

Biología Sintética: Diseñando Sistemas Biológicos con Piezas Genéticas

Daniel Aguilar-Salvador, Isabel Angeles-Santander, Mauricio A. Trujillo-Roldán,
Norma A. Valdez-Cruz*

*Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70228, México D.F., C.P. 04510, México * Correspondencia: adrivaldez1@gmail.com*

RESUMEN

La biología sintética es una nueva área de la biología y la tecnología que fusiona la biología molecular, la ingeniería genética y herramientas computacionales, para crear sistemas biológicos con funciones novedosas. Los sistemas creados sintéticamente son ya una realidad, y cada vez se acumulan más trabajos alrededor del mundo que muestran su factibilidad. En este campo no sólo se hacen pequeñas modificaciones en la información genética, sino que también se diseñan, manipulan, simulan e introducen circuitos genéticos a los organismos. Con este nuevo enfoque científico, se están abordando distintos problemas tecnológicos, como nuevas formas de síntesis y producción de biocombustibles, biofármacos, nanoestructuras, entre otras, permitiendo la innovación y desarrollos en la generación de energía, biomedicina y biología celular, así como en las ciencias de materiales. En este artículo se presenta una breve reseña de interesantes logros de la biología sintética. Entre ellos, la manipulación de *E. coli* para producir proteínas estables mediante recombinación homóloga simulando la biosíntesis de anticuerpos variables, basadas estructuralmente en las moléculas DARPinas derivadas de ankirinas, las cuales presentarán afinidad por diferentes sustratos.

Palabras clave: Biología sintética, Ingeniería genética, Biopartes, Anticuerpos, DARPinas.

ABSTRACT

Synthetic biology is a new area of biology and technology that fuses molecular biology, genetic engineering and computational tools, to create biological systems with novel functions. Systems synthetically created are now a reality, and the accumulation of more works around the world, shows their feasibility. In this field, not only minor modifications to genetic information in organisms are made, genetic circuits are designed, manipulated, simulated, built and introduced to whole organisms. With this new scientific approach, various technological problems are being addressed, such as new forms of synthesis and production of biofuels, biopharmaceuticals, nanostructures, among others, allowing innovation and developments in power generation, biomedical and cell biology as well as in the materials science. This article provides a brief overview of interesting

achievements of synthetic biology. Among them, the manipulation of *E. coli* to produce stable proteins by homologous recombination (mimicking the biosynthesis of antibodies variability), based on the structure of DARPinas derived from ankyrins, which will have affinity for different substrates.

Keywords: Synthetic biology, Genetic engineering, Biobricks, Antibodies, DARPins.

LA BIOLOGÍA SINTÉTICA

La promesa de la biología sintética es diseñar y construir diferentes sistemas biológicos de forma racional conjuntando piezas de información genética, lo que permitirá la modificación de la vida existente. Los sistemas que se diseñan en biología sintética comparten el hecho de no encontrarse en la naturaleza y de que algunos de ellos ni siquiera podrían sobrevivir fuera del laboratorio. Probablemente, en un futuro cercano, un científico de cualquier parte del mundo podrá sentarse ante la pantalla de su computadora y diseñar seres vivos en cuestión de días, o incluso de horas. Ya sea que desee fabricar fármacos complejos o combustible para aviones, podrá descargar de una base de datos la información genética necesaria para hacer un organismo “a la carte”. Como toda promesa, puede no cumplirse, aunque no parece tan lejana, pues ya se han construido circuitos genéticos que producen fármacos complejos y biocombustibles. Por ejemplo, el Doctor Jay Keasling de la Universidad de California, en 2003 diseñó e introdujo un circuito genético para producir en la bacteria *Escherichia coli* un precursor químico de la artemisinina (Martin *et al.*, 2003). Este es un compuesto que se usa como tratamiento contra la malaria y que de forma

