

(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  
17. Januar 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/04656 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12Q 1/00**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/07259

(22) Internationales Anmeldedatum:  
26. Juni 2001 (26.06.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 33 194.7 7. Juli 2000 (07.07.2000) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **XZILLION GMBH & CO. KG** [DE/DE]; 65926 Frankfurt (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **WAGNER, Peter** [DE/DE]; Im Altenhof 4, 65510 Idstein (DE). **PO-LAKOWSKI, Thomas** [DE/DE]; Dunckerstrasse 29a, 10439 Berlin (DE).

(74) Anwalt: **ACKERMANN, Joachim**; Postfach 11 13 26, 60048 Frankfurt (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: BIO-PROBES AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: BIOSONDEN UND DEREN VERWENDUNG

**WO 02/04656 A2**

(57) Abstract: The invention relates to the application of bio-probes which bind specifically to biological material and thus permit the detection and/or separation of the material so marked from an environment of similar biological material, by means of electrophoresis or dielectrophoresis. Said bio-probes are characterised in that they alter the electrical and/or dielectric properties of the biological material.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft den Einsatz von Biosonden, die spezifisch an biologisches Material binden und dadurch die Detektion und/oder Trennung des so markierten Materials aus einer Umgebung ähnlichen biologischen Materials mittels Elektrophorese oder Dielektrophorese ermöglichen. Die Biosonden zeichnen sich dadurch aus, daß sie die elektrischen und/oder dielektrischen Eigenschaften des biologischen Materials verändern.

## Beschreibung

5

## Biosonden und deren Verwendung

Die Erfindung betrifft Biosonden, die durch spezifische Bindung an biologisches Material dessen elektrische und/oder dielektrische Eigenschaften verändern und dadurch eine Detektion und/oder Reinigung des so modifizierten Materials mittels Elektrophorese und/oder Dielektrrophorese ermöglichen.

In der Biotechnologie, Bioanalytik und Diagnostik stellt sich häufig die Aufgabe, eine oder mehrere biologische Spezies selektiv aus einer Vorlage von biologischem Material bzw. von einem Hintergrund, der aus sehr ähnlichen biologischen Spezies besteht, abzutrennen. Bei dem biologischen Material kann es sich hierbei etwa um Gewebe, Zellen, Viren, Zellorganellen, Proteine, Proteinkomplexe, Kohlenhydrate, Lipide oder andere organische Verbindungen oder eine Mischung der aufgeführten Gruppen handeln. Die unterschiedlichen Spezies stammen entsprechend aus mindestens einer dieser Gruppen. Die Unterschiede in den Eigenschaften der verschiedenen biologischen Spezies, auf denen das Trennungs- oder Detektionsprinzip beruht, können sehr gering sein, so daß eine Trennung und/oder Detektion oft sehr schwierig oder überhaupt nicht zu erreichen ist.

Es existieren eine Vielzahl von Lösungsstrategien zum Nachweis und zur Trennung von biologischem Material (Lottspeich and Zorbas (1998) Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg). Grundsätzlich kann man Methoden, die sich die Unterschiede in den Eigenschaften der aufzutrennenden Spezies zur Trennung und zum Nachweis nutzbar machen, von solchen unterscheiden, bei denen erst durch eine selektive Modifikation des vorgelegten biologischen Materials die Detektion und Trennung der Spezies erreicht werden kann.

Die den dem biologischen Material eigenen Eigenschaften, die zur Detektion und/oder Trennung verschiedener Spezies verwendet werden, sind u.a. Polarität, Hydrophobizität, Ladung, Größe, Gewicht und Dichte. Beispiele für Verfahren, die sich diese Eigenschaften zunutze machen, sind Elektrophorese, Gelfiltration, 5 Affinitätschromatographie und Zentrifugation.

Verfahren, bei denen das biologische Material selektiv auf spezifische Weise markiert wird und erst aufgrund der Markierung oder aufgrund der durch die Markierung veränderten Eigenschaften Trennung oder Nachweis der verschiedenen 10 Spezies möglich werden, sind alle Verfahren, die auf einer Antikörper-Antigen-Wechselwirkung basieren. Beispiele hierfür sind ELISA-Verfahren (enzyme-linked immunosorbent assay) und bestimmte Varianten von FACS (fluorescence-activated cell sorting) und MACS (magnetic-activated cell sorting). In diesen Fällen wird unter Verwendung von spezifisch bindenden Antikörpern selektiv ein Enzym, ein 15 Fluoreszenzfarbstoff oder ein Magnetkugelchen an bestimmte Spezies des biologischen Materials gebunden, um Detektion oder Reinigung der so markierten Spezies zu ermöglichen.

