30

insbesondere Casein, für das Motorprotein oder das Filament geblockt wird, wobei das Molekül (7) insbesondere nach einer Beschichtung der Oberfläche (3) mit einer Silanverbindung (8) aufgebracht wird.

- 5 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zum Verbessern des automatisierten Durchsatzes der optischen Detektion eine Außenseite des Probenbehälters durch eine Silanisierung mit einer Silanverbindung (8), vorzugsweise Dichlordimethylsilan, beschichtet wird.
- 10 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche (3) vor dem Aufbringen des Motorproteins (1) oder des Filaments (4) des Zytoskeletts durch Spülen mit einem alkalischen Reiniger, Ethanol und/oder destilliertem Wasser gereinigt wird.
- 15 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das optische Detektieren des Fluoreszenzfarbstoffs (5)
- i) eine orts aufgelöste Messung des Fluoreszenzmarkers, bevorzugt eine interne Totalreflexionsmikroskopie und/oder Inversionsmikroskopie; und/oder
- 20 ii) die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs (5) mit einem Laser; umfasst.
- 25 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Fluoreszenzfarbstoff (5) ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus anorganischen Fluoreszenzfarbstoffen, organischen Fluoreszenzfarbstoffen und Mischungen hiervon, bevorzugt ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Quantum Dot, organisches Fluoreszenzmolekül mit einer molaren Masse von $\leq 1,2$ kDa und fluoreszierendes Protein, besonders bevorzugt ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Rhodamin, Fluorescein, Alexa 488, Cy5, GFP
- 30 und Kombinationen hiervon.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Fluoreszenzfarbstoff (5) über mindestens eine chemisch kovalente Bindung mit dem Filament (4) des Zytoskeletts und/oder dem Motorprotein (1) verbunden ist.
- 5 13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Filament (4) des Zytoskeletts mit einem ersten Fluoreszenzfarbstoff (5') und das Motorprotein (1) mit einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff (5'') markiert ist, wobei der erste und zweite Fluoreszenzfarbstoff (5', 5'') optional ein FRET-Paar bilden und das optische Detektieren des Fluoreszenzfarbstoffs eine FRET-Messung umfasst.
- 10 14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Lösung ferner
- 15 i) ein Reduktionsmittel, bevorzugt Dithiothreitol; und/oder
- ii) eine Pyranose, bevorzugt Glukose;
- zugegeben wird.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Lösung ferner mindestens ein Abbauinhibitor eines Filaments (4) des Zytoskeletts, bevorzugt ein Abbauinhibitor von Mikrotubuli und/oder Aktinfilamenten, besonders bevorzugt ein Abbauinhibitor ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Taxol, Taxol-Derivate, Phallotoxin, Phallotoxin-Derivate und Mischungen hiervon, zugegeben wird.
- 20 16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Probenaufnahmebehälter (2) ein Material enthält oder daraus besteht, das für Licht im Wellenlängenbereich von 400 nm bis 780 nm transparent ist, bevorzugt in diesem Wellenlängenbereich transparentes Glas und/oder transparenter Kunststoff.
- 25 17. System zur automatisierten Detektion einer Aktivität von Wirkstoffen in einer Lösung,
- 30

mit einer Befüllvorrichtung, die einen ersten Vorratsbehälter für ein Filament (4) des Zytoskeletts und ein Motorprotein (1) enthält, wobei das Filament (4) des Zytoskeletts und/oder das Motorprotein (1) mit einem Fluoreszenzfarbstoff (5) markiert ist,

5 wobei die Befüllvorrichtung einen zweiten Vorratsbehälter für einen Wirkstoff enthält;

wobei die Befüllvorrichtung einen dritten Vorratsbehälter für ein Enzym zur Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften der Lösung enthält;

10 wobei die Befüllvorrichtung einen vierten Vorratsbehälter für Adenosin triphosphat enthält;

wobei die Befüllvorrichtung dazu konfiguriert ist, Motorprotein (1), das zu dem jeweiligen Motorprotein (1) korrespondierendes Filament (4) eines Zytoskeletts, Wirkstoff, Enzym und Adenosin triphosphat automatisiert und sequenziell auf eine Oberfläche in einer Vertiefung (9) mindestens eines Probenaufnahmebehälters aufzubringen, und

15 wobei das System ferner eine optische Aufnahmeeinrichtung (11) zum automatisierten Detektieren des Fluoreszenzfarbstoffs in der Lösung enthält.

