



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 338 212**

51 Int. Cl.:

C12P 19/00 (2006.01)

C12P 19/62 (2006.01)

C07H 17/08 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/76 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01921617 .5**

96 Fecha de presentación : **17.04.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1278881**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.01.2003**

54

Título: **Productos híbridos glicosilados y su producción y utilización.**

30

Prioridad: **13.04.2000 GB 0009207**
23.10.2000 US 694218

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.05.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.05.2010

73

Titular/es: **BIOTICA TECHNOLOGY LIMITED**
112 Hills Road
Cambridge, Cambridgeshire CB2 1PH, GB

72

Inventor/es: **Leadlay, Peter Francis;**
Staunton, James y
Gaisser, Sabine

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 338 212 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

Productos híbridos glicosilados y su producción y utilización.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a productos híbridos glicosilados, y, en particular, a productos naturales, tales como poliquétidos y glucopéptidos, y a procedimientos para su preparación. La invención se refiere especialmente a células recombinantes en las que una glicosiltransferasa microbiana clonada puede ser convenientemente probada para su capacidad para generar derivados glicosilados específicos cuando se suministran con poliquétidos, péptidos, o poliquétidos-péptidos como sustratos.

Antecedentes de la invención

La glicosilación es importante para la bioactividad de muchos productos naturales, incluidos los compuestos antibacterianos tales como la eritromicina de poliquétido A y la vancomicina de glucopéptido, y sus compuestos antitumorales tales como la daunorubicina de poliquétido aromática y la bleomicina glucopéptido-poliquétido. Los poliquétidos son una clase grande y estructuralmente diversa de productos naturales que incluye muchos compuestos que poseen propiedades antibióticas o farmacológicas de otro tipo, tal como eritromicina, tetraciclinas, rapamicina, avermectina, monensina, epitolonas y FK506. En particular, los poliquétidos son abundantemente producidos por *Streptomyces* actinomicetos y bacterias relacionadas. Son sintetizados por la condensación paso a paso repetida de aciltioésteres de una manera análoga a la de la biosíntesis de ácidos grasos. La mayor diversidad estructural encontrada entre los poliquétidos natural surge de la selección del acetato (usualmente), o del propionato como unidades “iniciadoras” o “extensoras”, y de la existencia de distintos grados de transformación del grupo β -ceto observado después de cada condensación. Ejemplos de etapas de procesamiento incluyen la reducción de β -hidroxiacil-, reducción seguida por la deshidratación de 2-enoil-, y la reducción completa del aciltioéster saturado. El resultado estereoquímico de estas etapas de transformación también se especifica para cada ciclo de extensión de la cadena. Las cadenas de poliquétidos suelen ciclarse de manera específica y someterse a modificaciones adicionales de la enzima-catalizador para producir el poliquétido final. Los péptidos que se producen de manera natural producidos mediante sintetetas de péptido no ribosomales también se sintetizan mediante montaje paso a paso repetido, en este caso de aminoácidos activados, y las cadenas producidas son igualmente objeto de modificaciones adicionales para producir moléculas plenamente bioactivas. Los compuestos mezclados de poliquétido-péptido, denominado en lo sucesivo como incorporación de unidades de quétido y de aminoácidos, también son conocidos, y su bioactividad también está influenciada por su patrón de glicosilación y otras modificaciones. Los compuestos así producidos son especialmente valiosos, ya que incluyen un gran número de compuestos de utilidad conocida, por ejemplo, como antihelmínticos, insecticidas, inmunosupresores, agentes antifúngicos o antibacterianos.

Los *Streptomyces* y géneros estrechamente relacionados de bacterias filamentosas son productores abundantes de metabolitos de poliquétidos. Aunque un gran número de poliquétidos terapéuticamente importantes han sido identificados, sigue habiendo una necesidad de obtener poliquétidos nuevos que tengan propiedades mejoradas o que tengan una bioactividad completamente nueva. El aumento inexorable de la incidencia de organismos patógenos con resistencia a antibióticos como los macrólidos de 14 miembros o glucopéptidos representa una amenaza significativa para la salud humana y animal. Los procedimientos actuales de obtención de metabolitos de poliquétidos nuevos incluyen el cribado a gran escala de cepas de origen natural de *Streptomyces* y otros organismos, ya sea para la producción directa de moléculas útiles, o por la presencia de actividades enzimáticas que pueden bioconvertir un poliquétido existente, que se añade al medio de cultivo, en derivados específicos. Estos procedimientos son lentos y costosos, y la biotransformación utilizando células enteras puede además estar limitada por las reacciones colaterales o por una baja concentración o actividad de la enzima intracelular responsable de la bioconversión. Dada la complejidad de los poliquétidos bioactivos, que no son fácilmente susceptibles a la síntesis química total a gran escala. La modificación química de poliquétidos existentes ha sido ampliamente utilizada, pero muchas alteraciones deseables no son fácilmente alcanzables por este medio.

Mientras tanto, se han desarrollado procedimientos para la biosíntesis de poliquétidos alterados y de polipéptidos no ribosomalmente sintetizados mediante ingeniería de los correspondientes genes que codifican las sintetetas de poliquétidos y las sintetetas de polipéptidos, respectivamente. La biosíntesis de poliquétidos se inicia mediante un grupo de las enzimas que forman la cadena, conocidas como sintetas de poliquétidos. Dos clases de sinteta de poliquétidos (PKS) se han descrito en actinomicetos. Una clase, llamada PKSs tipo I, representada por la PKSs para los macrólidos eritromicina, oleandomicina, avermectina y rapamicina, se compone de un conjunto diferente o “módulo de extensión” de las enzimas para cada ciclo de extensión de la cadena de poliquétidos (Cortés, J. *et al.* Nature (1990) 348:176-178). El término “módulo de extensión” tal como se usa aquí se refiere al conjunto de dominios contiguos, de un dominio sinteta β -cetoacil-ACP (“KS”) al siguiente dominio de proteína transportadora de acilo (“ACP”), que realiza un ciclo de extensión de la cadena de poliquétidos.

La supresión en marco de ADN que codifica parte del dominio de quetoreductasa en el módulo 5 de la eritromicina que produce PKS (también conocida como sinteta de 6-deoxieritronolido B, DEBS) se ha demostrado que conducen a la formación de análogos de la eritromicina 5,6-dideoxi-3- α -micarosil-5-oxoeritronolido B, 5,6-dideoxi-5-oxoeritronolido B y 5,6-dideoxi, 6 β -epoxi-5-B oxoeritronolido (Donadio, S. *et al.* Science (1991) 252:675-679). Del mismo modo, la alteración de los residuos del sitio activo en el dominio de enoilreductasa del módulo 4 en DEBS,

mediante ingeniería genética del correspondiente ADN que codifica PKS y su introducción en *Erythraea Saccharopolyspora*, condujo a la producción de 6,7-anhidroeritromicina C (Donadio, S. *et al.* Proc Natl. Acad. Sci. EE.UU. (1993) 90:7119-7123). El documento WO 93/13663 describe otros tipos de manipulación genética de los genes DEBS que son capaces de producir poliquétidos alterados. Sin embargo, muchos de estos intentos se han indicado que han sido improductivos (Hutchinson, C. R. y Fujii, I. Annu. Rev. Microbiol. (1995) 49:201-238, en p. 231).

El documento WO 98/01546 describe la ingeniería de genes PKS de tipo híbrido que utiliza porciones de genes PKS derivados de más de un PKS natural, en particular procedentes de diferentes organismos, y el uso de estos genes recombinantes para la producción de metabolitos de poliquétidos alterados.

La segunda clase de PKS, denominada PKSs Tipo II, está representado por las sintasas de compuestos aromáticos. PKSs Tipo II sólo contienen un único conjunto de actividades enzimáticas de la extensión de la cadena y estos son reutilizadas en ciclos sucesivos (Bibb, M. J. *et al.* EMBO J. (1989) 8:2727-2736; Sherman, D. H. *et al.* EMBO J. (1989) 8:2717-2725; Fernández-Moreno, M.A. *et al.* J. Biol. Chem. (1992) 267:19278-19290). Las unidades “extendedoras” de la pKSs tipo II suelen ser unidades de acetato, y la presencia de ciclasas específicas dicta la vía preferida para la ciclación de la cadena completa en un producto aromático (Hutchinson, C. R. y Fujii, I. Annu. Rev. Microbiol. (1995) 49:201-238). Poliquétidos híbridos han sido obtenidos mediante la introducción de clones de ADN que contiene genes PKS tipo II en otra cepa que contiene una agrupación de genes PKS tipo II diferente, por ejemplo mediante la introducción de ADN derivado de la agrupación de genes para actinorhodina, de un poliquétido pigmentado azul de *Streptomyces coelicolor*, en una cepa que produce poliquétidos de antraquinona de *Streptomyces galileus* (Bartel, P. L. *et al.* J. Bacteriol. (1990) 172:4816-4826).

El número mínimo de campos necesarios para la extensión de la cadena de poliquétido PKS Tipo II cuando se expresa en una célula huésped *Streptomyces coelicolor* (el “PKS mínimo”) se ha definido por ejemplo, en el documento WO 95/08548 que contiene los siguientes tres polipéptidos que son productos de los genes de *actO I*: primero KS, en segundo lugar un polipéptido llamado CLF con una similitud de secuencia de aminoácido de extremo a extremo a la KS pero en el que el residuo del sitio activo esencial de la KS, es decir, un residuo de cisteína, está sustituido o por un residuo de glutamina, o en el caso de la PKS por un pigmento de esporas, tal como el producto del gen *Whie* (Chater, F. y K. Davis, N. K. Mol. Microbiol. (1990) 4:1679- 1691) por un residuo de ácido glutámico; y, finalmente, un ACP. La CLF se ha indicado por ejemplo, en el documento WO 95/08548 que es un factor que determina la longitud de la cadena de poliquétidos que se produce mediante la PKS mínima. Sin embargo, se ha encontrado (Shen, B. *et al.* J. Am. Chem. Soc. (1995) 117:6811-6821) que cuando la CLF para el octaquétido de actinorhodina se utiliza para sustituir la CLF para el decaquétido de tetracenomicina en las células huésped de *Streptomyces glaucescens*, el producto de poliquétido no se encuentra que esté alterado de un decaquétido a un octaquétido. Una nomenclatura alternativa ha sido propuesta en la que KS se designa KS α y CLF es designado KS β , para reflejar esta falta de confianza en la asignación correcta de la función de la CLF (Meurer, G. *et al.* Chemistry and Biology (1997) 4:433-443). La solicitud de Patente Internacional WO 00/00618 ha demostrado recientemente que la CLF y su homólogo en las multienzimas PKS tipo I, el denominado dominio KSQ, están involucrados en el inicio de la síntesis de la cadena de poliquétidos. El documento WO 95/08548 por ejemplo, describe la sustitución de los genes PKS de actinorhodina por ADN heterólogo de otras agrupaciones de genes PKS de tipo II, para obtener poliquétidos híbridos.

Esta capacidad de diseñar los genes PKS tanto de tipo I y tipo II plantea la posibilidad de biosíntesis combinatoria de poliquétidos para producir diversas librerías de nuevos productos naturales que pueden ser examinados para bioactividades deseables. Sin embargo, las agliconas producidas por los genes recombinantes PKS pueden procesarse sólo parcialmente, o en absoluto, mediante glucosiltransferasas y otras enzimas de modificación en análogos de los poliquétidos maduros. Por tanto, existe una necesidad adicional de proporcionar procedimientos para la conversión eficiente de estas agliconas nuevas en productos específicos glicosilados. Además, la invención de procedimientos eficientes de glicosilación proporcionaría un nuevo medio para aumentar muy significativamente la diversidad de las librerías de poliquétidos combinatorios, mediante la utilización de células recombinantes que contienen glucosiltransferasas clonadas alternativas y complementos alternativos de azúcares activados.

La bien conocida la influencia de glicosilación en la actividad biológica ha estimulado la investigación intensiva en los genes y enzimas que regulan la síntesis y la unión de sus unidades de azúcares específicos a poliquétidos y metabolitos de polipéptido (para una revisión ver Trefzer, A. *et al.* Natural Products Reports (1999) 16:283-299). Encuestas de estos metabolitos han revelado una alta diversidad en el tipo de sustitución glicosil que se encuentra, incluyendo un gran número de deoxihexosas diferentes y deoxiaminohexosas (véase, para una revisión Liu, HW y Thorson, J. S. Annu. Rev. Microbiol. (1994) 48:223-256) revisión). El secuenciado de agrupaciones de genes de biosíntesis para numerosos poliquétidos y péptidos glicosilados ha revelado la presencia de azúcar, genes de biosíntesis, así como genes que codifican las glucosiltransferasas que transfieren el grupo glicosil desde una forma activada del azúcar, por ejemplo, formas dTDP o dUDP, al aceptor de aglicona. Por ejemplo, los genes *eryB* y los genes *Eryc* de la agrupación de genes de biosíntesis de la eritromicina en *Saccharopolyspora erythraea* han sido identificados como implicados en la biosíntesis y el acoplamiento de, respectivamente, L-micarosa y D-desosamina al precursor de aglicona de la eritromicina A (Dhillon, N. *et al.*, Mol. Microbiol. (1989) 3:1405-1414; Haydock *et al.* Mol. Gen. Genet. (1991) 230:120-128; Salah-Bey, K. *et al.* Mol Gen. Genet (1998) 257:542-553; Gaissa, S. *et al.* Mol. Gen. Genet. (1998) 258:78-88; Gaissa, S. *et al.* (1997) Mol. Gen. Genet. 256: 239-251; Summers, D. *et al.* Microbiology (1997) 143: 3251-3262). Los documentos WO 97/23630 y WO 99/05283 describen la preparación de una eritromicina alterada por la eliminación de un gen de biosíntesis de azúcar específico, de modo que una alteración del azúcar se une a la aglicona. Así el documento WO 99/05283 describe los niveles bajos pero detectables de eritromicina, en los que por ejemplo desosamina

se sustituye por micaminosa (*eryCIV* knock-out), o se producen eritromicinas desmetilmicarosil (*eryBIII* knock-out). Mientras tanto, los análogos de metimicina se han producido en los que la desosamina ha sido reemplazada por D-quinuvosa (Borisov, S.A. *et al.* Org. Lett. (1999) 1:133-136), o a través de la incorporación del gen *calH* de la agrupación de genes de caliqueamicina *Micromonospora echinospora* en la cepa productora de metimicina (Zhao, L. *et al.* J. Amer. Chem. Soc. (1999) 121:9881-9882). Del mismo modo, han sido producidos glicopéptidos híbridos mediante el uso de clonación de glucosiltransferasas a partir de *Amycolatopsis orientalis* que producen micina para añadir D-xilosa o D-glucosa a agliconas de glucopéptidos estrechamente relacionados de acuerdo con la patente US 5.871.983 (1999) (Solenberg, P. *et al.* Chem. Biol. (1997) 4:195-202). También se han producido poliquétidos híbridos aromáticos, mediante la complementación entre especies de un gen mutante biosintético de azúcar individual con un gen similar con un estereoespecificidad diferente. Así, en lugar de la daunosamina natural, se produce 4'epi-daunosamina recombinante en *Streptomyces peuceitius* y unida mediante la glicosiltransferasa de daunosamina a la aglicona para obtener la epirubicina antitumoral derivada en lugar de la doxorubicina (Madduri, K. *et al.* Nature Biotechnology (1998) 16:69-74). En todos estos casos, la especificidad de la glicosiltransferasa permitió la sustitución de un azúcar activado alternativo, pero la aglicona y glicosiltransferasa no eran heterólogas entre sí. Se ha encontrado que cuando la glicosiltransferasa oleandrosa *oleG2* de *Streptomyces antibioticus* es clonada en la producción de eritromicina *Saccharopolyspora erythraea*, además de otros productos, se obtuvo la nueva eritromicina, en la que cladinosa/micarosa en C-3 se sustituye por ramnosa (Doumith, M. *et al.* Mol. Microbiol. (1999) 34:1039-1048). Se suponía que la ramnosa activa es producida por las células huésped, y es reclutada por la glicosiltransferasa *oleG2* en competencia con la micarosa activa que sabe que está presente.

Descripción de la invención

La presente invención muestra que las glucosiltransferasas clonadas cuando se criban rápidamente por su capacidad para fijarse a una gama de azúcares activados para una gama suministrada de forma exógena o plantillas de agliconas generadas de manera endógena, muestran una flexibilidad sorprendente hacia los sustratos de aglicona y de azúcar, y que este procedimiento permite la producción de poliquétidos glucosilados en buen rendimiento. Esto supera el problema no sólo de suministro de nuevas uniones de azúcar a poliquétidos individuales, incluyendo poliquétidos alterados mediante ingeniería genética, sino también aumentar la diversidad de las librerías de poliquétidos mediante fijación combinatoria de azúcares. Es especialmente sorprendente que los nuevos productos glucosilados puedan ser producidos en sistemas en los que uno o más de los componentes sean heterólogos entre sí, seleccionándose los componentes de la plantilla de aglicona, la fracción o fracciones de azúcar, la glicosiltransferasa, la célula huésped y/o los genes que codifican enzimas capaces de modificar la molécula de azúcar, ya sea antes o después de la adhesión a la plantilla de aglicona. En realizaciones preferidas, dos, tres, cuatro o todos los componentes son heterólogos entre sí.

En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir un producto híbrido glucosilado mediante la transferencia de una o varias fracciones de azúcar a una plantilla de aglicona, comprendiendo el procedimiento:

transformar las células huésped del microorganismo con ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa (GT);
y

proporcionar una plantilla de aglicona al GT, de modo que el GT transfiere una o varias fracciones de azúcar a la plantilla de aglicona para producir un producto híbrido glucosilado;

en el que una o más de la fracción o fracciones de azúcar, la plantilla de aglicona, la glicosiltransferasa o las células huésped son heterólogas con los otros componentes.

Preferentemente, el producto glucosilado híbrido es otro de los compuestos M1 a M4 descritos en Doumith *et al* (*supra*), por ejemplo, una eritromicina en la que cladinosa/micarosa en C-3 se sustituye por ramnosa.

En otro aspecto, la presente invención proporciona células huésped transformadas con ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa (GT), en el que el GT es heterólogo con las células huésped, y transfiere una o más fracciones de azúcar a una plantilla de aglicona en las células para producir un producto híbrido glucosilado.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir un producto híbrido glucosilado, comprendiendo el procedimiento el cultivo de las células huésped definidas anteriormente y aislar el producto así producido. En realizaciones en las que la plantilla de aglicona se suministra a las células huésped, en lugar de ser producida por la célula huésped, el procedimiento podrá incluir la etapa adicional de proporcionar la plantilla de aglicona a las células.

En otros aspectos, la presente invención proporciona productos de glicosilación híbridos tal como se pueden obtener mediante cualquiera de los procedimientos aquí descritos.

En algunas realizaciones de la presente invención, un “producto glucosilado híbrido” es aquel en el que la plantilla de aglicona y la fracción o fracciones de azúcar son heterólogas entre sí. En los procedimientos aquí descritos, uno o

más de los componentes del sistema utilizados para producir o modificar el producto glicosilado híbrido pueden ser heterólogos entre sí. Estos componentes incluyen el plantilla de aglicona, la fracción o fracciones de los azúcares, la cepa de microorganismos o células huésped, la glicosiltransferasa que cataliza la fijación de la fracción de azúcar a la plantilla de aglicona y la modificación de los genes capaces de modificar la molécula de azúcar, ya sea antes o después de la adhesión a la plantilla de aglicona. El producto glicosilado híbrido también puede ser objeto de transformación o derivación, ya sea mediante la cepa o después de aislar el medio de cultivo.

En la presente invención, una “plantilla de aglicona” es un poliquétido, un péptido o una mezcla de poliquétido-péptido que es capaz procesar, por ejemplo, mediante una glicosiltransferasa, para transferir uno o más fracciones activas de azúcar a la plantilla. La plantilla de aglicona puede incluir formas de glicosilación diferentes a la introducida por el GT heterólogo. Las células, además, pueden contener uno o más genes heterólogos de modificación, incluyendo pero no limitado a genes que codifican enzimas y otras proteínas capaces de realizar la transferencia de metilo, hidroxilación, o reacciones de epoxidación, en la fracción de azúcar, antes o después de la adhesión a la plantilla de aglicona. Como alternativa o adicionalmente, otra diversidad en productos híbridos se puede obtener mediante la supresión o modificación de uno o más genes homólogos de modificación.

En algunas realizaciones, la plantilla de aglicona puede producirse mediante la cepa de microorganismo, ya sea naturalmente o mediante la transformación de la cepa con uno o más genes o agrupaciones de genes capaces de producir la plantilla. A modo de ejemplo, cuando una cepa de microorganismo produce naturalmente un poliquétido, el procedimiento puede emplear la plantilla de aglicona de poliquétido de producción endógena mediante la cepa o la cepa puede estar diseñada para eliminar o inactivar la producción de esta plantilla. En este último caso, las células pueden transformarse con uno o más genes PKS o una agrupación de genes PKS para la producción heteróloga de una plantilla o, además, o alternativamente, una o varias plantillas pueden suministrarse de forma exógena a las células huésped, por ejemplo, en el procedimiento de cribado que se describen a continuación.

Tal como se mencionó anteriormente, la aglicona puede producirse mediante las células huésped mediante la clonación adicional en la célula de un gen o genes de sintasa de poliquétido recombinante de tipo I o II. Los genes recombinantes PKS pueden consistir en genes PKS naturales o versiones mutadas de genes naturales PKS, o genes PKS híbridos que consisten en porciones de al menos dos grupos de genes de tipo natural PKS diferentes o grupos de genes naturales PKS de tipo II, y pueden consistir en una librería de genes PKS híbridos de tipo I o II. Ejemplos de conjuntos de genes PKS incluyen aquellos que producen poliquétidos macrólidos de tipo I rifamicina, avermectina, rapamicina, inmunomicina, o eritromicina, narbomicina, oleandomicina, picromicina, espiramicina o tilosina; polienos tal como anfotericina B, candicidina, nistatina o pimaricina; poliéteres tales como monensina sódica, salinomicina, senduramicina o tetronasina, y poliquétidos de tipo II tales como actinorhodina, daunorubicina, oxitetraciclina o tetraciclina.

Una cepa de célula huésped preferida es actinomiceto, más preferentemente cepas tales como *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces griseofuscus*, *Streptomyces cinnamomensis*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces hygrosopicus*, *Micromonospora griseorubida*, *Streptomyces lasaliensis*, *Streptomyces venezuelae*, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces albus*, *Amycolatopsis mediterranei*, y *Tsukubaensis Streptomyces*. Ejemplos de cepas preferidas y modificaciones preferidas de las cepas para adaptarlas para su uso en la presente invención se exponen a continuación.

Ejemplos de glucosiltransferasas adecuadas para su uso, según la presente invención (lista de GTs, su contexto normal de biosíntesis y especificidades de sustrato normal):

De la vía de eritromicina de *Saccharopolyspora erythraea*: eryCIII desosaminiltransferasa y micarosiltransferasa eryBV.

De la vía de megalomicina de *Micromonospora megalomicea*: megCIII desosaminiltransferasa, megBV micarosiltransferasa y megosaminiltransferasa.

De la vía de oleandomicina *Streptomyces antibioticus*: oleandrosiltransferasa oleG2 (también las transferencias de ramnosa y olivosa) y desosaminiltransferasa oleG1.

De la vía de tilosina de *Streptomyces fradiae*: tylMIII micaminosiltransferasa, transferasa deoxiallosa tylN y micarosiltransferasa TYLCV.

De la vía de midecamicina de *Streptomyces mycarofaciens*: micaminosiltransferasa y micarosiltransferasa.

Desde la vía picromycina/narbomicina de *Streptomyces venezuelae*: desVII desosaminiltransferasa.

De la vía de espinosina de *Saccharopolyspora spinosa*: ramnosiltransferasa y forosaminiltransferasa.

De la vía de anfotericina *Streptomyces nodosus*: amphDI micosaminil transferasa.

ES 2 338 212 T3

De la vía de avermectina *Streptomyces avermitilis*: oleandrosiltransferasa.

De la vía de nistatina de *Streptomyces micosaminil*: transferasa.

5 De la vía de polieno 67-121C de *Actinoplanes caerulens*: micosaminiltransferasa, mannosiltransferasa (transferencia a la micosamina).

De la vía de elloramycin de *Streptomyces olivaceus* Tü2353: ramnosiltransferasa elmGT.

10 De la vía de mitramicina *Streptomyces argillaceus*: mtmGIV olivosiltransferasa.

De la vía de daunomicina de *Streptomyces peucetius*: daunosaminiltransferasa DNRS.

15 De la vía de urdamicina de *Streptomyces fradiae* Tü2717: rodinosiltransferasa urdGT1c, urdGT1b olivosiltransferasa, urdGT1a rodinosiltransferasa y urdGT2 olivosiltransferasa.

20 Preferiblemente, el procedimiento también comprende la etapa de la eliminación o inactivación de uno o más genes en las células huésped del microorganismo que participan en la producción de la plantilla de aglicona y/o en su tratamiento posterior, para suprimir o alterar así la producción natural de la plantilla o producto de aglicona.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir una librería capaz de producir una pluralidad de productos híbridos glicosilados, comprendiendo el procedimiento:

25 transformar las células huésped del microorganismo con ácido nucleico que codifica una o más glucosiltransferasas (GT); y

30 proporcionar una o más plantillas de aglicona para los GT, de manera que los GTs transfieren una o más fracciones de azúcar a la plantilla de aglicona para producir dicha pluralidad de productos híbridos glicosilados;

en el que una o más de la fracción o fracciones de azúcar, la plantilla de aglicona, la glicosiltransferasa o las células huésped son heterólogas con los otros componentes.

35 En otros aspectos, la presente invención proporciona un procedimiento que comprende además el crato de la librería de un producto híbrido glicosilado que tienen una característica deseada.

40 En realizaciones preferidas, la librería comprende 2 productos híbridos glicosilados, más preferiblemente al menos 10 productos híbridos glicosilados, más preferiblemente al menos 50 productos híbridos glicosilados y aún más preferiblemente al menos 100 productos híbridos glicosilados.

45 En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para el cribado de un producto híbrido glicosilado, comprendiendo el procedimiento:

50 producir una o más células huésped diferentes de microorganismos, transformándose cada célula huésped con ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa (GT), en el que el GT es heteróloga con la cepa del microorganismo, para formar una librería de células huésped;

suministrar la librería con una o más plantilla de aglicona;

cribar la librería para los productos híbridos glicosilados producidos mediante los GT, transfiriendo una o más fracciones de azúcar a la plantilla de aglicona.

55 Preferentemente, los procedimientos aquí también comprenden aislar una célula huésped que produce un producto híbrido glicosilado deseado, y su tratamiento adicional (por ejemplo, el cultivo de las células y aislar el producto producido) de modo que el producto puede hacerse a granel. Preferentemente, para maximizar la diversidad de los productos híbridos, el procedimiento de cribado emplea al menos dos células huésped y/o plantilla de agliconas y/o glucosiltransferasas y/o fracciones de azúcar activo y/o genes de modificación heterólogos diferentes capaces de modificar la molécula de azúcar antes o después de transferirse a la plantilla de aglicona, más preferiblemente al menos 3, más preferentemente al menos 5, más preferentemente al menos 10, más preferentemente al menos 20 y más preferentemente al menos 50 células y/o plantillas diferentes.

65 Este procedimiento de cribado permite que se generen un gran número de nuevos productos híbridos y se criben maximizando el número y la variedad de productos que pueden ser fabricados y probados. Los productos híbridos deseados pueden ser detectados por su actividad biológica (por ejemplo, antibióticos).

ES 2 338 212 T3

Será evidente para los expertos en la materia que la producción de glucósidos híbridos se puede hacer en una serie de formas alternativas usando la presente invención, por ejemplo:

(1) incluyendo todos los genes necesarios en la misma célula, ya sea introducidos por separado o como un solo casete, o

(2) paso a paso, el producto de una fermentación mediante una célula recombinante que contiene algunos de los genes expresados (ya sea después de la purificación o usado como un sobrenadante filtrado), que a su vez se alimenta a una segunda cepa de bioconversión que contiene el resto de los genes expresados.

En este último caso, el procedimiento de la invención puede comprender las etapas de:

producir una de la plantilla de aglicona o la fracción de azúcar en las primeras células huésped como un primer producto;

opcionalmente, purificar el primer producto de una cultivo de primeras células huésped; y

añadir el primer producto a una segunda célula huésped que comprende uno o más genes que codifican las otras de la plantilla de aglicona o la fracción de azúcar y una o más glucosiltransferasas, de modo que la fracción de azúcar se transfiere a la glicosiltransferasa, para producir el producto glicosilado híbrido.

El primer producto que puede estar en varios grados de purificación, es decir, que puede ser empleado como un sobrenadante filtrado, de forma aislada o en cualquier grado de perfección compatible con la producción en las segundas células huésped.

En algunas realizaciones, las células huésped, además, pueden contener genes clonados y expresados de la biosíntesis del azúcar, ya sea todo un grupo de genes necesarios para proporcionar una forma natural o nuevo deoxiazúcar, por ejemplo todos los genes específicos *eryB* de *Saccharopolyspora erythraea* o donde se requiera para hacer dTDP-micarosa activa a partir de intermediarios metabólicos comunes para células de actinomiceto, o tal como conjuntos de genes a los que les faltan ciertos genes, de manera que se proporcionan azúcares alterados activados, o determinados genes que sólo modifican el tipo de azúcares activados producidos por biosíntesis endógena de las vías de deoxihexosa. Así, la presente invención incluye la posibilidad de transformar las células huésped, con uno o más genes de modificación de la plantilla de aglicona, por ejemplo, para proporcionar posiciones alternativas en las que se puede introducir glicosilación, para modificar la funcionalidad existente en la plantilla o que están involucrados en el procesamiento posterior de los productos de glicosilación híbridos.

Las células pueden ser cultivadas, además, en presencia de cerulenina, que específicamente suprime la biosíntesis de poliquétidos endógenos, o además, o alternativamente mutarse para eliminar o desactivar uno o varios de los genes PKS presentes de forma natural en las células, en ambos casos el resultado es disminuir la competencia con la aglicona suministrada.

En otro aspecto, la presente invención proporciona los productos híbridos glicosilados producidos mediante cualquiera de los procedimientos aquí descritos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona nuevos productos híbridos glicosilados resultantes de la unión de las fracciones de azúcar a las plantillas de aglicona. Ejemplos de productos híbridos incluyen aquellos que comprenden:

(a) una o más ramnosa o azúcares de ramnosa sustituidos (por ejemplo, metilo) unidos a un eritronolido o a una eritromicina;

(b) una o más micarosa o azúcares de micarosa sustituidos unidos a un eritronolido o a una eritromicina;

(c) una o más micaminosa o azúcares de micaminosa sustituidos unidos a una eritromicina;

y las combinaciones de sustituyentes de azúcar (a), (b) y (c) en un eritronolido o en una eritromicina (por ejemplo, eritronolido B o eritromicina A).

Ejemplos de productos híbridos basados en una plantilla de tilactona incluyen aquellos que comprenden:

(a) una o más glucosa o azúcares de glucosa sustituidos unidos a una tilactona;

(b) una o más desosaminosa o azúcares de desosaminosa sustituidos unidos a una tilactona;

ES 2 338 212 T3

(c) una o más micaminosa o azúcares de micaminosa sustituidos unidos a una tilactona;

(d) una o más ramnosa o azúcares de ramnosa sustituidos unidos a una tilactona;

5 y las combinaciones de azúcares sustituyentes (a), (b), (c) y (d), tales como una ramnosa y un azúcar de micaminosa unido a una tilactona (por ejemplo, 23-O-ramnosil 5-O-micaminosil tilactona).

