



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 312 630**

⑤1 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **02777570 .9**

⑨6 Fecha de presentación : **18.11.2002**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1446504**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **18.08.2004**

⑤4 Título: **Composiciones de emulsión.**

③0 Prioridad: **16.11.2001 GB 0127564**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

⑦3 Titular/es: **MEDICAL RESEARCH COUNCIL**
20 Park Crescent
London W1B 1AL, GB

⑦2 Inventor/es: **Holliger, Philipp y**
Ghadessy, F.

⑦4 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 312 630 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

Composiciones de emulsión.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, *inter alia*, a emulsiones adecuadas para la compartimentación de las reacciones de transcripción/traducción y a procedimientos que utilizan dichas emulsiones. En particular, las emulsiones son útiles para compartimentar las reacciones eucarióticas de transcripción/traducción *in vitro*.

10 **Antecedentes de la invención**

Recientemente se han desarrollado procedimientos de compartimentación a base de emulsiones agua-en-aceite con el fin de utilizarlas en procedimientos de selección de repertorio (Tawfik & Griffiths 1998, Ghadessy *et al* 2001). La compartimentación segrega genes individuales y sus productos codificados (ya sea administrados mediante células (Ghadessy *et al.*, 2001) o expresados *in situ* (Tawfik & Griffiths, 1998)) en compartimentos acuosos, discretos, físicamente separados, asegurando así la conexión de genotipo y fenotipo durante el procedimiento de selección.

El documento WO99/02671 describe un procedimiento de aislamiento de uno o más elementos genéticos codificantes de un producto génico con una actividad deseada. Primero se compartimentan los elementos genéticos en microcápsulas, que preferentemente se forman por emulsificación y a continuación se transcriben y/o traducen con el fin de generar los productos génicos respectivos (ARN o proteína) en el interior de las microcápsulas. Por el contrario, los elementos genéticos pueden estar comprendidos en las microcápsulas de la emulsión y la transcripción y/o traducción (expresión) del producto génico puede tener lugar en el interior de éstas utilizando la maquinaria celular. Los elementos genéticos que generan el producto génico con la actividad deseada se pueden separar a continuación. Por ejemplo, en algunos casos la separación puede producirse debido a que la actividad deseada induce un cambio en la microcápsula. En otros casos la separación puede ser consecuencia de que la actividad deseada induce un cambio en el elemento genético.

El procedimiento dado a conocer en el documento WO99/02671 funciona bien con bacterias. Aunque la estrategia de compartimentación subcelular pueda extenderse en principio para comprender las células eucarióticas, por ejemplo, las levaduras, células de insecto o mamífero, en algunas aplicaciones sería deseable proporcionar la expresión *in situ* directamente en microcápsulas utilizando un sistema de transcripción/traducción eucariótico *in vitro*.

Se ha informado del éxito de la expresión de un enzima eucariótico, metilasa *Hae*, utilizando una emulsión de extracto S30 bacteriano (Tawfik D. & Griffiths A.D. 1998). Sin embargo, dichos procedimientos no son adecuados para algunas proteínas de interés, por ejemplo, proteínas grandes multidominio y ribonucleoproteínas que frecuentemente no se pueden expresar en forma funcional utilizando extractos bacterianos.

Por consiguiente, se puede observar que un procedimiento que permita la expresión *in situ* directamente en microcápsulas utilizando un sistema de transcripción/traducción eucariótico *in vitro* proporcionaría una contribución en la técnica.

Sumario de la invención

En consecuencia, en un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una emulsión que comprende un surfactante, una fase hidrófoba y una fase hidrófila que comprende una pluralidad de microcápsulas que comprenden un sistema de expresión eucariótico *in vitro*, en el que dicho surfactante es un surfactante a base de silicona químicamente inerte.

Durante el desarrollo de dicho procedimiento, los inventores encontraron repetidamente problemas para el mantenimiento de la capacidad para una eficaz transcripción/traducción de un sistema eucariótico, en particular del sistema de reticulocito de conejo lisado en emulsión. Tal como se describe más adelante, las múltiples modificaciones de las composiciones de emulsión utilizadas con los sistemas de expresión eucarióticos no tuvieron éxito en conferir dicha capacidad. Sin embargo, fue sorprendente descubrir que, cuando se utilizaron surfactantes de silicona químicamente inertes en las composiciones de emulsión, la eficacia de la transcripción de los sistemas de transcripción/traducción eucarióticos mejoró notablemente.

La emulsión permite la conexión del genotipo y el fenotipo debido a la compartimentación del sistema de expresión eucariótico, a la vez que evita muchas de las desventajas de los sistemas a base de células. Así, por ejemplo, permite que los productos génicos se obtengan sin la necesidad de extracción o secreción de las células.

En consecuencia, en un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de aislamiento de uno o más elementos genéticos que codifican el producto génico con la actividad deseada, que comprende las etapas siguientes:

- (a) compartimentar los elementos genéticos en microcápsulas formadas a partir de la emulsión de la presente invención,

- (b) expresar los elementos genéticos con el fin de preparar los productos génicos respectivos en el interior de las microcápsulas;
- (c) separar los elementos genéticos que producen los productos génicos con la actividad deseada.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento destinado a preparar un producto génico, que comprende las etapas siguientes:

- (a) preparar un elemento genético codificante del producto génico;
- (b) compartimentar elementos genéticos en microcápsulas formadas a partir de una emulsión de la presente invención;
- (c) expresar los elementos genéticos con el fin de preparar los respectivos productos génicos en el interior de las microcápsulas;
- (d) separar los elementos genéticos que producen los productos génicos con la actividad deseada; y
- (e) expresar los productos génicos con la actividad deseada.

Según este aspecto de la presente invención, la etapa (a) preferentemente comprende preparar un repertorio de elementos genéticos, en el que cada elemento genético codifica el producto génico potencialmente diferente. Los repertorios se pueden generar mediante procedimientos convencionales, tales como los utilizados en la generación de bibliotecas destinadas a la selección mediante procedimientos tales como el despliegue en fagos. Los productos génicos provistos de la actividad deseada se pueden seleccionar de entre los repertorios, según la presente invención.

Un cuarto aspecto de la presente invención proporciona un producto seleccionado mediante la utilización del procedimiento del segundo aspecto de la presente invención destinado o preparado según el tercer aspecto de la presente invención. Tal como se utiliza en la presente memoria, un “producto” se refiere al producto génico seleccionado o preparado según este aspecto, o el elemento genético (o la información genética comprendida en el mismo).

Se describe asimismo un procedimiento destinado a cribar un compuesto o compuestos capaces de modular la actividad del producto génico, que comprende las etapas siguientes:

- (a) preparar un repertorio de elementos genéticos codificantes del producto génico;
- (b) compartimentar los elementos genéticos en microcápsulas formadas a partir de una emulsión de la presente invención;
- (c) expresar los elementos genéticos con el fin de preparar los respectivos productos génicos en el interior de las microcápsulas;
- (d) separar los elementos genéticos que producen los productos génicos provistos de la actividad deseada; y
- (e) poner en contacto el producto génico provisto de la actividad deseada con el compuesto o compuestos y seguir la modulación de una actividad del producto génico por el compuesto o compuestos.

En el contexto de la presente invención, se considera que un surfactante es “químicamente inerte” si está sustancialmente libre de especies oxidantes, tales como peróxidos y aldehídos y especies desnaturizantes de las proteínas. Se consideran “sustancialmente libre” de especies oxidantes y especies desnaturizantes a los surfactantes 40%, preferentemente 50%, más preferentemente 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% menos de especies oxidantes y especies desnaturizantes de las proteínas que cualquiera de entre el monooleato de sorbinato convencional (Span®80; ICI) y el emulgente monooleato de polioxietilensorbitano (Tween® 80; ICI).

En la presente memoria se utilizan los términos “aislando”, “separando” y “seleccionando”, así como también las variaciones de los mismos. Aislamiento, según la presente invención, se refiere a un procedimiento de separación de una entidad de una población heterogénea, por ejemplo, una mezcla, de tal modo que queda libre de por lo menos una sustancia con la que se encontraba asociada antes del procedimiento de aislamiento. En una forma de realización preferida de la presente invención, aislamiento se refiere a la purificación de una entidad esencialmente hasta la homogeneidad. Separación de una entidad se refiere a un procedimiento de aislar preferentemente las entidades deseadas de las entidades no deseadas. En lo que se refiere al aislamiento de las entidades deseadas, los términos “aislando” y “separando” son equivalentes. El procedimiento de la presente invención permite la separación de los elementos genéticos deseados de un conjunto (librerías o repertorios) de elementos genéticos que comprenden el elemento genético deseado. En la presente invención “seleccionando” se utiliza con el fin de significar el procedimiento (incluyendo el procedimiento de separar) de aislar una entidad según una propiedad particular del mismo.

ES 2 312 630 T3

En una forma de realización preferida de los procedimientos de la presente invención, la separación de elementos genéticos se puede realizar mediante uno de entre esencialmente cuatro procedimientos, cuyos detalles se dan a conocer en el documento WO99/02671.

- (I) En una primera forma de realización, las microcápsulas se separan según una actividad del producto génico o un derivado del mismo que hace que las microcápsulas sean detectables en conjunto. En consecuencia, la invención proporciona un procedimiento según el segundo aspecto de la presente invención en el que el producto génico con la actividad deseada induce un cambio en la microcápsula, o una modificación de una o más moléculas en el interior de la microcápsula, que permite la separación de la microcápsula que comprende el producto génico y el elemento genético que lo codifica. En esta forma de realización, por consiguiente, las microcápsulas se separan físicamente entre sí según la actividad del producto génico expresado a partir del elemento genético comprendido en ellas, lo que hace posible enriquecer selectivamente las microcápsulas que comprenden los productos génicos con la actividad deseada.
- (II) En una segunda forma de realización, los elementos genéticos se separan después de la acumulación de las microcápsulas en uno o más compartimentos comunes. En esta forma de realización, el producto génico con la actividad deseada modifica el elemento genético que lo codifica (y que reside en la misma microcápsula) de tal modo que la hace seleccionable en una etapa siguiente. Las reacciones se detienen y las microcápsulas se abren de modo que se acumule el contenido de las microcápsulas individuales. La selección de los elementos genéticos modificados permite el enriquecimiento de los elementos genéticos que codifican el producto génico con la actividad deseada. En consecuencia, la presente invención proporciona un procedimiento según el segundo aspecto de la invención, en el que en la etapa (b) el producto génico con la actividad deseada modifica el elemento genético que lo codifica con el fin de permitir el aislamiento del elemento genético. Se deberá entender, evidentemente, que la modificación puede ser directa, producida por la acción directa del producto génico sobre el elemento genético, o indirecta, en la que una serie de reacciones, una o más de las cuales implica el producto génico que tiene la actividad deseada, conducen a la modificación del elemento genético.
- (III) En una tercera forma de realización, los elementos genéticos se separan después de acumular las microcápsulas en uno o más compartimentos comunes. En esta forma de realización, un gen con la actividad deseada induce un cambio en la microcápsula que comprende el producto génico y el elemento genético que lo codifica. Este cambio, cuando se detecta, dispara la modificación del gen en la microcápsula. Las reacciones se detienen y se rompen las microcápsulas de modo que se acumula todo el contenido de las microcápsulas individuales. La selección de los elementos genéticos modificados permite el enriquecimiento de los elementos genéticos que codifican el (los) producto(s) génico(s) con la actividad deseada. En consecuencia, la invención proporciona un procedimiento según un segundo aspecto de la presente invención, en el que en la etapa (b) el producto génico con la actividad deseada induce un cambio en la microcápsula que se detecta y dispara la modificación del elemento genético en la microcápsula de modo que permite su aislamiento. Se deberá entender que el cambio detectado en la microcápsula puede estar causado por la acción directa del producto génico, o por la acción indirecta, en la que una serie de reacciones, una o más de las cuales implica el producto génico con la actividad deseada, conducen al cambio detectado.
- (IV) En una cuarta forma de realización, los elementos genéticos se pueden separar mediante un proceso de múltiples etapas, que implica por lo menos dos etapas, por ejemplo, con el fin de permitir la exposición de los elementos genéticos a unas condiciones que permitan que tengan lugar por lo menos dos reacciones diferentes. Tal como resultará evidente para los expertos en la materia, la primera etapa de encapsulación de la presente invención debe producir condiciones que permitan la expresión de los elementos genéticos - sea esta transcripción, transcripción y/o traducción, replicación o similares. En estas condiciones, puede no ser posible seleccionar la actividad del producto génico en particular, por ejemplo, debido a que el producto génico puede ser inactivo en dichas condiciones, o porque el sistema de expresión comprenda una actividad interferente. La presente invención, por consiguiente, proporciona un procedimiento según un segundo aspecto de la presente invención, en el que la etapa (b) comprende expresar los elementos genéticos con el fin de preparar los respectivos productos génicos en el interior de las microcápsulas, conectando los productos génicos a los elementos genéticos que los codifican y aislando los complejos así formados. Esto permite aislar los elementos genéticos y los productos génicos asociados a ellos de las microcápsulas antes de que tenga lugar la separación según el producto génico. En una forma de realización preferida, los complejos se someten a una etapa adicional de compartimentación antes de aislar los elementos genéticos que codifican el producto génico con la actividad deseada. Esta etapa de compartimentación adicional, que tiene lugar ventajosamente en las microcápsulas, permite la realización de reacciones adicionales, en diferentes condiciones, en un ambiente en el que los elementos genéticos y sus productos respectivos están físicamente conectados. La separación eventual de los elementos genéticos se puede realizar según las anteriores formas de realización (I), (II) o (III).

