



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101983239 A

(43) 申请公布日 2011. 03. 02

(21) 申请号 200980111066. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 03. 30

C12N 9/10 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 15/74 (2006. 01)

61/040, 584 2008. 03. 28 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 09. 27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/038831 2009. 03. 30

(87) PCT申请的公布数据

W02009/121066 EN 2009. 10. 01

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 莱昂纳德·卡茨

杰弗里·L·福特曼

杰伊·D·科斯林

(74) 专利代理机构 北京泛诚知识产权代理有限

公司 11298

代理人 陈波 杨本良

权利要求书 1 页 说明书 21 页 附图 7 页

(54) 发明名称

使用聚酮化物合酶制备二元羧酸

(57) 摘要

本发明提供能够合成二元羧酸(二元酸)的聚酮化物合酶(PKS)。这种二元酸包括二酮化物-二元酸和三酮化物-二元酸。本发明包括编码所述PKS的重组核酸和包含所述PKS的宿主细胞。本发明还包括制备二元酸的方法。

1. 一种能够合成二元羧酸（二元酸）的聚酮化物合酶（PKS）。
2. 权利要求 1 所述的 PKS, 其中所述二元酸包含 1 至 10 个酮化物单元。
3. 权利要求 2 所述的 PKS, 其中所述二元酸包含 1 至 6 个酮化物单元。
4. 权利要求 3 所述的 PKS, 其中所述二元酸包含 1 至 3 个酮化物单元。
5. 权利要求 4 所述的 PKS, 其中所述二元酸是表 2A-F 和表 3A-KK 中所述的二元酸。
6. 一种编码权利要求 1-5 所述的聚酮化物合酶（PKS）的重组核酸。
7. 一种包含权利要求 6 所述的重组核酸的载体或表达载体。
8. 一种包含权利要求 6 所述的重组核酸的宿主细胞。
9. 一种包含权利要求 1-5 所述的 PKS 的宿主细胞。
10. 一种包含权利要求 7 所述的载体或表达载体的宿主细胞。
11. 权利要求 8-10 所述的宿主细胞, 其中所述宿主细胞是真核细胞。
12. 权利要求 11 所述的宿主细胞, 其中所述宿主细胞是 *Saccharomyces* 或 *Schizosaccharomyces* 属。
13. 权利要求 8-10 所述的宿主细胞, 其中所述宿主细胞是原核细胞。
14. 权利要求 13 所述的宿主细胞, 其中所述宿主细胞来自包括酵母细胞的合适的真核细胞, 例如来自 *Escherichia* 或 *Streptomyces* 属。
15. 一种制备二元酸的方法, 该方法包括: (a) 提供权利要求 8-10 所述的宿主细胞, 以及 (b) 在合适的培养介质中培养所述宿主细胞, 使得制得所述二元酸。
16. 权利要求 15 所述的方法, 还包括: (c) 从所述宿主细胞和所述培养介质中分离所述二元酸。
17. 权利要求 16 所述的方法, 还包括: (d) 使所述二元酸和二元胺反应以制得尼龙。
18. 权利要求 16 所述的方法, 还包括: (d) 使所述二元酸和二元醇反应以制得聚酯。
19. 一种组合物, 包含使用权利要求 16 所述的方法分离的二元酸和痕量残留物或污染物。

使用聚酮化物合酶制备二元羧酸

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2008 年 3 月 28 日提交的美国临时专利申请 No. 61/040, 584 的优先权, 其通过引用的方式并入本文中。

[0003] 政府支持声明

[0004] 本发明是在由美国能源部提供的合同 No. DE-AC02-05CH11231 的政府支持下进行的。政府具有本发明的某些权利。

技术领域

[0005] 本发明总体上涉及使用聚酮化物合酶制备二元羧酸。

背景技术

[0006] 二元羧酸（二元酸）是在市售聚合物（例如聚酯、聚氨酯）的生产中使用的重要化合物。例如参见图 1。二元酸己二酸 [1] 主要用作通过 [1] 和 1,6-己二胺的反应而产生的尼龙 [2] 聚酰胺的制备中的单体。聚酯（用在多种组成的织物和塑料中）通过对苯二甲酸 [3] 和二元醇（二醇）的聚合而形成, 所述二元醇（二醇）例如为乙二醇（以制备聚对苯二甲酸乙二醇酯 [4]）、丙二醇（聚对苯二甲酸 1,3-丙二醇酯 [5]）、或丁二醇（聚（邻苯二甲酸 1,4-丁二醇 [6]））。己二酸也用于多种聚酯的合成中。

[0007] 尼龙和聚酯的大规模世界范围内使用需要每年制备约 80 亿公吨的 [1] 和 150 亿公吨的 [3]。这些二元酸本身由从石油中提取的起始材料合成。一种降低对于油的较高依赖性以商业制备聚合物的方式是通过发酵法（包括使用聚酮化物合酶）来产生二元酸。

发明内容

[0008] 本发明提供能够合成二元羧酸（二元酸）的聚酮化物合酶 (PKS)。这些二元酸包括表 2A-F 和表 3A-KK 中所述的二酮化物 - 二元酸和三酮化物 - 二元酸。这些二元酸还可以是具有多于三个酮化物单元（例如 4、5、或 6、或更多个酮化物单元）的聚酮化物。这些二元酸还可以是具有多达 8、9 或 10 个酮化物单元的聚酮化物。这种二元酸包括具有官能团的聚酮化物, 所述官能团独立地包含 H、甲基、乙基、羟基或羰基。在一些实施方案中, 二元酸是具有 1、2 或 3 至多达 4、5、6、7、8、9 或 10 个酮化物单元的聚酮化物。

[0009] 本发明提供编码本发明的聚酮化物合酶 (PKS) 的重组核酸。本发明还提供包含本发明的重组核酸的载体或表达载体。本发明提供包含本发明的重组核酸和 / 或 PKS 中的任一种的宿主细胞。在一些实施方案中, 当在合适的条件下培养时, 宿主细胞能够产生二元酸, 例如表 2A-F 和表 3A-KK 中所述的二元酸。

[0010] 本发明提供制备二元酸（例如表 2A-F 和表 3A-KK 中所述的二元酸）的方法, 该方法包括: 提供本发明的宿主细胞; 以及在合适的培养介质中培养所述宿主细胞, 使得制得所述二元酸。该方法还可包括从所述宿主细胞和所述培养介质中分离所述二元酸。该方法还可包括使所述二元酸和二元胺反应以制得尼龙。可选择地, 该方法还可包括使所述二元

酸和二元醇反应以制得聚酯。

[0011] 本发明提供一种组合物,包含从制备二元酸的宿主细胞中分离的二元酸与所述宿主细胞的痕量残留物和 / 或污染物。

附图说明

[0012] 当结合附图阅读时,本领域普通技术人员将从示意性实施方案的下面描述中容易地意识到前面的方面和其他方面。

[0013] 图 1 示出在市售聚合物(例如聚酯、聚氨酯)的生产中使用二元酸的多种反应。二元酸己二酸 [1] 主要用作通过 [1] 和 1,6-己二胺的反应而产生的尼龙 [2] 聚酰胺的制备中的单体。聚酯通过对苯二甲酸 [3] 和二元醇(二醇)的聚合而形成,所述二元醇(二醇)例如为乙二醇(以制备聚对苯二甲酸乙二醇酯 [4])、丙二醇(聚对苯二甲酸 1,3-丙二醇酯 [5])、或丁二醇(聚(邻苯二甲酸 1,4-丁二醇 [6]))。

[0014] 图 2 示出用于引入聚酮化物链中的使用的模块(module)和对应的前体的类型。加载模块(Loading module)表示为 S1 和 S2。其余化合物表示使用延长剂模块 A-P 引入生长的聚酮化物链中的结构。虚线表示通过 Claisen 缩合形成的 C-C 键;键右边的原子和在虚线左边的碳原子表示由使用的模块确定的结构。R 基表示在通过模块确定的引入之前存在的酰基链。

[0015] 图 3 示出制备新型聚酰胺或新型聚酯的方案。

[0016] 图 4 示出用于生物合成衍生的二元酸的酶 PKS 体系的两个例子。

[0017] 图 5 示出构造 PKS 以证实二元酸的准备。标准参考物质 PKS(蓝色)的加载域和模块 1 结合异源 TE 域(黑色)以制备 [8]。A 中的构建体重新工程化以除去功能性 KSQ 域,从而制备 [9]。缩写见图 9 和 10 中。

[0018] 图 6 示出由交替的加载域、模块 1、模块 2 和 TE 域构成以制备 1,7-庚二酸的杂化 PKS。缩写见图 9 和 10 中。

[0019] 图 7 示出由交替的加载域、模块 1 和 TE 域构成以制备 2-甲基-1,5-戊二酸的杂化 PKS。A. 加载域含有甲基丙二酰基-特异性 AT 域(mmAT)。B. 延长剂域含有 mmAT 域。所有其他缩写见图 9 中。

[0020] 图 8 示出由 PKS 构建体制备的二和三酮化物酸,所述 PKS 构建体示出在各化学物的条件下需要的模块。所有的 PKS 具有所示的改变的加载域和延长剂域。缩写见图 9 中。(S) 和 (R) 是指由相应的模块的使用而形成的甲基或羟基的手性。

[0021] 图 9 示出在各缩合(和还原)循环(3)的末端的 pik PKS 的域组织和推荐的中间体的结构。线性多肽(Pik AI-AIV)示出为空箭头;模块被示出;域示出为球。彩色编码表示对应于用于编程的模块和域的初期聚酮化物链的链段。缩写:ACP,酰基载体蛋白;AT,酰基转移酶;DH;ER,烯酰还原酶;KR, β -酮还原酶;KS, β -酮酰基-ACP 合酶;KS^Q;缺少缩合活性但保持脱羧基活性的 KS 域;TE,硫酯酶。

[0022] 图 10. A. 由加载域构成以制备丁二酸的杂化 PKS,所述加载域含有功能性 KS^Q 域(蓝色)、单一延长剂模块(橙色)和 TE 域(黑色)。B. 和 A 中相同的 PKS 但缺少功能性 KS^Q 域,以制备戊二酸。缩写见图 9 中,不同之处在于 mAT 表示丙二酰基-特异性 AT 域。彩色方案用于表示可来自不同来源的加载域、模块 1 和硫酯酶域。

具体实施方式

[0023] 在描述本发明之前,应理解本发明并不限于所述特定实施方案,当然其可以变化。还应理解本文中使用的术语仅仅是为了描述特定实施方案,并且并非旨在限定,因为本发明的范围只受所附的权利要求书的限定。

[0024] 在提供数值的范围之处,应理解在该范围上下限之间的每个插入数值(除非文中另有明确规定,该插入数值到下限单位的十分之一)也特定地包括在内。所述范围中任何规定的数值或插入数值以及所述范围中任何其它规定数值或插入数值之间各较小的范围均包括在本发明内。以在规定的范围内任何具体的排它性限制为条件,这些较小范围的上下限可独立地包括在该小范围内或排除在外,并且包括或不包括上下限或包括其中之一的范围也包括于本发明。在规定的范围包括上下限之一或两者时,排除包括上下限之一或两者的范围也包括在本发明内。

[0025] 除非另有定义,本文所用的所有技术和科学术语均与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的意思相同。虽然任何类似或等同于文中所描述的方法和材料均可用于实践和测试本发明,现在将描述优选的方法和材料。文中提及的所有出版物均纳入本文作为参考来披露和描述与所引用的出版物有关的方法和/或材料。

[0026] 必须注意的是,除非文中另有明确规定,本文中使用和所附的权利要求中的单数形式“一个”、“一种”与“该”均包括复数对象。因此,例如,“二元酸”指包括多种这样的二元酸等。

[0027] 在阅读下面更充分地描述的本发明的细节后,本发明的这些和其他目的、优点和特征对于本领域的普通技术人员来说是显而易见的。

[0028] 聚酮化物合酶(PKS)

[0029] 本发明提供能够合成二元酸的聚酮化物合酶(PKS)。这些二元酸包括表 2A-F 和表 3A-KK 中所述的二酮化物和三酮化物。这些二元酸可以是具有多于三个酮化物单元(例如 4、5、或 6、或更多个酮化物单元)的聚酮化物。PKS 可以在宿主细胞中,或被分离或纯化。PKS 可体内(在宿主细胞中)或体外(在细胞提取物中,或在提供所有必需的化学组分或起始材料之处)合成二元酸。本发明提供使用这些体内或体外方式中的任一种来制备二元酸的方法。例如,能够合成二元酸 [9] 的 PKS 包含模块 S1 和 A(参见表 2A)。例如,能够合成二元酸 [8] 的 PKS 包含模量 S1、E 和 E(参见表 3A)。

[0030] 聚酮化物合酶(PKS)在 Claisen 缩合反应中使用短链脂肪酰基 CoA 来制备聚酮化物。和脂肪酸合酶(使用乙酰基 CoA 作为引子并且使用丙二酰基 CoA 作为延长剂单元,和迭代地使用单一模块以制备初期酰基链)不同,PKS 由离散的模块构成,其分别模块催化单一步骤的链生长。组成中的模块可彼此不同,使得总的来说,可以引入一些不同的引子(例如乙酰基 CoA、丙酰基 CoA)和延长剂,它们中的一些含有立体特异性甲基(或乙基)侧链。另外,PKS 模块并不一直还原由缩合形成的 3-羰基,而是可使其未还原(酮)、部分还原(羰基、2,3-烯)或全部还原(3-亚甲基)。多种聚酮化物合酶使用丙二酰基 CoA 或 [S]-2-甲基丙二酰基 CoA 作为引子以用于聚酮化物合成。在这样的情况下,末端羧基通常通过存在于 PKS 的相应加载域的 N-末端处的脱羧酶域而除去。简言之, α -碳和 β -羰基的结构(和手性)由在各特定步骤中生长链的合成中使用的 PKS 的模块来确定。由于合成中使用