Ejemplos específicos de los productos híbridos de la invención son:

10

3-O-(2'-O-metilramnosil)eritronolido B

3-O-(2',3'-bis-O-metilramnosil)eritronolido B

15

3-O-(2',3',4'-tris-O-metilramnosil)eritronolido B

8a-hidroxi-3-O-micarosil eritronolido B

20

8,8a-epoxi-3-O-micarosil eritronolido B

8,8a-dehidro-6-B deoxieritronolido

8-hidroxi-6-B deoxieritronolido

25

3-O-(2'-O-metilramnosil) eritromicina D

3-O-(2',3'-bis-O-metilramnosil) eritromicina D

3-O-(2',3',4'-tri-O-metil ramnosil) eritromicina D

30

5-O-micaminosil-4''-O-eritromicina micarosil A

5-O-glucosilo-tilactona

35

5-O-desosaminil-tilactona

23-O-ramnosil 5-O-tilactona micaminosil

5-O(2'-O)-bis-glucosilo-tilactona

40

3-O-ramnosil-8,8a-dehidro-6-deoxieritronolido B

3-O-ramnosil-8,8a-dihidroxi-eritronolido B

45

3,5 di-O-micarosil eritronolido B.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para el montaje de una serie de genes en un casete para la transformación de una célula huésped para la realización de los procedimientos aquí descritos. La estrategia para preparar casetes de genes con diferentes combinaciones de genes de glicosiltransferasa y metiltransferasa es una adaptación de una técnica que se ha descrito anteriormente (WO 00/77181A2) para construir casetes de genes expresados bajo el control del regulador *actII-Orf4*. La expresión de estos casetes de genes en un fondo de cepa adecuado es un enfoque poderoso para generar nuevos poliquétidos post-PKS de manera aleatoria o dirigida. El procedimiento se basa en la introducción de sitios de restricción *XbaI* en los extremos 3' y 5' de los fragmentos de PCR. La introducción de un sitio *XbaI* en el extremo 5' del fragmento de PCR que es sensible a la metilasa Dam del fondo de cepa protegerá este sitio de digestión de *XbaI* adicional. Para mantener la secuencia Shine Dalgarno 5' del gen de las construcciones derivadas pSG142 que contienen estos genes se utilizaron como plantilla. Utilizando el ADN plásmido aislado de las cepas huésped dam (tal como *E. coli* ET 12567 - McNeil *et al.*, (1992) Gene, 111, 61-68), los genes amplificados pueden ser aislados como fragmentos *XbaI*. Utilizando una cepa huésped con una metilasa Dam activa, tal como *E. coli* DH10B, estos fragmentos pueden ser clonados secuencialmente en casetes de genes. Esta técnica proporciona medios para construir casetes de genes de diferente longitud y diferente orden utilizando la misma estrategia una y otra vez. Una visión general de la estrategia aquí descrita y los casetes de genes aislados se representan en la figura. 18. En algunos casos, la expresión del gen terminal sorprendentemente fue mayor cuando el ácido nucleico que codifica una marca de histidina se fusionó con el extremo 3' del casete de genes.

65

Cuando se requiere más de un gen para introducirse y expresarse en las células huésped, muchas maneras se le ocurrirán fácilmente a la persona experta en la materia en cuanto a cómo puede lograrse este objetivo de una manera que se asegure que se coordinará la expresión de todos los productos de genes necesarios. Sin embargo, la presente

invención prevé además un nuevo procedimiento y casete de expresión para lograr este objetivo que, en una realización, permite que el montaje completo contiguo paso a paso de los genes de las vías individuales de azúcar, o de genes de modificación heterólogos, o de ambos tipos de genes, y, por tanto, no sólo los coloca en una única región de ADN bajo el control de un promotor común, sino que también facilita su manipulación genética juntos como una sola unidad o casete. Cada gen que forma parte del conjunto como un casete puede ser un gen natural o modificado, o versiones sintéticas de genes naturales, y estos genes naturales pueden obtenerse a partir de dicha célula huésped o pueden ser heterólogos con dicha célula huésped.

En consecuencia, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un casete de expresión que comprende uno o más genes de glicosiltransferasa y uno o más genes auxiliares, unidos operativamente bajo el control de un promotor. Como se describió anteriormente, los genes pueden ser auxiliares de los genes que codifican las proteínas involucradas en la biosíntesis de uno o más de los azúcares (una "gen de vía de azúcar") para permitir que una célula huésped transformada con el casete de expresión produzca una o varias fracciones de azúcar para su posterior transferencia a una plantilla de aglicona. Otros ejemplos de genes heterólogos auxiliares incluyen enzimas implicadas en el tratamiento de restos de azúcar o la plantilla de aglicona, ya sea antes o después de que la fracción de azúcar se transfiera a la aglicona mediante GT. Ejemplos de estas enzimas incluyen metiltransferasas y P450s que son responsables de la hidroxilación de la plantilla de aglicona. Preferentemente, los genes del casete están bajo el control de un solo promotor, preferentemente fuerte. Además, los presentes inventores han encontrado que la incorporación de una secuencia de ácido nucleico que codifica una marca de histidina adyacentes en (o inmediatamente 3') el gen terminal en el casete de expresión, de manera que se mejora la expresión de genes en el casete que es distal al promotor.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de un casete de expresión que comprende uno o más genes de glicosiltransferasa y uno o más genes auxiliares, comprendiendo el procedimiento vincular operativamente los genes juntos bajo el control de un promotor. El procedimiento podrá incluir la etapa adicional de la transformación de una célula huésped con el casete de expresión y la expresión de los genes comprendidos en el mismo para producir el GT y las proteínas codificadas mediante los genes auxiliares.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula huésped transformada con casete de expresión de este tipo.

Realizaciones de la presente invención se describen a modo de ejemplo y no como limitación con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1A: Esquema para el aislamiento de *S. erythaea* Δ orf14 que contiene una supresión 1247-bp en *eryB*: *tsr*, resistencia a la tioestreptona.

Figura 1B: Esquema para el aislamiento de la cepa de *S. erythaea* DM que contiene una supresión en *eryBV* y supresión 1191-BP *eryCIII tsr*, resistencia a la tioestreptona.

Figura 2: Estructura del plásmido de expresión pSG142. *EryRHS* denota un fragmento de ADN del flanco distal *ermE* de la agrupación de genes biosintéticos de eritromicina.

Figura 3: Esquema general para el cribado de la glicosiltransferasa clonada (glctr) por su capacidad para glicosilar agliconas *in vivo*.

Figura 4: Estructura de 3-O-ramnosil-eritronolido B + 3-O-ramnosil-6-deoxieritronolido B.

Figura 5A: Estructura de 5-O-desosaminiltilactona.

Figura 5B: Estructura de 5-O-glucosiltilactona.

Fig. 6: Vista general de los plásmidos pSGSpnI, pSGSpnK y pSGSpnH.

Fig. 6B: Comparación de ADN (arriba) y de aminoácidos (abajo) de la secuencia de *spnI/spnI* y la secuencia de acceso publicada AY007564. Los cambios incluidos en el nucleótido corregido y la secuencia de aminoácidos están subrayados.

Fig. 7: Análisis de *spnI* usando ADN cromosómico de SGT2pSGSpnI como plantilla.

Fig. 8: Análisis de *spnK* usando ADN cromosómico de SGT2pSGSpnK como plantilla.

Fig. 9: Análisis de *spnH* usando ADN cromosómico de SGT2pSGSpnH como plantilla.

ES 2 338 212 T3

Fig. 10: Análisis de los sobrenadantes de cultivo de SGT2 y SGT2pSGSpnI después de la alimentación de ramnosil-eritronolido B.

Fig. 11: Estructura de 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritronolido B.

Fig. 12: Análisis de los sobrenadantes de cultivo de SGT2 y SGT2pSGSpnK después de la alimentación con 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritronolido B.

Fig. 13: Vista general de los plásmidos pSGSpnHK y pSGSpnHKL.

Fig. 14: Estructura de 3-O-(2',3'-bis-O-metilramnosil) eritronolido B.

Fig. 15: Estructura de 3-O-(2',3',4'-tri-O-metilramnosil) eritronolido B.

Fig. 16: Estructuras de 3-O-ramnosil eritromicina-D (A), 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritromicina D (B) y 3-O-(2',3'-bis-O-metilramnosil) eritromicina D (C).

Fig. 17: Bioensayo de 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritromicina D y eritromicina A.

Fig. 18: Estrategia para aislar casetes de genes de *oleG2*, *spinI*, *spnH*, *spnK* y *eryCIII*.

Fig. 19: Resultados del análisis del sobrenadante de cultivo de SGT3pSGcasoleG2spnIspnK.

Fig. 20: Resultados del análisis del sobrenadante de cultivo de SGT3pSGcasoleG2spnIspnKeryCIII.

Figura 21: Estructuras de 8a-hidroxi-3-O-micarosil eritronolido B y 8,8a-epoxi-3-O-eritronolido micarosil B.

Figura 22: Estructuras de 8,8a-dehidro-6-deoxieritronolido B y 8-hidroxi-6-deoxieritronolido B.

Figura 23: Esquema para la construcción de casetes de genes y transformación en *S. erythraea*.

Figura 24: Estructuras de 3-O-ramnosil-8,8a-dehidro-6-deoxieritronolido B y 3-O-ramnosil-8,8a dihidroxi-6-deoxieritronolido B.

Figura 25: Secuencia de ADN de la región de inicio *oleG1* (número de acceso AJ002638).

Figura 26: Resultados de la complementación de la mutación de *eryCIII* en *S. erythraea* SGT2 y SGT2pSGO1eG1. 3-O-micarosil eritronolido B se alimentó a los cultivos tal como se describió anteriormente (Gaisser *et al.*, 2000). La presencia de 3-O-micarosil eritronolido B está indicada durante un máximo de un tiempo de retención de 20 min. El pico de un tiempo de retención de 15,7 y 734 m/z indica la presencia de la eritromicina A.

Figura 27: Resultados de la alimentación de 6-B deoxieritronolido a SGQ1, SGQ1pSGO1eG1, SGQ1pSGO1eG2 y SGQ1pSGO1eP. Las estructuras de los compuestos principales se indican.

Figura 28: Resultados de la alimentación de 3-O-ramnosil-6-B deoxieritronolido a SGQ1, SCrQ1pSGrO1eG1, SGQ1pSGO1eG2 y SGQ1pSGO1eP. Las estructuras de los compuestos principales se indican.

Figura 29: Estructura de 23-O-ramnosil-5-O-micaminosil-tilactona.

Figura 30: Estructura de 23-O-ramnosil-5-O-desosaminil-tilactona.

Figura 31: Estructura de 5-O-(2'-O)-bis-glucosilo tilactona.

Figura 32: Estructura de 5-O-micaminosil-eritromicina A y 5-O-micaminosil-4''-O-micarosil-eritromicina A.

Figura 33: Secuencia de genes *tylMI*, *tylM3* y *tylB*, mostrando 8 cambios de aminoácidos en *cylB* en comparación con la secuencia publicada.

Figura 34: Conjunto de casetes de genes en pUC18 para producir construcciones pUC18tyMiii-tylB y pUC 18ty-*MIII-tylB-tylMI*.

Figura 35: Mapas de restricción para pSGCIII, pSGTYLM2, pSGDESVII y pSGTYLCV.

Figura 36: Mapa de restricción de pGG1 plásmido.

Figura 37: Espectros de masas de los nuevos compuestos 5-O-micaminosil-eritromicina A y 3,5-di-O-micarosil-eritronolido B.

Materiales y procedimientos

Escherichia coli XL1-Blue MR (Stratagene) y *E. coli* DH10B (GibcoBRL) fueron cultivadas en medio 2xTY según lo descrito por Sambrook *et al.* (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2a Edición (1989) Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Press). Se obtuvieron vectores Litmus28 y pUC18 de New England Biolabs y vector pQE-16 de QIAGEN. El vector pIJ702 (Katz *et al.* J. Gen. Microbiol. (1983) 129:2703-2714) fue gentilmente proporcionado por DA Hopwood (John Innes Institute, Norwich, Reino Unido). El vector pUC2G que contiene un fragmento 6,2 kb *BGL/II* de cosAB35 clonado en pUC18 fue amablemente proporcionado por J. Salas (Universidad de Oviedo, España). El vector pLQD1 que contiene un fragmento de PvuII 5076 pb de cos25G8 cósmido clonado en pUC18 fue amablemente proporcionado por J. Salas (Universidad de Oviedo, España).

El cósmido nº 7 que ha sido aislado de una librería de cósmido *Streptomyces fradiae*, fue amablemente proporcionado por J. Cortés. Transformantes *E. coli* fueron seleccionados con 100 µg/ml de ampicilina. La cepa de variante roja *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 (Hessler *et al.* Appl. Microbiol. Biotechnol. (1997) 47:398-404) fue amablemente proporcionada por JM Weber y se mantiene de forma rutinaria en agar M1-102 (Kaneda *et al.* J. Biol. Chem. (1962) 237:322-327), R2T20 (Yamamoto *et al.* J. Antibiot. (1986) 34:1304-1313), R2T2 (igual que R2T (Weber *et al.* J. Bacteriol. (1985) 164:425-433), pero sin peptona), y TSB (Difco) de los cultivos líquidos a 30°C. Se utilizó *Bacillus subtilis* ATCC 6633 en los bioensayos para evaluar la producción de eritromicina tal como se describe (Gaisser *et al.* (1997), *supra*). Estos ensayos fueron modificados para investigar la producción de eritromicina después de la alimentación con eritronolido B o 3- α -micarosil-eritronolido B amablemente proporcionado por JM Michel (Hoechst Marion Roussel, Romainville, Francia). Ambos metabolitos (10 µl de 10 mm de solución de stock) se aplicaron a pozos de agar cortados en césped de *S. erythraea* y se incubaron a 30°C durante la noche tal como se describe (Gaisser *et al.* (1997) *supra*) y fue evaluado el desarrollo de las zonas de inhibición en el césped de *B. subtilis* alrededor de las colonias de *S. erythraea*. Se obtuvieron vectores de expresión en *S. erythraea* a partir del plásmido pCJR24 (Rowe *et al.* Gene (1998) 216:215-223). Fueron seleccionados plásmidos que contenían *S. erythraea* con 25 µg/ml de tioestreptona. Para investigar la producción de antibióticos, fueron cultivadas cepas de *S. erythraea* en medio de sacarosa succinato (Caffrey *et al.* (1992) FEBS Lett. 304:225-228) tal como se describe (Gaisser *et al.* (1997) *supra*) y las células fueron cosechadas por centrifugación. La tilactona fue amablemente proporcionada por B. Wilkinson, de Glaxo Group Research, Stevenage, Reino Unido. 150 µl de 100 mg/ml de solución de stock se añadieron a 500 ml de cultivo de expresión de *S. erythraea*.

Manipulación y secuenciación del ADN

Se realizaron procedimientos de manipulación de ADN, PCR y electroporación tal como se describe en Sambrook *et al.* (1989) *supra*. Los procedimientos de formación de protoplastos y transformación de *S. erythraea* fueron tal como se describe (Gaisser *et al.* (1997) *supra*). Se realizaron hibridaciones Southern con sondas marcadas con digoxigenina utilizando el equipo de etiquetado de ADN DIG (Boehringer Mannheim). La secuenciación del ADN se realizó mediante el procedimiento de Sanger *et al.* (P.N.A.S. USA (1977) 74:5463-5467), usando secuenciación automática de ADN en las plantillas ADN de doble cadena con un secuenciador 373A de Applied Biosystems. La secuencia de datos se analizó mediante los programas de Staden (Staden, R. Nucl. Acids Res. (1984) 12:521-528) y el paquete de software Genetics Computer Group (GCG, versión 10) (Devereux *et al.*, Nucl. Acids Res. (1984) 12:387-395).

Extracción y espectrometría de masas

10 ml de cada caldo de fermentación se centrifugaron y el pH del sobrenadante se ajustó a pH 9. El sobrenadante se extrajo dos veces con un volumen igual de acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se evaporó hasta secarse y, a continuación, se volvió a disolver en 0,3 ml de acetonitrilo/agua (1:1 v/v). Se realizó espectrometría de masas en un instrumento BioQ (Micromass, Manchester, Reino Unido) o Finnigan LCQ (Finnigan, CA). Fueron obtenidos espectros de alta resolución en un Bruker II BioApex FT-ICR (Bruker, Bremen, República Federal de Alemania).

Para análisis RMN, el caldo de bacterias fue centrifugado y el pH del sobrenadante se ajustó a un pH de aproximadamente 9. El sobrenadante se extrajo con tres volúmenes iguales de acetato de etilo, los extractos fueron combinados, secados (Na₂SO₄) y evaporados bajo presión reducida para dar un sólido amarillo. La purificación final se logró mediante HPLC preparativa de fase inversa en un sistema de Gilson 315, utilizando una columna Prodigy 21 mm x 250 mm ODS3 (Phenomenex, Macclesfield, Reino Unido). La fase móvil se bombeó con un caudal de 21 ml/min como sistema binario consistente en 45% CH₃CN, 55% 20 mM NH₄OAc [pH 5,5 con HCOOH] aumentando linealmente a 95% CH₃CN en 25 min.

Se adquirieron espectros ¹H de resonancia magnética nuclear (RMN) en 800 MHz en un Bruker Avance DRX800 y en 500 MHz en un Bruker Avance DRX500. Se adquirieron espectros ¹³C RMN a 100 MHz en un espectrómetro de Bruker Avance DRX400. Las muestras para el análisis de RMN se disolvieron en CD₃OD y los experimentos fueron realizados a 300 K. Se realizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un cromatógrafo Hewlett Packard HP 1100 líquido. Se obtuvieron espectros de espectrometría de masas de cromatografía de líquidos (LC-MS), espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y MSⁿ en una Finnigan MAT (San Jose, CA) LCQ. Se obtuvieron datos de alta resolución cuadrupolo de tiempo de vuelo MS/MS en un Macclesfield (Micromass, Reino Unido) QTOF. Se obtuvieron MSⁿ de alta resolución en un espectrómetro de masas de resonancia de ciclotrón de iones de transformada de Fourier Bruker Daltonics BioApex II 4.7 utilizando PEG como calibrador externo.

Supresión del cromosoma de *eryBV* (Fig. 1A)

El vector pNCO28 (Gaisser *et al.*, 1997) (Fig. 1A) fue digerido con *Xba*Enl/*Nhe*I y *Xba*Enl/*Spe*En, fueron aislados una banda de 3,8 kb y un fragmento de 0,4 kb, ligados y se transformaron en *E. coli* DH10B. Una construcción de vector pNCOΔ que contiene la supresión de *eryBV* fue aislado y el sitio de unión *Spe*I/*Nhe*I fue verificado por secuenciación. Después de la digestión con *BG*/II, el plásmido se ligó con *BG*/II pIJ702 cortado y se utilizó para transformar *E. coli* DH10B. pNCOΔpIJ702 plásmido fue aislado y se utilizó para transformar *S. erythraea* NRRL 2338 (variante roja). Las colonias fueron seleccionadas por su resistencia a la tioestreptona y la integración en el cromosoma fue confirmada mediante análisis southern. Para permitir el segundo evento de recombinación, los integrantes fueron subcultivados al menos cuatro veces en medio TSB (Difco) a 30°C. Se examinaron colonias aisladas para su sensibilidad a la tioestreptona y para la producción de eritromicina. La supresión cromosómica 1247 nt de *eryBV* se verificó mediante el uso del fragmento 1,5 kb *NCO* de pNCOΔ plásmido para investigar ADN cromosómico digerido con *Cla*I/*Pst*I y *Nco*I de la cepa de tipo salvaje y Δorf14 mutante. El análisis de la *S. erythraea* de tipo salvaje mostró la esperada banda 2,9 kb *Cla*I/*Pst*I y 2,7 kb *NCOI* después de la hibridación. Cuando el ADN cromosómico de Δorf14 fue tratado de manera similar, sólo se detectaron fragmentos de 1,6 kb *Cla*I/*Pst*I y 1,5 kb *NCOI*, lo que indica que *eryBV* habían sido retirado. El Δorf14 mutante fue probado en un bioensayo. No se observaron zonas de inhibición alrededor de las colonias de *S. erythraea* en el césped *B. subtilis* de, lo que indica que la eritromicina A no se produce por la cepa mutante.

20 Supresión cromosómica de *eryCIII* (Fig. 1B)

λSE55 plásmido (Haydock *et al.* Mol. Gen. Genet. (1991) 230:120-128) fue digerido con *Nco*I/*Xho*I (Fig. 1B) y un fragmento de 2,4 kb fue clonado en vector Litmus28 digerido con *Nco*I/*Xho*I. pLitNX plásmido fue aislado y su identidad verificada mediante digestión de restricción y por secuenciación. Usando λSE55 como plantilla y cebadores SG10 5'-GGCGATGTGCCAGCCCGCGAAGTT-3' y SG11 5'-AGCCGTCACCGGCCATGGTCTCGTCCGCATCT-3', un fragmento de 573 nt fue amplificado mediante PCR, tratado con polinucleótido quinasa T4 y clonado en *Sma*I pUC18 cortado. La secuencia fue marcada, y la construcción de este plásmido fue digerida con *Nco*I y un fragmento de 0,5 kb fue aislado, ligado a pLitNX digerido con *Nco*I y utilizado para transformar *E. coli* DH10B. pLitNXP plásmido fue aislado y se verificó la inserción correcta, mediante digestión de restricción y secuenciación, soportando una supresión en 1191 de NT *eryCIII*. La construcción pLitNXP fue digerida con *BGL*II y se ligó en pIJ702 tratado previamente con *BGL*II, y la mezcla se utiliza para transformar *E. coli* DH10B. pLitNXPII plásmido fue aislado y se utiliza para transformar *S. erythraea* Δorf14 mutante tal como se describe. La integración fue verificada mediante hibridación Southern. Después de su subcultivo, las colonias aisladas fueron examinadas para su sensibilidad a la tioestreptona tal como se describe anteriormente. Las colonias sensibles a la tioestreptona fueron cultivadas en pequeños parches y pedazos de agar tomadas de las zonas cultivadas y se colocaron en placas de bioensayo que contenían alfa-3-microssil-eritronolido B. No se observó ninguna zona de inhibición alrededor de las colonias aisladas de la cepa de *S. erythraea* DM (Δorf14Δorf8). La supresión cromosómica NT 1247 se verificó en hibridaciones Southern blot tal como se describe para la Δorf14 mutante. La supresión de *eryCIII* cromosómico 1191 nt se verificó mediante un fragmento de ADN marcado con digoxigenina 573 nt, amplificado mediante los cebadores SG10 y SG11, para sondear la cepa de ADN cromosómico de tipo salvaje digerida con *Nco*I y *Cla*I/*BGL*II y DM mutante (Δorf14Δorf8). El análisis de la *S. erythraea* de tipo salvaje mostró las bandas esperadas 1,7 kb *Nco*I y 12,4 kb *Bg*/II, después de la hibridación. Cuando el ADN cromosómico de DM fue tratado de manera similar, sólo se detectó un fragmento de 11 kb *Bg*/II y 0,5 kb *Nco*I que indica que se ha eliminado 1,2 kb del gen *eryCIII*.

45 Supresión cromosómica de *eryA*

Para permitir la alimentación de diferentes agliconas a una cepa mutante de *S. erythraea* que aloja genes heterólogos de glicosiltransferasa, la supresión de *eryA* anteriormente descrita para JC2/De160 (Rowe *et al.* (1998) *supra*) se introdujo también en la cepa mutante de *S. erythraea* DM. *S. erythraea* SGT2 fue aislado (Fig. 2) y las tres supresiones (*DeryADBVD*CIII) fueron verificadas mediante análisis Southern blot. Caldos de cultivo de *S. erythraea* SGT2 fueron analizados mediante espectrometría de masas de electropulverización. No se encontraron picos correspondientes a eritromicina A, o metabolitos de precursores.

55 Construcción de plásmido de expresión para *eryBV*

El gen *eryBV* fue amplificado por PCR usando los cebadores 1518 5'-GGGGGATCCCATATGCGGGTACTGCTGACGTCCTTCG-3' y 1519 5'-GAAAAGATCTGCCGGCGTGGCGGCGCGTGAGTTCCTC-3', que introducen un sitio *Bam*HI y *Nde*I sitio en el extremo 5' y un sitio *BG*/II, en el extremo 3' de *eryBV*. Después del tratamiento con polinucleótido quinasa T4, el producto de PCR se clonó en *Sma*I pUC18 cortado y el consiguiente plásmido fue utilizado para transformar *E. coli* DH10B. La secuencia de *eryBV* en el plásmido aislado fue marcada, y este plásmido fue digerido utilizando las enzimas de restricción *Bam*HI y *BG*/II, un fragmento de 1,2 kb fue aislado y se ligó en el fragmento de manera idéntica al vector digerido de pQE-16, que introduce un terminal C de marca His₆ en *EryBV*. El pQE-16 plásmido obtenido se digirió con *Nde*I y *Xba*I y un fragmento de 2,2 kb fue aislado y se ligó en el vector pCJR24 previamente cortado con *Nde*I y *Xba*I, para dar el pSG2414 plásmido. Para permitir la recombinación de este plásmido en el genoma de *S. erythraea*, un fragmento de 1,7 kb *NCOI* de cos6B cósmido (Gaisser *et al.* (1997) *supra*) del flanco distal *ermE* de la agrupación biosintética de eritromicina (Pereda *et al.* Gene (1997) 193:65-71) fue aislado y clonado en el sitio *NCOI* derivado de pQE-16. Esta construcción final fue nombrada pSG142.

ES 2 338 212 T3

Construcción de plásmido de expresión para *eryCIII*

Para la expresión de *eryCIII*, cebadores SG14 5'-GAAAAGATCTTCGTGGTTCTCTCCTTCCTGCGGCCAG-3' y SG15 5'-GGGGGATCCCATATGCGCGTCGTCTTCTCCTCCAT-3' se utilizaron para amplificar *eryCIII* con λ SE55 como plantilla. El fragmento de ADN de 1287 pb fue aislado, tratado con polinucleótido quinasa T4 y clonado en *SmaI* pUC18 cortado. Después de la transformación en *E. coli* DH10B, la construcción fue aislada y la secuencia de *eryCIII* fue verificada. Después de la digestión con *NdeI/BGLII*, el fragmento de 1,2 kb fue aislado, ligado con el fragmento del vector pSG142 digerido con *NdeI/BGLII* y usado para transformar *E. coli* DH10B. El pSGCIII plásmido fue aislado.

Construcción del plásmido de expresión para *oleG2*

Para la expresión de la *oleG2*, los cebadores Ole3 5'-GGCGGATCCCATATGCGCGTACTGCTGACCTGCTTCG CC-3' y Ole4 5'-CCAGATCTGCCCGCATGGTTCCCGCTCCTCGTCC-3' se utilizaron para amplificar *oleG2* utilizando pUC2G plásmido o ADN cromosómico de *Streptomyces antibioticus* como plantilla. El fragmento de la PCR fue aislado, tratado con polinucleótido quinasa T4 y clonado en *SmaI* pUC18 cortado. Después de la transformación en *E. coli* DH10B, la construcción fue aislada y la secuencia de *oleG2* fue verificada. Después de la digestión con *NdeI/BGLII*, el fragmento de 1,3 kb fue aislado, ligado con el fragmento de vector de pSG142 digerido con *NdeI/BGLII* y usado para transformar *E. coli* DH10B. pSGOLEG2 plásmido fue aislado.

Construcción de plásmido de expresión para *tylM2*

Para la expresión de *tylM2* (Gandecha *et al.* Gene (1997) 184:197-203) los cebadores Tyl1 5'-GTGGAGATCTCCT TTCCGCGCGGATCGGGACCG-3' y Tyl2 5'-GGGGGATCCCATATGCGGGTACTGCTGACCTGTATCG-3' se utilizan para amplificar *tylM2* usando el cósmido n° 7 como plantilla o ADN cromosómico de *Streptomyces fradiae*. El cebador Tyl2 fue elegido sobre la base de la comparación de secuencias de glucosiltransferasas conocidas, lo que indica la metionina en la posición 21 de la secuencia publicada (adhesión n° X81885) para el codón de inicio. Los cambios en la secuencia de ADN de *tylM2* señalados en una actualización reciente (X81885/Junio 1999) se confirmaron de forma independiente en este trabajo. El fragmento de PCR de ADN fue aislado, tratado con polinucleótido quinasa T4 y clonado en *SmaI* pUC18 cortado. Después de la transformación en *E. coli* DH10B, la construcción fue aislada y la secuencia de *tylM2* fue verificada. Después de la digestión con *NdeI/BGLII*, el fragmento de 1,3 kb fue aislado, ligado con el fragmento de vector de PSG II digerido con *NdeI/BGLII* y utilizado para transformar *E. coli* DH10B. Plásmido pSGTYLM2 fue aislado.

Construcción de plásmido de expresión para *desVII*

Para la expresión de *desVII* (Xue *et al.*, (1998) P.N.A.S. USA, 95:12111-12116) los cebadores Pik1 5'-GGAG GATCCCATATGCGCGTCTGCTGACCTCGTTCG-3' y Pik2 5'-GGGGTGCAGATCTGTGCCGGGCGTCCGCC GGCGGG-3' se utilizaron para amplificar *desVII* utilizando el ADN genómico de *Streptomyces venezuelae* como plantilla. El fragmento de PCR de ADN fue aislado, tratado con polinucleótido quinasa T4 y clonado en *SmaI* pUC18 cortado. Después de la transformación en *E. coli* DH10B, la construcción fue aislada y la secuencia de *desVII* fue verificada. Después de la digestión con *NdeI/BGLII*, un fragmento de 1,3 kb fue aislado, ligado con el fragmento de vector pSG142 digerido con *NdeI/BGLII* y usado para transformar *E. coli* DH10B. Plásmido pSGDESVII fue aislado.

Construcción de plásmido de expresión para *tylH*

Para la expresión de *tylH* (Fouces *et al.*, Microbiología, (1999) 145:855-868) los cebadores TylH1 5'-CCGCCCCG CCCAGATCTCCGCGGCCCTCATGCGT-3' y TylH2 5'-TTGAGGCCGACGACATATGTCCTCGTCCGGGGA-3' se utilizaron para amplificar *tylH* utilizando ADN genómico de *Streptomyces fradiae* como plantilla. El fragmento de PCR de ADN fue aislado, tratado con polinucleótido quinasa T4 y clonado en *SmaI* pUC18 cortado. Después de la transformación en *E. coli* DH10B, la construcción fue aislada. Después de la digestión con *NdeI/BGLII*, un fragmento de 1,6 kb fue aislado, ligado con el fragmento de vector pSG142 digerido con *NdeI/BGLII* y usado para transformar *E. coli* DH10B. Plásmido pSGTYLH1 fue aislado.

Construcción de plásmido de expresión para *tylN*

Para la expresión de la *tylN* (Fouce *et al.* 1999) los cebadores Tyl5 5'-GGGCATATGCGCATAGCGTTGCTGAC CATGGGCT-3' y Tyl4 5'-GGCCAGATCTGCCGGGGGTGTGTGCCGTGGTCCGGG-3' se utilizaron para amplificar *tylN* utilizando el ADN genómico de *Streptomyces fradiae* como plantilla. El fragmento de PCR de ADN fue aislado, tratado con polinucleótido quinasa T4 y clonado en *SmaI* pUC18 cortado. Después de la transformación en *E. coli* DH10B, la construcción fue aislada. Después de la digestión con *NdeI/BGLII*, un fragmento de 1,3 kb fue aislado, ligado con el fragmento de vector pSG142 digerido con *NdeI/BGLII* y usado para transformar *E. coli* DH10B. Plásmido pSGTYLN fue aislado.

Construcción de plásmidos de expresión, para *tylH* y *tylN*

pSGTYLH plásmido fue digerido con *BGLII* y pSGTYLN fue digerido con *AflIII/NheI*. Los fragmentos fueron sometidos a reacciones de relleno de polimerasa Klenow (Sambrook *et al.* (1989) *supra*). El vector de pSGTYLH

ES 2 338 212 T3

derivado de ADN fue aislado y ligado con el fragmento de 1,5 kb que codifica TylN. *E. coli* DH10B se transformó con la mezcla de ligación. Plásmido pSGTYLHN fue aislado.

Construcción de plásmido de expresión para *oleD*

5 Para la expresión de *oleD* (Hernández *et al.* Gene (1993) 134:139-140) los cebadores OleD1 5'-CCGGATCCCA TATGACCACCCAGACCACTCCC GCCCACATC-3' y OLE2 5'-CGAGATCTCAAAGCGGATCTCTGCCGGTC GGAACGGA-3' se utilizaron para amplificar *oleD* utilizando pLQD 1 (Luis M. Quirós) o el ADN cromosómico de *Streptomyces antibioticus* como plantilla. El fragmento de PCR de ADN fue aislado, tratado con polinucleótido
10 quinasa T4 y clonado en *Sma*I pUC18 cortado. Después de la transformación en *E. coli* DH10B, la construcción fue aislada. Después de la digestión con *Nde*EnLBGIII, el fragmento de 1,3 kb fue aislado, ligado con el fragmento de vector pSG142 digerido con *Nde*I/BgIII y usado para transformar *E. coli* DH10B. Plásmido pSGOLE2 fue aislado.

