



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 293 162**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04078078 .5**
86 Fecha de presentación : **18.11.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1518937**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **30.03.2005**

54 Título: **Método para aumentar la concentración de moléculas de ácidos nucleicos.**

30 Prioridad: **16.11.2001 GB 0127564**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

73 Titular/es: **Medical Research Council
20 Park Crescent
London W1B 1AL, GB**

72 Inventor/es: **Holliger, Philipp y
Ghadessy, Farid**

74 Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

ES 2 293 162 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

Método para aumentar la concentración de moléculas de ácidos nucleicos.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere, entre otras cosas, a emulsiones adecuadas para compartimentalización de moléculas de ácido nucleico y a procedimientos que usan tales emulsiones. En particular, las emulsiones son útiles en procedimientos para aumentar la concentración de moléculas de ácido nucleico.

10 Antecedentes de la invención

Se han desarrollado recientemente procedimientos de compartimentalización basados en emulsiones de agua en aceite para usar en procedimientos de selección de repertorio (Tawfik y Griffiths 1998, Ghadessy y col 2001). La compartimentalización segrega genes individuales y sus productos codificados (administrados mediante células (Ghadessy y col., 2001) o expresados *in situ* (Tawfik y Griffiths, 1998)) en compartimentos acuosos individuales físicamente separados, asegurando de este modo la unión de genotipo y fenotipo durante el procedimiento de selección.

El documento WO99/02671 describe un procedimiento para aislar uno o más elementos genéticos que codifican un producto génico que tiene una actividad deseada. Los elementos genéticos se compartimentalizan primero en microcápsulas, que se forman preferentemente por emulsión, y que después se transcriben y/o se traducen para producir sus productos génicos respectivos (ARN o proteína) dentro de las microcápsulas. Como alternativa, los elementos genéticos pueden estar contenidos en microcápsulas de la emulsión y la transcripción y/o la traducción (expresión) del producto génico puede tener lugar usando la maquinaria celular. Los elementos genéticos que producen un producto génico que tiene una actividad deseada pueden clasificarse posteriormente. Por ejemplo, en algunos casos la clasificación puede deberse a que la actividad deseada induce un cambio en la microcápsula. En otros casos, la clasificación puede deberse a que la actividad deseada induce un cambio en el elemento genético.

El procedimiento descrito en el documento WO99/02671 funciona bien con bacterias. Aunque en principio el procedimiento de subcompartimentalización celular puede extenderse para incluir células eucariotas, por ejemplo, células de levadura, de insecto o de mamífero, para algunas aplicaciones sería deseable proporcionar directamente una expresión *in situ* en microcápsulas usando un sistema de transcripción/traducción eucariota *in vitro*.

Se ha informado de la expresión previa de una enzima procariota con éxito, la metilasa *Hae*, usando extractos de S30 bacterianos en emulsión (Tawfik D. y Griffiths A.D. 1998). Sin embargo, tales procedimientos no son adecuados para algunas proteínas de interés, por ejemplo, grandes proteínas y ribonucleoproteínas multidominio que con frecuencia no pueden expresarse en forma funcional usando extractos bacterianos.

Por lo tanto, puede observarse que un procedimiento que permita directamente la expresión *in situ* en microcápsulas usando un sistema de transcripción/traducción eucariota *in vitro*, aportará una contribución a la técnica.

Resumen de la invención

La invención proporciona un procedimiento para aumentar la concentración de una molécula de ácido nucleico, comprendiendo dicho procedimiento: (a) formar microcápsulas a partir de una emulsión de agua en aceite, incluyendo dichas microcápsulas ácido nucleico, una solución acuosa que comprende los componentes necesarios para realizar la amplificación de ácido nucleico y un tensioactivo basado en silicona químicamente inerte; y (b) amplificar dicho ácido nucleico en las microcápsulas para formar copias amplificadas del ácido nucleico; aumentando de este modo la concentración de dicho ácido nucleico en las cápsulas.

En el contexto de la presente invención, se considera que un tensioactivo es “químicamente inerte” si está sustancialmente libre de especies oxidantes, tales como peróxidos y aldehídos, y de especies desnaturilizantes de proteínas. Se consideran “sustancialmente libres” de especies oxidantes y de especies desnaturilizantes tensioactivos que tienen 40%, preferentemente 50%, más preferentemente 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% menos de especies oxidantes y especies desnaturilizantes de proteínas que uno cualquiera de los emulsionantes convencionales monooleato de sorbitán (SpanTM 80; ICI) y monooleato de polioxietilensorbitán (TweenTM 80; ICI).

Se usan en este documento los términos “aislamiento”, “clasificación” y “selección”, así como variaciones de los mismos. El término aislamiento, según la presente invención, se refiere al procedimiento de separar una entidad de una población heterogénea, por ejemplo una mezcla, de tal forma que esté libre de al menos una sustancia con la que estuviera asociada antes del procedimiento de aislamiento. En una realización preferida, el aislamiento se refiere a la purificación de una entidad esencialmente hasta la homogeneidad. La clasificación de una entidad se refiere al procedimiento de aislar de manera preferencial entidades deseadas sobre entidades no deseadas. En tanto en cuanto se refieran al aislamiento de las entidades deseadas, los términos “aislamiento” y “clasificación” son equivalentes. El procedimiento de la presente invención permite la clasificación de elementos genéticos deseados a partir de combinaciones (bibliotecas o repertorios) de elementos genéticos que contienen el elemento genético deseado. El término selección se usa para referirse al procedimiento (incluyendo el procedimiento de clasificación) de aislar una entidad según una propiedad particular de la misma.

ES 2 293 162 T3

En realizaciones preferidas de los procedimientos de la invención, la clasificación de elementos genéticos puede realizarse mediante una de esencialmente cuatro técnicas, que se detallan en el documento WO99/02671.

(I) En una primera realización, las microcápsulas se clasifican según una actividad del producto génico o de un derivado del mismo que hace que la microcápsula sea detectable como un todo. Por consiguiente, la invención proporciona un procedimiento según el segundo aspecto de la invención en el que un 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 que se clasifique la microcápsula que contiene el producto génico y el elemento genético que lo codifica. En esta realización, por lo tanto, las microcápsulas se clasifican físicamente entre sí según la actividad del(de los) producto(s) génico(s) expresados a partir del(de los) elemento(s) genético(s) contenidos en las mismas, lo que hace posible enriquecer de manera selectiva a favor de microcápsulas que contienen productos génicos con la actividad deseada.

(II) En una segunda realización, los elementos genéticos se clasifican después de la combinación de las microcápsulas en uno o más compartimentos comunes. En esta realización, un producto génico que tiene la actividad deseada modifica al elemento genético que lo codifica (y que se encuentra en la misma microcápsula) de tal manera que lo hace seleccionable en una etapa posterior. Se detienen las reacciones y después se rompen las microcápsulas de manera que se combina todo el contenido de las microcápsulas individuales. La selección a favor de los elementos genéticos modificados permite el enriquecimiento de los elementos genéticos que codifican el(los) producto(s) génico(s) que tienen la actividad deseada. Por consiguiente, la invención proporciona un procedimiento según el segundo aspecto de la invención, en el que en la etapa (b) el producto génico que tiene la actividad deseada modifica al elemento genético que lo codifica para permitir el aislamiento del elemento genético. Debe entenderse, por supuesto, que la modificación puede ser directa, en el sentido de que se provoca 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 implican al producto génico que tiene la actividad deseada, conducen a la modificación del elemento genético.

(III) En una tercera realización, los elementos genéticos se clasifican después de la combinación de las microcápsulas en uno o más compartimentos comunes. En esta realización, un gen con una actividad deseada induce un cambio en la microcápsula que contiene el producto génico y el elemento genético que lo codifica. Este cambio, cuando se detecta, desencadena la modificación del gen en el interior de la microcápsula. Se detienen las reacciones y después se rompen las microcápsulas de manera que se combina todo el contenido de las microcápsulas individuales. La selección a favor de los elementos genéticos modificados permite el enriquecimiento de los elementos genéticos que codifican el(los) producto(s) génico(s) que tienen la actividad deseada. Por consiguiente, la invención proporciona un procedimiento según el segundo aspecto de la invención, en el que en la etapa (b) el producto génico que tiene la actividad deseada induce un cambio en la microcápsula que se detecta y que desencadena la modificación del elemento genético en el interior de la microcápsula para permitir su aislamiento. Debe entenderse que el cambio detectado en la microcápsula puede provocarse por la acción directa del producto génico o por acción indirecta, en la que una serie de reacciones, una o más de las cuales implican al producto génico que tiene la actividad deseada, conducen al cambio detectado.

(IV) En una cuarta realización, los elementos genéticos pueden clasificarse mediante un procedimiento multietapa que implica al menos dos etapas, por ejemplo, para permitir la exposición de los elementos genéticos a condiciones que permitan que se produzcan al menos dos reacciones separadas. Como será obvio para los expertos en la materia, la primera etapa de microencapsulación de la invención debe dar lugar a condiciones que permitan la expresión de los elementos genéticos -ya sea transcripción, transcripción y/o traducción, replicación o similares. En estas condiciones, puede no ser posible seleccionar a favor de una actividad de un producto génico particular, por ejemplo, porque el producto génico puede no ser activo en estas condiciones o porque el sistema de expresión contenga una actividad interferente. La invención proporciona, por lo tanto, un procedimiento según el segundo aspecto de la presente invención en el que la etapa (b) comprende expresar los elementos genéticos para producir sus respectivos productos génicos en el interior de las microcápsulas, unir los productos génicos con los elementos genéticos que los codifican y aislar los complejos así formados. Esto permite que se aíslen de las microcápsulas los elementos genéticos y sus productos génicos asociados antes de que se produzca la clasificación según la actividad del producto génico. En una realización preferida, los complejos se someten a una etapa de compartimentalización adicional antes de aislar los elementos genéticos que codifican un producto génico que tiene la actividad deseada. Esta etapa de compartimentalización adicional, que ventajosamente tiene lugar en las microcápsulas, permite la realización de reacciones adicionales, en condiciones diferentes, en un entorno en el que los elementos genéticos y sus productos génicos respectivos están físicamente unidos. La clasificación final de elementos genéticos puede realizarse según las realizaciones (I), (II) o (III) anteriores.