的模块和制备的聚酮化物的结构之间的相应性,因此通过聚酮化物合酶的选择和基因操纵可以编程所述合成以制备具有期望结构的化合物。因此,编程 PKS 以制备二元羧酸可通过从加载模块直接除去 N- 末端脱羧酶域而完成。图 2 示出多种模块和各模块利用的前体以引入到相应的初期酰基(聚酮化物)链中,从而导致目标化合物的范围。表 1 提供各模块的 PKS 源。各 PKS 源对本领域的普通技术人员来说是熟知的,并且容易获得。另外,对于表 1 中教导的各模块,可以是除了可使用的其他 PKS 之外的其他模块。

[0031] 表 1. 多种模块的 PKS 源

[0032]	模块	PKS 源
[0033]	S1	螺旋霉素 PKS 加载域
[0034]		红霉素 PKS 加载域
[0035]	S2	域
[0036]	A	利福霉素 PKS 模块 2
[0037]	B	寡霉素 PKS 模块 1
[0038]	C	螺旋霉素 PKS 模块 1
[0039]	D	苦霉素 PKS 模块 2
[0040]	E	寡霉素 PKS 模块 3
[0041]	F	红霉素 PKS 模块 3
[0042]	G	寡霉素 PKS 模块 5
[0043]	H	匹马菌素 PKS 模块 7
[0044]	I	泰乐菌素 PKS 模块 1
[0045]	J	红霉素 PKS 模块 1
[0046]	K	阿维菌素 PKS 模块 7
[0047]	L	雷帕霉素 PKS 模块 1
[0048]	M	红霉素 PKS 模块 4
[0049]	N	岬霉素模块 2
[0050]	O	子囊霉素模块 4
[0051]	P	FK506 模块 4

[0052] 所有的延长剂模块携带: β -酰基 ACP 合酶(通常称为酮合酶或 KS)域,其在延长剂和生长聚酮化物链之间进行脱羧缩合步骤;和酰基载体蛋白(ACP)域,其携带生长酰基链并使其存在至同源还原域以还原 β -羰基。组成中的模块可彼此不同,使得可以引入一些不同的引子和延长剂单元,它们中的一些含有立体特异性侧链(例如甲基、乙基、亚丙基)。各模块的酰基转移酶(AT)域确定引入的延长剂单元(例如丙二酰基 CoA、甲基丙二酰基 CoA 等)。另外,PKS 模块并不一直还原由缩合形成的 β -羰基,而是可使其未还原(酮)、部分还原(羟基、2,3-烯)或全部还原(3-亚甲基),如图 2 中所示。酮还原酶(KR)域将酮还原成 OH 官能团(立体特异性);脱水酶(DH)域从 α 和 β 的碳除去水,并且导致 α , β 反式双键;烯酰还原酶(ER)域将双键还原成 α , β -亚甲基中心;因此, β -羰基的还原性状态由相应的模块中的存在的功能性还原性域而决定。很少发现模块含有另外的 C-甲基化域(从而产生另外的 α -甲基侧链,如埃博霉素中那样)。因此,PKS 的构成确定了引入的引子和延长剂酰基单元的选择、在各缩合步骤中还原的程度、和加入链的单元的总数。

自然中见到的聚酮化物的结构的较广的多样性归因于 PKS 组成的多样性。抗菌素苦霉素的配基组分 (narbonolide) 的 PKS-定向合成示于图 9 中。pik PKS 使用 6 个模块 (加载域在模块 1 的 N-末端处);加载域和模块 1、3、4、5 和 6 使用前体 [S]-2-甲基丙二酰基 CoA, 模块 2 使用丙二酰基 CoA。(然而在引入后,三个侧链通过仍未完全地理解的过程而反转。)在各缩合循环后还原的各种程度由在各模块中存在相应的还原性域决定。PKS 产物的循环性质是由于在 ACP6 的末端硫酯键上在第一浓缩循环后产生的 OH 的 TE 域-催化的亲核性攻击。因此,聚酮化物 narbonolide 的结构由 pik PKS 来编程。

[0053] PKS 加载域和二元酸的形成

[0054] 尽管事实上所有聚酮化物都表现为以短链羧酸 (例如乙酰基 CoA 或丙酰基 CoA) 开始,但是实际中大多数聚酮化物合酶使用丙二酰基 CoA 或 [S]-2-甲基丙二酰基 CoA 作为引子以用于聚酮化物合成。在这样的情况下,如图 9 中所示用于 pik PKS 的那样,在酰基链生长时末端羧基通过存在于 PKS 的相应加载域的 N-末端处的脱羧酶域 (称为 KS^Q) 而除去。来自 PKS 的聚酮化物链的合成终止和释放通常导致产生游离的羧酸 (如果链释放的受体是水),或更通常地导致产生内酯 (如果受体是内部的 OH)。在引发链生长时没有除去羧基将导致产生二元酸 (如果内酯化的机会被抑制)。这可以通过从 PKS 的加载域除去 KSQ 域而实现。

[0055] 例子示于图 10 中,其示出单一 PKS,所述单一 PKS 由加载域、能够全部还原 β -羰基的单一延长剂模块和 TE 域构成。AT 域使用丙二酰基 CoA 作为引子和延长剂单元。加载域引入丙二酰基 CoA,但使其脱羧,同时留下两个碳乙酰基-ACP 部分。模块 1 和第二丙二酰基 CoA 进行脱羧性缩合,并且产生 β -羰基的全部还原,接着链释放产生正丁二酸,4-碳分子。如果除去构建的 PKS 的 KS^Q 域,由加载域产生的丙二酰基-ACP 部分将不会脱羧;随后的缩合、还原和链终止将释放 5-碳二元酸,1,5-戊二酸 [7]。如果第二延长剂模块能够引入丙二酰基 CoA,并且全部 β -羰基还原添加至 KSQ-缺失的 PKS 中,所得化合物将是 7-碳二元酸 (1,7-庚二酸)。因此,6-碳直链二元酸 (己二酸) 不能由此处所述的 PKS 工程化而制得。然而,下面将描述的是,可以使 PKS 工程化以制备 6-碳支链 (2-甲基戊烷) 二元酸。

[0056] 工程化聚酮化物合酶

[0057] 本发明提供编码本发明的聚酮化物合酶 (PKS) 的重组核酸。重组核酸可以是双链或单链 DNA 或 RNA。重组核酸可以编码本发明的 PKS 的可读框 (ORF)。重组核酸还可以包含用于在合适的宿主细胞中转录 ORF 的启动子序列。重组核酸还可以包含足以具有在宿主细胞中稳定地复制的重组核酸的序列。重组核酸可以是在宿主细胞中能够稳定保持的复制子。在一些实施方案中,复制子是质粒。本发明还提供包含本发明的重组核酸的载体或表达载体。

[0058] 本领域的普通技术人员将意识到多种重组载体可用在本发明的方面的实施中。如本文中所示的,“载体”是指用于将重组核酸引入细胞中以进行表达或复制的多核苷酸元件。这种载体的选择和使用在本领域中是常规的。“表达载体”包括能够表达这样的 DNA 的载体,所述 DNA 和调节序列 (例如启动子区域) 操作性连接。因此,表达载体是指重组 DNA 或 RNA 构建体,例如质粒、噬菌体、重组病毒或其他载体 (其在引入合适的宿主细胞中后导致克隆的 DNA 的表达)。合适的表达载体是本领域普通技术人员所熟知的,并且包括在真

核细胞和 / 或原核细胞复制的那些、和保持附加性的那些或整合到宿主细胞基因组中的那些。

[0059] 载体可被选择,从而含有以这样的方式和所得编码序列操作性连接的控制序列,该方式为编码序列的表达可在合适的宿主中实施。合适的控制序列包括在真核和原核宿主细胞中发挥作用的那些。如果克隆载体(其被用于获得编码衍生的 PKS 缺失控制序列的 PKS 基因以进行表达)和编码核苷酸序列操作性连接,核苷酸序列被插入合适的表达载体中。这可单独完成,或使用分离的编码核苷酸序列的库(其可插入宿主载体中)来完成,所得载体转换或转染到宿主细胞中,并且所得细胞接种到单独集落中。多种类型有机体的单一细胞培养物的合适控制序列是本领域熟知的。用于在酵母中表达的控制体系是可广泛获得的,并且是常规使用的。控制元件包括启动子(任选地含有操作子序列),并且取决于宿主的性质包括其他元件,例如核糖体结合位点。特别可用于原核宿主的启动子包括来自 PKS 基因群的那些,所述基因群导致作为第二代谢物的聚酮化物的产生,包括来自 I 型或芳族(II 型)PKS 基因群的那些。例子为 act 启动子、tcm 启动子、螺旋霉素启动子等。然而,也可使用其他细菌启动子,例如衍生自糖(例如半乳糖、乳糖(lac)和麦芽糖)代谢酶的那些。另外的例子包括衍生自生物合成酶的启动子,例如用于色氨酸(trp)、 β -内酰胺酶(bla)、 λ 噬菌体 PL 和 T5 的启动子。另外,可以使用合成启动子,例如 tac 启动子(美国专利 No. 4, 551, 433 ;其通过引用的方式并入)。

[0060] 如所述,特别有用的控制序列是本身或者和合适的调节体系一起在营养菌丝体中从生长转化到平稳期的过程中活化表达的那些。这些类型的示意性控制序列、载体和宿主细胞包括修饰的 *S. coelicolor* CH999 和在 PCT 公开 no. WO 96/40968 中所述的载体、和 *S. lividans* 的类似菌株。参见美国专利 No. 5, 672, 491、5, 830, 750、5, 843, 718 和 6, 177, 262, 它们均通过引用的方式并入。其他调节序列也可以是期望的,其允许相对于宿主细胞的生长而调节 PKS 序列的表达。调节序列是本领域普通技术人员已知的,并且例子包括引起基因对应于化学或物理刺激(包括存在调节化合物的情况)而打开或关闭表达的那些。其他类型的调节元件(例如增强子序列)也可以存在于载体中。

[0061] 合适的标记也可以包括在重组表达载体中。多种标记是已知的,它们可用于选择变形细胞系,并且通常包含这样的基因,当细胞在合适的选择性培养基中生长时,所述基因的表达赋予变形的细胞合适的显型。例如,这些标记包括赋予质粒抗菌素抗性或敏感性的基因。

[0062] 多种 PKS 核苷酸序列或这些序列的混合物可以使用单独的控制元件或在单一启动子的控制下,作为单独的盒克隆岛一种或多种重组载体中。PKS 亚单位或组件可以包括侧翼限制位点以允许其他 PKS 亚单位的容易缺失和插入。这些限制位点的设计是本领域普通技术人员已知的,并且可以使用上述技术来完成,例如定向突变和 PCR。将本发明的重组载体引入合适的宿主中的方法是本领域普通技术人员已知的,并且典型地包括使用 CaCl_2 或其他试剂(例如二价阳离子)、脂质转染法、DMSO 法、原生质体转化法、配对法和电穿孔法。

[0063] 本发明提供包含本发明的重组核酸和 / 或 PKS 中的任一种的宿主细胞。在一些实施方案中,当培养时,宿主细胞能够制备表 2A-F 和表 3A-KK 中所述的二元酸。宿主细胞可以是真核或原核细胞。合适的真核细胞包括酵母细胞,例如来自 *Saccharomyces* 或 *Schizosaccharomyces* 种。来自 *Saccharomyces* 种的合适的种类为 *Saccharomyces*

cerevisiae。来自 *Schizosaccharomyces* 种的合适的种类为 *Schizosaccharomyces pombe*。合适的原核细胞包括 *Escherichia coli* 或 *Streptomyces* 种类。

[0064] 在检查的 30 多种 PKS 中,生物合成中使用的模块和制备的聚酮化物的结构之间的相应性在 PKS 的蛋白序列和相应的基因的 DNA 序列的水平上完全理解。模块编程到聚酮化物结构中可以通过序列鉴别来鉴定。可以克隆(或合成)相应于所需模块的 DNA 序列并且将它们作为完全功能单元转移到异源,否则非聚酮化物中,从而产生宿主例如 *E. coli* (B. A. Pfeifer, S. J. Admiraal, H. Gramajo, D. E. Cane, C. Khosla, *Science* 291, 1790(2001);其通过引用的方式并入)和 *Streptomyces* (C. M. Kao, L. Katz, C. Khosla, *Science* 265,509(1994);其通过引用的方式并入)。用于聚酮化物生物合成的另外的基因也被鉴定。确定磷酸泛酰巯基乙胺:蛋白转移酶(PPTase)(转移 ACP 域的 4-磷酸泛酰巯基乙胺辅因子)的基因,通常存在于产生聚酮化物的宿中,已经在 *E. coli* 和其他宿主中克隆(K. J. Weissman, H. Hong, M. Oliynyk, A. P. Siskos, P. F. Leadlay, *ChemBiochem* 5, 116(2004);其通过引用的方式并入)。此外,用于制备前体(例如甲基丙二酰基 CoA 和乙基丙二酰基 CoA)的基因也已经被鉴定和克隆到异源宿主中。还可以重新编程聚酮化物生物合成以制备具有期望结构的化合物,其通过单一 PKS 的基因操作或由来自两种或多种来源的模块构成的杂化 PKS 的构建来进行(K. J. Weissman, H. Hong, M. Oliynyk, A. P. Siskos, P. F. Leadlay, *ChemBiochem* 5,116(2004);其通过引用的方式并入)。因此,编程 PKS 以制备具有期望结构的二元酸可以通过从加载模块直接除去 N-末端脱羧酶域、接着将改变加载域和一个或多个延长剂模块融合来完成,如图 10 中所示。