Aislamiento de 3-O-ramnosil-eritronolido B y 3-O-ramnosil-6-deoxi-eritronolido B

15 El pSGOLE2 plásmido se transformó en células mutantes DM de *S. erythraea* y los caldos de cultivo de las cepas transformadas se analizaron tal como se describe en Gaisser *et al.* (1997) y en Gaisser *et al.* (1998). El análisis de la *S. erythraea* DM mutante (pSGOLE2) mediante espectroscopia de masas de electropulverización reveló la presencia de dos nuevos picos distintos, en m/z 555 y 571, respectivamente, que no estaban presentes en el caldo de cultivo de la cepa DM *S. erythraea* examinada en las mismas condiciones de crecimiento, extracción y análisis. Experimentos
20 MS/MS revelaron que el ión con m/z 571 fragmentado en un ión con m/z 425 (correspondiente a la sal de sodio de eritronolido B, EB-Na⁺) correspondiente a la pérdida de m/z 146 (ramnosa). El patrón de fragmentación de los iones m/z 555 era idéntico al del fragmento m/z 571, pero cambió a la baja en 16 unidades de masa, lo que indica que falta un grupo hidroxilo. Esto se evidencia que el compuesto con m/z 555, que representa ramnosil-6-deoxieritronolido B. Para confirmar estas estructuras, se utilizaron 1,5 litros de caldo de cultivo para purificar 4,6 mg de 3-O-ramnosil-eritronolido B y 2,7 mg de 3-O-ramnosil-6-deoxieritronolido B. Ambos compuestos fueron analizados y las estructuras se vieron plenamente confirmadas por ¹H y ¹³C RMN.

TABLA 1

Datos de ¹HNMR para 3-O-ramnosil-eritronolido B

| Protón | δ_H | multiplicidad | acoplamiento |
|-------------------|------------|---------------|---------------|
| 2-H | 2,84 | dq | 10,4, 6,8 |
| 3-H | 3,71 | d | 10,4 |
| 4-H | 2,16 | dd | 7,4, 3,6 |
| 5-H | 3,52 | d | 3,6 |
| 7-H _a | 1,94 | dd | 14,7, 10,3 |
| 7-H _b | 1,43 | dd | 14,7, 2,6 |
| 8-H | 2,70 | m | |
| 10-H | 3,03 | qd | 6,9, 1,7 |
| 11-H | 3,96 | dd | 9,7, 1,5 |
| 12-H | 1,65 | qd | 9,7, 7,1 |
| 13-H | 5,44 | ddd | 9,7, 4,4, 0,6 |
| 14-H _a | 1,71 | m | |
| 14-H _b | 1,49 | m | |

ES 2 338 212 T3

| Protón | δ_H | multiplicidad | acoplamiento |
|-------------------|------------|---------------|--------------|
| 15-H ₃ | 0,88 | dd | 7,4, 7,4 |
| 16-H ₃ | 1,20 | d | 6,8 |
| 17-H ₃ | 1,02 | d | 7,4 |
| 18-H ₃ | 1,30 | s | |
| 19-H ₃ | 1,13 | d | 7,1 |
| 20-S ₃ | 0,96 | d | 6,8 |
| 21-H ₃ | 0,94 | d | 7,1 |
| 1'-H | 4,88 | d | 1,9 |
| 2'-H | 3,94 | dd | 3,2, 1,9 |
| 3'-H | 3,64 | dd | 9,5, 3,2 |
| 4'-H | 3,42 | dd | 9,5,9,5 |
| 5'-H | 3,85 | dq | 9,5, 6,2 |
| 6'-H ₃ | 1,28 | d | 6,2 |

TABLA 2

Datos de ¹³C RMN para 3-O-ramnosil-eritronolido B

| Carbono | δ_c |
|---------|------------|
| C1 | 175,4 |
| C2 | 44,3 |
| C3 | 87,5 |
| C4 | 36,1 |
| C5 | 80,6 |
| C6 | 74,4 |
| C7 | 36,3 |
| C8 | 44,7 |

ES 2 338 212 T3

| | Carbono | δ_c |
|----|---------|------------|
| 5 | C9 | 219,9 |
| | C10 | 39,3 |
| 10 | C11 | 69,5 |
| | C12 | 39,8 |
| 15 | C13 | 74,5 |
| | C14 | 25,5 |
| 20 | C15 | 9,3 |
| | C16 | 14,5 |
| 25 | C17 | 7,6 |
| | C18 | 16,4 |
| 30 | C19 | 17,4 |
| | C20 | 8,1 |
| | C21 | 8,1 |
| 35 | C1' | 103,0 |
| | C2' | 70,8 |
| 40 | C3' | 70,7 |
| | C4' | 72,2 |
| 45 | C5' | 69,3 |
| | C6' | 16,5 |

50

TABLA 3

55

Datos de $^1\text{HNMR}$ para 3-O-ramnosil-6-deoxieritronolido B

60

| Protón | δ_H | multiplicidad | acoplamiento |
|--------|------------|---------------|--------------|
| 2-H | 2,90 | m | |
| 3-H | 3,69 | m | |

65

ES 2 338 212 T3

| | Protón | δ_H | multiplicidad | acoplamiento |
|----|--------------------|------------|---------------|--------------|
| 5 | 4-H | 1,66 | m | |
| | 5-H | 3,52 | d | 8,7 |
| 10 | 6-H | 1,63 | m | |
| | 7-H _{un} | 1,89 | m | |
| 15 | 7-H _b | 0,96 | m | |
| | 8-H | 2,68 | m | |
| 20 | 10-H | 2,89 | m | |
| | 11-H | 3,75 | dd | 10,0, 1,8 |
| 25 | 12-H | 1,69 | m | |
| | 13-H | 5,25 | dd | 9,1, 4,5 |
| 30 | 14-H _{un} | 1,78 | m | |
| | 14-H _b | 1,53 | m | |
| 35 | 15-H ₃ | 0,92 | dd | 9,4, 9,4 |
| | 16-H ₃ | 1,97 | d | 6,8 |
| 40 | 17-H ₃ | 1,07 | d | 6,9 |
| | 18-H ₃ | 1,17 | d | 6,8 |
| 45 | 19-H ₃ | 1,11 | d | 6,6 |
| | 20-S ₃ | 1,24 | d | 6,9 |
| 50 | 21-H ₃ | 0,91 | d | 7,0 |
| | 1'-H | 4,79 | d | 1,6 |
| 55 | 2'-H | 3,97 | d | 3,2, 1,8 |
| | 3'-H | 3,61 | dd | 9,6, 3,2 |
| 60 | 4'-H | 3,42 | dd | 9,6, 9,6 |
| | 5'-H | 3,69 | dq | 9,6, 6,2 |
| 65 | 6'H ₃ | 1,28 | d | 6,2 |

ES 2 338 212 T3

TABLA 4

Datos de ^{13}C RMN para 3-O-ramnosil-6-deoxieritronolido B

| Carbano | δ_c |
|---------|------------|
| C1 | 177,0 |
| C2 | 42,6 |
| C3 | 83,1 |
| C4 | 41,5 |
| C5 | 76,4 |
| C6 | 36,2 |
| C7 | 33,6 |
| C8 | 44,4 |
| C9 | 213,3 |
| C10 | 44,9 |
| C11 | 70,0 |
| C12 | 40,9 |
| C13 | 76,0 |
| C14 | 25,2 |
| C15 | 5,9 |
| C16 | 13,8 |
| C17 | 8,5 |
| C18 | 19,5 |
| C19 | 14,8 |
| C20 | 14,1 |
| C21 | 8,3 |
| C1' | 103,0 |

ES 2 338 212 T3

| | Carbono | δ_c |
|----|---------|------------|
| 5 | C2' | 70,6 |
| | C3' | 70,8 |
| 10 | C4' | 72,2 |
| | C5' | 69,4 |
| 15 | C6' | 16,6 |

20 Construcción de plásmido de expresión para *spnI*

El gen *spnI* fue amplificado mediante PCR usando los cebadores SpnI1 5'-CTTCATATGAGTGAGATCGCAGTT GCCCCCTGGTTCG-3' y SpnI2 5'-AACAGATCTGCCGCCCTCGACGCCGAGCGCTTGCC-3', que introducen un sitio *NdeI* en el extremo 5' y un sitio *BGI*, en el extremo 3' de *spnI*. ADN cromosómico de *Spinosa Saccharopolyspora* fue utilizado como plantilla. Después del tratamiento con polinucleótido quinasa T4, el producto de PCR se clonó en pUC18 cortado *SmaI* y el plásmido resultante se utiliza para transformar *E. coli* DH10B. La secuencia de *spnI* en el plásmido aislado fue marcada, y este plásmido fue digerido utilizando las enzimas de restricción *NdeI* y *BGLII*. Un fragmento de 1,2 kb fue aislado y se ligó en el fragmento del vector digerido de manera idéntica de pSG142, que introdujo una marca His₆ de terminal C en *spnI*. Esta construcción final fue nombrada pSGSpnI (fig. 6). Se detectaron diferencias con la secuencia de ADN de acceso publicada AY007564 (Fig. 6B).

35 Construcción de plásmido de expresión para *spnK*

Para la expresión de *spnK*, se utilizaron cebadores SpnK1 5'-TCATCCATATGTCCACAACGCACGAGATCGAA ACCGT-3' y SpnK2 5'-TCTGCAGATCTCTCGTCCTCCGCGCTGTTACGTCGGCCA-3' para amplificar *spnK* con el ADN de los cromosomas de *Spinosa Saccharopolyspora* como plantilla. El fragmento de ADN de 1,2 kb fue aislado, tratado con polinucleótido quinasa T4 y clonado en *SmaI* cortado pUC18. Después de la transformación en *E. coli* DH10B, la construcción fue aislada y la secuencia de *spnK* fue verificada. Después de la digestión con *NdeI/BGI*, el fragmento de 1,2 kb fue aislado, ligado con el fragmento de vector de *NdeI/BGLII* digerido pSG142 y se usó para transformar *E. coli* DH10B. El plásmido pSGSpnK fue aislado (Fig. 6). Una marca His₆ de terminal C se introdujo en *spnK*.

45 Construcción de plásmido de expresión para *spnH*

Para la expresión de *spnH*, se utilizaron cebadores SpnH1 5'-TTCTAGAGATCTACCACAACCTGGTATTCGTG GAGAA-3' y SpnH2 5'-AACATATGCCCTCCAGAACGCGCTGTACCTGG-3' para amplificar *spnH* utilizando ADN cromosómico de *Spinosa Saccharopolyspora* como plantilla. El fragmento de PCR fue aislado, tratados con polinucleótido quinasa T4 y clonado en *SmaI* pUC18 cortado. Después de la transformación en *E. coli* DH10B, la construcción fue aislada y la secuencia de *spnH* fue verificada. Después de la digestión con *NdeI/BGLII*, el fragmento de 0,9 kb fue aislado, ligado con el fragmento de vector de *NdeI/BGLII* digerido pSG142 y usado para transformar *E. coli* DH10B. El plásmido pSGSpnH fue aislado (Fig. 6).

55 Aislamiento de las cepas de bioconversión SGT2pSGSpnI, SGT2pSGSpnK y SGT2pSGSpnH

Saccharopolyspora erythraea SGT2 (Gaisser *et al.* 2000) fue transformada con las construcciones de plásmido pSGSpnI, pSGSpnK y pSGSpnH. Los transformantes fueron verificados aislando el ADN cromosómico seguido por análisis de PCR. Los productos de PCR fueron evaluados mediante digestiones de restricción y el patrón de los fragmentos de ADN para *SPNI*, *spnK* y *spnH* fue el esperado (Fig. 7, 8 y 9).

Preparación de 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritronolido B

Se realizaron experimentos de alimentación usando 3-O-ramnosil-eritronolido (Gaiser *et al.* 2000) tal como se describe (Gaisser *et al.* 1997). Los cultivos de las cepas SGT2 y SGT2pSGSpnI fueron alimentados con 3-O-ramnosil-B eritronolido, se incubaron a 30°C durante 3 a 5 días y se analizaron mediante espectrometría de masas electropulvera-

ES 2 338 212 T3

ción (Fig. 10). Un nuevo pico era visible en los sobrenadantes de SGT2pSGSpnI con un tiempo de retención de 17,5 minutos y m/z 545 ($[M-H_2O]H^+$) y m/z 585 ($[M]Na^+$).

5 Aislamiento de 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritronolido B

1 l de sobrenadante de cultivo DMpSGOleG2 que contiene 3-O-ramnosil-eritronolido B fue esterilizado por filtración y alimentado a los cultivos de SGT2pSGSpnI utilizando técnicas microbiológicas estándar tal como se describe anteriormente. El nuevo compuesto con el tiempo de retención de 17,5 minutos y m/z 545 ($[M-H de_2O] W$) y m/z 585 ($[M]Na^+$) fue aislado a partir del sobrenadante de estos cultivos tal como se describió previamente (Gaisser *et al.*, 2000). El nuevo compuesto se caracteriza como 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritronolido B (Fig. 11).

TABLA 5

Datos de 1H y $^{13}CNMR$ para 3-O-(2'-O-metilramnosil)eritronolido B

| Posición | δ_n | Multiplicidad | Acoplamiento | δ_c |
|----------|------------|---------------|--------------|------------|
| 1 | | | | 176,8 |
| 2 | 2,85 | Dq | 10,2, 7,0 | 45,9 |
| 3 | 3,75 | d | 10,6 | 88,9 |
| 4 | 2,15 | m | | 37,8 |
| 5 | 3,51 | d | 3,9 | 81,8 |
| 6 | | | | 75,8 |
| 7 | 1,93 | dd | 14,5, 10,2 | 37,9 |
| | 1,43 | dd | 14,5, 2,7 | |
| 8 | 2,71 | m | | 46,2 |
| 9 | | | | 220,8 |
| 10 | 3,04 | m | | 40,9 |
| 11 | 3,96 | dd | 10,4, 1,6 | 71,0 |
| 12 | 1,65 | m | | 41,3 |

ES 2 338 212 T3

| Posición | δ_n | Multiplicidad | Acoplamiento | d_c |
|----------|------------|---------------|--------------|-------|
| 13 | 5,44 | dd | 9,8, 4,7 | 76,1 |
| 14 | 1,73 | m | | 27,1 |
| | 1,49 | m | | |
| 15 | 0,88 | dd | 7,4, 7,4 | 10,8 |
| 16 | 1,21 | d | 7,0 | 16,1 |
| 17 | 1,01 | d | 7,4 | 9,1. |
| 18 | 1,33 | S | | 26,6 |
| 19 | 1,13 | d | 7,0 | 19,0 |
| 20 | 0,96 | d | 6,7 | 9,6 |
| 21 | 0,94 | d | 7,0 | 9,7 |
| 1' | 4,93 | d | 1,4 | 100,8 |
| 2' | 3,54 | dd | 3,3, 1,7 | 82,3 |
| 3' | 3,68 | dd | 9,4, 3,2 | 72,1 |
| 4' | 3,34 | dd | 9,4, 9,4 | 73,9 |
| 5' | 3,82 | Dq | 9,4, 6,3 | 70,7 |
| 6' | 1,25 | d | 6,3 | 17,9 |
| 7' | 3,44 | s | | 59,1 |

Alimentación de 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritronolido B

3-O-ramnosil-eritronolido B se alimentó a los cultivos de SGT2pSGSpnI seguido de una incubación a 30°C. Los sobrenadantes que contienen 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritronolido B fueron centrifugados, esterilizados por filtración y se agregaron a los cultivos de las cepas SGT2 y SGT2pSGSpnK utilizando técnicas microbiológicas estándar. Después de la incubación a 30°C durante varios días, los sobrenadantes fueron analizados por espectrometría de masas electropulverización (Fig. 12). Un nuevo máximo con un tiempo de retención de 20,7 minutos y m/z de 559 ([M-H₂O] H⁺) y m/z de 599 ([M]Na⁺) se detectó, que indica la presencia de 3-O-(2',3'-bis-O-metilramnosil) eritronolido B en el sobrenadante del cultivo de la cepa SGT2pSGSpnK. Para preparar una cantidad suficiente de este nuevo compuesto para el análisis de RMN, se aisló pSGSpnKH plásmido.

Construcción de plásmido de expresión pSGSpnIKH

Un plásmido de expresión que contiene ambos genes, *spnH* y *spnK*, fue aislado después de la digestión de pSGSpnH plásmido con BGLII y de aislar el ADN del vector. El plásmido pSGSpnK fue digerido con AflIII/NheI y la banda de 1,5 kb de ADN fue aislada. Se realizaron reacciones de relleno utilizando el ADN de fragmentos aislados, tal como se describe en Sambrook *et al.* 1989, seguido por la ligadura y la transformación de *E. coli* DH10B. El plásmido pSGSpnHK fue aislado (Fig. 13). El plásmido pSGSpnHK fue digerido con XbaI y se aisló el DNA del vector. El plásmido pSGSpnI fue digerido con AflIII NheI y la banda de 1,5 kb de ADN fue aislada. Se realizaron reacciones de relleno utilizando el ADN de fragmentos aislados, tal como se describe en Sambrook *et al.* 1989, seguido de la ligadura y la transformación de *E. coli* DH10B. El plásmido pSGSpnIKH fue aislado (Fig. 13) y se transformó *S. erythraea* SGT2.

Preparación de 3-O-(2,3'-bis-O-metilramnosil) eritronolido B

1 l de sobrenadante de cultivo DMpSGOleG2 que contiene 3-O-ramnosil-eritronolido B fue esterilizado por filtración y se alimentó a los cultivos de SGT2pSGSpnIKH utilizando técnicas microbiológicas estándar. El nuevo compuesto se aisló en el sobrenadante de estos cultivos y se analizó mediante RMN utilizando los procedimientos descritos para la preparación de 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritronolido B. El nuevo compuesto se caracteriza como 3-O-(2',3'-bis-O-metilramnosil) eritronolido B (Fig. 14).

ES 2 338 212 T3

TABLA 6

Datos ¹H y ¹³C NMR para 3-O-(2';3'-bis-O-metilramnosil) eritronolido B

| Posición | δ_H | Multiplicidad | Acoplamiento | δ_c |
|----------|------------|---------------|-----------------|------------|
| 1 | | | | 175,3 |
| 2 | 2,87 | dq | 10,2, 6,8 | 44,4 |
| 3 | 3,37 | br.d | 10,2 | 87,5 |
| 4 | 2,15 | qdd | 7,3, 3,9, 0,9 | 36,3 |
| 5 | 3,51 | d | 3,8 | 80,4 |
| 6 | | | | 74,4 |
| 7 | 1,93 | dd | 14,8, 10,4 | 36,4 |
| | 1,44 | dd | 14,7, 2,7 | |
| 8 | 2,71 | dqd | 13,1, 7,1, 2,8 | 44,7 |
| 9 | | | | 219,3 |
| 10 | 3,04 | qd | 6,8, 1,7 | 39,4 |
| 11 | 3,97 | dd | 10,2, 1,7 | 69,6 |
| 12 | 1,65 | dqd | 10,4, 7,2, 0,9 | 39,8 |
| 13 | 5,44 | ddd | 9,8, 4,7, 0,9 - | 74,7 |
| 14 | 1,72 | ddq | 14,0, 9,6, 7,3 | 25,6 |
| | 1,50 | dqd | 14,0, 7,5, 4,6 | |
| 15 | 0,88 | dd | 7,4, 7,4 | 9,4 |
| 16 | 1,23 | d | 6,9 | 14,6 |
| 17 | 1,03 | d | 7,4 | 7,7 |
| 18 | 1,34 | s | | 25,1 |
| 19 | 1,14 | d | 7,1 | 17,5 |
| 20 | 0,96 | d | 6,8 | 8,2 |
| 21 | 0,94 | d | 7,1 | 8,2 |
| 1' | 4,95 | d | 1,7 | 99,5 |
| 2' | 3,75 | dd | 3,2, 1,9 | 76,8 |
| 3' | 3,37 | dd | 9,4, 3,0 | 80,5 |

ES 2 338 212 T3

| Posición | δ_H | Multiplicidad | Acoplamiento | δ_C |
|----------|------------|---------------|--------------|------------|
| 4' | 3,43 | dd | 9,4, 9,4 | 71,3 |
| 5' | 3,85 | dq | 9,4, 6,4 | 69,3 |
| 6' | 1,26 | d | 6,2 | 16,5 |
| 7' | 3,45 | s | | 57,6 |
| 8' | 3,48 | s | | 56,5 |

Un pequeño pico con m/z 613 fue detectado y el análisis MS/MS indicó que este pico representa 3-O-(2',3',4'-tri-O-metilramnosil) eritronolido B (Fig. 15).

Formación de 3-O-ramnosileritromicinas y 3-O-ramnosil-6-deoxieritromicinas

El pSGCIII plásmido se transformó en células de *S. erythraea* SGT2 para producir SGT2 de cepa mutante, pSGCIII y los caldos de cultivo de la cepa transformada se analizaron tal como se describe en Gaisser *et al.* (1997) y en Gaisser *et al.* (1988). Los sobrenadantes de los caldos de cultivo de *S. erythraea* DM mutante (pSGOLEG2) que contiene 3-O-ramnosil-eritronolido B fueron alimentados a las células SGT2pSGCIII. El análisis de los sobrenadantes utilizando espectrometría de masas de electropulverización reveló la presencia de un nuevo pico en m/z 706 correspondiente a 3-O-ramnosil-eritromicina D.

Ambos compuestos fueron aislados utilizando un enfoque de casete de gen tal como se describe a continuación.

Aislamiento de 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritromicinaD

1 l de sobrenadante de cultivo DMpSGOleG2 que contenía 3-O-ramnosil-eritronolido B fue esterilizado por filtración y se alimentó a los cultivos de SGT2pSGSpnI utilizando técnicas microbiológicas estándar. El sobrenadante del cultivo se analizó para 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritronolido B y se extrajo tal como se describe en Materiales y Procedimientos. El extracto crudo se disolvió en 1 ml de metanol y se añadió a los cultivos de SGT2pSGeryCIII seguido de una incubación a 30°C durante cuatro días. El sobrenadante fue analizado y un pico mayor en m/z 720 fue detectado. El nuevo compuesto se analizó utilizando los mismos procedimientos descritos para la preparación de 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritronolido B. El nuevo compuesto se identificó como 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritromicina D (Fig. 16B).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 338 212 T3

TABLA 7

Datos ¹H y ¹³C de RMN para 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritromicina D

| Posición | δ_H | Multiplicidad | Acoplamiento | δ_c |
|----------|------------|---------------------|----------------|------------|
| 1 | | | | 175,9 |
| 2 | 2,93 | dq | 9,4, 7,3 | 44,6 |
| 3 | 4,19 | d | 9,0 | 82,1 |
| 4 | 2,16 | m | | 39,4 |
| 5 | 3,59 | se superpone con 2' | | 83,7 |
| 6 | | | | 73,8 |
| 7 | 1,99 | dd | 14,9, 8,5 | 37,7 |
| | 1,54 | dd | 14,9, 4,7 | |
| 8 | 2,80 | m | | 42,8 |
| 9 | | | | 218,7 |
| 10 | 2,98 | dq | 6,8, 1,7 | 40,4 |
| 11 | 3,99 | dd | 10,2, 1,3 | 69,2 |
| 12 | 1,65 | dq | 9,8, 7,3 | 40,1 |
| 13 | 5,35 | ddd | 9,4, 4,7, 0,9 | 74,8 |
| 14 | 1,74 | ddq | 14,1, 9,4, 7,3 | 25,2 |
| | 1,51 | DQD | 14,1, 7,3, 4,7 | |
| 15 | 0,89 | dd | 7,3, 7,3 | 9,2 |
| 16 | 1,25 | d | 6,8 | 14,8 |
| 17 | 1,12 | d | 7,3 | 8,3 |
| 18 | 1,42 | s | | 26,1 |
| 19 | 1,12 | d | 6,8 | 8,3 |

ES 2 338 212 T3

| | Posición | δ_H | Multiplicidad | Acoplamiento | δ_c |
|----|----------|------------|-----------------|--------------|------------|
| 5 | 20 | 0,97 | d | 6,8 | 7,6 |
| | 21 | 0,93 | d | 7,3 | 8,2 |
| 10 | 1' | 5,01 | d | 1,3 | 98,0 |
| | 2' | 3,59 | se solapa con 5 | | 80,6 |
| 15 | 3' | 3,71 | dd | 9,4, 3,4 | 70,6 |
| | 4' | 3,40 | dd | 9,4, 9,4 | 72,1 |
| 20 | 5' | 3,75 | dq | 9,4, 6,0 | 69,8 |
| | 6' | 1,32 | d | 6,4 | 17,3 |
| 25 | 7' | 3,46 | s | | 57,6 |
| | 1" | 4,38 | d | 7,3 | 103,0 |
| 30 | 2" | 3,27 | dd | 10,7, 7,3 | 70,7 |
| | 3" | 2,80 | m | | 63,9 |
| 35 | 4" | 1,77 | m | | 30,2 |
| | | 1,28 | m | | |
| 40 | 5" | 3,75 | dq | 9,0, 6,0 | 67,7 |
| | 6" | 1,20 | d | 6,0 | 20,2 |
| 45 | 7" | 2,43 | s | | 38,9 |

Bioactividad de 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritromicina D

50 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 se utilizó en los bioensayos tal como se describió previamente (Gaisser *et al.*, 1998). Para evaluar la bioactividad de 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritromicina D, alícuotas de 1,1 mg de eritromicina A (Sigma) y de 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritromicina D fueron disueltas en 200 μ l cada uno de metanol, y unas series de 10 diluciones se prepararon. Los discos filtrantes estaban empapados con 10 μ l de estas soluciones y se colocaron en 2x placas TY cubiertas con agar inoculado con un cultivo durante la noche de *B. subtilis* tal como se describió 55 anteriormente (Gaisser *et al.* 1997). Se evaluó el desarrollo de las zonas de inhibición en la *B. subtilis* cultivada. El tamaño de los halos en el cultivo de bacterias alrededor de los discos de filtro indicó que la bioactividad de 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritromicina D era alrededor de 100 veces menor que la eritromicina A, con *Bacillus subtilis* ATCC 6633 como indicador de tensión (fig. 17).

60 *Aislamiento de 3-O-(2,3'-bis-O-metilramnosil) eritromicina D*

11 de sobrenadante de cultivo DMpSGOleg2 que contenía 3-O-ramnosil-eritronolido B fue esterilizado por filtración y se alimentó a los cultivos de SGT2pSGSpnHKI utilizando técnicas microbiológicas estándar. El sobrenadante 65 de cultivo se analizó para 3-O-(2',3'-bis-O-metilramnosil) eritronolido B y se extrajo tal como se describe en Materiales y Procedimientos. La fracción que contenía 3-O-(2',3'-bis-O-metilramnosil) eritronolido B fue aislada. El extracto seco de 3-O-(2',3'-bis-O-metilramnosil) eritronolido B se disolvió en 1 ml de metanol y se añadió a los cultivos de

ES 2 338 212 T3

SGT2pSGeryCIII seguido de una incubación a 30°C durante cuatro días. El sobrenadante se analizó. Un pico principal m/z de 734 fue detectado. El compuesto fue aislado y se analizó mediante los procedimientos descritos para la preparación de 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritronolido B. El nuevo compuesto se identificó como 3-O-(2',3'-bis-O-metilramnosil) eritromicina D (Fig. 16C).

5

10

TABLA 8

Datos de ^1H and ^{13}C RMN para 3-O-(2',3'-bis-O-metilramnosil) eritromicina D

15

| Posición | δ_{H} | Multiplicidad | Acoplamiento | δ_{C} |
|----------|---------------------|---------------|--------------|---------------------|
| 1 | | | | 176,0 |
| 2 | 2,93 | dq | 9,4, 6,8 | 44,8 |
| 3 | 4,20 | dd | 9,4, 0,9 | 82,5 |
| 4 | 2,18 | dq | 7,7, 7,3 | 39,2 |
| 5 | 3,61 | d | 7,7 | 84,0 |
| 6 | | | | 74,2 |
| 7 | 1,99 | dd | 14,9, 8,5 | 37,8 |

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 338 212 T3

| | Posición | δ_H | Multiplicidad | Acoplamiento | δ_C |
|----|----------|------------|---------------|----------------|------------|
| 5 | | 1,52 | dd | 14,9, 4,7 | |
| | 8 | 2,81 | m | | 42,8 |
| 10 | 9 | | | | 219,2 |
| | 10 | 2,96 | dq | 6,8, 1,7 | 40,5 |
| 15 | 11 | 3,99 | dd | 10,2, 1,7 | 69,4 |
| | 12 | 1,65 | dqd | 10,2, 7,3, 0,9 | 39,9 |
| 20 | 13 | 5,36 | ddd | 9,4, 4,7, 1,3 | 74,9 |
| | 14 | 1,74 | ddq | 14,1,9,4, 7,3 | 25,4 |
| | | 1,50 | dqd | 14,1, 7,3, 4,7 | |
| 25 | 15 | 0,90 | dd | 7,3, 7,3 | 9,3 |
| | 16 | 1,27 | d | 7,3 | 14,8 |
| 30 | 17 | 1,13 | d | 7,3 | 8,4 |
| | 18 | 1,43 | s | | 26,3 |
| 35 | 19 | 1,11 | d | 6,8 | 17,2 |
| | 20 | 0,97 | d | 6,8 | 7,7 |
| 40 | 21 | 0,92 | d | 7,3 | 8,3 |
| | 1' | 5,02 | d | 2,1 | 98,4 |
| 45 | 2' | 3,80 | dd | 2,6, 2,6 | 76,6 |
| | 3' | 3,39 | dd | 9,0, 3,0 | 80,4 |
| 50 | 4' | 3,49 | dd | 9,0, 9,0 | 70,9 |
| | 5' | 3,75 | dq | 9,0, 6,4 | 70,2 |
| 55 | 6' | 1,32 | d | 6,4 | 17,2 |
| | 7' | 3,49 | s | | 57,5 |
| 60 | 8' | 3,46 | s | | 56,3 |
| | 1'' | 4,44 | d | 7,3 | 102,5 |

65

ES 2 338 212 T3

| Posición | δ_H | Multiplicidad | Acoplamiento | δ_C |
|----------|------------|---------------|--------------|------------|
| 2" | 3,37 | dd | 7,3, 3,4 | 69,9 |
| 3" | 3,21 | m | | 65,0 |
| 4" | 1,91 | m | | 29,9 |
| | 1,42 | m | | |
| 5" | 3,75 | m | | 70,0 |
| 6" | 1,25 | d | 6,4 | 20,1 |
| 7" | 2,68 | s | | 38,5 |

Construcción de la cepa *Saccharopolyspora erythraea* EST 3 (Δ eryCIII Δ eryBVderyBVI)

Para evitar la contaminación con micarosil-eritronolido B en los ensayos de alimentación, la cepa de *Saccharopolyspora erythraea* SGT3 (*DeryCIIDeryBVDeryBVI*) se aisló utilizando pXhoI plásmido (Gaisser *et al.*, 1997). La transformación de la cepa de *S. erythraea* DM y el aislamiento de la SGT3 mutante se realizó según lo descrito (Gaisser *et al.*, 1997). Para investigar los mutantes sensibles a la tioestreptona n° 31, 33, 34 y 25, el ADN cromosómico se analizó mediante análisis de PCR. El ADN cromosómico fue sometido a PCR utilizando los cebadores tal como se describió anteriormente (Gaisser *et al.*, 1997). El fragmento de 360 pb esperado fue amplificado a partir de ADN de tipo salvaje y dos bandas de aproximadamente 100 y 300 pb de tamaño se detectaron después de digestión de restricción de *Pst*I. En las muestras con el ADN cromosómico de SGT3 como plantilla, un fragmento de 300 pb fue amplificado, que resultó ser resistente a la digestión por *Pst*I. Este resultado indica que la introducción de una supresión de 60 pb en *eryBVI* en el genoma de SGT3. Esta cepa se utiliza como base para la expresión de los casetes de genes descritos a continuación.

Construcción de plásmido de expresión para la *oleP*

Para la expresión de *oleP*, los cebadores OleP 5'-CTCCAGCAAAGGACACCCCATATGACCGATACGCACA-3' y OleP2 5'-CGGCAGATCTGCCGGCCGTCACCAGGAGACGATCTGG-3' se utilizaron para amplificar *oleP* utilizando 3gh2 plásmido como plantilla. El fragmento de PCR fue aislado, tratado con polinucleótido quinasa T4 y clonado en *Sma* pUC18 cortado. Después de la transformación en *E. coli* DH10B, la construcción fue aislada y la secuencia de *oleP* fue verificada. Después de la digestión con *Nde*I/*BGL*II, el fragmento de 1,3 kb fue aislado, ligado con el fragmento de vector de *Nde*I/*BGL*II digerido pSG142 y usado para transformar *E. coli* DH10B. El plásmido pSGOleP fue aislado.

