



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 283 344**

51 Int. Cl.:
C12N 15/76 (2006.01)
C07D 498/18 (2006.01)
A61K 31/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00990461 .6**
86 Fecha de presentación : **30.10.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1244800**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.10.2002**

54 Título: **Análogos de la rapamicina.**

30 Prioridad: **29.10.1999 US 162229 P**
20.04.2000 US 198578 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

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

72 Inventor/es: **Katz, Leonard;**
Liu, Lu y
Chung, Loleta, M.

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 283 344 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

Análogos de la rapamicina.

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona métodos recombinantes y materiales para producir policétidos novedosos por medio de la tecnología de ADN recombinante. La invención hace referencia a los campos de la agricultura, producción animal, química, química médica, medicina, biología molecular, farmacología, y tecnología veterinaria.

10 **Antecedentes de la invención**

Los policétidos representan una gran familia de diversos compuestos sintetizados a partir de unidades de 2 carbonos a través de una serie de condensaciones y modificaciones posteriores. Los policétidos existen en muchos tipos de organismos, incluyendo hongos y bacterias miceliales, en particular, actinomicetos. Existe una amplia variedad de estructuras de policétidos, y la clase de los policétidos abarca numerosos compuestos con actividades diversas. Eritromicina, FK-506, FK-520, megalomicina, narbomicina, oleandomicina, picromicina, rapamicina, espinocina, y la tilosina son ejemplos de tales compuestos. Dada la dificultad en la producción de compuestos policétidos mediante la metodología química tradicional, y la típicamente baja producción de policétidos en las células de tipo salvaje, existe un considerable interés por descubrir medios mejorados o alternativos para producir compuestos policétidos. Véanse las publicaciones PCT Núms. WO 93/13663; WO 95/08548; WO 96/40968; 97/02358; y 98/27203; Las patentes de los Estados Unidos Núms. 4.874.748; 5.063.155; 5.098.837; 5.149.639; 5.672.491; y 5.712.146; Fu *et al.*, 1994, *Biochemistry* 33: 9321-9326; McDaniel *et al.*, 1993, *Science* 262: 1546-1550; y Rohr, 1995, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34(8): 881-888.

Los policétidos son sintetizados en la naturaleza por las enzimas policétido sintasas (PKS). Estas enzimas, que son complejos de múltiples proteínas grandes, son similares a las sintasas que catalizan la condensación de unidades de 2 carbonos en la biosíntesis de ácidos grasos. Las enzimas PKS están codificadas por genes de PKS que normalmente constan de tres o más marcos de lectura abiertos (ORF). Se conocen dos tipos de enzimas PKS principales; estos difieren en su composición y modo de síntesis. Estos dos tipos principales de enzimas PKS son referidos comúnmente como enzimas PKS de Tipo I o “modular” y de Tipo 2 o “iterativo”.

Las PKS modulares son responsables de la producción de un gran número de antibióticos macrólidos de 12, 14, y 16 miembros incluyendo eritromicina, megalomicina, metimicina, narbomicina, oleandomicina, picromicina, y tilosina. Cada ORF de una PKS modular puede comprender uno, dos, o más “módulos” de actividad cetosintasa, cada uno de cuyos módulos consiste en al menos dos (si es un módulo de carga) y más típicamente tres (para el módulo de elongación más simple) o más actividades enzimáticas o “dominios”. Estas grandes enzimas funcionales (>300,000 kDa) catalizan la biosíntesis de macrolactonas de policétidos por medio de rutas de múltiples etapas que implican condensaciones descarboxilativas entre aciltioésteres seguidas de ciclos de actividades de transformación de carbonos β diversas (véase O'Hagan, D. *The polyketide metabolites*; E. Horwood: New York, 1991).

Durante la última media década, el estudio de la función y la especificidad de la PKS modular ha sido enormemente facilitado por el sistema de expresión en *Streptomyces coelicolor* basado en plásmidos desarrollado con los genes de la 6-desoxieritronolida B (6-dEB) sintasa (DEBS) (véase Kao *et al.*, 1994, *Science*, 265: 509-512, McDaniel *et al.*, 1993, *Science* 262:1546-1557, y las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.672.491 y 5.712.146). Las ventajas de este sistema genético basado en plásmidos para DEBS son que supera las técnicas tediosas y limitadas para la manipulación del organismo anfitrión de DEBS natural, *Saccharopolyspora erythraea*, permite una construcción más fácil de las PKS recombinantes, y reduce la complejidad del análisis de las PKS proporcionando un fondo de anfitrión “limpio”. Este sistema también acelera la construcción de la primera biblioteca combinatoria de policétidos modulares en *Streptomyces* (véase la Publicación PCT Núm. WO 98/49315).

La capacidad para controlar los aspectos de la biosíntesis de policétidos, tales como la selección de monómeros y el grado de tratamiento de los carbonos β , mediante manipulación genética de las PKS ha estimulado un gran interés en la ingeniería combinatoria de los antibióticos novedosos (véase Hutchinson, 1998, *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 319-329; Carreras y Santi, 1998, *Curr. Opin. Biotech.* 9: 403-411; y Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.712.146 y 5.672.491). Este interés ha dado como resultado la clonación, análisis, y manipulación mediante tecnología de ADN recombinante de los genes que codifican las enzimas PKS. La tecnología resultante permite manipular una agrupación de genes de PKS conocida o producir el policétido sintetizado por esa PKS a niveles superiores de los que existen en la naturaleza o en anfitriones que de otro modo no producen el policétido. La tecnología también permite producir moléculas que están estructuralmente relacionadas con, pero son distintas de, los policétidos producidos a partir de agrupaciones de genes de PKS conocidas.

La rapamicina es un policétido macrocíclico que es producido por *Streptomyces hygroscopicus* (ATCC 29253, NRRL 5491) y *Actinoplanes* sp. N902-109 (véase *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, Vol. 82, *Biotechnology of Antibiotics*; 2d Ed., ed. W.R. Strohl, Capítulo 17).

La rapamicina tiene actividades antifúngica, antitumoral, e inmunosupresora potente, y tiene un interés significativo para el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias y la prevención del rechazo de aloinjertos de órganos y piel (véase Schwecke *et al.*, Agosto 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7839-7845, y las referencias allí citadas). La actividad inmunosupresora surge de la capacidad de la rapamicina para evitar la respuesta proliferativa de las células T a la interleucina 2 unida al receptor de interleucina 2 (véase Schwecke *et al.*, *supra*). Por tanto, la rapamicina ofrece una excitante oportunidad para desarrollar nuevas clases de fármacos antifúngicos, antitumorales, e inmunosupresores.

El número y la diversidad de derivados de rapamicina ha sido limitado debido al número limitado de modificaciones químicas que se pueden realizar en la molécula compleja y a la no disponibilidad de células anfitrionas recombinantes que producen análogos de rapamicina. Los sistemas genéticos que resultan del diseño de genes biosintéticos de rapamicina serían valiosos para crear compuestos novedosos para aplicaciones farmacéuticas, agrícolas, y veterinarias. La producción de tales compuestos se obtendría más fácilmente si estuvieran disponibles células anfitrionas recombinantes que produjeran diversos análogos de rapamicina. En WO 98/54308 se hace referencia a la agrupación de genes de rapamicina y se describe el gen rapL, que está implicado en la formación del compuesto precursor ácido pipecólico. La desactivación del gen rapL permite introducir en el sistema precursores alternativos con el fin de producir ciertas variantes de rapamicina.

La presente invención satisface estas y otras necesidades.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona métodos recombinantes y materiales para expresar enzimas PKS y enzimas de modificación de policétidos derivadas en su totalidad o en parte de los genes biosintéticos de rapamicina en células anfitrionas recombinantes. La invención también proporciona los policétidos producidos por tales enzimas PKS. En la presente memoria se describen materiales recombinantes que comprenden ácidos nucleicos con secuencias de nucleótidos que codifican los genes biosintéticos de la rapamicina en los que al menos un dominio, módulo, o proteína codificada por un gen de PKS de rapamicina se ha suprimido, se ha vuelto inactivo mediante mutación, o se ha remplazado por una secuencia codificadora de un dominio, módulo o proteína diferente.

En una realización, la invención proporciona células anfitrionas recombinantes que producen un derivado de rapamicina o un análogo en particular 17-desmetilrapamicina. En una realización, el análogo de rapamicina es producido por una célula anfitriona recombinante que expresa una PKS híbrida que comprende toda o parte de la PKS de rapamicina y al menos una parte de una segunda PKS. En una realización preferida, la célula anfitriona es *Streptomyces hygroscopicus*.

La invención también proporciona policétidos novedosos, agentes antitumorales, agentes antifúngicos, inmunosupresores y otros compuestos útiles derivados de allí. Los compuestos de la invención también pueden ser utilizados en la fabricación de otro compuesto. Los compuestos de la invención pueden ser formulados en una mezcla o solución para la administración a un animal o ser humano.

Estas y otras realizaciones de la invención se describen con más detalle en la siguiente descripción, los ejemplos, y las reivindicaciones mostradas más abajo.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los módulos y dominios de DEBS.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona compuestos útiles en particular 17-desmetilrapamicina y células anfitrionas recombinantes. Según se utiliza en la presente memoria, el término recombinante hace referencia a un compuesto o composición producido por la intervención humana. En la presente memoria se describen compuestos de ADN recombinante que codifican todos o una porción de los genes biosintéticos de rapamicina. Asimismo se describen vectores de expresión recombinantes útiles en la producción de PKS de rapamicina y PKS híbridas formadas por una porción de la PKS de rapamicina en células anfitrionas recombinantes. La invención también proporciona los policétidos producidos por las PKS recombinantes y las enzimas de modificación de policétidos.

La rapamicina pertenece a la clase de policétidos de los productos naturales cuyos miembros tienen diversas propiedades estructurales y farmacológicas (véase Monaghan y Tkacz, 1990, *Annu. Rev. Microbiol.* 44: 271). La rapamicina es ensamblada por una enzima policétido sintasa (PKS). Estas enzimas median condensaciones sucesivas de monómeros tioéster con coenzima A activado derivados de pequeños ácidos orgánicos tales como acetato, propionato y butirato. Los sitios activos requeridos para la condensación incluyen una aciltransferasa (AT), proteína portadora de acilo (ACP), y beta-cetoacilsintasa (KS). Cada ciclo de condensación da como resultado un grupo β -ceto que se somete a todas, algunas, o ninguna de una serie de actividades de transformación. Los sitios activos que realizan estas reacciones incluyen una cetoreductasa (KR), deshidratasa (DH), y enoilreductasa (ER). De este modo, la ausencia de cualquier dominio de transformación beta-ceto da como resultado la presencia de una cetona, una KR sola da lugar a un hidroxilo, una KR y una DH dan como resultado un alqueno, mientras que una combinación KR, DH, y ER

ES 2 283 344 T3

conduce a una reducción completa hasta un alcanó. Tras el ensamblaje de la cadena de policétido, la molécula experimenta típicamente una o varias ciclaciones y una modificación post-PKS (p. ej., glicosilación, oxidación, acilación) para obtener el compuesto activo final.

5 Los macrólidos tales como la eritromicina y la rapamicina son sintetizados por PKS modulares (véase Cane *et al.*, 1998, *Science* 282: 63). Con fines ilustrativos, la PKS que produce el policétido eritromicina (6-desoxieritronolida B sintasa o DEBS; véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.824.513) se muestra en la Figura 1. La DEBS es el sistema PKS modular más caracterizado y ampliamente utilizado. La DEBS sintetiza el policétido 6-desoxieritronolida B (6-dEB). En las enzimas PKS modulares tales como DEBS, las etapas enzimáticas para cada ronda de condensación y reducción están codificadas en un único “módulo” del polipéptido (esto es, un módulo distinto para cada ciclo de condensación). La DEBS consiste en un módulo de carga y 6 módulos de elongación y un dominio de tioesterasa de terminación de la cadena (TE) en tres polipéptidos extremadamente grandes codificados por tres marcos de lectura abiertos. (ORF, denominados *eryAI*, *eryAII*, y *eryAIII*).

15 Cada una de las tres subunidades polipeptídicas de DEBS (DEBSI, DEBSII, y DEBSIII) contiene 2 módulos de elongación; DEBSI contiene adicionalmente el módulo de carga. Colectivamente, estas proteínas catalizan la condensación y la reducción apropiada de 1 unidad iniciadora de propionil CoA y 6 unidades elongadoras de metilmalonil CoA. Los módulos de elongación 1, 2, 5, y 6 contienen dominios KR; el módulo 4 contiene un grupo completo, KR/DH/ER, de dominios reductivos y deshidratasa; y el módulo 3 no contiene ningún dominio reductivo funcional. Después de la condensación y de las reacciones de deshidratación y reducción apropiadas, el intermedio unido a la enzima es lactonizado por la TE en el extremo del módulo de elongación 6 para formar 6-dEB.

Más concretamente, el módulo de carga de DEBS consiste en dos dominios, un dominio acil-transferasa (AT) y un dominio de proteína portadora de acilo (ACP). En otras enzimas PKS, el módulo de carga no está compuesto por una AT y una ACP pero en lugar de eso utiliza una KS inactivada, una AT, y una ACP. Esta KS inactivada se denomina en la mayoría de los casos KS^Q, donde la letra del superíndice es la abreviatura para el aminoácido, glutamina, que está presente en lugar de la cisteína del sitio activo requerida para la actividad. El dominio AT del módulo de carga reconoce un acil CoA concreto (propionilo para DEBS, que también puede aceptar acetilo) y lo transfiere en forma de un éster de tiol a la ACP del módulo de carga. Al mismo tiempo, la AT de cada uno de los módulos de elongación reconoce un CoA elongador concreto (metilmalonil para DEBS) y lo transfiere a la ACP de ese módulo para formar un tioéster. Una vez que la PKS es cebada con acil- y malonil-ACP, el grupo acilo del módulo de carga migra para formar un éster de tiol (trans-esterificación) en la KS del primer módulo de elongación; en esta fase, el módulo de elongación 1 posee un acil-KS y un metilmalonil ACP. El grupo acilo derivado del módulo de carga es anclado después covalentemente al carbono alfa del grupo malonilo para formar un enlace carbono-carbono, conducido por una descarboxilación concomitante, y generando un nuevo acil-ACP que tiene un esqueleto dos carbonos más largo que la unidad de carga (elongación o extensión). La cadena de policétido en crecimiento es transferida desde ACP a KS del siguiente módulo, y el proceso continúa.

La cadena de policétido, que crece dos carbonos cada módulo, se hace pasar sucesivamente en forma de un éster de tiol unido covalentemente de módulo en módulo, en un procedimiento de tipo cadena de ensamblaje. La cadena carbonada producida mediante este procedimiento sola poseería una cetona cada dos átomos de carbono, produciendo una policetona, de la cual procede el nombre de policétido. Comúnmente, no obstante, el grupo ceto beta de cada unidad de dos carbonos es modificado justo después de haber sido añadido a la cadena de policétido en crecimiento pero antes de ser transferido al siguiente módulo por una KR, una KR más una DH, o una KR, una DH, y una ER. Como se ha indicado antes, los módulos pueden contener también actividades enzimáticas adicionales.

