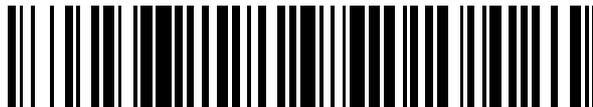


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 869**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2015 PCT/GB2015/053774**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2016 WO16092304**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2015 E 15823730 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 3230448**

54 Título: **Método de cribado de productos naturales bioactivos**

30 Prioridad:

09.12.2014 GB 201421850

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

26.11.2019

73 Titular/es:

**NANNA THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
Merrifield Centre, Rosemary Lane, Cambridge
Cambridgeshire CB1 3LQ, GB**

72 Inventor/es:

**WILLIAMS, DAVID HUGH;
WAIN, JOHN RICHARD y
WOODS, STUART ROBERT**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 732 869 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de cribado de productos naturales bioactivos

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a métodos para la selección de células procariotas mutantes para identificar productores de agentes citotóxicos (tales como antibióticos y agentes anticancerígenos) activos contra una célula diana (tales como bacterias patógenas y células tumorales), y a métodos para identificar un agente citotóxico que comprende tales métodos de selección. La invención también se refiere a procedimientos para producir un agente citotóxico que comprende los métodos de la invención.
- 10 **[0002]** Las bacterias son una fuente importante de productos naturales bioactivos, que incluyen antibióticos, agentes anticancerígenos, agentes de protección de cultivos e inmunosupresores. Por ejemplo, las actinobacterias, especialmente *Streptomyces* spp., son productoras de muchos metabolitos secundarios bioactivos que son útiles en medicina (por ejemplo, como antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antitrombóticos, agentes inmunomoduladores, agentes anticancerígenos e inhibidores de enzimas) y en la agricultura (por ejemplo, como insecticidas). herbicidas, fungicidas y sustancias promotoras del crecimiento para plantas y animales). Los antibióticos derivados de actinobacterias que son importantes en medicina incluyen aminoglucósidos, antraciclinas, cloranfenicol, macrólidos y tetraciclinas, mientras que los productos de bacterias naturales como la bleomicina, la doxorubicina, la rapamicina y la mitramicina son la base de importante terapéutica anticancerosa.
- 15 **[0003]** Sin embargo, existe una necesidad urgente de nuevos agentes citotóxicos, especialmente antibióticos, para contrarrestar la aparición de nuevos patógenos y la resistencia a los antimicrobianos existentes, mientras que la gama de agentes contra el cáncer se debe ampliar.
- 20 **[0004]** El cribado tradicional para los productores de agentes citotóxicos incluye pruebas de cepas puras de un productor candidato para la actividad contra células diana en medios sólidos o líquidos. En el primer caso, las bacterias productoras individuales con mutantes genéticos pueden colocarse en el césped de las células diana, de modo que las que producen los agentes citotóxicos deseados pueden identificarse por la aparición de zonas de inhibición/limpieza alrededor de las colonias mutantes emergentes. Sin embargo, esta técnica es laboriosa, por lo general no se puede aplicar en el caso de células diana de mamíferos y no es adecuada para pantallas de alto rendimiento.
- 25 **[0005]** El documento WO 2014/072697 describe un proceso para producir una bacteria mutante que presenta una supervivencia y/o un crecimiento mejorados en unas condiciones de crecimiento seleccionadas que comprenden los pasos de: (a) generar un conjunto de bacterias mutantes mediante mutagénesis de transposón con un transposón activador (TnA), en donde la TnA comprende un promotor capaz de aumentar la transcripción de un gen en o cerca de su sitio de inserción; (b) cultivar bacterias del grupo de mutantes en las condiciones de crecimiento seleccionadas y en una o más condiciones de referencia para producir dos o más cultivos de prueba; y (c) comparar la distribución de las inserciones de TnA entre los cultivos de prueba para identificar una primera clase de genes que son desventajosos para el crecimiento y/o la supervivencia bajo la condición de crecimiento seleccionada y una segunda clase de genes que son ventajosos para el crecimiento y/o la supervivencia bajo la condición de crecimiento seleccionada.
- 30 **[0006]** El documento GB 2 505 819 describe un método para identificar genes que median la sensibilidad o resistencia a antibióticos, en el que el método utiliza transposones con tres promotores diferentes de fuerzas variables para generar bacterias mutantes. El método comprende los pasos de generar un conjunto de bacterias mutantes mediante la mutagénesis de transposones de bacterias gramnegativas con una pluralidad de transposones activadores (TnA), cada transposón que comprende un promotor que mira hacia afuera (TnP); bacterias en crecimiento del grupo de mutantes en presencia de diferentes cantidades de dicho antibiótico; y comparando la distribución de las inserciones de TnA entre los cultivos de prueba para identificar un gen que media sensibilidad o resistencia a los antibióticos en la bacteria.
- 35 **[0007]** Aharoni et al: "High-Throughput Screening of Enzyme Libraries: Thiolactonases Evolved by Fluorescence-Activated Sorting of Single Cells in Emulsion Compartments", *Chemistry and Biology*, vol. 12, nº 12, páginas 1281-1289, describen células bacterianas individuales, cada una de las cuales expresa una variante de biblioteca diferente compartimentada en gotitas acuosas de emulsiones de agua en aceite (w/o), manteniendo así un enlace entre un gen transmitido por plásmidos, la variante enzimática codificada, y el producto fluorescente que esta enzima puede generar. La conversión en una emulsión doble de agua en aceite en agua (w/o/w) permite la clasificación de estos compartimientos por FACS, así como el aislamiento de células de bacterias vivas y sus genes que codifican enzimas.
- 40 **[0008]** Bernath et al: "In vitro compartmentalization by double emulsions: sorting and gene enrichment by fluorescence activated cell sorting", *Analytical Biochemistry*, vol. 325, nº 1, páginas 151-157, describe emulsiones de agua en aceite (w/o) que se pueden usar para compartimentar y seleccionar grandes bibliotecas de genes para una función predeterminada. Las gotitas acuosas de la emulsión w/o funcionan como compartimentos de tipo celular en cada uno de los cuales se transcribe y traduce un solo gen para dar múltiples copias de la proteína (por ejemplo, una
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

enzima) que codifica. La reemulsificación de emulsiones w/o proporciona emulsiones de agua en aceite en agua (w/o/w) con una fase de agua externa (continua) a través de la cual se pueden aislar gotitas que contienen marcadores fluorescentes mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

5 **[0009]** Baret et al: "Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity", Lab on a Chip, vol. 9, no. 13, páginas 1850-1858, describe un microfluídico clasificador de gotas activadas por fluorescencia (FADS) que combina el cribado en placa de microtitulación y la clasificación tradicional de células activadas por fluorescencia (FACS).

10 **[0010]** La detección de mutantes en medios líquidos se complica por los hechos de que los mutantes de interés que producen compuestos citotóxicos pueden exhibir tasas de crecimiento muy diferentes, reduciendo en gran medida la diversidad de los mutantes productores recuperados. Además, los mutantes diana que producen compuestos citotóxicos también pueden ser sobrecargados por "tramposos", que son mutantes que son resistentes a los compuestos citotóxicos producidos por las células productoras mutantes diana pero que no producen el agente citotóxico (gozando de una ventaja metabólica reflejada en una mayor tasa de crecimiento).

15 **[0011]** Un problema adicional asociado con la detección de mutantes productores en cultivo líquido surge del hecho de que los compuestos citotóxicos de interés pueden ser producidos a concentraciones relativamente bajas, y así efectivamente diluidos por el medio de cultivo líquido a granel. Por lo tanto, las señales valiosas que surgen de las células productoras mutantes pueden pasar desapercibidas (u ocultarse por los efectos de las células productoras mutantes que secretan agentes citotóxicos más potentes).

20 **[0012]** Por lo tanto, un reto importante para el desarrollo de nuevos productos naturales bioactivos es la necesidad de examinar grandes números de bacterias de productores para identificar aquellos productos que elaboran que tienen la actividad deseada, junto con la necesidad de asegurar una fuente de rica diversidad biológica en el nivel de los organismos productores candidatos a ser examinados. También existe la necesidad de métodos que puedan usarse en pantallas paralelas masivas de alto rendimiento, de modo que se puedan analizar un gran número de mutantes de células productoras diferentes contra una amplia gama de células diana diferentes.

25 **[0013]** Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para seleccionar células procariotas mutantes para identificar productores de un agente citotóxico activo contra una célula diana, comprendiendo el método los pasos de:

- 35 (a) proporcionar células de una especie procariota productora;
- (b) generar un conjunto de células productoras mutantes por mutagénesis de transposones de las células del Paso (a) con un transposón de activación (T_{NA}), en donde el T_{NA} comprende un promotor orientado hacia fuera ($T_{NA}P$) capaz de aumentar la transcripción de un gen en o cerca de su sitio de inserción en el ADN de dichas células productoras;
- 40 (c) co-encapsular miembros individuales del conjunto del Paso (b) con una o más células diana en microgotas, comprendiendo las microgotas un volumen de medio de crecimiento acuoso suspendido en un líquido portador inmiscible, generando así una biblioteca de microgotas que comprende cada una una célula productora mutante única y una o más células diana;
- 45 (d) incubar la biblioteca de microgotas del Paso (c) en condiciones adecuadas para el co-cultivo de la célula productora mutante única y la(s) célula(s) diana para producir una biblioteca de microcultivos, mediante la cual las células productoras mutantes que producen un agente citotóxico activo contra las células diana superan las células diana en cada microcultivo; y
- (e) seleccionar la biblioteca de microcultivos del Paso (d) para microcultivos en los que las células diana han sido superadas o sobredimensionadas hasta su extinción por células productoras mutantes.

50 **[0014]** El paso de encapsulación se lleva a cabo preferiblemente de tal manera que cada microgota contiene un solo miembro del conjunto mutante, junto con dos o más (por ejemplo, aproximadamente 10) células diana. Dependiendo del proceso de encapsulación empleado, la biblioteca de microgotas puede ser heterogénea con respecto al contenido celular, y algunas microgotas pueden estar vacías. Sin embargo, todo lo que se requiere es que la encapsulación resulte en la recuperación de al menos algunas microgotas que contienen una única célula productora mutante del conjunto de mutantes junto con una o más células diana.

55 **[0015]** El método de la invención permite el enriquecimiento de los microcultivos en el que las células han muerto y/o han sido superadas por células productoras mutantes, cuyas células mutantes pueden ser posteriormente aisladas y analizadas para identificar la base para su actividad citotóxica. Dado que el ensayo se realiza en volúmenes relativamente pequeños, el efecto de cada compuesto citotóxico producido por una célula productora mutante puede detectarse sin el efecto de dilución de un gran volumen de medios y/o el efecto de confusión de otros agentes citotóxicos (posiblemente más potentes) producido por otras células productoras mutantes. Por lo tanto, el método es mucho más sensible a las señales generadas por células productoras mutantes.

60 **[0016]** El método también evita el efecto "empantanamiento" de "tramposos", que son células productoras de mutantes que son resistentes a los compuestos citotóxicos producidos por las células productoras del mutante

diana, pero que no producen el agente citotóxico (por lo que gozan de una ventaja metabólica reflejada en una mayor tasa de crecimiento). Dichos "tramposos" producirían un crecimiento excesivo y extinguirían efectivamente la señal generada por los productores mutantes de agentes citotóxicos si no se dividieran efectivamente de mutantes de células productoras individuales mediante el paso de encapsulación de la invención.

5 **[0017]** El método puede comprender, además, la secuenciación del ADN de células productoras mutantes en microgotitas en las que las células diana ha sido superadas a la extinción por células productoras mutantes durante el paso de incubación las células diana. Dichas microgotas pueden aislarse mediante diversas técnicas de clasificación (ver más adelante), y las células pueden liberarse de las microgotas mediante cualquier método conveniente (por ejemplo, mediante la adición de surfactantes, detergentes, por sonicación, por choque osmótico o por mecánica o medios fisicoquímicos).

10 **[0018]** El ADN adyacente o cerca del sitio de inserción de la Tn_A se secuencia preferentemente, por ejemplo, mediante métodos que comprenden la amplificación selectiva de uniones transposón-ADN de la célula.

15 **[0019]** En realizaciones preferidas, la secuencia comprende secuenciación masivamente paralela de alto rendimiento. Se puede emplear cualquier tipo de secuenciación, por ejemplo, seleccionada de: (a) bioquímica de secuenciación por síntesis (SBS); y/o (b) secuenciación de nanoporos; y/o (c) tunelización de la secuencia actual; y/o (d) pirosecuenciación; y/o (e) secuenciación por ligación (secuenciación SOLID); y/o (f) semiconductor de iones; y/o (g) secuenciación de espectrometría de masas.

20 **[0020]** Preferiblemente, se secuencian aproximadamente 25, 50, 75, 100 o mayor que 100 pares de bases de ADN adyacente o cerca del sitio de inserción Tn_A . El ADN secuenciado puede ser 5' y/o 3' del sitio de inserción Tn_A .

25 **[0021]** Los métodos de la invención pueden comprender además el paso de transcritos de ARNm de secuenciación producidos por Tn_{AP} en células productoras mutantes en microgotitas en donde las células diana han sido superadas por células productoras mutantes para producir un perfil de ARNm transcrito. En tales realizaciones, el perfil de transcripción de ARNm comprende una determinación de:

- 30 (a) las secuencias de dichos transcritos de ARNm producidos por Tn_{AP} ; y/o
 (b) el inicio y el final de los transcritos de ARNm producidos por Tn_{AP} ; y/o
 (c) las longitudes de dichos transcritos de ARNm producidos por Tn_{AP} ; y/o
 (d) la abundancia relativa de dichos transcritos de ARNm producidos por Tn_{AP} ; y/o
 (e) el sitio de transcripción en el ADN celular; y/o
 35 (f) si los transcritos de ARNm producidos por Tn_{AP} son con sentido o antisentido con respecto al ADN celular; y/o
 (g) si los transcritos de ARNm producidos por Tn_{AP} corresponden a ORF con respecto al ADN celular; y/o
 (h) si los transcritos de ARNm producidos por Tn_{AP} codifican proteínas procarióticas y/o dominios de proteínas.

40 **[0022]** El tamaño de las microgotas se seleccionará en función de la naturaleza de las células (tanto de productores como de destino) a encapsular, y el número de duplicaciones a ser alcanzadas durante el paso de incubación. Típicamente, las microgotas se dimensionan para proporcionar un volumen de medio de crecimiento suficiente para soportar 1000 células. Por lo tanto, las microgotas pueden ser sustancialmente esféricas con un diámetro de: (a) 10 μm a 500 μm ; (b) 10 μm a 200 μm ; (c) 10 μm a 150 μm ; (d) 10 μm a 100 μm ; (e) 10 μm a 50 μm ; o (f) unos 100 μm .

45 **[0023]** Mientras que las microgotitas pueden comprender un volumen de medio de crecimiento acuoso en el estado de gel, en realizaciones preferidas que comprenden un volumen de medio de crecimiento acuoso en el estado líquido. En tales realizaciones, las microgotas pueden comprender un núcleo interno de medios de crecimiento acuosos envueltos en una capa externa de aceite, siendo el líquido portador una fase acuosa continua. Aquí, el núcleo acuoso interior tiene un diámetro de: (a) 10 μm a 500 μm ; (b) 10 μm a 200 μm ; (c) 10 μm a 150 μm ; (d) 10 μm a 100 μm ; (e) 10 μm a 50 μm ; o (f) aproximadamente 100 μm , mientras que la capa exterior de aceite puede tener un espesor de: (a) 10 μm hasta 200 μm ; (b) 10 μm a 200 μm ; (c) 10 μm a 150 μm ; (d) 10 μm a 100 μm ; (e) 10 μm a 50 μm ; o (f) unos 100 μm .