convencional se extrae de la planta *Artemisia annua*. La *E. coli* fue modificada genéticamente introduciéndole información genética codificante para enzimas involucradas en la vía metabólica del mevalonato de la levadura *S. cerevisiae* y el gen codificante para la enzima amorfadieno sintasa de *Artemisia annua* (Martin *et al.*, 2003). De esta manera, se logró producir amorfa-4,11-dieno (un compuesto a partir del cual se puede sintetizar la artemisinina) en *E. coli*. Posteriormente, en 2006 el mismo grupo reportó la producción de ácido artemisinico en *S. cerevisiae*, otro precursor de la artemisinina, cuya molécula necesita menos pasos de modificación química comparado con el amorfa-4,11-dieno, para obtener artemisinina (Ro *et al.*, 2006). Esto se logró mediante la modificación de la regulación de la vía del mevalonato y la introducción de dos genes de *Artemisia annua* en la levadura. Por otro lado, la empresa LS9, con base en San Francisco, California reportó la modificación de *E. coli* mediante la incorporación de un circuito genético para producir alcanos y alquenos, principales constituyentes de los combustibles fósiles (gasolina, diesel y turbosina), mediante la inserción de la ruta biosintética de la cianobacteria *Synechococcus elongatus* (Schirmer *et al.*,

2010). La ruta biosintética incluye dos enzimas, una reductasa acarreadora de grupos acilo y una aldehído decarbonilasa, las cuales convierten los intermediarios del metabolismo de ácidos grasos en alcanos y alquenos. El hallazgo de dicha ruta, así como la posibilidad de ser transferida entre organismos, permitirá la conversión biológica de carbohidratos o azúcares en combustibles de bajo costo (Schirmer *et al.*, 2010). En el 2011, todos los genes involucrados en dicha ruta biosintética fueron construidos en formato de bioparte para su posterior uso en otros circuitos genéticos (<http://2011.igem.org/Team:Washington>).

La Biología Sintética, también ha generado alternativas para la biomedicina, mediante el diseño y construcción de diferentes microorganismos para atacar distintas infecciones virales y microbianas. Por ejemplo, para enfrentar el problema de las bacterias patógenas resistentes a antibióticos y que forman biopelículas, se han modificado virus que infectan a bacterias, para que eliminen a distintas poblaciones bacterianas (Lu y Collins 2007, 2009). Por ejemplo, fago lítico T7 fue modificado genéticamente para producir la enzima dispersina B, que degrada la matriz extracelular que mantiene agragadas a las células, mientras el fago infecta y lisa las células (Lu y Collins 2007). En otro estudio, se modificó genéticamente a la bacteria *E. coli* Nissle 1917, para que sintetizara el autoinductor CAI-1, el cual promueve la inhibición de los genes de virulencia de *Vibrio*

cholerae. La previa inoculación de la bacteria modificada en ratones disminuyó la colonización de *V. cholerae* y aumentó 85% la sobrevivencia de los ratones infectados (Duan y March 2010).

Algunas de las ideas más ambiciosas buscan crear construcciones genéticas que puedan detectar enfermedades y restauren las funciones saludables de las propias células del cuerpo. Un ejemplo de esto es el trabajo de Kemmer y colaboradores (2010), quienes diseñaron y probaron en ratones con expresión deficiente de la ureato-oxidasa (enzima que degrada el ácido úrico), un circuito genético codificante para producir una proteína que “sensa” el ácido úrico y, cuando hay un exceso, se produce la enzima ureato-oxidasa. Sin embargo, estos trabajos con aplicaciones directas en mamíferos aún son escasos, debido a que la mayoría de las herramientas para hacer biología sintética se han probado en bacterias y levaduras. Por lo que, se requiere que la biología sintética tenga un mayor desarrollo en células de mamífero, tejidos y en organismos (Constante *et al.*, 2011).

HERRAMIENTAS DE LA BIOLOGÍA SINTÉTICA PARA ENSAMBLAR VIDA

La biología sintética además de la biología molecular requiere de la información genética y las diferentes técnicas de ensamblaje sistemático y estandarizado de distintas secuencias de ADN, para generar información genética nueva. Por esta razón, una contribución importante para el progreso

de la biología sintética fue el desarrollo de una base de datos en Internet llamada “Registry of Standard Biological Parts” (<http://partsregistry.org>, 2012), con información genética que a la fecha, incluye más de cinco mil biopartes estandarizadas o “BioBricks”. Cada uno de estas biopartes consta de una secuencia de ADN con características particulares que permiten ensamblarlas sistemáticamente. Casi todas las biopartes que se encuentran en esta base de datos fueron desarrolladas por los equipos de alumnos e investigadores del mundo que participan en el concurso “International Genetically Engineered Machine Competition” (iGEM), en el cual se plantean y desarrollan proyectos de biología sintética (<http://www.igem.org>, 2012). Las aplicaciones de los proyectos que han ganado este concurso incluyen propuestas en campos tan diversos como la biotecnología, la biomedicina, la nanotecnología y las ciencias computacionales (Goodman, 2008).