[0065] 操作模块 PKS 基因以制备本发明的 PKS 的重组方法在美国专利 No. 5,672,491、5,843,718、5,830,750、5,712,146 和 6,303,342、以及 PCT 公开 no. WO 98/49315 和 WO 97/02358 中有所描述,其通过引用的方式并入,多种基因工程策略被用于多种 PKS 以确定聚酮化物的结构可以被操纵以制备新型聚酮化物(参见上述引用的专利文献和 Hutchinson,1998, *Curr Opin Microbiol.* 1:319-329, and Baltz,1998, *Trends Microbiol.* 6:76-83;其通过引用的方式并入)。在一些实施方案中,杂化 PKS 的组分布置在多肽上,所述多肽具有多肽内接头,所述多肽内接头将多肽组件导向到功能性 PKS 蛋白中,使得不需要 PKS 在多肽中具有如自然 PKS 中观察到的相同布置的模块。接合多肽的合适的多肽内接头和在多肽内接合模块的多肽内接头在 PCT 公开 no. WO 00/47724 中有所描述,其通过引用的方式并入。

[0066] 基因构建体将使用加载模块的 KSQ 域的失活或缺失,使得保持悬挂的酸官能团。加载域将融合到一个或多个延长剂模块。最终模块将和硫酯酶(TE)域融合。例如,来自 *Streptomyces ambofaciens* 中的螺旋霉素 PKS 的加载域(LM)可熔融到来自 *Streptomyces noursei* 的制霉菌素(nysMod5)PKS 的模块 5、来自 *Saccharopolyspora erythraea* 的红霉素 PKS(eryTE)的 TE 域,以产生杂化聚酮化物合酶,其将制备戊二酸(戊二酸)(图 4)。来自 *Sorangium cellulosum* 的埃博霉素 PKS(epoMod5)的模块 5 插入在 nysMod5 和 eryTE 之间将产生庚二酸(图 4)。

[0067] 公开文献表明 ery TE 能够在我们的体系中释放游离酸。这是体外分析,但是该性能被预期转移到体内体系中。另一种考虑的观点是在 *Streptomyces cinnamonensis* 中使用来自莫能菌素途径的硫酯酶 MonCII。该酶已经被暗示从 PKS megasynthase 中释放线性

游离酸。

[0068] 已经阐明多种聚酮化物途径提供不同选择的宿主以制备这些二元酸和多种衍生物,如表 2 和 3 中所示。尽管所述产物可以在尺寸和官能性上有较大区别,但是所有都事实上使用相同的策略进行生物合成。

[0069] 非同源配子之间确切的界面将视情况而决定。来自目标蛋白的 ACP- 接头 -KS 和 ACP- 接头 -TE 区域将比对以检查最少分撒的融合点以用于杂化合酶。基因构建将使用不依赖于序列和接头的克隆 (SLIC) 以消除基因“瘢痕”。

[0070] 可在标记本发明的 PKS 中使用的 PKS 序列的部分来源列表示意性而非限制性地包括 Ambruticin (美国专利 No. 7, 332, 576); 阿维菌素 (美国专利 No. 5, 252, 474; MacNeil et al., 1993, *Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics*, Baltz, Hegeman, & Skatrud, eds. (ASM), pp. 245-256; MacNeil et al., 1992, *Gene* 115 :119-25); 杀假丝菌素 (FR0008) (Hu et al., 1994, *Mol. Microbiol.* 14 :163-72); 埃博霉素 (美国专利 No. 6, 303, 342); 红霉素 (WO 93/13663; 美国专利 No. 5, 824, 513; Donadio et al., 1991, *Science* 252 :675-79; Cortes et al., 1990, *Nature* 348 :176-8); FK506 (Motamedi et al., 1998, *Eur. J. Biochem.* 256 :528-34; Motamedi et al., 1997, *Eur. J. Biochem.* 244 :74-80); FK520 或子囊霉素 (美国专利 No. 6, 503, 737; 还参见 Nielsen et al., 1991, *Biochem.* 30 :5789-96); Jerangolid (美国专利 No. 7, 285, 405); 细霉素 (美国专利 No. 7, 288, 396); 洛伐他汀 (美国专利 No. 5, 744, 350); 奈马克丁 (MacNeil et al., 1993, *supra*); 尼达霉素 (Kakavas et al., 1997, *J. Bacteriol.* 179 :7515-22); 竹桃霉素 (Swan et al., 1994, *Mol. Gen. Genet.* 242 :358-62; 美国专利 No. 6, 388, 099; Olano et al., 1998, *Mol. Gen. Genet.* 259 :299-308); 岬霉素 (PCT 公开 no. WO 2003/044186); 苦霉素 (Xue et al., 2000, *Gene* 245 :203-211); 匹马霉素 (PCT 公开 no. WO2000/077222); Platenolide (EP Pat. App. 791,656); 雷帕霉素 (Schwecke et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 :7839-43); Aparicio et al., 1996, *Gene* 169 :9-16); 利福霉素 (August et al., 1998, *Chemistry&Biology*, 5 :69-79); Soraphen (美国专利 No. 5, 716, 849; Schupp et al., 1995, *J. Bacteriology* 177 :3673-79); 螺旋霉素 (美国专利 No. 5, 098, 837); 泰乐菌素 (EP 0 791,655; Kuhstoss et al., 1996, *Gene* 183 :231-36; 美国专利 No. 5, 876, 991)。其他合适的 PKS 编码序列是本领域普通技术人员容易获得的,或者保持为发现或表征的,但是对于本领域普通技术人员来说是可获得的 (例如通过参照 GenBank)。引用的各参考文献都是特异性的,并且单独通过引用的方式并入。

[0071] 络合聚酮化物包含较多种类的天然产物,所述天然产物在细菌 (主要成员是放射菌族;例如 *Streptomyces*)、真菌和植物中合成。聚酮化物来自大多数临床上重要的药物的配基组分,例如抗菌素 (例如红霉素、泰乐菌素),抗真菌剂 (例如制霉菌素)、抗癌剂 (例如埃博霉素)、免疫抑制剂 (例如雷帕霉素) 等。尽管这些化学物在它们的结构或它们的作用模式上彼此并不相同,但是它们具有共同基础以用于它们的生物合成,这通过称为聚酮化物合酶的酶的组来进行。

[0072] 由 PKS 制备的二元酸和三元酸

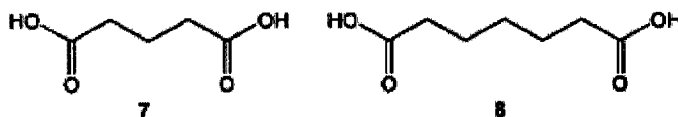
[0073] 本发明提供制备二元酸 (例如表 2A-F 和表 3A-KK 中所述的二元酸) 的方法,该方法包括:提供本发明的宿主细胞;以及在合适的培养介质中培养所述宿主细胞,使得制得

所述二元酸。该方法还可包括从所述宿主细胞和所述培养介质中分离所述二元酸。该方法还可包括使所述二元酸和二元胺反应以制得尼龙。合适的二元胺是链烷二元胺,例如 1,6-己二元胺。可选择地,该方法还可包括使所述二元酸和二元醇反应以制得聚酯。合适的二元醇是链烷二醇,例如乙二醇、丙二醇或丁二醇。用于异源表达 PKS 基因的多种方法和适于表达这些基因的宿主细胞、以及聚酮化物的制备在(例如)美国专利 No. 5,843,718、5,830,750 和 6,262,340、WO 01/31035、WO 01/27306 和 WO 02/068613、以及 U.S. 专利申请公开 No. 20020192767 和 20020045220 中有所描述,其通过引用的方式并入。

[0074] 本发明提供一种组合物,包含从制备二元酸的宿主细胞中分离的二元酸与所述宿主细胞的痕量残留物和/或污染物。

[0075] 己二酸是完全还原的对称脂肪族化合物的六碳链,其没有侧链,因此没有手性中心。只有奇数链长的二羧酸酯可以通过 PKS 产生。五元链由引子酰基单元和两个延长剂酰基单元的缩合形成。无论化合物的还原状态如何,存在设计的二酮化物,并且需要用于它们的合成的加载模块和一个延长剂模块。七元链三酮化物由引子和两个延长剂单元的缩合形成,其使用加载模块和两个延长剂模块。侧链(甲基、乙基、羟基)可以引入或形成,这取决于使用的模块。具有非手性中心的对称化合物在结构上和可通过编程的 PKS 制备的己二酸最类似,它们是二酮化物正戊二酸(戊二酸)[7] 和三酮化物正庚二酸[8]。这些化合物通过由加载模块 S1 和延长剂模块 E[7] 或 S1 和两个 E 延长剂模块[8](图 2)构成的聚酮化物合酶的缩合而制得。

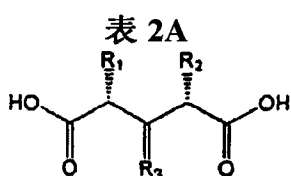
[0076]



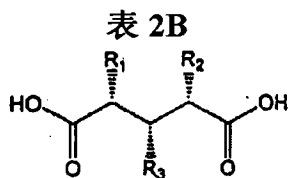
[0077] 这些分子可用作己二酸或其他二元酸的代替物,以制备如图 3 中的路线所示的新型聚酰胺或新型聚酯。由 PKS 制成二和三酮化物的所有其他二元酸将是不对称的。它们将含有一个或多个双键、或羟基、和/或一个或多个甲基侧链,因此它们在聚合时将导致产生化合物的混合物。目前不对称混合物在粘合剂组合物(其用于制备多种塑料)的制备中基本上用作低收缩添加剂。

[0078] 可以以 S1 或 S2 起始并且使用图 2 中所示的任一种延长剂模块来构建 PKS、32 种二酮化物-二元酸和 512 种三酮化物-二元酸。考虑到立体化学性,每种化合物都是化学上不同和独特的。除了化合物[7],所有都是不对称的。骨架的刚性由于存在双键和侧链而增强。可行的二酮化物示于表 2A-F 中,可行的三酮化物示于表 3A-KK 中。

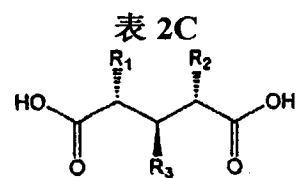
[0079] 表 2A-F. 使用图 2 中所示的模块制备的可行的二酮化物-二元酸



模块					
	R ₁	R ₂	R ₃	LM	Mod1
9	H	H	O	S1	A
10	H	CH ₃	O	S1	F
11	H	(CH ₂) ₃	O	S1	O
12	H	CH ₂ CH ₃	O	S1	P
13	H	H	CH ₂	S1	N
14	CH ₃	H	O	S2	A
15	CH ₃	CH ₃	O	S2	F
16	CH ₃	(CH ₂) ₃	O	S2	O
17	CH ₃	H	CH ₂	S2	N
18	CH ₃	CH ₂ CH ₃	O	S2	P

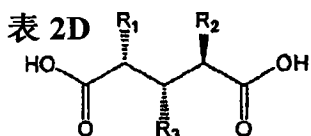


模块					
	R ₁	R ₂	R ₃	LM	Mod1
7	H	H	H	S1	E
19	H	H	OH	S1	C
20	H	CH ₃	H	S1	M
21	H	CH ₃	OH	S1	J
22	CH ₃	H	H	S2	E
23	CH ₃	H	OH	S2	C
24	CH ₃	CH ₃	H	S2	M
25	CH ₃	CH ₃	OH	S2	J

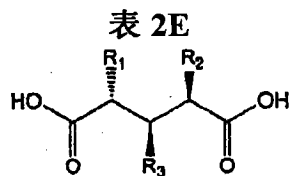


模块					
	R ₁	R ₂	R ₃	LM	Mod1
26	H	H	OH	S1	B
27	H	CH ₃	OH	S1	I
28	CH ₃	H	OH	S2	B
30	CH ₃	CH ₃	OH	S2	I

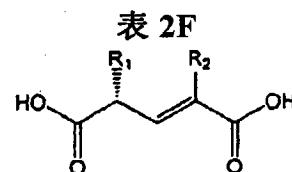
[0080]



模块					
	R ₁	R ₂	R ₃	LM	Mod1
31	H	CH ₃	H	S1	L
32	H	CH ₃	OH	S1	H
33	CH ₃	CH ₃	H	S2	L
34	CH ₃	CH ₃	OH	S2	H

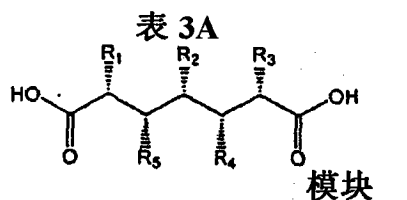


模块					
	R ₁	R ₂	R ₃	LM	Mod1
35	H	CH ₃	OH	S1	G
36	CH ₃	CH ₃	OH	S2	G



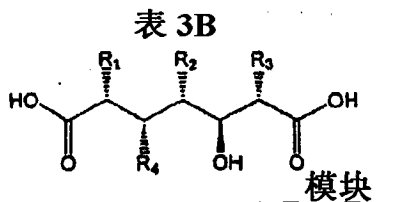
模块					
	R ₁	R ₂	LM	Mod1	
37	H	H	S1	D	
38	H	CH ₃	S1	K	
39	CH ₃	H	S2	D	
40	CH ₃	CH ₃	S2	K	