Alimentación de eritronolidos a la cepa SGT2pSGOleP

Saccharopolyspora erythraea SGT2 (Gaisser *et al.* 2000) fue transformada con la construcción de plásmido pSGOleP tal como se describe en Materiales y Procedimientos. Los transformantes fueron verificados por el aislamiento de ADN cromosómico seguido por análisis de PCR. Se realizaron experimentos de alimentación mediante 6-deoxieritronolido B, eritronolido B, 3-O-micarosil-eritronolido B, 3-O-ramnosil-eritronolido B (Gaisser *et al.* 2000), y eritromicina A tal como se describe (Gaisser *et al.* 1997). Los cultivos de las cepas SGT2 y SGT2pSGOleP fueron alimentados con estos compuestos, se incubaron a 30°C durante 3 a 5 días y se analizaron mediante espectrometría de masas de electropulverización. Nuevos picos eran visibles en sobrenadantes de SGT2pSGOleP alimentados con 6-deoxieritronolido B (m/z 434 [M]NH₄⁺), 3-O-micarosil-eritronolido B (m/z 578 [M]NH₄⁺ y m/z 580 [M]NH₄⁺) y 3-O-ramnosil-eritronolido B (m/z 580 [M]NH₄⁺ y m/z 582 [M]NH₄⁺). Los picos nuevos no pudieron ser detectados en sobrenadantes que contenía eritronolido B y eritromicina A. El análisis MS/MS de estos nuevos compuestos indicó la presencia de derivados de 8,8a-epoxi- o 8,8a-dihidroxi de 6-deoxieritronolido B, 3-O-micarosil eritronolido B, y 3-O-ramnosil-eritronolido B.

ES 2 338 212 T3

Preparación de 8 α -hidroxi-3-O-micarosil eritronolido B y 8-epoxi-3-O-eritronolido micarosil B

2,5 l de sobrenadante de cultivo de SGT2pSGOleP alimentados con 60 mg de 3-O-micarosil-eritronolido B fueron cultivados y los nuevos compuestos fueron aislados utilizando los procedimientos descritos en Materiales y Procedimientos. Las estructuras de estos compuestos fueron confirmadas por análisis de resonancia magnética nuclear mediante los procedimientos descritos para la preparación de 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritronolido B. Los compuestos derivados de 3-O-micarosil eritronolido B fueron identificados como 8 α -hidroxi-3-O-micarosil eritronolido B y 8,8 α -epoxi-3-O-micarosil eritronolido B (Fig. 21).

TABLA 9

Datos de ^1H NMR para 8 α -hidroxi-3-O-micarosil eritronolido B

| Protón | δ_{H} | multiplicidad | (acoplamiento Hz) |
|-----------------------------|---------------------|---------------|-------------------|
| 2-H | 2,87 | dq | 10,1, 7,0 |
| 3-H | 3,75 | dd | 10,0, 1,2 |
| 4-H | 2,15 | m | |
| 5-H | 3,55 | d | 3,5 |
| 7-H _a | 1,49 | dd | 14,6, 3,0 |
| 7-H _b | 1,84 | dd | 14,6, 10,3 |
| 8-H | 2,83 | m | |
| 8 α -H _{un} | 3,66 | dd | 11,0, 6,0 |
| 8 α -H _b | 3,71 | dd | 11,0, 9,1 |
| 10-H | 3,07 | qd | 6,9, 1,8 |
| 11-H | 3,93 | dd | 10,2, 1,8 |
| 12-H | 1,66 | m | |
| 13-H | 5,44 | ddd | 9,5, 4,9, 1,2 |
| 14-H _a | 1,49 | dqd | 16,9, 7,3, 4,8 |
| 14-H _b | 1,73 | ddq | 16,9, 9,5, 7,3 |
| 15-H ₃ | 0,88 | d | 7,3 |
| 16-H ₃ | 1,18 | d | 6,9 |
| 17-H ³ | 1,02 | d | 7,3 |
| 18-H ₃ | 1,33 | s | |

ES 2 338 212 T3

| Protón | δ_H | multiplicidad | (acoplamiento Hz) |
|--------------------|------------|---------------|-------------------|
| 19-H ₃ | 0,96 | d | 6,8 |
| 20-S ₃ | 0,94 | d | 7,1 |
| 1'-H | 5,02 | dd | 3,9, 1,1 |
| 2'-H _{un} | 1,84 | dd | 14,5, 4,2 |
| 2'-H _b | 2,08 | dd | 14,5, 1,2 |
| 4'-H | 2,98 | d | 9,7 |
| 5'-H | 4,06 | dq | 9,8, 6,2 |
| 6'-H ₃ | 1,28 | d | 6,2 |
| 7'-H ₃ | 1,22 | s | |

TABLA 10

Datos de ¹³C NMR para 8 α -hidroxi-3-O-micarosil eritronolido B

| Carbono | δ_c |
|---------|------------|
| 1 | 175,3 |
| 2 | 44,4 |
| 3 | 86,4 |
| 4 | 36,3 |
| 5 | 80,1 |
| 6 | 74,4 |
| 7 | 31,0 |
| 8 | 52,9 |
| 8a | 63,5 |
| 9 | 217,3 |
| 10 | 40,6 |
| 11 | 69,6 |

ES 2 338 212 T3

| | Carbono | δ_c |
|----|---------|------------|
| 5 | 12 | 39,6 |
| | 13 | 74,6 |
| 10 | 14 | 25,4 |
| | 15 | 9,3 |
| 15 | 16 | 14,4 |
| | 17 | 7,5 |
| 20 | 18 | 24,7 |
| | 19 | 7,2 |
| 25 | 20 | 8,2 |
| | 1' | 99,2 |
| 30 | 2' | 40,8 |
| | 3' | 69,5 |
| 35 | 4' | 76,3 |
| | 5' | 65,5 |
| 40 | 6' | 16,8 |
| | 7' | 24,7 |

TABLA 11

Datos de 1H NMR para 8,8 α -epoxi-3-O-micarosil eritronolido B

| | Protón | δ_H | Multiplicidad | (acoplamiento Hz) |
|----|-------------------|------------|---------------|-------------------|
| 55 | 2-H | 2,89 | dq | 10,4, 7,0 |
| | 3-H | 3,74 | dd | 10,4, 1,3 |
| 60 | 4-H | 2,21 | m | |
| | 5-H | 3,48 | d | 3,4 |
| 65 | 7-H _{un} | 1,50 | d | 14,9 |

ES 2 338 212 T3

| Protón | δ_H | Multiplicidad | (acoplamiento Hz) |
|----------------------|------------|---------------|-------------------|
| 5 7-H _b | 2,62 | d | 14,9 |
| 8a-H ^{un} | 2,52 | d | 5,5 |
| 10 8a-H _b | 2,67 | d | 5,5 |
| 10-H | 3,12 | dq | 6,8, 1,9 |
| 15 11-H | 4,22 | dd | 10,4, 1,9 |
| 12-H | 1,67 | qd | 7,0, 1,3 |
| 20 13-H | 5,47 | ddd | 9,8, 4,7, 1,3 |
| 14-H _{un} | 1,51 | m | |
| 14-H _b | 1,75 | m | |
| 25 15-H ₃ | 0,88 | dd | 7,3, 7,3 |
| 16-H ₃ | 1,20 | d | 7,3 |
| 30 17-H ₃ | 1,03 | d | 7,3 |
| 18-H ₃ | 1,43 | s | |
| 35 19-H ₃ | 0,97 | d | 6,8 |
| 20-S ₃ | 0,95 | d | 7,0 |
| 40 1'-H | 5,02 | dd | 4,2, 1,3 |
| 2'-H _{un} | 1,84 | dd | 14,5, 4,3 |
| 45 2'-H _b | 2,08 | dd | 14,5, 1,3 |
| 4'-H | 2,98 | d | 9,8 |
| 50 5'-H | 4,06 | dq | 9,8, 6,2 |
| 6'-H ₃ | 1,27 | d | 6,2 |
| 55 7'-H ₃ | 1,22 | s | |

60

65

ES 2 338 212 T3

TABLA 12

Datos de ^{13}C NMR para 8,8 α -epoxi-3-O-micarosil eritronolido B

| | Carbono | δ_c |
|----|---------|------------|
| 5 | 1 | 175,4 |
| 10 | 2 | 44,4 |
| | 3 | 86,7 |
| 15 | 4 | 36,2 |
| | 5 | 81,0 |
| 20 | 6 | 75,2 |
| | 7 | 35,0 |
| 25 | 8 | 62,5 |
| | 8a | 50,0 |
| 30 | 9 | 210,5 |
| | 10 | 44,1 |
| 35 | 11 | 68,9 |
| | 12 | 39,5 |
| 40 | 13 | 74,6 |
| | 14 | 25,5 |
| 45 | 15 | 9,4 |
| | 16 | 14,6 |
| 50 | 17 | 7,5 |
| | 18 | 25,9 |
| 55 | 19 | 7,7 |
| | 20 | 8,2 |
| | 1' | 99,4 |
| 60 | 2' | 40,7 |
| | 3' | 69,5 |
| 65 | 4' | 76,2 |

ES 2 338 212 T3

| Carbóno | δ_c |
|---------|------------|
| 5' | 65,3 |
| 6' | 16,8 |
| 7' | 24,6 |

Preparación de 8,8 α -dehidro-6-deoxieritronolido B y 8-hidroxi-6-deoxieritronolido B

PSGOleP plásmido se utilizó para transformar la cepa productora de deoxieritronolido B *S. erythraea* SGT1 (Δ eryBV, Δ eryCIII, Δ eryF) tal como se describe en Materiales y Procedimientos. Los transformantes fueron verificados por el aislamiento de ADN cromosómico seguido por análisis de PCR. Los cultivos de SGT1 y SGT1pSGOIeP se cultivaron tal como se describió anteriormente (Gaisser *et al.*, 2000) y los sobrenadantes se analizaron mediante espectrometría de masas de electropulverización tal como se describe en Materiales y Procedimientos. Dos compuestos principales en el sobrenadante fueron purificados y analizados mediante técnicas de RMN tal como se describe para la preparación de 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritronolido B. El producto con m/z 401 [MH₂O]H⁺ fue identificado como un derivado 8,8-dihidroxi de 6-B deoxieritronolido, divulgado recientemente (Shah *et al.*, 2.000). El compuesto con m/z de 385 [M]H⁺ fue confirmado como 8,8a-dehidro-6-deoxieritronolido B (Fig. 22). La estructura de otro compuesto menor del sobrenadante del cultivo fue identificado como 8-hidroxi-6-deoxieritronolido B (Fig. 22).

TABLA 13

Datos de ¹H RMN de 8,8 α -dehidro-6-B deoxieritronolido

| Protón | δ_H | multiplicidad | (acoplamiento Hz) |
|-------------------|------------|---------------|-------------------|
| 2-H | 2,70 | dq | 9,8, 6,8 |
| 3-H | 3,55 | ovrlp | |
| 4-H | 1,69 | ovrlp | |
| 5-H | 3,55 | ovrlp | |
| 6-H | 1,91 | m | |
| 7-H _{un} | 2,11 | dd | 17,1, 7,7 |

ES 2 338 212 T3

| Protón | δ_H | multiplicidad | (acoplamiento Hz) |
|--------------------|------------|---------------|-------------------|
| 7-H _b | 2,45 | dd | 17,1, 3,8 |
| 8a-H _{un} | 5,38 | s | |
| 8a-H _b | 5,66 | s | |
| 10-H | 3,23 | dq | 6,8, 1,7 |
| 11-H | 3,60 | dd | 10,2, 1,7 |
| 12-H | 1,70 | ovrlp | |
| 13-H | 5,24 | ddd | 9,4, 4,7, 2,1 |
| 14-H _{un} | 1,52 | ddq | 14,1, 9,4, 7,3 |
| 14-H _b | 1,77 | dqd | 14,1, 7,3, 4,7 |
| 15-H ₃ | 0,90 | dd | 7,3, 7,3 |
| 16-H ₃ | 1,18 | d | 6,8 |
| 17-H ₃ | 1,03 | d | 6,8 |
| 18-H ₃ | 1,12 | d | 6,8 |
| 19-H ₃ | 0,97 | d | 6,8 |
| 20-S ₃ | 0,96 | d | 7,3 |

TABLA 13

Datos de ¹³C RMN de 8,8 α -dehidro-6-B deoxieritronolido

| Carbono | δ_c |
|---------|------------|
| 1 | 178,7 |
| 2 | 45,3 |
| 3 | 75,5 |
| 4 | 42,3 |
| 5 | 77,7 |
| 6 | 35,9 |

ES 2 338 212 T3

| | Carbono | δ_c |
|----|---------|------------|
| 5 | 7 | 33,2 |
| | 8 | 150,4 |
| 10 | 8a | 120,6 |
| | 9 | 208,8 |
| 15 | 10 | 44,9 |
| | 11 | 71,9 |
| | 12 | 42,1 |
| 20 | 13 | 76,9 |
| | 14 | 26,7 |
| 25 | 15 | 10,9 |
| | 16 | 15,2 |
| 30 | 17 | 8,9 |
| | 18 | 20,2 |
| 35 | 19 | 6,5 |
| | 20 | 10,0 |

40

TABLA 14

Datos de 1H RMN de 8-hidroxi-6-deoxieritronolido B ($CDCl_3$)

45

| | Protón | δ_H | multiplicidad | (acoplamiento Hz) |
|----|-------------------|------------|---------------|-------------------|
| 50 | 2-H | 2,63 | dq | 10,2, 6,8 |
| | 3-H | 3,61 | dd | 10,2, 3,0 |
| 55 | 4-H | 1,56 | m | |
| | 5-H | 3,53 | br.s | |
| 60 | 6-H | 1,40 | m | |
| | 7-H _{un} | 1,74 | m | |

65

ES 2 338 212 T3

| Protón | δ_H | multiplicidad | (acoplamiento Hz) |
|----------------------|------------|---------------|-------------------|
| 5 7-H _b | 1,96 | dd | 14,9, 3,4 |
| 10-H | 3,05 | qd | 6,8, 0,9 |
| 10 11-H | 3,45 | d | 9,8 |
| 12-H | 1,72 | m | |
| 15 13-H | 5,45 | ddd | 9,4, 4,7, 0,9 |
| 14-H _{un} | 1,50 | m | |
| 14-H _b | 1,72 | m | |
| 20 15-H ₃ | 0,90 | t | 7,3, 7,3 |
| 16-H ₃ | 1,25 | d | 6,8 |
| 25 17-H ₃ | 1,05 | d | 7,3 |
| 18-H ₃ | 1,15 | d | 6,8 |
| 30 19-H ₃ | 1,42 | s | |
| 20-S ₃ | 1,11 | d | 6,8 |
| 35 21-H ₃ | 0,90 | d | 7,3 |

TABLA 15

Datos de ¹³C RMN de 8-hidroxi-6-deoxieritronolido B (CDCl₃)

| Carbono | δ_x |
|---------|------------|
| 1 | 175,6 |
| 2 | 43,9 |
| 3 | 77,8 |
| 4 | 41,3 |
| 5 | 79,4 |
| 6 | 36,0 |
| 7 | 39,2 |

ES 2 338 212 T3

| | Carbono | δ_x |
|----|---------|------------|
| 5 | 8 | 79,7 |
| | 9 | 218,7 |
| 10 | 10 | 38,8 |
| | 11 | 69,4 |
| 15 | 12 | 40,1 |
| | 13 | 75,2 |
| 20 | 14 | 25,6 |
| | 15 | 10,3 |
| 25 | 16 | 14,8 |
| | 17 | 7,7 |
| 30 | 18 | 20,2 |
| | 19 | 26,9 |
| 35 | 20 | 9,6 |
| | 21 | 8,9 |

40 Estrategia para aislar casetes de genes

La estrategia para preparar casetes de genes con diferentes combinaciones de genes y glicosiltransferasa-metiltransferasa es una adaptación de una técnica que se ha descrito anteriormente (WO 077181 A2) Para construir casetes de genes expresados bajo el control del regulador *actII ORF4*. La expresión de estos casetes de genes en un fondo de cepa adecuada es una aproximación poderosa para generar nuevos poliquétidos modificados post-PKS de manera aleatoria o dirigida. El procedimiento se basa en la introducción de los sitios de restricción *XbaI* en el extremo 3' y 5' de los fragmentos de PCR. La introducción de un sitio *XbaI* en el extremo 5' del fragmento de PCR que es sensible a la metilasa Dam del fondo de cepa protegerá este sitio de digerir más *XbaI*. Para mantener la secuencia Shine Dalgarno 5' del gen de las respectivas construcciones pSG142 que contienen estos genes se utilizan como plantilla. Utilizando el ADN plásmido aislado de la cepa Dam-huésped, como *E. coli* ET12567, los genes amplificados fueron aislados como fragmentos de *XbaI*. Utilizando una cepa huésped con una metilasa Dam activa, tal como *E. coli* DM10B, estos fragmentos fueron clonados de forma secuencial en casetes de genes. Esta técnica proporciona los medios para construir casetes de genes de diferente longitud y orden diferente utilizando la misma estrategia una y otra vez. Una visión general de la estrategia aquí descrita y los casetes de genes aislado se representa en la figura 18.

El siguiente ejemplo de esta metodología se basa en el aislamiento de un fragmento de PCR de *oleG2* en el que se introdujo un sitio de restricción *HindIII* y *NdeMe* en el extremo 5' del fragmento y un sitio *XbaI*, *BGLII* y *EcoRI* en el extremo 3' del fragmento de PCR. Este fragmento fue digerido utilizando las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI* y fue clonado en pUC 19, que fue digerido de forma idéntica. pSGcasleG2 plásmido fue aislado. Los genes *SPNI*, *spnK*, *spnH* y *eryCIII* fueron amplificados mediante técnicas de PCR. Un sitio de restricción *XbaI* se introdujo en el extremo 5' que es sensible a la metilación de la metilasa Dam del fondo de cepa. En el extremo 3' fue introducido un sitio *XbaI*. Las construcciones pSG142 que contienen estos genes se utilizan como plantilla. Los fragmentos de PCR fueron tratados con polinucleótido quinasa T4 tal como se describe anteriormente y clonado en *SmaI* pUC18 cortado. Las secuencias de ADN de estos clones fueron confirmadas por análisis de secuenciación. Después de la transformación de las construcciones en una fondo Dam⁻ cepa, el ADN fue aislado y digerido usando *XbaI*. Los fragmentos de *XbaI* de las inserciones de alrededor de 0,8-1,3 kb de tamaño fueron aislados y se ligaron en el *XbaI* pSGcasOleG2 cortado. Después de construir los casetes de genes en pUC 19, cada construcción

ES 2 338 212 T3

fue digerida utilizando enzimas de restricción *NdeI/BGLII*, y el fragmento de ADN que codifica el casete de genes fue aislado y clonado en el vector de ADN digerido *NdeII BglIII* de pSG142. Estos plásmidos se transformaron en SGT3. Los transformantes se analizaron tal como se describe anteriormente. Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

5

10

15

20

25

30

35

40

45

| | |
|-------------|--|
| casoleG21 | 5'GGGGAAGCTTGCCGACGATGACGACGACC ACCGGACGAACGCATCGATTAATTAAG |
| casoleG22 | 5' GGGGAATTCAGATCTGGTCTAGAGGTCAGCCCGCATGGTTCCTCCGCTCCTCGTCCGC GTCCGCCGCT |
| casspnI3 | 5' GGGTCTAGATCCGGACGAACGCATCGATTAATTAAGGAGGACAGATATGAGTGAGA TCGCAGTTGCCCC |
| casspnI4 | 5'GGGGTCTAGAGGTCAGCCGCCCTCGACGCCGAGCGCTTGCCGGGGCACGAACCCCGG CGCGGCAGGCT |
| casspnK1 | 5'GGGTCTAGATCCGGACGAACGCATCGATTAATTAAGGAGGACAGATATGTCCACAAC GCACGAGATCG |
| casspnK2 | 5' GGGGTCTAGAGGTCCTCGTCTCCGCGCTGTTACGTCGGCCAGGTGCAATATGTC |
| caseryCIII1 | 5'GGGTCTAGATCCGGACGAACGCATCGATTAATTAAGGAGGACAGATATGCGCGTCGT CTTCTCCTC |
| caseryCIII2 | 5'GGGGTCTAGAGGTCATCGTGGTTCT CTCCTTCCCTGCGGCCAGTTCCTCGCA |

Análisis de SGT3pSGcasoleG2spnI

El clon *SGT3pSGcasoleG2spnI* se aisló utilizando el procedimiento descrito anteriormente. Las células fueron cultivadas tal como se describe en Materiales y Procedimientos y el sobrenadante del cultivo se analizó. Como era de esperar, fueron detectados 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritronolido B y 3-O-(2'-O-metilramnosil)-6-deoxieritronolido B.

Análisis de SGT3pSGcasoleG2spnIspnK

SGT3pSGcasoleG2spnIspnK se aisló utilizando el procedimiento descrito anteriormente. Las células fueron cultivadas tal como se describe en Materiales y Procedimientos y el sobrenadante del cultivo se analizó. Como era de esperar, se detectaron 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritronolido B y 3-O-(2',3'-Bis-O-metilramnosil) eritronolido B (Fig. 19). El sobrenadante del cultivo también contiene otro nuevo compuesto que se aisló y la estructura fue confirmada mediante análisis de resonancia magnética nuclear mediante los procedimientos descritos para la preparación de 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritronolido B. La estructura del nuevo compuesto se caracterizó como 3-O-(2',3'-bis-O-metilramnosil)-6-deoxieritronolido B (Fig. 19).

65

ES 2 338 212 T3

TABLA 16

Datos de 1H y ^{13}C de RMN para 3-O-(2,3'-bis-O-metilramno4yl)-6-DEB

| Posición | δ_H | Multiplicidad | Acoplamiento | δ_c |
|----------|------------|---------------|---------------|------------|
| 1 | | | | 178,4 |
| 2 | 2,89 | dq | 8,1, 7,3 | 46,2 |
| 3 | 3,37 | superposición | | 84,1 |
| 4 | 1,68 | m | | 43,1 |
| 5 | 3,49 | d | 9,2 | 77,8 |
| 6 | 1,66 | m | | 37,1 |
| 7 | 1,01 | m | | 35 |
| | 1,86 | m | | |
| 8 | 2,68 | m | | 45,8 |
| 9 | | | | 218 |
| 10 | 2,95 | qd | 6,8, 1,9 | 43,8 |
| 11 | 3,73 | dd | 10,2, 1,7 | 72,1 |
| 12 | 1,65 | m | | 42 |
| 13 | 5,25 | ddd | 9,2, 5,3, 1,3 | 77,4 |
| 14 | 1,54 | m | | 26,5 |
| | 1,80 | m | | |
| 15 | 0,92 | dd | 7,3, 7,3 | 10,8 |
| 16 | 1,27 | d | 6,4 | 15,3 |
| 17 | 1,08 | d | 7,0 | 10 |
| 18 | 1,16 | d | 6,4 | 20,6 |
| 19 | 1,13 | d | 6,6 | 16,4 |
| 20 | 0,98 | d | 6,8 | 7,5 |

ES 2 338 212 T3

| Posición | δ_H | Multiplicidad | Acoplamiento | δ_c |
|----------|------------|---------------|--------------|------------|
| 21 | 0,92 | d | 7,0 | 9,7 |
| 1' | 4,97 | d | 1,5 | 100,7 |
| 2' | 3,77 | superposición | | 78,1 |
| 3' | 3,33 | dd | 9,4, 3,0 | 81,8 |
| 4' | 3,42 | dd | 9,4, 9,4 | 72,8 |
| 5' | 3,67 | dq | 9,4, 6,2 | 70,9 |
| 6' | 1,25 | d | 6,0 | 18,1 |
| 7' | 3,45 | s. | | 58,9 |
| 8' | 3,47 | s | | 57,9 |

Análisis de *SGT3pSGoleG2spnIspnKeryCIII*

SGT3pSGoleG2spnIspnKeryCIII fue aislado mediante los procedimientos descritos anteriormente. Las células fueron cultivadas tal como se describe en Materiales y Procedimientos. El sobrenadante de cultivo de *SGT3pSGcasoleG2spnIspnKeryCIII* contenía sólo pequeñas cantidades de compuestos con un residuo de azúcar de desosamina adjunto.

Análisis de *SGT3pSGoleG2spnIspnKeryCIIIhis*

El producto de PCR utilizando la combinación de cebadores de *caseryCIII2* y SG14 se aisló utilizando los procedimientos descritos para la construcción del plásmido de expresión para *eryCIII*. El casete de genes *pSGcasoleG2spnIspnKeryCIIIhis* se creó utilizando el procedimiento descrito anteriormente. La cepa *SGT3pSGcasoleG2spnIspnKeryCIIIhis* fue aislada y las células fueron cultivadas tal como se describe en Materiales y Procedimientos. El sobrenadante del cultivo del clon se evaluó mediante las técnicas descritas en Materiales y Procedimientos. Se detectaron compuestos de 3-O-manosilo eritromicina D, 3-O-(2'-O-metil ramnosil eritromicina D, 3-O-(2',3'-bis-O-metil ramnosil eritromicina D), 3-O-(2'-O-ramnosil metil)-6-desoxieritromicina D y 3-O-(2',3'-bis-O-ramnosil metil)-6-deoxi eritromicina D (Fig. 20). La introducción de la marca His₆ en el terminal C de *EryCIII* parece, por lo tanto, mejorar la transferencia del glicosilo del residuo de azúcar de desosamina a sus sustratos. Este resultado indica que la expresión del último gen de la cinta de genes puede mejorarse mediante la introducción de la fusión de la marca His₆ en el extremo terminal C de la proteína.

Casete *OleP*

Para incluir *oleP* en las disposiciones de casetes de genes, los cebadores *OleP*cas 1 5'-GGGTCTAGATCCGGACGAACGCATCGATTAATTAAGGAGGACAGATATGA CCGATACGCACACCGGACCGACACC-3' y *OleP*cas2 5'-GGGGTCTAGAGGT-CACCAGGAGACGATCTGGCGTTCCAGTCCGCGGATCA-3' fueron utilizados. El fragmento de PCR utilizando *pSGoleP* plásmido como plantilla fue aislado, tratado con polinucleótido quinasa T4 y clonado en *SmaI* pUC18 cortado. Después de la transformación en *E. coli* DH10B la construcción fue aislada y verificada. *pSGoleP*cas plásmido se utilizó para transformar la cepa ET12567 *dam Escherichia coli*. El ADN plásmido fue aislado y después de la digestión con *XbaI*, un fragmento de 1,3 kb fue aislado, ligado con el fragmento de vector de construcciones *XbaI* digeridas y se utiliza para transformar *E. coli* DH10B. Una visión general de estas construcciones se proporciona en la figura 23.

Preparación de 3-O-ramnosil-8,8 α -dehidro-6-deoxieritronolido B

La cepa *S. erythraea* *SGT1pSGcasoleG2oleP* fue aislada mediante los procedimientos descritos anteriormente y 4 l de las células fueron cultivadas tal como se describe en Material y Procedimientos. El sobrenadante del cultivo fue aislado y analizado tal como se describe para la preparación de 3-O-(2'-O-metilramnosil) eritronolido B. Dos nuevos compuestos de 3-O-ramnosil-8,8 α -dehidro-6-deoxieritronolido B y 3-O-ramnosil-8,8 α -dihidroxi-6-deoxieritronolido B se detectaron (Fig. 24). La estructura de 3-O-ramnosil-8,8 α -dehidro-6-deoxieritronolido B fue confirmada por análisis de RMN.

ES 2 338 212 T3

TABLA 17

Datos de ¹HNMR para 3-O-ramnosil-8,8a-dehidro-6-B deoxieritronolido

| Protón | δ_H | multiplicidad | (acoplamiento Hz) |
|--------------------|------------|---------------|-------------------|
| 2-H | 2,80 | dq | 7,3, 7,3 |
| 3-H | 3,76 | dd | 7,5, 2,6 |
| 4-H | 1,66 | m | |
| 5-H | 3,48 | dd | 7,9, 2,6 |
| 6-H | 2,00 | m | |
| 7-H _{un} | 2,18 | m | |
| 7-H _b | 2,39 | d | 16,4 |
| 8a-H _{un} | 5,42 | s | |
| 8a-H _b | 5,68 | s | |
| 10-H | 3,21 | m | |
| 11-H | 3,68 | m | |
| 12-H | 1,72 | m | |
| 13-H | 5,18 | ddd | 9,2, 4,9, 1,3 |
| 14-H _{un} | 1,53 | m | |
| 14-H _b | 1,77 | m | |
| 15-H ₃ | 0,90 | dd | 7,3, 7,3 |
| 16-H ₃ | 1,20 | d | 7,3 |
| 17-H ₃ | 1,06 | d | 6,8 |
| 18-H ₃ | 1,12 | d | 6,8 |
| 19-H ₃ | 0,98 | d | 6,8 |
| 20-S ₃ | 0,96 | d | 7,3 |
| 1'-H | 4,83 | oscurecido | |
| 2'-H | 3,96 | dd | 3,2, 1,7 |
| 3'-H | 3,62 | dd | 9,6, 3,2 |
| 4'-H | 3,42 | dd | 9,6, 9,6 |

ES 2 338 212 T3

| Protón | δ_H | multiplicidad | (acoplamiento Hz) |
|-------------------|------------|---------------|-------------------|
| 5'-H | 3,69 | m | |
| 6'-H ₃ | 1,28 | d | 6,2 |

TABLA 18

Datos de ¹³C RMN para 3-O-ramnosil-8,8a-dehidro-6-B deoxieritronolido

| Carbono | δ_c |
|---------|------------|
| 1 | 177,3 |
| 2 | 45,0 |
| 3 | 81,1 |
| 4 | 42,0 |
| 5 | 75,5 |
| 6 | 33,3 |
| 7 | 31,2 |
| 8 | 148,4 |
| 8a | 119,3 |
| 9 | 210,2 |
| 10 | 43,8 |
| 11 | 71,1 |
| 12 | 40,5 |
| 13 | 76,0 |
| 14 | 25,1 |
| 15 | 9,3 |
| 16 | 13,7 |
| 17 | 8,6 |
| 18 | 18,3 |

ES 2 338 212 T3

| Carbono | δ_c |
|---------|------------|
| 19 | 8,8 |
| 20 | 8,8 |
| 1' | 102,4 |
| 2' | 70,5 |
| 3' | 70,9 |
| 4' | 72,2 |
| 5' | 69,3 |
| 6' | 16,6 |

25 *Construcción de plásmido de expresión para oleG1*

Para establecer cuál de los diferentes codones iniciales posibles en la secuencia publicada (número de acceso AJ002638) se utiliza para la expresión de *oleG1* (Fig. 25), varias construcciones fueron probadas mediante la medición de la complementación de la mutación *eryCIII* en *S. erythraea* SGT2 después de la alimentación con 3-O-micarosil eritronolido B utilizando las técnicas descritas en Materiales y Procedimientos. La complementación indicada por la producción de pequeñas cantidades de eritromicina A sólo se observó cuando se utilizó vector pS-GOleG1 (Fig. 26). pSGOleG1 plásmido fue aislado usando los cebadores 7390 5'-CCGCCATATGAGCATCGCGTC GAACGGCGCGCGCTCGGC-3', 5'OLE2-TCAGATCTCCGCCTTCCCGCCATCGCGCCGGTGGCAT-3' para amplificar *oleG1*. El procedimiento de clonación fue tal como se describe para la construcción del plásmido de expresión para *oleG2*. Los vectores de expresión con el codón de inicio publicado o uno de los siguientes codones ATG indicados en la figura 25 no complementan la mutación *eryCIII* de SGT2 después de la alimentación con 3-O-micarosil eritronolido B. Este resultado indica que el codón de inicio correcto que se requiere para la expresión de *oleG1* ATG es la superposición con el codón de detención *oleP1* (Fig. 25).

40 *6-deoxieritronolido B como sustrato para *oleG2*, pero no *oleG1**

La *S. erythraea* SGQ mutante 1 (SGT2DeryF) fue creada a partir de SGT2 mediante la introducción de una eliminación en el *gen eryF* tal como se describe anteriormente utilizando técnicas microbiológicas estándar. SGQ1 fue transformado con las construcciones de plásmido pSGOleG2, pSGOleP y pSGOleG1 y experimentos de alimentación con el sobrenadante de cultivo estéril filtrado de SGT1 que contiene 6-deoxieritronolido B se llevaron a cabo tal como se describe en Materiales y Procedimientos. Los resultados indican que ambos, *OleG2* y *OleP* en menor medida, aceptan 6-deoxieritronolido B como sustrato (Fig. 27). 6-deoxieritronolido B no es un sustrato para *OleG1*.

50 *3-O-ramnosil-6-deoxieritronolido B como sustrato para *oleP**

Los sobrenadantes de cultivo de SGT1pSGOleG2 contienen 3-O-ramnosil-6-deoxieritronolido B fueron filtrados estériles y se añadieron a los cultivos de SGQ1, SGQ1pSGOleG2, SGQ1pSGOleP y SGQ1pSGOleG1 utilizando técnicas microbiológicas estándar. El análisis de estos sobrenadantes de cultivo indica que 3-O-ramnosil-6-deoxieritronolido B es un sustrato para *OleP* pero no para *OleG1* (Fig. 28).