Hoy en día se genera una extensa cantidad de datos gracias a las tecnologías como genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica que sirven de base para el desarrollo de nuevos circuitos genéticos (Nandagopal y Elowitz, 2011). Actualmente, se hace un gran esfuerzo para construir numerosos genes en formato de bioparte, caracterizar la interacción de las mismas con otras moléculas, su regulación, expresión y funcionalidad en diferentes organismos. La mayoría de los proyectos de biología sintética

que se han desarrollado hasta ahora, se basan en el conocimiento actual del funcionamiento de los organismos vivos. Sin embargo, la información es numerosa y creciente, por lo que se requiere de herramientas computacionales y matemáticas para integrar y hacer manejable esta gran cantidad de información, que sean una base clara para diseñar y construir sistemas biológicos artificiales.

Algunas de las herramientas computacionales ya existentes son “From Metabolite to Metabolite” (<http://fmm.mbc.nctu.edu.tw/>, 2012), con la que se pueden diseñar nuevas rutas metabólicas, o el “Standard Virtual Biological Parts”, que contiene una colección de modelos computacionales que ayudan a predecir el funcionamiento de un circuito genético, facilitando el diseño de circuitos genéticos antes de decidir cuál construir en el laboratorio (Cooling *et al.*, 2010). Por otro lado, aplicaciones como BioJADE, SynBioSS, GenoCAD y ClothoCAD buscan conjuntar el acceso a bases de datos de biopartes, el ensamblaje de nuevos circuitos genéticos y el modelaje matemático y computacional de los mismos (<http://web.mit.edu/jagoler/www/biojade/>, 2012; <http://synbio.ss.sourceforge.net/>, 2012; <http://www.genocad.org>, 2012; <http://www.clothocad.org/>, 2012). Aún con la ayuda de éste tipo de herramientas, un circuito optimizado puede no funcionar como se espera una vez que se construye y se introduce a un organismo, esto debido a la

complejidad inherente a todos los sistemas biológicos. Una manera de reducir dicha complejidad sería construir una “célula mínima”, que sólo tuviera la información genética necesaria para vivir y reproducirse. Por ejemplo, *Mycoplasma laboratorium* fue creada con éste propósito, siendo el organismo con el genoma más pequeño con sólo 382 genes (The J. Craig Venter Institute *et al.*, 2007).

Después del diseño de los circuitos, hay que construir una cadena de ADN con la información genética necesaria. Actualmente, la síntesis comercial de ADN la realizan compañías como Blue Heron, Geneart, DNA 2.0 y GenScript, aunque a un precio elevado en comparación con las técnicas estándar de biología molecular cuando se quieren ensamblar cadenas largas de ADN (amplificación, restricción, ligación, clonación, etc.). Para facilitar el ensamblaje se han propuesto métodos más eficientes, como el “Golden-Gate” (Engler *et al.*, 2008), el “ensamblaje Gibson” (Gibson *et al.*, 2009) y el “DNA assembler” (Shao *et al.*, 2009). Con esta última técnica, por ejemplo, se ha logrado el ensamblaje de 8 genes de una vía metabólica, formando una cadena de 19 mil nucleótidos de ADN en un solo paso; aunque el record de ensamblaje lo tiene el genoma sintético de *Mycoplasma mycoides*, de más de un millón de pares de bases, el cual fue ensamblado mediante recombinación homóloga, y además fue insertado con éxito en una célula a la que previamente se le

había extraído su propio genoma (Gibson *et al.*, 2010).

Además de diseñar información genética nueva, algunos científicos buscan codificarla de una manera diferente. Ya se han creado ARNs de transferencia que pueden incorporar aminoácidos modificados (Liu *et al.*, 2007). También, se han probado sistemas transcripcionales *in vitro* que usan codones de cuatro bases en vez de tres, los cuales codifican para aminoácidos no naturales (Taira *et al.*, 2005). El principal potencial de estos trabajos sería la posibilidad de incorporar aminoácidos con propiedades químicas y estructurales diferentes a los naturales para construir proteínas con nuevas propiedades y funciones.

