



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 310 207**

51 Int. Cl.:
C12N 15/10 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02745336 .4**
96 Fecha de presentación : **31.05.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1390492**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2004**

54 Título: **Evolución dirigida de biomoléculas usando microestructuras.**

30 Prioridad: **31.05.2001 EP 01113331**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.01.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.01.2009

73 Titular/es: **Direvo Biotech AG.**
Nattermannallee 1
50829 Köln, DE

72 Inventor/es: **Rarbach, Markus;**
Kettling, Ulrich;
Stephan, Jens y
Koltermann, Andre

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 310 207 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Evolución dirigida de biomoléculas usando microestructuras.

La presente invención se refiere a un procedimiento para una evolución dirigida de biomoléculas.

Antecedentes de la invención

En el procedimiento de la evolución molecular dirigida, a partir de bibliotecas que contienen un sinnúmero de variantes de una biomolécula, se seleccionan variantes que responden a una finalidad de desarrollo establecida. La repetición de variación, amplificación y selección de variantes genera biomoléculas optimizadas.

Los procedimientos de la evolución molecular dirigida se basan primariamente en la generación de una gran cantidad de variantes de ADN (biblioteca de genotipos). Partiendo de tal biblioteca de genotipos, se preparan los correspondientes productos génicos, se exploran respecto de sus propiedades (fenotipo) y se seleccionan de modo correspondiente. Para la investigación, los procedimientos de barrido, debido a su flexibilidad y su aplicabilidad general, se muestran particularmente ventajosos respecto de otros, por ejemplo, procedimientos de selección acoplados al crecimiento.

Los procedimientos de barrido se basan sobre el aislamiento espacial de las variantes genotípicas. Este aislamiento de los genotipos asegura tanto la posibilidad de medición por separado de las propiedades de los distintos fenotipos, como también la asignación del genotipo y del fenotipo, que son indispensables para la selección y la amplificación de genotipos óptimos. Como la cantidad de las variantes por ensayar puede ser muy grande, se realiza la segregación de los genotipos en procedimientos realizados hasta ahora, por lo general, en portamuestras que reúnen un sinnúmero de compartimientos para muestras. Los portamuestras usuales en el mercado llevan, por ejemplo, 96, 384 ó 1536 compartimientos para muestras. La cantidad de compartimientos para muestras se selecciona, en este caso, lo mayor posible para limitar la cantidad de los portamuestras necesarios y la cantidad de los reactivos de ensayo requeridos. En el desarrollo de portamuestras con una cantidad aún mayor de compartimientos para muestras es limitante la manipulación de las bajas cantidades de líquido en estos compartimientos. Las influencias sobre viscosidad y tensión superficial, así como la evaporación de muestras fluidas que son de menor importancia en mayores volúmenes, restringen esta forma de procedimiento de modo considerable.

Es objeto de la invención poner a disposición un procedimiento de barrido para la evolución molecular dirigida, que evite las desventajas mencionadas de los procedimientos de barrido orientados a los portamuestras.

En principio, por el documento WO9535492 ya se conoce un procedimiento con un objeto comparable. El procedimiento descrito es apropiado para separar los componentes de muestras de una mezcla de muestra líquida transportada en un capilar de acuerdo con sus propiedades. Es desventajoso en este procedimiento que no está prevista una posibilidad para reducir el transporte difusivo de las sustancias dentro de la corriente de fluido. Este déficit evita la utilización de compartimientos para muestras muy pequeños, ya que en especial en el caso de pequeñas dimensiones, la pérdida difusiva de los componentes de las muestras impide la posibilidad de realización de las reacciones pretendidas en el compartimiento para muestras. Además, la realización técnica del procedimiento requiere de altas exigencias para el posicionamiento mecánico de los componentes. Estas soluciones se presentan a menudo como inestables y propensas a fallar.

Además, por el documento DE-A-19950385 se conoce un procedimiento de control *in vivo* que permite la identificación de actividades en sí no seleccionables en una célula diana. La secuencia de ácido nucleico por ensayar se transporta junto con un vector informante por transfección hacia dentro de estas células diana. La actividad resultante de este informante en las células diana o en su sobrenadante de cultivo se toma como medida para la actividad no seleccionable de la secuencia de ácido nucleico investigada y su identificación. Sin embargo, es conocido que el uso de procedimientos para la expresión *in vivo* está limitado por algunos factores. De esta manera, las nucleasas o proteasas intracelulares pueden destruir el genotipo o el producto génico incorporado. Los productos génicos expresados pueden actuar de forma tóxica o inhibidora sobre las células huésped, perjudicando así su efectividad. Los productos génicos se pueden expresar, además, en forma insoluble o bien biológicamente inactiva como "inclusion body".

Por el contrario, la expresión *in vitro* celular no está ligada a ningún mecanismo de control celular, permitiendo sin etapas de aislamiento un acceso directo a los productos génicos expresados. Además, la obtención de productos génicos artificiales es posible mediante la incorporación de aminoácidos no proteinógenos modificados.

La presente invención describe un procedimiento de control que es apropiado para la identificación selectiva de genotipos, usando microestructuras apropiadas, sobre la base de expresión *in vitro* celular.

Breve descripción de la invención

Se halló que el control de una reunión de muestras, así como la selección o clasificación de muestras individuales de esta reunión puede realizarse en un procedimiento *in vitro* por medio de técnicas de microestructuración de estructuras de canales terminadas. La división en cada una de las muestras se realiza en estas microestructuras por medio de segregación con distintas fases fluidas. La presente invención se refiere, así, a

ES 2 310 207 T3

(1) un procedimiento para la selección acelular (es decir, *in vitro*) de variantes genotípicas provenientes de bibliotecas genotípicas en una microestructura que comprende la siguiente secuencia de etapas de reacción:

- (a) reunión de un fluido de ensayo, que comprende una biblioteca de genotipos en una forma expresable y auxiliares de expresión apropiados para la expresión acelular, y de un fluido de separación en la microestructura, de modo que se generan compartimientos individuales del fluido de ensayo;
- (b) transporte de los compartimientos a través de la microestructura, con lo cual se produce la expresión del genotipo en el fenotipo en los compartimientos,
- (c) detección del fenotipo en los compartimientos y
- (d) selección de los compartimientos según sus fenotipos.

Descripción de las figuras

Las funciones y propiedades esenciales del procedimiento según la invención (1) se explican con mayor detalle a continuación por medio de las figuras. Las figuras muestran representaciones esquemáticas de distintas formas de realización preferidas de la microestructura utilizada en el procedimiento según la invención.

La Figura 1 muestra esquemáticamente la conformación general de una estructura de canal microestructurada.

La Figura 2 muestra la conformación funcional de una estructura de canal microestructurada con elementos de construcción activos.

La Figura 3 muestra esquemáticamente una estructura de canal microestructurada con un área combinada de suministro de fluido de ensayo y de detección.

La Figura 4 muestra esquemáticamente una estructura de canal microestructurada, cuyas áreas de reacción están provistas de canales de reacción controlables de forma individual.

La Figura 5 muestra esquemáticamente una microestructura, empleada para la selección de una actividad de endonucleasa específica de secuencia.

La Figura 6 muestra en vista lateral la conformación detallada de la microestructura mostrada en la Figura 5, empleada para la selección de la actividad de la endonucleasa específica de secuencia.

Descripción detallada de la invención y las figuras

“Microestructura” en el sentido de la presente invención indica formaciones tridimensionales con estructura de canal. Las dimensiones de las estructuras de canales están preferentemente en el rango de 0,1 μm a 100 μm de ancho, con preferencia especial entre 1 y 10 μm . Las relaciones de aspecto están preferentemente en el rango de 0,1 a 10, con preferencia especial en 1.

“Fluidos” en el sentido de la presente invención son líquidos o gases. En particular, los fluidos de ensayo para la formación de los compartimientos de genotipos son soluciones o suspensiones acuosas de composición compleja, que, además de ADN, contienen todos los demás componentes esenciales para la expresión *in vitro* acelular del genotipo en el fenotipo.