Una vez que la cadena de policétido atraviesa el módulo de elongación final de una PKS, encuentra el dominio liberador o tioesterasa encontrado en el extremo carboxilo de la mayoría de las PKS. Aquí, el policétido es escindido de la enzima y ciclado. El policétido resultante puede ser modificado adicionalmente por medio de enzimas de adaptación o modificación; estas enzimas añaden grupos carbohidrato o grupos metilo, o realizan otras modificaciones, esto es, oxidación o reducción, sobre la molécula núcleo del policétido. Por ejemplo, las etapas finales en la conversión de 6-dEB en eritromicina A incluyen las acciones de numerosas enzimas de modificación, tales como: hidroxilación C-6, anclaje de los azúcares micarosa y desosamina, hidroxilación C-12 (que produce eritromicina C), y conversión de micarosa en cladinosa vía *O*-metilación.

Con esta visión de conjunto de la PKS DEBS, se puede apreciar mejor la PKS de rapamicina algo más compleja (RAPS para la rapamicina sintasa) y las enzimas de modificación de rapamicina. Los genes que codifican la PKS y las enzimas de modificación son referidos colectivamente en la presente memoria como agrupación de genes biosintéticos de la rapamicina. La agrupación de genes biosintéticos de rapamicina fue descrita primero por Schwecke *et al.*, *supra*. Esta referencia informó de que la PKS estaba compuesta por tres proteínas, RAPS1, RAPS2, y RAPS3, codificadas por tres genes, *rapA*, *rapB*, y *rapC*, respectivamente. RAPS1 comprendía el módulo de carga (también referido como dominio de carga) y cuatro módulos de elongación (1 a 4). RAPS2 codificaba seis módulos de elongación (5 a 10). RAPS3 codificaba cuatro módulos de elongación (11 a 14).

El módulo de carga de RAPS es algo más inusual que el de DEBS ya que comprende un dominio ligasa de coenzima A (CoA), un dominio ACP, y un dominio ER. El dominio CoA se une a un derivado de ácido shikímico (ácido (4R,5R)-4,5-dihidroxiclohex-1-enocarboxílico) que es reducido por el dominio ER para proporcionar la unidad iniciadora de ácido (1R,3R,4R)-dihidroxiclohexanocarboxílico.

ES 2 283 344 T3

Los módulos de elongación de RAPS comprenden todos los dominios KS, AT, y ACP. Las especificidades de los dominios AT y la presencia de los dominios KR, DH, y ER en cada uno de los módulos de elongación son identificadas en la siguiente tabla (véase Aparicio *et al.*, 1996, *Gene* 169: 9-16).

5

10

15

20

25

30

35

40

Módulo de elongación	Especificidad AT	Dominios KR, DH, y ER
1	Metilmalonil CoA	KR, DH, ER
2	Malonil CoA	KR (inactiva)
3	Metilmalonil CoA	KR, DH, ER
4	Metilmalonil CoA	KR, DH
5	Malonil CoA	KR
6	Metilmalonil CoA	KR (inactivo), DH
7	Metilmalonil CoA	KR, DH, ER
8	Malonil COA	KR, DH
9	Malonil CoA	KR, DH
10	Metilmalonil CoA	KR, DH
11	Malonil CoA	KR
12	Malonil CoA	KR
13	Metilmalonil CoA	KR, DH, ER
14	Malonil CoA	Ninguno

45

Como se describe más cuidadosamente más abajo, se pueden producir enzimas PKS novedosas que difieren de RAPS en que la especificidad de AT y/o la presencia o ausencia de los dominios KR, DH, y/o ER de al menos uno de los módulos de elongación es diferente.

50

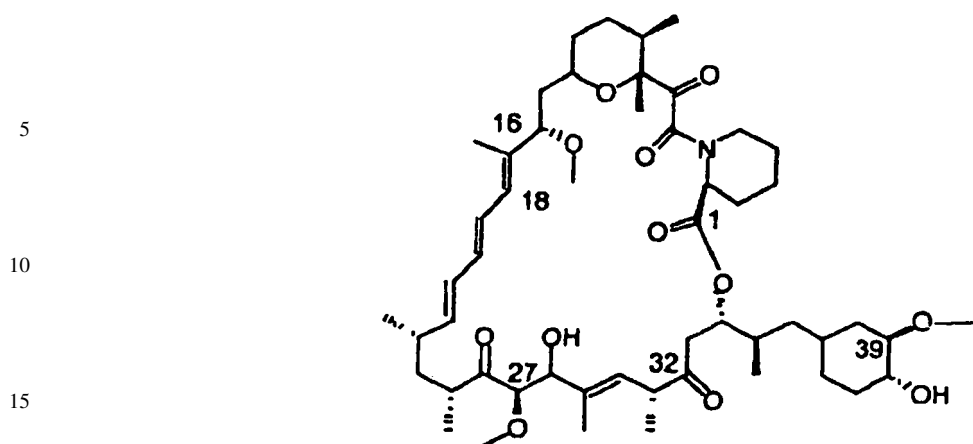
55

60

RAPS es también algo más inusual que DEBS ya que no contiene un dominio TE que cicle el policétido. En lugar de eso, en RAPS, la ciclación está mediada por el producto del gen *rapP*. De este modo, la cadena de policétido de la rapamicina es transferida de RAPS3 al grupo amino de un radical pipecolilo unido a RAPP, y el anillo de macrolactama es formado por el ataque del hidroxilo C-34 en el grupo carboxilo del radical pipecolilo. El radical pipecolilo está formado por una lisina ciclodesaminasa codificada por el gen *rapL* en la agrupación génica biosintética de la rapamicina. En la presente memoria se describen células anfitrionas recombinantes derivadas de células anfitrionas productoras de rapamicina en las que el gen de *rapL* se ha vuelto inactivo por una delección o mutación. Tales células anfitrionas pueden ser provistas después de ácido D,L-pipecólico, para elaborar rapamicina, o derivados de ácido pipecólico u otros compuestos susceptibles de servir como sustratos para el producto del gen *rapP*, para elaborar derivados de rapamicina. Tales células anfitrionas también pueden ser utilizadas para expresar derivados PKS de rapamicina (incluyendo aquellos formados por delección o inactivación de un dominio o dominios y aquellos formados por sustitución de un dominio o dominios por un dominio o dominios de una PKS heteróloga), de nuevo introduciendo ácido D,L-pipecólico, derivados de ácido pipecólico, u otros compuestos susceptibles de servir como sustratos para el producto del gen *rapP*. Tales otros compuestos incluyen, por ejemplo y sin limitación, L-prolina y sus derivados.

65

Una vez que se ha formado el anillo macrolactámico de rapamicina, otras numerosas enzimas de modificación de rapamicina actúan sobre el compuesto para formar rapamicina. Para facilitar el estudio de estas enzimas y los genes que las codifican, se muestra más abajo la estructura de la rapamicina.



20 Las enzimas de modificación de rapamicina metilan los grupos hidroxilo de C-16 y C-39 para formar los grupos metoxi C-16 y C-39, oxidan C-9 para formar el grupo ceto C-9, oxidan C-27 para formar un hidroxilo, y después metilan el hidroxilo de C-27 para formar el metoxi C-27.

25 Los genes que codifican estas enzimas de modificación también han sido clonados y caracterizados. Véase *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, Vol. 82, *supra*, y Molnar *et al.*, 1996, *Gene* 169:1-7.

30 De este modo, el producto del gen *rapI* metila el grupo hidroxilo C-39 para formar el grupo metoxi C-39. El producto del gen *rapJ* es una enzima P450 que oxida C-9 para formar el grupo ceto C-9. El producto del gen *rapN*, una enzima P450, y el producto del gen *rapO*, una ferredoxina, oxidan juntos C-27 para, en efecto, anclar un grupo hidroxilo a esa posición. Los productos de los genes *rapM* y *rapQ* son metiltransferasas que metilan los grupos hidroxilo C-16 y C-27.

35 En la presente memoria se describen células anfitrionas recombinantes que derivan de células anfitrionas productoras de rapamicina y difieren de ellas por la inactivación de uno o más de los genes *rapI*, *rapJ*, *rapM*, *rapN*, *rapO*, y *rapQ*. Como se ha mencionado antes, estas células también incluyen aquellas en las que el gen *rapL* también ha sido inactivado. Las células anfitrionas ilustrativas incluyen células anfitrionas derivadas de *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253 en las que se han inactivado los genes indicados: (i) *rapI*, (ii) *rapJ*, (iii) *rapM*, (iv) *rapQ*, (v) *rapN*, y *rapO*, (vi) *rapM*, *rapN*, *rapO*, (vii) *rapN*, *rapO*, y *rapQ*, (viii) *rapM*, *rapN*, *rapO*, y *rapQ*, y (ix) *rapL*, *rapM*, *rapN*, *rapO*, y *rapQ*. También se describen células anfitrionas que también expresan derivados de PKS de rapamicina, como se ha indicado antes y se ejemplifica más abajo.

40 Una célula anfitriona recombinante ilustrativa expresa una PKS de rapamicina recombinante en la cual el dominio 1 KS del módulo de elongación es inactivado por delección u otra mutación. La inactivación puede estar mediada por un cambio en el dominio KS que lo hace incapaz de unirse al sustrato (denominada mutación KS1°). Esta inactivación puede ser producida por una mutación en el codón para la cisteína del sitio activo que cambia el codón por otro codón, tal como un codón de alanina. Las células anfitrionas que expresan, o los extractos libres de células que contienen, una PKS que comprende la proteína codificada de ese modo pueden ser introducidas o suministradas con tioésteres de N-acilcisteamina de moléculas precursoras para preparar un policétido de interés. Véase la solicitud de Patente de los Estados Unidos con el Núm. de Serie 09/492.733, presentada el 27 de Enero de 2.000, y las publicaciones de patente PCT Núms. US99/03986 y US00/44717. Tales constructos KS1° son útiles en la producción de análogos de rapamicina que difieren de la rapamicina en la composición de la unidad iniciadora.

45 Las células anfitrionas recombinantes descritas en la presente memoria incluyen aquellas en las que las secuencias codificadoras para uno o más dominios o módulos de la PKS de rapamicina han sido suprimidas mediante recombinación homóloga. De este modo, se describen una variedad de células anfitrionas productoras de rapamicina modificada en las cuales uno o más de los genes biosintéticos de rapamicina han sido mutados o desorganizados. Estas células son útiles cuando se desea remplazar la función desorganizada por un producto génico expresado por un vector de expresión de ADN recombinante. Los vectores de expresión ilustrativos se describen con más detalle más abajo. Tales células anfitrionas pueden ser las células anfitrionas preferidas para expresar análogos de rapamicina. Las células anfitrionas particularmente preferidas de este tipo incluyen aquellas en las que la secuencia codificadora para el módulo de carga ha sido mutado o desorganizado, aquellas en las que uno o más de cualquiera de los ORF del gen de PKS ha sido mutado o desorganizado, y/o aquellas en las que los genes para una o más enzimas de modificación han sido mutados o desorganizados.

60 Si bien la presente invención proporciona células anfitrionas recombinantes útiles derivadas de células anfitrionas productoras de rapamicina tales como *Streptomyces hygroscopicus*, los análogos de rapamicina de la presente invención pueden ser producidos en anfitriones heterólogos mediante la expresión de todo o de una porción del gen biosintético de rapamicina. Se describen los métodos para la expresión heteróloga de uno o más de uno o más genes biosin-

téticos de rapamicina y vectores de expresión de ADN recombinante útiles en el método. Se considera que cualquier célula anfitriona distinta de una célula anfitriona productora de rapamicina de origen natural es una célula anfitriona heteróloga. De este modo, están incluidos los vectores de expresión recombinantes que incluyen tales ácidos nucleicos.

5 El término vector de expresión, según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un ácido nucleico que puede ser introducido en una célula anfitriona o un sistema de transcripción y traducción libre de células. Un vector de expresión puede ser mantenido permanentemente o transitoriamente en una célula, ya sea como parte del ADN cromosómico u otro ADN en la célula o en cualquier compartimento celular, tal como un vector replicante en el citoplasma. Un vector de expresión también comprende un promotor que conduce la expresión de un ARN,
10 que es traducido típicamente a un polipéptido en la célula o el extracto celular. Para la traducción eficaz del ARN a proteína, el vector de expresión también contiene típicamente una secuencia del sitio de unión al ribosoma situada aguas arriba del codón de iniciación de la secuencia codificadora del gen que va a ser expresado. También pueden estar presentes en el vector de expresión otros elementos, tales como intensificadores, secuencias señal de secreción, secuencias de terminación de la transcripción, y uno o más genes marcadores por los cuales pueden ser identificadas
15 y/o seleccionadas las células anfitrionas que contienen el vector. Se prefieren los marcadores seleccionables, esto es, genes que confieren resistencia o sensibilidad a antibióticos y confieren un fenotipo seleccionable a las células transformadas cuando las células se desarrollan en un medio selectivo apropiado.

Los diversos componentes de un vector de expresión pueden variar ampliamente, dependiendo del uso pretendido del vector y de la célula o las células anfitrionas en las cuales se pretende que el vector replique o conduzca la expresión. Los componentes del vector de expresión adecuados para la expresión de genes y el mantenimiento de vectores en *E. coli*, levadura, *Streptomyces*, y otras células utilizadas comúnmente son ampliamente conocidos y son asequibles comercialmente. Por ejemplo, los promotores adecuados para la inclusión en los vectores de expresión incluyen aquellos que funcionan en células anfitrionas eucarióticas y procarióticas. Los promotores pueden comprender secuencias reguladoras que permiten la regulación de la expresión en relación con el crecimiento de la célula anfitriona o que hacen que la expresión de un gen se efectúe o no se efectúe en respuesta a un estímulo químico o físico. Para *E. coli* y otras ciertas células anfitrionas bacterianas, se pueden utilizar promotores derivados de genes para enzimas biosintéticas, enzimas que confieren resistencia a antibióticos, y proteínas de fagos e incluyen, por ejemplo, los promotores de galactosa, lactosa (*lac*), maltosa, triptófano (*trp*), beta-lactamasa (*bla*), bacteriófago lambda PL, y T5. Además,
30 también se pueden utilizar los promotores sintéticos, tales como el promotor *tac* (Patente de los Estados Unidos Núm. 4.551.433).

De este modo, los vectores de expresión recombinante contienen al menos un sistema de expresión, que, a su vez, está compuesto por al menos una porción de PKS de rapamicina, otro gen biosintético de rapamicina o ambos que codifican secuencias conectadas operablemente a un promotor y opcionalmente secuencias de terminación que funcionan para efectuar la expresión de la secuencia codificadora en células anfitrionas compatibles. Las células anfitrionas son modificadas por transformación con vectores de expresión de ADN recombinante de la invención para que contengan las secuencias del sistema de expresión o bien en forma de elementos extracromosómicos o bien integrados en el cromosoma. Las células anfitrionas resultantes son útiles en los métodos para producir PKS y enzimas de modificación post-PKS así como policétidos y antibióticos y otros compuestos útiles derivados de allí.

Las células anfitrionas preferidas con el fin de seleccionar los componentes del vector para los vectores de expresión incluyen células anfitrionas fúngicas tales como células anfitrionas de levadura y procarióticas tales como *E. coli* y *Streptomyces*, pero también se pueden utilizar células anfitrionas de mamífero. En anfitriones tales como levaduras, plantas; o células de mamífero que normalmente no producen policétidos, puede ser necesario proporcionar, también típicamente mediante métodos recombinantes, holo-ACP sintetas adecuadas para convertir la PKS producida recombinantemente en funcional. La provisión de tales enzimas se describe, por ejemplo, en las publicaciones PCT Núms. WO 97/13845 y 98/27203. Las células anfitrionas particularmente preferidas para los fines de la presente invención son las células anfitrionas de *Streptomyces*, como se discute con más detalle más abajo.

