



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 100 31 028 B4 2008.09.04**

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **100 31 028.1**
 (22) Anmeldetag: **26.06.2000**
 (43) Offenlegungstag: **03.01.2002**
 (45) Veröffentlichungstag
 der Patenterteilung: **04.09.2008**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/48 (2006.01)**
G01N 33/483 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
G01N 15/00 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
GNOTHIS Holding SA, Ecublens, CH

(74) Vertreter:
Weickmann & Weickmann, 81679 München

(72) Erfinder:
Rigler, Rudolf, Prof. Dr., St-Sulpice, CH; Goesch, Michael, Dipl.-Ing., Stocksund, SE

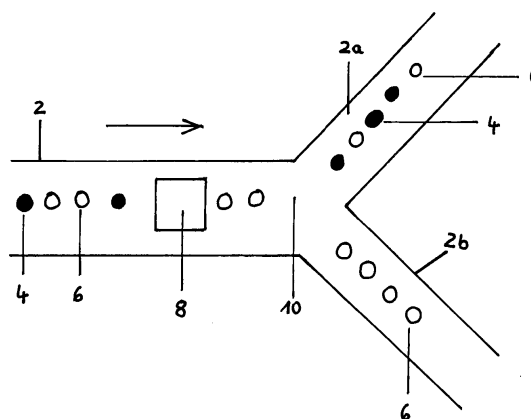
(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
 gezogene Druckschriften:

DE 195 20 298 A1
DE 100 23 423 A1
DE 43 01 005 A1
EP 06 79 251 B1
WO 99/66 318 A1
WO 91/15 750 A1

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Selektion von Partikeln**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Selektion eines Partikels mit einer vorbestimmten Eigenschaft aus einer Population umfassend eine Vielzahl von unterschiedlichen Partikeln, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen einer Population von unterschiedlichen Partikeln,
- (b) Markieren von Partikeln, die die vorbestimmte Eigenschaft aufweisen,
- (c) Leiten der Partikel in einem Mikrokanal durch ein Detektionselement, das zwischen markierten und nicht markierten Partikeln unterscheiden kann, wobei in einem ersten Selektionszyklus die Partikelkonzentration in einem Bereich von 10^8 bis 10^{14} Partikel pro $100 \mu\text{l}$ Probevolumen liegt, so dass neben den markierten Partikeln auch eine Anzahl negativer Partikel zunächst als positiv eingestuft werden,
- (d) Abtrennen positiv eingestuft und markierter Partikel, und
- (e) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte (c) und (d), wobei die Konzentration der Partikel in dem mindestens einen nachfolgenden Zyklus gegenüber dem ersten Selektionszyklus verringert wird, so dass markierte Partikel eindeutig als positiv identifiziert werden können.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion von Partikeln mit einer vorbestimmten Eigenschaft aus einer Population einer Vielzahl unterschiedlicher Partikel sowie die Verwendung einer zur Durchführung des Verfahrens geeigneten Vorrichtung.

[0002] Zur Identifizierung neuer Liganden für diagnostische, biomedizinische und pharmazeutische Anwendungen können kombinatorische Bibliotheken, bestehend aus einer Population einer Vielzahl von Partikeln, z. B. Phagen, Zellen, Ribosomen etc., eingesetzt werden, wobei die einzelnen Partikel jeweils unterschiedliche Liganden präsentieren (siehe z. B. WO90/02809; WO92/15677; WO92/15679; WO92/06204; WO92/06176; WO98/19162; WO98/35232; WO99/06839 und WO99/5428). Zur Identifizierung von Liganden mit einer vorbestimmten Eigenschaft wird üblicherweise eine Musterung der zu untersuchenden Bibliothek durchgeführt, wobei ein markiertes Zielmolekül mit den einzelnen Partikeln der Bibliothek in Kontakt gebracht wird und das Auftreten einer Bindung zwischen dem Zielmolekül und einem bestimmten Partikel der Bibliothek bzw. dem von dem Partikel präsentierten Liganden bestimmt wird. Anschließend muss das Partikel mit der vorbestimmten Eigenschaft identifiziert werden. Bisherige Selektions- und Identifizierungsmethoden, z. B. die sogenannten "Penning"- oder "Selex"-Verfahren haben jedoch eine relativ geringe Effizienz, sodass ein bestimmtes Partikel mit gewünschten Eigenschaften oftmals nicht in der Bibliothek gefunden werden kann, obwohl es dort vorhanden ist.

