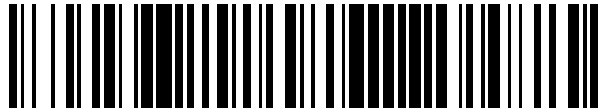


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 047**

51 Int. Cl.:

C40B 30/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2009 E 09727374 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 2260130**

54 Título: **Método para mejorar la actividad enzimática**

30 Prioridad:

04.04.2008 US 42637 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2014

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (50.0%)
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK y
THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BLAZEJ, ROBERT G. y
PAEGEL, BRIAN M.**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 443 047 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 mejorar la actividad enzimática

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención está dentro del campo técnico del diseño y selección de ingeniería de proteínas. Más particularmente, la presente invención se refiere a la mejora enzimática mediante evolución dirigida.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] La biomasa celulósica es el recurso natural renovable más abundante. Habiendo generado la biosfera un valor de mil millones de toneladas/año, la biomasa celulósica posee el potencial para reemplazar la demanda mundial y disminuir los combustibles fósiles. No obstante, según Zhang, Y. H. P. "Uno de los retos tecnológicos más importantes y difíciles es obtener la resistencia de los materiales lignocelulósicos naturales que deben ser enzimáticamente hidrolizados para producir azúcares fermentables". Véase, Zhang, Y. H. P., et al., "Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies". *Biotechnol. Adv.*, 2006, 24: 452-481.

[0003] La celulosa es un polisacárido que consta de 100 a 20.000 unidades de glucosa con enlace β -1-4. Las celulasas, el tipo de enzimas que hidrolizan la celulosa, han atraído un gran interés por su capacidad para degradar la biomasa celulósica a glucosa para la producción de biocombustible. Tres subclases de celulasa (endoglucanasa, exoglucanasa, β -glucosidasa) trabajan sinérgicamente para hidrolizar la celulosa. Las endoglucanasas hidrolizan enlaces glucosídicos β -1-4 intramoleculares a material celulósico insoluble para producir nuevos extremos de cadena. Las exoglucanasas hidrolizan progresivamente los extremos de cadena que liberan pequeños productos oligosacáridos hidrosolubles. Los productos solubles son hidrolizados finalmente mediante β -glucosidasa a glucosa (Schulein, M., "Protein engineering of cellulases". *Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct. Molec. Enzym.*, 2000, 1543(2): 239-252).

Resumen de la invención

[0004] La invención incluye un sistema para mejorar la actividad enzimática con respecto a un sustrato sólido. En un aspecto, la invención incluye un método de selección para mejorar la actividad de celulasa mediante la compartimentación *in vitro* en la que una micropartícula celulósica funciona como el sustrato de sólido previsto y como una estructura para la selección negativa. En otro aspecto, la micropartícula puede estar compuesta por lignina u otro sustrato insoluble.

[0005] Varias aplicaciones de la invención incluyen un sistema para generar una biblioteca de polinucleótidos. La biblioteca codifica variantes enzimáticas con actividad diferente con respecto al sustrato sólido previsto. El sistema además incluye medios de enlace de copias individuales o clonales de variantes genéticas individuales a una micropartícula compuesta por el sustrato sólido previsto. El sistema también incluye medios para compartimentar micropartículas individuales con genes enlazados en una emulsión que contiene una reacción de transcripción/traducción *in vitro*. Adicionalmente, el sistema incluye medios para la expresión de cada variante genética enlazada para producir enzimas en cada compartimento de emulsión con una actividad diferente con respecto a la micropartícula. Las micropartículas dentro de compartimentos de emulsión que contienen variantes enzimáticas altamente activas son degradadas, liberando así la variante genética de micropartículas enlazadas. Además, el sistema incluye medios para la rotura de los compartimentos de emulsión y la recuperación selectiva de las variantes genéticas liberadas que codifican enzimas con actividad enzimática mejorada en relación al sustrato de micropartícula. Además, la mejora de la actividad enzimática se puede conseguir generando una nueva biblioteca de polinucleótidos derivada de las variantes genéticas recuperadas y repitiendo los pasos anteriores.

[0006] Otras aplicaciones de la invención pueden incluir el uso de un enlazador divisible entre la variante genética y una micropartícula portadora no reactiva. El enlazador puede estar compuesto, por ejemplo, de celulosa, hemicelulosa o lignina. Dentro de compartimentos de emulsión que contienen variantes enzimáticas altamente activas, el enlazador es degradado, liberando así la variante genética enlazada de la micropartícula portadora.

[0007] La invención puede incluir una o varias de las siguientes ventajas. La invención utiliza un nuevo método basado en la CIV, modo de selección para optimizar la actividad enzimática de celulasas en los sustratos de celulosa insoluble, y es extensible para optimizar la actividad enzimática en cualquier sustrato insoluble. La selección enzimática se realiza en un material celulósico natural insoluble. Por lo tanto, la actividad enzimática está confeccionada al sustrato real de interés comercial, no un sustrato fluorogénico o soluble de sustitución. Se puede evaluar a poblaciones de 10^{10} - 10^{12} variantes genéticas, una gran mejora en los métodos basados en su selección que están normalmente limitados a 10.000 variantes. La selección enzimática se realiza completamente *in vitro*, eliminando los antecedentes genómicos y metabólicos del organismo que conducen a una optimización inespecífica.

[0008] Estas y otras características y ventajas de la presente invención se presentarán con más detalle en la siguiente especificación de la invención y las figuras anexas que ilustran, a modo de ejemplo, los principios de la invención.

Breve descripción de los dibujos

[0009] La invención se puede entender haciendo referencia a la descripción siguiente conjuntamente con los dibujos anexos que ilustran formas de realización específicas de la presente invención.

[0010] La figura 1 es una representación esquemática de los pasos del proceso implicados en la evolución dirigida mediante compartimentación *in vitro* (CIV).

[0011] La figura 2 es una representación esquemática de los pasos del proceso implicados en la selección enzimática conforme a la presente invención.

[0012] La figura 3 muestra una secuencia 1, que es la secuencia de ADN del gen endoglucanasa *eglI* de *Trichoderma reesei* (base de datos EMBL #M15665).

[0013] La figura 4 muestra una secuencia 2, que es la secuencia de ADN del gen ligninasa *LiP H8* de *Phanerochaete chrysosporium* (base de datos EMBL #Y00262).

Descripción detallada**Definiciones**

[0014] Los términos usados en las reivindicaciones y la especificación son definidos como se expone a continuación a menos que se especifique de otra manera.

[0015] El término "polinucleótido" se refiere a un polímero desoxirribonucleótido o ribonucleótido, y a menos que esté limitado de otro modo, incluye análogos conocidos de nucleótidos naturales que pueden funcionar de una manera similar a los nucleótidos de origen natural. El término "polinucleótido" se refiere a cualquier forma de ADN o ARN, incluyendo, por ejemplo, ADN genómico; el ADN complementario (ADNc), que es una representación de ADN del ARN mensajero (ARNm), normalmente se obtiene por transcripción inversa del ARNm o amplificación; las moléculas de ADN son producidas sintéticamente o por amplificación; y ARNm. El término "polinucleótido" abarca moléculas de ácido nucleico bicatenario, así como moléculas monocatenarias. En los polinucleótidos bicatenarios, no es necesario que las hebras de polinucleótidos sean coextensivas (es decir, no es necesario que un polinucleótido bicatenario sea bicatenario a lo largo de toda la longitud de ambas hebras).

[0016] Se dice que los polinucleótidos son "diferentes" si difieren en la estructura, por ejemplo, secuencia de nucleótidos.

[0017] Como se utiliza en este caso, el término "sustrato" se refiere generalmente a un sustrato para una enzima; es decir, el material sobre el que actúa una enzima para producir un producto de reacción.

[0018] Un "sustrato insoluble", como se utiliza en este caso, se refiere a un sustrato enzimático que no es soluble en agua a 37 °C.

[0019] Como se utiliza en este caso, una "fase sólida" se refiere a cualquier material que es un sólido cuando se emplea en los métodos de selección de la invención. La fase sólida es el material al que se enlazan los polinucleótidos para llevar a cabo estos métodos de selección.

[0020] El término "enlazador", como se utiliza en este caso, se refiere a cualquier fracción que fija un polinucleótido a una fase sólida.