50 En una realización preferida, los vectores de expresión se utilizan para construir una célula anfitriona de *Streptomyces* recombinante heteróloga que expresa una PKS recombinante. *Streptomyces* es un anfitrión conveniente para expresar policétidos, debido a que los policétidos son producidos naturalmente en ciertas especies de *Streptomyces*, y las células de *Streptomyces* generalmente producen los precursores necesarios para formar el policétido deseado. Los expertos en la técnica reconocerán que, si una célula anfitriona de *Streptomyces* produce cualquier porción de una enzima PKS o produce una enzima de modificación de policétido, el vector recombinante necesita conducir la expresión solamente de aquellos genes que constituyen el resto de la enzima PKS deseada u otras enzimas modificadoras de policétidos. De este modo, semejante vector puede comprender solamente un único ORF, constituyendo el resto de los polipéptidos deseados la PKS proporcionada por los genes del ADN cromosómico de la célula anfitriona.

60 Si *Streptomyces* u otra célula anfitriona produce normalmente policétidos, puede ser deseable modificar el anfitrión con el fin de evitar la producción de policétidos endógenos antes de su uso para expresar la PKS recombinante de la invención. Tales anfitriones modificados incluyen *S. coelicolor* CH999 y *S. lividans* modificado de un modo similar descrito en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.672.491, y en las publicaciones PCT Núms. WO 95/08548 y
65 WO 96/40968. En tales anfitriones, puede no ser necesario proporcionar actividades enzimáticas para todas las modificaciones post-traduccionales deseadas de las enzimas que elaboran la PKS producida recombinantemente, debido a que el anfitrión expresa naturalmente tales enzimas. En particular, estos anfitriones contienen generalmente holo-ACP sintetas que proporcionan el resto fosfopantoteínico necesario para la funcionalidad de la PKS.

En la presente memoria se describe una amplia variedad de vectores de expresión para su uso en *Streptomyces*. Los vectores de expresión replicante incluyen, por ejemplo y sin limitación, aquellos que comprenden un origen de replicación de un vector con un bajo número de copias, tal como SCP2* (véase Hopwood *et al.*, *Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory manual* (The John Innes Foundation, Norwich, U.K., 1985); Lydiate *et al.*, 1985, *Gene* 35: 223-235; y Kieser y Melton, 1988, *Gene* 65: 83-91), SLP1.2 (Thompson *et al.*, 1982, *Gene* 20: 51-62), y pSG5 (ts) (Muth *et al.*, 1989, *Mol. Gen. Genet.* 219: 341-348, y Bierman *et al.*, 1992, *Gene* 116: 43-49), o un vector con un elevado número de copias, tal como pJ101 y pJV1 (véase Katz *et al.*, 1983, *J. Gen. Microbiol.* 129:2703-2714; Vara *et al.*, 1989, *J. Bacteriol.* 171: 5782-5781; y Servin-Gonzalez, 1993, *Plasmid* 30: 131-140). No obstante, los vectores con un elevado número de copias no son preferidos para la expresión de genes grandes o genes múltiples. Para los vectores no replicantes e integrantes y generalmente para cualquier vector, es útil incluir al menos un origen de replicación de *E. coli*, tal como el de pUC, p1P, p1I, y pBR. Para los vectores basados en fagos, se pueden emplear el fago phiC31 y su derivado KC515 (véase Hopwood *et al.*, *supra*). Asimismo, el plásmido pSET152, el plásmido pSAM, los plásmidos pSE101 y pSE211, todos los cuales se integran de un modo específico del sitio en el ADN cromosómico de *S. lividans*, pueden ser empleados para los fines de la presente invención.

Los vectores de expresión recombinantes de *Streptomyces* comprenden típicamente uno o más marcadores seleccionables, incluyendo genes que confieren resistencia a antibióticos seleccionados del grupo que consiste en los genes que confieren resistencia *ermE* (confiere resistencia a eritromicina y lincomicina), *tsr* (confiere resistencia a tios-trepton), *aadA* (confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycin), *aacC4* (confiere resistencia a apramicina, kanamicina, gentamicina, geneticina (G418), y neomicina), *hyg* (confiere resistencia a higromicina), y *vph* (confiere resistencia a viomicina). Alternativamente, numerosos policétidos son coloreados naturalmente, y esta característica puede proporcionar un marcador incorporado para identificar células.

Las bacterias estreptomicetos han sido ampliamente utilizadas durante casi 50 años y son excelentes anfitriones para la producción de rapamicina y sus análogos. *Streptomyces lividans* y *S. coelicolor* han sido desarrollados para la expresión de sistemas PKS heterólogos. Estos organismos pueden mantener establemente genes PKS heterólogos clonados, expresarlos a elevados niveles en condiciones controladas, y modificar las correspondientes proteínas PKS (p. ej., fosfopantoteinilación) de manera que sean capaces de producir los policétidos que codifican. Además, estos anfitriones contienen las rutas necesarias para producir los sustratos requeridos para la síntesis de policétidos; p. ej., propionil-CoA y metilmalonil-CoA. Se encuentra disponible una amplia variedad de vectores de clonación y expresión para estos anfitriones, como son los métodos para la introducción y el mantenimiento estable de grandes segmentos de ADN foráneo. *S. lividans* y *S. coelicolor* crecen bien en numerosos medios y han sido adaptados a un elevado nivel de producción de policétidos en fermentadores. Si los niveles de producción son bajos, se encuentran disponibles numerosos enfoques racionales para mejorar el rendimiento (véase Hosted y Baltz, 1996, *Trends Biotechnol.* 14(7):245-50). También se pueden emplear métodos empíricos para incrementar los títulos de estos macrólidos, que han demostrado ser eficaces durante mucho tiempo para numerosos policétidos.

Las combinaciones de células anfitrionas de *Streptomyces*/vector incluyen células anfitrionas de *S. coelicolor* CH999 y *S. lividans* K4-114, que han sido modificadas con el fin de que no produzcan el policétido actinorhodina, y vectores de expresión derivados de los vectores pRM1 y pRM5, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.830.750 y en las solicitudes de patente de los Estados Unidos con los Núms. de Serie 08/828.898, presentada el 31 de Marzo de 1997, y 09/181.833, presentada el 28 de Oct. 1998. Estos vectores son particularmente preferidos ya que contienen promotores compatibles con numerosos y diversos *Streptomyces sp.* Los promotores particularmente útiles para las células anfitrionas de *Streptomyces* incluyen aquellas de las agrupaciones de genes de PKS que dan como resultado la producción de policétidos como metabolitos secundarios, incluyendo promotores de agrupaciones de genes de PKS aromáticas (Tipo II). Los ejemplos de promotores de agrupaciones de genes de PKS de Tipo II son los promotores del gen *act* y los promotores del gen *tcn*; un ejemplo de un promotor de la agrupación de genes de PKS de Tipo I son los promotores de los genes PKS y los genes DEBS de espiramicina. También se describen los promotores del gen biosintético de la rapamicina en forma recombinante. Estos promotores pueden ser utilizados para conducir la expresión de los genes biosintéticos de la rapamicina o cualquier otra secuencia codificadora de interés en células anfitrionas en las cuales funciona el promotor, concretamente *Micromonospora megalomicea* y generalmente cualquier especie de *Streptomyces*.

Como se ha descrito antes, las secuencias de control particularmente útiles son aquellas que solas o junto con sistemas reguladores adecuados activan la expresión durante la transición del crecimiento a la fase estacionaria en el micelio vegetativo. Es particularmente preferido el promotor contenido en el plásmido pRM5 mencionado antes, esto es, el par promotor *actII/actIII* y el gen activador *actII-ORF4*. Otros promotores de *Streptomyces* útiles incluyen sin limitación los del gen *ermE* y el gen *melC1*, que actúan constitutivamente, y el gen *tipA* y el gen *merA*, que pueden ser inducidos en cualquier fase de crecimiento. Además, el sistema de la ARN polimerasa de T7 ha sido transferido a *Streptomyces* y puede ser empleado en vectores adecuados y células anfitrionas de la invención. En este sistema, la secuencia codificadora para la ARN polimerasa de T7 es insertada en un sitio neutro del cromosoma o en un vector bajo el control del promotor *merA* inducible, y el gen de interés es colocado bajo el control del promotor de T7. Como se ha observado antes; se pueden emplear uno o más genes activadores para intensificar la actividad de un promotor. Los genes activadores además del gen *actII-ORF4* descrito antes incluyen los genes *dnrI*, *redD*, y *ptpA* (véase la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. de Serie 09/181.833, *supra*).

Para proporcionar una célula anfitriona y un vector preferidos, se colocan los genes biosintéticos de rapamicina en un vector de expresión recombinante y se transfieren a los anfitriones no productores de macrólidos *Streptomyces*

lividans K4-114 y *S. coelicolor* CH999. La transformación de *S. lividans* K4-114 o *S. coelicolor* CH999 con este vector de expresión da como resultado una cepa que produce cantidades detectables de rapamicina como se determina mediante análisis de los extractos mediante LC/MS. Se describen los compuestos de ADN recombinante en los cuales el dominio 1 KS del módulo de elongación de rapamicina codificada está inactivado. La introducción en *Streptomyces* *lividans* o *S. coelicolor* de un vector de expresión recombinante que codifica una PKS de rapamicina con un dominio KS1° produce una célula anfitriona útil para elaborar policétidos mediante un procedimiento conocido como alimentación de dicétidos. Las células anfitrionas resultantes pueden ser alimentadas o suministradas con tioésteres de N-acilcisteamina de moléculas precursoras para preparar análogos de rapamicina.

Las células anfitrionas recombinantes pueden expresar todos los genes biosintéticos de rapamicina o solamente un subgrupo de los mismos. Por ejemplo, si se expresan solamente los genes para la PKS de rapamicina en una célula anfitriona que de otro modo no produce enzimas modificadoras de policétidos que puedan actuar sobre el policétido producido, la célula anfitriona produce policétidos no modificados, denominados agliconas de macrólidos. Tales agliconas de macrólidos pueden ser modificadas añadiéndolas a la fermentación de una cepa tal como, por ejemplo, *Streptomyces hygroscopicus* que contiene las enzimas de modificación requisito. Existe una amplia variedad de organismos diversos que pueden modificar las agliconas de macrólidos para proporcionar compuestos con actividades útiles, o que pueden ser fácilmente modificados para que las tengan. Por ejemplo, *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces venezuelae*, *S. narbonensis*, *Micromonospora megalomicea*, *Streptomyces antibioticus*, *S. fradiae*, y *S. thermotolerans* contienen enzimas de modificación de policétidos.

Los métodos y constructos genéticos para producir los compuestos de la invención directamente en la célula anfitriona de interés se describen en la presente memoria. De este modo, los genes recombinantes, que incluyen los genes *rapA*, *rapB*, y *rapC* recombinantes con una o más deleciones y/o inserciones, incluyendo los remplazos de un fragmento del gen *rap* por un fragmento génico de un gen de PKS heterólogo pueden ser incluidos en los vectores de expresión adecuados para la expresión de los productos génicos codificados en células anfitrionas de *Streptomyces hygroscopicus*.

De este modo, se describen enzimas de PKS híbridas y las correspondientes células anfitrionas recombinantes que producen esas enzimas de PKS híbridas. Para los fines de la invención, una PKS híbrida es una PKS recombinante que comprende todos o parte de uno o más módulos de elongación y/o módulo de carga de la PKS de rapamicina y todos o parte de uno o más módulos de elongación y/o módulo de carga de una segunda PKS. La segunda PKS puede ser solamente una porción de una PKS que no es de rapamicina, tal como DEBS, FK-506 PKS, y FK-520 PKS. Los ejemplos ilustrativos de semejantes PKS híbridas se describen más abajo.

Los expertos en la técnica reconocerán que no se necesita aislar toda o parte de una PKS híbrida de una fuente de origen natural. Por ejemplo, solamente una pequeña porción de un dominio AT determina su especificidad. Véase la publicación de patente PCT Núm. WO US00/01838, y Lau *et al.*, *infra*. El estado de la técnica en la síntesis de ADN permite al artesano construir de *novo* compuestos de ADN de un tamaño suficiente para construir una porción útil de un módulo o dominio de PKS. De este modo, las secuencias que codifican el derivado deseado pueden ser sintetizadas utilizando los métodos de síntesis en fase sólida normalizados tales como los descritos por Jaye *et al.*, 1984, *J. Biol. Chem.* 259: 6331, y los aparatos para la síntesis automatizada son asequibles comercialmente, por ejemplo, de Applied Biosystems, Inc. Se considera que tales compuestos de ADN sintético son una porción de una PKS.

Una PKS híbrida puede resultar no solamente:

(i) de fusiones de secuencias codificadoras de un dominio heterólogo (donde heterólogo representa que los dominios de un módulo están derivados de al menos dos módulos de origen natural diferentes) para producir una secuencia codificadora de un módulo híbrido contenido en un gen de PKS cuyo producto es incorporado a PKS, si no también:

(ii) de fusiones de secuencias codificadoras de un módulo heterólogo (donde módulo heterólogo representa dos módulos que son adyacentes entre sí que no son adyacentes entre sí en las enzimas PKS de origen natural) para producir una secuencia codificadora híbrida contenida en un gen de PKS cuyo producto es incorporado a una PKS,

(iii) de la expresión de uno o más genes de PKS de rapamicina con uno o más genes de PKS que no son de rapamicina, incluyendo genes no de rapamicina tanto de origen natural como recombinantes, y

(iv) de combinaciones de los anteriores.

Más abajo se describen diversas PKS híbridas que ilustran estas diversas alternativas.

Asimismo se describen derivados de PKS de rapamicina que no contienen dominios, módulos, o proteínas de PKS no heterólogos, pero en lugar de ello derivados de PKS de rapamicina mediante la inactivación de al menos un dominio de al menos un módulo. Más abajo se proporcionan varios ejemplos de PKS derivadas de rapamicina.

La siguiente tabla muestra el análogo de rapamicina producido por la PKS de rapamicina híbrida o derivada. En cada caso, la célula anfitriona productora es *Streptomyces hygroscopicus*, y también se indican los genes de la enzima de modificación. Los análogos de rapamicina mostrados en la tabla son compuestos antifúngicos (se ejemplifica la 17-desmetilrapamicina; los otros análogos son con fines comparativos).

ES 2 283 344 T3

Compuesto/PKS

- 17,18-dihidrorapamicina/dominio ER insertado en módulo de elongación 10
- 5 19,20-dihidrorapamicina/dominio ER insertado en módulo de elongación 9
- 21,22-dihidrorapamicina/dominio ER insertado en módulo de elongación 8
- 17,18,19,20-tetrahidrorapamicina/dominio ER insertado en módulos de elongación 9 y 10
- 10 17,18,21,22-tetrahidrorapamicina/dominio ER insertado en módulos de elongación 8 y 10
- 19,20,21,22-tetrahidrorapamicina/dominio ER insertado en módulos de elongación 8 y 9
- 15 17,18,19,20,21,22-hexahidrorapamicina/dominio ER insertado en módulos de elongación 8, 9 y 10
- 16-desmetil-17,18-dihidrorapamicina/rapamicina 16-*O*-metiltransferasa desactivada; dominio ER insertado en módulo de elongación 10
- 20 16-desmetil-19,20-dihidrorapamicina/rapamicina 16-*O*-metiltransferasa desactivada; dominio ER insertado en módulo de elongación 9
- 16-desmetil-21,22-dihidrorapamicina/rapamicina 16-*O*-metiltransferasa desactivada; dominio ER insertado en módulo de elongación 8
- 25 16-desmetil-17,18,19,20-tetrahidrorapamicina/rapamicina 16-*O*-metiltransferasa desactivada; dominio ER insertado en módulos de elongación 9 y 10
- 16-desmetil-17,18,21,22-tetrahidrorapamicina/rapamicina 16-*O*-metiltransferasa desactivada; dominio ER insertado en módulos de elongación 8 y 10
- 30 16-desmetil-19,20,21,22-tetrahidrorapamicina/rapamicina 16-*O*-metiltransferasa desactivada; dominio ER insertado en módulo de elongación 10
- 35 16-desmetil-17,18,19,20,21,22-hexahidrorapamicina/rapamicina 16-*O*-metiltransferasa desactivada; dominio ER insertado en módulos de elongación 8, 9 y 10
- 17-desmetilrapamicina/remplazo de AT en el módulo de elongación 10
- 40 23-desmetilrapamicina/remplazo de AT en el módulo de elongación 7
- 17,23-didesmetilrapamicina/remplazos de AT en los módulos de elongación 7 y 10
- 17-desmetil-17,18-dihidrorapamicina/remplazo de AT en el módulo de elongación 10; dominio ER insertado en módulo de elongación 10
- 45 17-desmetil-19,20-dihidrorapamicina/remplazo de AT en el módulo de elongación 10; dominio ER insertado en módulo de elongación 9
- 50 17-desmetil-21,22-dihidrorapamicina/remplazo de AT en el módulo de elongación 10; dominio ER insertado en módulo de elongación 8
- 17-desmetil-17,18,19,20-tetrahidrorapamicina/remplazo de AT en el módulo de elongación 10; dominio ER insertado en módulos de elongación 9 y 10
- 55 17-desmetil-17,18,21,22-tetrahidrorapamicina/remplazo de AT en el módulo de elongación 10; dominio ER insertado en módulos de elongación 8 y 10
- 17-desmetil-19,20,21,22-tetrahidrorapamicina/remplazo de AT en el módulo de elongación 10; dominio ER insertado en módulos de elongación 8 y 9
- 60 17-desmetil-17,18,19,20,21,22-hexahidrorapamicina/remplazo de AT en el módulo de elongación 10; dominio ER insertado en módulos de elongación 8, 9 y 10
- 65 23-desmetil-17,18-dihidrorapamicina/remplazo de AT en el módulo de elongación 7; dominio ER insertado en módulo de elongación 10

ES 2 283 344 T3

23-desmetil-19,20-dihidrorapamicina/remplazo de AT en el módulo de elongación 7; dominio ER insertado en módulo de elongación 9

5 23-desmetil-21,22-dihidrorapamicina/remplazo de AT en el módulo de elongación 7; dominio ER insertado en módulo de elongación 8

23-desmetil-17,18,19,20-tetrahidrorapamicina/remplazo de AT en el módulo de elongación 7; dominio ER insertado en módulos de elongación 9 y 10

10 23-desmetil-17,18,21,22-tetrahidrorapamicina/remplazo de AT en el módulo de elongación 7; dominio ER insertado en módulos de elongación 8 y 10

15 23-desmetil-19,20,21,22-tetrahidrorapamicina/remplazo de AT en el módulo de elongación 7; dominio ER insertado en módulos de elongación 8, y 9

23-desmetil-17,18,19,20,21,22-hexahidrorapamicina/remplazo de AT en el módulo de elongación 7; dominio ER insertado en módulos de elongación 8, 9 y 10

20 17,23-didesmetil-17,18-dihidrorapamicina/remplazos de AT en los módulos de elongación 7 y 10; dominio ER insertado en módulo de elongación 10

17,23-didesmetil-19,20-dihidrorapamicina/remplazos de AT en los módulos de elongación 7 y 10; dominio ER insertado en módulo de elongación 9

25 17,23-didesmetil-21,22-dihidrorapamicina/remplazos de AT en los módulos de elongación 7 y 10; dominio ER insertado en módulo de elongación 8

17,23-didesmetil-17,18,19,20-tetrahidrorapamicina/remplazos de AT en los módulos de elongación 7 y 10; dominio ER insertado en módulos de elongación 9 y 10

30 17,23-didesmetil-17,18,21,22-tetrahidrorapamicina/remplazos de AT en los módulos de elongación 7 y 10; dominio ER insertado en módulos de elongación 8 y 10

35 17,23-didesmetil-19,20,21,22-tetrahidrorapamicina/remplazos de AT en los módulos de elongación 7 y 10; dominio ER insertado en módulos de elongación 8 y 9

17,23-didesmetil-17,18,19,20,21,22-hexahidrorapamicina/remplazos de AT en los módulos de elongación 7 y 10; dominio ER insertado en módulos de elongación 8, 9 y 10

40 19-metilrapamicina/remplazo de AT en el módulo de elongación 9 por el dominio AT del módulo de elongación 2 de DEBS o el módulo de elongación 6 de DEBS

19,20-del-rapamicina/supresión del módulo de elongación 9

45 18-hidroxirapamicina/supresión del dominio DH del módulo de elongación 10

18-cetorapamicina/supresión de los dominios KR y DH del módulo de elongación 10

50 rapamicina saturada en la posición 18/remplazo del dominio DH y KR del módulo de elongación 10 por los dominios KR, DH, y ER del módulo de elongación 4 de DEBS

55 Los métodos recombinantes para la manipulación de los genes de PKS modulares para elaborar enzimas PKS híbridas se describen en las Patentes de los Estados Unidos 5.672.491; 5.843.718; 5.830.750; y 5.712.146; y en las publicaciones PCT Núms. 98/49315 y 97/02358.

60 Se han utilizado numerosas estrategias de ingeniería genética con DEBS para demostrar que las estructuras de los policétidos pueden ser manipuladas para producir productos naturales novedosos, principalmente análogos de las eritromicinas (véanse las publicaciones de patente referidas *supra* y Hutchinson, 1998, *Curr Opin Microbiol.* 1:319-329, y Baltz, 1998, *Trends Microbiol.* 6:76-83. Estos métodos pueden ser aplicados fácilmente a los genes de PKS de rapamicina recombinante.

65 Estas técnicas incluyen: (i) delección o inserción de módulos para controlar la longitud de la cadena, (ii) inactivación de dominios de reducción/deshidratación para evitar las etapas de transformación del carbono beta, (iii) sustitución de los dominios AT para alterar las unidades iniciadoras y de elongación, (iv) adición de dominios de reducción/deshidratación para introducir actividades catalíticas, y (v) sustitución de dominios de ceto-reductasa KR para controlar la estereoquímica de los grupos hidroxilo. Además, se han utilizado mutantes de DEBS bloqueados diseñados para la biosíntesis dirigida por precursores de análogos que incorporan unidades iniciadoras derivadas sintéticamente. Por ejemplo, se produjeron más de 100 policétidos novedosos diseñando cambios individuales y combi-

ES 2 283 344 T3

natorios en múltiples módulos de DEBS. Las enzimas PKS híbridas basadas en DEBS con hasta tres sustituciones en los dominios catalíticos fueron construidas mediante mutagénesis con casete, en la cual diversos dominios de DEBS fueron remplazados por dominios de la PKS de rapamicina (véase Schweke *et al.*, 1995, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92, 7839-7843) o uno o más de los dominios KR de DEBS fueron suprimidos. Los remplazos o las deleciones de un único dominio funcional fueron combinados para generar enzimas DEBS con sustituciones de dominios catalíticos dobles y triples (véase McDaniel *et al.*, 1999, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96,1846-1851).

Los métodos para generar bibliotecas de policétidos han sido enormemente mejorados clonando genes de PKS en forma de un grupo de tres o más plásmidos mutuamente seleccionables, portando cada uno un gen de PKS de tipo salvaje o mutante diferente, introduciendo después todas las posibles combinaciones de los plásmidos con las secuencias codificadoras de PKS de tipo salvaje, mutantes, e híbridas en el mismo anfitrión (véase Pub. PCT Núm. 98/27203 y solicitud PCT Núm. US00/10021). Este método también puede incorporar el uso de un mutante KS1, que puede producir mediante biosíntesis mutacional policétidos elaborados a partir de unidades iniciadoras de dicétidos (véase Jacobsen *et al.*, 1997, *Science* 277, 367-369), así como el uso de un gen truncado que conduce a macrólidos de 12 miembros o un gen elongado que conduce a cetólidos de 16 miembros. Por otra parte, utilizando además uno o más vectores que codifican genes de enzimas de modificación de policétidos, se puede preparar una gran colección de policétidos modificados.

En la siguiente Tabla se enumeran referencias que describen genes de PKS ilustrativos y las enzimas correspondientes que pueden ser utilizadas en la construcción de las PKS híbridas recombinantes y los correspondientes compuestos de ADN que las codifican. Asimismo se presentan varias referencias que describen enzimas adaptadoras y los correspondientes genes que pueden ser empleados según los métodos descritos en la presente memoria.

25 *Avermectina*

Patente de los Estados Unidos Núm. 5.252.474 de Merck.

MacNeil *et al.*, 1993, *Industrial Microorganisms: Basic y Applied Molecular Genetics*, Baltz, Hegeman, & Skatrud, eds. (ASM), págs. 245-256, A Comparison of the Genes Encoding the Polyketide Synthases for Avermectin, Erythromycin, y Nemadectin.

MacNeil *et al.*, 1992, *Gene* 115:119-125, Complex Organization of the *Streptomyces avermitilis* genes encoding the avermectin polyketide synthase.

35 *Candicidina (FR008)*

Hu *et al.*, 1994, *Mol. Microbiol.* 14:163-172.

40 *Epotilon*

Pub. PCT Núm. 00/031247 de Kosan

45 *Eritromicina*

Pub. PCT Núm. 93/13663 de Abbott.

Patente de los Estados Unidos Núm. 5.824.513 de Abbott.

Donadio *et al.*, 1991, *Science* 252:675-9.

Cortes *et al.*, 8 Nov. 1990, *Nature* 348:176-8, An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*.

60 *Enzimas de Glicosilación*

Pub. de la Solicitud de Patente PCT Núm. 97/23630 de Abbott.

65 *FK-506*

Motamedi *et al.*, 1998, The biosynthetic gene cluster for the macrolactone ring of the immunosuppressant FK506, *Eur. J. biochem.* 256: 528-534.

ES 2 283 344 T3

Motamedi et al., 1997, Structural organization of a multifunctional polyketide synthase involved in the biosynthesis of the macrolide immunosuppressant FK506, *Eur. J. Biochem.* 244: 74-80.

5 *Metiltransferasa*

Patente de los Estados Unidos 5.264.355, presentada el 23 Nov. 1993, Metilating enzyme from *Streptomyces* MA6858. 31-O-desmetil-FK506 metiltransferase.

10 **Motamedi et al.**, 1996, Characterization of metiltransferase and hidroxilase genes involved in the biosynthesis of the immunosuppressants FK506 y FK520, *J. Bacteriol.* 178: 5243-5248.

15 *FK-520*

Pub. PCT Núm. 00/020601 de Kosan.

Véase también **Nielsen et al.**, 1991, *Biochem.* 30:5789-96 (enzimología de la incorporación de pipercolato).

20

Lovastatina

Patente de los Estados Unidos Núm. 5.744.350 de Merck.

25

Narbomicina (y Picromicina)

Pub. PCT Núm. 99/61599 de Kosan.

30

Nemadectina

MacNeil et al., 1993, *supra*.

35

Nidamicina

Kakavas et al., 1997, Identification and characterization of the niddamycin polyketide synthase genes from *Streptomyces caelestis*, *J. Bacteriol.* 179: 7515-7522.

40

Oleandomicina

45 **Swan et al.**, 1994, Characterisation of a *Streptomyces antibioticus* gene encoding a type I polyketide synthase which has an unusual coding sequence, *Mol. Gen. Genet.* 242: 358-362.

Pub. PCT Núm. 00/026349 de Kosan.

50 **Olano et al.**, 1998, Analysis of a *Streptomyces antibioticus* chromosomal region involved in oleandomycin biosynthesis, which encodes two glycosyltransferases responsible for glycosylation of the macrolactone ring, *Mol. Gen. Genet.* 259(3): 299-308.

55 *Platenolida*

Pub. de la Solicitud de Patente EP Núm. 791.656 de Lilly.

60 *Rapamicina*

Schwecke et al., Aug. 1995, The biosynthetic gene cluster for the polyketide rapamycin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7839-7843.

65 **Aparicio et al.**, 1996, Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase, *Gene* 169: 9-16.

ES 2 283 344 T3

Rifampicina

August et al., 13 Feb. 1998, Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the *rif* biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S669, *Chemistry & Biology*, 5(2): 69-79.

Sorafeno

Patente de los Estados Unidos Núm. 5.716.845 de Novartis.

Schupp et al., 1995, *J. Bacteriology* 177: 3673-3679. A *Sorangium cellulosum* (Myxobacterium) Gene Cluster for the Biosynthesis of the Macrolide Antibiotic Sorafen A: Cloning, Characterization, y Homology to Polyketide Synthase Genes from Actinomycetes.

Espiramicina

Patente de los Estados Unidos Núm. 5.098.837 de Lilly.

Gen Activador

Patente de los Estados Unidos Núm.

Patente de los Estados Unidos Núm. 5.514.544 de Lilly.

Tilosina

Pub. EP Núm. 791.655 de Lilly.

Kuhstoss et al., 1996, *Gene* 183:231-6., Production of a novel polyketide through the construction of a hybrid polyketide synthase.

Patente de los Estados Unidos Núm. 5.876.991 de Lilly.

Enzimas Adaptadoras

Merson-Davies y Cundliffe, 1994, *Mol. Microbiol.* 13: 349-355. Analysis of five tylosin biosynthetic genes from the *tylBA* region of the *Streptomyces fradiae* genome.

Como se ilustra en la Tabla anterior, existe una amplia variedad de genes de PKS que sirven como fuentes fácilmente asequibles de ADN e información de la secuencia para su uso en la construcción de ADN que codifica PKS híbrida.

Al construir las PKS híbridas, pueden ser provechosos ciertos métodos generales. Por ejemplo, a menudo es beneficioso conservar el marco del módulo que se va a alterar para elaborar la PKS híbrida. De este modo, si se desea añadir funcionalidades DH y ER a un módulo, a menudo se prefiere remplazar el dominio KR del módulo original por un segmento que contiene un dominio KR, DH, y ER de otro módulo, en lugar de insertar simplemente los dominios DH y ER. Se puede alterar la especificidad estereoquímica de un módulo por remplazo del dominio KS por un dominio KS de otro módulo que especifique una estereoquímica diferente. Véase Lau *et al.*, 1999, "Dissecting the role of acyltransferase domains of modular polyketide synthases in the choice y stereochemical fate of extender units" *Biochemistry* 38(5):1643-1651. Se puede alterar la especificidad de un dominio AT cambiando solamente un pequeño segmento del dominio. Véase Lau *et al.*, *supra*. También se puede sacar ventaja de regiones ligadoras conocidas en las proteínas PKS para ligar módulos de dos PKS diferentes para crear una PKS híbrida. Véase Gokhale *et al.*, 16 Apr. 1999, "Dissecting y Exploiting Intermodular Communication in Polyketide Synthases", *Science* 284:482-485.

Los compuestos de ADN que codifican PKS híbridas pueden ser y a menudo son híbridos de más de dos genes PKS. Incluso cuando solamente se utilizan dos genes, a menudo hay dos o más módulos en el gen híbrido en el cual todo o parte del módulo deriva de un segundo (o tercer) gen de PKS.

Asimismo se describen bibliotecas de genes de PKS, proteínas PKS, y por último, de policétidos, que son construidos generando modificaciones en la PKS de rapamicina de manera que los complejos de proteína producidos tengan actividades alteradas en uno o más aspectos y de este modo produzcan policétidos distintos del producto natural de la PKS. De este modo utilizando este método se pueden preparar policétidos novedosos, o los policétidos en general preparados más fácilmente. Proporcionando un gran número de genes diferentes o agrupaciones de genes derivadas de una agrupación de genes de PKS de origen natural, cada una de las cuales ha sido modificada de un modo diferente a

partir de la agrupación nativa, se puede producir una biblioteca combinatoria eficaz de policétidos como resultado de las múltiples variaciones de estas actividades. Como se describirá adicionalmente más abajo, los confines y límites de esto se pueden describir a nivel de policétido, proteína, y secuencia de nucleótidos codificadora.

5 Como se ha descrito antes, una PKS modular “derivada de” rapamicina u otra PKS de origen natural incluye una PKS modular (o su correspondiente gen o genes codificadores) que conserva el andamiaje de la porción utilizada del gen de origen natural. No todos los módulos necesitan estar incluidos en los constructos; no obstante, los constructos también pueden comprender más de 14 módulos de elongación. En el andamiaje constante, al menos una actividad enzimática es mutada, suprimida, remplazada, o insertada con el fin de alterar la actividad de la PKS resultante en
10 relación con la PKS original (nativa). La alteración se produce cuando estas actividades son suprimidas o son remplazadas por una versión diferente de la actividad, o simplemente mutadas de tal manera que resulte de estas actividades colectivas un policétido distinto del producto natural. Esto se produce debido a que ha habido una alteración resultante de la unidad iniciadora y/o la unidad de elongación, la estereoquímica, la longitud de la cadena o la ciclación, y/o el resultado del ciclo de reducción o deshidratación en una posición correspondiente en el policétido producto. Cuando
15 una actividad suprimida es remplazada, el origen de la actividad de remplazo puede venir de la correspondiente actividad de una PKS de origen natural diferente o de una región diferente de la PKS de rapamicina. Se pueden incluir cualquiera o todos los genes de PKS de rapamicina en el derivado o se pueden incluir porciones de cualquiera de estos, pero el andamiaje de una proteína PKS funcional se conserva en cualquier derivado que se construya.

20 De este modo, una PKS derivada de la PKS de rapamicina incluye una PKS que contiene el andamiaje de toda o de una porción de la PKS de rapamicina. La PKS derivada también contiene al menos dos módulos de elongación que son funcionales, preferiblemente tres módulos de elongación, y más preferiblemente cuatro o más módulos de elongación, y muy preferiblemente 14 módulos de elongación. La PKS derivada también contiene mutaciones, deleciones, inserciones, o remplazos de una o más de las actividades de los módulos funcionales de la PKS de rapamicina de manera
25 que la naturaleza del policétido resultante sea alterada a niveles tanto de proteína como de secuencia de ADN. Las realizaciones particularmente preferidas incluyen aquellas en las que un dominio KS, AT, o ACP ha sido suprimido o remplazado por una versión de la actividad de una PKS diferente o de otra localización dentro de la misma PKS. Asimismo se prefieren derivados en los que al menos una actividad enzimática del ciclo de condensación (KR, DH, o ER) ha sido suprimida o añadida o en los que cualquiera de estas actividades ha sido mutada con el fin de cambiar la estructura del policétido sintetizado por la PKS.
30

De este modo, existen al menos cinco grados de libertad para construir una PKS híbrida en términos del policétido que será producido. Primero, la longitud de la cadena de policétido se determina por el número de módulos de elongación en la PKS y se han descrito PKS híbridas que contienen 14, así como menos o más de 14, módulos de
35 elongación. Segundo, la naturaleza del esqueleto carbonado de la PKS se determina mediante las especificidades de las acilo transferasas que determinan la naturaleza de las unidades de elongación en cada posición, p. ej., malonilo, metilmalonilo, etilmalonilo, u otro malonilo sustituido. Tercero, la especificidad del módulo de carga también tiene un efecto sobre el esqueleto carbonado resultante del policétido. El módulo de carga puede utilizar una unidad iniciadora diferente. Como se ha observado antes, otro método para variar la especificidad del módulo de carga implica inactivar la actividad de la KS en el módulo de elongación 1 (KS1) proporcionar sustratos alternativos que sean análogos sintetizados químicamente de los productos del módulo de elongación 1, para el módulo de elongación 2. Este enfoque fue ilustrado en las publicaciones PCT Núms. 97/02358 y 99/03986, en las que la actividad de KS1 era inactivada por medio de una mutación. Cuarto, el estado de oxidación de las diversas posiciones del policétido será determinado por las porciones deshidratasa y reductasa de los módulos. Esto determinará la presencia y localización de los radicales
40 cetona y alcohol y los dobles enlaces C-C o los enlaces sencillos C-C del policétido. Finalmente, la estereoquímica del policétido resultante es una función de tres aspectos de la sintasa. El primer aspecto está relacionado con la especificidad AT/KS asociada con los malonilos sustituidos como unidades de elongación, lo que afecta a la estereoquímica solamente cuando se está perdiendo el ciclo reductor o cuando contiene solamente una cetorreductasa, ya que la deshidratasa anularía la quiralidad. Segundo, la especificidad de la cetorreductasa puede determinar la quiralidad de cualquier OH beta. Finalmente, la especificidad de la enoilreductasa para los malonilos sustituidos como unidades de elongación puede influir en la estereoquímica cuando hay un KR/DH/ER completo disponible.
45
50

De este modo, los sistemas de PKS modulares en general y el sistema de PKS de rapamicina en particular permiten sintetizar una amplia gama de policétidos. En comparación con los sistemas de PKS aromáticos, los sistemas de PKS
55 modulares aceptan una amplia gama de unidades iniciadoras, incluyendo monómeros alifáticos (acetilo, propionilo, butirilo, isovalerilo, etc.), aromáticos (aminohidroxibenzoilo), alicíclicos (ciclohexanoilo), y heterocíclicos (tiazolilo). Ciertas PKS modulares tienen una especificidad relajada para sus unidades iniciadoras (Kao *et al.*, 1994, *Science, supra*). Las PKS modulares también muestran una variedad considerable con respecto a la elección de unidades de elongación en cada ciclo de condensación. El grado de beta-cetorreducción siguiente a la reacción de condensación puede ser alterado mediante manipulación genética (Donadio *et al.*, 1991, *Science, supra*; Donadio *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7119-7123). Del mismo modo, el tamaño del policétido producto se puede variar diseñando mutantes con el número de módulos apropiado (Kao *et al.*, 1994, *J. Am. Chem. Soc.* 116:11612-11613). Por último, las enzimas PKS modulares son particularmente bien conocidas para generar una gama impresionante de centros asimétricos en sus productos de una manera muy controlada. Los policétidos, antibióticos, y otros compuestos producidos
60 son típicamente formas estereoisoméricas sencillas. Aunque los compuestos de la invención pueden existir en forma de mezclas de diastereoisómeros, puede ser beneficioso en algunos casos generar estereoisómeros individuales. De este modo, el potencial combinatorio dentro de las rutas de la PKS modular basadas en andamiajes de PKS modulares de origen natural, tales como la rapamicina, es virtualmente ilimitado.
65

Si bien las PKS híbridas son producidas muy a menudo “mezclando y emparejando” porciones de secuencias codificadoras de PKS, también pueden ser utilizadas para introducir, alterar, o suprimir una actividad en el polipéptido codificado. Las mutaciones pueden ser realizadas en las secuencias nativas utilizando mecanismos convencionales. Los sustratos para la mutación pueden ser una agrupación de genes completa o solamente uno o dos de ellos; el sustrato para la mutación también pueden ser porciones de uno o más de estos genes. Las técnicas de mutación incluyen preparar oligonucleótidos sintéticos que incluyen las mutaciones e insertar la secuencia mutada en el gen que codifica una subunidad de PKS utilizando la digestión con una endonucleasa de restricción. Véase, p. ej., Kunkel, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 448; Geisselsoder *et al.*, 1987, *BioTechniques* 5:786: Alternativamente, las mutaciones pueden ser efectuadas utilizando un cebador desemparejado (generalmente 10-20 nucleótidos de longitud) que hibride con la secuencia de nucleótidos nativa, a una temperatura por debajo de la temperatura de fusión del dúplex desemparejado. El cebador se puede hacer específico manteniendo la longitud del cebador y la composición de bases dentro de límites estrechos y manteniendo la base mutante localizada centralmente. Véase Zoller y Smith, 1983, *Methods Enzymol.* 100:468. La elongación del cebador se efectúa utilizando ADN polimerasa, el producto clonado, y clones que contienen el ADN mutado; derivados por segregación de la hebra elongada del cebador, seleccionada. La identificación se puede lograr utilizando el cebador mutante como sonda de hibridación. La técnica también es aplicable para generar mutaciones multi-puntuales. Véase, p. ej., Dalbie-McFarland *et al.*, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6409. También se puede utilizar la mutagénesis mediante PCR para efectuar las mutaciones deseadas.

La mutagénesis al azar de porciones seleccionadas de las secuencias de nucleótidos que codifican las actividades enzimáticas también se puede completar mediante diversos mecanismos diferentes conocidos en la técnica, p. ej., insertando al azar un ligador oligonucleotídico en un plásmido, mediante irradiación con rayos X o luz ultravioleta, mediante incorporación de nucleótidos incorrectos durante la síntesis de ADN *in vitro*, mediante mutagénesis por PCR propensa a errores, mediante preparación de mutantes sintéticos, o dañando el ADN plasmídico *in vitro* con productos químicos. La mutagénesis química incluye, por ejemplo, bisulfito de sodio, ácido nitroso, nitrosoguanidina, hidroxilamina, agentes que dañan o separan bases evitando de ese modo el emparejamiento de bases normal tal como hidrazina o ácido fórmico, análogos de precursores nucleotídicos tales como 5-bromouracilo, 2-aminopurina, o agentes intercalantes de acridina tales como proflavina, acriflavina, quinacrina, y similares. Generalmente, el ADN plasmídico o los fragmentos de ADN son tratados con mutágenos químicos, transformados en *E. coli* y propagados en forma de una reserva o biblioteca de plásmidos mutantes.

Al construir una PKS híbrida, las regiones que codifican las correspondientes actividades enzimáticas, esto es, las regiones que codifican las correspondientes actividades de las diferentes PKS sintetas o de las diferentes localizaciones de la misma PKS, pueden ser recuperadas, por ejemplo, utilizando técnicas de PCR con cebadores apropiados. Por regiones que codifican la “correspondiente” actividad se quiere significar aquellas regiones que codifican el mismo tipo general de actividad. Por ejemplo, una actividad KR codificada en una localización de una agrupación de genes “corresponde” a una actividad que codifica KR en otra localización de la agrupación de genes o de una agrupación de genes diferente. De un modo similar, se podría considerar correspondiente un ciclo de reductasa completo. Por ejemplo, KR/DH/ER puede corresponder a una KR sola.

Si se va a realizar el remplazo de una región diana concreta en una PKS del anfitrión, este remplazo se puede llevar a cabo *in vitro* utilizando enzimas de restricción adecuadas. El remplazo también se puede efectuar *in vivo* utilizando técnicas recombinantes que implican secuencias homólogas que enmarcan el gen de remplazo en un plásmido donador y una región aceptora en un plásmido receptor. Tales sistemas, que implican ventajosamente plásmidos de diferentes sensibilidades a la temperatura se describe, por ejemplo, en la publicación PCT Núm. WO 96/40968. Los vectores utilizados para realizar las diversas operaciones para remplazar la actividad enzimática en los genes de PKS del anfitrión o para apoyar las mutaciones en estas regiones de los genes de la PKS del anfitrión pueden ser seleccionadas para que contengan secuencias de control conectadas operablemente a las secuencias codificadoras resultantes de tal manera que la expresión de las secuencias codificadoras se pueda efectuar en un anfitrión apropiado.

No obstante, también se pueden utilizar simples vectores de clonación. Si los vectores de clonación empleados para obtener genes de PKS que codifican PKS derivadas carecen de secuencias de control para la expresión conectadas operablemente a las secuencias de nucleótidos codificadoras, se insertan secuencias de nucleótidos en los vectores de expresión apropiados. Esto no necesita ser realizado individualmente, si no que se puede insertar una reserva de secuencias de nucleótidos codificadoras aisladas en los vectores de expresión, los vectores resultantes transformados o transfectados en células anfitrionas, y las células resultantes cultivadas en placa en colonias individuales. En la presente memoria se describe una variedad de compuestos de ADN recombinante en los que las diversas secuencias codificadoras de los dominios y módulos de la PKS de rapamicina están flanqueadas por sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de origen no natural.

Las diversas secuencias de nucleótidos de PKS pueden ser clonadas en uno o más vectores recombinantes en forma de casetes individuales, que separan elementos de control, o bajo el control de, p. ej., un único promotor. Las regiones codificadoras de subunidades de PKS pueden incluir sitios de restricción limítrofes para permitir la fácil delección e inserción de otras secuencias codificadoras de subunidades de PKS de manera que se puedan generar PKS híbridas. El diseño de semejantes sitios de restricción únicos es conocido por los expertos en la técnica y puede ser completado utilizando los mecanismos descritos antes, tales como la mutagénesis dirigida al sitio y la PCR.

Los vectores de expresión que contienen secuencias de nucleótidos que codifican una variedad de enzimas PKS para la producción de diferentes policétidos son transformados después en las células anfitrionas apropiadas para

construir la biblioteca. En un enfoque directo, una mezcla de tales vectores es transformada en células anfitrionas seleccionadas y las células resultantes son cultivadas en colonias individuales y seleccionadas para identificar los transformantes acertados. Cada colonia individual tiene la capacidad de producir una PKS sintasa concreta y por último un policétido concreto. Típicamente, habrá duplicaciones en algunas, la mayoría, o todas las colonias; el subgrupo de las colonias transformadas que contiene una PKS diferente en cada colonia miembros puede ser considerado una biblioteca. Alternativamente, los vectores de expresión pueden ser utilizados individualmente para transformar anfitriones, cuyos anfitriones transformados son ensamblados después en una biblioteca. Se encuentra disponible una variedad de estrategias para obtener una multiplicidad de colonias que contengan cada una una agrupación de genes de PKS derivada de la agrupación de genes del anfitrión de origen natural de manera que cada colonia de la biblioteca produzca una PKS diferente y por último un policétido diferente. El número de policétidos diferentes que son producidos por la biblioteca es típicamente al menos cuatro, más típicamente al menos diez, y preferiblemente al menos 20, y más preferiblemente al menos 50, reflejando números similares de agrupaciones de genes de PKS y productos de genes de PKS alterados diferentes. El número de miembros de la biblioteca se elige arbitrariamente; no obstante, los grados de libertad esbozados antes con respecto a la variación de las unidades iniciadoras, de elongación, la estereoquímica, el estado de oxidación, y la longitud de la cadena permite la producción de bibliotecas bastante grandes.

Los métodos para introducir vectores recombinantes en los anfitriones adecuados son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen típicamente el uso de CaCl_2 o agentes tales como otros cationes divalentes, lipofección, DMSO, transformación de protoplastos, infección, transfección, y electroporación. Las colonias productoras de policétidos pueden ser identificadas y aisladas utilizando mecanismos conocidos y los policétidos producidos pueden ser caracterizados adicionalmente. Los policétidos producidos por estas colonias pueden ser utilizados colectivamente en un panel para representar una biblioteca o pueden ser evaluados individualmente en cuanto a su actividad.

Las bibliotecas pueden ser consideradas de este modo a cuatro niveles: (1) una multiplicidad de colonias cada una con una secuencia codificadora de PKS diferente; (2) las proteínas producidas a partir de las secuencias codificadoras; (3) los policétidos producidos a partir de las proteínas ensambladas en una PKS funcional; y (4) los antibióticos o compuestos con otras actividades deseadas derivadas de los policétidos.

Las colonias de la biblioteca son inducidas a producir las sintasas relevantes y de este modo producir los policétidos relevantes para obtener una biblioteca de policétidos. Los policétidos secretados al medio pueden ser escrutados en cuanto a su unión a las dianas deseadas, tales como receptores, proteínas de señalización, y similares. Se pueden utilizar los sobrenadantes *per se* para el escrutinio, o se puede efectuar primero una purificación parcial o completa de los policétidos. Típicamente, semejantes métodos de escrutinio implican la detección de la unión de cada miembro de la biblioteca a un receptor o a otro ligando diana. La unión puede ser detectada directamente o a través de un análisis competitivo. Los medios para escrutar tales bibliotecas en cuanto a la unión son bien conocidos en la técnica. Alternativamente, los miembros policétidos individuales de la biblioteca pueden ser sometidos a ensayo frente a la diana deseada. En este evento, se pueden incluir más fácilmente los escrutinios en los que se mide la respuesta biológica de la diana. La actividad del antibiótico puede ser verificada utilizando análisis de escrutinio típicos tales como los expuestos por Lehrer *et al.*, 1991, en *J. Immunol. Meth.* 137:167-173.

Se describen los métodos para la preparación de un gran número de policétidos. Estos policétidos son compuestos útiles directamente y como intermedios en la formación de compuestos con actividad antifúngica, antitumoral, e inmunosupresora. Los métodos y las células anfitrionas recombinantes son útiles en la producción de policétidos. El compuesto de la invención puede ser producido haciendo crecer y fermentando las células anfitrionas de la invención en condiciones conocidas en la técnica para la producción de otros policétidos. El compuesto de la invención puede ser aislado de caldos de fermentación de estas células cultivadas y purificado mediante procedimientos normalizados.

El compuesto puede ser formulado fácilmente para proporcionar la composición farmacéutica de la invención. La composición farmacéutica de la invención puede ser utilizada en forma de una preparación farmacéutica, por ejemplo, en forma sólida, semisólida, o líquida. Esta preparación contendrá el compuesto de la invención en forma de un ingrediente activo mezclado con un portador o excipiente orgánico o inorgánico adecuado para la aplicación externa, entérica, o parenteral. El ingrediente activo puede ser compuesto, por ejemplo, con los portadores farmacéuticamente aceptables, no tóxicos para comprimidos, gránulos, cápsulas, supositorios, soluciones, emulsiones, suspensiones, y cualquier otra forma adecuada para su uso.

Los portadores que pueden ser utilizados incluyen agua, glucosa, lactosa, goma de acacia, gelatina, manitol, pasta de almidón, trisilicato de magnesio, talco, almidón de maíz, queratina, sílice coloidal, almidón de patata, urea, y otros portadores adecuados para su uso en la fabricación de preparaciones, en forma sólida, semi-sólida o licuada. Además, se pueden utilizar agentes coadyuvantes estabilizantes, espesantes, y colorantes y perfumes. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden ser utilizados con hidroxipropil-metilcelulosa esencialmente como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.916.138, o con un tensioactivo esencialmente como se describe en la publicación de patente EPO Núm. 428.169.

Las formas de dosificación oral pueden ser preparadas esencialmente como describen Hondo *et al.*, 1987, *Transplantation Proceedings XIX*, Supp. 6: 17-22.

ES 2 283 344 T3

Las formas de dosificación para la aplicación externa pueden ser preparadas esencialmente como se describe en la publicación de patente EPO Núm. 423.714.

5 El compuesto activo está incluido en la composición farmacéutica en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en el proceso de enfermedad o la afección.

10 Para el tratamiento de afecciones y enfermedades causadas por infección, cáncer, o trastorno autoinmunitario o para lograr la inmunosupresión, el compuesto de la invención puede ser administrado oralmente, tópicamente, parenteralmente, mediante pulverización por inhalación, o rectalmente en formulaciones unitarias de dosificación que contienen portadores, coadyuvantes, y vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales. El término parenteral, según se utiliza en la presente memoria, incluye inyecciones subcutáneas, e inyecciones intravenosas, intramusculares, e intraesternales o técnicas de infusión.

15 Los niveles de dosificación del compuesto de la invención son del orden de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal por día, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal por día. Los niveles de dosificación son útiles en el tratamiento de las afecciones indicadas antes (de aproximadamente 0,7 mg a aproximadamente 3,5 mg por paciente por día, suponiendo un paciente de 70 kg). Además, el compuesto de la invención puede ser administrado intermitentemente, esto es, a intervalos semi-semanales, semanales, semi-mensuales, o mensuales.

20 La cantidad de ingrediente activo que puede ser combinada con los materiales portadores para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del anfitrión tratado y del modo de administración concreto. Por ejemplo, una formulación destinada a la administración oral a humanos puede contener de 0,5 mg a 5 gm de agente activo compuesto con una cantidad apropiada y conveniente de material portador, que puede variar de aproximadamente 5 por ciento a aproximadamente 95 por ciento de la composición total. Las formas unitarias de dosificación contendrán generalmente de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 500 mg de ingrediente activo. Para la administración externa, el compuesto de la invención puede ser formulado, por ejemplo, en el intervalo de 0,0001% a 60% en peso, preferiblemente de 0,001% a 10% en peso, y muy preferiblemente de aproximadamente 0,005% a 0,8% en peso.

30 No obstante se entenderá, que el nivel de dosificación específico para cualquier paciente concreto dependerá de una variedad de factores. Estos factores incluyen la actividad del compuesto específico empleado; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, y la dieta del sujeto; el tiempo y la ruta de administración y la tasa de excreción del fármaco; que se emplee en el tratamiento una combinación de fármacos; y la gravedad de la enfermedad o afección concreta para la cual se solicita la terapia.

35 Habiendo proporcionado antes una descripción detallada de la invención, se dan los siguientes ejemplos con el fin de ilustrar la invención y no se deberán considerar una limitación del alcance de la invención o las reivindicaciones.

40 Ejemplo 1

Metodología General

45 *Cepas bacterianas, plásmidos, y condiciones de cultivo.* Se utilizó *Streptomyces coelicolor* CH999 descrito en WO 95/08548, publicada el 30 Marzo de 1995, o *S. lividans* K4-114, descrito por Ziermann y Betlach, Enero 99, Recombinant Polyketide Synthesis in *Streptomyces*: Engineering of Improved Host Strains, *BioTechniques* 26:106-110, como anfitrión de expresión. Las manipulaciones de ADN se realizaron en *Escherichia coli* XL1-Blue, asequible de Stratagene. *E. coli* MC1061 también es adecuada para su uso como anfitrión para la manipulación de plásmidos. Los plásmidos se hicieron pasar a través de *E. coli* ET12567 (*dam dcm hsdS Cm^r*) (MacNeil, 1988, *J. Bacteriol.* 170: 5607) para generar ADN no metilado antes de la transformación de *S. coelicolor* o *Saccharopolyspora erythraea*. Las cepas de *E. coli* se hicieron crecer en condiciones normalizadas. Las cepas de *S. coelicolor* se hicieron crecer en placas de agar R2YE (Hopwood *et al.*, *Genetic manipulation of Streptomyces. A laboratory manual.* The John Innes Foundation: Norwich, 1985).

55 Muchos de los vectores de expresión de la invención ilustrados en los ejemplos derivan del plásmido pRM5, descrito en WO 95/08548. Este plásmido incluye un replicón colEI, un replicón de *Streptomyces* SCP2* apropiadamente truncado, dos promotores *act* para permitir la clonación bidireccional, el gen que codifica el activador *actII-ORF4* que induce la transcripción de los promotores *act* durante la transición desde la fase de crecimiento a la fase estacionaria, y genes marcadores apropiados. Los sitios de restricción diseñados en el plásmido facilitan la construcción combinatoria de las agrupaciones de genes de PKS partiendo de casetes que codifican dominios individuales de PKS de origen natural. Cuando se utiliza el plásmido pRM5 para la expresión de una PKS, todos los genes biosintéticos relevantes pueden ser portados por el plásmido y por lo tanto susceptible de una fácil manipulación y mutagénesis en *E. coli*. Este plásmido también es adecuado para su uso células anfitrionas de *Streptomyces*. *Streptomyces* está genéticamente y fisiológicamente bien caracterizado y expresa las actividades subordinadas requeridas para la producción *in vivo* de la mayoría de los policétidos. El plásmido pRM5 utiliza el promotor *act* para la expresión del gen de PKS, de manera que los policétidos sean producidos de una manera de tipo metabolito secundario, aliviando de ese modo los efectos tóxicos de sintetizar compuestos potencialmente bioactivos *in vivo*.

Manipulación de ADN y organismos. Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la polimerasa de *Pfu* (Stratagene; también se puede utilizar la polimerasa de *Taq* de Perkin Elmer Cetus) en las condiciones recomendadas por el fabricante de la enzima. Se utilizaron mecanismos normalizados *in vitro* para las manipulaciones de ADN (Sambrook *et al.*: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Edición Actual)). Se transformó *E. coli* utilizando métodos basados en cloruro de calcio normalizados; también se puede utilizar un aparato de pulsos para *E. coli* de Bio-Rad y los protocolos proporcionados por Bio-Rad. *S. coelicolor* fue transformado mediante procedimientos normalizados (Hopwood *et al.*: *Genetic manipulation of Streptomyces. A laboratory manual*. The John Innes Foundation: Norwich, 1985), y dependiendo de qué marcador seleccionable se hubiera empleado, se seleccionaron los transformantes utilizando 1 mL de una capa de 1,5 mg/mL de tiosstrepton, 1 mL de una capa de 2 mg/mL de apramicina, o ambos.

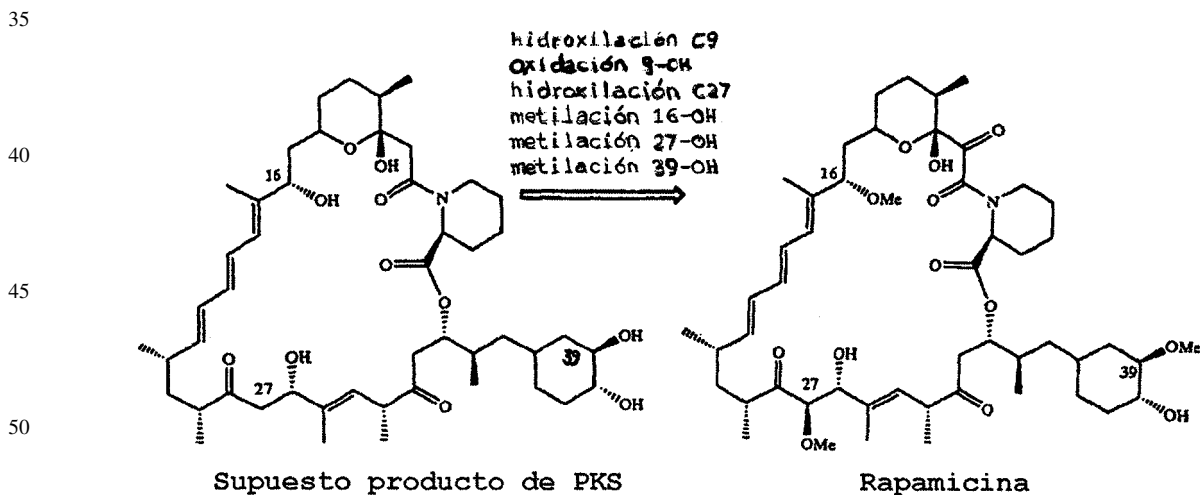
Ejemplo 2

Producción de 16-desmetil-27-desmetoxirapamicina (comparativo)

Se modificó *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253 para suprimir los genes *rapL*, *rapM*, *rapN*, *rapO*, y *rapQ* mediante el siguiente procedimiento. La célula anfitriona recombinante producida fue denominada *S. hygroscopicus* KOS020-70 y produce 16-desmetil-27-desmetoxirapamicina. Este compuesto tiene una actividad inmunosupresora inferior a la rapamicina pero puede tener utilidad como inmunosupresor, una neurotrofina, y como agente antifúngico. Las referencias citadas en este ejemplo se identifican por un número entre paréntesis; la lista numerada de referencias se localiza al final de este ejemplo.

La rapamicina (sirolimus, Rapamune™) es un macrólido inmunosupresor producido por *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253. Descubierta originalmente como agente antifúngico (16), más tarde se encontró que tenía actividad inmunosupresora, que evitaba que los receptores de interleucina 2 transdujeran una señal de proliferación, un mecanismo distinto del de los inmunosupresores ciclosporina o FK506 (2, 3). La rapamicina es una molécula muy compleja, haciendo difícil sintetizar muchos análogos que podrían tener propiedades superiores. No obstante, la biosíntesis de rapamicina implica un sistema de policétido sintasa (PKS) modular (15) que se ha demostrado que es susceptible de diseño genético para obtener análogos novedosos (7).

Basándose en datos de estudios de marcaje con isótopos (13, 14), se sabe que el producto del complejo de PKS y las posteriores reacciones de modificación son como se muestra más abajo.