La "encapsulación secundaria" puede realizarse también con elementos genéticos unidos a productos génicos por otros medios, tales como mediante presentación en fago, presentación en polisomas, fusión de ARN-péptido o fusión de péptido represor lac.

El(los) elemento(s) genético(s) seleccionado(s) pueden someterse también a posteriores, posiblemente más rigurosas rondas de selección en etapas repetidas de manera reiterada, volviendo a aplicar el procedimiento de la invención en su totalidad o solamente en etapas seleccionadas. Adaptando las condiciones de la manera apropiada, pueden aislarse elementos genéticos que codifiquen productos génicos que tengan una actividad más optimizada después de cada ronda de selección.

Además, los elementos genéticos aislados después de una primera ronda de selección pueden someterse a mutagénesis antes de repetir la selección mediante repeticiones reiteradas de las etapas del procedimiento de la invención como se ha expuesto anteriormente. Después de cada ronda de mutagénesis, algunos elementos genéticos se habrán modificado de tal manera que se potencia la actividad de los productos génicos.

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

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra emulsiones formadas mezclando una fase oleosa con un lisado de reticulocitos de conejo (RRL) durante 1,5 min y fotografiadas en el espectro visible después de una incubación de 15 min a 30°C. De izquierda a derecha: 1) mezcla de CSR, 2) mezcla de CSR + DDT, 3) Span80 a 1,5% en aceite mineral, 4) Span80 a 1,5% en aceite mineral + DDT, 5) Abil EM90TM a 4%, 6) Abil EM90TM a 4% + DDT.

La Figura 2 muestra una imagen de una emulsión de Abil EM90 a 4% en aceite mineral tomada en modo de contraste de fases. La distancia entre las barras es de 10 μ m.

La Figura 3 muestra los resultados de la 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 WT de expresión en tándem (150 ng); Carril 6, construcción mutante de delección en tándem (150 ng)

Panel B: En emulsión, mismas anotaciones en los carriles que en el panel A.

Descripción detallada

Emulsiones

Las emulsiones son sistemas heterogéneos de dos fases líquidas inmiscibles con una de las fases dispersa en la otra como gotitas de tamaño microscópico o coloidal (Becher, 1957; Sherman, 1968; Lissant, 1984). Las emulsiones de la invención deben permitir la formación de microcápsulas.

Las emulsiones pueden producirse a partir de cualquier combinación adecuada de líquidos inmiscibles. La emulsión de la presente invención tiene una fase hidrófila (que contiene los componentes bioquímicos) como la fase presente en forma de gotitas finamente divididas (la fase dispersa, interna o discontinua) y un líquido hidrófobo inmiscible (un "aceite") como matriz en la que están suspendidas estas gotitas (la fase no dispersa, continua o externa). Tales emulsiones se denominan "de agua en aceite" (W/O). Esto tiene la ventaja de que la fase acuosa que contiene los componentes bioquímicos se compartimentaliza en su totalidad en gotitas discretas (la fase interna). La fase externa, que es un aceite hidrófobo, generalmente no contiene ninguno de los componentes bioquímicos y es, por lo tanto, inerte.

La creación de una emulsión requiere generalmente la aplicación de energía mecánica para forzar que se junten las fases. Hay una variedad de maneras de hacer esto que utilizan una variedad de dispositivos mecánicos, incluyendo agitadores (tales como barras de agitación magnética, agitadores de hélice y de turbina, dispositivos de paletas y batidores), homogeneizadores (incluyendo homogeneizadores rotor-estator, homogeneizadores de válvula de alta presión y homogeneizadores de propulsión), molinos coloidales, dispositivos de ultrasonido y "de emulsión de membranas" (Becher, 1957; Dickinson, 1994).

Es deseable que la emulsión sea estable durante la incubación a 30°C durante al menos una hora. En algunos casos, se prefiere que también sea estable a mayores temperaturas, especialmente si se usan ciclos de temperatura durante PCR u otros procedimientos de amplificación.

Tensioactivos

Las emulsiones de la invención se estabilizan por adición de uno o más agentes surfactantes (tensioactivos). Estos tensioactivos se denominan agentes emulsionantes y actúan en la interfase agua/aceite para evitar (o al menos retrasar) la separación de las fases. Pueden usarse muchos aceites y muchos emulsionantes para la generación de emulsiones de agua en aceite; una recopilación reciente enumeraba más de 16.000 tensioactivos, muchos de los cuales se usan como agentes emulsionantes (Ash y Ash, 1993).

Sin embargo, como se describe en los ejemplos, los tensioactivos usados convencionalmente en aplicaciones de emulsiones tales como tensioactivos no iónicos (Schick, 1966), por ejemplo, monooleato de sorbitán (SpanTM 80; ICI

ES 2 293 162 T3

y monooleato de polioxietilensorbitán (TweenTM80;ICI) no son adecuados para la expresión eucariota eficaz *in vitro* con el lisado de reticulocitos de conejo.

5 Sin embargo, como se describe en este documento, tal expresión puede mantenerse cuando se usan tensioactivos basados en silicona químicamente inertes.

Preferentemente, el tensioactivo basado en silicona químicamente inerte de la emulsión es un copolímero de silicona.

10 Más preferentemente, el tensioactivo comprende un copolímero de polisiloxano-policetil-polietilenglicol (Cetyl Dimethicone Copolyol), por ejemplo, Abil.[®] EM90 (Goldschmidt).

15 El tensioactivo basado en silicona químicamente inerte puede proporcionarse como el único tensioactivo en la composición de emulsión, o puede proporcionarse como uno de varios tensioactivos. Por ejemplo, puede usarse una mezcla de diferentes tensioactivos.

En realizaciones preferidas, el tensioactivo se proporciona a una concentración v/v en la fase oleosa de la emulsión de 0,5 a 20%, preferentemente de 1 a 10%, más preferentemente de 3-5%.

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

25 En una realización muy preferida de la invención, la emulsión se realiza añadiendo una fase acuosa gota a gota a una fase oleosa en presencia de un tensioactivo que comprende aproximadamente 3-5% (v/v) de copolímero de polisiloxano-policetil-polietilenglicol en aceite mineral, preferentemente a una proporción de fase aceite: agua de 2,5:1.

El tensioactivo puede estar presente al principio con la composición hidrófoba. Por lo tanto, una composición que comprende el tensioactivo y la composición hidrófoba representa un aspecto adicional de la presente invención.

30 Como alternativa, el tensioactivo puede añadirse en una etapa posterior, por ejemplo, durante o después de mezclar las fases hidrófoba e hidrófila.

35 En esta realización el tensioactivo puede proporcionarse en un kit, junto con una composición hidrófoba. El kit puede incluir también opcionalmente un sistema de expresión eucariota tal como lisado de reticulocitos de conejo y/o un dispositivo para mezclar las fases hidrófoba e hidrófila. Puede incluir además instrucciones para su uso para proporcionar una emulsión de la presente invención.

Como alternativa, el tensioactivo puede estar presente al principio con la composición hidrófila.

40 *Microcápsulas*

45 El término “microcápsula” es sinónimo de “compartimento” y los términos se usan de manera intercambiable. En esencia, una microcápsula es un compartimento artificial cuyos bordes limitantes restringen el intercambio de los componentes de los mecanismos moleculares descritos en este documento, que permiten la clasificación de elementos genéticos según la función de los productos genéticos que codifican.

Las microcápsulas formadas mediante la emulsión requieren propiedades físicas apropiadas para permitir el funcionamiento en la invención. En particular, el contenido de cada microcápsula debe aislarse del contenido de las microcápsulas circundantes.

50 Preferentemente, las microcápsulas que se usan en los procedimientos de la presente invención podrán producirse en un número muy grande y, de este modo, compartimentalizar una biblioteca de elementos genéticos que codifican un repertorio de productos genéticos. La función de la microcápsula es permitir la co-localización del ácido nucleico y del polipéptido correspondiente codificado por el ácido nucleico. Esto se consigue preferentemente mediante la capacidad de la microcápsula de restringir sustancialmente la difusión de cadenas de molde y de producto a otras microcápsulas.

60 En segundo lugar, los procedimientos de la presente invención requieren que haya solamente un número limitado de elementos genéticos por microcápsula formada en la emulsión. Esto asegura que el producto genético de un elemento genético individual se aislará de otros elementos genéticos. Por lo tanto, la unión entre elemento genético y producto genético será muy específica. El factor de enriquecimiento es mayor con uno o menos elementos genéticos por microcápsula por término medio, o con dos o más copias de un único elemento genético por microcápsula, siendo la unión entre el ácido nucleico y la actividad del producto genético codificado tan estrecha como sea posible, ya que el producto genético de un elemento genético individual se aislará de los productos de otros elementos genéticos. Sin embargo, aunque no se use la situación teóricamente óptima de, por término medio, un único elemento genético o menos por microcápsula, se ha demostrado que es beneficiosa una proporción de 5, 10, 50, 100 ó 1000 o más elementos genéticos por microcápsula al clasificar una gran biblioteca. Rondas posteriores de clasificación, incluyendo una encapsulación renovada con diferente distribución de elementos genéticos, permitirán una clasificación más rigurosa de los elementos genéticos. Preferentemente, hay un solo menos por microcápsula.

ES 2 293 162 T3

En tercer lugar, la formación y la composición de las microcápsulas no debe suprimir la función de la maquinaria para la expresión de los elementos genéticos y la actividad de los productos génicos usando sistemas de expresión eucariotas *in vitro*.

5 Por consiguiente, las microcápsulas formadas mediante la emulsión deben cumplir estos tres requerimientos. La emulsión apropiada puede variar dependiendo de la naturaleza exacta de los requerimientos en cada aplicación de la invención, como será obvio para un experto en la materia.