[0021] Los términos "aminoácido" o "residuo de aminoácido" incluyen L-aminoácidos o residuos de origen natural, a menos que se indique específicamente de otra manera. Los términos "aminoácido" y "residuo de aminoácido" también incluyen D-aminoácidos así como aminoácidos químicamente modificados, tales como análogos de aminoácidos, aminoácidos de origen natural que no se incorporan normalmente a las proteínas, y compuestos sintetizados químicamente con las propiedades características de aminoácidos (colectivamente, aminoácidos "atípicos"). Por ejemplo, análogos o miméticos de fenilalanina o prolina que permiten la misma restricción conformacional de los compuestos peptídicos como Phe o Pro natural se incluyen en la definición de "aminoácido".

Evolución de proteína mediante compartimentación *in vitro*

[0022] La presente invención emplea compartimentación *in vitro* (CIV) para una evolución enzimática rápida y de rendimiento alto. En lugar de contar con una conexión física entre el genotipo y el fenotipo como implementados en las tecnologías de pantalla, la CIV une genotipo y fenotipo mediante un confinamiento espacial en una única gotita acuosa de una emulsión de agua en aceite (Tawfik, D.S. et al., "Man-made cell-like compartments for molecular evolution". Nat. Biotechnol., 1998, 16(7): 652-656; US 6489103; WO 1999/002671 A1). La CIV se presenta de forma esquemática en la figura 1 (100). Como en la práctica, se mezcla una reacción de transcripción/traducción *in vitro* (TTIV) con una solución

que contiene la biblioteca de polinucleótidos (102). La biblioteca de polinucleótidos (102), comúnmente preparada por amplificación o recombinación mutagénica, contiene variantes (103) de la secuencia genética de tipo salvaje enlazada mediante una atadura (104) a una fracción de sustrato (106) (Cadwell, R.C. et al., "Mutagenic PCR". PCR-Methods and Applications, 1994, 3(6): S136-S140; Vartanian, J.P. et al., "Hypermutagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions". Nucleic Acids Res., 1996, 24(14): 2627-2631; Stemmer, W.P.C., "Rapid Evolution of a Protein *in vitro* by DNA Shuffling". Nature, 1994, 370(6488): 389-391; Zhao, H.M. et al., "Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination". Nat. Biotechnol., 1998, 16(3): 258-261). La biblioteca de polinucleótidos (102) y la solución TTIV se mezclan y dispersan (107) en una solución de aceite/tensioactivo mineral (114) para producir una emulsión (110). El volumen de una gotita media (112) en la emulsión (110) determina la concentración inicial de la solución de la biblioteca de polinucleótidos (102) de manera que de media sólo una variante genética (103) contenida en la biblioteca de polinucleótidos (102) estará presente en cualquier gotita acuosa dada (112) en la emulsión (110). La emulsión (110) se incuba a 30 °C, con lo cual el sistema IVTT transcribe y traduce (115) una variante genética (103) a una variante enzimática de proteína (116) (Miller, O.J. et al., "Directed evolution by *in vitro* compartmentalization." Nat. Methods, 2006, 3(7): 561-570).

[0023] Una vez traducida, la variante de proteína (116) cataliza la transformación del sustrato relacionado con la variante genética (106) al producto (118) si la variante de proteína (116) es catalíticamente activa. La emulsión (110) se estropea (119) por la extracción o el centrifugado, y las variantes genéticas (120) son recuperadas. En aplicaciones previas de esta técnica, tiene lugar una selección positiva (123), por ejemplo, cuando unas variantes genéticas recuperadas (120) pasan por una columna con afinidad de enlace (122) con el producto (118). Las variantes genéticas (124) que codifican la variante enzimática de proteína catalíticamente superior son retenidas. Las variantes genéticas (124) enriquecidas de este modo se amplifican mediante técnicas mutagénicas previamente descritas para generar una biblioteca refinada de polinucleótidos para otros ciclos de emulsión y selección.

[0024] Se realizó de varias maneras una selección de fenotipos deseados que usan métodos CIV previamente practicados. El sustrato ha sido enlazado al gen, y la transformación del sustrato enlazado al gen etiquetó el genotipo competente para la selección de afinidad como se ha descrito anteriormente (Agresti, J.J. et al., "Selection of ribozymes that catalyse multiple-turnover Diels-Alder cycloadditions by using *in vitro* compartmentalization". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2005, 102(45): 16170-16175; Tawfik, D.S. et al., "Man-made cell-like compartments for molecular evolution". Nat. Biotechnol., 1998, 16(7): 652-656). Alternativamente, si el fenotipo es actividad de polimerasa, tiene lugar una selección a través del enriquecimiento donde las polimerasas más activas amplifican el gen coencapsulado con la polimerasa (Ghadessy, F.J. et al., "Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2001, 98(8): 4552-4557). La clasificación de gotitas de alto rendimiento a través de la selección de una célula activada por fluorescencia también ha sido usada para identificar y formar catalizadores que codifican genes que transforman un sustrato fluorogénico o enlazan un anticuerpo fluorescente específico para el producto objetivo (Griffiths, A.D. et al., "Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by *in vitro* compartmentalization". Embo J., 2003, 22(1): 24-35; Aharoni, A. et al., "High-throughput screening of enzyme libraries: Thiolactonases evolved by fluorescence-activated sorting of single cells in emulsion compartments". Chem. Biol., 2005, 12(12): 1281-1289; Mastrobattista, E. et al., "High-throughput screening of enzyme libraries: *In vitro* evolution of a beta-galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions". Chem. Biol., 2005, 12(12): 1291-1300).

[0025] A pesar de las ventajas de CIV sobre técnicas de selección de enzimas *in vivo*, estos métodos CIV previamente practicados no son adecuados para una mejora de la actividad enzimática en relación a sustratos insolubles tales como biomasa celulósica. Los métodos CIV previos requieren un sustrato soluble enlazado al gen que se convierte en un producto que permanece enlazado al gen o un sustrato fluorogénico innatural como se ha descrito anteriormente. En ambos casos, las enzimas seleccionadas que utilizan estos métodos no presentan un aumento de la actividad en relación a los sustratos insolubles de origen natural.

[0026] Por lo tanto, ha sido conveniente el desarrollo de un sistema de mejora enzimática que permita la selección de una actividad enzimática en el sustrato pertinente de fase sólida insoluble y que fue realizado *in vitro* para eliminar efectos de antecedentes genómicos y metabólicos del organismo que están presentes *in vivo*. En general, el esquema de la invención funciona en el modo de selección, donde se seleccionan variantes con propiedades catalíticas convenientes en los antecedentes de una población de variantes indeseables. Además, la selección puede llevarse a cabo en un tamaño de población de miles de millones de variantes o más para mostrar eficazmente el paisaje de optimización enzimática.

Método de selección general

[0027] La invención proporciona un método de selección para mejorar una actividad enzimática en un sustrato insoluble. El método emplea una recogida de polinucleótidos que codifican variantes de una o más enzimas que actúan en un sustrato insoluble, tal como una biblioteca de polinucleótidos. La recogida de polinucleótidos va unida a una recogida de fases sólidas, tales como microesferas o partículas. El enlazador o las fases sólidas incluyen un sustrato para una o más enzimas, de manera que la actividad de tipo enzimático codificada en los polinucleótidos pueden liberar los polinucleótidos de las fases sólidas, bien segmentando el enlazador o degradando la microesfera o partícula.

[0028] En formas de realización particulares, el método implica la suspensión de las fases sólidas enlazadas al

5 polinucleótido en una fase acuosa que comprende componentes para la transcripción/traducción *in vitro*. La fase acuosa se utiliza para formar una emulsión de agua en aceite, donde las fases de sólido enlazadas de polinucleótido se compartimentan en gotitas acuosas en una fase continua de aceite. La fase acuosa de la emulsión incluye los reactivos necesarios para la transcripción/traducción *in vitro*, y la emulsión se mantiene en condiciones adecuadas a estos procesos, de manera que las variantes enzimáticas codificadas en los polinucleótidos se expresan en las gotitas acuosas de la emulsión. Una variante enzimática activa en una gotita acuosa disociará el enlazador que fija el(los) polinucleótido(s) de esa gotita a la microesfera o partícula y/o degradará la microesfera o partícula fijada al polinucleótido. De esta manera, los polinucleótidos son liberados de las microesferas o partículas en la fase acuosa. La emulsión se degrada, y la fase acuosa es separada de las fases sólida y de aceite para recuperar polinucleótidos que han sido liberados de las fases sólidas, permitiendo así la selección de polinucleótidos que codifican variantes de enzima activa. Si se desea, se puede introducir otra variación genética en los polinucleótidos recuperados, por ejemplo, por reacción en cadena de polimerasa con tendencia al error (PCR), y el método repetido.