[0003] Ein direkter Nachweis von einzelnen Analytmolekülen ist mit der EP 0 679 251 B1 beschriebenen Verfahren zur Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) beschrieben. Mittels FCS kann in einem kleinen Messvolumen von beispielsweise $< 10^{-14}$ l ein einziges oder nur wenige mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Moleküle nachgewiesen werden. Das Messprinzip der FCS beruht darauf, dass ein kleines Volumenelement der Probenflüssigkeit einem starken Anregungslicht, z. B. eines Lasers ausgesetzt wird, sodass nur diejenigen Fluoreszenzmoleküle, die sich in diesem Messvolumen aufhalten, angeregt werden. Das emittierte Fluoreszenzlicht aus diesem Volumenelement wird dann auf einen Detektor, z. B. einen Fotomultiplier abgebildet. Ein Molekül, das sich im Volumenelement befindet, wird sich gemäß seiner charakteristischen Diffusionsgeschwindigkeit mit einer durchschnittlichen, aber für das betreffende Molekül charakteristischen Zeit wieder aus dem Volumenelement entfernen und dann nicht mehr zu beobachten sein.

[0004] Wird nun die Lumineszenz ein- und desselben Moleküls während seiner durchschnittlichen Auf-

enthaltensdauer in dem Messvolumen mehrmals angeregt, so lassen sich von diesem Molekül viele Signale erfassen.

[0005] In der DE 195 20 298 A1 ist ein Verfahren beschrieben, bei dem Partikel aufgrund bestimmter Eigenschaften detektiert und sortiert werden, wobei individuelle Sortierschritte mehrfach aufeinander folgen. Das Verfahren wird jedoch nicht unter Bedingungen durchgeführt, bei denen während eines ersten Selektionszyklus neben markierten Partikeln auch nicht markierte Partikel als positiv eingestuft werden.

[0006] Vorrichtungen zur Selektion markierter Partikel aus einem Gemisch mit nicht markierten Partikeln sind beispielsweise aus der WO 99/66318 A1, der WO 91/15750 A1 und der DE 43 01 005 A1 bekannt.

[0007] Die Anwendung der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie zur Sortierung und Identifizierung einzelner Moleküle ist bei Eigen und Rigler (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), 5740–5747) und Rigler (J. Biotech. 41 (1995), 177–186) beschrieben. Es wird die Verwendung einer Quadrupol-Falle und elektrischer Feldgradienten in Verbindung mit Einzelphotonendetektoren zur Identifizierung von Einzelmolekülen vorgeschlagen. Obwohl dieses Verfahren gegenüber den klassischen Selektionierungsprozeduren eine erheblich höhere Effizienz aufweist, erfordert die Selektion von Einzelmolekülen die Verwendung extrem geringer Partikelkonzentrationen und ist zeitaufwendig. Es besteht daher ein Bedürfnis, die Sensitivität und Effizienz bei der Selektionierung von Partikeln zu verbessern.

[0008] Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Selektion eines Partikels mit einer vorbestimmten Eigenschaft aus einer Population einer Vielzahl unterschiedlicher Partikeln, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen einer Population von unterschiedlichen Partikeln,
- (b) Markieren von Partikeln, die die vorbestimmte Eigenschaft aufweisen,
- (c) Leiten der Partikel in einem Mikrokanal durch ein Detektionselement, das zwischen markierten und nicht markierten Partikeln unterscheiden kann, wobei in einem ersten Selektionszyklus die Partikelkonzentration in einem Bereich von 10^8 bis 10^{14} Partikel pro 100 μ l Probenvolumen liegt, so dass neben den markierten Partikeln auch eine Anzahl negativer Partikel zunächst als positiv eingestuft werden,
- (d) Abtrennen positiv eingestufte und markierter Partikel, und
- (e) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte (c) und (d), wobei die Konzentration der Partikel in dem mindestens einen nachfolgenden Zyklus gegenüber dem ersten Selektionszyklus verringert wird, so dass markierte Partikel eindeu-

tig als positiv identifiziert werden können.