10 El tamaño de microcápsula preferido variará dependiendo de los requerimientos exactos de cualquier procedimiento de selección individual que se vaya a realizar según la presente invención. En todos los casos, la consideración principal es la necesidad de la concentración requerida de los componentes en los compartimentos individuales para conseguir una transcripción/traducción eficaz. Esto puede equilibrarse con otros requerimientos que pueden referirse al tamaño de la biblioteca de genes, al enriquecimiento o a los procedimientos de clasificación.

15 Si se proporcionan microcápsulas pequeñas, pueden proporcionarse un número muy grande de microcápsulas separadas en un volumen pequeño de emulsión. Además, el suministro de microcápsulas pequeñas aumenta la selectividad aumentando la probabilidad de que solamente se produzca un tipo de producto génico en el interior de una microcápsula dada. Por lo tanto, se prefiere que, por término medio, no exista más de un elemento genético que vaya a transcribirse y/o traducirse por compartimento para mantener la unión entre el ácido nucleico y la actividad del producto génico codificado tan estrecha como sea posible. Sin embargo, aunque no se use la situación teóricamente óptima de, por término medio, un único elemento genético o menos por microcápsula, se ha demostrado que es beneficiosa una proporción de 5, 10, 50, 100 ó 1000 o más elementos genéticos por microcápsula al clasificar una gran biblioteca. Rondas posteriores de clasificación, incluyendo una encapsulación renovada con diferente distribución de elementos genéticos, permitirán una clasificación más rigurosa de los elementos genéticos. Preferentemente, no hay más de un único elemento genético por microcápsula por término medio.

20 Es deseable que el volumen medio de las microcápsulas sea menor de $5,2 \times 10^{-16} \text{ m}^3$ (que se corresponde con una microcápsula esférica de diámetro menor de $10 \mu\text{m}$), más deseable que sea menor de $6,5 \times 10^{-17} \text{ m}^3$ (que se corresponde con una microcápsula esférica de diámetro menor de $1 \mu\text{m}$) y es aún más deseable un volumen de aproximadamente $4,2 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ (que se corresponde con una microcápsula esférica de diámetro de aproximadamente $2 \mu\text{m}$).

30 La concentración real de ADN o de ARN en las microcápsulas puede aumentarse artificialmente por diversos procedimientos que conocerán bien los expertos en la materia. Éstos incluyen, por ejemplo, la adición de compuestos químicos de exclusión de volumen tales como polietilenglicoles (PEG) y una variedad de técnicas de amplificación de genes, incluyendo transcripción usando ARN polimerasas incluyendo las de bacterias tales como *E. coli* (Roberts, 1969; Blattner y Dahlberg, 1972; Roberts col., 1975; Rodsenberg col., 1975), las de eucariotas, por ejemplo (Weily col., 1979; Manley col., 1983) y las de bacteriófagos tales como T7, T3 y SP6 (Meltony col., 1984); la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saikiy col., 1988); amplificación de replicasa $Q\beta$ (Mieley col., 1983; Cahilly col., 1991; Chetverin y Spirin, 1995; Katanaevy col., 1995); la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Landegreny col., 1988; Barany, 1991); y sistemas de replicación autosostenida de secuencia (Fahyy col., 1991) y amplificación por desplazamiento de cadena (Walkery col., 1992). Pueden usarse ventajosamente técnicas de amplificación de genes usando ciclos de temperatura (tales como PCR y LCR) si las emulsiones y los sistemas de transcripción *in vitro* o de transcripción-traducción acopladas son termoestables.

45 Aumentar la concentración local eficaz de ácido nucleico permite que las microcápsulas se usen más eficazmente. Por lo tanto, pueden usarse microcápsulas que tienen volúmenes de hasta sólo aproximadamente $5,2 \times 10^{-16} \text{ m}^3$ (que se corresponden con una esfera de $10 \mu\text{m}$ de diámetro) para muchos fines, aunque, por supuesto, pueden usarse microcápsulas con volúmenes mayores si se desea.

50 El tamaño de la microcápsula debe ser suficientemente grande para contener todos los componentes requeridos por las reacciones bioquímicas que se necesita que se produzcan en el interior de la microcápsula. Por ejemplo, *in vitro*, tanto las reacciones de transcripción como las reacciones de transcripción-traducción acopladas requieren con frecuencia una concentración total de nucleósidos trifosfato de aproximadamente 2 mM.

55 Puede señalarse también que, para transcribir un gen en una molécula pequeña de ARN sencillo de 500 bases de longitud, se requerirá un mínimo de 500 moléculas de nucleósido trifosfato por microcápsula ($8,33 \times 10^{-22}$ moles). Para constituir una solución 2 mM, este número de moléculas debe estar contenido en una microcápsula de $4,17 \times 10^{-19}$ litros ($4,17 \times 10^{-22} \text{ m}^3$) de volumen, que, si es esférica, tendría un diámetro de 93 nm.

60 Además, particularmente en el caso de reacciones que implican traducción, debe señalarse que los ribosomas eucariotas necesarios para que se produzca la traducción tienen un diámetro de aproximadamente 30 nm. Por lo tanto, el límite inferior preferido para las microcápsulas es un diámetro de aproximadamente $0,1 \mu\text{m}$ (100 nm).

65 Por lo tanto, el volumen de la microcápsula es preferentemente del orden entre $5,2 \times 10^{-22} \text{ m}^3$ y $5,2 \times 10^{-16} \text{ m}^3$, que se corresponde con una esfera de diámetro entre $0,1 \mu\text{m}$ y $10 \mu\text{m}$, más preferentemente entre $5,2 \times 10^{-19} \text{ m}^3$ y $6,5 \times 10^{-17} \text{ m}^3$ ($1 \mu\text{m}$ y $5 \mu\text{m}$).

ES 2 293 162 T3

Aunque se prefieren microcápsulas pequeñas para ciertas aplicaciones, como en los procedimientos descritos en el documento WO99/02671, es importante señalar que la presente invención no se limita de ningún modo al suministro de microcápsulas pequeñas y que los sistemas de transcripción y de traducción también funcionan en microcápsulas grandes.

5

El tamaño de las microcápsulas en emulsión puede variarse simplemente adaptando las condiciones de emulsión usadas para formar la emulsión según los requerimientos del sistema de selección.

10 El tamaño del compartimento puede variarse (dentro de los límites de estabilidad de la emulsión y de inactivación del RRL) mediante 1) un tiempo de mezcla aumentado, 2) diferentes proporciones W/O y 3) diferentes concentraciones de tensioactivo.

15 La distribución de tamaños de microcápsulas en las emulsiones puede determinarse por cualquier procedimiento conocido por un experto en la materia. Por ejemplo, la distribución de tamaños puede evaluarse usando difracción de láser (por ejemplo, usando un Coulter LS230 Particle Size Analyser) o mediante examen microscópico.

Expresión

20 El término “expresión”, como se usa en este documento, se usa en su sentido más amplio, para referirse a que un ácido nucleico contenido en el elemento genético se convierte en su producto génico. Por lo tanto, cuando el ácido nucleico es ADN, la expresión se refiere a la transcripción del ADN en ARN; cuando el ARN codifica una proteína, la “expresión” puede referirse también a la traducción del ARN en una proteína. Cuando el ácido nucleico es ARN, la “expresión” puede referirse a la replicación de este ARN en copias de ARN adicionales, a la transcripción inversa del ARN en ADN y, opcionalmente, a la transcripción de este ADN en molécula(s) de ARN adicional(es), así como, opcionalmente, a la traducción de cualquiera de las especies de ARN producidas en proteínas. Preferentemente, por lo tanto, la “expresión” se realiza mediante uno o más procedimientos seleccionados del grupo constituido por transcripción, transcripción inversa, replicación y traducción.

30 La “expresión” del elemento genético puede referirse, por lo tanto, a ADN, ARN o proteína, o a un ácido nucleico o proteína que contiene bases o aminoácidos no naturales (el producto génico) en el interior de la microcápsula de la invención, de manera que el producto génico está confinado dentro de la misma microcápsula que el elemento genético.

Sistemas de expresión

35

Puede usarse cualquier sistema de expresión eucariota *in vitro* apropiado en la emulsión de la invención con tal que incluya los componentes que se necesitan para la transcripción y/o traducción. Si se desea glicosilación, entonces pueden estar presentes también una o más glicosilasas, según sea apropiado, para conseguir un patrón de glicosilación deseado.

40

El sistema de expresión puede, por ejemplo, comprender todo o parte de un lisado o extracto celular. Por ejemplo, puede usarse extracto de germen de trigo (Andersony col., 1983) y está disponible en el mercado en Promega. Es deseable, sin embargo, que el lisado celular sea un lisado celular de mamífero. Puede ser un lisado de reticulocitos. Un lisado de reticulocitos preferido es un lisado de reticulocitos de conejo (un “RRL”). El sistema RRL está bien caracterizado (véase, por ejemplo, Pelham y Jackson, 1976) y está disponible en el mercado en Promega.

45

Sin embargo, puede usarse cualquier sistema de expresión eucariota conveniente preparado a partir de otros extractos celulares. Los extractos deben contener todos los componentes que se requieren para la traducción del ARN (por ejemplo, ribosomas, ARNt, aminoacil-ARNt sintetasas, factores de inicio, de elongación y de terminación, etc), con los extractos preferentemente suplementados con aminoácidos, ATP, GTP, creatina fosfato y creatina fosfoquinasa, y otros cofactores tales como Mg^{2+} .

50

Usando emulsiones de la presente invención es posible obtener una expresión apreciable de un elemento genético y/o actividad de un producto génico usando un sistema de expresión eucariota *in vitro* presente en una emulsión. La expresión y/o actividad está deseablemente a un nivel de al menos 1% de la que se consigue para el producto génico con el sistema de expresión antes de la formación de la emulsión. Más preferentemente, es de al menos 10%, 20% o 30% de dicho nivel y/o actividad.

55

Elementos genéticos

60

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

65

Pueden usarse ácidos nucleicos que codifican cualquier producto génico apropiado en los sistemas de transcripción y/o traducción *in vitro*. Además de las secuencias codificantes, los ácidos nucleicos pueden, por ejemplo, comprender promotores, operadores, potenciadores, secuencias de inicio y de terminación transduccional y transcripcional, secuencias de poliadenilación, sitios de corte y empalme, regiones reguladoras cadena arriba y cadena abajo, etc., según

ES 2 293 162 T3

se requieran para la transcripción y/o traducción. En algunos casos, puede preferirse usar promotores inducibles y/o sensibles a temperatura para asegurar que la expresión se produce solamente en una etapa particular.

5 El componente de ácido nucleico del elemento genético puede unirse además, covalentemente o no covalentemente, a una o más moléculas o estructuras, incluyendo polipéptidos, péptidos, entidades y grupos químicos, soportes de fase sólida tales como perlas magnéticas, y similares. En los procedimientos de la invención, estas estructuras o moléculas pueden diseñarse para facilitar la clasificación y/o aislamiento del elemento genético que codifica un producto génico con la actividad deseada.

10 Como se deducirá de lo siguiente, en muchos casos, el polipéptido u otro grupo o construcción molecular es un ligando o sustrato que se une directa o indirectamente o que reacciona con el producto génico para marcar al elemento genético. Esto permite la clasificación del elemento genético según la actividad del producto génico.

15 El ligando o sustrato puede unirse con el ácido nucleico mediante una diversidad de medios que serán obvios para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Hermanson, 1996). Cualquier señal será suficiente para permitir la posterior selección del elemento genético. La clasificación puede ser por cualquier procedimiento que permita la separación, amplificación o supervivencia preferencial del elemento genético marcado. Los ejemplos incluyen la selección mediante unión (incluyendo técnicas basadas en separación magnética, por ejemplo, usando Dynabeads™) y mediante resistencia a la degradación (por ejemplo, mediante nucleasas, incluyendo endonucleasas de restricción):

20 Una manera en la que puede unirse una molécula de ácido nucleico con un ligando o sustrato es mediante biotinylación. Esto puede realizarse mediante amplificación por PCR con un cebador de biotinylación en 5' tal que la biotina y el ácido nucleico se unan covalentemente. Puede unirse un ácido nucleico biotinylado con una microperla de poliestireno (0,035 a 0,2 μm de diámetro) que esté revestida con avidina o estreptavidina, por lo que se unirá con el ácido nucleico con una afinidad muy alta. Esta perla puede modificarse con sustrato o con ligando por cualquier procedimiento adecuado tal como añadiendo sustrato biotinylado o mediante unión covalente.

25 Como alternativa, puede unirse un ácido nucleico biotinylado con avidina o estreptavidina que estén formando un complejo con una gran molécula proteica tal como tiroglobulina (669 kD) o ferritina (440 kD). Este complejo puede modificarse con sustrato o con ligando, por ejemplo, mediante unión covalente con el grupo α -amino de lisinas o mediante una interacción no covalente tal como biotina-avidina. El sustrato puede estar presente en forma no unida al elemento genético pero conteniendo una "señal" inactiva que requiere una etapa adicional para activarse, tal como fotoactivación (por ejemplo, un análogo de biotina "enjaulado" (Sundberg col., 1995; Pirrung y Huang, 1996)). Después, el catalizador a seleccionar convierte el sustrato en producto. Entonces la "señal" puede activarse, y el sustrato "marcado" y/o el producto unido mediante una molécula de unión a señal (por ejemplo, avidina o estreptavidina) formar un complejo con el ácido nucleico. La proporción de sustrato con respecto a producto unido con el ácido nucleico mediante la "señal" reflejará, por lo tanto, la proporción del sustrato y del producto en la solución.

30 Una alternativa es unir el ácido nucleico con un anticuerpo específico de producto (u otra molécula específica de producto). En esta situación, el sustrato (o uno de los sustratos) está presente en cada microcápsula no unido con el elemento genético, pero tiene una "señal" molecular (por ejemplo, biotina, DIG o DNP). Cuando un catalizador a seleccionar convierte el sustrato en producto, el producto retiene la "señal" y, después, se captura en la microcápsula por el anticuerpo específico de producto. De esta manera, el elemento genético solamente se asocia con la "señal" cuando codifica o produce una enzima capaz de convertir el sustrato en producto.

35 Cuando se detienen todas las reacciones y se combinan las microcápsulas, los elementos genéticos que codifican enzimas activas pueden enriquecerse usando un anticuerpo u otra molécula que se una o que reaccione específicamente con la "señal". Aunque tanto sustrato como producto tienen la señal molecular, sólo los elementos genéticos que codifiquen el producto génico activo se co-purificarán.

40 En una aplicación muy preferida, los procedimientos de la presente invención son útiles para clasificar bibliotecas de elementos genéticos. La invención, por consiguiente, proporciona un procedimiento según los aspectos precedentes de la invención, en el que los elementos genéticos se aíslan de una biblioteca de elementos genéticos que codifican un repertorio de productos génicos. En este documento, los términos "biblioteca", "repertorio" y "combinación" se usan según su significado común en la técnica, de manera que una biblioteca de elementos genéticos codifica un repertorio de productos génicos. En general, las bibliotecas se construyen a partir de combinaciones de elementos genéticos y tienen propiedades que facilitan la clasificación.

45 La selección inicial de un elemento genético de una biblioteca de elementos genéticos usando la presente invención requerirá en la mayoría de los casos la clasificación de un gran número de variantes de elementos genéticos. Pueden generarse bibliotecas de elementos genéticos de una variedad de maneras diferentes, incluyendo las siguientes.

50 Pueden clonarse combinaciones de elementos genéticos de origen natural a partir de ADN genómico o de ADNc (Sambrook col., 1989); por ejemplo, se ha demostrado que las bibliotecas de anticuerpos de fagos, generadas mediante amplificación por PCR de repertorios de genes de anticuerpos de donantes inmunizados o no inmunizados, son fuentes muy eficaces de fragmentos de anticuerpos funcionales (Wintery col., 1994; Hoogenboom, 1997). Pueden generarse también bibliotecas de genes codificando la totalidad (véase, por ejemplo, Smith, 1985; Parmley y Smith, 1988) o parte de los genes (véase, por ejemplo, Lowmany col., 1991) o combinaciones de genes (véase, por ejemplo,

Nissimy col., 1994) mediante un oligonucleótido sintético aleatorio o dopado. También pueden generarse bibliotecas introduciendo mutaciones en un elemento genético o en una combinación de elementos genéticos “aleatoriamente” mediante una variedad de técnicas *in vivo*, incluyendo; uso de “cepas mutantes” de bacterias tales como *E. coli mutD5* (Liao y col., 1986, Yamagishiy col., 1990; Lowy col., 1996); uso del sistema de hipermutación de anticuerpos de linfocitos B (Yelamosy col., 1995). Pueden introducirse también mutaciones aleatorias tanto *in vivo* como *in vitro* mediante mutágenos químicos e ionización o irradiación UV (véase Friedberg y col., 1995), o incorporación de análogos de bases mutagénicas (Freese, 1959; Zaccoloy col., 1996). También pueden introducirse mutaciones “aleatorias” en genes *in vitro* durante la polimerización, por ejemplo, usando polimerasas con tendencia a cometer errores (Leung y col., 1989).

Puede introducirse diversificación adicional usando recombinación homóloga *in vivo* (véase Kowalczykowski col., 1994) o *in vitro* (Stemmer, 1994a; Stemmer, 1994b)

Producto génico

La presente invención puede usarse, por lo tanto, para producir productos génicos deseados específicos o para producir una serie de productos génicos diversos (que pueden ser parcialmente o totalmente desconocidos) con fines de clasificación.

El término “*producto génico*” se usa en este documento en su sentido más amplio para incluir no sólo polipéptidos sino también productos génicos de ARN. Por lo tanto, incluye los productos de la transcripción en solitario, así como los productos tanto de transcripción como de traducción.

Son productos génicos preferidos polipéptidos de origen natural en células eucariotas (especialmente células de mamíferos o humanas) pero no en células procariotas, o formas mutantes de tales polipéptidos que tienen una o más modificaciones de aminoácidos en relación con el polipéptido eucariota de tipo natural. Las formas mutantes son útiles para generar diversidad, por ejemplo con fines de investigación. Sin embargo, si se realizan modificaciones de aminoácidos se prefiere que se limiten a un número de tales modificaciones, por ejemplo, que se modifiquen menos de 50, menos de 25, menos de 10 o menos de 5 aminoácidos en relación con el polipéptido de tipo natural. Las formas mutantes pueden actuar, por ejemplo, como antagonistas o agonistas de una o más actividades biológicas de un polipéptido de tipo silvestre. Por lo tanto, pueden ser útiles para estudiar las relaciones entre estructura y función, en investigación, en programas de desarrollo de fármacos, etc. Pueden introducirse mutaciones en ácidos nucleicos mediante cualquier procedimiento apropiado. Por ejemplo, puede generarse una secuencia de ácido nucleico que incorpore un cambio de secuencia deseado mediante mutagénesis dirigida. Éste puede usarse después para permitir la expresión de un ARN o de un polipéptido que tenga el correspondiente cambio en su secuencia. Como alternativa, puede sintetizarse un ácido nucleico que incluya una mutación dada. También pueden proporcionarse mutaciones usando agentes mutágenos y/o irradiación.

Para ciertas aplicaciones el sistema de expresión puede usarse para expresar un producto génico útil en la replicación, reparación, mantenimiento o replicación de un ácido nucleico de una célula eucariota, preferentemente de una célula de mamífero o humana. El producto génico puede, por lo tanto, tener actividad como polimerasa, transcriptasa inversa, ligasa o telomerasa, por ejemplo. Puede tener más de una de estas actividades. Si está implicado en la reparación de ácidos nucleicos, puede tener actividad exonucleasa.

Pueden producirse productos génicos en los compartimentos formados por la fase hidrófila de la emulsión y que contengan el sistema de expresión.

Procedimientos de selección

Los procedimientos pueden configurarse para seleccionar moléculas de producto génico de ARN, ADN o proteína con actividad catalítica, reguladora o de unión.

(i) Selección de afinidad

En el caso de la selección de un producto génico con afinidad por un ligando específico, el elemento genético puede unirse al producto génico en la microcápsula a través del ligando. Sólo los productos génicos con afinidad por el ligando se unirán, por lo tanto, al elemento genético en sí y, por lo tanto, sólo los elementos genéticos que produzcan producto activo se conservarán en la etapa de selección. En esta realización, el elemento genético comprenderá, por lo tanto, un ácido nucleico que codifica el producto génico unido a un ligando para el producto génico.

En esta realización, todos los productos génicos a seleccionar contienen un supuesto dominio de unión por el que van a seleccionarse y una característica común -una señal. El elemento genético en cada microcápsula está físicamente unido al ligando. Si el producto génico producido a partir del elemento genético tiene afinidad por el ligando, se unirá a él y estará físicamente unido al mismo elemento genético que lo codificó, dando lugar a que el elemento genético esté “marcado”. Al final de la reacción, se combinan todas las microcápsulas y se combinan todos los elementos genéticos y productos génicos en un entorno. Los elementos genéticos que codifiquen productos génicos que presenten la unión deseada pueden seleccionarse mediante purificación de afinidad usando una molécula que se una específicamente, o que reaccione específicamente con la “señal”.

En una realización alternativa, pueden clasificarse elementos genéticos basándose en que el producto génico, que se une al ligando, simplemente oculta al ligando de, por ejemplo, parejas de unión adicionales. Ante esta eventualidad, el elemento genético, en lugar de retenerse durante la etapa de purificación de afinidad, puede eluirse selectivamente mientras que otros elementos genéticos quedan unidos.

En una realización alternativa, la invención proporciona un procedimiento según el segundo aspecto de la invención, en el que en la etapa (b) los productos génicos se unen a elementos genéticos que los codifican. Los productos génicos junto con los elementos genéticos unidos se clasifican después como resultado de la unión de un ligando a los productos génicos que tienen la actividad deseada. Por ejemplo, todos los productos génicos pueden contener una región invariable que se una covalentemente o no covalentemente al elemento genético, y una segunda región que esté diversificada para generar la actividad de unión deseada.

La clasificación por afinidad es dependiente de la presencia de dos miembros de una pareja de unión en tales condiciones que pueda producirse la unión. Cualquier pareja de unión puede usarse para este fin. Como se usa en este documento, el término pareja de unión se refiere a cualquier pareja en moléculas capaz de unirse entre sí. Los ejemplos de parejas de unión que pueden usarse en la presente invención incluyen un antígeno y un anticuerpo o fragmento del mismo capaz de unirse con el antígeno, la pareja biotina-avidina/estreptavidina (Savagey col., 1994), un polipéptido de unión dependiente de calcio y un ligando del mismo (por ejemplo, calmodulina y un péptido de unión a calmodulina (Stofkoy col., 1992, Montigianiy col., 1996)), parejas de polipéptidos que se ensamblan para formar una cremallera de leucina (Tripety col., 1996), histidinas (normalmente péptidos de hexahistidina) y Cu^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} quelados (por ejemplo, Ni-NTA; Hochulyiy col., 1987), proteínas de unión a ARN y de unión a ADN (Klug, 1995) incluyendo las que contienen motivos de dedos de zinc (Klug y Schwabe, 1995) y ADN metiltransferasas (Anderson, 1993) y sus sitios de unión a ácidos nucleicos.

Sin embargo, la utilidad de ciertos procedimientos de selección basados en afinidad puede ser limitada. Especialmente con interacciones de baja a media afinidad, la semivida de las interacciones puede ser con frecuencia demasiado corta en comparación con el tiempo que se requiere para detectar las interacciones.

Por lo tanto, en una realización de la presente invención, los procedimientos de selección se basan en aumentar la afinidad de las interacciones intermoleculares permitiendo que se produzcan interacciones multivalentes. El aumento aparente de afinidad resultante que se consigue con una interacción multivalente, también denominada avidéz, se debe al hecho de que tienen lugar dos o más interacciones de unión en el mismo complejo molecular, ya que el coste entrópico adicional de la segunda o más interacciones es muy pequeño. Esto es porque ya se han perdido la mayoría de los grados de libertad con la inmovilización del ligando multivalente mediante la unión con el primer sitio de unión. Sin embargo, la avidéz puede tener efectos particularmente drásticos sobre la cinética de disociación (k_{off}), ya que tienen que romperse todas las interacciones antes de que pueda producirse la disociación.

Por lo tanto, en esta realización, pueden seleccionarse moléculas que interactúen permitiendo que se produzcan interacciones multivalentes entre las moléculas, aumentando por lo tanto la estabilidad de cualquier complejo que se forme en comparación con una interacción monovalente correspondiente.

Preferentemente, la primera y/o segunda molécula de interacción, por ejemplo, el producto génico y la molécula de ligando a la que se une, se han modificado para aumentar su valencia. Preferentemente, existen uno o más grupos reactivos en las moléculas de producto génico o de ligando, o en ambas, de manera que las moléculas de producto génico (y/o de ligando) se asocian entre sí para formar complejos de producto génico multivalentes y/o complejos de moléculas de ligando multivalentes. Los complejos multivalentes pueden seleccionarse después para la unión según la invención. Preferentemente, los grupos reactivos forman un enlace covalente en la interacción.

El término “complejo multivalente”, como se usa en este documento, se refiere a un complejo molecular que comprende (i) al menos dos moléculas de producto génico o al menos una molécula de un producto génico multivalente y (ii) una molécula de ligando multivalente, en el que las al menos dos moléculas de producto génico interactúan con la molécula de ligando o la al menos una molécula de un producto génico multivalente interactúa con la molécula de ligando mediante al menos dos valencias.

En tales procedimientos de selección de avidéz, la molécula de ligando es preferentemente multivalente. Por ejemplo, cuando la molécula de ligando es un polipéptido, la molécula de ligando puede ser multivalente en virtud de que se exprese como proteína de fusión a un tercer polipéptido con el que multimeriza.

Las moléculas de producto génico y/o de ligando pueden comprender una señal, por ejemplo, una señal o resto de biotina o de un epítopo myc, para facilitar la purificación de los complejos formados entre ellos, y/o para facilitar la recuperación de las moléculas de producto génico y/o de ligando para su análisis e identificación.

La molécula de ligando es normalmente un multímero, tal como un dímero, o capaz de formar un homomultímero en las condiciones de reacción usadas en los procedimientos de la invención. Como alternativa, la molécula de ligando puede ser un heteromultímero. Se prefiere usar moléculas de ligando que sean polipéptidos que hayan sido fabricados para que sean multiméricos pero cuyas subunidades constituyentes no forman normalmente multímeros. Esto puede conseguirse mediante unión química de dos o más moléculas para formar un multímero unido covalentemente. Como alternativa, en el caso de moléculas de ligando que son polipéptidos y que se unen a productos génicos que son

polipéptidos, las moléculas pueden expresarse como fusión a un tercer polipéptido, formando el tercer polipéptido homomultímeros que producen eficazmente la multimerización de la secuencia polipeptídica del ligando fusionado. Un ejemplo de un tercer polipéptido adecuado (denominado en este documento polipéptido “gancho”) es la glutatión-S-transferasa (GST), que forma dímeros. Los polipéptidos gancho preferidos proporcionan buenos niveles de expresión de productos solubles. En una realización, se prefieren polipéptidos gancho que sean adecuados para secretarse en el periplasma bacteriano (por ejemplo, GST después de la eliminación de los 3 residuos Cys de la superficie (Tudyka y Skerra, 1997)). La molécula de ligando puede proporcionarse como una pluralidad de moléculas de ligando.

En una realización particularmente preferida de la invención, los productos génicos son polipéptidos codificados por primeros polinucleótidos y los polinucleótidos se asocian con los polipéptidos correspondientes de manera que cuando se selecciona un primer polipéptido durante los procedimientos de investigación de la presente invención, la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido seleccionado está físicamente unida, o en estrecha proximidad, y puede recuperarse fácilmente y, por ejemplo, secuenciarse para determinar la identidad del polipéptidos seleccionado. Para conseguir esto, la pluralidad de primeros polinucleótidos en un compartimento debe ser tal que, por término medio, haya un único polinucleótido por uso en la emulsión de la presente invención.

Se describen detalles adicionales de procedimientos de selección basados en avidez, que pueden usarse en los procedimientos de la presente invención, en la solicitud de Patente de Gran Bretaña en tramitación 0114856.8.

(ii) *Catálisis*

Cuando la selección es por catálisis, el elemento genético en cada microcápsula puede comprender el sustrato de la reacción. Si el elemento genético codifica un producto génico capaz de actuar como catalizador, el producto génico catalizará la conversión del sustrato en el producto. Por lo tanto, al final de la reacción, el elemento genético está físicamente unido al producto de la reacción catalizada. Cuando se combinan las microcápsulas y se combinan los reactivos, los elementos genéticos que codifican moléculas catalíticas pueden enriquecerse seleccionando a favor de cualquier propiedad específica del producto.

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

Como alternativa, puede realizarse una selección indirectamente acoplando una primera reacción a reacciones posteriores que tengan lugar en la misma microcápsula. Existen dos formas generales en las que esto puede realizarse. En primer lugar, el producto de la primera reacción puede hacerse reaccionar con, o unirse a, una molécula que no reaccione con el sustrato de la primera reacción. En segundo lugar, la reacción acoplada sólo se desarrollará en presencia del producto de la primera reacción. Después, un elemento genético activo puede purificarse mediante selección por las propiedades del producto de la segunda reacción.

Como alternativa, el producto de la reacción que se está seleccionando puede ser el sustrato o cofactor de una segunda reacción catalizada por enzimas. La enzima que cataliza la segunda reacción puede traducirse *in situ* en las microcápsulas o incorporarse en la mezcla de reacción antes de la microencapsulación. Sólo cuando se lleva a cabo la primera reacción, la enzima acoplada generará un producto seleccionable.