15 **Polinucleótidos**

[0029] Los polinucleótidos útiles en la invención codifican una enzima o variante enzimática y pueden incluir secuencias reguladoras adecuadas, tales como aquellas requeridas para la expresión eficaz del producto genético, por ejemplo promotores, potenciadores, secuencias de iniciación traduccional, secuencias de poliadenilación, sitios de empalme y similares.

20 [0030] En formas de realización determinadas, los métodos de la presente invención son útiles para clasificar bibliotecas de polinucleótidos. En formas de realización particulares, los métodos emplean bibliotecas con al menos aproximadamente: 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , y 10^{12} polinucleótidos diferentes. Generalmente, el tamaño de la biblioteca será inferior a aproximadamente 10^{15} polinucleótidos diferentes.

25 [0031] Las bibliotecas de polinucleótidos se pueden crear en cualquiera de la variedad de formas que son conocidas para los expertos en la técnica. Particularmente se pueden clonar depósitos de polinucleótidos de origen natural a partir de ADN genómico o ADNc (Sambrook et al., 1989); por ejemplo, las bibliotecas de anticuerpo fago hechas por repertorios de amplificación de PCR de genes de anticuerpos de donantes inmunizados o no inmunizados han comprobado fuentes muy eficaces de fragmentos de anticuerpo funcional (Winter et al., 1994; Hoogenboom, 1997). Las bibliotecas de genes también pueden estar hechas mediante la codificación de todos (ver por ejemplo Smith, 1985; Parmley y Smith, 1988) o parte de los genes (ver por ejemplo Lowman et al., 1991) o depósitos de genes (ver por ejemplo Nissim et al., 1994) mediante una síntesis aleatoria o de oligonucleótidos dopada. Las bibliotecas también pueden hacerse mediante la introducción de mutaciones en un polinucleótido o agrupación de polinucleótidos de forma aleatoria por una variedad de técnicas *in vivo*, incluyendo; el uso de cepas mutágenas, 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 linfocitos B (Yelamos et al., 1995). También se pueden introducir mutaciones aleatorias tanto *in vivo* como *in vitro* mediante mutágenos químicos, e ionización o irradiación UV (ver Friedberg et al., 1995), o incorporación de análogos de base mutagénica (Freese, 1959; Zaccolo et al., 1996). También se pueden introducir mutaciones aleatorias en genes *in vitro* durante la polimerización por ejemplo usando polimerasas con tendencia a error (Leung et al., 1989). Se puede introducir otra diversificación usando una recombinación homóloga ya sea *in vivo* (ver Kowalczykowski et al., 1994) o *in vitro* (Stemmer, 1994a; Stemmer, 1994b). También se pueden sintetizar químicamente bibliotecas de genes parciales o completos de bases de datos de secuencia o secuencias computacionalmente previstas.

45 **Fases sólidas**

[0032] Los polinucleótidos de la invención están fijados a fases sólidas que pueden, pero no necesitan ser un sustrato insoluble para la enzima o la variante enzimática codificada por los polinucleótidos. Los materiales útiles como fases sólidas en la invención pueden incluir: carbohidratos poliméricos naturales y sus derivados sintéticamente modificados, entrecruzados o sustituidos, tales como agar, agarosa, ácido alginico reticulado, quitina, gomas guar sustituidas y reticuladas, ésteres de celulosa, especialmente con ácido nítrico y ácidos carboxílicos, ésteres de celulosa mezclada, y éteres de celulosa; polímeros naturales que contienen nitrógeno, tales como proteínas y derivados, que incluyen gelatinas reticuladas o modificadas, y queratinas; polímeros de hidrocarburo natural, tales como látex y caucho; polímeros sintéticos, tales como polímeros de vinilo, que incluyen polietileno, polipropileno, poliestireno, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo y sus derivados parcialmente hidrolizados, poli(acrilamidas, polimetacrilatos, copolímeros y terpolímeros de los policondensados anteriores, tales como poliésteres, poliamidas y otros polímeros, tales como poliuretanos o poliepoxis; materiales inorgánicos porosos tales como sulfatos o carbonatos de metales alcalinotérreos y magnesio, que incluyen sulfato de bario, sulfato de calcio, carbonato cálcico, silicatos de metales alcalinos y alcalinotérreos, aluminio y magnesio; y óxidos de aluminio o de silicio o hidratos, tales como arcillas, alúmina, talco, caolín, zeolita, gel de sílice o vidrio (estos materiales se pueden utilizar como filtros con los materiales poliméricos anteriores); y mezclas o copolímeros de las clases anteriores, tales como copolímeros de injerto obtenidos por la inicialización de la polimerización de polímeros sintéticos en un polímero natural preexistente.

65 [0033] Las fases sólidas generalmente tienen un tamaño y forma que permite su suspensión en un medio acuoso, seguido de la formación de una emulsión de agua en aceite. Las fases sólidas adecuadas incluyen microesferas o partículas (ambas denominadas "micropartículas" para facilitar la discusión). Las micropartículas útiles en la invención

pueden ser seleccionadas por un experto en la técnica de cualquier tipo adecuado de material en partículas e incluir aquellos compuestos por celulosa, sefarosa, poliestireno, polimetilacrilato, polipropileno, látex, politetrafluoroetileno, poliacrilonitrilo, policarbonato o materiales similares. Las micropartículas preferidas incluyen aquellas cuyo promedio se sitúa entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 35 micras, más preferiblemente entre aproximadamente 1 a 20 micras de diámetro, micropartículas hapténadas, micropartículas impregnadas por uno o preferiblemente al menos dos colorantes fluorescentes (particularmente aquellas que se pueden identificar después de un aislamiento individual en una célula de flujo y excitación mediante láser), ferrofluidos (es decir, partículas magnéticas inferiores a aproximadamente 0,1 micras en tamaño), microesferas magnéticas (p. ej., partículas superparamagnéticas aproximadamente 3 micras en tamaño), y otras micropartículas desmontables o eliminables por sedimentación y/o filtración.

Unión de polinucleótidos a fases sólidas

[0034] Los polinucleótidos se enlazan a las fases sólidas a través de cualquier medio conocido entre aquellos de la técnica que no interfieren con la transcripción/traducción. En formas de realización preferidas, el enlazador se fija a un extremo de cada polinucleótido, anclando así el polinucleótido a la fase sólida. Si la fase sólida no es un sustrato para las enzimas/variantes enzimáticas codificadas por los polinucleótidos, el enlazador es o incluye una fracción que se puede dividir por las variantes activas y/o enzimáticas para liberar los polinucleótidos de las fases sólidas.

[0035] En varias formas de realización, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 (o cualquier rango con estos valores como objetivos) polinucleótidos diferentes se enlazan a una fase sólida única. En formas de realización preferidas, los polinucleótidos diferentes codifican diferentes tipos de enzimas, por ejemplo, enzimas que trabajan conjuntamente para degradar un tipo particular de sustrato insoluble.

[0036] Una manera en la que el polinucleótido se puede enlazar a una fase sólida es a través de una conjugación epoxídica. Esta se puede hacer mediante la activación de la fase sólida (es decir, micropartículas de celulosa de 1 a 20 μm de diámetro) usando un epóxido bifuncional tal como 1,4-butanodiol diglicidil éter. Amplificación por PCR del polinucleótido con un cebador 5'-amino modificado se puede utilizar para introducir una amina primaria enlazada de manera covalente. En otras formas de realización, la modificación de amina puede ser interna. Un polinucleótido no modificado o amino modificado puede estar acoplado de manera covalente a la fase sólida epoxiactivada a través de una conjugación de apertura de anillo epoxídica.