20 18. System nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass der dritte Vorratsbehälter ein Enzym enthält, bevorzugt Glucose-Oxidase und/oder Pyranose-Oxidase, optional entweder Glucose-Oxidase oder Pyranose-Oxidase, besonders bevorzugt Pyranose-Oxidase enthält.

25 19. System nach einem der Ansprüche 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Vorratsbehälter der Befüllvorrichtung eine erste Kammer und eine zweite Kammer aufweist, wobei die erste Kammer das Motorprotein (1) enthält und die zweite Kammer das Filament (4) des Zytoskeletts enthält.

30 20. System nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass das System dazu konfiguriert ist, automatisiert auf eine Oberflä-

che in einer Vertiefung (9) mindestens eines Probenaufnahmebehälters

i) erst ein Motorprotein (1) und anschließend ein zu dem jeweiligen Motorprotein (1) korrespondierendes Filament (4) eines Zytoskeletts aufzubringen; und/oder

ii) erst ein Filament (4) eines Zytoskeletts und anschließend das zu dem Filament (4) des Zytoskeletts korrespondierende Motorprotein (1) aufzubringen; und

dann den Wirkstoff und das Enzym zur Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften der Lösung zuzugeben und anschließend Adenosin triphosphat zuzugeben.

21. System nach einem der Ansprüche 17 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass das System

i) dazu konfiguriert ist, eine orts aufgelöste Messung eines Fluoreszenzfarbstoffs (5), bevorzugt eine interne Totalreflexionsmikroskopie und/oder Inversionsmikroskopie, durchzuführen; und/oder

ii) einen Laser zur Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffs (5) enthält.

22. System nach einem der Ansprüche 17 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass die optische Aufnahmeeinrichtung (11) zum Durchführen einer internen Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie mit einem Immersionsobjektiv ausgebildet ist.

23. System nach einem der Ansprüche 17 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass das System eine Steuer- und Auswerteeinheit (14) zum automatisierten Ansteuern, Messen und Auswerten enthält.

24. System nach einem der Ansprüche 17 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass das System eine Laserstrahlungsquelle zum Anregen des Fluoreszenzfarbstoffs (5) mit einem Laserstrahl aufweist.

25. System nach einem der Ansprüche 17 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass der

- i) erste Vorratsbehälter ein Filament (4) des Zytoskeletts und ein Motorprotein (1) enthält; und/oder
- ii) zweite Vorratsbehälter einen Wirkstoff enthält; und/oder
- iii) vierte Vorratsbehälter Adenosintriphosphat enthält.

- 5 26. System nach einem der Ansprüche 17 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Befüllvorrichtung einen fünften Vorratsbehälter für ein Reduktionsmittel aufweist, wobei der fünfte Vorratsbehälter bevorzugt ein Reduktionsmittel, vorzugsweise Dithiotreitol, und/oder eine Pyranose, vorzugsweise Glucose, aufweist.