Este concepto de acoplamiento puede desarrollarse para incorporar múltiples enzimas, usando cada una como sustrato el producto de la reacción previa. Esto permite la selección de enzimas que no reaccionarán con un sustrato inmovilizado. También puede diseñarse para proporcionar una sensibilidad aumentada mediante la amplificación de la señal si un producto de una reacción es un catalizador o un cofactor para una segunda reacción o serie de reacciones que conducen a un producto seleccionable (por ejemplo, véase Johannson y Bates, 1988; Johannsson, 1991). Además, un sistema de cascada enzimática puede basarse en la producción de un activador para una enzima o en la destrucción de un inhibidor de enzimas (véase Mizzy col., 1989). El acoplamiento tiene también la ventaja de que puede usarse un sistema de selección común para un grupo completo de enzimas que generan el mismo producto, y permite la selección de transformaciones químicas complejas que no puede realizarse en una sola etapa.

Por lo tanto, tal procedimiento de acoplamiento permite la evolución de nuevas “rutas metabólicas” *in vitro* de manera gradual, seleccionando y mejorando primero una etapa y después la siguiente. La estrategia de selección se basa en el producto final de la ruta, de manera que todas las etapas anteriores pueden evolucionarse de manera independiente o secuencialmente sin que tenga que establecerse un nuevo sistema de selección para cada etapa de la reacción.

Expresado de una manera alternativa, se proporciona un procedimiento de aislamiento de uno o más elementos genéticos que codifican un producto génico que tiene una actividad catalítica deseada, que comprende las etapas de:

- (1) expresar elementos genéticos para dar sus productos génicos respectivos;

ES 2 293 162 T3

(2) permitir que los productos génicos catalicen la conversión de un sustrato en un producto, que puede ser o no directamente seleccionable, según la actividad deseada;

5 (3) opcionalmente, acoplar la primera reacción con una o más reacciones posteriores, estando controlada cada reacción por el producto de las reacciones previas, y conduciendo a la generación de un producto final seleccionable;

(4) unir el producto seleccionable de la catálisis a los elementos genéticos mediante:

10 (a) acoplamiento de un sustrato con los elementos genéticos de tal manera que el producto permanezca asociado con los elementos genéticos, o

(b) reacción o unión del producto seleccionable con los elementos genéticos mediante una “señal” molecular adecuada unida al sustrato que permanece sobre el producto, o

15 (c) acoplamiento del producto seleccionable (pero no del sustrato) a los elementos genéticos por medio de una reacción específica de producto o de una interacción con el producto;

(5) seleccionar el producto de la catálisis junto con el elemento genético al que está unido por medio de una reacción específica o de una interacción con el producto, o mediante purificación de afinidad usando una “señal” molecular adecuada unida al producto de la catálisis; en el que en las etapas (1) a (4) cada elemento genético y su producto génico respectivo están contenidos dentro de una microcápsula formada a partir de una emulsión de la invención.

25 (iii) Regulación

Puede usarse un sistema similar para seleccionar por propiedades reguladoras de enzimas.

30 En el caso de la selección a favor de una molécula reguladora que actúa como activador o como inhibidor de un procedimiento bioquímico, los componentes del procedimiento bioquímico pueden traducirse *in situ* en cada microcápsula o pueden incorporarse en la mezcla de reacción antes de la microencapsulación. Si el elemento genético que se está seleccionado va a codificar un activador, puede realizarse la selección para el producto de la reacción regulada, como se ha descrito anteriormente en relación con la catálisis. Si se desea un inhibidor, la selección puede ser por una propiedad química específica del sustrato de la reacción regulada.

35 Por lo tanto, se proporciona un procedimiento de clasificación de uno o más elementos genéticos que codifican un producto génico que presenta una actividad reguladora deseada, que comprende las etapas de:

(1) expresar los elementos genéticos para dar sus productos génicos respectivos;

40 (2) permitir que los productos génicos activen o inhiban una reacción bioquímica o una secuencia de reacciones acopladas según la actividad deseada, de manera tal que permitan la generación o la supervivencia de una molécula seleccionable;

(3) unir la molécula seleccionable con los elementos genéticos mediante:

45 (a) teniendo la molécula seleccionable o el sustrato del que deriva unido a los elementos genéticos, o

(b) reacción o unión del producto seleccionable con los elementos genéticos por medio de una “señal” molecular adecuada unida al sustrato que permanece sobre el producto, o

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

55 (4) seleccionar el producto seleccionable junto con el elemento genético al que está unido por medio de una reacción específica o por interacción con el producto seleccionable, o mediante purificación de afinidad usando una “señal” molecular adecuada unida al producto de la catálisis;

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

(iv) Clasificación de microcápsulas

65 La invención proporciona la clasificación de microcápsulas intactas cuando lo permiten las técnicas de clasificación que se estén empleando. Las microcápsulas pueden clasificarse como tales cuando el cambio inducido por el producto génico deseado se produce o se manifiesta en la superficie de microcápsula o es detectable desde el exterior de la microcápsula. El cambio puede estar causado por la acción directa del producto génico, o por una acción indirecta, en la que una serie de reacciones, una o más de las cuales implican el producto génico que tiene la actividad deseada, conducen al cambio. Por ejemplo, la microcápsula puede estar configurada de tal manera que el producto génico se

presente en su superficie y, de este modo, sea accesible a reactivos. Cuando la microcápsula es una microcápsula membranosa, el producto génico puede dirigirse o puede dirigir una molécula a la membrana de la microcápsula. Esto puede conseguirse, por ejemplo, empleando una secuencia de localización de membrana, como las que derivan de proteínas de membrana, que favorecerá la incorporación de una molécula fusionada o unida en la membrana de la microcápsula. Como alternativa, cuando la microcápsula se forma por separación de fases, tal como con emulsiones de agua en aceite, una molécula que tenga partes que sean más solubles en la fase extracapsular se colocará de tal manera que estas partes se sitúen en los límites de la microcápsula.

En un aspecto preferido de la invención, sin embargo, se aplica una clasificación de microcápsulas por sistemas de clasificación que se basan en un cambio en las propiedades ópticas de la microcápsula, por ejemplo, características de absorción o de emisión de las mismas, por ejemplo, alteración de las propiedades ópticas de la microcápsula como resultado de una reacción que conduce a cambios en la absorbancia, luminiscencia, fosforescencia o fluorescencia asociada con la microcápsula. Todas estas propiedades se incluyen en el término “ópticas”. En tal caso, las microcápsulas pueden clasificarse por clasificación activada por luminiscencia, fluorescencia o fosforescencia. En una realización muy preferida, se emplea la clasificación activada por fluorescencia para clasificar microcápsulas en las que la producción de un producto génico que tiene una actividad deseada se acompaña de la producción de una molécula fluorescente en la cápsula. Por ejemplo, el propio producto génico puede ser fluorescente, por ejemplo, una proteína fluorescente tal como GFP. Como alternativa, el producto génico puede inducir o modificar la fluorescencia de otra molécula, tal como uniéndose a ella o reaccionando con ella.

(v) *Identificación de microcápsulas*

Pueden identificarse las microcápsulas en virtud de un cambio inducido por el producto génico deseado que o se produce o se manifiesta en la superficie de la microcápsula o es detectable desde el exterior como se ha descrito en la sección (iv) (Clasificación de microcápsulas). Este cambio, cuando se identifica, se usa para desencadenar la modificación del gen en el interior del compartimento. En un aspecto preferido de la invención, la identificación de microcápsulas se basa en un cambio en las propiedades ópticas de la microcápsula que resulta de una reacción que conduce a luminiscencia, fosforescencia o fluorescencia en el interior de la microcápsula. La modificación del gen en el interior de las microcápsulas se desencadenará mediante la identificación de luminiscencia, fosforescencia o fluorescencia. Por ejemplo, la identificación de luminiscencia, fosforescencia o fluorescencia puede desencadenar el bombardeo del compartimento con fotones (u otras partículas u ondas) que conduce a la modificación del elemento genético. Se ha descrito anteriormente un procedimiento similar para la clasificación rápida de células (Keijy col., 1994). La modificación del elemento genético puede ser el resultado de, por ejemplo, el acoplamiento de una “señal” molecular, enjaulada por un grupo protector fotolábil con los elementos genéticos: el bombardeo con fotones de una longitud de onda apropiada conduce a la eliminación de la jaula. Después, se combinan todas las microcápsulas y se combinan los elementos genéticos juntos en un entorno. Los elementos genéticos que codifican productos génicos que presentan la actividad deseada pueden seleccionarse mediante purificación de afinidad usando una molécula que se une específicamente a o que reacciona específicamente con la “señal”.

(vi) *Procedimiento multietapa*

Se apreciará también que, según la presente invención, no es necesario que todos los procedimientos de transcripción/replicación y/o traducción y selección se desarrollen en una única etapa, y que todas las reacciones tengan lugar en una microcápsula. El procedimiento de selección puede comprender dos o más etapas. En primer lugar, la transcripción/replicación y/o la traducción de cada elemento genético de una biblioteca de elementos genéticos puede tener lugar en una primera microcápsula. Cada producto génico se une después al elemento genético que lo codifica (que se encuentra en la misma microcápsula). Después, las microcápsulas se rompen y los elementos genéticos unidos a sus productos génicos respectivos se purifican opcionalmente. Como alternativa, los elementos genéticos pueden unirse a sus productos génicos respectivos usando procedimientos que no se basan en la encapsulación. Por ejemplo, presentación en fagos (Smith, G. P., 1985), presentación en polisomas (Matteheakkisy col., 1994), fusión de ARN-péptido (Roberts y Szostak, 1997) o fusión de péptido represor lac (Cull, y col., 1992).

En la segunda etapa del procedimiento, cada elemento genético purificado unido a su producto génico se coloca en una segunda microcápsula que contiene los componentes de la reacción a seleccionar. Después, se inicia esta reacción. Después de finalizar las reacciones, las microcápsulas se rompen de nuevo y se seleccionan los elementos genéticos modificados. En el caso de reacciones multietapa complejas en las que están implicados muchos componentes y etapas de reacción individuales, pueden realizarse una o más etapas intermedias entre la etapa inicial de generación y de unión del producto génico al elemento genético, y la etapa final de generación del cambio seleccionable en el elemento genético.

