

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 221**

51 Int. Cl.:

B01J 19/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.04.2022** **PCT/EP2022/060239**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2022** **WO22223516**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2022** **E 22723995 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2024** **EP 4243976**

54 Título: **Procedimiento para producir matrices complejas**

30 Prioridad:

19.04.2021 DE 102021109811

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:

25.11.2024

73 Titular/es:

**BIOCOPY GMBH (100.0%)
Elzstrasse 27
79312 Emmendingen, DE**

72 Inventor/es:

**KRÄMER, STEFAN DANIEL;
ROTH, GÜNTER y
WÖHRLE, JOHANNES**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 989 221 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

Procedimiento para producir matrices complejas

5 Estado de la Técnica

En biología, los complejos se pueden componer de diferentes componentes. En este caso, se trata la mayoría de las veces de combinaciones de al menos dos moléculas que interactúan entre sí de forma no covalente. En este caso, el complejo molecular presenta, por norma general, una función modificada en comparación con las moléculas individuales. Ejemplos típicos son, p. ej., los complejos proteína-proteína o los complejos ARN-proteína o también los complejos ADN-proteína. Ejemplos son los ribosomas o también los nucleosomas. Por ejemplo, las moléculas MHC/HLA forman complejos con diferentes péptidos. Habitualmente, se incorporan de 8 a 11 péptidos, con lo que estabiliza el complejo. El complejo se presenta en una célula y puede tener lugar una unión con un receptor de células T.

El análisis o ensayo de diferentes complejos puede resultar relevante para muchas cuestiones. Por lo tanto, son de interés las micromatrices que contienen complejos de este tipo.

Por micromatrices se entiende una colección de muchos puntos (manchas) pequeños y diferentes con moléculas sobre un sustrato sólido. En el caso de la producción de micromatrices se distingue fundamentalmente entre 4 tipos diferentes de producción:

1. Micromatrices manchadas

a. Detector de micromatrices [1]

2. Micromatrices sintetizadas in situ

a. Síntesis puntual; impresión por inyección de tinta [2]

b. Fotolitografía mediante fotomáscaras [3]

c. Fotolitografía mediante microespejos [4]

3. Síntesis mediante ADN polimerasa

Un método relativamente novedoso para producir micromatrices de ADN consiste en sintetizar el ADN en la superficie mediante una polimerasa con ayuda de un molde de ADN (documento WO2009034181A2_stellacci, documento WO2010100265A1_roth). En este caso, se dota a una superficie sólida de los llamados cebadores (puntos de partida de la síntesis de la ADN polimerasa). A continuación se coloca sobre esta superficie una mezcla compuesta por los componentes individuales de la síntesis, la ADN polimerasa y el molde. La síntesis discurre en este caso de forma muy paralela hasta en varios miles de puntos. El espacio de reacción de cada uno de estos puntos se separó físicamente entre sí para garantizar una reacción de síntesis independiente. Esto puede representar una separación en el espacio mediante microcavidades hasta una limitación de la difusión.

4. Síntesis mediante mezcla de traducción in vitro

Una micromatriz de ADN se puede transcribir a una micromatriz de proteínas traduciendo primero el ADN expresable en ARN y luego traduciendo el ARN en proteínas con ayuda de una mezcla de expresión libre de células. Este principio ya se ha demostrado en una pluralidad de aplicaciones y realizaciones diferentes, pero en esencia siempre se basan en la expresión de proteínas libre de células. Solo se diferencian la implementación técnica y la captura de las proteínas en la superficie [5, 16]. En cada una de las aplicaciones descritas, el objetivo es crear una micromatriz de proteínas con manchas de proteínas monoclonales lo más puras posibles.

Las diferencias fundamentales en los métodos de fabricación consisten en que las moléculas se producen por adelantado en el primer método 1 mencionado y durante la producción de las micromatrices en el caso de los otros métodos.

También existen enfoques y métodos cuyo propósito es replicar micromatrices existentes. Ejemplos de ello son:

5. La reproducción de micromatrices de ADN mediante hibridación [6-10]

6. La reproducción de micromatrices de ADN mediante hibridación y extensión mediante ADN polimerasa [11-13]

7. Reproducción mediante un chip de cavidad maestra y una subsiguiente PCR [14, 15]

El objetivo de todos los métodos arriba descritos para producir micromatrices es crear puntos de la molécula objetivo que sean lo más monoclonales posible. La molécula objetivo ya no forma en este caso interacciones con otras moléculas. En el caso de todos los métodos de síntesis conocidos se requiere la interacción de las más diversas moléculas para sintetizar la molécula objetivo (componentes de síntesis, ADN, ARN, proteínas). En la mayoría de los casos, estas moléculas ya no están presentes en la micromatriz final obtenida. Si es así, éstas solo deberían considerarse accesorios y ya no tendrían interacción relevante alguna con las moléculas objetivo. Esto significa que estos métodos son muy adecuados para crear micromatrices con moléculas objetivo que sean lo más puras posible.

Sin embargo, en la naturaleza sucede a menudo que determinadas moléculas primero deben ser activadas por otras o deben formar los llamados complejos con otras moléculas para alcanzar un estado activado. Las micromatrices que contienen moléculas activadas de esta manera no pueden producirse con el estado actual de la técnica o solo pueden producirse mediante rodeos complejos.

En biología y la industria, los robots de pipeteo se utilizan a menudo para introducir moléculas en las denominadas cámaras de reacción (de micro a macro). Clásicamente se utilizan placas de microtitulación con 6, 12, 24, 48, 96, 384, 1536 o 3456 cámaras de reacción (pocillos). Esto es especialmente necesario cuando el número de muestras a analizar es muy elevado. Aquí es habitual y estado conocido de la técnica que las moléculas se mezclen en cámaras de reacción de este tipo para llevar a cabo una pluralidad de ensayos biológicos tales como, p. ej., ELISA, ensayos de actividad, ensayos enzimáticos y muchos más. De esta manera también se pueden generar y medir complejos moleculares en un procedimiento de alto rendimiento.

Sin embargo, es una práctica habitual medir las distintas reacciones por separado. Es posible crear complejos de moléculas en las cámaras de reacción y luego imprimirlos en una superficie mediante la fabricación clásica de micromatrices. Este tipo de producción requiere mucho tiempo y es caro. Además, se demuestra que moléculas particularmente complejas, tales como receptores o enzimas, se dañan debido al largo proceso de transferencia y se vuelven parcial o completamente inactivas o muestran un comportamiento artificial. En general, se intenta añadir las moléculas más complejas lo más tarde posible o, preferiblemente, lavarlas en solución sobre una matriz terminada. Por lo tanto, existen muchas más matrices de antígenos (ya que son menos complejas) que matrices de anticuerpos (ya que son más complejas) para medir una interacción antígeno-anticuerpo.

El documento US8105845B2 pertenece al estado conocido de la técnica y describe un método para producir y medir una matriz con complejos. El método es relativamente complicado y utiliza un sistema de canales. Una superficie se recubre con una molécula a través de 6 canales. Luego se gira la configuración 90 grados y tiene lugar un segundo recubrimiento a través de los mismos canales que conduce a la formación compleja de las moléculas. Luego se puede enviar un analito a través de los canales para medir la interacción entre el analito y el complejo en la superficie. Con ayuda de esta configuración se pueden medir potencialmente 36 complejos moleculares en la superficie.

Las publicaciones US 8211382 B2 y US 9682396 B2 pertenecen al estado conocido de la técnica y describen el denominado método de impresión por flujo. En este método, se presiona un cabezal de impresión sobre una superficie para crear muchos canales de microfluidos pequeños y cerrados. A continuación, las moléculas se introducen a través de estos canales para ponerlas en contacto específico con la superficie. El número de canales en el cabezal de impresión representa también una limitación en el caso de este sistema.

Un método de producción de micromatrices conocido por el estado conocido de la técnica tiene lugar a través de la transferencia simultánea de moléculas desde un chip de cavidad con muchas cámaras de reacción pequeñas a una superficie. Un procedimiento de este tipo se da a conocer, por ejemplo, en el documento WO 2010100265 A1. Aquí las moléculas se disponen en un sistema portador (p. ej., un chip de cavidad) y se multiplican en los espacios de reacción. Las moléculas o los derivados formados son luego capturados en una superficie de captura. En este contexto no se describe ni se planifica la creación de complejos. Además, un componente esencial del método es una etapa de amplificación.

El documento WO 2013174942 A1 pertenece asimismo al estado conocido de la técnica y describe cómo se puede producir otra molécula a partir de una molécula de molde dentro de un sistema portador (p. ej., un chip de cavidad) para luego capturar el producto en una superficie de captura. El objetivo es crear en este caso una micromatriz que sea lo más pura posible y se componga de puntos puros monoclonales. No se consideró una mezcla específica de dos tipos de moléculas con el objetivo de formar complejos.