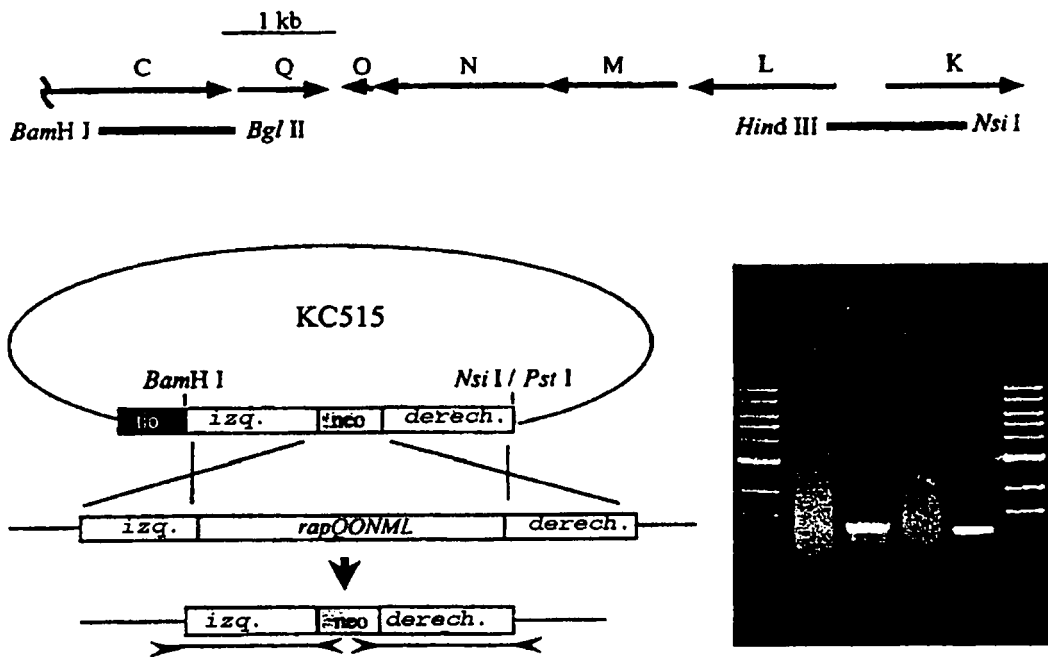
Las reacciones de modificación se enumeran en orden arbitrario, excepto que la hidroxilación en la posición 9 debe producirse antes de la oxidación del hidroxilo 9. El orden temporal de estas reacciones no se conoce y puede no estar restringido.

Un primer complejo de PKS grande sintetiza el precursor de macrolactona de 31 miembros, que incluye una unidad iniciadora derivada de shikimato y piperolato como unidad final incorporada por una péptido-sintetasa no ribosómica. El precursor es hidroxilado en C-9 y C-27, los hidroxilos 16, 27 y 31 son metilados, y el hidroxilo 9 es oxidado para formar la α -cetoamida (13, 14). No obstante, el orden en el cual se producen estas reacciones post-PKS no se conoce, ni ha sido asignada cada reacción a un gen o genes específicos.

El análisis de una región de 100 kb del genoma de *S. hygroscopicus* que abarca la agrupación de genes biosintéticos de rapamicina (1, 11, 15) reveló cinco genes inmediatamente aguas abajo de *rapC* que supuestamente codifica una O-metiltransferasa (*rapQ*), una ferredoxina (*rapO*), una P450 hidroxilasa (*rapN*), una segunda O-metiltransfera-

sa (*rapM*) y lisina-ciclodesaminasa (*rapL*). Introduciendo una mutación por desplazamiento del marco en *rapL* (8), se demostró recientemente que este gen codifica la actividad necesaria para convertir lisina en ácido pipercolico, la unidad final incorporada al precursor macrolactona. Un segundo gen de la P450 hidroxilasa (*rapJ*) y un tercer gen de la O-metiltransferasa (*rapI*) están muy próximos en la secuencia a *fkbD* y *fkbM*, que hidroxila C-9 y metila el hidroxilo 31 del anillo de dihidroxiciclohexano, respectivamente, de FK506 (12,17). Sin embargo, la regioespecificidad de las dos P450 hidroxilasas y las tres O-metil transferasas en la agrupación de la rapamicina no ha sido asignada previamente.

Subsiste la necesidad de análogos de rapamicina con una actividad mejorada y medios para su producción. La presente invención satisface tales necesidades ya que proporciona, entre otros, un organismo recombinante del cual se han remplazado los cinco genes, *rapQONML*, por un marcador de resistencia a neomicina y el compuesto 16-desmetil-27-desmetoxirapamicina, produciendo el cultivo de esta cepa, cantidades significativas, cuando se introduce pipecolato. La cepa en la cual la región *rapQONML* era remplazada por una casete de resistencia a neomicina fue construida como se muestra en el diagrama más abajo.



Como se ha mostrado antes, las secuencias que flanquean la región *rapQONML* fueron clonadas mediante PCR, la casete de resistencia a neomicina Tn5 de pFDNEO-S fue insertada entre ellas, y la casete fue ligada en el vector del fago KC515. El fago recombinante fue utilizado para obtener lisógenos NeoR de *S. hygroscopicus*, que fueron escrutados en cuanto al evento de doble entrecruzamiento parcheando en medio de agar que contiene tanto neomicina como Tioestrepton. Las cepas NeoR, ThioS fueron analizadas mediante PCR para confirmar la presencia de ambos amplímeros que abarcan las secuencias homólogas. El ADN de la cepa KOS20-001 produjo ambos amplímeros, indicando que los genes *rapQONML* habían sido remplazados por el marcador neo. De este modo, en el diagrama anterior, se muestran la región *rapQONML* y la localización de las dos secuencias limítrofes utilizadas en la construcción. Asimismo se muestra el resultado del evento de doble paso con el ADN del fago recombinante; la localización de los dos amplímeros utilizados para verificar la cepa de doble paso se indica mediante líneas entre flechas convergentes que representan los cebadores. Finalmente, se muestran los resultados de las reacciones de PCR con ADN de tipo salvaje (calles 1 y 3) y KOS20-001 (calles 2 y 4). Los cebadores amplificaban la región izquierda (calles 1 y 2) o la región derecha (calles 3 y 4). Las calles con marcador (M) son la escala de 1 kb de New England Biolabs.

Las cepas (KOS20-001) y de tipo salvaje (ATCC 29253) diseñadas fueron fermentadas en presencia y ausencia de 1 mg/L de D,L-pipercolato, y los cultivos fueron analizados como se describe más abajo. La HPLC-MS demostró que la cepa con la delección, cuando crecía en presencia de pipercolato, no producía rapamicina detectable, si no que en lugar de eso producía un nuevo metabolito también con una fuerte absorción a 287 nm. La comparación del espectro de masas de la rapamicina con el del nuevo metabolito demostró una fragmentación que coincidía con que fuera 16-desmetil-27-desmetoxirapamicina, como se muestra en la Tabla 1, más abajo.

TABLA 1. Comparación de las masas de los fragmentos observadas en la LC-MS para la 16-desmetil-27-desmetoxirapamicina y la rapamicina auténtica.

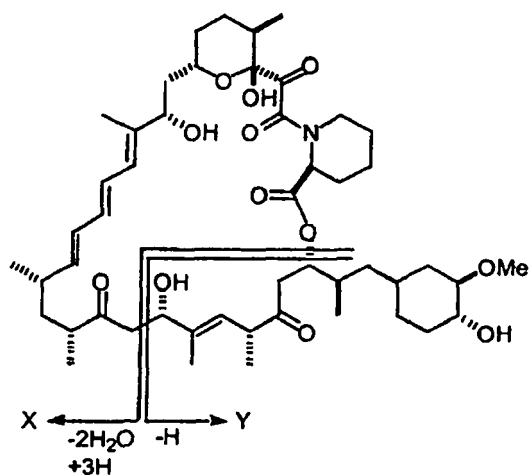
16-desmetil-27-desmetoxirapamicina		rapamicina	
calculado	observado	calculado	observado
$C_{49}H_{76}NO_{12}$	ninguno	$C_{51}H_{80}NO_{13}$	ninguno
$(M+H)^+$		$(M+H)^+$	
$C_{49}H_{74}NO_{11}$	852, 5262	$C_{50}H_{74}NO_{12}$	882, 5368
$(M+H-H_2O)^+$		$(M+H-CH_3OH)^+$	
$C_{49}H_{72}NO_{10}$	834, 5156	$C_{50}H_{74}NO_{11}$	864, 5262
$(M+H-2H_2O)^+$		$(M+H-H_2O-CH_3OH)^+$	
$C_{49}H_{70}NO_9$	816, 5051	$C_{50}H_{72}NO_{10}$	846, 5156
$(M+H-3H_2O)^+$		$(M+H-CH_3OH-2H_2O)^+$	
$C_{49}H_{70}NO_9$	798, 4945	$C_{49}H_{68}NO_9$	814, 4894
$(M+H-4H_2O)^+$		$(M+H-2CH_3OH-2H_2O)^+$	
$C_{30}H_{42}NO_6$	512, 3012		
Frag. X			

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

16-desmetil-27-desmetoxirapamicina		rapamicina	
	calculado	observado	
$C_{19}H_{31}O_2$	323, 2222	323	calculado 323, 2222
Frag. Y			observado 323
$C_{19}H_{29}O_3$	305, 2117	305, 2111	$C_{19}H_{31}O_2$
Frag, Y-H ₂ O			Frag. Y
$C_{18}H_{25}O_2$	273, 1855	273	$C_{19}H_{29}O_3$
Frag. Y-H ₂ O-MeOH			Frag. Y-H ₂ O
			$C_{18}H_{25}O_2$
			Frag. Y-H ₂ O-MeOH

ES 2 283 344 T3

Por analogía con la serie de pérdidas de los 2MeOH y los 2H₂O observadas para la rapamicina, los espectros de masas de la 16-desmetil-27-desmetoxirapamicina mostraban pérdidas sucesivas de 4H₂O. Ambos compuestos presentaban la pérdida del fragmento Y, mostrada más abajo, y los fragmentos derivados de él, indicando que esta porción de la molécula no había cambiado. Las masas de los fragmentos observados para la rapamicina y el análogo se enumeran en la Tabla 1, anterior.



El fragmento X, mostrado antes, también apoya la estructura propuesta. KOS20-001 fue cultivado en un fermentador de 10 litros para proporcionar suficiente material para la caracterización adicional. La 16-desmetil-27-desmetoxirapamicina fue aislada del caldo de aislamiento como se describe más abajo. Las asignaciones del RMN parcial se realizaron a partir de una serie de experimentos 1D y TOCSY, HSQC, y HMBC, como se muestra en la Tabla 2.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 283 344 T3

TABLA 2

Datos de RMN seleccionados para la 16-desmetil-27-desmetoxirapamicina y la rapamicina^a

Posición	16-desmetil-27-desmetoxirapamicina		rapamicina ^b	
	H ¹ δ (ppm)	C ¹³ δ (ppm)	H ¹ δ (ppm)	C ¹³ δ (ppm)
1		170,4		169,2
2	5,20	51,8	5,29	51,3
8		166,6		166,8
9		194,8		192,5
10		98,9		98,5
27	2,52 (dd, 17,5, 3,0 Hz)	46,8	3,71	84,9
	2,64 (dd, 17,5, 9,0 Hz)			
32		208,7		208,2
39	2,93	84,4	2,93	84,4
40	3,39	73,9	3,35	73,9
27-OMe			3,34	59,5
39-OMe	3,41	56,4	3,41	56,5
^a Los datos referidos son para el confórmero principal en CDCl ₃ .				
^b Datos de la referencia 1.				

De acuerdo con lo previsto, el espectro de RMN H¹ de la 16-desmetil-27-desmetoxirapamicina presentaba solamente una señal de grupo metoxi principal en δ 3,41 y los datos de HSQC demostraron que estos protones estaban anclados un carbono resonante a 56,4. Un pico cruzado de HBMC conectaba la función metoxi con un carbono con una señal a δ 84,4 (C-39). Se observaba una correlación entre H-39 (2,93) y una señal a δ 3,38 (H-40), que proporcionaba una prueba adicional de la localización del grupo metoxi. Estos valores coincidían bien con los referidos para la rapamicina (10).

La evidencia de que el nuevo metabolito difería de la rapamicina en la posición 27 fue proporcionada por el espectro de RMN H¹. La región de δ 3,65-3,75, donde el H-27 de la rapamicina resuena, estaba desprovisto de señales, y se observaban dos grupos de señales únicas en δ 2,63 (dd, 17,5, 9,5 Hz) y 2,47 (dd, 17,5, 3,0 Hz), similares a las referidas previamente para H2-27 de la 27-desmetoxirapamicina (5). Combinados, los datos indican que la cepa de delección produce el nuevo metabolito 16-desmetil-27-desmetoxirapamicina.

Debido a que las funciones alfa-cetoamida y 39-metoxi están presentes en el análogo de rapamicina, los genes *rapQONML* no están implicados en estas reacciones. El gen de la metiltransferasa restante de la cepa de delección

ES 2 283 344 T3

rapQONML, *rapI*, debe codificar por lo tanto la enzima responsable de la metilación del hidroxilo 39 de un precursor de rapamicina, coincidiendo con la observación de que *rapI* está muy íntimamente relacionado con *fkbM* en la agrupación FK506. Se ha demostrado que se requiere un gen *fkbM* funcional para la metilación del hidroxilo 31 de un precursor de FK506. Por lo tanto, las metiltransferasas codificadas por los genes *rapQ* y *rapM* deben ser responsables de la metilación de los hidroxilos 16 y 27, aunque la especificidad precisa de estas enzimas no puede ser definida a partir del resultado. El gen de la P450 hidroxilasa restante de la agrupación de la rapamicina de la cepa de delección *rapQONML* es *rapJ*, que debe codificar por lo tanto la enzima para la hidroxilación del carbono 9, que coincide con su íntima homología con *fkbD*. Por lo tanto, el gen *rapN*, debe ser responsable de la otra hidroxilación en el carbono 27.

Debido a que eran producidos unos niveles significativos de 16-desmetil-27-desmetoxirapamicina por la cepa diseñada, las otras reacciones de transformación post-PKS no requieren un precursor que ya haya sido modificado en las posiciones 16 y 27. De este modo, o bien las posiciones 16 y 27 son las últimas en ser modificadas, o bien las enzimas de modificación post-PKS reconocen solamente una región de la molécula que circunda la diana para la modificación.

Las cepas bacterianas, los plásmidos y los fagos utilizados se enumeran en la Tabla 3, más abajo.

TABLA 3

Cepas bacterianas, plásmidos y fagos

Cepa, plásmido o fago	Características relevantes	Referencia o fuente
<i>E. coli</i>		
XL1-Blue	anfitrión vector común	Stratagene
<i>S. hygroscopicus</i>		
NRRL 5491	productos de rapamicina de tipo salvaje	ATCC
KOS20-001	cepa de delección <i>rapQONML</i>	Este trabajo
<i>S. lividans</i>		
TK24	anfitrión para la propagación de fagos	6

ES 2 283 344 T3

	Plásmidos		
5	Litmus 28	vector de clonación general	New England
			Biolabs
10	pCR-Script	vector para amplímeros de PCR	Stratagene
15	pFDNEO-S	fuelle de marcador neoR	
20	pKOS7-150	Litmus 28 nuevo poliligador	Este trabajo
25	pKOS20-55.2	amplímero 5' límite en pCR-Script	Este trabajo
	pKOS20-56.1	amplímero 3' límite en pCR-Script	Este trabajo
30	pKOS20-61.1	amplímero 3' límite en pKOS7-150	Este trabajo
35	pKOS20-68	amplímero 5' límite en pFDNEO-S	Este trabajo
40	pKOS20-70	casete de remplazo rapQONML::neo	Este trabajo
	Fago		
45	KC515	c+ ΔattP::tsr, vph	6
50	phKOS20-001	casete de remplazo KC515 Δvph::	Este trabajo

55 El plásmido pFDNEO-S fue una amable donación del Prof. Ryszard Brzezinski de la Université du Sherbrooke, Canadá. *S. hygroscopicus* ATCC 29253 y la cepa recombinante KOS20-001 fueron cultivados en placa sobre SY (1% almidón soluble, 0,2% extracto de levadura, 20% de agar) para obtener esporas.

60 La casete para el remplazo de rapQONML por un gen resistente a la neomicina fue construido como se ha mostrado antes. Se obtuvieron regiones de aproximadamente 1,2 kb aguas arriba y aguas abajo de los genes rapQONML mediante amplificación por PCR a partir de ADN genómico de *S. hygroscopicus*. La localización de cada cebador en la secuencia de la agrupación de rapamicina publicada (1,11,15) dada más abajo hace referencia al extremo 3' de cada cebador. La región aguas arriba fue obtenida con cebadores desde el nucleótido 89986.