Los sistemas de transcripción y/o traducción celular provenientes de “los auxiliares de expresión apropiados para la expresión acelular” en el sentido de la invención (también denominados “componentes esenciales”) comprenden componentes tales como factores de traducción (factores de iniciación, elongación, terminación), ribosomas (70S u 80S), t-ARNA, aminoacil-tARN-sintasas. Los sistemas acelulares son extractos celulares obtenidos por centrifugación y otras técnicas de purificación que disponen de actividad biológica. Básicamente, se pueden preparar lisados celulares a partir de todas las células. Para la expresión *in vitro* acelular, se pueden utilizar distintos lisados celulares procariontes u eucariontes. Se utilizan con preferencia extractos de células de *E. coli* (por ejemplo, extracto S30), de reticulocitos (“Rabbit Reticulocytes”) y de plántulas de trigo (“Wheat Germ”). La desintegración celular se realiza de acuerdo con protocolos conocidos por el especialista (ver al respecto, por ejemplo, Promega Corporation, Protocols and Application Guide, tercera edición, 1996, y la literatura allí citada). El especialista también sabe que, para una expresión eficiente, son necesarios aún aditivos de otros componentes tales como, por ejemplo, nucleótidos, aminoácidos, equivalentes energéticos, sistemas regeneradores de energía, cofactores como Mg^{2+} , aditivos tampón, eventualmente ARN-polimerasa exógena, como T7-ARN-polimerasa.

El genotipo por investigar y por expresar se puede añadir en forma de distintas matrices, como ADN o ARNm circular o lineal, en cada caso de origen celular o en forma sintética. Las plantillas de partida y el sistema de expresión deben concordar. De esta manera, se utilizan, por ejemplo, para la reacción de ADN, con preferencia sistemas de transcripción/traducción acoplados como extracto S30 de *E. coli*.

Para la producción de variantes de ADN (bibliotecas de genotipos) se puede recurrir a diversos métodos. Los procedimientos *in vitro* conocidos son “Random Nucleic Acid Mutagenesis” logrados, por ejemplo, por aplicación de polimerasas con alta cuota de error (documento WO 9218645), mutagénesis de casete (A. R. Oliphant *et al.*, Gene 44 177-183 (1986); M. S. Horwitz, *et al.*, Genome 31 112-117 (1989)), error-prone PCR (R. C. Cadwell y G. F. Joice, PCR Methods Appl. 2 28-33 (1992)), y “Site Saturation Mutagenesis”. Además, es apropiado el uso de “Recombination Chain Reaction” (documento WO 0134835), “DNA-Shuffling” (documento WO 9522625), “Staggered Extension Method” (documento WO 9842728) o “Random Priming Recombination” (documento WO9842728). También se pueden emplear métodos de recombinación no homóloga como “Itchy” (M. Ostermeier *et al.*, Nature Biotechnology 17 1205-1209 (1999)).

Para la formación de los compartimientos de medios de separación, se emplean fluidos no miscibles con agua. Ellos son en especial sustancias orgánico-químicas inertes hidrofóbicas que están presentes a temperatura ambiente operativa y presión operativa como fase líquida. En una forma preferida, se emplean hidrocarburos alifáticos o aromáticos, alcanos o alcanos superiores, ésteres o éteres de hidrocarburos superiores, hidrocarburos halogenados, aceites minerales, aceites de siliconas o mezclas de estas sustancias.

Como fluido de ensayo se emplea, en una forma de realización preferida, una solución, suspensión o emulsión acuosa que contiene los reactivos de detección. Los reactivos de detección preferidos son sustratos que experimentan modificaciones mensurables por interacción con el fenotipo expresado del genotipo. Las modificaciones mensurables comprenden, en este caso, por ejemplo, modificaciones en el espectro de absorción, modificación de las propiedades cromóforas, fluoróforas, modificaciones de la radiactividad mensurable.

También se emplean mezclas de sustratos y reactivos que llevan a un producto final mensurable de forma estequiométrica con el primer sustrato modificado con el fenotipo expresado en una cascada de reacción.

Con preferencia, se emplean sustratos que están acoplados con grupos funcionales definidos y, con ello, grupos detectables de manera definida. Los ejemplos de estos grupos son marcadores fluoróforos tales como, por ejemplo, Rhodamine Green (Molecular Probes Inc., Oregon, Estados Unidos) o Cy-5 (Amersham Biosciences Europe GmbH, Friburgo).

Estos sustratos se han de seleccionar siempre, en este caso, de acuerdo con el fenotipo expresado y su espectro de actividad. A modo de ejemplo, se puede emplear para la selección de variantes de proteasa expresada un sustrato peptídico acoplado con un fluoróforo.

La formación del fluido de ensayo determina los parámetros de selección para un fenotipo por evaluar positivo y, así, también determina la lectura de los genotipos correspondientes.

La velocidad de flujo en los canales del sustrato de reacción microestructurado es, en una forma de realización preferida, de entre 10^{-7} m s⁻¹ y 10^{-2} m s⁻¹, en una forma de realización de especial preferencia, entre 10^{-6} m s⁻¹ y 10^{-4} m s⁻¹.

Separación de los genotipos en compartimientos individuales: en una forma de realización preferida, cada compartimiento contiene un genotipo. La segregación de los genotipos se puede realizar, en este caso, por medio de una distribución puramente estadística o también dirigida por medio de un cálculo técnico de medición directa y correspondiente individualización de las biomoléculas que llevan el genotipo. Las biomoléculas que llevan el genotipo están compuestas, por lo general, de ADN bicatenario, eventualmente también como ADN o ARN monocatenario. En otra forma de realización, se reúnen varios genotipos en un compartimiento para poder investigar una mayor cantidad de variantes. Partiendo del genotipo, se forma dentro del compartimiento el correspondiente fenotipo. La segregación satisface, en este caso, tanto la función de la separación de la cantidad de fenotipos para la medición de las propiedades, como también el acoplamiento de genotipo y fenotipo, que permite un posterior aislamiento de mejores genotipos. Los volúmenes de los compartimientos están en general en el rango de 0,01 a 10.000 fl, con preferencia en el rango de 0,1 a 1000 fl, con preferencia especial de 1 a 100 fl.

Adición de reactivos de ensayo en cada uno de los compartimientos: Los reactivos apropiados para la detección del fenotipo no se pueden añadir en la mayoría de las aplicaciones en la formación de los compartimientos del genotipo, ya que pueden interferir, por un lado, con los procedimientos *in vitro* para la expresión del fenotipo y ya que, por otro lado, se dificulta un control temporal exacto del curso de la reacción por medio de la adición temprana de los reactivos.

Detección del fenotipo: la detección de las propiedades fenotípicas de cada genotipo o de cada compartimiento se realiza preferentemente con procedimientos ópticos, con preferencia especial con procedimientos fluorimétricos. Los procedimientos de medición apropiados para la medir dimensiones estructurales de hasta pocos 100 nm se describen, a modo de ejemplo, en el documento DE 197 57 740.

Lectura de genotipos: la lectura de los genotipos con fenotipo de evaluación positiva se logra primariamente por selección de los compartimientos correspondientes al fenotipo positivo. Esta diferenciación en compartimientos que contienen fenotipos positivos o negativos se logra por medio de una separación espacial posterior a la detección en los correspondientes reservorios de selección.

El genotipo se aísla en forma de ADN o ARN de cada uno de los compartimientos seleccionados y se puede llevar nuevamente al proceso. Esto permite un nuevo ciclo de una lectura dirigida (donde se pueden utilizar, por ejemplo, preparaciones de ensayo con composición modificada).

- 5 En la Fig. 1 se reproduce esquemáticamente la conformación de una estructura de canal microestructurada que reúne estas funciones, permitiendo así la evolución dirigida de biomoléculas.

