



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 287 960**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

C12P 19/62 (2006.01)

C12N 15/76 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97953212 .4**

86 Fecha de presentación : **12.12.1997**

87 Número de publicación de la solicitud: **0948613**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.10.1999**

54 Título: **Producción de policetidas en bacterias y levadura.**

30 Prioridad: **18.12.1996 US 33193 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

73 Titular/es: **Kosan Biosciences, Inc.**
3832 Bay Center Place
Hayward, California 94545, US

72 Inventor/es: **Barr, Philip, J.;**
Santi, Daniel, V.;
Ashley, Gary, W. y
Ziermann, Rainer

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 287 960 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

Producción de policetidas en bacterias y levadura.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a la producción de policetidas en hospedadores microbianos tales como levaduras y *E. coli* y a la preparación de bibliotecas que contienen una variedad de policetida sintasas (PKS) funcionales y a la variedad resultante de policetidas. Más específicamente, se refiere al suministro de porciones de los sistemas de policetida sintasa en vectores separados para sencillez en el mezclado y emparejado de estas porciones para crear una variedad de PKS resultantes. Esto permite la producción de bibliotecas de policetida sintasas y policetidas mediante un método combinatorio en lugar de la manipulación enfocada a un único sistema de producción.

Antecedentes de la técnica

Las policetidas representan un grupo singularmente útil de productos naturales que están relacionados por su serie de reacciones general de biosíntesis. Los elementos representativos incluyen los antibióticos macrólidos, por ejemplo, eritromicina, espiramicina y tilosina, inmunodepresores tales como rapamicina y FK506, antiparasitarios tales como las avermectinas, agentes antimicóticos tales como anfotericina B y nistatina, agentes anticancerígenos tales como daunorrubicina y doxorubicina y antiolesterolémicos tales como mevinolina. Las policetidas generalmente son metabolitos secundarios de los actinomicetos que incluyen el género *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Saccharopolyspora* y *Nocardia*. Se estimó que en 1986 se habían caracterizado 6.000 antibióticos de origen microbiano de los que 70 estaban en uso clínico; unos 1.100 metabolitos adicionales se describieron entre 1988 y 1992, de los que aproximadamente el 40% eran policetidas.

A pesar de la multiplicidad de las estructuras policetídicas disponibles en la naturaleza, continúa habiendo necesidad de ampliar el repertorio de policetidas disponibles y sintetizar una multiplicidad de policetidas en forma de bibliotecas de modo que exista un sustrato conveniente para cribado destinado a identificar policetidas que son aplicables a una diana específica de interés. La presente invención proporciona soluciones a estas necesidades.

Las policetidas generalmente se sintetizan por condensación de unidades de dos carbonos de manera análoga a la síntesis de ácidos grasos. En general, la síntesis conlleva una unidad iniciadora y unidades ampliadoras; estas unidades de "dos carbonos" proceden de aciltioésteres, típicamente tioésteres de acetil, propionil, malonil o metilmalonil coenzima-A. Existen dos clases principales de policetida sintasas (PKS) que se diferencian en la "manera" en la que se utilizan las secuencias catalíticas, las denominadas PKS (aromáticas) y las PKS modulares. La presente invención emplea secuencias de codificación para estas clases como se explicará con más detalle en la solicitud en la presente memoria.

La producción recombinante de PKS funcional heteróloga, es decir, una PKS que es capaz de producir una policetida, se ha conseguido en *Streptomyces* y formas híbridas de las PKS aromáticas se han producido también en estos hospedadores. Véase, por ejemplo, Khosla, C. *et al.*, *J. Bacteriol.* (1993) 175:2194-2204; Hopwood, D. A. *et al.*, *Nature* (1985) 314:642-644; Sherman, D. H. *et al.*, *J. Bacteriol.* (1992) 174:6184-6190. Además, la producción de enzimas PKS modulares se ha conseguido en *Streptomyces* como se describe en la solicitud PCT de WO 95/08548. En todos estos casos, las enzimas PKS se han expresado a partir de un solo vector. Un solo vector que llevaba genes que codifican las secuencias catalíticas de PKS fue transformado en *E. coli* por Roberts, G. A., *et al.*, *Eur. J. Biochem.* (1993) 214:305-311, pero la PKS no era funcional, debido supuestamente a la falta de pantotenoilación de las proteínas portadoras de acilo.

Kao, C. M., *et al.*, *Science* (1994) 265:509-512 describen la biosíntesis manipulada genéticamente de una macrolactona completa en un hospedador heterólogo, *Streptomyces coelicolor* CH999. Shen, B., *et al.*, *J. Bacteriol.* (1992) 174:3818-3821 describen la purificación y caracterización de la proteína portadora de acilo de la tetracenomicina C policetida sintasa de *Streptomyces glaucescens*. El documento WO 95/08548 describe generalmente policetidas y policetida sintasas, en particular la producción recombinante de policetidas que utilizan un sistema hospedador-vector y la biosíntesis combinatoria de policetidas.

La presente invención proporciona sistemas doble o multivectores para la producción de PKS y las policetidas resultantes en una variedad de hospedadores. La utilización de vectores múltiples proporciona un medio de manera más eficaz para aumentar el número de formas combinatorias de PKS y policetidas que pueden prepararse. Además del sistema para la pantotenoilación de las proteínas portadoras de acilo (es decir, una holo ACP sintasa) permite la producción de policetidas en un amplio espectro de hospedadores.

Exposición de la invención

La presente invención se refiere a materiales recombinantes para la producción de policetidas en una amplia variedad de hospedadores y de bibliotecas de enzimas PKS y a las policetidas resultantes basándose en un sistema vectorial múltiple. La utilización de un sistema multivectorial facilita la construcción de bibliotecas combinatorias y permite más flexibilidad para diseñar varios elementos de las mismas. La invención también se refiere a dichas bibliotecas que son esencialmente autoidentificadoras debido a un sistema autocrino que conlleva receptores sensibles a la policetida.

ES 2 287 960 T3

En un primer aspecto, la invención se refiere a una célula huésped recombinante modificada, que, en forma no modificada, no produce policetidas, célula que se modifica para contener un sistema de expresión para una policetida sintasa (PKS) mínima y un sistema de expresión para una holo ACP sintasa, comprendiendo dicha PKS mínima una zona catalítica cetosintasa/acil transferasa (KS/AT), una zona catalítica del factor de longitud de la cadena (CLF) y una actividad de la proteína portadora de acilo (ACP) para una PKS aromática; o

comprendiendo dicha PKS mínima una zona catalítica KS, una zona catalítica AT y una actividad de ACP para una PKS modular o una PKS micótica.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a una célula huésped recombinante modificada que contiene

a) por lo menos dos vectores; conteniendo dicho primer vector un primer marcador seleccionable y un primer sistema de expresión y conteniendo dicho segundo vector un segundo marcador seleccionable y un segundo sistema de expresión y opcionalmente vectores adicionales que contienen marcadores seleccionables adicionales y sistemas de expresión en los que dichos sistemas de expresión contenidos en dichos vectores son eficaces para producir por lo menos una policetida sintasa (PKS) mínima; o

b) por lo menos un vector y un cromosoma modificado, conteniendo dicho vector un primer marcador seleccionable y un primer sistema de expresión y conteniendo dicho cromosoma modificado un segundo sistema de expresión y opcionalmente vectores adicionales que contienen marcadores seleccionables adicionales y sistemas de expresión en los que dichos sistemas de expresión contenidos en dichos vectores en combinación con dicho sistema de expresión en dicho cromosoma son eficaces para producir por lo menos una PKS mínima;

comprendiendo dicha PKS mínima una zona catalítica cetosintasa/aciltransferasa (KS/AT), una zona catalítica de factor de longitud de cadena (CLF) y una actividad de la proteína portadora de acilo (ACP) para una PKS aromática; o

dicha PKS mínima que comprende una zona catalítica KS una zona catalítica AT y una actividad de ACP para una PKS modular,

en la que la célula se modifica más para contener un sistema de expresión recombinante para una holo ACP sintasa y en la que la célula, en forma no modificada, no produce policetidas.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una biblioteca A de policetida sintasas PKS o policetidas sintetizadas que comprende un panel de colonias aisladas, conteniendo cada colonia

a) por lo menos dos vectores; conteniendo dicho primer vector un primer marcador seleccionable y un primer sistema de expresión y conteniendo dicho segundo vector un segundo marcador seleccionable y un segundo sistema de expresión y opcionalmente vectores adicionales que contienen marcadores seleccionables adicionales y sistemas de expresión en los que dichos sistemas de expresión contenidos en dichos vectores son eficaces para producir por lo menos una policetida sintasa (PKS) mínima; o

b) por lo menos un vector y un cromosoma modificado, conteniendo dicho vector un primer marcador seleccionable y un primer sistema de expresión y conteniendo dicho cromosoma modificado un segundo sistema de expresión y opcionalmente vectores adicionales que contienen marcadores seleccionables adicionales y sistemas de expresión en los que dichos sistemas de expresión contenidos en dichos vectores en combinación con dicho sistema de expresión en dicho cromosoma son eficaces para producir por lo menos una PKS mínima;

comprendiendo dicha PKS mínima una zona catalítica cetosintasa/aciltransferasa (KS/AT), una zona catalítica de factor de longitud de cadena (CLF) y una actividad de la proteína portadora de acilo (ACP) para una PKS aromática; y

comprendiendo dicha PKS mínima una zona catalítica KS, una zona catalítica AT y una actividad de ACP para una PKS modular,

en la que la combinación de vectores o de vector(es) y de cromosoma modificado es diferente en cada colonia, y cada colonia contiene además un sistema de expresión recombinante para una holo ACP sintasa, y en la que cada colonia, en forma no modificada, no produce policetidas.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir una policetida o una biblioteca de policetidas cuyo procedimiento comprende cultivar las células del primer, segundo o tercer aspecto en condiciones en las que dichos sistemas de expresión producen las proteínas codificadas y en las que se sintetiza(n) dicha(s) policetida(s).

En un quinto aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para identificar una policetida que se une a un receptor diana cuyo procedimiento comprende poner en contacto dicho receptor con cada uno de los miembros de la biblioteca del tercer aspecto en condiciones en las que pueda detectarse la unión a dicho receptor; y detectar la presencia o ausencia de unión a dicho receptor con respecto a cada miembro, con lo cual se identifica un miembro que se une a un receptor.

En un sexto aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para identificar una policetida funcional en un sistema de detección basado en células cuyo procedimiento comprende evaluar la presencia o ausencia de señal de cada miembro de la biblioteca del tercer aspecto en dicho sistema de detección basado en células mediante el cual se identifica un polipéptido funcional.

En un séptimo aspecto, la invención se refiere a una célula de levadura modificada que contiene:

un vector adaptado para la expresión en levadura, cuyo vector contiene un marcador seleccionable que puede funcionar en levadura, y un sistema de expresión que comprende la zona de codificación de por lo menos una actividad catalítica de policetida sintasa funcional funcionalmente unida a un activador operable en levadura, en la que la célula de levadura contiene además un sistema de expresión recombinante para una holo ACP sintasa.

En un octavo aspecto, la invención se refiere a una célula de *E. coli* modificada que contiene:

un vector adaptado para la expresión en levadura, cuyo vector contiene un marcador seleccionable que puede funcionar en *E. coli*, y un sistema de expresión que comprende la zona de codificación de por lo menos una actividad catalítica de policetida sintasa funcional funcionalmente unida a un activador operable en *E. coli*, en la que la célula de *E. coli* contiene además un sistema de expresión recombinante para una holo ACP sintasa.

En un noveno aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir una actividad de policetida sintasa cuyo procedimiento comprende cultivar la célula de levadura del séptimo aspecto o la célula de *E. coli* del octavo aspecto en condiciones en las que se favorece la expresión.

En un décimo aspecto, la invención se refiere a un vector adaptado para la expresión en levadura cuyo vector contiene un marcador seleccionable que puede funcionar en levadura, y un sistema de expresión que comprende la zona de codificación de por lo menos una actividad catalítica de policetida sintasa funcional fusionada a una zona de codificación de una holo ACP sintasa funcional a fin de codificar una proteína de fusión funcionalmente unida a un activador operable en levadura.

En un undécimo aspecto, la invención se refiere a un vector adaptado para la expresión en *E. coli* cuyo vector contiene un marcador seleccionable que puede funcionar en *E. coli*, y un sistema de expresión que comprende la zona de codificación de por lo menos una actividad catalítica de policetida sintasa funcional fusionada a una zona de codificación de una holo ACP sintasa funcional a fin de codificar una proteína de fusión funcionalmente unida a un activador operable en *E. coli*.

Las formas de realización preferidas del primer, segundo y tercer aspectos están publicadas en las reivindicaciones 2 a 6, 9 a 14 y 17 a 21, respectivamente.