[0009] Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Selektion von einzelnen Partikeln aus sehr großen Partikelpopulationen, die beispielsweise mehr als 10^8 oder sogar 10^{12} oder mehr unterschiedliche Partikel umfassen. Die Partikel können Zellen, Teile von Zelloberflächen, Zellorganellen, z. B. Ribosomen, Viren wie etwa Bakteriophagen, z. B. filamentöse Phagen oder in Phagenhüllen verpackte Plasmide (Phagemide), Nukleinsäuren wie Gene oder cDNA-Moleküle, Proteine wie etwa Enzyme oder Rezeptoren, oder niedermolekulare Substanzen sein. Vorzugsweise sind die Partikel Elemente einer kombinatorischen Bibliothek, z. B. einer Bibliothek von genetischen Packungen wie Phagen, Zellen, Sporen oder Ribosomen, die auf ihrer Oberfläche Peptidstrukturen, z. B. lineare oder zirkuläre Peptide, oder Proteine wie Antikörper, vorzugsweise fusioniert mit Oberflächenproteinen, z. B. Oberflächenproteinen von filamentösen Phagen, präsentieren.

[0010] Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht eine effiziente Selektion eines Partikels mit einer vorbestimmten Eigenschaft aus einer Vielzahl unterschiedlicher Partikel. Unter "vorbestimmte Eigenschaft" im Sinne der vorliegenden Erfindung ist vorzugsweise die Fähigkeit zur Bindung an eine Zielsubstanz zu verstehen. Die Bindung des Partikels an die Zielsubstanz kann eine Liganden-Rezeptor-Bindung, eine Enzym-Substrat-Bindung, eine Antikörper-Antigen-Bindung, eine Nukleinsäurehybridisierung, eine Zucker-Lectin-Bindung oder eine andere hochaffine biologische Wechselwirkung umfassen. Andererseits kann die vorbestimmte Eigenschaft des Partikels auch darin bestehen, eine biologische Wechselwirkung, z. B. die Bindung an eine Zielsubstanz, zu verhindern.

[0011] Zur Selektion des Partikels mit der vorbestimmten Eigenschaft wird die Partikelpopulation vorzugsweise mit einer nachweisbaren Markierung tragenden Zielsubstanz inkubiert, wobei die Inkubationsbedingungen derart gewählt werden, dass das Partikel mit der vorbestimmten Eigenschaft an eine Markierungsgruppe bindet und so von anderen Partikeln abgetrennt werden kann. Als Markierungsgruppen kommen insbesondere nicht radioaktive Markierungsgruppen und besonders bevorzugt durch optische Methoden nachweisbare Markierungsgruppen, wie etwa Farbstoffe, und insbesondere Fluoreszenzmarkierungsgruppen in Betracht. Beispiele für geeignete Fluoreszenzmarkierungsgruppen sind Rhodamin, Texas-Rot, Phycoerythrin, Fluorescein und andere in diagnostischen Verfahren oder Selektionsverfahren übliche Fluoreszenzfarbstoffe.

[0012] Die markierte Zielsubstanz ist für das zu identifizierende Partikel spezifisch, d. h. die Zielsubstanz bindet unter den Testbedingungen mit ausrei-

chend hoher Affinität und Selektivität an das Partikel mit der vorbestimmten Eigenschaft, um eine Selektion zu ermöglichen.

[0013] Gegebenenfalls kann die vorbestimmte Eigenschaft des zu selektionierenden Partikels auch eine biologische Aktivität, z. B. eine enzymatische Aktivität sein. In diesem Fall können die Partikel mit einem chromogenen oder fluoreszenten Enzymsubstrat inkubiert und in Vesikeln, z. B. Lipidvesikeln wie Liposomen, verkapselt werden. Sofern ein Partikel, z. B. ein Phage oder ein Ribosom, an seiner Oberfläche ein aktives Enzymmolekül präsentiert, erfolgt innerhalb des Vesikels eine Umsetzung des Substrats, wobei ein farbiges oder fluoreszentes Produkt gebildet wird, welches nachgewiesen werden kann.