LOS PROBLEMAS DE LA VIDA SINTÉTICA©

El Registro de Partes Biológicas Estandarizadas, al igual que las aplicaciones computacionales son gratuitas. Algunos investigadores opinan que las herramientas que permiten hacer biología sintética (biopartes, células mínimas, técnicas de laboratorio y programas computacionales) deberían estar disponibles para cualquiera que desee usarlas, y que sólo las aplicaciones específicas que se desarrollen deberían patentarse (Erickson *et al.*, 2011). Uno de los principales problemas con limitar el uso y distribución de las biopartes, y de cualquier herramienta que facilite la tarea de los biólogos sintéticos, es que cada grupo

tendría que desarrollar sus propias biopartes y herramientas, lo que se reflejaría en pérdida de tiempo y recursos (Peccoud *et al.*, 2011). Un ejemplo de ello es lo que sucede con varios de los proyectos que se publican en revistas científicas, donde sólo se presentan los datos finales y no las secuencias de ADN o estrategias que se utilizaron (Peccoud *et al.*, 2011). Por otro lado, la convergencia de la biología sintética con otros campos de la ciencia, en especial con las tecnologías de la información y la nanotecnología, dificulta la toma de decisiones sobre qué debería ser patentable (Parens *et al.*, 2009). Después de todo, a nivel molecular los sistemas biológicos pueden considerarse como máquinas moleculares, y la información genética aunque propia de los seres vivos, puede ser vista como otro tipo de información (Parens *et al.*, 2009).

Otro tema en discusión son los retos de bioseguridad que plantea el diseño de seres vivos (Schmidt, 2008; Schmidt *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2009). En todos los países se deben discutir y crear los marcos regulatorios adecuados para que estos nuevos organismos se construyan con fines benéficos, tomando todas las medidas precautorias (Schmidt *et al.*, 2008). Es por esto que tanto la comunidad científica como el público en general, necesitan entender el potencial y los límites de la biología sintética para aprovechar al máximo esta nueva disciplina. Con las aplicaciones que se desarrollen se mejorarán las expectativas de

vida, la sobrevivida ante diferentes enfermedades y padecimientos. Y no sólo eso, también se encontrarán nuevas maneras de producir energías renovables y alimentos para nuestro mundo en crecimiento, así como nuevos materiales que impactarán en la vida que conocemos.

EL DISEÑO DE UN SISTEMA BIOLÓGICO SIMULADOR DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

Simular en bacterias (como en *E. coli*) la recombinación somática que sucede durante la generación de anticuerpos en la maduración de linfocitos es un ejemplo claro de lo que se puede lograr con Biología Sintética. Es así como en nuestro grupo de investigación se ha logrado el ensamblaje de las secuencias nucleotídicas que tienen la información codificante para generar mediante recombinación proteínas basadas en la estructura de DARPinas. Las DARPinas son proteínas muy estables con estructura alfa enlazadas por “loops” de forma repetida (Stumpff *et al.*, 2008). Las DARPinas se derivan de repeticiones de ankirinas, que son una familia de proteínas de unión que se encuentran en mamíferos y particularmente en humanos (Lander *et al.*, 2001). Estas proteínas tienen por función biológica la unión a distintos blancos, debido a que poseen una superficie que interactúa con diferentes moléculas, además de que la repetición de los módulos que las conforman las hacen versátiles, variadas y diferentes en tamaño, sin que se altere su estructura

básica (Forrer *et al.*, 2004). A partir de las repeticiones de ankirinas, se han diseñado moléculas alternativas de reconocimiento por antígenos, entre ellas librerías de módulos de DARPinas (Forrer *et al.*, 2004). De los diferentes módulos obtenidos, se han construido proteínas con alta estabilidad, solubilidad y semejanza con la proteína de unión GA humana (Uniprot ID Q06547) (Stumpp *et al.*, 2008). Además, las DARPinas obtenidas son moléculas pequeñas, de aproximadamente una décima parte de un anticuerpo IgG convencional. Debido a sus propiedades, las DARPinas pueden ser usadas como andamiaje para el diseño de proteínas de reconocimiento de diferentes blancos, para su uso en biomedicina e investigación básica. Lo

anterior sustenta que en nuestro grupo estamos construyendo una secuencia sintética de ADN codificante para DARPinas, las cuales presentarán dominios conservados y distintos fragmentos variables que se introducirán mediante recombinación usando el sistema CRE/lox. El sistema sintético será incorporado en la Bacteria *E. coli*, para que produzca hasta 18 DARPinas diferentes. Usando los elementos estructurales de las DARPinas y los posibles cambios en diferentes aminoácidos que introducirá la recombinación, se realizó una predicción estructural *in silico* de las posibles 18 combinaciones esperadas (Fig. 1). Los modelos mostraron que no se alterará la estructura básica que le confiere estabilidad a las DARPinas (Fig. 1). De ser exitoso,