Si el sistema de PKS mínimo es un sistema aromático, el sistema mínimo comprenderá una zona catalítica cetosintasa/acil transferasa (KS/AT), una zona catalítica de factor de longitud de cadena (CLF) y una actividad de proteína portadora de acilo (ACP). Si el sistema PKS mínimo es un sistema modular, el sistema contendrá por lo menos una zona catalítica KS, una zona catalítica AT y una actividad ACP. Para los sistemas modulares, estas actividades son suficientes con tal que los productos intermedios en la síntesis se proporcionen como sustratos; si se requiere síntesis *de novo* debería incluirse una aciltransferasa de carga que incluya otra zona AT y ACP.

Al suministrar un sistema de expresión para una holo ACP sintasa compatible en un vector independiente, en uno de los vectores en un sistema vectorial múltiple (o en un solo vector para la expresión de PKS) o como una proteína de fusión con una PKS o una porción de la misma, hospedadores tales como *E. coli*, levadura y otros sistemas microbianos que no sintetizan habitualmente policetidas pueden prepararse en hospedadores convenientes. Esto evita la necesidad de suministrar hospedadores "limpios" de cepas productoras de policetidas de, por ejemplo, *Streptomyces*.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama que presenta la composición de varias PKS aromáticas típicas.

La Figura 2 es un diagrama que presenta la organización de eritromicina PKS como típica de una PKS modular.

La Figura 3 es un diagrama que presenta la organización del sistema PKS micótico, 6-metil ácido salicílico sintasa (6-MSAS).

La Figura 4 es un diagrama que presenta la conceptualización de un sistema PKS modular multivectorial.

La Figura 5 es un diagrama de un sistema PKS aromático multivectorial.

La Figura 6 presenta, en forma de diagrama, la construcción de un vector para la expresión de una holo ACP sintasa y un vector para la expresión del gen que codifica 6-MSAS, ambos vectores para su utilización en levadura.

La Figura 7 presenta los resultados de las series de HPLC en sobrenadantes de cultivos de levadura transformados con varios vectores de la invención.

Las Figuras 8A y 8B presentan la cinética de producción del antibiótico ácido 6-metilsalicílico (6-MSA) en levadura (Figura 8A) y en *E. coli* (Figura 8B).

La Figura 9 presenta los sistemas de expresión de dos PKS modulares para su utilización en vectores compatibles con levadura junto con los productos esperados.

10 Modos de poner en práctica la invención

La invención en varios aspectos emplea varios componentes del sistema PKS aromático, el sistema PKS modular, un sistema PKS micótico o formas modificadas de los mismos o partes de más de uno de éstos. Las características generales de los sistemas PKS aromáticos, modulares y micóticos se presentan en las Figuras 1, 2 y 3, respectivamente.

Los sistemas PKS “aromáticos” se caracterizan por la utilización iterativa de secuencias catalíticas en varias enzimas producidas. Por consiguiente, en los sistemas PKS aromáticos, se produce solamente una enzima con un tipo específico de actividad para catalizar la actividad aplicable al sistema en toda la síntesis de la policetida. En los sistemas PKS aromáticos las enzimas de la PKS mínima se codifican en tres marcos de lectura abiertos (ORF). Como se muestra en la Figura 1, la actinorhodina PKS está codificada en seis ORF independientes. Para la PKS mínima, un ORF contiene una cetosintasa (KS) y una aciltransferasa (AT); un segundo ORF contiene lo que se cree que es un factor de longitud de cadena (CLF); y un tercer marco de lectura codifica una proteína portadora de acilo (ACP). Los ORF adicionales codifican una aromatasas (ARO), una ciclasa (CYC) y una cetereductasa (KR). La combinación de una KS/AT, ACP y CLF constituye una PKS mínima, ya que estos elementos son necesarios para una única condensación de una unidad de dos carbonos.

Por otra parte, la gris PKS contiene cinco ORF independientes en los que KS/AT, CLF y ACP son tres ORF, la KR está en un cuarto y la ARO está en un quinto.

En el sistema PKS “modular”, cada secuencia catalítica se utiliza solamente una vez y la PKS completa está codificada como una serie de “módulos”. Por lo tanto, la proteína sintasa modular contiene una multiplicidad de secuencias catalíticas que presentan el mismo tipo de actividad catalítica. Un módulo mínimo contiene por lo menos una KS, una AT y una ACP. Las actividades adicionales opcionales incluyen actividad de KR, DH, enoilreductasa (ER) y tioesterasa (TE). La Figura 2 presenta, en forma de diagrama, la organización del sistema PKS modular para la síntesis del precursor inmediato, 6-dEB, para el antibiótico eritromicina. Como se muestra, existe una zona de carga seguida de seis módulos; la tioesterasa en el módulo 6 efectúa la liberación de la 6-desoxieritronolida B (6-dEB) completa en la síntesis en la que está acoplada mediante un grupo fosfopantoteínico. El diagrama presenta la formación progresiva de la 6-dEB que se cicla después de la eliminación de la holo ACP en el módulo 6 de la sintasa. Para convertir la 6-dEB en eritromicina A, se añaden dos restos de azúcar en reacciones ulteriores mediante los grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5.

La PKS “micótica” que codifica la ácido 6-metil salicílico sintasa (6-MSAS) presenta alguna similitud tanto con la PKS aromática como con la modular. Hay solamente un marco de lectura para KS, AT, una deshidratasa (DH), KR y ACP. Por lo tanto, parece similar a un solo módulo de una PKS modular. Estas secuencias, sin embargo, se utilizan de manera iterativa. A diferencia de una PKS aromática, no incluyen un CLF, como se muestra en la Figura 3.

La invención en la presente memoria emplea sistemas de expresión para las actividades catalíticas implicadas en todos los sistemas PKS aromático, modular y micótico. Las proteínas pueden contener las secuencias de aminoácidos naturales y por lo tanto las especificidades de sustrato y actividades de las formas naturales, o formas alteradas de estas proteínas, pueden utilizarse con tal que se mantenga la actividad catalítica deseada. La especificidad y eficacia de esta actividad puede diferenciarse, sin embargo, de la de las formas naturales. Determinadas actividades presentes en el sistema natural, sin embargo, pueden eliminarse intencionalmente. Además, los componentes de varios sistemas aromáticos pueden mezclarse y emparejarse, así como pueden los componentes de varios módulos de los sistemas modulares. La solicitud PCT WO 95/08548, citada anteriormente, describe la construcción de sistemas PKS aromáticos híbridos en los que, por ejemplo, los marcos de lectura abiertos de actinorhodina están incluidos en los vectores de expresión con marcos de lectura abiertos de sistemas aromáticos alternativos.

Los sistemas de expresión para las proteínas PKS solos pueden no ser suficientes para la producción real de policetidas a menos que el hospedador recombinante contenga también actividad de holo ACP sintasa que efectúa la pantotenoilación de la proteína portadora de acilo. Esta etapa de activación es necesaria para la capacidad de la ACP para “conocer” la unidad “2C” que es la unidad iniciadora o la cadena de policetida en crecimiento en la serie de condensaciones de Claisen que produce el polipéptido acabado. Para los hospedadores que carecen de la enzima de la fosfopantotenoilación que se comporta como una holo ACP sintasa, la invención proporciona medios para conferir esta actividad suministrando sistemas de expresión adecuados para esta enzima. El sistema de expresión para la holo ACP sintasa puede suministrarse en un vector independiente del que lleva una unidad PKS o puede suministrarse en el mismo vector o puede integrarse en el cromosoma del hospedador, o puede suministrarse como un sistema de expresión para una proteína de fusión con toda o una parte de una policetida sintasa. En general, las holo ACP sintasas

asociadas a la síntesis de ácidos grasos no son adecuadas; en su lugar, las sintasas asociadas específicamente a la síntesis de policetida o a la síntesis de proteínas no ribosómicas son útiles en este aspecto.

Específicamente, los sistemas de PKS modular y micótica no están activados por la fosfopantotenoilación efectuada por las enzimas de fosfopantotenoilación autóctonas para *E. coli*; sin embargo, las enzimas procedentes de *Bacillus*, en particular la gramicidina holo ACP sintasa de *Bacillus brevis* y la holo-ACP relacionada con surfactina sintasa de *Bacillus subtilis* pueden utilizar los dominios y sustratos ACP de PKS modular y micótica. Como se muestra en los Ejemplos a continuación, aunque la inclusión de un sistema de expresión durante una síntesis de holo-ACP apropiada no es necesaria para sólo la expresión de los genes que codifican a PKS micótica o modular en *E. coli* o levadura, la inclusión de dichos sistemas de expresión se requiere si las enzimas producidas han de producir las policetidas.

Obsérvese que en algunos hospedadores recombinantes, puede ser necesario activar las policetidas producidas por modificación después de la síntesis cuando se desean policetidas con actividad antibiótica. Si es este el caso para un determinado hospedador, el hospedador se modificará, por ejemplo por transformación, para que contenga aquellas enzimas necesarias para efectuar estas modificaciones. Entre dichas enzimas, por ejemplo, están las enzimas de glucosilación.

Las posibilidades combinatorias para la síntesis de sistemas PKS aromáticos dependen de la naturaleza de las secuencias utilizadas de forma iterativa y la presencia o ausencia de las actividades opcionales que no forman parte del sistema PKS mínimo requerido para la condensación de Claisen que representa el mecanismo de síntesis para el producto final policetida. Por lo tanto, aunque la síntesis de PK aromático puede contener una KS/AT, ACP y CLF, las demás actividades catalíticas, es decir, KR, ARO y CYC son opcionales. Las PK sintasas micóticas requieren solamente funcionalidades de KS, AT y ACP como los sistemas PKS modulares. Pueden utilizarse varias combinaciones de estas actividades de varias fuentes así como sus formas mutadas.

Debido a que las secuencias catalíticas se utilizan solamente una vez en los sistemas PKS modulares, las posibilidades combinatorias en este tipo de sintasa son mayores. El potencial combinatorio de una PKS modular está dado por: $AT_L \times (AT_E \times 4)^M$ donde AT_L es el número de aciltransferasas de carga, AT_E es el número de aciltransferasas ampliadoras y M es el número de módulos en el grupo génico. El número 4 está presente en la fórmula porque representa el número de maneras que un grupo ceto puede modificarse ya sea por 1) ninguna reacción; 2) actividad de KR solo; 3) actividad de KR+DH; o 4) actividad de KR+DH+ER. Se ha demostrado que la expresión solamente de los dos primeros módulos de la eritromicina PKS dieron como resultado la producción de un producto de tricetida truncado previsto. Véase Kao, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* (1994) 116: 11612-11613. Un nuevo macrólido de 12 elementos similar a la metimicina aglucón fue producido por la expresión de los módulos 1 a 5 de esta PKS en *S. coelicolor*. Véase Kao, *C. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* (1995) 117: 9105-9106. Este trabajo, así como el de Cortés, *J. et al.*, *Science* (1995) 268: 1487-1489, demuestra que los módulos de PKS son funcionalmente independientes de modo que el tamaño del anillo de lactona puede controlarse por el número de módulos presentes.

Además de controlar el número de módulos, los módulos pueden modificarse genéticamente, por ejemplo, por eliminación de un dominio de cetorreductasa tal como describe Donadio, *S. et al.*, *Science* (1991) 252:675-679; Donadio, *S. et al.*, *Gene* (1992) 115:97-103. Además, la mutación de un dominio de enoil reductasa fue descrito por Donadio, *S. et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90:7119-7123. Estas modificaciones también produjeron PKS modificada y por lo tanto policetidas modificadas.

Tal como se indicó anteriormente, en la presente invención, las secuencias de codificación para las actividades catalíticas procedentes de sistemas PKS aromáticos, micóticos o modulares encontrados en la naturaleza pueden utilizarse en sus formas naturales o modificadas por técnicas de mutagénesis habitual para eliminar o disminuir la actividad disminuida o para introducir una actividad en un módulo en el que no está originalmente presente. Por ejemplo, una actividad de KR puede introducirse en un módulo normalmente que carece de esta función.

Aunque la técnica, indicada anteriormente, ha conseguido producir algunas nuevas policetidas en virtud de la construcción de sistemas PKS híbridos y/o aromáticos alterados o modulares en *Streptomyces* a partir de un solo vector de expresión, no se han obtenido ventajas de la utilización de un sistema de vector múltiple en células huésped generalmente a fin de producir una variedad más amplia de sintasas. "Múltiple" significa dos o más; "vector" significa una molécula de ácido nucleico que puede utilizarse para transformar sistemas hospedadores y que contiene tanto un marcador seleccionable como un sistema de expresión independiente que contiene una secuencia de codificación bajo el control de un activador y cualesquiera otras secuencias adecuadas que regulan la expresión. Dichos vectores típicos son plásmidos, pero pueden utilizarse otros vectores tales como fagómidos, cósmidos, vectores víricos y similares según la naturaleza del hospedador.

Desde luego, uno o más de los vectores independientes pueden producir la integración de los sistemas de expresión aplicables al cromosoma del hospedador.

Ninguno de los hospedadores microbianos generalmente, tales como *E. coli* y levadura, se han utilizado con éxito para construir policetidas. Se cree que esto es debido a la falta de holo ACP sintasa que, según los procedimientos de la invención, se suministran a estos hospedadores.