[0014] Zur Unterscheidung von markierten Partikeln, d. h. Partikeln mit der vorbestimmten Eigenschaft, und nicht markierten Partikeln, d. h. Partikeln ohne die vorbestimmte Eigenschaft, werden die Partikel in einem Mikrokanal durch ein Detektionselement geleitet. Das Leiten durch den Mikrokanal erfolgt vorzugsweise durch einen hydrodynamischen Fluss, beispielsweise durch Saug- oder Pumpwirkung. Der Fluss kann jedoch auch ein elektroosmotischer Fluss sein, der durch einen elektrischen Feldgradienten erzeugt wird. Weiterhin ist eine Kombination von hydrodynamischem Fluss und Feldgradienten möglich. Der Fluss durch den Mikrokanal weist vorzugsweise ein parabolisches Flussprofil auf, d. h. die Fließgeschwindigkeit ist maximal im Zentrum des Mikrokanals und nimmt in einer parabolischen Funktion zu den Rändern bis zu einer Minimalgeschwindigkeit ab. Die Flussgeschwindigkeit durch den Mikrokanal liegt im Maximum vorzugsweise im Bereich von 1 bis 50 mm/sec, besonders bevorzugt im Bereich von 5 bis 10 mm/sec. Der Durchmesser des Mikrokanals liegt vorzugsweise im Bereich von 1 bis 100 μm , besonders bevorzugt von 10 bis 50 μm . Vorzugsweise wird die Messung in einem linearen Mikrokanal mit im Wesentlichen einem konstanten Durchmesser durchgeführt.

[0015] Die Identifizierung eines markierten Partikels kann mittels einer beliebigen Messmethode, z. B. mit einer Orts- und/oder zeitaufgelösten Fluoreszenz-Spektroskopie erfolgen, die in der Lage ist, in einem sehr kleinen Volumenelement wie es in einem Mikrokanal vorliegt, sehr geringe Signale von Markierungsgruppen, insbesondere Fluoreszenzsignale bis hinunter zur Einzelphotonenzählung zu erfassen. Wichtig ist dabei, dass die von markierten Partikeln stammenden Signale sich deutlich von denen unterscheiden, die von den markierten Partikeln verursacht werden.

[0016] Beispielsweise kann die Detektion mittels Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie erfolgen, bei der ein sehr kleines konfokales Volumenelement,

beispielsweise $0,1$ bis 20×10^{-15} l der durch den Mikrokanal strömenden Probenflüssigkeit einem Anregungslicht eines Lasers ausgesetzt wird, das die in diesem Messvolumen befindlichen Rezeptoren zur Emission von Fluoreszenzlicht anregt, wobei das emittierte Fluoreszenzlicht aus dem Messvolumen mittels eines Fotodetektors gemessen wird, und eine Korrelation zwischen der zeitlichen Veränderung der gemessenen Emission und der relativen Fluggeschwindigkeit der beteiligten Moleküle erstellt wird, sodass bei entsprechend starker Verdünnung einzelne Moleküle in dem Messvolumen identifiziert werden können. Auf Einzelheiten zur Verfahrensdurchführung und apparative Details zu den für die Detektion verwendeten Vorrichtungen wird auf die Offenbarung der EP 0 679 251 B1 verwiesen.

[0017] Alternativ kann die Detektion auch durch eine zeitaufgelöste Abklingmessung, ein sogenanntes Time Gating erfolgen, wie beispielsweise von Rigler et al., "Picosecond Single Photon Fluorescence Spectroscopy of Nucleic Acids", in: "Ultrafast Phenomenes", D. H. Auston, Ed., Springer 1984, beschrieben. Dabei erfolgt die Anregung der Fluoreszenzmoleküle innerhalb eines Messvolumens und anschließend – vorzugsweise in einem zeitlichen Abstand von ≥ 100 ps – das Öffnen eines Detektionsintervalls am Fotodetektor. Auf diese Weise können durch Raman-Effekte erzeugte Hintergrundsignale ausreichend gering gehalten werden, um eine im Wesentlichen störungsfreie Detektion zu ermöglichen.