[0037] En formas de realización ilustrativas, el polinucleótido se puede enlazar a una fase sólida a través de un enlazador cruzado heterobifuncional. Este puede hacerse mediante la activación de la fase sólida (es decir, micropartículas de celulosa de 1 a 20 μm de diámetro) usando un agente oxidante tal como el metaperiodato de sodio. Amplificación por PCR del polinucleótido con un cebador amino modificado puede utilizarse para introducir una amina primaria enlazada de manera covalente. Alternativamente, la modificación de amino puede ser interna. Un polinucleótido amino modificado puede acoplarse de manera covalente a grupos de aldehído generados durante la oxidación de la fase sólida a través de un enlazador cruzado heterobifuncional tal como succinimidil 4-hidrazinonicotinato acetona hidrazono.

[0038] Otra forma en la que el polinucleótido se puede enlazar a una fase sólida es a través de biotinylación. Esto puede hacerse mediante amplificación por PCR con un cebador de biotinylación (p. ej., un cebador 5'-biotinylación) de manera que la biotina y el polinucleótido están enlazados de manera covalente. Un polinucleótido biotinylado se puede acoplar a una microesfera de poliestireno (0,035 a 10 μm de diámetro) que está recubierta con avidina o estreptavidina, que enlazarán por lo tanto el polinucleótido biotinylado con una gran afinidad.

[0039] Si la fase sólida es silicio o vidrio, la superficie debe estar activada generalmente antes de fijar polinucleótidos. Los compuestos de silano activado tales como trietoxi amino propil silano (disponible en Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), trietoxi vinilo silano (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis.), y (3-mercaptopropil)-trimetoxi silano (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) pueden utilizarse para introducir grupos reactivos tales como amino, vinilo y tiol, respectivamente. Tales superficies activadas pueden utilizarse para unir el polinucleótido directamente (en los casos de amino o tiol), o la superficie activada puede reaccionar además con enlaces tales como glutaraldehído, bis (succinimidil) suberato, SPPD 9 succinimidil 3-[2-piridilditio] propionato), SMCC (succinimidil-4-[Nmaleimidometil] ciclohexano-1-carboxilato), SIAB (succinimidil [4iodoacetil] aminobenzoato), y SMPB (succinimidil 4-[1maleimidofenil] butirato) para separar el polinucleótido de la superficie. Los grupos vinilo se pueden oxidar para proporcionar medios para la fijación covalente. Los grupos vinilo también pueden usarse como anclaje para la polimerización de varios polímeros tales como ácido poliacrílico, que pueden proporcionar puntos de fijación múltiple para polinucleótidos específicos. Los grupos amino pueden reaccionar con dextranos oxidados de varios pesos moleculares para proporcionar enlaces hidrofílicos de diferente tamaño y capacidad. Adicionalmente, las interacciones polielectrolíticas pueden utilizarse para inmovilizar un polinucleótido específico en una fase sólida usando técnicas y análisis químicos descritos en las solicitudes estadounidenses n.º 150,278, presentada en enero, 29, 1988 y n.º 375,029, presentada en julio, 7, 1989.

Formación de fases acuosas que contienen reactivos de transcripción/traducción *in vitro*

[0040] Según la invención, las fases sólidas enlazadas a polinucleótidos se suspenden en una fase acuosa que incluye

componentes para la transcripción/traducción *in vitro*. Tales componentes se pueden seleccionar para los requisitos de un sistema específico de los siguientes: un búfer adecuado, un sistema de transcripción/replicación *in vitro* y/o un sistema de traducción *in vitro* que contiene todos los ingredientes necesarios, enzimas y cofactores, ARN polimerasa, nucleótidos, ARN de transferencia, ribosomas y aminoácidos (natural o sintético).

[0041] Un tampón adecuado será uno en el que todos los componentes deseados del sistema biológico sean activos y dependan por lo tanto de los requisitos de cada sistema de reacción específica. Unos tampones adecuados para reacciones químicas y/o biológicas se conocen en la técnica y se proporcionan fórmulas en varios textos de laboratorio, tales como Sambrook et al., 1989.

[0042] Sistemas de traducción *in vitro* ilustrativa puede incluir un extracto celular, típicamente de bacterias (Zubay, 1973; Zubay, 1980; Lesley et al., 1991; Lesley, 1995), reticulocitos de conejo (Pelham y Jackson, 1976), o germen de trigo (Anderson et al., 1983). Se dispone comercialmente de muchos sistemas adecuados (por ejemplo de Promega) que incluyen aquello que permitirá la transcripción/traducción acoplada (todos los sistemas bacterianos y el reticulocito y sistemas de extracto de germen de trigo TNT.TM. de Promega). La mezcla de aminoácidos usados pueden incluir aminoácidos sintéticos si se desea, para aumentar el número posible o variedad de proteínas producida en la biblioteca. Esto se puede realizar cargando los ARNt con aminoácidos artificiales y usando estos ARNt para la traducción *in vitro* de las proteínas a seleccionar (Ellman et al., 1991; Benner, 1994; Mendel et al., 1995).

Formación de emulsiones

[0043] Las emulsiones se pueden producir a partir de cualquier combinación adecuada de líquidos inmiscibles. Preferiblemente la emulsión de la presente invención tiene agua (con componentes bioquímicos) como la fase presente en forma de gotitas finamente divididas (la fase dispersa, interna o discontinua) y un líquido hidrofóbico inmiscible (un aceite) como la matriz en la que estas gotitas son suspendidas (la fase no dispersa, externa o continua). Tales emulsiones son denominadas agua en aceite (W/O).

[0044] La emulsión se puede estabilizar mediante la adición de uno o más agentes tensioactivos (tensioactivos). Estos tensioactivos son denominados agentes emulsionantes y actúan en la interfaz agua/aceite para prevenir (o al menos retrasar) la separación de las fases. Muchos aceites y muchos emulsionantes se pueden usar para la generación de emulsiones de agua en aceite; una compilación reciente catalogada por encima de 16.000 tensioactivos, siendo muchos usados como agentes emulsionantes (Ash y Ash, 1993). Los aceites adecuados incluyen aceite mineral blanco ligero y tensioactivos no iónicos (Schick, 1966) tal como sorbitán monooleato (Span.TM.80; ICI) y polioxietileno sorbitán monooleato (Tween™ 80; ICI).

[0045] El uso de tensioactivos aniónicos también puede ser beneficioso. Los tensioactivos adecuados incluyen colato sódico y taurocolato sódico. Se prefiere particularmente el deoxicolato sódico, preferiblemente en una concentración de 0,5% p/v o inferior. La inclusión de tales tensioactivos puede aumentar en algunos casos la expresión de los polinucleótidos y/o la actividad de las enzimas/variantes enzimáticas. La adición de algunos tensioactivos aniónicos a una mezcla reactiva no emulsionada anula completamente la traducción. No obstante, durante la emulsión el tensioactivo es transferido de la fase acuosa a la interfaz y se restaura la actividad. La adición de un tensioactivo aniónico a las mezclas para emulsionar asegura que las reacciones procedan sólo después de la compartimentación.

[0046] La creación de una emulsión requiere generalmente la aplicación de energía mecánica para juntar las fases a la fuerza. Hay varias formas de hacer esto utilizando varios dispositivos mecánicos, que incluyen agitadores (tales como barras de agitación magnéticas, propulsor y agitadores de turbina, dispositivos de pala y batidoras), homogenizadores (incluyendo homogenizadores de estátor-rotor, homogenizadores de válvula de alta presión y homogenizadores de chorro), molinos de coloide, ultrasonido y dispositivos de "emulsificación de membrana" (Becher, 1957; Dickinson, 1994).

[0047] Las gotitas acuosas formadas en emulsiones de agua en aceite son generalmente estables con poco si hay intercambio de polinucleótidos o enzimas/variantes enzimáticas entre gotitas. La tecnología existe para crear emulsiones con volúmenes hasta lo más alto de las escalas industriales de miles de litros (Becher, 1957; Sherman, 1968; Lissant, 1974; Lissant, 1984).

[0048] El tamaño de gotita preferida variará dependiendo de los requisitos precisos de cualquier proceso de selección individual que se debe llevar a cabo según la presente invención. En cualquier caso, habrá un equilibrio óptimo entre el tamaño de la biblioteca de polinucleótidos, el enriquecimiento requerido y la concentración requerida de componentes en las gotitas individuales para conseguir una expresión eficaz y una reactividad de las enzimas/variantes enzimáticas.