Als Beispiel für ein Verfahren, bei dem eine Auftrennung von biologischem Material 20 nur sehr schlecht möglich ist, sei die free flow-Elektrophorese (FFE) genannt (Bauer, J. (1999) J. Chrom. B 722: 55). Bei diesem Verfahren wird ein laminarer Flüssigkeitsstrom zwischen zwei eng beieinander stehenden Glasplatten hindurchgeleitet. Durch ein senkrecht zur Fließrichtung angelegtes elektrisches Feld kann eine Auftrennung der verschiedenen Spezies des vorgelegten biologischen 25 Materials aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung erreicht werden. Wird die FFE beispielsweise zur Auftrennung von Zellen eingesetzt, so werden diese aufgrund ihrer negativen Ladung von der Kathode elektrisch angezogen. Die laterale Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen hängt hierbei von der Oberflächenladungsdichte der Zellen ab. Zellen mit unterschiedlichen 30 Oberflächenladungsdichten haben unterschiedliche laterale Wanderungsgeschwindigkeiten und können so voneinander getrennt werden. Der entscheidende Nachteil der FFE ist, daß biologisches Material vielfach sehr ähnliche Ladungseigenschaften besitzt. Zellen etwa besitzen alle eine negative und

zudem vielfach eine fast identische Oberflächenladungsdichte und können so nur sehr schlecht mittels FFE voneinander getrennt werden. Oft ist bei der FFE nur dann eine ausreichende Trennschärfe zu erreichen, wenn durch eine pathogene Veränderung die Oberflächenladungsdichte der Zellen hinreichend modifiziert ist.

- 5 Aus diesem Grund ist der Einsatz der FFE heute sehr stark zurückgegangen und die Methode wurde durch andere, vielfach teurere und apparativ aufwendigere Methoden verdrängt.

Auch bei dem relativ neuen Verfahren der Dielektrophorese (Fiedler et al. (1998)

- 10 Anal. Chem. 70: 1909; Betts et al. (1999) J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl. 85: 201) hat man mit ähnlichen Problemen zu tun, wie sie sich bei elektrophoretischen Verfahren, wie der zuvor beschriebenen FFE ergeben. Die Dielektrophorese (DEP) ist ein Verfahren, bei dem man sich die dielektrischen Eigenschaften von biologischem Material zunutze macht, um dieses voneinander zu trennen.

- 15 Dielektrophorese findet statt, wenn man biologisches Material inhomogenen elektrischen Wechselfeldern aussetzt. Das biologische Material bewegt sich in dem inhomogenen elektrischen Feld aufgrund seiner dielektrischen Eigenschaften (permanenter oder induzierbarer elektrischer Dipol), wodurch eine Auftrennung möglich wird.

- 20 In Zellen beispielsweise gibt es verschiedene Bereiche, die polarisierbar sind, und damit für die Dielektrophorese nutzbar gemacht werden können. Hierzu gehören die elektrische Ladungsdoppelschicht, die eine Zelle umgibt, die Zellmembranen, die die Zelle bzw. die Zellorganellen begrenzen, sowie das polare Cytoplasma im Zellinnern.

- 25 Die Dielektrophorese kann beispielsweise verwendet werden zur Auftrennung von Zellen, Bakterien und anderen Mikroorganismen. Denkbar ist der Einsatz der Dielektrophorese aber ebenso zur Auftrennung von anderem biologischen Material wie etwa Nukleinsäuren, Proteinen, Lipiden oder anderen organischen Verbindungen.

- 30 Anwendungsmöglichkeiten der Dielektrophorese sind z.B. die Untersuchung von Trinkwasser, Lebensmitteln und biologischen Flüssigkeiten in Hinblick auf krankheitserregende Mikroorganismen oder die Anreicherung von Stammzellen aus dem Knochenmark oder peripheren Blut.

Der Nachteil der Dielektrophorese ist, daß auch die dielektrischen Eigenschaften von biologischem Material oft sehr ähnlich sind, wodurch eine Auf trennung von unterschiedlichen Spezies erschwert wird.

- 5 Die erfindungsgemäße Aufgabe besteht deshalb darin, die Trennschärfe von elektrophoretischen und/oder dielektrophoretischen Verfahren zu vergrößern und damit ein verbessertes Nachweis- und/oder Reinigungsverfahren zur Verfügung zu stellen.
- 10 Gelöst wird die Aufgabe durch die spezifische Bindung von Biosonden an eine bestimmte Spezies oder an eine Gruppe bestimmter Spezies aus einer Vorlage von biologischem Material, das mindestens eine Spezies enthält, wodurch selektiv und spezifisch die elektrischen und/oder dielektrischen Eigenschaften der so markierten Spezies verändert werden und dadurch die Reinigung und/oder Detektion der so markierten Spezies bzw. des durch Bindung der Biosonde entstandenen Komplexes aus Biosonde und biologischer Spezies möglich wird.
- 15

Das biologische Material umfasst hierbei erfindungsgemäß insbesondere mindestens eine Spezies aus mindestens einer Gruppe ausgewählt aus Gewebe, Zellen, Zellorganellen, Viren, Proteine, Peptide, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate, Lipide oder andere organische Verbindungen, wobei die Spezies auch modifiziert sein können.