[0018] Besonders bevorzugt umfasst die Vorrichtung zum Nachweis von fluoreszenzmarkierten Partikeln in der den Mikrokanal durchströmenden Probenflüssigkeit einen Laser als Fluoreszenzanregungslichtquelle für die Moleküle, eine optische Anordnung zur Leitung und Fokussierung von Laserlicht des Lasers auf einen Fokalbereich des Mikrokanals und zur konfokalen Abbildung des Fokalbereichs auf eine Fotodetektoranordnung zur Erfassung von Fluoreszenzlicht, welches im Fokalbereich von einem oder gegebenenfalls mehreren optisch angeregten Molekülen emittiert wurde, wobei die optische Anordnung ein Beugungselement oder ein phasenmodulierendes Element im Strahlengang des Lasers aufweist, welches gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren optischen Abbildungselementen dazu eingerichtet ist, aus dem Laserstrahl des Lasers ein Beugungsmuster in Form eines linearen oder zweidimensionalen Arrays von Fokalbereichen in dem Mikrokanal zu erzeugen, wobei die optische Anordnung dazu eingerichtet ist, jeden Fokalbereich konfokal für die Fluoreszenzdetektion durch die Fotodetektoranordnung abzubilden. Alternativ kann die Detektorvorrichtung zwei den Mikrokanal an einander gegenüberliegenden Seiten begrenzende Wände aufweisen, von denen eine ein Array von vorzugsweise integrierten, in den Mikrokanal emittierenden Laserelementen als Fluoreszenzanregungslichtquellen auf-

weist, und von denen die andere ein Array von vorzugsweise integrierten, den Laserelementen jeweils gegenüberliegend zugeordneten Fotodetektorelementen als Fluoreszenzlichtdetektoren aufweist, wobei die Laserelemente vorzugsweise Potenzialtopflaserelemente und die Fotodetektorelemente Avalanche-Dioden sind. Derartige Vorrichtungen sind beispielsweise in der DE 100 23 423 A1 beschrieben.

[0019] Die durch das Detektionselement identifizierten markierten Partikel werden von nicht markierten Partikeln abgetrennt. Dieses Abtrennen kann durch eine Sortierprozedur, wie in Holm et al. (Analytical Methods and Instrumentation, Special Issue μ TAS 96, 85–87), Eigen und Rigler (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), 5740–5747) oder Rigler (J. Biotech 41 (1995), 177–186) beschrieben, erfolgen. Vorzugsweise erfolgt eine automatische Sortierprozedur, wobei markierte und nicht markierte Partikel in unterschiedliche Verzweigungen des Mikrokanals geleitet werden. Die Steuerung der Sortierprozedur erfolgt vorzugsweise dadurch, dass nach Erkennen eines markierten Partikels im Detektionselement ein externes oder in die Mikrostruktur integriertes Ventil umgeschaltet wird, sodass das markierte Partikel in die dafür vorgesehene Verzweigung des Mikrokanals geleitet wird und anschließend das Ventil wieder umgeschaltet wird, sodass nicht markierte Partikel in die andere Verzweigung des Mikrokanals geleitet werden.

[0020] Das erfindungsgemäße Verfahren ist ein Kaskadenprozess, der eine gegebenenfalls mehrfache Wiederholung der Detektions- und Abtrennschritte umfasst. Während die aus dem Stand der Technik bekannte Prozedur zur Selektion von Einzelmolekülen nur bei extrem hohen Verdünnungen und somit sehr großen Volumina zuverlässig durchführbar ist, wird beim erfindungsgemäßen Verfahren die Konzentration der durch die Detektorvorrichtung geleiteten Partikel ausreichend hoch eingestellt, sodass das zu untersuchende Gesamtvolumen an Probenflüssigkeit, welches die Gesamtpopulation der Partikel enthält, gering gehalten werden kann. Dabei wird für den ersten Selektionszyklus eine Partikelkonzentration von 10^8 bis 10^{14} pro $100 \mu\text{l}$ Probevolumen und bevorzugt 10^{10} bis 10^{12} Partikel pro $100 \mu\text{l}$ Probevolumen eingesetzt. Bei diesen Bedingungen nimmt man zwar in Kauf, dass neben dem markierten Partikel auch eine Anzahl weiterer negativer Partikel, üblicherweise 10^2 bis 10^3 Partikel zunächst als positiv eingestuft werden. Durch nachfolgende Selektionszyklen, die mit jeweils verringerter Konzentration gegenüber einem vorhergehenden Zyklus durchgeführt werden, können jedoch schließlich einzelne Partikel, welche die vorbestimmten Eigenschaften aufweisen, isoliert werden. Die Verringerung der Partikelkonzentration wird vorzugsweise so gewählt, dass in einem weiteren Selektionsschritt ein positiver Partikel eindeutig identifiziert werden kann. Beispielsweise kann

die Partikelkonzentration pro Zyklus um mindestens den Faktor 10^4 , vorzugsweise um den Faktor 10^6 bis 10^8 und besonders bevorzugt um ca. den Faktor 10 verringert werden. Das Probenvolumen erhöht sich dabei im allgemeinen nicht wesentlich, da durch den ersten Selektionszyklus eine signifikante Verringerung der Partikelzahl erzielt wurde. Gegebenenfalls können nach dem zweiten Selektionszyklus noch ein oder mehrere weitere Zyklen durchgeführt werden.