La separación de los compartimientos para la segregación de los genotipos se realiza por adición intermitente de al menos un fluido de ensayo que contiene los genotipos (102) y al menos un fluido de separación (101) en una estructura de compartimentalización (106). El fluido (102) contiene, en este caso, preferentemente todas las sustancias necesarias para la expresión del genotipo, la composición de estos fluidos y los procedimientos para su preparación son conocidos por el especialista (Lesley, S. A., *Methods Mol. Biol.* 37, 265 (1995)). El fluido de separación puede ser tanto una solución acuosa, como también un líquido no acuoso, preferentemente no miscible con agua o un gas. También se pueden usar para la separación de los compartimientos de los genotipos (109) en compartimientos de fluidos de separación estructurados (111), que hacen necesaria la adición de varios componentes de fluidos de separación. Las temperaturas de ambas áreas de reacción I (108) y II (110) se pueden controlar, en este caso, por medio de elementos de termostato apropiados. Ambas áreas de reacción (108 y 110) se pueden operar en función de la aplicación con temperatura igual o diferente. El uso de fluidos no miscibles con agua o gases como fluido de separación (101) en combinación con un flujo hidrodinámico en el sustrato de reacción microestructurado es ventajoso porque, a través de esta segregación de los compartimientos de los genotipos, se puede minimizar el transporte difusivo de sustancias entre los compartimientos de los genotipos (109) y entre los compartimientos de los genotipos (109) y el fluido de separación (101). También es ventajoso que, con el uso de fluidos no miscibles con agua o gases como fluido con separación (101) en el flujo hidrodinámico, se minimiza la dispersión axial. La expresión del genotipo se produce en el área de reacción I (108). El tiempo de reacción puede ser elegido libremente por el experimentador por elección de la longitud del canal de reacción microestructurado en el área de reacción I, así como por elección de la velocidad del fluido en el área de reacción I. La adición de los componentes de reacción para la determinación de las propiedades fenotípicas de las biomoléculas formadas en el compartimiento de los genotipos (109) en el área de reacción (108) se realiza en un área (107) del sustrato microestructura, una cantidad de un fluido de ensayo (103) seleccionada por el experimentador se reúne con los compartimientos de los genotipos (109). Con preferencia, el fluido de ensayo (103) está compuesto de un fluido que es miscible con el compartimiento de los genotipos (109) o es soluble en él. La conversión de los componentes de reacción añadidos con el fluido de ensayo (103) a través de las biomoléculas presentes en el compartimiento de los genotipos (109) se realiza en el área de reacción II (110). El tiempo de reacción puede ser elegido libremente por el experimentador por medio de la selección de la longitud del canal de reacción microestructurado en el área de reacción II, así como por medio de la selección de la velocidad del fluido en el área de reacción II.

La medición de los productos de reacción generados de la conversión de los componentes del fluido de ensayo (103) y el compartimiento de los genotipos (109) se realiza en un rango de medición (105) del sustrato de reacción. Con preferencia, se emplean para la medición procedimientos de medición espectroscópicos, con máxima preferencia, métodos espectroscópicos confocales de fluorescencia. Estos métodos están en condiciones de determinar la composición de la muestra en dimensiones estructurales de pocos 100 nm con alta sensibilidad. La aplicación de procedimientos confocales de detección de mínimas cantidades de sustancia se indica, por ejemplo, en los documentos DE4301005 y WO9535492.

45 Los compartimientos de los genotipos con resultados de medición positivos en el sentido de la finalidad de la evolución se deben separar de aquellos con resultados de medición negativos para separar las variantes ventajosas de la biblioteca utilizada de las desventajosas. Esta separación se realiza en un rango de selección (104) del sustrato de reacción por medio del mando controlado de los compartimientos de los genotipos en uno de al menos dos canales de selección 112 y 113.

50 Todas las etapas de proceso mencionadas se reúnen e integran ventajosamente en estructuras de canales terminadas por medio de técnica de microestructuras. Estas estructuras de canales se pueden acabar con distintos materiales. Entre ellos, se cuentan metales (por ejemplo, silicio), materiales amorfos (por ejemplo, vidrio), materiales cerámicos y materiales poliméricos (por ejemplo, poliuretanos (PU), polidimetilsiloxanos (PDMS) y polimetilmetacrilatos (PMMA)). Con preferencia, las estructuras de canales se producen por medio de técnicas de separación o decapación en materiales metálicos, cerámicos o amorfos. Las ventajas de estas formas de realización son las bajas tolerancias de las estructuras que se pueden lograr, así como una alta funcionalidad de los elementos constructivos integrables. Además, los procedimientos litográficos suaves y los procedimientos de moldeo permiten la producción de sustratos de reacción microestructurados de materiales poliméricos como poliuretanos (PU) y polidimetilsiloxanos (PDMS). Como los elementos funcionales integrados están fijados dentro de sustratos de reacción microestructurados, resultan aquí esenciales ventajas respecto de otras preparaciones de solución en cuanto a la estabilidad del sistema.

65 Los elementos constitutivos activos se pueden ejecutar como componente de la microestructura como elementos de memoria de forma, grupos constructivos piezoeléctricos o elementos magnetostrictivos. En una forma de realización preferida, se ejecutan elementos constructivos activos como elementos de memoria de forma. Entre los elementos constitutivos integrables, se cuentan, por ejemplo, válvulas y bombas (T. Gerlach, M. Schuenemann y H. Wurm, *Journal of Micromechanics & Microengineering*, 5 (2): 199-201 (junio de 1995)).

ES 2 310 207 T3

Los elementos constitutivos se emplean en una forma de realización preferida para la segregación en la corriente de fluido y la selección de compartimientos elegidos. En una forma de realización especial, los elementos constitutivos activos están dispuestos fuera de la microestructura, pero directamente unida con ella.

5 En otra forma de realización de especial preferencia, los elementos constitutivos activos se hallan en la microestructura, es decir, son componentes. La conformación funcional de una estructura de canal microestructurada utilizada en el procedimiento según la invención son elementos constitutivos activos 221, 222, 223, 224 y 225 se reproduce en la Fig. 2. Los elementos de válvula microestructurados 221 y 222, que están unidos con el primer o el segundo canal de suministro, sirven para formar la corriente de fluido compartimentalizada descrita de los componentes de fluido
10 201 y 202 en el elemento de compartimentalización 206.

Los elementos de válvula se abren en una forma de realización preferida en una secuencia establecida por el experimentador y durante un período establecido por el experimentador, permitiendo así el paso de los elementos del fluido de volumen definido.

15 El elemento de válvula 223 (que puede estar conformado según los elementos de válvula 221 y 222) controla la adición del fluido de ensayo 203 en el área 207. En una forma de realización preferida, el control el elemento de válvula se coordina con el control de los elementos de válvula 221 y 222 de modo tal que se añaden los reactivos de ensayo cuando se halla un compartimiento de genotipos dentro del rango de adición 207. En especial al usar fluidos compresibles o sustratos de reacción microestructurados de materiales elásticos, la coordinación de los elementos de
20 válvula 221, 222 y 223 puede ser insuficiente para garantizar de forma segura la adición de los reactivos de ensayo a un compartimiento del genotipo en el área de adición 207. En otra forma de realización preferida, se puede determinar el transporte de un compartimiento del genotipo en el área de adición 207 por medio de técnicas de medición y se puede abrir el elemento de válvula 223 a partir de este valor de medición. Con preferencia, para la detección del
25 compartimiento del genotipo en el área de adición 207 se emplean procedimientos de medición ópticos. Los elementos de válvula 224 y 225 (Fig. 2) controlan la selección de los compartimientos del genotipo después de la detección de sus propiedades fenotípicas en el rango de detección 205. Para la selección de cada uno de los compartimientos del genotipo, se abren alternativamente los elementos de válvula de al menos dos de los canales de selección 212 y 213.

30 En otra forma de realización preferida, tal como se representa esquemáticamente en la Fig. 3, se pueden determinar las propiedades fenotípicas del producto génico formado en contacto directo del área de adición del fluido de ensayo (307). El sustrato de reacción microestructurado se prepara dejando de lado el área de reacción II (compárese para ello la Fig. 1, área de reacción II (110)) de forma tal que coinciden espacialmente el área de adición del fluido de ensayo (307) y el rango de detección (305). Las ventajas de esta forma de realización consisten en que se pueden
35 observar rápidas reacciones entre el producto génico y los reactivos de ensayo como series de medición temporalmente resueltas. Estas mediciones en serie temporales permiten, para reacciones rápidas, una mejor caracterización de las propiedades fenotípicas del producto génico formado como la determinación de cada uno de los valores de medición después de un tiempo de reacción establecido dado por la selección de la longitud del área de reacción II. La duración de la medición en serie temporal se puede prolongar por interrupción de la corriente de fluido en el sustrato de reacción
40 microestructurado cerrando al mismo tiempo los elementos de válvula 321, 322 y 323.