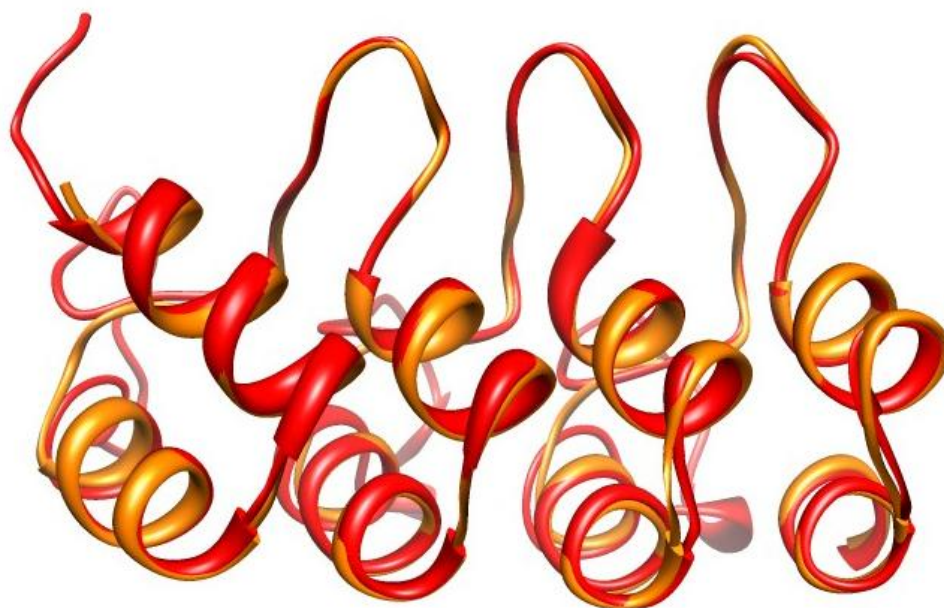


Fig. 1. Comparación estructural entre la DARPina consenso con PDB ID 2QYJ (anaranjado), y la predicción estructural de una de las proteínas producto del sistema de recombinación propuesto por nuestro grupo (rojo), usando el software I-TASSER (Ambrish *et al.*, 2010).

este mecanismo de recombinación en la bacteria, podría convertirse en el primer paso para desarrollar un método alternativo de producción de moléculas variables análogas a los anticuerpos monoclonales, con las ventajas estructurales de las DARPinas. Las DARPinas resultantes posteriormente deben ser caracterizadas y enfrentadas con distintos blancos para encontrar sus antígenos. Hasta ahora, este trabajo es de Ciencia Básica, y una vez que el sistema sintético sea funcional se pueden introducir de forma racional elementos de reconocimiento específico al andamiaje diseñado en este trabajo.

CONCLUSIONES

La Biología sintética aún está en sus inicios, sin embargo diversos trabajos muestran un claro desarrollo en la generación de nuevas terapias médicas, la obtención de biocombustibles y la producción de materiales novedosos. La identificación de conexiones entre las vías metabólicas, regulatorias, y de respuesta de las células, permitirá la construcción de circuitos genéticos, cada vez más complejos. De ahí que el desarrollo de nuevas herramientas computacionales sea necesario para identificar nuevos componentes que predigan el comportamiento de los sistemas sintéticos diseñados.

Los ejemplos presentados en este escrito dan una visión del potencial de la biología sintética. Particularmente, el modelo bacteriano diseñado en nuestro grupo del

proceso de recombinación somática, propia de células de nuestro sistema inmune, podría servir como un sistema alternativo para la producción de moléculas análogas a los anticuerpos.