[0021] Weiterhin umfasst das erfindungsgemäße Verfahren vorzugsweise das Identifizieren oder/und Charakterisieren der gefundenen Partikel mit der vorbestimmten Eigenschaft. Dieser Schritt kann beispielsweise eine Amplifizierung, z. B. im Falle von Zellen und Viren, eine Vermehrung oder im Falle von Nukleinsäuren eine Amplifikationsreaktion wie PCR oder eine Sequenzierung umfassen. Das identifizierte bzw. charakterisierte Partikel bzw. dessen charakteristische Determinante, z. B. ein auf der Oberfläche präsentiertes Protein, kann anschließend dem jeweils dafür vorgesehenen Verwendungszweck zugeführt oder als Grundlage zur Herstellung einer weiteren kombinatorischen Bibliothek, z. B. durch Mutagenese, eingesetzt werden.

[0022] In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird nach dem Markieren der Partikel, aber vor dem Einbringen der Partikel in die Detektionsvorrichtung eine Affinitäts-Vorselektionsprozedur vorgenommen. Hierzu erfolgt nach der Markierung, z. B. einer Behandlung der Partikelpopulation mit einem markierten Bindemolekül, ein weiterer Behandlungsschritt mit unmarkierten Bindemolekülen, sodass bei Partikeln, die das markierte Bindemolekül nur schwach gebunden haben, durch Dissoziation ein Austausch des markierten Bindemoleküls gegen das unmarkierte Bindemolekül stattfinden kann. Diese schwach bindefähigen und somit unerwünschten Partikel werden in diesem Fall bei der Selektionsprozedur von vornherein nicht als positiv erkannt und scheiden daher aus. Durch Einstellung der Bedingungen bei der Behandlung von markierten Partikeln mit unmarkierten Bindemolekülen kann die "Stringenz" der Affinitäts-Vorselektion eingestellt werden. Durch Erhöhung der Zeitdauer der Inkubation, der Temperatur und der Konzentration unmarkierter Bindemoleküle wird eine Erhöhung der Stringenz erreicht.

[0023] Falls die vorbestimmte Eigenschaft des Partikels darin besteht, selektiv an eine Zielsubstanz, aber möglichst nicht an eine mit der Zielsubstanz nahe verwandte Substanz zu binden, kann vor oder/und nach der Markierung der Zielsubstanz eine Inkubation mit der nahe verwandten Substanz erfolgen, sodass Partikel mit einer Affinität für die nahe verwandte Substanz bei der Selektionsprozedur von vornherein nicht erfasst werden.

[0024] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer Vorrichtung zur Selektion eines Partikels mit einer vorbestimmten Eigenschaft aus einer Population umfassend eine Vielzahl von unterschiedlichen Partikeln, wobei die Vorrichtung umfasst:

- (a) einen optisch transparenten Mikrokanal,
- (b) Mittel zum Einbringen von Partikeln in den Mikrokanal,
- (c) Mittel zur Detektion einer Markierung auf einem durch den Mikrokanal geleiteten Partikel,
- (d) Mittel zum Abtrennen eines markierten Partikels von nicht markierten Partikeln,

wobei die Mittel (c) und (d) derart ausgebildet sind, dass sie eine mindestens einmalige Wiederholung der Detektions-/Abtrennprozedur ermöglichen, zur Durchführung eines hierin offenbarten erfindungsgemäßen Verfahrens.

[0025] Die Vorrichtung enthält vorzugsweise weiterhin automatische Manipulationsvorrichtungen, Heiz- oder Kühleinrichtungen wie Peltier-Elemente, Reservoirs und gegebenenfalls Zufuhrleitungen für Probenflüssigkeit und Reagenzien sowie elektronische Auswertungsgeräte.