Der wesentliche Vorteil der hier beschriebenen Erfindung gegenüber den üblichen Verfahren liegt in der Möglichkeit der einfachen und schnellen Trennung und/oder Detektion des durch Bindung der Biosonde an die biologische Spezies entstandenen Komplexes aus biologischer Spezies und Biosonde, was zum einen dazu verwendet werden kann, um den Nachweis oder die Reinigung der so selektiv markierten Spezies zu ermöglichen, umgekehrt aber auch dazu verwendet werden kann, eine oder mehrere Biosonden aus einer Vorlage von Biosonden mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten selektiv abzutrennen. In letzterem Fall kann das biologische Material vor Durchführung des Trennverfahrens insbesondere mit einer Bibliothek von erfindungsgemäßen Biosonden unterschiedlicher

Bindungsspezifität kontaktiert werden, so dass aus der Bibliothek selektiv bindende Biosonden identifiziert und isoliert werden können.

Der entscheidende Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber

- 5 Verfahren wie FACS und MACS ist, daß die Biosonde nicht auf aufwendige Weise mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem Magnetkugelchen modifiziert werden muß, um Detektion und/oder Reinigung des markierten biologischen Materials zu ermöglichen, und daß ebenfalls der apparative Aufwand, der bei Verfahren wie FACS oder MACS unumgänglich ist, wegfällt.

10

Das erfindungsgemäße Verfahren zum Nachweis oder zur Reinigung von biologischem Material kann insbesondere folgende Schritte umfassen:

- 15 a) Vorlage von biologischem Material, das unterschiedliche Spezies enthält.
- b) Hinzufügen einer Biosonde, enthaltend einen Teil A, der spezifisch an mindestens eine der Spezies bindet, und einen Teil B, der die elektrischen und/oder dielektrischen Eigenschaften der durch spezifische Bindung der Biosonde markierten Spezie(s) verändert, so daß der Nachweis und/oder die Reinigung dieser markierten Spezie(s) durch Elektrophorese und/oder Dielektrrophorese ermöglicht oder verbessert wird.
- c) Aufbau eines elektrischen Feldes zum Nachweis oder zur Reinigung des Komplexes bzw. der Komplexe aus biologischer Spezie(s) und spezifisch gebundener Biosonde durch Elektrophorese oder Dielektrrophorese.

20

Das erfindungsgemäße Verfahren kann zwecks Identifizierung und Isolierung von spezifisch an vorgelegtes biologisches Material bindende Biosonden insbesondere folgende Schritte umfassen:

- 30 a) Vorlage von biologischem Material, das mindestens eine Spezie enthält.
- b) Hinzufügen einer Biosonde oder verschiedener Biosonden, enthaltend jeweils einen Teil A, der spezifisch an mindestens eine der Spezies binden kann, und einen Teil B, der die elektrischen und/oder dielektrischen

Eigenschaften der durch Bindung einer Biosonde markierten Spezie(s) verändert, so daß Detektion und/oder Reinigung eines so entstehenden Komplexes aus biologischer Spezie(s) und biologischem Material möglich wird, wobei die verschiedenen Biosonden unterschiedliche

- 5 Bindungsspezifitäten besitzen und mindestens eine der hinzugefügten Biosonden an das biologische Material bindet.
- c) Aufbau eines elektrischen Feldes zum Nachweis oder zur Reinigung des Komplexes bzw. der Komplexe aus biologischer Spezie(s) und spezifisch gebundener Biosonde durch Elektrophorese oder Dielektrrophorese.
- 10 Bei den verschiedenen Biosonden gemäß Punkt (b) kann es sich hierbei insbesondere um eine Bibliothek von Biosonden unterschiedlicher Substratspezifität handeln, die mehr als  $10^9$ , insbesondere mehr als  $10^{12}$  verschiedene Biosonden umfaßt.
- 15 Die erfindungsgemäßen Biosonden umfassen einen Teil A, der die spezifische Wechselwirkung zwischen der Sonde und dem biologischen Material vermittelt, und einen Teil B, der die Eigenschaften des biologischen Materials in der gewünschten Art verändert, also in Hinblick auf die Elektrophorese die Ladung, in Hinblick auf die Dielektrrophorese die Dielektrizitätskonstante oder die spezifische Leitfähigkeit bzw. 20 die Polarisierbarkeit verändert. Die Teile A und B müssen hierbei nicht strukturell voneinander getrennt sein.