[0049] Los procesos de expresión preferiblemente tienen lugar dentro de cada gotita individual proporcionada por la presente invención. Tanto la transcripción *in vitro* como la transcripción/traducción acoplada se vuelven menos eficaces en concentraciones de ADN subnanomolar. Debido al requisito de que esté presente sólo un número limitado de moléculas de ADN en cada gotita, por lo tanto, esto establece un límite superior práctico en el posible tamaño de la gotita. El volumen medio de las gotitas se encuentra generalmente entre aproximadamente 1 femtolitro y aproximadamente 1 nanolitro, inclusive. El diámetro medio de las gotitas acuosas típicamente se encuentra entre aproximadamente 1 µm y aproximadamente 100 µm, inclusive. En formas de realización determinadas, el volumen

medio de las gotitas es preferiblemente inferior a $5,2 \times 10^{-16} \text{ m}^3$, (correspondiente a una gotita esférica de diámetro inferior a $10 \text{ }\mu\text{m}$, más preferiblemente inferior a $6,5 \times 10^{-17} \text{ m}^3$, ($5 \text{ }\mu\text{m}$), más preferiblemente aproximadamente $4,2 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ ($2 \text{ }\mu\text{m}$) y de la forma más preferible aproximadamente $9 \times 10^{-18} \text{ m}^3$ ($2,6 \text{ }\mu\text{m}$).

5 [0050] La concentración eficaz de polinucleótidos en las gotitas puede aumentar artificialmente mediante varios métodos que son conocidos de sobra para aquellos versados en la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, la adición de volumen excluyendo los productos químicos tales como polilitenglicol (PEG) y una variedad de técnicas de amplificación génica, incluyendo la transcripción que usa ARN polimerasas que incluyen aquellas de bacterias tales como *E. coli* (Roberts, 1969; Blattner y Dahlberg, 1972; Roberts et al., 1975; Rosenberg et al., 1975), eucariotas, p. ej., (Weil et al., 1979; Manley et al., 1983) y bacteriófagos tales como T7, T3 y SP6 (Melton et al., 1984); la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki et al., 1988); la amplificación de la Q β replicasa (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); sistema de replicación de secuencia autónomo (Fahy et al., 1991) y amplificación de desplazamiento de cadena (Walker et al., 1992). Incluso se podrían usar las técnicas de ampliación génica que requieren un ciclo térmico tal como PCR y LCR si las emulsiones y la transcripción *in vitro* o sistemas de transcripción/traducción acoplada fueran termoestables (por ejemplo, los sistemas de transcripción/traducción acoplada podrían crearse a partir de un organismo termoestable tal como *Thermus aquaticus*).

20 [0051] El hecho de aumentar la concentración local eficaz de ácido nucleico permite usar eficazmente las gotitas más grandes. Esto permite un límite superior práctico preferido para la mayoría de aplicaciones para el volumen de gotita de aproximadamente $2,2 \times 10^{-14} \text{ m}^3$ (correspondiente a una esfera con un diámetro de $35 \text{ }\mu\text{m}$).

25 [0052] El tamaño de gotita debe ser lo suficientemente grande para contener todos los componentes requeridos de las reacciones bioquímicas que es necesario que tengan lugar en la gotita, además de la fase sólida enlazada al polinucleótido. Tanto las reacciones de transcripción y las reacciones de transcripción/traducción acopladas *in vitro* emplean normalmente una concentración de nucleótidos total de aproximadamente 2 mM. Por ejemplo, para transcribir un gen a una única molécula de ARN corta de 500 bases de longitud se requiere un mínimo de 500 moléculas de nucleótidos por gotita ($8,33 \times 10^{-22}$ moles). Para constituir una solución de 2 mM, este número de moléculas debe estar contenido dentro de una gotita con un volumen $4,17 \times 10^{-19}$ litros ($4,17 \times 10^{-22} \text{ m}^3$ si fuera esférico, tendría un diámetro de 93 nm).

30 [0053] Además, los ribosomas necesarios para que tenga lugar la traducción poseen aproximadamente 20 nm de diámetro. Por lo tanto, el límite inferior preferido para gotitas es un diámetro de aproximadamente $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ (100 nm).

35 [0054] El tamaño de gotitas de emulsión pueden variar simplemente mediante la confección de las condiciones de emulsión usadas para formar la emulsión según los requisitos del sistema de selección. Cuanto más grande sea el tamaño de la gotita, más grande es el volumen requerido para emulsionar una biblioteca de polinucleótidos dada, ya que el factor limitante en última instancia será el tamaño de la gotita y, con ello, el número de gotitas posible por unidad de volumen. En formas de realización ejemplares, la emulsión incluye al menos cerca de: 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} y 10^{12} gotitas/ml de emulsión.

45 [0055] Dependiendo de la complejidad y tamaño de la biblioteca a seleccionar, puede ser beneficioso formar una emulsión de manera que se incluya generalmente 1 o menos de 1 fase sólida enlazada al polinucleótido en cada gotita de la emulsión. El número de polinucleótidos por gotita se determina por la distribución de Poisson. Por consiguiente, si las condiciones son ajustadas de modo que hay, de media, 0,1 fase sólida enlazada al polinucleótido por gotita, luego, en la práctica, aproximadamente: el 90% de las gotitas no contendrán ninguna fase sólida enlazada al polinucleótido, el 9% de gotitas contendrán 1 fase sólida enlazada al polinucleótido, y el 1% de gotitas contendrán 2 o más fases sólidas enlazadas al polinucleótido. En la práctica, los valores medios de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5, más preferiblemente aproximadamente 0,3, las fases sólidas enlazadas al polinucleótido por gotita proporcionan emulsiones que contienen un porcentaje lo suficientemente alto de gotitas con 1 fase sólida enlazada al polinucleótido por gotita, con un porcentaje lo suficientemente bajo de gotitas con 2 o más fases sólidas enlazadas al polinucleótido por gotita. Este método proporcionará generalmente la mayor potencia de resolución. No obstante, donde la biblioteca es más grande y/o más compleja esto puede ser impracticable; sería preferible incluir diferentes fases sólidas enlazadas al polinucleótido juntas y basarse en la aplicación repetida del método de la invención para conseguir la clasificación de la actividad deseada. En varias formas de realización, la emulsión de agua en aceite está formada bajo condiciones donde al menos cerca del: 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de las gotitas acuosas incluyen 1 o menos de 1 fase sólida enlazada al polinucleótido.

60 [0056] Estudios teóricos indican que cuanto mayor sea el número de variantes polinucleótidas creadas, es más probable que una molécula sea creada con las propiedades deseadas (ver Perelson y Oster, 1979 para una descripción de la aplicación de esto en repertorios de anticuerpos). Recientemente también se ha confirmado prácticamente que unos repertorios de anticuerpo de fago mayores dan lugar a más anticuerpos con mejores afinidades de enlace que unos repertorios más pequeños (Griffiths et al., 1994). Para asegurar que se generen variantes raras y así sean capaces de ser seleccionadas, generalmente es conveniente un tamaño grande de la biblioteca.

65 [0057] Usando la presente invención, en un diámetro de gotita acuosa preferida de $2,6 \text{ }\mu\text{m}$, un tamaño de repertorio de

al menos 10¹¹ puede ser clasificado inmediatamente utilizando 1 ml de fase acuosa en una emulsión de 20 ml.

Recuperación de polinucleótidos liberados

5 [0058] La emulsión se mantiene durante el tiempo suficiente en unas condiciones adecuadas para la transcripción/traducción de las enzimas/variantes enzimáticas. Las enzimas/variantes enzimáticas actúan para disociar un enlazador divisible que pega los polinucleótidos a las fases sólidas, si está presente, y/o para degradar las fases sólidas que consistan en un sustrato insoluble para la enzima. De este modo, la actividad enzimática produce la liberación de enzimas/variantes enzimáticas activas que codifican polinucleótidos de sus fases sólidas a la fase acuosa.

10 [0059] La fase acuosa es separada de la fase sólida y oleosa mediante cualquier técnica adecuada, tal como, por ejemplo sedimentación utilizando un centrifugador. Los polinucleótidos liberados se pueden recuperar de la fase acuosa a través de cualquiera de las técnicas convencionales.