60 *Alimentación de 8,8a-epoxi-3-O-eritronolido micarosil B*

Los cultivos de células de SGT1pSGOleG1 se cultivaron tal como se describe en Material y Procedimientos y fueron alimentados con 8,8a-epoxi-3-O-micarosil eritronolido B, tal como se describió anteriormente (Gaisser *et al.*, 2000). El sobrenadante del cultivo se analizó utilizando las técnicas descritas anteriormente y los resultados indican que 8,8a-epoxi-3-O-micarosil eritronolido B es un sustrato para *OleG1*.

ES 2 338 212 T3

Expresión de pSGcassOleG2EryCIII en SGT3

El gen *noG2* fue amplificado utilizando los cebadores casoleG21 y casoleG22 (véase más arriba) y el ADN de pSGOleG2 plásmido como plantilla (Gaisser *et al.* 2000). El producto de PCR se ligó en el *Sma* pUC18 cortado y transformado en la cepa *Escherichia coli* DH108. La secuencia del producto de PCR fue verificada. El plásmido resultante fue digerido utilizando las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* seguido por un ligado en *EcoREnHindIII* digerido pUC19 y la transformación de *E. coli* DH10B. El plásmido resultante fue nombrado pSGcassOleG2.

El gen *eryCIII* se amplificó usando los cebadores caseryCIII y caseryCIII2 (véase más arriba) y el ADN de pSGeryCIII plásmido como plantilla. El producto de PCR se ligó en *Sma* pUC18 cortado y transformado en la cepa *Escherichia coli* DH10B. La secuencia de los productos de PCR se verificó. El plásmido resultante se transformó en la cepa *Escherichia coli* Dam ER12567. El ADN de los transformantes fue aislado y digerido con el enzima de restricción *XbaI*. El fragmento de ADN de 1,3 kb fue aislado y ligado a *XbaI* pSGcassOleG2 digerido y transformado en *E. coli* DH10B. La orientación correcta de *eryCIII* se evaluó mediante las digestiones de restricción y se aisló pOleG2EryCIII plásmido. Una banda de ADN de unos 2,8 kb fue aislada después de una restricción de uso de digestión de *NdeI*, *BGLII* y *DraI* seguida por una ligadura en el vector de expresión pSG142 *NdeI/BGLII* digerido y la transformación de *E. coli* DH10B. pSGcassOleG2EryCIII plásmido fue aislado y se utiliza para transformar el mutante *S. erythraea* SGT3. Colonias resistentes a la tioestreptona fueron seleccionadas. El sobrenadante de cultivo de estas cepas se aisló tal como se describe (Gaisser *et al.* 1997) y se analizó mediante espectrometría de masas de electropulverización. Se detectó un pico con un tiempo de retención de 9,2 y m/z de 706, lo que indica la presencia de ramnosil-ertromicina D en el sobrenadante. Otro pico de m/z 690 también se encontró, lo que indica la presencia de ramnosil desoxieritromicina-6-D en el sobrenadante (ver Fig. 16).

La actividad antimicrobiana de los análogos de la eritromicina resultante fue demostrada a través del desarrollo de zonas de inhibición en un césped de *Bacillus subtilis* sensible a la eritromicina alrededor de las células transformadas en un bioensayo estándar.

Aislamiento de 5-O-glucosilo-y 5-O-desosaminil-tilactona

El análisis del estándar de tilactona utilizando espectrometría de masas de electropulverización mostró un pico importante en m/z 377 y picos menores en m/z 359 y m/z 417. Cuando la tilactona fue suministrada a la cepa SGT2, en la que ambos *eryBV* y *eryCIII* se suprimen, los picos de m/z 557 y 579 fueron detectados en el sobrenadante de cultivo, lo que correspondería a derivados glucosilados de tilactona. Esto confirmó la presencia de otra glicosiltransferasa en *S. erythraea* que acepta la tilactona como sustrato. Sin embargo, el análisis del sobrenadante de cultivo de *S. erythraea* SGT2 (pSGTYLM2) alimentado con tilactona reveló un pico mayor en m/z 552, que se fragmentó en los picos de m/z 158 y m/z 359 en experimentos MS/MS, lo que indica la presencia de 5-O-desosaminil tilactona en el medio de expresión de *S. erythraea* SGT2 (pSGTYLM2). Las tilactonas supuestas de glucosilo y desosaminilo (2,2 mg y 2,0 mg, respectivamente, de 1,5 de caldo de cultivo) se analizaron y las estructuras se vieron plenamente confirmadas como 5-O-glucosilo-y 5-O-desosaminil-tilactona mediante el uso de ¹H y ¹³C RMN (véanse las figuras 5A y 5B, respectivamente).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 338 212 T3

TABLA 19

¹H RMN de datos para el 5-desosaminyl-tilactona

| Protón | δ_H | Multiplicidad | Acoplamiento |
|--------------------|------------|---------------|-----------------|
| 2-H _a | 2,49 | dd | 17,4, 9,6 |
| 2-H _b | 2,04 | d | 17,4 |
| 3-H | 3,72 | d | 9,6 |
| 4-H | 1,70 | m | |
| 5-H | 3,77 | d | 9,6 |
| 6-H | 1,11 | m | |
| 7-H _{un} | 1,72 | m | |
| 7-H _b | 1,45 | m | |
| 8-H | 2,64 | m | |
| 10-H | 6,47 | m | 15,4 |
| 11-H | 7,27 | d | 15,4 |
| 13-H | 5,70 | d | 10,4 |
| 14-H | 2,81 | ddq | 10,2, 10,2, 6,5 |
| 15-H | 4,72 | ddd | 9,7, 9,7, 2,5 |
| 16-H _{un} | 1,90 | m | |
| 16-H _b | 1,60 | m | |

ES 2 338 212 T3

| Protón | δ_H | Multiplicidad | Acoplamiento |
|-----------------------------------|------------|---------------|-----------------|
| 17-H ₃ | 0,96 | dd | 7,4, 7,4 |
| 18-H ₃ | 1,04 | d | 6,8 |
| 19-H _{un} | 1,60 | m | |
| 19-H _b | 1,42 | m | |
| 20-S ₃ | 0,85 | dd | 7,2, 7,2 |
| 21-H ₃ | 1,19 | d | 6,9 |
| 22-H ₃ | 1,84 | br.s | |
| 23-H ₃ | 1,08 | d | 6,5 |
| 1'-H | 4,28 | d | 7,3 |
| 2'-H | 3,37 | dd | 10.5,7.3 |
| 3'-H | 3,20 | ddd | 11,4, 11,4, 4,0 |
| 4'-H _a | 1,93 | m | |
| 4'-H _b | 1,44 | m | |
| 5'-H | 3,61 | dq | 10,2, 6,1 |
| 6'-H ₃ | 1,26 | d | 6,1 |
| 7'(CH ₃) ₂ | 2,70 | S | |

TABLA 20

Datos de ¹³C RMN para 5-desosaminil-tilactona

| Carbono | δ_c |
|---------|------------|
| C1 | 173,6 |
| C2 | 39,7 |
| C3 | 67,0 |
| C4 | 40,9 |
| C5 | 78,6 |

ES 2 338 212 T3

| | Carbano | δ_c |
|----|-------------------------------------|------------|
| 5 | C6 | 39,4 |
| | C7 | 33,3 |
| 10 | C8 | 44,7 |
| | C9 | 205,5 |
| 15 | C10 | 118,2 |
| | C11 | 148,1 |
| 20 | C12 | 133,3 |
| | C13 | 146,0 |
| 25 | C14 | 38,3 |
| | C15 | 78,4 |
| 30 | C16 | 23,9 |
| | C17 | 8,4 |
| | C18 | 8,3 |
| 35 | C19 | 20,5 |
| | C20 | 10,8 |
| 40 | C21 | 16,3 |
| | C22 | 11,4 |
| 45 | C23 | 14,3 |
| | C' | 103,3 |
| 50 | C2' | 69,3 |
| | C3' | 65,0 |
| 55 | C4' | 29,7 |
| | C5' | 67,8 |
| 60 | C6' | 19,5 |
| | N7'-(CH ₃) ₂ | 38,5 |

65

ES 2 338 212 T3

TABLA 21

Datos de ¹H RMN para 5-glucosilo-tilactona

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

| Protón | δ_H | Multiplicidad | Acoplamiento |
|-------------------|------------|---------------|-----------------|
| 2-H _{un} | 2,49 | dd | 17,4, 9,6 |
| 2-H _b | 2,05 | d | 17,4 |
| 3-H | 3,74 | br. d | 9,9 |
| 4-H | 1,68 | m | |
| 5-H | 3,77 | br. d | 9,4 |
| 6-H | 1,11 | m | |
| 7-H _{un} | 1,72 | m | |
| 7-H _b | 1,48 | m | |
| 8-H | 2,66 | dqd | 11,8, 6,9, 3,6 |
| 10-H | 6,44 | d | 15,5 |
| 11-H | 7,23 | d | 14,9 |
| 13-H | 5,67 | d | 10 |
| 14-H | 2,78 | ddq | 10,3, 10,3, 6,6 |
| 15-H | 4,68 | ddd | 9,1, 9,1, 2,7 |
| 16-H _a | 1,86 | m | |
| 16-H _b | 1,58 | m | |
| 17-H ₃ | 0,94 | dd | 7,3, 7,3 |
| 18-H ₃ | 1,04 | d | 6,9 |
| 19-H _a | 1,43 | m | |
| 19-H _b | 1,64 | m | |
| 20-S ₃ | 0,87 | t | 7,3 |
| 21-H ₃ | 1,19 | d | 6,9 |

ES 2 338 212 T3

| Protón | δ_H | Multiplicidad | Acoplamiento |
|--------------------|------------|---------------|--------------|
| 22-H ₃ | 1,85 | br.s | |
| 23-H ₃ | 1,07 | d | 6,6 |
| 1'-H | 4,28 | d | 7,8 |
| 2'-H | 3,17 | dd | 9,2, 7,8 |
| 3'-H | 3,33 | m | |
| 4'-H | 3,34 | m | |
| 5'-H | 3,19 | m | |
| 6'-H _{un} | 3,82 | dd | 11,6, 2,6 |
| 6'-H _b | 3,72 | dd | 11,6,4.,8 |

TABLA 22

Datos de ¹³C RMN para 5-glucosilo-tilactona

| Carbono | δ_c |
|---------|------------|
| C1 | 173,6 |
| C2 | 39,8 |
| C3 | 66,9 |
| C4 | 41,1 |
| C5 | 79,1 |
| C6 | 39,6 |
| C7 | 33,4 |
| C8 | 45,1 |
| C9 | 205,7 |
| C10 | 118,6 |
| C11 | 148,2 |
| C12 | 133,9 |

ES 2 338 212 T3

| | Carbono | δ_c |
|----|---------|------------|
| 5 | C13 | 146,3 |
| | C14 | 38,4 |
| | C15 | 78,6 |
| 10 | C16 | 24,3 |
| | C17 | 8,6 |
| 15 | C18 | 8,2 |
| | C19 | 21,3 |
| | C20 | 10,9 |
| 20 | C21 | 16,5 |
| | C22 | 11,1 |
| 25 | C23 | 14,9 |
| | C' | 103,1 |
| 30 | C2' | 74,3 |
| | C3' | 76,7 |
| 35 | C4' | 70,2 |
| | C5' | 75,9 |
| 40 | C6' | 61,2 |

Producción de 23-hidroxi-5-O-tilactona micaminosil

45 La cepa de *S. erythraea* SGT2pSGTyIM2 se cultivó tal como se describió anteriormente (Gaisser *et al.*, 1997). La tilactona fue suministrada a estos cultivos después de 48 h (en comparación con 24h en la alimentación anterior). El análisis de los sobrenadantes mediante espectroscopia de masas de electropulverización reveló la presencia de un nuevo pico en m/z 552, que se identificó como 5-O-desosaminil-tilactona. Un segundo pico de m/z 568 se detectó en este sobrenadante y el análisis MS/MS de este compuesto confirmó la presencia de 5-O-micaminosil-tilactona en el medio de expresión de la cepa de *S. erythraea* SGT2pSGTYLH. El análisis de los sobrenadantes reveló un cambio del pico de la 5-O-micaminosil-tilactona de m/z 568 a 584 m/z. Este resultado indica que la 5-O-micaminosil-tilactona fue también tratada mediante la expresión del locus TyIH (Fouces *et al.*, 1999). El locus TyIH consta de dos genes, tyIH1 (tipo ferredoxina 3Fe-4S) y tyIH2 (tipo citocromo P450), postulado para formar el sistema de oxidorreducción que participan en la oxidación de C23, para producir 23-hidroxi-5-O-tilactona micaminosil en el cultivo sobrenadante.

Producción de 23-O-ramnosil 5-O-tilactona micaminosil

60 Una alícuota del sobrenadante que contiene 5-O-micaminosil-tilactona se utilizó para alimentar cultivos de *S. erythraea* SGT2pSGTYLHN. El análisis de los sobrenadantes mediante espectroscopia de masa de electropulverización reveló la presencia de un nuevo pico en m/z 730, el cambio de m/z 146 indica la presencia de 23-ramnosil 5-O-tilactona micaminosil en el sobrenadante del cultivo.

Aislamiento de 5-O-(2'-O)-bis-glucosilo-tilactona

65 Cultivos de SGT2pSGOLED son alimentados con tilactona. Los sobrenadantes de estos cultivos contienen un producto nuevo con m/z consistente con la estructura de la diglucosil-tilactona. El compuesto se purificó tal como se describe anteriormente y la estructura confirmó totalmente mediante ^1H y ^{13}C RMN.

ES 2 338 212 T3

TABLA 23

Datos de ¹H RMN para 5-O(2'-O)-bis-glucosilo-tilactona

| Protón | δ_H | multiplicidad | acoplamiento |
|--------------------|------------|---------------|-----------------|
| 2-H _a | 2,05 | d | 17,5 |
| 2-H _b | 2,48 | dd | 17,5, 9,6 |
| 3-H | 3,73 | br. d | 9,8 |
| 4-H | 1,74 | m | |
| 5-H | 3,78 | d | 9,4 |
| 6-H | 1,11 | m | |
| 7-H _a | 1,45 | m | |
| 7-H _b | 1,75 | m | |
| 8-H | 2,65 | m | |
| 10-H | 6,46 | d | 15,3 |
| 11-H | 7,23 | d | 15,3 |
| 13-H | 5,66 | d | 10,2 |
| 14-H | 2,78 | ddq | 10,2, 10,2, 6,4 |
| 15-H | 4,68 | ddd | 10,2, 9,4, 2,6 |
| 16-H _a | 1,58 | m | |
| 16-H _b | 1,86 | m | |
| 17-H ₃ | 0,94 | dd | 7,3, 7,3 |
| 18-H ₃ | 1,07 | d | 6,8 |
| 19-H _{um} | 1,43 | m | |
| 19-H _b | 1,63 | m | |
| 20-S ₃ | 0,88 | dd | 7,3, 7,3 |
| 21-H ₃ | 1,21 | d | 6,8 |
| 22-H ₃ | 1,85 | s | |
| 23-H ₃ | 1,07 | d | 6,6 |
| 1'-H | 4,42 | d | 7,7 |
| 2'-H | 3,43 | m | |
| 3'-H | 3,52 | dd | 9,0, 9,0 |
| 4'-H | 3,37 | m | |
| 5'-H | 3,21 | m | |

ES 2 338 212 T3

| Protón | δ_H | multiplicidad | acoplamiento |
|--------------------|------------|---------------|--------------|
| 6'-Ha | 3,70 | m | |
| 6''-H _b | 3,82 | dd | 11,5, 2,6 |
| 1''-H | 4,56 | d | 7,7 |
| 2''-H | 3,27 | m | |
| 3''-H | 3,37 | m | |
| 4''-H | 3,28 | m | |
| 5''-H | 3,29 | m | |
| 6''-Ha | 3,71 | m | |
| 6''-H _b | 3,89 | br. d | 11,9 |

TABLA 24

Datos de ^{13}C RMN para 5-O(2'-O)-bis-glucosilo-tilactona

| Carbono | δ_C |
|---------|------------|
| C1 | 173,4 |
| C2 | 40,0 |
| C3 | 66,9 |
| C4 | 40,9 |
| C5 | 78,7 |
| C6 | 39,6 |
| C7 | 33,5 |
| C8 | 45,2 |
| C9 | 205,7 |
| C10 | 118,8 |
| C11 | 148,5 |
| C12 | 133,9 |

ES 2 338 212 T3

| | Carbono | δ_C |
|----|---------|------------|
| 5 | C13 | 146,4 |
| | C14 | 38,5 |
| 10 | C15 | 78,5 |
| | C16 | 24,4 |
| 15 | C17 | 8,6 |
| | C18 | 8,3 |
| 20 | C19 | 21,1 |
| | C20 | 11,1 |
| 25 | C21 | 16,6 |
| | C22 | 11,8 |
| 30 | C23 | 15,0 |
| | C1' | 101,0 |
| 35 | C2' | 81,7 |
| | C3' | 76,2 |
| 40 | C4' | 70,1 |
| | C5' | 75,8 |
| 45 | C6' | 61,2 |
| | C1'' | 104,3 |
| 50 | C2'' | 74,2 |
| | C3'' | 76,6 |
| 55 | C4 | 70,0 |
| | C5'' | 77,1 |
| 60 | C6'' | 61,6 |

Utilizando la aproximación descrita para la creación de casetes de genes se desarrolló una estrategia para aislar 5-O-micaminosil-eritromicina A y 5-O-micaminosil-(4''-O-micarosil)-eritromicina A (fig. 32).

65

ES 2 338 212 T3

Aislamiento de un casete de genes que codifica la vía biosintética de micaminosa

Un casete de genes fue aislado, que codifica los genes responsables de la síntesis de TDP-D-micaminosa mediante la amplificación de *tylMIII*, *tylB* y *tylMI* en la agrupación de genes de biosíntesis de tilosina (números de acceso sf08223 y x81885) utilizando el ADN cromosómico de *Fradiae Streptomyces* y los cebadores siguientes:

TylM31

5'GGCGGGGAGAGAGGAGAGCATATGAACACGGCAGCCGGCCCGACC

TylM32

5'CCCCCTCTAGAGGTC ACTCGGGGACATACGGGGCGACGGGCAGCCG

TylM11

5'GGGGGTCTAGATCTTAATTAAGGAGGACAACCATGGCCCATTCAGCCACGGCCGG
ACCGCAGGCCGA

TylM12

5'GGGGGTCTAGAGGCATATGTGTCTCCTTAATTAATCACCGGGTTTCTCCCTTCGCTCCG
GGGAGCCCGGT

TylB1

5'CCCCCTCTAGATCTTAATTAAGGAGGACACCCATGACAGGGCTGCCGCGGCCCGCCGTC
CGGGTG

TylB2

5'GGGGGTCTAGAGGTCACGGGCCTTCCTCCCAGGAGTCCAGCGCGGCCGA

Los fragmentos de PCR fueron clonados en *Sma* pUC18 cortado utilizando técnicas estándar de clonación tal como se describe en Materiales y Procedimientos. Las secuencias de los fragmentos clonados fueron verificadas mediante análisis de la secuencia de ADN. No se detectaron diferencias en la secuencia publicada mediante *tylMI* o *tylM3*, pero fueron detectados cambios en *tylB*, que resultaron en el cambio de 8 regiones de aminoácidos en comparación con la secuencia publicada de TylB (Fig. 33).

Los casetes de genes se unieron en pUC18 utilizando el procedimiento descrito anteriormente (Fig. 34). Los constructos *pUC18tylMIII-tylB* y *pUC18tylMIII-tylB-tylMI* fueron aislados y confirmados mediante digestiones de restricción. pUC plásmido *18tylMIII-tylB-tylMI* fue digerido con *NdeI* y la inserción de aproximadamente 3,5 kb fue aislada y ligada a *NdeI* digerido pSGCIII, pSGDEVII y pSGTYLCV (Fig. 35). La posición correcta se ha confirmado usando digestiones de restricción.

Aislamiento de GG1 de *S. erythraea*

pNCO62 plásmido (Gaisser *et al.*, 1997) fue aislado de una cepa huésped *Escherichia coli* dam y digerido con las enzimas de restricción *BalI/BclI*. Para introducir una delección de 0,9 kb en *eryCIV* tal como se describió previamente (Salah-Bey *et al.*, 1998), los extremos de los fragmentos de ADN fueron rellenados usando técnicas microbiológicas estándar, seguido por una etapa de ligado y electroporación de *E. coli* DH10B. pGG17 plásmido fue aislado y confirmado mediante análisis de secuencias y digestión de restricción. Para introducir un marcador seleccionable en esta construcción, un fragmento de 1,1 kb que contiene el gen resistente a la tioestreptona se aisló utilizando el pIB060 plásmido y se ligó en pGG17 para generar pGG1 (fig. 36). Este plásmido se utilizó para introducir la supresión de *eryCIV* en el genoma de *S. erythraea* de tipo salvaje. Para aislar la cepa de *S. erythraea* se usaron técnicas GG1 descritas anteriormente (Gaisser *et al.*, 1998).

Aislamiento de SGQ2 *S. erythraea*

PGG1 plásmido se utilizó para introducir una supresión de 0,9 kb de *eryCIV* (Salah-Bey *et al.*, 1998) en la cepa de *S. erythraea* SGT2 mutante para crear el SGQ2 mutante cuádruple, utilizando las técnicas microbiológicas descritas anteriormente (Gaisser *et al.*, 1998). Para verificar el mutante, se usó pSGCIII plásmido para transformar SGQ2 y SGQ2pSGCIII fue aislado. Las células fueron cultivadas tal como se describe en Material y Procedimientos y la

alimentación con 3-O-micarosil eritronolido B se llevó a cabo tal como se describe (Gaisser *et al.*, 2000). El sobrenadante del cultivo celular se evaluó mediante las técnicas descritas en Materiales y Procedimientos y dos nuevos picos con 750 m/z y 713 m/z se detectaron (Fig. 37). Usando las técnicas MS/MS descritas en Materiales y Procedimientos, estos nuevos compuestos fueron identificados como 5-O-micaminosil eritromicina A y 3,5-di-O-micarosil-eritronolido B.

Producción mejorada de 5-O-micaminosil-eritromicina A

El plásmido producido mediante la clonación del casete de genes de micaminosa tylMIII-tylB-tylM1 en la orientación correcta en el sitio *NdeI* del plásmido pSGCIII se utilizó para transformar SGQ2 y la cepa SGQ2p (micaminosa) CIII se aisló. Las células fueron cultivadas tal como se describe en Materiales y Procedimientos y la alimentación con micarosil-eritronolido B se llevó a cabo tal como se describe (Gaisser *et al.*, 2000). El sobrenadante del cultivo celular se analizó mediante HPLC-MS tal como se describe en Materiales y Procedimientos y se detectaron picos de 750 m/z y 713 m/z, pero la cantidad del material con 750 m/z, que corresponde a 5-O-micaminosil-eritromicina A, fue significativamente mayor en relación con los otros picos.

Construcción de plásmido de expresión para *tylCV*

Para la expresión de *tylCV* se utilizan los cebadores TylCV15'-GCCTGACGAAGGGTCCTGCCATATGGCTCA TATTGCATT y TylCV2 5'-GCGTGGGCGCCGGAGATCTGGCCGCGGGGACAGCA para amplificar *tylCV* utilizando el ADN genómico de *S. fradiae* como plantilla. El fragmento de PCR fue aislado y clonado tal como se describe para la construcción del plásmido de expresión de *eryCIII*. Después de la digestión con *NdeI/BGLII* un fragmento de 1,2 kb fue aislado, ligado en pSG142 digerido con las enzimas de restricción y utilizado para transformar *E. coli* DH10B tal como se describe anteriormente. pSGTYLCV plásmido fue aislado.

Producción de 5-O-micaminosil-(4''-O-micarosil) eritromicina A

El pSGTylCV plásmido se utilizó para transformar SGQ2 y la cepa SGQ2pSGTylCV fue aislado. Las células fueron cultivadas tal como se describe en Materiales y Procedimientos y un sobrenadante filtrado de la cepa SGQ2p (micaminosa) CIII, que contiene 5-O-micaminosil-eritromicina A, se realizó según lo descrito para experimentos similares con anterioridad (Gaisser *et al.*, 2000). El sobrenadante del cultivo celular de la cepa SGQ2pSGTylCV se analizó mediante HPLC-MS tal como se describe en Materiales y Procedimientos y un nuevo pico con 894 m/z se detectó, que corresponde a 5-O-micaminosil-(4''-O-micarosil) eritromicina A.

Referencias

- Caffrey, P. *et al.*, (1992) *FEBS* 304: 225-228.
- Devereux, J. *et al.*, (1984) *Nucl Acids Res.* 12: 387-395.
- Fouces, R. *et al.*, (1999) *Microbiol* 145: 855-868.
- Gaissa, S. *et al.*, (1997) *Mol Gen. Genet* 256: 239-251.
- Gaisser, S. *et al.*, (2000) *Mol Microbiol* 36: 391-401.
- Gandecha, A.R *et al.*, (1997) *Gene* 184: 197-203.
- Haydock, S.F. *et al.*, (1991) *Mol Gen. Genet* 230: 120-128.
- Hernández, C. *et al.*, (1993) *Gene* 134: 139-140.
- Hessler, P.E., *et al.*, (1997) *Applied Microbiology and Biotechnology* 47: 398-404.
- Kaneda, T. *et al.*, (1962) *J Biol Chem* 237: 322-327.
- Katz, E. *et al.*, (1983) *J Gen Microbiol* 129: 2703-2714.
- Pereda, A. *et al.*, (1997) *Gene* 193: 65-71.
- Sambrook, J. *et al.* (1989) 2^a ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, N.Y.
- Sanger, F. *et al.*, (1977) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 74: 5463-5467.

Staden, R. (1984) *Nucl Acids Res.* 12: 521-528.

Weber, JM. *et al.*, (1985) *J Bacteriol* 164: 425-433.

5 Yamamoto, H. *et al.*, (1986) *J Antibiot* 34: 1304-1313.

Xue, Y. *et al.*, (1998) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 95: 12111-12116.

10 Olano *et al.*, (1998) *Mol Gen. Genet* 259: 299-308.

Rodríguez *et al.*, (1995) *FEMS Microbiol. Letters* 127: 117-120.

Shah *et al.*, (2000) *J Antibiot* 53: 502-508.

15 Spagnoli *et al.*, (1983) *J Antibiot* 36: 365-375.

Referencias citadas en la descripción

20 Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

25 Documentos de patente citados en la descripción

- WO 9313663 A [0005]
- WO 9905283 A [0010]
- WO 9801546 A [0006]
- US 5871983 A [0010]
- 30 • WO 9508548 A [0008]
- US 1999 A [0010]
- WO 0000618 A [0008]
- WO 0077181 A2 [0054]
- 35 • WO 9723630 A [0010]
- WO 077181 A2 [0100]

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- 40 • Cortés, J. *et al.* *Nature*, 1990, vol. 348, 176-178 [0004]
- Donadio, S. *et al.* *Science*, 1991, vol. 252, 675-679 [0005]
- Donadio, S. *et al.* *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 7119-7123 [0005]
- 45 • Hutchinson, C. R.; Fujii, I. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1995, vol. 49, 201-238 [0005] [0007]
- Bibb, M. J. *et al.* *EMBO J.*, 1989, vol. 8, 2727-2736 [0007]
- 50 • Sherman, D. H. *et al.* *EMBO J.*, 1989, vol. 8, 2717-2725 [0007]
- Fernandez-Moreno, M.A. *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 19278-19290 [0007]
- Bartel, P. L. *et al.* *J. Bacteriol.*, 1990, vol. 172, 4816-4826 [0007]
- 55 • Chater, K. F.; Davis, N. K. *Mol. Microbiol.*, 1990, vol. 4, 1679-1691 [0008]
- Shen, B. *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, vol. 117, 6811-6821 [0008]
- 60 • Meurer, G. *et al.* *Chemistry and Biology*, 1997, vol. 4, 433-443 [0008]
- Trefzer, A. *et al.* *Natural Products Reports*, 1999, vol. 16, 283-299 [0010]
- Liu, H.-W.; Thorson, J.S. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1994, vol. 48, 223-256 [0010]
- 65 • Dhillon, N. *et al.* *Mol. Microbiol.*, 1989, vol. 3, 1405-1414 [0010]
- Haydock *et al.* *Mol. Gen. Genet.*, 1991, vol. 230, 120-128 [0010] [0068]

ES 2 338 212 T3

- **Salah-Bey, K. et al. *Mol Gen. Genet.*, 1998**, vol. 257, 542-553 [0010]
- **Gaisser, S. et al. *Mol. Gen. Genet.*, 1998**, vol. 258, 78-88 [0010]
- 5 • **Gaisser, S. et al. *Mol. Gen. Genet.*, 1997**, vol. 256, 239-251 [0010]
- **Summers, D. et al. *Microbiology*, 1997**, vol. 143, 3251-3262 [0010]
- **Borisova, S.A. et al. *Org. Lett.*, 1999**, vol. 1, 133-136 [0010]
- 10 • **Zhao, L. et al. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1999**, vol. 121, 9881-9882 [0010]
- **Solenberg, P. et al. *Chem. Biol.*, 1997**, vol. 4, 195-202 [0010]
- 15 • **Madduri, K. et al. *Nature Biotechnology*, 1998**, vol. 16, 69-74 [0010]
- **Doumith, M. et al. *Mol. Microbiol.*, 1999**, vol. 34, 1039-1048 [0010]
- **McNeil et al. *Gene*, 1992**, vol. 111, 61-68 [0054]
- 20 • **Sambrook et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press*, 1989** [0061]
- **Katz et al. *J. Gen. Microbiol.*, 1983**, vol. 129, 2703-2714 [0061]
- 25 • **Hessler et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1997**, vol. 47, 398-404 [0062]
- **Kaneda et al. *J. Biol. Chem.*, 1962**, vol. 237, 322-327 [0062]
- **Yamamoto et al. *J. Antibiot.*, 1986**, vol. 34, 1304-1313 [0062]
- 30 • **Weber et al. *J. Bacteriol.*, 1985**, vol. 164, 425-433 [0062]
- **Rowe et al. *Gene*, 1998**, vol. 216, 215-223 [0062]
- 35 • **Caffrey et al. *FEBS Lett.*, 1992**, vol. 304, 225-228 [0062]
- **Sanger et al. *P.N.A.S. USA*, 1977**, vol. 74, 5463-5467 [0063]
- **Staden, R. *Nucl. Acids Res.*, 1984**, vol. 12, 521-528 [0063]
- 40 • **Devereux et al. *Nucl. Acids Res.*, 1984**, vol. 12, 387-395 [0063]
- **Pereda et al. *Gene*, 1997**, vol. 193, 65-71 [0070]
- 45 • **Gandecha et al. *Gene*, 1997**, vol. 184, 197-203 [0073]
- **Xue et al. *P.N.A.S. USA*, 1998**, vol. 95, 12111-12116 [0074]
- **Fouces et al. *Microbiology*, 1999**, vol. 145, 855-868 [0075]
- 50 • **Hernandez et al. *Gene*, 1993**, vol. 134, 139-140 [0078]
- **Caffrey, P. et al. *FEBS*, 1992**, vol. 304, 225-228 [0128]
- 55 • **Devereux, J. et al. *Nucl Acids Res*, 1984**, vol. 12, 387-395 [0128]
- **Fouces, R. et al. *Microbiol*, 1999**, vol. 145, 855-868 [0128]
- **Gaisser, S. et al. *Mol Gen Genet*, 1997**, vol. 256, 239-251 [0128]
- 60 • **Gaisser, S. et al. *Mol Microbiol*, 2000**, vol. 36, 391-401 [0128]
- **Gandecha, A.R et al. *Gene*, 1997**, vol. 184, 197-203 [0128]
- 65 • **Haydock, S.F. et al. *Mol Gen Genet*, 1991**, vol. 230, 120-128 [0128]
- **Hernandez, C. et al. *Gene*, 1993**, vol. 134, 139-140 [0128]

ES 2 338 212 T3

- **Hessler**, P E. *et al. Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, vol. 47, 398-404 [0128]
- **Kaneda**, T. *et al. J Biol Chem*, 1962, vol. 237, 322-327 [0128]
- 5 • **Katz**, E. *et al. J Gen Microbiol*, 1983, vol. 129, 2703-2714 [0128]
- **Pereda**, A. *et al. Gene*, 1997, vol. 193, 65-71 [0128]
- **Sanger**, F. *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, vol. 74, 5463-5467 [0128]
- 10 • **Staden**, R. *Nucl Acids Res*, 1984, vol. 12, 521-528 [0128]
- **Weber**, J.M. *et al. J Bacteriol*, 1985, vol. 164, 425-433 [0128]
- 15 • **Yamamoto**, H. *et al. J Antibiot*, 1986, vol. 34, 1304-1313 [0128]
- **Xue**, Y. *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, vol. 95, 12111-12116 [0128]
- **Olano** *et al. Mol Gen Genet*, 1998, vol. 259, 299-308 [0128]
- 20 • **Rodríguez** *et al. FEMS Microbiol. Letters*, 1995, vol. 127, 117-120 [0128]
- **Shah** *et al. J Antibiot*, 2000, vol. 53, 502-508 [0128]
- 25 • **Spagnoli** *et al. J Antibiot*, 1983, vol. 36, 365-375 [0128]

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para producir un producto glicosilado híbrido mediante la transferencia de una o varias fracciones de azúcar a una plantilla aglicona, comprendiendo el procedimiento:

a) eliminar o inactivar uno o más genes en una célula huésped de microorganismo implicada en el procesamiento de una plantilla de aglicona endógena de manera que se suprime la producción de un producto natural glicosilado mediante dicha célula huésped de microorganismo;

10 b) transformar dicha célula huésped de microorganismo con ácido nucleico que codifica una glicosiltransferasa (GT), y,

15 c) proporcionar una plantilla de aglicona exógena a la GT de manera que la GT transfiere una o más fracciones de azúcar a la plantilla de aglicona exógena para producir un producto híbrido glicosilado;

en el que una o más de la fracción o fracciones de azúcar, la plantilla de aglicona exógena, la GT o la célula huésped es heteróloga con los otros componentes.