Aunque los desarrollos de la biología sintética tienen problemas de tipo técnico, práctico, legal y ético, que tendrán que ser solucionados, la biología sintética seguirá creciendo con la incorporación de más disciplinas al campo, y será una de las principales herramientas para entender, diseñar y crear nuevos sistemas biológicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al CONACyT Ciencia Básica 104951-Z

REFERENCIAS

- Ambrish R, Alper K & Yang Z (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Prot.* 5: 725-738
- Constante, M, Grunberg R & Isalan M (2011) A biobrick library for cloning custom eukaryotic plasmids. *PLoS. One.* 6: 23685.
- Cooling, MT, Rouilly V, Misirli G, Lawson J, Yu T, *et al.* (2010) Standard virtual biological parts: a repository of modular modeling components for synthetic biology. *Bioinformatics.* 26: 925-931.
- Duan F & March JC (2010) Engineered bacterial communication prevents *Vibrio cholerae* virulence in an infant mouse

Artículos

- model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:11260-11264.
- Erickson B, Singh R & Winters P (2011) Synthetic biology: regulating industry uses of new biotechnologies. *Science* 333: 1254-1256.
- Engler C, Kandzia R & Marillonnet S (2008) A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLoS ONE* 3: e3647.
- Forrer P, Binz HK, Stumpp MT & Plückthun A. (2004) Consensus design of repeat proteins. *Chembiochem* 5: 183–189.
- Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC & Hutchison CA 3rd, *et al.* (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6: 343-345.
- Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, Noskov VN, Chuang RY, *et al.* (2010) Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 329: 52-56.
- Goodman C (2008). Engineering ingenuity at iGEM. *Nat. Chem. Biol.* 4: 13
- Kemmer C, Gitzinger M, Daoud-El Baba M, Djonov V, Stelling J *et al.* (2010) Self-sufficient control of urate homeostasis in mice by a synthetic circuit. *Nat. Biotechnol.* 28, 355–360.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, *et al.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860–921.
- Liu W, Brock A, Chen S, Chen S & Schultz PG (2007) Genetic incorporation of unnatural amino acids into proteins in mammalian cells. *Nat. Methods* 4:239-244.
- Lu TK & Collins JJ (2007). Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 11197-11202.
- Lu T K & Collins JJ (2009) Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 4629-4634.
- Martin VJJ, Pitera DJ, Withers ST, Newman JD & Keasling JD (2003) Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat. Biotech.* 21: 796-802.
- Nandagopal N & Elowitz MB (2011) Synthetic biology: integrated gene circuits. *Science* 333: 1244-1248.
- Parens E, Johnston J & Moses J (2009) Ethical Issues in Synthetic Biology: An Overview of the Debates, Woodrow Wilson International Center for Scholars, (disponible: www.synbioproject.org/library/publications/archive/synbio3/).
- Peccoud J, Anderson JC, Chandran D, Densmore D, Galdzicki M *et al.* (2011) Essential information for synthetic DNA sequences. *Nat. Biotechnol.* 29:22
- Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, *et al.* (2006) Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 440: 940-943.
- Shao Z, Zhao H & Zhao H (2009) DNA assembler, an in vivo genetic method for

Artículos

- rapid construction of biochemical pathways. *Nucl. Acids. Res.* 37: e16.
- Schirmer A, Rude MA, Li X, Popova E & del Cardayre SB (2010) Microbial Biosynthesis of Alkanes. *Science* 329: 559-562.
- Schmidt M (2008) Diffusion of synthetic biology: a challenge to biosafety. *Syst. Synth. Biol.* 2: 1-6.
- Schmidt M, Torgersen H, Ganguli-Mitra A, Kelle A, Deplazes A & Biller-Andorno N. (2008) SYNBIOSAFE e-conference: online community discussion on the societal aspects of synthetic biology. *Syst. Synth. Biol.* 2: 7-17.
- Schmidt M, Ganguli-Mitra A, Torgersen H, Kelle A, Deplazes A *et al.* (2009) A priority paper for the societal and ethical aspects of synthetic biology. *Syst. Synth. Biol.* 3: 3-7.
- Stumpp MT, Binz HK & Amstutz P (2008) DARPin: a new generation of protein therapeutics. *Drug Discov. Today* 13: 695-701.
- Taira H, Fukushima M, Hohsaka T & Sisido M (2005) Fourbase codon-mediated incorporation of non-natural amino acids into proteins in a eukaryotic cell-free translation system. *J. Biosci. Bioeng.* 99: 473-476.
- The J. Craig Venter Institute, Glass J, Smith HO, Hutchinson CA, Alperovich NY & Assad-Garcia N (2007) Minimal Bacterial Genome. World patent WO2007047148.