[0081] 表 3A-KK. 使用图 2 中所示的模块制备的可行的三酮化物 - 二元酸

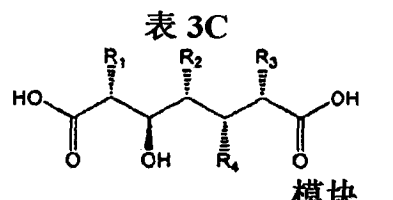


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	LM	Mod1	Mod2
8	H	H	H	H	H	S1	E	E
41	H	H	H	OH	H	S1	E	E
42	H	H	H	H	OH	S1	E	E
43	H	H	H	OH	OH	S1	C	C
44	H	H	H	H	H	S1	E	E
45	H	H	CH ₃	H	H	S1	E	E
46	H	H	CH ₃	OH	H	S1	E	E
47	H	H	CH ₃	H	OH	S1	C	C
48	H	H	CH ₃	OH	OH	S1	C	C
49	H	CH ₃	H	H	H	S1	M	M
50	H	CH ₃	H	H	OH	S1	J	J
51	H	CH ₃	H	OH	OH	S1	J	J
52	H	CH ₃	CH ₃	H	H	S1	M	M
53	H	CH ₃	CH ₃	OH	H	S1	M	M
54	H	CH ₃	CH ₃	H	OH	S1	J	J
55	H	CH ₃	CH ₃	OH	OH	S1	J	J
56	CH ₃	H	H	H	H	S2	E	E
57	CH ₃	H	H	OH	H	S2	E	E
58	CH ₃	H	H	H	OH	S2	C	C
59	CH ₃	H	H	OH	OH	S2	C	C
60	CH ₃	H	CH ₃	H	H	S2	E	E
61	CH ₃	H	CH ₃	OH	H	S2	E	E
62	CH ₃	H	CH ₃	H	OH	S2	M	M
63	CH ₃	H	CH ₃	OH	OH	S2	C	C
64	CH ₃	CH ₃	H	H	H	S2	M	M
65	CH ₃	CH ₃	H	OH	H	S2	M	M
66	CH ₃	CH ₃	H	OH	OH	S2	J	J
67	CH ₃	CH ₃	H	H	H	S2	M	M
68	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H	S2	M	M
69	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	OH	S2	M	M
70	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	OH	S2	J	J
71	CH ₃	CH ₃	CH ₃	OH	OH	S2	J	J

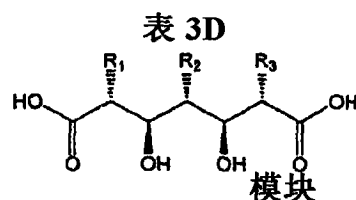
[0082]



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	LM	Mod1	Mod2
72	H	H	H	H	S1	E	B
73	H	H	CH ₃	H	S1	E	B
74	H	CH ₃	H	H	S1	M	B
75	H	CH ₃	CH ₃	H	S1	M	B
76	H	H	H	OH	S1	C	B
77	H	H	CH ₃	OH	S1	C	B
78	H	CH ₃	H	OH	S1	J	B
79	H	CH ₃	CH ₃	OH	S1	J	B
80	CH ₃	H	H	H	S2	E	B
81	CH ₃	H	CH ₃	H	S2	E	B
82	CH ₃	CH ₃	H	H	S2	M	B
83	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	S2	M	B
84	CH ₃	H	H	OH	S2	C	B
85	CH ₃	H	CH ₃	OH	S2	C	B
86	CH ₃	CH ₃	H	OH	S2	J	B
87	CH ₃	CH ₃	CH ₃	OH	S2	J	B

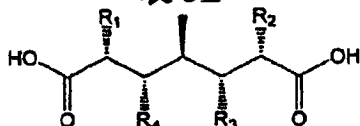


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	LM	Mod1	Mod2
88	H	H	H	H	S1	B	E
89	H	H	CH ₃	H	S1	B	M
90	H	H	H	OH	S1	B	C
91	H	H	CH ₃	OH	S1	B	J
92	H	CH ₃	H	H	S1	I	E
93	H	CH ₃	CH ₃	H	S1	I	M
94	H	CH ₃	H	OH	S1	I	C
95	H	CH ₃	CH ₃	OH	S1	I	J
96	CH ₃	H	H	H	S2	B	E
97	CH ₃	H	CH ₃	H	S2	B	M
98	CH ₃	H	H	OH	S2	B	C
99	CH ₃	H	CH ₃	OH	S2	B	J
100	CH ₃	CH ₃	H	H	S2	I	E
101	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	S2	I	M
102	CH ₃	CH ₃	H	OH	S2	I	C
103	CH ₃	CH ₃	CH ₃	OH	S2	I	J



	R ₁	R ₂	R ₃	LM	Mod1	Mod2
104	H	H	H	S1	B	B
105	H	H	CH ₃	S1	B	B
106	H	CH ₃	H	S1	I	B
107	H	CH ₃	CH ₃	S1	I	B
108	CH ₃	H	H	S2	B	B
109	CH ₃	H	CH ₃	S2	B	B
110	CH ₃	CH ₃	H	S2	I	B
111	CH ₃	CH ₃	CH ₃	S2	I	B

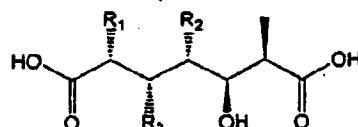
表 3E



模块

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	LM	Mod1	Mod2
112	H	H	H	H	S1	L	E
113	H	H	OH	H	S1	L	L
114	H	CH ₃	H	H	S1	L	L
115	H	CH ₃	OH	H	S1	L	L
116	H	H	H	OH	S1	L	H
117	H	H	OH	OH	S1	H	H
118	H	CH ₃	H	OH	S1	H	H
119	H	CH ₃	OH	OH	S1	H	H
120	CH ₃	H	H	H	S2	L	L
121	CH ₃	H	OH	H	S2	L	L
122	CH ₃	CH ₃	H	H	S2	L	L
123	CH ₃	CH ₃	OH	H	S2	L	L
124	CH ₃	H	H	OH	S2	H	H
125	CH ₃	H	OH	OH	S2	H	H
126	CH ₃	CH ₃	H	OH	S2	H	H
127	CH ₃	CH ₃	OH	OH	S2	H	H

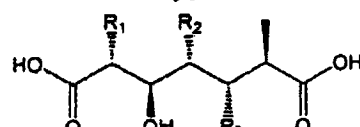
表 3H



模块

	R ₁	R ₂	R ₃	LM	Mod1	Mod2
162	H	H	H	S1	E	G
163	H	H	OH	S1	C	G
164	H	CH ₃	H	S1	C	G
165	H	CH ₃	OH	S1	J	G
166	CH ₃	H	H	S2	E	G
167	CH ₃	H	OH	S2	C	G
168	CH ₃	CH ₃	H	S2	M	J
169	CH ₃	CH ₃	OH	S2	M	J

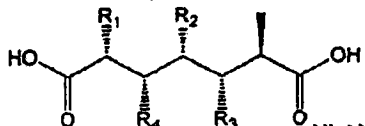
表 3I



模块

	R ₁	R ₂	R ₃	LM	Mod1	Mod2
160	H	H	H	S1	B	L
161	H	H	OH	S1	B	L
162	H	CH ₃	H	S1	I	L
163	H	CH ₃	OH	S1	I	L
164	CH ₃	H	H	S2	B	L
165	CH ₃	H	OH	S2	B	L
166	CH ₃	CH ₃	H	S2	I	L
167	CH ₃	CH ₃	OH	S2	I	L

表 3F

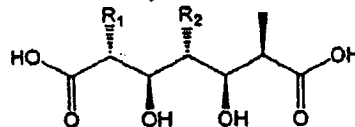


模块

[0083]

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	LM	Mod1	Mod2
128	H	H	H	H	S1	E	L
129	H	H	OH	H	S1	E	L
130	H	H	H	OH	S1	C	L
131	H	H	OH	OH	S1	C	L
132	H	CH ₃	H	H	S1	M	L
133	H	CH ₃	OH	H	S1	M	L
134	H	CH ₃	H	OH	S1	J	L
135	H	CH ₃	OH	OH	S1	J	L
136	CH ₃	H	H	H	S2	E	L
137	CH ₃	H	OH	H	S2	E	L
138	CH ₃	H	H	OH	S2	C	L
139	CH ₃	H	OH	OH	S2	C	L
140	CH ₃	CH ₃	H	H	S2	M	L
141	CH ₃	CH ₃	OH	H	S2	M	L
142	CH ₃	CH ₃	H	OH	S2	J	L
143	CH ₃	CH ₃	OH	OH	S2	J	L

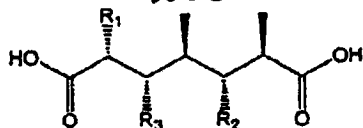
表 3J



模块

	R ₁	R ₂	LM	Mod1	Mod2
168	H	H	S1	B	G
169	H	CH ₃	S1	I	G
170	CH ₃	H	S2	B	G
171	CH ₃	CH ₃	S2	I	G

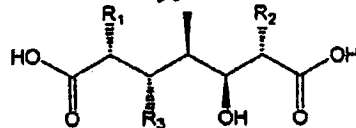
表 3G



模块

	R ₁	R ₂	R ₃	LM	Mod1	Mod2
144	H	H	H	S1	L	L
146	H	OH	H	S1	L	L
148	H	H	OH	S1	L	L
147	H	OH	OH	S1	H	L
148	CH ₃	H	H	S2	L	L
149	CH ₃	OH	H	S2	L	L
150	CH ₃	H	OH	S2	L	L
151	CH ₃	OH	OH	S2	H	L

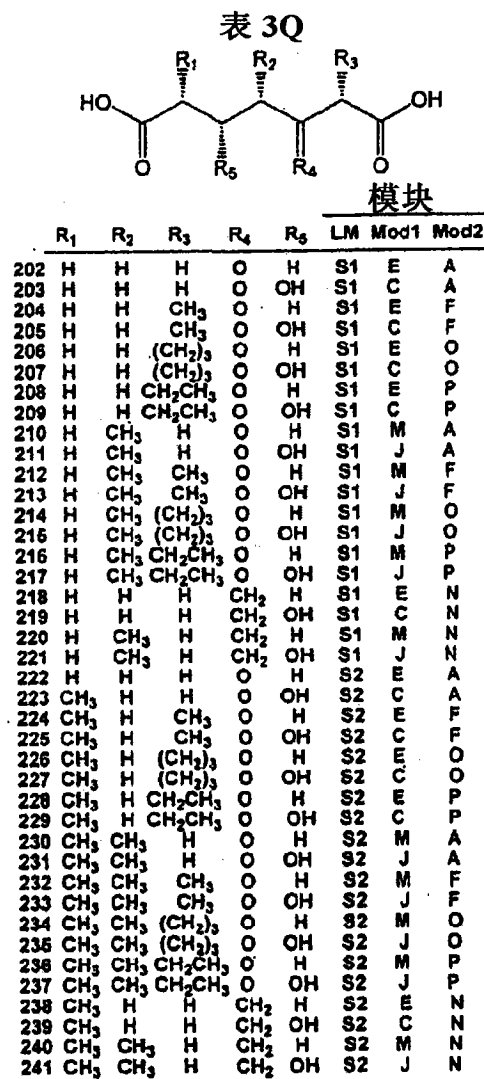
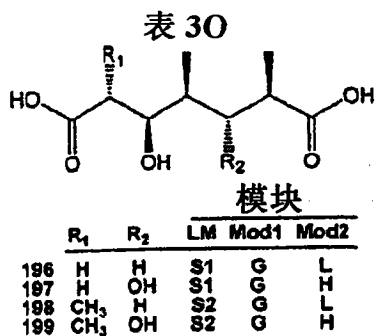
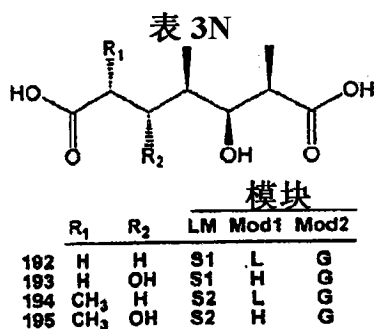
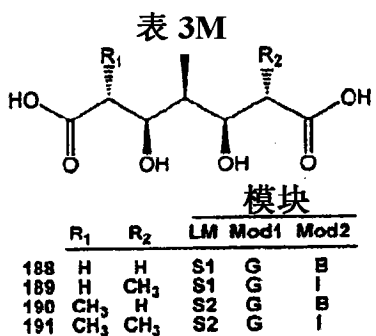
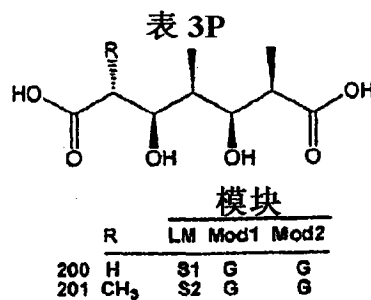
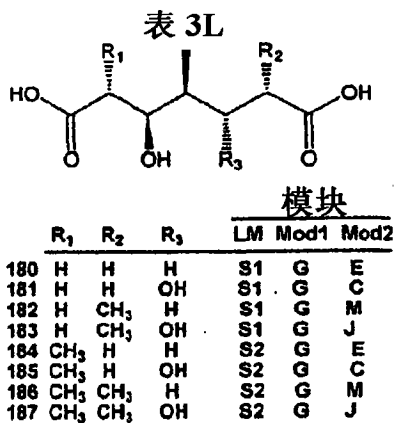
表 3K



模块

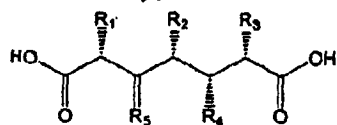
	R ₁	R ₂	R ₃	LM	Mod1	Mod2
172	H	H	H	S1	L	B
173	H	CH ₃	H	S1	L	I
174	H	H	OH	S1	H	B
175	H	CH ₃	OH	S1	H	I
176	CH ₃	H	H	S2	L	B
177	CH ₃	CH ₃	H	S2	L	I
178	CH ₃	H	OH	S2	L	B
179	CH ₃	CH ₃	OH	S2	H	I

[0084]



[0085]

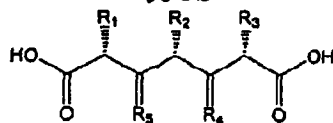
表 3R



模块

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	LM	Mod1	Mod2
242	H	H	H	H	O	S1	A	E
243	H	H	H	OH	O	S1	A	C
244	H	H	CH ₃	H	O	S1	A	M
245	H	H	CH ₃	OH	O	S1	A	J
248	H	CH ₃	H	H	O	S1	F	E
247	H	CH ₃	H	OH	O	S1	F	C
248	H	CH ₃	CH ₃	H	O	S1	F	M
249	H	CH ₃	CH ₃	OH	O	S1	F	J
250	H	(CH ₂) ₃	H	H	O	S1	O	E
261	H	(CH ₂) ₃	H	OH	O	S1	O	C
252	H	(CH ₂) ₃	CH ₃	H	O	S1	O	M
253	H	(CH ₂) ₃	CH ₃	OH	O	S1	O	J
254	H	CH ₂ CH ₃	H	H	O	S1	P	E
255	H	CH ₂ CH ₃	H	OH	O	S1	P	C
256	H	CH ₂ CH ₃	CH ₃	H	O	S1	P	M
257	H	CH ₂ CH ₃	CH ₃	OH	O	S1	P	J
258	H	H	H	H	CH ₂	S1	N	E
259	H	H	H	OH	CH ₂	S1	N	C
280	H	H	CH ₃	H	CH ₂	S1	N	M
281	H	H	CH ₃	OH	CH ₂	S1	N	J
282	CH ₃	H	H	H	O	S2	A	A
283	CH ₃	H	H	OH	O	S2	A	A
284	CH ₃	H	CH ₃	H	O	S2	A	A
285	CH ₃	H	CH ₃	OH	O	S2	A	A
286	CH ₃	CH ₃	H	H	O	S2	F	F
287	CH ₃	CH ₃	H	OH	O	S2	F	F
288	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	O	S2	F	F
289	CH ₃	CH ₃	CH ₃	OH	O	S2	F	F
290	CH ₃	(CH ₂) ₃	H	H	O	S2	O	O
291	CH ₃	(CH ₂) ₃	H	OH	O	S2	O	O
292	CH ₃	(CH ₂) ₃	CH ₃	H	O	S2	O	O
293	CH ₃	(CH ₂) ₃	CH ₃	OH	O	S2	O	O
294	CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	H	O	S2	O	O
295	CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	OH	O	S2	O	O
296	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₃	H	O	S2	O	O
297	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₃	OH	O	S2	O	O
298	CH ₃	H	H	H	CH ₂	S2	O	S1
299	CH ₃	H	H	OH	CH ₂	S2	O	S1
300	CH ₃	(CH ₂) ₃	H	H	CH ₂	S2	O	S1
301	CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	H	CH ₂	S2	O	S1
302	CH ₃	H	H	H	CH ₂	S2	CH ₂	S1
303	CH ₃	H	H	OH	CH ₂	S2	CH ₂	S1
304	CH ₃	H	CH ₃	H	CH ₂	S2	CH ₂	S1
305	CH ₃	H	CH ₃	OH	CH ₂	S2	CH ₂	S1
306	CH ₃	H	CH ₂ CH ₃	H	CH ₂	S2	CH ₂	S1
307	CH ₃	H	H	H	O	S2	O	S2
308	CH ₃	H	H	OH	O	S2	O	S2
309	CH ₃	H	CH ₃	H	O	S2	O	S2
310	CH ₃	H	CH ₃	OH	O	S2	O	S2
311	CH ₃	CH ₃	H	H	O	S2	O	S2
312	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	O	S2	O	S2
313	CH ₃	CH ₃	CH ₃	OH	O	S2	O	S2
314	CH ₃	CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	O	S2	O	S2
315	CH ₃	(CH ₂) ₃	H	H	O	S2	O	S2
316	CH ₃	(CH ₂) ₃	H	OH	O	S2	O	S2
317	CH ₃	(CH ₂) ₃	CH ₃	H	O	S2	O	S2
318	CH ₃	(CH ₂) ₃	CH ₃	OH	O	S2	O	S2
319	CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	H	O	S2	O	S2
320	CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	OH	O	S2	O	S2
321	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₃	H	O	S2	O	S2
322	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₃	OH	O	S2	O	S2
323	CH ₃	H	H	H	CH ₂	S2	O	S2
324	CH ₃	CH ₃	H	H	CH ₂	S2	O	S2
325	CH ₃	(CH ₂) ₃	H	H	CH ₂	S2	O	S2
326	CH ₃	(CH ₂) ₃	H	OH	CH ₂	S2	O	S2
327	CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	H	CH ₂	S2	CH ₂	S2
328	CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	OH	CH ₂	S2	CH ₂	S2
329	CH ₃	H	CH ₃	H	O	S2	CH ₂	S2
330	CH ₃	H	(CH ₂) ₃	H	O	S2	CH ₂	S2
331	CH ₃	H	CH ₂ CH ₃	H	O	S2	CH ₂	S2

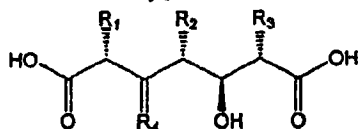
表 3S



模块

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	LM	Mod1	Mod2
282	H	H	H	O	O	S1	A	A
283	H	H	CH ₃	O	O	S1	A	F
284	H	H	(CH ₂) ₃	O	O	S1	A	O
285	H	H	CH ₂ CH ₃	O	O	S1	A	P
286	H	CH ₃	H	O	O	S1	F	F
287	H	CH ₃	CH ₃	O	O	S1	F	F
288	H	CH ₃	(CH ₂) ₃	O	O	S1	F	F
289	H	CH ₃	CH ₂ CH ₃	O	O	S1	F	F
290	H	(CH ₂) ₃	H	O	O	S1	O	O
291	H	(CH ₂) ₃	CH ₃	O	O	S1	O	O
292	H	(CH ₂) ₃	(CH ₂) ₃	O	O	S1	O	O
293	H	(CH ₂) ₃	CH ₂ CH ₃	O	O	S1	O	O
294	H	CH ₂ CH ₃	H	O	O	S1	P	P
295	H	CH ₂ CH ₃	CH ₃	O	O	S1	P	P
296	H	CH ₂ CH ₃	(CH ₂) ₃	O	O	S1	P	P
297	H	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	O	O	S1	P	P
298	H	H	H	CH ₂	O	S1	P	A
299	H	CH ₃	H	CH ₂	O	S1	P	A
300	H	(CH ₂) ₃	H	CH ₂	O	S1	P	O
301	H	CH ₂ CH ₃	H	CH ₂	O	S1	P	N
302	H	H	H	CH ₂	CH ₂	S1	N	N
303	H	H	H	CH ₂	CH ₂	S1	N	N
304	H	H	CH ₃	O	CH ₂	S1	N	N
305	H	H	CH ₃	O	CH ₂	S1	N	N
306	H	H	CH ₂ CH ₃	O	CH ₂	S1	N	N
307	CH ₃	H	H	O	O	S2	A	A
308	CH ₃	H	CH ₃	O	O	S2	A	A
309	CH ₃	H	(CH ₂) ₃	O	O	S2	A	A
310	CH ₃	H	CH ₂ CH ₃	O	O	S2	A	A
311	CH ₃	CH ₃	H	O	O	S2	A	F
312	CH ₃	CH ₃	CH ₃	O	O	S2	A	F
313	CH ₃	CH ₃	(CH ₂) ₃	O	O	S2	F	F
314	CH ₃	CH ₃	CH ₂ CH ₃	O	O	S2	F	F
315	CH ₃	(CH ₂) ₃	H	O	O	S2	F	O
316	CH ₃	(CH ₂) ₃	CH ₃	O	O	S2	F	O
317	CH ₃	(CH ₂) ₃	(CH ₂) ₃	O	O	S2	F	O
318	CH ₃	(CH ₂) ₃	CH ₂ CH ₃	O	O	S2	F	O
319	CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	O	O	S2	O	P
320	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₃	O	O	S2	O	P
321	CH ₃	CH ₂ CH ₃	(CH ₂) ₃	O	O	S2	O	P
322	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	O	O	S2	O	P
323	CH ₃	H	H	CH ₂	O	S2	A	F
324	CH ₃	CH ₃	H	CH ₂	O	S2	A	F
325	CH ₃	(CH ₂) ₃	H	CH ₂	O	S2	O	P
326	CH ₃	(CH ₂) ₃	H	CH ₂	O	S2	O	P
327	CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	CH ₂	CH ₂	S2	N	N
328	CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	CH ₂	CH ₂	S2	N	N
329	CH ₃	H	CH ₃	O	O	S2	N	N
330	CH ₃	H	(CH ₂) ₃	O	CH ₂	S2	N	N
331	CH ₃	H	CH ₂ CH ₃	O	CH ₂	S2	N	N

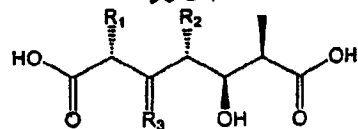
表 3T



模块

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	LM	Mod1	Mod2
332	H	H	O	S1	A	B
333	H	H	O	S1	A	F
334	H	CH ₃	H	S1	F	B
335	H	CH ₃	CH ₃	S1	F	O
336	H	(CH ₂) ₃	H	S1	F	O
337	H	(CH ₂) ₃	CH ₃	S1	O	P
338	H	CH ₂ CH ₃	H	S1	P	N
339	H	CH ₂ CH ₃	CH ₃	S1	P	N
340	H	H	CH ₂	S1	N	N
341	H	H	CH ₃	S1	N	N
342	CH ₃	H	H	S2	A	A
343	CH ₃	H	CH ₃	S2	A	F
344	CH ₃	CH ₃	H	S2	F	F
345	CH ₃	CH ₃	CH ₃	S2	F	F
346	CH ₃	(CH ₂) ₃	H	S2	F	O
347	CH ₃	(CH ₂) ₃	CH ₃	S2	O	P
348	CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	S2	O	P
349	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₃	S2	P	N
350	CH ₃	H	H	S2	P	N
351	CH ₃	H	CH ₂	S2	N	N

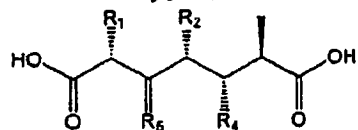
表 3V



模块

R ₁	R ₂	R ₃	LM	Mod1	Mod2
372	H	O	S1	A	G
373	H	CH ₃	S1	F	O
374	H	(CH ₂) ₃	S1	F	O
375	H	CH ₂ CH ₃	S1	P	N
376	H	H	S1	N	N
377	CH ₃	H	S2	A	F
378	CH ₃	CH ₃	S2	F	O
379	CH ₃	(CH ₂) ₃	S2	F	O
380	CH ₃	CH ₂ CH ₃	S2	P	N
381	CH ₃	H	S2	N	N

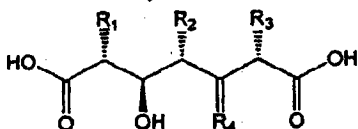
表 3W



模块

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	LM	Mod1	Mod2
382	H	H	CH ₃	H	O	S1	A
383	H	H	CH ₃	OH	O	S1	A
384	H	H	CH ₃	H	CH ₂	S1	A
385	H	H	CH ₃	OH	CH ₂	S1	N
386	H	CH ₃	CH ₃	H	O	S1	F
387	H	CH ₃	CH ₃	OH	O	S1	F
388	H	(CH ₂) ₃	CH ₃	H	O	S1	O
389	H	(CH ₂) ₃	CH ₃	OH	O	S1	O
390	H	CH ₂ CH ₃	CH ₃	H	O	S1	P
391	H	CH ₂ CH ₃	CH ₃	OH	O	S1	P
392	CH ₃	H	CH ₃	H	O	S2	A
393	CH ₃	H	CH ₃	OH	O	S2	A
394	CH ₃	H	CH ₃	H	CH ₂	S2	A
395	CH ₃	H	CH ₃	OH	CH ₂	S2	N
396	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	O	S2	F
397	CH ₃	CH ₃	CH ₃	OH	O	S2	F
398	CH ₃	(CH ₂) ₃	CH ₃	H	O	S2	O
399	CH ₃	(CH ₂) ₃	CH ₃	OH	O	S2	O
400	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₃	H	O	S2	P
401	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₃	OH	O	S2	P

表 3U



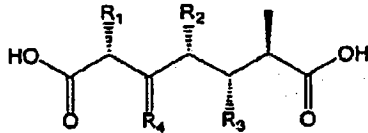
模块

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	LM	Mod1	Mod2
352	H	H	O	S1	B	A
353	H	H	CH ₃	S1	B	F
354	H	H	(CH ₂) ₃	S1	B	F
355	H	H	CH ₂ CH ₃	S1	B	P
356	H	H	H	S1	B	N
357	H	CH ₃	H	S1	I	A
358	H	CH ₃	CH ₃	S1	I	F
359	H	CH ₃	(CH ₂) ₃	S1	I	F
360	H	CH ₃	CH ₂ CH ₃	S1	I	P
361	H	CH ₃	H	S1	I	N
362	CH ₃	H	H	S2	B	A
363	CH ₃	H	CH ₃	S2	B	F
364	CH ₃	H	(CH ₂) ₃	S2	B	F
365	CH ₃	H	CH ₂ CH ₃	S2	B	P
366	CH ₃	H	H	S2	B	N
367	CH ₃	CH ₃	H	S2	I	A
368	CH ₃	CH ₃	CH ₃	S2	I	F
369	CH ₃	CH ₃	(CH ₂) ₃	S2	I	F
370	CH ₃	CH ₃	CH ₂ CH ₃	S2	I	P
371	CH ₃	CH ₃	H	S2	I	N

[0086]

[0087]