Por lo tanto, con objeto de producir las policetidas de la invención, se modifican hospedadores adecuados que contengan vectores, típicamente plásmidos, que contienen sistemas de expresión para la producción de proteínas con una o más de las actividades asociadas a PKS. Colocando varias actividades en diferentes vectores de expresión, puede conseguirse un alto grado de variación. Puede utilizarse una variedad de hospedadores; cualquier célula huésped adecuada para la que pueden idearse marcadores de selección para asegurar la incorporación de vectores múltiples pueden utilizarse fácilmente. Los hospedadores preferidos incluyen levadura, *E. coli*, actinomicetos y células vegetales, aunque no existe ninguna razón teórica por la que no puedan utilizarse células de mamífero o de insecto u otros hospedadores recombinantes adecuados. Entre las cepas de levadura preferidas están *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Los actinomicetos preferidos incluyen varias cepas de *Streptomyces*.

La selección de hospedadores, desde luego, comanda la selección de las secuencias de referencia asociadas al sistema de expresión así como los marcadores seleccionables. Los sistemas activadores adecuados, por ejemplo, para su utilización en *E. coli* incluyen el activador triptófano (trp), el activador lactosa (lac), el activador T7 y el activador P_L derivado de λ y la secuencia de unión del ribosoma del gen N. Para levaduras, las secuencias de referencia adecuadas incluyen activadores de la síntesis de enzimas glucolíticas, tal como la 3-fosfoglicerato cinasa. Otros activadores incluyen aquellos para alcohol deshidrogenasa (ADH-1 y ADH-2), isocitocromo-C, ácido fosfatasa, enzimas degradantes asociadas con el metabolismo del nitrógeno y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Se cree también que las secuencias terminadoras son deseables en el extremo 3' de las secuencias de codificación.

Los activadores adecuados para su utilización en células de mamífero, actinomicetos, células vegetales, células de insecto y similares son también conocidos por los expertos en la materia.

Los marcadores seleccionables adecuados para su utilización en bacterias tales como *E. coli* y actinomicetos generalmente proporcionan resistencia antibiótica, para su utilización en levadura con frecuencia requisitos nutritivos de complemento. Los marcadores seleccionables para su utilización en levadura incluyen, pero no se limitan a *URA3*, *LEU2-d*, *TRP1*, *LYS2*, *HIS1*, *HIS3*. Los marcadores seleccionables para su utilización en actinomicetos incluyen, pero no se limitan a aquellos para resistencia a tioestreptona, apramicina, higromicina y eritromicina.

Los procedimientos y materiales para la construcción de vectores, la transformación de las células huésped y la selección de transformadores con éxito son bien comprendidas en la materia.

Por lo tanto, según una forma de realización de la invención en la presente memoria, se modificará una sola célula huésped para que contenga una multiplicidad de vectores, contribuyendo cada vector a una parte de la síntesis de un sistema PKS. Al construir vectores múltiples para la producción de sistemas PKS aromáticos, los marcos de lectura independientes tales como los mostrados en la Figura 1 pueden incorporarse a vectores independientes o, si se construyen de manera apropiada, las partes de los marcos de lectura pueden distribuirse entre más de un vector, cada uno con secuencias apropiadas para efectuar el control de la expresión. Para los sistemas modulares un solo modulo o más de un modulo puede residir como parte de un sistema de expresión en un solo vector; se utilizan vectores múltiples para modificar la célula para que contenga el sistema PKS completo deseado.

Como se indicó anteriormente, uno o más de los sistemas de expresión introducidos en el hospedador pueden integrarse en el cromosoma.

Por lo tanto, para preparar las bibliotecas de la invención, se transforman células huésped adecuadas con el número deseado de vectores; utilizando diferentes marcadores seleccionables en cada vector deseado como parte de la modificación, pueden seleccionarse transformadores consolidados que se modifican mediante la inclusión de todos los vectores deseados. Utilizando mezclas de un primer vector con un primer marcador seleccionable que contiene una multiplicidad de sistemas de expresión para una proteína de una PKS sintasa, y una mezcla de un segundo vector con sistemas de expresión para una variedad de una segunda parte de un sistema PKS, y así sucesivamente, se obtienen colonias de transformadores consolidados que presentan una representación combinatoria de sistemas PKS "híbridos". Preparando los paneles de colonias individuales de dichos transformadores consolidados, se obtiene una biblioteca de sistemas de PKS y de este modo una biblioteca de policetidas. Se suministra también un sistema de expresión para holo ACP sintasa. Las policetidas pueden estar glucosiladas dependiendo de la naturaleza del hospedador.

Este método puede modificarse también efectuando la integración de la parte apropiada de uno o más de los múltiples vectores en el cromosoma del hospedador. La integración puede efectuarse utilizando vectores de fago adecuados o por recombinación homóloga. Si se utiliza la recombinación homóloga, la integración puede eliminar también la actividad de PKS endógena que reside normalmente en el cromosoma, como se describe en la solicitud PCT WO 95/08548 citada anteriormente. En estas formas de realización, también, un marcador seleccionable tal como con resistencia a higromicina o a tioestreptona se incluirá en el vector que efectúa la integración.

Puede cribarse a continuación la actividad de las bibliotecas de policetidas con respecto a cualquier diana sensible a policetidas a fin de identificar los miembros de policetida específicos que activarán o si no se unirán a la diana. Dichos procedimientos de cribado son habituales en la técnica.

En una forma de realización particularmente preferida de la invención, la biblioteca puede prepararse cribándose mediante la introducción de un receptor sensible a policetida que sea intracelular o esté desplegado en la superficie de la célula huésped que produce la propia policetida. Este sistema "autocrino" permite seleccionar aquellas colonias que

activan el receptor. Dichos sistemas se describen, por ejemplo, en un artículo de Broach, J. R. y Thorner, J., *Nature* (1996) 384:supl. 7:14-16.

Los sistemas autocrinos no necesitan estar limitados, sin embargo, a receptores, pero pueden incluir proteínas que se expresan internas a la célula y cuya interacción puede evaluarse con respecto a las policetidas producidas, de manera análoga al sistema híbrido de la levadura 2 descrito por Fields en la patente U.S. n° 5.283.173.

Por lo tanto, se modifican las células para crear "sistemas de detección basados en células para la función policetida". La función de la policetida puede incluir actividad agonista o antagonista con respecto a un receptor, que se produce en la superficie de la célula o se produce intracelularmente, o las policetidas pueden ser agonistas o antagonistas de dos cribas de interacción de híbridos de modo que sea posible seleccionar inhibidores de la interacción proteína-proteína o factores de reticulación análogos a la rapamicina y FK506.

Obsérvese, que dichos sistemas de detección basados en células son también útiles en bibliotecas de identificación de policetidas que se producen a partir de las células que contienen solamente sistemas de un solo vector. Por lo tanto, estas mejoras son aplicables no solamente a las bibliotecas combinatorias multivectoriales de la presente invención sino también a bibliotecas de policetida sintasa y de policetida producidas utilizando células que contienen estos sistemas en un solo vector de expresión.

Como se mencionó anteriormente, las enzimas adicionales que efectúan modificaciones después de la traducción en sistemas enzimáticos en la PKS pueden necesitar ser introducidas en el hospedador mediante sistemas de expresión recombinantes adecuados. Además, pueden necesitarse las enzimas que activan las propias policetidas, por ejemplo, por glucosilación. Puede también ser necesario modificar los dominios catalíticos para alterar su especificidad del sustrato o para los dominios sustitutivos con especificidad apropiada. Por ejemplo, generalmente se cree que las concentraciones de malonil CoA en las levaduras son mayores que las de metilmalonil CoA; si se selecciona levadura como hospedador, puede ser deseable incluir dominios catalíticos que pueden utilizar malonil CoA como unidad ampliadora, tales como los derivados de espiramicina o tilosina.

La Figura 4 presenta gráficamente una forma de realización de las bases conceptuales de la presente invención en la que se emplean tres vectores independientes para producir una PKS modular. Como se muestra, cada vector permite la construcción de 64 marcos de lectura abiertos diferentes utilizando dos AT ampliadores (uno de metilmalonil CoA y el otro de malonil CoA) y las cuatro combinaciones que implican KR, DH y ER como se describió anteriormente. Por lo tanto, el módulo n° 1 puede emplear malonil CoA como unidad ampliadora; el módulo n° 2 metilmalonil CoA; puede utilizarse la secuencia opuesta, o ambos ampliadores pueden utilizar malonil CoA o ambos pueden utilizar metilmalonil CoA. Esto da como resultado cuatro tipos independientes de combinaciones de ampliadores, cada una de las cuales se multiplica por las cuatro variantes KR/DH/ER. Cada plásmido por separado ofrece la misma serie de posibilidades; uno de los plásmidos debe contener también una función de carga y el otro debe contener una función de tioesterasa. Por lo tanto, mediante la construcción de 192 plásmidos, el límite superior de la síntesis de nuevas policetidas es $64 \times 64 \times 64$ ó 262, 144 moléculas, que proporcionan un procedimiento eficaz para obtener grandes cifras de nuevas policetidas.

La Figura 5 presenta un método para una PKS aromática de vector múltiple que se publica con mayor detalle en el Ejemplo 11 a continuación en la presente memoria. En la Figura 5, los tres marcos de lectura independientes de una policetida sintasa aromática típica se colocan en vectores por separado. De este modo, cada marco de lectura puede derivarse si se desea de una policetida sintasa aromática diferente.

Otra modificación útil para variar las policetidas producidas independientemente de la célula huésped empleada manipula la PKS, en particular una PKS modular o micótica, para activar la cetosintasa (KS) en el primer módulo. Esto permite un aumento de eficiencia al permitir al sistema incorporar una tioéster dicetida adecuada tal como el N-acetil cisteamina tioéster del ácido 3-hidroxi-2-metil pantonoico, o tioésteres similares de análogos de dicetida, tal como describen Jacobsen *et al.*, *Science* (1997) 277:367-369. La construcción de módulos de PKS que contienen zonas inactivadas de cetosintasa se describe en la correspondiente solicitud U.S. n° 08/675.817 y se publica en la solicitud PCT WO 97/02358. Estos módulos de PKS modificados pueden emplearse en varias formas de realización de la invención para preparar bibliotecas utilizando procedimientos multivectoriales y/o en organismos de producción a base de *E. coli* y levadura para las policetidas que requieran la adición y expresión de un gen que codifica una holo-ACP sintasa adecuada.

Por lo tanto, la presente invención proporciona la oportunidad de producir policetidas en hospedadores que normalmente no las producen, tales como *E. coli* y levadura. La invención proporciona asimismo más medios adecuados para proporcionar una variedad de productos de policetida suministrando los elementos de la PKS introducida, bien en una *E. coli* o en un hospedador de levadura o en otros hospedadores utilizados más tradicionalmente, en vectores por separado múltiples. La invención incluye asimismo bibliotecas de policetidas preparadas utilizando los métodos de la invención.

Utilizaciones de policetidas

Tal como se entiende bien, las policetidas, en sus formas glucosiladas, son potentes antibióticos. Además, muchas policetidas son inmunodepresoras y agentes anticancerígenos. Se ha descubierto asimismo que las policetidas o sus

formas glucosiladas pueden reducir la inflamación en determinadas circunstancias. Esto se cree que es debido a la capacidad de determinados antibióticos para inhibir la liberación de citocinas tales como IL-8. Por ejemplo, Hott, M. en el *Kurume Medical Journal* (1996) 43:207-217 saca en conclusión que el efecto clínico favorable de la eritromicina en la neumonía de organización criptógena y en enfermedades relacionadas se debe a la inhibición de la acumulación neutrófila en las vías respiratorias periféricas por supresión local de la producción de IL-8. En el trabajo experimental adicional, Tamaoki, J. *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1996) 40:1726-1728 demostraron que el pretratamiento de cobayas con roxitromicina o eritromicina inhibía el aumento de secreción de células caliciformes cuando se inhalaba IL-8. Hamada, K. *et al.*, *Chemotherapy* (1995) 41:59-69 demostraron que el efecto antitumoral de la eritromicina en ratones era debido al aumento de la producción de IL-4. En otro estudio, Keicho, N. *et al.*, *Journal of Antibiotics* (Tokio) (1993) 46:1406-1413, afirman que se ha descrito que la eritromicina disminuye el grado de inflamación independiente de su acción antimicrobiana y demuestra que la eritromicina suprime la respuesta proliferante de los linfocitos humanos estimulados con mitógenos y antígenos pero que no tuvo ningún efecto sobre la producción de IL-2 inducida por concanavalina-A o sobre la expresión de IL-2R- α . Bailly, S. *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (1991) 35:2016-2019 demostraron que la roxitromicina, la espiramicina y la eritromicina presentan diferentes espectros sobre la producción de IL-1 α , IL-1 β e IL-6 así como el factor α de la necrosis tumoral. La espiramicina, y en menor medida, la eritromicina aumentan la producción total de IL-6 sin afectar la IL-1 α , IL-1 β o TNF α . La roxitromicina no tuvo ningún efecto.