El documento WO 2013 045700 A1 también pertenece al estado conocido de la técnica y describe cómo se puede generar otra molécula a partir de exactamente una molécula de molde que está presente en una cavidad. Para ello se rellena una mezcla de amplificación. A continuación, el producto obtenido se captura sobre una superficie de captura. Mediante el método se debe generar una micromatriz que sea lo más pura posible que se componga de puntos puros monoclonales. En el método descrito es necesario amplificar las moléculas y no está prevista una mezcla

específica de moléculas. Por lo tanto, con este método no es posible generar una micromatriz de complejos moleculares.

5 El documento WO 2013186359 A1 pertenece al estado conocido de la técnica y describe un procedimiento para analizar propiedades moleculares o condiciones de reacción, produciendo en primer lugar una matriz con puntos moleculares monoclonales. En este caso, se producen y transfieren las moléculas del producto. La formación de complejos no está incluida en el espectro de reacción previsto.

10 El documento DE 102018122546 B3 también pertenece al estado conocido de la técnica. Esta publicación describe los posibles usos de una matriz compleja de MHC, pasando a emplearse MHCs especialmente estabilizados. La medición tiene lugar mediante BLI (siglas inglesas de interferometría de biocapa). Sin embargo, no se da a conocer la producción de la matriz.

15 Por lo tanto, actualmente no existe un método en el estado conocido de la técnica con el que se pueda producir una micromatriz con complejos moleculares de forma sencilla y económica.

Descripción de la invención

20 Por lo tanto, el cometido de la invención era proporcionar un procedimiento para producir una matriz compleja molecular que supere las desventajas de la técnica anterior y, de esta forma, esté en condiciones de proporcionar diferentes matrices para análisis de una manera sencilla, rentable y rápida. El problema se resuelve mediante las reivindicaciones independientes. Formas de realización especialmente ventajosas se encuentran en las reivindicaciones dependientes.

25 En una primera forma de realización preferida, la invención se refiere a un procedimiento para la producción in situ de una micromatriz de complejo molecular que comprende las siguientes etapas:

- proporcionar una primera superficie que comprende varias zonas efectivas separadas,
- 30 - disponer las primeras moléculas en varias zonas efectivas,
- añadir una segunda molécula a cada una de las zonas efectivas con la primera molécula dispuesta
- cerrar las zonas efectivas con una segunda superficie,
- 35 - formar complejos entre las moléculas,
- inmovilizar el complejo formado en una superficie de captura.

40 De manera particularmente preferida, el procedimiento para la producción in situ de una micromatriz de complejo molecular comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar una primera superficie que comprende varias zonas efectivas separadas,
- 45 b) disponer primeras moléculas en varias zonas efectivas,
- c) fijar las moléculas presentadas en la superficie,
- d) añadir una segunda molécula a cada una de las zonas efectivas con la primera molécula dispuesta,
- 50 e) cerrar las zonas efectivas con una segunda superficie,
- f) formar complejos entre las moléculas,
- 55 g) inmovilizar el complejo formado sobre una superficie de captura, preferiblemente la superficie de e).

60 Por consiguiente, en el método según la invención los complejos moleculares formados se pueden transferir simultáneamente a la superficie de captura, sin tener que sacarlos individualmente de las cámaras de reacción (por medio de microfluidos o mediante un medio portador) y sin tener que transferirlos a la superficie final. Esto representa un alivio considerable en comparación con los métodos del estado conocido de la técnica y conduce a ahorros de tiempo y costes, así como a resultados muy precisos.

65 Por consiguiente, un aspecto esencial de la invención estriba en que las moléculas que deben formar el complejo o que deben ser examinadas en cuanto a sus propiedades de formación de complejos no se premezclan. Es decir, no se detecta complejo alguno en una matriz, sino que la formación de complejos solo tiene lugar en la superficie. Esto tiene la ventaja de que no es necesario crear premezclas, lo cual llevaría mucho tiempo y requeriría tanto una cantidad

relativamente grande de material como de recursos. Ante todo en el caso de una pluralidad de combinaciones posibles, los métodos del estado conocido de la técnica alcanzan rápidamente sus límites. Si en una matriz deben estar contenidos un gran número de complejos diferentes, se tendría que preparar una gran cantidad de premezclas, lo que ya no es necesario con el método según la invención. Por el contrario, el método según la invención es claramente más rápido y consume menos materiales, recursos y tiempo de personal.

En el caso de un complejo, dos o más moléculas entran típicamente en una interacción no covalente. En este caso, en el sentido de la invención se prefiere que el complejo resultante cumpla un cometido y/o funciones que las moléculas individuales por sí mismas no serían capaces de realizar.

En este caso, se pueden utilizar diferentes primeras moléculas sobre una superficie. Si no se utiliza solo un tipo de primeras moléculas sobre una superficie, éstas pueden estar presentes por separado en zonas eficaces individuales, de modo que en cada zona efectiva solo se presente un tipo de moléculas. Sin embargo, también es posible que se dispongan varios tipos de primeras moléculas dentro de un intervalo eficaz. También es posible disponer los diferentes tipos de primeras moléculas uno tras otro.

Si se deposita más de un tipo de primeras moléculas en una zona eficiente, es posible que pase a emplearse más de un tipo de primeras moléculas en el complejo formado. Se prefiere que el método según la invención no contenga una etapa de amplificación y/o que las primeras moléculas no se sometan a derivatización alguna. Por lo tanto, no es necesario proporcionar una mezcla de reacción.

Con el procedimiento según la invención es posible facilitar y acelerar claramente la producción de una micromatriz compleja.

En este caso, se prefiere que la superficie de captura sea la segunda superficie. Con ello es posible que los complejos se acumulen ya durante la formación del complejo. El procedimiento es particularmente adecuado si pasa a emplearse la misma segunda molécula en toda la matriz.

La segunda superficie también puede ser una micromatriz propiamente dicha, que contiene, p. ej., las segundas moléculas.

En el caso de las zonas efectivas se trata preferentemente de cavidades y/o manchas. Es importante que las zonas efectivas de la primera superficie estén separadas entre sí y que las moléculas no puedan mezclarse.

Las superficies pueden estar hechas de diferentes materiales, p. ej.: vidrio o PDMS.

Preferiblemente, la primera superficie, la segunda superficie y/o la superficie de captura tienen las siguientes dimensiones: 5 mm - 75 mm × 3 mm - 25 mm, de forma especialmente preferente 10 mm - 25 mm × 10 mm - 25 mm, de forma muy especialmente preferente 15 mm × 15 mm.

El número de zonas efectivas por superficie asciende preferentemente a 50 - 20.000, de forma especialmente preferente a 300 - 10.000.

Las zonas efectivas pueden tener tamaños completamente diferentes. Se trata preferentemente de zonas redondas, aunque también son posibles otras formas. El diámetro de las distintas zonas efectivas asciende preferentemente a 50 µm a 1000 µm, de forma especialmente preferente a 100 µm a 700 µm, de forma muy especialmente preferente a 15 µm a 500 µm. La distancia entre las zonas efectivas también puede variar. Se prefieren distancias entre 10 µm y 200 µm, de manera especialmente preferida entre 20 µm y 100 µm, de manera muy particularmente preferida 50 µm.

Si las zonas efectivas son cavidades, éstas tienen un volumen preferido de 500 pl a 100 nl, de manera especialmente preferida de 350 pl a 30 nl, de manera muy particularmente preferida de 500 pl a 5 nl.

La profundidad de las cavidades es preferentemente de 5 µm a 100 µm, de forma especialmente preferente de 10 µm a 50 µm, de manera muy especialmente preferente de 30 µm.

Formas de realización específicas presentan, por ejemplo, las siguientes dimensiones:

- 4.104 (54×76) zonas efectivas en una superficie de 16 mm × 10 mm con un diámetro de zona efectiva de 150 µm y una distancia de 50 µm entre las zonas efectivas. Si se trata de cavidades, éstas son de 30 µm de profundidad y presentan un volumen de 530 pl.

- 1.188 (27×44) zonas efectivas en una superficie de 16 mm × 10 mm con un diámetro de zona efectiva de 300 µm y una distancia de 50 µm entre las zonas efectivas. Si se trata de cavidades, éstas son de 30 µm de profundidad y presentan un volumen de 2,12 nl.

- o 476 (28×17) zonas efectivas en una superficie de 16 mm × 10 mm con un diámetro de zona efectiva de 500 µm y una distancia de 50 µm entre las zonas efectivas. Si se trata de cavidades, éstas son de 30 µm de profundidad y presentan un volumen de 5,8 nl.