El tiempo de permanencia de los compartimientos para las muestras en las áreas de reacción 108 y 110 del sustrato de reacción representado esquemáticamente en la Fig. 1 está dado por la longitud del área de reacción y la velocidad del fluido en esta área. Según las relaciones conocidas por el especialista, en caso de un transporte de fluido hidrodinámico,
45 aumenta la pérdida de presión con la longitud de la estructura de canal. Para tiempos de reacción muy largos y los las áreas de reacción largas necesarias, la presión necesaria para el transporte hidrodinámico puede constituir un impedimento técnico para la construcción del sustrato de reacción microestructurado. En este caso, la forma de realización esquematizada en la Fig. 4 representa una solución ventajosa del problema técnico. Las áreas de reacción 408 y 410 están ejecutados aquí como canales de reacción 427 separados, controlables por apertura de los distintos
50 elementos de válvula 426. En el procedimiento según la invención, se llenan así los canales individuales después de abrir cada una de las válvulas con la corriente de fluido compartimentalizada. El sinnúmero de canales de reacción 426 previstos se puede llenar de esta manera. Una vez transcurrido un tiempo de reacción seleccionable, se puede empujar el fluido compartimentalizado presente en cada uno de los canales de reacción por medio de otro fluido compartimentalizado o un fluido no compartimentalizado y se puede llevar al siguiente elemento funcional (407) o
55 (404).

Según la invención, es apropiado el procedimiento para seleccionar biomoléculas con determinadas propiedades fenotípicas de un sinnúmero de variantes. Las variantes se pueden preparar por medio de procedimientos *in vitro* para la mutación de una secuencia de ADN del fenotipo de partida. En especial es apropiado el procedimiento para la selección
60 de fenotipos con genotipos celularmente compatibles. No celularmente compatible es, por ejemplo, una actividad de endonucleasa específica de secuencia, cuando a la célula le falta la actividad de metilasa con la correspondiente especificidad de secuencia, ya que aquí se daña el ADN propio de la célula por medio de la actividad catalítica de la proteína expresada. Tal fenotipo no celularmente compatible se halla también, por ejemplo, cuando la actividad catalítica de una proteína expresada tiene efectos tóxicos sobre el metabolismo celular u otras propiedades inhibitoras
65 del crecimiento.

Para la selección de una actividad de endonucleasa específica de secuencia, se puede emplear, tal como se indica a continuación en el ejemplo, un diseño de microestructura según la Fig. 5 y la Fig. 6. En la Fig. 5, se muestra

ES 2 310 207 T3

una microestructura que está compuesta por los suministros de reactivos 501 (fluido de separación), 502 (fluido de expresión), 503 (fluido de ensayo), la estructura de compartimentalización 506, el área de adición de ensayo 507, el área de selección 504, el área de medición 505, así como los reservorios 512 ó 513 para compartimientos seleccionados o descartados. Las áreas entre la estructura de compartimentalización 505 el área de adición de ensayo 507 o bien entre el área de adición de ensayo 507 y el área de medición 505 representan, en cada caso, las áreas de reacción I o II (508 o bien 510). En estas áreas, la expresión puede tener lugar en el fenotipo o bien la reacción del fenotipo con los reactivos de ensayo añadidos.

La estructura del módulo de selección microestructurado completo está reproducida en vista lateral en la Figura 6. La microestructura 630 está cerrada con un vidrio flotante 631 (*floatglas*; espesor 170 μm). Los elementos de válvula 621, 622, 623, 624, 625 (tapados en la Fig. 6) están ejecutados como válvulas en miniatura (Lee Hydraulische Miniaturkomponenten GmbH, Frankfurt del Meno). Estas microválvulas se conectan por medio de una unidad de control externa (construcción propia, estructura de conexión según las indicaciones del fabricante Lee GmbH). Los elementos de válvula están fijados en una estructura portante 633 que está unida con ellos por compresión con la microestructura 630. La unión hidráulicamente obturada de las microválvulas (621, 622, 623, 624, 625) a través de los elementos de conexión 636 y los pasajes 637 con los reservorios 601, 602, 603, 612, 613 de la microestructura 630 se logra por medio de los elementos de obturación 634. Para producir la solidez mecánica de todo el módulo de selección, se coloca la microestructura 630 sobre un soporte 632. El soporte 632 sirve también para la atemperación del módulo de selección. Para la detección óptica del rendimiento bioquímico de la reacción en los compartimientos de fluido (tal como se representa esquemáticamente en la Fig. 1 con el número 109), se usa en el área de detección 605 un objetivo microscópico (635) en la microestructura cubierto con un vidrio flotante.

El procedimiento según la invención y la microestructura allí utilizada se explica con mayor detalle por medio del siguiente ejemplo no limitativo.

Ejemplo

El ejemplo aquí explicado describe la selección de una actividad de endonucleasa específica de secuencia.

Constitución y composición de una microestructura: para la selección de una actividad de endonucleasa específica de secuencia, se selecciona una microestructura según la Fig. 5 y la Fig. 6. Las estructuras de canales de una microestructura de este tipo se preparan por ablación UV al vacío a partir del material PMMA (metacrilato de polimetilo). La producción y el uso de estas microestructuras para el análisis de reacciones bioquímicas se ha mostrado en repetidas ocasiones (M. Lapczynska, Dissertation Universität Gesamthochschule Kassel "Vakuum-ultraviolett (VUV)-Laser-induzierte Mikrostrukturierung von Polymer-Substraten für laserspektroskopische Anwendung in der Bioanalytik" (1998); K. Dörre, Dissertation Technische Universität Braunschweig "Machbarkeitsstudien zur DNA-Einzelmolekülsequenzierung in Mikrostrukturen" (2000); K. Dörre *et al.*, Journal of Biotechnology 86 225-236 (2001); J. Stephan *et al.*, Journal of Biotechnology 86 255-267 (2001)). El ancho y la profundidad de los canales es de aproximadamente 1 μm . Los reservorios 601, 602, 603, 612 y 613 se incorporan por medio de elaboración de la estructura con mecánica de precisión.

Con los procedimientos de espectroscopia de fluorescencia descritos en el documento DE 19757740, también se pueden determinar en canales de reacción microestructurados reacciones bioquímicas con alta resolución. Además, la óptica microscópica permite el control visual de la compartimentalización dentro de la microestructura y, con ello, las adecuaciones experimentales de los parámetros operativos necesarios tales como presión previa de los suministros de reactivos, así como duración y coordinación de los intervalos de conexión de los elementos de válvula 621, 622, 623, 624, 625.

Selección de actividad de endonucleasa específica de secuencia: antes de usar el módulo de expresión, se llena la estructura de canal con fluido de separación.

Como fluido de separación, se emplea una mezcla de hidrocarburos alifáticos perfluorados (Fluorinert FC40, Art. N.º F9755, Sigma Aldrich GmbH, Deisenhofen). El fluido de separación se comporta inerte frente a reacciones bioquímicas. El fluido de separación se envasa para ello en el compartimiento 501. El llenado de los canales microestructurados se realiza en parte de forma espontánea por acción capilar. Las áreas parciales llenadas no espontáneamente de los canales se pueden llevar por aplicación de presión negativa en los compartimientos 502, 503, 512, 513. A continuación se incorporan todos los reactivos necesarios en los compartimientos previstos de la microestructura (fluido de expresión 502, fluido de ensayo 503). La diferencia en volumen para el llenado del volumen de todos los compartimientos se completa con un fluido de acoplamiento inmiscible con agua (aceite mineral de baja viscosidad, Art. N.º M5904, Sigma Aldrich GmbH, Deisenhofen). Asimismo, se llenan los reservorios 512 y 513 con fluido de acoplamiento. El fluido de acoplamiento sirve para el acoplamiento hidráulico entre los elementos de válvula y los reservorios de fluidos mediante un medio no compresible. El fluido de expresión acuoso y el fluido de ensayo se recubren con el fluido de acoplamiento. Los elementos de válvula 622 a 625 se unen con reservorios llenados con fluido de acoplamiento, cargados a presión, el elemento de válvula 621 se une con el reservorio llenado con fluido de separación, cargado a presión. La presión previa de cada reservorio se elige, en cada caso, por separado para cada reservorio.