15 [0060] Después de cada recorrido de selección, el enriquecimiento de la agrupación de polinucleótidos para aquellos que codifiquen las moléculas de interés se pueden evaluar mediante reacciones de transcripción/traducción no compartimentalizadas. La agrupación seleccionada se puede amplificar y/o clonar en un vector adecuado para la propagación y/o expresión. El ARN y/o la proteína recombinante pueden producirse a partir de los clones individuales para una mayor purificación y ensayo. Las variantes de enzima recombinante seleccionadas utilizando los métodos de la invención se pueden emplear para cualquier aplicación para que la enzima nativa se emplee. Así, por ejemplo, una variante de celulasa se puede poner en contacto con un sustrato celulósico, por ejemplo, biomasa. En una forma de realización ejemplar, la biomasa se encuentra en forma de material granuloso, donde el diámetro de partícula media se encuentra en el rango de 1 a 100 µm. En este asunto, una variante de celulosa de la invención se puede emplear en la producción de un biocombustible.

25 **Formas de realización ejemplares**

[0061] El sistema y método de la presente invención se describirá en relación con enzimas expresadas a partir de secuencias genéticas de ADN sintético. No obstante, el sistema y método también se puede usar con secuencias de ADN derivadas de fuentes naturales o con secuencias genéticas de ARN naturales o sintéticas.

35 [0062] Como se muestra en la figura 2, el proceso de selección enzimática 200, en una forma de realización, empieza con la creación de una biblioteca de polinucleótidos (202). Más específicamente, la biblioteca de polinucleótidos se puede crear a partir de una secuencia de genes que codifica una enzima con actividad con respecto al sustrato insoluble previsto. En la tabla siguiente se muestran ejemplos de sustratos insolubles y las enzimas que han catalizado su degradación.

Clase	Ejemplos	Enzimas
Polisacáridos insolubles	Celulosa, hemicelulosa, quitina, sefarosa	Celulasa, hemicelulasa, quitinasa, agarasa
Proteínas insolubles	Amiloides, queratinas	Neprilisina, proteasa, queratinasa
Polímeros orgánicos, plásticos	Lignina, ácido poliláctico, polibutileno succinato, policaprolactona, polihidroxibutirato	Lignina peroxidasa, lipasa, cutinasa

40 Por ejemplo, la secuencia 1 que codifica el gen de la endoglucanasa *egII* de *Trichoderma reesei*, se puede utilizar para sustratos o enlaces compuestos por celulosa. De forma similar, la secuencia 2, codificación del gen de la ligninasa *LiP H8* de *Phanerochaete chrysosporium*, se puede utilizar para sustratos o enlaces compuestos por lignina. Las secuencias pueden ser sintetizadas químicamente por varios comerciantes (p. ej., Biomatik Corp., BioPioneer, Codon Devices, Exon BioSystems, y Molecular Cloning Laboratories). Las secuencias genéticas pueden incluir un sitio de iniciación de la transcripción tal como la secuencia del promotor T7 al igual que la secuencia de señal de unión ribosómica Kozak para la transcripción y traducción eficaz en la reacción de transcripción/traducción *in vitro* (TTIV) descrita a continuación. La secuencia 5'-(N)10-TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCCACCATGG-3' se puede añadir a la secuencia genética para proporcionar esta iniciación de transcripción y sitios de unión ribosómicos.

50 [0063] Las variantes genéticas (203) en la biblioteca de polinucleótidos (202) se pueden crear usando una amplificación mutagénica. Más específicamente, 10 µL de 10x tampón PCR mutagénico (70 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,1% (w/v) de gelatina) se combina con 10 µL de 10x mezcla dNTP (2 mM dGTP, 2 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dTTP), 30 pmol de cebador PCR 5'-amino modificado hacia adelante, 30 pmol o cebador PCR inverso, 20 fmol de la secuencia genética 1 o 2, y llevarlo a un volumen total de 88 µL con agua. A continuación se añaden 10 µL de 5 mM MnCl₂ y 5 unidades (2 µL) de ADN polimerasa *Taq* para obtener un volumen final de 100 µL. La solución se mezcla cuidadosamente mediante pipeta. La reacción está en un ciclo térmico 30x durante 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 45 °C y 1 minuto a 72 °C.

[0064] La amplificación mutagénica que utiliza un cebador PCR 5'-amino modificado hacia adelante proporciona un medio de conexión de variantes genéticas (203) a una micropartícula insoluble (206). Las micropartículas pueden ser

micropartículas de celulosa (SigmaCell S3504, Sigma-Aldrich) preparadas de la siguiente manera: 1 g de micropartículas se lava con 100 ml de etanol 95%, 100 ml de agua, y 20 ml de NaOH 0,6 N. Las micropartículas se combinan con 2,5 ml de 1,4-butanodiol diglicidil éter (Eastman Kodak) y 2,5 ml de NaOH 0,6 N que contienen 4 mg/ml de NaBH₄. La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 18 h con agitación continua. La reacción se detiene mediante lavado con agua hasta obtener un pH neutro. Lavar con 50 ml de etanol 95% elimina el 1,4-butanodiol diglicidil éter residual. Las variantes genéticas 5'-amino modificadas (203) están enlazadas (204) a las micropartículas preparadas (206) en NaOH 0,1 N a 21 °C durante 4-8 h en una proporción estequiométrica de 1:3 a 1:10, de manera que en general sólo una variante genética (203) se enlaza (204) en cualquier microesfera dada (206) como describe la distribución de Poisson. Véase (Moss, L.G., et al., "A simple, efficient method for coupling DNA to cellulose". J. Bio. Chem., 1981: 256(24): 12655-12658).

[0065] En una forma de realización ilustrativa alternativa, se utiliza una amplificación mutagénica que usa un PCR amino modificado para enlazar (204) variantes genéticas (203) a una micropartícula insoluble (206), tal como una micropartícula de celulosa (SigmaCell S3504, Sigma-Aldrich), se realiza de la siguiente manera: se lavan 5 mg de micropartículas con 3x 40 ml de agua, y 3x 40 ml de 100 mM de acetato sódico. Las micropartículas se oxidan en un metaperiodato de sodio de 100 mM, solución de acetato sódico de 100 mM durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se elimina la solución lavando las micropartículas 3x 40 ml de agua. Las variantes genéticas amino modificadas se activan con un enlazador cruzado heterobifuncional combinando el 10% p/v de succinimidil 4-hidrazinonicotinato acetona hidrazono disuelto en la dimetilformamida con variantes genéticas de 5 µg en 1x solución salina de tampón fosfato durante 3 horas a temperatura ambiente. Las variantes genéticas activadas son purificadas por el enlazador cruzado heterobifuncional residual y se intercambian en 1x búfer de solución salina de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico usando una columna NAP-5 (GE Healthcare Life Sciences). Las variantes genéticas activadas (203) se enlazan (204) a las micropartículas preparadas (206) en 1x búfer de solución salina de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico a 21 °C durante 1 hora en una proporción estequiométrica de 1:3 a 1:10 de manera que en general sólo una variante genética (203) se enlace (204) a cualquier microesfera dada (206) como describe la distribución de Poisson. Véase (Bioconjugate Techniques, 2ª edición, Greg T. Hermanson, publicado por Academic Press, Inc., 2008).

[0066] La biblioteca de polinucleótidos (202) puede emulsionar (207) utilizando el siguiente procedimiento: se prepara una mezcla de tensioactivo de aceite (214) (4% v/v copolímero de polisiloxano-policetil-poliétilenglicol (Abil EM90, Goldschmidt) disuelto en el aceite mineral ligero) y se transfieren 950 µL a un vial CryoTube (1,8 ml, base redonda, en forma de estrella; Nunc), enfriados en hielo, y se añade una barra agitadora magnética. La mezcla se agita a 1.150 r.p.m en un agitador magnético. La mezcla TTIV reactiva se prepara (35 µL EcoPro T7 (Promega), 2 µL 5mM metionina, 1,66 fmol biblioteca de polinucleótidos (202), agua hasta 50 µL) y se añade a la mezcla de tensioactivo de aceite (214) en alícuotas de 10 µl por un periodo de 2 min para generar una emulsión (210) que contiene 10¹⁰-10¹² gotitas (212) (compartimentos). La emulsión se incuba a 23-30 °C durante 1-4 h para permitir la transcripción y traducción (215) de la variante genética (203) en la variante enzimática de proteína (216).