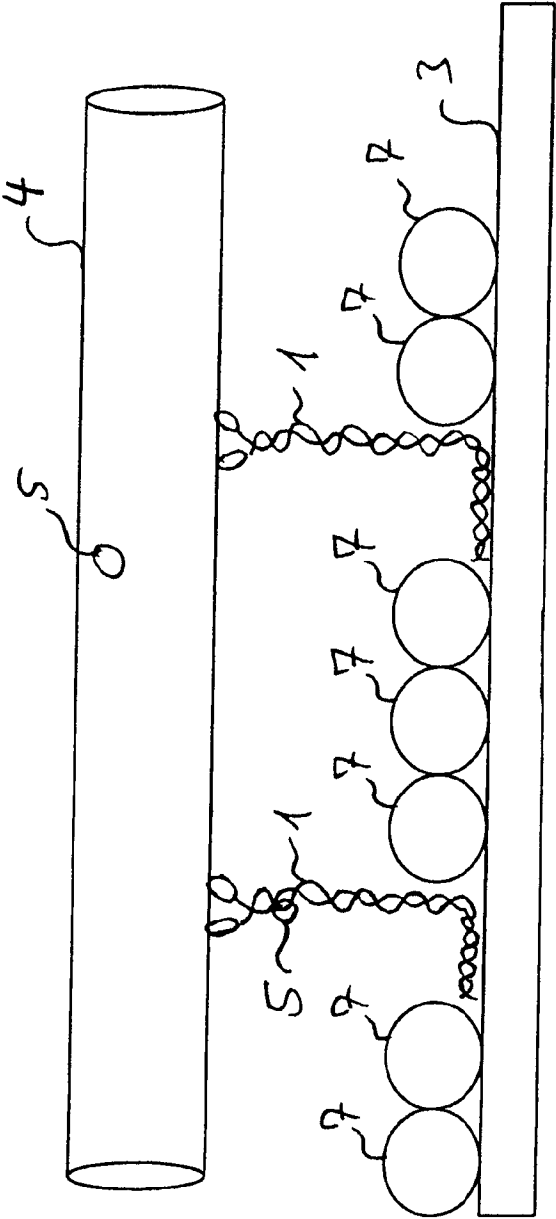


Fig. 1

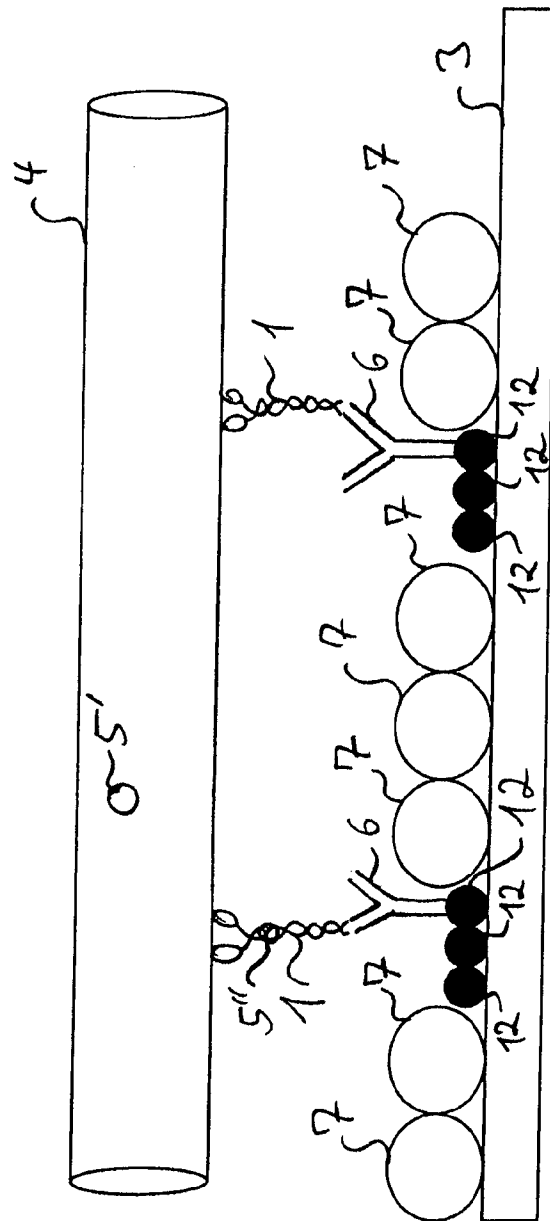


Fig. 2

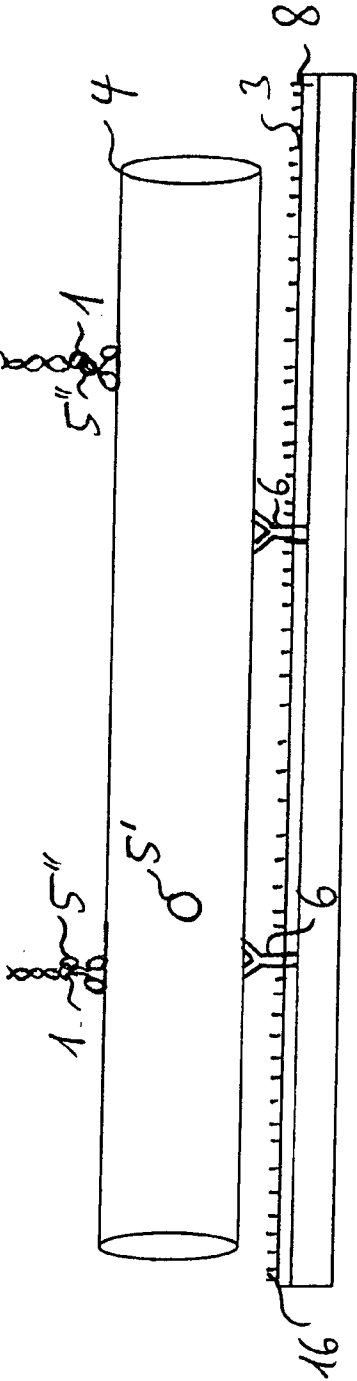


Fig. 3

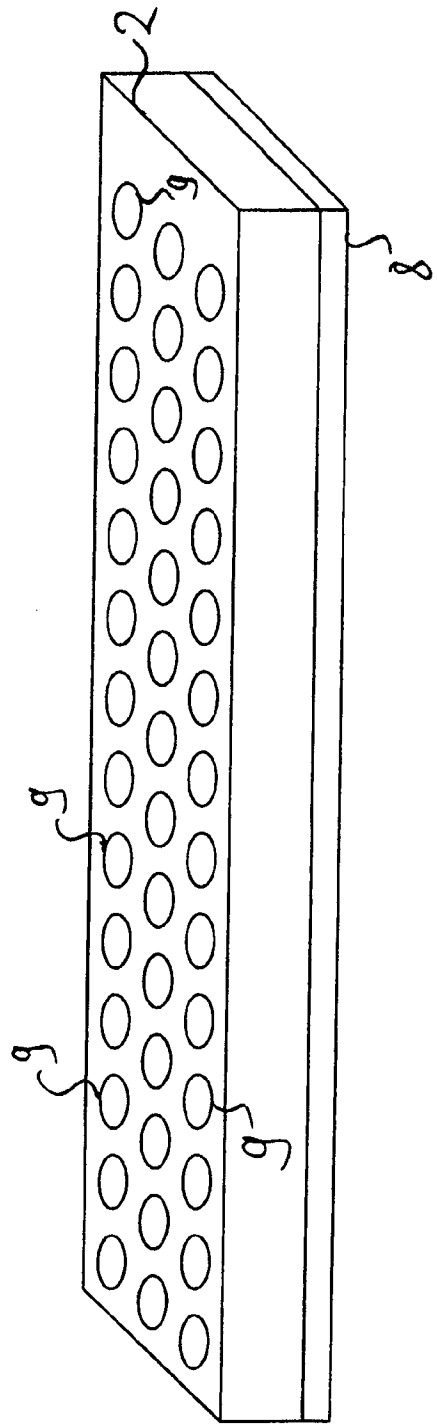


Fig. 4

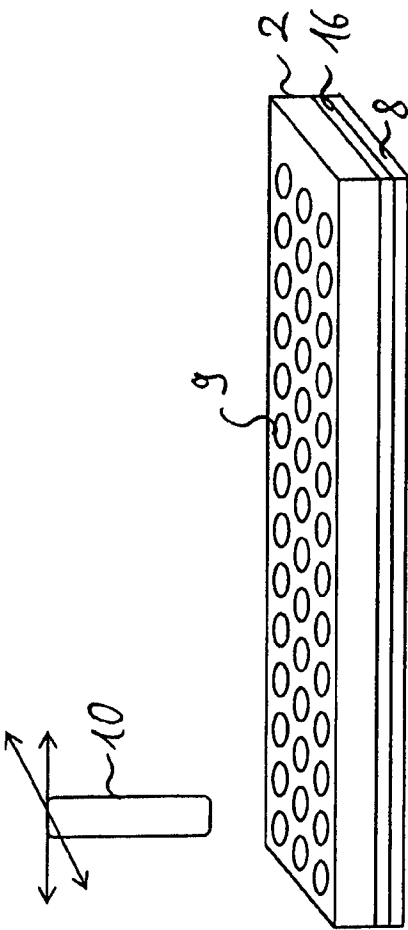


Fig. 5

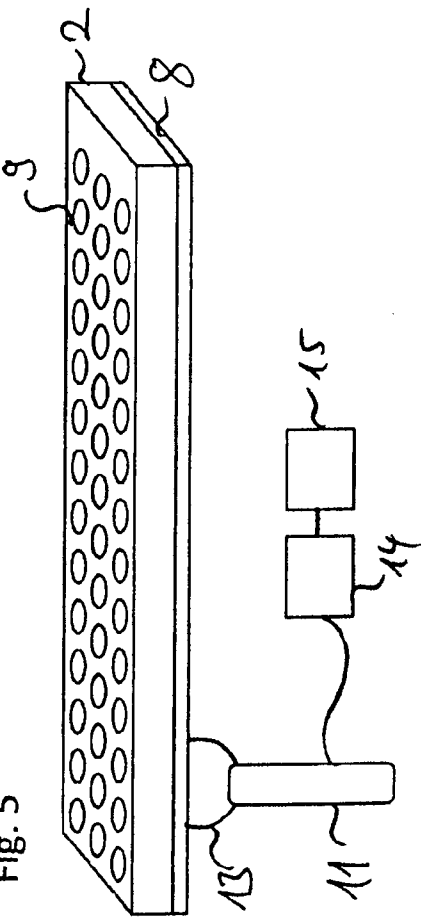


Fig. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/076546

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N21/64 G01N35/02
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 7 202 051 B1 (FINER JEFFREY T [US] ET AL) 10 April 2007 (2007-04-10) abstract column 1, line 38 - column 22, line 18 -----	1-26
A	US 2007/105214 A1 (MICKLASH KENNETH J II [US] ET AL) 10 May 2007 (2007-05-10) abstract paragraph [0014] - paragraph [0025] paragraph [0195] - paragraph [0200] ----- -/-	1-26



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 December 2016

Date of mailing of the international search report

18/01/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pisani, Francesca

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/076546