5 La invención no se limita en modo alguno a estas formas de realización. En principio son concebibles todas las dimensiones, números, formas y disposiciones posibles de superficies y zonas efectivas. También es posible utilizar chips comunes, p. ej., aquellos con 1188 cavidades.

10 Además, se prefiere que las moléculas depositadas en la etapa c) se fijen a la superficie a lo largo de un día de inmovilización, mediante adsorción, mediante interacción iónica, mediante fuerzas de van der Waals y/o mediante secado.

Si se utiliza una etiqueta de inmovilización, no necesariamente tiene que unirse covalentemente a la superficie. También es posible una conexión a través de, p. ej., interacciones intermoleculares.

15 Por lo tanto, puede preferirse que las primeras moléculas incluyan etiquetas de inmovilización.

Se prefiere que las superficies con las moléculas tengan una larga vida útil después de esta etapa, lo que constituye una ventaja decisiva de este procedimiento. La durabilidad también depende en este caso de las moléculas empleadas. Se prefiere especialmente que las superficies así producidas puedan almacenarse durante cualquier período de tiempo. Dependiendo de la molécula, pueden transcurrir fácilmente varias semanas o meses entre la etapa c) y la etapa d). Lo mejor es almacenar las superficies secas y por debajo de la temperatura ambiente, preferiblemente por debajo de 10 °C, de manera particularmente preferible a 4 °C.

25 Es frecuente el caso de que los complejos se compongan en un participante en el complejo estable y otra inestable. Por lo tanto, la invención es especialmente ventajosa porque es posible predisponer el participante en el complejo estable como primera molécula (p. ej., un péptido) y almacenarlo de esta manera durante un largo período de tiempo. Luego, el participante en el complejo menos estable se añade como una segunda molécula (p. ej., un MHC) poco antes de un análisis o examen planificado.

30 Los complejos también se pueden emplear como primera o segunda molécula. Éstas forman entonces un nuevo complejo con la primera o bien la segunda molécula, que luego se captura en la superficie como un complejo en el sentido de la invención. Por lo tanto, no se trata solo de unir complejos a una superficie, sino más bien de permitir específicamente que se formen complejos y luego interceptarlos.

35 Se prefiere que

- las segundas moléculas se añadan a las primeras moléculas o en donde

40 • las segundas moléculas estén presentes en la segunda superficie y el contacto entre las zonas efectivas que comprenden las primeras moléculas y las segundas moléculas se establezca a través de un puente líquido.

45 La adición de las segundas moléculas se puede realizar de diferentes formas. Es importante que en la medida de lo posible no quede aire en las zonas efectivas entre las dos superficies, ya que esto puede dificultar la captura de las moléculas en la superficie de captura. Además, si es posible, no debe tener lugar una contaminación cruzada y las zonas efectivas deben mantenerse separadas. Esto es especialmente importante cuando se trabaja con diferentes primeras moléculas en una superficie.

50 Se prefiere que las segundas moléculas incluyan etiquetas de inmovilización. En este caso, son posibles las mismas etiquetas de inmovilización que en el caso de las primeras moléculas.

Es posible que las segundas moléculas se apliquen a la superficie en una gran gota. Este modo de proceder tiene la ventaja de que las distintas zonas efectivas se pueden llenar casi sin aire. Sin embargo, dependiendo del nivel de llenado, al colocar la segunda superficie pueden eliminarse moléculas, por lo que este método no es adecuado para todas las aplicaciones o bien se debe trabajar con especial precisión.

60 Otro método lo representa el llenado con pequeñas gotitas. Esto se puede hacer, p. ej., con una impresora. En este caso, las segundas moléculas se aplican en pequeñas gotitas en las zonas efectivas. Si se utilizan cavidades como zonas efectivas, puede ser ventajoso elegir que el volumen de las gotitas sea mayor que el volumen de las cavidades para excluir tantas burbujas de aire como sea posible. Sin embargo, llenar en exceso las zonas efectivas puede provocar contaminación cruzada, ya que las moléculas pueden penetrar en las zonas efectivas vecinas.

65 Sin embargo, se ha demostrado que es especialmente preferente utilizar pequeñas gotitas, cuyo volumen sea menor que el de las zonas efectivas. El exceso de aire se puede eliminar, p. ej., después de colocar la segunda superficie, preferiblemente aplicando una sobrepresión. Este modo de proceder tiene la ventaja de que no estén presentes

burbujas de aire y que no se produzca una contaminación cruzada. Con la tecnología de medición actual, este método proporcionó, por lo tanto, los mejores resultados.

Si las segundas moléculas están presentes sobre una segunda superficie, éstas pueden estar presentes en zonas efectivas separadas o de forma extensiva. Se prefiere que solo se utilice un tipo de segundas moléculas por matriz, especialmente si éstas se aplican de forma extensiva sobre la segunda superficie. Si la segunda superficie es una micromatriz o una matriz de cavidades, también pueden pasar a emplearse segundas moléculas diferentes, en cuyo caso las diferentes segundas moléculas se presentan separadas en el espacio por zonas efectivas, preferiblemente puntos o cavidades.

Por consiguiente, las zonas efectivas de la primera superficie se ponen en contacto con la segunda molécula. Esto puede ocurrir simultáneamente o zona efectiva por zona efectiva. Después o durante el llenado, las zonas efectivas se cierran con una superficie de captura, que luego puede atrapar específicamente el complejo molecular resultante.

La formación del complejo se realiza ventajosamente en las zonas efectivas cerradas. En este caso, se puede tratar, p. ej., de cavidades cerradas. Un puente líquido que se forma entre ambas superficies puede conducir también a zonas efectivas cerradas en el sentido de la invención.

Se prefiere que la formación del complejo se posibilite mediante la disolución de la fijación de las primeras moléculas. Dependiendo del tipo de fijación, esto se puede realizar de diferentes maneras, p. ej., escindiendo la etiqueta de inmovilización, rehidratación o disolviendo las interacciones intermoleculares. Un experto en la materia puede elegir el método adecuado sin tener que inventar nada por sí mismo. Dependiendo del día y de la unión, se pueden considerar diferentes métodos para separar la etiqueta de inmovilización. La separación puede realizarse mediante luz de diferentes longitudes de onda, p. ej., luz UV, escisión química, escisión enzimática, campos eléctricos, campos magnéticos o también escisión electroquímica.

Se prefiere, además, que la disposición de las primeras moléculas en las zonas efectivas de la primera superficie ocurra a través de uno de los siguientes métodos:

a. depósito de líquido en manchas que comprende las primeras moléculas,

b. sintetizar las primeras moléculas,

c. aplicar partículas que comprenden las primeras moléculas y/o

d. poner en contacto las zonas efectivas de la primera superficie con una micromatriz de ADN, que comprende manchas de ADN, codificando el ADN las primeras moléculas.

Se prefiere que las primeras moléculas se seleccionen del grupo que comprende proteínas, péptidos, ADN, ARN, moléculas pequeñas, células, preferiblemente proteínas asociadas a CRISPR y sus mutantes, ARNg, proteínas de la clase de los complejos mayores de histocompatibilidad y sus mutantes, proteínas de la clase de los anticuerpos, linfocitos T, linfocitos B. En este sentido, por lo tanto, las células también pueden denominarse moléculas. Cuando se emplean células como primeras moléculas, el participante en el complejo representa la mayoría de las veces una proteína de superficie u otra estructura molecular en la superficie de la célula, que en biología se denomina la mayoría de las veces receptor, interactuador, marcador o complejo de diversidad (CD). Como participantes en el complejo también pueden servir lípidos, fosfolípidos, residuos de azúcares u otras estructuras superficiales. Se prefiere particularmente que como primeras moléculas se empleen moléculas que sean lo suficientemente estables como para fijarse y almacenarse en la superficie. Por lo tanto, las primeras moléculas particularmente preferidas son proteínas, péptidos, ADN, ARN y moléculas pequeñas.

Se prefiere que las segundas moléculas se seleccionen del grupo que comprende proteínas, péptidos, ADN, ARN, moléculas pequeñas, células, preferiblemente proteínas asociadas a CRISPR y sus mutantes, ARNg, proteínas de la clase de los complejos mayores de histocompatibilidad y sus mutantes, proteínas de la clase de los anticuerpos, linfocitos T, linfocitos B. En este sentido, por lo tanto, las células también pueden denominarse moléculas. Cuando las células se emplean como segundas moléculas, el participante del complejo es la mayoría de las veces una proteína de superficie u otra estructura en la superficie de la célula.

Se prefiere que se formen complejos de proteína-proteína o bien de proteína-péptido. También se prefieren complejos, en los que un participante del complejo se encuentra sobre una superficie de la célula. Este puede ser el caso, p. ej., si se emplea una célula como primera o segunda molécula.