Por lo tanto, existen numerosos artículos que indican que los antibióticos son también importantes para modular los mecanismos inflamatorios. La bibliografía parece demostrar que la eritromicina disminuye la producción de IL-8, pero aumenta la producción de IL-6, IL-1 e IL-2. La espiramicina ha demostrado también que aumenta la producción de IL-6.

Estos ejemplos están destinados a ilustrar pero no a limitar la invención.

Ejemplo 1

Construcción de 102d, vector de expresión de levadura de 6-MSAS

Se obtuvieron secuencias de control eficaces en levaduras y se insertaron en el plásmido pBlueScript (Stratagene) junto con un polienlazador. El activador ADH2 de *S. cerevisiae* se amplió por PCR utilizando los cebadores siguientes:

transcrito: GGGAGCTCGGATCCATTTAGCGGCCGCAAAACGTAGGGGC

complementario: CCGAATTCTAGAGGTTTCATATGGTATTACGATATAGTTAATAG.

El cebador transcrito contiene 15 bases complementarias con la secuencia de 5' ADH2 e introduce las secuencias de restricción *SacI* (nucleótidos 3 a 8), *BamHI* (nucleótidos 9 a 14) y *NotI* (nucleótidos 20 a 27). El cebador complementario contiene 15 bases complementarias de la secuencia 3' ADH2 e introduce las secuencias *NdeI* (nucleótidos 18 a 23), *XbaI* (nucleótidos 7 a 12) y *EcoRI* (nucleótidos 3 a 8).

El terminador ADH2 se amplió por PCR utilizando los cebadores siguientes:

transcrito: GGGAATTCATAGTCGACCGGACCGATGCCTTCACGATTTATAG

complementario: TTTTCTATTATAAGATGAAAAACGAGGGGAGCTCCCATGGCC.

El cebador transcrito introduce las secuencias de restricción *EcoRI* (nucleótidos 3 a 8), *Sall* (nucleótidos 12 a 17) y *RsrII* (nucleótidos 17 a 24). El cebador complementario introduce las secuencias de restricción *XhoI* (nucleótidos 29 a 34) y *Asp718* (nucleótidos 35 a 40).

El fragmento *SacI/EcoRI* que contiene el activador ADH2, el fragmento *EcoRI/Asp718* que contiene el terminador ADH2 y el fragmento *SacI/Asp718* de pBlueScript se ligaron para producir el vector intermedio 43d2 que contiene las secuencias de clonación (L2) para 6MSAS y el gen para el tensioactivo fosfopantoteína transferasa de *B. subtilis* (gen *sfp*). Véase la Figura 6. Contiene también las secuencias (L1, L3) para transferir la casete activador/terminador en los vectores lanzadera de levadura así como las secuencias (L1, L2) para desplazar las casetes activador/gen desde el vector intermedio BlueScript en el vector lanzadera de levadura.

El activador/terminador ADH2 se introdujo a continuación en el vector lanzadera pYT de *E. coli*/levadura (donación del Dr. S. Hawkes, Universidad de California, San Francisco). El fragmento de restricción *BamHI/Sall* de 13,2 kbp de pYT se ligó al fragmento de restricción de 757 bp *BamHI/XhoI* de 43d2 para dar el plásmido 101c, que contiene los marcadores Leu y Ura para selección.

Para completar la construcción del vector de expresión, se obtuvo un fragmento de restricción *NdeI/XbaI* de 5,3 kbp que contiene el gen para la ácido 6-metilsalicílico sintasa (6-MSAS) de *Penicillium patulum* a partir del plásmido desmetilado pDB102 (Bedford, D., *et al.*, *J. Bacteriology* (1995) 177:4544-4548) y se ligó en 43d2 restringido por

ES 2 287 960 T3

NdeI/XbaI, dando el plásmido intermedio 71d. El fragmento de restricción *NotI/RsrII* de 6,1 kbp procedente de 71d se ligó al fragmento de restricción 12..6 kbp *NotI/RsrII* de 101c para producir el vector de expresión 102d.

Ejemplo 2

Expresión de 6-MSAS en *Saccharomyces cerevisiae*

InvSci (MATa his3D1 leu2 trpI-289 ura3-52) (Invitrogen) de *Saccharomyces cerevisiae* competente se transformó con 102d, a continuación se colocó en placas mínimas de agar-agar (1,7 g/l de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos o sulfato amónico (DIFCO), 5 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 g/l de glucosa, 20 g/l de agar-agar que contiene aminoácidos para la selección basada en prototrofia de uracilo). Los transformantes se recogieron y cultivaron durante 24 horas en medio mínimo con uracilo insuficiente. El ADN plásmido se aisló de los transformantes y se analizó por análisis de digestión de restricción para confirmar la identidad.

Se utilizó un transformante consolidado para inocular 2 ml de medio mínimo con uracilo insuficiente y se cultivó durante la noche a 30°C en un agitador orbital. Se utilizó una alícuota de 100 μl de este cultivo para inocular 100 ml de medio YPD (Wobbe, C. R., en *Current Protocols in Molecular Biology*, suplemento 34:13.0.1-13.13.9 (Wiley, 1996)) (10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 20 g/l de glucosa) y el cultivo se cultivó a 30°C en un agitador.

Se recogieron las células por centrifugación de alícuotas de 500 μl del cultivo extraídas después de 18 y 36 horas de cultivo y lisadas por ebullición en 50 μl de 2 $\times$ tampón de carga de gel SDS durante 2 minutos.

Se analizaron los lisados celulares cargando en 12% de geles SDS-PAGE. Una banda correspondiente al tamaño esperado de 6-MSAS se observó a aprox. 190 kD.

Ejemplo 3

Construcción de un vector de expresión de holo ACP sintasa

El gen *sfp* de *Bacillus subtilis* codifica una holo ACP sintasa, es decir, una fosfopantotenoil transferasa, y se inserta en el plásmido YepFLAG-1 (IBI/Kodak).

El fragmento de restricción *PacI/NotI* de 5,7 kbp de YepFLAG-1 se ligó con un polienlazador sintético para introducir las siguientes secuencias de restricción:

(PacI) - BamHI - NotI - NcoI - RsrII - XhoI SalI - (NotI).

Las secuencias de ligadura originales *PacI* y *NotI* se destruyeron en la ligadura. El vector resultante se cortó con *BamHI* y *SalI* y se ligó a 43d2 y se digirió con *BamHI/XhoI* (véase el Ejemplo 1) para introducir el activador/terminador ADH2, obteniendo de este modo el plásmido 126b. El gen *sfp* de *Bacillus subtilis* se amplió a partir del plásmido pUC8-sfp (Nakano, M. *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* (1992) 232:313-321) por PCR utilizando los cebadores:

transcrito: TAGACACATATGAAGATTTACGGAATTTATATG

complementario: TACATTCTAGAAATTATAAAAGCTCTTCG.

El cebador transcrito introduce una secuencia de restricción *NdeI* (nucleótidos 7 a 12) y el cebador complementario introduce una secuencia *XbaI* (nucleótidos 6 a 11).

El fragmento de PCR resultante se ligó en las secuencias *NdeI* y *XbaI* de 43d2 para producir el plásmido 109c.

El fragmento de restricción *BamHI/SalI* de 1,3 kbp de 109c se ligó a 126b digerido con *BamHI/SalI* para producir el vector de expresión 128a que contiene el gen *sfp* bajo control de las secuencias ADH y de prototrofia de triptófano como marcador de selección.

Ejemplo 4

Producción de ácido 6-metilsalicílico en levadura

Células InvSci1 competentes de *Saccharomyces cerevisiae* se transformaron con 102d (6 MSAS) y 128a (*sfp* holo ACP sintasa). Se utilizó 128a en la primera transformación con selección para prototrofia de triptófano; las células transformadas consolidadas se transfectaron a continuación con 102d, con selección para triptófano y prototrofia de uracilo. Los transformantes aparecieron después de 48 a 72 horas a 30°C.

Se cultivaron colonias aisladas de 6-MSAS/*sfp* transformables 24 a 48 h a 30°C en medio mínimo con triptófano y uracilo insuficientes, tras lo cual se utilizaron 100 μl para inocular 10 ml de medio YPD. Los cultivos se cultivaron durante 18 h a 30°C en un agitador orbital a 225 rpm. Se inoculó medio YPD (50 ml) con 0,5 ml de los cultivos

de la noche y se incubó a 30°C durante 142 h. Se eliminaron alícuotas de 1 ml periódicamente y se recogieron las células por centrifugación. Se pusieron en suspensión las células en tampón de carga SDS-PAGE, se hirvieron durante 2 min. y se sometieron a SDS-PAGE para determinar la producción de la proteína PKS. Se analizó en los sobrenadantes la producción de ácido 6-metilsalicílico mediante inyección de 20 μ l en HPLC (columna C18 en fase inversa, gradiente agua/acetonitrilo/ácido acético, detección UV de red de diodos). Los parámetros de LC fueron los siguientes: disolvente A = ácido acético al 1% en agua; disolvente B = ácido acético al 1% en acetonitrilo; gradiente: 20% B a 80% B en 30 min. después a 100% en 2 min.; caudal = 0,5 ml/min. La cantidad de ácido 6-metilsalicílico (6-MSA) se cuantificó por integración del pico a 307 nm. Se generó una curva patrón utilizando ácido 6-metilsalicílico auténtico (Seidel, J. L., *et al.*, *J. Chem. Ecology*, (1990) 16:1791-1816).

En la Figura 7 se presentan los resultados de un experimento típico. La levadura que contenía solamente el plásmido de referencia 101c o el plásmido de referencia y el plásmido de expresión 128a de *sfp* no produjo 6-MSA (líneas b y d). La levadura que contiene solamente el vector de expresión 102d de 6-MSA produjo una cantidad apenas detectable de 6-MSA (línea c). La levadura que contiene tanto el vector de expresión 102d de 6-MSA como el vector de expresión 128a de *sfp* produjo como mucho 1,7 g/l de 6-MSA (línea a).

La cinética para el cultivo de levadura y la producción de 6-MSA para el transformante se presentan en la Figura 8A. Como se muestra, los cuadrados blancos representan el cultivo medido por DO₆₀₀. Los rombos blancos representan la producción de 6-MSA en g/l. La producción de 6-MSA comienza cuando la glucosa se agota constantemente, con desrepresión del activador ADH2. Se alcanzó estabilización después de aproximadamente 60 h de cultivo y permaneció constante hasta 150 h.

Para la preparación de 6-MSA a gran escala, un cultivo de levadura de 500 ml que alberga los dos plásmidos se cultivó durante 120 h y las células se eliminaron por centrifugación. El caldo de cultivo sobrenadante (280 ml) se acidificó con 28 ml de HOAc glacial, a continuación se extrajo con 280 ml de acetato de etilo. El extracto orgánico se concentró a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cristalización en agua y los cristales se secaron al vacío sobre KOH. La identidad de 6-MSA se confirmó por RMN y espectrometría de masas. En el experimento específico descrito anteriormente, los 280 ml de cultivo de levadura exento de células dieron 240 mg de 6-MSA como agujas cristalinas. Los cultivos del matraz agitados produjeron típicamente más de 1 g/l de ácido 6-metilsalicílico.

Ejemplo 5

Construcción del vector de expresión DEBS módulo 6 KR-ACP-TE, plásmido 104

Se construyó el plásmido 90, que contiene un activador T5, 2 operadores lac y lac^{lq} ligando un fragmento *XhoI/XbaI* de 1,1 kbp de pQE60 (Qiagen) al fragmento mayor *XhoI/XbaI* de pET22b(+) (Novagen). Un fragmento de restricción *PstI/EcoRI* que contiene el módulo 6 KR-ACP-TE que codifica el ADN se ligó al plásmido 90 para dar el plásmido 104, vector de expresión para este módulo.

Ejemplo 6

Fosfopantotenoilación del módulo 6 KR-ACP-TE

A. In vivo

SJ16 de *Escherichia coli* auxótrofa de β -alanina (*E. coli* Genetic Stock Center), se cotransformó con 104 y un plásmido de expresión de holo-ACP sintasa que contiene genes para:

Ácido graso sintasa holo-ACPS (ACPS) de *E. coli*;

enterobactina sintetasa holo-ACPS (EntD) de *E. coli*,

o

gramicidina sintetasa holo-ACPS (GsP) de *Bacillus brevis*.

Los plásmidos de expresión holo-ACPS fueron donaciones generosas del Dr. Daniel Santi, UCSF (Ku, J., *et al.*, *Chemistry & Biology* (1997) 4:203-207).

Cada cotransformante se cultivó en medio E mínimo (Vogel, H. J. *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1956) 218:97-106) enriquecido con tiamina al 0,001%, metionina al 0,01% y β -alanina 100 μ M a 37°C durante 20 h. Se recogieron las células por centrifugación y se lavaron con 1 ml de medio de cultivo sin β -alanina. Este lavado se repitió cuatro veces. Por último, se incubaron las células en 1 ml de medio de cultivo sin β -alanina a 37°C durante 6 h.