Al abrir las válvulas 621, 622, 623, 624, 625, se llenan las conexiones flexibles, así como las válvulas en sí con fluido de separación o fluido de acoplamiento sin inclusión de burbujas de gas. El módulo de soporte 633 se une, a su

vez, sin inclusión de burbujas de gas, por compresión con la microestructura 630. El fluido de expresión (502) contiene un extracto de *E. coli* S30 apropiado para la expresión de proteínas acelular. El fluido de expresión (502) contiene un extracto de *E. coli* 530 apropiado para la expresión de proteínas acelular, incluso de todos los demás excipientes (T7-ARN-polimerasa, etc.) (Lesley, S.A., Methods Mol. Biol. 37, 265 (1995)).

La biblioteca de genotipos, basada en el gen EcoRI de *E. coli*, se diluye en esta preparación a una temperatura de 4°C a una concentración de 500 pM de ADN de plásmido.

Los elementos de válvula (621 y 622) del elemento de compartimentalización (506) del sustrato de reacción microestructurado se controlan en la adición de fluido de expresión (502 ó 602) y fluido de separación (501 ó 601) de modo tal que se forman compartimientos de genotipos acuosos con una longitud de aproximadamente 2 µm y compartimientos de fluido de separación con una longitud de 10 µm. En las dimensiones del canal de 1 µm x 1 µm, el volumen de cada compartimiento de genotipos es de 2 fl, cada compartimiento de genotipo lleva entonces en promedio estadístico aproximadamente 0,6 moléculas de ADN de la biblioteca empleada. Conforme a ello, aproximadamente el 54% de los compartimientos formados no contiene molécula de ADN, 33% de los compartimientos contiene una molécula de ADN y 13% de los compartimientos contiene dos o más moléculas de ADN.

Se halló que por medio de la actividad nucleolítica inespecífica, se produce a menudo una pérdida de ADN empleado, de modo que la concentración del ADN utilizado se puede seleccionar según la aplicación algo mayor en el rango nanomolar (1 - 10 nM).

La velocidad de transporte dentro del área de incubación I (508) de la estructura del canal se selecciona con aproximadamente 2,0 cm h⁻¹, de modo que cada compartimiento genotípico formado recorre después de aproximadamente 0,5 h el recorrido de incubación I de 1 cm para la expresión proteica. Después de la expresión del fenotipo, se dosifican los compartimientos de genotipos con aproximadamente 8 fl de fluido de ensayo (503 ó 603). El fluido de ensayo (503/603) contiene todos los componentes necesarios para la reacción endonucleolítica y su comprobación: 150 mM de KOAc, 37,5 mM de acetato de Tris, pH 7,6, 15 mM de MgOAc, 0,75 mM de β-mercaptoetanol, 515 µg/ml de BSA, 0,05% de Triton X-100, 0,5% de glicerina, 10 nM de sustrato de ADN rotulado dos veces con fluorescencia. Según los métodos mencionados en el documento DE 19757740, se determina la actividad de la endonucleasa específicamente por medio de la adición de sustratos de ADN marcos dos veces con fluorescencia.

Como sustrato de ADN para la detección de la reacción endonucleolítica, se usan según los procedimientos descritos por Winkler T. *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 (1999) 1375-1376), oligonucleótidos marcados con colorante fluorescente. Los sustratos utilizados se representan a continuación:

Oligonucleótido I

Cy5-ATGGCTAATG ACCGAGAATA GGGATCCGAA TTCAATATTG GTACCTACGG

GCTTTGCGCT CGTATC

Oligonucleótido II

RhG-GATACGAGCG CAAAGCCCGT AGGTACCAAT ATTGAATTCTG GATCCCTATT

CTCGGTCATT AGCCAT

Cy5 (Amersham Biosciences Europe GmbH, Friburgo) y RhG (Rhodamine Green de Molecular Probes Inc., Oregon, Estados Unidos) son colorantes fluorescentes típicamente utilizados. Las nucleobases se abrevian según la nomenclatura conocida por el especialista con las letras A, C, G, T. Los dos oligonucleótidos I y II se pueden condensar después de la desnaturalización térmica en una cadena doble, que lleva ambos colorantes fluorescentes, así como la secuencia de corte específica de la endonucleasa EcoRI. La interfase de la endonucleasa específica de secuencia EcoRI se representa subrayada.

La adición del fluido de ensayo (503 ó 603) eleva la velocidad media del fluido a 3,3 cm h⁻¹. Después de un tiempo de incubación de 1 h, cada compartimiento de genotipo pasa por el área de incubación II (510) de 3,3 cm de longitud hacia el elemento de detección (505 ó 605). La actividad de endonucleasa se detecta de acuerdo con los procedimientos de espectroscopia fluorescente descrita por T. Winkler *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 1375-1378 (1999)). Estos procedimientos también se pueden utilizar en microestructuras, tal como se pudo indicar en la disertación de K. Dörre antes citada. En el elemento de selección (504) se produce luego, por control de los elementos de válvula (624 y 625), la selección de compartimientos de genotipos de evaluación positiva.

Los compartimientos de evaluación positiva se guían así por apertura del elemento de válvula 625 hacia el reservorio 512, mientras que los compartimientos de evaluación negativa, se guían por apertura del elemento de válvula 624 hacia el reservorio 513.

Una vez terminado el proceso de selección, se pueden transportar en el canal de unión entre la estructura de selección 504 y el reservorio 512 los compartimientos del genotipo restantes cerrando permanentemente los elementos

ES 2 310 207 T3

de válvula 622, 623 y 624, así como abriendo permanentemente los elementos de válvula 621 y 625, hacia el reservorio 512.

5 La mezcla de todos los compartimientos del genotipo de evaluación positiva se extrae después de disolver la unión entre la microestructura 630 y la estructura de soporte 633 del compartimiento 512. Como el volumen total del compartimiento de genotipo que se halla en el reservorio 512 es escaso, se pipetea para extraer los genotipos un volumen adicional de 10 ul de tampón (tampón de Tris-EDTA, 50 mM de Tris(hidroximetil)-aminometano (Merck KG, Art. N.º 1.08382.2500), 10 mM de Titriplex III (Merck KG, Art. N.º 1.08418.1000), pH 7,0) de forma manual sobre la base del reservorio 512. Por múltiple toma y suministro del volumen, se pueden extraer los compartimientos del genotipo en el volumen del tampón. El volumen del tampón se extrae del compartimiento, eventualmente los
10 residuos convertidos de fluido de separación y fluido de acoplamiento se pueden separar por centrifugación y por extracción de la fase acuosa.

De acuerdo con métodos conocidos por el especialista (métodos de reacción en cadena de polimerasa PCR), se
15 multiplican los genotipos que se hallan en el volumen del tampón, de modo que son accesibles de las siguientes manipulaciones biomoleculares y eventualmente el suministro repetido en un ciclo de expresión y selección.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la selección acelular de variantes genotípicas de bibliotecas de genotipos en una microestructura, que comprende la siguiente secuencia de etapas de reacción:

- (a) reunión de un fluido de ensayo, que comprende una biblioteca de genotipos en una forma expresable y auxiliares de expresión apropiados para la expresión acelular, y de un fluido de separación en la microestructura, de modo que se generan compartimientos individuales del fluido de ensayo;
- (b) transporte de los compartimientos a través de la microestructura, con lo cual se produce la expresión del genotipo en el fenotipo en los compartimientos,
- (c) detección del fenotipo en los compartimientos y
- (d) selección de los compartimientos según sus fenotipos.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en la que después de la etapa (b) se añade un fluido de ensayo con reactivos que son apropiados para la detección del fenotipo a los compartimientos.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que

- el fluido de ensayo y los auxiliares de expresión apropiados para la expresión acelular están seleccionados de soluciones y suspensiones acuosas de composiciones complejas, con preferencia un extracto celular apropiado para la expresión de proteínas *in vitro*, y/o
- el fluido de ensayo es un fluido no miscible con agua y está seleccionado en especial de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, alcoholes superiores, alcanos superiores, ésteres y éteres y hidrocarburos superiores, hidrocarburos halogenados y siliconas y mezclas de estas sustancias y/o
- la velocidad de transporte de los compartimientos en la microestructura es 1×10^{-7} a 1×10^{-2} m/s, con preferencia 1×10^{-6} a 1×10^{-4} m/s.

4. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, en las que la concentración de la biblioteca de genotipos y la reunión de fluido de ensayo y fluido de separación se selecciona de forma tal que en un promedio estadístico está contenida sólo una variante genotípica por compartimiento, y/o en las que el volumen del compartimiento es de 0,01 fl a 10 pl, con preferencia de 0,1 fl a 1 pl, con preferencia especial de 1 a 100 fl.

5. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 2 a 4, en las que el fluido de ensayo es miscible con el fluido de ensayo y es inmisible con el fluido de separación, está seleccionado en especial de soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas, y el momento de la adición se selecciona de modo tal que ya se ha formado una cantidad suficiente de producto génico para la detección.

6. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 5, en las que

- los reactivos de ensayo son específicos para la función por seleccionar y son en especial aquellos que son apropiados para analizar la función por seleccionar con procedimientos de medición ópticos, en especial fluorimétricos y/o
- la detección del fenotipo en los compartimientos comprende la determinación cualitativa y/o cuantitativa de las propiedades fenotípicas, y se realiza en especial por medio de procedimientos ópticos, con preferencia especial por medio de procedimientos fluorimétricos.

7. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, en las que el fenotipo es actividad endonucleolítica.

8. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 7, en las que la selección de los compartimientos se realiza por clasificación y/o el procedimiento comprende también la etapa de reacción

- (e) aislamiento del genotipo de los compartimientos clasificados, con la formación de una nueva biblioteca de genotipos.

9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la biblioteca de genotipos obtenida se somete a uno o varios otros ciclos de reacción (a) a (d).