20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la plantilla de aglicona exógena y la fracción o fracciones de azúcar son heterólogas entre sí.

25 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la plantilla de aglicona exógena y/o la fracción o fracciones de azúcar son heterólogas con la célula huésped.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la plantilla de aglicona exógena, la fracción o fracciones de azúcar y la GT son heterólogas con la célula huésped.

30 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la célula huésped se transforma con un gen o genes para producir la fracción de azúcar.

35 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que también comprende la utilización de un enzima para modificar la fracción de azúcar y/o la plantilla de aglicona, ya sea antes o después de la unión de la fracción de azúcar a la plantilla de aglicona.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la enzima es una metiltransferasa.

40 8. Procedimiento según la reivindicación 6 o reivindicación 7, en el que la célula huésped se transforma con un gen heterólogo que codifica dicha enzima.

9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el plantilla de aglicona exógena se selecciona del grupo que consiste en un poliquétido, un poliquétido-péptido mixto y un péptido.

45 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que también comprende eliminar o inactivar uno o más genes en las células huésped de microorganismo que participan en la producción de la plantilla de aglicona endógena, suprimiendo o alterando así la producción de la plantilla o producto de aglicona endógena.

50 11. Producto glucosilado híbrido seleccionado del grupo consistente en:

(a) una o más ramnosa o azúcares de ramnosa sustituidos unidos a un tilactona;

(b) una o más micarosa o azúcares de micarosa sustituidos unidos a un eritronolido o una eritromicina;

55 (c) una o más micaminosa o azúcares de micaminosa sustituidos unidos a un eritronolido, una eritromicina, o una tilactona;

(d) una o más glucosa o azúcares de glucosa sustituidos unidos a una tilactona;

60 (e) una o más desosaminosa o azúcares de desosaminosa sustituidos unidos a una tilactona;

(f) combinaciones de (b) y (c) sobre un eritronolido o una eritromicina, y

65 (g) las combinaciones (a), (c), (d) y (e) en una tilactona.

ES 2 338 212 T3

12. Compuesto seleccionado entre el grupo formado por:

3-O-(2'-O-metilramnosil) eritronolido B,

5 3-O-(2',3'-bis-O-metilramnosil) eritronolido B,

3-O-(2',3',4'-tris-O-metilramnosil) eritronolido B,

10 8a-hidroxi-3-O-micarosil eritronolido B,

8,8a-epoxi-3-O-micarosil eritronolido B,

8,8a-dehidro-6-deoxieritronolido B,

15 8-hidroxi-6-deoxieritronolido B,

3-O-(2'-O-metilramnosil) eritromicina D,

20 3-O-(2',3'-bis-O-metilramnosil) eritromicina D,

3-O-(2',3',4'-tris-O-metil ramnosil) eritromicina D,

5-O-micaminosil-(4'-O-micarosil-)eritromicina A,

25 5-O-glucosilo-tilactona,

23-O-ramnosil 5-O-tilactona micaminosil,

30 5-O(2'-O)-bis-glucosilo-tilactona,

3-O-ramnosil-8,8a-dehidro-6-deoxieritronolido B,

3-O-ramnosil-8,8a-dihidroxi-B eritronolido,

35 3,5 di-O-micarosil eritronolido B,

3-O-ramnosil-8,8 bis dihidroxi-6-deoxieritronolido B,

8,8a-epoxi-3-O-ramnosileritronolido B,

40 8,8a-hidroxi -3-O-micarosileritronolido B,

3-O-(2',3'-bis-O-metilramnosil)-6-deoxieritronolido B,

45 3-O-(2'-O-metilramnosil)-6-deoxieritronolido B,

5-O-micaminosileritromicina A,

23-hidroxi-5-O-micaminosil tilactona,

50 8,8a-epoxi-6-deoxieritronolido B, y

8,8a dihidroxi-6-deoxieritronolido B.

55

13. Compuesto según la reivindicación 12, en el que el compuesto es 3,5 di-O-eritronolido micarosil B.

14. Célula de microorganismo huésped, en la que uno o más genes implicados en el procesamiento de una plantilla de aglicona endógena se han eliminado o inactivado de tal manera que se suprime la producción de un producto endógeno glicosilado, y en la que dicha célula huésped se transforma con ácido nucleico que codifica una glucosil-transferasa (GT), en el que la GT es heteróloga de la célula huésped y transfiere una o más fracciones de azúcar en una plantilla de aglicona exógena se proporcionan a las células para producir un producto híbrido glicosilado, y en la que la célula huésped también se transforma con uno o más genes auxiliares que comprenden un gen de vía de azúcar que codifica una proteína implicada en la biosíntesis de una fracción de azúcar, permitiendo así que una célula huésped transformada con el casete de expresión produzca fracciones de azúcar para su posterior transferencia a una plantilla de aglicona exógena.

60

65

ES 2 338 212 T3

15. Célula huésped según la reivindicación 14, en la que uno o más genes implicados en la producción de una plantilla de aglicona endógena se han eliminado o inactivado de tal manera que se suprime la producción de una plantilla de aglicona endógena.
- 5 16. Célula huésped según la reivindicación 14 ó 15, en la que los genes auxiliares comprenden una enzima para modificar la fracción de azúcar y/o la plantilla de aglicona exógena, antes o después de la unión de la fracción de azúcar con la plantilla de aglicona exógena.
- 10 17. Célula huésped según la reivindicación 16, en la que la enzima es una metiltransferasa.
18. Célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, que es una cepa de actinomiceto.
- 15 19. Célula huésped según la reivindicación 18, en la que la cepa de actinomiceto se seleccionada del grupo formado por *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces griseofuscus*, *Streptomyces cinnamomensis*, *Streptomyces fradiae*; *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces hygrosopicus*, *Micromonospora griseorubida*, *Streptomyces lasaliensis*, *Streptomyces venezuelae*, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces albus*, *Amocolatopsis mediterranei*, y *Streptomyces tsukubaensis*.
- 20 20. Procedimiento para producir un producto híbrido glucosilado, comprendiendo el procedimiento:
- cultivar la célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 22, en el que la célula huésped está provista de una plantilla de aglicona exógena, y
- 25 aislar el producto así producido.
21. Procedimiento para producir una librería que comprende una pluralidad de productos híbridos glicosilados, comprendiendo el procedimiento:
- 30 a) eliminar o inactivar uno o más genes en una célula huésped de microorganismo implicada en el procesamiento de una plantilla de aglicona endógena de manera que se suprime la producción de un producto natural glicosilado mediante dicha célula huésped de microorganismo;
- 35 b) transformar dicha célula huésped de microorganismo con ácido nucleico que codifica una o más glucosiltransferasas (GT); y
- c) proporcionar una o más plantillas de aglicona exógena a las GTs de manera que las GTs transfieren una o más fracciones de azúcar a la plantilla de aglicona exógena para producir dicha pluralidad de productos híbridos glicosilados;
- 40 en el que uno o más de la fracción o fracciones de azúcar, la plantilla de aglicona exógena, la glicosiltransferasa o las células huésped es heteróloga con los otros componentes.
- 45 22. Procedimiento según la reivindicación 21, en el que la célula huésped también se transforma con uno o más genes auxiliares.
- 50 23. Procedimiento según la reivindicación 22, en el que dicho uno o más genes auxiliares comprenden un gen de vía de azúcar que codifica una proteína implicada en la biosíntesis de una fracción de azúcar, lo que permite que una célula huésped transformada con el casete de expresión produzca fracciones de azúcar para su posterior transferencia a la plantilla de aglicona exógena.
- 55 24. Procedimiento según las reivindicaciones 21 ó 23, en el que los genes auxiliares comprenden una enzima para modificar la fracción de azúcar y/o la plantilla de aglicona exógena, antes o después de la unión de la fracción de azúcar a la plantilla de aglicona exógena.
- 60 25. Procedimiento según la reivindicación 24, en el que la enzima es una metiltransferasa.
26. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, que también comprende cribar la librería para un producto híbrido glucosilado que tiene una característica deseada.
- 65 27. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26, que también comprende aislar una célula huésped que produce un producto glicosilado híbrido deseado.
28. Procedimiento según la reivindicación 27, que también comprende cultivar las células huésped y aislar el producto glicosilado híbrido así producido.

ES 2 338 212 T3

29. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 28, en el que la biosíntesis endógena de poliquétidos se suprime mediante la mutación, supresión o inactivación de uno o más de los genes PKS presentes de forma natural en las células.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig.1A.

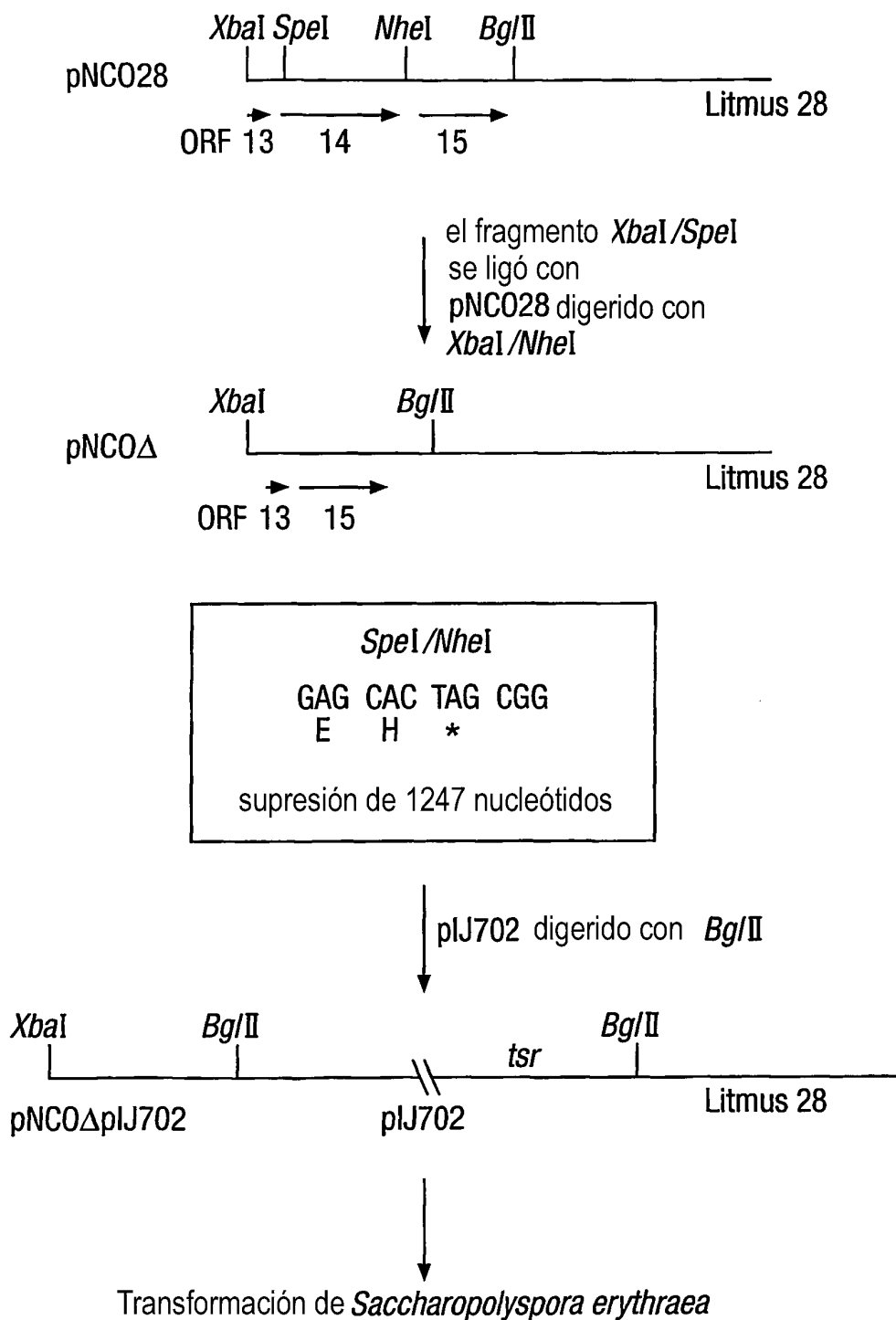
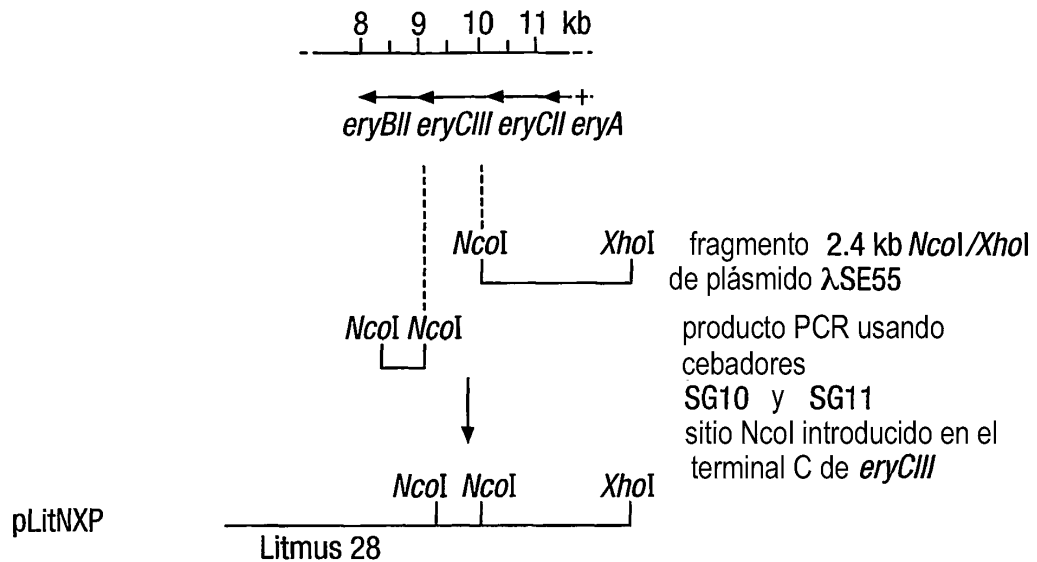


Fig.1B.



| | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------|
| | <i>NcoI</i> | | | | | | | | | | | | |
| ... | GAC | GAC | CAT | GGA | GGA | GAA | GAC | GAC | GCG | CAT | CGC | GGT | TAC |
| ... | CTG | CTG | GTA | CCT | CCT | CTT | CTG | CTG | CGC | GTA | GCG | CCA | ATG |
| ... | V | V | M | S | S | F | V | V | R | M | | | |
| | | | | | | | | | | | | | EryCIII |
| | supresión de 1191 nucleótidos | | | | | | | | | | | | |

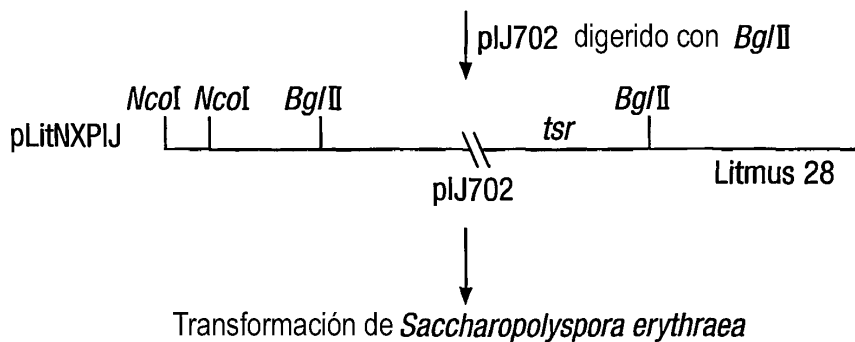


Fig.2.

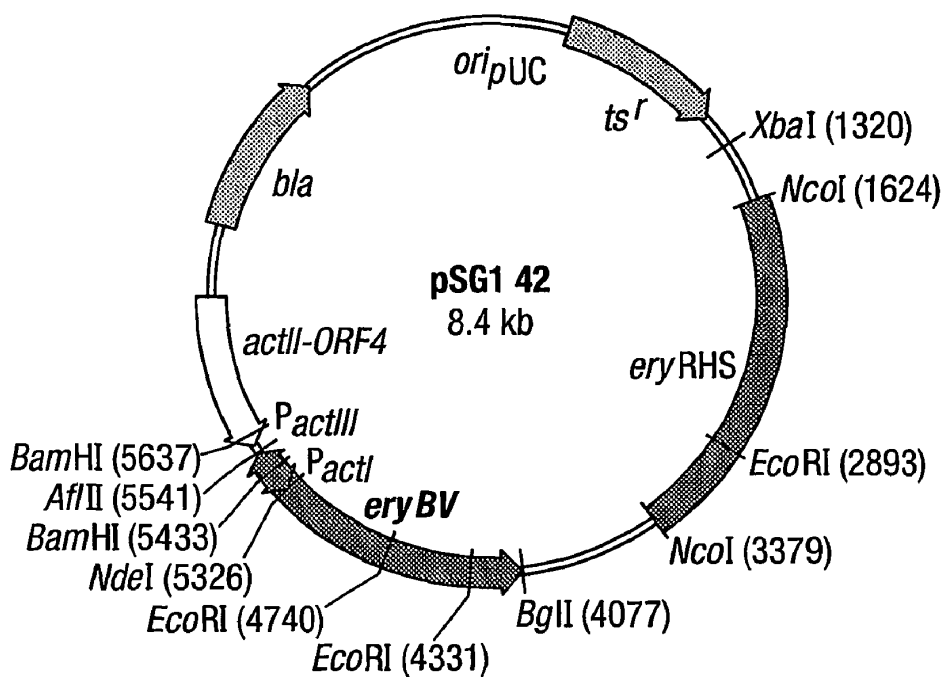


Fig.3.

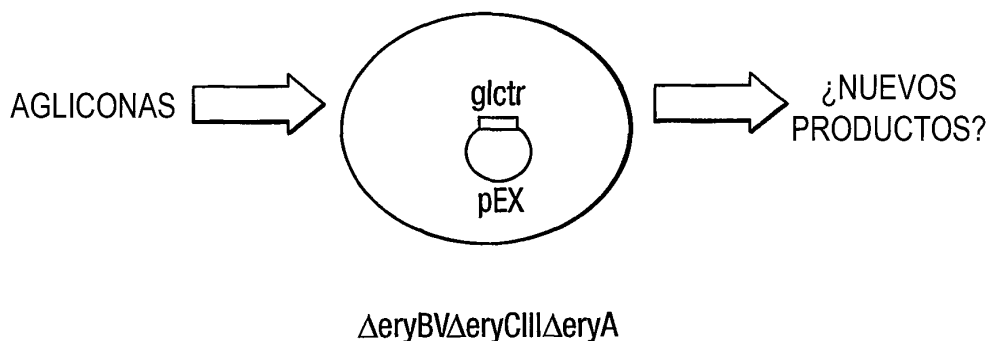
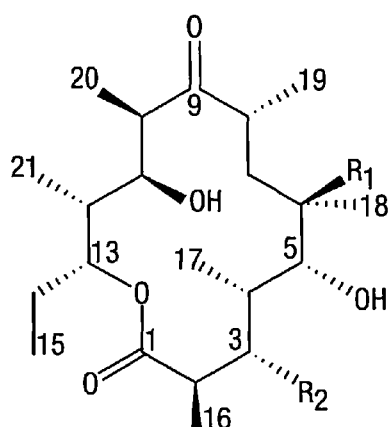


Fig.4.



R₁=OH

R₂=OH

Eritronolido B

R₁=H

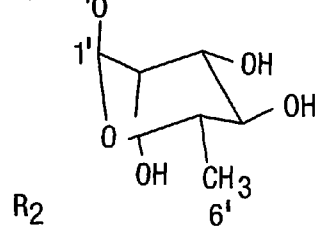
R₂=OH

6-Deoxieritronolido B

R₁=OH

R₂

3-O-Ramnosil-eritronolido B



R₁=H

R₂

3-O-Ramnosil-6-deoxieritronolido B

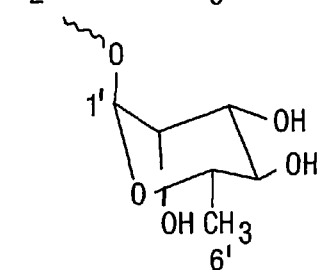
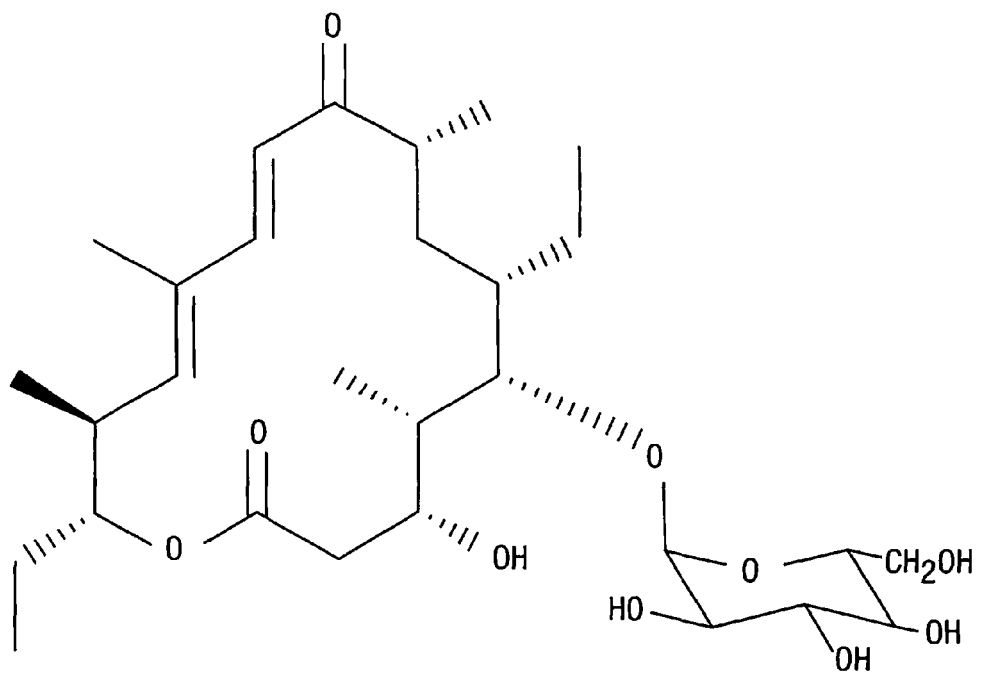


Fig.5B.



5-O-Glucosil-tilactona

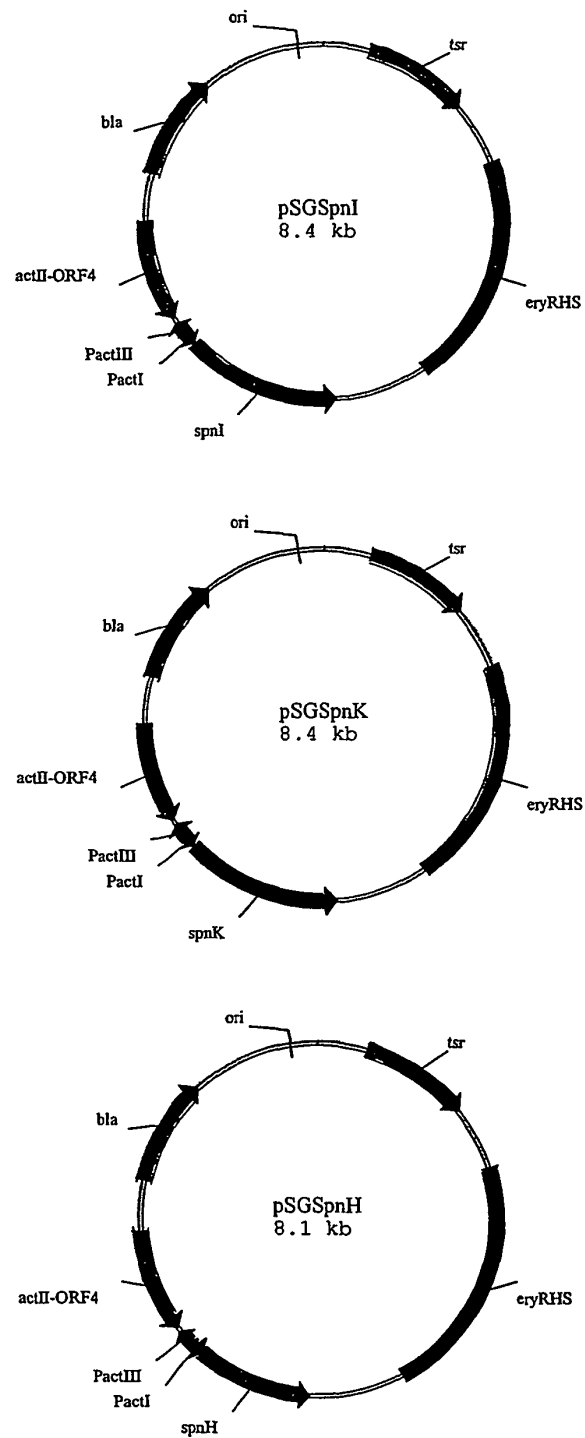


Fig. 6

ES 2 338 212 T3

```

403 CATGGCGGGGAAGATCGGGCCGTTTCGACATTGTCATCGACGACGGCAGCC 354
||||| ||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
17344 CATGGTGGCGAAGATCGGCCCGTTTCGACATTGTCATCGACGACGGCAGCC 17393

353 ATGTCAACGACCACGTCAAGAAATCCTTCCAATCCCTGTTTCCGCACGTC 304
||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
17394 ATGTCAACGACCACGTCAAGAAATCCTTCCAATCCCTGTTTCCGCACGTC 17443

303 CGCCCAGGTGGTTTGTACGTCATCGAGGATCTCCAGACGGCGTACTGGCC 254
||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
17444 CGCCCAGGTGGTTTGTACGTCATCGAGGATCTCCAGACGGCGTACTGGCC 17493

253 CGGCTACGGCGGTTCGCGATGGGGAACCCGCGGCCAGCGCACCTCGATCG 204
||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
17494 CGGCTACGGCGGTTCGCGATGGGGAACCCGCGGCCAGCGCACCTCGATCG 17543

203 ACATGCTCAAAGAACTGATCGACGGCCTGCATTATCAGGAGCGCGAATCG 154
||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
17544 ACATGCTCAAAGAACTGATCGACGGCCTGCATTATCAGGAGCGCGAATCG 17593

153 CGGTGCGGGACCGAGCCCTCCTACACGGAACGGAACTGGCGGCCCTGCA 104
||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
17594 CGGTGCGGGACCGAGCCCTCCTACACGGAACGGAACTGGCGGCCCTGCA 17643

103 CTTCTACCACAACCTGGTATTCGTGGAGAAAGGGCTCAACGCTGAGCCTG 54
||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
17644 CTTCTACCACAACCTGGTATTCGTGGAGAAAGGGCTCAACGCTGAGACTG 17693

1 MSEIIVAPWSVVERLLLAAGAGPAKLQEAQVAVGLDAVADAIIVDELVVRC 50
||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
1 MSEIIVAPWSVVERLLLAAGAGPAKLQEAQVAVGLDAVADAIIVDELVVRC 50

51 DPLSLDESVRIGLEITSGAQLVRRITVELDHAGLRLLAAVAAAVALRFDV 100
||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
51 DPLSLDESVRIGLEITSGAQLVRRITVELDHAGLRLLAAVAAAVALRFDV 100

101 DLLEGLFGPVDGRRHNSREVRWSDSMTQFSPDQLAGAQRLLAFRNRVST 150
||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
101 DLLEGLFGPVDGRRHNSREVRWSDSMTQFSPDQLAGAQRLLAFRNRVST 150

151 AVHAVLAAAATRDLGALAVRYGSDKWADLHWYTEHYEHHSRFDAPV 200
||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
151 AVHAVLAAAATRDLGALAVRYGSDKWADLHWYTEHYEHHSRFDAPV 200

201 RVLEIGIGGYHAPELGGASLRMWQRYFRRLVYGLDIFEKAGNEGHRVRK 250
||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
201 RVLEIGIGGYHAPELGGASLRMWQRYFRRLVYGLDIFEKAGNEGHRVRK 250

251 LRGDQSDAEFLEDMAKIGPFDIVIDDGSHVNDHVKKSFOQLFPHVRPVG 300
||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
251 LRGDQSDAEFLEDMAKIGPFDIVIDDGSHVNDHVKKSFOQLFPHVRPVG 300

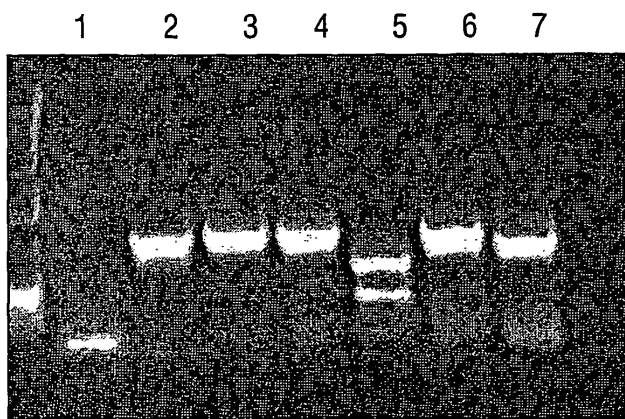
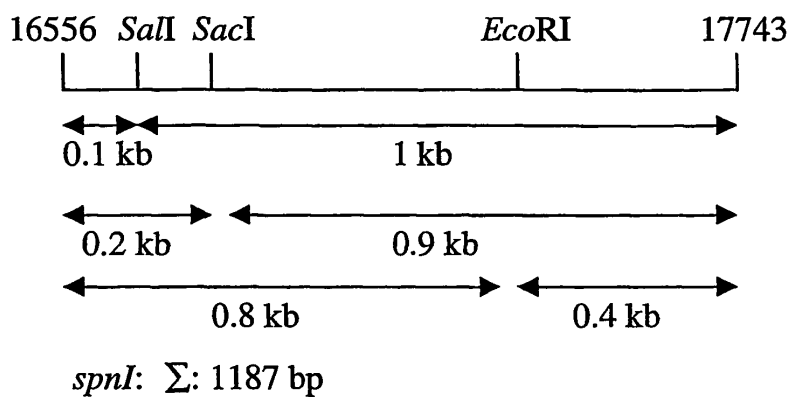
301 LYVIEDLQTAYWPGYGGRDGEPAAQRTSIDMLKELIDGLHYQERESRCGT 350
||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
301 LYVIEDLQTAYWPGYGGRDGEPAAQRTSIDMLKELIDGLHYQERESRCGT 350

351 EPSYTERNVAALHFYHNLVFEKGLNAEPAAPGFVPRQALGVEGG 395
||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
351 EPSYTERNVAALHFYHNLVFEKGLNAEPAAPGFVPRQALGVEGG 395

```

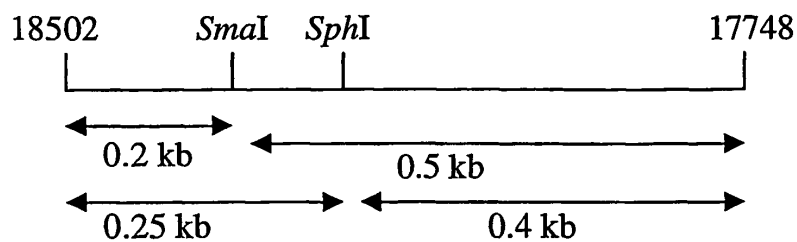
Figura 6B

Fig.7.