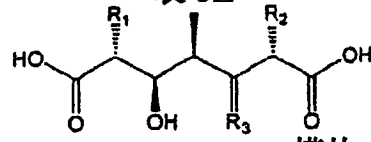
表 3X



模块

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	LM	Mod1	Mod2
382	H	H	H	O	S1	A	L
383	H	H	OH	O	S1	A	L
384	H	H	H	CH ₂	S1	N	L
385	H	H	OH	CH ₂	S1	N	L
386	H	CH ₃	H	O	S1	F	L
387	H	CH ₃	OH	O	S1	F	L
388	H	(CH ₂) ₃	H	O	S1	O	L
389	H	(CH ₂) ₃	OH	O	S1	O	L
390	H	CH ₂ CH ₃	H	O	S1	P	L
391	H	CH ₂ CH ₃	OH	O	S1	P	L
392	CH ₃	H	H	O	S2	A	L
393	CH ₃	H	OH	O	S2	A	L
394	CH ₃	H	H	CH ₂	S2	N	L
395	CH ₃	H	OH	CH ₂	S2	N	L
396	CH ₃	CH ₃	H	O	S2	F	L
397	CH ₃	CH ₃	OH	O	S2	F	L
398	CH ₃	(CH ₂) ₃	H	O	S2	O	L
399	CH ₃	(CH ₂) ₃	OH	O	S2	O	L
400	CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	O	S2	P	L
401	CH ₃	CH ₂ CH ₃	OH	O	S2	P	L

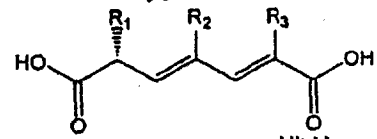
表 3Z



模块

	R ₁	R ₂	R ₃	LM	Mod1	Mod2
423	H	H	O	S1	G	A
424	H	CH ₃	O	S1	G	F
425	H	(CH ₂) ₃	O	S1	G	O
426	H	CH ₂ CH ₃	O	S1	G	P
427	H	H	CH ₂	S1	G	N
428	CH ₃	H	O	S2	G	A
429	CH ₃	CH ₃	O	S2	G	F
430	CH ₃	(CH ₂) ₃	O	S2	G	O
431	CH ₃	CH ₂ CH ₃	O	S2	G	P
432	CH ₃	H	CH ₂	S2	G	N

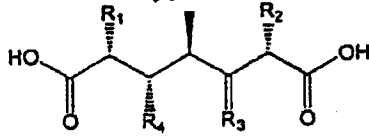
表 3AA



模块

	R ₁	R ₂	R ₃	LM	Mod1	Mod2
433	H	H	H	S1	D	D
434	H	H	CH ₃	S1	D	K
435	H	CH ₃	H	S1	K	D
436	H	CH ₃	CH ₃	S1	K	K
437	CH ₃	H	H	S2	D	D
438	CH ₃	H	CH ₃	S2	D	K
439	CH ₃	CH ₃	H	S2	K	D
440	CH ₃	CH ₃	CH ₃	S2	K	K

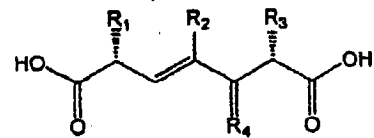
表 3Y



模块

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	LM	Mod1	Mod2
402	H	H	O	H	S1	L	A
403	H	CH ₃	O	H	S1	L	F
404	H	(CH ₂) ₃	O	H	S1	L	O
405	H	CH ₂ CH ₃	O	H	S1	L	P
406	H	H	CH ₂	H	S1	L	N
407	H	H	O	OH	S1	H	A
408	H	CH ₃	O	OH	S1	H	F
409	H	(CH ₂) ₃	O	OH	S1	H	O
410	H	CH ₂ CH ₃	O	OH	S1	H	P
411	H	H	CH ₂	OH	S1	H	N
412	CH ₃	H	O	H	S2	L	A
413	CH ₃	CH ₃	O	H	S2	L	F
414	CH ₃	(CH ₂) ₃	O	H	S2	L	O
415	CH ₃	CH ₂ CH ₃	O	H	S2	L	P
416	CH ₃	H	CH ₂	H	S2	L	N
417	CH ₃	H	O	OH	S2	L	A
418	CH ₃	CH ₃	O	OH	S2	L	F
419	CH ₃	(CH ₂) ₃	O	OH	S2	L	O
420	CH ₃	CH ₂ CH ₃	O	OH	S2	L	P
421	CH ₃	H	CH ₂	OH	S2	L	N

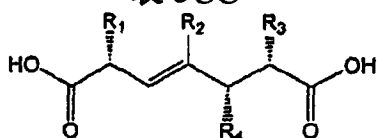
表 3BB



模块

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	LM	Mod1	Mod2
441	H	H	H	O	S1	D	A
442	H	H	CH ₃	O	S1	D	F
443	H	H	(CH ₂) ₃	O	S1	D	O
444	H	H	CH ₂ CH ₃	O	S1	D	P
445	H	CH ₃	H	O	S1	K	A
446	H	CH ₃	CH ₃	O	S1	K	F
447	H	CH ₃	(CH ₂) ₃	O	S1	K	O
448	H	CH ₃	CH ₂ CH ₃	O	S1	K	P
449	H	H	H	CH ₂	S1	K	N
450	H	CH ₃	H	CH ₂	S1	D	A
451	CH ₃	H	H	O	S2	D	F
452	CH ₃	H	CH ₃	O	S2	D	O
453	CH ₃	H	(CH ₂) ₃	O	S2	D	P
454	CH ₃	H	CH ₂ CH ₃	O	S2	D	A
455	CH ₃	CH ₃	H	O	S2	K	F
456	CH ₃	CH ₃	CH ₃	O	S2	K	O
457	CH ₃	CH ₃	(CH ₂) ₃	O	S2	K	P
458	CH ₃	CH ₃	CH ₂ CH ₃	O	S2	K	N
459	CH ₃	H	H	CH ₂	S2	D	A
460	CH ₃	CH ₃	H	CH ₂	S2	K	F

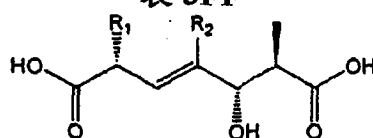
表 3CC



模块

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	LM	Mod1	Mod2
461	H	H	H	H	S1	D	E
462	H	H	H	OH	S1	D	C
463	H	H	CH ₃	H	S1	D	M
464	H	H	CH ₃	OH	S1	D	J
465	H	CH ₃	H	H	S1	K	E
466	H	CH ₃	H	OH	S1	K	C
467	H	CH ₃	CH ₃	H	S1	K	M
468	H	CH ₃	CH ₃	OH	S1	K	J
469	CH ₃	H	H	H	S2	O	D
470	CH ₃	H	H	OH	S2	D	C
471	CH ₃	H	CH ₃	H	S2	D	M
472	CH ₃	H	CH ₃	OH	S2	D	J
473	CH ₃	CH ₃	H	H	S2	K	E
474	CH ₃	CH ₃	H	OH	S2	K	C
475	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	S2	K	M
476	CH ₃	CH ₃	CH ₃	OH	S2	K	J

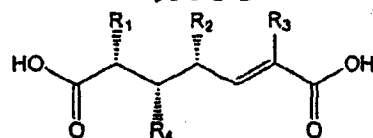
表 3FF



模块

	R ₁	R ₂	LM	Mod1	Mod2
493	H	H	S1	D	H
494	H	CH ₃	S1	K	H
495	CH ₃	H	S2	D	H
496	CH ₃	CH ₃	S2	K	H

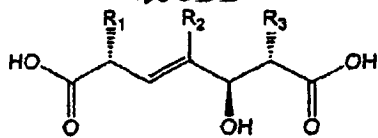
表 3GG



模块

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	LM	Mod1	Mod2
497	H	H	H	H	S1	E	D
498	H	H	CH ₃	H	S1	E	K
499	H	H	OH	OH	S1	C	D
500	H	H	CH ₃	OH	S1	C	K
501	H	CH ₃	H	H	S1	M	D
502	H	CH ₃	CH ₃	H	S1	M	K
503	H	CH ₃	H	OH	S1	J	D
504	H	CH ₃	CH ₃	OH	S1	J	K
505	CH ₃	H	H	H	S2	E	D
506	CH ₃	H	CH ₃	H	S2	E	K
507	CH ₃	H	H	OH	S2	C	D
508	CH ₃	H	CH ₃	OH	S2	C	K
509	CH ₃	CH ₃	H	H	S2	M	D
510	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	S2	M	K
511	CH ₃	CH ₃	H	OH	S2	J	D
512	CH ₃	CH ₃	CH ₃	OH	S2	J	K

表 3DD

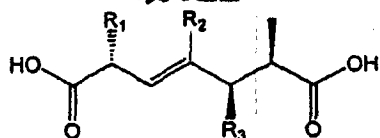


模块

[0088]

	R ₁	R ₂	R ₃	LM	Mod1	Mod2
477	H	H	H	S1	D	B
478	H	H	CH ₃	S1	D	I
479	H	CH ₃	H	S1	K	B
480	H	CH ₃	CH ₃	S1	K	I
481	CH ₃	H	H	S2	D	B
482	CH ₃	H	CH ₃	S2	D	I
483	CH ₃	CH ₃	H	S2	K	B
484	CH ₃	CH ₃	CH ₃	S2	K	I

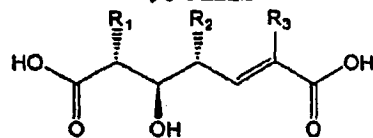
表 3EE



模块

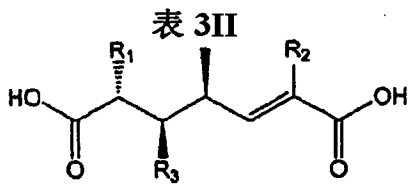
	R ₁	R ₂	R ₃	LM	Mod1	Mod2
485	H	H	H	S1	D	L
486	H	H	OH	S1	D	G
487	H	CH ₃	H	S1	K	L
488	H	CH ₃	OH	S1	K	G
489	CH ₃	H	H	S2	D	L
490	CH ₃	H	OH	S2	D	G
491	CH ₃	CH ₃	H	S2	K	L
492	CH ₃	CH ₃	OH	S2	K	G

表 3HH



模块

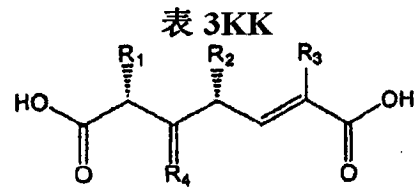
	R ₁	R ₂	R ₃	LM	Mod1	Mod2
513	H	H	H	S1	B	D
514	H	H	CH ₃	S1	B	K
515	H	CH ₃	H	S1	I	D
516	H	CH ₃	CH ₃	S1	I	K
517	CH ₃	H	H	S2	B	D
518	CH ₃	H	CH ₃	S2	B	K
519	CH ₃	CH ₃	H	S2	I	D
520	CH ₃	CH ₃	CH ₃	S2	I	K



模块

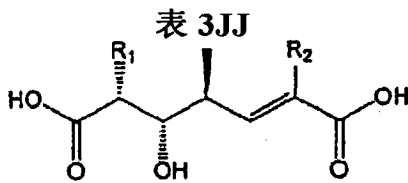
	R ₁	R ₂	R ₃	LM	Mod1	Mod2
521	H	H	H	S1	L	D
522	H	CH ₃	H	S1	L	K
523	H	H	OH	S1	G	D
524	H	CH ₃	OH	S1	G	K
525	CH ₃	H	H	S2	L	D
526	CH ₃	CH ₃	H	S2	L	K
527	CH ₃	H	OH	S2	G	D
528	CH ₃	CH ₃	OH	S2	G	K

[0089]



模块

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	LM	Mod1	Mod2
533	H	H	H	O	S1	A	D
534	H	H	CH ₃	O	S1	A	K
535	H	H	H	CH ₂	S1	N	D
536	H	H	CH ₃	CH ₂	S1	N	K
537	H	CH ₃	H	O	S1	F	D
538	H	CH ₃	CH ₃	O	S1	F	K
539	H	(CH ₂) ₃	H	O	S1	F	D
540	H	(CH ₂) ₃	CH ₃	O	S1	O	K
541	H	CH ₂ CH ₃	H	O	S1	P	D
542	H	CH ₂ CH ₃	CH ₃	O	S1	P	K
543	CH ₃	H	H	O	S2	A	D
544	CH ₃	H	CH ₃	O	S2	A	K
545	CH ₃	H	H	CH ₂	S2	N	D
546	CH ₃	H	CH ₃	CH ₂	S2	N	K
547	CH ₃	CH ₃	H	O	S2	F	D
548	CH ₃	CH ₃	CH ₃	O	S2	F	K
549	CH ₃	(CH ₂) ₃	H	O	S2	O	D
550	CH ₃	(CH ₂) ₃	CH ₃	O	S2	O	K
551	CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	O	S2	P	D
552	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₃	O	S2	P	K



模块

	R ₁	R ₂	LM	Mod1	Mod2
529	H	H	S1	H	D
530	H	CH ₃	S1	H	K
531	CH ₃	H	S2	H	D
532	CH ₃	CH ₃	S2	H	K

[0090] 来自聚酮化物合酶的长链二元酸

[0091] 聚酮化物骨架通过在生物合成中使用的各模块的两个碳原子而增加。使用图 2 中所示的引子和延长剂分子,可以通过杂化 PKS 而制备的可行的二元酸的数量示于表 4 中。每种都将仅保持单一对称分子(完全还原的二元酸);所有其他的是不对称的。

[0092] 表 4. 可来自图 2 示出的模块的聚酮化物的数量

[0093]

总的种类	延长剂分子的数量	聚酮化物链中的碳的数量	可行的分子的数量
二酮化物	1	5	32
三酮化物	2	7	512
四酮化物	3	9	8192
五酮化物	4	11	262144