Teil A der Biosonde ist oder umfaßt z.B. ein spezifisch an biologisches Material bindendes Peptid. In diesem Fall kommt eine spezifische Wechselwirkung zwischen 25 dem Peptid und einem Peptid-Rezeptor, der sich auf dem biologischen Material befindet, zustande. Ein Beispiel für eine derartige Wechselwirkung ist die des  $\alpha$ -Faktor-Rezeptors Ste2p aus *Saccharomyces cerevisiae* mit dem dazugehörigen Peptid-Liganden  $\alpha$ -Faktor. Weitere Beispiele sind der TSH-Rezeptor (Schuppert et al. (1996) Thyroid 6: 575), der FSH-Rezeptor (Tilly et al. (1992) Endocrinology 131: 30 799), der EGF-Rezeptor (Christensen et al. (1998) Dan. Med. Bull. 45: 121), der TNF-Rezeptor (Murphy et al. (1994) Thymus 23: 177), der Transferrin-Rezeptor (Ponka and Lok (1999) Int. J. Biochem. Cell Biol. 31: 1111), der Insulin-Rezeptor (Milazzo et al. (1992) Cancer Res. 52: 3924), der FGF-Rezeptor (Kiefer et al. (1991)

Growth Factors 5: 115), der TGF $\beta$ -Rezeptor (Derynck et al. (1994) Princess Takamatsu Symp. 24: 264), der IGF-Rezeptor (Peyrat and Bonneterre (1992) Breast Cancer Res. Treat. 22: 59), der Angiotensin II-Rezeptor (Smith and Timmermans (1994) Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 3: 112) oder der Somatostatin-Rezeptor

5 (Schonbrunn (1999) Ann. Oncol. 10 Suppl. 2: 17) und die Wechselwirkungen mit ihren jeweiligen Liganden. Analog sind alle Peptide einsetzbar, die in der Lage sind, spezifisch an das gewünschte biologische Material zu binden.

Bei dem spezifisch bindenden Teil A kann es sich auch um einen Antikörper handeln, insbesondere etwa um einen Antikörper, der Markerstrukturen auf 10 Zelloberflächen erkennt. Ein Beispiel für eine solche Markerstruktur ist der Transferrin-Rezeptor. Teil A kann desweiteren auch aus einer niedermolekularen Struktur bestehen, die spezifisch an biologisches Material bindet. Ein Beispiel für eine derartige niedermolekulare Struktur ist Acetylcholin, das vom Acetylcholin-Rezeptor spezifisch gebunden wird. Teil A der Biosonde kann aber beispielsweise 15 auch ein Kohlenhydrat, ein Lipid, eine anorganische Verbindung, eine Nukleinsäure oder ein anderer Ligand, der spezifisch an biologisches Material bindet, sein oder eine dieser Gruppen umfassen.

1 Teil B der Biosonde, der mit Teil A verknüpft ist, ist oder umfaßt eine Struktur, die 20 bei Bindung an das biologische Material dessen elektrische und/oder dielektrische Eigenschaften verändert, so dass sich das Verhalten des so modifizierten biologischen Materials in einem elektrischen und/oder dielektrischen Feld verändert. Dies kann beispielsweise durch Einführung elektrischer Ladung, durch Veränderung der Dielektrizitätskonstanten und/oder durch Veränderung der spezifischen 25 Leitfähigkeit des biologischen Materials geschehen. Beispiele für Träger elektrischer Ladung sind in diesem Sinne saure und basische Aminosäuren (Aspartat, Glutamat, Lysin, Arginin), Nukleinsäuren (einzelsträngige und doppelsträngige DNA und RNA, DNA/RNA-Heteroduplex), organische Säuren und Basen (Tartrat, Citrat, Amine), polyquarternäre Amine sowie anorganische Ladungsträger. Strukturen, die das 30 dielektrische Verhalten des biologischen Materials verändern, sind neben den oben genannten Strukturen beispielsweise auch hydrophobe, elektrisch neutrale Strukturen, wie Lipide, Fettsäuren, Wachse, Öle und Sterole.

In einer bevorzugten Ausführung ist oder umfaßt Teil B der Biosonde eine Nukleinsäure, die unmittelbar oder über ein Zwischenglied an Teil A der Biosonde kovalent geknüpft ist. Die Nukleinsäure umfaßt hierbei vorzugsweise mindestens 5 oder 10, besonders bevorzugt mindestens 15 oder 20, Nukleotide.