Un complejo de proteína-péptido preferido es, p. ej., un complejo de MHC-péptido. También son posibles los complejos de anticuerpo-antígeno.

También se forman preferentemente complejos de ARN-proteína. Por ejemplo, se pueden emplear ARNg y Cas9 en cada caso como primera o segunda molécula. De esta forma resulta un complejo de ARN-proteína, cuya función sería

cortar y/o unir específicamente el ADN. El ARNg procura la especificidad y Cas9 procura la actividad enzimática del proceso de corte.

Además, se prefieren los complejos de ADN-proteína.

5 La superficie de captura comprende preferiblemente moléculas de captura seleccionadas del grupo que comprende proteínas, péptidos, ADN, ARN, moléculas pequeñas, preferiblemente silanos, azúcares, etiquetas de inmovilización de proteínas.

10 En este caso es posible que las moléculas de captura capturen específicamente una primera molécula, una segunda molécula y/o el complejo formado. Un complejo formado puede presentar, p. ej., una estructura terciaria que no se encuentra en las distintas moléculas y que es reconocida específicamente por la molécula de captura, por ejemplo un anticuerpo.

15 En otra forma de realización preferida, la invención se refiere a un procedimiento descrito, en el que se analiza, mide y/o caracteriza la micromatriz del complejo molecular. En este caso, puede tratarse, p. ej., de una medición de interacciones o de una investigación de funciones del complejo. El análisis de la interacción puede referirse a la formación del complejo en sí o también a una interacción de salida con una o más moléculas adicionales.

20 Una aplicación importante del procedimiento según la invención lo representa la detección de MHC o HLA. La presentación de péptidos en la superficie celular mediante moléculas de MHC/HLA es un componente importante en la respuesta inmune contra infecciones o también células cancerosas. Terapias celulares adaptativas ofrecen nuevas vías efectivas para un tratamiento directo y personalizado de enfermedades. Por ejemplo, las células T del paciente pueden modificarse genéticamente con un receptor de células T específico (TCR), que puede reconocer de manera
25 establecida una determinada enfermedad cancerígena y, con ello, desencadenar una respuesta inmune para combatir de manera establecida el tumor del paciente. Otra posibilidad de lograr el mismo resultado consiste en administrar al paciente una molécula "bienespecífica de TCR" diseñada que induce el contacto entre un tipo de célula anormal y una célula T. En ambos enfoques terapéuticos se debe garantizar que el nuevo TCR administrado no interactúe con células sanas y desencadene con ello una reacción autoinmune.

30 Con el método arriba descrito es posible producir un ensayo de MHC o HLA que esté diseñado específicamente para detectar miles de combinaciones diferentes de péptidos de MHC o HLA. Estas combinaciones de péptidos de MHC o HLA son la clave para distinguir las células del propio cuerpo de las células extrañas o degeneradas. Además, son los sitios de unión de las moléculas de TCR. Antes de las terapias basadas en TCR, los TCRs deben examinarse con
35 un alto rendimiento para garantizar que solo se unan a la combinación especial de HLA-péptido que esté presente en la célula cancerosa y no a las que se encuentran en las células sanas. [17] Mediante la detección, se puede examinar, p. ej., la eficacia y especificidad de los candidatos a TCR.

40 Para llevar a cabo una detección de este tipo, se mezclan de forma establecida y separada miles de péptidos diferentes con la misma molécula de MHC o HLA. En este caso, habitualmente los péptidos son las primeras moléculas que se depositan. Sin embargo, también es posible que los MHCs/HLAs representen las primeras moléculas y los péptidos se añadan como segundas moléculas. Con ello se produce una formación del complejo de MHC/HLA y péptido. Luego, los distintos complejos formados se inmovilizan sobre una superficie de captura para generar una micromatriz. Luego, la micromatriz se pone en contacto con las moléculas de TCR a analizar. Estas pueden estar presentes
45 solubles como analito o también en una célula o partes de una célula. Finalmente, se pueden analizar las interacciones entre el TCR y los complejos de HLA-péptido.

Para el método según la invención no es necesario estabilizar especialmente los HLAs o MHCs. Las detecciones se pueden llevar a cabo tanto con moléculas de MHC/HLA nativas, modificadas, mutadas o estabilizadas. Esto también
50 es posible, entre otras cosas, porque la invención permite almacenar los participantes del complejo, estables y almacenables a largo plazo, en espacios separados. Los participantes menos estables solo se pueden añadir como segunda molécula inmediatamente antes de utilizar la matriz, de modo que todo el complejo se forme inmediatamente sin mostrar signo alguno de descomposición debido al almacenamiento.

55 Se prefiere, además, que la detección de MHC/HLA se lleve a cabo con células T o partes de las mismas en lugar de TCRs, presentando estas células T un TCR correspondiente en su superficie.

En una forma de realización adicional, inicialmente se evita la formación del complejo porque la primera o la segunda molécula están presentes en un complejo con una molécula temporal. Preferiblemente, en este caso un MHC ya está
60 unido con un péptido temporal. Este péptido temporal está unido al orificio o bolsillo de unión al péptido del MHC, de modo que el MHC no puede aceptar otro péptido. Este enlace se rompe mediante una señal y el MHC está listo para formar un complejo con el péptido deseado.

65 En este caso, preferentemente es posible utilizar MHCs que contengan un péptido escindible por UV y que actúen como marcadores de posición. A continuación, en el procedimiento según la invención, este péptido se sustituye por un péptido deseado. Para ello se utiliza una fuente de luz UV que ilumina el chip en cuanto se han aportado ambas

moléculas (MHC y el péptido deseado). La luz UV escinde el marcador de posición y libera la posición para que el péptido deseado pueda formar un complejo con el MHC. En este caso, la formación del complejo se activa mediante una señal adicional, aquí la señal UV. Esta forma de realización es particularmente adecuada para el empleo de MHCs no estabilizados.

En otra forma de realización, se utilizan MHCs que no están plegados correctamente. El plegamiento solo tiene lugar en presencia de los péptidos que se unen al orificio/bolsillo de unión al péptido.

Todas las formas de realización de la invención son adecuadas tanto para el empleo de MHC Clase I como de MHC Clase II.

Otro posible campo de aplicación de la invención lo representa, p. ej., la investigación en el campo de la terapia génica. Las proteínas Cas (p. ej., Cas9) ofrecen la posibilidad de realizar una edición muy precisa del genoma, lo que desempeña un papel importante, ante todo en el campo de las terapias génicas. En el caso de Cas9, la proteína se programa utilizando dos moléculas de ARN específicas (ARNtracr y ARNcr). Esta programación confiere a la Cas9 la especificidad de unirse a un locus del gen particular. En este caso, ARNtracr y ARNcr también se pueden fusionar para formar el denominado ARN guía o ARNg. La ventaja es que solo hay que asociar la Cas9 a una molécula para conferirle la especificidad adecuada. Precisamente en el campo de la terapia génica personalizada, puede ser necesario testar muchas moléculas de ARNg diferentes para examinar su especificidad y actividad fuera del objetivo para el locus del gen correspondiente. El objetivo es minimizar los efectos secundarios de la terapia génica para cada paciente [18].

Cuando muchos ARNg diferentes se asocian con las proteínas Cas correspondientes, se habla en este caso de aplicaciones CRISPR multiplexadas. En el estado de la técnica ya se han descrito campos de aplicación muy amplios. En este caso, siempre se hace una distinción entre edición de genes y regulación de la transcripción. En el primero, se realizan cortes de manera establecida (ya sea roturas de cadena sencilla o doble) y en el segundo, las proteínas Cas se unen a los loci correspondientes para ejercer un efecto sobre la regulación del gen [18].

Con el nuevo método según la invención es posible generar una micromatriz en la que estén presentes muchos complejos diferentes de proteína ARNg-Cas. Con una matriz de este tipo, se puede examinar, por una parte, la unión a determinadas regiones del ADN (p. ej., para análisis fuera del objetivo). Por otro lado, las distintas zonas efectivas también pueden conectarse con células para modificar o regular de manera establecida genes en un formato de alto rendimiento. Igualmente son posibles matrices en las que una pluralidad de mutantes Cas se asocian con el mismo ARNg, p. ej., para generar / detectar un mutante Cas mejorado o una proteína con reconocimiento de secuencia PAM (siglas inglesas de motivo adyacente al protoespaciador) modificado.

Todos los métodos conocidos en el estado de la técnica en la zona CRISPR se basan en colecciones todo incluido en tubos para enfoques desplegables o en células con lecturas basadas en células. Sin embargo, las micromatrices CRISPR no se describen en la técnica anterior.