También se puede realizar la “encapsulación secundaria” con los elementos genéticos conectados a los productos génicos mediante otros procedimientos, tales como mediante despliegue en fagos, despliegue en polisomas, fusión de ARN-péptido o fusión de represor lac-péptido.

El (los) elemento(s) genético(s) seleccionado(s) también se puede(n) someter a ciclos siguientes, posiblemente más astringentes de separación en etapas reiterativamente repetidas, reapplicando el procedimiento de la invención en su totalidad o en solamente etapas seleccionadas. Mediante el ajuste de las condiciones adecuadas, se pueden aislar, después de cada ciclo de selección, elementos genéticos que codifican productos génicos con actividades más optimizadas.

Además, los elementos genéticos aislados después del primer ciclo de separación se pueden someter a mutagénesis antes de repetir la separación mediante repeticiones reiteradas de las etapas del procedimiento de la presente invención según se ha descrito anteriormente. Después de cada ciclo de mutagénesis, algunos elementos genéticos habrán sido modificados de tal modo que se habrá amplificado la actividad de los productos génicos.

Además, los elementos genéticos seleccionados se pueden clonar en vectores de expresión con el fin de permitir una caracterización adicional de los elementos genéticos y sus productos. Los expertos en la materia conocen una pluralidad de vectores adecuados. Los vectores pueden ser, por ejemplo, virus, plásmidos o vectores de fago provistos de un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión del elemento genético y opcionalmente un regulador del promotor. Los vectores pueden comprender un marcador genético seleccionable, por ejemplo, el gen de resistencia a la neomicina para los vectores de mamíferos.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra emulsiones formadas mediante la mezcla de una fase oleosa con un lisado de reticulocitos de conejo (RRL) durante 1,5 minutos y fotografiado en el espectro visible después de 15 minutos de incubación a 30°C. De izquierda a derecha: 1) mezcla CSR, 2) mezcla CSR + DTT, 3) 1,5% Span® 80 en aceite mineral, 4) 1,5% Span® 80 en aceite mineral + DTT, 5) 4% Abil EM90, 6) 4% Abil EM90 + DTT.

La Figura 2 muestra la imagen en modo de contraste de fase de una emulsión de 4% Abil EM90 en aceite mineral. La distancia entre las barras es de 10 µm.

La Figura 3 muestra los resultados de expresión de telomerasa:

Panel A (no emulsionado); Carril 1, hTERT (75 ng); Carril 2, hTR (75 ng); Carril 3, hTERT + hTR; Carril 4, sin construcción; Carril 5, Construcción de expresión WT en secuencia (150 ng); Carril 6, construcción de mutantes de delección en secuencia (150 ng).

Panel B: En emulsión, la anotación de los carriles es como en el panel A.

Descripción detallada

Emulsiones

Las emulsiones son sistemas heterogéneos de dos fases líquidas inmiscibles con una de las fases dispersada en la otra en forma de pequeñas gotas microscópicas o de tamaño coloidal (Becher, 1957; Sherman, 1968; Lissant, 1984). Las emulsiones de la presente invención deben permitir la formación de microcápsulas.

Las emulsiones se pueden preparar a partir de cualquier combinación adecuada de líquidos inmiscibles. La emulsión de la presente invención presenta una fase hidrófila (que comprende los componentes bioquímicos) como la fase presente en forma de pequeñas gotas finamente divididas (la fase dispersa, interna o discontinua) y una fase hidrófoba, líquido inmiscible (un aceite) como matriz en la que las pequeñas gotas están suspendidas (la fase no dispersa, continua o fase externa). Dichas emulsiones se refieren como “agua-en-aceite” (W/O). Esto tiene la ventaja de que toda la fase acuosa que comprende los componentes bioquímicos está compartimentada en pequeñas gotas discretas (la fase interna). La fase externa, siendo un aceite hidrófobo, generalmente no comprende ningún componente bioquímico y por consiguiente es inerte.

La preparación de una emulsión necesita generalmente la aplicación de energía mecánica con el fin de forzar la unión de las fases. Existe una pluralidad de formas para ello que utilizan múltiples dispositivos mecánicos, que comprenden agitadores (tales como barras magnéticas agitadoras, agitadores de hélice y turbina, mecanismos de palas y batidoras), homogeneizadores (que comprenden los homogeneizadores de rotor estator, homogeneizadores de válvula de presión elevada y homogeneizadores de chorro), molinos coloidales, aparatos emulsificadores de ultrasonidos y de membrana (Becher, 1957; Dickinson, 1994).

Es deseable que la emulsión sea estable durante la incubación a 30°C durante por lo menos una hora. En algunos casos es preferible que también sea estable a temperaturas más elevadas, especialmente si se utiliza termociclaje durante los procedimientos de amplificación por PCR y otros.

Surfactantes

Las emulsiones de la presente invención se estabilizan mediante la adición de uno o más agentes de acción superficial (surfactantes). Dichos surfactantes se refieren como agentes emulgentes y funcionan en la interfase agua/aceite

evitando (o por lo menos retardando) la separación de las fases. Se pueden utilizar muchos aceites y muchos emulgentes con el fin de generar emulsiones de agua en aceite, una compilación reciente lista más de 16.000 surfactantes, muchos de los cuales se utilizan como emulgentes (Ash y Ash, 1993).

5 Sin embargo, tal como se describe en los Ejemplos, los surfactantes utilizados convencionalmente en las aplicaciones de emulsiones tales como los surfactantes no iónicos (Schick, 1966), por ejemplo, el monooleato de sorbitano (Span[®]80; ICI) y el monooleato de polioxietilensorbitano (Tween[®]80; ICI) no son adecuados para una expresión eucariótica *in vitro* eficaz con lisado de reticulocitos de conejo.

10 Sin embargo, tal como se describe en la presente memoria, dicha expresión se puede mantener cuando se utilizan surfactantes a base de silicona químicamente inerte.

Preferentemente, el surfactante a base de silicona químicamente inerte de la emulsión es co-polímero de silicona.

15 Más preferentemente el surfactante comprende un co-polímero de polisiloxano-policetil-polietilenglicol (Copoliol de cetildimeticona) por ejemplo Abil[®] EM90 (Goldschmidt).

20 El surfactante a base de silicona químicamente inerte se puede proporcionar como el único surfactante en la composición de emulsión o se puede proporcionar como uno de entre múltiples surfactantes. Por ejemplo se puede utilizar una mezcla de surfactantes diferentes.

25 En una forma de realización preferida, el surfactante se proporciona a una concentración volumen/volumen en la fase oleosa de la emulsión comprendida entre el 0,5 y el 20%, preferentemente entre el 1 y el 10%, más preferentemente entre el 3 y el 5%.

En una forma de realización muy preferida, el surfactante se proporciona a una concentración v/v en la fase oleosa del 4%.

30 En una forma de realización muy preferida de la presente invención, la emulsión se prepara mediante la adición gota a gota de una fase acuosa a la fase oleosa en presencia de un surfactante que comprende entre el 3 y el 5% (v/v) de copolímero polisiloxano-policetil-polietilenglicol en aceite mineral, preferentemente en una proporción de fase oleosa:fase acuosa de 2,5:1.

35 El surfactante puede estar presente inicialmente con la composición hidrófoba. Por consiguiente, una composición que comprenda el surfactante y la composición hidrófoba representa un aspecto adicional de la presente invención.

Por el contrario, el surfactante se puede añadir en una etapa más adelante, por ejemplo, durante o después de mezclar las fases hidrófoba e hidrófila.

40 En esta forma de realización, el surfactante se puede proporcionar en un equipo, junto con la composición hidrófoba. El equipo puede comprender además opcionalmente un sistema de expresión eucariótico tal como lisado de reticulocitos de conejo y/o un mecanismo para mezclar las fases hidrófoba e hidrófila. Puede comprender además instrucciones para su utilización con el fin de proporcionar una emulsión de la presente invención.

45 Por el contrario, el surfactante puede estar presente inicialmente en la composición hidrófila.

Microcápsulas

50 El término "microcápsula" es sinónimo de "compartimento" y los términos se utilizan de modo intercambiable. En esencia, una microcápsula es un compartimento artificial cuyos bordes de delimitación limitan el intercambio de los componentes del mecanismo molecular descrito en la presente memoria, lo que permite la separación de los elementos genéticos según la función de los productos genéticos que los codifican.

55 Las microcápsulas formadas por la emulsión requieren propiedades físicas apropiadas para que pueda funcionar la invención. En particular, el contenido de cada microcápsula debe estar aislado del contenido de las microcápsulas circundantes.

60 Preferentemente, las microcápsulas utilizadas en el procedimiento de la presente invención se podrán preparar en grandes cantidades, y de ese modo compartimentar una biblioteca de elementos genéticos que codifica un repertorio de productos genéticos. La función de las microcápsulas es permitir la co-localización del ácido nucleico y el correspondiente polipéptido codificado por el ácido nucleico. Esto se logra preferentemente debido a la capacidad de las microcápsulas para limitar sustancialmente la difusión de las cadenas patrón y producto a otras microcápsulas.

65 En segundo lugar, los procedimientos de la presente invención requieren que exista solamente un número limitado de elementos genéticos por microcápsula formada en la emulsión. Esto asegura que el producto génico de un elemento genético individual esté aislado de los demás elementos genéticos. Así, el acoplamiento del elemento genético y el producto génico será muy específico. El factor de enriquecimiento es máximo con un promedio de uno o menos elementos genéticos por microcápsula, o dos o más copias de un solo elemento genético por microcápsula, siendo la

conexión entre el ácido nucleico y la actividad codificada por el producto génico lo más próxima posible, ya que el producto génico de un elemento genético individual estará aislado de los productos de los demás elementos genéticos. Sin embargo, incluso si la situación teóricamente óptima de, en promedio, un solo elemento genético o menos por microcápsula no se utilice, una proporción de 5, 10, 50, 100 ó 1.000 o más elementos genéticos por microcápsula puede demostrar ser beneficiosa para separar una biblioteca grande. Subsiguientes ciclos de separación, que comprende nuevas encapsulaciones con distribuciones diferentes de elementos genéticos, permitirá una separación más astringente de los elementos genéticos. Preferentemente, hay uno o menos elementos genéticos por microcápsula.

En tercer lugar, la formación y la composición de las microcápsulas no debe abolir el funcionamiento de la maquinaria de expresión de los elementos genéticos y la actividad del producto génico utilizando sistemas de expresión eucariótica *in vitro*.

En consecuencia, las microcápsulas formadas mediante la emulsión deben cumplir estos tres requisitos. La emulsión apropiada puede oscilar dependiendo de la naturaleza precisa de las necesidades en cada aplicación de la presente invención, tal como resultará evidente para un experto en la materia.

El tamaño preferido de microcápsula dependerá de los requisitos precisos de cada procedimiento de selección individual que se deba realizar según la presente invención. En todos los casos, la principal consideración es la necesidad de la concentración necesaria de componentes en los compartimentos individuales para lograr una transcripción/traducción eficaz. Esto puede estar equilibrado con otros requisitos que pueden estar relacionados con el tamaño de la biblioteca de genes, enriquecimiento o procedimiento de separación.

Si se proporcionan microcápsulas pequeñas, se puede proporcionar un gran número de microcápsulas discretas en un pequeño volumen de emulsión. Además la provisión de pequeñas microcápsulas incrementa la selectividad al incrementar la posibilidad de que solo se produzca el producto génico en una microcápsula determinada. Por consiguiente es preferible que en promedio no haya más de un elemento genético que se deba transcribir/traducir por compartimento, con el fin de mantener la conexión entre el ácido nucleico y la actividad del producto codificado por el gen lo más próxima posible. Sin embargo, incluso si no se utiliza la situación teóricamente óptima de, en promedio, un solo elemento genético o menos por microcápsula, una proporción de 5, 10, 50, 100 ó 1.000 o más elementos genéticos por microcápsula puede resultar beneficiosa en la separación de un librería grande. Los siguientes ciclos de separación, comprendiendo encapsulación renovada con una distribución diferente de elementos genéticos, permitirán una separación más astringente de los elementos genéticos. Preferentemente, en promedio no debe haber más de un solo elemento genético por microcápsula.

Sería deseable que el volumen medio de las microcápsulas fuese inferior a $5,2 \times 10^{-16} \text{ m}^3$, (correspondiente a una microcápsula esférica de diámetro inferior a $10 \mu\text{m}$), más preferentemente inferior a $6,5 \times 10^{-17} \text{ m}^3$ (correspondiente a una microcápsula esférica de diámetro inferior a $5 \mu\text{m}$), todavía más preferentemente aproximadamente $4,2 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ (correspondiente a una microcápsula esférica de un diámetro aproximado de $2 \mu\text{m}$).

La concentración efectiva de ADN o ARN en las microcápsulas puede incrementarse artificialmente mediante múltiples procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la materia. Éstos comprenden, por ejemplo, la adición de productos químicos que excluyen el volumen, tales como los polietilenglicoles (PEG) y múltiples procedimientos de amplificación génica, comprendiendo transcripción utilizando ARN polimerasas comprendiendo las de las bacterias tales como *E. coli* (Roberts, 1969; Blattner and Dahlberg, 1972; Roberts *et al.*, 1975; Rosenberg *et al.*, 1975), eucariotas, por ejemplo (Weil *et al.*, 1979; Manley *et al.*, 1983) y de bacteriófago tales como la T7, T3 y SP6 (Melton *et al.*, 1984); la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1988); amplificación por replicasa Q β (Miele *et al.*, 1983; Cahill *et al.*, 1991; Chetverin y Spirin, 1995; Katanaev *et al.*, 1995); la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Landegren *et al.*, 1988; Barany, 1991); y los sistemas de replicación de secuencias autosostenidos (Fahy *et al.*, 1991) y la amplificación por desplazamiento de cadena (Walker *et al.*, 1992). Los procedimientos de amplificación de genes que utilizan ventajosamente el termo ciclado (tal como la PCR y LCR) se pueden utilizar si la emulsión y los sistemas de transcripción *in vitro* o la transcripción acoplada a traducción son termoestables.

El incremento de la concentración local efectiva de ácido nucleico permite que las microcápsulas se utilicen más efectivamente. Así, se pueden utilizar microcápsulas con volúmenes de hasta $5,2 \times 10^{-16} \text{ m}^3$ (correspondientes a diámetros esféricos de $10 \mu\text{m}$) para múltiples propósitos, aunque desde luego también se pueden utilizar microcápsulas de volúmenes superiores, si se desea.

El tamaño de las microcápsulas deberá ser suficientemente grande para alojar todos los componentes necesarios para las reacciones bioquímicas que deberán tener lugar en el interior de las microcápsulas. Por ejemplo, *in vitro*, las reacciones de transcripción y las reacciones acopladas de transcripción-traducción requieren una concentración total de nucleósido trifosfatos de aproximadamente 2 mM.

También se deberá advertir que, con el fin de transcribir un gen en una sola molécula de ARN corto de 500 bases de longitud, se necesitaría un mínimo de 500 moléculas de nucleósido trifosfato por microcápsula ($8,33 \times 10^{-22}$ moles). Con el fin de generar una disolución 2 mM, este número de moléculas debe estar comprendido en una microcápsula con un volumen de $4,17 \times 10^{-19}$ litros ($4,17 \times 10^{-22} \text{ m}^3$), que, si es esférica, tendría un diámetro de 93 nm.

Además, particularmente en el caso de reacciones que implican traducción también se deberá advertir que los ribosomas eucarióticos necesarios para que tenga lugar la traducción son propiamente de aproximadamente 30 nm en diámetro. En consecuencia, el límite inferior preferido para las microcápsulas es un diámetro de aproximadamente 0,1 μm (100 nm).

Por consiguiente, el volumen de las microcápsulas es del orden de entre $5,2 \times 10^{-22}$ y $5,2 \times 10^{-16} \text{ m}^3$ que corresponde a esferas de un diámetro comprendido entre 0,1 μm y 10 μm , más preferentemente de entre aproximadamente $5,2 \times 10^{-19} \text{ m}^3$ y $6,5 \times 10^{-17} \text{ m}^3$ (1 μm y 5 μm).

Aunque las microcápsulas pequeñas son preferibles en ciertas aplicaciones, tales como los procedimientos dados a conocer en el documento WO99/02671, es importante advertir que la presente invención no está en modo alguno limitada a proporcionar microcápsulas pequeñas y que los sistemas de transcripción y traducción también funcionan en microcápsulas grandes.

El tamaño de las microcápsulas de la emulsión se puede modificar simplemente ajustando las condiciones de la emulsificación utilizadas con el fin de generar la emulsión según los requisitos del sistema de selección.

El tamaño del compartimento se puede modificar (dentro de ciertos límites de estabilidad de la emulsión e inactivación del RRL) mediante 1) el incremento del tiempo de mezclado, 2) diferentes proporciones W/O, 3) diferente concentración de surfactante.

La distribución de los tamaños de las microcápsulas en las emulsiones se puede determinar mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, la distribución de tamaños se puede ensayar utilizando difracción de láser (por ejemplo, utilizando un Coulter LS230 Particle Size Analyzer) o mediante examen al microscopio.

Expresión

“Expresión”, tal como se utiliza en la presente memoria, tiene un significado amplio, se refiere a que un ácido nucleico comprendido en el elemento genético se convierte en el producto génico. Así, cuando el ácido nucleico es ADN, expresión se refiere a la transcripción del ADN en ARN; cuando este ARN codifica una proteína, “expresión” también se puede referir a la traducción del ARN a proteína. Cuando el ácido nucleico es ARN, “expresión” puede referirse a la replicación de este ARN en otras copias de ARN, la transcripción inversa del ARN en ADN y opcionalmente la transcripción de este ADN en moléculas adicionales de ARN, así como opcionalmente la traducción de cualquier especie de ARN generada en proteína. Preferentemente, por consiguiente, la “expresión” se realiza mediante uno o más de los procesos seleccionados de entre el grupo que comprende transcripción, transcripción inversa, replicación y traducción.

La “expresión” del elemento genético puede por consiguiente estar dirigida a ADN, ARN o proteína, o ácido nucleico o proteína que comprende bases o aminoácidos no naturales (el producto génico) en el interior de la microcápsula de la presente invención, de modo que el producto génico esté confinado en el interior de la misma microcápsula que el elemento genético.

Sistemas de expresión

Se puede utilizar un sistema de expresión eucariótico *in vitro* cualquiera en la emulsión de la presente invención, con la condición de que comprenda los componentes para la transcripción y/o traducción. Si se desea glicosilación, también pueden estar presentes una o más glicosilasas, según sea apropiado con el fin de lograr el patrón de glicosilación deseado.

El sistema de expresión puede, por ejemplo, comprender la totalidad o parte de un lisado celular o extracto, por ejemplo se puede utilizar extracto de germen de trigo (Anderson *et al.*, 1983) y está disponible de Promega. Deseablemente, sin embargo, el lisado celular es un lisado celular de mamífero. Puede ser un lisado de reticulocitos. Un lisado de reticulocitos preferido es el lisado de reticulocitos de conejo (un “RRL”). El sistema de RRL está bien caracterizado (véase por ejemplo, Pelma y Jackson, 1976) y se encuentra disponible en Promega.

Sin embargo, se puede utilizar cualquier sistema de expresión eucariótico conveniente preparado a partir de extractos celulares. Los extractos deben comprender todos los componentes necesarios para la traducción del ARN (por ejemplo ribosomas, ARNt, aminoacil-ARNt sintetasa, factores de iniciación, elongación y terminación etc., estando los extractos preferentemente suplidos con aminoácidos, ATP, GTP, fosfato de creatina y creatina fosfoquinasa, otros cofactores tales como Mg^{2+}).

Mediante la utilización de las emulsiones de la presente invención es posible obtener una expresión apreciable de un elemento genético y/o la actividad del producto génico utilizando un sistema de expresión eucariótica *in vitro* presente en la emulsión. La expresión y/o actividad son deseables a un nivel de por lo menos el 1% de la obtenible por el producto génico con el sistema de expresión antes de la formación de la emulsión. Más preferentemente es de por lo menos el 10%, 20% o 30% de dicho nivel y/o actividad.

Elementos genéticos

Un “elemento genético” es una molécula o construcción molecular que comprende ácido nucleico. Los elementos genéticos de la presente invención pueden comprender un ácido nucleico cualquiera (por ejemplo ADN, ARN o cualquier análogo, natural o artificial, de los mismos).

En los sistemas de transcripción y/o traducción se pueden utilizar ácidos nucleicos codificantes de un producto cualquiera adecuado. Además de las secuencias codificantes, los ácidos nucleicos pueden, por ejemplo, comprender promotores, operadores, amplificadores, secuencias iniciadoras de la traducción y transcripción, secuencias de polia-

denilación, lugares de corte, regiones reguladoras corriente arriba y corriente abajo, etc., tal como se requiere en la transcripción y/o traducción. En algunos casos puede ser preferible utilizar promotores inducibles y/o sensibles a la temperatura con el fin de asegurar que la expresión tiene lugar solamente en una etapa particular.

El componente de ácido nucleico del elemento genético puede además estar conectado, covalentemente o no covalentemente, a una o más moléculas o estructuras, que comprenden polipéptidos, péptidos, entidades químicas y grupos, soportes de fase sólida tales como cuantas magnéticas y similares. En los procedimientos de la presente invención, estas estructuras o moléculas se pueden diseñar con el fin de asistir en la separación y/o separación de los elementos genéticos que codifican el producto génico con la actividad deseada.

Tal como resultará evidente a partir de lo que sigue, en muchos casos el polipéptido u otro grupo molecular o construcción es un ligando o un sustrato que directa o indirectamente se une, o reacciona con el producto génico con el fin de marcar el elemento genético. Esto permite la separación del elemento genético con base en la actividad del producto génico.

El ligando o sustrato se pueden conectar al ácido nucleico mediante una pluralidad de medios que resultarán evidentes para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Hermanson, 1996). Será suficiente una etiqueta cualquiera que permita la subsiguiente selección del elemento genético. La separación puede ser mediante un procedimiento cualquiera que permita la separación preferente, amplificación o supervivencia del elemento genético etiquetado. Los ejemplos comprenden la selección mediante la unión (comprendiendo las técnicas basadas en separación magnética, por ejemplo Dynabeads®) y mediante la resistencia a la degradación (por ejemplo por nucleasas, comprendiendo endonucleasas de restricción).

Un modo en que se puede unir la molécula de ácido nucleico a un ligando o sustrato es mediante biotinylation. Esto se puede realizar mediante amplificación PCR con un cebador 5'-biotinylation de modo que la biotina y el ácido nucleico se enlazan covalentemente. Un ácido nucleico biotinylation se puede enlazar a una microcuenta de poliestireno (0,035 a 0,2 μ m de diámetro) recubierta de avidina o estreptavidina, que por consiguiente se unirá al ácido nucleico con elevada afinidad. Esta cuenta se puede derivatizar con un sustrato o ligando mediante cualquier procedimiento adecuado tal como mediante la adición de un sustrato biotinylation o mediante enlace covalente.

Por el contrario, un ácido nucleico biotinylation se puede acoplar a avidina o estreptavidina acoplejada a una molécula de proteína grande tal como tiroglobulina (669 Kd) o ferritina (440 Kd). Este complejo se puede derivatizar con sustrato o ligando, por ejemplo mediante enlace covalente al grupo amino de la lisina o a través de una interacción no covalente tal como la de biotina-avidina. El sustrato se puede encontrar en forma no enlazada al elemento genético pero comprendiendo una etiqueta inactiva que necesita una etapa adicional para activarse, tal como una fotoactivación [por ejemplo un análogo “enjaulado” de la biotina, (Sundberg *et al.*, 1995; Pirrung y Huang, 1996)]. El catalizador que se debe seleccionar convierte a continuación al sustrato en producto. La “etiqueta” puede activarse a continuación y el sustrato “etiquetado” y/o el producto unido por una molécula unida a la etiqueta (por ejemplo avidina o estreptavidina) puede acoplejarse al ácido nucleico. La proporción entre sustrato y producto unido al ácido nucleico mediante la “etiqueta” reflejará en consecuencia la proporción de sustrato y producto en disolución.

Una alternativa es unir el ácido nucleico a un anticuerpo específico al producto (u otra molécula con especificidad por el producto). En este escenario, el sustrato (o uno de los sustratos) se encuentra en cada microcápsula desconectado del elemento genético, pero tiene una molécula de “etiqueta” (por ejemplo biotina, DIG o DNP). Cuando un catalizador que se debe seleccionar convierte el sustrato en el producto, el producto retiene la “etiqueta” y a continuación es capturado en la microcápsula por el anticuerpo específico del producto. De este modo el elemento genético solamente se asocia a la etiqueta cuando codifica o produce un enzima capaz de convertir el sustrato en el producto.

Cuanto se detienen todas las reacciones y se combinan las microcápsulas, los elementos genéticos que codifican enzimas activos se pueden enriquecer utilizando un anticuerpo u otra molécula que se une, o reacciona específicamente con la “etiqueta”. Aunque ambos, sustrato y producto, tienen la etiqueta molecular, solamente se co-purificarán los elementos genéticos que codifican productos activos génicos.

En una forma de realización muy preferida, los procedimientos de la presente invención son útiles en la separación de librerías de elementos genéticos. La presente invención, en consecuencia proporciona un procedimiento según los anteriores aspectos de la invención, en el que los elementos genéticos se aíslan de una librería de elementos genéticos que codifican un repertorio de productos genéticos. En la presente memoria, los términos “librería”, “repertorio” y “conjunto” se utilizan según su significado ordinario en la materia, de modo que una librería de elementos genéticos

codifica un repertorio de productos génicos. En general, las librerías se construyen a partir de conjuntos de elementos genéticos y tienen propiedades que facilitan su separación.

La selección inicial de un elemento genético de una librería de elementos genéticos que utiliza la presente invención requerirá en la mayoría de los casos el cribado de gran número de elementos genéticos variantes. Las librerías de elementos genéticos se pueden crear en una gran pluralidad de formas diferentes, que comprenden las siguientes.

Se pueden clonar conjuntos de elementos genéticos naturales a partir de ADN genómico o ADNc (Sambrook *et al.*, 1989); por ejemplo, las librerías de anticuerpos en fagos, generadas mediante la amplificación de repertorios de genes de anticuerpos derivados de donantes inmunizados o no inmunizados han demostrado ser fuentes muy efectivas de fragmentos funcionales de anticuerpos (Winter *et al.*, 1994; Hoogenboom, 1997). Las librerías de genes se pueden hacer también codificando todos (véase por ejemplo Smith, 1985; Pamley y Smith, 1988) o parte de los genes (véase por ejemplo Lowman *et al.*, 1991) o conjuntos de genes (véase por ejemplo Nissim *et al.*, 1994) mediante un oligonucleótido al azar o sintético dopado. Las librerías también se pueden generar mediante la introducción de mutaciones en un elemento genético o un conjunto de elementos genéticos “al azar” mediante una pluralidad de procedimientos *in vivo*, que comprenden: utilizar “cepas mutadoras” de bacterias tales como *E. coli mutD5* (Liao *et al.*, 1986; Yamagishi *et al.*, 1990; Low *et al.*, 1996); utilizando el sistema de hipermutación de anticuerpos de los linfocitos-B (Yelamos *et al.*, 1995). Las mutaciones al azar se pueden introducir también tanto *in vivo* como *in vitro* mediante mutágenos químicos y radiación ionizante o UV (véase Friedberg *et al.*, 1995), o mediante la introducción de análogos mutagénicos de una base (Freese, 1959; Zaccolo *et al.*, 1996). También se pueden introducir mutaciones “al azar” en los genes *in vitro* durante la polimerización, por ejemplo, mediante la utilización de polimerasas con tendencia a hacer errores (Leung *et al.*, 1989).

Se puede introducir diversificación adicional mediante la utilización de recombinación homóloga tanto *in vivo* (véase Kowalozkykowski *et al.*, 1994) o *in vitro* (Stemmer, 1994a; Stemmer, 1994b).

Productos génicos

La presente invención por consiguiente se puede utilizar con el fin de preparar productos génicos específicos deseados o con el fin de preparar una gama de múltiples productos génicos (que pueden ser desconocidos en parte o totalmente) para cribado.

El término “producto génico” se utiliza en la presente invención en su sentido más amplio, que comprende no solamente polipéptidos sino también productos de ARN génico. Así, comprende los productos de transcripción solamente, así como también los productos de transcripción y traducción.

Los productos génicos preferidos son polipéptidos naturales de las células eucarióticas (especialmente células de mamífero o humanas pero no en células procarióticas, o formas mutantes de dichos polipéptidos con cambios en uno o más aminoácidos, relativos al polipéptido eucariótico silvestre. Las formas mutantes son útiles en la generación de diversidad, por ejemplo, con el fin de realizar cribas. Sin embargo, si se realizan cambios de aminoácidos es preferible que el número de estos cambios esté limitado, por ejemplo, que en relación al polipéptido silvestre el número de aminoácidos cambiado sea inferior a 50, inferior a 25, inferior a 10 o inferior a 5. Las formas mutantes pueden, por ejemplo, funcionar como antagonistas o agonistas de una o más de las actividades biológicas de un polipéptido silvestre. Pueden por consiguiente ser útiles en el estudio de la relación estructura-función, en cribados, en programas de desarrollo de fármacos, etc. Las mutaciones se pueden introducir en los ácidos nucleicos mediante los procedimientos adecuados. Por ejemplo, se puede proporcionar la secuencia de un ácido nucleico que comprende un cambio deseado en la secuencia mediante mutagénesis dirigida. Ésta se puede utilizar con el fin de permitir la expresión de un ARN o un polipéptido con el correspondiente cambio en la secuencia. Por el contrario, se puede sintetizar un ácido nucleico que comprende una mutación determinada. Las mutaciones se pueden proporcionar también mediante la utilización de un agente mutante y/o irradiación.

En ciertas aplicaciones el sistema de expresión se puede utilizar con el fin de expresar el producto génico útil en la replicación, reparación mantenimiento o replicación de un ácido nucleico de una célula eucariótica, preferentemente de una célula de mamífero o humana. El producto génico puede por consiguiente tener actividad de polimerasa, transcriptasa inversa, ligasa o telomerasa, por ejemplo. Puede tener más de una actividad. Si está implicado en la reparación de un ácido nucleico, puede tener actividad editora.

Los productos génicos se pueden preparar en los compartimentos formados por la fase hidrófila de la emulsión que comprende el sistema de expresión.

Procedimientos de selección

Los procedimientos se pueden configurar para seleccionar ARN, ADN o moléculas de proteína productos génicos provistos de actividad catalítica, reguladora o de enlace.

(i) *Selección por afinidad*

En el caso de la selección de un producto génico con afinidad por un ligando específico el elemento genético puede estar unido al producto génico en la microcápsula mediante el ligando. Solamente los productos génicos con afinidad por el ligando se unirán al elemento genético propiamente y por consiguiente solamente los elementos genéticos que generan producto activo serán retenidos en la etapa de selección. En esta forma de realización, el elemento genético comprenderá, por consiguiente, un ácido nucleico que codifica el producto génico unido a un ligando para el producto génico.

En esta forma de realización, todos los productos génicos que se desea seleccionar comprenden un dominio de enlace putativo, que se debe seleccionar y una característica común, una etiqueta. El elemento genético en cada microcápsula está físicamente unido a un ligando. Si el producto génico preparado a partir del elemento genético tiene afinidad por el ligando, se unirá al mismo y quedará físicamente unido al mismo elemento genético que lo codifica, resultando en el etiquetado del elemento genético. Al final de la reacción, todas las microcápsulas se combinan y todos los elementos genéticos y productos genéticos se acumulan en un ambiente. Los elementos genéticos que codifican productos génicos que muestran la unión deseada se pueden seleccionar mediante purificación por afinidad utilizando una molécula que se una específicamente, o reaccione específicamente con la etiqueta.

En una forma de realización alternativa, los elementos genéticos se pueden separar con base en que el producto génico, que se une al ligando, meramente esconde al ligando de, por ejemplo, otros compañeros de unión. En esta eventualidad, el elemento genético, en lugar de ser retenido durante la etapa de purificación por afinidad, se puede eluir selectivamente mientras otros elementos genéticos quedan unidos.

En una forma de realización alternativa, la presente invención proporciona un procedimiento según el segundo aspecto de la presente invención, en el que en la etapa (b) los productos génicos se unen a los elementos genéticos que los codifican. Los productos génicos junto con los elementos genéticos unidos se separan a continuación como resultado de la unión de un ligando a los productos génicos que disponen de la actividad deseada. Por ejemplo, todos los productos génicos pueden comprender una región invariable que se une covalentemente o no covalentemente al elemento genético y una segunda región que está diversificada de modo que genera la actividad de unión deseada.

La separación por afinidad depende de la presencia de dos miembros de una pareja de unión en condiciones tales que pueda tener lugar la unión. Se puede utilizar una pareja de unión cualquiera con este fin. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término pareja de unión se refiere a un par de moléculas capaz de unirse entre sí. Los ejemplos de parejas de unión que se pueden utilizar en la presente invención comprenden un antígeno y un anticuerpo o fragmento del mismo capaz de unirse al antígeno, el par biotina-avidina/estreptavidina (Savage *et al.*, 1994), un polipéptido de unión dependiente del calcio y un ligando del mismo (por ejemplo calmodulina y un péptido que se une a la calmodulina (Stofko *et al.*, 1992; Montigiani *et al.*, 1996), pares de polipéptidos que se ensamblan para formar un cremallera de leucina (Tripete *et al.*, 1996), histidinas (típicamente péptidos de hexahistidina) y Cu^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} quelados (por ejemplo Ni-NTA; Hochuli *et al.*, 1987), proteínas de unión al ADN o ARN (Klug, 1995) incluyendo las que comprenden motivos de dedos de zinc (Klug y Schwabe, 1995) y ADN metiltransferasas (Anderson, 1993) y sus lugares de unión a los ácidos nucleicos.

Sin embargo, la utilidad de ciertos procedimientos de selección basados en afinidad puede ser limitada. Especialmente en las interacciones de afinidad media a baja, la vida media de las interacciones puede ser frecuentemente demasiado corta en comparación con el tiempo necesario para detectar las interacciones.

Así, en una forma de realización de la presente invención, los procedimientos de selección se basan en aumentar la afinidad de las interacciones intermoleculares permitiendo que tengan lugar interacciones multivalentes. El aparente incremento en afinidad resultante logrado mediante interacciones multivalentes, también denominado avidéz, es debido al hecho de que cuando tienen lugar dos o más interacciones de unión en el mismo complejo molecular, solamente se paga un precio entrópico adicional muy pequeño por la segunda y adicionales interacciones. Ello es debido a que la mayoría de los grados de libertad se perdieron cuando la unión a través de un lugar de unión inmovilizó el ligando multivalente. Sin embargo, la avidéz puede tener efectos particularmente drásticos en la cinética de disociación (k_{off}), ya que todas las interacciones se deben romper antes de que tenga lugar la disociación.

Por consiguiente, en esta forma de realización, las moléculas que interactúan se pueden seleccionar permitiendo que ocurran interacciones multivalentes entre las moléculas, incrementando así la estabilidad de cualquier complejo formado en comparación con una interacción monovalente.

Preferentemente, la primera y segunda molécula que interactúan, por ejemplo, el producto génico y la molécula ligando a la que se une, han sido modificadas con el fin de incrementar su valencia. Preferentemente, en el producto génico o en la molécula ligando o en los dos, hay uno o más grupos reactivos, de tal modo que las moléculas producto génico (y/o el ligando) se asocian entre sí formando complejos multivalentes de los productos génicos y/o complejos de moléculas ligando multivalentes. Los complejos multivalentes se pueden seleccionar por unión según la presente invención. Preferentemente, los grupos reactivos forman un enlace covalente cuando interactúan.

El término “complejos multivalentes” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a complejos moleculares que comprenden (i) por lo menos dos moléculas del producto génico o por lo menos una molécula de un producto

multivalente génico y (ii) una molécula ligando multivalente, en la que por lo menos las por lo menos dos moléculas del producto génico se encuentran interactuando con la molécula ligando o la por lo menos una molécula de un producto multivalente génico interactúa con la molécula ligando mediante por lo menos dos valencias.

5 En dichos procedimientos de selección por avidéz, la molécula ligando es preferentemente multivalente. Por ejemplo, cuando la molécula ligando es un polipéptido, la molécula ligando puede ser multivalente en virtud de estar expresada como una proteína de fusión a un tercer polipéptido que se multimeriza.

10 Las moléculas de producto génico y/o ligando pueden comprender una etiqueta, por ejemplo una biotina o una etiqueta de epítipo o parte de myc, con el fin de asistir en la purificación de los complejos formados entre ellas, y/o asistir en la recuperación de las moléculas producto génico y/o ligando para el análisis y la identificación.

15 La molécula ligando es típicamente un multímero, tal como un dímero, o capaz de formar un homomultímero en las condiciones de reacción utilizadas en el procedimiento de la presente invención. Por el contrario, la molécula ligando puede ser un heteromultímero. Es preferible utilizar moléculas ligando que son polipéptidos diseñados para que sean multiméricos pero cuyas unidades constituyentes normalmente no formen multímeros. Se puede lograr esto mediante la unión química de dos o más moléculas con el fin de formar un multímero covalentemente enlazado. Por el contrario, en el caso de moléculas ligando que son polipéptidos y que se unen a polipéptidos productos génicos, las moléculas se pueden expresar como una fusión a un tercer polipéptido, formando el tercer polipéptido homomultímeros, lo que efectivamente resulta en la multimerización de la secuencia del polipéptido ligando fusionado. Un ejemplo de tercer polipéptido adecuado (referido en la presente memoria como polipéptido "gancho") es la glutathione-S-transferasa (GST), que forma dímeros. Los péptidos gancho preferidos proporcionan buenos niveles de expresión de productos solubles. En una forma de realización, son preferibles los polipéptidos gancho adecuados para secreción en el periplasma bacteriano (por ejemplo, GST después de escindir los 3 residuos Cys superficiales (Tudyka y Skerra, 25 1997)). La molécula ligando se puede proporcionar como una pluralidad de moléculas ligando.

En una forma de realización particularmente preferida de la presente invención, los productos génicos son polipéptidos codificados por primeros polinucleótidos y los polinucleótidos están asociados con los correspondientes polipéptidos de tal modo que cuando un primer polipéptido se selecciona durante el procedimiento de cribado de la presente invención, la secuencia del polinucleótido que codifica el polipéptido seleccionado está físicamente unida, o 30 en la proximidad, y se puede recuperar con facilidad y, por ejemplo, secuenciar con el fin de determinar la identidad del polipéptido seleccionado. Con el fin de lograr esto, la pluralidad de primeros polinucleótidos en un compartimento puede ser tal que en promedio haya solamente un polinucleótido utilizando la emulsión de la presente invención.

35 En la solicitud de patente co-pendiente GB n° 114856.8, se describen detalles adicionales sobre los procedimientos de selección por avidéz que se pueden utilizar en los procedimientos de la presente invención.

(ii) Catálisis

40 Cuando se selecciona para catálisis, el elemento genético en cada microcápsula puede comprender el sustrato de la reacción. Si el elemento genético codifica el producto génico capaz de funcionar como catalizador, el producto génico catalizará la conversión del sustrato en el producto. Por consiguiente, al final de la reacción el elemento genético está físicamente unido al producto de la reacción catalizada. Cuando las microcápsulas se combinan y se acumulan los reactantes, los elementos genéticos que codifican moléculas catalíticas se pueden enriquecer mediante la selección de cualquier propiedad específica del producto.

Por ejemplo, el enriquecimiento puede ser mediante purificación por afinidad utilizando una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) que se una específicamente al producto. Asimismo, el producto génico puede tener el efecto de modificar un componente del ácido nucleico del elemento genético, por ejemplo mediante metilación (o desmetilación) 50 o mutación del ácido nucleico, haciéndolo resistente, o susceptible al ataque por nucleasas, tales como endonucleasas de restricción.

Por el contrario, la selección se puede realizar directamente mediante acoplamiento de una primera reacción a reacciones siguientes que tienen lugar en la misma microcápsula. Hay dos formas generales en las que se puede 55 realizar esto. En primer lugar, el producto de la primera reacción se puede hacer reaccionar, o unir a una molécula que no reaccione con el sustrato de la primera reacción. Una segunda reacción acoplada solamente procederá en presencia del producto de la primera reacción. Un elemento genético activo puede purificarse a continuación mediante la selección de las propiedades del producto de la segunda reacción.

60 Por el contrario, el producto de la reacción que se selecciona puede ser el sustrato o cofactor de una segunda reacción catalizada por un enzima. El enzima que cataliza la segunda reacción puede estar traducido *in situ*, en la microcápsula o incorporado en la mezcla de reacción antes de la microencapsulación. Solamente cuando proceda la primera reacción el enzima acoplado generará un producto seleccionable.

65 Este concepto de acoplamiento se puede elaborar con el fin de incorporar una pluralidad de enzimas, cada uno de ellos utilizando como sustrato el producto de la reacción anterior. Esto permite la selección de enzimas que no reaccionarán con un sustrato inmovilizado. También se puede diseñar con el fin de producir un incremento de sensibilidad mediante amplificación de la señal si el producto de una reacción es un catalizador o un cofactor de una

segunda reacción o serie de reacciones que conducen a un producto seleccionable (por ejemplo, véase Johannsson y Bates, 1988; Johannsson, 1991). Además, un sistema de cascada enzimática se puede basar en la preparación de un activador par un enzima o en la destrucción de un inhibidor de un enzima (véase Mize *et al.*, 1989). El acoplamiento tiene la ventaja de que se puede utilizar un sistema de selección común para todo un grupo de enzimas que generan el mismo producto y permite la selección de transformaciones químicas complejas que no se pueden realizar en una sola etapa.

Dicho procedimiento de acoplamiento permite así la evolución de nuevas “sendas metabólicas” *in vitro* en etapas, seleccionando y mejorando primero una etapa y a continuación la siguiente. La estrategia de selección se basa en el producto final de la senda, de modo que todas las etapas anteriores pueden evolucionar independientemente o en secuencia sin tener que montar un nuevo sistema de selección para cada etapa de la reacción.

Expresado en forma alternativa, se proporciona un procedimiento de aislamiento de uno o más elementos genéticos que codifican el producto génico con la actividad catalítica deseada, que comprende las etapas siguientes:

- (1) expresar elementos genéticos con el fin de preparar los respectivos productos génicos;
- (2) permitir que los productos génicos catalicen la conversión de un sustrato en un producto, que puede o no ser directamente seleccionable, según la actividad deseada;
- (3) opcionalmente acoplar la primera reacción a una o más reacciones siguientes, estando cada una de las reacciones modulada por el producto de la reacción anterior, y conduciendo a la generación de un producto final seleccionable;
- (4) unir el producto seleccionable de la catálisis a los elementos genéticos mediante:
 - a) el acoplamiento del sustrato a los elementos genéticos de tal modo que el producto permanezca asociado con los elementos genéticos, o
 - b) la reacción o el enlace del producto seleccionable a los elementos genéticos mediante una etiqueta molecular adecuada unida al sustrato que permanece en el producto, o
 - c) el acoplamiento del producto seleccionable (pero no el sustrato) a los elementos genéticos mediante una reacción específica del producto o interacción con el producto; y
- (5) seleccionar el producto de la catálisis, junto con el elemento genético al que está unido, mediante una reacción específica o la interacción con el producto, o mediante purificación por afinidad utilizando una “etiqueta” molecular unida al producto de la catálisis, en el que en las etapas (1) a (4) cada elemento genético y los respectivos productos génicos están comprendidos en el interior de una microcápsula formada a partir de una emulsión de la presente invención.

(iii) Regulación

Se puede utilizar un sistema similar para seleccionar las propiedades reguladoras de los enzimas.

En el caso de selección para una molécula reguladora que funciona como activador o inhibidor de un proceso bioquímico, los componentes del proceso bioquímico se pueden traducir *in situ* en cada microcápsula o se pueden incorporar en la mezcla de reacción antes de la microencapsulación. Si el elemento genético que se está seleccionando es para codificar un activador, la selección se puede realizar para el producto de la reacción regulada, tal como se ha descrito anteriormente en conexión con la catálisis. Si se desea un inhibidor, la selección puede ser para una propiedad química específica del sustrato de la reacción regulada.

Por consiguiente, se proporciona un procedimiento para separar uno o más elementos genéticos que codifican el producto génico que muestra una actividad reguladora deseada, que comprende las etapas siguientes:

- (1) expresar los elementos genéticos con el fin de preparar los respectivos productos génicos;
- (2) permitir que los productos génicos activen o inhiban una reacción bioquímica, o una secuencia de reacciones acopladas, de acuerdo con la actividad deseada, de tal modo que permita la generación o supervivencia de una molécula seleccionable;
- (3) asociar la molécula seleccionable a los elementos genéticos mediante
 - a) la disposición de la molécula seleccionable, o el sustrato del que se deriva, unida a los elementos genéticos, o

b) la reacción o unión del producto seleccionable a los elementos genéticos, mediante una “etiqueta” molecular adecuada unida al sustrato que permanece en el producto, o

c) el acoplamiento del producto de la catálisis (pero no el sustrato) a los elementos genéticos, mediante una reacción específica del producto o la interacción con el producto;

(4) seleccionar el producto seleccionable, junto con el elemento genético al que está unido, mediante una reacción específica o la interacción con el producto seleccionable, o mediante purificación por afinidad utilizando una “etiqueta” molecular unida al producto de la catálisis.

en la que en las etapas (1) a (4) cada elemento genético y el respectivo producto génico están comprendidos en el interior de una microcápsula formada mediante una emulsión de la presente invención.

(iv) Separación de microcápsulas

La presente invención proporciona la separación de microcápsulas intactas que se efectúa mediante los procedimientos de separación utilizados. Las microcápsulas se pueden separar como tales cuando el cambio inducido por el producto genético deseado tiene lugar o se manifiesta en la superficie de la microcápsula o es detectable desde el exterior de la microcápsula. El cambio puede estar producido por la acción directa del producto génico, o indirecta, en la que una serie de reacciones, una o más de las cuales implica al producto génico que tiene la actividad deseada, conducen al cambio. Por ejemplo, la microcápsula puede estar configurada de tal modo que el producto génico esté desplegado en su superficie y por consiguiente sea accesible a reactivos. Cuando la microcápsula es una microcápsula membranosa, el producto génico puede ser la diana o puede causar la dirección de una molécula a la membrana de la microcápsula. Esto se puede lograr, por ejemplo, utilizando una secuencia de localización a la membrana, tal como las derivadas de proteínas de membrana, que favorecerán la incorporación de una molécula fundida o unida en la membrana de la microcápsula. Por el contrario, cuando se forma una microcápsula mediante reparto de fases tal como en las emulsiones de-agua-en-aceite, una molécula con partes que son más solubles en la fase extra-capsular se dispondrán de tal modo que se encuentren en el límite de la microcápsula.

En un aspecto preferido de la presente invención, sin embargo, se aplica la separación de microcápsulas a sistemas de separación basados en un cambio de las propiedades ópticas de la microcápsula, por ejemplo las características de absorción o emisión de la misma, por ejemplo la alteración de las propiedades ópticas de la microcápsula resultantes de una reacción que conduce a cambios en absorción, luminiscencia, fosforescencia o fluorescencia asociados a la microcápsula. Todas estas propiedades están comprendidas en el término “óptico”. En tal caso, las microcápsulas se pueden separar mediante separación activada por luminiscencia, fluorescencia o fosforescencia. En una forma de realización muy preferida, se utiliza separación activada por fluorescencia con el fin de separar microcápsulas en las que la preparación del producto génico con la actividad deseada está acompañada por la preparación de una molécula fluorescente en la cápsula. Por ejemplo, el propio producto génico puede ser fluorescente, por ejemplo una proteína fluorescente tal como la GFP. Por el contrario, el producto génico puede inducir o modificar la fluorescencia de otra molécula, tal como por la unión o la reacción con ella.

(v) Identificación de microcápsulas

Las microcápsulas se pueden identificar en virtud de un cambio inducido por el producto génico deseado que ocurre o se manifiesta en la superficie de la microcápsula o es detectable desde el exterior tal como se describe en la sección (IV) (Separación de microcápsulas). Este cambio, cuando se identifica, se utiliza con el fin de iniciar la modificación génica en el interior del compartimento. En un aspecto preferido de la presente invención, la identificación de la microcápsula se basa en un cambio en las propiedades ópticas de la microcápsula que resultan de una reacción que produce luminiscencia, fosforescencia o fluorescencia en el interior de la microcápsula.

La modificación génica en el interior de la microcápsula sería iniciada mediante la identificación de luminiscencia, fosforescencia o fluorescencia. Por ejemplo, la identificación de luminiscencia, fosforescencia o fluorescencia puede iniciar el bombardeo del compartimento con fotones (u otras partículas u ondas) lo que conduce a la modificación del elemento genético. Se ha descrito anteriormente un procedimiento similar para la separación rápida de células (Keij *et al.*, 1994). La modificación de los elementos genéticos puede resultar, por ejemplo, de acoplar una “etiqueta” molecular, enjaulada en un grupo protector fotolábil a los elementos genéticos: el bombardeo con fotones de longitud de onda adecuada conduce a la eliminación de la jaula. Después, todas las microcápsulas se combinan y se acumulan los elementos genéticos en un ambiente. Los elementos genéticos que codifican productos génicos que muestran la actividad deseada se pueden seleccionar mediante purificación por afinidad utilizando una molécula que se une específicamente, o reacciona específicamente con la “etiqueta”.

(vi) Procedimiento multi-etapa

Se apreciará asimismo que según la presente invención, no es necesario que procedan en una sola etapa todos los procesos de transcripción/replicación y/o traducción y selección, teniendo lugar todas las reacciones en una microcápsula. El procedimiento de selección puede comprender dos o más etapas. Primero, la transcripción/replicación y/o traducción de cada elemento genético de una librería de elementos genéticos puede tener lugar en una primera microcápsula. El producto de cada gen se asocia a continuación al elemento genético que lo codifica (que reside en la misma

microcápsula). Las microcápsulas se rompen a continuación, y los elementos genéticos unidos a los productos génicos respectivos son opcionalmente purificados. Por el contrario, los elementos genéticos se pueden unir a los productos génicos respectivos utilizando procedimientos que no dependen de la encapsulación. Por ejemplo, despliegue en fagos (Smith, G.P., 1985), despliegue en polisomas (Matheakkis *et al.*, 1994), fusión ARN-péptido (Roberts y Szostak, 1997) o fusión del represor lac péptido (Cull, *et al.*, 1992).

En una segunda etapa del procedimiento, cada elemento genético purificado unido al producto de su gen se introduce en una segunda microcápsula que comprende los componentes de la reacción que se debe seleccionar. A continuación se inicia esta reacción. Una vez completas las reacciones, las microcápsulas se rompen otra vez y los elementos genéticos modificados se seleccionan. En el caso de reacciones complejas de múltiples etapas en las que se encuentran implicados muchos componentes individuales y etapas de reacción, se pueden realizar una o más etapas intermedias entre la etapa inicial de creación de la unión del producto génico al elemento genético y la etapa final de generar un cambio seleccionable en el elemento genético.

(vii) Selección mediante activación de un gen reportero y expresión *in situ*

Se puede configurar el sistema de tal modo que la unión deseada, la actividad catalítica o reguladora codificada por el elemento genético conduzca, directa o indirectamente a la activación de la expresión de un “gen reportero” que se encuentra presente en todas las microcápsulas. Solamente los productos génicos con la actividad deseada activarán la expresión del gen reportero. La actividad resultante de la expresión del gen reportero permite la selección del elemento genético (o del compartimento que lo comprende) mediante cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria.

Por ejemplo, la activación del gen reportero puede ser el resultado de una actividad enlazante del producto génico en modo análogo al del sistema de “dos híbridos” (Fields y Song, 1989). La activación puede también resultar del producto de una reacción catalizada por el producto génico deseable. Por ejemplo, el producto de reacción puede ser un inductor transcripcional del gen reportero. Por ejemplo la arabinosa se puede utilizar con el fin de inducir transcripción a partir del promotor araBAD. La actividad del producto génico deseable también puede producir la modificación de un factor de transcripción, lo que resulta en la expresión del gen reportero. Por ejemplo, si el producto deseado génico es una quinasa o fosfatasa la fosforilación o defosforilación de un factor de transcripción puede conducir a la activación de la expresión del gen reportero.

(viii) Amplificación

Según otro aspecto de los procedimientos de la presente invención, los procedimientos pueden comprender la etapa adicional de amplificar los elementos genéticos. La amplificación selectiva se puede utilizar como unos medios de enriquecimiento para los elementos genéticos según el producto génico deseado.

En todas las configuraciones anteriores, el material genético comprendido en los elementos genéticos se puede amplificar y repetir el procedimiento en etapas reiterativas. La amplificación puede realizarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Saiki *et al.*, 1988) o mediante la utilización de una de entre la pluralidad de otros procedimientos de amplificación de genes que comprenden: amplificación por Q β replicasa (Cahill, Foster y Mahan, 1991; Chetverin y Spirin, 1995; Katanaev, Kurnasov y Spirin, 1995); la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Landegren *et al.*, 1988; Barny, 1991); el sistema de replicación de secuencias auto-sostenido (Fahy, Kwoh y Gingeras, 1991) y la amplificación por desplazamiento de cadena (Walter *et al.*, 1992).

Ejemplos

Ejemplo 1

Las emulsiones convencionales no apoyan una eficaz traducción eucariótica in vitro

Se utilizó una formulación de fase oleosa que comprende 4,5% v/v de monooleato de sorbitano (Span® 80, Fluka; 85548) y 0,4% v/v de monooleato de polioxietilensorbitan (Tween® 80, Sigma Ultra; P-8074, y 0,05% v/v de t-octilfenoxipoli-etoxietanol (Triton® X 100, Sigma) en aceite mineral (Sigma; M-3516) (“mezcla original CSR”) con el fin de emulsionar una reacción de expresión RRL. Todas las reacciones se realizaron utilizando el sistema de transcripción/traducción acoplado TNT T7 quick (Promega) que expresa luciferasa de luciérnaga a partir de un plásmido patrón. Se ensambló una reacción de expresión de 50 μ l en hielo que comprendía 80% RRL (v/v), metionina 0,02 mM y plásmido patrón de luciferasa (1 μ g). Una alícuota de 40 μ l se emulsionó mediante la adición gota a gota (1 gota cada 5 segundos) a 100 μ l de fase oleosa enfriado en hielo con agitación constante (1000 rpm). Después de la adición de la última gota (aproximadamente 20 segundos) se continuó la agitación durante 3 a 4 minutos adicionales.

Las reacciones emulsionadas se incubaron a 30°C durante 1 hora y se extrajeron utilizando éter tal como se ha descrito anteriormente. La actividad de luciferasa se midió en un lector de placas de 96 pocillos utilizando el reactivo de ensayo de luciferasa (Promega). La reacción no emulsionada se extrajo también con éter para permitir una justa comparación de las actividades. Esto demostró que los niveles de expresión en el interior de la emulsión fueron muy bajos, típicamente el 0,1% el de la reacción no emulsionada.

ES 2 312 630 T3

Utilizando una formulación de fase oleosa “reducida”, que comprendía 1,5% (v/v) Span® 80 (Sigma) en aceite mineral (Sigma), se observaron rendimientos ligeramente mejores de hasta el 0,7%, especialmente con la adición de DTT 20 μ M. La inclusión de DTT con la mezcla de aceite original CSR fue muy perjudicial para la formación de la emulsión. Se ensayaron múltiples proporciones de fase acuosa a fase oleosa y múltiples tiempos de mezclado. Las condiciones descritas anteriormente dieron la actividad más elevada con retención de la integridad de la emulsión durante el período de incubación.

Por consiguiente, la emulsificación de una reacción RRL utilizando la formulación de emulsión “clásica” a base de Span® 80 sola o en combinación con Triton® 80 y Triton® X-100 resultó en una pérdida completa de la actividad de traducción *in vitro* (< 1% de la expresión fuera de la emulsión (Tabla 2)) tal como se puede juzgar por la expresión del enzima luciferasa de luciérnaga.

Además, se observó un cambio de color en el componente hemo del RRL de un color rosado oscuro a un marrón óxido en cuestión de minutos después de la emulsificación (véase la Figura 1), lo que indica la oxidación del hemo, presumiblemente atribuible a un componente de la fase oleosa.

Ejemplo 2

Los antioxidantes no restauran una eficaz traducción eucariótica in vitro

La traducción en mamíferos está regulada, *inter alia*, por una familia de kinasas eIF-2 α en respuesta al estrés celular (revisado por Dever (1999), TIBS, 24:398-403). Las kinasas eIF-2 α comprenden un dominio sensor y dominio eIF2 kinasa conservado. Su función es fosforilar eIF-2 α (lo que inhibe la traducción) en respuesta a los estímulos recibidos a través del dominio sensor. Esto sirve para proteger a la célula en circunstancias de estrés celular debido a disminución de recursos (la traducción de proteínas consume grandes cantidades de energía celular) o como defensa antivírica evitando la expresión del genoma vírico. Se conocen 4 kinasas que responden a diferentes tipos de señales de estrés (Tabla 1).

TABLA 1

Kinasas eIF2 sensibles al estrés

Nombre	Señal activadora
HRI	Estrés oxidativo (hemo bajo)
PKR	Infección vírica (dsARN)
GCN2	Inanición (bajo en aminoácidos, ARNt no cargado)
PERK	Estrés térmico, infección vírica (proteína desnaturalizada)

Se razonó que una de las razones de la total inhibición de la traducción (considerando la decoloración del hemo en el RRL) era el estrés oxidativo producido por la difusión de especies oxidantes del aceite en la fase acuosa.

Se identificó que el componente responsable de la decoloración y la inhibición de la traducción estaba comprendido tanto en el surfactante Span® 80 como en el Tween® 80 pero no en el aceite mineral.

Se intentó tamponar el cambio redox mediante la provisión de compuestos antioxidante o reductores en la fase oleosa (BDH, BDA) y/o en la fase acuosa (DTT, ácido ascórbico). Además, se intentó eliminar las especies oxidantes de la fase oleosa mediante reacción de la fase oleosa (la mezcla de aceite mineral surfactante) o Span® 80 solamente con cuentas de borohidruro de poliesterilmetiltrimetilamonio (Novabiochem) o DTT antes de la emulsión. Aunque ralentizaron la decoloración (Fig. 1), esto solamente produjo una mejora ligera en la eficacia de la traducción (Tabla 2). Además, el tratamiento de la fase oleosa con cuentas de borohidruro pareció reducir las propiedades de formar emulsión de la fase surfactante/aceite lo que condujo a emulsiones muy desestabilizadas.

El DTT solo (a 20 μ M concentración final) produjo una mejora ligera pero consistente en los niveles de expresión en el interior de la emulsión en comparación con la reacción no emulsionada (Tabla 2). Niveles de DTT superiores demostraron ser perjudiciales para el sistema de expresión RRL (no mostrado). En general el DTT también demostró desestabilizar la emulsión.

Ejemplo 3

Ni AMPc ni 2-AP permiten una traducción eficaz eucariótica in vitro

También se intentó una inhibición directa de la senda eIF2 kinasa utilizando AMPc o 2-aminopurina (2-AP). Aunque el AMPc produjo una pequeña mejora cuando se utilizó por sí solo, demostró no ser aditivo al efecto beneficioso del DTT (no mostrado). Tanto el AMPc como el 2-AP son inhibidores de las kinasas eIF2 más bien inespecíficos (no

ES 2 312 630 T3

se dispone en la actualidad de inhibidores específicos) y presumiblemente interfieren con otros procesos del sistema de traducción RRL.

Ejemplo 4

Ni HSP70 ni HSP90 permiten una eficaz traducción eucariótica in vitro

El hecho de que incluso a elevadas concentraciones de DTT no se rescatase más que una actividad traduccional residual sugirió que otros factores además de la oxidación debían contribuir a la inhibición de la traducción. Un sospechoso fue la desnaturalización de las proteínas producida por el procedimiento de emulsión, es decir, el mezclado vigoroso de la fase hidrófila de agua y la fase hidrófoba de aceite. Desde luego, se conoce desde hace tiempo que la adición de BSA (que presumiblemente comprende alguna proteína desnaturalizada generada por la congelación-descongelación) resulta en la inhibición de la traducción [Matts *et al.*, Biochemistry, 32:7323-7328 (1993)], incluso sin emulsión. Se confirmaron los resultados de Matts 93 con y sin emulsión. También se intentó tamponar el efecto supliendo el lisado de RRL con chaperonas, en particular HSP70 y HSP90 (Sigma). De nuevo, esto produjo solamente una pequeña mejora (no aditiva) (no mostrada), que se podía igualar o superar mediante la adición de pequeñas cantidades (5%) de glicerina (no mostrada), de la que se sabe que protege a las proteínas frente a la desnaturalización.

Ejemplo 5

Desarrollo de una nueva fase oleosa y emulsión agua-en-aceite

Dado el bajo nivel de actividad, se realizaron esfuerzos para identificar una nueva formulación de fase oleosa con menor potencial para generar estrés oxidativo o desnaturalización de las proteínas durante el procedimiento de emulsión.

Después de que fallasen los intentos de mejorar la actividad con las emulsiones a base de Span® 80 se ensayaron nuevos surfactantes.

Se realizaron reacciones de emulsión tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, pero con la sustitución de los surfactantes utilizados en esta reacción (Span®80, Tween®80 y Triton®) por surfactantes a base de silicona. De entre éstos, se descubrió que tuvieron éxito los surfactantes a base de silicona químicamente inertes.

El copolímero de polisiloxano-policetil-polietilenglicol (ABIL EM90) (Goldschmidt) utilizado al 4% (v/v) en aceite mineral produjo mejoras considerables. Emulsionando tal como se describe en el Ejemplo 1, con la excepción de un tiempo de agitación reducido (1,5 minutos), los niveles de expresión incrementaron dramáticamente hasta un 39% (Tabla 2) de los de la reacción no emulsionada. Esta emulsión fue estable a través del período de incubación, y la visualización al microscopio reveló que la mayoría de los compartimentos presentaban un diámetro comprendido entre 2 y 5 micras (Fig.2).

TABLA 2

Actividad de luciferasa (en unidades de luz (LU)) de la luciferasa expresada en extracto de lisado de reticulocito no emulsionado y emulsionado con dos tiempos de mezclado diferentes (3 min. y 4 min.)

	No emulsionado	Emulsionado: tiempo de mezclado	Mezcla de emulsión CSR	1,5% Span® 80 en aceite mineral	4% Abil
-DTT	326789	3 min	945	832	127828
+DTT	231318		N.A.*	1632	78970
% actividad			0,2%	0,2%/0,6	39%/34%
	Fondo: 249				
-DTT	154442	4 min	327	338	40155
+DTT	101702		N.A.*	843	29493
% actividad			0,13%	0,15%/0,7	26%/29%
	Fondo: 14				

*emulsión no estable

Ejemplo 6

Expresión de telomerasa humana en emulsión utilizando la nueva fase oleosa

Los telómeros son estructuras de ADN específicas que se encuentran en los extremos de los cromosomas en los eucariotas. Están añadidas en el extremo 3' (permaneciendo después de eliminar el cebador de ARN utilizado en la replicación del ADN) por el enzima especializado telomerasa, que comprende un componente de ARN y un componente de proteína. En los humanos, el enzima comprende ARN telomérico humano (hTR) y el polipéptido telomerasa humano (hTERT) y añade copias repetidas de la secuencia hexamérica (TTAGGG) a los extremos de los cromosomas. La actividad telomerasa ha sido implicada tanto durante el desarrollo tumoral como en la progresión así como también en la senescencia y muerte celular programada.

La telomerasa, hasta la fecha, no se ha expresado con éxito en forma funcional en los procariotas, presumiblemente porque necesita chaperonas especializadas (por ejemplo, HSP 90) y factores accesorios para su ensamblaje y función. Pero se puede expresar en las células eucarióticas y también en los sistemas de traducción de lisado de reticulocito de conejo *in vitro* [Weinrich *et al.*, Nat. Genet., 17:498-502 (1997); Beatie *et al.*, (8:177-180 (1998)].

La fase oleosa del Ejemplo 5 se ensayó para la expresión de telomerasa humana funcional en RRL. Se prepararon mediante ampliación por PCR patrones lineales regulados por T7 codificantes tanto de hTERT como de hTR en tándem clonados corriendo abajo del IRES de pCITE4a (Novagen) o hTERT clonado en pCITE4a con hTR clonado por separado en una variante de pCITE4a (en el que el IRES está eliminado (pCITE-E)) o un mutante de delección inactivo de la telomerasa, utilizando los plásmidos parentales y cebadores CITET7ba (5'-GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAA-3') y CITerto (5'-CCGGATATAGTTCCTCCTTTCAGC-3').

Las reacciones de expresión (50 µl) comprendían RRL (80% v/v), construcción de telomerasa (véase la leyenda de la Fig. 3), metionina (1 mM), sustrato de telomerasa (TS (cebador telomerasa) cebador (5'-AATCCGTCGAGCA GAGTT-3') (Intergen) 1 µM), amplificador PCR (Promega) (3 µl), dNTPs (25 µl), DTT (20 µM). Se formaron las emulsiones en condiciones refrigeradas (en hielo) exactamente como se ha descrito anteriormente y se incubaron a 30°C durante 1,5 horas. A continuación se extrajeron las emulsiones con 200 µl de cloroformo-alcohol isoamílico, seguido de extracción de la fase acuosa con 1 volumen de fenol-cloroformo.

Los productos de la reacción de telomerasa se precipitaron con etanol y se resuspendieron en 20 µl de agua estéril. A continuación se utilizó un ensayo TRAP (Kim 94) (Intergen) a base de PCR con el fin de detectar productos de extensión de la telomerasa formados en la emulsión. La actividad telomerasa produce una escalera característica (con un espaciado de 6 bp entre cada repetición) (véase la Fig. 3).

Los resultados indican expresión de telomerasa funcionalmente activa a partir del patrón WT en emulsión. Los experimentos control tanto omitiendo la adición del gen de telomerasa como utilizando un mutante de delección inactivo dieron resultados negativos (Fig. 3).

Referencias

- Anderson, C.W., Straus, J.W. y Dudock, B. S. (1983) *Methods Enzymol*, 101, 635-44.
- Anderson, J.E. (1993) *Curr. Op. Struct. Biol.*, 3, 24-30.
- Ash, M. y Ash, I. (1993) *Handbook of industrial surfactants*. Gower, Aldershot.
- Barany, F. (1991) *PCR Methods Applic.*, 1, 5-16.
- Becher, P. (1957) *Emulsions: theory and practice*. Reinhold, New York.
- Blattner, F.R. y Dahlberg, J.E. (1972) *Nature New Biol*, 237, 227-32.
- Cahill, P., Foster, K. y Mahan, D. E. (1991) *Clin Chem*, 37, 1482-5.
- Chetverin, A.B. y Spirin, A.S. (1995) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 51, 225-70.
- Cull, M.G., Miller, J.F. y Schatz, P.J. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 1865-9.
- Dever TE., *Trends Biochem Sci*. (1999), 24, 398-403
- Dickinson, E. (1994) En Wedlock, D.J. (ed.), *Emulsions and droplet size control*. Butterworth-Heine-mann, Oxford, Vol. pp. 191-257.
- Fahy, E., Kwoh, D.Y. y Gingeras, T.R. (1991) *PCR Methods Appl*, 1, 25-33.