- 5 In einer besonders bevorzugten Ausführung der Biosonde umfaßt Teil B der Biosonde eine Nukleinsäure, die die genetische Information für Teil A der Biosonde umfaßt, wobei Teil A der Biosonde ein Protein oder Polypeptid umfaßt, und Teil B der Biosonde eine einzel- oder doppelsträngige RNA oder DNA oder eine RNA/DNA-Heteroduplex umfaßt, die kovalent an Teil A der Biosonde geknüpft ist.
- 10 Besonders bevorzugt umfasst auch hier bei Teil A der Biosonde einen Liganden für den Ste2p-Rezeptor, den TSH-Rezeptor, den FSH-Rezeptor, den EGF-Rezeptor, den TNF-Rezeptor, den Transferrin-Rezeptor, den Insulin-Rezeptor, den FGF-Rezeptor, den TGF $\beta$ -Rezeptor, den IGF-Rezeptor, den Angiotensin II-Rezeptor oder den Somatostatin-Rezeptor und Teil B der Biosonde jeweils eine Nukleinsäure, die 15 die für die genannten Liganden kodierende Sequenzen umfaßt. Bevorzugt sind bei dieser bevorzugten Ausführungsform Teil A und Teil B der Biosonde über eine Einheit kovalent miteinander verknüpft, die dazu in der Lage ist, in einer ribosomalen katalysierten Translationsreaktion die wachsende Peptidkette unter Ausbildung einer 20 kovalenten Bindung zu übernehmen. Diese Einheit umfasst in diesem Sinne beispielsweise ein Puromycin- oder Puromycin-analoges Molekül und/oder eine Aminosäure oder ein Aminosäure-analoges Molekül. Siehe hierzu beispielsweise auch Roberts et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12297, WO98/16636 und Krayevsky et al. (1979) Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology 23: 1.
- 25 Zusätzlich zur selektiven Markierung bestimmter Spezies aus dem vorgelegten biologischen Material mit einer spezifisch bindenden Biosonde kann eine Markierung dieser Spezies mit einem Fluoreszenzfarbstoff, einem Farbstoff (wie z.B. Propidiumjodid, Calcofluor), einem entsprechend markierten spezifisch bindenden 30 Antikörper (z.B. FITC), einer radioaktiven Markierung (z.B.  $^{35}\text{S}$ -Methionin) oder einer anderen Verbindung, die eine einfache Detektion des biologischen Materials ermöglicht, durchgeführt werden.

Der Nachweis und/oder die Auftrennung der mittels der Biosonde markierten biologischen Materialien kann entweder elektrophoretisch unter Verwendung eines konstanten elektrischen Feldes, beispielsweise durch free flow Elektrophorese, oder unter Verwendung eines inhomogenen Wechselfeldes durch Dielektrrophorese 5 erfolgen. Insbesondere bei der DEP kann durch die Verwendung der Biosonden eine signifikante Verbesserung der Trennschärfe erreicht werden.

Besonders bevorzugt anzuwenden ist das erfindungsgemäße Verfahren der Markierung von biologischen Spezies mit Biosonden und der anschließenden 10 Auftrennung des biologischen Materials durch Elektrophorese oder Dielekrophorese bei der Verwendung von Biochips. Bevorzugt sind hierbei Biochips anzuwenden, wie sie von Cheng et al. beschrieben werden (Cheng et al. (1998) Anal. Chem. 70:2321). Biochips erlauben eine Durchführung der Trennung und/oder des 15 Nachweises in miniaturisierter Form. Durch die Miniaturisierung kann der experimentelle Aufwand z.B. im Vergleich zu FACS zusätzlich reduziert werden.

Über die dielektrische Auftrennung von Zellen auf einem Chip ist bereits berichtet worden (Cheng et al. (1998) Anal. Chem. 70:2321), wobei in diesem speziellen Fall die Unterschiede in den dielektrischen Eigenschaften der aufzutrennenden Spezies 20 groß genug waren, um eine Auftrennung zu ermöglichen. Die Verwendung der erfindungsgemäßen Biosonden erlaubt auch dann eine Auftrennung biologischer Spezies, wenn die Unterschiede in den dielektrischen Eigenschaften der biologischen Spezies selbst nicht groß genug sind, um Auftrennung durch Dielektrrophorese zu ermöglichen.

25

## Beispiele

Beispiel 1:

### Herstellung einer Biosonde

30 Die Biosonde wird ausgehend von einer DNA-Sequenz über eine *in vitro* Transkription und Translation hergestellt. Nach Roberts and Szostak (1997; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12297) wird das bei der Translation entstehende Peptid über ein Puromycin kovalent mit seiner mRNA verknüpft. Somit stellt der Peptid-

Anteil den spezifischen Binder dar, während der mRNA-Anteil durch seine starke negative Ladung im neutralen pH-Bereich die physikalischen Eigenschaften des biologischen Materials so verändert, daß eine Selektion bzw. Detektion ermöglicht wird. Im Ausführungsbeispiel ist das biologische Material eine Population von