55 **[0024]** En las emulsiones de tipo W/O individuales, el vehículo líquido puede ser cualquier líquido no miscible con agua, por ejemplo un aceite, opcionalmente seleccionado de: (a) un aceite de hidrocarburo; (b) un aceite de fluorocarbono; (c) un aceite de éster; (d) un aceite que tiene baja solubilidad para componentes biológicos de la fase acuosa; (e) un aceite que inhibe la difusión molecular entre microgotas; (f) un aceite que es hidrófobo y lipófobo; (g) un aceite que tiene buena solubilidad para gases; y/o (h) combinaciones de cualquiera de dos o más de los anteriores.

60 **[0025]** Por lo tanto, las microgotas pueden estar comprendidas en una emulsión W/O en la que las microgotitas constituyen una fase acuosa, dispersa, y el líquido portador constituye una fase continua de aceite.

65 **[0026]** En otras realizaciones, las microgotas están comprendidas en una emulsión doble W/O/W y el líquido portador puede ser un líquido acuoso. En tales realizaciones, el líquido acuoso puede ser solución salina tamponada con fosfato (PBS).

[0027] Las microgotas pueden por lo tanto estar comprendidas en una W/O/W de doble emulsión en la que las microgotitas comprenden: (a) un núcleo interno de medio de crecimiento acuoso envuelto en una cáscara de aceite exterior como la fase dispersa, y (b) El líquido portador como la fase acuosa continua.

5 [0028] En realizaciones en las que las microgotas están comprendidas en una emulsión, el vehículo líquido puede constituir la fase continua y las microgotas de la fase dispersada, y en tales formas de realización la emulsión puede comprender además un tensioactivo y opcionalmente un co-tensioactivo.

10 [0029] El agente tensioactivo y/o co-tensioactivo puede estar situado en la interfase de las fases dispersa y continua, y cuando las microgotas están comprendidas en una emulsión doble W/O/W el tensioactivo y/o co-tensioactivo pueden estar situados en la interfaz del núcleo acuoso y la cubierta de aceite y en la interfaz de la cubierta de aceite y la fase continua exterior. Las microgotas pueden monodispersarse (como se define aquí).

15 [0030] El paso de co-encapsulación puede comprender la mezcla de: (i) el conjunto de células productoras mutantes; (ii) una población de las células diana; (iii) un medio de crecimiento acuoso; (iv) un líquido inmiscible en agua, por ejemplo, un aceite como se define aquí; y (v) un tensioactivo, por ejemplo, como se define en el presente documento, en condiciones en las que se forma una única emulsión de tipo W/O que comprende microgotas del medio de crecimiento acuoso dispersado en el líquido inmiscible en agua.

20 [0031] En algunas realizaciones, la emulsión simple de tipo W/O como se describe anteriormente se usa para el paso de incubación. Esto puede ser preferido en circunstancias donde la fase continua de aceite proporciona una mejor compartimentación de los microcultivos (por ejemplo, previniendo o limitando interacciones interculturales mediadas por productos bioactivos solubles en agua liberados durante el cultivo). En tales realizaciones, la posterior manipulación, selección (y en particular la clasificación) puede facilitarse mediante una etapa de emulsificación adicional, posterior a la incubación, en la que se mezcla un líquido portador acuoso, por ejemplo, como se define aquí, con la emulsión única utilizada para el paso de incubación. en condiciones en las que se forma una doble emulsión W/O/W que comprende microgotas del medio de crecimiento acuoso envuelto en el líquido inmiscible en agua y disperso en el líquido portador acuoso.

25 [0032] El paso de co-encapsulación (c) puede comprender la mezcla de: (a) el conjunto de células productoras mutantes; (b) una población de las células diana; (c) un medio de crecimiento acuoso; (d) un líquido inmiscible en agua, por ejemplo, un aceite como se define en el presente documento; (e) un surfactante, por ejemplo, como se define aquí, y (f) un líquido portador acuoso, por ejemplo, como se define aquí, bajo condiciones por las cuales se forma una doble emulsión W/O/W que comprende microgotas del medio de crecimiento acuoso envuelto en el líquido inmiscible y disperso inmiscible en agua y disperso en el líquido portador acuoso.

30 [0033] Cualquier medio puede emplearse para el paso de mezcla: por ejemplo, este paso puede comprender: (a) agitación en vórtex y/o (b) sonicación; (c) homogeneización; (d) pico-inyección y/o (e) enfoque de flujo.

35 [0034] Como se explicó anteriormente, según el proceso de encapsulación empleado, la biblioteca de microgotas puede ser heterogénea con respecto al contenido celular, y algunas microgotas pueden estar vacías. En tales circunstancias, el paso de coencapsulación (c) puede comprender además la eliminación de microgotas vacías que no contienen productor(es) mutante(s) y/o célula(s) diana(s). Este paso se logra convenientemente mediante la Clasificación de Gotas Activada por Fluorescencia (FADS), y en tales realizaciones, las células productoras y/o diana están marcadas de manera fluorescente.

40 [0035] El paso de incubación (d) se lleva a cabo durante un período y en condiciones seleccionadas por referencia a la naturaleza de las células productoras y de destino seleccionados. Por lo tanto, esta etapa puede comprender mantener la biblioteca de microgotas a una temperatura de 15°C - 95°C durante al menos 1 hora. En algunas realizaciones, la biblioteca de microgotas se mantiene a una temperatura de: (a) 15°C - 42°C; (b) 20°C - 40°C; (c) 20°C - 37°C; (d) 20°C - 30°C; o (e) alrededor de 25°C; (f) 40°C - 60°C; (g) 60°C - 80°C; o (h) 80°C - 98°C.

45 [0036] El paso de incubación (d) puede comprender el mantenimiento de la biblioteca de microgotas a dicha temperatura durante aproximadamente 2, 4, 6, 12, 24 o 48 horas, o hasta 7 días, por ejemplo durante 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días. En otras realizaciones, el paso de incubación (d) comprende mantener la biblioteca de microgotas a dicha temperatura durante hasta 2 semanas, por ejemplo durante 1 semana o 2 semanas.

[0037] El paso de selección (e) puede comprender eliminar microgotas que contienen células diana.

50 [0038] Esto se logra convenientemente mediante FADS, en cuyo caso las células diana pueden estar marcadas con fluorescencia. De este modo, las gotas que contienen solo células productoras mutantes que han superado o sobre crecido hasta la extinción de las células diana (o células productoras en cocultivo con mutantes de células productoras resistentes) se pueden aislar mediante la clasificación, lo que enriquece enormemente las células productoras mutantes que elaboran agentes citotóxicos contra las células diana.

55 [0039] El método puede comprender además una etapa de análisis de potencia llevada a cabo durante el paso de

incubación (d), lo que determina la tasa de crecimiento relativo en co-cultivo de células productoras mutantes y células diana. Esto puede comprender el muestreo de microgotas que contienen solo células productoras mutantes por FADS durante el paso de incubación, por ejemplo, en diferentes puntos temporales. Por lo tanto, dos o más rondas sucesivas de selección de FADS se pueden llevar a cabo durante la incubación para recuperar diferentes clases de mutantes productores en función de la potencia del agente citotóxico producido. En tales realizaciones, las células diana pueden estar marcadas con fluorescencia y las microgotas que contienen células diana se someten a una incubación continua. Por lo tanto, el paso de selección (e) comprende preferiblemente la clasificación FADS para las microgotas en las cuales las células diana han sido superadas o crecidas en la extinción por las células productoras mutantes.

[0040] Las especies procarióticas productoras se pueden seleccionar de arqueas, por ejemplo seleccionadas de entre el phyla: (a) Crenarchaeota; (b) Euryarchaeota; (c) Korarchaeota; (d) Nanoarchaeota y (e) Thaumarchaeota, por ejemplo *Haloferax volcanii* o *Sulfolobus* spp. Alternativamente, las especies procarióticas productoras pueden seleccionarse de bacterias, por ejemplo seleccionadas de: (a) actinomicetos; (b) *Pseudomonas* spp., y (c) *Bacillus* spp.

[0041] En realizaciones preferidas, las especies bacterianas de productores se seleccionan de *Streptomyces* spp, por ejemplo seleccionadas de: (A) *Streptomyces coelicolor*, (b) *Streptomyces lividans*; (c) *Streptomyces venezuelae*; (d) *Streptomyces griseus*; (e) *Streptomyces avermitilis*; y (f) *Streptomyces bingchengensis*;

[0042] La célula diana puede ser una célula bacteriana o eucariótica. Por ejemplo, la célula diana puede ser: (a) fúngica; (b) mamaliana; (c) una célula vegetal superior; (d) protozoo; (e) una célula helmintos; (f) algas; o (h) una célula de invertebrados.

[0043] En algunas realizaciones, la célula diana es una célula cancerosa, por ejemplo una célula cancerosa humana.

[0044] En otras realizaciones, la célula diana es una bacteria patógena.

[0045] En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para identificar un agente citotóxico que comprende la selección de bacterias mutantes para identificar a los productores de un agente citotóxico activo contra una célula diana de acuerdo con un método como se define anteriormente.

[0046] En un tercer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para producir un agente citotóxico que comprende el método del segundo aspecto de la invención como se define anteriormente. En este caso, el proceso puede comprender además sintetizar o aislar dicho agente citotóxico de las bacterias mutantes, y opcionalmente puede comprender mezclar el agente citotóxico sintetizado o aislado con un excipiente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica.

[0047] Otros aspectos y realizaciones preferidas de la invención se definen y describen en las otras reivindicaciones que figuran a continuación.

[0048] Cuando se usa en el presente documento y salvo que se indique específicamente lo contrario, los siguientes términos pretenden tener los siguientes significados además de cualesquiera significados más amplios (o más estrechos) que los términos podrían tener en la técnica:

A menos que el contexto requiera lo contrario, el uso aquí del singular se debe leer para incluir el plural y viceversa. El término "un" o "una" utilizado en relación con una entidad debe leerse para referirse a uno o más de esa entidad. Como tales, los términos "un" (o "una"), "uno o más" y "al menos uno" se usan indistintamente en este documento.

[0049] Tal como se utiliza aquí, el término "comprenden", o variaciones de los mismos tales como "comprende" o "comprendiendo", han de entenderse para indicar la inclusión de cualquier número entero recitado (por ejemplo, una característica, elemento, rasgo, propiedad, método/paso o limitación del proceso) o grupo de enteros (por ejemplo, características, elementos, rasgos, propiedades, pasos o limitaciones del método/proceso), pero no la exclusión de ningún otro entero o grupo de enteros. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, el término "que comprende" es inclusivo o abierto y no excluye enteros adicionales o pasos de método/proceso no reconocidos.

[0050] El término gen es un término que describe una unidad hereditaria que consiste en una secuencia de ADN que ocupa una ubicación específica en un cromosoma o plásmido y determina una característica particular en un organismo. Un gen puede determinar una característica de un organismo especificando una cadena polipeptídica que forma una proteína o parte de una proteína (gen estructural); o codificar una molécula de ARN; o regular la operación de otros genes o reprimir dicha operación; o afectar el fenotipo por algún otro mecanismo aún no definido.

[0051] El ADN genómico términos es un término de la técnica usado en el presente documento para definir ADN cromosómico como distinto de ADN plásmido extracromosómicamente mantenido.

[0052] El término genoma es un término de la técnica usado en este documento para definir todo el complemento

genético de un organismo, y así incluye cromosómico, plásmido, profago y cualquier otro ADN.

[0053] El término bacteria gram-positiva es un término de la técnica que define una clase particular de bacterias que se agrupan juntas en la base de ciertas características de tinción de la pared celular.

[0054] El término bacteria gram-positiva de G + C baja es un término de la técnica que define una clase subclase particular de bacterias relacionadas evolutivamente dentro de las gram-positivas sobre la base de la composición de las bases en el ADN. La subclase incluye *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp. y *Lacto-bacillus* spp.).

[0055] El término bacteria gram-positiva de G + C alta es un término de la técnica que define una clase subclase particular de bacterias relacionadas evolutivamente dentro de las gram-positivas sobre la base de la composición de las bases en el ADN. La subclase incluye actinomicetos (actinobacterias) que incluyen *Actinomyces* spp., *Arthrobacter* spp., *Corynebacterium* spp., *Frankia* spp., *Micrococcus* spp., *Micromonospora* spp., *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Propionibacterium* spp. y *Streptomyces* spp.

[0056] El término bacteria gram-negativa es un término de la técnica que define una clase particular de bacterias que se agrupan juntas en la base de ciertas características de tinción de la pared celular. Los ejemplos de géneros bacterianos gram negativos incluyen *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Neisseria*.

[0057] El término "monodisperso" como se aplica a las microgotitas significa cualquier emulsión que muestra un coeficiente de dispersión de tamaño de partícula, ϵ , de no más de 1,0, no más de 0,5, y preferiblemente no más de 0,3. Dicho coeficiente ϵ se define por la siguiente ecuación:

$$\epsilon = \frac{(90 D_p - 10 D_p) / 50 D_p}{1}$$

donde $^{10}D_p$, $^{50}D_p$ y $^{90}D_p$ son los tamaños de partícula cuando las frecuencias acumuladas estimadas a partir de una curva de distribución de tamaño de partícula acumulada relativa para la emulsión son 10%, 50% y 90%, respectivamente. El caso donde $\epsilon = 0$ significa un estado ideal en el que las partículas de emulsión no muestran dispersión de tamaño de partícula en absoluto.

[0058] Tal como se utiliza aquí, el término "tasa de inserción" tal como se aplica a la inserción de transposón, se utiliza para indicar la densidad de T_{NA} de inserción al nivel del depósito mutante como un todo, con una inserción T_{NA} en cada bacteria. También se entenderá que los eventos de inserción de T_{NA} letales, como los que surgen de la inactivación por inserción de un gen esencial, no serán representados por miembros viables del conjunto de mutantes. Por lo tanto, las tasas de inserción especificadas aquí se aplican a regiones no esenciales del ADN.

[0059] Como se usa en este documento, el término "agente citotóxico" define cualquier compuesto (por ejemplo un metabolito, proteína, péptido u otro biopolímero) que actúa para matar, o para evitar o restringir el crecimiento o la actividad biológica de, una célula diana.

Cellulas procariotas productoras

[0060] Se puede usar cualquier célula procariota de acuerdo con la invención, incluyendo células arqueas y bacterianas.

[0061] Las células arqueales pueden seleccionarse de los filos: (a) Crenarchaeota; (b) Euryarchaeota; (c) Korarchaeota; (d) Nanoarchaeota y (e) Thaumarchaeota.

[0062] Como ejemplos, los géneros arqueales incluyen *Acidianus*, *Acidilobus*, *Acidococcus*, *Aciduliprofundum*, *Aeropyrum*, *Archaeoglobus*, *Bacilloviridae*, *Caldisphaera*, *Caldivirga*, *Caldococcus*, *Cenarchaeum*, *Desulfurococcus*, *Ferroglobus*, *Ferropasma*, *Geogemma*, *Geoglobus*, *Haladaptaus*, *Halalkalicoccus*, *Haloalcalophilium*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobaculum*, *Halobiforma*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Halomicrobium*, *Halopiger*, *Haloplanus*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Halosarcina*, *Halosimplex*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Halovivax*, *Hyperthermus*, *Ignicoccus*, *Ignisphaera*, *Metallosphaera*, *Methanicrococcus*, *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanocalculus*, *Methantxaldococcus*, *Methanocella*, *Methanococcoides*, *Methanococcus*, *Methanocorpusculum*, *Methanoculleus*, *Methanofollis*, *Methanogenium*, *Methanohalobium*, *Methanohalophilus*, *Methanolacinia*, *Methanolobus*, *Methanomethylovorans*, *Methanomicrobium*, *Methanoplanus*, *Methanopyrus*, *Methanoregula*, *Methanosaeta*, *Methanosalsum*, *Methanosarcina*, *Methanosphaera*, *Methanospirillum*, *Methanothermobacter*, *Methanothermococcus*, *Methanothermus*, *Methanotherrix*, *Methanotorris*, *Nanoarchaeum*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronolimnobius*, *Natronomonas*, *Natronorubrum*, *Nitracopumilus*, *Palaeococcus*, *Picrophilus*, *Pyrobaculum*, *Pyrococcus*, *Pyrodictium*, *Pyrolobus*, *Staphylothermus*, *Stetteria*, *Stygiolobus*, *Sulfolobus*, *Sulfobobococcus*, *Sulfurisphaera*, *Thermocladium*, *Thermococcus*, *Thermodiscus*, *Thermofilum*, *Thermoplasma*, *Thermoproteus*, *Thermosphaera* and *Vulcanisaeta*.