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	F. GITTES ET AL: "Directional loading of the kinesin motor molecule as it buckles a microtubule", BIOPHYSICAL JOURNAL, vol. 70, no. 1, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 418-429, XP055329413, AMSTERDAM, NL ISSN: 0006-3495, DOI: 10.1016/S0006-3495(96)79585-1 page 418 - page 419 -----	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/076546

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 7202051	B1	10-04-2007	US 7202051 B1	10-04-2007
			US 2007254310 A1	01-11-2007
			US 2009029344 A1	29-01-2009
			US 2009117534 A1	07-05-2009

US 2007105214	A1	10-05-2007	US 2007105214 A1	10-05-2007
			WO 2007056512 A2	18-05-2007

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. G01N21/64 G01N35/02
 ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 G01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 7 202 051 B1 (FINER JEFFREY T [US] ET AL) 10. April 2007 (2007-04-10) Zusammenfassung Spalte 1, Zeile 38 - Spalte 22, Zeile 18 -----	1-26
A	US 2007/105214 A1 (MICKLASH KENNETH J II [US] ET AL) 10. Mai 2007 (2007-05-10) Zusammenfassung Absatz [0014] - Absatz [0025] Absatz [0195] - Absatz [0200] ----- -/-	1-26



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

15. Dezember 2016

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18/01/2017

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Pisani, Francesca

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	F. GITTES ET AL: "Directional loading of the kinesin motor molecule as it buckles a microtubule", BIOPHYSICAL JOURNAL, Bd. 70, Nr. 1, 1. Januar 1996 (1996-01-01) , Seiten 418-429, XP055329413, AMSTERDAM, NL ISSN: 0006-3495, DOI: 10.1016/S0006-3495(96)79585-1 Seite 418 - Seite 419 -----	1-26

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2016/076546

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 7202051 B1	10-04-2007	US 7202051 B1	10-04-2007
		US 2007254310 A1	01-11-2007
		US 2009029344 A1	29-01-2009
		US 2009117534 A1	07-05-2009

US 2007105214 A1	10-05-2007	US 2007105214 A1	10-05-2007
		WO 2007056512 A2	18-05-2007