Por lo tanto, mediante la invención produce por primera vez un método de producción sencillo para micromatrices de los complejos, que no requiere una reacción de amplificación y en el que también pueden pasar a emplearse componentes complejos más inestables.

Descripción de las Figuras

En lo que sigue, la invención se describe con ayuda de figuras y ejemplos, sin estar limitados a los mismos.

La **Figura 1** muestra una forma de realización preferida de la invención. En la figura mostrada se utiliza como zonas efectivas una primera superficie con cavidades separadas. En A a E se muestra cómo están presentes o pueden introducirse las primeras moléculas. Esto se puede hacer ya sea depositando líquido en manchas que contiene las moléculas puras (A), depositando líquido en manchas que contiene las moléculas con una etiqueta de inmovilización específica (B), sintetizando las moléculas con una etiqueta de inmovilización específica (C), depositando / aplicando partículas (perlas), en el que las moléculas están ancladas con una etiqueta de inmovilización (D) específica

o se cierran las cavidades con una micromatriz de ADN (manchada, sintetizado...), que contiene manchas de ADN que a su vez codifican los primeros participantes del complejo (E).

Si aún no es el caso (C y D), en la siguiente etapa las primeras moléculas se llevan a la superficie de las cavidades y se fijan allí. Esto se puede hacer secando el líquido (F) existente, mediante inmovilización específica a través de la etiqueta de inmovilización y posterior lavado o secado del chip (G), mediante expresión de las moléculas de ADN y subsiguiente inmovilización específica a través de la etiqueta de inmovilización y posterior lavado o secado. del chip (H).

En (I) las cavidades se llenan con la segunda molécula.

La formación del complejo tiene lugar dentro de las cavidades cerradas ya sea por rehidratación de las moléculas de la etapa 1 (J) o por escisión específica de las etiquetas de inmovilización de las primeras moléculas de la etapa 1 (K).

Al atrapar los complejos resultantes en la superficie de captura, así como al lavar la superficie, se crea una micromatriz que se puede medir y caracterizar aún más (L + M). En el caso de la superficie de captura se puede tratar de la segunda superficie de la etapa 1 o de otra superficie.

La **Figura 2** muestra una forma de realización preferida adicional del procedimiento según la invención.

Se produce una matriz mediante síntesis o detección con una pluralidad de primeras moléculas diferentes, en el presente ejemplo péptidos (A). Otra matriz se produce mediante la detección de una pluralidad de segundas moléculas (aquí complejos de MHC) (B). A continuación, ambas matrices se llevan a estrecho contacto de tal manera que se forma un puente líquido entre las distintas matrices. Es importante que los distintos puentes líquidos no se toquen, de modo que las zonas efectivas permanezcan separadas (C). Las moléculas de la primera matriz (A) se rehidratan o se separan específicamente de la superficie, p. ej., a través de la luz. A continuación, ambas moléculas de las respectivas matrices se mezclan entre sí a través del contacto y se produce una formación del complejo MHC-péptido (D). Entonces se pueden capturar los complejos MHC-péptido. El resultado es una micromatriz de complejos MHC-péptido (E).

Figura 3

La Figura 3 muestra la aplicación del método según la invención en combinación con una detección de MHC. Para llevar a cabo una detección de este tipo, se mezclan de forma establecida y separada miles de péptidos diferentes con la misma molécula de MHC (A). Con ello se produce una formación del complejo de MHC y péptido. La figura muestra este proceso, para una mejor ilustración representado de forma simplificada, no en zonas efectivas cerradas. A continuación, los distintos complejos se inmovilizan sobre una superficie para generar una micromatriz (B). Luego, la micromatriz se pone en contacto con la molécula de TCR a analizar (C). Finalmente, se pueden analizar las interacciones entre el TCR y los complejos de MHC-péptido (D).

Figura 4

La Figura 4 muestra una forma de realización preferida del método según la invención. En este caso, las primeras moléculas, en este caso péptidos, se colocan en un chip, p. ej., un chip PDMS (A). En la etapa B se puede ver cómo se fijaron los péptidos mediante secado. En este caso, es posible un almacenamiento a 4 °C durante un largo período de tiempo (C). En la etapa D se añaden las segundas moléculas, en este caso complejos de MHC. En la etapa E, las cavidades de la primera superficie se cierran con una superficie de captura y se crean zonas efectivas cerradas en las que se forman complejos de MHC-péptido. Estos son capturados por las moléculas de captura en la superficie de captura. En este caso, se añaden receptores de células T en la etapa F para analizar las propiedades de unión.

Figura 5

La Figura 5 muestra diferentes formas de realización del método según la invención. En la etapa A, las primeras moléculas se depositan en zonas efectivas (aquí cavidades). Esto tiene lugar en forma de tropos. En la etapa B se puede ver la fijación, que aquí se realiza mediante secado. En este ejemplo, las superficies cargadas de esta manera se pueden almacenar durante mucho tiempo preferentemente a 4 °C (C).

En la segunda fila se muestran diferentes posibilidades de aplicar las segundas moléculas. En este ejemplo, los MHCs se utilizan como segundas moléculas. 1 muestra que las segundas moléculas se pueden aplicar mediante gotas grandes, de modo que se llenen al mismo tiempo varias zonas efectivas. En este caso, las cavidades se llenan para evitar inclusiones de aire. En 2, los MHCs se aplican en gotitas más pequeñas de manera establecida en las distintas zonas efectivas. También en este caso las cavidades están demasiado llenas en el ejemplo. En 3, los MHCs se aplican de forma más establecida en gotitas más pequeñas sobre las distintas zonas efectivas, siendo el volumen de las gotitas más pequeño que el de las cavidades.

La formación del complejo tiene lugar en las zonas efectivas. A continuación, se coloca una superficie de captura en los tres ejemplos. En la última fila se puede ver cómo se presentan unidos los complejos a la superficie de captura y, en este caso, se examinan sus propiedades de unión a los receptores de células T.

Figura 6

La Figura 6 muestra diferentes resultados de los métodos según la Figura 5, mostrando la Figura 6.3.2 un resultado muy bueno cuando el método según la invención se lleva a cabo correctamente. La Figura 6.2.2 muestra asimismo un resultado evaluable, produciéndose una contaminación cruzada con las cavidades

vecinas. Sin embargo, aquí ya se puede medir una interacción con los receptores de células T. En las Figuras 6.3.1 y 6.3.2 se muestra un resultado deseable si el método según la invención se lleva a cabo correctamente. Aquí se pueden reconocer cavidades limpias, por lo que no se produjeron contaminaciones cruzadas. La interacción con los receptores de células T se puede medir fácilmente.

Se llevaron a cabo diferentes experimentos utilizando MHCs como segunda molécula. Para ello se utilizaron distintos MHCs y se produjeron matrices de complejos de péptido-MHC (pMHC) con el procedimiento según la invención. A continuación, las matrices se inundaron con receptores de células T y se visualizó la unión a los pMHCs. Los ejemplos mostrados más adelante deben ilustrar la invención y no limitar el objeto de la solicitud. En particular, son adecuadas tanto moléculas de MHC de clase 1 como de MHC de clase 2. El análisis aquí mostrado con analitos solubles del receptor de células T es una zona de aplicación ejemplar. Asimismo es posible poner las matrices en contacto con células T o partes de ellas y determinar su interacción. Por supuesto, también son posibles análisis completamente diferentes, poniendo entonces las matrices en contacto con otros componentes o participantes en el análisis.

En particular:

Ejemplo 1

Se llevaron a cabo experimentos con MHCs estabilizados (fuente: Tetramershop), que no contienen péptidos en la bolsa de unión a péptidos.

Se proporcionan un portaobjetos de vidrio recubierto de estreptavidina y un chip de cavidad.

Para la inmovilización de los ligandos etiquetados con biotina se utilizan portaobjetos de vidrio recubiertos con estreptavidina.

Los chips de cavidad (chip de cavidad BioCopy) comprenden pequeñas cavidades que se utilizan como recipientes de reactivos para la formación del complejo pMHC.

Los péptidos utilizados para los complejos de pMHC se imprimen en los chips de cavidades preparados. Estos se pueden almacenar entonces hasta su uso posterior.

En la siguiente etapa, las moléculas de MHC se imprimen en los chips peptídicos preparados. A esto le sigue la unión del péptido en la bolsa de unión del MHC. Los complejos así formados quedan atrapados en la superficie recubierta de estreptavidina y forman una formación de micromatriz.

Después de un etapa de incubación, el sándwich de chip y portaobjetos de vidrio se puede separar y la micromatriz de pMHC está lista para su uso.

Las matrices producidas de esta manera se testaron y para ello se lavaron con receptores de células T. Se visualizó la unión de las manchas de pMHC y proporcionó buenos resultados.