(vii) *Selección mediante activación de la expresión de un gen informador in situ*

El sistema puede configurarse de manera que la actividad de unión, catalítica o reguladora deseada codificada por un elemento genético conduzca, directa o indirectamente, a la activación de la expresión de un “gen informador” que esté presente en todas las microcápsulas. Sólo los productos génicos con la actividad deseada activan la expresión del gen informador. La actividad resultante de la expresión del gen informador permite la selección del elemento genético (o del compartimento que lo contiene) mediante cualquiera de los procedimientos descritos en este documento.

ES 2 293 162 T3

Por ejemplo, la activación del gen informador puede ser el resultado de la actividad de unión del producto génico de manera análoga al “sistema de dos híbridos” (Fields y Song, 1989). La activación también puede ser resultado del producto de una reacción catalizada por un producto génico deseable. Por ejemplo, el producto de la reacción puede ser un inductor transcripcional del gen informador. Por ejemplo, puede usarse arabinosa para inducir la transcripción del promotor araBAD. La actividad del producto génico deseable puede producir también la modificación de un factor de transcripción, dando como resultado la expresión del gen informador. Por ejemplo, si el producto génico deseado es una quinasa o fosfatasa, la fosforilación o desfosforilación de un factor de transcripción puede conducir a la activación de la expresión del gen informador.

10 (viii) Amplificación

Según aspectos adicionales de los procedimientos de la presente invención, los procedimientos pueden comprender la etapa adicional de amplificar los elementos genéticos. Puede usarse la amplificación selectiva como un medio para enriquecer a favor de los elementos genéticos que codifican el producto génico deseado.

En todas las configuraciones anteriores, puede amplificarse el material genético contenido en los elementos genéticos y repetirse el procedimiento en etapas reiteradas. La amplificación puede ser mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Saikiy col., 1988) o usando una de una variedad de otras técnicas de amplificación de genes incluyendo: amplificación de replicasa Q β (Cahill, Foster y Mahan, 1991; Chetverin y Spirin, 1995; Katanaev, Kumasov y Spirin, 1995); la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Landegreny col., 1988; Barany, 1991); el sistema de replicación autosostenida de la secuencia (Fahy, Kwoh y Gingeras, 1991) y amplificación con desplazamiento de cadena (Walkery col., 1992).

25 Ejemplos

Ejemplo 1

Las emulsiones convencionales no soportan una traducción eucariota eficaz in vitro

Se usó una formulación de fase oleosa que comprendía 4,5% v/v de monooleato de sorbitán (Span 80, Fluka; 85548) y 0,4% v/v de monooleato de polioxietilensorbitán (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 de CSR”) para emulsionar una reacción de expresión de RRL. Todas las reacciones de RRL se realizaron usando el sistema rápido de transcripción/traducción acopladas TNT T7 (Promega) que expresa luciferasa de luciérnaga a partir de un molde plasmídico. Se preparó en hielo una reacción de expresión de 50 μ l que comprendía RRI a 80%, (v/v), metionina 0,02 mM y molde plasmídico de luciferasa (1 μ g). Se emulsionó una alícuota de 40 μ l de esta reacción mediante la adición gota a gota (1 gota por 5 segundos) a 100 μ l de fase oleosa enfriada en hielo con agitación constante (1000 rpm). Después de la adición de la última gota (aproximadamente 20 segundos), se continuó agitando durante 3-4 minutos adicionales.

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

Usando una formulación de fase oleosa “reducida”, que comprendía 1,5% (v/v) de Span 80 (SIGMA) en aceite mineral (SIGMA), se observaron rendimientos ligeramente mejorados de hasta 0,7%, especialmente con la adición de DTT a 20 μ M. La inclusión de DTT usando la mezcla oleosa de CSR original fue extremadamente perjudicial para la formación de la emulsión. Se ensayaron varias proporciones de fase acuosa en fase oleosa y se variaron los tiempos de mezcla. Las condiciones descritas anteriormente proporcionaron la mayor actividad con mantenimiento de la integridad de la emulsión durante el periodo de incubación.

Por lo tanto, la emulsión de una reacción de RRL usando las formulaciones de emulsión “clásicas” basadas en Span80 solo o junto con Tween80 y TritonX-100 dio como resultado una pérdida completa de la actividad de traducción *in vitro* (< 1% según la expresión fuera de la emulsión (Tabla 2)) a juzgar por la expresión de la enzima de luciferasa de luciérnaga.

Además se observó un cambio de color del componente de hemina del RRL de un color rosa oscuro a un marrón oxidado en cuestión de minutos después de la emulsión (véase la Fig. 1), indicando la oxidación de la hemina, presumiblemente atribuible a un componente de la fase oleosa.

Ejemplo 2

Los antioxidantes no restauran una traducción eucariota eficaz in vitro

La traducción en mamíferos está regulada, entre otras cosas, por la familia de las quinasas eIF-2 α en respuesta a estrés celular (véase la revisión por Dever (1999), TIBS, 24, 398-403). Las quinasas eIF-2 α contienen un dominio sensor y un dominio quinasa eIF-2 conservado. Su función es fosforilar eIF-2 α (lo que detiene la traducción) en

ES 2 293 162 T3

respuesta a estímulos recibidos a través del dominio sensor. Esto sirve para proteger a la célula de malgastar recursos en circunstancias de estrés celular (la traducción de proteínas consume grandes cantidades de energía celular) o como defensa antiviral, evitando la expresión del genoma viral. Se conocen cuatro quinasas diferentes que responden a distintos tipos de señales de estrés (Tabla 1).

TABLA 1

Quinasas eIF2 de respuesta a estrés

Nombre	Señal activadora
HRI	estrés oxidativo (bajo hemo)
PKR	infección viral (ARNbc)
GCN2	inanición (pocos aminoácidos, ARNt no cargado)
PERK	estrés por calor, infección viral (proteínas no plegadas)

Se dedujo que una de las razones de la detención completa de la traducción (dada la decoloración de la hemina en el RRL) era el estrés oxidativo causado por la difusión de especies oxidantes de la fase oleosa a la fase acuosa.

Se identificó que el componente responsable de la decoloración y de la inhibición de la traducción estaba contenido tanto en el tensioactivo Span80 como en el Tween80, pero no en el aceite mineral.

Se trató de tamponar el cambio del potencial redox proporcionando compuestos antioxidantes o reductores en la fase oleosa (BDH, BDA) y/o en la fase acuosa (DTT, ácido ascórbico). Además, se trató de retirar las especies oxidantes de la fase oleosa haciendo reaccionar la fase oleosa (mezcla de tensioactivo y aceite mineral) o el Span80 solo con perlas de borohidruro de (poliestirilmetil)trimetilamonio (Novabiochem) o con DTT antes de la emulsión. Aunque ralentizaba la decoloración (Fig. 1), esto producía solamente ligeras mejoras en las eficacias de traducción (Tabla 2). Además, el tratamiento de la fase oleosa con perlas de borohidruro parecía reducir las propiedades emulsionantes del tensioactivo/fase oleosa, conduciendo a emulsiones más desestabilizadas.

Sólo el DTT (a una concentración final de 20 μ M) produjo una mejora ligera pero uniforme en los niveles de expresión en la emulsión en comparación con la reacción no emulsionada (Tabla 2)). Niveles mayores de DTT demostraron ser perjudiciales para el sistema de expresión de RRL (no se muestran los datos). En general, el DTT también demostró desestabilizar las emulsiones.

Ejemplo 3

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

También se intentó una inhibición directa de la ruta de las eIF2 quinasas usando AMPc o 2-aminopurina (2-AP). Aunque el AMPc produjo una pequeña mejora cuando se usó en solitario, no demostró ser aditiva a los efectos beneficiosos del DTT (no se muestran los datos). Tanto el AMPc como el 2-AP son inhibidores muy inespecíficos de las eIF2 quinasas (en la actualidad no existen inhibidores específicos disponibles) y presumiblemente interfieren con otros procedimientos en el sistema de traducción del RRL.

Ejemplo 4

Ni HSP70 ni HSP90 permiten una traducción eucariota eficaz in vitro

El hecho de que ni siquiera altas concentraciones de DTT consigan recuperar más que una actividad de traducción residual, sugiere que otros factores aparte de la oxidación deben estar contribuyendo a la inhibición de la traducción. Una posibilidad era una desnaturalización proteica debida al procedimiento de emulsión, es decir, a la mezcla energética de una fase acuosa hidrófila y una fase oleosa hidrófoba. De hecho, se sabe desde hace algún tiempo que la adición de BSA (presumiblemente conteniendo alguna proteína desnaturalizada por la congelación-descongelación) produce una detención de la traducción (Matts y col (1993), *Biochemistry*, 32, 7323-7328), incluso sin emulsión. Se confirmaron los resultados de Matts en 1993 con y sin emulsión. También se intentó tamponar el efecto suplementando los lisados de RRL con chaperonas, en particular con HSP70 y HSP90 (SIGMA). De nuevo, esto produjo sólo pequeñas mejoras (no aditivas) (no se muestran los datos), que podían igualarse o superarse mediante la adición de pequeñas cantidades (5%) de glicerol (no se muestran los datos), que se sabe que protege a las proteínas de la desnaturalización.

ES 2 293 162 T3

Ejemplo 5

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

5 Dado este bajo nivel de actividad, se llevaron a cabo intentos para identificar una nueva formulación de fase oleosa con un menor potencial de causar estrés oxidativo o desnaturalización proteica durante el procedimiento de emulsión.

10 Después de que los intentos de mejorar la actividad con emulsiones basadas en Span80 no tuvieran éxito, se ensayaron nuevos tensioactivos.

Se realizaron las reacciones de emulsión como se ha descrito en el Ejemplo 1, pero sustituyendo los tensioactivos usados en esa reacción (Span80, Tween80 y Triton) con tensioactivos basados en silicona. De éstos, se descubrió que los tensioactivos basados en silicona químicamente inerte tenían éxito.

15 El copolímero de polixiloxano-policetil-polietilenglicol (ABIL EM90™) (Goldschmidt) usado a 4% (v/v) en aceite mineral proporcionó mejoras significativas. Emulsionando como se ha descrito en el Ejemplo 1, con la excepción de un tiempo de agitación reducido (1,5 minutos), los niveles de expresión aumentaron drásticamente hasta 39% (Tabla 2) de los de la reacción no emulsionada. Esta emulsión era estable a lo largo del periodo de incubación, y la visualización microscópica reveló que la mayoría de los compartimentos tenían diámetros en el intervalo de 2-5 micrómetros (Fig. 2).