- 5 Hefezellen der Art *Saccharomyces cerevisiae* vom Paarungstyp MAT $\alpha$ , die den  $\alpha$ -Faktor-rezeptor (*STE2*) exprimieren (Davis and Davey (1997) Biochem. Soc. Trans. 25: 1015). Die detaillierte Ausführung wird im folgenden beschrieben: Ausgehend von einer DNA-Sequenz (Seq. 1), die über Standardverfahren (Oligonucleotid-Synthese) hergestellt werden kann, oder die kommerziell erhältlich ist (z.B.
- 10 INTERACTIVA The Virtual Laboratory, Ulm), wird über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ein doppelsträngiges DNA Moleköl (Seq. 2) generiert. Das DNA Moleköl enthält folgende Sequenzbereiche: eine T7-Promotorsequenz, eine TMV Translationsinitiationssequenz, einen kodierenden Bereich mit einem 5' kodierten E-tag, einer  $\alpha$ -Faktor Sequenz und einem 3' kodierten Strep-tag. Die
- 15 Durchführung der PCR ist Stand der Technik und sieht wie folgt aus:  
In ein PCR-Reaktionsgefäß werden folgende Bestandteile gegeben:  
1  $\mu$ l DNA (aus der Oligonucleotid-Synthese entspricht 1 nmol, Seq. 1)  
10  $\mu$ l Taq-Polymerase Puffer 10x (Promega, Mannheim)  
10  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega, Mannheim)
- 20 10  $\mu$ l 2,5 mM dNTP-Mix (Promega, Mannheim)  
10  $\mu$ l 10  $\mu$ M Primer 1 (Seq. 3)  
10  $\mu$ l 10  $\mu$ M Primer 2 (Seq. 4)  
2  $\mu$ l 5 U/ $\mu$ l Taq-Polymerase (Promega, Mannheim)  
Das PCR Programm ist wie folgt charakterisiert:
- 25 10 Zyklen mit 1 min 95°C, 2 min 55°C, 2 min 72°C.  
Die DNA wird quantifiziert und etwa 1 nmol der doppelsträngigen DNA werden als Template für die *in vitro* Transkription verwendet. Die Transkription erfolgt mit einem käuflichen System von Ambion (Austin, USA). Der Standard-Ansatz sieht wie folgt aus:
- 30 50  $\mu$ l DNA-Template (1 nmol)  
20  $\mu$ l Reaction Puffer (Ambion, Austin)  
20  $\mu$ l 75 mM ATP (Ambion, Austin)  
20  $\mu$ l 75 mM CTP (Ambion, Austin)

20 µl 75 mM GTP (Ambion, Austin)  
20 µl 75 mM UTP (Ambion, Austin)  
20 µl Enzyme-Mix (Ambion, Austin)  
30 µl H<sub>2</sub>O

- 5 Der Ansatz wird für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die RNA wird über Phenol-Chloroform Extraktion aufgearbeitet (Davis et al. 1994) und anschließend quantifiziert.

Die mRNA muß zur Herstellung der Biosonde am 3' Ende modifiziert werden, so daß sich an der mRNA eine kurze DNA-Sequenz und an deren 3' Ende ein

- 10 Puromycin befindet. Diese Technik ist bei Roberts und Szostak (1997; s.o.) beschrieben. Im Ausführungsbeispiel erfolgt die Modifikation wie folgt:

2 nmol mRNA

2 nmol Linker (Seq. 5; INTERACTIVA, Ulm)

2 nmol Splint (Seq. 6; INTERACTIVA, Ulm)

- 15 ad 125 µl H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wird für 3 min auf 70°C erwärmt und 15 min bei RT abgekühlt.

Anschließend werden 15 µl 10x Ligase-Puffer (Promega, Mannheim) und 10 µl 20 U/µl T4 DNA-Ligase (Promega, Mannheim) zugegeben. Durch Inkubation für 4 h bei Raumtemperatur wird der Puromycin-tragende Linker mit der mRNA ligiert.

- 20 Der gesamte Ansatz wird mit 10 nmol Antisplint (Seq. 7) versetzt und für 5 min auf 80°C erwärmt. Anschließend wird der Ligationsansatz auf Eis abgekühlt und die ligierte mRNA wird quantifiziert.

Zur Herstellung der Biosonde werden 200 pmol ligierte mRNA mit 10 µl <sup>35</sup>S-Methionin (APbiotech, Freiburg), 15 µl Aminosäure Mastermix ohne Methionin

- 25 (Ambion, Austin) und 200 µl Retic Lysate IVT (Ambion, Austin) versetzt und translatiert. Es wird auf 300 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der Ansatz wird bei 30°C für 30 min inkubiert. Anschließend werden 100 µl 2,5 M KCl und 70 µl 1 M MgCl<sub>2</sub> zugegeben. Der Ansatz wird über Nacht bei -20°C gelagert.

Zur Aufarbeitung der Biosonden wird der Translationsansatz mit 10 ml

- 30 Bindungspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH8,0; 1M NaCl; 0,25 % Triton X-100) versetzt und es werden 10 mg Oligo-dT Cellulose (Apbiotech, Freiburg) zugegeben. Der Ansatz wird eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die Cellulose mit den gebundenen Biosonden wird durch Filtration abgetrennt und mit 8 ml

12

Bindungspuffer gewaschen. Die Biosonden werden mit 4 mal 100 µl H<sub>2</sub>O eluiert. Durch eine Bestimmung der <sup>35</sup>S-Zerfälle in einem Scintillationszähler werden die Biosonden quantifiziert und können anschließend zur Bindung an das biologische Material eingesetzt werden.