Ejemplo 2

Se llevaron a cabo experimentos con MHCs no estabilizados (fuente: p. ej., Sanquin, Biolegend), que incluyen péptidos escindibles por UV o sensibles a UV.

Se proporcionan un portaobjetos de vidrio recubierto de estreptavidina y un chip de cavidad.

Para la inmovilización de los ligandos etiquetados con biotina se utilizan portaobjetos de vidrio recubiertos con estreptavidina.

Los chips de cavidad (chip de cavidad BioCopy) comprenden pequeñas cavidades que se utilizan como recipientes de reactivos para la formación del complejo pMHC.

Los péptidos utilizados para los complejos de pMHC se imprimen en los chips de cavidades preparados. Estos se pueden almacenar entonces hasta su uso posterior.

En la siguiente etapa, las moléculas de MHC se imprimen en los chips peptídicos preparados. Para el intercambio de un péptido escindible por UV que está localizado en el MHC no estabilizado, se utiliza una fuente de luz UV y se ilumina el chip. La escisión por UV provoca el intercambio del péptido escindido por el péptido proporcionado (impreso).

Después del intercambio del péptido, los complejos así formados quedan atrapados sobre la superficie recubierta de estreptavidina y forman una formación de micromatriz.

Después de un etapa de incubación, el sándwich de chip y portaobjetos de vidrio se puede separar y la micromatriz de pMHC está lista para su uso.

La matriz así producida se lavó con receptores de células T y se pudo visualizar la unión a los pMHCs y proporcionó buenos resultados.

Ejemplo 3

Se llevaron a cabo experimentos con HLAs no estabilizados (fuente: p. ej., Immudex) que deben plegarse. Los MHCs no cargados no están plegados correctamente. Un plegamiento tiene lugar en presencia de los péptidos.

Se proporcionan un portaobjetos de vidrio recubierto de estreptavidina y un chip de cavidad.

Para la inmovilización de los ligandos etiquetados con biotina se utilizan portaobjetos de vidrio recubiertos con estreptavidina.

Los chips de cavidad (chip de cavidad BioCopy) comprenden pequeñas cavidades que se utilizan como recipientes de reactivos para la formación del complejo pMHC.

Los péptidos utilizados para los complejos de pMHC se imprimen en los chips de cavidades preparados. Estos se pueden almacenar entonces hasta su uso posterior.

En la siguiente etapa, las moléculas de MHC se imprimen en los chips peptídicos preparados. Entonces tiene lugar el plegamiento y los péptidos se unen a las bolsas de las moléculas de MHC y forman así un complejo de pMHC.

Los complejos formados quedan atrapados en la superficie recubierta de estreptavidina y forman una formación de micromatriz.

Después de una etapa de incubación, el sándwich de chip y portaobjetos de vidrio se puede separar y la micromatriz de pMHC está lista para su uso.

La matriz producida de esta manera se testó al lavarla con receptores de células T. Los puntos de pMHC unidos se pudieron visualizar y muestran buenos resultados.

Bibliografía:

[1] Rays, M., Chen, Y. y Su, Y. A. (1996). Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature genetics*, 14.

[2] Blanchard, A. P., Kaiser, R. J. y Hood, L. E. (1996). High-density oligonucleotide arrays. *Biosensors and bioelectronics*, 11(6-7), 687-690.

[3] Pease, A. C., Solas, D., Sullivan, E. J., Cronin, M. T., Holmes, C. P. y Fodor, S. P. (1994). Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(11), 5022-5026.

[4] Nuwaysir, E. F., Huang, W., Albert, T. J., Singh, J., Nuwaysir, K., Pitas, A., ... y Green, R. D. (2002). Gene expression analysis using oligonucleotide arrays produced by maskless photolithography. *Genome research*, 12(11), 1749-1755.

[5] Kilb, N., Burger, J. y Roth, G. (2014). Protein microarray generation by in situ protein expression from template DNA. *Engineering in Life Sciences*, 14(4), 352-364.

[6] documento US20060141245A1

[7] documento WO2006112815A2

[8] Lin, H., Sun, L. y Crooks, R. M. (2005). Replication of a DNA Microarray. *Journal of the American Chemical Society*, 127(32), 11210-11211.

[9] Kim, J. y Crooks, R. M. (2007). Parallel fabrication of RNA microarrays by mechanical transfer from a DNA master. *Analytical chemistry*, 79(23), 8994-8999.

[10] Lin, H., Kim, J., Sun, L. y Crooks, R. M. (2006). Replication of DNA microarrays from zip code masters. *Journal of the American Chemical Society*, 128(10), 3268-3272.

- [11] Kim, J. y Crooks, R. M. (2007). Replication of DNA microarrays prepared by in situ oligonucleotide polymerization and mechanical transfer. *Analytical chemistry*, 79(19), 7267-7274.
- 5 [12] documento US20100256017A1
- [13] documento WO2008022332A2
- [14] documento WC2010100265A1
- 10 [15] Krämer, S. D., Wöhrle, J., Meyer, P. A., Urban, G. A. y Roth, G. (2019). How to copy and paste DNA microarrays. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- [16] Kilb, N., Herz, T., Burger, J., Woehrle, J., Meyer, P. A. y Roth, G. (2019). Protein Microarray Copying: Easy on-Demand Protein Microarray Generation Compatible with Fluorescence and Label-Free Real-Time Analysis. *ChemBioChem*, 20(12), 1554-1562.
- 15 [17] Moritz, A., Anjanappa, R., Wagner, C., Bunk, S., Hofmann, M., Pszolla, G., ... y Maurer, D. (2019). High-throughput peptide-MHC complex generation and kinetic screenings of TCRs with peptide-receptive HLA-A* 02: 01 molecules. *Science immunology*, 4(37).
- 20 [18] McCarty, N. S., Graham, A. E., Studená, L. y Ledesma-Amaro, R. (2020). Multiplexed CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation. *Nature communications*, 11(1), 1-13.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción in situ de una micromatriz de complejo molecular que comprende las siguientes etapas:
 - a) proporcionar una primera superficie que comprende varias zonas efectivas separadas,
 - b) disponer primeras moléculas en varias zonas efectivas,
 - c) fijar las moléculas presentadas en la superficie,
 - d) añadir una segunda molécula a cada una de las zonas efectivas con la primera molécula dispuesta,
 - e) cerrar las zonas efectivas con una segunda superficie,
 - f) formar complejos entre las moléculas,
 - g) inmovilizar el complejo formado en una superficie de captura.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la superficie de captura es la segunda superficie.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que las zonas efectivas son cavidades y/o manchas.
4. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que las moléculas depositadas en la etapa c) se fijan a la superficie a través de una etiqueta de inmovilización, mediante adsorción, mediante interacción iónica, mediante fuerzas de Van der Waals, mediante una reacción química específica y/o mediante secado.
5. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que
 - las segundas moléculas se añaden a las primeras moléculas o en el que
 - las segundas moléculas están presentes sobre la segunda superficie y se establece un contacto entre las zonas efectivas que comprenden las primeras moléculas y las segundas moléculas a través de un puente líquido.
6. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que la formación del complejo se posibilita mediante la disolución de la fijación de las primeras moléculas.
7. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que inicialmente se evita la formación del complejo porque la primera o la segunda molécula están presentes en un complejo con una molécula temporal.
8. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que la formación del complejo se activa mediante una señal, preferentemente una señal de luz UV.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que mediante la señal se separa la formación del complejo con la molécula temporal.
10. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que la disposición de las primeras moléculas en las zonas efectivas de la primera superficie se produce a través de uno de los siguientes métodos:
 - a. depósito de líquido en manchas que comprende las primeras moléculas,
 - b. sintetizar las primeras moléculas,
 - c. aplicar partículas que comprenden las primeras moléculas y/o
 - d. poner en contacto las zonas efectivas de la primera superficie con una micromatriz de ADN, que comprende manchas de ADN, codificando el ADN las primeras moléculas.
11. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que la primera y/o la segunda molécula contienen etiquetas de inmovilización.
12. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que las primeras y/o las segundas moléculas se seleccionen del grupo que comprende proteínas, péptidos, ADN, ARN, moléculas pequeñas, células, preferiblemente proteínas asociadas a CRISPR y sus mutantes, ARNg, proteínas de la clase de los complejos mayores de histocompatibilidad y sus mutantes, proteínas de la clase de los anticuerpos, linfocitos T, linfocitos B.
13. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que la superficie de captura comprende moléculas de captura seleccionadas del grupo que comprende proteínas, péptidos, ADN, ARN, moléculas pequeñas, preferiblemente silanos, azúcares, etiquetas de inmovilización de proteínas.
14. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que la micromatriz del complejo molecular se analiza, mide y/o caracteriza.
15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que la micromatriz del complejo molecular se pone en contacto con receptores de células T, células T o partes de las mismas y se analiza la interacción entre los complejos moleculares y los receptores de células T, células T o partes de las mismas.