[0026] Weiterhin soll die Erfindung durch die nachfolgenden Figuren erläutert werden. Es zeigen:

[0027] [Fig. 1](#) einen Ausschnitt einer Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Durch einen Mikrokanal (2) werden markierte Partikel (4) und nicht markierte Partikel (6) zu einem Detektionselement (8) transportiert. Bei Erkennung eines markierten Partikels (4) durch das Detektionselement (8) werden Ventile (nicht gezeigt) aktiviert, die an der Verzweigungsstelle (10) des Mikrokanals betätigt werden, sodass die markierten Partikel (4) in die Verzweigung (2a) und unmarkierte Partikel in die Verzweigung (2b) geleitet werden. Die Partikelkonzentration oder/und die Durchflussgeschwindigkeit durch den Mikrokanal werden beim erfindungsgemäßen Verfahren so groß gewählt, dass auch ein Eintritt nicht markierter Partikel (6) in die für markierte Partikel vorgesehene Verzweigung (2a) erfolgt. Durch gegebenenfalls mehrfache Wiederholung der Selektions-/Abtrennprozedur werden schließlich nur markierte Partikel erhalten.

[0028] [Fig. 2](#) das Prinzip der kaskadenartigen Selektions-/Abtrennprozedur. Die durch den Mikrokanal (20) geleiteten Partikel werden – wie in [Fig. 1](#) gezeigt – an einer ersten Verzweigung in einen für die markierten Partikel vorgesehenen Arm (24a) und einen für die nicht markierten Partikel vorgesehenen Arm (22a) des Mikrokanals aufgetrennt. Die durch den Kanalarm (24a) geleiteten Partikel werden an einer weiteren Verzweigung erneut in einen für markierte Partikel vorgesehenen Arm (24b) und einen für nicht

markierte Partikel vorgesehenen Arm (**22b**) aufgetrennt. Gegebenenfalls kann noch eine weitere Auftrennung der durch den Mikrokanal (**24b**) strömenden Partikel in einen Arm (**24c**) und einen Arm (**22c**) erfolgen.

[0029] **Fig. 3** eine Ausführungsform der verwendeten Vorrichtung mit multiplen Eingängen. Partikel aus unterschiedlichen Subbibliotheken (**30a**, **30b**, **30c**, **30d**, **30f**) können an einem Schaltventil (**32**) in einen Mikrokanal (**34**) eingeleitet und dort der in **Fig. 1** und **Fig. 2** gezeigten Kaskaden-Selektions-/Abtrennprozedur unterzogen werden.

[0030] **Fig. 4** eine Ausführungsform der verwendeten Vorrichtung mit multiplen Ausgängen. Die durch einen Mikrokanal (**40**) strömenden Partikel werden an der Verzweigungsstelle (**42**) in mehrere Arme (**44a**, **44b**, **44c**, **44d**) aufgetrennt. Die Auftrennung in mehr als zwei Arme kann beispielsweise bei Verwendung mehrerer Markierungsgruppen zweckmäßig sein, um Partikel mit keiner, jeweils einer oder mehreren Markierungsgruppen voneinander zu trennen. Alternativ kann die Trennung auch aufgrund der Intensität der Markierung durch Einstellung entsprechender Cutoff-Werte am Detektor erfolgen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Selektion eines Partikels mit einer vorbestimmten Eigenschaft aus einer Population umfassend eine Vielzahl von unterschiedlichen Partikeln, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen einer Population von unterschiedlichen Partikeln,
- (b) Markieren von Partikeln, die die vorbestimmte Eigenschaft aufweisen,
- (c) Leiten der Partikel in einem Mikrokanal durch ein Detektionselement, das zwischen markierten und nicht markierten Partikeln unterscheiden kann, wobei in einem ersten Selektionszyklus die Partikelkonzentration in einem Bereich von 10^8 bis 10^{14} Partikel pro $100 \mu\text{l}$ Probenvolumen liegt, so dass neben den markierten Partikeln auch eine Anzahl negativer Partikel zunächst als positiv eingestuft werden,
- (d) Abtrennen positiv eingestuft und markierter Partikel, und
- (e) mindestens einmaliges Wiederholen der Schritte (c) und (d), wobei die Konzentration der Partikel in dem mindestens einen nachfolgenden Zyklus gegenüber dem ersten Selektionszyklus verringert wird, so dass markierte Partikel eindeutig als positiv identifiziert werden können.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Partikel aus Zellen, Teilen von Zelloberflächen, Zellorganellen, Viren, Nukleinsäuren, Proteinen und niedermolekularen Substanzen ausgewählt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Population eine kombinatorische Bibliothek umfasst.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die kombinatorische Bibliothek aus genetischen Packungen wie Phagen, Zellen, Sporen oder Ribosomen ausgewählt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Population mehr als 10^8 unterschiedliche Partikel umfasst.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Population mehr als 10^{12} unterschiedliche Partikel umfasst.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Markieren eine Inkubation der Partikel mit einer nachweisbaren Markierung tragenden Zielsubstanz umfasst.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass als Markierung eine Fluoreszenzmarkierungsgruppe verwendet wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Partikel durch einen Mikrokanal mit einem Durchmesser von 1 bis $100 \mu\text{m}$ geleitet werden.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Partikel mittels eines hydrodynamischen Flusses durch den Mikrokanal geleitet werden.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion der markierten Partikel durch Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie erfolgt.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion der markierten Partikel durch eine zeitaufgelöste Fluoreszenz-Abklingmessung erfolgt.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Abtrennen das Leiten der markierten Partikel und der nicht markierten Partikel in unterschiedliche Verzweigungen des Mikrokanals umfasst.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Partikel in einem nachfolgenden Verfahrenszyklus um mindestens den Faktor 10^4 verringert wird.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, weiterhin umfassend das Identifizieren