Una alícuota de 30 μ l de las células privadas de alimento se añadió a 1 ml de medio de cultivo enriquecido con [3H]- β -alanina 0,52 μ M (1 μ Ci, American Radiolabeled Chemicals, Inc.). Después de 6 h a 37°C, se provocaron las células por adición de IPTG a 1 mM, se mantuvieron durante unas 3 h. más a 37°C y se centrifugó. El sedimento

celular se hirvió en tampón de carga de gel SDS, a continuación se analizó en un gel de SDS-PAGE al 10%. El gel se tiñó con Coomassie Blue, se fotografió, se buscó en Amplify (Amersham), se secó y se autorradiografió utilizando película Bio-MAX de Kodak durante 2 días.

El fragmento del módulo 6 KR-ACP-TE de DEBS se marcó de manera eficaz durante la coexpresión con GsP y con EntD, aunque no se observó ningún marcado durante la coexpresión con ACPS. La incapacidad de ACPS para activar el fragmento de DEBS es de esperar basándose en la inactividad conocida y la falta de fosfopentotenoilación de la proteína de DEBS cuando se expresa en *E. coli* (Roberts *et al.*, *Eur. J. Biochem.* (1993) 214:305-311).

B. *In vitro*

El fragmento del módulo 6 KR-ACP-TE de DEBS se purificó en *E. coli* transformado con p104 utilizando una columna de afinidad con Ni^{+2} siguiendo las directrices del fabricante (Invitrogen). Surfactina sintetasa holo-ACPS purificada (sfp) de *Bacillus subtilis* fue una donación del Dr. Christopher Walsh (Harvard Medical School). La 3H-coenzima A marcada fue una donación del Dr. Daniel Santi (UCSF).

Todos los análisis fueron realizados en MgCl_2 10 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 8,8), en un volumen total de 100 μl , y contenían 40.000 cpm de 3H-coenzima A y sfp 0,39 μM . Una referencia positiva contenía el dominio PheAT 1,8 μM de gramicidina sintetasa (Dr. Daniel Santi, UCSF), que está normalmente pantotenoilado por sfp. Las reacciones se mantuvieron 12 h a 37°C, a continuación se hirvieron en tampón de carga de gel SDS y se analizaron en un gel SDS-PAGE al 10%. El gel se tiñó con Coomassie Blue, se fotografió, se buscó en Amplify (Amersham), se secó y se autorradiografió utilizando película Bio-MAX de Kodak durante 2 días.

Tanto PheAT como el fragmento del módulo 6 KR-ACP-TE de DEBS se marcaron eficazmente con sfp.

Ejemplo 7

Producción de ácido 6-metilsalicílico en Escherichia coli

El plásmido 90 (véase el Ejemplo 5) se convirtió en p95 insertando un enlazador entre el *EcoRI/HindIII* en el plásmido 90 a fin de introducir las secuencias de restricción *NdeI* y *SpeI* adyacentes al activador T5. Se construyó el vector de expresión 109 de 6-MSAS, ligando un fragmento *NdeI/XbaI* que contiene el marco de lectura abierto de 6-MSAS (Pfeifer, E. *et al.*, *Biochemistry* (1995) 34:7450-7459) con el fragmento grande *NdeI/SpeI* de 95 dejando aproximadamente 1 kbp del enlazador entre las secuencias *SpeI* y *HindIII* del vector.

Se preparó el vector de expresión de sfp, 108, ligando un fragmento de restricción *EcoRI/PvuII* de 1,1 kbp de pUCB-sfp (véase el Ejemplo 3) a pACYC-184 (New England Biolabs) cortado con *EcoRV* después completado con la secuencia *EcoRI* por ADN polimerasa I. La orientación del gen sfp con respecto al activador fue verificada por digestión con *HindIII*.

Los plásmidos 108 y 109 se cotransformaron en C2453 de *E. coli* y los transformantes se seleccionaron por resistencia a cloranfenicol y ampicilina. Se cultivó una colonia aislada que contiene ambos plásmidos en medio 765 de ATCC enriquecido con glicerol al 10% a 37°C hasta una densidad de DO_{600} 1,0, a continuación se enfrió a 30°C y se provocó por adición de IPTG 0,5 mM. Se continuó el cultivo celular durante 36 h. a 30°C. Se comprobó la expresión proteica mediante gel SDS-poliacrilamida al 10%. La formación del ácido 6-metilsalicílico fue seguida por análisis de HPLC del caldo de cultivo.

La concentración de 6-MSA fue estimada como se describe en el Ejemplo 4 a partir de un diagrama de concentración frente al área integrada del pico de la HPLC correspondiente utilizando una muestra auténtica. La identidad del producto fue confirmada por LC-espectroscopía de masas, que puso de manifiesto $[\text{M}+\text{H}]^+ = 153$, con un fragmento principal a $m/z = 135$ correspondiente a la pérdida de H_2O . En estas condiciones, el cultivo produjo 50 mg/l de ácido 6-metilsalicílico.

La producción de 6-MSA en *E. coli* dependía de la presencia del plásmido que codifica la proteína sfp. *E. coli* transformado con solamente el vector de expresión de 6-MSAS, 109, cuando se provoca con IPTG seguido de incubación a 37°C durante 4 h., presentó la producción de 6-MSAS de aproximadamente 190 kD en aproximadamente 5% de proteína total. Sin embargo, la mayor parte de la proteína era insoluble y no se detectó 6-MSA en el medio. Cuando la SJ16 de *E. coli* auxótrofa de β -alanina que contiene el vector de expresión 109 de 6-MSAS se incubó con β -alanina marcada antes y después de la inducción, no se encontró radioactividad en la banda de 6-MSAS en SDS-PAGE; de este modo, parece que 6-MSAS no fue modificado con el cofactor fosfopantoteínico por la transferasa endógena. En un experimento similar que implica SJ16 de *E. coli* cotransformado con ambos plásmidos 108 y 109, se encontró una cantidad detectable de radioactividad en la banda de 6-MSAS de 190 kD; sin embargo, no se detectó 6-MSA en estas condiciones. No obstante, cuando la temperatura de incubación se redujo para activar el plegamiento de la proteína apropiada y se añadió glicerol al medio para aumentar las concentraciones de sustrato intracelular malonil CoA, se mejoró la producción de 6-MSA. De este modo, cuando se cultivaron las células a 30°C en ausencia de glicerol o a 37°C en presencia de glicerol al 10%, no se produjo 6-MSA. Sin embargo, cuando se cultivó como se describió anteriormente a 30°C en presencia de glicerol al 10%, se produjo 6-MSA hasta aproximadamente 75 mg/l después de 24 h. de incubación. En la Figura 8B se presentan las cinéticas de producción.

Ejemplo 8

Producción de ácido 6-metilsalicílico en Saccharomyces cerevisiae utilizando una proteína de fusión PKS-holo ACP sintasa

Se preparó una proteína de fusión entre la ácido 6-metilsalicílico sintasa (6-MSAS) de *Penicillium patulum* y la surfactina holo ACP sintasa (sfp) de *Bacillus subtilis* de la forma siguiente:

Se ligó un fragmento *NdeI/HindIII* de 5,3 kbp que contiene el gen de 6-MSAS (véase el Ejemplo 1) con un fragmento *HindIII/XbaI* de 708 bp que contiene el gen sfp (véase el Ejemplo 3) y con 43d2 restringido por *NdeI/XbaI* (véase el Ejemplo 1) para producir el plásmido 69 intermedio. Un fragmento de restricción *NotI/RsrII* de 6 kbp de 69 se ligó con 101c restringido por *NotI/RsrII* (véase el Ejemplo 1) para dar el vector de expresión de levadura 26a1 (véase el Ejemplo 1). Este vector contiene el gen de fusión 6-MSAS/sfp entre el par activador/terminador ADH2.

La proteína de fusión resultante consistía en conectar la lisina C-terminal de 6-MSAS con la metionina N-terminal de sfp utilizando un enlazador de (alanina)₃, de modo que la secuencia de ADN del gen en la zona de la fusión era:

5' - AAGCTTGCCAAA-GCCGCCGCC-ATGAAGATTTAC-3'

en la que los codones de lisina y metionina están subrayados.

La transformación de InvSc1 de *S. cerevisiae* con 26a1 y el cultivo como se describe en el Ejemplo 3 dio como resultado la producción de ácido 6-metilsalicílico a una concentración comparable con la procedente de la expresión de 6-MSAS y sfp como genes separados. La proteína de fusión combina de este modo las actividades enzimáticas de 6-MSAS y de sfp, se fosfopantotenoila y produce el producto policetida.

Esto resulta especialmente útil para la transformación de hospedadores cuando el número de replicones del plásmido utilizables para los vectores de expresión es limitado, cuando los mensajes policistrónicos no se procesan de manera adecuada o cuando la transformación con múltiples vectores es difícil y/o dura mucho tiempo.

Ejemplo 9

Producción de 6-desoxieritronolida B por sistemas de expresión cromosómico/de plásmido mezclados en Streptomyces lividans utilizando integración cromosómica

Para demostrar la viabilidad de dividir los tres genes de DEBS entre sistemas de expresión cromosómicos y de plásmido, se llevaron a cabo dos experimentos. En ambos experimentos, se utilizó el vector de integración pSET152 (Bierman, M., *et al.*, *Gene* (1992) 116: 43-49) para colocar un gen del grupo del gen de DEBS bajo control del activador actinorhodina en el cromosoma de *Streptomyces* en el punto de unión al fago. Los genes restantes se colocaron en el plásmido de replicación, pRM5 (McDaniel *et al.*, *Science* (1993) 262:1546-1550), también bajo control del activador actinorhodina.

A. El gen *eryAIII* (que codifica los módulos 5 y 6 y la tioesterasa de DEBS) bajo control del activador actinorhodina se clonó en pSET152. Se utilizó el vector resultante para transformar K4-114 de *S. lividans*, cepa en la que se ha eliminado el gen de actinorhodina por recombinación homóloga por métodos normalizados (solicitud de patente U.S. n° 08/238.811). Se seleccionaron transformantes resistentes a apramicina.

Se construyó un plásmido de expresión clonando los genes *eryAI* y *eryAII* (que contienen los módulos 1+2 y 3+4, respectivamente) en las secuencias *PacI/EcoRI* de pRM5 de modo que los dos genes estaban bajo el control del activador actinorhodina. Este plásmido se utilizó para transformar protoplastos del clon de *S. lividans* que contienen el gen integrado *eryAIII* y se seleccionaron las colonias resistentes tanto a tioestreptona como a apramicina.

B. Alternativamente, el activador actinorhodina y el gen *eryAI* se clonaron en pSET152 y ulteriormente se integraron en el cromosoma de *S. lividans*. Los genes *eryAII* y *eryAIII* se clonaron en pRM5 detrás del activador actinorhodina, y este plásmido se utilizó para transformar la cepa de *S. lividans* que contiene el gen integrado *eryAI*.

Las colonias seleccionadas al azar de los organismos anteriores que contienen sistemas de expresión cromosómico, de plásmido mezclados se cultivaron en medio R2YE sobre resina XAD-16, y en los extractos de etanol de la resina recogidos después de 7 días se analizó la producción de 6-desoxieritronolida B por LC/espectrometría de masas. Los cultivos de ambos experimentos A y B produjeron 6-desoxieritronolida B a concentraciones entre 15 y 20 mg/l, comparables a las encontradas en extractos de cultivos de *S. lividans* que contienen pCK7, un plásmido replicante que contiene los tres genes *eryA* bajo el control del activador de actinorhodina.

Ejemplo 10

Producción de 6-desoxieritronolida B mediante sistemas de expresión cromosómicos/de plásmido mezclados en Streptomyces lividans

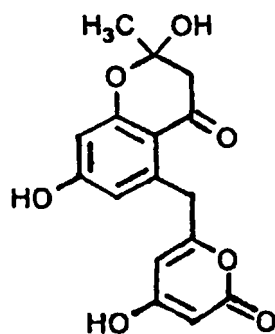
Un procedimiento alternativo para construir un sistema de expresión cromosómico-de plásmido mezclado para PKS multigen también consigue la creación simultánea de un hospedador limpio para la producción de policetida. Un hospedador de expresión adecuado, que normalmente produce un producto de policetida, tiene sus genes de PKS cromosómicos sustituidos por un subconjunto de los genes de PKS extraños por recombinación homóloga. Éste efectúa la integración cromosómica deseada de los genes de PKS extraños a la vez que elimina simultáneamente la interferencia del PKS natural y la competencia por el mismo. El ejemplo se ilustra fácilmente para *S. coelicolor* y *S. lividans*, los cuales construyen la policetida actinorhodina azul.