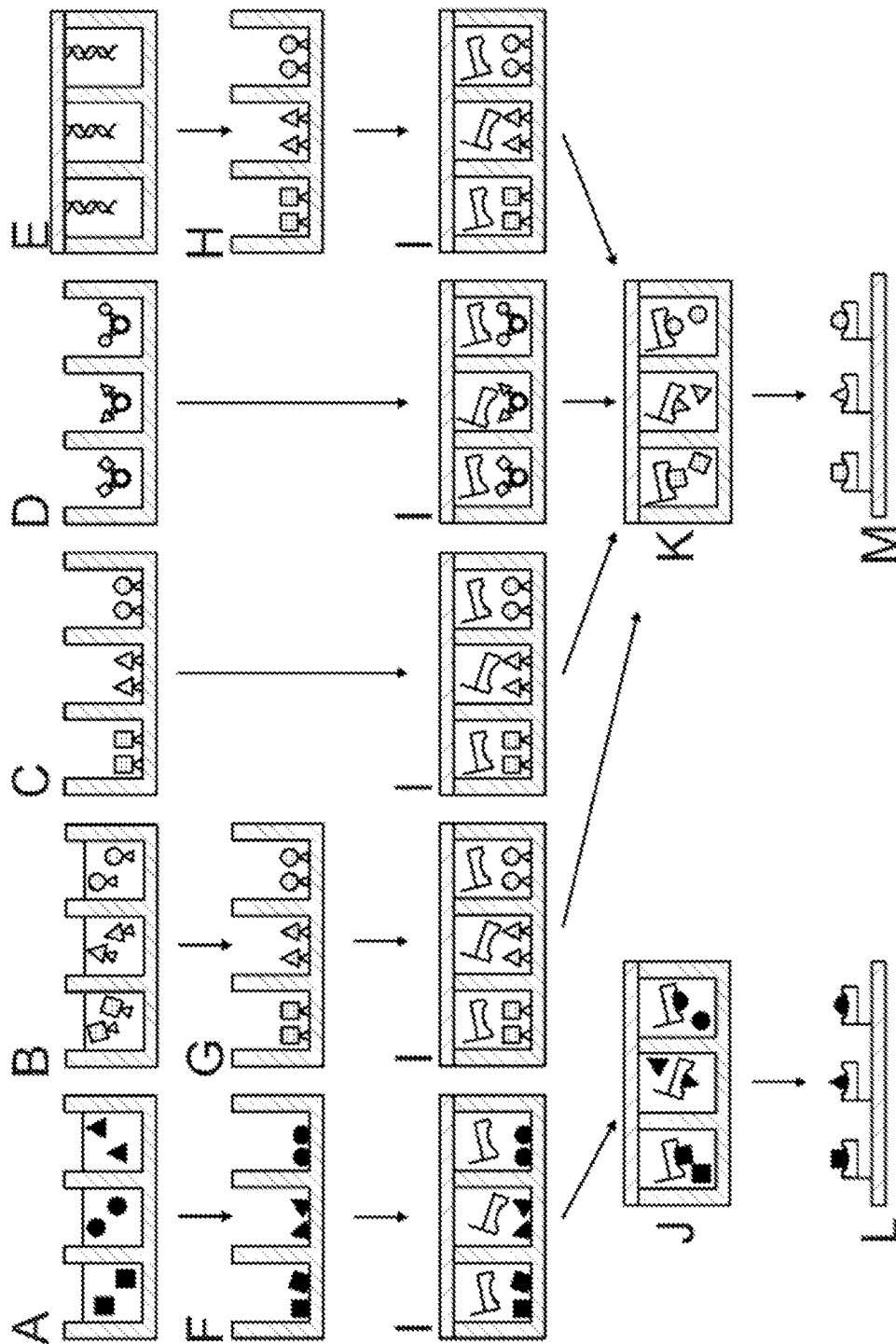


Fig. 1

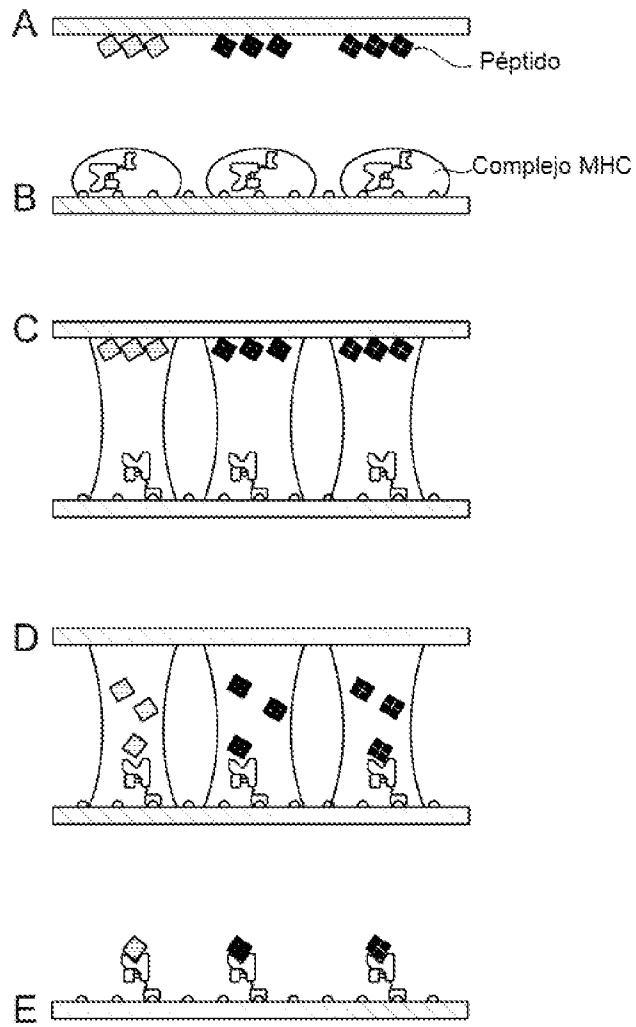
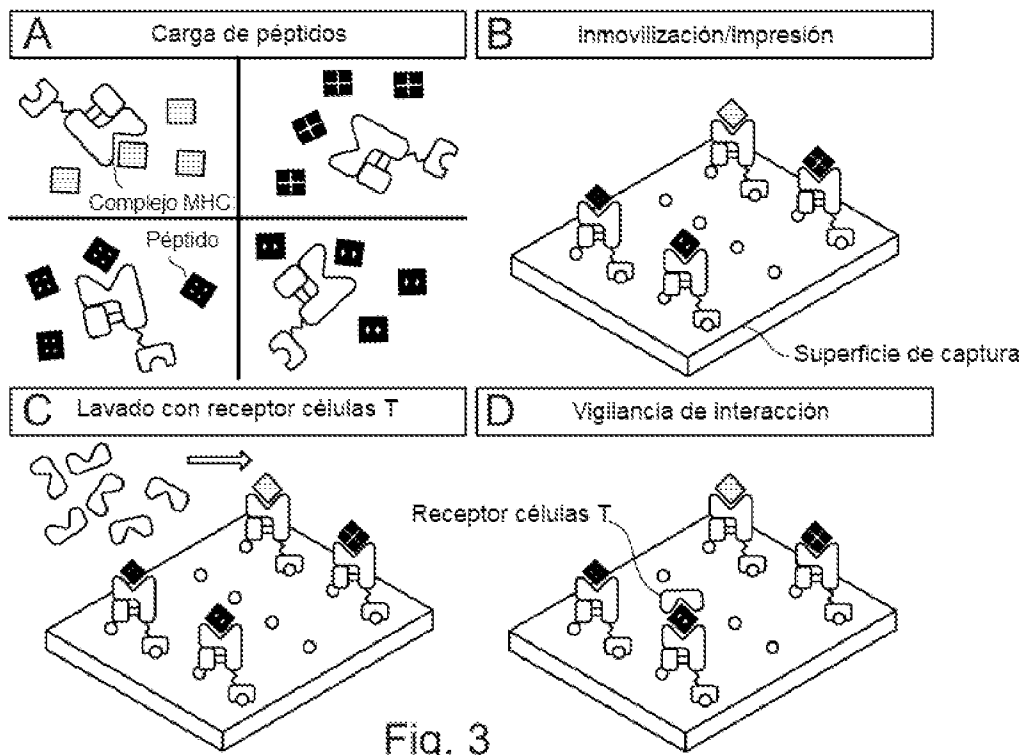