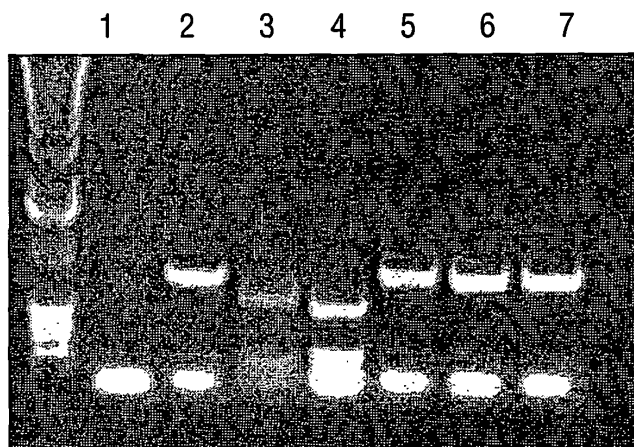


- 1: Control ADN genómico SGT2 y cebadores: no producto PCR
- 2: SGT2pSGSpnI: no digerido
- 3: SGT2pSGSpnI: *SmaI* digerido
- 4: SGT2pSGSpnI: *SphI* digerido
- 5: SGT2pSGSpnI: *EcoRI* digerido
- 6: SGT2pSGSpnI: *SacI* digerido
- 7: SGT2pSGSpnI: *SalI* digerido

Fig.9.



spnH Σ : 754 bp



- 1: Control ADN genómico SGT2 y cebadores: no producto PCR
- 2: SGT2pSGSpnH: no digerido
- 3: SGT2pSGSpnH: *SmaI* digerido
- 4: SGT2pSGSpnH: *SphI* digerido
- 5: SGT2pSGSpnH: *EcoRI* digerido
- 6: SGT2pSGSpnH: *SacI* digerido
- 7: SGT2pSGSpnH: *SalI* digerido

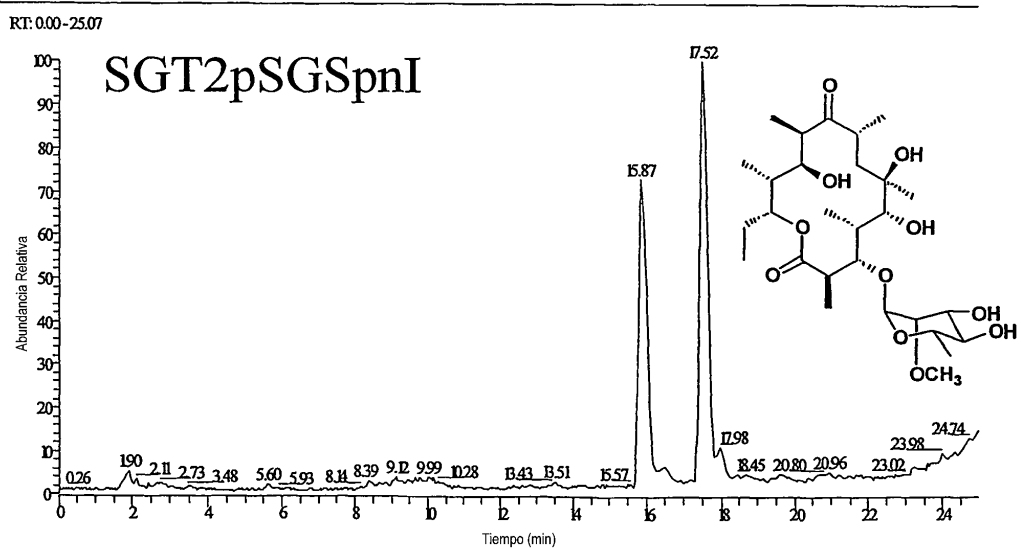
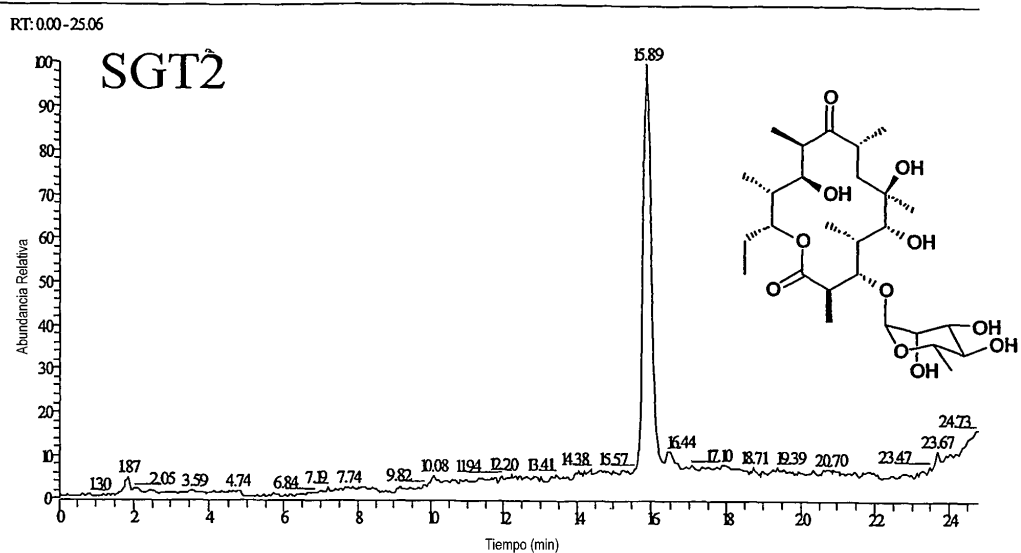
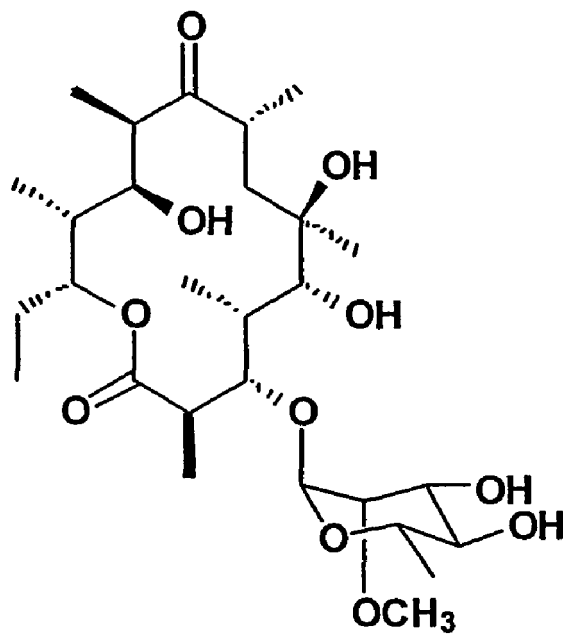


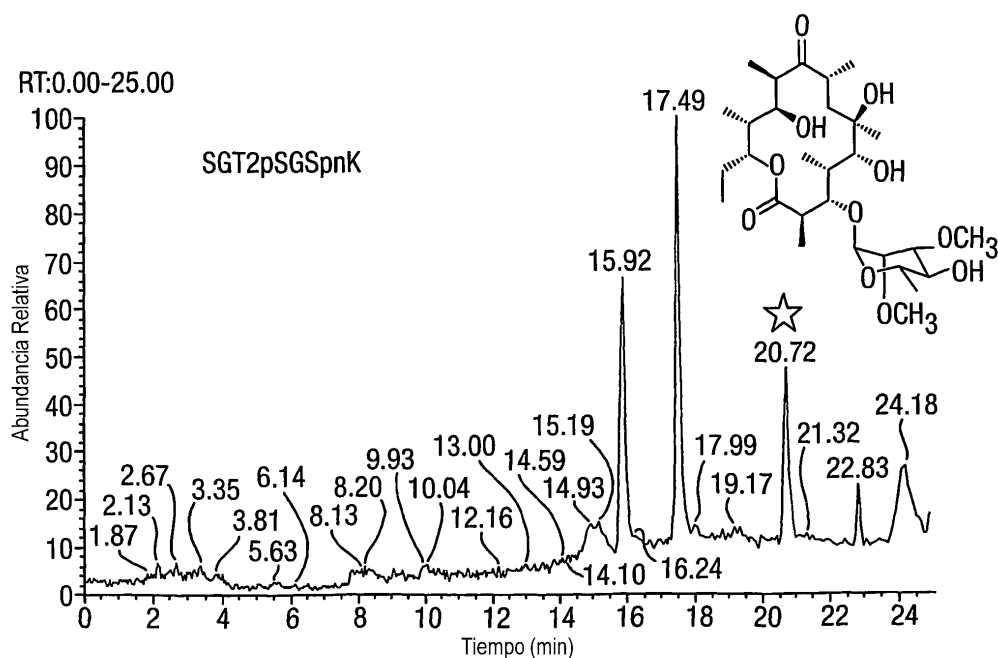
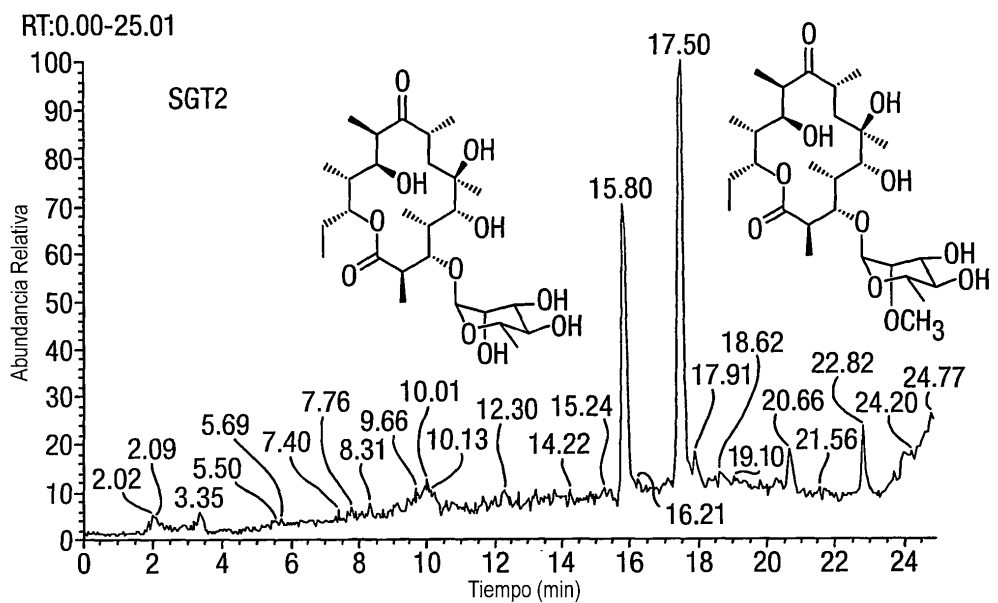
Fig. 10



3-O-(2'-O-metilramnosil)eritronolido B

Fig. 11

Fig.12.



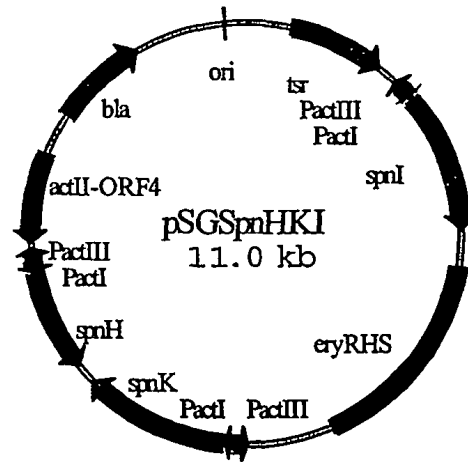
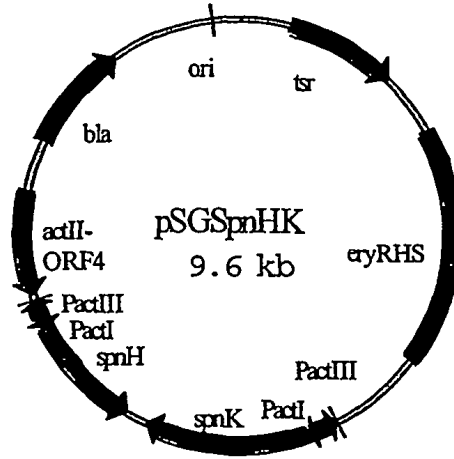
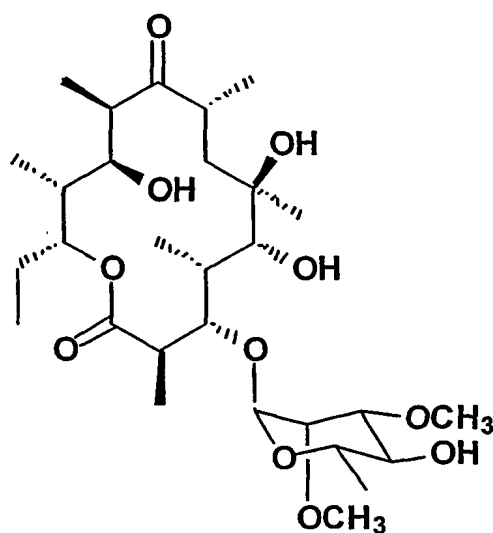
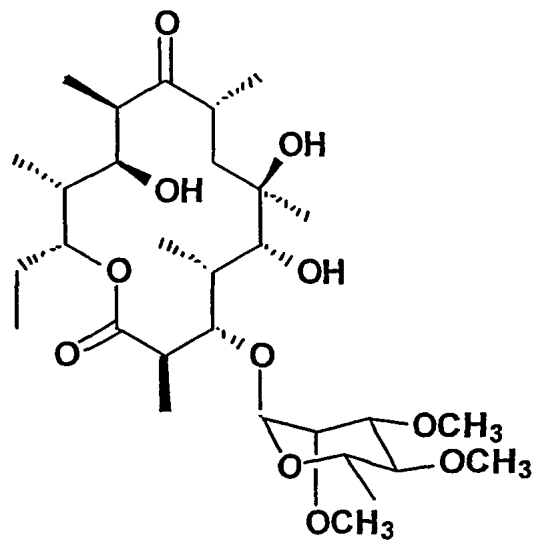


Fig. 13



3-O-(2',3'-bis-O-metilramnosil)eritronolido B

Fig. 14



3-O-(2',3',4'-tris-O-metilramnosil)eritronolido B

Fig. 15

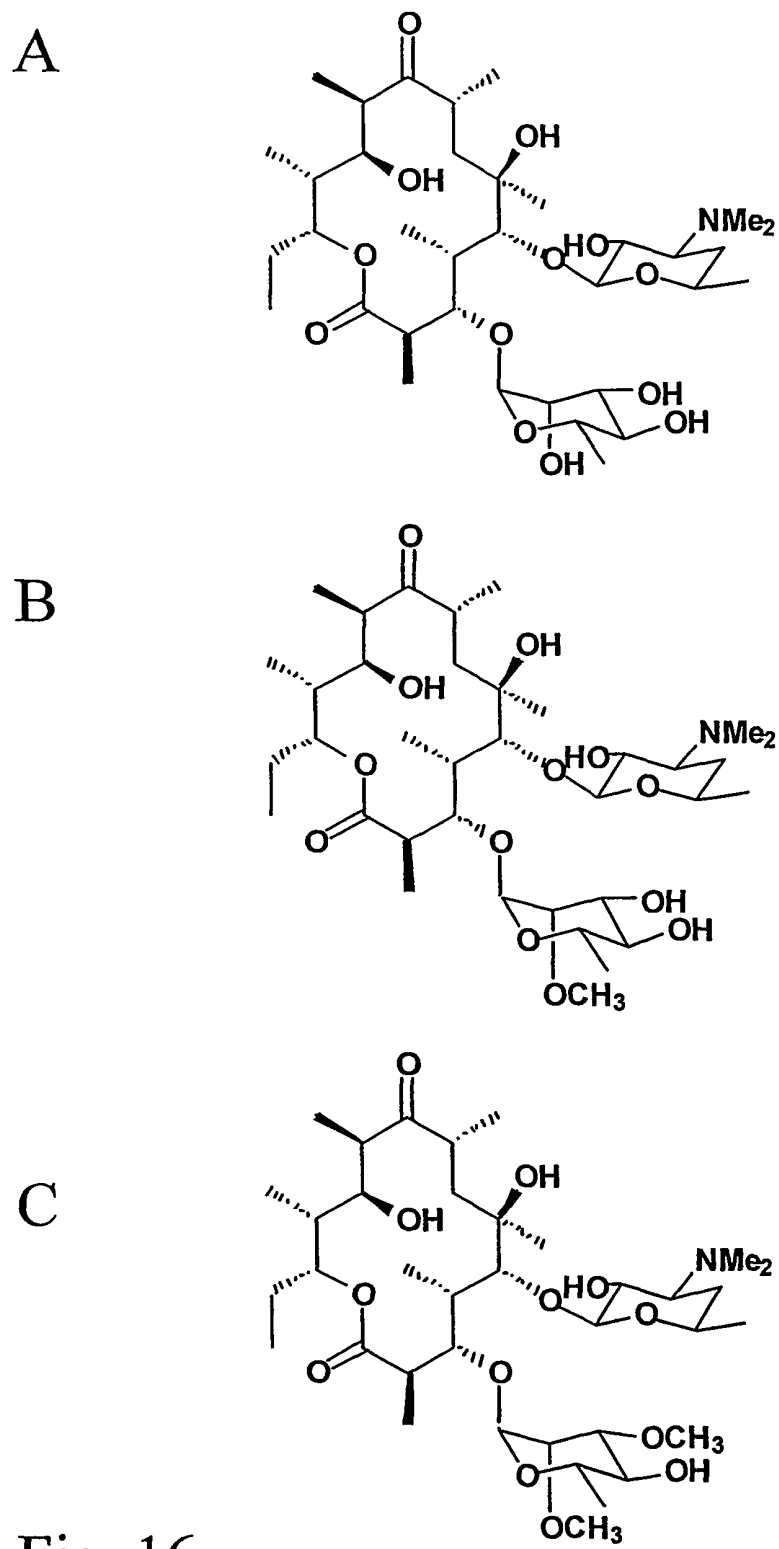
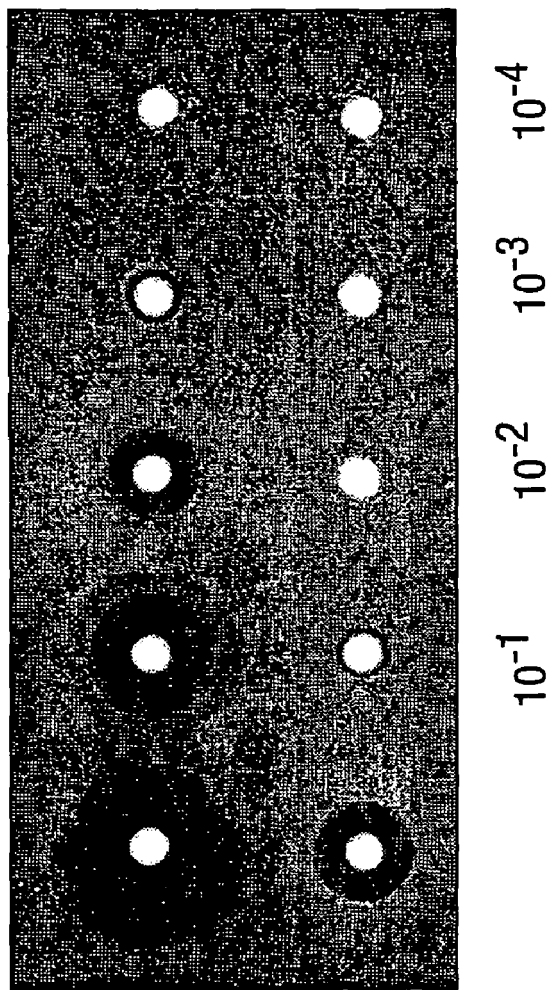


Fig.17.



Eritromicina A

3-O-(2'-Metilramnosil) Eritromicina D

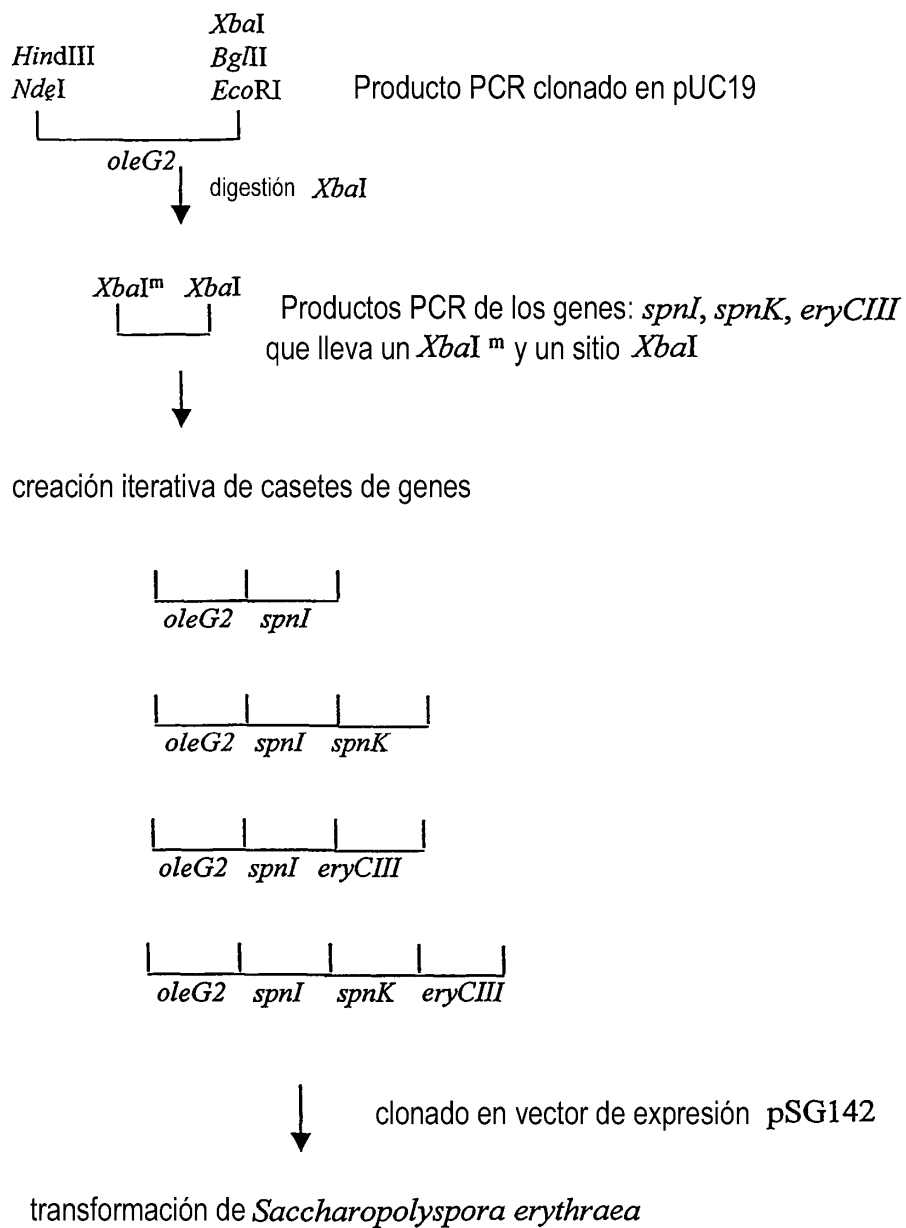
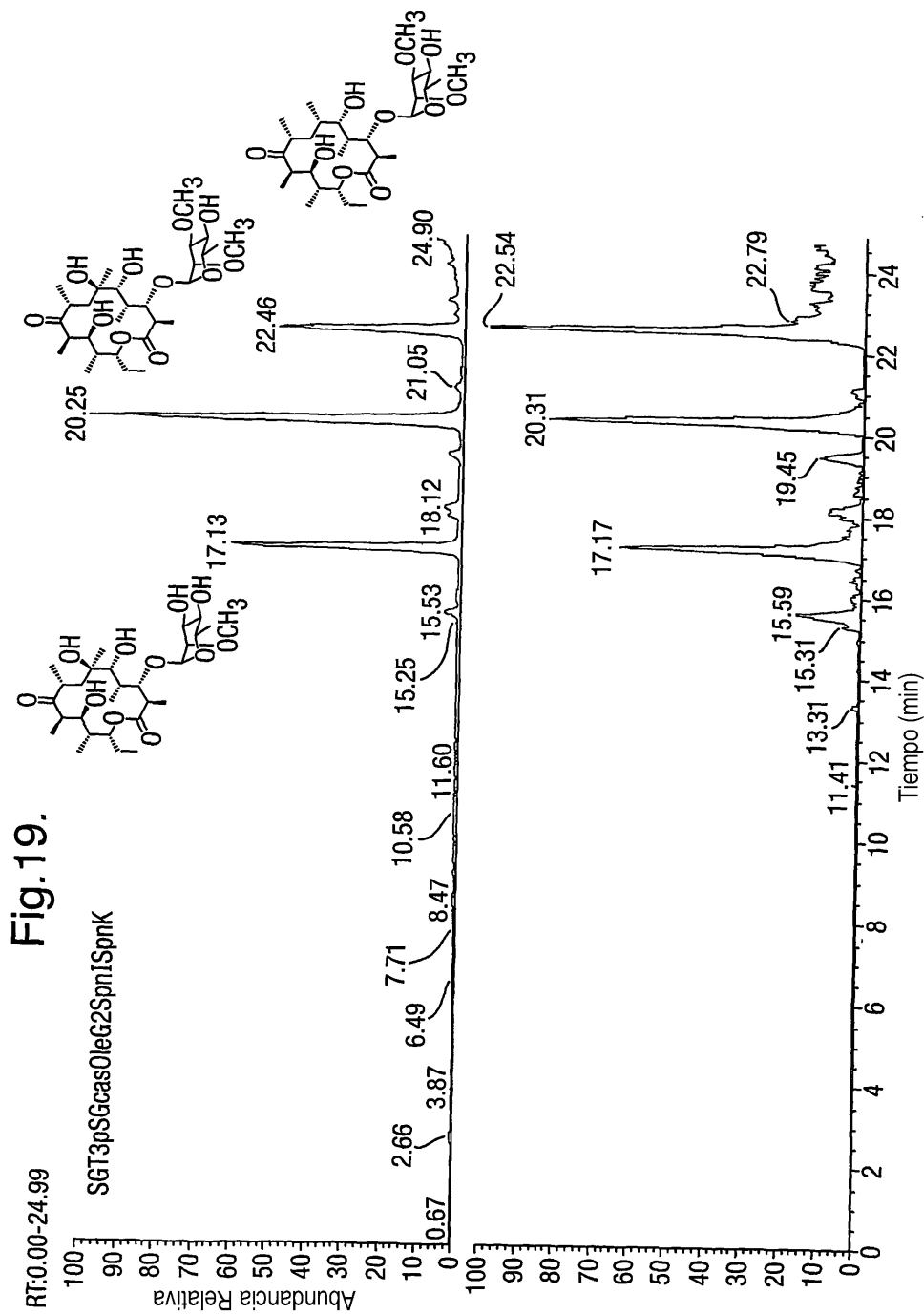
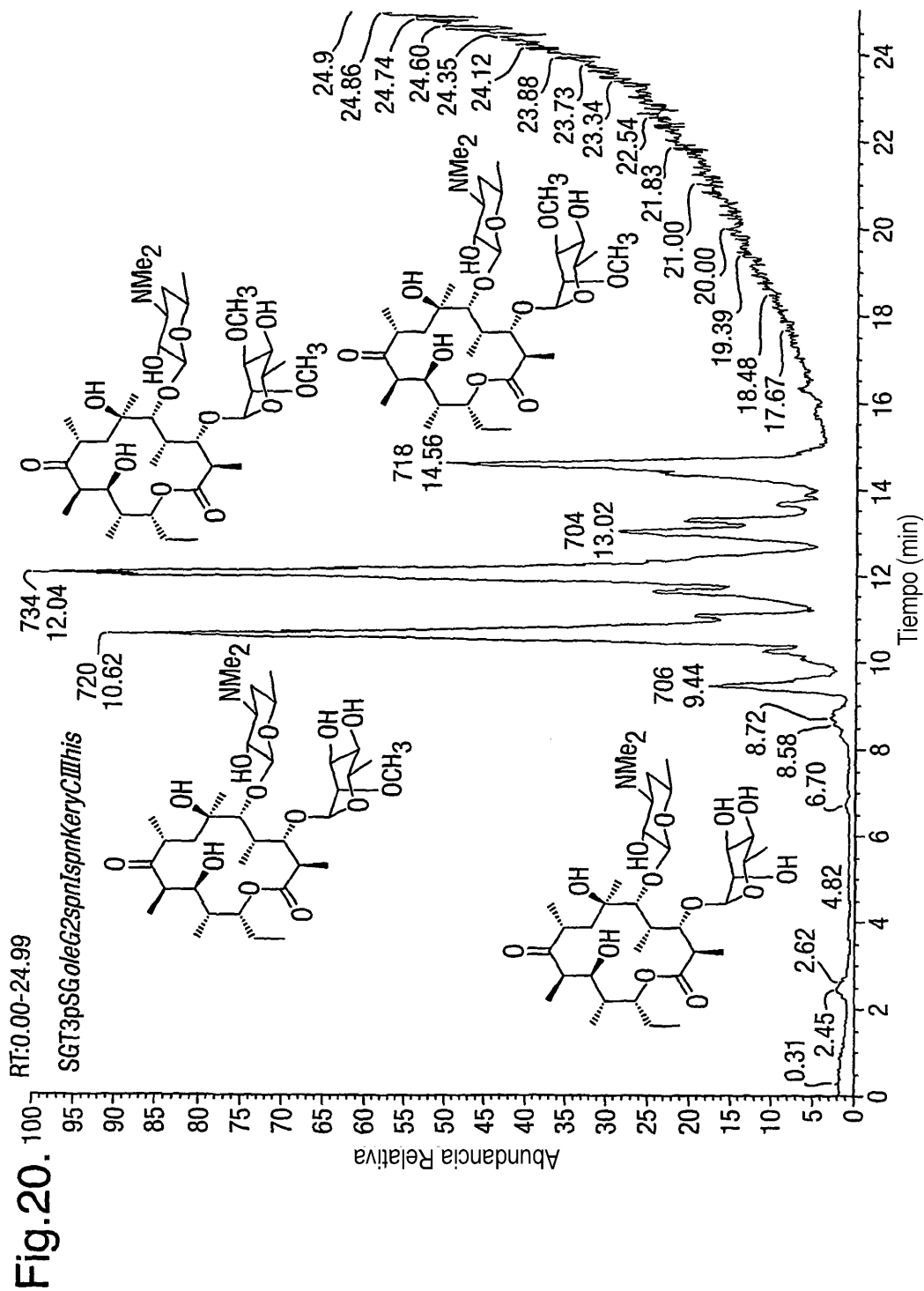
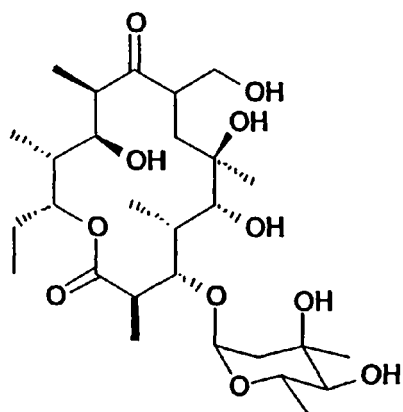