[0063] Especies arqueales ejemplares incluyen: *Aeropyrum pernix*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Desulfococcus species TOK*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanococcus jannaschii*, *Pyrobaculum aerophilum*, *Pyrobaculum calidifontis*, *Pyrobaculum islandicum*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrococcus GB-D*, *Pyrococcus glycovorans*, *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus spp. GE23*, *Pyrococcus spp. ST700*, *Pyrococcus woessii*, *Pyrodictium occultum*, *Sulfolobus acidocaldarium*, *Sulfolobus solataricus*, *Sulfolobus tokodaii*, *Thermococcus aggregans*, *Thermococcus barossii*, *Thermococcus celer*, *Thermococcus fomicolans*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermococcus hydrothermalis*, *Thermococcus onnurineus NA 1*, *Thermococcus pacificus*, *Thermococcus profundus*, *Thermococcus siculi*, *Thermococcus spp. GE8*, *Thermococcus spp. JDF-3*, *Thermococcus spp. TY*, *Thermococcus thioreducens*, *Thermococcus zilligti*, *Thermoplasma acidophilum*, *Thermoplasma volcanium*, *Acidianus hospitalis*, *Acidilobus sacharovorans*, *Aciduliprofundum boonei*, *Aeropyrum pernix*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Archaeoglobus profundus*, *Archaeoglobus veneficus*, *Caldivirga maquilingensis*, *Candidatus Korarchaeum cryptofilum*, *Candidatus Methanoregula boonei*, *Candidatus Nitrosoarchaeum limnia*, *Cenarchaeum symbiosum*, *Desulfurococcus kamchatkensis*, *Ferroglobus placidus*, *Ferroplasma acidarmanus*, *Halalkalicoccus jeotgali*, *Haloarcula hispanica*, *Haloarcula marismortui*, *Halobacterium salinarum*, *Halobacterium species*, *Halobiforma lucisalsi*, *Haloferax volcanii*, *Halogeometricum borinquense*, *Halomicrobium mukohataei*, *halophilic archaeon sp. DL31*, *Halopiger xanaduensis*, *Haloquadratum walsbyi*, *Halorhabdus tiamatea*, *Halorhabdus utahensis*, *Halorubrum lacusprofundi*, *Haloterrigena turkmenica*, *Hyperthermus butylicus*, *Igniococcus hospitalis*, *Ignisphaera aggregans*, *Metallosphaera cuprina*, *Metallosphaera sedula*, *Methanobacterium sp. AL-21*, *Methanobacterium sp. SWAN-1*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanocaldococcus fervens*, *Methanocaldococcus infernus*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Methanocaldococcus sp. FS406-22*, *Methanocaldococcus vulcanius*, *Methanocella conradii*, *Methanocella paludicola*, *Methanocella sp. Rice Cluster I (RC-I)*, *Methanococcoides burtonii*, *Methanococcus aeolicus*, *Methanococcus maripaludis*, *Methanococcus vanniellii*, *Methanococcus voltae*, *Methanocorpusculum labreantum*, *Methanoculleus marisnigri*, *Methanohalobium evestigatum*, *Methanohalophilus mahii*, *Methanoplanus petrolearius*, *Methanopyrus kandleri*, *Methanosaeta concilii*, *Methanosaeta harundinacea*, *Methanosaeta thermophila*, *Methanosalsum zhilinae*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosphaera stadtmanae*, *Methanosphaerula palustris*, *Methanospirillum hungatei*, *Methanothermobacter marburgensis*, *Methanothermococcus okinawensis*, *Methanothermus fervidus*, *Methanotorris igneus*, *Nanoarchaeum equitans*, *Natrialba asiatica*, *Natrialba magadii*, *Natronomonas pharaonis*, *Nitrosopumilus maritimus*, *Picrophilus torridus*, *Pyrobaculum aerophilum*, *Pyrobaculum arsenaticum*, *Pyrobaculum calidifontis*, *Pyrobaculum islandicum*, *Pyrobaculum sp. 1860*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus sp. NA42*, *Pyrococcus yayanosii*, *Pyrolobus fumarii*, *Staphylothermus hellenicus*, *Staphylothermus marinus*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus islandicus*, *Sulfolobus solfataricus*, *Sulfolobus tokodaii*, *Thermococcus barophilus*, *Thermococcus gammatolerans*, *Thermococcus kodakaraensis*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus onnurineus*, *Thermococcus sibiricus*, *Thermococcus sp. 4557*, *Thermococcus sp. AM4*, *Thermofilum pendens*, *Thermoplasma acidophilum*, *Thermoplasma volcanium*, *Thermoproteus neutrophilus*, *Thermoproteus tenax*, *Thermoproteus uzoniensis*, *Thermosphaera aggregans*, *Vulcanisaeta distributa*, and *Vulcanisaeta moutnovskia*.

[0064] Los ejemplos particulares de células arqueales útiles como células productoras de acuerdo con la invención incluyen *Haloferax volcanii* y *Sulfolobus spp.*

[0065] Las células bacterianas pueden ser seleccionadas del phylum Actinobacteria, por ejemplo de las siguientes familias: Actinomycetaceae; Propionibacteriaceae; Frankiaceae; Micrococcaceae; Micromonosporaceae; Streptomyetaceae; Micobacterias; Corynebacteriaceae; Pseudonocardiaceae y Nocardiceae.

[0066] Por lo tanto, en algunas realizaciones, la célula procariota productora se selecciona de *Saccaropolispora spp.*, Por ejemplo, *Saccaropolispora Erythrea*. En otras realizaciones, la célula procariota productora se selecciona de *Kutzneria spp.*, por ejemplo, *Kutzneria albida*. En otras realizaciones más, la célula procariota productora se selecciona de *Mycobacterium spp.*, por ejemplo, *Mycobacterium marinum*.

[0067] En realizaciones preferidas, la célula procariota productora se selecciona de *Streptomyces spp.* El género *Streptomyces* comprende más de 500 especies, cualquiera de las cuales puede usarse como cepas productoras de acuerdo con la invención. Por lo tanto, la cepa productora puede seleccionarse de cualquiera de las siguientes especies: *S. ambofaciens*, *S. achromogenes*, *S. anulatus*, *S. avermitilis*, *S. coelicolor*, *S. clavuligerus*, *S. felleus*, *S. ferralitis*, *S. filamentosus*, *S. griseus*, *S. hygrosopicus*, *S. iysosuperficus*, *S. lividans*, *S. noursei*, *S. scabies*, *S. somaliensis*, *S. thermoviolaceus*, *S. venezuelae* y *S. violaceoruber*.

[0068] En algunas realizaciones, la célula procariota productora se selecciona de: (a) *Streptomyces coelicolor*, (b) *Streptomyces lividans*; (c) *Streptomyces venezuelae*; (d) *Streptomyces griseus*; (e) *Streptomyces avermitilis*; y (f) *Streptomyces bingchengensis*.

[0069] En otras realizaciones, la célula procariota productora se selecciona de *Micromonospora spp.*, cuyo género comprende varias especies, cualquiera de las cuales pueden ser utilizadas como cepas productoras de acuerdo con la invención. Así, la célula productora puede seleccionarse de una célula de cualquiera de las siguientes especies: *M. aurantiaca*, *M. carbonacea*, *M. chalcea*, *M. chersina*, *M. citrea*, *M. coerulea*, *M. echinaurantiaca*, *M. echinofusca*, *M. echinospora*, *M. fulviviridis*, *M. gallica*, *M. halophytica*, *M. inositola*, *M. inyonensis*, *M. nigra*, *M. olivasterospora*, *M.*

pallida, *M. peucetia*, *M. purpureochromogenes*, *M. rosaria*, *M. sagamiensis* y *M. viridifaciens*.

[0070] Las células bacterianas también pueden ser seleccionadas del filo Firmicutes, por ejemplo, de las siguientes clases: bacilos, Clostridia y Mollicutes.

[0071] Los bacilos ejemplares incluyen aquellos seleccionados de cualquiera de las siguientes familias: Alicyclobacillaceae; Bacillaceae; Caryophanaceae; Listeriaceae; Paenibacillaceae; Planococcaceae; Sporolactobacillaceae; Staphylococcaceae; Thermoactinomycetaceae y Turicibacteraceae; Clostridia ejemplares incluyen aquellos seleccionados de cualquiera de las siguientes familias: cidaminococcaceae; Clostridiaceae; Eubacteriaceae; Heliobacteriaceae; Lachnospiraceae; Peptococcaceae; Peptostreptococcaceae y Syntrophomonadaceae.

[0072] En algunas realizaciones, la célula procarionota productora se selecciona de *Bacillus* spp. y Clostridia spp., por ejemplo, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum*;

[0073] Las células bacterianas también pueden ser seleccionadas de la familia Pseudomonadaceae, por ejemplo miembros del género *Pseudomonas*.

Células diana para uso en los métodos de la invención.

Células diana bacterianas

[0074] Las células diana para uso de acuerdo con la invención pueden ser células bacterianas. En tales realizaciones, las bacterias pueden seleccionarse de: (a) bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y/o Gram-variables; (b) bacterias formadoras de esporas; (c) bacterias que no forman esporas; (d) bacterias filamentosas; (e) bacterias intracelulares; (f) aerobios obligados; (g) anaerobios obligados; (h) anaerobios facultativos; (i) bacterias microaerófilas y/o (f) patógenos bacterianos oportunistas.

[0075] En ciertas realizaciones, las células diana para uso de acuerdo con la invención pueden seleccionarse a partir de bacterias de los siguientes géneros: *Acinetobacter* (p. ej. *A. baumannii*); *Aeromonas* (p. ej. *A. hydrophila*); *Bacillus* (p. ej. *B. anthracis*); *Bacteroides* (p. ej. *B. fragilis*); *Bordetella* (p. ej. *B. pertussis*); *Borrelia* (p. ej. *B. burgdorferi*); *Brucella* (p. ej. *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis* y *B. suis*); *Burkholderia* (p. ej. *B. cepacia* complex); *Campylobacter* (p. ej. *C. jejuni*); *Chlamydia* (p. ej. *C. trachomatis*, *C. suis* y *C. muridarum*); *Chlamydophila* (p. ej. (p. ej. *C. pneumoniae*, *C. pecorum*, *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. felis* y *C. caviae*); *Citrobacter* (p. ej. *C. freundii*); *Clostridium* (p. ej. *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens* y *C. tetani*); *Corynebacterium* (p. ej. *C. diphtheriae* y *C. glutamicum*); *Enterobacter* (p. ej. *E. cloacae* y *E. aerogenes*); *Enterococcus* (p. ej. *E. faecalis* y *E. faecium*); *Escherichia* (p. ej. *E. coli*); *Flavobacterium*; *Francisella* (p. ej. *F. tularensis*); *Fusobacterium* (p. ej. *F. necrophorum*); *Haemophilus* (p. ej. *H. somnus*, *H. influenzae* y *H. parainfluenzae*); *Helicobacter* (p. ej. *H. pylori*); *Klebsiella* (p. ej. *K. oxytoca* y *K. pneumoniae*); *Legionella* (p. ej. *L. pneumophila*); *Leptospira* (p. ej. *L. interrogans*); *Listeria* (p. ej. *L. monocytogenes*); *Moraxella* (p. ej. *M. catarrhalis*); *Morganella* (p. ej. *M. morganii*); *Mycobacterium* (p. ej. *M. leprae* y *M. tuberculosis*); *Mycoplasma* (p. ej. *M. pneumoniae*); *Neisseria* (p. ej. *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*); *Pasteurella* (p. ej. *P. multocida*); *Peptostreptococcus*; *Prevotella*; *Proteus* (p. ej. *P. mirabilis* y *P. vulgaris*); *Pseudomonas* (p. ej. *P. aeruginosa*); *Rickettsia* (p. ej. *R. rickettsii*); *Salmonella* (p. ej. serotipos . Typhi y Typhimurium); *Serratia* (p. ej. *S. marcescens*); *Shigella* (p. ej. *S. flexneria*, *S. dysenteriae* y *S. sonnei*); *Staphylococcus* (p. ej. *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. intermedius*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*); *Stenotrophomonas* (p. ej. *S. maltophilia*); *Streptococcus* (p. ej. *S. agalactiae*, *S. mutans*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*); *Treponema* (p. ej. *T. pallidum*); *Vibrio* (p. ej. *V. cholerae*) y *Yersinia* (p. ej. *Y. pestis*).

[0076] Las células diana para uso de acuerdo con la invención pueden ser seleccionadas bacterias gram-positivas de G + C alta y bacterias gram-positivas de G + C baja.

Bacterias patógenas como células diana

[0077] Patógenos bacterianos humanos o animales incluyen bacterias tales como *Legionella* spp., *Listeria* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Hafnia* spp., *Haemophilus* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., *Bacillus* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp., *Neisseria* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Mycobacterium* spp., *Enterobacter* spp.

Células fúngicas patógenas

[0078] Estas incluyen levaduras, por ejemplo, especies de *Candida* que incluyen *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis*, y hongos filamentosos como el *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. y dermatofitos como *Trichophyton* spp.

Patógenos de las plantas

[0079] Las células diana para uso de acuerdo con la invención pueden ser patógenas de las plantas, por ejemplo

Pseudomonas spp., *Xylella* spp., *Ralstonia* spp., *Xanthomonas* spp., *Erwinia* spp., *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Botrytis* spp., *Leptosphaeria* spp., mildiúes en polvo (Ascomycota) y óxido (Basidiomycota).

Células mutantes productoras

5 **[0080]** Los métodos de la invención implican la generación de un conjunto de células procariotas mutantes por mutagénesis de transposones. El tamaño del conjunto de mutantes afecta la resolución del método: a medida que aumenta el tamaño del conjunto, se representarán cada vez más genes diferentes con inserciones de Tn_A (y, por lo tanto, se ensayarán). A medida que el tamaño de la reserva disminuye, la resolución del método se reduce, los genes se analizarán de manera menos eficaz y cada vez más genes no se analizarán.

10 **[0081]** De manera ideal, el grupo de mutantes generado en los métodos de la invención es exhaustivo, en el sentido de que se representan las inserciones en todos los genes (no esenciales). El número de mutantes de inserción Tn_A (es decir, el tamaño del conjunto de mutantes) requerido para lograr esto depende de varios factores, entre los que se incluyen: (a) el tamaño del genoma procariótico; (b) el tamaño promedio de los genes; y (c) cualquier sesgo de sitio de inserción Tn_A .

15 **[0082]** Con respecto a este último, algunas áreas del genoma atraen una baja frecuencia de inserción (regiones especialmente ricas en GC). Por lo tanto, se prefieren las frecuencias de inserción y los tamaños de agrupación lo suficientemente grandes como para asegurar inserciones en regiones refractarias de inserción.

20 **[0083]** En general, se requiere una velocidad de inserción mínima de un transposón por 25 pb para lograr un depósito general/de la biblioteca, que típicamente implica un tamaño de la agrupación mínima para células procariotas que tienen un tamaño de genoma de 4 a 7 Mb de $0,5 \times 10^5$ a 1×10^5 , por ejemplo 5×10^5 , preferiblemente al menos aproximadamente 1×10^6 mutantes. En muchos casos, 1×10^6 mutantes permitirán la identificación de \square 300,000 sitios de inserción diferentes y corresponderán a 1 inserción de transposón cada 13 a 23 pb (o alrededor de 40-70 sitios de inserción diferentes por gen).