[0094] 已经描述了本发明,提供下列实施例以通过示意性的方式而非通过限制性的方式来描述本发明。

[0095] 实施例 1

[0096] 二元酸的制备

[0097] 可以构建聚酮化物合酶,并将这些合酶引入到细菌 *Escherichia coli* (或另一种容易工程化的宿主) 中,使得从可再生的糖(例如葡萄糖)源,这种熟知的微生物可以制备任意数量的二元酸,所述二元酸可以代替由油或其他不可再生的原料制备的那些。

[0098] 在 *E. coli*, *S. cerevisiae* 或 *Streptomyces* 中可以制备下列二元酸: 1,5-戊二酸、1,7-庚二酸、2-甲基-1,5-戊二酸。

[0099] 上述列出的三种化合物需要构建杂化 PKS, 其含有两个“非自然”的接点, 和使加载域的 KSQ 片段除去或失活。“自然”PKS 可被修饰以制备二元酸。含有螺旋霉素 (标准参考物质) PKS 的加载域和模块 1 的 DNA 片段克隆到 *E. coli* 载体 pPRO1 8 (S. K. Lee, J. D. Keasling, *Appl Environ Microbiol* 71, 6856 (2005); 其通过引用的方式并入) 或 pET28B 中, 并且引入 DNA 片段, 所述 DNA 片段含有来自 *ery* PKS 或 *monC* II 基因的 TE 域, 所述 *ery* PKS 或 *monC* II 基因编码来自莫能菌素聚酮化物途径的 TE 功能 (B. M. Harvey et al., *ChemBiochem* 7, 1435 (2006); 其通过引用的方式并入) 模块 1 的下游中, 如图 5A 所示。片段使用 SLIC (不依赖于序列和连接酶的克隆) 方案来接合, 使得“瘢痕” (在结合点处改变的序列) 不会发生 (M. Z. Li, S. J. Elledge, *Nat Methods* 4, 251 (2007); 其通过引用的方式并入)。这种构建通过下列情况而正确地证实: 宿主 (*E. coli*) 产生 (3-羟基丁酸酯), 其使用 LCMS 分析针对可以市售获得的可靠的标准来进行。根据 El-Jaber et al. 的步骤, 图 5A 中示出的构建体被重新克隆或子克隆以在和图 5B 中所示的相同载体中消除所有或大多数对应于 KSQ 域的片段 (或使用脱羧基功能图的活性位点的定向突变), 并且检测各种构建体以制备二元酸 [19] (N. El-Jaber et al., *J Nat Prod* 66, 722 (2003); 其通过引用的方式并入) 以进行分离和纯化。所述结构通过 NMR 分析来证实。可选择地, 除了在 *E. coli* 中制备 [19], 图 5A 的各种构建体和图 5B 的各种构建体都子克隆到 *Streptomyces* 载体 pSET152 (整合) 和 pRJ446 (自动复制) 的衍生物中, 并将它们引入多种 *Streptomyces* 宿主 (例如 *S. coelicolor*, *S. lividans*, *S. fradiae*) 中以在这些构建体中制备 [19]。另外, 可以使用来自其他 PKS 体系 (例如寡霉素、匹马菌素) 的加载域-模块 1 片段以产生 [19] (作为 3-立体异构体), 从而证实二元酸的产生, 如果需要的话。这些方案应该产生预期的二元酸。本文中所述的 PKS 基因或者携带它们的宿主可得自美国典型微生物菌种保藏中心 (ATCC)。

[0100] 实施例 2

[0101] 1,5 戊二酸 [7] 的制备

[0102] 可以按照类型的试验途径 (如实施例 1 中所述) 来制备 [7]。由于没有连接利用丙二酸酯的加载域和延长剂模块 (含有丙二酸酯-特异性 AT 域 (mAT) 和全部还原域 (DH1ER, KR) 以产生 β -亚甲基中心 (图 10)) 的天然 PKS 系统, 因此构建“杂化”。使用来自实施例 1 的重新构建的加载域, 其在多种基因构建体中产生二元酸。这些包括融合至 DNA 片段, 所述 DNA 片段含有来自 *Streptomyces noursei* ATCC 11455 的制霉菌素 PKS 的模块 5 或模块 6, 或者含有来自 *Streptomyces avermitilis* 的寡霉素 PKS 的模块 3, 或者将多种模块的 DH 和 ER 域加到标准参考物质 PKS 的模块 1 中以能够全部还原, 从而制得所需要 β -亚甲基中心。可选择地, 可以使用含有加载域的片段从融合至模块 2 的 AT-ACP 片段的单一 PKS 通过模块 1 的 KS 域。这在加载域 ACP 和模块 1 的 KS 域之间保持保持同源性, 以及保持合适的模块间隔。第三种方案是使用直接编码模块 5 和 6 的制霉菌素 PKS 的片段, 其中除去或失活模块 5 的 KS 域, 从而能够使模块 5 起到加载域的作用。(还原域的存在不应该干涉其在随后对于模块 1 的浓缩中的应用) 这些构建体中的每种都连接至实施例 1 中所述的 TE 域, 并且置于合适的载体和宿主中, 然后用于检测以制备 [7]。本文中所述的 PKS 基因或携带它们的宿主可得自美国典型微生物菌种保藏中心。

[0103] 实施例 3**[0104] 1,7 庚二酸的制备 [10]**

[0105] [8] 的制备需要加入第二延长剂模块以制备三酮化物 - 二元酸。向需要制备 [7] 的最佳构建体中加入另外的模块,所述模块含有 mAT 域和在模块 1 和 TE 域之间的全部还原域,以制备图 6 中所示的杂化 PKS。

[0106] 实施例 4**[0107] 2- 甲基 -1,5- 戊二酸 [11] 的制备**

[0108] 可以使用两种选择性策略来制备 [22],如图 7 中所示。杂化 PKS 可以在加载域 (图 7A) 中或在延长剂域 (图 7B) 中使用甲基丙二酰基 - 特异性 AT 域 (mmAT)。pik PKS 的加载域和模块 4 (图 5) 含有 mmAT 域 (导致和对应的甲基侧链相同手性;[S]-2- 甲基 - 和 [S]-3- 甲基 -1,5- 戊二酸是相同的)。通过选择模块可以获得相反的手性。在 *E. coli* 中,通过引入来自 *Propionibacterium shermanii* 的基因 *mutA*,可以从琥珀酰 CoA 中制备高水平的 [2S]- 甲基丙二酰基 CoA (L. C. Dayem et al., *Biochemistry* 41,5193(2002);其通过引用的方式并入)。表达 *mutA* 的 *E. coli* 菌株是熟知的和容易获得的。

[0109] 实施例 5**[0110] 1g/l 的 1,5- 戊二酸的制备**

[0111] 验证了 [7] 生产的滴度、使用所述构建体的相同基础和使用两种构建体的其配对物正丁二酸 [6]。正丁二酸和 [7] 的生产之间的巨大不同表明修饰的加载域不能导致最佳利用率,或者在聚酮化物前端处的羧基抑制通过 PKS 的通量。构建体中的初始设计中的 mRNA 转录子的二级结构被检查以将其支配为较差表达的基础。加载域的大量重新构建可以尝试使 KSQ 域失活并寻找滴度增加。另外,可以体外使制备 [7] 的菌株的 PKS 构建体突变,将 DNA 重新引入宿主,并且测试数百种独立的分离物的滴度增加。

[0112] 如果初始评价在正 - 丁二酸和 [7] 的滴度方面没有表现出显著性差异,滴度的限制是由于涉及下列方面的因素:PKS DNA 在宿主中的表达;PKS 蛋白的周转;或底物的供应。可以使用“OMICS”方案以理解限制的基础(即转录子、蛋白和代谢物分析)。如果所述限制被发现,可以采取必要的步骤以将其修复(例如启动子的改变、酶的失活降解、宿主的改变、侧面途径的消除等)。

[0113] 实施例 6**[0114] 另外的二元酸的制备**

[0115] 已知多于一打的延长剂模块,所述延长剂模块在初期聚酮化物链中产生结构不同的引入的 2- 碳单元。差异来自 α - 甲基碳 (H、[R]- 甲基、[S]- 甲基、[S]- 乙基、[S]- 亚丙基等) 的侧链和 β - 羰基 (酮、[R]-OH、[S]-OH、烯基、亚甲基) 的还原度。使用丙二酰基 CoA 或甲基丙二酰基 CoA 作为引子,可以制备多于一打的二酮化物 - 二元酸和多于 250 种的三酮化物 - 二元酸。可以使用最容易获得的延长剂模块(例如其中模块已经被克隆并且用在另外的应用中,并且此处可以重新使用)制备 6-10 种二元酸或三元酸。图 8 中示出的化合物 [10、30、37、117、165、483] 表示可以制备的分子和它们的构建所需要的模块的例子。表 2A-F 和表 3A-KK 中教导了二酮化物 - 二元酸和三酮化物 - 二元酸的另外的例子。

[0116] 尽管已经参照特定的实施方案来描述了本发明,但是本领域技术人员应该理解在不偏离本发明的真实精神和范围的情况下,可以进行各种修改,并且可以替换等价物。另

外,可以进行多种改变以使特定的情况、材料、物质组成、过程、过程的一个步骤或多个步骤适应本发明的主题、精神和范围。所有这些修改旨在落入所附权利要求书的范围内。

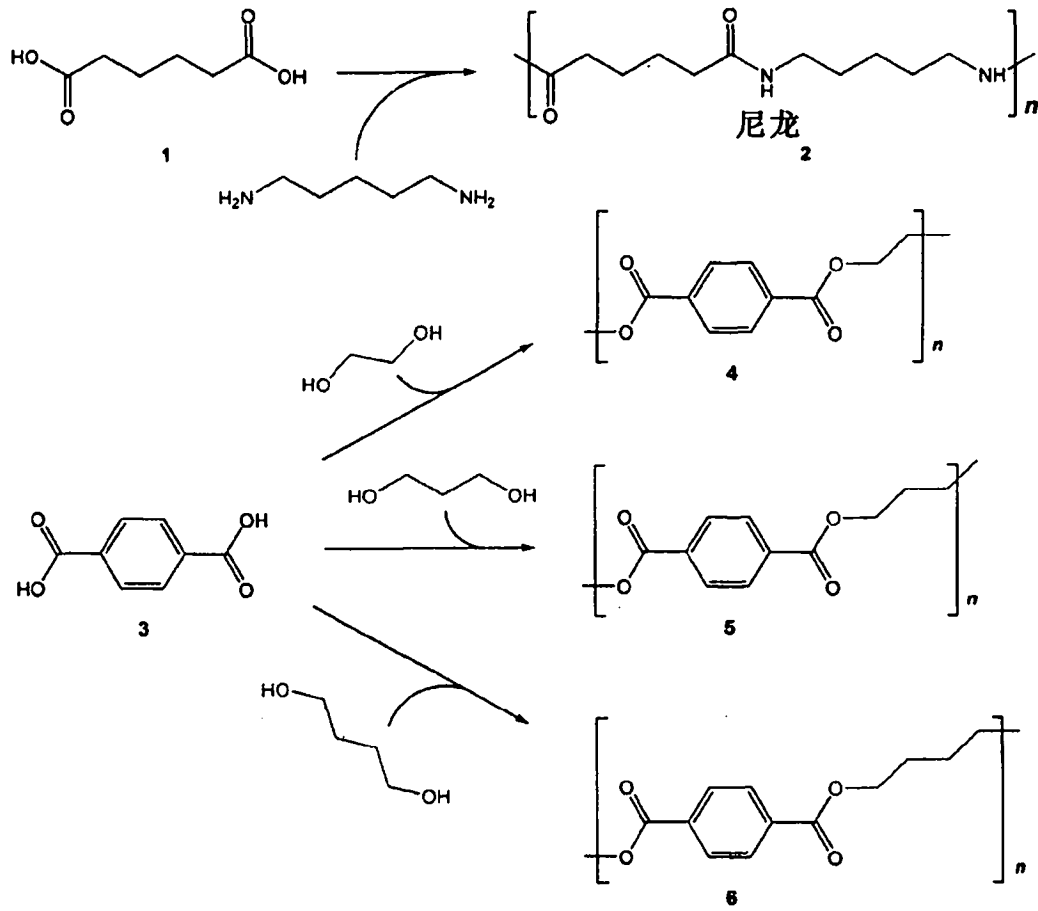


图 1

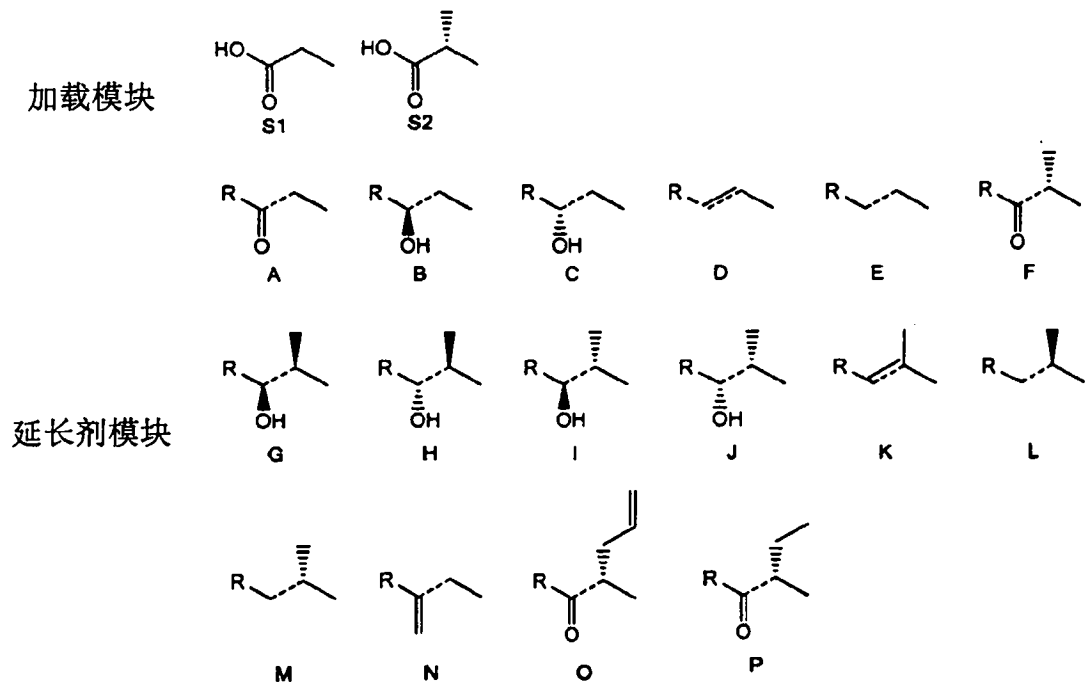


图 2

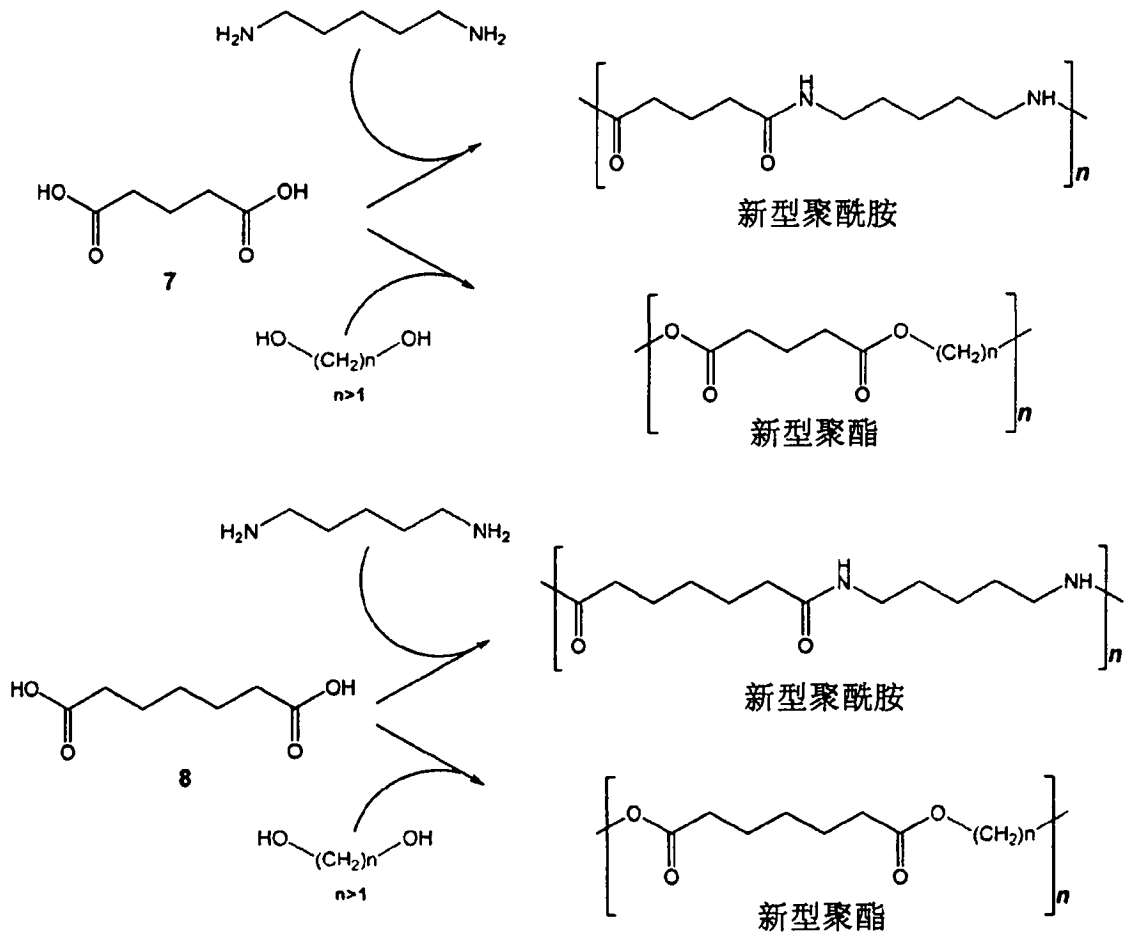


图 3

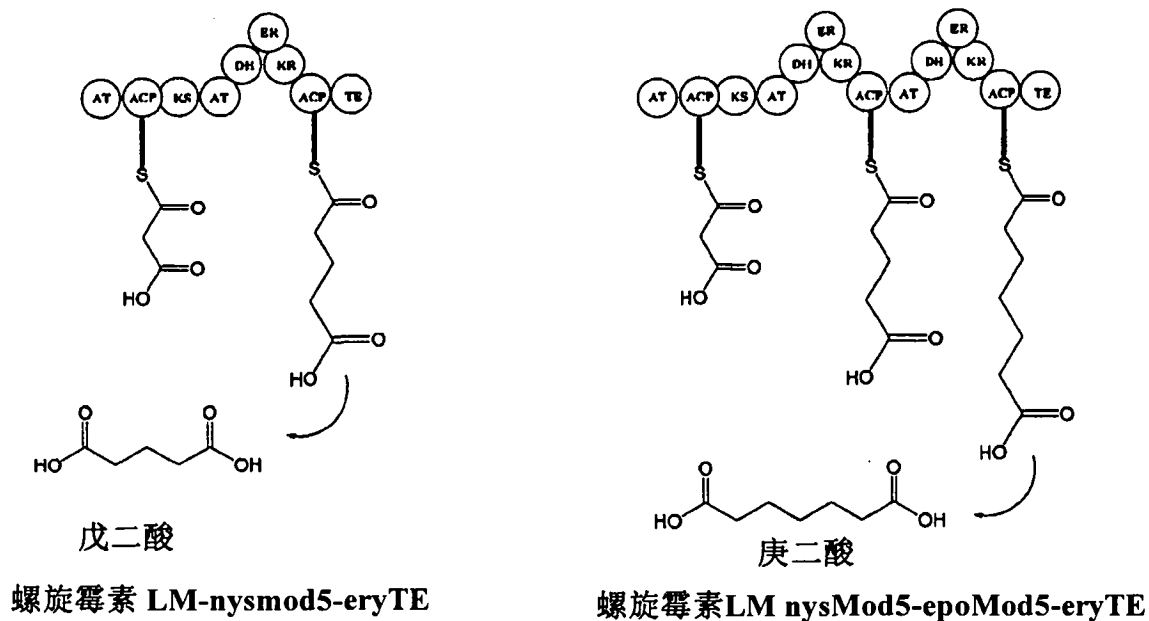


图 4

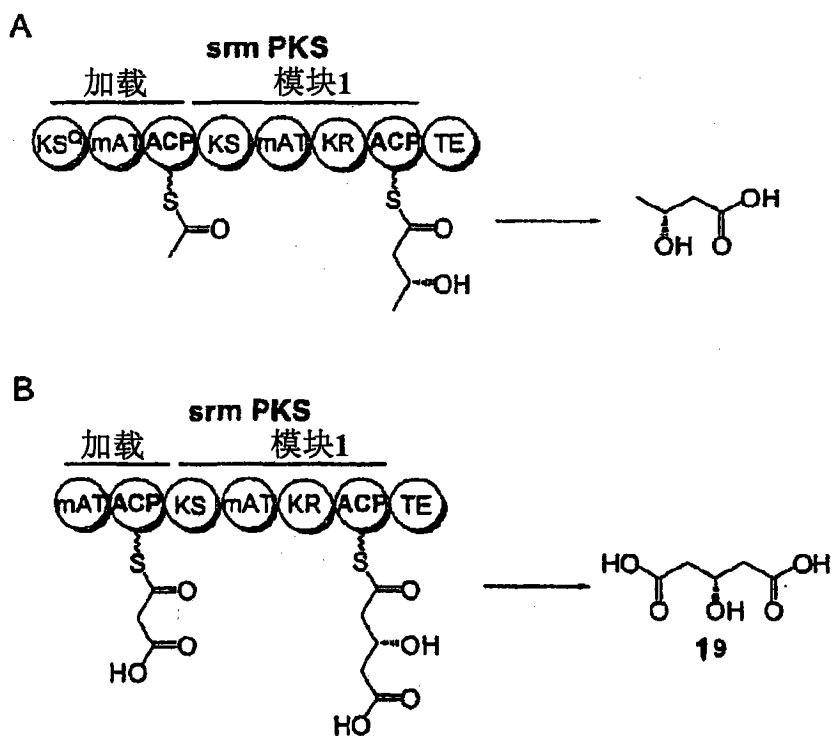


图 5

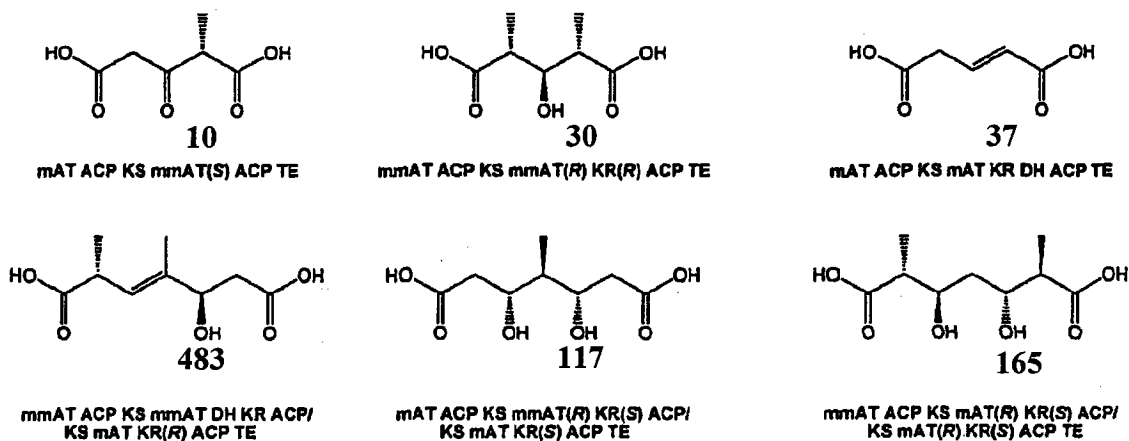


图 8

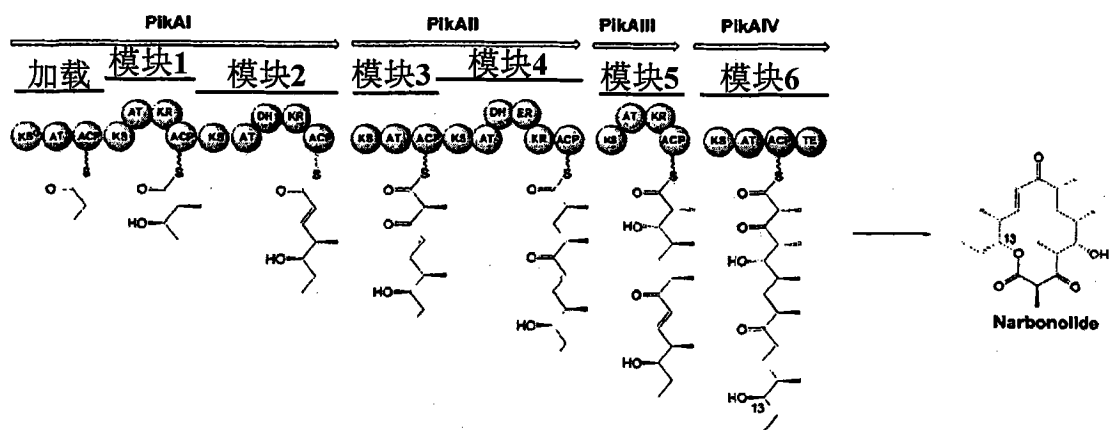


图 9

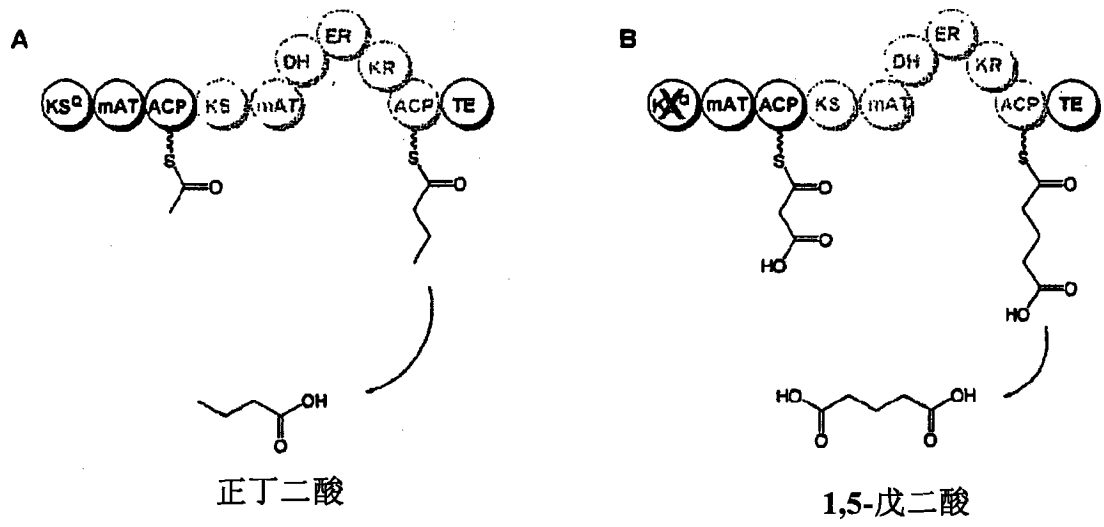


图 10