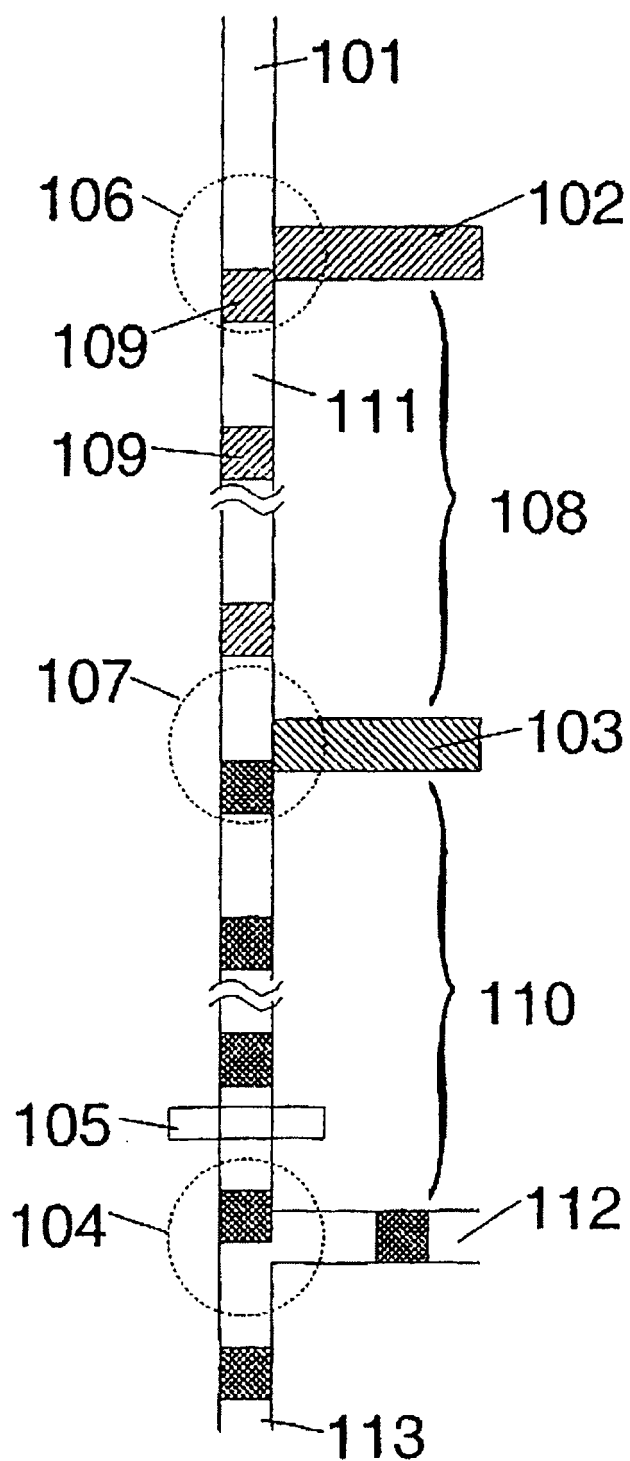


Fig. 1

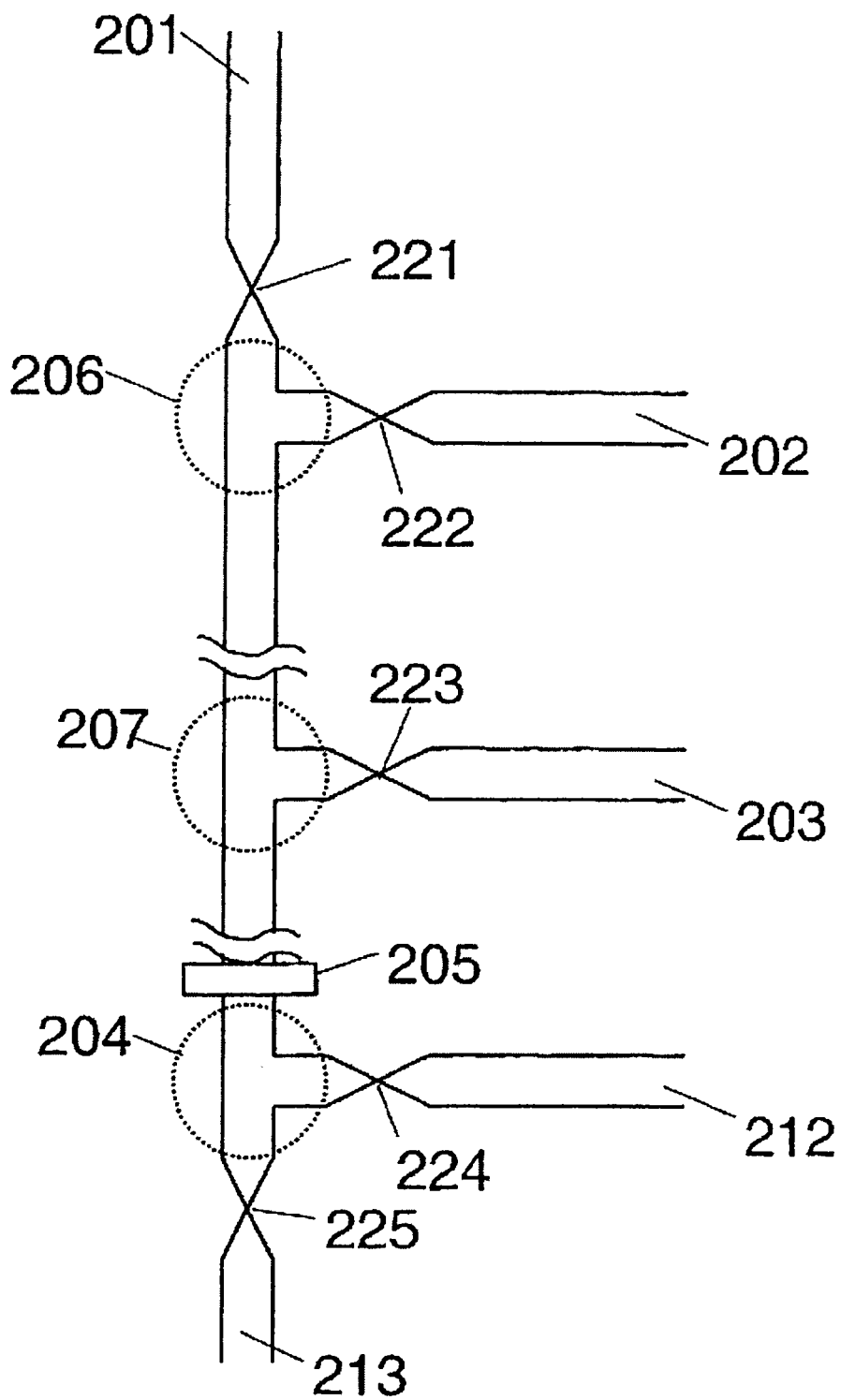


Fig. 2

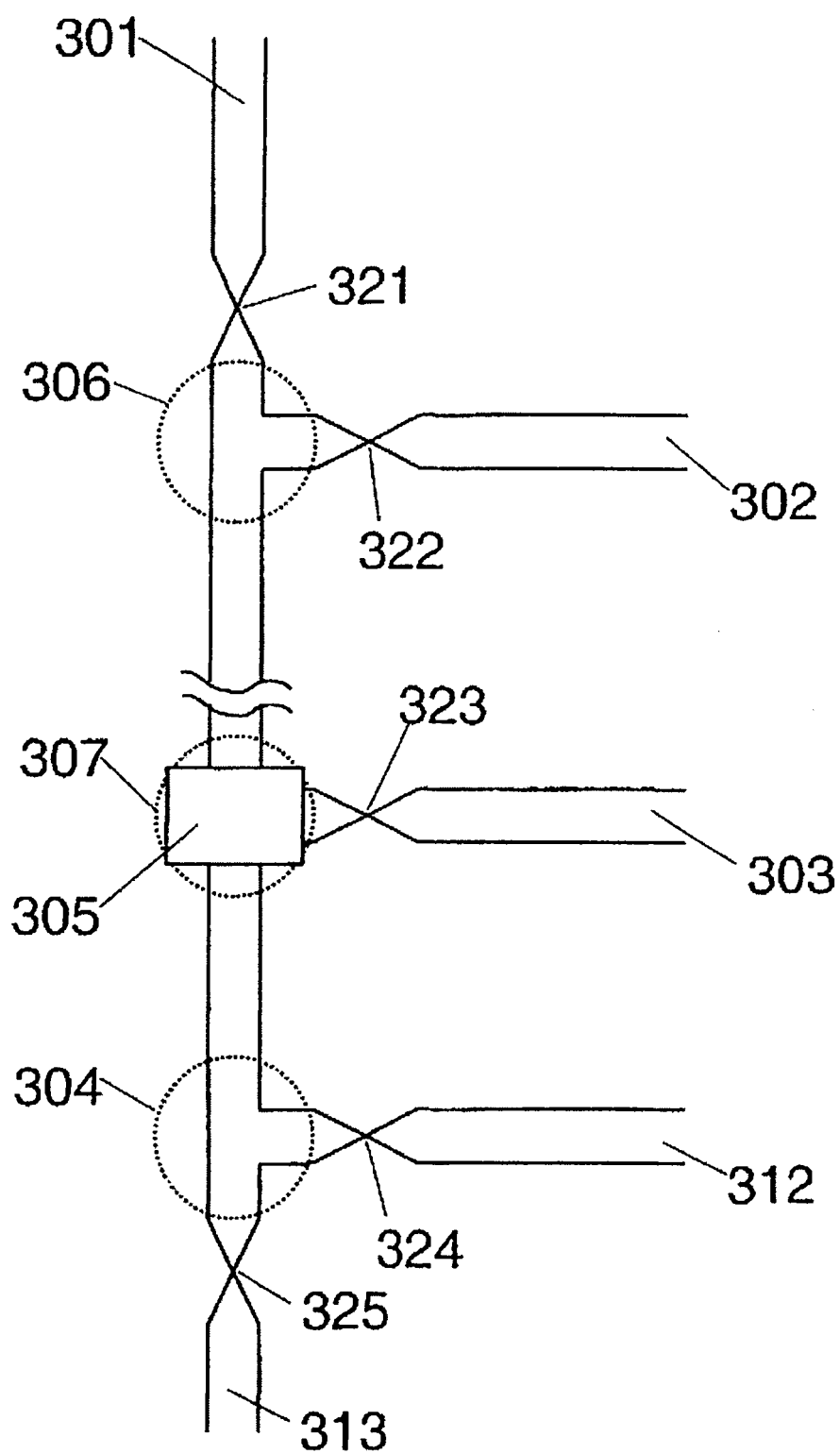


Fig. 3

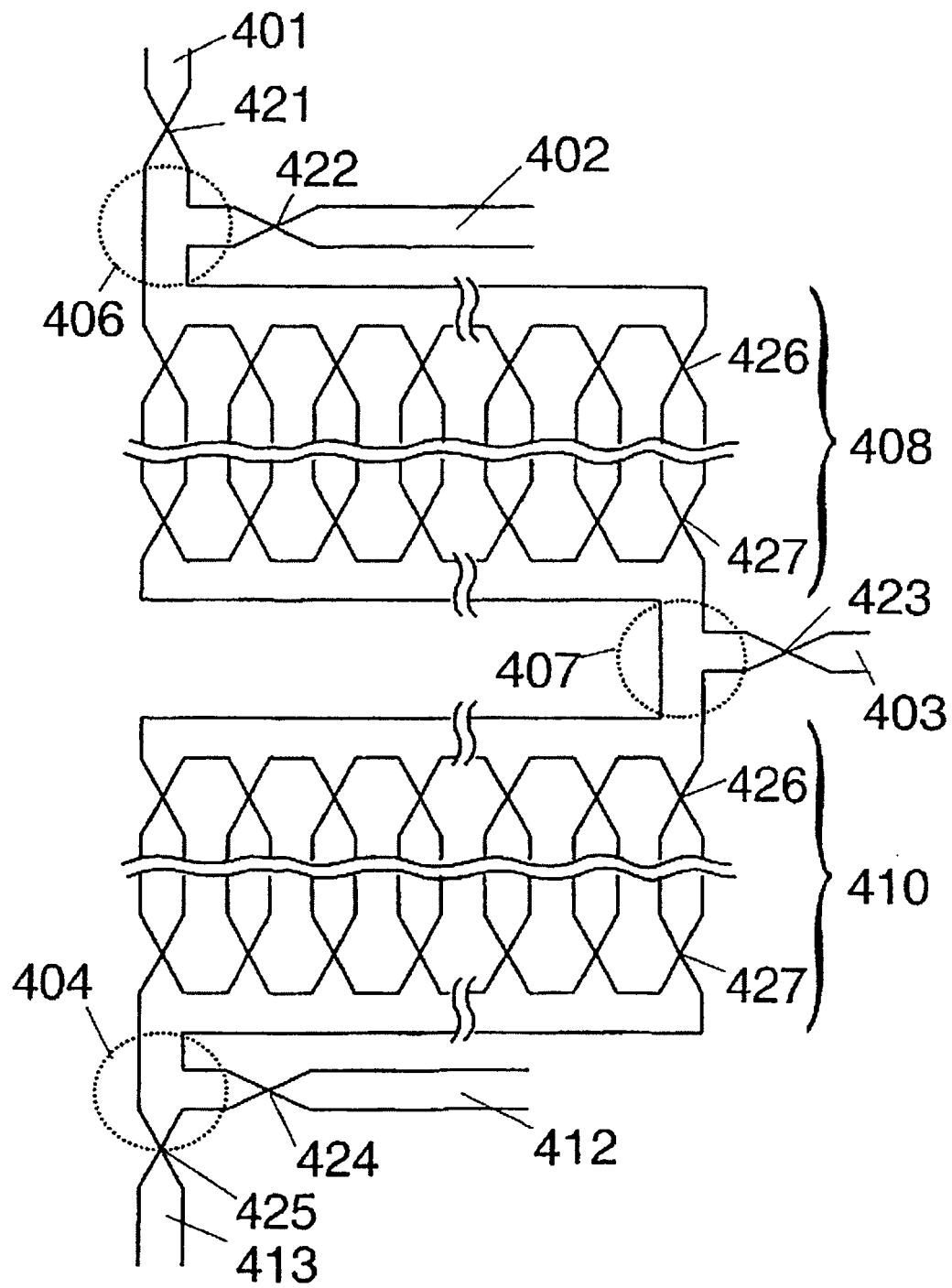


Fig. 4

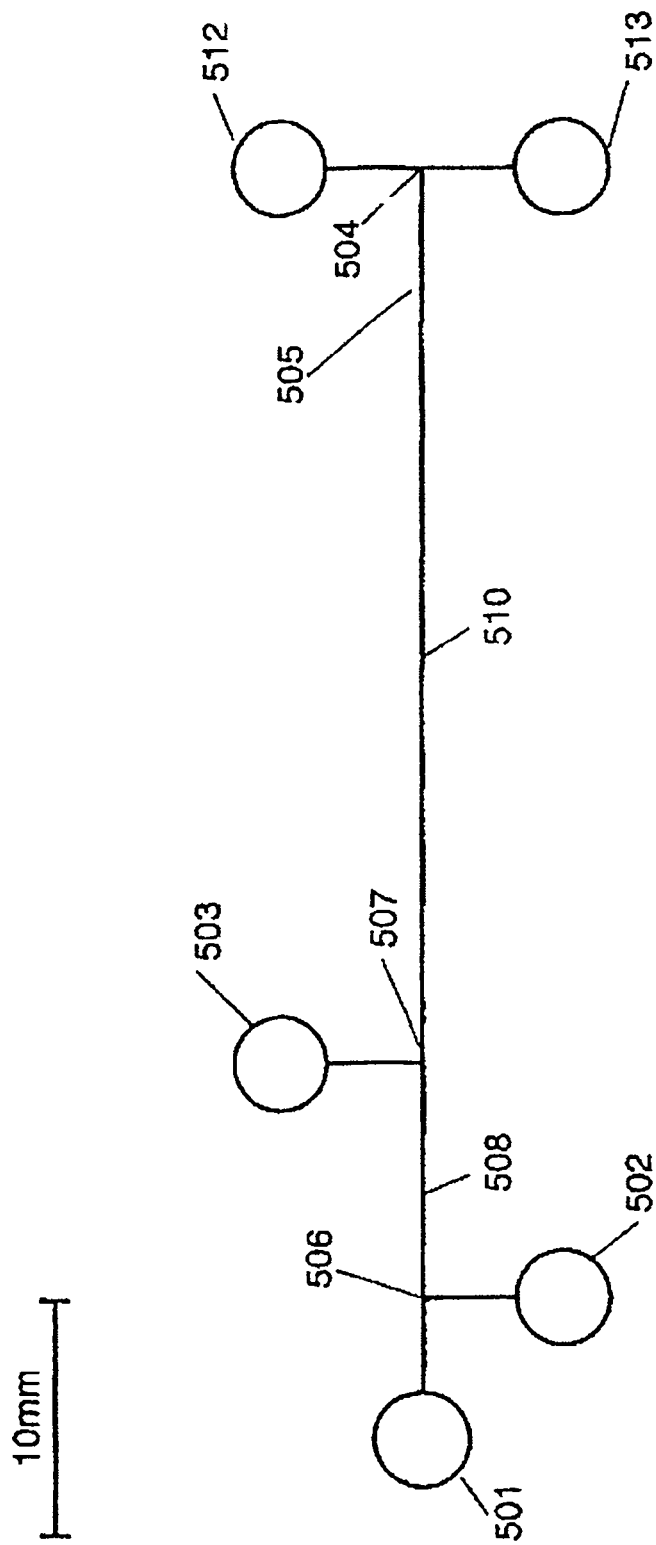


Fig. 5

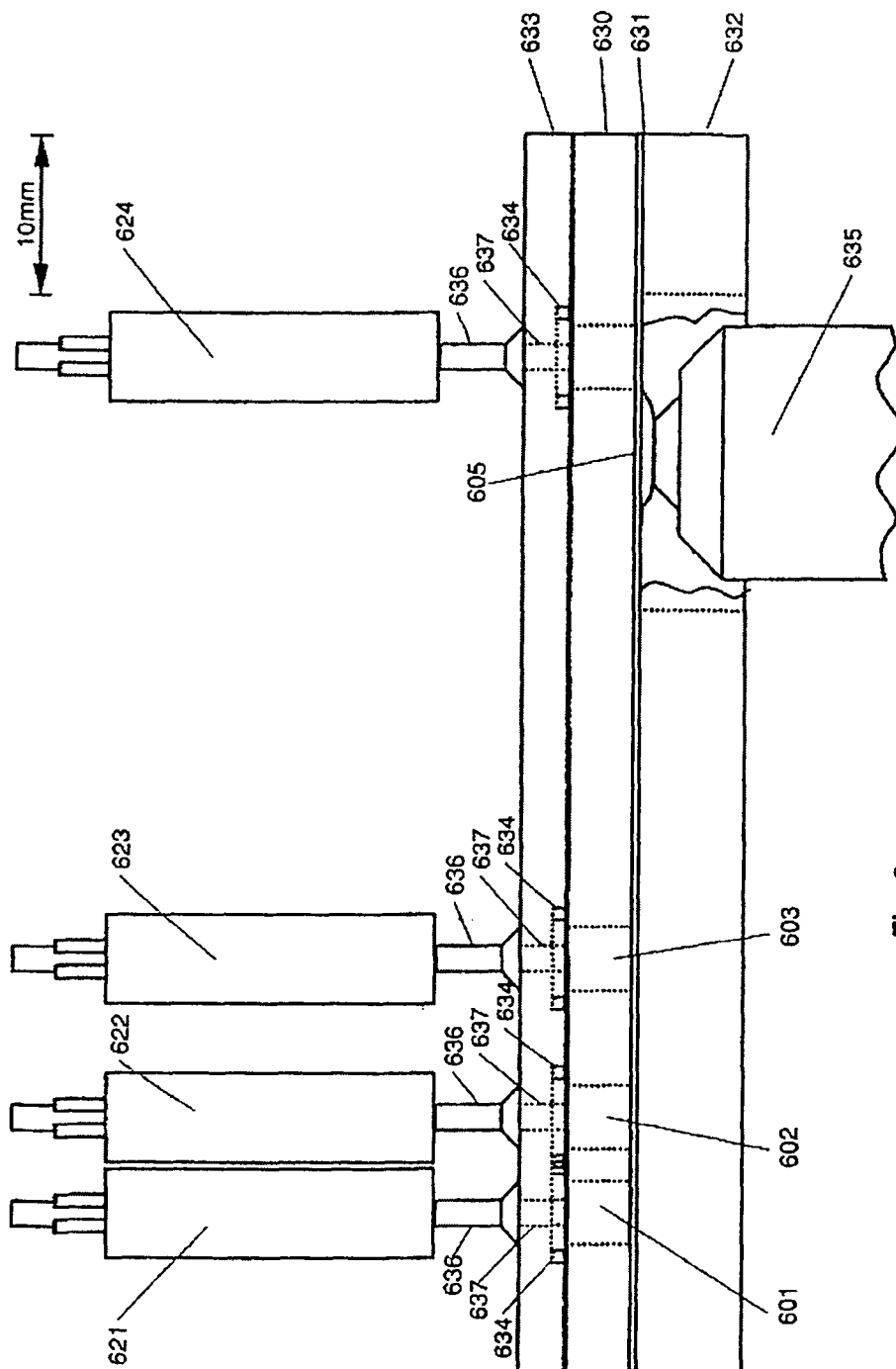


Fig. 6

ES 2 310 207 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> DIREVO Biotech AG

5 <120> Microestructuras y su uso para la evolución dirigida de biomoléculas

<130> 021342wo/JH/ml

10 <140>

<141>

<160> 2

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 66

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 1

30 **atggcta**atg **accgaga**ata **gggatcc**gaa **ttcaat**attg **gtacct**acgg **gctttgc**gt 60
 cgtatc 66

<210> 2

<211> 66

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 2

45 **gatacgag**cg **caaagccc**gt **aggtacca**at **attgaatt**cg **gatccct**att **ctcggtc**att 60
 agccat 66

50

55

60

65