[0067] Una vez traducida, la variante enzimática (216) empieza a degradar la micropartícula de celulosa (206). Las variantes genéticas (203) que codifican las variantes enzimáticas (216) que exponen una actividad mejorada con respecto a la micropartícula de celulosa (206) degradan la micropartícula (217). Tales variantes genéticas tienen probablemente más posibilidades de ser liberadas (218) de la micropartícula degradada (217) que las variantes genéticas que codifican variantes enzimáticas que muestran una actividad inferior. Un periodo de incubación variable de 1-4 h mejora la astringencia del ensayo. En la práctica, se comienza con un período de incubación más largo y se va acortando progresivamente el período de incubación a través de etapas de selección posteriores cuando la enzima se refina a un estado más activo. Tras la incubación, la emulsión (210) se rompe por centrifugado (219) a 13.000 g durante 5 min a 25 °C. Las variantes genéticas (220) que codifican enzimas con una actividad baja o nula con respecto a la micropartícula (206) coprecipita con las micropartículas (206) durante el centrifugado (219). Las micropartículas degradadas (217) también precipitan durante el centrifugado (219). Las variantes genéticas (224) que codifican variantes enzimáticas que muestran una actividad mejorada permanecen suspendidas en la solución acuosa y, de este modo, son selectivamente enriquecidas a través de la selección negativa de variantes genéticas ligadas a micropartículas (206, 202). Las variantes genéticas (224) se pueden recuperar de la solución acuosa usando PCR, por ejemplo, el equipo de purificación PCR QIAquick (Qiagen), y sometido a ciclos adicionales (226) de amplificación mutagénica y selección para mejorar además la actividad enzimática.

[0068] El proceso 200 es diferente del presentado en la figura 1 (100) en el cual el sustrato (106), producto (118), y variante genética (103) permanecen enlazados (104) y en el cual se realiza una selección positiva mediante la captura de afinidad (122, 123) del producto (118).

REIVINDICACIONES

1. Método de selección para mejorar la actividad enzimática en un sustrato insoluble, donde el método comprende:
- 5 (a) proveer una pluralidad de polinucleótidos que codifican variantes de una o más enzimas que actúan en un sustrato insoluble, donde la pluralidad de los polinucleótidos se enlaza a una pluralidad de fases sólidas y el enlazador o las fases sólidas comprenden un sustrato para una o más enzimas;
- (b) suspender las fases sólidas enlazadas al polinucleótido en una fase acuosa que comprende componentes para la transcripción/traducción *in vitro*;
- 10 (c) formar una emulsión de agua en aceite, donde las fases sólidas enlazadas de polinucleótido están compartimentadas en gotitas acuosas en una fase continua de aceite;
- (d) realizar transcripción/traducción *in vitro* para expresar variantes enzimáticas dentro de gotitas acuosas de la emulsión; y
- 15 (e) separar la fase acuosa de la fase sólida y de aceite para la recuperación de polinucleótidos que han sido liberados de las fases sólidas.
2. Método según la reivindicación 1, donde la pluralidad de polinucleótidos comprende al menos 10^6 polinucleótidos diferentes.
- 20 3. Método según la reivindicación 1 o 2, donde cada fase sólida enlazada de polinucleótido comprende de 1 a 6 polinucleótidos diferentes, cada uno de los cuales está presente en una o más copias.
4. Método según la reivindicación 3, donde dichos no más de 6 polinucleótidos diferentes codifican de 2 a 6 tipos diferentes de enzimas.
- 25 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde las fases sólidas comprenden microesferas o partículas.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la emulsión de agua en aceite se forma bajo condiciones donde al menos aproximadamente el 20% de gotitas acuosas comprende 1 o menos de 1 fase sólida enlazada al polinucleótido.
- 30 7. Método según la reivindicación 6, donde cada fase sólida enlazada al polinucleótido comprende de 1 a 6 polinucleótidos, cada uno de los cuales está presente en una o más copias, por lo cual se expresan respectivamente de 1 a 6 variantes enzimáticas por gotita acuosa que contiene una fase sólida enlazada al polinucleótido.
- 35 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la emulsión comprende al menos aproximadamente 10^9 gotitas acuosas/ml de emulsión.
- 40 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la fase acuosa es separada del sólido y las fases de aceite por sedimentación utilizando un centrifugador.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los polinucleótidos recuperados se amplifican y enlazan a una pluralidad de fases sólidas, donde el enlazador o las fases sólidas comprenden un sustrato para una o más enzimas, y se repiten los pasos (b)-(e) definidos en la reivindicación 1.
- 45 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde los polinucleótidos recuperados se mutagenizan y luego se enlazan a una pluralidad de fases sólidas, donde el enlazador o las fases sólidas comprenden un sustrato para una o más enzimas, y se repiten los pasos (b)-(e) definidos en la reivindicación 1.
- 50 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde uno o más de los polinucleótidos recuperados son traducidos *in vitro* para producir una o más variantes enzimáticas.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde uno o más de los polinucleótidos recuperados son clonados en un vector.
- 55 14. Método según la reivindicación 13, donde el vector comprende un vector de expresión, y el método adicionalmente comprende:
- 60 a) expresión de uno o más de los polinucleótidos recuperados para producir una o más variantes enzimáticas;
- b) recuperación de una o más variantes enzimáticas del cultivo; y
- c) contacto de una o más variantes enzimáticas con un sustrato insoluble.
15. Método según la reivindicación 14, donde el sustrato insoluble comprende biomasa.
- 65