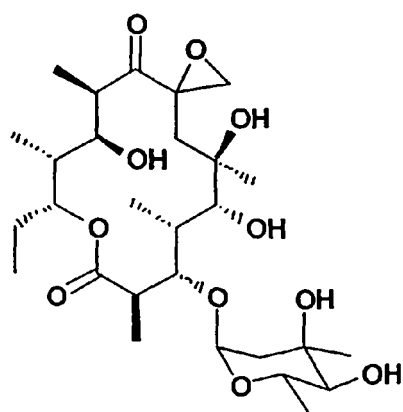
Fig. 18







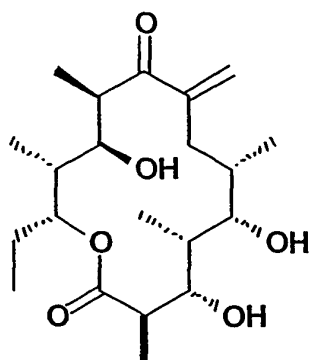
8a-hidroxi-3-O-micarosil eritronolido B



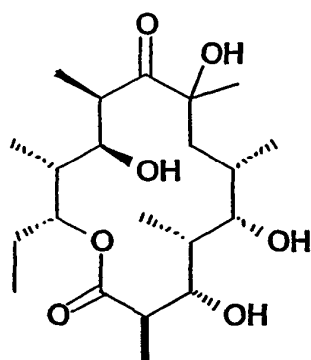
8,8a-epoxi-3-O-micarosil eritronolido B

Fig. 21

ES 2 338 212 T3

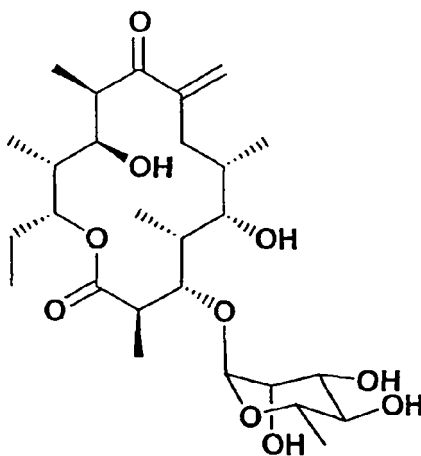


8,8a-dehidro-6-deoxieritronolido B

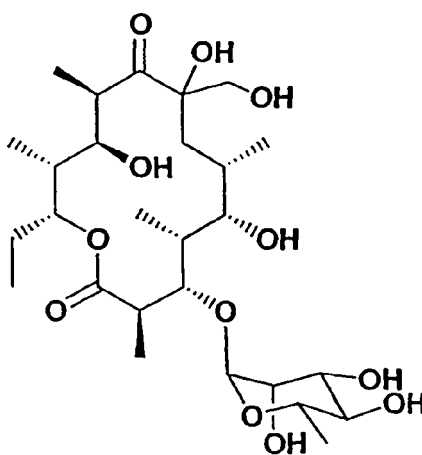


8-hidroxi-6-deoxieritronolido B

Fig. 22



3-O-ramnosil-8,8a-dehidro-6-deoxieritronolido B



3-O-ramnosil-8,8a-dihidroxi-6-deoxieritronolido B

Fig. 24

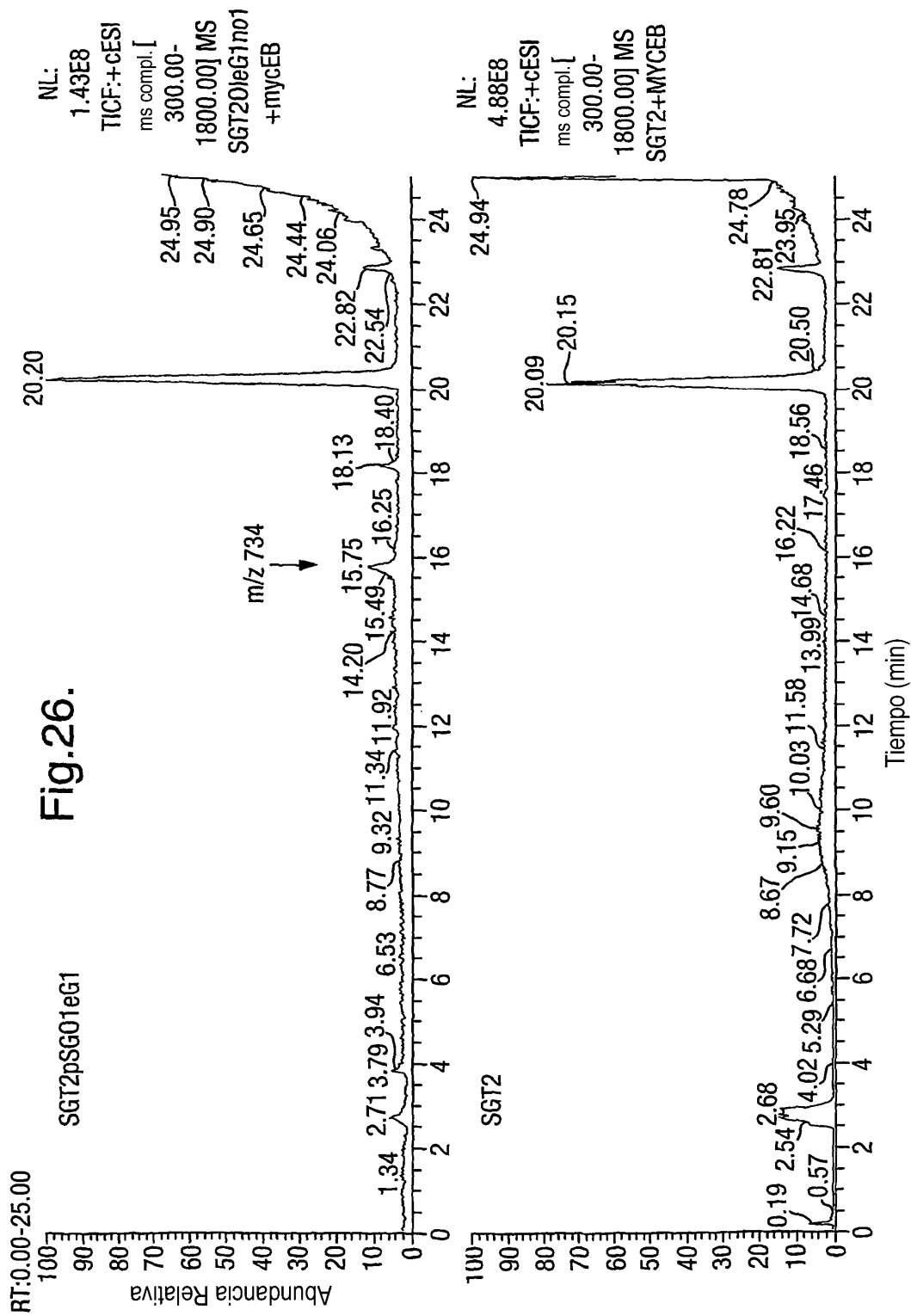
ES 2 338 212 T3

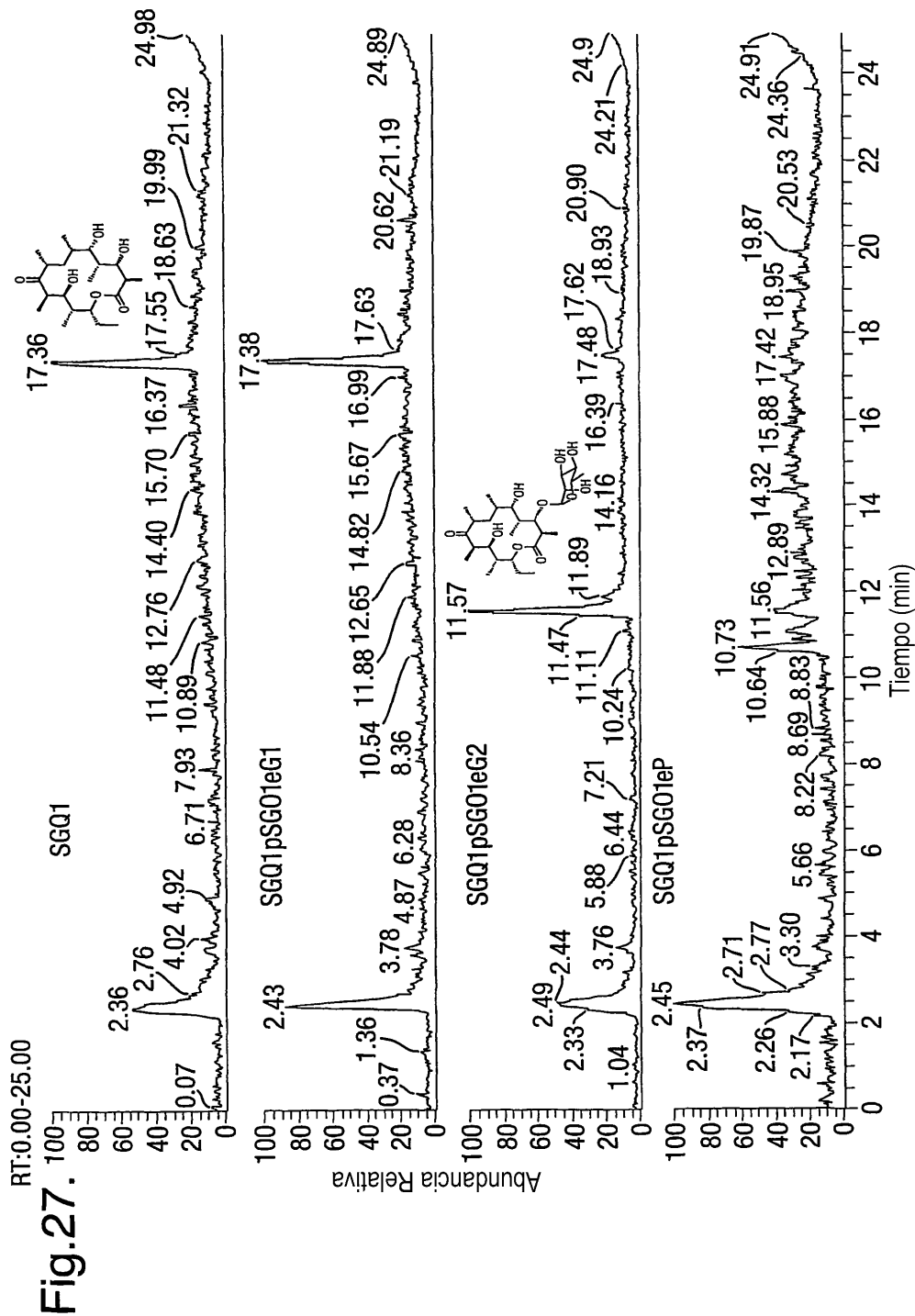
```

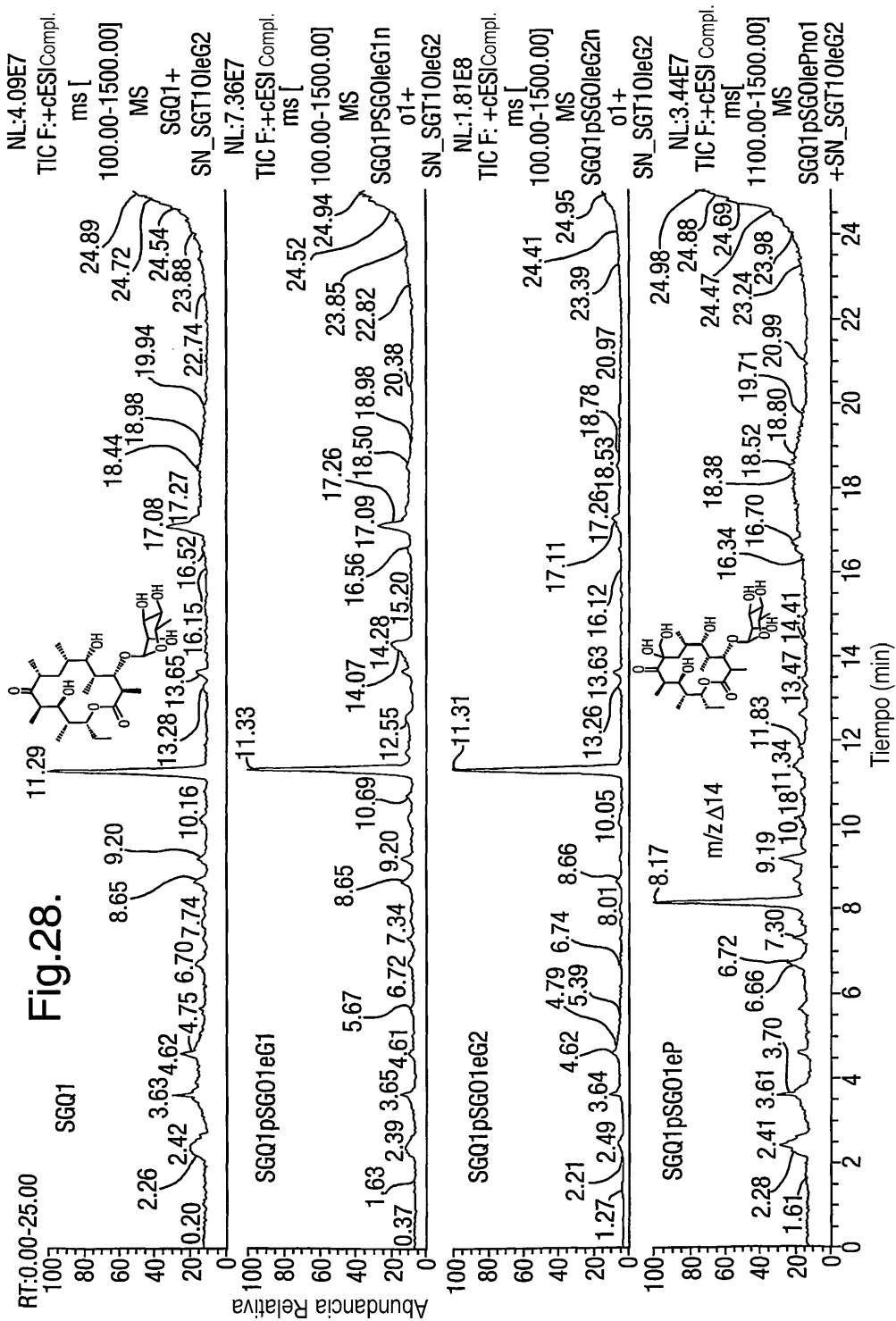
      CCCC GGCTGACGGCGGGACCCGTCGTACGACGGCGGCGTTCCCTGTCGTCGGCGGG
1300 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1359
      GGGGCCGACTGCCGCCGCCCTGGCAGCATGCTGCCGCCGCAAGGGACAGCAGCCGCC
a      P R L T A A G P V V R R R R S P V V G G -
      CITOCROMO P450 MONOOXIGENASA OLEP1
      CTGCACCGGGCTCCGGTGGCCGCCGATGAGCATCGCGTCGAACGGCGCGCTCGGCC
1360 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1419
      GACGTGGCCCGAGGCCACCGGCGGCGTACTCGTAGCGCAGCTTGCCGCGCGAGCCGGG
a      L H R A P V A A A *
c      A P G S G G R R M S I A S N G A R S A P -
      CCCGCCGCCCTGCGCGTGATGATGACCACCTTCGCGGCCAACACGCACTTCCAGCCGC
1420 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1479
      GGGCGGCCGGGACGCGCACTACTACTGGTGGGAAGCGCGGTTGTGCGTGAAGGTCGGCG
c      R R P L R V M M T T F A A N T H F Q P L -
      INICIO OLEG1 (PUBLICADO)
      TGGTCCCCCTGGCCTGGGCAC
1480 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1500
      ACCAAGGGGACCGGACCCGTG
c      V P L A W A -

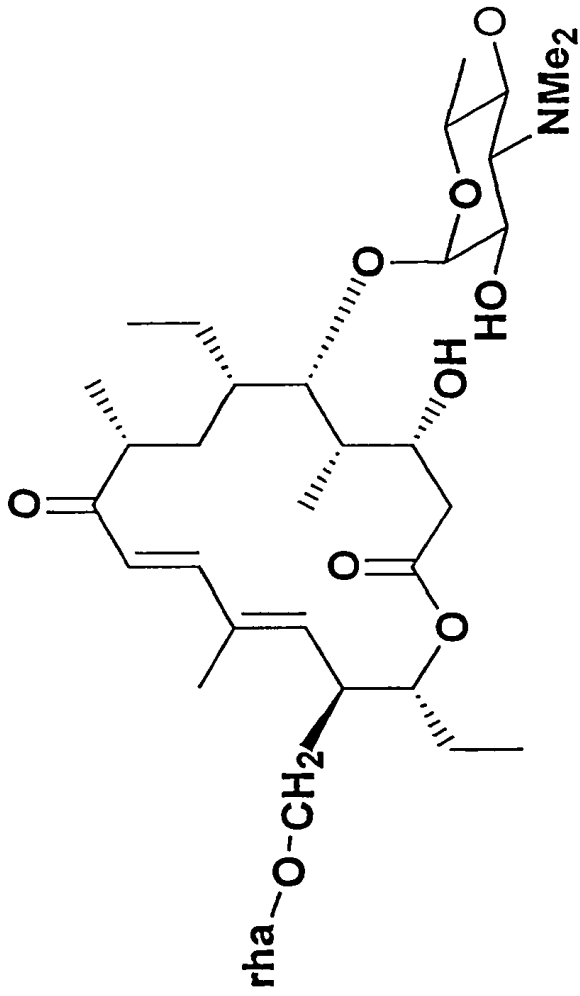
```

Fig. 25





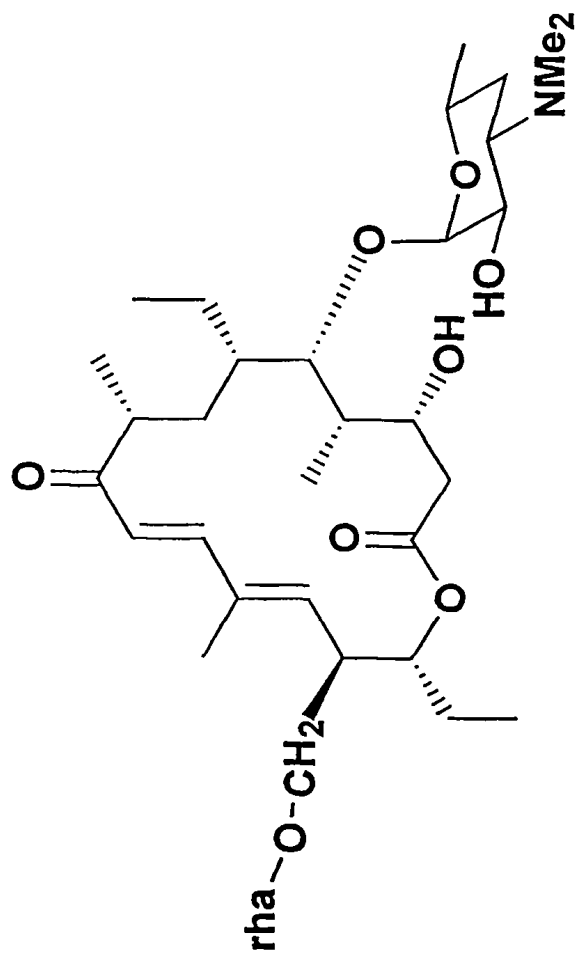




23-O-ramnosil-5-O-micaminosil-tilactona

rha = ramnosa

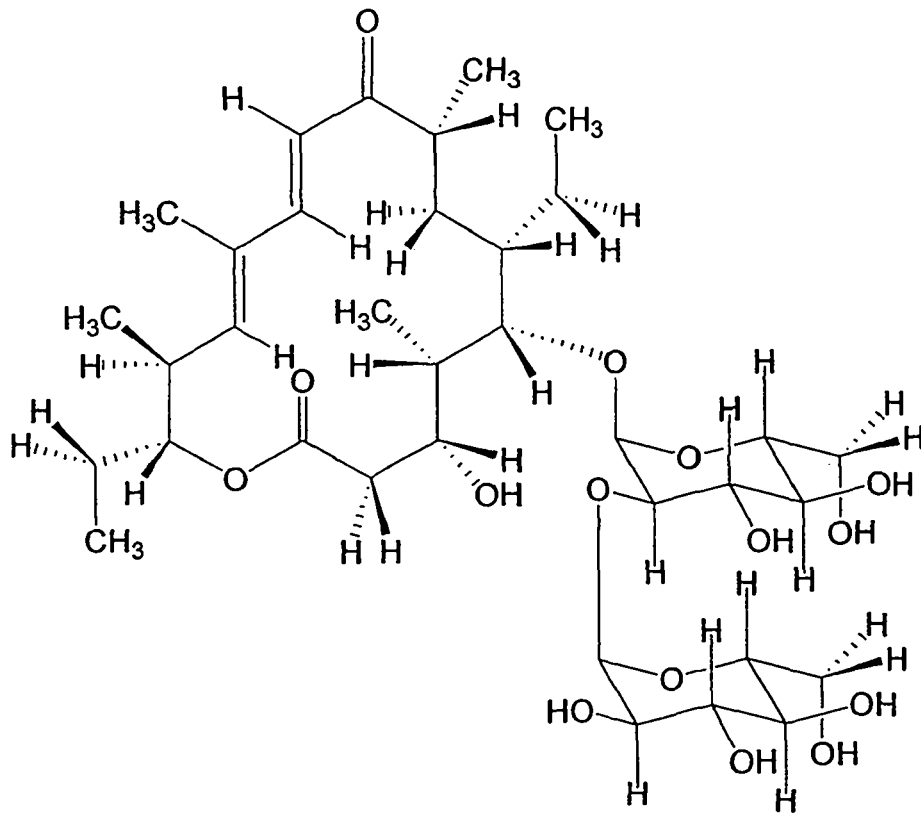
Figura 29



23-O-ramnosil-5-O-desosaminil-tilactona

rha = ramnosa

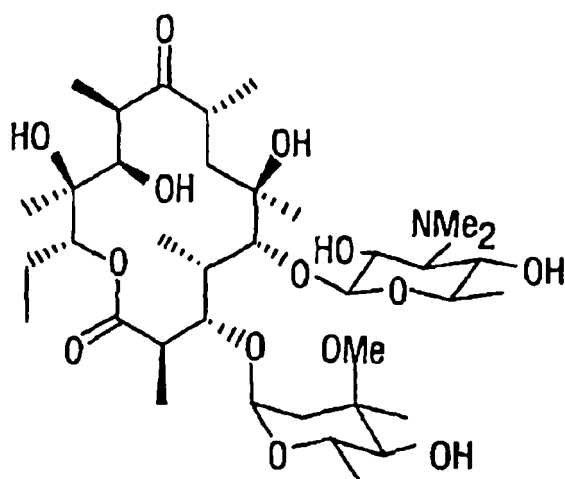
Figura 30



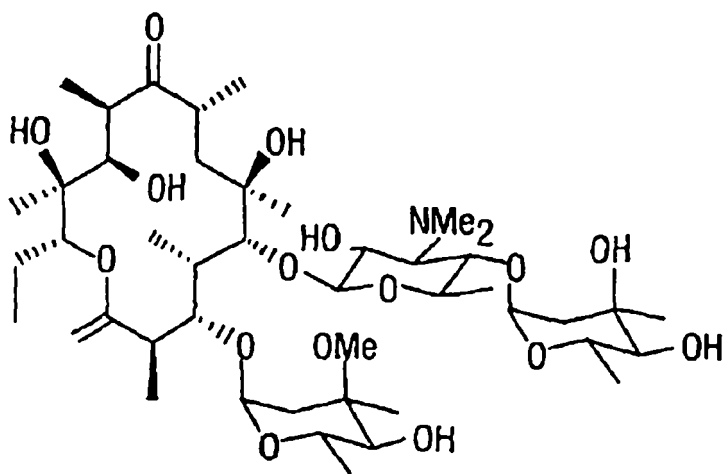
5-O-(2'-O)-bis-glucosil-tilactona

Fig.31

Fig.32.



5-O-micaminosil-erythromicina A



5-O-micaminosil-(4'-O-micarosil)-erythromicina A

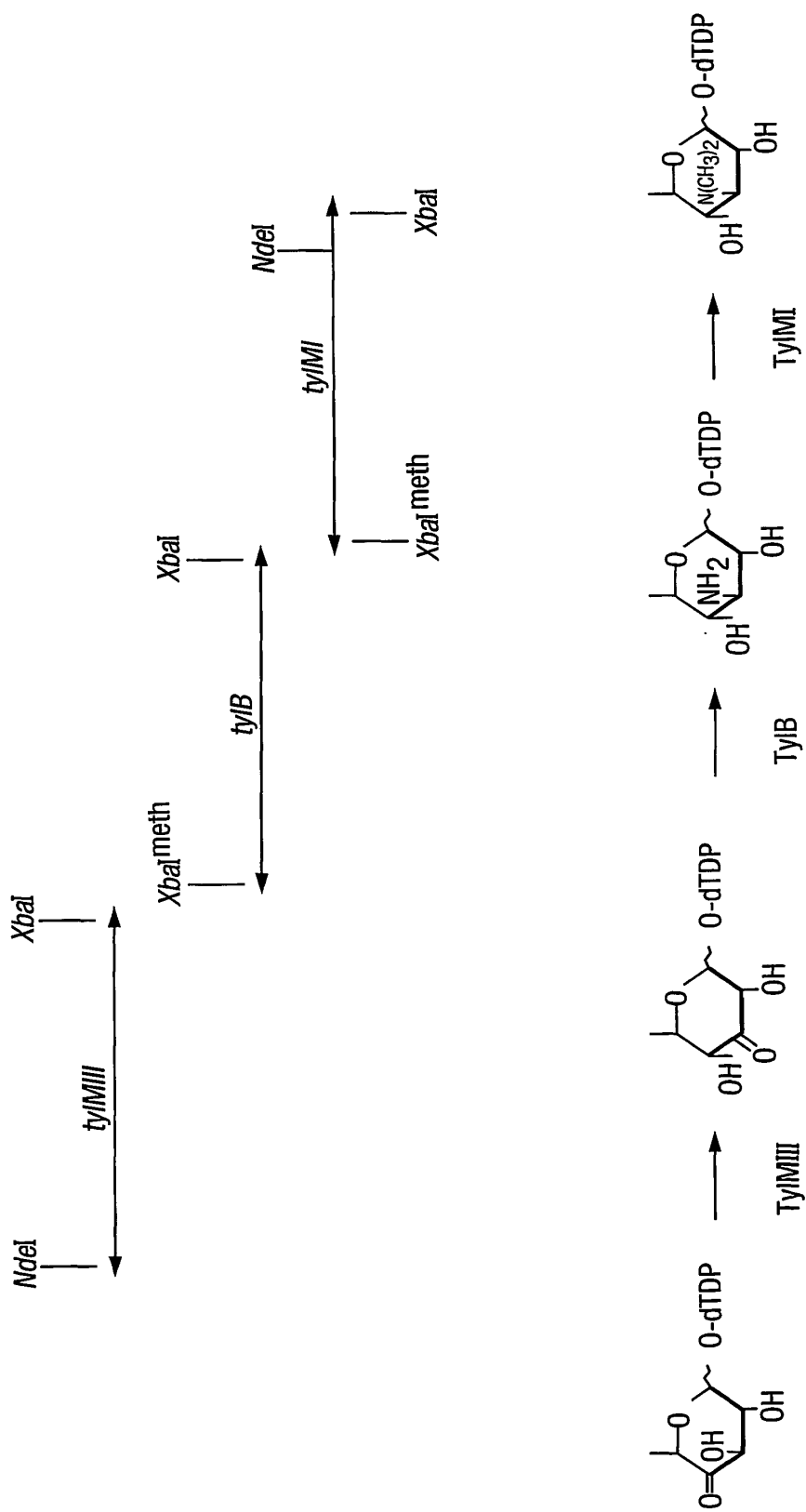
```

1 MTGLPRPAVRVPFHDLRDVHAATGVESEIGGALLRVAARGRYLLGAELAA 50
  |||
1 MTGLPRPAVRVPFHDLRDVHAATGVESEIGAALLRVAAGGRYLLGAELAA 50
  |||
51 FEERFAEYCGNAHCVAVGSGLDDARLALWALGVGEGDEVIVPSHTFIASW 100
  |||
51 FEERFAEYCGNAHCVAVGSGLDALRLALWALGVGEGDEVIVPSHTFIASW 100
  |||
101 LAVSATGATPVPVEPGDPGPGGAFLLDPDRLEAALTPRTRAVMPVHLY 150
  |||
101 LAVSATGATPVPVEPGDPGQPGGAFLLDPDRLEAALTPRTRAVMPVHLY 150
  |||
151 GHPVDLDPVGAFAPHEPHGLAVVEDAAQA.TARYRGRRIGSGHRTAFSFYPG 199
  |||
151 GHPVDLDPVGAFAPHERHGLAVVEDAAQAHGARYRGRRIGSGHATAFSFYPG 200
  |||
200 KNLGALGDGGAVVTSDPELADRLRLLRNYGAREKYRHEERGTSRLDELQ 249
  |||
201 KNLGALGDGGAVVTSDPELADRLRLLRNYGAREKYRHEERGTSRLDELQ 250
  |||
250 AAVLSVKLPYLDAWNTRRREIAARYGEALP;LPGVTVPEGRV.AEPVWHQ 298
  |||
251 AAVLSVKLPYLDAWNTRRREIAARYGEALP;LPGVTVPEAAAWAEPVWHQ 300
  |||
299 YVLRSPYRDRLRRRLAEAGVETLVHYPV/VHASGAYAGAGPCPAGGLPRA 348
  |||
301 YVLRSPYRDRLRRRLAEAGVETLVHYPV/VHASGAYAGAGPCPAGGLPRA 350
  |||
349 ERLAGEVLSLPIGPHLPDEAVEVVIAA QSAALDSWEEGP 388
  |||
351 ERLAGEVLSLPIGPHLPDEAVEVVIAAVQSAALDSWEEGP 390
  |||

```

Fig. 33

Fig.34.



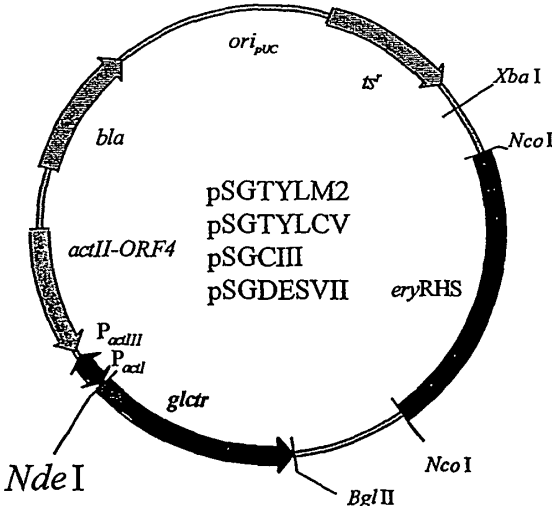
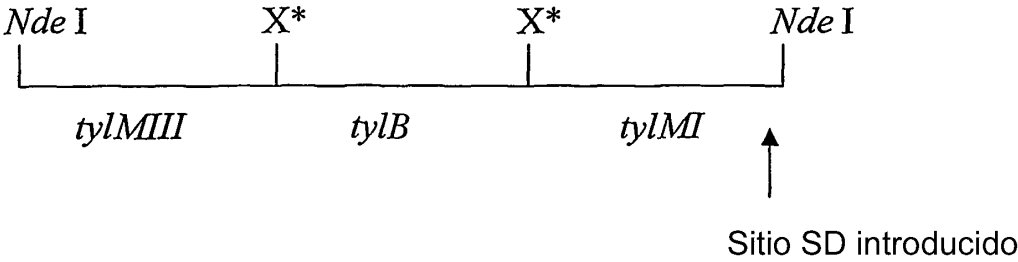
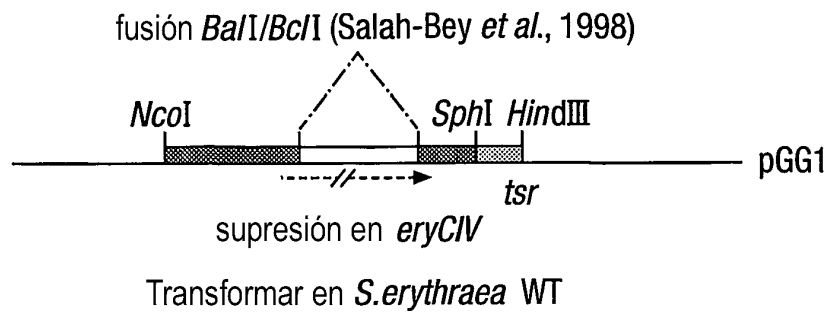
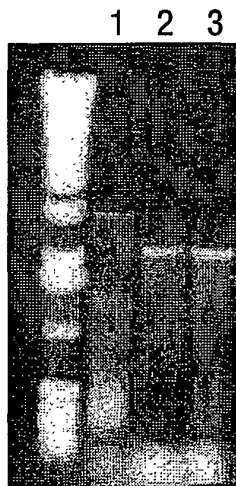


Fig.35

Fig.36.



Se aislaron dos clones sensibles a la triostreptona -n° 2 y 5-



- 1: PCR usando WT genómico como plantilla
- 2: PCR usando n° 2 genómico como plantilla
- 3: PCR usando n° 3 genómico como plantilla

← La supresión *eryCIV* se inserta en el genoma

Σ: *S.erythraea* GG1 fue aislada