25 **[0084]** Sin embargo, los métodos de la invención no requieren necesariamente un depósito mutante integral (en el sentido definido anteriormente) con el fin de generar accesos útiles. Más bien, se pueden usar tamaños de agrupación menores que el conjunto integral ideal, siempre que se pueda tolerar una reducción en la resolución (y la falla concomitante de analizar ciertos genes). Este puede ser el caso, por ejemplo, cuando el método está diseñado para ejecutarse de forma iterativa hasta que se identifique un resultado: en tales realizaciones, el tamaño efectivo de la agrupación aumenta con cada iteración del método.

30 Mutagénesis transposón

35 **[0085]** Los transposones, a veces llamados elementos transponibles, son polinucleótidos capaces de insertar copias de sí mismos en otros polinucleótidos. El término transposón es bien conocido por los expertos en la técnica e incluye clases de transposones que pueden distinguirse sobre la base de la organización de secuencias, por ejemplo, repeticiones cortas invertidas en cada extremo; repeticiones terminales largas (LTR) directamente repetidas en los extremos; y poliA en los extremos 3' de los transcritos de ARN con extremos 5' a menudo truncados.

40 **[0086]** Los transposomas son complejos transposasa-transposón en los que el transposón no codifica transposasa. Así, una vez insertado el transposón es estable. Preferiblemente, con el fin de asegurar la estabilidad del conjunto mutante, el transposón no codifica la transposasa y se proporciona en forma de un transposoma (es decir, como un complejo con enzima transposasa), como se describe a continuación.

45 **[0087]** Como se usa en este documento, el término "activación de transposón" (en adelante abreviado " Tn_A ") define un transposón que comprende un promotor tal que la inserción de transposón aumenta la transcripción de un gen en o cerca del sitio de inserción. Ejemplos de tales transposones se describen en Troeschel et al. (2010) *Methods Mol Biol.* 668: 117-39 y Kim et al. (2008) *Curr Microbiol.* 57 (4): 391-394.

50 **[0088]** El transposón de activación/transposoma puede ser introducido en el genoma procariota (incluyendo cromosómico y/o de ADN plásmido) por cualquiera de una amplia variedad de procedimientos estándar que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los transposomas Tn_A pueden introducirse por electroporación (o cualquier otro método de transformación adecuado).

55 **[0089]** Preferiblemente, el método de transformación genera 1×10^3 a 5×10^3 transformantes/ng ADN, y tales eficacias de transformación son generalmente alcanzables usando electroporación.

60 **[0090]** Alternativamente, la mutagénesis de transposón usando Tn_A puede realizarse in vitro y las moléculas recombinantes transformadas/transfectadas en las células procariotas. En tales realizaciones, los transposomas pueden prepararse de acuerdo con un protocolo estándar mezclando la enzima transposasa disponible comercialmente con el fragmento de ADN del transposón. Los transposomas resultantes se mezclan luego con el ADN extracromosómico de interés para permitir la transposición, luego el ADN se introduce en una cepa bacteriana

del huésped utilizando electrotransformación para generar un conjunto de mutantes transposón de ADN extracromosomal.

[0091] En realizaciones en las que la mutagénesis se realiza in vitro, es posible mezclar transposomas con ADN genómico in vitro y luego introducir el ADN mutagenizado (opcionalmente, después de la fragmentación y/o circularización) en la célula procarionta huésped (por ejemplo, mediante electroporación) después de lo cual la maquinaria de recombinación endógena lo incorpora en el genoma. Dicho enfoque puede ser particularmente útil en el caso de procariontas que son naturalmente competentes (por ejemplo, *Acinetobacter* spp.) y/o puede incorporar ADN a través de eventos de recombinación homóloga de cruce (por ejemplo, doble cruce).

Activar transposones para su uso en los métodos de la invención.

[0092] Cualquier transposón de activación adecuado se puede utilizar en los métodos de la invención. Los transposones adecuados incluyen aquellos basados en TN3 y los transposones similares a TN3 (Clase II) que incluyen $\gamma\delta$ (Tn 1000), Tn501, TN2501, TN21, TN917 y sus parientes. También Tn 10, Tn5, TnpHoA, TN903, TN5096, Tn5099, TN4556, UC8592, IS493, Mu bacteriófago y bacteriófagos transponibles relacionados. Una variedad de transposones adecuados también están disponibles comercialmente, incluyendo por ejemplo el transposón EZ-Tn5TM <R6K_{Yori}/KAN-2>.

[0093] Transposones preferidos son aquellos que portan genes de resistencia a antibióticos aunque cualquier marcador seleccionable puede ser utilizado incluyendo complementación auxotrófica (que puede ser útil en la identificación de mutantes que llevan un transposón), incluyendo Tn5, Tn10 y TnpHoA. Por ejemplo, Tn10 transporta un gen de resistencia a la tetraciclina entre sus elementos IS, mientras que Tn5 transporta genes que codifican polipéptidos que confieren resistencia a kanamicina, estreptomycin y bleomicina. Otros genes de resistencia adecuados incluyen aquellos que incluyen neomicina, apramicina, tiostrepton y cloranfenicol acetiltransferasa (que confiere resistencia al cloranfenicol).

[0094] Por supuesto, es posible generar nuevos transposones mediante la inserción de diferentes combinaciones de genes de resistencia a antibióticos entre elementos IS, o mediante la inserción de combinaciones de genes de resistencia a antibióticos entre los extremos de mosaico transposón (preferido), o alterando la secuencia de polinucleótido del transposón, por ejemplo, haciendo una sustitución de base redundante o cualquier otro tipo de sustitución de base que no afecte a la transposición o las características de resistencia a los antibióticos del transposón, en la región codificante de un gen de resistencia a los antibióticos o en cualquier otra parte del transposón. Tales transposones están incluidos dentro del alcance de la invención.

[0095] En muchas realizaciones, un único transposón se utiliza para generar el conjunto mutante. Sin embargo, como se explicó anteriormente, el número de mutantes de inserción de Tn (es decir, el tamaño de la agrupación de mutantes) requerido para lograr un conjunto completo o una biblioteca depende, entre otras cosas, de cualquier sesgo de sitio de inserción de Tn. Por lo tanto, en los casos en que se produce el sesgo del sitio de inserción del transposón, se pueden usar dos o más transposones diferentes para reducir o eliminar el sesgo del sitio de inserción. Por ejemplo, se puede emplear una combinación de dos transposones diferentes basados en Tn5 y Tn10.

Promotores para uso en la activación de transposones

[0096] La naturaleza del promotor presente en el Tn_A es dependiente de la naturaleza del transposón y el último huésped procarionta. En general, se elige un promotor eficiente orientado hacia el exterior que impulsa la transcripción constitutiva y/o de alto nivel de ADN cerca o adyacente al sitio de inserción.

[0097] El promotor puede incluir: (a) una caja de Pribnow (elemento -10); (b) un elemento -35 y/o (c) un elemento UP.

[0098] Por ejemplo, el promotor *lac* se puede utilizar con el EZ-Tn5TM <R6K y ori/KAN-2 >transposón, y tales constructos son adecuados para el ensayo de, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. y otros miembros de la familia Enterobacterias como *Klebsiella* spp. Otros promotores adecuados incluyen: rpl J (proteína de la subunidad ribosomal grande; promotor de potencia moderada); tac (híbrido artificial *lac/trp*; promotor fuerte) y *rrnB* (promotor del gen del ARN ribosomal; promotor muy fuerte).

[0099] Los promotores adecuados también pueden ser diseñados o seleccionados como se describe en Rhodius et al. (2011) *Nucleic Acids Research*: 1-18 y Zhao et al. (2013) *ACS Synth. Biol.* 2 (11): 662-669. La aplicación rápida de la secuenciación de la próxima generación a RNA-seq proporciona ahora una gran cantidad de información de alta resolución de sitios de inicio de transcripción a nivel genómico, lo que simplifica enormemente la identificación de secuencias promotoras en cualquier procarionta determinado. Esto permite la construcción de modelos de promotores descriptivos para genomas completos. RNA-seq también proporciona información cuantitativa sobre la abundancia del transcrito y, por lo tanto, la fuerza del promotor, lo que permite la construcción de modelos de fuerza del promotor que luego se pueden usar para las clasificaciones de la fuerza del promotor predictivo (ver Rhodius et al. (2011) *Nucleic Acids Research*: 1-18).

[0100] Por lo tanto, PCR en tiempo real y ARN-seq permiten la rápida identificación de promotores constitutivos fuertes de las regiones aguas arriba de los genes de mantenimiento en la célula productora seleccionada.

[0101] Los promotores adecuados también pueden identificarse mediante el ensayo. Por ejemplo, se puede construir una serie de plásmidos para ensayar empíricamente la fuerza del promotor. Brevemente, el promotor que se va a ensayar se coloca aguas arriba de un gen de resistencia a los antibióticos y luego se transforma en las bacterias relevantes. El ensamblaje general de clonación y la amplificación del plásmido se pueden llevar a cabo en *E. coli* (facilitado por el gen de resistencia a la ampicilina y el pBR322 ori) y la actividad del promotor en la bacteria diana puede ensayarse generando una curva de destrucción con el antibiótico relevante. un promotor de nivel muy alto da más expresión de resistencia a los antibióticos y, por lo tanto, sobrevive a una mayor concentración de antibióticos. La serie de plásmidos está diseñada para ser modular, de modo que el origen de la replicación, los genes de resistencia y el promotor se puedan cambiar fácilmente.

[0102] Los promotores adecuados para uso con Actinobacteria en general (y *Streptomyces* spp., en particular) incluyen los promotores actinobacteriales GAPDH y RPSL descritos en Zhao et al. (2013) ACS Synth. Biol. 2 (11): 662-669.

[0103] En las circunstancias en múltiples promotores de diferentes puntos fuertes se van a utilizar (véase a continuación para más detalles en este sentido), entonces GAPDH de *Eggerthella lenta* y rpsL de *Cellulomonas flavigina* puede ser utilizado como la base para promotores muy fuertes, gapdh y rpsL de *S. griseus* se pueden usar como base para los promotores de fuerza media, mientras que rpoA y rpoB de *S. griseus* se pueden usar como base para los promotores de fuerza baja (ver Shao et al. (2013) ACS Synth. Biol. 2 (11): 662-669).

[0104] Otros promotores adecuados incluyen ermE*, una variante mutada del promotor del gen de resistencia a eritromicina de *Saccharopolispora erythraea* (ver por ejemplo, Wagner et al (2009) J. Biotechnol, 142: 200-204).

[0105] Los promotores adecuados para uso con Actinobacteria pueden ser identificados y/o por modificación genética como se describe en Seghezzi et al. (2011) Applied Microbiology and Biotechnology 90 (2): 615-623, donde se describe el uso de cuadros aleatorios -10 y -35 para identificar secuencias importantes para los niveles de expresión. Otro enfoque se describe en Wang et al. (2013) Applied and Environmental Microbiology 79 (14): 4484-4492.

[0106] Los promotores adecuados para uso con *Bacillus* spp. pueden estar basados en los muchos promotores diferentes descritos para el organismo modelo de *Bacillus subtilis*, incluyendo por ejemplo el P43, amyE y APRE promotores de *B. subtilis* (véase por ejemplo Kim et al. (2008) Biotechnology y Bioprocesos Engineering 13 (3) 313-318).

Uso de T_nA múltiples/promotores múltiples

[0107] En algunas realizaciones de la invención, el genoma procarionta se sondea con una mezcla de diferentes transposones activantes que tienen promotores orientados hacia afuera de diferentes puntos fuertes. En algunas circunstancias, se recupera una gama más amplia de genes involucrados en la resistencia y/o sensibilidad a los antibióticos si se emplea una mezcla de transposones activadores con al menos tres promotores diferentes de fuerza progresivamente decreciente para generar el grupo de mutantes.

[0108] En tales circunstancias, el uso de una pluralidad de activación de transposones con promotores de fuerza variable asegura que las inserciones de transposones se producen sustancialmente en todos los genes no esenciales se representan en el depósito mutante inicial, ya que la inserción del transposón ahora puede resultar en la activación de genes a producir un nivel apropiado de transcripción (ni demasiado alto, ni demasiado bajo).

[0109] En tales formas de realización, pueden utilizarse siempre que una amplia variedad de promotores que al menos tres promotores diferentes se usan en donde la fuerza relativa de dichos promotores es: T_nA_{P1} >T_nA_{P2} >T_nA_{P3}; de modo que la inserción de transposones en el ADN procariótico genera un conjunto de células mutantes que contienen miembros en los que uno o más genes se transcriben de T_nA_{P1}, uno o más genes se transcriben de T_nA_{P2} y uno o más genes se transcriben de T_nA_{P3}.

[0110] Preferiblemente, T_nA_{P1} es un promotor fuerte, T_nA_{P2} un promotor de fuerza media y T_nA_{P3} un promotor débil en las células huésped procariontas mutagenizadas en las condiciones utilizadas para la incubación y la cultura del depósito mutante en presencia de las células diana. En algunas realizaciones, la tasa de inicio de la transcripción relativa de T_nA_{P1} es al menos 3 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces o al menos 10.000 veces mayor que la de T_nA_{P3} en estas condiciones.

[0111] Cada promotor incluye típicamente: (a) una caja de Pribnow (elemento -10); (b) un elemento -35 y (c) un elemento UP. Los expertos en la materia pueden identificar fácilmente promotores que tienen las fuerzas relativas requeridas mediante análisis de secuencia y/o ensayos in vitro o in vivo usando construcciones de expresión.

[0112] Los promotores adecuados incluyen el *E. coli* rpl J (grande proteína de la subunidad ribosomal; promotor de fuerza moderada); Los promotores tac (híbrido lac/trp artificial; promotor fuerte) y *rnmB* (promotor del gen del ARN ribosómico; promotor muy fuerte).

5 **[0113]** Como se usa en este documento, los términos P_{rplJ} y P_{rnmB} se refieren específicamente a promotores *E. coli* para la proteína L10 de la subunidad 50S ribosomal y genes de ARN ribosómico 16S, respectivamente. También se pueden usar ortólogos de estos (y otros) promotores de *E. coli* de otras bacterias gram-negativas, incluidos en particular los promotores ortólogos de *Pseudomonas aeruginosa* o *Acinetobacter baumannii*.

10 **[0114]** Por ejemplo, el gen ortólogo *Acinetobacter baumannii* correspondiente a *E. coli* *rnmB* P_{rnmB} tiene el símbolo de gen A1S_R12 y codifica el gen de ARN ribosomal *Acinetobacter baumannii* 16S, de modo que el promotor ortólogo correspondiente se denomina en la presente $P_{(A1S_R12)}$. Así, cuando el método se aplica a *Acinetobacter baumannii*, Tn_{P1} puede ser $P_{(A1S_R12)}$.

15 **[0115]** Del mismo modo, cuando se aplica el método de la invención a *Pseudomonas aeruginosa*, Tn_{P2} puede ser promotor del gen de ARN ribosomal 16S de *P. aeruginosa* (es decir $Ps.P_{rnmB}$) mientras Tn_{P3} se puede seleccionar de la *rpsJ* (proteína S10 de la subunidad ribosomal pequeña (30S)) promotor del gen de *P. aeruginosa* (es decir $Ps.P_{rpsJ}$) y la *E. coli* P_{rnmB} .

20 Efectos de la inserción de Tn_A : generación de células productoras mutantes que expresan compuestos citotóxicos

[0116] El uso de la mutagénesis de transposón con un transposón de activación (Tn_A) de acuerdo con los métodos de la invención es capaz de producir una gama muy diversa de fenotipos, ya que el efecto de la inserción de la Tn_A puede variar de la pérdida total de la función, la actividad disminuida, a diversos grados de actividad incrementada, con cambio de función (e incluso ganancia de función) también es posible.