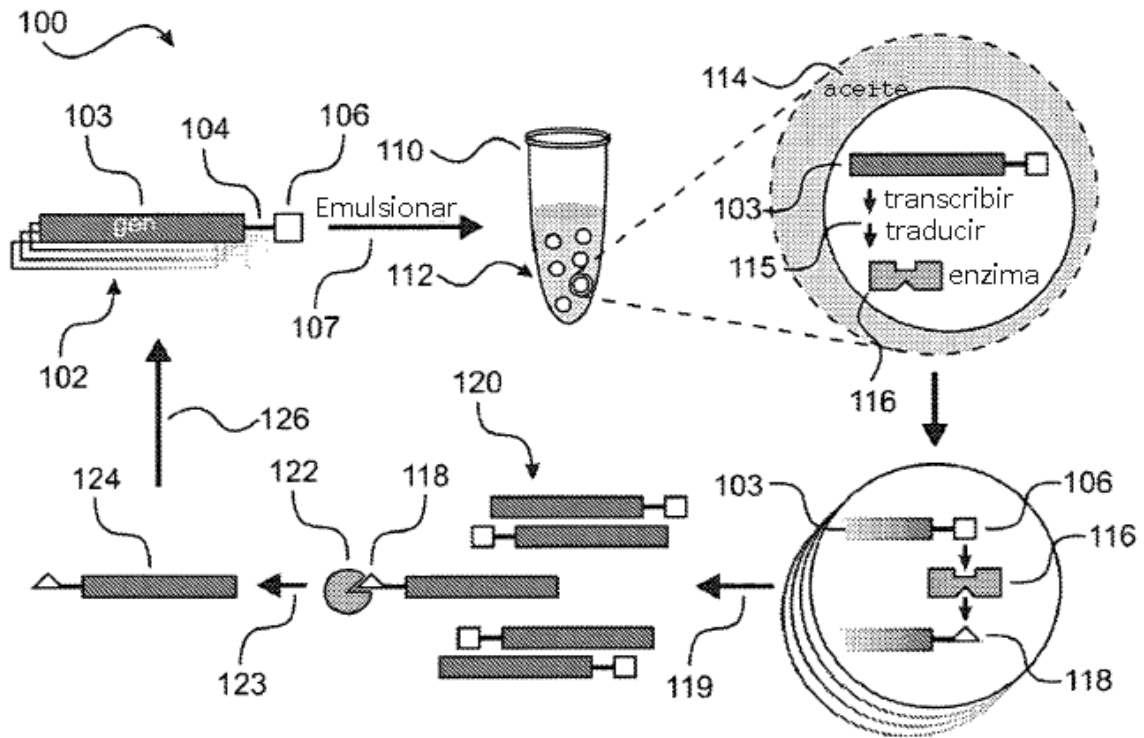


Fig. 1

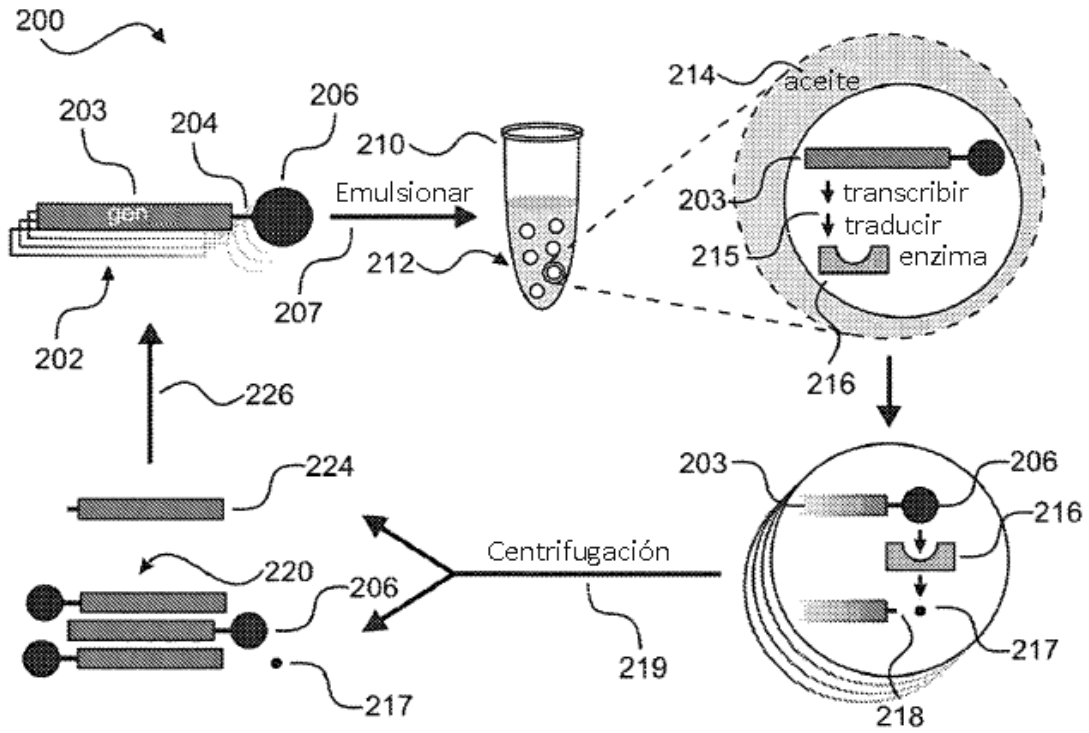


Fig. 2

ES 2 443 047 T3

Secuencia 1527 BP; 320 A; 526 C; 411 G; 270 T; 0 otro ;

```
ttgtccaaa atggcgccct cagttacact gccgttgacc acggccatcc tggccattgc 60
ccggctcgtc gccgcccagc aaccgggtac cagcaccccc gaggtccatc ccaagttgac 120
aacctacaag tgtacaaagt ccggggggtg cgtggcccag gacacctcgg tggtccttga 180
ctggaactac cgctggatgc acgacgaaa ctacaactcg tgcaccgtca acggcggcgt 240
caacaccacg ctctgcctcg acgaggcgac ctgtggcaag aactgcttca tcgagggcgt 300
cgactacgcc gcctcgggcg tcacgacctc gggcagcagc ctcaccatga accagtacat 360
gcccagcagc tctggcggtt acagcagcgt ctctcctcgg ctgtatctcc tggactctga 420
cggtgagtac gtgatgctga agctcaacgg ccaggagctg agcttcgacg tcgacctctc 480
tgctctgccg tgtggagaga acggctcgtt ctacctgtct cagatggacg agaacggggg 540
cgccaaccag tataacacgg ccgggtgcaa ctacgggagc ggctactgcg atgctcagtg 600
ccccgtccag acatggagga acggcacctt caacactagc caccaggggt tctgctgcaa 660
cgagatggat atcctggagg gcaactcgag ggcgaaatgcc ttgacccttc actcttgcac 720
ggccaacggc tcggaactct ccggttgccg cttcaacccc tatggcagcg gctacaaaag 780
gtgagcctga tgccactact acccctttcc tggcgctctc gcggttttcc atgctgacat 840
ggttttccag ctactacggc cccggagata ccggttgacac ctccaagacc ttcaccatca 900
tcaccagtt caacacggac aacggctcgc cctcgggcaa ccttgtgagc atcaccgcga 960
agtaccagca aaacggcgtc gacatcccca gcgccagcc cggcggcgac accatctcgt 1020
cctgcccgtc cgcctcagcc tacggcggcc tcgccaccat gggcaaggcc ctgagcagcg 1080
gcatggtgct cgtgttcagc atttggaacg acaacagcca gtacatgaac tggctcgaca 1140
gcggaacgc cgccccctgc agcagcaccg agggcaaccc atccaacatc ctggccaaca 1200
acccaacac gcaagtcgtc ttctccaaca tccgctgggg agacattggg tctactacga 1260
actcgactgc gccccgccc ccgctcgtt ccagcacgac gttttcgact acacggagga 1320
gctcgacgac ttcgagcagc ccgagctgca cgcagactca ctgggggagc tgcggtggca 1380
ttgggtacag cgggtgcaag acgtgcacgt cgggcactac gtgccagtat agcaacgact 1440
gttcgtatcc ccatgcctga cgggagtgat tttgagatgc taaccgctaa aatacagact 1500
actcgcaatg cctttagagc gttgact 1527
```

Fig. 3

ES 2 443 047 T3

Secuencia 1340 BP; 244 A; 467 C; 328 G; 301 T; 0 otro ;

```
ttttttcttc agtcccactc agcaccagca acacagcgga catggccttc aagcagctct 60
tcgcagctat ctctctcgct ctcttgctct cggctgcgaa cgcggctgcg gtgatcgaga 120
agcgcgccac ctgttccaac ggcaagaccg tcggcgatgc gtcgctgtgc gcttggttcg 180
acgtcctgga tgatatccag cagaacctgt tccacggcgg ccagtgcggc gctgaggcgc 240
acgagtcgat tcgtctcgtc ttccacgact ccatcgcaat ttgcgccgcc atggaggcac 300
agggcaagtt cggcggcggt ggtgctgacg gctccatcat gatcttcgac gatatcgaga 360
ctgcgttcca ccctaacatc ggtctcgacg agatcgtaaa gctccagaag ccattcgttc 420
agaagcaccg tgtaaccctt ggtgacttca tcgccttcgc tggctgtgtc gcgctcagca 480
actgccttgg tgccccgcag atgaacttct tcaactggtc tgcacctgct acccagcccg 540
ctcctgatgg ccttgtcccc gagcccttcc acactgtcga ccaaatcctc aaccgtgtca 600
acgacgcagg cgagttcgat gagctcgagc ttgtctggat gctctccgcg cactccgctc 660
cagcggtgaa cgacgtcgac ccgaccgtcc agggctctgcc ctttgactcg acccccggaa 720
tcttcgactc ccagttcttc gtcgagactc agcttcgtgg taccgccttc cccggctctg 780
gtggcaacca aggcgaggtc gagtcgccc tccttqccga aattcgctc cagtccgacc 840
acaactatcg ccgcgactcg cgcacggcgtSecuencia Jca gtccttcgtc aacaaccagt 900
ccaagctcgt cgatgacttc cagttcatct tctctgcctt caccagctc ggccaggacc 960
cgaacgcgat gaccgactgc tcggatgta tcccgcagtc caagccctc cctggcaacc 1020
tcccattctc gttcttcccc gctggcaaga ccatcaagga cgttgagcag gcgtgtgagg 1080
agagcccctt ccgactctca ccactctccc gggccccgag acgtccgtcc agcgcctccc 1140
tcgcctctcg ggtgcttaaa tgatgccata cagaatactc ctcaaaccga ctgtaacggg 1200
ggccggctaa ctcgtgacgg aacttcggct ttactagatt tcattcctcg tatctctgca 1260
cctaactacg aatctcattc gtctacttcc ttcttacgat attccttgcg cgtgggctta 1320
tgaatatcgt gtgcacatcc 1340
```

Fig. 4