65 (5'-ATCGGATCCGC GCCAGGTCCGGCGACCCGTCCTCC-3'), introduciendo un sitio BamH I, y 91124

(5'-GATAGATCTAGACCGAAGGCCGACATCACGGTGTGCGAAC-3'), introduciendo un sitio Bgl II. La región aguas abajo fue obtenida con cebadores a partir de 95072

ES 2 283 344 T3

(5'-ATCAAGCTTG CTTGATGTACGCTGGCACAGAACCTTGG-3'), introduciendo un sitio *Hind* III, y 96218

(5'-GATATGCATCCGTGCCGTCCCAGGTTCTCGGCACCGATC-3'), introduciendo un sitio *Nsi* I. Las mezclas de PCR incluían polimerasa de *Pfu* (Stratagene), el tampón del fabricante, 10% DMSO, dATP, dTTP, dCTP 200 μ M cada uno, y dGTP y desaza-dGTP (Roche) 100 μ M cada uno. Se utilizaron treinta ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C y 3 min a 72°. Cada amplímero fue clonado en el sitio *Srf* I de pCR-Script (Stratagene) para dar pKOS20-55.2 y pKOS20-56.1, respectivamente, y los clones fueron verificados mediante secuenciación.

El plásmido pKOS7-150 estaba derivado de Litmus 28 y tiene la siguiente secuencia entre los sitios *Sna*B I y *Avr* II: 5'-TGGATCCACAGATCTGCCTGC-AGCATCTAGAAAGCTT ACATGCATCCTAG-3'. La región izquierda fue aislada de pKOS20-56.1 en forma de un fragmento *Eco*R I - *Bgl* II de 1,2 kb y clonada en los sitios *Eco*R I - *Bam*H I de pFDNEO-S (4), para dar pKOS20-68. La región derecha fue aislada de pKOS20-56.1 en forma de un fragmento *Hind* III - *Nsi* I de 1,2 kb y clonada en los mismos sitios de pKOS7-150 para dar pKOS20-61.1. El fragmento *Bam*H I - *Hind* III de 2,2 kb de pKOS20-68 fue movido a los mismos sitios de pKOS20-61.1 para dar pKOS20-70, en el cual se había insertado el gen de resistencia a la neomicina entre las secuencias limítrofes de *rapQONML*.

La casete descrita antes fue aislada de pKOS20-70 en forma de un fragmento *Bam*H I - *Nsi* I de 3,4 kb y ligada a los sitios *Bam*H I - *Pst* I del ADN de KC515 y el ADN transfectado en protoplastos de *S. lividans* TK24 como se ha descrito (6). Las placas de fagos recombinantes fueron identificadas utilizando la PCR. El fago que albergaba la casete de remplazo fue mezclado con esporas recién germinadas de ATCC 29253 y cultivado en placa sobre agar harina de avena modificado (10^7 - 10^8 esporas por placa; MOI de 5-10) como se ha descrito (9). Después de 20 h a 30°C, las placas fueron recubiertas con neomicina (10 μ g/ml concentración final) e incubadas aproximadamente 10 días. Las colonias seleccionadas fueron transferidas a medio mínimo que contenía 20 μ g/ml de neomicina y aquellas que crecían bien después de aproximadamente 10 días fueron aplicada en estrías sobre medio mínimo que contenía 20 μ g/ml de neomicina para obtener clones puros. Los clones fueron sometidos a ensayo para el evento de doble entrecruzamiento parcheando en medio con neomicina sola y neomicina más Tiostrepton. Las cepas NeoR, ThioS seleccionadas se hicieron crecer en caldo de soja con tripsina añadida de Difco con un suplemento de 1% de glucosa, tampón MES (ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico) 100 mM, pH 6,0 y el ADN fue aislado como se ha descrito (6). El ADN fue analizado mediante PCR en cuanto a la presencia de amplímeros diagnóstico del evento de remplazo con paso doble. Las pares de cebadores hibridaban con las regiones fuera de la secuencia homóloga izquierda (5'-CGGGCGTCTGATCGACCAGGATGAGATGGG-3') y dentro del promotor de la casete neo.

(5'-TATGTTGGTGTTCATTCTACCAGAATCGGCAAAGATGTCA-3'), o fuera de la secuencia homóloga derecha (5'-GCGAGGGCGTAGCCCCGGCG-3') y en el poliligador en el extremo 3' de la casete neo.

(5'-GTGCACCTGCAGGCATGCAAGCTT-3'). Una cepa en la cual la región *rapQONML* estaba correctamente remplazada por la casete neo fue denominada KOS20-001.

Esporas de *S. hygroscopicus* ATCC 29253 y KOS20-001 fueron inoculadas en 40 ml de TSB (8) con suplemento en matraces con pantalla de 250 mL. Después de 20 horas, los cultivos fueron cosechados, resuspendidos en 30% de glicerol y dispensados en alícuotas de 1 ml para dar un banco de células de trabajo. Se utilizó un vial de células congeladas para inocular 40 mL de TSB con suplemento (8) en matraces con pantalla de 250 ml. Aproximadamente a las 20 hrs, la concentración de glucosa se aproximó a cero, medido con un analizador de bioquímica YSI 2700 Select, momento en el cual se añadió D,L-pipecolato (Sigma) a los cultivos de KOS70-001 (concentración final 1 mg/ml). Se extrajeron alícuotas de los cultivos después de 3-4 días (cuando se habían desarrollado completamente) como sigue. A una alícuota de caldo completo se añadieron dos volúmenes de acetona y la mezcla se sometió a sonicación un minuto sobre hielo con un Sonic Dismembrator 60 (Fisher) ajustado al máximo. Se añadieron tres volúmenes de acetato de etilo, en relación con la alícuota original, y la mezcla se sacudió. Después de la centrifugación, la fase de acetato de etilo superior fue transferida a un nuevo recipiente, secada añadiendo sulfato de sodio anhidro, y concentrada mediante evaporación rotatoria. El residuo se redisolvió en acetato de etilo para su análisis (0,5% del volumen de caldo original).

Los extractos fueron analizados utilizando un sistema que constaba de un Beckman System Gold HPLC, un detector Alltech ELSD, y un detector basado en LC MS PE SCIEX API100 equipado con una fuente de ionización química. El eluyente de una columna Metachem Inertsil ODS-3 (5 μ m, 4,6 X 150 mm) a 50°C de un gradiente lineal de 50% a 100% MeCN (0,1% HOAc) a 1 mL/min a lo largo de 5 min fue controlado mediante UV a 287 nm, ELSD, y MS. En estas condiciones, la rapamicina eluía a los 9,4 min y la 16-desmetil-27-desmetoxirapamicina a los 8,4 min. El LC/MS de alta resolución de una muestra purificada de 16-desmetil-27-desmetoxirapamicina fue obtenido en un PE Biosystems Mariner API-TOF MS también configurado con una fuente de ionización química a presión atmosférica.

Se cultivo KOS20-001 en un fermentador de 10-litros de medio TSB con suplemento sembrado con 500 mL de cultivo de dos días del mismo medio. A los 3 días, se recogió el cultivo, se añadió un volumen igual de metanol, y después de 30 minutos se centrifugó la suspensión. El sobrenadante fue sometido a extracción en fase sólida en HP-20 (volumen de la columna 500 ml, 100 ml/min). Después de la captura, la columna fue lavada con 2 litros de MeOH-H₂O (1:1), seguido de 2 litros de MeOH-H₂O (2:1). El nuevo metabolito se hizo eluir después de la columna con 1,5 litros de MeOH. Una fracción de 1 gramo del resto de 2,5 g resultante fue fraccionada sobre LH-20 (CH₂Cl₂-MeOH, 1:1). Las fracciones que contenían el análogo fueron reunidas y sometidas de nuevo a cromatografía sobre LH-20 (heptano-diclorometano-EtOH, 10:10:1). La purificación final fue mediante HPLC (10 X 250 mm, Metachem Inertsil ODS-3, gradiente lineal de 50% MeCN-H₂O a 95% MeCN-H₂O a lo largo de 30 min, 5 ml/min, UV = 287 nm).

ES 2 283 344 T3

En el texto anterior, estas referencias son indicadas mediante referencias entre paréntesis al número según el cual la referencia se enumera más abajo.

- 5 1. **Aparicio et al.** 1996. Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene*. **169**(1):9-16.
2. **Bierer, B. E.** 1995. Mechanisms of action of immunosuppressive agents: cyclosporin A, FK506, and rapamycin. *Proc Assoc Am Physicians*. **107**(1):28-40.
- 10 3. **Brazelton et al.** 1996. Molecular mechanisms of action of new xenobiotic immunosuppressive drugs: tacrolimus (FK506), sirolimus (rapamycin), mycophenolate mofetil and leflunomide. *Curr Opin Immunol*. **8**(5):710-20.
- 15 4. **Denis et al.** 1991. An improved aminoglycoside resistance gene cassette for use in gram-negative bacteria and *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett*. **65**(3):261-4.
- 20 5. **Findlay et al.** 1982. The structure of demethoxyrapamycin. *Can. J. Chem*. **60**:2046-2047.
6. **Hopwood et al.** 1985. Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. *The John Innes Foundation*, Norwich, UK.
7. **Katz, L.** 1997. Manipulation of modular polyketide synthases. *Chem. Rev.* **97**(7):2557-2576.
8. **Khaw et al.** 1998. Mutational biosynthesis of novel rapamycins by a strain of *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 5491 disrupted in rapL, encoding a putative lysine cyclodeaminase. *J Bacteriol*. **180**(4):809-14.
- 25 9. **Lomovskaya et al.** 1997. Gene disruption and replacement in the rapamycin-producing *Streptomyces hygroscopicus* strain ATCC 29253. *Microbiology*. **143**(Pt 3):875-83.
- 30 10. **McAlpine et al.** 1991. Revised NMR assignments for rapamycin. *J Antibiot (Tokyo)*. **44**(6): 688-90.
11. **Molnar et al.** 1996. Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of genes flanking the poliketide synthase. *Gene*. **169**(1):1-7.
- 35 12. **Motamedi et al.** 1996. Characterization of methyltransferase and hydroxylase genes involved in the biosynthesis of the immunosuppressants FK506 y FK520. *J Bacteriol*. **178**(17):5243-8.
13. **Paiva et al.** 1991. Incorporation of acetate, propionate, and methionine into rapamycin by *Streptomyces hygroscopicus*. *J Nat Prod*. **54**(1):167-77.
- 40 14. **Reynolds et al.** 1997. Rapamycin, FK506, and ascomycin-related compounds, p. 497-520. *En W. R. Strohl* (ed.), *Biotechnology of Antibiotics*, 2^a, rev. y ed. ampliada, vol. 82. M. Dekker, New York.
- 45 15. **Schwecke et al.** 1995. The biosynthetic gene cluster for the poliketide immunosuppressant rapamycin. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**(17):7839-43.
16. **Sehgal et al.** 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)*. **28**(10):727-32.
- 50 17. **Shafiee et al.** 1997. Chemical and biological characterization of two FK506 analogs produced by targeted gene disruption in *Streptomyces* sp. MA6548. *J Antibiot (Tokyo)*. **50**(5):418-23.

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una célula anfitriona de *Streptomyces hygroscopicus* recombinante que produce 17-desmetilrapamicina, donde la célula comprende una agrupación del gen de la policétido sintasa (PKS) de rapamicina modificado que expresa una PKS de rapamicina modificada y donde la PKS de rapamicina modificada comprende un dominio aciltransferasa (AT) de remplazo en el módulo de elongación 10.

10 2. La 17-desmetilrapamicina en forma sustancialmente pura.

10 3. Una composición farmacéutica que comprende 17-desmetilrapamicina y un portador farmacéuticamente aceptable, no tóxico.

15

20

25

30

35

40

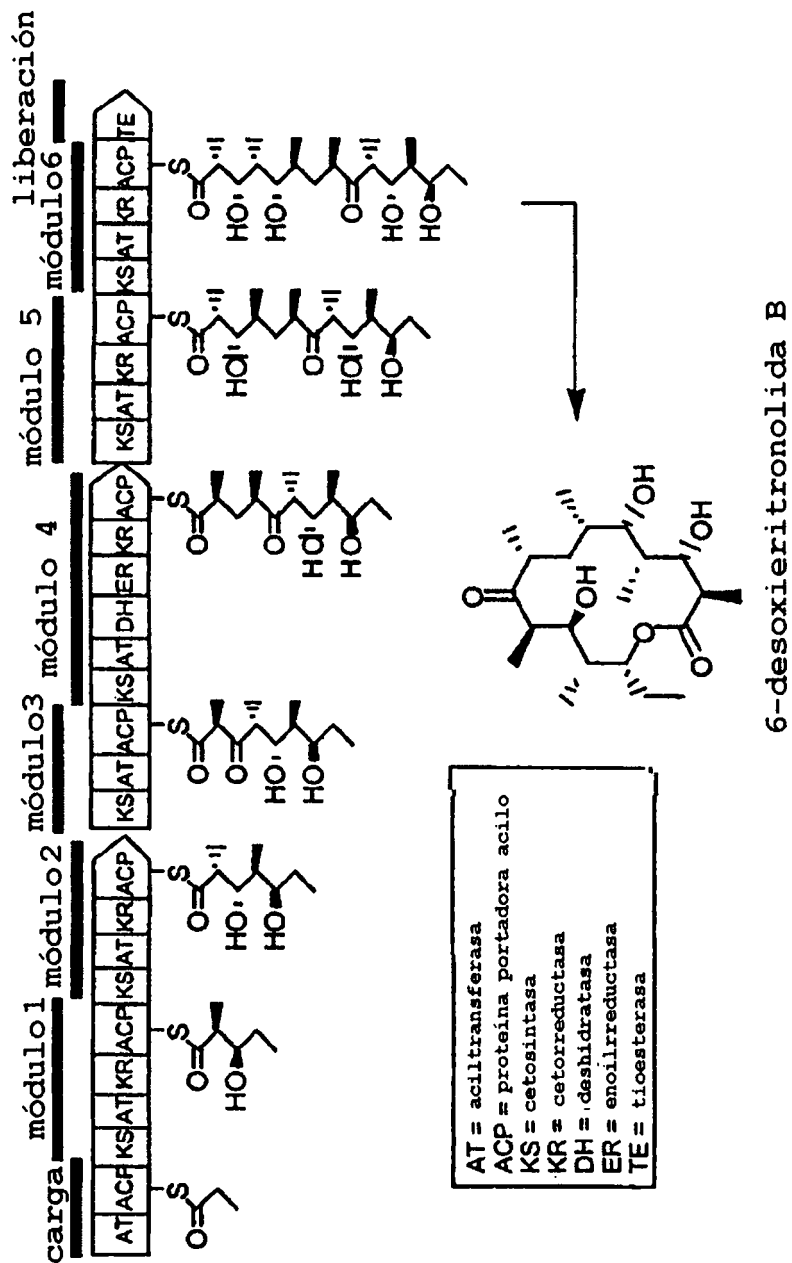
45

50

55

60

65



Biosíntesis de 6-Desoxieritronolida B (6-dEB), la Aglicona de Eritromicina, por una PKS Modular

Figura 1