[0117] Esto se deduce del hecho de que el efecto de la inserción de la Tn_A en el ADN de la célula productora procariota es dependiente del contexto de la secuencia. La inserción en la secuencia de codificación de un gen estructural puede dar como resultado la inactivación por inserción (y, por lo tanto, la pérdida completa de la función), mientras que la inserción corriente arriba de un gen u operón puede dar como resultado una mayor transcripción de Tn_AP y así conducir a la expresión de ese gen u operón (siendo la extensión de la sobreexpresión dependiente de efectos posicionales/polares sutiles).

[0118] Se introduce una capa de complejidad adicional por el hecho de que la inserción de Tn_A puede dar lugar a transcripciones de las cadenas sentido y antisentido, lo que da como resultado la producción de transcripciones antisentido que surgen de la transcripción que conduce a Tn_AP de la cadena no codificante del ADN de la célula productora procariótica mutante. Dichas transcripciones antisentido pueden suprimir o activar la expresión génica (por ejemplo, pueden suprimir la expresión de genes mediante la unión a ARNm complementario codificado por la cadena codificante correspondiente del ADN de dicha célula procariótica), o pueden activar la transcripción del gen suprimiendo expresión de los genes que codifican los genes represores.

[0119] Algunos de los mecanismos por los que la mutagénesis de transposón con un transposón de activación (Tn_A) de acuerdo con los métodos de la invención dan lugar a mutantes que expresan agentes citotóxicos descritos en detalle a continuación:

45 Activación de procesos metabólicos secundarios

[0120] Muchos compuestos citotóxicos son productos de rutas metabólicas secundarias y, como tales, están sujetos a mecanismos reguladores que sirven para mantener la primacía de las rutas metabólicas primarias requeridas para el crecimiento. Estos mecanismos pueden limitar la producción de productos citotóxicos a niveles indetectables y/o inactivos en cribados basados en cribados de actividad contra células diana co-cultivadas.

[0121] El uso de la mutagénesis de transposón con un transposón de activación (Tn_A) de acuerdo con los métodos de la invención puede resultar en inserción Tn_A en el ADN celular de las especies procariotas productoras que:

55 (a) se produce un flujo ascendente de un activador de un gen u operón del agente citotóxico críptico, mientras que Tn_AP impulsa una mayor transcripción del activador que actúa en trans para aumentar la expresión del gen u operón del agente citotóxico críptico; o

60 (b) la inserción inactiva un represor de un gen u operón del agente citotóxico críptico, aumentando así la expresión del gen u operón del agente citotóxico críptico;

[0122] En cualquier caso, se generan mutantes en los que sea de-seleccionado efectivamente el control existente de las rutas metabólicas secundarias responsables de la producción de agentes citotóxicos.

65 Sobreexpresión e inactivación de genes estructurales.

[0123] En este contexto, los genes estructurales se consideran ser los que codifican para cualquier producto de ARN o proteína no asociada con la regulación.

[0124] La sobreexpresión del gen estructural puede aumentar la producción de compuestos citotóxicos de interés e inserción T_{NA} aguas arriba de una enzima implicada en la síntesis de agente citotóxico; por lo que $T_{NA}P$ impulsa el aumento de la transcripción y así conduce a una mayor expresión de dicha enzima, por lo tanto puede resultar en la generación de una importante clase de mutantes de interés. De manera similar, la corriente de inserción de T_{NA} de una enzima que produce un agente citotóxico como actividad secundaria, mientras que la $T_{NA}P$ impulsa un aumento de la transcripción y, por lo tanto, conduce a una mayor expresión de dicha enzima, aumentando así su actividad lateral y aumentando los niveles del agente citotóxico;

[0125] La inactivación estructural del gen también puede aumentar la producción de compuestos citotóxicos de interés. Esto es particularmente aplicable cuando se aplica a sistemas en los que un producto natural se transforma biosintéticamente a otro compuesto menos útil. La inserción T_{NA} en el ADN celular de la especie procarionota productora que inactiva de manera insercional una enzima para la cual un agente citotóxico es un sustrato, por lo que niveles crecientes del agente citotóxico, por lo tanto, pueden resultar en la generación de mutantes de interés.

Sobreexpresión de genes de exportación.

[0126] Biosíntesis de producto natural es a menudo sometido a regulación por retroalimentación negativa. Por lo tanto, la eliminación de la célula de los compuestos que median la regulación de retroalimentación negativa por las proteínas de exportación o los sistemas de flujo de salida pueden resultar en la producción de compuestos citotóxicos de interés. Por ejemplo, la producción de doxorubicina en *Streptomyces peucetius* se puede aumentar en dos veces mediante la sobreexpresión de los genes de exportación *drrA* y *drrB*.

[0127] Por lo tanto, la inserción de T_{NA} en el flujo ascendente de un gen de exportación involucrado en el aclaramiento de los compuestos que median la regulación de retroalimentación negativa de la síntesis del agente citotóxico, mientras que el $T_{NA}P$ impulsa una mayor transcripción y por lo tanto conduce a una mayor expresión de dicho gen de exportación, por lo tanto, puede resultar en la generación de otra clase importante de mutantes de interés.

Suministro de precursor

[0128] Los cuellos de botella en las rutas biosintéticas pueden restringir la síntesis de productos naturales y pueden estar asociados con la provisión limitada de precursores clave por las rutas metabólicas primarias. Tales limitaciones pueden ser superadas por la regulación al alza de genes u operones que codifican enzimas asociadas con tales cuellos de botella: el aumento de los niveles de enzimas se traduce en una disminución de los efectos del cuello de botella y, por lo tanto, mejora la síntesis de los compuestos citotóxicos de interés.

[0129] Por lo tanto, la corriente de inserción de T_{NA} de una enzima asociada con tales cuellos de botella en la síntesis de agentes citotóxicos, mientras que la $T_{NA}P$ provoca un aumento de la transcripción y, por lo tanto, conduce a una mayor expresión de dicha enzima, puede por lo tanto resultar en la generación de una clase de mutantes de interés.

Activación de genes crípticos.

[0130] Muchos compuestos citotóxicos de interés son productos de procesos metabólicos secundarios que son silenciosos en la mayoría de las condiciones de crecimiento. Dicho proceso puede ser inducido solo durante fases particulares de crecimiento, bajo ciertas condiciones de crecimiento, durante etapas particulares de desarrollo (por ejemplo, esporulación), inducción por citocinas bacterianas (por ejemplo, como parte de un sistema de detección de quórum), estimulación por factores producidos por otros organismos, estado de nutrientes, temperatura, estrés u otros reguladores microbianos intercelulares.

[0131] Por ejemplo, los proyectos recientes de secuenciación del genoma con *Streptomyces* spp. han revelado que poseen muchas vías biosintéticas antibióticas "crípticas"; es decir, tienen el potencial genético para producir muchos más antibióticos de lo que se creía anteriormente. Estas vías crípticas no son reliquias genéticas, pero pueden activarse para dirigir la producción de nuevos antibióticos.

[0132] El uso de la mutagénesis de transposón con un transposón de activación (T_{NA}) de acuerdo con los métodos de la invención puede resultar en una inserción T_{NA} en el ADN celular de las especies procarionotas productoras que:

(a) se produce un flujo ascendente de un gen u operón del agente citotóxico críptico, mientras que el $T_{NA}P$ provoca un aumento de la transcripción y, por lo tanto, conduce a la expresión del gen u operón del agente citotóxico críptico; o

(b) se produce un flujo ascendente de un activador de un gen u operón del agente citotóxico críptico,

mientras que $T_{nA}P$ impulsa una mayor transcripción del activador que actúa en trans para aumentar la expresión del gen u operón del agente citotóxico críptico; o

5 (c) inactiva la inserción de un represor de un gen u operón del agente citotóxico críptico, aumentando así la expresión del gen u operón del agente citotóxico críptico.

[0133] En cada caso, se generan mutantes en los que se dieron a conocer las rutas metabólicas crípticas responsables de la producción de agentes citotóxicos.

10 Efectos de dominio funcional.

[0134] Las enzimas implicadas en la síntesis de agentes citotóxicos pueden estar compuestas por dominios múltiples, funcionalmente distintos. La inserción de T_{nA} en el ADN celular de la especie procariota productora que:

15 (a) inactiva la inserción de uno o más dominios de una enzima de dominios múltiples, lo que altera su función de manera que sintetiza, directa o indirectamente, un agente citotóxico; o

(b) se produce un flujo ascendente de uno o más dominios de una enzima de múltiples dominios, mientras que $T_{nA}P$ impulsa un aumento de la transcripción de dicho uno o más dominios, lo que altera la función de dicha enzima de manera que sintetiza, directa o indirectamente, un agente citotóxico;

20

por lo tanto, puede resultar en la generación de una clase adicional de mutantes de interés.

[0135] Finalmente, el uso de la mutagénesis de transposón con un transposón de activación (T_{nA}) de acuerdo con los métodos de la invención puede resultar en la inserción de T_{nA} en el ADN celular de las especies procariotas productoras que altera el repertorio de codificación de la célula productora procariota tal que un agente citotóxico completamente nuevo se expresa directa o indirectamente (es decir, la mutación resultante puede ser neomórfica).

25

30 Determinación del contexto de secuencia de inserciones de T_{nA}

[0136] Como se explicó anteriormente, el uso de mutagénesis de transposón con un transposón de activación (T_{nA}) de acuerdo con los métodos de la invención resulta en la producción de un conjunto mutante de rica diversidad.

[0137] Este aspecto de la invención se complementa con la capacidad de establecer el contexto de la secuencia de las inserciones de transposones asociados con la producción de agentes citotóxicos de interés. Esto facilita enormemente la identificación del agente citotóxico, las vías metabólicas por las que se sintetiza en la célula y su modo de acción (ya que la distribución de las inserciones de T_{nA} en todo el conjunto de mutantes puede revelar la identidad de los factores/mecanismos de resistencia) en mutantes de resistencia cocultivados de las células procariotas).

35

[0138] El contexto de secuencia se determina preferiblemente mediante secuenciación de ADN adyacente o cerca de (5' y/o 3') del sitio de inserción de T_{nA} (por ejemplo, mediante secuenciación de ADN que comprende cruces de ADN de T_{nA} genómicos). Típicamente, el ADN bacteriano que flanquea o está adyacente a uno o ambos extremos de la T_{nA} se secuenció.

40

[0139] La longitud del ADN adyacente secuenciado no necesita ser extenso, y es preferiblemente relativamente corto (por ejemplo, menos de 200 pares de bases).

45

[0140] Se pueden usar varios métodos para determinar la distribución de inserción de T_{nA} mediante la secuenciación de ADN: dichos métodos se han denominado recientemente procedimientos Tn-seq (van Opijnen et al. (2009) Nat. Methods 6: 767-772). Por ejemplo, los procedimientos Tn-seq incluyen la purificación por afinidad de las uniones Tn amplificadas (Gawronski et al. (2009) PNAS 106: 16422-16427); ligadura de adaptadores en secuencias genómicas distales al final del transposón utilizando un sitio de restricción especializado (Goodman et al. (2009) Cell Host Microbe 6: 279-289; van Opijnen et al. (2009) Nat. Methods 6: 767- 772); amplificación selectiva (Langridge et al. (2009) Genome Research 19: 2308-2316) y la generación de círculos de ADN monocatenario que llevan uniones Tn, que sirven como plantillas para la amplificación y secuenciación después de la eliminación del ADN genómico por digestión con exonucleasa (Gallagher et al. (2011) mBio 2 (1):e00315-10).

50

[0141] Cualquier técnica de secuenciación de alto rendimiento adecuado puede ser utilizada, y hay muchas plataformas de secuenciación disponibles comercialmente que son adecuadas para uso en los métodos de la invención. Las plataformas de secuenciación basadas en secuenciación por síntesis (SBS) son particularmente adecuadas para su uso en los métodos de la invención: por ejemplo, el sistema IlluminaTM genera millones de lecturas de secuencias relativamente cortas (54, 75 o 100 pb) y es particularmente preferido.

55

[0142] Otras técnicas adecuadas incluyen métodos basados en terminadores de tinte reversibles. Aquí, las moléculas de ADN se unen primero a los cebadores en un portaobjetos y se amplifican para que se formen colonias

60

65

clonales locales (amplificación de puente). Se añaden cuatro tipos de ddNTP y se eliminan por lavado los nucleótidos no incorporados. A diferencia de la pirosecuenciación, el ADN solo puede extenderse un nucleótido a la vez. Una cámara toma imágenes de los nucleótidos marcados con fluorescencia y luego el tinte junto con el bloqueador terminal 3' se elimina químicamente del ADN, lo que permite un ciclo siguiente.

[0143] Otros sistemas capaces de lecturas de secuencia corta incluyen tecnologías SOLiD™ e Ion Torrent (ambos se venden por Applied Biosystems™). La tecnología SOLiD™ emplea secuenciación por ligadura. Aquí, un conjunto de todos los oligonucleótidos posibles de una longitud fija se marcan de acuerdo con la posición secuenciada. Los oligonucleótidos son recocidos y ligados; La ligación preferencial por la ADN ligasa para secuencias coincidentes da como resultado una señal informativa del nucleótido en esa posición. Antes de la secuenciación, el ADN se amplifica por PCR en emulsión. Las perlas resultantes, cada una de las cuales contiene solo copias de la misma molécula de ADN, se depositan en un portaobjetos de vidrio. El resultado son secuencias de cantidades y longitudes comparables a la secuenciación de Illumina.

[0144] Ion Torrent Systems Inc. ha desarrollado un sistema basado en el uso de la química de secuenciación estándar, pero con un nuevo sistema de detección basado en semiconductores. Este método de secuenciación se basa en la detección de iones de hidrógeno que se liberan durante la polimerización del ADN, a diferencia de los métodos ópticos utilizados en otros sistemas de secuenciación. Un micropocillo que contiene un filamento de ADN de plantilla que debe secuenciarse se inunda con un solo tipo de nucleótido. Si el nucleótido introducido es complementario al nucleótido de plantilla principal, se incorpora a la cadena complementaria en crecimiento. Esto provoca la liberación de un ión de hidrógeno que dispara un sensor de iones hipersensible, lo que indica que se ha producido una reacción. Si las repeticiones de homopolímeros están presentes en la secuencia de la plantilla, se incorporarán múltiples nucleótidos en un solo ciclo. Esto conduce a un número correspondiente de hidrógenos liberados y una señal electrónica proporcionalmente más alta.

Evaluación funcional de mutantes.

[0145] El análisis de la información de secuencia descrita anteriormente puede permitir una evaluación del papel funcional de uno o más elementos celulares en la producción y/o modo de acción del agente citotóxico.

[0146] Técnicas analíticas adecuadas incluyen la bioinformática, donde la secuencia (total o parcial) de los elementos genéticos afectados por inserción Tn_A se utiliza para interrogar las bases de datos de secuencia que contienen información de la célula procarionota se ensaya y/o otras especies con el fin de identificar los genes (por ejemplo, genes ortólogos en otras especies) para los cuales ya se han asignado funciones bioquímicas esenciales y/o que se ha demostrado que son esenciales.

[0147] Programas de bioinformática adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al (1990) J. Mol Biol. 215: 403-410 y Altschul et al (1997) Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402). Las bases de datos adecuadas incluyen, por ejemplo, EMBL, GENBANK, TIGR, EBI, SWISS-PROT y trEMBL.

[0148] Alternativamente, o, además, la secuencia (completa o parcial) de los genes/elementos genéticos implicados se usa para interrogar una base de datos de secuencias que contiene información sobre la identidad de los genes que se ha construido previamente utilizando los métodos convencionales de Tn-seq. descrito en la técnica anterior (por ejemplo, como se describe en Gawronski et al. (2009) PNAS 106: 16422-16427; Goodman et al. (2009) Cell Host Microbe 6: 279-289; van Opijnen et al. (2009) Nat. Methods 6: 767-772; Langridge et al. (2009) Genome Research 19: 2308-2316; Gallagher et al. (2011) mBio 2 (1): e00315-10) y/o las técnicas descritas en WO 01/07651.