5

### Sequenzen

Seq 1

GGTGCGCCGGTGCGTATCCGGATCCGCTGGAACCGCGTTGGCATTGGTTGC  
AACTAAAACCTGGCCAACCAATGTACTGGAGCCACCCGCAGTTGAGAAA

10 Seq 2

TAATACGACTCACTATAAGGGACAATTACTATTACAATTACAATGGGTGCGCCG  
GTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACCGCGTTGGCATTGGTTGCAACTAAAACC  
TGGCCAACCAATGTACTGGAGCCACCCGCAGTTGAGAAAGCAGGTGCATCCG

CT

15 Seq 3

TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG GGT  
GCG CCG GTG CCG TAT

Seq 4

AGC GGA TGC TTT CTC AAA CTG

20 Seq 5

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCC-Puromycin

Seq 6

GCGCGCTTTTTTNTAGCGGATGC

**Patentansprüche**

1. Verfahren zum Nachweis oder zur Reinigung von biologischem Material durch Elektrophorese oder Dielektrrophorese, folgenden Schritte umfassend:

- 5 a) Vorlage von biologischem Material, das unterschiedliche Spezies enthält.
- b) Hinzufügen einer Biosonde, enthaltend einen Teil A, der spezifisch an mindestens eine der Spezies bindet, und einen Teil B, der die elektrischen und/oder dielektrischen Eigenschaften der durch 10 spezifische Bindung der Biosonde markierten Spezie(s) verändert, so daß der Nachweis und/oder die Reinigung dieser markierten Spezie(s) durch Elektrophorese und/oder Dielektrrophorese ermöglicht oder verbessert wird.
- c) Aufbau eines elektrischen Feldes zum Nachweis oder zur Reinigung 15 des Komplexes bzw. der Komplexe aus biologischer Spezie(s) und spezifisch gebundener Biosonde durch Elektrophorese oder Dielektrrophorese.

2. Verfahren zum Nachweis oder zur Reinigung von Biosonden, die spezifisch an 20 biologisches Material binden, durch Elektrophorese oder Dielektrrophorese, folgende Schritte umfassend:

- a) Vorlage von biologischem Material, das mindestens eine Spezie enthält.
- b) Hinzufügen einer Biosonde oder verschiedener Biosonden, enthaltend jeweils einen Teil A, der spezifisch an mindestens eine der Spezies binden 25 kann, und einen Teil B, der die elektrischen und/oder dielektrischen Eigenschaften der durch Bindung einer Biosonde markierten Spezie(s) verändert, so daß Detektion und/oder Reinigung eines so entstehenden Komplexes aus biologischer Spezie(s) und biologischem Material möglich wird, wobei die verschiedenen Biosonden unterschiedliche 30 Bindungsspezifitäten besitzen und mindestens eine der hinzugefügten Biosonden an das biologische Material bindet.
- c) Aufbau eines elektrischen Feldes zum Nachweis oder zur Reinigung des Komplexes bzw. der Komplexe aus biologischer Spezie(s) und spezifisch gebundener Biosonde durch Elektrophorese oder Dielektrrophorese.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, charakterisiert dadurch, daß Teil A der Biosonde ein Protein, bevorzugt ein Antikörper oder Peptid, eine anorganische Verbindung, ein Kohlenhydrat, eine Nukleinsäure, ein Lipid oder eine andere spezifisch an biologisches Material bindende organische Verbindung ist oder mindestens eine der genannten Gruppen umfaßt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, charakterisiert dadurch, daß Teil B der Biosonde eine Nukleinsäure, ein elektrisch geladenes Peptid, ein polyquaternäres Amin, eine organische Säure, eine organische Base, eine anorganische Substanz, ein Lipid, eine Fettsäure oder eine Verbindung aus der Familie der Wachse, Öle oder Sterole ist oder mindestens eine der genannten Gruppen umfaßt.
5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, charakterisiert dadurch, daß Teil A der Biosonde ein Peptid oder Protein und Teil B der Biosonde eine für das Peptid oder Protein kodierende Nukleinsäure ist, die kovalent an dieses Peptid oder Protein gebunden ist, wobei die kovalente Bindung des Peptids bzw. Proteins an die Nukleinsäure vorzugsweise über ein Puromycin-Molekül erfolgt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 5, wobei es sich bei der Nukleinsäure um einzelsträngige RNA, doppelsträngige RNA, einzelsträngige DNA, doppelsträngige DNA oder um eine DNA/RNA-Heteroduplex handelt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 6, wobei es sich bei dem spezifisch bindenden Peptid, das Teil A der Biosonde ist oder von diesem umfaßt wird, um einen Liganden handelt, der an einen Rezeptor aus der Gruppe der folgenden Rezeptoren bindet: Ste2p-Rezeptor aus *Saccharomyces cerevisiae*, TSH-, FSH-, EGF-, TNF-, Transferrin-, Insulin-, FGF-, TGF $\beta$ -, IGF-, Angiotensin II- oder Somatostatin-Rezeptor.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei es sich bei dem biologischen Material um Gewebe, Zellen, Zellorganellen, Viren, Proteine, Peptide,

Nukleinsäuren, Kohlenhydrate, Lipide oder andere organische Verbindungen handelt oder dieses zumindest eine der genannten Gruppen umfaßt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, gekennzeichnet dadurch, daß es sich bei dem elektrophoretischen Verfahren um die free flow Elektrophorese handelt.

10. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, charakterisiert dadurch, daß das elektrophoretische oder dielektrrophoretische Verfahren unter Verwendung von Biochips durchgeführt wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, charakterisiert dadurch, daß das mit Hilfe der Biosonden spezifisch markierte Material zusätzlich auf andere Weise spezifisch markiert wird.

15 12. Verfahren nach Anspruch 11, charakterisiert dadurch, daß es sich bei der zusätzlichen Markierung um eine Farbmarkierung, eine Fluoreszenzmarkierung oder eine radioaktive Markierung handelt.

20 13. Molekül, im folgenden Biosonde genannt, das einen spezifisch an einen Rezeptor bindenden Proteinteil enthält, der unmittelbar oder über ein Zwischenglied kovalent mit einer Nukleinsäure verknüpft ist, wobei die Nukleinsäure vorzugsweise mehr als 5 Nukleotide umfaßt, gekennzeichnet dadurch, daß der Proteinteil des Moleküls einen Liganden für einen Rezeptor aus der Gruppe der folgenden Rezeptoren umfaßt: Ste2p-Rezeptor aus *Saccharomyces cerevisiae*,  
25 TSH-, FSH-, EGF-, TNF-, Transferrin-, Insulin-,  
TGF-, TGF $\beta$ -, IGF-, Angiotensin II- oder Somatostatin-Rezeptor.

14. Biosonde nach Anspruch 13, wobei die Nukleinsäure die genetische Information  
30 für den Proteinteil umfaßt.

15. Biosonde nach Anspruch 13 oder 14, wobei es sich bei der Nukleinsäure um einzelsträngige RNA, doppelsträngige RNA, einzelsträngige DNA, doppelsträngige DNA oder um eine DNA/RNA-Heteroduplex handelt.
- 5 16. Molekül, im folgenden Biosonde genannt, das einen spezifisch an biologisches Material bindenden Proteinteil enthält, der unmittelbar oder über ein Zwischenglied kovalent mit einem Lipidmolekül verknüpft ist, wobei es sich bei dem biologischen Material um Gewebe, Zellen, Zellorganellen, Viren, Proteine, Peptide, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate, Lipide oder andere organische Verbindungen handelt oder dieses zumindest eine der genannten Gruppen umfaßt.
- 10 17. Molekül, im folgenden Biosonde genannt, das einen spezifisch an biologisches Material bindenden Proteinteil enthält, der unmittelbar oder über ein Zwischenglied kovalent mit einer polyquaternären Ammoniumverbindung verknüpft ist, wobei es sich bei dem biologischen Material um Gewebe, Zellen, Zellorganellen, Viren, Proteine, Peptide, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate, Lipide oder andere organische Verbindungen handelt oder dieses zumindest eine der genannten Gruppen umfaßt.
- 15 20 18. Biosonde nach Anspruch 16 oder 17, wobei es sich bei dem Proteinteil um ein Molekül handelt, das einen Liganden für einen Rezeptor aus der Gruppe der folgenden Rezeptoren umfaßt: Ste2p-Rezeptor aus *Saccharomyces cerevisiae*, TSH-, FSH-, EGF-, TNF-, Transferrin-, Insulin-, FGF-, TGF $\beta$ -, IGF-, Angiotensin II- oder Somatostatin-Rezeptor.
- 25 19. Biosonde nach einem der Ansprüche 13 bis 18, wobei das Zwischenglied ein Puromycin-Molekül umfaßt.
- 30 20. Komplex aus biologischem Material und einer spezifisch an dieses gebundenen Biosonde nach Anspruch 13 bis 19, wobei es sich bei dem biologischen Material um Gewebe, Zellen, Zellorganellen, Viren, Proteine, Peptide, Nukleinsäuren,

Kohlenhydrate, Lipide oder andere organische Verbindungen handelt oder dieses zumindest eine der genannten Gruppen umfaßt.

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Xzillion GmbH & Co. KG

<120> Biosonden und deren Verwendung

<130> 200at15

<140>

<141>

<150> 10033194.7

<151> 2000-07-07

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 102

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: alpha-Faktor

<400> 1

ggtgccgg tgccgtatcc ggatccgctg gaaccgcgtt ggcattggtt gcaactaaaa 60  
cctggccaaac caatgtactg gagccacccg cagtttgaga aa 102

<210> 2

<211> 162

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PRE-Fusagen

<400> 2

taatacact cactataggg acaattacta tttacaatta caatgggtgc gccggtgccg 60  
tatccggatc cgctggAACc gcgttggcat tggttgcAAC taaaacctgg ccaaccaatg 120  
tactggagcc acccgcagtt tgagaaagca ggtgcacccg ct 162

<210> 3

<211> 63

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 3

taatacgaact cactataggg acaattacta tttacaatta caatgggtgc gccgggtgccg 60  
tat 63

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 4

agcggatgct ttctcaaact g 21

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Linker mit  
Puromycin am 3'-Ende

<400> 5

aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaacc 29

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Splint

<400> 6

gcgcgctttt tttttnagcg gatgc 25