Se ha descrito un procedimiento mediante el cual el grupo del gen actinorhodina completo se elimina de estos organismos y se sustituye por un marcador antibiótico por recombinación homóloga (solicitud de patente U.S. nº 08/238.811). Este método se adapta de la manera siguiente: El vector de recombinación está constituido por cualquier vector de generar ADN monocatenario (p. ej., pBlueScript) que contiene los elementos siguientes: 1) una secuencia de ADN homóloga al extremo 5' de 1 kbp del grupo act; 2) un marcador con resistencia (p. ej., a higromicina o tioestreptona); 3) el gen activador act 11-orf4; 4) el activador act; 5) uno o más genes del PKS extraño; y 6) una secuencia de ADN homóloga a la del extremo 3' de 1 kbp del grupo act. La transformación de *S. coelicolor* o *S. lividans* con el vector de recombinación seguida por selección para resistencia a la higromicina e identificación por pérdida del color azul proporciona un hospedador que carece del gen de actinorhodina y que contiene una copia cromosómica de los genes PKS extraños junto con los necesarios elementos para control de actinorhodina. Este hospedador es transformado ulteriormente por vectores replicantes (p. ej., plásmidos basados en SCP2*) y/o con vectores de fago integradores (p. ej., pSET152) que contienen otros genes del PKS extraño para completar la serie de genes PKS y producir producto de policetida.

Ejemplo 11

Construcción de vectores de levadura para la expresión de una PKS mínima aromática

Los genes que codifican la proteína bifuncional KS/AT y el gen CLF de la actinorhodina PKS (en el diagrama de la Figura 5) se amplían y se adaptan por PCR y se clonan en el vector de expresión pYEura3 de levadura (Clontech) bajo el control de los activadores Gal1 y Gal10, respectivamente. El gen ACP se amplía y se clona junto con el gen holo-ACP sintasa, si es necesario, en un plásmido procedente del pYEura3 por sustitución del gen Ura3 con el gen Leu2-d. La expresión es conducida también por los activadores Gal1 y Gal10, respectivamente. La cepa BJ2168 de levadura se transforma conjuntamente con estos plásmidos y también con el plásmido 128a (véase Ejemplo 3) y los transformantes seleccionados en placas con uracilo y leucina insuficientes por métodos normalizados. La expresión es provocada por el cultivo en galactosa al 2% según las instrucciones del fabricante. La policetida producida por este sistema de síntesis se prevé que sea



Ejemplo 12

Construcción de vectores de levadura para la expresión de actividades de sintasa modular

Se construyen dos vectores. Uno contiene el supuesto sistema de dos módulos de espiramicina bajo control del activador ADH-2 y colineal con el dominio de tioesterasa de la eritromicina PKS. El montaje de la secuencia de codificación se manipula genéticamente para que esté flanqueado por una secuencia *NdeI* en el codón de iniciación y una secuencia *NsiI* después del codón de terminación; este montaje se clona utilizando enlazadores oligonucleotídicos sintéticos en pYT.

En el segundo vector, la estructura análoga del sistema eritromicina PKS flanqueado por las secuencias *NdeI* y *NsiI*, como describen Kao, C. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* (1995) 117:9105-9106, se clona en pYT a fin de colocarse bajo el control del activador ADH-2. La Figura 9 presenta la parte de expresión aplicable de estos vectores y los productos de policetida esperados.

REIVINDICACIONES

1. Célula huésped recombinante modificada, que, en forma no modificada, no produce policetidas, cuya célula se modifica para contener un sistema de expresión para una policetida sintasa (PKS) mínima y un sistema de expresión para una holo ACP sintasa,

comprendiendo dicha PKS mínima una zona catalítica cetosintasa/acil transferasa (KS/AT), una zona catalítica del factor de longitud de la cadena (CLF) y una actividad de la proteína portadora de acilo (ACP) para una PKS aromática; o

dicha PKS mínima que comprende una zona catalítica KS, una zona catalítica AT y una actividad de ACP para una PKS modular o una PKS micótica.

2. Célula modificada según la reivindicación 1 que es *E. coli* o levadura.

3. Célula modificada según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha PKS es la sintasa para el ácido 6-metil salicílico.

4. Célula modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la secuencia nucleotídica que codifica dicha holo ACP sintasa y la secuencia nucleotídica que codifica por lo menos una parte de dicha PKS mínima se fusionan a fin de codificar una proteína de fusión.

5. Célula modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el sistema de expresión para dicha PKS mínima y dicho sistema de expresión para dicha holo ACP sintasa están presentes en vectores independientes.

6. Célula modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho sistema de expresión está integrado en el cromosoma de la célula huésped.

7. Procedimiento para producir una policetida, cuyo procedimiento comprende cultivar las células de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en condiciones en las que dichos sistemas de expresión producen las proteínas codificadas y en las que se sintetiza dicha policetida.

8. Célula huésped recombinante modificada que contiene bien

a) por lo menos dos vectores; conteniendo dicho primer vector un primer marcador seleccionable y un primer sistema de expresión y conteniendo dicho segundo vector un segundo marcador seleccionable y un segundo sistema de expresión y opcionalmente vectores adicionales que contienen marcadores seleccionables adicionales y sistemas de expresión en los que dichos sistemas de expresión contenidos en dichos vectores son eficaces para producir por lo menos una policetida sintasa (PKS) mínima; o

b) por lo menos un vector y un cromosoma modificado, conteniendo dicho vector un primer marcador seleccionable y un primer sistema de expresión y conteniendo dicho cromosoma modificado un segundo sistema de expresión y opcionalmente vectores adicionales que contienen marcadores seleccionables adicionales y sistemas de expresión en los que dichos sistemas de expresión contenidos en dichos vectores en combinación con dicho sistema de expresión en dicho cromosoma son eficaces para producir por lo menos una PKS mínima;

comprendiendo dicha PKS mínima una zona catalítica cetosintasa/aciltransferasa (KS/AT), una zona catalítica de factor de longitud de cadena (CLF) y una actividad de la proteína portadora de acilo (ACP) para una PKS aromática; o

dicha PKS mínima que comprende una zona catalítica KS una zona catalítica AT y una actividad de ACP para una PKS modular,

en la que la célula se modifica más para contener un sistema de expresión recombinante para una holo ACP sintasa y en la que la célula, en forma no modificada, no produce policetidas.

9. Célula según la reivindicación 8, que es una célula de levadura, una célula de *E. coli*, una célula de actinomiceto o una célula vegetal.

10. Célula según la reivindicación 8 ó 9, que contiene asimismo un sistema de expresión para un sistema de detección a base de células para una policetida funcional.

11. Célula de la reivindicación 8 ó 9 que produce por lo menos una PKS aromática mínima y que contiene:

(a) un primer vector que comprende un primer marcador seleccionable y un sistema de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una zona catalítica KS/AT funcionalmente unida a un activador que puede funcionar en dicha célula;

(b) un segundo vector que comprende un segundo marcador seleccionable y un sistema de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una zona catalítica CLF funcionalmente unida a un activador operable en dicha célula; y

5 (c) un tercer vector que comprende un tercer marcador seleccionable y un sistema de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una actividad de ACP funcionalmente unida a un activador que puede funcionar en dicha célula.

12. Célula de la reivindicación 8 ó 9 que produce por lo menos una PKS modular mínima y que contiene:

10 (a) un primer vector que contiene un primer marcador seleccionable y un sistema de expresión para por lo menos un módulo de una policetida sintasa (PKS) funcionalmente unida a un activador que puede funcionar en dicha célula; y

15 (b) un segundo vector que contiene un segundo marcador seleccionable y una secuencia nucleotídica que codifica por lo menos un segundo módulo de una policetida sintasa funcionalmente unida a un activador operable en dicha célula.

20 13. Célula según la reivindicación 12, en la que dicho primer y segundo módulo proceden de diferentes policetida sintasas.

14. Célula según la reivindicación 13, en la que dicha secuencia nucleotídica que codifica por lo menos un módulo contiene asimismo una secuencia nucleotídica que codifica una actividad de KR; o

25 en la que la secuencia nucleotídica que codifica por lo menos un módulo codifica una actividad de KR y DH; o

en la que dicha secuencia nucleotídica que codifica por lo menos un módulo codifica una actividad de KR, DH y ER; y/o

30 en la que dicha secuencia nucleotídica que codifica por lo menos un módulo codifica una actividad de tioesterasa (TE).

35 15. Procedimiento para producir una policetida, cuyo procedimiento comprende cultivar las células según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14 en condiciones en las que dichos sistemas de expresión producen las proteínas codificadas y en las que se sintetiza dicha policetida.

16. Biblioteca de policetida sintasas PKS o de policetidas sintetizadas que comprende un panel de colonias aisladas, conteniendo cada colonia bien

40 a) por lo menos dos vectores; conteniendo dicho primer vector un primer marcador seleccionable y un primer sistema de expresión y conteniendo dicho segundo vector un segundo marcador seleccionable y un segundo sistema de expresión y opcionalmente vectores adicionales que contienen marcadores seleccionables adicionales y sistemas de expresión en los que dichos sistemas de expresión contenidos en dichos vectores son eficaces para producir por lo menos una policetida sintasa (PKS) mínima; o

45 b) por lo menos un vector y un cromosoma modificado, conteniendo dicho vector un primer marcador seleccionable y un primer sistema de expresión y conteniendo dicho cromosoma modificado un segundo sistema de expresión y opcionalmente vectores adicionales que contienen marcadores seleccionables adicionales y sistemas de expresión en los que dichos sistemas de expresión contenidos en dichos vectores en combinación con dicho sistema de expresión en dicho cromosoma son eficaces para producir por lo menos una PKS mínima;

comprendiendo dicha PKS mínima una zona catalítica cetosintasa/aciltransferasa (KS/AT), una zona catalítica de factor de longitud de cadena (CLF) y una actividad de la proteína portadora de acilo (ACP) para una PKS aromática; y

55 comprendiendo dicha PKS mínima una zona catalítica KS, una zona catalítica AT y una actividad de ACP para una PKS modular,

en la que la combinación de vectores o de vector(es) y cromosoma modificado es diferente en cada colonia, y

60 cada colonia contiene asimismo un sistema de expresión recombinante para una holo ACP sintasa,

y en la que cada colonia, en forma no modificada, no produce policetidas.

65 17. Biblioteca según la reivindicación 16, en la que dichas colonias son colonias de levadura, *E. coli*, actinomicetos o células vegetales.

18. Biblioteca según la reivindicación 16 ó 17, en la que cada colonia contiene asimismo un sistema de expresión para un sistema de detección a base de células para una policetida funcional.

19. Biblioteca según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en la que las PKS son PKS aromáticas y cada colonia contiene:

(a) un primer vector que comprende un primer marcador seleccionable y un sistema de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una zona catalítica KS/AT funcionalmente unida a un activador que puede funcionar en dicha célula;

(b) un segundo vector que comprende un segundo marcador seleccionable y un sistema de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un dominio catalítico CLF funcionalmente unido a un activador que puede funcionar en dicha célula;

(c) un tercer vector que contiene un tercer marcador seleccionable y un sistema de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una actividad de ACP funcionalmente unida a un activador que puede funcionar en dicha célula;

en la que dicha combinación de primer, segundo y tercer vectores es diferente en cada colonia.

20. Biblioteca según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en la que las PKS son PKS modulares en el que cada colonia contiene:

un primer vector que contiene un primer marcador seleccionable y un sistema de expresión para por lo menos un módulo de una PKS funcionalmente unida a un activador que puede funcionar en dicha célula; y

un segundo vector que contiene un segundo marcador seleccionable y una secuencia nucleotídica que codifica por lo menos un segundo módulo de una policetida sintasa funcionalmente unida a un activador que puede funcionar en dicha célula;

en la que dicha combinación del primer y segundo vectores es diferente en cada colonia.

21. Biblioteca según la reivindicación 20, en la que dicha secuencia nucleotídica que codifica por lo menos un módulo contiene asimismo una secuencia nucleotídica que codifica una actividad de KR; o

en la que la secuencia nucleotídica que codifica por lo menos un módulo codifica una actividad de KR y DH; o

en la que dicha secuencia nucleotídica que codifica por lo menos un módulo codifica una actividad de KR, DH y ER; y/o

en la que dicha secuencia nucleotídica que codifica por lo menos un módulo codifica una actividad de tioesterasa (TE).

22. Procedimiento para producir una biblioteca de policetidas, cuyo procedimiento comprende cultivar las células según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21 en condiciones en las que dichos sistemas de expresión producen las proteínas codificadas y en las que se sintetizan dichas policetidas.

23. Procedimiento para identificar una policetida que se une a un receptor diana cuyo procedimiento comprende poner en contacto dicho receptor con cada uno de los miembros de la biblioteca según la reivindicación 16 en condiciones en las que pueda detectarse la unión a dicho receptor; y

detectar la presencia o ausencia de unión a dicho receptor con respecto a cada miembro, con lo cual se identifica un miembro que se une a un receptor.

24. Procedimiento para identificar una policetida funcional en un sistema de detección a base de células cuyo procedimiento comprende evaluar en cada miembro de la biblioteca según la reivindicación 16

la presencia o ausencia de señal en dicho sistema de detección a base de células, con cual se identifica una policetida funcional.

25. Célula de levadura modificada para contener:

un vector adaptado para la expresión en levadura, cuyo vector contiene un marcador seleccionable que puede funcionar en levadura, y un sistema de expresión que comprende la zona de codificación de por lo menos una actividad catalítica de policetida sintasa funcional unida funcionalmente a un activador que puede funcionar en levadura,

en la que la célula de levadura contiene asimismo un sistema de expresión recombinante para una holo ACP sintasa.

26. Procedimiento para producir una actividad de policetida sintasa, cuyo procedimiento comprende cultivar la célula de levadura según la reivindicación 25 en condiciones en las que se favorece la expresión.

ES 2 287 960 T3

27. Célula de *E. coli* modificada que contiene un vector adaptado para la expresión en *E. coli*, cuyo vector contiene un marcador seleccionable que puede funcionar en *E. coli*, y un sistema de expresión que comprende la zona de codificación de por lo menos una actividad catalítica de polietileno sintasa funcional unida funcionalmente a un activador que puede funcionar en *E. coli*,

en la que la célula de *E. coli* contiene asimismo un sistema de expresión recombinante para una holo ACP sintasa.

28. Procedimiento para producir una actividad de polietileno sintasa, cuyo procedimiento comprende cultivar la célula de *E. coli* según la reivindicación 27 en condiciones en las que se favorece la expresión.

29. Vector adaptado para la expresión en levadura, cuyo vector contiene un marcador seleccionable que puede funcionar en levadura, y un sistema de expresión que comprende la zona de codificación de por lo menos una actividad catalítica de polietileno sintasa funcional fusionada a una zona de codificación para una holo ACP sintasa funcional a fin de codificar una proteína de fusión unida funcionalmente a un activador que puede funcionar en levadura.

30. Vector adaptado para la expresión en *E. coli*, cuyo vector contiene un marcador seleccionable que puede funcionar en *E. coli*, y un sistema de expresión que comprende la zona de codificación de por lo menos una actividad catalítica de polietileno sintasa funcional fusionada a una zona de codificación para una holo ACP sintasa funcional a fin de codificar una proteína de fusión unida funcionalmente a un activador que puede funcionar en *E. coli*.

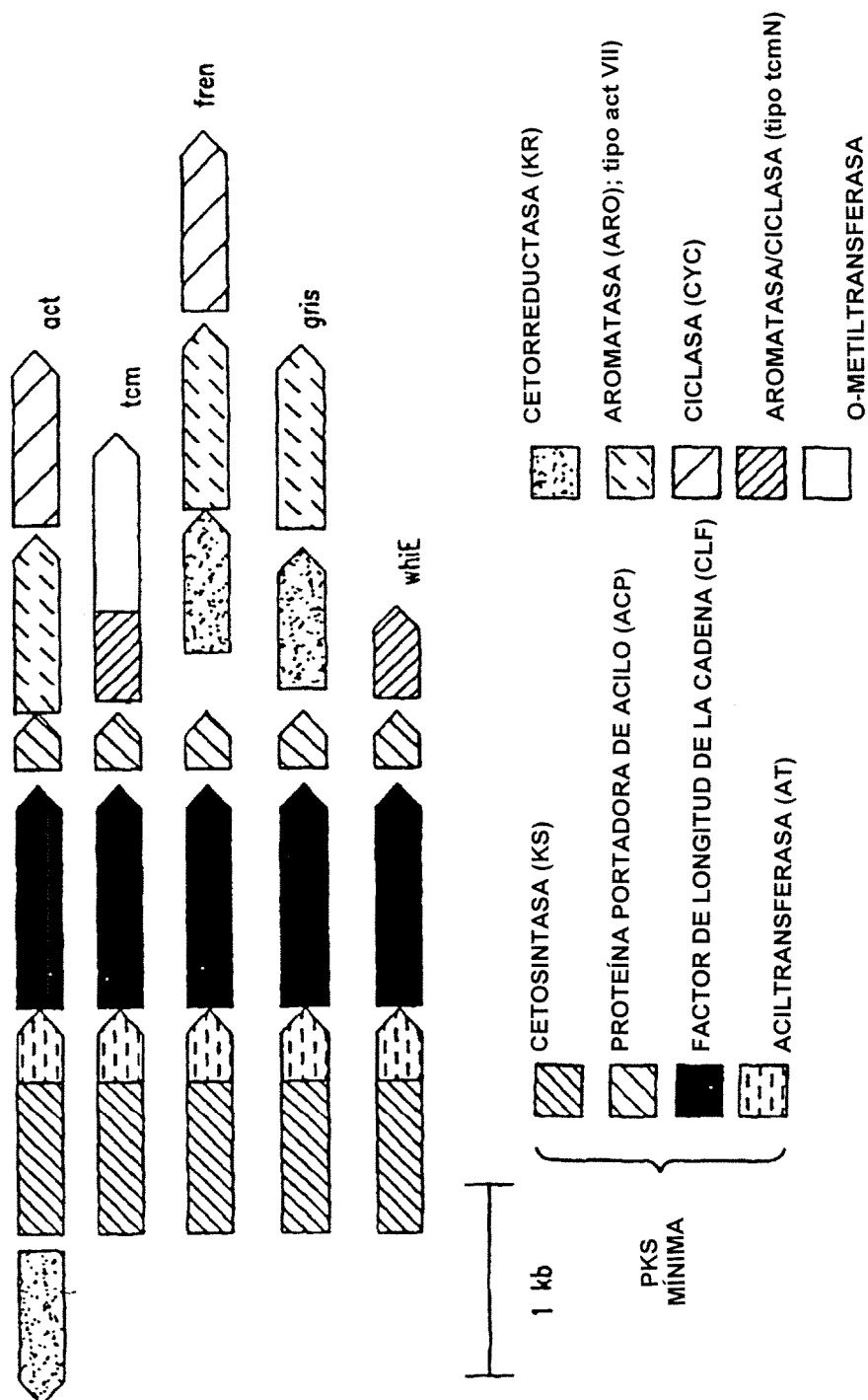


FIG. 1

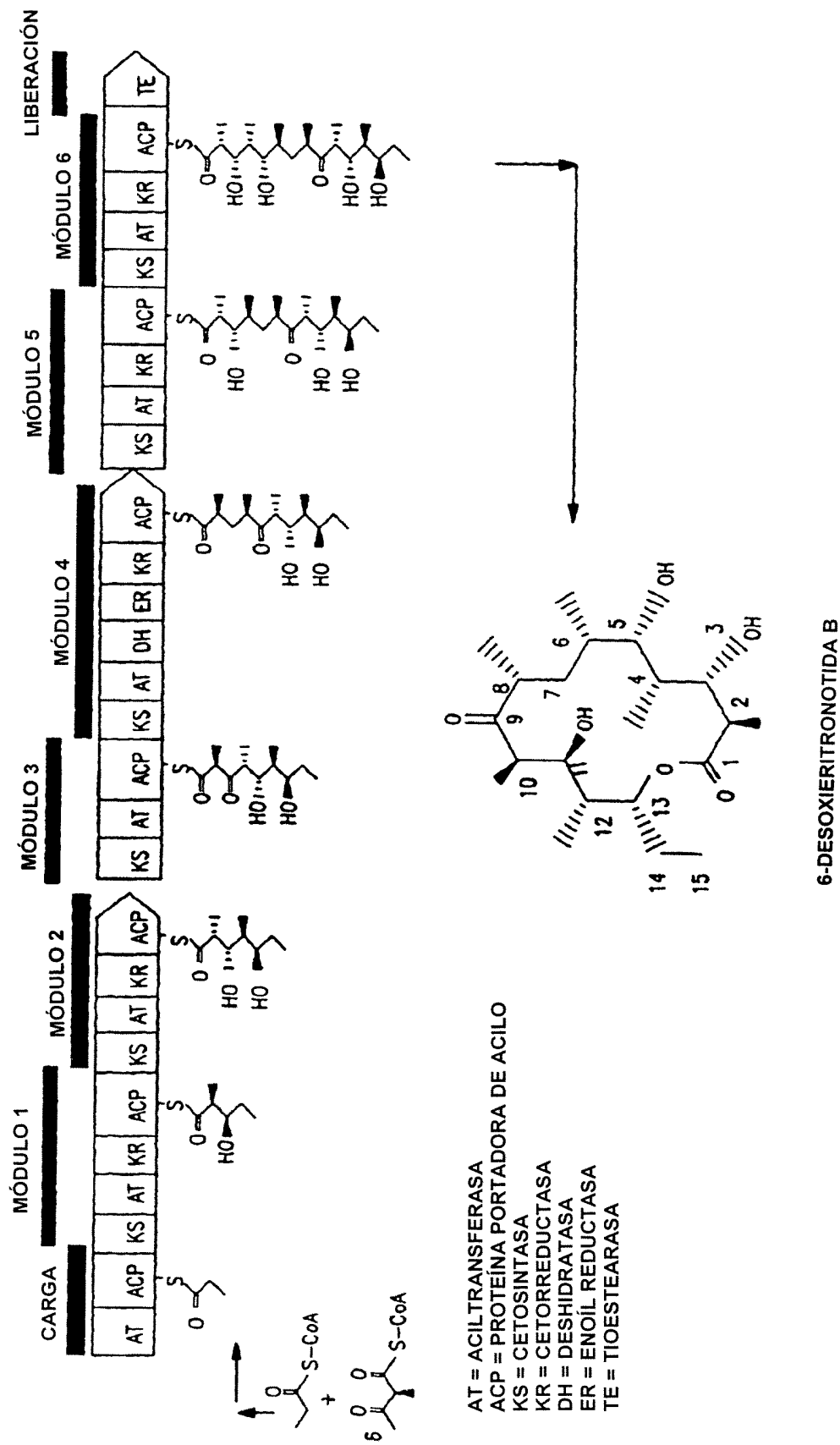


FIG. 2

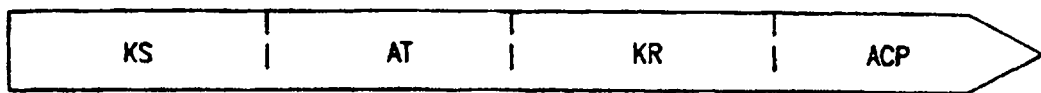


FIG. 3

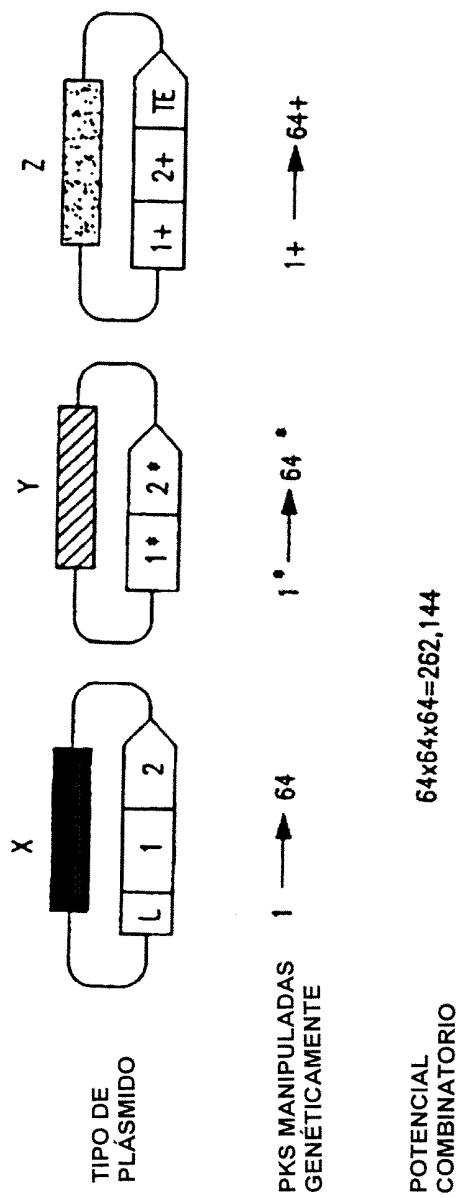


FIG. 4

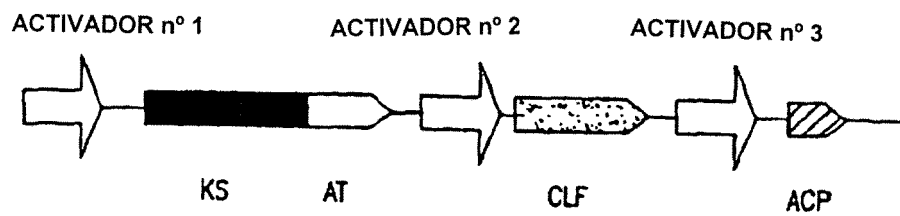


FIG. 5

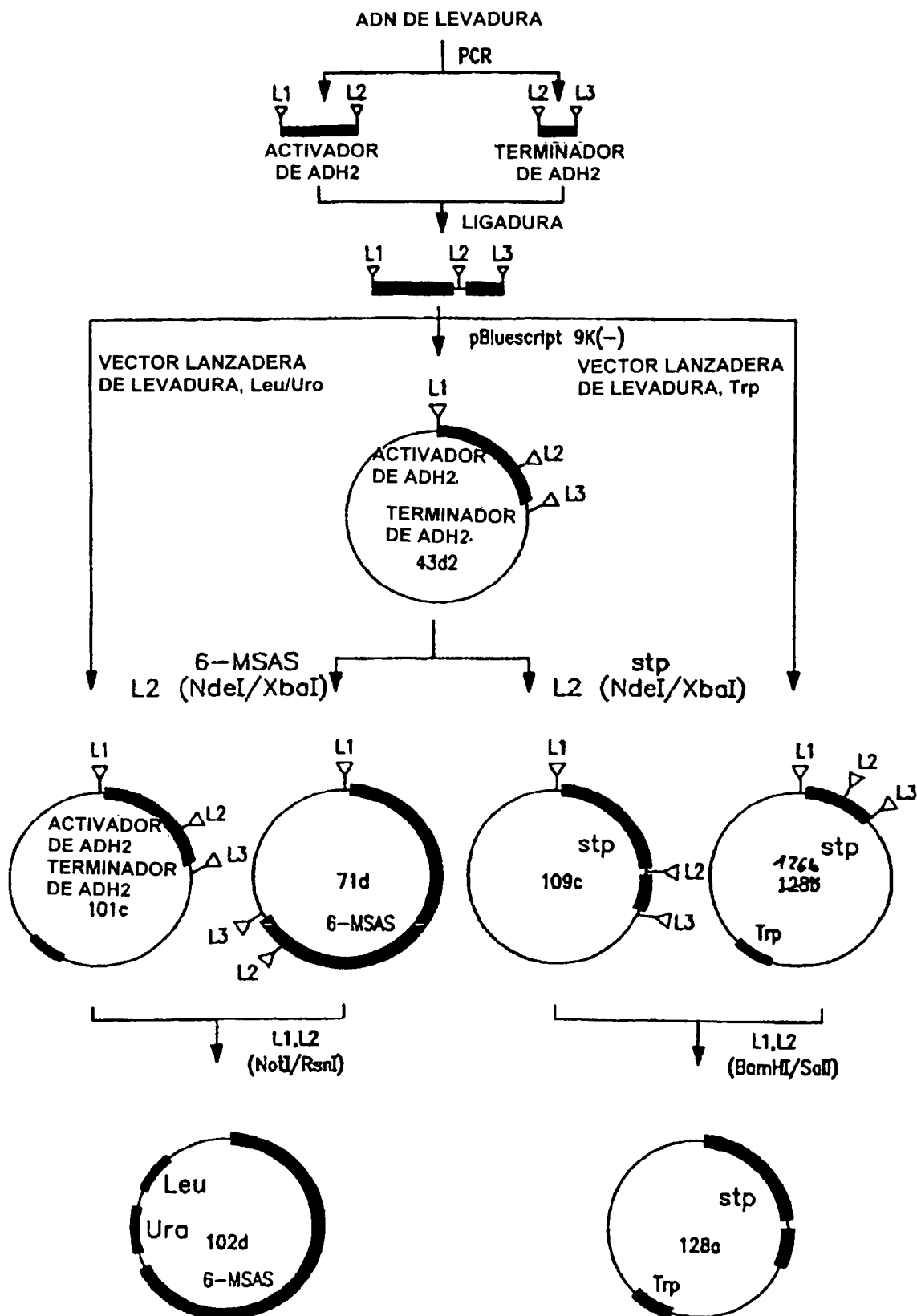


FIG. 6

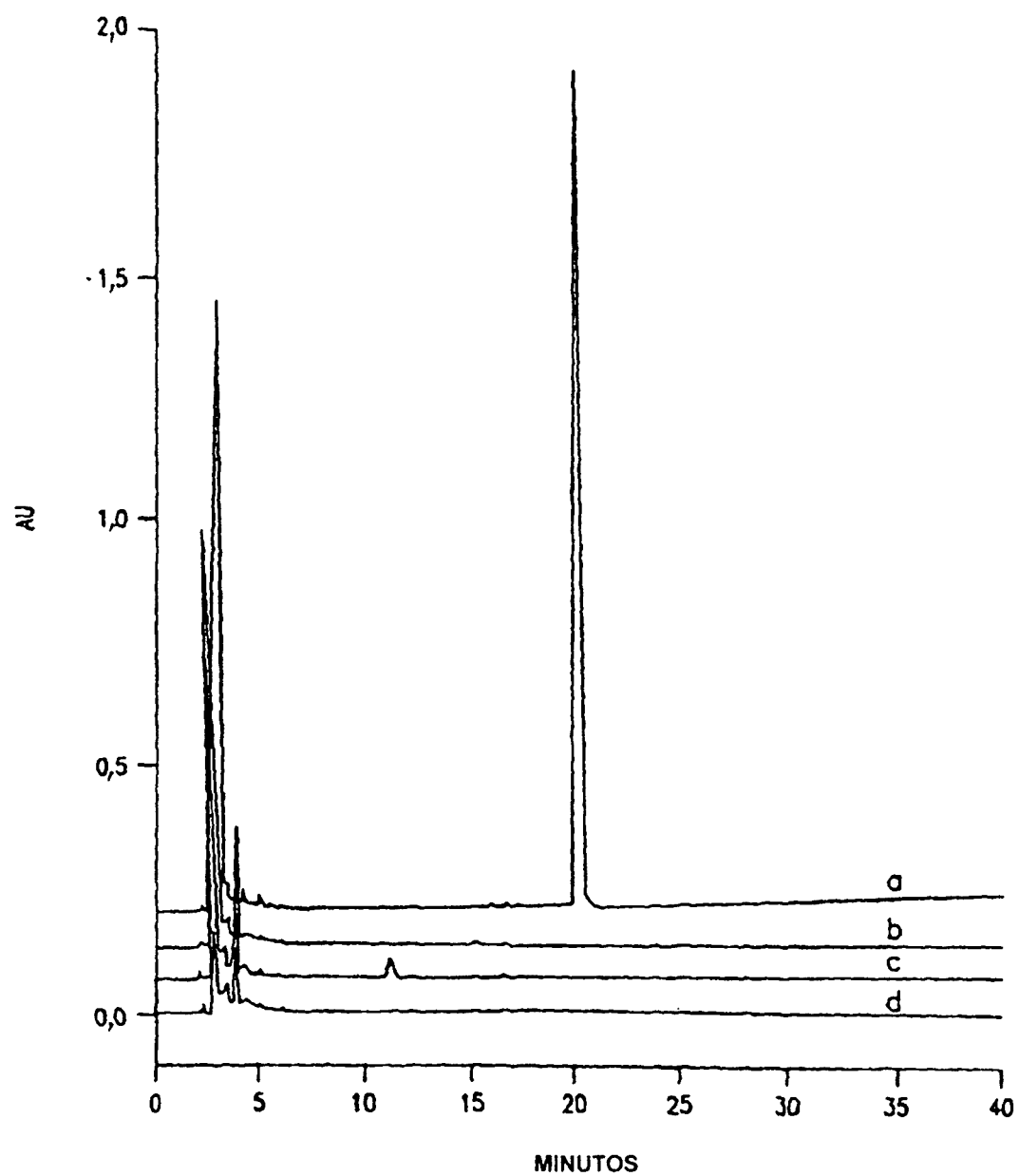


FIG. 7

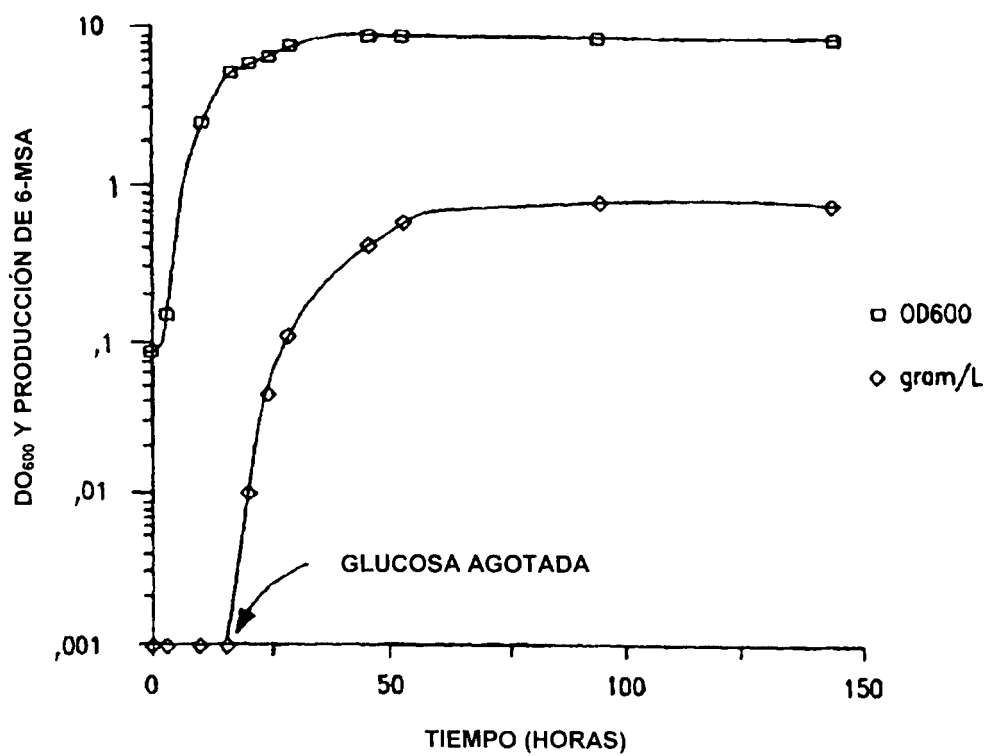


FIG. 8A

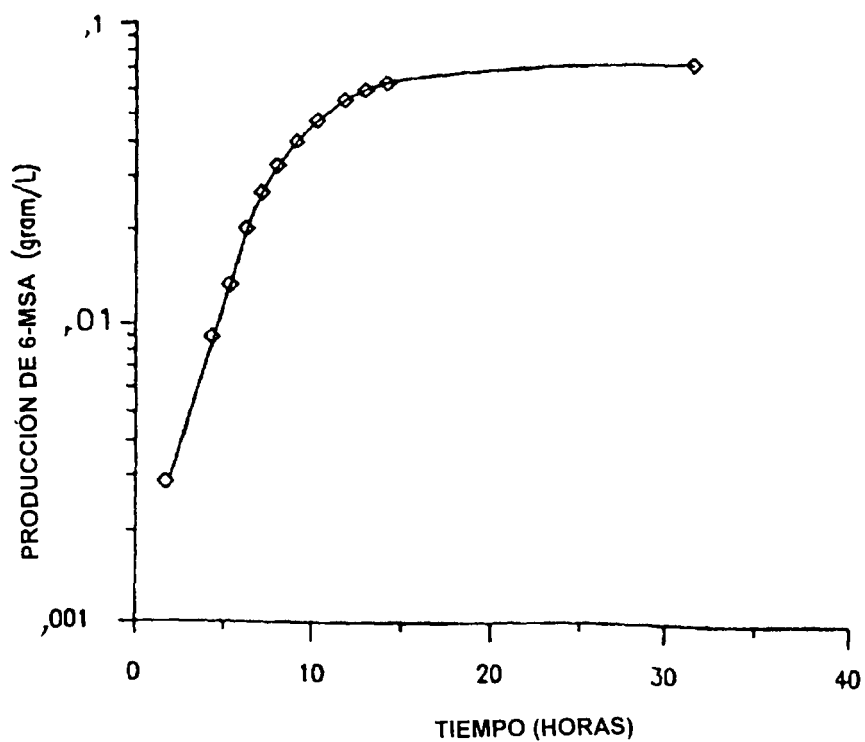


FIG. 8B



FIG. 9A

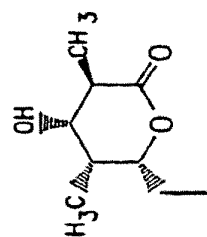
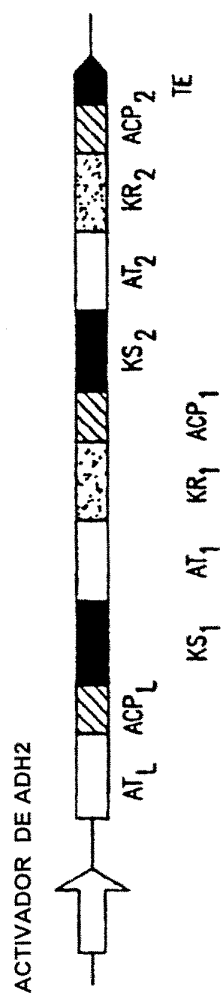


FIG. 9B