[0149] La posición del promotor insertado puede evaluarse con respecto a su contribución al aumento de la transcripción de secuencias de ADN aguas abajo pertinentes. Un componente de bioinformática matemática/técnicamente sencilla de esta técnica permite el reconocimiento de la contribución de la secuencia promotora insertada a la transcripción del gen del agente citotóxico putativo. La bioinformática permitiría que se consideraran los efectos de la lectura transcripcional en los genes situados aguas abajo del gen adyacente al transposón insertado, donde no hay una secuencia de terminación de la transcripción de ARN definida.

Co-encapsulación de microgotas

[0150] Los métodos de la invención son adecuados para cribado de alto rendimiento, ya que los métodos implican compartimentalización del ensayo de cribado en pequeños volúmenes de medio de crecimiento en forma de microgotas discretas. Esto permite que cada microgota se trate como un recipiente de cultivo separado, lo que permite un rápido rastreo de grandes cantidades de co-cultivos de líquidos individuales utilizando metodologías establecidas de microfluidos y/o clasificación de células.

[0151] Por lo tanto, las microgotitas de la invención funcionan como recipientes de cultivo individuales, discretas en donde las células productoras y diana pueden ser co-cultivadas, analizadas, manipuladas, aisladas y/o clasificadas.

[0152] Cualquier método adecuado se puede emplear para la co-encapsulación de células productoras mutantes y células diana en microgotas de acuerdo con la invención. Por ejemplo, las células productoras mutantes y las células diana pueden co-encapsularse en microgotas de gel de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO98/41869. Por lo tanto, las gotas de gel pueden fabricarse utilizando principios de gelificación iónica o térmica: típicamente, las células productoras y las células diana se mezclan con un precursor fluido de la matriz de gel. Esto luego se solidifica por polimerización, causando el menor trauma posible para las células: por ejemplo, los choques que surgen de los cambios en la temperatura, la presión osmótica y el pH deben minimizarse. Generalmente se prefiere el uso de hidrogeles, ya que exhiben una alta retención de agua y porosidad, permitiendo la libre difusión de nutrientes y productos de desecho. Muchas de estas matrices son conocidas en la técnica, incluyendo polisacáridos, tales como alginatos, carageenanos, agarosa, quitosán, celulosa, pectinas y poliacrilamidas.

[0153] Las células productoras y diana pueden añadirse al material de matriz de gel para formar una suspensión y distribuirse uniformemente mientras la matriz está en fase líquida. Las regiones de gel o las gotas de gel se forman mediante el endurecimiento de la matriz después de la formación de pequeños volúmenes individuales de las gotas de suspensión de matriz de gel utilizando técnicas establecidas. Las técnicas adecuadas incluyen, por ejemplo, emulsificación con aceite, agitación con vórtex, sonicación, homogeneización, goteo usando un aparato de tipo jeringa, vibración de una boquilla unida a un depósito de la suspensión o atomización seguida de separación electrostática o corte con cables giratorios.

Coencapsulación de emulsiones.

[0154] Se prefiere de acuerdo con la invención la co-encapsulación por emulsificación. Como se describe a continuación, se pueden usar emulsiones tanto de fase simple como de fase doble, que incluyen emulsiones de tipo agua en aceite (W/O) y agua en aceite en agua (W/O/W). En emulsiones W/O, la fase dispersa puede comprender microgotas de medio de crecimiento acuoso suspendido en una fase oleosa continua. En emulsiones W/O/W, la fase dispersa puede comprender microgotas de medio de crecimiento acuoso envuelto en una fase oleosa, cuyas microgotas se suspenden a su vez en una fase acuosa continua. Dichas emulsiones W/O/W pueden mostrar propiedades reológicas mejoradas con respecto a las emulsiones W/O simples: pueden exhibir, por ejemplo, una viscosidad más baja, lo que permite tasas de flujo más altas/presiones de funcionamiento más bajas cuando se clasifican con FADS y/o se procesan usando dispositivos microfluidosos (ver abajo).

[0155] Por lo tanto, en las realizaciones más sencillas de la invención, co-encapsulación implica la formación de emulsiones que comprenden microgotitas de medio de crecimiento líquido que contiene células productoras y diana mutante dispersadas en un líquido portador como la fase continua. Dichas emulsiones individuales son del tipo W/O, aunque se apreciará que se puede usar cualquier líquido adecuado como fase continua siempre que sea inmiscible con el medio de crecimiento seleccionado para el co-cultivo de las células productoras y diana. Típicamente, sin embargo, el líquido portador es un aceite.

[0156] Dependiendo, entre otras cosas, de la naturaleza de la fase continua (p.ej., el tipo de aceite) y del tamaño de la gota, las emulsiones individuales del tipo descrito anteriormente pueden tener una viscosidad que hace difícil que las microgotas se clasifiquen mediante ciertos microfluidos y/o clasificación celular. Por ejemplo, la viscosidad puede limitar los caudales alcanzables (por ejemplo, en el rango de 10-100 microgotas por segundo usando FADS, ver más abajo) y/o puede requerir presiones operativas indeseablemente altas.

Emulsiones dobles

[0157] De acuerdo con la invención, son particularmente preferidas las emulsiones dobles del tipo W/O/W. Dichas emulsiones comprenden microgotas que contienen un núcleo acuoso de medio de crecimiento acuoso líquido que contiene productor mutante y células diana envueltas en una envoltura de líquido inmiscible (típicamente un aceite), dispersándose estas microgotas en un líquido portador acuoso como la fase continua.

[0158] Los cocultivos encapsulados de esta manera pueden exhibir viscosidades muy bajas y, por lo tanto, pueden clasificarse utilizando, por ejemplo, FADS (ver más abajo) a tasas de flujo mucho más altas, lo que permite la clasificación de más de 10.000 microgotas por segundo (ver, por ejemplo, Bernath y otros (2004) Analytical BioChemistry 325: 151-157).

[0159] La coencapsulación en emulsiones dobles se puede lograr mediante cualquiera de una amplia variedad de técnicas, utilizando una amplia gama de medios de crecimiento acuosos, aceites portadores y tensioactivos adecuados. Las técnicas adecuadas para hacer emulsiones dobles (y para clasificarlas usando FACS) se describen, por ejemplo, en Bernath et al. (2004) Analytical BioChemistry 325: 151-157.

Tensioactivos para uso en co-encapsulación de emulsiones.

[0160] Como se explica en el presente documento, las microgotitas (y los microcultivos correspondientes) de la invención pueden comprender emulsiones de tipo una agua-en-aceite (W/O) solo o de agua-en-aceite-en-agua (W/O/W) doble, y en tales realizaciones, uno o más tensioactivos pueden ser necesarios para estabilizar la emulsión.

- 5 **[0161]** El (los) tensioactivo(s) y/o co-tensioactivo(s) se incorporan preferiblemente en las interfaces W/O, de modo que en realizaciones donde se utilizan individuales emulsiones W de tipo de E/S, el tensioactivo y o co-surfactante puede estar presente en la interfaz de las microgotas de medio de crecimiento acuoso y la fase continua (por ejemplo, aceite). De manera similar, cuando se usan emulsiones de tipo doble W/O/W para la co-encapsulación de acuerdo con la invención, el (los) surfactante(s) y/o co-surfactante(s) pueden estar presente(s) en una o ambas interfaces del núcleo acuoso y la cubierta inmisible (p.ej., aceite) y la interfaz entre la capa de aceite y la fase acuosa continua.
- 10 **[0162]** Una amplia gama de tensioactivos adecuados están disponibles, y los expertos en la técnica serán capaces de seleccionar un tensioactivo apropiado (y co-surfactante, si es necesario) de acuerdo con los parámetros de detección seleccionados. Por ejemplo, los surfactantes adecuados se describen en Bernath et al. (2004) Analytical BioChemistry 325: 151-157; Holtze y Weitz (2008) Lab Chip 8 (10): 1632-1639; y Holtze et al. (2008) Lab Chip. 8 (10): 1632-1639.
- 15 **[0163]** Los tensioactivos son preferiblemente biocompatibles. Por ejemplo, el surfactante puede seleccionarse para que no sea tóxico para el productor mutante y las células diana utilizadas en el cribado). El surfactante seleccionado también puede tener una buena solubilidad para los gases, lo que puede ser necesario para el crecimiento y/o la viabilidad de las células encapsuladas.
- 20 **[0164]** La biocompatibilidad se puede determinar mediante cualquier ensayo adecuado, incluidos ensayos basados en ensayos de compatibilidad con un ensayo bioquímico sensible de referencia (como la traducción in vitro) que sirve como un sustituto de la biocompatibilidad a nivel celular. Por ejemplo, la traducción in vitro (IVT) del ADN plasmídico que codifica la enzima β -galactosidasa con un sustrato fluorogénico (fluoresceína di- β -D-galactopiranosido (FDG)) se puede usar como un indicador de biocompatibilidad ya que se forma un producto fluorescente cuando el ADN encapsulado, las moléculas involucradas en la transcripción y la traducción y la proteína traducida no se adsorben a la interfaz de la gota y la estructura de orden superior de la proteína permanece intacta.
- 25 **[0165]** El agente o agentes tensioactivos también pueden evitar la adsorción de biomoléculas en la interfaz de microgotas. Esto puede aumentar la sensibilidad del cribado al garantizar que las células diana estén completamente expuestas a agentes citotóxicos secretados por células productoras mutantes. También puede contribuir a la biocompatibilidad, por ejemplo, evitando el secuestro de biomoléculas necesarias para el crecimiento celular, la expresión génica y/o la señalización.
- 30 **[0166]** El tensioactivo también puede funcionar para aislar las microgotas individuales (y los microcultivos correspondientes), de manera que sirvan como microvasos individuales para co-cultivo de células productoras y diana mutante. En tales realizaciones, el tensioactivo puede ser tanto hidrófobo como lipófilo, y por lo tanto exhibe baja solubilidad para los reactivos biológicos de la fase acuosa mientras inhibe la difusión molecular entre microgotas.
- 35 **[0167]** En algunas realizaciones, el tensioactivo estabiliza (es decir, impide la coalescencia) de una sola emulsión compuesta de gotitas de medios acuosos (que contiene células encapsuladas) dispersadas en una fase de aceite para la duración del paso de incubación. De manera similar, el surfactante puede estabilizar gotitas de medios acuosos (que contienen células encapsuladas) en una emulsión doble de agua en aceite en agua (W/O/W) durante la duración del paso de incubación.
- 40 **[0168]** Por lo tanto, el surfactante puede estabilizar la biblioteca de microgotas en las condiciones empleadas para el co-cultivo de la célula productora del mutante único y la(s) célula(s) diana, y así puede estabilizar las microgotas a la temperatura de incubación seleccionada (por ejemplo, aproximadamente 25°C) para el tiempo de incubación seleccionado (por ejemplo, durante al menos una hora, y en algunas realizaciones hasta 14 días).
- 45 **[0169]** El rendimiento de la estabilización puede controlarse, por ejemplo, mediante microscopía de contraste de fase, dispersión de luz, medición de reflectancia de haz focalizado, centrifugación y/o reología.
- 50 **[0170]** Los ejemplos de tensioactivos adecuados incluyen: Abil WE 09 (Evonik - una mezcla 1:1:1 de cetil PEG/PPG 10/1 dimeticona, poligliceril-4 isoestearato y hexil laurato); Span® 80; Tween® 20; Tween® 80 y combinaciones de los mismos.
- Aceites para uso en la co-encapsulación de emulsiones.*
- 60 **[0171]** Si bien se apreciará que cualquier líquido inmisible con el medio de crecimiento acuoso puede ser utilizado en la formación de emulsiones de microgotas para su uso de acuerdo con la invención, el fluido inmisible es típicamente un aceite.
- 65 **[0172]** Preferiblemente, se selecciona un aceite que tiene una baja solubilidad para los componentes biológicos de la fase acuosa. Otras propiedades funcionales preferidas incluyen una buena solubilidad para los gases, la capacidad de inhibir la difusión molecular entre microgotas y/o hidrofobicidad y lipofobicidad combinadas. El aceite

puede ser un aceite de hidrocarburo, pero se prefieren aceites minerales ligeros, aceites de fluorocarbono o éster. También se prefieren mezclas de dos o más de los aceites descritos anteriormente.

5 **[0173]** Los ejemplos de aceites adecuados incluyen: carbonato de dietilhexilo (Tegosoft® DEC (Evonik)); aceite mineral ligero (Fisher); y combinaciones de los mismos.

Procesos para emulsión de microgotas.

10 **[0174]** Los expertos en la técnica conocen una amplia gama de diferentes métodos de emulsificación, cualquiera de los cuales se puede usar para crear las microgotas de la invención.

15 **[0175]** Muchas técnicas de emulsificación implican mezclar dos líquidos en procesos a granel, a menudo usando turbulencia para mejorar la ruptura de la gota. Tales métodos incluyen vórtice, sonicación, homogeneización o combinaciones de los mismos.

20 **[0176]** En estos planteamientos "top-down" a la emulsificación, poco control sobre la formación de gotitas individuales es posible, y una amplia distribución de tamaños de microgotas se produce típicamente. Los enfoques alternativos "de abajo hacia arriba" operan al nivel de las caídas individuales y pueden implicar el uso de dispositivos microfluídicos. Por ejemplo, las emulsiones se pueden formar en un dispositivo microfluídico al colisionar una corriente de aceite y una corriente de agua en una unión en forma de T: las microgotas resultantes varían en tamaño dependiendo del caudal en cada corriente.

25 **[0177]** Un procedimiento preferido para producir microgotitas para uso de acuerdo con la invención comprende el flujo de enfoque (como se describe en, por ejemplo Anna et al (2003) Appl Phys Lett 82 (3): 364-366). En este caso, un fluido de fase continua (fluido de enfoque o funda) que flanquea o rodea la fase dispersa (fluido enfocado o núcleo), produce una ruptura de gotitas en las proximidades de un orificio a través del cual se extruyen ambos fluidos. Un dispositivo de enfoque de flujo consiste en una cámara de presión presurizada con un suministro de fluido de enfoque continuo. En el interior, uno o más fluidos enfocados se inyectan a través de un tubo de alimentación capilar cuya extremidad se abre frente a un pequeño orificio que une la cámara de presión con el ambiente externo. La corriente de fluido de enfoque moldea el menisco fluido en una cúspide dando lugar a un micro o nano-chorro constante que sale de la cámara a través del orificio; el tamaño del chorro es mucho más pequeño que el orificio de salida. La inestabilidad capilar rompe el chorro constante en gotitas o burbujas homogéneas.

35 **[0178]** El tubo de alimentación puede estar compuesto de dos o más agujas concéntricas y ser inyectados diferentes líquidos o gases inmiscibles que conducen a gotas compuestas. El enfoque de flujo garantiza una producción extremadamente rápida y controlada de hasta millones de gotas por segundo a medida que se rompe el chorro.

40 **[0179]** Otras posibles técnicas de formación de gotitas microfluídicas incluyen pico-inyección, por lo que primero se forman gotitas de aceite en agua y luego pasan por una unión en T, a lo largo de la parte superior de la T y luego se inyecta la fase acuosa interna en la gotita de aceite, creando una doble emulsión.

45 **[0180]** En todos los casos, el rendimiento del proceso de formación de microgotas seleccionado puede controlarse mediante microscopía de contraste de fase, dispersión de luz, medición de reflectancia de haz focalizado, centrifugación y/o reología.

Clasificación de gotas activadas por fluorescencia

50 **[0181]** Como se explica en el presente documento, los métodos de invención son adecuados para cribado de alto rendimiento, ya que implican compartimentar el ensayo de cribado en pequeños volúmenes de medio de crecimiento en forma de microgotas discretas. Esto permite que cada microgota se trate como un recipiente de cultivo separado, lo que permite un rápido rastreo de grandes cantidades de co-cultivos de líquidos individuales utilizando metodologías establecidas de microfluidos y/o clasificación de células.