- Fields, S. & Song, O.** (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-6.
- Freese, E.** (1959) *J. Mol. Biol.*, 1, 87.
- 5 **Friedberg, E.C., Walker, G.C. y Siede, W.** (1995) DNA repair and mutagenesis. *ASM Press*, Washington D.C.
- Ghadessy et al** (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 4552-4557
- Hermanson, G.T.** (1996) Bioconjugate techniques. *Academic Press*, San Diego.
- 10 **Hochuli, E., Dobeli, H. y Schacher, A.** (1987) *J Chromatogr*, 411, 177-84.
- Hoogenboom, H. R.** (1997). Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Trends Biotechnol.* 15, 62-70.
- 15 **Johannsson, A.** (1991) In Price, C.P. y Newman, D.J. (ed.), Heterogeneous enzyme immunoassays. *Stockton Press*, New York, Vol. pp. 295-325.
- 20 **Johannsson, A. y Bates, D.L.** (1988) En Kemeny, D.M. y Challacombe, S.i. (ed.), - Amplification by second enzymes. *John Wiley, Chichester*, Vol. pp. 85-106.
- Katanaev, V.L., Kurnasov, O.V. y Spirin, A.S.** (1995) *Febs Lett*, 359, 89-92
- Kim, NW & Wu, F** (1994), *Nucleic Acid Res*, 25, 2595-2597
- 25 **Klug, A.** (1995) *Ann N Y Acad Sci*, 758, 143-60.
- Klug, A. y Schwabe, J.W.** (1995) *Faseb T*, 9, 597-604.
- 30 **Kowalczykowski, S.C., Dixon, D.A., Eggleston, A.K., Lauder, S.D. y Rehrauer, W.M.** (1994) *Microbiol Rev*, 58, 401-65.
- Landegren, U., Kaiser, R., Sanders, J. y Hood, L.** (1988) *Science*, 241, 1077-80.
- 35 **Leung, D.W., Chen, E. y Goeddel, D.V.** (1989) *Technique*, 1, 11-15.
- Liao, H., McKenzie, T. y Hageman, R.** (1986) *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 576-80.
- Lissant, K.J., ed. Emulsions and emulsion technology. Surfactant Science New York: *Marcel Dekker*, 1984.
- 40 **Low, N.M., Holliger, P.H. y Winter, G.** (1996) *J Mol Biol*, 260, 359-68.
- Lowman, H.B., Bass, S.H., Simpson, N. y Wells, J.A.** (1991) *Biochemistry*, 30, 10832-8.
- 45 **Manley, J.L., Fire, A., Samuels, M. y Sharp, P.A.** (1983) *Methods Enzymol*, 101, 568-82.
- Mattheakis, L.C., Bhatt, R.R. y Dower, W.J.** (1994) *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 9022-6.
- Matts et al** (1993), *Biochemistry*, 32, 7323-7328
- 50 **Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. y Green, M.R.** (1984) *Nucleic Acids Res*, 12, 7035-6.
- Miele, E.A., Mills, D.R. y Kramer, F.R.** (1983) *J Mol Biol*, 171, 281-95.
- 55 **Mize, P.D., Hoke, R.A., Linn, C.P., Reardon, J.E. y Schulte, T.H.** (1989) *Anal Biochem*, 179, 229-35.
- Montigiani, S., - Neri, G., - Neri, P. y Neri, D.** (1996) *J Mol Biol*, 258, 6-13.
- 60 **Nissim, A., Hoogenboom, H.R. I Tomlinson, I.M., - Flynn, G., - Midgley, C., Lane, D. y Winter, G.** (1994) *Embo J*, 13, 692-8.
- Parmley, S.F. y Smith, G.P.** (1988) *Gene*, 73, 305-18.
- 65 **Pelham, H.R. y Jackson, R.J.** (1976) *Eur J Biochem*, 67, 247-56.
- Pirrung, M.C. y Huang, C.Y.** (1996) *Bioconjug Chem*, 7, 31721.

ES 2 312 630 T3

Roberts, B.E., Gorecki, M., Mulligan, R.C., Danna, K.J., Rozenblatt, S. y Rich, A. (1975) *Proc Natl Acad Sci USA*, 72, 1922-6.

Roberts, J.W. (1969) *Nature*, 224, 1168-74.

Roberts, R. & Szostak, J. (1997) RNA-peptide fusions for the *in vitro* selection of peptides and proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 12297-12302.

Rosenberg, M., Weissman, S. y Decrombrughe, B. (1975) *J Biol Chem*, 250, 4755-64.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. (1988) *Science*, 239, 487-91.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York.

Savage, M.D., Mattson, G., Desai, S., Nielander, G.W., Morgensen, S. y Conklin, E.J. (1994) Avidin-biotin chemistry: a handbook. *Pierce Chemical Company, Rockford*. **Schick, M.J. (1966)** Nonionic surfactants. *Marcel Dekker*, New York.

Sherman, P. (1968) *Emulsion science*. *Academic Press*, London.

Smith, G.P. (1985) *Science*, 228, 1315-7.

Schick, M.J. (1966) Nonionic surfactants. *Marcel Dekker*, New York.

Sherman, P. (1968) *Emulsion science*. *Academic Press*, London.

Smith, G.P. (1985) *Science*, 228, 1315-7.

Stemmer, W.P. (1994a) *Nature*, 370, 389-91.

Stemmer, W.P. (1994b) *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 10747-51.

Stofko, H.R., Carr, D.W. y Scott, J.D. (1992) *Febs Lett*, 302, 274-8.

Sundberg, S.A., Barrett, R.W., Pirrung, M., Lu, A.L., Kiangsoontra, B. y Holmes, C.P. (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 12050-12057.

Tawfik D. & Griffiths A.D. (1998) *Nature Biotech.* 16, 652

Tripet, B., Yu, L., Bautista, D.L., Wong, W.Y., Irvin, R.T. y Hodges, R.S. (1996) *Protein Engng.*, 9, 1029-1042.

Walker, G.T., Fraiser, M.S., Schram, J.L., Little, M.C., Nadeau, J.G. y Malinowski, D.P. (1992) *Nucleic Acids Res*, 20, 1691-6.

Weil, P.A., Luse, D.S., Segall, J. y Roeder, R.G. (1979) *Cell*, 18, 469-84.

Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. y Hoogenboom, H.R. (1994) *Annu Rev Immunol*, 12,433-55.

Yamagishi, J., Kawashima, H., Matsuo, N., Ohue, M., Yamayoshi, M., Fukui, T., Kotani, H., Furuta, R., Nakano, K. y Yamada, M. (1990) *Protein Eng*, 3, 713-9.

Yelamos, J., Klix, N., Goyenechea, B., Lozano, F., Chui, Y.L., Gonzalez, F.A., Pannell, R., Neuberger, M.S. y Milstein, C. (1995) *Nature*, 376, 225-9.

Zaccolo, M., Williams, D.M., Brown, D.M. y Gherardi, E. (1996) *J Mol Biol*, 255, 589-603.

REIVINDICACIONES

1. Emulsión que comprende un surfactante, una fase hidrófoba y una fase hidrófila que comprende una pluralidad de microcápsulas que contienen un sistema funcional de expresión eucariótico *in vitro*, en el que el surfactante es un surfactante químicamente inerte a base de silicona.
2. Emulsión según la reivindicación 1, en la que el surfactante a base de silicona es un copolímero de silicona.
3. Emulsión según la reivindicación 2, en la que el surfactante a base de silicona es el copolímero polisiloxano-policetil-poliethylenglicol.
4. Emulsión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el surfactante está provisto en una concentración v/v en la fase oleosa del 4%.
5. Emulsión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la emulsión comprende un sistema de expresión eucariótico *in vitro*.
6. Emulsión según la reivindicación 5, en la que el sistema de expresión eucariótico comprende la totalidad o parte de un lisado celular de mamífero.
7. Emulsión según la reivindicación 6, en la que el lisado es un lisado de reticulocitos.
8. Emulsión según la reivindicación 5, en la que el lisado es un lisado de reticulocitos de conejo.
9. Emulsión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la expresión y/o la actividad del producto génico en el interior de la emulsión está a un nivel de por lo menos el 1% del nivel del producto génico que se puede obtener mediante el sistema de expresión antes de la formación de la emulsión.
10. Emulsión según la reivindicación 9, en la que la expresión y/o la actividad del producto génico en el interior de la emulsión es de un nivel de por lo menos el 10%, por lo menos el 20% o por lo menos el 30% del nivel del producto génico que se puede obtener mediante el sistema de expresión antes de la formación de la emulsión.
11. Emulsión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la emulsión es estable durante la incubación a 30°C durante por lo menos una hora.
12. Emulsión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la fase hidrófoba comprende un aceite mineral.
13. Procedimiento de obtención de una emulsión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende agitar juntos en presencia de un surfactante químicamente inerte a base de silicona una composición hidrófoba y una composición hidrófila que comprende un sistema de expresión eucariótico.
14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que el surfactante está presente en la composición hidrófoba.
15. Procedimiento de obtención de un producto génico que comprende formar una emulsión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, permitiendo que el producto génico se exprese mediante el sistema de expresión y, opcionalmente, purificar el producto génico.
16. Producto génico obtenido mediante un procedimiento según la reivindicación 15.
17. Procedimiento para aislar uno o más elementos genéticos codificantes del producto génico que presenta una actividad deseada, que comprende las etapas siguientes:
 - (a) compartimentar los elementos genéticos en microcápsulas formadas a partir de una emulsión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12;
 - (b) expresar los elementos genéticos con el fin de preparar sus productos génicos respectivos en el interior de las microcápsulas;
 - (c) separar los elementos genéticos que producen el (los) producto(s) génico(s) que presenta la actividad deseada.
18. Procedimiento para compartimentar un elemento genético y expresar el elemento genético con el fin de formar su producto génico en el interior del compartimento, que comprende las etapas siguientes:
 - (a) formar una disolución acuosa que comprende el elemento genético y los componentes necesarios para expresarlo con el fin de formar su producto génico;

ES 2 312 630 T3

- (b) microencapsular la disolución con el fin de formar una microcápsula discreta que comprende el elemento genético;
- (c) exponer las microcápsulas a condiciones adecuadas para la expresión del elemento genético para formar su producto génico; en el que las microcápsulas se forman a partir de una emulsión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

19. Procedimiento de preparación de un producto génico, que comprende las etapas siguientes:

- (a) preparar un elemento genético que codifica el producto génico;
- (b) compartimentar los elementos genéticos en microcápsulas formadas a partir de una emulsión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12;
- (c) expresar los elementos genéticos con el fin de preparar sus productos génicos respectivos en el interior de las microcápsulas;
- (d) separar los elementos genéticos que producen el (los) producto(s) génico(s) que presenta(n) la actividad deseada; y
- (e) expresar el producto génico que presenta la actividad deseada.

20. Elemento genético aislado mediante la utilización del procedimiento según la reivindicación 17.

21. Producto génico aislado mediante la utilización del procedimiento según la reivindicación 17 o preparado mediante la utilización del procedimiento según la reivindicación 19.

Fig 1

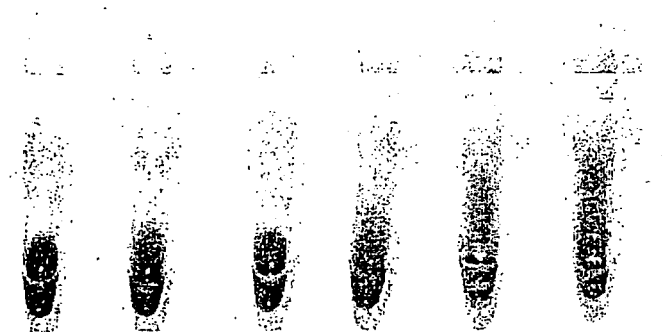


Fig 2

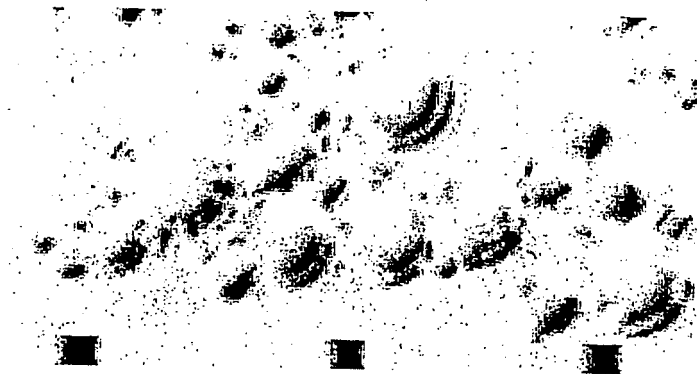
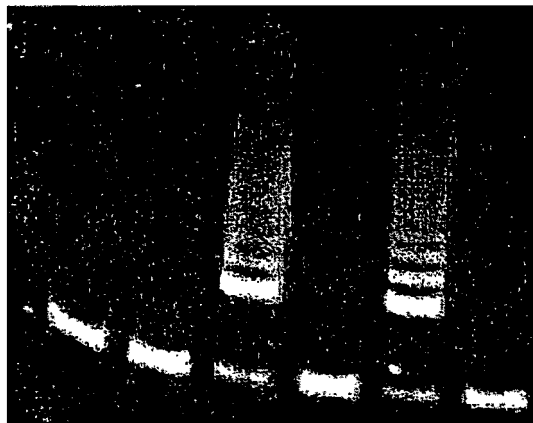


Fig 3

A



B



1 2 3 4 5 6