Fig. 2



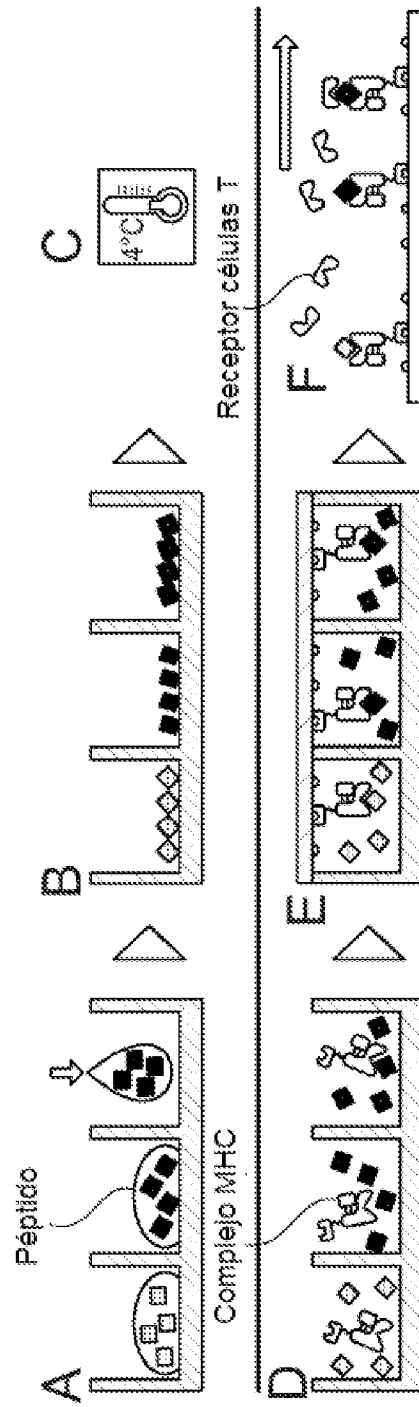


Fig. 4

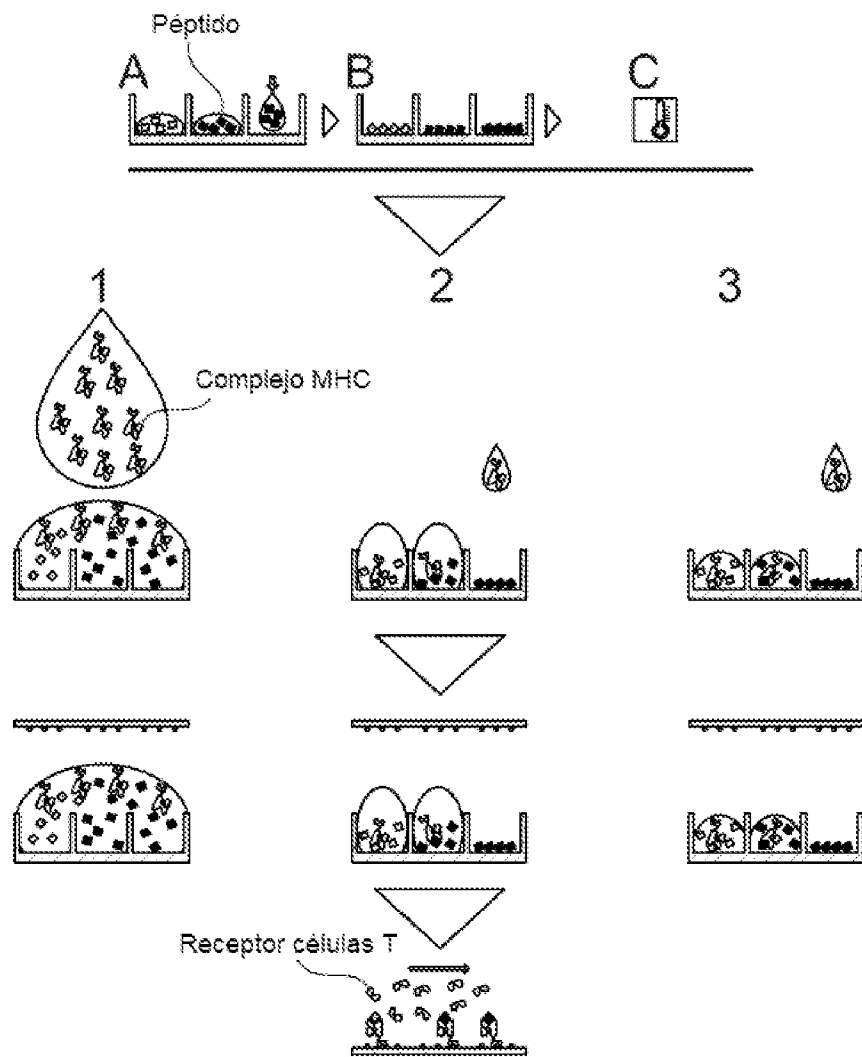


Fig. 5

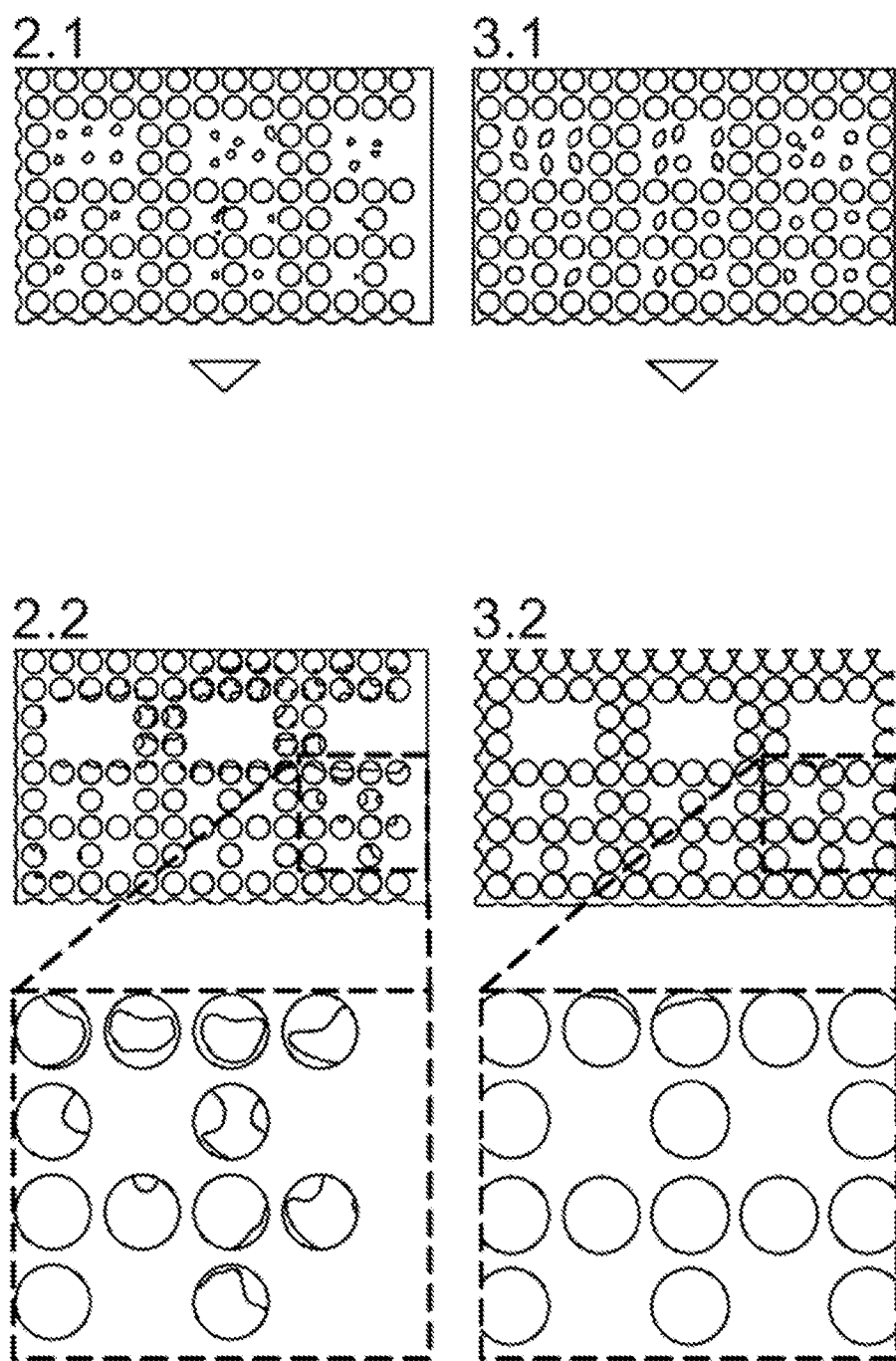


Fig. 6