55 **[0182]** Por lo tanto, tras el paso de co-encapsulación, las microgotitas resultantes pueden ser ordenadas por la adaptación de dispositivos y protocolos de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Esta técnica se ha denominado clasificación de gotas activadas por fluorescencia (FADS) y se describe, por ejemplo, en Baret et al. (2009) Lab Chip 9: 1850-1858.

60 **[0183]** Los FADS se pueden usar para manipular las microgotas en cualquier etapa después de su formación en los métodos de la invención, pero se usan preferiblemente al menos para cribar la biblioteca de microcultivos en los que las células diana han sido superadas o crecidas hasta su extinción por células productoras mutantes. Los FADS también se pueden usar durante el paso de coencapsulación, por ejemplo, para eliminar microgotas vacías que no contienen célula(s) productoras mutantes y/o diana.

65 **[0184]** Cualquiera o ambas de las células productoras mutantes y las células diana pueden marcarse con fluorescencia para permitir el FADS. Se pueden usar una variedad de proteínas fluorescentes como etiquetas para

este propósito, que incluyen, por ejemplo, la proteína verde fluorescente (GFP) de tipo silvestre de *Aequorea victoria* (Chalfie et al. 1994, Science 263: 802-805) y GFP modificadas (Heim et al. 1995, Nature 373: 663-4; publicación PCT WO 96/23810). Alternativamente, las proteínas fluorescentes no *Aequorea* sintéticas IP-Free © de DNA2,0 se pueden usar como fuente de diferentes secuencias codificantes de proteínas fluorescentes que se pueden amplificar por PCR o escindir fácilmente usando los sitios de restricción Bsal flanqueantes y clonarlas en cualquier otro vector de expresión de elección.

[0185] La transcripción y traducción de este tipo de gen informador conduce a la acumulación de la proteína fluorescente en las células, lo que las hace susceptibles a FADS.

Incubación

[0186] Las condiciones de incubación y de la naturaleza del medio de crecimiento acuoso se seleccionan según la naturaleza de las células productoras y diana seleccionadas, y los expertos en la técnica serán capaces de determinar fácilmente los medios apropiados, las temperaturas de crecimiento y la duración de la incubación.

[0187] Por ejemplo, los organismos mesófilos generalmente se incubarán a 15°C - 42°C, mientras que los termófilos moderados se cultivarán a temperaturas más altas (típicamente 40°C - 60°C).

[0188] Los termófilos e hipertermófilos se cultivarán a temperaturas aún más altas (típicamente 60°C - 80°C y 80°C - 98°C, respectivamente).

Ejemplificación

[0189] La invención se describirá ahora con referencia a ejemplos específicos. Estos son meramente ejemplares y solo con fines ilustrativos: no pretenden limitar en modo alguno el alcance del monopolio reivindicado o la invención descrita. Estos ejemplos constituyen el mejor modo actualmente contemplado para practicar la invención.

Ejemplo 1: Encapsulación utilizando emulsión única.

Mezcla de aceite para la fase continua.

[0190]

- 73% Tegosoft DEC (Evonik), 20% aceite mineral ligero (Fisher), 7% Abil WE09 (Evonik) (surfactante)
- 70% Tegosoft DEC (Evonik), 20,3% aceite mineral ligero (Fisher) 4,5% Span-80 (surfactante), 4,8% Tween 20 (surfactante)
- 90% aceite mineral ligero, 10% Span-80 (surfactante)

[0191] Todas las mezclas de aceite deben prepararse al menos 30 minutos antes de su uso, pero pueden conservarse indefinidamente.

Medios de crecimiento acuosos para fase dispersa

[0192] Esto se puede seleccionar de entre los siguientes:

- Caldo SOC (20 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ y 20 mM de glucosa)
- SOC + 5% de glicerol
- Caldo LB (10 g/l de peptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de NaCl)
- 2 x YT (16 g/l de triptona, 10 g/l de extracto de levadura, 5 g/NaCl)
- 2 x YT + 0,5% de glucosa y 5% de glicerol
- 2xYT + 5% de glicerol
- Peptona glicerol medio 5g/L peptona, 5% glicerol

[0193] La inclusión de glicerol como fuente de carbono puede facilitar la formación de microgotas mediante agitación con vórtex.

1. De 0,5 ml a 10 ml de medio de crecimiento que contenga las células productoras y diana en los números de células apropiados para obtener <1 productor y luego ≥ 1 célula diana por gota producida. Esto se divide en partes alícuotas en un recipiente adecuado (se aceptan placas Eppendorf de 1,5 o 2 ml 15 ml o 50 ml de halcón o placa de 24 pocillos).

2. Este medio de crecimiento luego se superpone con 1-2x volumen de la mezcla de aceite.

3. Este es el vórtice durante 3 a 6 minutos (generalmente 5 minutos) a 12.000-18.000 rpm. La velocidad

varía según el aceite y los medios utilizados, así como el tamaño de gota deseado, como regla general, cuanto mayor sea la velocidad y cuanto más largo sea el vórtice, menor será el tamaño promedio de la gota (aunque este método siempre genera un rango de tamaños).

5 4. La integridad de las gotas y la presencia de células en el interior se analizan visualmente bajo un microscopio usando contraste de fase. Se pueden usar métodos de visualización alternativos, por ejemplo, fluorescencia.

10 5. Las gotitas se incuban luego a la temperatura adecuada (generalmente a 37°C, pero son estables entre 4°C y 95°C) durante períodos de tiempo de 1h a ≥ 14 días.

6. Las gotas pueden clasificarse por FADS si es necesario y luego las células deseadas se recuperan de las gotas.

15 7. Para romper gotitas abiertas, se agrega surfactante adicional (p.ej., SDS al 1% para aceite de Tegosoft, pero se puede usar cualquier surfactante apropiado como Tweens, Sarcosyl, etc.) esto interrumpe las células liberadoras de integridad de las gotitas.

20 8. Algunas mezclas de aceite pueden lisarse congelando la solución y rompiendo las gotas.

9. Las células se pueden recuperar por centrifugación, o la muestra se puede aplicar directamente a las columnas para extracciones de ADN.

Ejemplo 2: Encapsulación utilizando doble emulsión.

25 *Medios de crecimiento acuosos*

[0194] Como en el Ejemplo 1 (arriba).

30 *Mezclas utilizadas para producir la fase acuosa externa*

[0195]

- 35 • Solución salina tamponada con fosfato (PBS; tampón fosfato 10 mM, NaCl 137 mM) con Tween-20 al 2%
- PBS con 2% de Tween-80 (surfactante)

Mezcla de aceite para conchas de gotitas

40 **[0196]** En cuanto a las mezclas de aceite establecidas en el Ejemplo 1 (arriba).

45 1. De 0,5 ml a 10 ml de medio de crecimiento que contenga las células productoras y diana en los números de células apropiados para obtener <1 productor y luego ≥ 1 célula diana por gota producida. Esto se divide en partes alícuotas en un recipiente adecuado (se aceptan placas Eppendorf de 1,5 o 2 ml 15 ml o 50 μ l de halcón o placa de 24 pocillos).

2. Este medio de crecimiento luego se superpone con 1-2x volumen de la mezcla de aceite.

50 3. Este es el vórtice durante 3 a 6 minutos (generalmente 5 minutos) a 12.000-18.000 rpm. La velocidad varía según el aceite y los medios utilizados, así como el tamaño de gota deseado, como regla general, cuanto mayor sea la velocidad y cuanto más largo sea el vórtice, menor será el tamaño de gota promedio, aunque este método siempre genera un rango de tamaños.

55 4. La integridad de las gotas y la presencia de células en el interior se analizan visualmente bajo un microscopio usando contraste de fase. Se pueden usar métodos de visualización alternativos, por ejemplo, fluorescencia.

60 5. Luego se introduce una segunda etapa de vórtice para generar la doble emulsión. Se añade un volumen igual al volumen de aceite de la segunda fase acuosa con surfactante a la emulsión única. Luego se agita en vórtice, pero a velocidades reducidas (6.000 a 10.000 rpm) durante solo 2-3 minutos. La formación de gotitas de doble emulsión se puede visualizar en un microscopio como antes.

65 6. Las gotitas se incuban luego a la temperatura adecuada (generalmente a 37°C, pero son estables entre 4°C y 95°C) durante períodos de tiempo de 1h a ≥ 14 días.

7. Las gotas pueden clasificarse por FADS si es necesario y luego las células deseadas se recuperan de las

gotas.

8. Para romper las gotitas abiertas, se agrega surfactante adicional (por ejemplo, SDS al 1% para el aceite de Tegosoft, pero se puede usar cualquier surfactante apropiado como Tweens, Sarcosyl o similar) esto interrumpe las células liberadoras de integridad de las gotitas.

9. Algunas mezclas de aceite pueden lisarse congelando la solución y rompiendo las gotas.

10. Las células se pueden recuperar por centrifugación, o la muestra se puede aplicar directamente a las columnas para las extracciones de ADN.

Ejemplo 3: Producción de microgotas usando un chip microfluídico

[0197] La generación de gotas en un microfluído permite la creación de emulsiones simples y dobles. En su forma más simple, las emulsiones dobles se forman por formación secuencial de y aceite en gotita de agua y luego formación de una segunda capa acuosa por la misma metodología.

[0198] Los métodos alternativos implican co-encapsulación simultánea de fase acuosa en el aceite y luego la gotita de aceite acuoso en una fase continua secundaria de medios acuosos. La formación de gotas en un chip lleva a la generación de gotitas de tamaño uniforme. El tamaño está directamente relacionado con el tamaño de los canales en el fluido y los caudales utilizados para generar gotitas. La formación de gotitas microfluídicas permite el uso de nuevas mezclas de aceite y surfactante que no están disponibles cuando se producen gotitas en los enfoques masivos "de arriba hacia abajo".

[0199] El productor y células diana en medio de crecimiento adecuado se mezclan en proporciones adecuadas para permitir ≤ 1 productor por gota y luego ≥ 1 célula diana por gota. Esta mezcla acuosa de células luego se bombea a través de un dispositivo microfluídico con una geometría que permite la formación de gotas de emulsión única de agua en aceite, o gotas de emulsión doble, como se detalla a continuación.

[0200] Estas gotitas se recogen en un recipiente adecuado para la incubación y se incubaron a temperatura apropiada (por lo general 37°C, pero son estables entre 4°C y 95°C) durante períodos de tiempo de 1 h a ≥ 14 días.

[0201] Las gotas pueden clasificarse por FADS si es necesario y luego las células deseadas se recuperan de las gotas.

[0202] Para abrir las gotitas, se agrega surfactante adicional (por ejemplo, SDS al 1% para aceite de Tegosoft, pero se puede usar cualquier surfactante como Tweens, Sarcosyl, etc. para alterar la integridad de la gota, liberando así las células. Algunas mezclas de aceite pueden lisarse congelando la solución y rompiendo las gotitas.

[0203] Después, las células se pueden recuperar por centrifugación, o la muestra se puede aplicar directamente a las columnas para las extracciones de ADN.

Ejemplo 4: Producción de microgotas de doble emulsión usando enfoque de flujo

[0204] En este caso, el aceite fluye desde los lados hacia un canal hidrofóbico que causa la compresión de la fase acuosa que genera el agua en las gotas de aceite. Este método permite que se genere un buen control de tamaño y se generen miles de gotas por segundo, dependiendo de los caudales de las segundas fases líquidas.

[0205] Es posible usar dos chips de este tipo conectados en serie para generar emulsiones dobles: las primeras gotas son una fase acuosa en aceite que se empujan a través de un segundo chip como si fuera una fase acuosa, el aceite que fluye lateralmente se reemplaza con la fase acuosa secundaria.

[0206] También es posible integrar ambos pasos en un solo chip y una interfaz de unión; por lo que se forman gotas de agua en aceite y se rodean inmediatamente en la fase acuosa externa para generar la doble emulsión W/O/W.

[0207] Los recubrimientos hidrófilos e hidrófobos se invierten sobre el segundo chip, así el segundo chip tiene la misma geometría, pero los revestimientos de superficies opuestas para facilitar el flujo de fase acuosa como el fluido portador/vaina. Esto permite una encapsulación en dos etapas: la primera para generar emulsiones monofásicas que se utilizan para la incubación y el cocultivo de las células productoras y diana, y una segunda etapa en la que los microcultivos se convierten en emulsiones dobles para los siguientes FADS.

Ejemplo 5: Condiciones de co-cultivo para células procariotas y eucariotas

[0208] El cocultivo equilibrado de células bacterianas y eucariotas (es decir, las condiciones de cultivo en las que las tasas de duplicación de células procariotas y eucariotas no son tan diferentes como para dar lugar a un crecimiento excesivo rápido de una clase de células) se puede lograr fácilmente mediante la selección de medios de cultivo

apropiados y condiciones de incubación (que incluyen, entre otras cosas, el grado de aireación y la temperatura de incubación).

5 [0209] La Tabla 1 a continuación muestra el crecimiento de bacterias del suelo utilizadas para el co-cultivo en medios de cultivo tisular disponibles comercialmente y en condiciones idénticas a las utilizadas para el cultivo de células de mamíferos en medios de cultivo de mamíferos comúnmente usados (es decir, a 37°C). La Tabla 2 muestra las tasas de crecimiento publicadas de una selección de líneas celulares eucariotas en estas condiciones. La Tabla 3 muestra el crecimiento de las bacterias del suelo utilizadas para el co-cultivo en medios de cultivo tisular disponibles comercialmente a 30°C (en lugar de 37°C), pero por lo demás en condiciones idénticas a las utilizadas para obtener los datos que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Crecimiento a 37°C

15	Medio de cepa	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas mandelii</i>	<i>Streptomyces venezuelae</i>	<i>Streptomyces 14100</i>
	Estilo libre	43,6 horas	45,8 horas	51,1 horas	33,07 horas	22,7 horas
	DMEM + 10% FBS	34,9 horas	48,7 horas	34,8 horas	27,0 horas	29,1 horas
20	RPMI + 10% FBS	33,0 horas	32,75 horas	35,2 horas	38,8 horas	29,1 horas

Tabla 2: Tasas de crecimiento representativas de células eucariotas

25	Líneas celulares	HEK-293	COS-7	Jurkat	Hibridoma	A549 humano	Línea celular murina 264	B16F10
30	Tiempo de duplicación (h)	10	18	48	14	27	11	12

Tabla 3: Crecimiento a 30°C

35	Medio de cepa	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas mandelii</i>	<i>Streptomyces venezuelae</i>	<i>Streptomyces 14100</i>
	Estilo libre	15,7 horas	21,0 horas	18,5 horas	22,4 horas	13,3 horas
40	DMEM	19,5 horas	19,3 horas	23,0 horas	18,7 horas	16,1 horas
	RPMI	23,9 horas	22,5 horas	21,1 horas	52,0 horas	20,4 horas

45 [0210] La tasa de crecimiento se calculó por el cultivo de cultivos de una noche frescos de cada cultivo a 30°C en los medios de cultivo de mamífero deseados. Esto después se diluyó 1 en 50 en medios de cultivo de tejido fresco y el OD₆₀₀ después se midió en diversos puntos temporales durante el crecimiento a 37°C + 5% de CO₂ o a 30°C. La tasa de crecimiento se calculó a partir del tiempo de duplicación durante el crecimiento exponencial del cultivo, y se basó en cultivos individuales cultivados por triplicado.

50 [0211] Como puede verse a partir de los datos anteriores, las tasas de crecimiento relativo de células procariontas y eucariotas en co-cultivo se pueden controlar fácilmente para lograr co-cultivos equilibrados por entre otras cosas la selección de condiciones de cultivo apropiadas, incluyendo la temperatura de incubación.