oder/und Charakterisieren eines Partikels mit der vorbestimmten Eigenschaft.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, weiterhin umfassend einen Affinitäts-Vorselektionsschritt, wobei die markierten Partikel Bedingungen ausgesetzt werden, bei denen schwächer markierte Partikel ihre Markierung verlieren.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass nach dem Markieren eine Inkubation mit einer unmarkierten Zielsubstanz erfolgt.

18. Verwendung einer Vorrichtung zur Selektion eines Partikels mit einer vorbestimmten Eigenschaft aus einer Population umfassend eine Vielzahl von unterschiedlichen Partikeln umfassend:

- (a) einen optisch transparenten Mikrokanal,
 - (b) Mittel zum Einbringen von Partikeln in den Mikrokanal,
 - (c) Mittel zur Detektion einer Markierung auf einem durch den Mikrokanal geleiteten Partikel,
 - (d) Mittel zum Abtrennen eines markierten Partikels von nicht markierten Partikeln, wobei die Mittel (c) und (d) derart ausgebildet sind, dass sie eine mindestens einmalige Wiederholung der Detektions-/Abtrennprozedur ermöglichen,
- zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 17.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

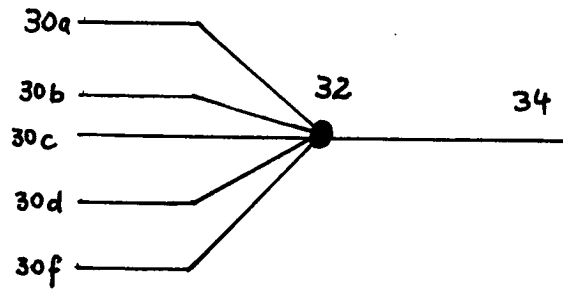


Fig. 3

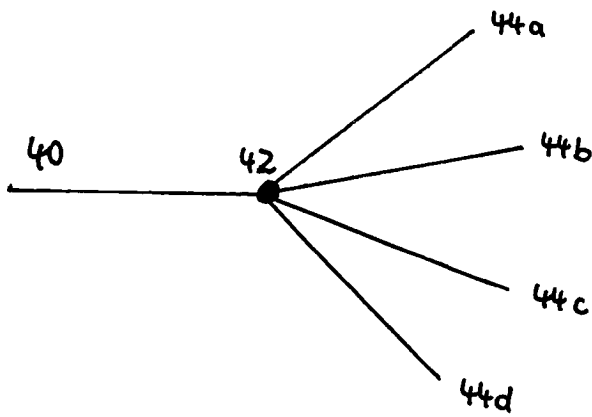


Fig. 4