TABLA 2

25 *Actividad luciferasa (en unidades de luz (LU)) de luciferasa expresada en extracto de reticulocitos de conejo no emulsionado y emulsionado con dos tiempos de mezcla diferentes (3 min y 4 min)*

	No emulsionado	Emulsionado: tiempo de mezcla	Mezcla de emulsión de CSR	Span80 a 1,5% en aceite mineral	Abil a 4%
-DTT	326789	3 min	945	832	127828
+DTT	231318		N.A*	1632	78970
% de actividad			0,2%	0,2%/0,6	39%/34%
	Fondo: 249				
*emulsión inestable					
	No emulsionado	Emulsionado: tiempo de mezcla	Mezcla de emulsión de CSR	Span80 a 1,5% en aceite mineral	Abil a 4%
-DTT	154442	4 min	327	338	40155
+DTT	101702		N.A*	843	29493
% de actividad			0,13%	0,15%/0,7	26%/29%
	Fondo:114				
*emulsión inestable					

ES 2 293 162 T3

Ejemplo 6

Expresión de telomerasa humana en emulsión usando una nueva fase oleosa

5 Los télomeros son estructuras de ADN específicas que se encuentran en los extremos de los cromosomas en eucariotas. Se añaden al extremo 3' (que queda libre después de retirarse el cebador de ARN usado para la replicación de ADN) mediante una enzima telomerasa especializada que comprende un componente de ARN y un componente proteico. En humanos, la enzima comprende ARN telomérico humano (hTR) y el polipéptido de telomerasa humano (hTERT) y añade copias repetidas de una repetición hexomérica (TTAGGG) en los extremos de los cromosomas.
10 La actividad telomerasa se ha implicado tanto en el desarrollo como en la progresión de tumores, así como en la senescencia y en la muerte celular programada.

Hasta ahora la telomerasa no se ha expresado con éxito de manera funcional en procariotas, presumiblemente porque requiere chaperonas especializadas (por ejemplo, HSP 90) y factores accesorios tanto para su ensamblaje como para su función. Pero puede expresarse en células eucariotas y también en el sistema de traducción *in vitro* del lisado de reticulocitos de conejo (Weinrich y col (1997), Nat. Genet., 17, 498-502/ Beattie y col (1998, 8, 177-180).
15

La fase oleosa del ejemplo 5 se ensayó para determinar la expresión de la telomerasa humana funcional en RRL. Se prepararon moldes lineales dirigidos por T7 que codificaban hTERT wt y hTR en tándem clonados cadena abajo del IRES de pCITE4a (Novagen) o hTERT clonado en pCITE4a con hTR clonado por separado en una variante del pCITE4a (en la que se ha deletado el IRES (pCITE-E)) o un mutante de delección inactivo de telomerasa mediante amplificación por PCR usando los plásmidos parentales y cebadores CITET7ba (5'-GTTTTCCAGTCAC-GACGTTGTAA-3') (ID SEC N°: 1) y CITETerfo (5'-CCGGATATAGTTCCTCCTTTCAGC-3') (ID SEC N°:2) respectivos.
20
25

Las reacciones de expresión (50 μ l) comprendían RRL (80% v/v), construcción de telomerasa (véase la leyenda de la Figura 3), metionina (1 mM), sustrato de telomerasa (TS (sustrato de telomerasa) cebador (5'-AATCCGTCGAG-CAGAGTT-3') (Intergen) 1 μ M), potenciador de PCR (Promega) (3 μ l), dNTP (25 μ M), DTT (20 μ M). 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. Después, las emulsiones se extrajeron con 200 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico, seguido de la extracción de la fase acuosa con 1 volumen de fenol-cloroformo.
30

Los productos de reacción de telomerasa se precipitaron con etanol y se resuspendieron en 20 μ l de agua estéril. Después, se usó un ensayo TRAP basado en PCR (Kim 94) (Intergen) para detectar productos de extensión de la telomerasa formados en la emulsión. La actividad telomerasa produce una escala característica (con 6pb de separación para cada repetición) (véase fig. 3).
35

Los resultados indicaron expresión de telomerasa funcionalmente activa a partir del molde WT en emulsión. Los experimentos de control omitiendo la adición del gen de telomerasa o usando un mutante de delección inactivo, dieron resultados negativos (Fig. 3).
40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para aumentar la concentración de una molécula de ácido nucleico, comprendiendo dicho procedimiento:
- (a) formar microcápsulas a partir de una emulsión de agua en aceite, incluyendo dichas microcápsulas ácido nucleico, una solución acuosa que comprende los componentes necesarios para realizar la amplificación del ácido nucleico y un tensioactivo basado en silicona químicamente inerte; y
- 10 (b) amplificar dicho ácido nucleico en las microcápsulas para formar copias amplificadas del ácido nucleico; aumentando de este modo la concentración de dicho ácido nucleico en las microcápsulas.
- 15 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la emulsión de agua en aceite comprende una proporción de agua en aceite de 1 a 2,5.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho tensioactivo se proporciona a una concentración v/v en la fase oleosa de la emulsión de 0,5 a 20%.
- 20 4. Un procedimiento según la reivindicación 1, la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que dicho tensioactivo basado en silicona comprende un copolímero de silicona.
5. Un procedimiento según la reivindicación 1, la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que dicho tensioactivo basado en silicona comprende un copolímero de polisiloxano-policetil-poli-etilenglicol.
- 25 6. Un procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicho tensioactivo es Abil EM90™.
7. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que dicha emulsión es termoestable.
- 30 8. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que dicho ácido nucleico es ADN genómico o ADNc.
9. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente que comprende además unir dicho ácido nucleico a un soporte sólido en dichas microcápsulas.
- 35 10. Un procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicho soporte sólido comprende perlas.
11. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el que las perlas comprenden perlas de poliestireno o magnéticas.
- 40 12. Un procedimiento según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que dichas perlas comprenden un revestimiento seleccionado entre avidina, estreptavidina, anticuerpos anti-digoxigenina y anticuerpos anti-2,4-dinitrofenilo.
- 45 13. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que dicho ácido nucleico comprende una señal seleccionada entre biotina, digoxigenina y 2,4-dinitrofenilo.
14. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, que comprende además clasificar o aislar el ácido nucleico amplificado.
- 50 15. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que cuando se forman una pluralidad de microcápsulas, cada una contiene por término medio una o menos de una molécula de ácido nucleico.
- 55 16. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que cuando se forman una pluralidad de microcápsulas cada una contiene por término medio entre 5 y 1000 moléculas de ácido nucleico.
17. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que dicha amplificación de ácido nucleico se realiza mediante amplificación de replicasa Q β , reacción en cadena de la ligasa, replicación autosostenida de la secuencia o amplificación con desplazamiento de cadena.
- 60 18. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que dicha amplificación de ácido nucleico se realiza usando la reacción en cadena de la polimerasa.

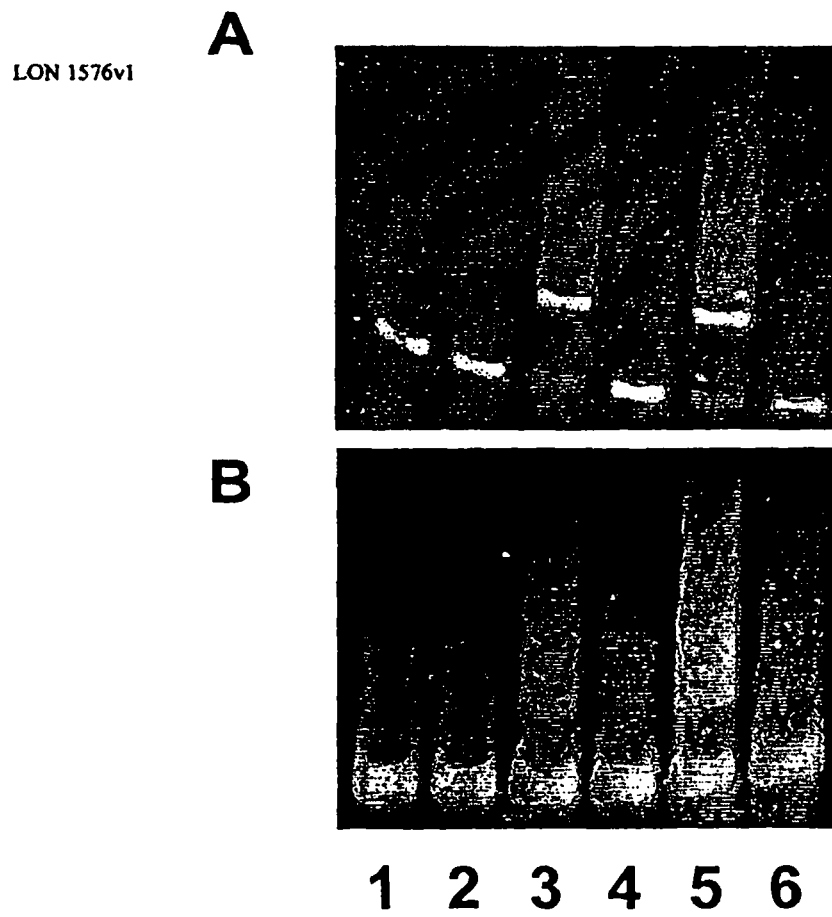
Fig 1



Fig 2



Fig 3



ES 2 293 162 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Consejo de Investigación Médica	
5	<120> COMPOSICIÓN DE LA EMULSIÓN	
	<130> 21465-204-019	
	<160> 2	
	<170> PatentIn versión 3.1	
10	<210> 1	
	<211> 24	
	<212> ADN	
15	<213> Cebador	
	<400> 1	
20	gtttcccag tcacgacgtt gtaa	24
	<210> 2	
	<211> 24	
25	<212> ADN	
	<213> Cebador	
	<400> 2	
30	ccggatatag ttctccttt cagc	24
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		