REIVINDICACIONES

1. Un método para seleccionar células procariotas mutantes para identificar a los productores de un agente citotóxico activo contra una célula diana, comprendiendo el método los pasos de:

- (a) proporcionar células de una especie procariota productora;
- (b) generar un conjunto de células productoras mutantes por mutagénesis de transposones de las células del paso (a) con un transposón de activación (T_{nA}), en el que el T_{nA} comprende un promotor orientado hacia fuera (T_{nAP}) capaz de aumentar la transcripción de un gen en o cerca de su sitio de inserción en el ADN de dichas células productoras;
- (c) co-encapsular miembros individuales del conjunto del paso (b) con una o más células diana en microgotas, comprendiendo las microgotas un volumen de medio de crecimiento acuoso suspendido en un líquido portador inmiscible, generando así una biblioteca de microgotas que comprende cada una una célula productora mutante única y una o más células diana;
- (d) incubar la biblioteca de microgotas del paso (c) en condiciones adecuadas para el co-cultivo de la célula productora mutante única y la(s) célula(s) diana(s) para producir una biblioteca de microcultivos, mediante la cual las células productoras mutantes producen un agente citotóxico activo contra las células diana superan las células diana en cada microcultivo; y
- (e) seleccionar la biblioteca de microcultivos del paso (d) para microcultivos en los que las células diana han sido superadas o sobredimensionadas hasta su extinción por células productoras mutantes.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además el paso de secuenciación del ADN de células productoras mutantes en microgotas en las que las células diana han sido superadas o crecidas en la extinción por células productoras mutantes, opcionalmente en donde: (i) ADN adyacente o cerca del sitio de inserción e T_{nA} se secuencia, por ejemplo mediante secuenciación que comprende la amplificación selectiva de las uniones de ADN transposón-celular; y/o (ii) la secuenciación comprende una secuenciación masiva paralela de alto rendimiento, por ejemplo, seleccionada entre: (a) bioquímica de secuenciación por síntesis (SBS); y/o (b) secuenciación de nanoporos; y/o (c) tunelización de la secuencia actual; y/o (d) pirosecuenciación; y/o (e) secuenciación por ligación (secuenciación SOLiD); y/o (f) semiconductor de iones; y/o (g) secuenciación de espectrometría de masas; y/o (iii) se secuencian aproximadamente 25, 50, 75, 100 o más de 100 pares de bases de ADN adyacentes o cerca del sitio de inserción de T_{nA} ; y/o (iv) el ADN secuenciado es 5' y/o 3' al sitio de inserción de T_{nA} .

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además el paso de secuenciación de transcritos de ARNm producidos por T_{nAP} en células productoras mutantes en microgotas en las que las células diana han sido superadas o superadas por la extinción por células productoras mutantes para producir un perfil de transcripción de ARNm, opcionalmente en donde se dice el perfil de transcripción de ARNm comprende una determinación de:

- (a) las secuencias de dichos transcritos de ARNm producidos por T_{nAP} ; y/o
- (b) el inicio y el final de los transcritos de ARNm producidos por T_{nAP} ; y/o
- (c) las longitudes de dichos transcritos de ARNm producidos por T_{nAP} ; y/o
- (d) la abundancia relativa de dichos transcritos de ARNm producidos por T_{nAP} ; y/o
- (e) el sitio de transcripción en el ADN celular; y/o
- (f) si los transcritos de ARNm producidos por T_{nAP} son con sentido o antisentido con respecto al ADN celular; y/o
- (g) si los transcritos de ARNm producidos por T_{nAP} corresponden a ORF con respecto al ADN celular; y/o
- (h) si los transcritos de ARNm producidos por T_{nAP} codifican proteínas procarióticas y/o dominios de proteínas.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que las microgotas: (a) son sustancialmente esféricas y tienen un diámetro de: (a) 10 μm a 500 μm ; (b) 10 μm a 200 μm ; (c) 10 μm a 150 μm ; (d) 10 μm a 100 μm ; (e) 10 μm a 50 μm ; o (f) unos 100 μm ; y/o (b) comprenden un volumen de medio de crecimiento acuoso en estado de gel o líquido; y/o (c) comprenden un núcleo interior de un medio de crecimiento acuoso envuelto en una cáscara de aceite exterior, el líquido portador es una fase acuosa continua, opcionalmente en el que el núcleo acuoso interior tiene un diámetro de: (a) 10 μm a 500 μm ; (b) 10 μm a 200 μm ; (c) 10 μm a 150 μm ; (d) 10 μm a 100 μm ; (e) 10 μm a 50 μm ; o (f) aproximadamente 100 μm y/o en donde la cubierta de aceite exterior tiene un espesor de: (a) 10 μm a 200 μm ; (b) 10 μm a 200 μm ; (c) 10 μm a 150 μm ; (d) 10 μm a 100 μm ; (e) 10 μm a 50 μm ; o (f) unos 100 μm .

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el líquido portador es un líquido inmiscible en agua, opcionalmente en el que: (i) el líquido inmiscible en agua es un aceite, por ejemplo, seleccionado de: (a) un aceite de hidrocarburo; (b) un aceite de fluorocarbono; (c) un aceite de éster; (d) un aceite que tiene baja solubilidad para componentes biológicos de la fase acuosa; (e) un aceite que inhibe la difusión molecular entre microgotas; (f) un aceite que es hidrófobo y lipófobo; (g) un aceite que tiene buena solubilidad para gases; y/o (h) combinaciones de cualquiera de dos o más de los anteriores; y/o (ii) las microgotas están comprendidas en una emulsión W/O en la que las microgotas constituyen una fase acuosa dispersa y el líquido portador constituye una fase oleosa continua.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el líquido portador es un líquido acuoso, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS), y las microgotas están comprendidas opcionalmente en una doble emulsión W/O/W en la que las microgotas comprenden: (a) un núcleo interno de medio de crecimiento acuoso envuelto en una capa externa de aceite como la fase dispersa, y (b) el líquido portador como la fase acuosa continua.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las microgotas están comprendidas en una emulsión, en donde el líquido portador constituye la fase continua y las microgotas constituyen la fase dispersa, y en el que la emulsión comprende además un agente tensioactivo y opcionalmente un co-agente tensioactivo, opcionalmente en donde: (a) el surfactante y/o co-surfactante está ubicado en la interfaz de las fases dispersas y continuas; y/o (b) las microgotas están comprendidas en una doble emulsión W/O/W como se define en la reivindicación 6 y el surfactante y/o co-surfactante está ubicado en la interfaz del núcleo acuoso y la capa de aceite; y/o (c) el surfactante y/o co-surfactante comprende un agente fluorosur que tiene un grupo de cabeza no iónico; y/o (d) el surfactante y/o co-surfactante comprende un poliéter perfluorado (PFPE); y/o (e) el surfactante y/o co-surfactante comprende un copolímero de bloque PFPE-poli(etilenglicol) (PEG), por ejemplo un copolímero dibloque o tribloque, por ejemplo un copolímero tribloque PFPE-PEG-PFPE.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las microgotas son monodispersas.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:

(A) el paso de coencapsulación (c) comprende mezclar: (a) el conjunto de células productoras mutantes; (b) una población de las células diana; (c) un medio de crecimiento acuoso; (d) un líquido inmisible en agua, por ejemplo un aceite como se define en la reivindicación 5; y (e) un tensioactivo, por ejemplo, como se define en la reivindicación 7, en condiciones en las que se forma una única emulsión de tipo W/O que comprende microgotas del medio de crecimiento acuoso dispersado en el líquido inmisible en agua, opcionalmente en el que sigue el paso de incubación (d), un líquido portador acuoso, por ejemplo, como se define en la reivindicación 6, se mezcla con la emulsión única del paso (c) en condiciones en las que una doble emulsión W/O/W que comprende microgotas del medio de crecimiento acuoso envuelto en el líquido inmisible en agua se forma líquido y se dispersa en el vehículo acuoso líquido; o

(B) el paso de coencapsulación (c) comprende mezclar: (a) el conjunto de células productoras mutantes; (b) una población de las células diana; (c) un medio de crecimiento acuoso; (d) un líquido inmisible en agua, por ejemplo un aceite como se define en la reivindicación 5; (e) un tensioactivo, por ejemplo, como se define en la reivindicación 7, y (f) un líquido portador acuoso, por ejemplo, como se define en la reivindicación 6, en condiciones en las que una doble emulsión W/O/W que comprende microgotas del medio de crecimiento acuoso cubierto en el líquido inmisible en agua y dispersado en el vehículo acuoso se forma un líquido;

opcionalmente, en el que la mezcla comprende: (a) vórtice y/o (b) sonicación; (c) homogeneización; (d) picroinyección y/o (e) enfoque de flujo y/o el paso de coencapsulación (c) comprende además eliminar microgotas vacías que no contienen productor(es) mutante(s) y/o célula(s) diana, por ejemplo, en donde las células mutantes productoras y/o las células diana están marcadas de forma fluorescente y las microgotas vacías se eliminan mediante FADS.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el paso de incubación (d) comprende mantener la biblioteca de microgotas a una temperatura de 15°C a 95°C durante al menos 1 hora, en donde opcionalmente: (a) la biblioteca de microgotas se mantiene a una temperatura de: (i) 15°C - 42°C; (ii) 20°C - 40°C; (iii) 20°C - 37°C; (iv) 20°C - 30°C; o (v) unos 25°C; (vi) 40°C - 60°C; (vii) 60°C - 80°C; o (viii) 80°C - 98°C; (b) el paso de incubación (d) comprende mantener la biblioteca de microgotas a dicha temperatura durante aproximadamente 2, 4, 6, 12, 24 o 48 horas o hasta 7 días, por ejemplo durante 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días; (c) el paso de incubación (d) comprende mantener la biblioteca de microgotas a dicha temperatura durante hasta 2 semanas, por ejemplo, durante 1 semana o 2 semanas.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:

(A) el paso de selección (e) comprende: (i) eliminar microgotas que contienen células diana, opcionalmente en donde las células diana están marcadas con fluorescencia y las microgotas que contienen células diana se eliminan mediante FADS; y/o (ii) comprende la clasificación FADS para las microgotas en las cuales las células diana han sido superadas o crecidas en la extinción por células productoras mutantes; y/o

(B) el método comprende además una etapa de análisis de potencia realizada durante el paso de incubación (d), por lo que se determina la tasa de crecimiento relativa en el cocultivo de células productoras mutantes y células diana, donde opcionalmente: (i) el paso de análisis de potencia comprende la selección de microgotas que contienen solo células productoras mutantes por FADS, por ejemplo, en las que se llevan a cabo dos o más rondas sucesivas de selección de FADS durante la incubación; y/o (ii) las células diana se marcan con fluorescencia y las microgotas que contienen células diana se someten a una incubación continua.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:

(A) la especie procariota productora se selecciona de:

5 archaea, por ejemplo, seleccionado de los filos: (a) Crenarchaeota; (b) Euryarchaeota; (c) Korarchaeota; (d) Nanoarchaeota y (e) Thaumarchaeota, por ejemplo Haloferax volcanii o Sulfolobus spp.; y/o bacterias, por ejemplo, seleccionadas de: (a) Actinomicetos; (b) Pseudomonas spp., y (c) Bacillus spp., seleccionados opcionalmente de Streptomyces spp, por ejemplo Streptomyces coelicolor; Streptomyces lividans; Streptomyces venezuelae; Streptomyces griseus;

10 Streptomyces avermitilis; Streptomyces bingchenggensis; Kutzneria albida; Saccaropolispora erythraea; Mycobacterium marinum; Bacillus amyloliquefaciens subsp. Plantarum; y micromonospora echinospora.

y/o

15 (B) la célula diana es una célula bacteriana o eucariota, que opcionalmente es micótica; mamífero; una célula de planta superior; protozoo; una célula de helmintos; algas o una célula de invertebrado, por ejemplo, una célula cancerosa, por ejemplo, una célula cancerosa humana, o una bacteria patógena, por ejemplo, seleccionada entre: Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecium, Enterococcus faecium, Enterococcus faecium, Enterococcus faecium y Enterobacter spp.

20

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:

25 (A) la célula productora mutante y/o la célula o células diana del paso (c) están marcadas, por ejemplo, con un marcador fluorescente y/o en el que el paso de selección (e) comprende FADS; y/o

(B) el conjunto de células productoras mutantes comprende: (a) al menos $0,5 \times 10^5$ mutantes, por ejemplo, al menos 1×10^5 mutantes; (b) al menos 5×10^5 mutantes; (c) al menos 1×10^6 mutantes; (d) $0,5 \times 10^6$ a 2×10^6 mutantes; (e) aproximadamente 1×10^6 mutantes; o (f) hasta 10×10^6 mutantes; y/o

30 (C) el paso de mutagénesis del transposón (b) produce una tasa de inserción de: (a) al menos un transposón por 50 pares de bases de ADN bacteriano; (b) al menos un transposón por 30 pares de bases de ADN bacteriano; (c) al menos un transposón por 25 pares de bases de ADN bacteriano; (d) al menos un transposón por 15 pares de bases de ADN bacteriano; (e) al menos un transposón por cada 10 pares de bases de ADN bacteriano; o (f) al menos un transposón por 5 pares de bases de ADN de bacterias; y/o

35 (D) el paso de mutagénesis del transposón (b) comprende la inserción de la T_{NA} en: (a) ADN cromosómico (genómico); (b) ADN plasmídico, o (c) una mezcla de ADN cromosómico (genómico) y plásmido de las células de la especie bacteriana productora; y/o

(E) la mutagénesis del transposón del paso (b) ocurre in vivo o in vitro; y/o

(F) el agente citotóxico se selecciona de: (a) un antibiótico; (b) un agente antineoplásico; y (c) un agente antimicótico; y/o

40 (G) en el paso (b) inserción de T_{NA} en el ADN celular de la especie procariota productora:

(a) se produce un flujo ascendente de un gen u operón del agente citotóxico críptico, mientras que el $T_{NA}P$ provoca un aumento de la transcripción y, por lo tanto, conduce a la expresión del gen u operón del agente citotóxico críptico;

45 (b) se produce un flujo ascendente de un activador de un gen u operón del agente citotóxico críptico, mientras que $T_{NA}P$ impulsa una mayor transcripción del activador que actúa en trans para aumentar la expresión del gen u operón del agente citotóxico críptico;

(c) inactiva la inserción de un represor de un gen u operón del agente citotóxico críptico, aumentando así la expresión del gen u operón del agente citotóxico críptico;

50 (d) se produce un flujo ascendente de una enzima involucrada en la síntesis del agente citotóxico, donde el $T_{NA}P$ conduce a un aumento de la transcripción y, por lo tanto, conduce a un aumento de la expresión de dicha enzima;

(e) inactiva por inserción una enzima para la cual un agente citotóxico es un sustrato, lo que aumenta los niveles del agente citotóxico;

55 (f) se produce un flujo ascendente de una enzima que produce un agente citotóxico como actividad secundaria, mientras que el $T_{NA}P$ provoca un aumento de la transcripción y, por lo tanto, conduce a una mayor expresión de dicha enzima, lo que aumenta su actividad lateral y aumenta los niveles del agente citotóxico;

60 (g) inactiva de manera insertada uno o más dominios de una enzima de múltiples dominios, lo que altera su función de tal manera que sintetiza, directa o indirectamente, un agente citotóxico;

(h) se produce un flujo ascendente de uno o más dominios de una enzima de múltiples dominios, mientras que $T_{NA}P$ impulsa un aumento de la transcripción de dicho uno o más dominios, lo que altera la función de dicha enzima de manera que se sintetiza, directa o indirectamente., un agente citotóxico; o

65 (i) altera el repertorio de codificación de manera que un agente citotóxico se expresa directa o indirectamente.

- 14.** Un método para identificar un agente citotóxico que comprende seleccionar bacterias mutantes para identificar a los productores de un agente citotóxico activo contra una célula diana de acuerdo con un método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 5 **15.** Un proceso para producir un agente citotóxico que comprende el método como se define en la reivindicación 14, que comprende además sintetizar o aislar dicho agente citotóxico de las bacterias mutantes, y luego mezclar opcionalmente el agente citotóxico sintetizado o aislado con un excipiente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica.