



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 296 063**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/36 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **05075774 .9**

(86) Fecha de presentación : **16.07.2003**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1589031**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **26.10.2005**

(54) Título: **Producción de poliquétidos y otros productos naturales.**

(30) Prioridad: **16.07.2002 GB 0216509**
25.10.2002 GB 0224922

(73) Titular/es: **Biotica Technology Limited**
112 Hills Road
Cambridge CB2 1PH, GB

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

(72) Inventor/es: **Gregory, Matthew Alan;**
Gaisser, Sabine;
Petkovic, Hrvoje y
Moss, Steven

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

(74) Agente: **Urízar Anasagasti, José Antonio**

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

DESCRIPCIÓN

Producción de poliquétidos y otros productos naturales.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la producción de poliquétidos y otros productos naturales y con libreras de compuestos y compuestos individuales novedosos. Un área importante es el aislamiento y uso potencial de análogos novedosos de ligandos de FKBP y las células hospederas que producen estos compuestos. La invención se ocupa, de modo particular, de los métodos para la transformación eficiente de cepas que producen análogos de FKBP y células recombinantes en las que los genes clonados o cassetes génicos se expresan para generar compuestos novedosos tales como poliquétidos (especialmente rapamicina) análogos a los ligandos de FKBP, y a los procesos para su preparación, y a los medios empleados en la misma (p.e. ácidos nucleicos, vectores, cassetes génicos y cepas genéticamente modificadas).

15 Antecedentes de la invención

La rapamicina (sirolimus) (Figura 1) es un macrólido lipófilo producido por *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 5491 (Sehgal *et al.*, 1975; Vézina *et al.*, 1975; Patente de U.S. No. 3,929,992; Patente de U.S. No. 3,993,749) con un grupo 1,2,3-tricarbonilo enlazado a una lactona del ácido pipecólico (Paiva *et al.*, 1991). Otros macrólidos relacionados (Figura 2) incluyen FK506 (tacrolimus) (Schreiber y Crabtree, 1992), FK520 (ascomicina o inmunomicina) (Wu *et al.*, 2000), FK525 (Hatanaka H, *et al.*, 1989, FK523 (Hatanaka, H., *et al.*, 1988), antascomicinas (Fehr, T., *et al.*, 1996) y meridamicina (Salituro *et al.*, 1995). Para el propósito de esta invención, la rapamicina se describe mediante la convención de numeración de McAlpine *et al.* (1991), con preferencia sobre las convenciones de numeración de Findlay *et al.* (1980) o de los Chemical Abstracts (11th Cumulative Index, 1982-1986 p60719CS).

El modo de acción versátil de la rapamicina demuestra el valor farmacológico del compuesto y enfatiza la necesidad del aislamiento de derivados novedosos del fármaco. La rapamicina muestra una actividad antifúngica moderada, fundamentalmente contra especies de *Candida* pero también contra hongos filamentosos (Baker *et al.*, 1978; Sehgal *et al.*, 1975; Vézina *et al.*, 1975; Patente de U.S. No. 3,929,992; Patente de U.S. No. 3,993,749). La rapamicina inhibe la proliferación celular utilizando las vías de transducción de señales en una variedad de tipos celulares, p.e. mediante la inhibición de la vía de señalización que permite la progresión de la fase G₁ a la S del ciclo celular (Kuo *et al.*, 1992). En las células T, la rapamicina inhibe la señalización a partir del receptor de IL-2 y la autoproliferación subsiguiente de las células T, lo que produce inmunosupresión. Los efectos inhibitorios de la rapamicina no se limitan a las células T, pues la rapamicina inhibe la proliferación de muchos tipos de células en los mamíferos (Brunn *et al.*, 1996). La rapamicina es, por tanto, un poderoso inmunosupresor con aplicaciones terapéuticas establecidas o predichas en la prevención del rechazo de alotransplantes de órganos y en el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Kahan *et al.*, 1991). La misma parece causar un menor número de efectos colaterales que los tratamientos antirrechazo estándares (Navia, 1996). La 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina (SDZ RAD, Certican, Everolimus) es un análogo semisintético de la rapamicina que muestra efectos farmacológicos inmunosupresores (Sedrani, R. *et al.*, 1998; U.S. 5,665,772). La eficacia clínica del fármaco se encuentra actualmente bajo investigación en ensayos clínicos en Fase III (Kirchner *et al.*, 2000). El éster de rapamicina CCI-779 (Wyeth-Ayerst) inhibe el crecimiento celular in vitro e inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* (Yu *et al.*, 2001). El fármaco se encuentra actualmente en ensayos clínicos en Fase III. El valor de la rapamicina en el tratamiento de soriasis de placa crónica (Kirby y Griffiths, 2001), el uso potencial de efectos tales como la estimulación del crecimiento de neuritas en células PC12 (Lyons *et al.*, 1994), el bloqueo de las respuestas proliferativas a citoquinas por células vasculares y del músculo liso después de daño mecánico (Gregory *et al.*, 1993) y su papel en la prevención de la fibrosis por alotrasplante (Waller y Nicholson, 2001) son áreas de intensa investigación (Kahan y Camardo, 2001). Informes recientes revelan que la rapamicina está asociada con una menor incidencia de cáncer en pacientes con alotransplantes de órganos que están bajo terapia inmunosupresora a largo plazo que en aquellos que se encuentran bajo otros regímenes inmunosupresores, y que esta incidencia reducida del cáncer se debe a la inhibición de la angiogénesis (Guba *et al.*, 2002). Se ha informado que las actividades neurotróficas de los ligandos de la inmunofilina son independientes de sus actividades inmunosupresoras (Steiner *et al.*, 1997) y que la estimulación del crecimiento de nervios se promueve por alteración del complejo del receptor a esteroides maduro, como se describe en la aplicación de la patente WO01/03692. Se han informado efectos colaterales tales como la hiperlipidemia y la trombocitopenia, así como efectos teratogénicos potenciales (Hentges *et al.*, 2001; Kahan y Camardo, 2001).

El esqueleto poliquétido de la rapamicina se sintetiza mediante una condensación cabeza cola de un total de siete unidades de propionato y siete unidades de acetato a una unidad de partida de ácido ciclohexano carboxílico, derivado del siquimato (Paiva *et al.*, 1991). El iminoácido derivado de la L-lisina, ácido pipecólico, se condensa a través de un enlace amida con el último acetato del esqueleto poliquétido (Paiva *et al.*, 1993) y le sigue una lactonización para formar el macrociclo. Se ha secuenciado una región genómica de 107 kb que contiene el cluster de genes biosintéticos (Schwecke *et al.*, 1995). El análisis de los marcos de lectura abiertos reveló tres grandes genes que codifican para la poliquétido sintasa modular (PKS) (Aparicio *et al.*, 1996; Schwecke *et al.*, 1995). Embebido entre los genes PKS se encuentra el gen rap^P que codifica para una proteína con similitud de secuencia con los dominios de activación de las sintetasas de péptidos no ribosomales, y que se piensa que actúa de modo análogo (König *et al.*, 1997). La región que codifica para los genes PKS está flanqueada por los dos lados por 24 marcos de lectura abiertos adicionales que codifican para enzimas que se cree que se requieren en la biosíntesis de la rapamicina (Molnár *et al.*, 1996). Estos incluyen las siguientes enzimas de modificación de post-poliquétido: dos monooxigenasas citocromo P-450,

designadas como RapJ y RapN, una ferredoxina asociada, RapO, y tres O-metiltransferasas potenciales dependientes de SAM, RapI, RapM y RapQ. Otros genes adyacentes tienen posibles funciones en la regulación y secreción de la rapamicina (Molnár *et al.*, 1996). El cluster contiene también al gen rapL cuyo producto, RapL se propone para catalizar la formación del precursor de la rapamicina, el ácido L-pipecólico, a través de la ciclodeshidratación de la L-lisina (Khaw *et al.*, 1998; Paiva *et al.*, 1993). La introducción de una mutación con corrimiento del marco de lectura en rapL dio origen a un mutante incapaz de producir cantidades significativas de rapamicina y la suplementación del medio de cultivo con ácido L-pipecólico restableció los niveles de producción de rapamicina del tipo salvaje (Khaw *et al.*, 1998). Los precursores de la biosíntesis del anillo ciclohexano de la rapamicina se originan de la vía del ácido siquímico (Lowden *et al.*, 1996; Lowden *et al.*, 2001). Otros macrólidos estrechamente relacionados tales como el FK506 (tacrolimus) (Schreiber y Crabtree, 1992), FK520 (ascomicina o inmunomicina) (Wu *et al.*, 2000), la antascomicina (Fehr, T., *et al.*, 1996) y la meridamicina (Salituro *et al.*, 1995) comparten un farmacóforo común que interactúa con las proteínas de unión a FK506 (FKBPs) (Figura 2). De este modo, la rapamicina y los compuestos relacionados, por ejemplo, pero sin limitarse a, FK506, FK520, "hyg", FK523, meridamicina, antascomicina, FK525 y tsukubamicina pueden considerarse "ligandos de FKBPs". La secuencia parcial del cluster de genes FK506 (Motamedi *et al.*, 1996; Motamedi *et al.*, 1997; Motamedi y Shafiee, 1998), del cluster "hyg" (Ruan *et al.*, 1997) y la secuencia completa del cluster de genes FK520 ha sido publicada (Wu *et al.*, 2000; Patente de U.S. No. 6,150,513). Existe una homología significativa entre los genes dentro de estos clusters y los clusters de genes de la biosíntesis de la rapamicina, y similitud en la función de la enzima (Motamedi *et al.*, 1996).

Se cree que las acciones farmacológicas de la rapamicina que se han caracterizado hasta la fecha se encuentren mediadas por la interacción con receptores citosólicos nombrados FKBPs o inmunofilinas. Las inmunofilinas (este término se utiliza para denotar proteínas de unión a inmunosupresores) catalizan la isomerización de enlaces peptidil prolina en cis y trans y pertenecen a una familia de enzimas altamente conservadas, que se encuentran en una amplia variedad de organismos (Rosen y Schreiber, 1992). Dos grandes grupos de enzimas que pertenecen a la familia de las inmunofilinas están representados por los FKBPs y las ciclofilinas (Schreiber y Crabtree, 1992). El principal receptor intracelular de la rapamicina en células T en eucariontes es FKB12 (DiLella y Craig, 1991), y el complejo resultante interactúa de manera específica con proteínas blanco para inhibir la cascada de transducción de señales de la célula. FK506, un agente inmunosupresor relacionado estructuralmente con la rapamicina, también une de modo específico a FKB12, pero efectúa la inmunosupresión a través de un mecanismo diferente (Chang *et al.*, 1991; Sigal y Dumont, 1992). La rapamicina y FK506 compiten por el mismo sitio de unión, de modo que FK506 pudiera tener un efecto de antagonismo con la rapamicina cuando ambas drogas se utilizan juntas (Cao *et al.*, 1995). El análisis de la estructura cristalina del complejo FKB12-rapamicina ha identificado un farmacóforo de unión a rapamicina llamado el "dominio de unión" (Van Duyne *et al.*, 1993) (ver la Figura 1). El "dominio de unión" se requiere para la interacción con la inmunofilina y consta, tanto para la FK506 como para la rapamicina, de la región C-1 a C-14, incluyendo el enlace éster, el anillo pipecolinilo, el dicarbonilo y el anillo hemiacetal (ver la Figura 2). La interacción se caracteriza por poseer numerosos contactos hidrofóbicos y algunos puentes de hidrógeno incluyendo uno al grupo hidroxilo en el anillo ciclohexano. El anillo pipecolinilo (C2 a N7) logra la penetración más profunda al interior de la proteína cuando se encuentra rodeado por residuos de aminoácidos aromáticos altamente conservados que recubren la cavidad de unión hidrofóbica. Los dos grupos carbonilo de C1 y de C8 están involucrados en enlaces por puentes de hidrógeno y el grupo carbonilo del C9 se interna en un bolsillo formado por tres residuos de aminoácidos aromáticos completamente conservados (un residuo de tirosina y dos residuos de fenilalanina) en FKB12. El dominio del complejo inmunofilina-ligando que interactúa con la proteína blanco se proyecta hacia el exterior del FKB.

El blanco del complejo rapamicina-FKB12 se ha identificado en levaduras como TOR (blanco de la rapamicina) (Alarcon *et al.*, 1999) y la proteína de mamíferos se conoce como FRAP (proteína asociada a FKB12-rapamicina) o mTOR (blanco de la rapamicina de mamíferos) (Brown *et al.*, 1994). Estas proteínas muestran una similitud significativa con los dominios fosfotransferasa de las fosfatidilinositol 3-quinasas y la observación de que una mutación puntual en el dominio de unión del FKB12-rapamicina (FRB) de mTOR elimina la actividad de la mTOR quinasa proporciona evidencias del papel de FRB en la función del dominio quinasa (Vilella-Bach *et al.*, 1999). Se ha obtenido la estructura cristalina de FKB12-rapamicina con una forma truncada de mTOR que contiene el dominio FRB (Chen *et al.*, 1995) y de este modo se ha definido el dominio "efector" de la rapamicina (Choi *et al.*, 1996; Liang *et al.*, 1999). El análisis de la estructura cristalina reveló que los contactos proteína-proteína se encuentran relativamente limitados en comparación con la interacción entre la rapamicina y cada proteína. No se identificaron puentes de hidrógeno entre la rapamicina y FRB. La interacción se concentra en una serie de contactos hidrofóbicos entre la región trieno de la rapamicina y, fundamentalmente, residuos aromáticos de FRB (Liang *et al.*, 1999). El átomo más profundamente enterrado de la rapamicina es el metilo unido al C23 (ver la Figura 2). La región C23 a C34 y el anillo ciclohexilo de la rapamicina tienen contactos hidrofóbicos superficiales con FRB. Se hizo evidente la existencia de un pequeño cambio conformacional en la rapamicina entre los complejos binarios y ternarios (Liang *et al.*, 1999).

Se detectaron las divergencias entre los efectos biológicos de los análogos del grupo metoxi de C16 de la rapamicina y su capacidad de unir a FKB12 y se postuló la localización de los sustituyentes de C16 en el espacio interfacial entre FKB12 y mTOR (Luengo *et al.*, 1995). El análisis de la estructura cristalina de FKB12 con la 28-O-metilo rapamicina, que no es inmunosupresora, reveló una diferencia significativa en la orientación del anillo ciclohexilo, lo que puede provocar la perturbación de la unión de mTOR (Kallen *et al.*, 1996).

La rapamicina ejerce su acción sobre las cascadas de señalización en la célula a través de la inhibición de la p70^{S6K} quinasa, una quinasa serina/treonina de eucariontes superiores que fosforila a la proteína ribosomal S6 (Ferrari *et al.*, 1993; Kuo *et al.*, 1992). La proteína S6 se localiza en la subunidad ribosomal 40S y se cree que sea un sitio

funcional importante involucrado en la unión del tRNA y del mRNA. Se ha postulado una función regulatoria en la traducción del mRNA de la fosforilación de S6 por p70^{S6k} (Kawasome *et al.*, 1998). La rapamicina inhibe la síntesis de proteína a través de su efecto sobre otros eventos relacionados con el crecimiento, incluyendo la actividad de quinasas dependientes de ciclinas, la fosforilación del modulador del elemento de respuesta a cAMP (CREM) y la fosforilación 5 de la proteína de unión al factor de elongación 4E-BP1 (FAS1) (Hung *et al.*, 1996). El fármaco induce la acumulación de las especies desfosforiladas de 4E-BP1 que se unen al factor de iniciación de la traducción eIF-4E, y de este modo, suprime la iniciación de la traducción de los mRNAs dependientes de cap (Hara *et al.*, 1997; Raught *et al.*, 2001).

10 Se ha descrito la existencia de una relación entre la señalización de mTOR y la síntesis de proteínas localizada en las neuronas; el efecto sobre el estado de fosforilación de las proteínas involucradas en el control de la traducción; la abundancia de los componentes de la maquinaria traduccional a niveles transcripcional y traduccional; el control de la actividad de la aminoácido permeasa y la coordinación de la transcripción de muchas enzimas involucradas en 15 vías metabólicas (Raught *et al.*, 2001). Las vías de señalización sensibles a rapamicina también parecen desempeñar un papel importante en el desarrollo embrionario del cerebro, el aprendizaje y la formación de la memoria (Tang *et al.*, 2002). Los estudios de las proteínas TOR en levaduras han revelado también sus papeles en la modulación de las 20 vías de señalización sensibles a nutrientes (Hardwick *et al.*, 1999). De manera semejante, se ha mostrado que mTOR es un blanco directo de la acción de la proteína quinasa B y que tiene un papel clave en la señalización de la insulina (Sheferd *et al.*, 1998; Nave *et al.*, 1999). El TOR de mamíferos ha sido involucrado también en la polarización del citoesqueleto de actina y la regulación de la iniciación de la traducción (Alarcon *et al.*, 1999). Las fosfatidilinositol 3-quinasas, tales como mTOR, son funcionales en varios aspectos de la patogénesis de tumores tales como la progresión 25 del ciclo celular, la adhesión, la supervivencia celular y la angiogénesis (Roymans y Slegers, 2001).

30 La mayor parte de las inmunofilinas no parecen estar directamente involucradas en actividades inmunosupresoras y se conoce relativamente poco acerca de sus ligandos naturales aunque se ha informado la existencia de candidatos a ligandos naturales de las FKBP llamados proteínas asociadas a FKBP (FAP) tales como FAP48 y FAP1. La rapamicina impidió la interacción específica de las FAPs con FKBP durante la formación de complejos de manera dependiente de la dosis (Chambraud *et al.*, 1996; Kunz *et al.*, 2000). Las inmunofilinas parecen ejercer su función en un amplio intervalo de actividades celulares tales como el plegamiento de las proteínas; el ensamblaje y tráfico de proteínas; la co-regulación de complejos moleculares que incluyen las proteínas de choque térmico; los receptores a esteroides; los canales iónicos; las interacciones célula a célula y la transcripción y traducción de genes (Galat 2000; Hamilton y Steiner 1998). Todas las inmunofilinas poseen la propiedad de plegamiento de proteína de la isomerización peptidil-protiol cis-trans y se han encontrado varias inmunofilinas localizadas en el retículo endoplasmático, el sitio principal de síntesis de proteínas en la célula. Además de FKBP12 (U.S. 5,109,112) otras inmunofilinas incluyen a FKBP12.6 (U.S. 5,457,182), FKBP13 (Hendrickson *et al.*, 1993; U.S. 5,498,597), FKBP25 (Hung y Schreiber, 1992; Jin *et al.*, 35 1992), FKBP14.6 (U.S. 5,354,845), FKBP52 (U.S. 5,763,590), FKBP60 (Yem *et al.*, 1992) y FKBP65 (Patterson *et al.*, 2000).

40 El gran número de FKBP que se encuentran presentes en diferentes tipos celulares también destaca la utilidad del aislamiento de análogos de ligandos de FKBP novedosos con dominios efectores y/o de unión con potencialidad de cambiarse.

45 Los estudios farmacocinéticos de la rapamicina y de los análogos de la rapamicina han demostrado la necesidad del desarrollo de compuestos novedosos de la rapamicina que puedan ser más estables en solución, más resistentes al ataque metabólico y que tengan una biodisponibilidad mejorada. Se ha recurrido a la modificación utilizando las 50 posiciones químicamente disponibles en la molécula, sin embargo, esta estrategia tiene una utilidad limitada debido a que los sitios disponibles para la modificación química están limitados y existe una menor capacidad para modificar de modo selectivo una posición particular. Las estrategias biológicas para producir análogos novedosos de la rapamicina han sido menos exitosas debido a las dificultades encontradas al trabajar con el organismo (Lomovskaya *et al.*, 1997; Kieser *et al.*, 2000) a pesar de la disponibilidad de la secuencia del cluster de genes de la biosíntesis de rapamicina a partir de *S. hygroscopicus* (Schwecke *et al.*, 1995).

55 Se ha informado de una gama de análogos de la rapamicina sintetizados utilizando los sitios químicamente bio-disponibles de la molécula. La descripción de los siguientes compuestos se adaptó al sistema de numeración de la molécula de rapamicina descrito en la Figura 1. Los sitios químicamente biodisponibles en la molécula para la derivatización o el remplazamiento incluyen los grupos hidroxilo C40 y C28 (p.e. U.S. 5,665,772; U.S. 5,362,718), los grupos metoxi C39 y C16 (p.e. WO96/41807; U.S. 5,728,710), los grupos ceto C32, C26 y C9 (p.e. U.S. 5,378,836; U.S. 5,138,051; U.S. 5,665,772). La hidrogenación en C17, C19 y/o C21, dirigida al trieno, condujo a la retención de la actividad antifúngica pero a la pérdida de la inmunosupresión (p.e. U.S. 5,391,730; U.S. 5,023,262). A través de la derivatización se han logrado mejoras significativas en la estabilidad de la molécula (p.e. formación de oximas en C32, C40 y/o C28, U.S. 5,563,145, U.S. 5,446,048), resistencia al ataque metabólico (p.e. U.S. 5,912,253), biodisponibilidad (p.e. U.S. 5,221,670; U.S. 5,955,457; WO98/04279) y la producción de prodrogas (p.e. U.S. 6,015,815; U.S. 5,432,183). Sin embargo, la modificación química requiere cantidades significativas del molde de rapamicina y, como se trata de un compuesto lóbil base y ácido, es difícil trabajar con el mismo. Cuando la derivatización química puede ser grupo selectiva, es a menudo difícil que sea sitio selectiva. Por tanto, la modificación química requiere invariablemente múltiples pasos de protección y desprotección y produce mezclas de productos con rendimientos variables.

60 Se ha descrito también el aislamiento de análogos de la rapamicina utilizando métodos biológicos tales como la biotransformación y la modificación genética basada en fagos. El aislamiento de metabolitos minoritarios a partir de

cepas mutantes y de cepas que producen rapamicina ha proporcionado pequeñas cantidades de un número de análogos de la rapamicina. Estas cepas son con frecuencia de bajo rendimiento y producen mezclas de análogos de la rapamicina. Se informó del aislamiento de la 27-O-desmetilrapamicina y 27-desmetoxirapamicina a partir del sobrenadante de cultivo de *S. hygroscopicus* NCIMB 40319 (Box *et al.*, 1995). La actividad antifúngica de la 27-O-desmetilrapamicina fue menor que la de la rapamicina pero la inhibición de la actividad FKBP12 PPlasa pareció incrementarse. La inhibición de la proliferación de células T esplénicas murinas estimuladas por ConA y la inhibición de la proliferación estimulada por LPS de células B esplénicas murinas disminuyó al compararse con la rapamicina (Box *et al.*, 1995). De modo similar, las actividades antifúngicas de los derivados de la rapamicina prolilrapamicina, 27-O-desmetilrapamicina y 27-desmetoxirapamicina fueron menores que la de la rapamicina (Wong *et al.*, 1998). Se han 5 aislado también análogos de la rapamicina (16-O-desmetilrapamicina, 27-O-desmetilrapamicina, 39-O-desmetilrapamicina, 16,27-O-bisdesmetiltrapamicina, prolilrapamicina, 26-O-desmetilprolilrapamicina, 9-deoxorapamicina, 27-desmetoxirapamicina, 27-desmetoxi-39-O-desmetilrapamicina, 9-deoxo-27-desmetoxirapamicina, 28-dehidrorapamicina, 9-deoxo-27-desmetoxi-39-O-desmetifrapamicina) a partir de *Actinoplanes* sp N902-109 después de la adición de 10 inhibidores de la citocromo P450 y/o la suplementación del cultivo con precursores o después de la biotransformación de la rapamicina aislada (Nishida *et al.*, 1995). El uso de tales inhibidores, sin embargo, solo permite seleccionar el 15 direccionamiento hacia una enzima particular y no es sitio selectiva. La producción racional de un único análogo seleccionado no es posible por este método. La producción resultante de mezclas de análogos de la rapamicina en lugar de un único producto deseado también tiene un impacto en el rendimiento. Se evaluó la actividad inhibitoria de los 20 compuestos sobre la reacción de linfocitos mezclados (MLR) y se detectó poco efecto sobre la actividad después de la pérdida del grupo metilo en C27 y/o C16. Además, la 9-deoxorapamicina mostró una disminución más significativa en la actividad, y la pérdida del grupo metoxi en C27, el grupo hidroxi en C28 y la sustitución del grupo pipecolinilo por un grupo prolilo produjo una reducción en la potencia (Nishida *et al.*, 1995). De modo semejante, se ha informado la 25 biotransformación de la rapamicina y el aislamiento de 16,39-O-bisdesmetilrapamicina (WO 94/09010). La retención de la actividad inhibitoria en ensayos de proliferación celular con compuestos modificados en el anillo ciclohexilo, p.e. 39-O-desmetilrapamicina y modificaciones en C40 tales como SDZ RAD, identificaron esta región de la molécula 30 como un blanco en la generación de análogos novedosos de la rapamicina. Se ha informado la existencia de análogos novedosos de la rapamicina después de añadir ácido ciclohexano carboxílico, ácido cicloheptano carboxílico, ácido ciclohex-1-enocarboxílico, ácido 3-metilciclohexanocarboxílico, ácido ciclohex-3-enocarboxílico, ácido 3-hidroxiciclohex-4-enocarboxílico y ácido ciclohept-1-eneocarboxílico a cultivos de *S. hygroscopicus*, lo que demuestra la flexibilidad en el módulo de carga de la rapamicin poliquétido sintasa (P.A.S. Lowden, FD disertación, Universidad de Cambridge, 1997). Estos análogos novedosos de la rapamicina se produjeron en competencia con el iniciador natural, ácido 4,5-dihidroxiciclohex-1-enocarboxílico, lo que produjo rendimientos reducidos y mezclas de productos.

Se ha informado del aislamiento de cepas de *S. hygroscopicus* recombinantes que producen varios análogos de la 35 rapamicina, utilizando métodos biológicos mediados por la tecnología de fagos (Lomovskaya *et al.*, 1997). En presencia de la adición de derivados de prolína, un mutante por delección en rapL de *S. hygroscopicus* sintetizó los análogos novedosos de la rapamicina prolilrapamicina, 4-hidroxiprolilrapamicina y 4-hidroxiprofil-26-desmetoxi-rapamicina (Khaw *et al.*, 1998). De modo similar, se han identificado las rapamicinas novedosas 3-hidroxi-prolil-rapamicina, 3-hidroxi-prolil-26-desmetoxi-rapamicina, y ácido trans-3-aza-biciclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico rapamicina como se 40 describe en WO98/54308. La actividad de la prolilrapamicina y la 4-hidroxiprolil-26-desmetoxi-rapamicina se evaluó en ensayos de proliferación y la actividad inhibitoria del segundo compuesto fue significativamente menor que la de la rapamicina (Khaw *et al.*, 1998). La delección de cinco genes contiguos, rapQONML (responsables de las modificaciones post-poliquétido en C16, C27 y de la producción de ácido L-pipecólico) y su reemplazo con un marcador de resistencia a neomicina en *S. hygroscopicus* ATCC29253 utilizando una metodología basada en fagos condujo a 45 la producción de 16-O-desmetil-27-desmetoxirapamicina cuando se le suministró el ácido pipecólico (Chung *et al.*, 2001). No se ha demostrado la complementación de este mutante por delección utilizando esta tecnología. Además, la funcionalidad sitio específica de rapM y rapQ no es clara aún, por lo tanto, el diseño racional de análogos de la rapamicina que requieren la metilación en C16-OH o C27-OH no se ha hecho posible. La metodología basada en fagos posee un número de desventajas como se describe con más detalle posteriormente. Ofrece un proceso difícil y 50 prolongado para la obtención de cepas mediante ingeniería genética y tiene una versatilidad reducida en comparación con la metodología que se revela en la presente patente.

Las estrategias convencionales para la manipulación de los genes que modifican la rapamicina utilizando métodos 55 biológicos comprenden la mutación o delección de genes individuales en el cromosoma de una cepa hospedera y/o la inserción de genes individuales como copias extra de genes homólogos o heterólogos ya sea de modo individual o como cassetes génicos (WO01/79520, WO03/048375). Sin embargo, el aislamiento de análogos novedosos de la rapamicina utilizando tales métodos biológicos ha sido limitado debido a las dificultades en la transformación del organismo productor de rapamicina, *S. hygroscopicus*. Se ha informado que los métodos comúnmente utilizados de transformación con ADN de plásmidos o transferencia de conjugación no fueron exitosos con la cepa que produce 60 rapamicina (Lomovskya *et al.*, 1997, Schweke *et al.*, 1995, Kieser *et al.*, 2000). El estado actual de la técnica utiliza la metodología de Lomovskya *et al.* (1997), un método de trabajo intensivo basado en fagos que se encuentra severamente limitado por el tamaño de los fragmentos de ADN clonados que se transfieren a *S. hygroscopicus* (Kieser *et al.*, 2000). Esta tecnología se limita a la transferencia de un máximo de 6.4 kb de ADN clonado. Por lo tanto, cuando 65 se complementa un mutante por delección utilizando esta tecnología, el técnico se encuentra limitado a la inclusión de ~2 genes funcionales además del promotor deseado, las regiones de homología y el marcador de resistencia. La información genética para el grupo de genes de la biosíntesis de rapamicina se encuentra disponible desde 1995 (Schweke *et al.*, 1995), sin embargo, se ha realizado poco progreso en esta área (Khaw *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 2001; WO01/34816).

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método para la generación de análogos de ligandos de FKBP que incorporan una unidad iniciadora no natural, dicho método comprende:

5 (a) la generación de una cepa recombinante en la que al menos el homólogo de rapK se ha eliminado o inactivado;

y

10 (b) la suplementación con una unidad iniciadora no natural a dicha cepa.

15 La presente invención también proporciona métodos recombinantes para la transformación eficiente de cepas que contienen un grupo biosintético que codifica para un ligando de FKBP, por ejemplo, pero sin limitarse a, *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NRRL 5491, *Actinoplanes* sp. N902-109 FERM BP-3832, *Streptomyces* sp. AA6554, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6475 ATCC 14891, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6678 ATCC 55087, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6674, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* ATCC 55276, *Streptomyces tsukubaensis* No.9993 FERM BP-927, *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *yakushimaensis*, *Streptomyces* sp. DSM 4137, *Streptomyces* sp. DSM 7348, *Micromonospora* n.sp. A92-306401 DSM 8429, *Streptomyces* sp. MA 6858 ATCC 55098, *Streptomyces* sp. MA 6848, dichos métodos comprenden:

20 (a) la construcción de un plasmidio de delección conjugativa en una cepa de *E. coli* que sea *dam*⁻, *dcm*⁻ o *dam*⁻ y *dcm*⁻.

25 (b) la generación de esporas a partir de dicha cepa adecuadas para la conjugación en la que dicha cepa se cultiva a una humedad de entre 10% y 40% y las esporas se colectan entre los días 5 y 30;

30 (c) la conjugación de la cepa de *E. coli* del paso (a) con las esporas del paso (b) en un medio que contiene por litro:

35 i) 0,5 g a 5 g de polvo de maíz pulido,

40 ii) 0,1 g a 5 g de extracto de levadura,

45 iii) 0,1 g a 10 g carbonato de calcio; y

50 iv) 0,01 g a 0,5 g de sulfato de hierro;

dicho medio contiene adicionalmente BACTO-agar y almidón y se somete a secado para producir una pérdida de peso del 1-20%; y

55 (d) opcionalmente el cultivo de la cepa bajo condiciones apropiadas para la producción de poliquétido.

En una realización preferida, los métodos se utilizan para la transformación de *Streptomyces hygroscopicus* subsp., *hygroscopicus* (p.e. NRRL 5491), *Actinoplanes* sp. N902-109 (p.e. FERM BP-3832), *Streptomyces* sp. AA6554, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (p.e. MA 6475 ATCC 14891), *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (p.e. MA 6678 ATCC 55087), *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (p.e. MA 6674), *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (p.e. ATCC 55276), *Streptomyces tsukubaensis* No.9993 (p.e. FERM BP-927), *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *yakushimaensis*, *Streptomyces* sp. (p.e. DSM 4137), *Streptomyces* sp. (p.e. DSM7348), *Micromonospora* n.sp. A92-306401 (p.e. DSM 8429) o *Streptomyces* sp. (p.e. MA 6858 ATCC 55098). En una realización más preferida, los métodos se utilizan para la transformación de: *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* (p.e. NRRL5491) o *S. hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (p.e. ATCC14891). En una realización aún más preferida, los métodos se utilizan para la transformación de la subsp. *hygroscopicus* de *S. hygroscopicus* productora de rapamicina (p.e. NRRL 5491).

Por tanto, la presente invención también proporciona una cepa recombinante que contiene clusters de biosíntesis que codifican para ligandos FKBP en el que uno o más genes auxiliares se han eliminado o inactivado utilizando los métodos que se describen en el presente documento.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos y materiales recombinantes para la expresión de combinaciones de enzimas de modificación de poliquétidos para producir análogos novedosos de poliquétidos. En una realización específica, la presente invención proporciona métodos y materiales recombinantes para la expresión de combinaciones de enzimas responsables de la modificación post-PKS y/o suministro del precursor a partir de grupos de biosíntesis que codifican para ligandos de FKBP, por ejemplo, pero sin limitarse a, rapamicina, FK506, FK520, FK523, FK525, antasomicina, meridamicina, tsukubamicina y análogos de los mismos y métodos para la producción de análogos en células hospederas recombinantes. En una realización preferida, los métodos y materiales recombinantes se utilizan para la expresión de combinaciones de enzimas responsables de la modificación post-PKS y/o del suministro del precursor en la biosíntesis de rapamicina, FK520, FK506 e "hyg" y métodos para la producción de análogos de la rapamicina, FK520, FK506 e "hyg" en células hospederas recombinantes. En una realización mucho más preferida, los métodos y materiales recombinantes se utilizan en la expresión de combinaciones de enzimas res-

ponsables de la modificación post-PKS y/o del suministro del precursor en la biosíntesis de rapamicina y los métodos para la producción de análogos de la rapamicina en células hospederas recombinantes.

De manera global, la presente invención está relacionada con la alteración de un sistema de genes que posee

5 una porción central responsable de la producción de un producto básico, y una multiplicidad de genes modificadores responsables de efectuar modificaciones relativamente pequeñas al producto básico - p.e. efectuar la glicosilación, oxidación, reducción, alquilación, desalquilación, acilación o ciclización del producto básico, y una multiplicidad de genes de suministro del precursor que están relacionados con la producción de compuestos precursores particulares (p.e. pipecolato; ácido 4,5 dihidroxiciclohex-1-eno carboxílico). De este modo, el producto básico puede ser un polí-
10 quétido modular y los genes modificadores pueden estar relacionados con la glicosilación y/o otras modificaciones de la cadena del políquétido, y los genes de suministro del precursor pueden estar involucrados en la producción y/o incorpación de precursores naturales o no naturales (p.e. pipecolato y/o ácido 4,5 dihidroxiciclohex-1-eno carboxílico en el sistema rapamicina).

15 La porción central puede no funcionar correctamente, o incluso no funcionar del todo, en ausencia del gen de suministro del precursor (a menos que el compuesto precursor natural o no natural se suministre o esté disponible de otro modo).

20 En un aspecto, la invención proporciona los métodos para la alteración de un sistema de genes con una porción nula-
clear que no puede funcionar debido a una delección o inactivación de un gen de suministro del precursor. Los sistemas de genes adecuados incluyen, pero no se limitan a, los grupos biosintéticos de la rapamicina, antascomicina, FK520, FK506, "hyg", FK523, meridamicina, FK525 y tsukubamicina. En este aspecto de la invención, el gen de suministro del precursor que se encuentra ausente es, de preferencia, rapK o un homólogo de rapK (p.e. fkbO en los grupos de genes FK506 o FK520). El sistema de genes es, de preferencia, el grupo de la rapamicina. El gen de suministro de
25 precursor que se encuentra ausente es con mayor preferencia rapK. Este aspecto de la invención proporciona los métodos para la producción eficiente de una multiplicidad de productos básicos mediante la incorporación de precursores naturales o no naturales (p.e. ácido 4,5-dihidroxiciclohex-1-eno carboxílico). Los métodos pueden también incluir otros aspectos como se especifica más adelante.

30 Otro tipo de sistema es el sistema de péptido no ribosomal ("NRP") en el que el producto básico es un péptido y los genes modificadores son genes responsables de las modificaciones a un péptido (glicosilación, reducción etc), y los genes de suministro de precursor son genes involucrados en la producción de residuos de aminoácidos inusuales que deben incorporarse al péptido. Los sistemas pueden ser también de tipo mezclado, p.e. tener una porción políquétido y una porción con un origen biosintético diferente, p.e. NRP. De hecho, la rapamicina puede considerarse como un
35 ejemplo de esto, debido a que el residuo pipecolato es un residuo aminoacídico añadido por una enzima similar a las encontradas en los sistemas NRP.

40 Estos genes modificadores y genes de suministro del precursor pueden ser considerados como "genes auxiliares" para la síntesis de políquétido y el término "genes auxiliares" como se utiliza en el presente documento puede referirse a los genes modificadores, a los genes de suministro del precursor o a ambos.

45 La alteración del sistema de genes involucra la creación de un sistema con funcionamiento alterado en el que se ha alterado el conjunto de genes auxiliares. Por tanto, uno o más genes auxiliares (y de preferencia, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más o siete o más) pueden haberse eliminado (o convertido en no funcionales) y/o reemplazado por genes diferentes.

50 Esto puede involucrar un "sistema de delección" que comprenda un ácido nucleico que codifique un sistema de genes en el que falte una multiplicidad de genes auxiliares funcionales. Este sistema de delección puede complementarse entonces con uno o más genes auxiliares funcionales (que pueden ser iguales o diferentes a los genes que reemplazan). Este puede llevarse a cabo de modo combinatorio, un sistema de delección que sea complementado por una multiplicidad de genes y conjuntos de genes diferentes.

55 Puede producirse un sistema alterado que difiera del sistema natural en la ausencia de una o más funciones modificadoras a través de (a) la producción de un sistema de delección y la restauración por complementación de la casi totalidad de los genes suprimidos; o (b) mediante la supresión selectiva o la inactivación de genes de un sistema existente. En un sistema alterado producido según (b) los genes pueden inactivarse mediante mutagénesis dirigida de un sitio activo importante en la función de la proteína (mutación puntual del sitio activo), mediante truncación del gen a través de una mutación por corrimiento del marco de lectura, mediante una delección en el marco de una sección del gen importante para su función, tal como el sitio activo; la delección o inactivación parciales por mutación puntual.
60 Todos estos se pueden realizar mediante recombinación doble y selección del genotipo mutante, o mediante recombinación simple. En una realización preferida, el sistema alterado se produce por el método (a). Tales métodos pueden ser utilizados también para producir un sistema de delección. La estrategia de "complementación" (a) es de preferencia homóloga, en la que los genes "restablecidos" pertenecen al mismo grupo de genes, sin embargo, la complementación heteróloga, en la que los genes restablecidos se seleccionan a partir de grupos de biosíntesis diferentes que codifican para ligandos FKBP, se contempla también en la presente invención. En una realización preferida, los genes "restablecidos" son esencialmente los mismos genes que los suprimidos, o son variantes de los mismos que realizan funciones similares.

En otro aspecto de la invención, un sistema alterado con un gen de suministro de precursor suprimido (o no funcional) puede ser alimentado con precursores alternativos para que genere productos que varían.

Como se aplica al sistema de la poliquétido sintasa (“PKS”), un tipo de realización de preferencia es un método de producción de poliquétidos que comprenda: (a) proporcionar una cepa de un organismo que contiene uno o más genes de la PKS expresables para producir una PKS funcional que pueda generar un poliquétido en el organismo, por ejemplo genes PKS que codifican para un ligando de FKBP, el organismo carente de uno o más (y de presencia en pluralidad) genes auxiliares funcionales asociados de modo natural con dichos genes de la PKS que codifican para productos de genes capaces de realizar modificaciones respectivas del poliquétido; y (b) realizar la complementación por medio de provocar que dicho organismo exprese uno o más genes auxiliares, cuyos genes modificadores expresados constituyen un conjunto incompleto de genes auxiliares asociados naturalmente a dichos genes de la PKS y/o comprenden una o más variantes de genes auxiliares; y (c) cultivar dicha cepa y aislar de modo opcional, los análogos de poliquétido producidos.

El paso de proporcionar una cepa de un organismo que contenga uno o más genes PKS puede incluir un paso de proporcionar un ácido nucleico que codifique para un cluster de genes que comprenda dichos uno o más genes PKS y en el que se encuentre(n) ausente(s) dichos uno o más genes auxiliares; e introducir dicho ácido nucleico en el organismo.

Los genes PKS son, con preferencia, genes de la rapamicina. Los genes auxiliares que faltan son, de preferencia, uno o más de rapK, rapI, rapQ, rapM, los genes contiguos rapN y O (designados en el presente documento como rapN/O), rapL y rapJ. En realizaciones preferidas contempladas por la presente invención:

i) un gen auxiliar se encuentra ausente, por ejemplo, se encuentra ausente rapK; rapI; rapQ; rapM; rapL, rapN/O o rapJ; de preferencia en el caso en que está ausente un gen auxiliar, el mismo se selecciona entre el grupo que consta de rapK; rapI; rapQ; rapM; rapN/O y rapJ;

ii) dos genes auxiliares se encuentran ausentes, por ejemplo, están ausentes: rapKrapI; rapKrapQ; rapKrapM; rapKrapN/O; rapKrapL; rapKrapJ; rapk/rapQ; rapIrapM; rapIrapN/O; rapIrapL; rapIrapJ; rapQrapM; rapQrapN/O; rapQrapL; rapQrapJ; rapMrapN/O; rapMrapL; rapMrapJ; rapN/OrapL; rapN/OrapJ o rapLrapJ;

iii) tres genes auxiliares se encuentran ausentes, por ejemplo, están ausentes: rapKrapIrapQ; rapKrapIrapM; rapKrapIrapN/O; rapKrapIrapL; rapKrapIrapJ; rapKrapQrapM; rapKrapQRapN/O; rapKrapQrapL; rapKrapQrapJ; rapKrapMrapN/O; rapKrapMrapL; rapKrapMrapJ; rapKrapN/OrapL; rapKrapN/OrapJ; rapKrapLrapJ; rapIrapQrapM; rapIrapQrapN/O; rapIrapQrapL; rapIrapQrapJ; rapIrapMrapN/O; rapIrapMrapL; rapIrapMrapJ; rapIrapN/OrapL; rapIrapN/OrapJ; rapIrapLrapJ; rapQrapMrapN/O; rapQrapMrapL; rapQrapMrapJ; rapQrapN/OrapL; rapQrapN/OrapJ; rapQrapLrapJ; rapMrapN/OrapL; rapMrapN/OrapJ; rapMrapLrapO o rapN/OrapLrapJ;

iv) cuatro genes auxiliares se encuentran ausentes, por ejemplo, están ausentes: rapKrapIrapQrapM; rapKrapIrapQrapN/O; rapKrapIrapQrapL; rapKrapIrapQrapJ; rapKrapIrapMrapN/O; rapKrapIrapMrapL; rapKrapIrapMrapJ; rapKrapIrapN/OrapL; rapKrapIrapN/OrapJ; rapKrapIrapLrapJ; rapKrapQrapMrapN/O; rapKrapQrapMrapL; rapKrapQrapMrapJ; rapKrapQrapN/OrapL; rapKrapQrapN/OrapJ; rapKrapQrapLrapJ; rapKrapQrapQrapM; rapKrapQrapMrapN/O; rapKrapQrapMrapL; rapKrapQrapMrapJ; rapKrapQrapN/OrapL; rapKrapQrapN/OrapJ; rapKrapQrapLrapJ; o

vii) siete genes auxiliares se encuentran ausentes; p.e., están ausentes, rapKrapIrapQrapMrapN/OrapLrapJ.

La expresión “se encuentran ausentes uno o más genes auxiliares funcionales” cubre tanto la ausencia de un gen, como la presencia de un gen en un estado no funcional, p.e. porque ha sido inutilizado de manera específica.

En un aspecto, la invención proporciona una vía novedosa y expedita para la incorporación eficiente de precursores naturales o no naturales a ligandos de FKBP. Estos incluyen, pero no se limitan a, los sistemas poliquétido sintasa/sistemas de sintasa no ribosomal de péptidos de rapamicina, antascomicina, FK520, FK506, “hyg”, FK523, meridamicina, FK525 y tsukubamicina, la invención por tanto proporciona análogos novedosos de sus productos naturales respectivos. En un aspecto específico, la invención proporciona una vía novedosa y expedita para la incorporación eficiente de precursores naturales o no naturales que proporcionen análogos novedosos de la rapamicina.

ES 2 296 063 T3

Por tanto, en un aspecto la presente invención proporciona un método para generar análogos de ligandos de FKBP que incorporan una unidad de partida no natural, dicho método comprende:

- (a) generar una cepa recombinante en la que al menos el homólogo de rapK se ha suprimido o inactivado; y
- 5 (b) alimentar con una unidad de partida no natural dicha cepa

En una realización preferida, la cepa recombinante se genera utilizando los métodos de la presente invención.

10 También proporcionamos librerías de compuestos y compuestos individuales disponibles utilizando dichos sistemas. De este modo, un compuesto típico es una variante de un compuesto producido naturalmente por un sistema de genes que tiene una porción nuclear responsable de la generación de un producto básico, y una multiplicidad de genes auxiliares responsables de realizar modificaciones relativamente pequeñas del producto básico, variante que se puede producir mediante un sistema alterado de modo que uno o más de los genes auxiliares están ausentes, son no 15 funcionales, o son reemplazados por variantes funcionales. Una clase preferida de compuestos son los análogos de la rapamicina que corresponden a productos del sistema de la rapamicina en el que uno o más de los genes seleccionados entre el grupo que consta de los genes rapK, rapI, rapQ, rapM, rapN, rapO, rapL y rapJ se encuentran ausentes, son no funcionales o son variantes.

20 También proporcionamos análogos novedosos de FKBP, incluyendo los análogos de la rapamicina. Tales compuestos pueden poseer una o más propiedades útiles, por ejemplo, pero sin limitarse a, utilidad como inmunosupresores, agentes antifúngicos, agentes anticáncer, agentes neuroregenerativos, o agentes para el tratamiento de la soriasis, artritis reumatoide, fibrosis y otras enfermedades hiperproliferativas.

25 Definiciones

Como se utiliza en el presente documento, el término “*gene(s) modificadores*” incluye los genes requeridos para las modificaciones post-poliquétilo sintasa del poliquétilo, por ejemplo, pero sin limitarse a, citocromo P-450 monooxigenasas, ferredoxinas y O-metiltransferasas dependientes de SAM. En el sistema de la rapamicina estos genes modificadores incluyen a rapN/O, rapM, rapI, rapQ, y rapJ pero los expertos en la técnica apreciarán que los sistemas PKS relacionados con la rapamicina (por ejemplo, pero sin limitarse a: FK506, FK520, antascomicina, “hyg”, FK523, meridamicina, FK525 y tsukubamicina) tendrán homólogos de al menos un subgrupo de estos genes, algunos de los cuales se discuten posteriormente.

35 Como se utiliza en el presente documento, el término “*gen(es) de suministro del precursor*” incluye los genes requeridos para el suministro de los precursores naturales o no naturales, los genes requeridos para la síntesis de cualquier precursor incorporado de manera natural o no natural y los genes requeridos para la incorporación de cualquier precursor incorporado de manera natural o no natural. Por ejemplo, pero sin limitarse a ello, en el sistema de la rapamicina estos genes incluyen rapL, rapK y rapP pero un experto en la técnica apreciará que los sistemas PKS 40 relacionados con la rapamicina (por ejemplo, pero sin limitarse a: FK506, FK520, antascomicina, “hyg”, FK523, meridamicina, FK525 y tsukubamicina) poseerán homólogos de estos genes, algunos de los cuales se discuten con mayor profundidad posteriormente.

45 Como se utiliza en el presente documento, el término “*gen(es) auxiliar(es)*” incluye referencias a los genes modificadores, genes de suministro del precursor o ambos, genes modificadores y genes de suministro del precursor.

Como se utiliza en el presente documento, el término “*precursor*” incluye unidades de partida naturales (p.e. ácido 4,5-dihidroxiciclohex 1-eno carboxílico), unidades de partida no naturales, y aminoácidos incorporados naturalmente (p.e. ácido pipecólico) y aminoácidos incorporados de modo no natural.

50 Como se utiliza en el presente documento, el término “*unidad de partida no natural*” se refiere a cualesquiera de los compuestos que pueden ser incorporados como unidad de partida en la síntesis de poliquétilo que no son la unidad de partida usualmente utilizada por esa PKS.

55 Como se utiliza en el presente documento, el término “*ligandos de FKBP*” se refiere a los compuestos que se unen a la inmunofilina FKBP, tales compuestos contienen, preferiblemente, una α , β -diceto amida en la que el β -ceto se encuentra enmascarado por un hemi-acetal. Tales compuestos incluyen, sin limitación, la rapamicina, FK520, FK506, antascomicina, “hyg”, FK523, meridamicina, FK525 y tsukubamicina,

60 Como se utiliza en el presente documento, el término “*clusters de biosíntesis que codifican ligandos de FKBP*” incluye pero no se limita a los grupos de genes que dirigen la síntesis de la rapamicina, FK506, FK520, “hyg”, FK523, antascomicina, meridamicina, FK525 y tsukubamicina.

65 Como se utiliza en el presente documento, el término “*cepas que contienen grupos de biosíntesis que codifican ligandos de FKBP*” incluye pero no se limita a: *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* (p.e. NRRL 5491), *Actinoplanes* sp. N902-109 (p.e. FERM BP-3832), *Streptomyces* sp. AA6554, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6475 (p.e. ATCC 14891), *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6678 (p.e. ATCC 55087), *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6674, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus*

(p.e. ATCC 55276), *Streptomyces tsukubaensis* No.9993 (p.e. FERM BP-927), *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *yakushimaensis*, *Streptomyces* sp. (p.e. DSM 4137), *Streptomyces* sp. (p.e. DSM 7348), *Micromonospora* n.sp. A92-306401 (p.e. DSM 8429) o *Streptomyces* sp. MA 6858 (p.e. ATCC 55098).

5 Como se utiliza en el presente documento, el término “homólogo de rapK” se refiere a los homólogos del gen rapK de la rapamicina en otros grupos de biosíntesis que codifican ligandos de FKBP, por ejemplo pero sin limitarse a: el gen fkbO del grupo FK520, el gen fkbO del grupo FK506 y el Orf5 en el grupo “hyg”. Tales homólogos de rapK realizan la misma función que rapK en la síntesis de estos ligandos relacionados con FKBP, es decir, son esenciales en el suministro de la unidad de partida natural. De preferencia, tales homólogos de rapK poseen al menos 40% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de rapK como se muestra en la Figura 27 (SEC ID NO: 13).

Descripción detallada de la invención

15 En un aspecto, la presente invención proporciona un método novedoso y expedito para la transformación de *S. hygroscopicus*. La utilización de la tecnología de fagos para el aislamiento de cepas genéticamente modificadas de *S. hygroscopicus* ha sido descrita previamente (Khaw *et al.*, 1998; Lomovskaya *et al.*, 1997). Sin embargo, no se ha informado de otro método aparte de la transfección para la introducción de ADN en la cepa de *S. hygroscopicus* productora de rapamicina. De hecho, se ha afirmado previamente que los métodos comúnmente utilizados de transformación con 20 ADN plasmídico o transferencia conjugativa no fueron exitosos con la cepa productora de rapamicina (Lomovskaya *et al.*, 1997; Kieser *et al.*, 2000; Schweke *et al.*, 1995).

25 En la presente invención, se estableció sorprendentemente un protocolo de conjugación para la transformación existente de *S. hygroscopicus* como se describe en el Ejemplo 1. La metodología se ejemplificó mediante el aislamiento del mutante por delección en *S. hygroscopicus* MG2-10 (Ejemplo 2) y mediante la expresión de los genes y combinaciones de genes como se describen en los Ejemplos 3, 5 y 15.

30 Por tanto, en un aspecto la presente invención proporciona un método para la producción de una cepa recombinante que contiene los clusters de biosíntesis que codifican los ligandos de FKBP en los que uno o más genes auxiliares han sido suprimidos o inactivados, dicho método comprende:

- (a) construcción de un plasmidio de conjugación en una cepa de *E. coli* que sea *dam*⁻, *dcm*⁻ o *dam*⁻ y *dcm*⁻;
- (b) la generación de esporas a partir de dicha cepa adecuadas para la conjugación en la que dicha cepa crece a una humedad de entre 10% y 40% y las esporas se colectan entre los días 5 y 30;
- (c) la conjugación de la cepa de *E. coli* del paso (a) con las esporas del paso (b) en un medio que contiene por litro:
 - i) 0,5 g a 5 g de polvo de maíz pulido,
 - ii) 0,1 g a 5 g de extracto de levadura,
 - iii) 0,1 g a 10 g carbonato de calcio; y
 - iv) 0,01 g a 0,5 g de sulfato de hierro;

40 45 dicho medio contiene adicionalmente BACTO-agar y almidón y se somete a secado para producir una pérdida de peso del 1-20%; y

50 (d) opcionalmente el cultivo de la cepa bajo condiciones apropiadas para la producción de poliquétido.

De preferencia, la cepa de *E. coli* del paso (a) es *dam*⁻ y *dcm*⁻.

55 De preferencia, en el paso (b) las esporas se colectan entre los días 10 y 25 o entre los días 14 y 21. En otra realización, en el paso (b), la cepa se cultiva a una humedad de entre 10 y 20%.

En una realización específica, el almidón del medio utilizado en el paso (c) es almidón de trigo.

60 En realizaciones preferidas, los medios utilizados en el paso (c) contienen 1 g a 4 g polvo de maíz pulido, 1 g a 4 g de extracto de levadura, 1 g a 5 g de extracto de levadura; y 0,2 g a 0,4 g de sulfato de hierro por litro. En una realización más preferida, el medio contiene por litro: 2,5 g polvo de maíz pulido, 3 g de extracto de levadura, 3 g de extracto de levadura; y 0,3 g de sulfato de hierro;

65 La estrategia de complementación que se muestra en esta invención proporciona un método expedito para evaluar e identificar la función de cada uno de los genes auxiliares p.e. rapK, rapQ, rapN/O, rapM, rapL, rapJ y/o rapI en la biosíntesis de rapamicina. El producto del gen RapK ha sido identificado previamente como un candidato interesante para la dioxigenasa dependiente de pteridina que pudiera catalizar también un paso de oxidación en la biosíntesis de rapamicina (Molnár *et al.*, 1996). El gen homólogo de fkbO se identificó en el grupo de genes de biosíntesis de

FK506 y debido a la semejanza estructural de la rapamicina y de FK506, se ha postulado un papel para rapK en la oxidación del grupo OH de C9 (Motamedi *et al.*, 1996). Los hallazgos en los Ejemplos 3, 4 y 6, que describen la producción dependiente de rapK de pre-rapamicina por *S. hygroscopicus* MG2-10 (pSGsetrapK) sugieren que RapK posee al menos una función adicional en la biosíntesis de rapamicina.

5 En otro aspecto, por tanto, los métodos de la presente invención conducen a la elucidación de la función de RapK, es decir que la expresión del gen rapK es esencial en la acumulación de cualquier producto macrólido ciclado. En otro aspecto diferente, la presente invención describe la complementación de *S. hygroscopicus* MG2-10 con fkbO, el homólogo de rapK del grupo FK520, con la observación sorprendente de la producción, dependiente de fkbO, de pre-rapamicina por *S. hygroscopicus* MG2-10 (pMG169-1) (Ejemplo 11). Puede ser notado por un experto en la técnica que fkbO desempeña una función en la producción de FK520 como rapK y fkbO en la producción de rapamicina. Más aún, un experto en la técnica apreciará que otros homólogos de rapK, que incluyen, pero no se limitan a, fkbO en el cluster FK506, fkbO en el cluster FK520 y Orf5 en el cluster "hyg" también desempeñan la misma función. En otro aspecto diferente de la invención, los homólogos de rapK en los grupos de biosíntesis que codifican para ligandos 10 de FKBP, que incluyen, pero no se limitan a, FK506, FK520, FK525, antascomicina, FK523, tsukubamicina, y "hyg" pueden ser eliminados o inactivados, lo que proporciona cepas incapaces de fabricar sus productos naturales conocidos respectivos. De modo semejante, la estrategia de complementación que se describe con anterioridad proporciona un 15 método expedito para investigar la función, especificidad y orden de los productos de genes auxiliares expresados en la biosíntesis de otros políptidos o péptidos no ribosomales.

20 En una clase de realización preferida, la presente invención proporciona un método para la producción de una cepa hospedera recombinante capaz de producir análogos de la rapamicina, que involucra además la construcción de delecciones genómicas, que incluyen pero no se limitan a rapQONMLKJI, introducidas en *S. hygroscopicus* y la complementación o complementación parcial por expresión de genes únicos o combinaciones de genes, que incluyen, 25 pero no limitan a, rapK, rapI, rapQ, rapM, los genes contiguos rapN y O (en el presente documento designados como rapN/O), rapL y rapJ, en cassetes génicos. Además, la invención proporciona un método para producir dichos análogos de la rapamicina mediante el cultivo de dicha cepa hospedera recombinante, y el aislamiento opcional de los 30 análogos de la rapamicina producida. De este modo, la cepa recombinante MG2-10 (pSGsetrapK), producida mediante complementación de la cepa de delección genómica *S. hygroscopicus* MG2-10, con rapK, se cultivó para producir 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina (pre-rapamicina).

En otro aspecto diferente de esta clase de invención, la estrategia involucra la integración de un vector que comprenda un subconjunto de genes que incluya, pero no se limite a, rapK, rapI, rapQ, rapM, rapN, rapO, rapL y rapJ en el mutante por delección de *S. hygroscopicus* mencionado anteriormente. Tal integración puede realizarse utilizando 35 una variedad de funciones de integración que incluyen, pero no se limitan a: vectores basados en φ C31, vectores basados en pSAM2 integrasa (p.e. en pPM927 (Smovkina *et al.*, 1990)), R4 integrasa (p.e. en pAT98 (Matsuura *et al.*, 1996)), φ VWB integrasa (p.e. en pKT02 (Van Mellaert *et al.*, 1998)), φ BT1 integrasa ((p.e. pRT801) Gregory *et al.*, en prensa) y L5 integrasa (p.e. Lee *et al.*, 1991). En algunos casos pudiera ser necesaria la alteración de la cepa hospedera por adición de los sitios específicos attB para la integrasa para permitir una integración de alta eficiencia. 40 Pueden ser utilizados también vectores de replicación, ya sea como reemplazo de, o además de los vectores basados en φ C31. Estos incluyen, pero no se limitan a, vectores basados en pIJ101 (p.e. pIJ487, Kieser *et al.*, 2000), pSG5 (p.e. pKC1139, Bierman *et al.*, 1992) y SCP2* (p.e. pIJ698, Kieser *et al.*, 2000). Esta metodología ha sido ejemplificada en el presente documento por el uso de las funciones de integración sitio específicas del φ BT1 y φ C31.

45 Aunque la introducción de cassetes génicos en *S. hygroscopicus* se ha ejemplificado en la presente invención utilizando las funciones de integración sitio específicas del φ BT1 y el φ C31, los expertos en la técnica apreciarán que existen descritas en la literatura un número de estrategias diferentes, que incluyen las mencionadas anteriormente que pueden también ser utilizadas para introducir tales cassetes génicos en cepas hospederas procariontes, o de preferencia, actinomycetes. Estas incluyen la utilización de vectores de integración sitio específicos alternativos como se describe 50 anteriormente y en los siguientes artículos (Kieser *et al.*, 2000; Van Mellaert *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1991; Smovkina *et al.*, 1990; Matsuura *et al.*, 1996). De modo alternativo, los plasmidos que contengan los cassetes génicos pueden integrarse en un sitio neutral en el cromosoma utilizando sitios de recombinación homóloga. Más aún, para un número de cepas hospederas de actinomycete, incluyendo *S. hygroscopicus*, los cassetes génicos pueden introducirse en plásmidos de autoreplicación (Kieser *et al.*, 2000; WO98101571).

55 En un aspecto diferente de esta clase, la invención proporciona cassetes génicos para la complementación de las cepas recombinantes por delección de *S. hygroscopicus*. Previamente han sido descritos métodos de construcción de cassetes génicos y sus heterólogos utilizados para producir macrólidos glicosilados híbridos (Gaisser *et al.*, 2002; WO01/79520, WO 03/048375). El método de clonaje utilizado para aislar los cassetes génicos de la presente invención 60 difiere significativamente de la estrategia previamente descrita en la que el cassette genético se ensambla directamente en un vector de expresión en lugar de pre-ensamblarse los genes en plásmidos pUC18/19-, con lo que se proporciona un procedimiento de clonaje más rápido. Esta estrategia se ejemplifica como se describe en los Ejemplos 3, 4, 5, 9 y 15. Como se describe en el presente documento, un vector adecuado (por ejemplo, pero sin limitación, pSGLit1) puede construirse para el uso en la construcción de dichos cassetes génicos, en el que un sitio de restricción adecuado (por ejemplo, pero sin limitarse a, XbaI), sensible a la metilación dam se inserte hacia 5' del (los) gen(es) de interés y un segundo sitio de restricción (por ejemplo XbaI) pueda insertarse hacia 3' de los genes de interés. Los expertos apreciarán que pueden utilizarse otros sitios de restricción como alternativa a XbaI y que el sitio sensible a metilación 65 puede estar hacia 5' o 3' del(los) gen(es) de interés.

En un aspecto diferente de esta clase, la presente invención proporciona un sistema para la producción combinatoria de cepas hospederas recombinantes capaces de producir análogos de la rapamicina, que involucra la construcción de una delección genómica rapQONMLKJI introducida en *S. hygroscopicus* y su complementación parcial mediante una librería combinatoria de cassetes génicos que consta de uno o varios de los genes auxiliares suprimidos rapQ, rapN/O, rapM, rapL, rapK, rapJ, y rapI.

La estrategia presentada comprende, como parte de la estrategia de clonaje, combinar genes que incluyen, pero no se limitan exclusivamente a, rapK, rapI, rapQ, rapM, rapN/O, rapL y rapJ, y/o genes con funciones génicas similares, en cualquier combinación y orden de genes posibles.

Otro aspecto de la invención permite el aumento de la expresión génica mediante el cambio en el orden de los genes en el casete génico. Como se aplica a la clase preferida, los genes pueden comprender uno o más de rapK, rapI, rapQ, rapM, rapN/O, rapL y rapJ y/o genes con funciones similares, lo que permite el arreglo de los genes en una multitud de permutaciones como se presenta en el Ejemplo 5.

La estrategia de clonaje descrita en esta invención también permite la introducción de una cola de histidina en combinación con una secuencia terminadora 3' en el casete génico para aumentar la expresión génica. Los expertos en la técnica apreciarán que pueden ser utilizadas otras secuencias terminadoras.

65 Otro aspecto de la invención describe los usos múltiples de las secuencias del promotor en el casete génico ensamblado para la optimización de la expresión génica.

ES 2 296 063 T3

En estos momentos será obvio para los expertos en la materia que pueden construirse las cepas por delección de *S. hygroscopicus*, delección que comprenda, pero no se limite a, un gen o un subgrupo de los genes rapQ, rapN/O, rapM, rapL, rapK, rapJ y rapI. En este caso, los casetes génicos para la complementación o la complementación parcial generalmente constan de genes únicos o una pluralidad de genes seleccionados entre el subgrupo de genes suprimidos.

5 Es bien conocido por los expertos en la materia que existen homólogos para varios de los genes de suministro del precursor y de los genes modificadores de la rapamicina en los grupos de genes de sistemas estrechamente relacionados que incluyen FK506 (Motamedi *et al.*, 1996; Motamedi *et al.*, 1997; Motamedi & Shafiee, 1998) y FK520 (Wu *et al.*, 2000). Estos incluyen los siguientes, como se describen en la Tabla I inferior:

10

TABLA I

Gen de la Rapamicina	Homólogo de FK506	Homólogo de FK520	'hyg'
rapI (No. Acc CAA60470)	fkB M (No. Acc AAC44360)	fkB M (No. Acc AAF86398)	
rapJ (No. Acc CAA60469)	fkB D (No. Acc AAC44359)	fkB D (No. Acc AAF86397)	
rapK (No. Acc CAA60468)	fkB O (No. Acc AAC68817)	fkB O (No. Acc AAF86394)	Orf5 (No Acc AAC38060)
rapL (No. Acc CAA60467)	fkB L (Motamedi & Shafiee, 1998)	fkB L (No. Acc AAF86391)	

15 Aunque los grupos de genes de otros sistemas estrechamente relacionados, que incluyen, pero no se limitan a aquellos de la biosíntesis de FK523, meridamicina, FK525, antascomicina y tsukubamicina no han sido secuenciados aún, puede anticiparse que se demostrará que los mismos poseen un parecido cercano a aquellos cuyas secuencias han sido determinadas, y, en particular, que estos grupos de genes contendrán homólogos cercanos de varios de los genes modificadores y de suministro del precursor de la rapamicina. Por tanto, en otro aspecto más de la invención, los genes de grupos de genes heterólogos de tales sistemas estrechamente relacionados, que incluyen, pero no se limitan a, FK506, FK520, FK523, antascomicina, meridamicina, FK525, "hyg" y tsukubamicina pueden ser incluidos en casetes génicos en lugar de o además de los homólogos de la rapamicina para la complementación y/o la complementación parcial de la cepa productora de rapamicina que contiene una delección de un gen o delecciones que incluyen pero no se limitan a los genes rapK, rapI, rapQ, rapM, rapN/O, rapL y rapJ.

20 Es bien conocido para los expertos en la técnica que los grupos de genes de poliquétido pueden ser expresados en hospederos heterólogos (Pfeifer y Khosla, 2001). De acuerdo con esto, la presente invención incluye la transferencia del grupo de genes de la biosíntesis de rapamicina con o sin genes de resistencia y regulatorios, ya sea completo o 25 contenido de delecciones, para la complementación en hospederos heterólogos. Los métodos y vectores para la transferencia como se definió anteriormente de dichos grandes fragmentos de ADN son bien conocidos en la técnica (Rawlings, 2001; Staunton y Weissman, 2001) o se proporcionan en el presente documento en los métodos explicados. En 30 este contexto una cepa de células hospederas es un procarionte, con mayor preferencia un actinomicete o *Escherichia coli*, con mayor preferencia aún incluye, pero no se limitan a *S. hygroscopicus*, *S. hygroscopicus* sp., *S. hygroscopicus* var. *ascomyceticus*, *Streptomyces tsukubaensis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces lividans*, *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cinnamonensis*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseofuscus*, *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces venezuelae*, *Micromonospora griseorobusta*, *Amycolatopsis mediterranei* o *Actinoplanes* sp. N902-109.

35 Los análogos de la rapamicina pueden obtenerse mediante un proceso que comprende los pasos de:

40 a) construcción de una cepa por delección, a través de los métodos de la invención; la delección incluye, pero no se limita a, los genes rapK, rapQ, rapN/O, rapM, rapL, rapJ y rapI, o un subgrupo de los mismos,

45 b) cultivo de la cepa bajo condiciones adecuadas para la producción de poliquétido;

50 c) el aislamiento opcional del intermediario del análogo de la rapamicina producido;

55 d) la construcción de una cepa de biotransformación que contenga un casete genético que comprenda todos o un subgrupo de los genes suprimidos;

60 e) la suplementación del intermediario del análogo de la rapamicina al sobrenadante o aislamiento del cultivo como en el paso c) a un cultivo de la cepa de biotransformación bajo condiciones adecuadas de biotransformación

65 f) aislamiento opcional del análogo de la rapamicina producido.

Las cepas hospederas adecuadas para la construcción de la cepa de la biotransformación incluyen la cepa hospedera nativa en la que el grupo de genes de la biosíntesis de rapamicina ha sido suprimido, o sustancialmente suprimido o inactivado, de modo tal que se elimine la síntesis del poliquétido, o una cepa hospedera heteróloga. Los métodos para la expresión de casetes génicos que incluyen uno o una pluralidad de genes modificadores o genes de suministro de precursor en hospederos heterólogos se describen en WO 01/79520. En este contexto, los hospederos heterólogos adecuados para la biotransformación de dicho intermediario del ligando del análogo de FKBP incluyen, pero no se limitan a, *S. hygroscopicus*, *S. hygroscopicus* sp., *S. hygroscopicus* var. *ascomyceticus*, *Streptomyces tsukubaensis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces lividans*, *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cinnamonensis*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseofuscus*, *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces venezuelae*, *Micromonospora griseorubida*, *Amycolatopsis mediterranei*, *Escherichia coli* y *Actinoplanes* sp. N902-109.

La estrecha relación estructural entre la rapamicina y FK506, FK520, FK523, "hyg", meridamicina, antascomicina, FK525 y tsukubamicina, entre otros, y las homologías establecidas entre los genes involucrados en la biosíntesis de rapamicina y FK506 y FK520 (*vide supra*), hacen obvia la aplicación de los métodos de la presente invención a estos sistemas estrechamente relacionados. En otro aspecto, por tanto, la invención incluye la construcción de cepas por delección de las cepas productoras de compuestos estrechamente relacionados, que incluyen pero no se limitan a FK506, FK520, FK523, "hyg", antascomicina, meridamicina, FK525 y tsukubamicina, que contengan una delección de un gen o delecciones de genes modificadores y/o de genes de suministro del precursor, y más particularmente, que incluyan pero no se limiten a, genes con funciones similares como rapK, rapI, rapQ, rapM, rapN/O, rapL y rapJ, y su complementación o complementación parcial con un gen o casete génico que comprenda todos o un subgrupo de los genes homólogos suprimidos, o sus homólogos funcionales a partir de grupos de genes heterólogos, que incluyen pero no se limitan a rapK, rapI, rapQ, rapM, rapN/O, rapL y rapJ para producir cepas recombinantes capaces de producir análogos de poliquétido que varíen a partir del poliquétido de partida en la incorporación de precursores alternativos y/o el grado de la modificación post-PKS. Además, la invención proporciona un método de producción de dichos análogos de poliquétido mediante el cultivo de dicha cepa hospedera recombinante, y el aislamiento de modo opcional de los análogos de poliquétido producidos.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para la producción de cepas hospederas recombinantes capaces de producir análogos de ligandos de poliquétidos FKBP (distintos de la rapamicina) que varíen a partir del poliquétido de partida en la incorporación de precursores alternativos y/o el grado de la modificación post-PKS, lo que incluye la construcción de una cepa por delección genómica en la cual todos o una porción de los genes auxiliares han sido eliminados, y su complementación parcial mediante un casete génico que comprenda uno o la pluralidad de los genes suprimidos y/o sus homólogos, y además, un método de producir dichos análogos de poliquétidos mediante el cultivo de dicha cepa hospedera recombinante, y opcionalmente el aislamiento de los análogos de poliquétido producidos. Es bien conocido en la técnica que en la mayoría de los casos los genes auxiliares se co-localizan con los genes de la poliquétido sintasa en un grupo de genes (Hopwood, 1997; Motamedi y Shafiee, 1998; Wu *et al.*, 2000) y de este modo se facilita la creación de la cepa por delección. Los genes auxiliares a ser suprimidos pueden o no formar naturalmente una secuencia contigua, sin embargo, una vez que se ha creado la cepa por delección, la complementación parcial mediante casetes génicos proporciona una estrategia expedita para la producción de cepas recombinantes en las que han sido suprimidos uno o varios de dichos genes. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona un método para la producción combinatoria de cepas hospederas recombinantes capaces de producir análogos de ligandos de poliquétidos FKBP (distintos de la rapamicina) que varíen a partir del poliquétido de partida en la incorporación de precursores alternativos y/o el grado de la modificación post-PKS, que comprendan la complementación parcial de dicha cepa por delección genómica mediante una librería combinatoria de casetes génicos que comprenda uno o varios de los genes suprimidos, y además, un método para producir dichos análogos de poliquétidos mediante el cultivo de dichas cepas hospederas recombinantes bajo condiciones adecuadas para la producción de poliquétidos, y opcionalmente el aislamiento de los análogos de poliquétido producidos. En este contexto, una cepa celular hospedera recombinante preferida es un procariote, con mayor preferencia un actinomicete, con mayor preferencia aún, una cepa seleccionada entre *S. hygroscopicus*, *S. hygroscopicus* sp., *S. hygroscopicus* var. *ascomyceticus*, *Streptomyces tsukubaensis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces lividans*, *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cinnamonensis*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseofuscus*, *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces venezuelae*, *Micromonospora griseorubida*, *Amycolatopsis mediterranei* o *Actinoplanes* sp. N902-109.

Los expertos en la técnica apreciarán que los métodos de la presente invención pueden aplicarse a cepas hospederas recombinantes en las que la poliquétido sintasa (PKS) ha sido alterada mediante ingeniería genética para expresar una rapamicina modificada u otro análogo de poliquétido. La literatura previa describe varios métodos para la producción de poliquétidos novedosos por delección o inactivación de dominios individuales (WO93/13663, WO97/92358), la construcción de poliquétido sintetasas híbridas (WO98/01546, WO00/00618, WO00/01827) o la alteración de la especificidad de dominio mediante mutagénesis dirigida (WO02/14482).

Es bien conocido en la técnica que los péptidos no ribosomales se biosintetizan por las Péptido Sintetasas No Ribosomales (NRPSs) a través de la condensación por pasos de sucesivos bloques elementales aminoacídicos, en un proceso análogo al de la biosíntesis de poliquétido (para una revisión, ver Marahiel *et al.*, 1997; Schwarzer y Marahiel, 2001). Es bien conocido que varios péptidos no ribosomales incluyen residuos de aminoácidos inusuales (modificados, aminoácidos proteinogénicos y/o aminoácidos no proteinogénicos) y ácidos carboxílicos, cuyos genes de biosíntesis se encuentran colocalizados junto a los genes de la péptido sintasa no ribosomal en el grupo de genes de péptidos no

ribosomales (Marahiel *et al.*, 1997; Konz y Marahiel, 1999; Blanc *et al.*, 1997). En varios casos, los productos peptídicos no ribosomales que se liberan inicialmente de la NRPS se continúan modificando por un grupo de enzimas, que incluyen, pero no se limitan a, glicosil transferasas, reductasas, de acilación o de formación de anillos heterocíclicos (Konz y Marahiel, 1999; Blanc *et al.*, 1995). Estos incluyen los antibióticos cloroeremomicina, pristinamicina, vancomicina y bleomicina (Konz y Marahiel, 1999; Du *et al.*, 2000). Los genes de estas enzimas post-NRPS se encuentran también típicamente colocalizados en el grupo de genes de biosíntesis (Marahiel *et al.*, 1997; Schwarzer y Marahiel, 2001). Por tanto, en un aspecto adicional, la invención incluye un método para la producción de análogos de péptidos no ribosomales, que varían a partir del péptido no ribosomal inicial en la incorporación de aminoácidos precursores alternativos y/o el grado de modificación post-NRPS, lo que comprende la construcción de una cepa por delección genómica en la que se han suprimido todos o una porción de los genes que codifican para la síntesis del aminoácido nativo precursor y/o las enzimas post-NRPS, y su complementación parcial mediante un casete génico que comprende uno o varios de los genes suprimidos y/o sus homólogos, y, adicionalmente, un método para producir dichos análogos de péptidos no ribosomales mediante el cultivo de dicha cepa hospedera recombinante, y opcionalmente el aislamiento de los análogos de péptidos no ribosomales producidos. Los genes de la biosíntesis de precursor y post-NRPS que se suprimen pueden o no formar de manera natural una secuencia contigua, sin embargo, una vez que se ha creado la cepa por delección, la complementación parcial mediante cassetes génicos proporciona una estrategia expedita para la producción de cepas recombinantes en las que uno o una pluralidad de dichos genes se han suprimido. Por tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona un método para la producción combinatoria de cepas hospederas recombinantes capaces de producir análogos de péptidos no ribosomales que varíen del péptido no ribosomal inicial en la incorporación de precursores alternativos y/o el grado de modificación post-NRPS, lo que comprende la complementación parcial de dicha cepa por delección genómica mediante una librería combinatoria de cassetes génicos que comprenda uno o varios de los genes suprimidos, y, además, un método para la producción de dichos análogos de péptidos no ribosomales mediante el cultivo de dichas cepas hospederas recombinantes bajo condiciones adecuadas para la producción de péptidos no ribosomales, y opcionalmente, el aislamiento de los análogos de péptidos no ribosomales producidos. En este contexto, una cepa celular hospedera recombinante preferida es un procarionte, con mayor preferencia un actinomycete, con mayor preferencia aún, una cepa seleccionada entre *S. hygroscopicus*, *S. hygroscopicus* sp., *S. hygroscopicus* var. *ascomyceticus*, *Streptomyces tsukubaensis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces lividans*, *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cinnamomensis*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseofuscus*, *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces venezuelae*, *Micromonospora griseorubida*, *Amycolatopsis mediterranei* o *Actinoplanes* sp. N902-109.

Es bien conocido que muchos actinomycetes contienen múltiples grupos de genes de biosíntesis de diferentes metabolitos secundarios, incluyendo poliquétidos y péptidos sintetizados de manera no ribosomal. Específicamente, se ha demostrado que las cepas de *S. hygroscopicus* producen una variedad de poliquétidos y péptidos sintetizados de manera no ribosomal, además de la rapamicina, FK506, FK520, FK523, meridamicina, FK525, antasomicina y tsukubamicina. Estos incluyen, pero no se limitan a, elaiofilina, bialafos, higromicina, augustomicina, endomicina (A, B), glebomicina, higroscopina, ossamicina y nigericina. Estos grupos de genes de biosíntesis adicionales representan un requerimiento competitivo de los precursores biosintéticos y una demanda metabólica adicional en la cepa hospedera. Con el objetivo de aumentar la producción de la rapamicina deseada, o la de otros análogos de poliquétidos, pudiera ser, en consecuencia, ventajoso suprimir o inactivar cualquier otro grupo de genes de biosíntesis presente en la cepa hospedera. Los métodos para la delección o inactivación de los grupos de genes de biosíntesis son bien conocidos en la técnica.

En un aspecto adicional de esta clase, la invención proporciona una metodología de mutasíntesis para la complementación de cepas por delección recombinantes.

En un aspecto adicional, las cepas de *S. hygroscopicus* de la presente invención que contienen una delección de rapL pueden alimentarse con análogos del aminoácido incorporado naturalmente, ácido L-pipecólico, para producir nuevos análogos de la rapamicina en los que el residuo pipecolil se encuentra reemplazado. La literatura previa describe que un mutante rapL puede complementarse mediante la adición de ácido L-pipecólico al cultivo (Khaw *et al.*, 1998). De modo semejante, se ha demostrado que se aislaron los análogos de la rapamicina después de la adición y la incorporación de análogos del ácido L-pipecólico, L-prolina, L-trans-4-hidroxiprolina, L-cis-4-hidroxiprolina, L-cis-3-hidroxiprolina, ácido trans-3-aza-biciclo[3.1,0]hexano-2-carboxílico (WO98/54308). Utilizando *S. hygroscopicus* MG2-10 como cepa fondo para expresar genes o cassetes génicos que codifiquen para pasos de modificación post-PKS que no incluyan a homólogos rapL o rapL, se genera una librería de cepas de *S. hygroscopicus*, capaz de producir una variedad de productos modificados al suplementarse con análogos del ácido L-pipecólico. Los análogos adecuados del ácido L-pipecólico incluyen al ácido pipecólico y la prolina sustituidos con alquilo, halo, hidroxi, y amino, y más particularmente, los análogos de L-prolina, L-trans-4-hidroxiprolina, L-cis-4-hidroxiprolina, L-cis-3-hidroxiprolina, ácido trans-3-aza-biciclo[3.1,0]hexano-2-carboxílico y ácido L pipecólico demostraron que catalizan el intercambio de PP-ATP, determinado mediante una modificación del método de Lipmann (Nielsen *et al.*, 1991) que incluyen la L-4-hidroxiprolina, 1-hidroxiprolina, 2-hidroxiprolina, 3-hidroxiprolina, trans-3-metil-L-prolina, cis-3-metilprolina, cis-3-metil-DL-prolina, cis,trans-4-metilprolina, cis-4-metil-DL-prolina, trans-4-metil-DL-prolina, trans-4-aminoprolina, cis-4-cloro-L-prolina, 5-iminoprolina clorhídrico, cis-5-metil-DL-prolina, ácido (+)-piperálico, ácido 5-cloropipecólico, ácido 5-hidroxipipecólico, ácido cis-4-hidroxi-L-pipecólico, ácido trans-4-hidroxi-D pipecólico, ácido 4-hidroxiallopipecólico, ácido tiazolidina-4-carboxílico (Nielsen *et al.*, 1991). Esta estrategia se encuentra ejemplificada en el Ejemplo 7.

5 Previamente ha sido descrita la producción de un número limitado de análogos novedosos de la rapamicina después de añadir análogos estructurales cercanos de la unidad de partida natural ácido 4,5-dihidroxiciclohex-1-enecarboxílico a cultivos de *S. hygroscopicus*, y de este modo se ha demostrado que el módulo de carga de la poliquétido sintasa de la rapamicina posee cierta flexibilidad con respecto al ácido de partida (P.A.S. Lowden, *disertación de doctorado*, 5 Universidad de Cambridge, 1997). Sin embargo, estos métodos conducen a la producción de una mezcla de productos. En un aspecto adicional, la presente invención incluye la producción de análogos de la rapamicina y de ligandos de FKBP relacionados mediante la adición a las cepas de la presente invención de análogos de la unidad de partida naturalmente incorporada ácido 4,5-dihidroxiciclohex-1-enecarboxílico para producir análogos de la rapamicina que 10 incorporen unidades de partida alternativas que incluyen, pero no se limitan a, ácido ciclohexano carboxílico, ácido 3-cis,4-trans-dihidroxiciclohexano carboxílico, ácido 1-ciclohexeno carboxílico, ácido 3-ciclohexeno carboxílico, ácido cicloheptano carboxílico, ácido 2-norbomane carboxílico, ácido 3-hidroxiciclohexano carboxílico, ácido 4-hidroxiciclohexano carboxílico, ácido 3-metilciclohexano carboxílico, ácido 4-metilciclohexano carboxílico, ácido 3-(cis/trans) 15 metoxiciclohexano carboxílico, ácido 4-(cis/trans)metoxiciclohexano carboxílico, ácido 4-oxo ciclohexano carboxílico, ácido 3-fluoro-4-hidroxicarboxílico y ácido 4-fluoro-3-hidroxicarboxílico, ácido-óxido 3-ciclohexano carboxílico, ácido 3,4-cis-dihidroxiciclohexano carboxílico, ácido 3-cloro-4-hidroxicarboxílico y ácido 4-cloro-3-hidroxicarboxílico (y el par de diastereoisómeros opuestos), ácido ciclohexilpropiónico, ácido 4-ter-butilciclohexano carboxílico y ésteres y sales simples de los mismos. Esta estrategia se ejemplifica en los Ejemplos 8, 19 y 20.

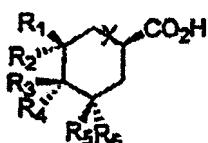
20 Además, pueden añadirse análogos estructurales de los precursores de biosíntesis de la unidad de partida del ácido 4,5-dihidroxiciclohex-1-enecarboxílico (Lowden *et al.*, 2001), lo que conduce a la producción de análogos novedosos de la rapamicina que incorporen unidades de partida alternativas.

25 Sin embargo, estos métodos pueden conducir a la producción de grupos de mezclas de productos; por tanto, la presente invención proporciona, además, un método para la eliminación de la competencia entre las unidades de partida producidas endógenamente y los análogos de ácido de partida alternativos que se añaden con el objetivo de aumentar la eficiencia de la producción de análogos novedosos de la rapamicina.

30 Con el objetivo de eliminar la competencia entre las unidades de partida naturales producidas endógenamente y los análogos de ácidos de partida alternativos añadidos, es preferible interrumpir la biosíntesis de la unidad de partida natural, ácido 4,5-dihidroxiciclohex-1-enecarboxílico. Esto puede lograrse mediante la delección o inactivación de uno o más de los genes involucrados en la biosíntesis de la unidad de partida natural ácido 4,5-dihidroxiciclohex-1-enecarboxílico a partir del ácido siquímico (Lowden *et al.*, 2001) o de la biosíntesis del ácido siquímico en sí misma. En el segundo caso, pudiera ser necesario complementar los cultivos con aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano). De modo alternativo, la producción endógena de la unidad de partida natural ácido 4,5-dihidroxiciclohex-35 1-eno carboxílico puede eliminarse mediante la adición de un inhibidor químico de la biosíntesis del ácido siquímico. Tales inhibidores se encuentran bien descritos en la literatura.

40 En otro aspecto, la invención hace uso del sorprendente descubrimiento de que rapK se encuentra involucrado en el suministro del (de los) precursor(es) de biosíntesis, p.e. la unidad de partida de la rapamicina, ácido 4,5-dihidroxiciclohex-1-eno carboxílico, y por tanto la delección o inactivación de rapK o un homólogo de rapK proporciona una cepa en la que no existe competencia entre la unidad de partida natural y las unidades de partida no naturales añadidas. En otro aspecto, la invención proporciona un método para la incorporación eficiente de los ácidos añadidos, que incluyen, pero no se limitan a aquellos que se describen posteriormente.

45 Por lo tanto, en un aspecto de la invención, el método comprende añadir unidades de partida de la fórmula



55 donde X = enlace o CH₂ y R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ pueden ser iguales o diferentes y pueden ser, de modo independiente, Cl, F, OH, SH, H, alquilo, CN, Br, R₇, OR⁷, C(O)R₇ o HNR₇ donde R₇ es un alquilo C1-C4; R₁ y R₃, R₂ y R₄, R₃ y R₅, R₄ y R₆, R₁ y R₅, o R₂ y R₆ pueden encontrarse unidos por un enlace, sea sustituido o no sustituido, metileno, un enlace éter, un enlace thia o un enlace amino, R₁ y R₂, R₃ y R₄ o R₅ y R₆ pueden encontrarse juntos como una cetona; siempre que no más de 4 entre R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ sean Cl; no más de 2 entre R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ sean HNR₇; no más de 2 entre R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ sean SH y ambos grupos R de un carbono del anillo no sean OH.

60 En una realización preferida, la unidad de partida no se selecciona del grupo que consta de: ácido ciclohexano carboxílico, ácido 3-cis,4-trans-dihidroxiciclohexanocarboxílico, ácido cicloheptanocarboxílico y ácido 3-(cis/trans)-metilciclohexano carboxílico.

65 En realizaciones preferidas: donde R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son una combinación de F y sustitución de OH, no más de 3 de R₁₋₆ se encuentran sustituidos y los restantes son H. Donde R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son una combinación de Cl y sustitución de OH, no más de 3 de R₁₋₆ se encuentran sustituidos y los restantes son H. Donde cualesquiera dos de

ES 2 296 063 T3

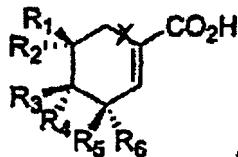
entre R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son OH y cualesquiera dos grupos R en un carbono son F, los restantes son H. Donde dos entre R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son Cl, los restantes son H. Donde dos entre R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son Cl, que no estén enlazados al mismo carbono, y otro R es OH, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es alquilo y los restantes son H; el grupo alquilo debe tener una longitud lineal de no más de 3 carbonos. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es NHR_7 , los restantes son H.

En realizaciones mucho más preferidas: donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son OH y un tercer grupo R es F, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son F, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son OH, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son OH y un tercer grupo R es Cl, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son F, y un tercer grupo R es OH, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es SH, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es SH y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H.

En realizaciones aún mucho más preferidas: donde uno de entre R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es F, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son Cl, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 , son F y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H. Donde uno entre R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es Cl y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es alquilo y los restantes son H; el grupo alquilo no debe contener más de 4 carbonos y tener una longitud lineal de no más de 3 carbonos. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es alquilo y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono) y los restantes son H; el grupo alquilo no debe contener más de 4 carbonos y tener una longitud lineal de no más de 3 carbonos.

Un aspecto adicional de la invención incluye la adición de unidades de partida de la fórmula

30



35 donde X = enlace o CH_2 y R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 y R_6 pueden ser iguales o diferentes y pueden ser, de modo independiente, Cl, F, OH, SH, H, alquilo, CN, Br, R_7 , OR_7 , $C(O)R_7$ o HNR_7 donde R_7 es un alquilo C1-C4; R_1 y R_3 , R_2 y R_4 , R_3 y R_5 , R_4 y R_6 , R_1 y R_5 , o R_2 y R_6 pueden encontrarse unidos por un enlace metíleno, sea sustituido o no sustituido, un enlace éter, un enlace tio, o un enlace amino, R_1 y R_2 , R_3 y R_4 o R_5 y R_6 pueden encontrarse unidos como una cetona; siempre que no más de 4 de R_1 R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 sean Cl; no más de dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 sean HNR_7 ; no más de 2 de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 sean SH y ambos grupos R enlazados al mismo carbono en el anillo no sean OH.

En una realización preferida, la unidad de partida no se selecciona entre el grupo que consta de: ácido 1-ciclohexeno carboxílico y ácido 1-ciclohepteno carboxílico.

45

En realizaciones preferidas, donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son una combinación de sustituciones de F y OH no más de 3 de R_{1-6} se encuentran sustituidos y los restantes son H. Donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son una combinación de Cl y sustitución de OH no más de 3 de R_{1-6} se encuentran sustituidos y los restantes son H. Donde cualesquiera de entre R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son OH y dos de los grupos R restantes son F sobre el mismo carbono, los restantes son H. Donde dos de entre R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son Cl, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son Cl, que no se encuentren enlazados al mismo carbono, y otro grupo R es OH, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es alquilo y los restantes son H; el grupo alquilo debe tener una longitud lineal de no más de 3 carbonos. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es NHR_7 , los restantes son H.

55

En realizaciones mucho más preferidas: donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son OH y un tercer grupo R es F, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son F, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son OH y un tercer grupo R es Cl, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son OH y un tercer grupo R es OH, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es SH, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es SH y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H.

60

En realizaciones mucho más preferidas aún: donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es F, los restantes son H. Donde dos entre R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son Cl, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 , son F y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es Cl, un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es alquilo y los restantes son H; el

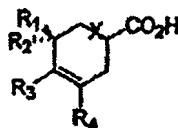
ES 2 296 063 T3

grupo alquilo debe contener no más de 4 carbonos y tener una longitud lineal de no más de 3 carbonos. Donde uno de los siguientes R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es alquilo y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H; y el grupo alquilo debe contener no más de 4 carbonos y tener una longitud lineal de no más de 3 carbonos.

5

Otro aspecto de la invención incluye la adición de unidades de partida de la fórmula:

10



15 donde X = enlace o CH₂, R₁ y R₂, pueden ser iguales o diferentes y pueden ser, de modo independiente, F, Cl, OH, SH, H, CN, OR₇, C(O)R₇, o NHR₇ en los que R₇ es un alquilo C1-C4, R₁ y R₂ pueden también encontrarse juntos formando una cetona, un grupo spirociclopropilo o con -OCH₂-, -CH₂O-, -SCH₂- o -CH₂S-; más aún, R₃, y pueden ser iguales o diferentes y pueden ser, de modo independiente, F, Cl, Br, OR₇, H o CN; siempre que ambos grupos R enlazados al mismo carbono del anillo no sean OH.

20

En una realización preferida, la unidad de partida no debe ser ácido 5-cis-hidroxil-3-ciclohexeno carboxílico.

25 En realizaciones preferidas: Donde dos de los siguientes R₁, R₂, R₃, o R₄ son F, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R₁, R₂, R₃, o R₄ es Cl, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R₃, o R₄ es F y uno de los siguientes R₁ o R₂ es OH, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R₃ o R₄ es Cl y uno de los siguientes R₁ o R₂ es OH, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R₁ o R₂ es SH, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R₁, R₂, R₃, o R₄ es alquilo y los restantes son H; el grupo alquilo debe contener no más de 4 carbonos y tener una longitud lineal de no más de 3 carbonos. Donde uno de los siguientes R₃ o R₄ es alquilo y R₁ o R₂ es OH, los restantes son H; y el grupo alquilo debe contener no más de 4 carbonos y tener una longitud lineal de no más de 3 carbonos.

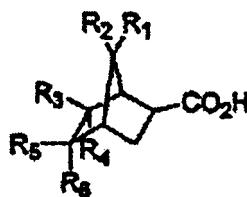
30

En una realización mucho más preferida, donde uno de los siguientes R₁, R₂, R₃, o R₄ es F, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R₁, R₂, R₃, o R₄ es Cl, los restantes son H.

35

Otro aspecto de la invención comprende la adición de unidades de partida de la fórmula

40



45

donde R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ pueden ser iguales o diferentes y pueden ser, de modo independiente, Cl, F, OH, SH, H, alquil, CN, Br, R₇, OR₇, C(O)R₇ o HNR₇ donde R₇ es un alquilo C1-C4; R₁ y R₃, R₂ y R₄, R₃ y R₅, R₄ y R₆, R₁ y R₅, o R₂ y R₆ pueden encontrarse unidos por un enlace, sea sustituido o no sustituido, metileno, un enlace éter, un enlace thia o un enlace amino, R₃ y R₄ o R₅ y R₆ R₆ pueden encontrarse unidos como una cetona; siempre que los grupos R que se originan del mismo carbono del anillo no sean OH.

50

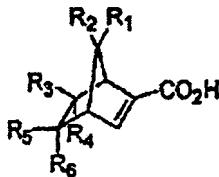
En realizaciones preferidas: donde dos de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son F, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son OH, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son OH, y un tercer grupo R es F, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son OH, y un tercer grupo R es Cl, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son F y un tercer grupo R es OH, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es Br, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es Br y un segundo grupo R es OH, los restantes son H.

55

En realizaciones más preferidas: Donde uno de los siguientes R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es F, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es Cl, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es F y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H. Donde uno de los siguientes R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es Cl y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H. Donde uno de los siguientes R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es SH, los restantes son H. Donde uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es SH y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H. Donde uno de los siguientes R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es alquilo y los restantes son H; el grupo alquilo debe contener no más de 4 carbonos y tener una longitud lineal de no más de 3 carbonos. Donde uno de los siguientes R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ alquilo y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H; y el grupo alquilo debe contener no más de 4 carbonos y tener una longitud lineal de no más de 3 carbonos.

ES 2 296 063 T3

Otro aspecto de la invención incluye adicionar unidades de partida de la fórmula



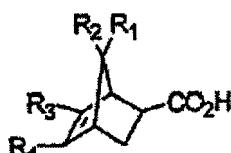
10 donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 pueden ser iguales o diferentes y pueden ser, de modo independiente, Cl, F, OH, SH, H, alquilo, CN; Br, R_7 , OR $_7$, C(O)R $_7$ o HNR $_7$ donde R $_7$ es un alquilo C1-C4; R_1 y R_3 , R_2 y R_4 , R_3 y R_5 , R_4 y R_6 , R_1 y R_5 , o R_2 y R_6 pueden encontrarse unidos por un enlace metíleno, sea sustituido o no sustituido, un enlace éter, un enlace tio o un enlace amino, R_3 y R_4 o R_5 y R_6 pueden encontrarse unidos como una cetona; siempre que ambos grupos R 15 que se originan del mismo carbono del anillo no sean OH.

En realizaciones preferidas: donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son una combinación de sustituciones de F y OH no más de 3 de R_{1-6} están sustituidos y los restantes son H. Donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son una combinación de Cl y sustitución de OH no más de 3 de R_{1-6} están sustituidos y los restantes son H. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son OH y dos de los grupos R restantes unidos al mismo carbono son F, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son Cl, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son Cl (que no estén enlazados al mismo carbono) y un tercer grupo R es OH, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es alquilo y los restantes son H; el grupo alquilo debe tener una longitud lineal de no más de 3 carbonos. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son SH, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es HNR $_7$, los restantes son H.

En realizaciones más preferidas: Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son F, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son OH, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son OH y un tercer grupo R es F, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son OH y un tercer grupo R es Cl, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 son F, y un tercer grupo R es OH, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es Br, los restantes son H. Donde uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es Br y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es SH, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es SH y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H.

En realizaciones más preferidas: Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es F, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es Cl, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es F y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es Cl y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es alquilo y los restantes son H; el grupo alquilo debe tener no más de 4 carbonos y tener una longitud lineal de no más de 3 carbonos. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 o R_6 es alquilo y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H; y el grupo alquilo debe tener no más de 4 carbonos y tener una longitud lineal de no más de 3 carbonos.

Otro aspecto de la invención incluye la adición de unidades de partida de la fórmula



55 donde R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes y pueden ser, de modo independiente F, Cl, OH, SH, H, CN, OR $_7$, C(O)R $_7$, o HNR $_7$ en los que R $_7$ es un alquilo C1-C4, R_1 y R_2 pueden encontrarse juntos en forma de una cetona, un grupo spirociclopropilo o con -OCH $_2$ -, -CH $_2$ O-, -SCH $_2$ - o -CH $_2$ S-; más aún, R_3 , y R_4 pueden ser iguales o diferentes y pueden ser, de modo independiente, F, Cl, Br, OR $_7$, H o CN; siempre que ambos grupos R enlazados al mismo carbono del anillo no sean OH.

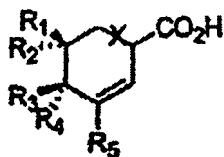
En realizaciones preferidas: Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 y R_4 es F, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 y R_4 es Cl, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 y R_4 es F y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 y R_4 es Cl y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 y R_4 es SH, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 y R_4 es alquil, los restantes son H; y el grupo alquilo debe tener no más de 4 carbonos y tener una longitud lineal de no más de 3

ES 2 296 063 T3

carbonos. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 y R_4 es alquilo y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H; y el grupo alquilo debe contener no más de 4 carbonos y tener una longitud lineal de no más de 3 carbonos. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son F, los restantes son H.

5 Otro aspecto de la invención incluye la adición de unidades de partida de la fórmula

10



15

donde X = enlace o CH_2 ; y R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 pueden ser iguales o diferentes y pueden ser, de modo independiente, Cl, F, OH, SH, H, alquil, CN, Br, R_7 , OR_7 , $C(O)R_7$ o HNR_7 donde R_7 es un alquilo C1-C4, R_1 y R_3 , R_2 y R_4 , pueden encontrarse juntos formando una cetona o enlazados, ya sea de modo sustituido o no sustituido, como enlace metileno, enlace éter, enlace tio o enlace amino donde R_1 y R_2 o R_3 y R_4 se encuentran enlazados como grupo spiro-ciclopropilo o con $-OCH_2-$ o $-CH_2O-$ o $-SCH_2-$ o $-CH_2S-$, R_5 puede ser F, Cl, OR_7 , H o CN; siempre que no más de dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 sean SH y que ambos grupos R enlazados al mismo carbono del anillo no sean OH.

20 En realizaciones preferidas: donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son una combinación de F y OH no más de 3 de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 se encuentran sustituidos y los restantes son H. Donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son una combinación de Cl y OH, no más de 3 de R_1-5 se encuentran sustituidos y los restantes son H. Donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son una combinación de dos OH (que no se encuentren enlazados al mismo carbono) y dos F enlazados al mismo carbono, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son Cl, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son Cl (que no estén enlazados al mismo carbono) y un tercer grupo R es OH, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es alquil, los restantes son H; y el grupo alquilo debe tener una longitud lineal de no más de 3 carbonos. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son SH, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es NHR_7 , los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es SH, los restantes son H.

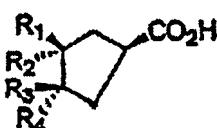
25

30 En realizaciones mucho más preferidas: donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es OH, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es F, los restantes son H. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es Cl, los restantes son H. Donde uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es F y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H. Donde uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es Cl y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H. Donde uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es SH y un segundo grupo es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H. Donde uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es alquilo, los restantes son H; y el grupo alquilo no debe contener más de 4 carbonos y tener una longitud lineal de no más de 3 carbonos. Donde uno de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es alquilo y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H; y el grupo alquilo debe contener no más de 4 carbonos y tener una longitud lineal de no más de 3 carbonos. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son F, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son OH y un tercer grupo R es F, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son OH y un tercer grupo R es Cl, los restantes son H. Donde dos de los siguientes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son F y un tercer grupo R es OH, los restantes son H.

35

40 Otro aspecto de la invención incluye el suministro de unidades de partida de la fórmula

50



55 60 donde R_1 , R_2 , R_3 y R_4 pueden ser iguales o diferentes y pueden ser, de modo independiente, Cl, F, OH, SH, H, alquilo, CN, Br, R_7 , OR_7 , $C(O)R_7$ o HNR_7 , donde R_7 es un alquilo C1-C4, R_1 y R_2 o R_3 y R_4 pueden encontrarse juntos en forma de una cetona, siempre que dos grupos R enlazados al mismo carbono no sean ambos OH.

65 En realizaciones preferidas: donde uno de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 es F, los restantes son H. Donde uno de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 es Cl, los restantes son H. Donde uno de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 es Br, los restantes son H. Donde uno de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 es OH, los restantes son H. Donde uno de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 es F y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H. Donde uno de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 es Cl y un segundo grupo R es OH (que no estén

ES 2 296 063 T3

enlazados al mismo carbono), los restantes son H. Donde uno de R₁, R₂, R₃ o R₄ es SH, los restantes son H. Donde uno de R₁, R₂, R₃ o R₄ es SH y un segundo grupo R es OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H. Donde uno de R₁, R₂, R₃ o R₄ es alquilo, los restantes son H; y el grupo alquilo no debe contener más de 4 carbonos y tener una longitud lineal de no más de 3 carbonos. Donde uno de R₁, R₂, R₃ o R₄ es alquilo y un segundo

5 grupo R OH (que no estén enlazados al mismo carbono), los restantes son H; y el grupo alquilo no debe contener más de 4 carbonos y tener una longitud lineal de no más de 3 carbonos. Donde dos de R₁, R₂, R₃ o R₄ son F, los restantes son H. Donde dos de R₁, R₂, R₃ o R₄ son OH y un tercer grupo R es F, los restantes son H. Donde dos de R₁, R₂, R₃ o R₄ son OH y un tercer grupo R es R es Cl, los restantes son H. Donde dos de R₁, R₂, R₃ o R₄ son F y un tercer grupo R es OH, los restantes son H.

10

En una realización preferida, la presente invención proporciona un método para la incorporación eficiente de: ácido 2-norbornano carboxílico; ácido 2-(cis/trans)-hidroxiciclohexano carboxílico; ácido 3-(cis/trans)-hidroxiciclohexano carboxílico; ácido 4-(cis/trans)-hidroxiciclohexano carboxílico; ácido 2-(cis/trans)-metilciclohexano carboxílico; ácido 4-(cis/trans)-metoxiciclohexano carboxílico; ácido 3-(cis/trans)-metoxiciclohexano carboxílico; ácido 4-(cis/trans)-metoxiciclohexano carboxílico; ácido 4-oxociclohexano carboxílico; ácido etilo 2-oxociclohexano carboxílico; ácido 4-trans-n-pentylciclohexano carboxílico; ácido 2-trans-aminociclohexano carboxílico; ácido 4-cis-aminociclohexano carboxílico; ácido 4-(cis/trans)-aminometilciclohexano carboxílico; ácido ciclopentano carboxílico; ácido ciclobutano carboxílico; ácido 1-metilciclohexano carboxílico; ácido 3-trans-hidroxi-4-cis-fluorociclohexano carboxílico y ácido 4-trans-hidroxi-3-cis-fluorociclohexano carboxílico; ácido 3-cis-hidroxi-4-trans-fluorociclohexano carboxílico y ácido 4-cis-hidroxi-3-trans-fluorociclohexano carboxílico; ácido 3-cis-hidroxi-4-trans-clorociclohexano carboxílico y ácido 4-cis-hidroxi-3-trans-clorociclohexano carboxílico; ácido 3-trans-hidroxi-4-cis-clorociclohexano carboxílico; ácido 3-(cis/trans)-metoxiciclohexano carboxílico; ácido 4-(cis/trans)-metoxiciclohexano carboxílico; ácido 4-oxo ciclohexano carboxílico; ácido ciclobutano carboxílico; ácido 3-trans-hidroxi-4-cis-fluorociclohexano carboxílico y ácido 4-trans-hidroxi-3-cis-fluorociclohexano carboxílico; ácido 3-cis-hidroxi-4-trans-fluorociclohexano carboxílico y ácido 4-cis-hidroxi-3-trans-fluorociclohexano carboxílico; ácido 3-cis-hidroxi-4-trans-clorociclohexano carboxílico y ácido 4-cis-hidroxi-3-trans-clorociclohexano carboxílico; ácido 3-trans-hidroxi-4-cis-clorociclohexano carboxílico y ácido 4-trans-hidroxi-3-cis-clorociclohexano carboxílico; ácido 3-trans-ciclohexeneoxide carboxílico; ácido 3,4-cis-dihidroxiciclohexano carboxílico y ácido 3,4-trans-dihidroxiciclohexano carboxílico; ácido ciclohexanoacético; ácido ciclohexanopropiónico o ácido 4-cis/trans-tert-butilciclohexano carboxílico o ésteres simples o sales de los mismos en análogos de ligandos de FKBP por una cepa en la que se ha eliminado o inactivado rapK o un homólogo de rapK. En una realización más preferida, la presente invención proporciona un método para la incorporación eficiente de: ácido 3-(cis/trans)-hidroxiciclohexano carboxílico; ácido 4-(cis/trans)-hidroxiciclohexano carboxílico; ácido 3-(cis/trans)-metoxiciclohexano carboxílico; ácido 4-(cis/trans)-metoxiciclohexano carboxílico; ácido 4-oxo ciclohexano carboxílico; ácido ciclobutano carboxílico; ácido 3-trans-hidroxi-4-cis-fluorociclohexano carboxílico y ácido 4-trans-hidroxi-3-cis-fluorociclohexano carboxílico; ácido 3-cis-hidroxi-4-trans-fluorociclohexano carboxílico y ácido 4-cis-hidroxi-3-trans-fluorociclohexano carboxílico; ácido 3-cis-hidroxi-4-trans-clorociclohexano carboxílico y ácido 4-cis-hidroxi-3-trans-clorociclohexano carboxílico; ácido 3-trans-hidroxi-4-cis-clorociclohexano carboxílico y ácido 4-trans-hidroxi-3-cis-clorociclohexano carboxílico; ácido 3-trans-ciclohexeneoxide carboxílico; ácido 3,4-cis-dihidroxiciclohexano carboxílico y ácido 3,4-trans-dihidroxiciclohexano carboxílico; ácido ciclohexanoacético; ácido ciclohexanopropiónico; ácido 4-cis/trans-tert-butilciclohexano carboxílico o ésteres simples o sales de los mismos en análogos de ligandos de FKBP por cepas en las que se ha eliminado o inactivado rapK o un homólogo de rapK.

En una realización específica de la presente invención las unidades de partidas suministradas no son ácido ci-

40 clohexano carboxílico, ácido 3-cis,4-trans-dihidroxiciclohexano carboxílico, ácido 1-ciclohexeno carboxílico, ácido 3-ciclohexeno carboxílico, ácido cicloheptano carboxílico, ácido 3-(cis/trans)-metilciclohexano carboxílico, ácido 4-(cis/trans)-metilciclohexano carboxílico, ácido 1-ciclohepteno carboxílico ni ácido 5-cis-hidroxil-3-ciclohexeno carboxílico.

45 Las cepas que se utilizan en las realizaciones descritas anteriormente se seleccionan entre el grupo que comprende: *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NRRL 5491, *Actinoplanes* sp. N902-109 FERM BP-3832, *Streptomyces* sp. AA6554, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6475 ATCC 14891, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6678 ATCC 55087, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6674, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* ATCC55276, *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *ascomyceticus* ATCC14891, *Streptomyces tsukubaensis* No.9993 FERM BP-927, *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *yakushimaensis*, *Streptomyces* sp. DSM 4137, *Streptomyces* sp. DSM 7348, *Micromonospora* n.sp. A92-306401 DSM 8429, *Streptomyces* sp. MA 6858ATCC55098, *Streptomyces* sp.MA6848. En una realización preferida dicha cepa se selecciona entre el grupo que consta de: *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NRRL 5491, *Actinoplanes* sp. N902-109 FERM BP-3832, *Streptomyces* sp. AA6554, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6475 ATCC 14891, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6678 ATCC 55087, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6674, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* ATCC 55276, *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *ascomyceticus* ATCC 14891, *Streptomyces tsukubaensis* No.9993 FERM BP-927, *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *yakushimaensis*, *Streptomyces* sp. DSM 4137, *Streptomyces* sp. DSM 7348, *Micromonospora* n.sp. A92-306401 DSM 8429 o *Streptomyces* sp. MA 6858 ATCC 55098. En una realización mucho más preferida, la cepa es el

60 productor de rapamicina *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus*.

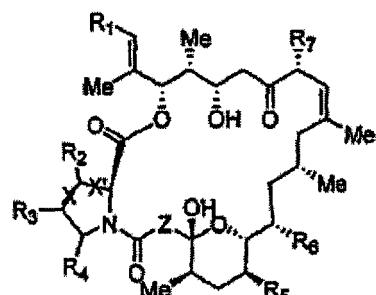
En los métodos para la incorporación eficiente de los ácidos carboxílicos suministrados descritos anteriormente, los compuestos producidos son análogos de los ligandos de FKBP como se describe en el presente documento, por ejemplo, pero sin limitarse a: rapamicina, FK506, FK520, FK523, FK525, antascomicina, meridamicina y tsukuba-micina. En una realización preferida, los compuestos producidos son los análogos de la rapamicina, FK506 o FK520. En una realización mucho más preferida, los compuestos producidos son análogos de la rapamicina; estos compuestos corresponden a la Fórmula II o Fórmula III como se describen posteriormente.

ES 2 296 063 T3

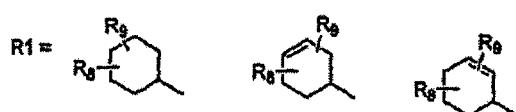
De modo adicional, los métodos antes descritos pueden ser utilizados para generar análogos de novedosos FK506 y FK520 que corresponden a la Fórmula I siguiente:

Fórmula I

5



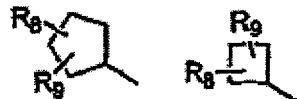
10



15



30



$R_8 = OH$
 $R_9 = H, OH, \text{halo, tiol, alquilo}$

35

$R_2 = H, \text{alquilo, halo, hidroxil, tiol}$

$R_3 = H, \text{alquilo, halo, hidroxil, tiol}$

40

$R_4 = H, \text{alquiol, halo, hidroxil, tiol}$

$R_5 = OMe, Me \text{ o } H$

$R_6 = OMe, Me \text{ o } H$

45

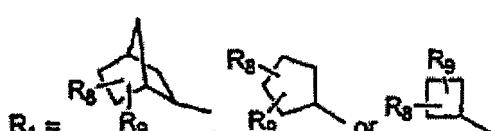
$R_7 = CH_2CH_3 \text{ o } CH_2CH = CH_2$

$Z = \text{ceto o } CH_2$

50

$X = X' = \text{enlace; } X = \text{enlace y } X' = CH_2, S, O \text{ o } X = CH_2, S, O, \text{unidad ciclopropil fusionada y } X' = \text{enlace}$

En una realización preferida,



60

donde $R_8 = OH$ y $R_9 = H, OH, \text{halo, alquilo o tiol.}$

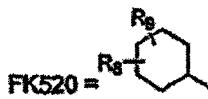
En una realización aún más preferida





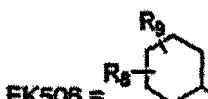
donde $R_8 = OH$ y $R_9 = \text{halo}$.

5



donde $R_8 = 4\text{-trans-OH}$, $R_9 = 3\text{-cis-OCH}_3$, y $R_2 = R_3 = R_4 = H$, $X = CH_2$, $X' = \text{enlace}$, $Z = \text{ceto}$, $R_5 = R_6 = OCH_3$ y $R_7 = CH_2CH_3$

10



donde $R_8 = 4\text{-trans-OH}$, $R_9 = 3\text{-cis-OCH}_3$, y $R_2 = R_3 = R_4 = H$, $X = CH_2$, $X' = \text{enlace}$, $Z = \text{ceto}$, $R_5 = R_6 = OCH_3$ y $R_7 = CH_2CH = CH_2$

15

Así, por ejemplo, la cepa recombinante *S. hygroscopicus* MG2-10 puede cultivarse en presencia de ácido ciclohexano carboxílico para producir 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina (Ejemplo 12). Puede observarse por los expertos en la técnica que los homólogos de rapK en otros grupos de biosíntesis que codifican para ligandos FKBP, que incluyen, pero no se limitan a, FK506, FK520, FK523, FK525, meridamicina, tsukubamicina, antascomicina y "hyg" pueden eliminarse o inactivados para permitir un suministro eficiente de los ácidos carboxílicos que constituyen la unidad de partida, que conduce a la producción de análogos novedosos.

En otro aspecto, las cepas de *S. hygroscopicus* de la invención (incluyendo rapL o los homólogos de rapL o sin incluir rapL o los homólogos de rapL y/o incluyendo rapK o los homólogos de rapK o sin incluir rapK o los homólogos de rapK) pueden alimentarse con análogos del ácido L-pipecólico, como se describe anteriormente, en combinación con análogos de la unidad de partida natural, ácido 4,5-dihidroxiciclohex-1-enecarboxílico, como se describe anteriormente, para producir análogos de la rapamicina en los que ambos, la unidad de partida y el residuo pipecolil han sido reemplazados. Esta estrategia se ejemplifica en los Ejemplos 10, 11 y 12.

La presente invención proporciona un proceso para la producción de análogos de ligandos de FKBP con variación en el grado de modificación post-PKS y/o en el que el residuo de ácido pipecólico ha sido reemplazado, y opcionalmente el residuo de ácido 4,5-dihidroxiciclohex-1-eno carboxílico ha sido reemplazado. Este proceso comprende el paso de eliminar o inactivar uno o más genes en la célula hospedera del microorganismo involucrada en la producción del compuesto precursor, ácido L-pipecólico y/o ácido 4,5-dihidroxiciclohex-1-eno carboxílico, requeridos en la biosíntesis del molde rapamicina poliquétido/NRPS y/o en su subsiguiente modificación post-PKS, de modo de suprimir la producción del producto natural. El proceso comprende además la transformación de las células hospederas del microorganismo con ácidos nucleicos que codifican para los genes modificadores del poliquétido para restablecer la producción de poliquétido, cultivar las células hospederas transformadas bajo condiciones adecuadas para la producción de poliquétido y opcionalmente el aislamiento de los análogos de rapamicina de los poliquétidos producidos.

La presente invención proporciona un proceso para la producción de análogos de ligandos de FKBP que incluyen, pero no se limitan a, FK506, FK520, FK523, FK525, tsukubamicina, antascomicina, meridamicina e "hyg", con variación en el grado de modificación post-PKS y/o en el que el residuo de aminoácido se ha reemplazado, y opcionalmente la unidad de partida se ha reemplazado. Este proceso comprende el paso de eliminar o inactivar uno o más genes en las células hospederas del microorganismo involucradas en la producción del residuo de aminoácido y/o los precursores de la unidad de partida, requeridos en la biosíntesis del molde poliquétido/NRPS y/o en su modificación post-PKS subsiguiente, de modo de suprimir la producción del producto natural. El proceso comprende además la transformación de las células hospederas del microorganismo con los ácidos nucleicos que codifican para los genes modificadores del poliquétido para restablecer la producción de poliquétido, cultivar las células hospederas transformadas bajo condiciones adecuadas para la producción de poliquétido y opcionalmente el aislamiento de los análogos de poliquétido producidos.

También proporcionamos análogos novedosos de los ligandos de FKBP: 31-desmetoxi-FK520, 31-desmetoxi-31-cis-hidroxi-32-trans-hidroxi-FK520, 31-desmetoxi-31-cis-hidroxi-32-cis-hidroxi-FK520, 31-desmetoxi-31-trans-hidroxi-32-trans-hidroxi-FK52D, 31-O-desmetil-32-dehidroxi-FK520, 31-O-desmetil-FK520, 31-desmetoxi-31-metil-FK520, 31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-metil-FK520, 31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-fluoro-FK520, 31-desmetoxi-31-fluoro-FK520, 31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-cloro-FK520, 31-desmetoxi-31-cloro-FK520, 31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-terc-butil-FK520, 29-de(3-metoxi-4-hidroxi-ciclohexil)-29-(hidroxi-cicloheptil)-FK520, 29-de(3-metoxi-4-hidroxi-ciclohexil)-29-(hidroxi-norbornil)-FK520, 9-deoxo-31-desmetoxi-FK520, 9-deoxo-31-desmetoxi-31-cis-hidroxi-32-trans-hidroxi-FK520, 9-deoxo-31-desmetoxi-31-cis-hidroxi-32-cis-hidroxi-FK520, 9-deoxo-31-desmetoxi-31-trans-hidroxi-32-trans-hidroxi-FK520, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-FK520, 9-deoxo-31-O-desmetil-FK520, 9-deoxo-31-desmetoxi-31-metil-FK520, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-metil-FK520, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-fluoro-FK520, 9-deoxo-31-desmetoxi-31-fluoro-FK520, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-cloro-FK520, 9-deoxo-31-desmetoxi-31-cloro-FK520, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-terc-butil-FK520, 9-deoxo-29-de(3-metoxi-4-hidroxi-ciclohexil)-29-(hidroxi-cicloheptil)-FK520, 9-deoxo-29-de(3-metoxi-4-hidroxi-ciclohexil)-29-(hidroxi-norbornil)-FK520, 30-desmetoxi-prolil-FK520, 30-desmetoxi-30-

5 xi-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-31-O-desmetil-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-31-desmetoxi-31-metil-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-metiltrans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-fluoro-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-31-desmetoxi-31-fluoro-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-cloro-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-31-desmetoxi-31-cloro-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-31-O-desmetilo 32-dehidroxi-32-terc-butil-trans-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-29-de(3-metoxi-4-hidroxi-ciclohexil)-29-(hidroxicicloheptil)-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-29-de(3-metoxi-4-hidroxi-ciclohexil)-29-(hidroxi-norbornil)-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520.

9-deoxo-31-desmetoxi-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-31-desmetoxi-31-cis-hidroxi-32-trans-hidroxi-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-31-desmetoxi-31-cis-hidroxi-32-cis-hidroxi-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-31-desmetoxi-31-trans-hidroxi-32-trans-hidroxi-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-31-O-desmetil-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-31-desmetoxi-31-metil-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-2-metiltrans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-fluoro-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-31-desmetoxi-31-fluoro-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-cloro-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-31-desmetoxi-31-cloro-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-terc-butil-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-29-de(3-metoxi-4-hidroxi-ciclohexil)-29-(hidroxi-cicloheptil)-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520, 9-deoxo-29-de(3-metoxi-4-hidroxi-cydohekil)-29-(hidroxi-norbornil)-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK520.

ES 2 296 063 T3

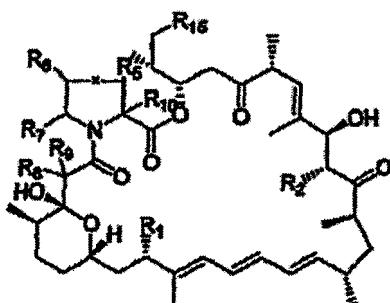
til-4-hidroxi-prolil-FK506, 8-deoxo-30-O-desmetil-31-dehidroxi-31-fluoro-4-hidroxi-prolil-FK506, 8-deoxo-30-desmetoxi-30-fluoro-4-hidroxi-prolil-FK506, 8-deoxo-30-O-desmetil-31-dehidroxi-31-cloro-4-hidroxi-prolil-FK506, 8-deoxo-30-desmetoxi-30-cloro-3-hidroxi-4-hidroxi-prolil-FK506, 8-deoxo-30-O-desmetil-31-dehidroxi-31-tert butil-4-hidroxi-prolil-FK506, 8-deoxo-28-de(3-metoxi-4-hidroxi-ciclohexil)-28-(hidroxi-cicloheptil)-4-hidroxi-prolil-FK506, 8-deoxo-28-de(3-metoxi-4-hidroxi-ciclohexil)-28-(hidroxi-norbornil)-4-hidroxi-prolil-FK506, 31-desmetoxi-trans-3-biciclo[3.1.0]FK506, 31-desmetoxi-31-cis-hidroxi-32-trans-hidroxi-trans-3-biciclo[3.10]FK506, 31-desmetoxi-31-cis-hidroxi-32-cis-hidroxi-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 31-desmetoxi-31-trans-hidroxi-32-trans-hidroxi-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 31-O-desmetil-32-dehidroxi-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 31-O-desmetil-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 31-desmetoxi-31-metiltrans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-metil-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-fluoro-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 31-desmetoxi-31-fluoro-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 31-Odesmetil-32-dehidroxi-32-cloro-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 31-desmetoxi-31-cloro-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-terc-butil-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 29-de(3-metoxi-4-hidroxi-ciclohexil)-29-(hidroxi-cicloheptil)-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 29-de(3-metoxi-4-hidroxi-ciclohexil)-29-(hidroxi-norbornil)-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 9-deoxo-31-desmetoxi-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 9-deoxo-31-desmetoxi-31-cis-hidroxi-32-trans-hidroxi-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-31-trans-hidroxi-32-trans-hidroxi-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-31-metil-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-fluoro-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-metil-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-fluoro-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-cloro-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 9-deoxo-31-O-desmetil-32-dehidroxi-32-terc-butyl-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506, 9-deoxo-29-de(3-metoxi-4-hidroxi-ciclohexil)-29-(hidroxi-cicloheptil)-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506. 9-deoxo-29-de(3-metoxi-4-hidroxi-ciclohexil)-29-(hidroxi-norbornil)-trans-3-biciclo[3.1.0.]FK506.

25

También proporcionamos:

A: Compuestos de la fórmula:

30



35

40

45

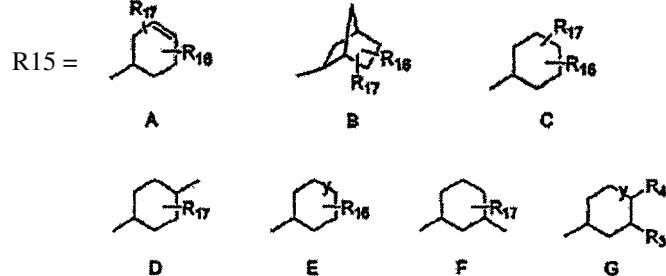
$x =$ enlace o CHR_{11} , o $-CHR_6-x-CHR_5-$ es $R_{13} \begin{array}{c} R_{11} \\ \diagup \\ \diagdown \\ R_{14} \end{array} R_{12}$



50

55

60



R1 = OH, OCH₃

65

R2 = H, OH, OCH₃

R3 = H, OH, CH₃, F, Cl, OCH₃

ES 2 296 063 T3

R4 = H, OH, CH₃, F, Cl

R5 = H, OH

5 R6 = H, OH

R7 = H

10 R8 = H, ceto

10 R9 = H, ceto

R10 = H

15 R11 = H

R13 = H

20 R14 = H

20 R16 = OH, OCH₃

R17 = H, OH, Cl, F y

25 y = enlace, CH₂

con la salvedad de que los compuestos no incluyen lo siguiente:

30 i) donde R₁ = OCH₃ en combinación con R₂ = H, R₁₅ = C, R₁₆ = cis-3-OH, R₁₇ = trans-4-OH, R₅ = H, R₆ = H, R₇ = H, R₈ = H, R₉ = H, R₁₀ = H, R₁₁ = H, x = CHR₁₁;

35 ii) donde R₁ = OH en combinación con R₂ = OCH₃, R₁₅ = C, R₁₆ = cis-3-OH, R₁₇ = trans-4-OH, R₅ = H, R₆ = H, R₇ = H, R₈, R₉ = ceto, R₁₀ = H, R₁₁ = H, x = CHR₁₁;

35 iii) donde R₁ = OH en combinación con R₂ = OH, R₁₅ = C, R₁₆ = cis-3-OCH₃, R₁₇ = trans-4-OH, R₅ = H, R₆ = H, R₇ = H, R₈, R₉ = ceto, R₁₀ = H, R₁₁ = H, x = CHR₁₁;

40 iv) donde R₁ = OH en combinación con R₂ = H, R₁₅ = C, R₁₆ = cis-3-OCH₃, R₁₇ = trans-4-OH, R₅ = H, R₆ = H, R₇ = H, R₈, R₉ = ceto, R₁₀ = H, R₁₁ = H, x = CHR₁₁;

45 v) donde R₁ = OCH₃ en combinación con R₂ = H, R₁₅ = C, R₁₆ = cis-3-OH, R₁₇ = trans-4-OH, R₅ = H, R₆ = H, R₇ = H, R₈, R₉ = ceto, R₁₀ = H, R₁₁ = H, x = CHR₁₁;

50 vi) donde R₁ = OCH₃ en combinación con R₂ = H, R₁₅ = C, R₁₆ = cis-3-OCH₃, R₁₇ = trans-4-OH, R₅ = H, R₆ = H, R₇ = H, R₈ = H, R₉ = H, R₁₀ = H, R₁₁ = H, x = CHR₁₁;

55 vii) excepto donde R₁ = OCH₃ en combinación con R₂ = OH, R₁₅ = C, R₁₆ = cis-3-OCH₃, R₁₇ = trans-4-OH, R₅ = H, R₆ = H, R₇ = H, R₈ = H, R₉ = H, R₁₀ = H, R₁₁ = H, x = CHR₁₁;

55 viii) donde R₁ = OCH₃ en combinación con R₂ = OCH₃, R₁₅ = C, R₁₆ = cis-3-OCH₃, R₁₇ = trans-4-OH, R₅ = H, R₆ = H, R₇ = H, R₈ = H, R₉ = H, R₁₀ = H, R₁₁ = H, x = CHR₁₁;

55 ix) donde R₁ = OH en combinación con R₂ = OCH₃, R₁₅ = C, R₁₆ = cis-3-OCH₃, R₁₇ = trans-4-OH, R₅ = H, R₆ = H, R₇ = H, R₈, R₉ = ceto, R₁₀ = H, R₁₁ = H, x = CHR₁₁;

60 x) donde R₁ = OCH₃ en combinación con R₂ = OH, R₁₅ = C; R₁₆ = cis-3-OCH₃, R₁₇ = trans-4-OH, R₅ = H, R₆ = H, R₇ = H, R₈, R₉ = ceto, R₁₀ = H, R₁₁ = H, x = CHR₁₁;

60 xi) donde R₁ = OCH₃ en combinación con R₂ = H, R₁₅ = C, R₁₆ = cis-3-OCH₃, R₁₇ = trans-4-OH, R₅ = H, R₆ = H, R₇ = H, R₈, R₉ = ceto, R₁₀ = H, R₁₁ = H, x = CHR₁₁;

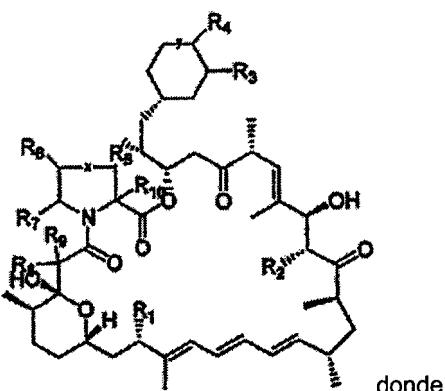
65 xii) donde R₁ = OCH₃ en combinación con R₂ = OCH₃, R₁₅ = C, R₁₆ = cis-3-OH, R₁₇ = trans-4-OH, R₅ = H, R₆ = H, R₇ = H, R₈, R₉ = ceto, R₁₀ = H, R₁₁ = H, x = CHR₁₁;

65 xiii) donde R₁ = OCH₃ en combinación con R₂ = H, R₁₅ = C, R₁₆ = cis-3-OCH₃, R₁₇ = trans-4-OH, R₅ = H, R₆ = H, R₇ = H, R₈ = H, R₉ = H, R₁₀ = H, x = enlace;

ES 2 296 063 T3

- xiv) donde $R_1 = OCH_3$ en combinación con $R_2 = OCH_3$, $R_{15} = C$, $R_{16} = cis-3-OCH_3$, $R_{17} = trans-4-OH$, $R_5 = H$, $R_6 = H$, $R_7 = H$, $R_8 = H$, $R_9 = H$, $R_{10} = H$, $x =$ enlace;
- 5 xv) donde $R_1 = OCH_3$ en combinación con $R_2 = OH$, $R_{15} = C$, $R_{16} = cis-3-OCH_3$, $R_{17} = trans-4-OH$, $R_5 = H$, $R_6 = H$, $R_7 = H$, R_8 , $R_9 =$ ceto, $R_{10} = H$, $x =$ enlace;
- 10 xvi) donde $R_1 = OCH_3$ en combinación con $R_2 = H$, $R_{15} = C$, $R_{16} = cis-3-OCH_3$, $R_{17} = trans-4-OH$, $R_5 = H$, $R_6 = H$, $R_7 = H$, R_8 , $R_9 =$ ceto, $R_{10} = H$, $x =$ enlace;
- 15 xvii) donde $R_1 = OCH_3$ en combinación con $R_2 = OCH_3$, $R_{15} = C$, $R_{16} = H$, $R_{17} = OH$, $R_5 = H$, $R_6 = H$, $R_7 = H$, R_8 , $R_9 =$ ceto, $R_{10} = H$, $R_{11} = H$, $x = CHR_{11}$;
- 19 
- xviii) donde $-CHR_6-x-CHR_5$ es y $R_{11} = H$, $R_{13} = H$, $R_{14} = H$, en combinación con $R_1 = OCH_3$, $R_2 = OCH_3$, $R_{15} = C$, $R_{16} = cis-3-OCH_3$, $R_{17} = trans-4-OH$, $R_7 = H$, R_8 , $R_9 =$ ceto, $R_{10} = H$;
- 20 xix) donde $R_{15} = G$, $R_{16} = cis-3-OCH_3$, $R_{17} = trans-4-OH$, $y =$ enlace, en combinación con $R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$, $R_5 = H$, $R_6 = OH$, $R_7 = H$, $R_{11} = H$, $x =$ enlace, R_8 , $R_9 =$ ceto, $R_{10} = H$;
- 25 xx) donde $R_{15} = G$, $R_3 = H$, $R_4 = trans-OH$, $y =$ enlace, en combinación con $R_1 = OCH_3$, $R_2 = OCH_3$, $R_5 = H$, $R_6 = H$, $R_7 = H$, $R_{11} = H$, $x = CHR_{11}$, R_8 , $R_9 =$ ceto, $R_{10} = H$
- 30 xxii) donde $R_{15} = G$, $R_3 = H$, $R_4 = OH$, $y = CH_2$ en combinación con $R_1 = OCH_3$, $R_2 = OCH_3$, $R_5 = H$, $R_6 = H$, $R_7 = H$, $R_{11} = H$, $x = CHR_{11}$, R_8 , $R_9 =$ ceto, $R_{10} = H$
- xxiii) donde $R_{15} = G$, $R_3 = CH_3$, $R_4 = OH$, $y =$ enlace, en combinación con $R_1 = OCH_3$, $R_2 = OCH_3$, $R_5 = H$, $R_6 = H$, $R_7 = H$, $R_{11} = H$, $x = CHR_{11}$, R_8 , $R_9 =$ ceto, $R_{10} = H$
- 35 xxiv) donde $R_{15} = G$, $R_3 = H$, $R_4 = OH$, $y = CH_2$, en combinación con $R_1 = OH$, $R_2 = OH$, $R_5 = H$, $R_6 = H$, $R_7 = H$, $R_{11} = H$, $x = CHR_{11}$, $R_8 = R_9 = H$, $R_{10} = H$
- 40 xxv) donde $R_{15} = G$, $R_3 = H$, $R_4 = OH$, $y = CH_2$, en combinación con $R_1 = OCH_3$, $R_2 = OCH_3$, $R_5 = H$, $R_6 = H$, $R_7 = H$, $R_{11} = H$, $x = CHR_{11}$, $R_8 = R_9 = H$, $R_{10} = H$
- 45 xxvi) donde $R_{15} = G$, $R_3 = H$, $R_4 = OH$, $y = CH_2$, en combinación con $R_1 = OH$, $R_2 = OCH_3$, $R_5 = H$, $R_6 = H$, $R_7 = H$, $R_{11} = H$, $x = CHR_{11}$, $R_8 = R_9 = H$, $R_{10} = H$
- 50 xxvii) donde $R_{15} = G$, $R_3 = H$, $R_4 = OH$, $y = CH_2$, en combinación con $R_1 = OH$, $R_2 = H$, $R_5 = H$, $R_6 = H$, $R_7 = H$, $R_{11} = H$, $x = CHR_{11}$, $R_8 = R_9 = H$, $R_{10} = H$;
- xxviii) donde $R_{15} = G$, $R_3 = H$, $R_4 = OH$, $y = CH_2$, en combinación con $R_1 = OH$, $R_2 = OCH_3$, $R_5 = H$, $R_6 = H$, $R_7 = H$, $R_{11} = H$, $x = CHR_{11}$, R_8 , $R_9 =$ ceto, $R_{10} = H$
- 55 xxix) donde $R_{15} = G$, $R_3 = H$, $R_4 = OH$, $y = CH_2$, en combinación con $R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$, $R_5 = H$, $R_6 = H$, $R_7 = H$, $R_{11} = H$, $x = CHR_{11}$, R_8 , $R_9 =$ ceto, $R_{10} = H$

B. Compuestos según la fórmula siguiente



ES 2 296 063 T3

$R_1 = OH, OCH_3$

$R_2 = H, OH, OCH_3$

5 $R_3 = H, OH, CH_3, OCH_3$

$R_4 = H, OH$

10 $R_5 = H$

$R_6 = H, OH$

$R_7 = H$

15 $R_8 = H, \text{ceto}$

$R_9 = H, \text{ceto}$

20 $R_{10} = H$

$x = \text{enlace, } CH_2 \text{ o-}CHR_6\text{-}x\text{-}CHR_5\text{-} \text{ es}$ 

25

$R_{11} = H$

30

$R_{13} = H$

$R_{14} = H$

$y = \text{enlace, } CH_2$

35 con la salvedad de que los compuestos no incluyan lo siguiente:

i) donde $R_3 = H, R_4 = \text{trans-OH}, y = \text{enlace}$, en combinación con $R_1 = OCH_3, R_2 = OCH_3, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, x = CH_2, R_8, R_9 = \text{ceto}, R_{10} = H$

40 ii) donde $R_3 = H, R_4 = OH, y = CH_2$ en combinación con $R_1 = OCH_3, R_2 = OCH_3, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, x = CH_2, R_8, R_9 = \text{ceto}, R_{10} = H$

iii) donde $R_3 = cis-OH, R_4 = H, y = \text{enlace}$, en combinación con $R_1 = OCH_3, R_2 = OCH_3, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, x = CH_2, R_8, R_9 = \text{ceto}, R_{10} = H$

45 iv) donde $R_3 = CH_3, R_4 = OH, y = \text{enlace}$, en combinación con $R_1 = OCH_3, R_2 = OCH_3, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, x = CH_2, R_8, R_9 = \text{ceto}, R_{10} = H$

50 v) donde $R_3 = H, R_4 = OH, y = CH_2$, en combinación con $R_1 = OH, R_2 = OH, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, x = CH_2, R_8 = R_9 = H, R_{10} = H$

vi) donde $R_3 = H, R_4 = OH, y = CH_2$, en combinación con $R_1 = OCH_3, R_2 = OCH_3, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, x = CH_2, R_8 = R_9 = H, R_{10} = H$

55 vii) donde $R_3 = H, R_4 = OH, y = CH_2$, en combinación con $R_1 = OH, R_2 = OCH_3, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, x = CH_2, R_8 = R_9 = H, R_{10} = H$

viii) donde $R_3 = H, R_4 = OH, y = CH_2$, en combinación con $R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, x = CH_2, R_8 = R_9 = H, R_{10} = H$

60 ix) donde $R_3 = H, R_4 = OH, y = CH_2$, en combinación con $R_1 = OH, R_2 = OCH_3, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, x = CH_2, R_8, R_9 = \text{ceto}, R_{10} = H$

x) donde $R_3 = H, R_4 = OH, y = CH_2$, en combinación con $R_1 = OCH_3, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, x = CH_2, R_8, R_9 = \text{ceto}, R_{10} = H$

65 xi) donde $R_3 = OCH_3, R_4 = OH, y = \text{enlace}$, en combinación con $R_1 = OCH_3, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = OH, R_7 = H, x = \text{enlace}, R_8, R_9 = \text{ceto}, R_{10} = H$



- 5 xii) donde $-\text{CHR}_6-\text{x-CHR}_5-$ es y $\text{R}_{11} = \text{H}$, $\text{R}_{13} = \text{H}$, $\text{R}_{14} = \text{H}$, en combinación con $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_3 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_4 = \text{OH}$, $\text{R}_7 = \text{H}$, $\text{R}_8, \text{R}_9 = \text{ceto}$, $\text{R}_{10} = \text{H}$

10 xiii) donde $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$ en combinación con $\text{R}_2 = \text{H}$, $\text{R}_3 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_4 = \text{OH}$, $\text{R}_5 = \text{H}$, $\text{R}_6 = \text{H}$, $\text{R}_7 = \text{H}$, $\text{R}_8 = \text{H}$, $\text{R}_9 = \text{H}$, $\text{R}_{10} = \text{H}$, $\text{x} = \text{enlace}$, $\text{y} = \text{enlace}$

15 xiv) donde $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$ en combinación con $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_3 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_4 = \text{OH}$, $\text{R}_5 = \text{H}$, $\text{R}_6 = \text{H}$, $\text{R}_7 = \text{H}$, $\text{R}_8 = \text{H}$, $\text{R}_9 = \text{H}$, $\text{R}_{10} = \text{H}$, $\text{x} = \text{enlace}$, $\text{y} = \text{enlace}$

15 xv) donde $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$ en combinación con $\text{R}_2 = \text{OH}$, $\text{R}_3 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_4 = \text{OH}$, $\text{R}_5 = \text{H}$, $\text{R}_6 = \text{H}$, $\text{R}_7 = \text{H}$, $\text{R}_8, \text{R}_9 = \text{ceto}$, $\text{R}_{10} = \text{H}$, $\text{x} = \text{enlace}$, $\text{y} = \text{enlace}$

20 xvi) donde $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$ en combinación con $\text{R}_2 = \text{H}$, $\text{R}_3 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_4 = \text{OH}$, $\text{R}_5 = \text{H}$, $\text{R}_6 = \text{H}$, $\text{R}_7 = \text{H}$, $\text{R}_8, \text{R}_9 = \text{ceto}$, $\text{R}_{10} = \text{H}$, $\text{x} = \text{enlace}$, $\text{y} = \text{enlace}$

20 xvii) donde $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_2 = \text{H}$, $\text{R}_3 = \text{OH}$, $\text{R}_4 = \text{OH}$, $\text{R}_8 = \text{H}$, $\text{R}_9 = \text{H}$

25 xviii) donde $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_2 = \text{H}$, $\text{R}_3 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_4 = \text{OH}$, $\text{R}_8 = \text{H}$, $\text{R}_9 = \text{H}$

25 xix) donde $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_2 = \text{H}$, $\text{R}_3 = \text{OH}$, $\text{R}_4 = \text{OH}$, $\text{R}_8, \text{R}_9 = \text{ceto}$

25 xx) donde $\text{R}_1 = \text{OH}$, $\text{R}_2 = \text{OH}$, $\text{R}_3 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_4 = \text{OH}$, $\text{R}_8, \text{R}_9 = \text{ceto}$

30 xxi) donde $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_3 = \text{OH}$, $\text{R}_4 = \text{OH}$, $\text{R}_8, \text{R}_9 = \text{ceto}$

30 xxii) donde $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_2 = \text{OH}$, $\text{R}_3 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_4 = \text{OH}$, $\text{R}_8, \text{R}_9 = \text{ceto}$

30 xxiii) donde $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_3 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_4 = \text{OH}$, $\text{R}_8 = \text{H}$, $\text{R}_9 = \text{H}$

C. Un compuesto seleccionado entre el grupo que consta de: 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina (prerapamicina), 9-deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina, 16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina, 9-deoxo-16-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina, 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina, 16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina, 9-deoxo-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina, 9-deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetilo rapamicina, 27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina, 9-deoxo-16-O-desmetilo rapamicina 9-deoxo-39-O-desmetilo rapamicina, 8-deoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina (preprolilrapamicina), 8-deoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 8-deoxo-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 8-deoxo-15-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 8-deoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-prolil rapamicina, 15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 8-deoxo-26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolil rapamicina, 8-deoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-prolil rapamicina, 15-O-desmetil-38-O-desmetil-prolil rapamicina, 8-deoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-prolil rapamicina, 15-O-desmetil-38-O-desmetil-prolil rapamicina, 15-O-desmetil-26-O-desmetil-prolil rapamicina, 15-O-desmetil-26-desmetoxi-prolil rapamicina, 26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolil rapamicina, 26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolil rapamicina, 8-deoxo-15-O-desmetil-prolil rapamicina, 8-deoxo-26-O-desmetil-prolil rapamicina, 8-deoxo-38-O-desmetil-prolil rapamicina, 15-Odesmetil-prolil rapamicina, 38-O-desmetil-prolil rapamicina, 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina, 16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina, 9-deoxo-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina, 9-deoxo-16-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina, 16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina, 9-deoxo-27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina, 16-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina, 27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina, 27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina, 9-deoxo-39-desmetoxi-rapamicina, 8-deoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolil rapamicina, 8-deoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolil rapamicina, 15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolil rapamicina, 8-deoxo-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolil rapamicina, 15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolil rapamicina, 8-deoxo-26-O-desmetoxi-38-desmetoxi-prolil rapamicina, 8-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(hidroxiciclohexenil) rapamicina, 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(dihidroxi ciclohexil) rapamicina, 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(hidroxinorbornil) rapamicina, 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-metil-4-hidroxiciclohexil) rapamicina, 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(4-metilo hidroxiciclohexil) rapamicina, 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-fluoro-4-hidroxiciclohexil) rapamicina, 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-hidroxi-4-fluorociclohexil) rapamicina, 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-Metoxi-4-transhidroxiciclohexil)-36-(3-chloro-4-hidroxiciclo-

ES 2 296 063 T3

hexil) rapamicina, 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-hidroxi-4-chlorociclohexil) rapamicina, 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-cis-4-cis-dihidroxiciclohexil) rapamicina, 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-trans-9-trans-dihidroxiciclohexil) rapamicina, 9-deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina, 9-deoxo-16-O-desmetil-27O-desmetil-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(hidroxiciclohexenil) rapamicina, 9-deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(hidroxinorbornil) rapamicina, 9-deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(4-metil hidroxiciclohexil) rapamicina.

10 En una realización específica, la presente invención describe métodos para producir y, de manera opcional, aislar los siguientes compuestos (Figura 10, Figura 11, Figura 12, Figura 13, y Figuras 14, 15, 16 y Figura 17):

TABLA II

15

Compuesto no:	Nombre:
1.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina (prerapamicina)
2.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina
3.	16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina
4.	9-deoxo-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina
5.	9-deoxo-16-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina
6.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina
7.	16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina
8.	9-deoxo-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina
9.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetilo rapamicina
10.	16-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina
11.	16-O-desmetil-27-O-desmetilo rapamicina
12.	16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina
13.	27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina
14.	27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina
15.	9-deoxo-16-O-desmetilo rapamicina
16.	9-deoxo-27-desmetoxi-rapamicina
17.	9-deoxo-27-O-desmetilo rapamicina
18.	9-deoxo-39-O-desmetilo rapamicina
19.	9-deoxo rapamicina
20.	16-O-desmetilo rapamicina
21.	27-O-desmetilo rapamicina
22.	27-desmetoxi-rapamicina
23.	39-O-desmetilo rapamicina
24.	8-deoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina (preprolilrapamicina)
25.	8-deoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina
26.	15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina

50

55

60

65

ES 2 296 063 T3

27.	8-deoxo-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina	
28.	8-deoxo-15-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina	
29.	8-deoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-prolilrapamicina	
30.	15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina	
31.	8-deoxo-26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina	
32.	8-deoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-prolilrapamicina	
33.	15-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina	
34.	15-O-desmetil-26-O-desmetil-prolilrapamicina	
35.	15-O-desmetil-26-desmetoxi-prolilrapamicina	
36.	26-desmetoxi-38-O-desmethyl-prolilrapamicina	
37.	26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina	
38.	8-deoxo-15-O-desmetil-prolilrapamicina	
39.	8-deoxo-26-desmetoxi-prolilrapamicina	
40.	8-deoxo-26-O-desmetil-prolilrapamicina	
41.	8-deoxo-38-O-desmetil-prolilrapamicina	
42.	8-deoxo-prolilrapamicina	
43.	15-O-desmetil-prolilrapamicina	
44.	26-O-desmetil-prolilrapamicina	
45.	26-desmetoxi-prolilrapamicina	
46.	38-O-desmetil-prolilrapamicina	
47.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina	
48.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina	
49.	16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina	
50.	9-deoxo-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina	
51.	9-deoxo-16-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina	
52.	16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina	
53.	9-deoxo-27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina	
54.	16-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina	
55.	27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina	
56.	27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina	
57.	9-deoxo-39-desmetoxi-rapamicina	
58.	39-O-desmetoxi-rapamicina	
59.	8-deoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina	
60.	8-deoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina	
61.	15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina	
62.	8-deoxo-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina	
63.	8-deoxo-15-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina	
64.	15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina	
65.	8-deoxo-26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina	
66.	15-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina	
67.	26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina	
68.	26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina	
69.	8-deoxo-38-desmetoxi-prolilrapamicina	
70.	38-desmetoxi-prolilrapamicina	
71.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-(hidroxiciclohexenil) rapamicina	36-
72.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-(dihidroxi ciclohexil) rapamicina	36-
73.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-(hidroxinorbornil) rapamicina	36-
74.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-4-hidroxiciclohexil) rapamicina	36-(3-metil-
75.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-metilo hidroxiciclohexil) rapamicina	36-(4-
76.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-	36-(3-

ES 2 296 063 T3

	fluoro-4-hidroxiciclohexil) rapamicina	
77.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxicydohexil)- hidroxi-4-fluorociclohexil) rapamicina	36-(3-
78.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)- chloro-4-hidroxiciclohexil) rapamicina	36-(3-
79.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)- hidroxi-4-chlorociclohexil) rapamicina	36-(3-
80.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)- 36-(3-cis-4- cis-dihidroxiciclohexil) rapamicina	36-(3-cis-4-
81.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)- trans-4-trans-dihidroxiciclohexil) rapamicina	36-(3-
82.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina	
83.	9-deoxo-16-O-desmetil-27O-desmetil-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)- (hidroxiciclohexenil) rapamicina	36-
84.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)- (hidroxinorbornyl) rapamicina	36-
85.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)- metilo hidroxiciclohexil) rapamicina	36-(4-
86.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)- (hidroxicicloheptil) rapamicina	36-
87.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-36-de(3-cis--metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)- (hidroxicloheptil) rapamicina	36-

También proporcionamos los siguientes análogos novedosos de la rapamicina:

30

TABLA III

Compuesto no:	Nombre:
1.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxil-27-desmetoxil rapamicina (prerapamicina)
2.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina
3.	16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina
5.	9-deoxo-16-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina
6.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina
7.	16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina
8.	9-deoxo-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina
9.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetilo rapamicina
14.	27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina
15.	9-deoxo-16-O-desmetilo rapamicina
18.	9-deoxo-39-O-desmetil-rapamycin
24.	8-deoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina (preprolilrapamicina)
25.	8-deoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina
26.	15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina
27.	8-deoxo-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina
28.	8-deoxo-15-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina
29.	8-deoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-prolilrapamicina
30.	15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina
31.	8-deoxo-26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina
32.	8-deoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-prolilrapamicina
33.	15-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina
34.	15-O-desmetil-26-O-desmetil-prolilrapamicina
35.	15-O-desmetil-26-desmetoxi-prolilrapamicina
36.	26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina
37.	26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina
38.	8-deoxo-15-O-desmetil-prolilrapamicina
40.	8-deoxo-26-O-desmetil-prolilrapamicina
41.	8-deoxo-38-O-desmetil-prolilrapamicina
43.	15-O-desmetil-prolilrapamicina

ES 2 296 063 T3

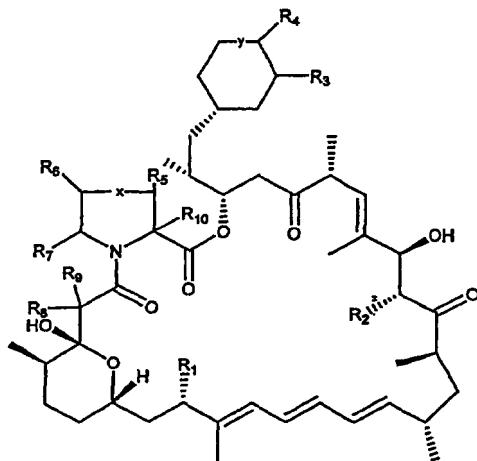
46.	38-O-desmetil-prolilrapamicina
47.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina
48.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina
49.	16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina
50.	9-deoxo-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina
51.	9-deoxo-16-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina
52.	16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina
53.	9-deoxo-27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina
54.	16-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina
55.	27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina
56.	27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina
57.	9-deoxo-39-desmetoxi-rapamicina
59.	8-deoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina
60.	8-deoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina
61.	15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina
62.	8-deoxo-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina
63.	8-deoxo-15-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina
64.	15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina
65.	8-deoxo-26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina
66.	15-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina
67.	26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina
68.	26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina
69.	8-deoxo-38-desmetoxi-prolilrapamicina
70.	38-desmetoxi-prolilrapamicina
71.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)- 36-(hidroxiciclohexenil) rapamicina
72.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)- 36-(dihidroxi ciclohexil) rapamicina
73.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)- 36-(hidroxinorbornil) rapamicina
74.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-metil-4-hidroxiciclohexil) rapamicina
75.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)- 36-(4-metilo hidroxiciclohexil) rapamicina
76.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)- 36-(3-fluoro-4-hidroxiciclohexil) rapamicina
77.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-hidroxi-4-fluorociclohexil) rapamicina
78.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-chloro-4-hidroxiciclohexil) rapamicina
79.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)- 36-(3-hidroxi-4-chlorociclohexil) rapamicina
80.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)- 36-(3-cis-4-cis-dihidroxiciclohexil) rapamicina
81.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)- 36-(3-trans-4-trans-dihidroxiciclohexil) rapamicina
82.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina
83.	9-deoxo-16-O-desmetil-27O-desmetil-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)- 36-(hidroxiciclohexenil) rapamicina
84.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)- 36-(hidroxinorbornil) rapamicina
85.	9-deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-36-de(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)- 36-(4-metilo hidroxiciclohexil) rapamicina

ES 2 296 063 T3

También proporcionamos análogos novedosos de la rapamicina de

Fórmula II:

5



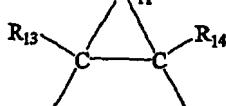
10

15

20

25

donde x = enlace o CHR_{11} , o $-\text{CHR}_6\text{-x-CHR}_5-$ es



30

y = enlace o CHR_{12}

35

$\text{R}_1 = \text{OH, OCH}_3$

$\text{R}_2 = \text{H, OH, OCH}_3$

40

$\text{R}_3 = \text{H, residuo OH, OCH}_3, \text{alquil-, halo-, amino-, tiol-}$

45

$\text{R}_4 = \text{H, residuo OH, OCH}_3, \text{alquil-, halo-, amino-, tiol-}$

$\text{R}_5 = \text{H, residuo alquil-, halo-, hidroxi-}$

50

$\text{R}_6 = \text{H, residuo alquil-, halo-, hidroxi-}$

$\text{R}_7 = \text{H, residuo alquil-, halo-, hidroxi-}$

$\text{R}_8 \text{ R}_9 = \text{O o H, H}$

55

$\text{R}_{10} = \text{H, residuo alquil-, halo-, hidroxi-}$

$\text{R}_{11} = \text{H, residuo alquil-, halo-, hidroxi-}$

60

$\text{R}_{12} = \text{H, residuo alquil-, halo-, hidroxi-}$

$\text{R}_{13} = \text{H, residuo alquil-, halo-, hidroxi-}$

$\text{R}_{14} = \text{H, residuo alquil-, halo-, hidroxi-}$

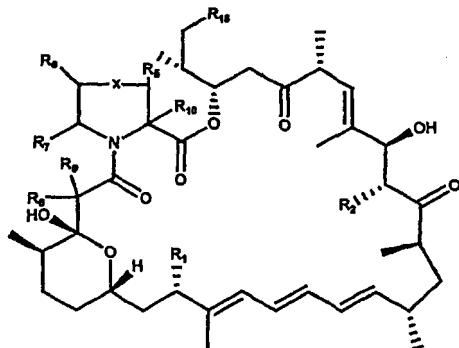
65

ES 2 296 063 T3

También proporcionamos análogos novedosos de la rapamicina de

Fórmula III:

5



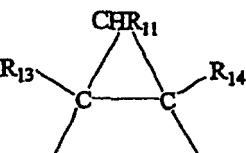
10

15

20 donde:

20

25 $x = \text{enlace o } \text{CHR}_{11}, \text{ o } -\text{CHR}_6-\text{x-CHR}_5-$ es



30 $R_1 = \text{OH, OCH}_3$

30

$R_2 = \text{H, OH, OCH}_3$

35 $R_5 = \text{H, residuo alquil-, halo-, hidroxi-}$

35

$R_6 = \text{H, residuo alquil-, halo-, hidroxi-}$

$R_7 = \text{H, residuo alquil-, halo-, hidroxi-}$

40 $R_8, R_9 = \text{O H, H}$

40

$R_{10} = \text{H, residuo alquil-, halo-, hidroxi-}$

45 $R_{11} = \text{H, residuo alquil-, halo-, hidroxi-}$

45

$R_{12} = \text{H, residuo alquil-, halo-, hidroxi-}$

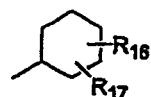
$R_{13} = \text{H, residuo alquil-, halo-, hidroxi-}$

50

$R_{14} = \text{H, residuo alquil-, halo-, hidroxi-}$

55 $R_{15} =$

55



60

$R_{16} = \text{OH}$

65 $R_{17} = \text{H, OH, halo-, tiol-, alquil-}$

65

Los análogos novedosos de la rapamicina resultan eficaces de manera directa, y como moldes para la semisíntesis o bioconversión posterior para producir compuestos útiles, como inmunosupresores, agentes antifúngicos, agentes anticancerígenos, agentes neurodegenerativos o agentes para el tratamiento de la soriasis, la artritis reumatoide, la fibrosis y otras enfermedades neuroproliferativas.

ES 2 296 063 T3

Por lo tanto, también revelamos el uso de los análogos de ligandos de FKBP en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, el tratamiento de infecciones fúngicas, el tratamiento de enfermedades autoinmunes, inflamatorias, proliferativas e hiperproliferativas, o el mantenimiento de la inmunosupresión.

5 Un experto en la técnica será capaz, mediante experimentación rutinaria, de determinar la capacidad de estos compuestos de inhibir el crecimiento de los hongos (e.g. Baker, H., *et al.*, 1978; NCCLS Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts: Approved standard M27-A, 17(9). 1997), y, por ejemplo, pero sin limitación, de emplear los métodos descritos en el Ejemplo 19. Además, un experto en la técnica sería capaz de determinar, mediante experimentación rutinaria, la capacidad de estos compuestos de inhibir el crecimiento de células tumorales, por ejemplo, pero sin limitación, mediante el empleo de los métodos descritos en el Ejemplo 19 (ver también Dudkin, L., *et al.*, 2001; Yu *et al.* 2001). Los compuestos revelados anteriormente resultan útiles para la inducción de inmunosupresión y, por tanto, se relacionan con métodos de inducción profiláctica o terapéutica de inducción de supresión del sistema inmune de un humano o animal para el tratamiento o prevención del rechazo de órganos o tejidos trasplantados, el tratamiento de enfermedades autoinmunes, inflamatorias, proliferativas e hiperproliferativas (los ejemplos incluyen, pero no se limitan de manera inclusiva a las enfermedades autoinmunes, la diabetes tipo I, el rechazo agudo o crónico de un trasplante de órgano o tejido, el asma, los tumores, o los desórdenes hiperprolíficos, la soriasis, el eczema, la artritis reumatoide, la fibrosis, las alergias, y las alergias relacionadas con los alimentos). Dichos ensayos son bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, pero sin limitación: Actividad inmunosupresora - Warner, LM., *et al.*, 1992, Kahan *et al.* (1991) & Kahan & Camardo, 2001); Alotrasplantes - Fishbein, T.M., *et al.*, 2002, Kirchner *et al.* 2000; Autoinmune/Inflamatoria/Asma - Carlson, R.P. *et al.*, 1993, Powell, N. *et al.*, 2001; Diabetes I - Rabinovitch, A. *et al.*, 2002; Soriasis - Reitamo, S. *et al.*, 2001; Artritis reumatoide - Foey, A., *et al.*, 2002; Fibrosis - Zhu, J. *et al.*, 1999, Jain, S., *et al.*, 2001, Gregory *et al.* 1993.

10

15

20

25

La capacidad de los compuestos revelados anteriormente de inducir inmunosupresión puede demostrarse en pruebas estándar empleadas con este propósito, por ejemplo, pero sin limitación, empleando los métodos descritos en el ejemplo 19. Los compuestos resultan útiles en relación con los mecanismos antifibróticos, neurorregenerativos y anti-angiogénicos, un experto en la técnica sería capaz, mediante experimentación rutinaria, de determinar la capacidad de estos compuestos de prevenir la angiogénesis (p. e. Guba, M., *et al.*, 2002,). Un experto en la técnica podría, mediante experimentación rutinaria, determinar la utilidad de estos compuestos (p. e. Morice, M.C., *et al.*, 2002). Además, un experto en la técnica podría, mediante experimentación rutinaria, determinar la capacidad neurorregenerativa de estos compuestos (e.g. Myckatyn, T.M., *et al.*, 2002, Steiner *et al.* 1997).

30

Breve descripción de las figuras

35 Figura 1 Estructura de la rapamicina, las secciones a la izquierda de la línea representan el dominio de unión y las de la derecha indican el dominio efector.

Figura 2 Estructura de la rapamicina (A), FK-520 (C) y meridamicina (D).

40 Figura 3 Mapa plasmídico de pMG55, un vector de doble recombinación con selección positiva para RpsL y en T para conjugación.

Figura 4 Un diagrama de flujo mostrando la estrategia de clonaje para el aislamiento de pMAG144-16 para crear MG2-10.

45 Figura 5 Revisión de los casetes génicos

Figura 6 Estructura de 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina

50 Figura 7 Estructura de 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil prolilrapamicina

Figura 8 Estructura de 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi rapamicina

Figura 9 Estructura de 16-O-desmetil-27-desmetoxi rapamicina

55 Figura 10 Estructuras de compuestos 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 15, 16, 17, 18 y 19

Figura 11. Estructuras de compuestos 3, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 20, 21, 22 y 23

60 Figura 12 Estructuras de compuestos 24, 25, 27, 28, 29, 31, 32, 38, 39, 40, 41 y 42

Figura 13 Estructuras de compuestos 26, 30, 33, 34, 35, 36, 37, 43, 44, 45, y 46

Figura 14 Estructuras de compuestos 47, 48, 50, 51, 53 y 57

65 Figura 15 Estructuras de compuestos 49, 52, 54, 55, 56, y 58

Figura 16 Estructura de compuestos 61, 64, 66, 67, 68, y 70

ES 2 296 063 T3

Figura 17 Estructura de compuestos 59, 60, 62, 63, 65, y 69

Figura 18 Coherencia HMBC de enlaces múltiple heteronuclear de la prerapamicina

5 Figura 19 Coherencia HMQC cuántica múltiple heteronuclear de la prerapamicina

Figura 20 Espectroscopía de correlación (COSY) de la prerapamicina indicada por medio de las flechas continuas, espectroscopía de correlación total (TOCSY) de la prerapamicina indicada por medio de las flechas de puntos.

10 Figura 21 Correcciones en la secuencia de ADN de rapN, la secuencia corregida se muestra encima (SEC. ID. NO: 1) y la secuencia publicada (acc no: X86780, nt 91764-92978) se muestra debajo (SEC. ID. NO: 2).

Figura 22 Correcciones en la secuencia aminoacídica de RapN, la secuencia corregida se muestra encima (SEC. ID. NO: 3) y la secuencia publicada (acc no: X86780) se muestra debajo (SEC. ID. NO: 4).

15 Figura 23 Correcciones en la secuencia de ADN de rapM, la secuencia corregida se muestra encima (SEC. ID. NO: 5) y la secuencia publicada (acc no: X86780, nt 92992-93945 complemento) se muestra debajo (SEC. ID. NO: 6).

20 Figura 24 Correcciones en la secuencia aminoacídica de RapM, la secuencia corregida se muestra encima (SEC. ID. NO: 7) y la secuencia publicada (acc no: X86780) se muestra debajo (SEC. ID. NO: 8).

Figura 25 Correcciones en la secuencia de ADN de rapL, la secuencia corregida se muestra encima (SEC. ID. NO: 9) y la secuencia publicada (acc no: X86780, nt 94047-95078 complemento) se muestra debajo (SEC. ID. NO: 10).

25 Figura 26 Correcciones en la secuencia aminoacídica de RapL, la secuencia corregida se muestra encima (SEC. ID. NO: 11) y la secuencia publicada (acc no: X86780) se muestra debajo (SEC. ID. NO: 12).

Figura 27 Correcciones en la secuencia de ADN de rapK, la secuencia corregida se muestra encima (SEC. ID. NO: 13) y la secuencia publicada (acc no: X86780, nt 95430-96434) se muestra debajo (SEC. ID. NO: 14).

30 Figura 28 Correcciones en la secuencia aminoacídica de RapK, la secuencia corregida se muestra encima (SEC. ID. NO: 15) y la secuencia publicada (acc no: X86780) se muestra debajo (SEC. ID. NO: 16).

Figura 29 Correcciones en la secuencia de ADN de rapJ, la secuencia corregida se muestra encima (SEC. ID. NO: 17) y la secuencia publicada (acc no: X86780, nt 96465-97625) se muestra debajo (SEC. ID. NO: 18).

Figura 30 Correcciones en la secuencia aminoacídica de RapJ, la secuencia corregida se muestra encima (SEC. ID. NO: 19) y la secuencia publicada (acc no: X86780) se muestra debajo (SEC. ID. NO: 20).

40 Figura 31 Correcciones en la secuencia de ADN de rapI, la secuencia corregida se muestra encima (SEC. ID. NO: 21) y la secuencia publicada (acc no: X86780, nt 97622-98404) se muestra debajo (SEC. ID. NO: 22).

Figura 32 Correcciones en la secuencia aminoacídica de RapI, la secuencia corregida se muestra encima (SEC. ID. NO: 23) y la secuencia publicada (acc no: X86780) se muestra debajo (SEC. ID. NO: 24).

45 Figura 33 Correcciones en la secuencia de ADN de rapQ, la secuencia corregida se muestra encima (SEC. ID. NO: 25) y la secuencia publicada (acc no: X86780, nt 90798-91433) se muestra debajo (SEC. ID. NO: 26).

Figura 34 Correcciones en la secuencia aminoacídica de RapQ, la secuencia corregida se muestra encima (SEC. ID. NO: 27) y la secuencia publicada (acc no: X86780) se muestra debajo (SEC. ID. NO: 28).

Figura 35 Un diagrama de flujo que muestra la estrategia de clonaje para el aislamiento de pMG278-1, para crear MG3.

55 Figura 36 Un diagrama de flujo que muestra la estrategia de clonaje para el aislamiento de pMG267-1, para crear MG4.

Materiales y métodos

60

Materiales

Todas las enzimas y reactivos de biología molecular se obtuvieron a partir de fuentes comerciales. El ácido piperídico D/L se obtuvo a partir de Sigma.

65

ES 2 296 063 T3

Materiales de partida

La tabla IV resume las fuentes de los ácidos empleados para los experimentos de alimentación descritos en la sección de Ejemplos. Para los compuestos que fueron adquiridos se proporcionan los detalles de la fuente. Un método de síntesis breve se proporciona para los ácidos de partida que se sintetizaron en nuestro laboratorio. Un experto en la técnica comprenderá que las variaciones a los métodos descritos son de rutina y se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

10

TABLA IV

Ácido	Compañía	Número de lote	Síntesis
Ácido ciclohexano carboxílico	Aldrich	10, 183-4	
Ácido 3-cis, 4-trans-dihidrociclohexano carboxílico			En nuestro laboratorio por el método de la tesis de PhD de Lowden
Ácido 1-ciclohexano carboxílico	Aldrich	32, 836-7	
Ácido 3-ciclohexano carboxílico	Aldrich	45, 357-7	
Ácido cicloheptano carboxílico	Aldrich	C9, 850-0	
Metil-2-norbornano carboxilato	Aldrich	S40, 932-4	
Ácido 2-(cis/trans)-hidroxiciclohexano carboxílico	U. Nottingham		Sin. por Dr. R. Goss
Ácido 3-(cis/trans)-hidroxiciclohexano carboxílico	U. Nottingham		Sin. por Dr. R. Goss
Ácido 4-(cis/trans)-hidroxiciclohexano carboxílico	U. Nottingham		Sin. por Dr. R. Goss
Ácido 2-(cis/trans)-metilciclohexano carboxílico	Aldrich	33,060-4	
Ácido 3-(cis/trans)-metilciclohexano carboxílico	Aldrich	33,061-2	
Ácido 4-(cis/trans)-metilciclohexano carboxílico	Aldrich	33,062-0	
Ácido 3-(cis/trans)-metoxiciclohexano carboxílico	Aldrich	33,283-6	
Ácido 4-(cis/trans)-metoxiciclohexano carboxílico	Aldrich	33,284-4	
Etilo 4-ciclohexano carboxilato	Aldrich	32,062-5	
Etilo 2-ciclohexano carboxilato	Aldrich	16,699-5	
Ácido 4-trans-n-pentilciclohexano carboxílico	Aldrich	26,160-2	
Ácido 2-trans-aminociclohexano carboxílico	Aldrich	A7331	
Ácido 4-cis-aminociclohexano carboxílico	Aldrich	40,485-3	
Ácido 4-(cis/trans)-(aminometil)-	Aldrich	S42,955-4	

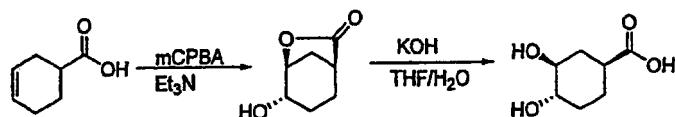
55

60

65

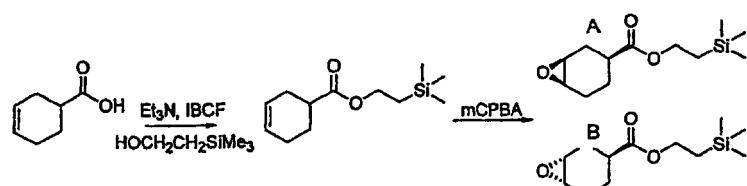
5	ciclohexano carboxílico			
10	Ácido ciclopentano carboxílico	Aldrich	C11,200-3	
15	Ácido ciclobutano carboxílico	Aldrich	C9,560-9	
20	Ácido 1-metilciclohexano carboxílico	Aldrich	14,282-4	
25	Mezcla de ácido 3-trans-hidroxi-4-cis-fluorociclohexano carboxílico y ácido 4-trans-hidroxi-3-cis-fluorociclohexano carboxílico o mezcla de ácido 3-cis-hidroxi-4-trans-fluorociclohexano carboxílico y ácido 4-cis-hidroxi-3-trans-fluorociclohexano carboxílico			En nuestro laboratorio, Método B
30	Mezcla de ácido 3-cis-hidroxi-4-trans-clorociclohexano carboxílico y ácido 4-cis-hidroxi-3-trans-clorociclohexano carboxílico			En nuestro laboratorio, Método C
35	Mezcla de 3-trans-hidroxi-4-cis-clorociclohexano carboxílico y 4-trans-hidroxi-3-cis-clorociclohexano carboxílico			En nuestro laboratorio, Método C
40	Ácido 3-trans-ciclohexeno óxido carboxílico			En nuestro laboratorio, Método A
45	Ácido 3-cis-ciclohexeno óxido carboxílico			En nuestro laboratorio, Método A
50	Mezcla de ácido 3,4-cis-dihidroxiciclohexano carboxílico y ácido 3,4-trans-dihidroxiciclohexano carboxílico			En nuestro laboratorio, Método D
55	Ácido ciclohexano acético	Aldrich	C10,450-7	
60	Ácido ciclohexanopropiónico	Aldrich	16,147	
65	Ácido 4-cis/trans-terc-butilciclohexano carboxílico	Aldrich	37,493-8	

Síntesis del ácido 3-cis,4-trans-dihidroxiciclohexano carboxílico



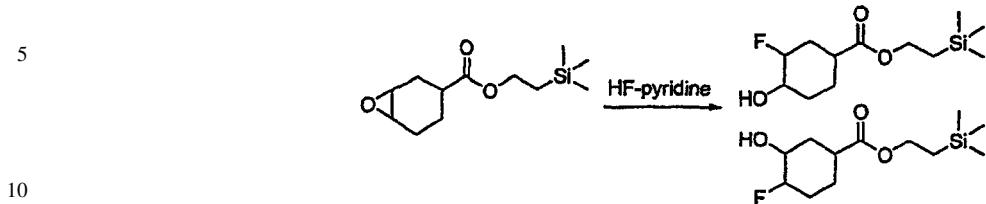
50 El ácido 3-cis,4-trans-dihidroxiciclohexano carboxílico racémico fue fácilmente obtenido a partir del ácido 3-ciclohexano carboxílico racémico, disponible comercialmente. El ácido se epoxidó por medio del tratamiento con ácido meta-clorobenzoico y se convirtió a lactona *in situ*, por medio de la adición de base (trietilamina), configurando de ese modo las estereoquímicas relativas. Esta lactona se hidrolizó a continuación por medio de la acción de hidróxido de potasio acuoso, y el producto final se purificó por medio de resinas de intercambio iónico (ver PAS Lowden Thesis 1997, Corey, E. J. and Huang, H., 1989).

Método A



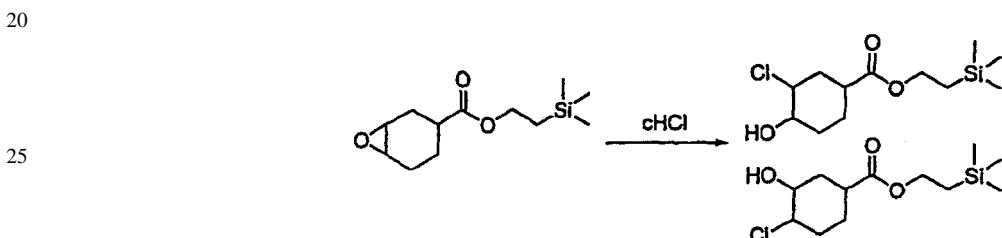
65 Los epóxidos A y B se sintetizaron por medio de etapas estándar. Se protegió el ácido ciclohex-3-eno carboxílico con 2-trimetilsililetanol, siguiendo la activación con isoutilcloroformato y trietilamina. El éster resultante se trató con ácido metacloroperbenzoico y la mezcla racémica resultante de diastereoisómeros se separó sobre una fase normal de sílica. Los epóxidos se hicieron reaccionar sobre (ver más adelante) o se desprotegieron directamente por medio del tratamiento de ácido trifluoroacético, para liberar los ácidos respectivos.

Método B



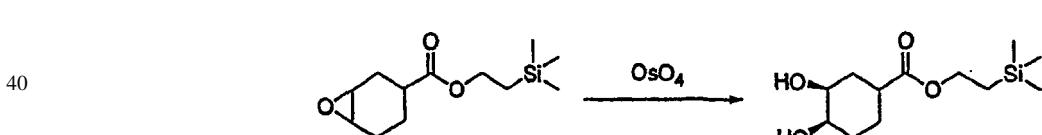
15 Un epóxido protegido se trató con HF-piridina ahidro para efectuar la apertura del anillo para producir un par de regiómeros racémico, que contenían F y OH en un arreglo trans (como se describió con anterioridad para el óxido de ciclohexeno). Los ésteres se desprotegieron a continuación con ácido trifluoroacético para liberar los ácidos, (ver Welch, J. T. y Seper, K., W., 1988).

Método C



30 Un epóxido protegido se trató con solvente orgánico suspendido en ácido clorhídrico concentrado para efectuar la apertura del anillo para producir un par de regiómeros racémicos, que contenían Cl y OH en una configuración trans (como se demostró previamente para el óxido de ciclohexeno). Los ésteres se desprotegieron a continuación con ácido trifluoroacético para liberar los ácidos, (ver Chini, M., Crotti, P., et al., 1992).

Método D



45 Se generaron los ácidos cis-dihidroxyciclocarboxílicos mediante el tratamiento de époxidos protegidos con una cantidad catalítica de tetróxido de osmio junto con un cooxidante. Los ésteres se desprotegieron a continuación con ácido trifluoroacético para liberar los ácidos.

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

50 La *Escherichia coli* DH10B (GibcoBRL) se cultivó en medio 2xTY como describen Sambrook *et al.* (1989) y la *E. coli* ET12567 (pUB307) como describen MacNeil *et al.* (1992) y la *E. coli* ET12567 (pUZ8002) como se describe en Pager *et al.* (1999), en medio 2xTY con kanamicina (25 µg/ml). Los vectores pUC18 y Litmus28 se obtuvieron de New England Biolabs. El vector pSET152 se describe en Bierman *et al.*, (1992a). Los transformantes de *E. coli* se seleccionaron positivamente con ampicillina 100 µg/ml o apramicina, 50 µg/ml.

55 El productor de rapamicina *S. hygroscopicus* ATCC29252 y sus derivados se mantuvieron en placas con medio 1 agar (ver más adelante) a 26°C, y se cultivaron en TSBGM (sobrenadante tríptico de soya con 1,0% de glucosa y 100 mM MES, pH 6,0), como se describe en (Khaw *et al.*, 1998), suplementado con apramicina, 100 µg/ml cuando se requirió.

60 Los cultivos líquidos se mantuvieron a 25°C en frascos Erlenmeyer horizontales con agitación a 300 rpm.

65 El mutante de *S. hygroscopicus* MG1C, resistente a estreptomicina se seleccionó empleando procedimientos estándar y se mantuvo en medio 1 con estreptomicina (50 µg/ml).

ES 2 296 063 T3

Métodos de alimentación

Se prepararon conjuntos de esporas de todas las cepas después de cultivadas en medio 1, se conservaron en glicerol al 20% w/v: lactosa en agua destilada al 10% w/v y se almacenaron a -80°C. Se prepararon cultivos vegetativos por medio de la inoculación de 100 μ l del conjunto congelado en 50 ml de medio 6 en un frasco de 250 ml. El cultivo se incubó durante 36 a 48 horas a 28°C, 250 rpm.

Procedimiento de alimentación: Los cultivos vegetativos se inocularon a 0,5 ml en 7 ml de medio 7 en tubos de 50 ml. El cultivo se llevó a cabo durante 7 días, a 26°C, 250 rpm. La alimentación/adición de los ácidos carboxílicos 10 seleccionados (“iniciadores no naturales” o “iniciadores naturales”) se llevó a cabo entre 24 y 48 horas después de la inoculación y se alimentaron a 1 mM ó 3 mM.

Medio 1: Medio A Modificado

componente	Fuente	Catálogo #	g/l
Polvo de maíz procesado	Sigma	C-8160	2,5 g
Extracto de levadura	Difoc	0127-17	3 g
Carbonato de calcio	Sigma	C5929	3 g
Sulfato de hierro	Sigma	F8633	0,3 g
Agar BACTO			20 g
Almidón de trigo	Sigma	S2760	10 g
Agua hasta			1 L

El medio se esterilizó a continuación mediante autoclave a 121°C, durante 15 min.

Medio 2 (Box *et al.*, 1995)

componente	g/L
Peptona-SL de soya (Marcor)	10
Glucosa (Sigma G-7021)	20
Levadura panadera	5
NaCl (Sigma)	2
<i>Elementos en trazas</i>	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,125
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,01
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02
Ajustar pH a 7,0	

Medio 3 (Wilkinson *et al.*, 2000)

componente	g/L
Dextrosa (Sigma)	15
Glicerol (BDH-Merck)	15
Peptona de Soya (Marcor-SL)	15
NaCl (Fisher)	3
CaCO ₃ (Sigma)	1

ES 2 296 063 T3

Medio 4 (Patente U.S. No. 3.993.749)

Componente	g/L
Harina de soya (Arkasoy 50)	30
Glucosa (Sigma G-7021)	20
Sulfato de amonio	15
KH ₂ PO ₄ (Sigma)	5
<i>Elementos en trazas</i>	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,125
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,01
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02
Ajustar pH a 6,0,	

Medio 5 (Box *et al.*, 1995)

Componente	g/L
Harina de soya (Arkasoy 50)	30
Glucosa (Sigma G-7021)	20
Levadura panadera	6
K ₂ HPO ₄ (Sigma)	2,5
KH ₂ PO ₄ (Sigma)	2,5
NaCl (Sigma)	5
Glicerol (BDH)	30
Aceite de soya	10
<i>Elementos en trazas</i>	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,125
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,01
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02
Ajustar pH a 6,4,	

Medio 6: Medio de siembra RapV7

Componente	Por L
Harina de soya (Nutrisoy)	5 g
Dextrin (White, Prolab)	35 g
Sólidos de maíz procesados (Sigma)	4 g
Glucosa	10 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g
Ácido Láctico (80%)	1,6 ml
CaCO ₃ (Sigma)	7g
Ajustar pH a 7,5 con NaOH 1M	

ES 2 296 063 T3

Medio 7: medio MD6 (medio de fermentación)

Componente	Por L
5 Harina de soya (Nutrisoy)	30 g
10 Almidón de maíz (Sigma)	30 g
15 Dextrina (White, Prolab)	19 g
20 Fructosa	20 g
25 Levadura (Allinson)	3 g
30 Sólidos de maíz procesados (Sigma)	1 g
35 L-lisina	2,5 g
40 KH₂PO₄	2,5 g
45 KH₂PO₄	2,5 g
50 (NH₄)₂SO₄	10 g
55 NaCl	5 g
60 CaCO₃ (Caltec)	10 g
65 MnCl₂.4H₂O	10 mg
70 MgSO₄.7H₂O	2,5 mg
75 FeSO₄.7H₂O	120 mg
80 ZnSO₄.7H₂O	50 mg
85 MES (monohidrato de ácido sulfúrico 2-morfolinoetano)	21,2 g
90 El pH se corrige a 6,0 con NaOH 1M	

30 antes de la esterilización se añaden 0,4 ml de α -amilasa Sigma (BAN 250) a 1 L de medio. El medio se esteriliza durante 20 min a 121°C.

35 Medio 8: medio MD3 (medio de fermentación)

Componente	Por L
40 Harina de soya (Nutrisoy)	31,25 g
45 Dextrina blanca (Prolab)	18,75 g
50 KH₂PO₄	5 g
55 (NH₄)₂SO₄	5 g
60 MnCl₂.4H₂O	10 mg
65 MgSO₄.7H₂O	2,5 mg
70 FeSO₄.7H₂O	120 mg
75 ZnSO₄.7H₂O	50 mg
80 SAG 417	1,2 mL
85 Se ajusta el pH a 6,4 con NaOH	
90 L-lisina	0,625 g
95 Glucosa (40% w/v)	50 mL

55

Descripción de las cepas

60 Todas las cepas compartían la morfología del tipo salvaje, con micelas vegetativas, hifas aéreas blancas, y desarrollaban esporas grises que se tornaban negras, y se mostraban higroscópicas de modo característico.

65 Las esporas empleadas de preferencia para la generación de las cepas recombinantes como se describe en el presente documento, eran de color gris oscuro, como se define en Fan 4, 202 C a B, con mayor preferencia, son como se define en Fan 4, 202 B (Royal Horticultural Society Colour Chart 2001, disponible en The Royal Horticultural Society, 80 Vincent Square, London, SW1P 2PE).

Manipulación y secuenciación de ADN

Las manipulaciones de ADN y los procedimientos de electroporación se llevaron a cabo como se describe en Sambrook *et al.* (1989). Las hibridizaciones de Southern se llevaron a cabo con sondas marcadas con digoxigenina, 5 empleando el paquete de marcaje de ADN DIG, como describe el fabricante (Boehringer Mannheim). La secuenciación de ADN se llevó a cabo como se describió con anterioridad (Gaisser *et al.*, 2000).

*Fermentación de cepas de *Streptomyces higroscopicus**

10 Las cepas de *Streptomyces higroscopicus* se cultivaron a partir de un conjunto de esporas congeladas en criopreservación (glicerol al 20%; lactosa al 10% w/v en agua destilada) en medio 1 (ver Materiales y Métodos) y las esporas se cultivaron después de un crecimiento de 10-20 días a 29°C. De modo alternativo, las esporas de conjuntos de trabajo se inocularon directamente en el medio precultivado. Un precultivo primario se inoculó con las esporas colectadas y se cultivó en frascos Erlenmeyer de 250 ml, que contenían 50 ml de Medio 6 (ver Materiales y Métodos), agitados a 250 15 rpm llenos con dos pulgadas de contenido, a 30°C, durante dos días. El precultivo primario se empleó para inocular precultivos secundarios de Medio 6 (ver Materiales y Métodos), a 10% v/v, que se agitó a 300 rpm, con una pulgada de contenido, a 28°C, durante 24 h. Los precultivos secundarios se emplearon para inocular, a 10% v/v, Medio 8 de producción (ver Materiales y Métodos), que contenía 0,01% v/v de SAG 417, antiespumante y se dejó fermentar en un biorreactor con agitación, durante cinco a siete días a 26°C. Se ajustó un flujo de aire de 0,75 vvm, bajo presión de 0,5 20 bar y la velocidad de la punta del impelente se controló entre 0,98 ms⁻¹ y 2,67 ms⁻¹. Se añadió SAG 417 adicional a demanda. Se controló el pH entre 6 y 7, con amonio (10% v/v) o ácido sulfúrico (1 M) y se goteó solución de glucosa (40% w/v) al comenzar la demanda de amonio.

Extracción y método de análisis (A) mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

25 Se llevó a cabo la centrifugación en un sobrenadante de fermentación de 50 ml y se extrajeron separadamente el sobrenadante y el mycelium, como sigue. Las células se lavaron con agua y se extrajeron con 50 ml de metanol durante 16 horas a 4°C. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación, se evaporó el metanol hasta sequedad y luego se disolvió en 200 µl de metanol. El sobrenadante del sobrenadante de fermentación se extrajo dos veces con un 30 volumen igual de acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se evaporó a sequedad y luego se disolvió en 200 µl de metanol. El análisis de HPLC se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido Hewlett Packard HP1100, con detector de longitud de onda variable, o un instrumento Finnigan MAT LCQ (Finnigan, CA). Los espectros de alta resolución se obtuvieron en un espectrómetro de masas Bruker BioApex II 4.7 T Fourier Transform-Ion Ciclotron Resonance (FT-ICR) (Bruker, Bremen, FRG).

35 Para el análisis de RMN, se centrifugó el sobrenadante de bacterias, se extrajo el sobrenadante con tres volúmenes iguales de acetato de etilo y se extrajeron las células con metanol como se describió con anterioridad. Los extractos se combinaron, se secaron (Na₂SO₄) y se evaporaron bajo presión reducida, para rendir un sólido blanco.

40 Los espectros de RMN de protones detectados (¹H, DQF-COSY, TOCSY, HMQC, HMBC, NOESY) se grabaron en un espectrómetro Bruker Advance DRX500, que operaba a 500 MHz a 27°C, con la excepción del ejemplo 6, en que el espectrómetro Bruker Advance DRX500 se operó a 500 MHz a 10°C. Los cambios químicos se describen en partes por millón (ppm) en la escala δ y se refieren a δ_H 7,26 (¹H) y CHCl₃ a δ_C 77,0 (¹³C). Los valores *J* se dan en Hertz (Hz).

*Protocolos de extracción, aislamiento y análisis (B)**Protocolo de extracción y purificación*

50 El sobrenadante de fermentación se clarificó por medio de centrifugación para dar lugar al sobrenadante y las células. El sobrenadante se aplicó a una columna (16 x 15 cm) de resina Diaion HP20 (Supelco), se lavó con agua, seguida por MeOH/H₂O al 75%, y luego se eluyó con MeOH. Las células se mezclaron hasta homogeneidad con un volumen igual de acetona. Luego de al menos 30 minutos, la fase de acetona se clarificó por medio de centrifugación, y se decantó el sobrenadante. Las células sedimentadas se extrajeron dos veces más de forma similar con acetona. 55 El extracto de acetona se combinó con el MeOH de la columna HP20 y se eliminó el solvente al vacío para dar un concentrado acuoso. El acuoso (por lo regular 1-2 L) se extrajo con EtOAc en un volumen mínimo de EtOAc y se secó sobre sílica. La sílica cubierta se aplicó a una columna de sílica (400 g, 36 x 6 cm), que se eluyó de manera secuencial con mezclas de acetona/hexano, en un intervalo desde 25% de acetona hasta 100% de acetona. Las fracciones que contenían los análogos de rapamicina se identificaron mediante HPLC (280 nm), empleando las condiciones que aquí 60 se describen.

Las fracciones que contenían los análogos de rapamicina se combinaron y el solvente se eliminó al vacío. El residuo se cromatógrafió luego sobre Sephadex LH20, se eluyó con cloroformo/heptano/etanol 10:10:1. Los análogos semipurificados de rapamicina se purificaron por medio de cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (C 65 18), empleando un HPLC Wilson, eluyendo una columna de Phenomenex 21,2 x 250 mm Luna de 5µm C18 BDS a 21 ml/min, con una elución isocrática con mezclas de CH₃CN/H₂O de 50% a 70%, en dependencia de la polaridad del análogo de rapamicina.

Análisis de los sobrenadantes de cultivo

Se agitó una alícuota de sobrenadante entero (1 ml) con CH₃CN durante 30 min. La mezcla se clarificó mediante centrifugación, y el sobrenadante se analizó por HPLC con detección de arreglo de diodo. El sistema de HPLC consistía en un HP1100 Agilent, equipado con una columna BDS HYPERSIL C18 de 3 µm 4,6 x 150 mm (ThermoHypersil-Keystone), calentada a 40°C. El gradiente de elución fue de 55% de la fase móvil B a 95% de la fase móvil B durante 10 minutos, seguido por una fijación isocrática a 95% de la fase móvil B durante 2 minutos, con una velocidad de flujo de 1 mL/min. La fase móvil A era 10% de acetonitrilo: 90% agua, conteniendo 10 mM de acetato de amonio y 0,1% de ácido trifluoroacético, la fase móvil B era 90% de acetonitrilo: 10% de agua, conteniendo 10 mM de acetato de amonio y 0,1% de ácido trifluoroacético. Los análogos de rapamicina se identificaron por la presencia del trieno característico de la rapamicina, centrado en 278 nm. Los análogos FK506 y FK520 se identificaron mediante análisis LC-MS.

Análisis por LCMS

El sistema de HPLC descrito con anterioridad se acopló a un espectrómetro de masas de electrospray Bruker Daltonics Esquire3000. La misma columna y el mismo esquema de elución por gradiente descritos con anterioridad se emplearon aquí. La fase móvil A era agua, la fase móvil B era acetonitrilo. Se empleó un cambio de positivo a negativo en el intervalo de escaneo de 500 a 1000 Dalton.

Ejemplo 1

*Conjugación de *S. hygroscopicus**

El plásmido a conjugarse en *S. hygroscopicus* se transformó mediante electroporación en una cepa de *E. coli* ET12567 dam⁻ dcm⁻, que contenía ya fuese pUB307, como se describe en MacNeil *et al.* (1992) o pUZ8002, como se describe en Pager *et al* (1999). Se empleó un precultivo (cultivo durante toda la noche, 30°C) para inocular 2xTY (con apramicina a 50 µg/ml y kanamicina a 25 µg/ml) a una dilución de 1/25 y se creció con agitación a 37°C hasta una densidad óptica a 595 nm de 0,25-0,6. Las células de este sobrenadante se lavaron dos veces con 2xTY, luego se resuspendieron en 0,5 ml de 2xTY por 25 ml del cultivo original. La calidad del lote de esporas empleado es crítica para el éxito de este método. En este contexto, la edad de las esporas cuando se cultivan, y el empleo de medio 1 son cruciales para el aislamiento de una suspensión de esporas de alta calidad. Para aislar suspensiones de esporas de alta calidad de *S. hygroscopicus*, se rociaron placas presecadas de medio 1 agar (ver sección Materiales y Métodos) con esporas o micelas de *S. hygroscopicus* empleando técnicas microbiológicas estándar, seguidas por incubación a 26°-28°C durante 14-21 días. Las esporas se cultivaron mediante adición de 1-2 ml de 20% w/v de glicerol o agua mediante técnicas estándar. Una alícuota de 200 µl de la suspensión de esporas de *S. hygroscopicus* se lavó en 500 µl de 2xTY, se resuspendió en 500 µl de 2xTY, se sometió a choque térmico a 50°C durante 10 minutos y luego se enfrió en hielo. Una alícuota de 0,5 ml de la suspensión de *E. coli* se mezcló con las esporas expuestas a choque térmico y esta mezcla se depositó en placas con medio 1 agar. Estas placas se incubaron a 26-28°C durante 16 horas antes de recubrirlas con 1 mg de ácido nalidíxico y 1 mg de apramicina por placa. Las colonias exconjugantes aparecieron, usualmente, después de 3-7 días.

*Uso en *S. hygroscopicus* MG2-10 de un vector de integración alternativo, pRT801*

La conjugación también se llevó a cabo empleando el vector de integración pRT801 basado en φBT1 en *S. hygroscopicus* MG2-10, como se describe con anterioridad. Las colonias exconjugantes se plantaron en medio 1 que contenía apramicina 50 µg/ml y ácido nalidíxico 50 µg/ml, y se demostró que eran resistentes a apramicina.

Ejemplo 2

*Aislamiento del mutante MG2-10 de *S. hygroscopicus* que porta la delección cromosómica de rapQONMLKJI (Figura 4)*

Se construyó un mutante de *S. hygroscopicus* (MG2-10) en el que los genes de modificación de la rapamicina rap^Q, rapO/N, rapM, rapL, rapK, rapJ y rapI se habían eliminado, como se describe a continuación:

Aislamiento del mutante MG1C resistente a estreptomicina

Se esparcieron células de *S. hygroscopicus* NRRL5491 sobre placas de medio 1 que contenía 50 mg/ml de estreptomicina. Se aislaron tres colonias y se marcaron MG1A, MG1B y MG1C. Estas se conjugaron como en el ejemplo 1 con el plásmido pMG49, un derivado de pSET152 que contenía el gen rpsL proveniente de *S. lividans* TK24. Los exconjugantes de cada una de estas conjugaciones se colocaron sobre una placa de medio 1 que contenía 50 mg/ml de apramicina y 50 mg/ml de ácido nalidíxico, para confirmar la presencia del plásmido pMG49. Luego se colocaron, junto con las cepas originales MG1A, MG1B y MG1C, tanto sobre una placa de medio 1 que no contenía ningún antibiótico, como sobre una placa de medio 1 que contenía 50 mg/ml de estreptomicina. Se observó crecimiento en todos los casos, excepto las franjas correspondientes a MG1A (pMG49), MG1B (pMG49) y MG1C (pMG49) sobre estreptomicina, lo que indicaba que el tipo salvaje del gen rpsL de *S. lividans* TK24 confería sensibilidad dominante

ES 2 296 063 T3

a estreptomicina en estas cepas. Se midió la producción de prerpamicina en MG1A, MG1B y MG1C y se tomó el mejor productor, MG1C, para el trabajo posterior.

Conjugación de S. hygroscopicus MG1C

5 Las conjugaciones se llevaron a cabo como se describe en el ejemplo 1, empleando el *S. hygroscopicus* MG1C resistente a estreptomicina y las construcciones derivadas del vector pMG55.

Construcción del vector conjugativo de doble recombinación pMG55 (Figura 3)

10 Los cebadores MAG47 5'-GCAAGCTTGGTACCGACACGCTGCCAACAGG-3' (SEC ID NO: 29) y MAG48 5'-GCGCATGCCCTAGGGTGTACATTACTCTCC-3' (SEC ID NO: 30) se emplearon para amplificar el gen rpsL de *S. lividans* empleando el plásmido pRPSL21 (Shima *et al.*, 1996) como molde. El fragmento de PCR se digirió con SphI y HindI, se aisló y se ligó con el fragmento de 3,2kb de pSET152 (Bierman *et al.*, 1992b), que había sido 15 digerido con SphI y HindI. Luego de la transformación en *E. coli* DH10B, se aisló el plásmido pMG55. Este plásmido se confirmó mediante secuenciación. El plásmido pMG55 contiene al gen rpsL para permitir la selección de los dobles recombinantes (Hosted and Baltz, 1997).

20 *Aislamiento del mutante MG2-10 de S. hygroscopicus, que porta la delección cromosómica de rapQONMLKJII (Fig.4)*

25 Los cebadores MAG23 5'-TATCTAGACTTCGACGTGCCCTGGGACA-3' (SEC ID NO: 31) y MAG24 5'-AGAAGCTTACCCAATTCCAACATCACCT-3' (SEC ID NO: 32) se emplearon para amplificar la región izquierda de homología (desde nt 89298 hasta nt 90798) en el cluster de rapamicina, como se describe en Schwecke *et al.* (Schwecke *et al.*, 1995) empleando ADN genómico preparado a partir de *S. hygroscopicus* NRRL5491 como molde. El producto de PCR de 1,5 kb se digirió con XbaI y HindI y se ligó en pUC18 cortado con XbaI y HindIII. Luego de la transformación en *E. coli* DH10B, se aisló el plásmido pMAG127-8. Los cebadores MAG25 5'-GGAAGCTTT GACCACACGCCGCCGTTC-3' (SEQ ID NO: 33) y MAG26 5'-ATGCATGCCGCCGCAACCGCTGGCCT-3' (SEQ ID NO: 34) se emplearon para amplificar la región derecha de homología (desde nt 98404 hasta nt 99904) en el cluster de rapamicina, como se describe en Schwecke *et al.* (Schwecke *et al.*, 1995) empleando ADN genómico preparado a partir de *S. hygroscopicus* NRRL5491 como molde. El producto de PCR de 1,5 kb se digirió con HindIII y SphI y se ligó en pUC18 cortado con HindIII y SphI. Luego de la transformación en *E. coli* DH10B, se aisló el plásmido pMAG128-2 (Figura 4). Ambos plásmidos se comprobaron mediante análisis de secuencia. El plásmido pMAG127-8 se digirió con SphI y HindIII, el plásmido pMAG128-2 se digirió con XbaI y HindIII y se aislaron los 30 fragmentos de 1,5 kb de ambos plásmidos. Dichos fragmentos se ligaron en pUC18 cortado con SphI y XbaI y se emplearon para transformar *E. coli* DH10B. Se aisló el plásmido pMAG131-1. Este plásmido se digirió con SphI y XbaI, el fragmento de 3 kb se aisló y se ligó en pMG55 cortado con SphI y AvrII y el ADN se empleó para transformar *E. coli* DH10B. El plásmido pMAG144-16 se aisló y se empleó para conjugar *S. hygroscopicus* MG1C. Se aisló una 35 colonia de *S. hygroscopicus* resistente a apramicina, cultivada durante 24 horas en TSBGM con agitación a 26°C, y se colocó sobre placas de agar con medio 1 que contenían 50 µg/l de estreptomicina. Las colonias resistentes a estreptomicina se aislaron y se demostró que eran sensibles a apramicina. La delección cromosómica de 7606 nt de la región rapQONMLKJII, correspondiente al cluster de rapamicina se verificó en el mutante MG2-10 mediante el empleo del producto de PCR de 1,5 kb de MAG23 y MAG24 usado como sonda para elADN cromosómico digerido con EcoRI y 40 BamHI. El análisis del ADN cromosómico de MG2-10 se trató de manera similar, se detectaron bandas de 9,6 kb con EcoRI y 7,6 kb con BamHI, lo que indicaba que rapQONMLKJII había sido eliminado.

Ejemplo 3

50 *Expresión de rapK en el mutante MG2-10 de S. hygroscopicus que portaba la delección cromosómica de rapQONMLKJII (Figura 4)*

Construcción del vector de expresión pSGset1

55 El vector pCJR336 (gentilmente proporcionado por Christine Martin y Corinne Squire), derivado de pSET152 (Bierman *et al.*, 1992a) se creó por medio del clonaje del dímero cebador de CR347 5'-TAAACTAGTC CATCTGAGAGTTTCATATGCCCTATTCTGCCAGCCGCTAGAAAT-3' (SEC ID NO: 35) y CR348 5'-ATTCTAGAGCGGCTGGGCAGAATAGGCCATATGAAACTCTCAGATGGACTAGTTA-3' (SEC ID NO: 36) en pSET152 digerido con PvuII empleando técnicas estándar de biología molecular, de manera que se introdujese 60 sitios para las enzimas de restricción SpeI, NdeI y XbaI en pSET152. La orientación del inserto se confirmó mediante secuenciación. El plásmido pCJR336 se digirió empleando las enzimas de restricción NdeI/SpeI y el vector pSG142 (Gaisser *et al.*, 2000) se digirió de forma idéntica. Las bandas de ADN resultantes, de alrededor de 5,4 kb para pCJR336 y 1,2 kb para pSG142 se aislaron luego de la ligación que se usó para transformar a *E. coli* DH10B. La construcción del vector que contenía a la región reguladora actII-ORF4 se aisló y se digirió empleando la enzima de 65 restricción XbaI, seguido por un tratamiento con fosfatasa alcalina, de acuerdo con protocolos estándar. El ADN aislado se ligó con un fragmento de alrededor de 200 pb del plásmido pEXoleG2cas (derivado de pSG142 que contenía el fragmento ca. de 1,2 kb NdeI/BglII) de pSGcasOleG2 (WO01/79520), digerido con las enzimas de restricción XbaI y NheI. El vector pSGset1 se aisló y se verificó la orientación correcta del inserto empleando digestiones de restricción

ES 2 296 063 T3

y análisis de secuencia. El plásmido pSGset1 contiene el regulador actII-ORF4, el promotor P_{actl} y la secuencia codificadora de cola 6xHis, así como la región terminadora de la transcripción lambda t_0 (originaria del plásmido pQE-16) y puede integrarse de modo sitio específico en el sitio de unión φ C31.

5 Clonaje de rapK

El gen rapK se amplificó mediante PCR empleando los cebadores BIOSG8 5'-GGGCATATGAGGCAATT-GACTCCGCCGGTCACGGCACCGTACTGCC-3' (SEC ID NO: 37) y BIOSG9 5'-GGGGTCTAGAGGTACCGC-CACCACACCCTCGATCTCGACC-3' (SEC ID NO: 38), que introducen un sitio de NdeI en el extremo 5' y un sitio de XbaI en el extremo 3' de rapK. Se empleó el plásmido pR19 (Schwecke *et al.*, 1995) como molde. Luego del tratamiento con T4 polinucleótido quinasa empleando técnicas estándar, el producto del PCR se ligó con pUC18 cortado con SmaI, para transformar a *E. coli* DH10B. La secuencia de ADN de rapK en el plásmido aislado pUCrapK se verificó mediante análisis de secuencia. Las diferencias en la secuencia de ADN, en comparación con la secuencia publicada (acc. No. X86780) se muestran en la Figura 27. Los cambios resultantes en RapK se muestran en la Figura 28.

Aislamiento de pSGsetrapK

El plásmido pUCrapK se digirió con NdeI y XbaI y los fragmentos de inserto se aislaron y se ligaron en un pSGset1 digerido de forma idéntica. La ligación se empleó para transformar *E. coli* DH10B empleando procedimientos estándar y se analizaron los transformantes. El plásmido pSGsetrapK se aisló y se verificó la construcción empleando digestiones de restricción y análisis de secuencia.

25 Ejemplo 4

Identificación de 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina (prerapamicina, Figura 6)

Se obtuvo la 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina (prerapamicina) mediante la conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus*, como se describe en el Ejemplo 1, con pSGsetrapK y el aislamiento de los productos generados en la fermentación. Esto demuestra que es posible complementar la delección de rapK en la cepa MG2-10 y que, si la cepa se alimenta con ácido pipecólico, se produce prerapamicina, un análogo que carece de las modificaciones post-PKS.

35 El plásmido pSGsetrapK se conjugó en *S. hygroscopicus* MG2-10, y la cepa se cultivó en TSBGM suplementado con 2 mg/l de ácido pipecólico a 25°C, con agitación. Se extrajeron las células con metanol y el sobrenadante de cultivo se extrajo con acetato de etilo, como se describió con anterioridad.

40 El análisis del sobrenadante de cultivo del mutante MG2-10 de *S. hygroscopicus* (pSGsetrapK) alimentado con ácido pipecólico mediante HPLC con detección W a 280 nm reveló la presencia de dos picos nuevos principales con tiempos de retención de 4,0 y 5,1 minutos. La espectroscopia de masas por electrospray de estos picos mostró que ambos contenían iones correspondientes a un compuesto con una masa molar de 841,5. Ninguno de estos picos se observó en las extracciones del cultivo de *S. hygroscopicus*, cepa NRRL 5491, o de la cepa MG2-10 mutante sin el plásmido pSGsetrapK de expresión de rapK. El análisis MS/MS del ion con m/z de 846 (correspondiente al aducto 45 de sodio de la prerapamicina) mostró que se fragmentaba en un ion con m/z de 735, correspondiente a la pérdida de m/z 129 (ácido pipecólico), o un ion con m/z de 556, correspondiente a la pérdida de m/z 308 (C28-C42 de la prerapamicina). Este ion, a su vez, se fragmentaba más aun a un ion con m/z 306, correspondiente a la pérdida de m/z 250 (C14-C27 de la prerapamicina). Este patrón de fragmentación era idéntico al patrón observado para la rapamicina, pero con la segunda pérdida de m/z (-308) reducida en 14, correspondiente a la ausencia del grupo O-metilo C39, 50 la tercera pérdida de m/z (-250) reducida en 44, correspondiente a la ausencia de los grupos metoxi C27 y O-metilo C16, y con un ion final (306) con m/z reducida en 14, en correspondencia con la ausencia del grupo cetona C9. Esto era evidencia de que el compuesto con masa molar 841,5 representa a la 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina (prerapamicina).

55 Ejemplo 5

Preparación de los casetes génicos para la expresión en *S. hygroscopicus* MG2-10

60 Los casetes génicos capaces de dirigir la expresión de una variedad de genes modificadores de rapamicina y combinaciones de genes modificadores se construyeron como se describe a continuación.

Clonaje de rapN/O

65 Los genes contiguos rapN y rapO, designados a partir de ahora como rapN/O se amplificaron mediante PCR, empleando los cebadores BIOSG2 5'-GGGCATATGTCGACGACCGATCAGGGTGAGACCGGAAAGGCCTG-3' (SEC ID NO: 39) y BIOSG3 5'-GGGGTCTAGAGGTACGTCCCTGGGGTTCGAGAAGCTCGCCGGTCTCCTT-3' (SEC ID NO: 40), que introducen un sitio de NdeI en el extremo 5' y un sitio de XbaI en el extremo 3' de rapN/O. Se

ES 2 296 063 T3

empleó el plásmido pR19 (Schwecke *et al.*, 1995) como molde. Luego del tratamiento con la T4 polinucleótido quinasa empleando técnicas estándar, se ligó el producto del PCR en pUC18 cortado con SmaI y se empleó para transformar *E. coli* DH10B. La secuencia de ADN de rapN/O en el plásmido pUCrapN/O aislado se verificó mediante análisis de secuencia. Las diferencias en la secuencia de ADN en comparación con la secuencia publicada (acc. no. X86780) se muestran en la Fig 21. Los cambios resultantes en RapN se muestran en la Fig 22.

Clonaje de rapM

El gen rapM se amplificó mediante PCR empleando los cebadores BIOSG4 5'-GGGCATATGATCCAACCGA CGTCGTACCGCCTTCACAGCGG-3' (SEC ID NO: 41) y BIOSG5 5'-GGGGTCTAGAGGTACACCGCGAC GGCGATCTGGTCCGATAGG-3' (SEC ID NO: 42), que introducen un sitio para NdeI en el extremo 5' y un sitio para XbaI en el extremo 3' de rapM. El plásmido pR19 (Schwecke *et al.*, 1995) se empleó como molde. Luego del tratamiento con la T4 polinucleótido quinasa empleando técnicas estándar, se ligó el producto del PCR en pUC18 cortado con SmaI y se empleó para transformar *E. coli* DH10B. La secuencia de ADN de rapM en el plásmido pUCrapM aislado se verificó mediante análisis de secuencia. Las diferencias en la secuencia de ADN en comparación con la secuencia publicada (acc. no. X86780) se muestran en la Fig 23. Los cambios resultantes en RapM se muestran en la Fig 24.

Clonaje de rapL

El gen rapL se amplificó mediante PCR empleando los cebadores BIOSG6 5'-GGGCATATGCAGACCA AGGTTCTGTGCCAGCGTGACATCAAG-3' (SEC ID NO: 43) y BIOSG7 5'-GGGGTCTAGAGGTACTACAG CGAGTACGGATCGAGGACGTCCTCGGGCG-3' (SEC ID NO: 44), que introducen un sitio para NdeI en el extremo 5' y un sitio para XbaI en el extremo 3' de rapL. El plásmido pR19 (Schwecke *et al.*, 1995) se empleó como molde. Luego del tratamiento con la T4 polinucleótido quinasa empleando técnicas estándar, se ligó el producto del PCR en pUC18 cortado con SmaI y se empleó para transformar *E. coli* DH10B. La secuencia de ADN de rapL en el plásmido pUCrapL aislado se verificó mediante análisis de secuencia. Las diferencias en la secuencia de ADN en comparación con la secuencia publicada (acc. no. X86780) se muestran en la Fig 25. Los cambios resultantes en RapL se muestran en la Fig 26.

Clonaje de rapL_{his}

El gen rapL se amplificó mediante PCR empleando los cebadores BIOSG6 5'-GGGCATATGCAGACCA AGGTTCTGTGCCAGCGTGACATCAAG-3' (SEC ID NO: 43) y BIOSG45 5'-GGAGATCTCAGCGAGTACGGAT CGAGGACGTCCTCGGGCG-3' (SEC ID NO: 45), que introducen un sitio para NdeI en el extremo 5' y un sitio BglIII en el extremo 3' de rapL. El plásmido pR19 (Schwecke *et al.*, 1995) se empleó como molde. Luego del tratamiento con la T4 polinucleótido quinasa empleando técnicas estándar, se ligó el producto del PCR en pUC18 cortado con SmaI y se empleó para transformar *E. coli* DH10B. La secuencia de ADN de rapL en el plásmido pUCrapL_{his} aislado se verificó mediante análisis de secuencia.

Clonaje de rapK

El gen rapK se amplificó mediante PCR empleando los cebadores BIOSG85'-GGGCATATGAGGCAATTGA CTCCGCCGGTCACGGCACCGTACTGCC-3' (SEC ID NO: 37) y BIOSG9 5'-GGGGTCTAGAGGTACGCCAC CACACCCTCGATCTCGACC-3' (SEQ ID NO: 38), que introducen un sitio para NdeI en el extremo 5' y un sitio para XbaI en el extremo 3' de rapK. El plásmido pR19 (Schwecke *et al.*, 1995) se empleó como molde. Luego del tratamiento con la T4 polinucleótido quinasa empleando técnicas estándar, se ligó el producto del PCR en pUC18 cortado con SmaI y se empleó para transformar *E. coli* DH10B. La secuencia de ADN de rapK en el plásmido pUCrapK aislado se verificó mediante análisis de secuencia. Las diferencias en la secuencia de ADN en comparación con la secuencia publicada (acc. no. X86780) se muestran en la Fig 27. Los cambios resultantes en RapK se muestran en la Fig 28.

Aislamiento de pSGsetrapN/O, pSGsetrapM, pSGsetrapQ, pSGsetrapI, pSGsetrapK, y pSGsetrapL

Los plásmidos pUCrapN/O, pUCrapJ, pUCrapM, pUCrapI, pUCrapL, pUCrapK y pAHL42 se digirieron con NdeI y XbaI y los fragmentos insertados, con intervalos de tamaño desde aproximadamente 1,3 kb hasta 0,7 kb, se amplificaron y ligaron en pSGset1 cortados de forma idéntica. Se emplearon los ligados para transformar *E. coli* DH10B empleando procedimientos estándar y se analizaron los transformantes. Los plásmidos pSGsetrapN/O, pSGsetrapM, pSGsetrapQ, pSGsetrapI, pSGsetrapK, y pSGsetrapL se aislaron y se verificaron las construcciones empleando digestiones de restricción y análisis de secuencia.

Clonaje de rapJ

El gen rapJ se amplificó mediante PCR empleando los cebadores BIOSG10 5'-GGGCATATGAGCACCGA AGCTCAGCAAGAGAGCACGCCACCGCACGCT-3' (SEC ID NO: 46) y BIOSG11 5'-GGGGTCTAGAGGT CACTCCGCTCCCCAGGTGACCCGGAGCTGGC-3' (SEC ID NO: 47), que introducen un sitio para NdeI en el extremo 5' y un sitio para XbaI en el extremo 3' de rapJ. El plásmido pR19 (Schwecke *et al.*, 1995) se empleó como molde. Luego del tratamiento con la T4 polinucleótido quinasa empleando técnicas estándar, se ligó el producto del

ES 2 296 063 T3

PCR en pUC18 cortado con SmaI y se empleó para transformar *E. coli* DH10B. La secuencia de ADN de rapJ en el plásmido pUCrapJ aislado se verificó mediante análisis de secuencia. Las diferencias en la secuencia de ADN en comparación con la secuencia publicada (acc. no. X86780) se muestran en la Fig 29. Los cambios resultantes en RapJ se muestran en la Fig 30.

5

Clonaje de rapI

El gen rapI se amplificó mediante PCR empleando los cebadores BIOSG12 5'-GGGCATATGAGCGCG TCCGTGCAGACCATCAAGCTGCC-3' (SEC ID NO: 48) y BIOSG13 5'-GGGGTAGAGGTCAGGCCTC-3' (SEC ID NO: 49), que introducen un sitio para NdeI en el extremo 5' y un sitio para XbaI en el extremo 3' de rapI. El plásmido pAHL2 (gentilmente proporcionado por Huai-Lo-Lee) se obtiene a partir de pUC18, conteniendo el gen rapI y se empleó como molde. Luego del tratamiento con la T4 polinucleótido quinasa empleando técnicas estándar, se ligó el producto del PCR en pUC18 cortado con SmaI y se empleó para transformar *E. coli* DH10B. La secuencia de ADN de rapI en el plásmido pUCrapI aislado se verificó mediante análisis de secuencia. Las diferencias en la secuencia de ADN en comparación con la secuencia publicada (acc. no. X86780) se muestran en la Fig 31. Los cambios resultantes en RapI se muestran en la Fig 32.

10

15

Clonaje de rapQ

El gen rapQ se amplificó mediante PCR empleando los cebadores AHL21 5'-CATATGTTGGAATTGGGTA CCCGCCTG-3' (SEC ID NO: 50) y AHL22 5'-TCTAGACGCTCACGCCCTCCAGGGTG-3' (SEC ID NO: 51), que introducen un sitio para NdeI en el extremo 5' y un sitio para XbaI en el extremo 3' de rapQ. El plásmido pR19 (Schwecke *et al.*, 1995) se empleó como molde. Luego del tratamiento con la T4 polinucleótido quinasa empleando técnicas estándar, se ligó el producto del PCR en pUC18 cortado con SmaI y se empleó para transformar *E. coli* DH10B. La secuencia de ADN de rapQ en el plásmido pAHL42 aislado se verificó mediante análisis de secuencia. Las diferencias en la secuencia de ADN en comparación con la secuencia publicada (acc. no. X86780) se muestran en la Fig 33. Los cambios resultantes en RapQ se muestran en la Fig 34.

20

25

Aislamiento de pUC18eryBVcas

30

El gen rapQ se amplificó mediante PCR empleando los cebadores casOleG21 (WO01/79520) y 7966 5'-GGGG AATTCAAGATCTGGTCTAGAGGTAGCCGGCGTGGCGCGCTGAGTTCCAGTCGCAGATCT-3' (SEC ID NO: 52) y pSG142 (Gaisser *et al.*, 2000) como molde. El fragmento de PCR se clonó empleando técnicas estándar, y el plásmido pUC18eryBVcas se aisló con un sitio para NdeI sobreelapado con el codón de inicio de eryBV y sendos sitios para XbaI y BglII luego del codón de parada. La construcción se verificó mediante análisis de secuencia.

35

Aislamiento del vector pSGLit1

40

45

50

El gen eryBV se amplificó mediante PCR empleando los cebadores BIOSG1 5'-GGGTCTAGATCCGGACGA ACGCATCGATTAATTAAAGGAGGACACATA-3' (SEC ID NO: 53) y 7966 5'-GGGAATTCAAGATCTGGTCTA-GAGGTAGCCGGCGTGGCGCGCTGAGTTCCAGTCGCAGATCT-3' (SEC ID NO: 52), que introducen un sitio para XbaI sensible a la mutilación Dam en el extremo 5' y sendos sitios para XbaI y BglII en el extremo 3' de eryBV. El plásmido pUC18eryBVcas se empleó como molde. Luego del tratamiento con la T4 polinucleótido quinasa empleando técnicas estándar, se ligó el producto del PCR en pUC18 cortado con SmaI y se empleó para transformar *E. coli* DH10B. La construcción se digirió luego con BamHI/BglII y se aisló una banda de ADN de aproximadamente 1,3 kb a partir de un gel de azarosa seguido por la ligación con el ADN del vector Litmus28 digerido con BamHI/BglII empleando procedimientos estándar. Se aisló el vector pSGLit1 y la secuencia de ADN del inserto se verificó mediante análisis de secuencia.

Aislamiento de pSGsetrapN/O, pSGsetrapM, pSGsetrapQ, pSGsetrapI, pSGsetrapK, y pSGsetrapL

Los plásmidos pUCrapN/O, pUCrapJ, pUCrapM, pUCrapI, pUCrapL, pUCrapK y pAHL42 se digirieron con NdeI y XbaI y los fragmentos insertados, con intervalos de tamaño desde aproximadamente 1,3 kb hasta 0,7 kb, se amplificaron y ligaron en pSGset1 cortados de forma idéntica. Se emplearon los ligados para transformar *E. coli* DH10B empleando procedimientos estándar y se analizaron los transformantes. Los plásmidos pSGsetrapN/O, pSGsetrapM, pSGsetrapQ, pSGsetrapI, pSGsetrapK, y pSGsetrapL se aislaron y se verificaron las construcciones empleando digestiones de restricción y análisis de secuencia.

60

Aislamiento de pSGLitrapN/O, pSGLitrapM, pSGLitrapQ, pSGLitrapI, pSGLitrapK, pSGLitrapL y pSGUtrapL_{his}

Los plásmidos pSGLitrapN/O, pSGLitrapM, pSGLitrapQ, pSGLitrapI, pSGLitrapK, pSGLitrapL y pSGUtrapL_{his} se digirieron empleando las enzimas de restricción NdeI/BglII y las bandas en el intervalo desde aproximadamente 0,7 a 1,3 kb se aislaron luego de la ligación con pSGLit1 digerido con NdeI/BglII. Las ligaciones se emplearon para transformar *E. coli* ET12567 y se analizaron los transformantes. Se aislaron los plásmidos pSGLitrapN/O, pSGLitrapM, pSGLitrapQ, pSGLitrapI, pSGLitrapK, pSGLitrapL y pSGUtrapL_{his}.

ES 2 296 063 T3

Aislamiento de pSGsetrapKI, pSGsetrapKM, pSGsetrapKN/O, pSGsetrapKL, pSGsetrapKQ, y pSGsetrapKJ

Los plásmidos pSGLtrapN/O, pSGLtrapJ, pSGLtrapM, pSGUtrapQ, pSGLtrapI, pSGLtrapL se digirieron con XbaI y los fragmentos, en el intervalo entre aproximadamente 0,8 y 1,3 kb se aislaron y luego se ligaron con pSGsetrapK digerido con XbaI y tratado con fosfatasa alcalina empleando técnicas estándar de biología molecular. Las ligaciones se emplearon para transformar *E. coli* DH10B y se analizaron los transformantes. Los plásmidos pSGsetrapKI, pSGsetrapKM, pSGsetrapKN/O, pSGsetrapKL, pSGsetrapKQ, y pSGrapKJ se aislaron y se verificó la orientación del inserto mediante el análisis de digestión de restricción. Para la adición de rapL_{his} estas construcciones fueron digeridas con BglII/XbaI seguido por digestión parcial con BglII según fuese apropiado y los fragmentos del vector aislados se ligaron con el fragmento de ~1 kb de XbaI/BglII de pSGLtrapL_{his}.

Aislamiento de los plásmidos pSGsetrapKIJ, pSGsetrapKIM y pSGsetrapKIQ

Los plásmidos pSGLtrapJ, pSGLtrapM, and pSGLtrapQ se digirieron empleando XbaI y los fragmentos, en el intervalo entre aproximadamente 0,8 y 1,3 kb se aislaron seguido de ligaciones con pSGsetrapKI digerido con XbaI y tratado con fosfatasa alcalina usando técnicas estándar de biología molecular. Las ligaciones se emplearon para transformar *E. coli* DH10B y se analizaron los transformantes. Se aislaron los plásmidos pSGsetrapKIJ, pSGsetrapKIM, y pSGrapKIQ y se verificó la orientación del inserto por medio de análisis de digestión de restricción. Para la adición de rapL_{his} estas construcciones fueron digeridas con BglII/XbaI seguido por digestión parcial con BglII cuando fuese apropiado, y los fragmentos del vector aislados se ligaron con los fragmentos de ~1 kb de XbaI/BglII de pSGLtrapL_{his}.

Aislamiento de los plásmidos pSGsetrapKN/OI, pSGsetrapKN/OQ, pSGsetrapKN/OM and pSGsetrapKN/OJ

Los plásmidos pSGLtrapI, pSGLtrapM, pSGLtrapJ, and pSGLtrapQ se digirieron empleando XbaI y los fragmentos, en el intervalo entre aproximadamente 0,8 y 1,3 kb se aislaron seguido de ligaciones con pSGsetrapKN/O digerido con XbaI y tratado con fosfatasa alcalina usando técnicas estándar de biología molecular. Las ligaciones se emplearon para transformar *E. coli* DH10B y se analizaron los transformantes. Se aislaron los plásmidos pSGsetrapKN/OI, pSGsetrapKN/OQ, pSGsetrapKN/OM y pSGrapKN/OJ y se verificó la orientación del inserto por medio de análisis de digestión de restricción. Para la adición de rapL_{his} estas construcciones fueron digeridas con BglII/XbaI seguido por digestión parcial con BglII cuando fuese apropiado, y los fragmentos del vector aislados se ligaron con los fragmentos de ~1 kb de XbaI/BglII de pSGLtrapL_{his}.

Aislamiento de los plásmidos pSGsetrapKJM and pSGsetrapKJQ

Los plásmidos pSGLtrapM and pSGLtrapQ se digirieron empleando XbaI y los fragmentos, en el intervalo entre aproximadamente 0,8 y 1,1 kb se aislaron seguido de ligación con pSGsetrapKJ digerido con XbaI y tratado con fosfatasa alcalina usando técnicas estándar de biología molecular. Las ligaciones se emplearon para transformar *E. coli* DH10B y se analizaron los transformantes. Se aislaron los plásmidos pSGsetrapKJM y pSGrapKJQ y se verificó la orientación del inserto por medio de análisis de digestión de restricción. Para la adición de rapL_{his} estas construcciones fueron digeridas con BglII/XbaI seguido por digestión parcial con BglII cuando fuese apropiado, y los fragmentos del vector aislados se ligaron con los fragmentos de ~1 kb de XbaI/BglII de pSGLtrapL_{his}.

Empleando la misma estrategia delineada con anterioridad, se aislaron los siguientes casetes génicos:

45	pSGsetrapKIJM	pSGsetrapKN/OJI	pSGsetrapKIQN/OM
	pSGsetrapKIJQ	pSGsetrapKJMN/O	pSGsetrapKJMN/OQ
	pSGsetrapKIJN/O	pSGsetrapKJQN/O	pSGsetrapKIJN/OMQ
	pSGsetrapKIMN/O	pSGsetrapKIJN/OM	pSGsetrapN/OQ
50	pSGsetrapKIQN/O	pSGsetrapKIJN/OQ	pSGsetrapKIJMN/OQ
	pSGsetrapKN/OMQ	pSGsetrapKIMN/OQ	

Se presenta un resumen en la Figura 5.

55 Para la adición de rapL_{his} estas construcciones de casetes fueron digeridas bien con BglII/XbaI, o bien con XbaI, seguido de digestión parcial con BglII según fuese apropiado y los fragmentos aislados del vector se ligaron con el fragmento de aproximadamente 1 kb de XbaI/BglII de pSGLtrapL_{his}.

60 Ejemplo 6

Aislamiento de 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina (prerapamicina, Figura 6)

65 La 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina (prerapamicina) se obtuvo por medio de la conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* con pSGsetrapKL y el aislamiento de los productos generados como se describe más adelante. Esto demuestra que es posible complementar la delección de rapK y rapL en la cepa MG2-10 y que se produce prerapamicina, un análogo que carece de la modificación post-PKS. La adición de ácido

ES 2 296 063 T3

pipecólico no se requiere cuando se complementa con rapL, lo que confirma que rapL desempeña un papel en la proporción del ácido pipecólico en la producción de la rapamicina.

5 *S. hygroscopicus* MG2-10 (pSGsetrapKL) se cultivó a partir de una masa de esporas de trabajo congelada en criopreservación (20% glicerol, 10% lactosa w/v en agua destilada) en medio 1 (ver Materiales y Métodos), agitada a 250 rpm con un agitador de dos pulgadas a 30°C, durante dos días. El precultivo primario se empleó para inocular dos precultivos secundarios de medio 2 (ver materiales y Métodos) y el medio 3, a 10% v/v, que se agitó a 300 rpm con un agitador de una pulgada, a 25°C, durante otras 24 horas. Cuatro litros de medio 4 (ver Materiales y Métodos) y medio 5 (ver Materiales y Métodos) se prepararon, conteniendo 0,01% v/v de antiespumante Pluronic L101 (BASF). El medio

10 4 de producción se inoculó con el precultivo secundario en el medio 2 y se inoculó el medio 5 de producción con el precultivo secundario en medio 3 a 10% v/v y se permitió fermentar en un biorreactor de 7L con agitación durante cinco a siete días a 25°C. Se ajustó el flujo de aire a 0,75 vvm y la velocidad de la punta del impelente se controló entre 0,98 ms⁻¹ y 2,67 ms⁻¹. Se añadió más Pluronic L101 a demanda.

15 Para confirmar la estructura de la 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicin (prerapamicin), se trajeron sobrenadantes del medio 4 y el medio 5 con acetato de etilo y se redujo a un extracto crudo mediante evaporación. Los extractos se desgrasaron en una partición de hexano:metanol:agua y se aplicaron a un cartucho de 70 g de sílica, comenzando con hexano y terminando con acetona. Las fracciones de prerapamicina de cada fermentación se recogieron y se aplicaron a un cartucho de C18 comenzando con agua y terminando con metanol. Se aisló la prerapamicina (8,5 mg) luego de cromatografía en Sephadex LH₂₀ empleando heptano:cloroformo:etanol como fase móvil. Este compuesto se analizó y la estructura fue totalmente confirmada por medio de RMN (Figuras 18-20). Los datos de RMN ¹H y ¹³C se presentan en la Tabla V a continuación.

25

(Tabla pasa a página siguiente)

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 296 063 T3

TABLA V
Datos de RMN 1H y ^{13}C para la prerapamicina

	Posición	δ_H	multiplicidad	acoplamiento	δ_C
5	1				171,8
	2	5,49			52,7
	3a	1,76			25,9
10	4a	2,21			
	4b	1,21			20,9
	5a	1,75			
	5b	1,47			25,0
	6a	3,27			45,1
15	6b	3,87	br.d	12,8	
	8				171,6
	9a	2,46	d	12,8	41,4
	9b	3,23	d	12,8	
20	10				98,9
	11	1,60			38,1
	12a	1,52			27,6
	12b	1,65 ^t			
25	13a	1,38			31,6
	13b	1,53			
	14	4,00			71,5
	15a	1,48			40,6
30	15b	1,70			
	16	3,95	br.d	8,1	75,5
	17				139,2
	18	6,39			122,6
	19	6,33			128,1
35	20	6,17	dd	14,3; 10,7	131,4
	21	6,04			130,9
	22	5,26			138,1
	23	2,21			37,2
40	24a	1,26			39,8
	24b	1,64			
	25	2,30			45,8
	26				215,3
45	27a	2,42	dd	15,1; 4,7	44,8
	27b	2,89	dd	15,1; 5,8	
	28	4,32	dd	5,5; 4,9	71,4
	29				138,6
	30	5,26			123,7
50	31	3,20			45,5
	32				208,2
	33a	2,58	dd	18,1; 9,6	
	34	5,18			76,0
55	35	1,72			31,9
	36a	1,00			37,3
	36b	1,07			
	37	1,30			33,1
60	38 ^a Ax.	0,62	ddd	11,9; 11,9; 11,9	38,2
	38b	Eq.	1,83		
	39	3,24			74,9
	40	3,25			75,9
	41a	1,28			31,5
65	41b	1,94			
	42a	0,98			32,2
	42b	1,61			

ES 2 296 063 T3

43	0,98	d	6,6	16,5
44	1,61	s		14,1
45	1,04	d	6,8	21,3
46	0,95	d	6,8	21,3
47	1,66	d	0,9	14,1
48	0,99	d	6,8	17,4
49	0,89	d	6,6	17,4

¹⁰ Asignación tentativa

Ejemplo 7

15 Aislamiento de la 8-deoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina (preprolilrapamicina, Figura 7)

El suministro de ácido de prolina a *S. hygroscopicus* MG2-10 (pSEGrapK) dio como resultado la producción de preprolilrapamicina, como se describe más adelante. Esto demostró que, en ausencia de rapL, se incorporan análogos alternativos del ácido pipecólico.

S. hygroscopicus MG2-10 (pSGsetrapK) se cultivó en TSBGM suplementado con prolina a 1 mg/l a 25°C con agitación. Se extrajeron las células con metanol, y el sobrenadante del cultivo se extrajo con acetato de etilo, como se describió con anterioridad.

El análisis del sobrenadante del cultivo del mutante MG2-10 (pSGsetrapK) de *S. hygroscopicus* suplementado con prolina, mediante HPLC con detección UV a 280 nm mostró la presencia de dos nuevos picos importantes con tiempos de retención de 4,5 y 4,6 minutos. La espectroscopia de masas mediante electrospray de estoscópicos reveló que ambos contenían iones correspondientes a un compuesto con masa molar de 827,5. Ninguno de estos picos se apreció en el cultivo de *S. hygroscopicus* NRRL 5491, *S. hygroscopicus* MG1C o *S. hygroscopicus* MG2-10 sin el plásmido de expresión de rapK pSGsetrapK. El análisis MS/MS del ion con m/z de 850 (correspondiente al aducto de sodio de la preprolilrapamicina) mostró que se fragmentaba en un ion con m/z de 735, correspondiente a la pérdida de m/z 115 (prolina), o un ion con m/z de 542, correspondiente a la pérdida de m/z 308 (C27-C41 de la preprolilrapamicina). Este ion, a su vez, se fragmentó más aun para dar origen a un ion con m/z 292, correspondiente a la pérdida de m/z 250 (C13-C26 de la preprolilrapamicina). Este patrón de fragmentación era idéntico al patrón observado para la rapamicina, pero con la primera pérdida de m/z (-115) reducida en 14, correspondiente a la ausencia del grupo O-metilo C38, la tercera pérdida de m/z (-250) reducida en 44, en correspondencia con la ausencia de los grupos metoxi C26 y O-metilo C15 y el ion final (306) con la masa reducida en 14, en correspondencia con la ausencia del grupo cetona C8, y el cambio del ácido pipecólico por prolina. Esto indicaba que el compuesto con masa molar de 827,5 representa a la 8-deoxo-15-Odesmetil-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina (preprolilrapamicina).

Ejemplo 8

45 Aislamiento de la 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina (39-dehidroxi prerapamicina, Figura 8)

La suplementación de *S. hygroscopicus* MG2-10 (pSGsetrapK) con ácido pipecólico y ácido ciclohexano carboxílico dio como resultado la producción de dos compuestos principales, la prerapamicina, que corresponde a la incorporación de la unidad de partida natural y la 39-dehidroxi prerapamicina, que corresponde a la incorporación de la unidad de partida suplementada.

S. hygroscopicus MG2-10 (pSGsetrapK) se cultivó en TSBGM, suplementado con ácido pipecólico a 2 mg/l y 1 mM de ácido ciclohexano carboxílico a 25°C con agitación. El sobrenadante de cultivo se extrajo con acetato de etilo como se describió con anterioridad.

El análisis del sobrenadante de cultivo del mutante MG2-10 (pSGsetrapK) de *S. hygroscopicus* suplementado con ácido ciclohexano carboxílico, mediante HPLC con detección UV a 280 nm mostró la presencia de un nuevo pico principal, con un tiempo de retención de 5,8 minutos. La espectroscopia de masas de electrospray de este pico mostró que contenía iones correspondientes a un compuesto con una masa molar de 825,5. Este pico no se observó en los cultivos de *S. hygroscopicus* NRRL 5491, *S. hygroscopicus* MG1C o *S. hygroscopicus* MG2-10 sin el plásmido de expresión de rapK pSGsetrapK. El análisis MS/MS del ion con m/z de 848 (correspondiente al aducto de sodio de la 39-dehidroxi prerapamicina) demostró que se fragmentaba en un ion con m/z de 719, correspondiente a la pérdida de m/z 129 (ácido pipecólico), o un ion con m/z de 556, correspondiente a la pérdida de m/z 292 (C28-C42 de la 39-dehidroxi prerapamicina). Este ion, a su vez, se fragmentaba en un ion con m/z 306, correspondiente a la pérdida de m/z 250 (C14 a C27 de la 39-deshidroxi prerapamicina). Este patrón de fragmentación era idéntico al patrón observado para la prerapamicina, pero con la segunda pérdida de m/z (-292) reducida en 16, en correspondencia con la ausencia del grupo hidroxilo C39. Esto era evidencia de que el compuesto con masa molar 825,5 representa a la 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina (39-dehidroxi-prerapamicina).

ES 2 296 063 T3

Ejemplo 9

Aislamiento de la 16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina (Figura 9)

5 La cepa MG2-10 (pSGsetrapK) de *S. hygroscopicus* se conjugó con pSGsetrapKIJ, como se describió en el Ejemplo 1. La suplementación de esta cepa con ácido pipecólico y el aislamiento de los productos generados por la fermentación dieron como resultado la producción de 16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina.

10 El plásmido pSGsetrapKIJ (Figura 5) se conjugó en *S. hygroscopicus* MG2-10 y la cepa se cultivó en TSB GM 10 supplementado con 2 mg/l de ácido pipecólico a 25°C con agitación. Se extrajeron las células con metanol y se extrajo el sobrenadante del cultivo con acetato de etilo, como se describió con anterioridad.

15 El análisis del extracto del mutante MG2-10 (pSGsetrapK) de *S. hygroscopicus* mediante espectroscopia de masas de electrospray mostró un pico principal que contenía iones correspondientes a un compuesto con un compuesto de una masa molar de 869. Este pico no se observó en los cultivos de *S. hygroscopicus* NRRL 5491, *S. hygroscopicus* MG1C o *S. hygroscopicus* MG2-10 sin el plásmido de expresión de rapK pSGsetrapK. El análisis MS/MS del ion con m/z de 892 (correspondiente al aducto de sodio de la 16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina) demostró que se fragmentaba en un ion con m/z de 763, correspondiente a la pérdida de m/z 129 (ácido pipecólico), o un ion con m/z de 332, (C28-C42 de la 16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina). Este ion, a su vez, se fragmentaba en un ion con m/z 320, correspondiente a la pérdida de m/z 250 (C14 a C27 de la 16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina). Este patrón de fragmentación era idéntico al patrón observado para la prerapamicina, pero con la tercera pérdida de m/z (-250) reducida en 44, en correspondencia con la ausencia de los grupos metilo C16 y metoxi C27. Esto era evidencia de que el compuesto con masa molar 869 era la 16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina.

20 25 Ejemplo 10

Suplementación de una batería de compuestos

30 *S. hygroscopicus* MG2-10 (pSGsetrapK) se empleó para la suplementación de una batería de compuestos. Los cultivos vegetativos primarios se prepararon mediante la inoculación de medio con el surtido de esporas, como se describe en los Materiales y Métodos. El medio TSB GM se inoculó al 10% v/v empleando los métodos que se describen en la sección de materiales y métodos. Se añadieron los compuestos siguientes como se indica en la Tabla VI, a continuación:

35

TABLA VI

	Ácido ciclohexano carboxílico (1 mM)	Ácido ciclohex-1-eno carboxílico (1 nM)	Ácido cicloheptano carboxílico (1 mM)
L-lisina (25,3 mM)	X	X	X
L-prolina (44,7 mM)	X	X	X
Ácido DL-pipecolínico (39,8 mM)	X	X	X
Trans-4-hidroxi prolina (13 mM)	X	X	X
Cis-4-hidroxi prolina (0,2 mM)	X	X	X

40 45 50 Los cultivos se incubaron, se extrajeron y se midieron empleando técnicas descritas en la sección de Materiales y Métodos. La Tabla VII muestra los resultados del análisis que muestra el ion (m/z) observado para cada combinación de ácido carboxílico y aminoácido de partida.

TABLA VII

55

	Ácido ciclohexano carboxílico	Ácido ciclohex-1-eno carboxílico	Ácido cicloheptano carboxílico
L-lisina	848,5	848,5	862,4
L-prolina	834,5	834,5	848,5
Ácido DL-pipecolínico	848,5	848,5	862,4
Trans-4-hidroxi prolina	850,5	850,5	864,5
Cis-4-hidroxi prolina	850,5	n.a.	864,5

60 65

Estos datos demuestran la incorporación de los compuestos suplementados.

Ejemplo 11

Complementación de S. hygroscopicus MG2-10 con fkbO

5 Para evaluar si los genes homólogos a rapK, tales como fkbO en *S. hygroscopicus* var. *ascomyceticus* y *S. tsukubaensis*, y la orf5 del cluster “hyg” parcialmente secuenciado (Ruan *et al.*, 1997) cumplen funciones similares, se llevaron a cabo ensayos de complementación empleando fkbO como se describe a continuación.

Aislamiento de pMG169-1

10 El gen fkbO de *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891), productora de FK520, se amplificó mediante PCR empleando los cebadores fkbof 5'-GGGCATATGACCGATGCCGGACGCCA 3' (SEC ID NO: 54) y fkbor 5' GGGGTCTAGATCACGCCACCATGCCTTCGA 3' (SEC ID NO: 55), que introducen un sitio para NdeI en el extremo 5' y un sitio para XbaI en el extremo 3' de fkbO. El ADN genómico aislado a partir de *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) se empleó como molde. El producto de PCR amplificado se sometió a 15 digestión con NdeI y XbaI y se ligó con pSGsetI cortado con NdeI-XbaI. Se empleó el producto ligado para transformar *E. coli* DH10B y los transformantes se analizaron empleando métodos descritos en la sección de Materiales y Métodos. Se aisló el plásmido pMG169-1 y se verificó la digestión de restricción y se transformó *S. hygroscopicus* MG2-10 empleando los métodos descritos en la sección de Materiales y Métodos.

Complementación heteróloga de rapK mediante fkbO

20 Se cultivó *S. hygroscopicus* MG2-10 (pMG169-1) en TSBGM suplementado con 2 mg/l de ácido pipecólico a 25°C con agitación. Se extrajeron el sobrenadante del cultivo y las células, empleando los métodos descritos en la sección 25 de Materiales y Métodos (Método A). El análisis del extracto con detección UV a 280 nm mostró la presencia de dos nuevos picos principales con tiempos de retención de 4,5 y 4,6 minutos. La espectroscopia de masas de electrospray de estos picos mostró que ambos contenían iones con una masa molar de 827,5, correspondiente a los dos isómeros de la prerpamicina (Ejemplo 7).

30 Ejemplo 12

Producción eficiente de 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina (39-dehidroxi prerpamicina, Figure 8) en ausencia de competencia por la unidad de partida endógena, por medio de la suplementación a un mutante knockout de rapK

35 La capacidad de *S. hygroscopicus*, cepas MG2-10 y MG2-10 (pSGsetrapK) de incorporar una unidad de partida diferente, el ácido ciclohexano carboxílico se comparó como se describe más adelante. Cuando se le proporcionaba ácido ciclohexano carboxílico y ácido pipecólico, la MG2-10 producía solo un compuesto (39-dehidroxi prerpamicina), correspondiente a la incorporación de la unidad de partida suministrada, únicamente, mientras que MG2-10 (pSGsetrapK) producía dos compuestos en una proporción 1:1, la 39-dehidroxi prerpamicina y la prerpamicina. Esto demostró que se necesita rapK para la incorporación de la unidad de partida natural endógena, y que una cepa knockout para rapK no tenía competencia de la unidad de partida endógena con la unidad de partida natural.

40 *S. hygroscopicus* MG2-10 se cultivó en TSBGM suplementado con 2 mg/L de ácido pipecólico y 1 mM de ácido ciclohexano carboxílico a 25°C con agitación. El sobrenadante del cultivo se extrajo con acetato de etilo como se describió con anterioridad. El análisis de los extractos mediante HPLC con detección UV a 280 nm mostró la presencia 45 de un nuevo pico importante con un tiempo de retención de 5,8 min. Sin embargo, *S. hygroscopicus* MG2-10 (pSGsetrapK) (Ejemplo 4), produjo prerpamicina (Figura 6) además de 39-dehidroxi prerpamicina, en una proporción aproximada de 1:1, cuando se le suministró ácido ciclohexano carboxílico (Ejemplo 8, Figura 8). Resulta sorprendente 50 que la suplementación de *S. hygroscopicus* MG2-10 con ácido ciclohexano carboxílico dio como resultado un solo producto, la 39-dehidroxi prerpamicina. El iniciador endógeno, el ácido 4,5-dihidroxiciclohex-1-eno carboxílico no se incorporó en ausencia de rapK. Por tanto, no hubo competencia entre la incorporación del ácido carboxílico suministrado y el iniciador endógeno.

55 Ejemplo 13

Elucidación de la función de RapM

60 Se mantuvieron cultivos de *Streptomyces lividans* TK24, *S. lividans* TK24 (pSGsetrapM) y *S. lividans* TK24 (pSGsetrapQ) en TSBGM con agitación a 30°C y se suplementaron con 20 µg/ml de prerpamicina. Los controles no fueron suplementados. Luego de otros 5 días de incubación, se extrajeron los cultivos con acetato de etilo y se llevaron hasta sequedad. La reconstitución y el análisis mediante LC-MS identificaron que no había producción de análogos de rapamicina en los controles no suplementados. Se identificaron dos nuevos picos importantes en el extracto de *S. lividans* TK24 (pSGsetrapM) suplementado con prerpamicina, uno a 2,5 min y otro a 7,9 min. La espectroscopia de masas de 65 electrospray de estos picos mostró que ambos contenían iones correspondientes a un compuesto con una masa molar de 855,6, consistente con la 9-deoxo-16-O-metil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina (16-O-metil-prerpamicina). Por lo regular se observaron dos isómeros cuando se analizaron los extractos por LC-MS en ausencia de TFA. No se identificaron picos nuevos en los extractos de *S. lividans* TK24 o *S. lividans* TK24 (pSGsetrapQ). Fue evidente la

ES 2 296 063 T3

5 presencia de prerapamicina no modificada. RapM fue el responsable claro de la mutilación en el hidroxilo C16, RapQ no era específico para este sitio.

Ejemplo 14

5 *Elucidación de la función de RapJ*

10 Se mantuvieron cultivos de *Streptomyces lividans* TK24, *S. lividans* TK24 (pSGsetrapK), *S. lividans* TK24 (pSGsetrapJ) y *S. lividans* TK24 (pSGsetrapKJ) en TSBGM con agitación a 30°C y se suplementaron con 40 µg/ml de prerapamicina. Los controles no fueron suplementados. Luego de otros 5 días de incubación, se extrajeron los cultivos con acetato de etilo y se llevaron hasta sequedad. La reconstitución y el análisis mediante LC-MS identificaron que no había producción de análogos de rapamicina en los controles no suplementados. Se identificaron un nuevo pico importantes en el extracto de *S. lividans* TK24 (pSGsetrapM) suplementado con prerapamicina, a 4,9 min. La espectroscopia de masas de electrospray de este pico mostró que contenía iones correspondientes a un compuesto con una masa molar de 855,5, consistente con la 16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina (C9 oxoprerapamicina). No se identificaron picos nuevos en los extractos de *S. lividans* TK24 y *S. lividans* TK24 (pSGsetrapK) suplementados con prerapamicina. Fue evidente la presencia de prerapamicina no modificada.

20 Debido a la homología de RapJ con FkbD del cluster FK506 y el cluster FK520, se ha postulado que RapJ oxida a la prerapamicina en C9 a 9-hidroxi-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina (C9 OH-prerapamicina). Se ha postulado que RapK es responsable de la conversión posterior a cetona. Resulta sorprendente que, en presencia de RapJ, pero ausencia de RapK, se forme 16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina (C9 ceto-prerapamicina). RapJ posee una clara función oxidativa en C9, observándose una conversión completa de la cetona. RapK no posee una función oxidativa en C9.

25 Ejemplo 15

30 Se construyeron plásmidos que contenían las siguientes combinaciones de genes modificadores de la rapamicina, como se describe a continuación: pMG260 (rapI, rapJ, rapN, rapO, y rapL), pMG261 (rapI, rapJ, rapN, rapO, rapM y rapL), pMG262 (rapI, rapJ, rapN, rapO, rapM, rapQ y rapL) pMG236 (rapN, rapO, rapQ and rapL) y pMG238 (rapJ y rapL).

Aislamiento de los plásmidos pMG236 y pMG238

35 Se dirigieron los plásmidos pSGsetrapNOQ y pSGsetrapJ empleando BglIII/XbaI y se ligaron los fragmentos de vectores aislados con el fragmento XbaI/BglIII de 1 kb de pDGLtrapL_{his}. Se aislaron los plásmidos pMG236 (que expresaba rapN, rapO, rapQ y rapL) y pMG238 (que expresaba rapJ y rapL), respectivamente.

Aislamiento de los plásmidos pMG260, pMG261 y pMG262

40 Los plásmidos pSGSetrapKIJNOL, pSGSetrapKIJMNOL, y pSGSetrapKIJMNOQL se dirigieron empleando BglIII y los fragmentos de inserción aislados (que contienen el cluster de genes de la rapamicina desde el sitio BglIII en rapI hasta el sitio BglIII después de rapL) se ligaron con el fragmento del vector pSGSetrapI digerido con BglIII. Se aislaron los plásmidos pMG260 (que expresaba rapI, rapJ, rapN, rapO, y rapL), pMG261 (que expresaba rapI, rapJ, rapN, rapO, rapM y rapL), y pMG262 (que expresaba rapI, rapJ, rapN, rapO, rapM, rapQ y rapL).

Ejemplo 16

50 Se construyó un mutante de *S. hygroscopicus* (MG3) que portaba la delección cromosómica de rapK, como se describe más adelante. La complementación heteróloga de rapK con fkbO puede entonces llevarse a cabo como se describe y dará como resultado la restauración de la producción de rapamicina, lo que demuestra que fkbO es capaz de complementar la función de rapK en *S. hygroscopicus*.

*Aislamiento del mutante MG3 de *S. hygroscopicus* que porta la delección cromosómica de rapK*

55 Se emplearon los cebadores RAPKF1 5'-CAAAGCTTCCTGGCGCGGTTGGCCGGCA-3' (SEC ID NO: 56) y RAPKF2 5'-TGGCATGCCCTCCCCGCCGTTCCCTGGC-3' (SEC ID NO: 57) para amplificar la región de homología fuera del gen rapK (desde nt94403 hasta el nt95429 en el cluster de rapamicina descrito en Schwenke *et al.*, 1995) empleando ADN genómico preparado a partir de *S. hygroscopicus* NRRL5491 como molde. El producto de PCR de 1 kb se fosforiló empleando la T4 polinucleótido quinasa, y se ligó en pUC18 cortado con SmaI desfosforilado. Luego de la transformación en *E. coli* DH10B, se aisló el plásmido pMG233-7. Se emplearon los cebadores RAPKR1 5'-TGGCATGCCCTCCCCGCCGAGCTGACCTGGAA-3' (SEC ID NO: 58) y RAPKR2 5'-GTTCTAGAGCT TACCGCGTGATGTCGAACG-3' (SEC ID NO: 59) para amplificar la región derecha de homología fuera del gen rapK (desde nt96435 hasta el nt97428 en el cluster de rapamicina como está descrito por Schwenke *et al.*, 1995) empleando ADN genómico preparado a partir de *S. hygroscopicus* NRRL5491 como molde. El producto de PCR de 1 kb se fosforiló empleando T4 polinucleótido quinasa y se ligó en pUC18 cortado con SmaI y desfosforilado. Luego de la transformación en *E. coli* DH10B, se aisló el plásmido pMG257-7. Se verificaron ambos plásmidos en busca de la secuencia de análisis. El plásmido pMG233-7 se dirigió con SphI/XbaI y se aisló el fragmento de 3,7 kb, el pMG257-

7 se digirió con Sphi/XbaI y se aisló el fragmento de 1 kb. Estos fragmentos se ligaron y se emplearon para transformar *E. coli* DH10B. Se aisló el plásmido pMG268-12. Este plásmido se digirió con HindIII/XbaI y se aisló el fragmento de 2 kb y se ligó en pMG55 cortado con HindIII/XbaI y se empleó el ADN para transformar *E. coli* DH10B. Se aisló el plásmido pMG278-1 y se empleó para conjugar *S. hygroscopicus* MG1C.

5 Se aisló una colonia resistente a apramicina, y se cultivó durante 24 horas en TSBGM con agitación a 30°C y se dispersó en placas con agar y medio 1 que contenían 50 µg/l de estreptomicina. Se aislaron las colonias resistentes a estreptomicina y se mostró que eran sensibles a apramicina. Se pudo corroborar la mutación cromosómica en el nt1004 de rapK en el mutante MG3 mediante Southern blotting. Se presenta un resumen en la Figura 35.

10 Se cultivó *S. hygroscopicus* MG3 en TSBGM a 26°C con agitación. Se extrajeron tanto el sobrenadante del cultivo como las células empleando los métodos que se describen en la sección de Materiales y Métodos. El análisis del extracto con detección UV demostró que no se encontraba presente ningún pico con las características del trieno de rapamicina.

15 *Expresión de fkbO en el mutante MG3 de S. hygroscopicus que porta la delección cromosómica de rapK*

20 El plásmido pMG169-1 (descrito en el ejemplo 11) se transformó en el mutante MG3 de *S. hygroscopicus* empleando los métodos que se describen en la sección de Materiales y Métodos.

25 *Complementación heteróloga de rapK por fkbO*

25 *S. hygroscopicus* MG3pMG169-1 se cultivó en TSBGM a 26°C con agitación. Se extrajeron tanto el sobrenadante del cultivo como las células, empleando los métodos que se describen en la sección de Materiales y Métodos. El análisis del extracto con detección UV a 280 nm mostró la presencia de dos nuevos picos principales. La espectroscopía de masas de electrospray de estos picos demostró que los mismos contenían iones con una masa molar de 913, correspondiente a la rapamicina.

30 *Ejemplo 17*

35 *Aislamiento y complementación heteróloga del mutante MG4 de S. hygroscopicus var. ascomyceticus que porta la delección cromosómica de fkbO*

35 Se emplearon los cebadores FKOF1 5'-GCTCTAGAGCCCGCGCTGCCGGACACG-3' (SEC ID NO: 60) y FKOF2 5'-CCCTCTGCAGGCGTCCGGCATCGTCATCAG-3' (SEC ID NO: 61) para amplificar la región izquierda de homología (desde el nt45750 hasta el nt46751 en el cluster de ascomicina, como se describe en Wu *et al.*, 2000) empleando el ADN genómico preparado a partir de *S. hygroscopicus var. ascomyceticus* ATCC14891 como molde. El producto de PCR de 1 kb se fosforiló empleando la T4 polinucleótido quinasa y se ligó en pUC18 cortado con SmaI y desfosforilado. Luego de la transformación en *E. coli* DH10B, se aisló el plásmido pMG258-4. Se emplearon los cebadores FKOR1 5'-CGCCTGCAGGGATACGGTCCCGCCGGTCTGC-3' (SEC ID NO: 62) y FKOR2 5'-CCAAGCTTGTACGGTTCGCCACGGCGTGC-3' (SEC ID NO: 63) para amplificar la región derecha de homología (desde el nt47785 hasta el nt48781 en el cluster de rapamicina, como se describe en Wu *et al.*, 2000) empleando el ADN genómico preparado a partir de *S. hygroscopicus var. ascomyceticus* ATCC14891 como molde. Se fosforiló el producto de PCR de 1 kb empleando la T4 polinucleótido quinasa y se ligó en pUC18 cortado con SmaI y desfosforilado. Luego de la transformación en *E. coli* DH10B, el plásmido pMG259-9 se aisló. Se verificó en ambos plásmidos la presencia de la secuencia de análisis. El plásmido pMG258-4 se digirió con SbfI/HindIII y se aisló el fragmento de 3,7 kb, pMG259-5 se digirió con SbfI/HindIII y se aisló el fragmento de 1 kb. Estos fragmentos se ligaron y se emplearon para transformar *E. coli* DH10B. Se aisló el plásmido pMG265-1. El plásmido se digirió con HindIII/EcoRI y se aisló el fragmento de 2 kb y se ligó en pMG55 cortado con HindIII/EcoRI y el ADN se empleó para transformar *E. coli* DH10B. El plásmido pMG267-1 se aisló y se empleó para conjugar *S. hygroscopicus var. ascomyceticus* ATCC14891.

40 Se aisló una colonia resistente a apramicina y se cultivó durante 24 horas en TSBGM con agitación a 30°C y se dispersó en placas con agar y medio 1 que contenían 50 µg/l de estreptomicina. Se aislaron las colonias resistentes a estreptomicina y se mostró que eran sensibles a apramicina. Se pudo corroborar la mutación cromosómica en el nt1034 de fkbO en el mutante MG4 mediante Southern blotting. Se presenta un resumen en la Figura 35.

45 *Expresión de RapK en el mutante MG4 de S. hygroscopicus var. ascomyceticus que porta la delección cromosómica de fkbO*

50 El plásmido pSGsetRapK se transformó en el mutante MG4 de *S. hygroscopicus* como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

55 *Complementación heteróloga de fkbO por rapK*

55 Se cultivó *S. hygroscopicus var. ascomyceticus* MG4pSGSetRapK en TSBGM a 26°C con agitación. Se extrajeron tanto el sobrenadante del cultivo como las células, empleando los métodos descritos en la sección de Materiales y Métodos. Se analizó el extracto por medio de LC-MS para detectar la presencia de un nuevo pico importante para mostrar que el mismo contenía iones correspondientes a FK520 (ascomicina).

Ejemplo 18

5 Resulta obvio para los expertos en la técnica que otros clusters biosintéticos, que codifican para ligandos FKBP, por ejemplo, FK506 pueden modificarse de manera que el homólogo de rapK sea eliminado o inactivado empleando los métodos que se describen en el presente documento. En FK506, por ejemplo, esto podría hacerse mediante la amplificación de los productos de PCR contra las regiones a cada lado del gen *fkbO* (número de acceso a la secuencia AF082099, AF082100), ligando los mismos en un vector como pMG55, transformando la cepa productora de FK506, seleccionando para el doble entrecruzamiento y confirmando la remoción del gen *fkbO* por medio de Southern blotting.

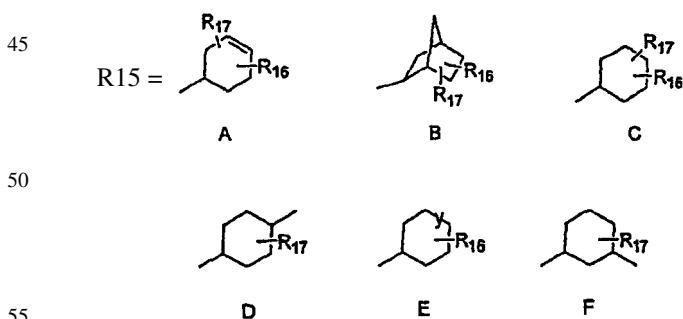
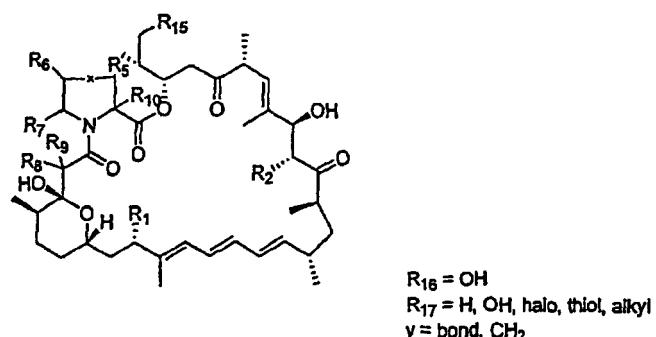
10 Ejemplo 19

Incorporación de unidades de partida no naturales por la cepa de delección de rapK, *S. hygroscopicus* MG2-10, a análogos de rapamicina en ausencia de competencia por unidades de partida naturales endógenas

15 Como se demostró en los Ejemplos 10 y 12, la rapamicina PKS posee un elevado grado de flexibilidad para las unidades de partida no naturales y, en ausencia de rapK, el sistema está libre de competencia del iniciador natural. En este Ejemplo, se demuestra más aún el grado de flexibilidad.

20 Se cultivó *S. hygroscopicus* MG2-10, se suplementó y se extrajo de acuerdo a los métodos de suplementación, extracción y análisis que se describen en Materiales y Métodos (Método B). La gama de ácidos carboxílicos suplementados, junto a los compuestos generados, se lista más adelante. Resulta sorprendente que todos los ácidos carboxílicos listados se incorporaron, tal como se determinó por medio de la observación del cromóforo UV característico a 278 nm y la espectrometría de masas de electrospray. Lo que dio como resultado la producción de análogos de rapamicina

25 Los análogos de rapamicina generados correspondían a la fórmula siguiente, como se describe en la Tabla VII:



ES 2 296 063 T3

TABLA VIII

	Unidad de partida de ácido carboxílico suplementada	M-H	(M+K)	Compuesto generado
5	Ácido ciclohexano carboxílico	824,7	864,6	$R_{15} = E, R_{16} = 4\text{-OH}, y = \text{enlace, en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
10	Ácido 3-cis, 4-trans-dihidrociclohexano carboxílico	840,5	880,4	$R_{15} = C, R_{16} = 3\text{-cis-OH}, R_{17} = 4\text{-trans-OH, en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
15	Ácido 1-ciclohexeno carboxílico	824,4	864,3	$R_{15} = E, R_{16} = 3\text{-OH, y = bond, en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
20	Ácido 3-ciclohexeno carboxílico	840,5	880,4	$R_{15} = C, R_{16} = OH, R_{17} = OH, \text{en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
		822,4	862,3	$R_{15} = A, R_{16} = OH, R_{17} = H, \text{en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
25	Ácido cicloheptano carboxílico	838,4	878,3	$R_{15} = E, R_{16} = OH, y = CH_2, \text{en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
30	Carboxilato de Metilo 2-norbormano	836,2	876,2	$R_{15} = E, R_{16} = OH, y = CH_2, \text{en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
35	Ácido 3-hidroxiciclohexano carboxílico	824,7	864,6	$R_{15} = E, R_{16} = 3\text{-OH, y = enlace, en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
40	Ácido 4-hidroxiciclohexano carboxílico	824,6	864,6	$R_{15} = E, R_{16} = 4\text{-OH, y = enlace, en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
45	Ácido 3-metilciclohexano carboxílico	838,4	878,3	$R_{15} = F, R_{17} = OH, \text{en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
50	Ácido 4-metilciclohexano carboxílico	838,4	878,3	$R_{15} = D, R_{17} = OH, \text{en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
55	Ácido 3-(cis/trans) metoxiciclohexano carboxílico	824,3	864,2	$R_{15} = E, R_{16} = 3\text{-OH, y = enlace, en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
60	Carboxilato de Etíl14-ciclohexano	824,3	864,2	$R_{15} = E, R_{16} = 4\text{-OH, y = enlace, en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
65	Ácido 3-fluoro-4-hidroxi ciclohexano carboxílico y ácido 4-fluoro-3-hidroxi ciclohexano carboxílico	843,0	882,0	$R_{15} = C, R_{16} = OH, R_{17} = F, \text{en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
	Ácido 3-ciclohexano óxido carboxílico	841,0	880,8	$R_{15} = C, R_{16} = 3\text{-cis-OH}, R_{17} = 4\text{-trans-OH, en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
	Ácido 3,4-cis-dihidroxi ciclohexano carboxílico	841,2	881,1	$R_{15} = C, R_{16} = 3\text{-cis-OH}, R_{17} = 4\text{-cis-OH, en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
		841,2	881,1	$R_{15} = C, R_{16} = 3\text{-trans-OH}, R_{17} = 4\text{-trans-OH, en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
	Ácido 3-cloro-4-hidroxi ciclohexano carboxílico y ácido 4-cloro-3-hidroxi	858,8	898,8	$R_{15} = C, R_{16} = OH, R_{17} = Cl, \text{en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$

ciclohexano carboxílico (y el par de diasteroisómeros opuestos)			H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
5 Ácido ciclohexilpropiónico	825,0	864,9	R ₁₅ = C, R ₁₆ = 3-cis-OH, R ₁₇ = 4-trans-OH, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂ TBC

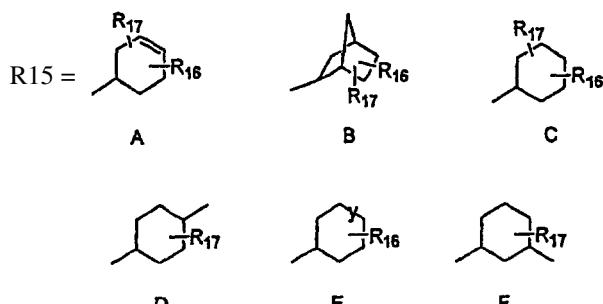
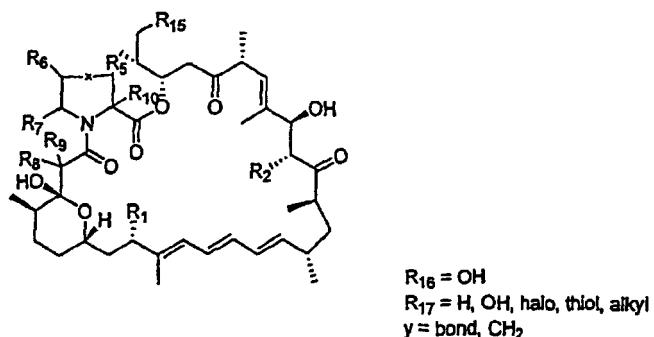
10 Ejemplo 20

Incorporación de unidades de partida no naturales por la cepa *S. hygroscopicus* MG2-10[pSGsetrapN/OQLhis] con la delección rapK a análogos de rapamicina en ausencia de competencia por la unidad de partida natural endógena

15 Como se demostró en los Ejemplos 10, 12 y 19, la rapamicina PKS posee un alto grado de flexibilidad para las unidades no naturales de partida en ausencia de rapK, el sistema se encuentra libre de competencia por el iniciador natural. En este ejemplo, se demuestra más aun el grado de flexibilidad.

20 Se cultivó *S. hygroscopicus* MG2-10[pSGsetrapN/OQLhis], se suplementó y se extrajo de acuerdo con los métodos de suplementación, extracción y análisis que se describen en Materiales y Métodos (Método B). La gama de ácidos carboxílicos suplementados junto con los compuestos generados se lista a continuación. Resulta sorprendente que todos los ácidos carboxílicos listados se incorporaron como se determinó por medio de la observación del cromóforo UV característico a 278 nm y la espectrometría de masas de electrospray y dieron como resultado la producción de 25 análogos de rapamicina.

Los análogos de rapamicina generados corresponden a la fórmula siguiente, como se describe en la Tabla IX:



ES 2 296 063 T3

TABLA IX

Unidad de partida de ácido carboxílico suplementada	M-H	(M+K)	Compuesto generado
Ácido ciclohexano carboxílico	840,4	880,4	$R_{15} = E, R_{16} = 4\text{-OH}, y = \text{enlace, en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
Ácido 3-cis, 4-trans-dihidrociclohexano carboxílico	840,4	880,4	$R_{15} = C, R_{16} = 3\text{-cis-OH}, R_{17} = 4\text{-trans-OH, en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
	856,4	896,4	$R_{15} = C, R_{16} = 3\text{-cis-OH}, R_{17} = 4\text{-trans-OH, en combinación con } R_1 = OH, R_2 = OH, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
Ácido 1-ciclohexeno carboxílico	824,4	864,4	$R_{15} = E, R_{16} = 3\text{-OH, y = bond, en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
	840,4	880,4	$R_{15} = E, R_{16} = 3\text{-OH, y = bond, en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
Ácido 3-ciclohexeno carboxílico	840,4	880,4	$R_{15} = C, R_{16} = OH, R_{17} = OH, en combinación con R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
	822,4	862,4	$R_{15}=A, R_{16} = OH, R_{17} = H, en combinación con R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
	840,4	880,4	$R_{15}=A, R_{16} = OH, R_{17} = H, en combinación con R_1 = OH, R_2 = OH, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
Ácido cicloheptano carboxílico	854,4	894,4	$R_{15}=E, R_{16} = OH, y = CH_2, en combinación con R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
Ácido metilo 2-norbornano carboxílico	852,4	892,4	$R_{15}=B, R_{16} = OH, R_{17} = H, en combinación con R_1 = OH, R_2 = OH, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
Ácido 3-hidroxiciclohexano carboxílico	824,4	864,4	$R_{15} = E, R_{16} = 3\text{-OH, y = enlace, en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
Ácido 4-hidroxiciclohexano carboxílico	840,4	880,4	$R_{15} = E, R_{16} = 4\text{-OH, y = enlace, en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
	824,4	864,4	$R_{15} = E, R_{16} = 4\text{-OH, y = enlace, en combinación con } R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
Ácido 4-metilciclohexano carboxílico	838,4	878,4	$R_{15} = D, R_{17} = OH, en combinación con R_1 = OH, R_2 = H, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$
	854,4	894,4	$R_{15} = D, R_{17} = OH, en combinación con R_1 = OH, R_2 = OH, R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H, R_9 = H, R_{10} = H, x = CH_2$

ES 2 296 063 T3

Ejemplo 20

Incorporación de unidades de partida no naturales por la cepa MG3 de S. hygroscopicus con la delección de rapK, a análogos de rapamicina en ausencia de competencia por la unidad de partida natural

Como se demostró en los Ejemplos 10, 12 y 19, la rapamicina PKS posee un alto grado de flexibilidad para las unidades no naturales de partida en ausencia de rapK, el sistema se encuentra libre de competencia por el iniciador natural. En este ejemplo, se demuestra más aun el grado de flexibilidad.

Se cultivó *S. hygroscopicus* MG3, se suplementó y se extrajo de acuerdo con los métodos de suplementación, extracción y análisis que se describen en Materiales y Métodos (Método B). La gama de ácidos carboxílicos suplementados junto con los compuestos generados se lista a continuación. La incorporación de los ácidos carboxílicos listados y la producción de análogos de rapamicina se determinó por medio de la observación del cromóforo UV característico a 278 nm y la espectrometría de masas de electrospray.

Los ácidos carboxílicos que pueden suplementarse como unidades de partida incluyen el ácido ciclohexano carboxílico, ácido 3-cis, 4-trans-dihidroxiciclohexano carboxílico, ácido 1-ciclohexeno carboxílico, ácido 3-ciclohexeno carboxílico, ácido cicloheptano carboxílico, carboxilato de metilo 2-norbornano, ácido 3-hidroxiciclohexano carboxílico, ácido 4-hidroxiciclohexano carboxílico, ácido 3-metilciclohexano carboxílico, ácido 4-metilciclohexano carboxílico, ácido 3-(cis/trans) metoxiciclohexano carboxílico, ácido 4-(cis/trans) metoxiciclohexano carboxílico, carboxilato de etilo 4-ciclohexanona, ácido 3-fluoro-4-hidroxicarboxílico y ácido 4-fluoro-3-hidroxicarboxílico, ácido 3-ciclohexano óxido carboxílico, ácido 3,4-cis-dihidroxiciclohexano carboxílico, ácido 3-cloro-4-hidroxicarboxílico y ácido 4-cloro-3-hidroxicarboxílico (y el par de diastereoisómeros opuestos), ácido ciclohexilpropiónico y ácido 4-terc-butilciclohexano carboxílico.

Ejemplo 21

Incorporación de unidades de partida no naturales por la cepa S. hygroscopicus var. ascomyceticus MG4 con delección de fkbO a análogos de FK520 en ausencia de competencia por unidades de partida naturales endógenas

Como se demostró en los Ejemplos 10, 12, 19 y 20, la rapamicina PKS posee un alto grado de flexibilidad para las unidades no naturales de partida. En ausencia de fkbO, el sistema FK520 se encuentra libre de competencia por el iniciador natural. En este ejemplo, se analiza el grado de flexibilidad de FK520 PKS, libre de competencia por parte del iniciador natural.

Se cultivó *S. hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MG4, se suplementó y se extrajo de acuerdo con los métodos de suplementación, extracción y análisis que se describen en Materiales y Métodos (Método B). La gama de ácidos carboxílicos suplementados junto con los compuestos generados se proporcionan en la Tabla IV. La incorporación de los ácidos carboxílicos listados y la producción de análogos de FK520 se determinó por medio de espectrometría de masas de electrospray.

Ejemplo 22

Incorporación de ácidos de partida no naturales a análogos de FK506 por el mutante de S. tsukubaensis con delección de fkbO en ausencia de competencia por parte del iniciador natural

Se cultivó un mutante de *S. tsukubaensis* con delección de fkbO y se suplementó de acuerdo con los métodos de suplementación descritos en Materiales y Métodos. Se suplementó un subconjunto de los ácidos carboxílicos listados en la Tabla IV en Materiales y Métodos. Se llevó a cabo el análisis como se describe en el Método (B) de los Materiales y Métodos.

Ejemplo 23

Aislamiento del producto de la fermentación de S. hygroscopicus MG2-10[pSGsetrapKILh]

Se obtuvo 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina por medio de la conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* con pSGsetrapKIL_h y el aislamiento de los productos de fermentación generados como se describe más adelante. Esto demuestra que es posible complementar la delección de rapK, rapI y rapL en la cepa MG2-10 y que se produce 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina, un análogo que carece de las modificaciones post-PKS. La suplementación de ácido pipecólico no se requiere cuando rapL es complementado, confirmando que rapL desempeña un papel en la provisión de ácido pipecólico para la producción de rapamicina.

Se fermentó *S. hygroscopicus* MG2-10 [pSGsetrapKIL_{his}] (ver Materiales y Métodos) y se extrajo y aisló empleando el método (B) como se describe en Materiales y Métodos. El sistema de solvente isocrático empleado para la HPLC preparativa fue 60% de CH₃CN/H₂O.

ES 2 296 063 T3

La 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina (Compuesto 6) posee las características siguientes:

Rendimiento del aislamiento: 22 mg

5 Peso molecular: 856

Fórmula molecular: $C_{49}H_{77}NO_{11}$

10 UV (mediante detección de arreglo de diodos durante el análisis de HPLC): 268 nm, 278 nm, 288 nm

10 MS electrospray: m/z para MNa^+ = 878, m/z para $M-H$ = 854

15 La Tabla X, a continuación, resume los datos de RMN de 1H y ^{13}C para la 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina en $CDCl_3$

20 (Tabla pasa a página siguiente)

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 296 063 T3

TABLA X

Protón	δ_H	multiplicidad	acoplamiento	δ_C
5	1			169,0 171,5
	2	4,37 5,40		55,6 52,5
	3a	1,51 1,75 ^a		26,5 26,3
	3b	2,40 2,19		
10	4a			20,9
	4b			
	5a	1,30 1,48		25,1
	5b	1,68 1,72		
15	6a	4,45 3,26		39,0 44,4
	6b	2,16 3,83		
	8			171,7 172,4
	9a	2,41 2,54		38,7 40,2
20	9b	2,67 2,89		
	10			98,4 99,7
	10-OH	6,62 5,34	br. S	
	11	1,37 1,51		38,7 38,7
25	12a	1,67 1,62		27,3 27,6
	12b	1,48 1,48		
	13a	1,29 1,32		
	13b			
30	14	4,21 3,87		71,3 69,6
	15a	1,47 ^b 1,50		
	15b	1,66 1,65		
	16	4,21 4,06	dd	76,0 75,6
35	17			141,6 138,4
	18	6,08 6,22	d d	122,5 125,0
	19	6,38 6,31	dd dd	128,6 127,7
	20	6,01 6,17	dd	131,1 132,2
40	21	6,04 6,04		130,3 130,3
	22	5,18 5,30	dd dd	139,4 139,1
	23	2,11 2,15		9,3
	24a	1,34 1,35		39,5 37,3
45	24b	1,68 1,67		40,3 40,3
	25	2,43 2,44		45,5 46,3
	26			215,2 216,1
	27a	2,53 2,60		46,7 47,9
50	27b	2,65 2,43		
	28	4,33 4,39	dd	71,7 71,9
	29			139,6 139,6
	30	5,36 5,45	d	123,7 125,4
55	31	3,24 3,37		46,4 45,6
	32			209,0 209,1
	33a	2,63 2,63		39,4 39,4
	33b	2,95 2,95		
60	34	5,13 5,38		76,0 74,2
	35	1,93 1,98 ^b		32,7 32,7
	36a	1,04 1,03		37,8 39,8
	36b	1,17 1,16		
65	37	1,34 1,38		33,2 33,2
	38a ax.	0,61 0,73	ddd ddd	11,9; 11,9; 11,9
				11,9; 11,9; 11,9
	38b eq.	2,04 2,09		
65	39	2,90 2,91		84,5 84,4
	40	3,37 3,37		73,8 73,8
	41a	1,31 1,31		31,2 31,2
	41b	1,97 1,97		
65	42a	0,97 0,97		31,7 31,7
	42b			
	43	0,93 0,93	d d	16,8 ^c 16,9 ^c
	44	1,78 1,63	s s	15,6 12,7
65	45	0,98 1,00		21,7 21,7
	46	1,00 1,02		16,7 19,1
	47	1,58 1,48	s s	13,1 11,7

ES 2 296 063 T3

48	1,07	1,00	d	6,9	16,2	14,6
49	0,89	0,89	d d	6,8	14,6 ^d	15,2 ^d
50	3,37	3,37	s s		56,5	56,5

a: se puede asignar en lugar de H4a

5 b: asignación tentativa

c: se puede intercambiar la asignación

d: se puede intercambiar la asignación

10 El compuesto 6 existe como una mezcla 1:1 de confórmeros en CDCl₃. Los datos anteriores son para ambos confórmeros. En los casos en que se ha trazado una línea punteada a través de la tabla no fue posible determinar la conectividad entre los sistemas de espín, por tanto, la asignación de datos a un confórmero particular no resulta posible.

Ejemplo 24

15 Aislamiento del producto de la fermentación de *S. hygroscopicus* MG2-10[pSGsetrapKIML_h]

Se obtuvo 9-deoxo-27-desmetoxi-rapamicina por medio de la conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* con pSGsetrapKIML_h, como se describió en el Ejemplo 1, y el aislamiento de los productos de fermentación. Esto demuestra que es posible complementar la delección de rapK, rapI, rapM y rapL en la cepa MG2-10 con la producción de un análogo de la rapamicina que carece de algunas de las modificaciones post-PKS.

20 Se fermentó *S. hygroscopicus* MG2-10 [pSGsetKIML_{his}] (ver Materiales y Métodos) y se extrajo y aisló empleando el método (B) como se describe en Materiales y Métodos. El sistema de solvente isocrático empleado para la HPLC preparativa fue 75% de CH₃CN/H₂O.

25 La 9-deoxo-27-desmetoxi-rapamicina (Compuesto 16) posee las características siguientes:

Rendimiento del aislamiento: 24 mg

30 Peso molecular: 870

Fórmula molecular: C₅₀H₇₉NO₁₁

UV (mediante detección de arreglo de diodos durante el análisis de HPLC): 268 nm, 278 nm, 288 nm

35 MS electrospray: m/z para MNa⁺ = 892, m/z para M-H = 868

La Tabla XI, a continuación, resume los datos de RMN de ¹H y ¹³C para la 9-deoxo-27-desmetoxi-rapamicina en CDCl₃.

40

TABLA XI

Protón	δ_H	multiplicidad	acoplamiento	δ_C
1				171,0
2	5,37	m		52,0
3a	1,73	m		26,8
3b	2,22	m		
4a	1,39	m		20,5
4b	1,73	m		
5a	1,56	m		25,1
5b	1,77	m		
6a	3,34	m		43,5
6b	3,85	br. d	12,9	
8				173,4
9a	2,43	d	14,4	38,8
9b	2,74	d	14,4	
10				98,0
10-OH	6,02	s		
11	1,43	m		39,1
12a	1,44	m		27,5
12b	1,58	m		
13a	1,28	m		32,2
13b	1,45	m		
14	3,61	m		65,8
15a	1,55	m		38,6
15b	1,64	m		
16	3,70	dd	10,8; 4,7	84,5
17				134,8

ES 2 296 063 T3

	18	5,98	d	9,2	130,8
	19	6,34	m		126,9
	20	6,32	m		133,1
	21	6,11	dd	15,3; 9,0	130,6
5	22	5,46	dd	15,2; 8,6	139,3
	23	2,22	m		35,7
	24a	1,28	m		40,2
	24b	1,49	m		
10	25	2,58	m		44,8
	26				215,0
	27a	2,65	m		46,2
	27b	2,65	m		
	28	4,37	m		73,1
15	29				139,8
	30	5,32	d	9,9	124,5
	31	3,38	m		46,3
	32				208,9
	33a	2,59	m		41,4
20	33b	2,59	m		
	34	5,04	ddd	5,2; 5,2; 5,2	75,7
	35	1,97	m		33,4
	36a	1,11	m		38,6
	36b	1,26	m		
25	37	1,41	m		33,1
	38a ax.	0,69	ddd	12,3; 12,3; 12,3	34,1
	38b eq.	2,11	m		
	39	2,93	m		84,4
30	40	3,37	m		73,9
	41a	1,32	m		31,2
	41b	1,97	m		
	42a	1,00	m		31,6
	42b	1,68	m		
35	43	0,88	d	6,4	16,9
	44	3,10	s		55,6
	45	1,59	s		9,9
	46	1,02	d	7,2	20,5
	47	1,03	d	7,1	15,7
40	48	1,67	s		12,2
	49	1,12	d	6,8	16,3
	50	0,92	d	6,8	15,8
	51	3,39	s		56,5

45 Ejemplo 25

*Aislamiento del producto de la fermentación de *S. hygroscopicus* MG2-10 (pSGsetKIN/OLh)*

Se obtuvo la 9-Deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetilo rapamicina mediante la conjugación de la cepa de *S. hygroscopicus* MG2-10 con pSGsetKIN/OL_{his}, como se describe en el Ejemplo 1 y se aislaron los productos generados 50 durante la fermentación. Esto demostró que es posible complementar la delección de rapK, rapI, rapN/O y rapL en la cepa MG2-10 con la producción de un análogo de la rapamicina que carece de alguna de las modificaciones post-PKS.

Se fermentó *S. hygroscopicus* MG2-10 (pSGsetKIN/OL_{his}) (ver Materiales y Métodos), se extrajo y se aisló empleando el Método (B), como se describe en Materiales y Métodos. 55

El sistema de solvente isocrático empleado para la HPLC preparativa fue 60% de CH₃CN/H₂O. La 9-Deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetilrapamicina (Compuesto 9) posee las características siguientes:

60 Rendimiento del aislamiento: 77 mg

Peso molecular: 872

Fórmula molecular: C₄₉H₇₇NO₁₂

65 UV (mediante detección de arreglo de diodos durante el análisis de HPLC): 268 nm, 278 nm, 288 nm

MS electrospray: m/z para MNa⁺ = 894, m/z para M-H = 870

ES 2 296 063 T3

La Tabla XII a continuación resume los datos de RMN de ^1H y ^{13}C para la 9-deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-rapamicina en CDCl_3 .

5

TABLA XII

	Protón	δ_{H}	multiplicidad	acoplamiento	δ_{C}
10	1				172,1
	2	5,55	m		52,8
	3a	1,74	m		26,0
	3b	2,21	m		
	4a	1,18	m		21,1
15	4b	1,73	m		
	5a	1,44	m		25,2
	6a	3,28	m		45,7
	6b	3,87	br. d		
	8				171,6
20	9a	2,41	d	12,5	42,3
	9b	3,34	d	12,5	
	10				99,2
	10-OH	4,15	m		
	11	1,61	m		38,3
25	12a	1,36	m		31,5
	12b	1,52	m		
	13a	3,99	m		72,5
	13b	1,45	m		40,9
30	14	3,99	m		72,5
	15a	1,45	m		40,9
	15b	1,70	m		
	16	3,86	m		75,3
	17				140,0
35	18	6,44	d	11,4	121,9
	19	6,33	dd	14,4; 11,4	128,6
	20		dd	14,8; 10,6	131,2
	21		dd	14,9; 10,6	131,2
	22	5,25	m		137,4
40	23	2,26	m		35,3
	24a	1,21	m		41,1
	24b	1,21	m		
	25	2,37	m		40,9
45	26				212,8
	27	4,55	d	2,3	74,9
	28	4,20			77,3
	29				135,8
	30	5,25	m		124,9
50	31	3,29	m		44,9
	32				208,0
	33a	2,53	dd	18,2; 4,0	42,2
	33b	2,81	dd	18,2; 10,6; 4,0; 4,0	
55	34	5,28	ddd		75,8
	35	1,71	m		31,2
	36a	0,92	m		36,9
	36b	1,04	m		
	37	1,23	m		32,6
60	38a ax.	0,28	ddd	11,9; 11,9; 11,9	34,2
	38b eq.	1,88	m		
	39	2,85			84,8
	40	3,29	m		74,1
	41a	1,26	m		31,3

ES 2 296 063 T3

41b	1,92	m		
42a	0,88	m		32,3
42b	1,57	m		
5 43	0,98	d	6,2	16,6
44	1,59	s		14,6
45	1,01	d	6,4	21,4
10 46	0,89	d	6,4	12,0
47	1,90	s		15,7
48	0,92	d	6,4	15,6
49	0,84	d	6,8	17,6
15 50	3,37	s		57,5

Ejemplo 26

*Aislamiento del producto de la fermentación de *S. hygroscopicus* MG2-10 (pSGsetKJLh)*

- 20 Se obtuvo la 16-O-Desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina mediante la conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* con pSGsetKJL_{his}, como se describió en el Ejemplo 1, y el aislamiento de los productos generados en la fermentación. Esto demostró que era posible la complementación de la delección de rapK, rapJ y rapL en la cepa MG2-10 con la producción de análogos de rapamicina que carecen de alguna de las modificaciones post-PKS.
- 25 Se fermentó *S. hygroscopicus* MG2-10 (pSGsetKJL_{his}) (ver Materiales y Métodos), se extrajo y se aisló empleando el Método (B), como se describe en Materiales y Métodos. El sistema de solvente isocrático empleado para la HPLC preparativa fue 55% de CH₃CN/H₂O. La 16-O-Desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina (Compuesto 3) posee las características siguientes:

30 Rendimiento del aislamiento: 176 mg (mezcla de los 2 isómeros interconvertibles)

Peso molecular: 856

35 Fórmula molecular: C₄₈H₇₃NO₁₂

UV (mediante detección de arreglo de diodos durante el análisis de HPLC): 268 nm, 278 nm, 288 nm

MS electrospray: m/z para MNa⁺ = 894, m/z para M-H = 854

40 Fragmentación MS: El aducto de sodio (m/z 878) se fragmentó para proporcionar tres fragmentos: C8-C24, m/z MNa⁺ 749; C1-C27, m/z MNa⁺ 570; C28-C42+C1-C14, m/z MNa⁺ 628. Los iones fragmentos 628 y 570 se fragmentaron nuevamente para producir el mismo fragmento: C1-C14 m/z MNa⁺ 320. La masa de este fragmento C1-C14 es mayor en 14 unidades de masa que el fragmento equivalente resultado de la fragmentación del aducto de sodio de la 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina (Compuesto 1), consistente con la oxidación en C9.

Ejemplo 27

*Aislamiento del producto de la fermentación de *S. hygroscopicus* MG2-10 (pSGsetKMNOLh)*

50 Se obtuvo 9-Deoxo-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina mediante la conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* con pSGsetKMN/OL_{his}, como se describió en el Ejemplo 1, y el aislamiento de los productos generados en la fermentación. Esto demostró que era posible la complementación de la delección de rapK, rapM, rapN/O y rapL en la cepa MG2-10 con la producción de análogos de rapamicina que carecen de alguna de las modificaciones post-PKS.

60 Se fermentó *S. hygroscopicus* MG2-10 (pSGsetKMN/OL_{his}) (ver Materiales y Métodos), se extrajo y se aisló empleando el Método (B), como se describe en Materiales y Métodos. El sistema de solvente isocrático empleado para la HPLC preparativa fue 60% de CH₃CN/H₂O. La 9-Deoxo-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina (Compuesto 8) posee las características siguientes:

Rendimiento del aislamiento: 6 mg

65 Peso molecular: 872

Fórmula molecular: C₄₉H₇₇NO₁₂

ES 2 296 063 T3

UV (mediante detección de arreglo de diodos durante el análisis de HPLC): 268 nm, 278 nm, 288 nm

MS electrospray: m/z para MNa^+ = 894, m/z para $M-H$ = 870

5 Fragmentación MS: El aducto de sodio (m/z 894) se fragmentó para proporcionar tres fragmentos: C8-C42, m/z MNa^+ 765; C1-C27, m/z MNa^+ 586; C28-C42+C1-C14, m/z MNa^+ 614. Los iones fragmentos 614 y 586 se fragmentaron nuevamente para producir el mismo fragmento: C1-C14 m/z MNa^+ 306. La masa de este fragmento C1-C14 es idéntica a la obtenida para el aducto de sodio de la 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina. El compuesto es 9-deoxo. El fragmento C1-C27 posee una masa mayor en 30 unidades que la del fragmento equivalente de la 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina, consistente con una hidroxilación y una metilación; RapM metila el grupo hidroxilo en C16 (ver Ejemplo 22 para pSGsetKIL_{his}, junto al Ejemplo 23 pSGsetKIML_{his}) y RapN en combinación con RapO hidroxila C27, de manera que los datos son consistentes con que el compuesto sea la 9-deoxo-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina (Compuesto 8).

10 15 Ejemplo 28

*Aislamiento del producto de la fermentación de *S. hygroscopicus* MG2-10 (pSGsetKIJL_{his})*

20 Se obtuvo 16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina mediante la conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* con pSGsetKIJL_{his}, como se describió en el Ejemplo 1, y el aislamiento de los productos generados en la fermentación. Esto demostró que era posible la complementación de la delección de rapK, rapI, rapJ y rapL en la cepa MG2-10 con la producción de análogos de rapamicina que carecen de alguna de las modificaciones post-PKS.

25 Se fermentó *S. hygroscopicus* MG2-10 (pSGsetKMN/OL_{his}) (ver Materiales y Métodos), se extrajo y se aisló empleando el Método (B), como se describe en Materiales y Métodos. El sistema de solvente isocrático empleado para la HPLC preparativa fue 60% de CH3CN/H2O. La 16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina (Compuesto 12) posee las características siguientes:

Rendimiento del aislamiento: 11 mg

30 Peso molecular: 870

Fórmula molecular: $C_{49}H_{75}NO_{12}$

35 UV (mediante detección de arreglo de diodos durante el análisis de HPLC): 268 nm, 278 nm, 288 nm

MS electrospray: m/z para MNa^+ = 892, m/z para $M-H$ = 868

40 Ejemplo 29

*Aislamiento del producto de la fermentación de *S. hygroscopicus* MG2-10 (pSGsetKL_{his})*

45 Se obtuvo 9-Deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina mediante la conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* con pSGsetKL_{his}, como se describió en el Ejemplo 1, y el aislamiento de los productos generados en la fermentación. Esto demostró que era posible la complementación de la delección de rapK y rapL en la cepa MG2-10 con la producción de análogos de rapamicina que carecen de alguna de las modificaciones post-PKS.

50 Se fermentó *S. hygroscopicus* MG2-10 (pSGsetKL_{his}) (ver Materiales y Métodos), se extrajo y se aisló empleando el Método (B), como se describe en Materiales y Métodos.

55 El sistema de solvente isocrático empleado para la HPLC preparativa fue 60% de CH3CN/H2O. La 9-Deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina (Compuesto 1) posee las características siguientes:

Rendimiento del aislamiento: 24 mg

55 Peso molecular: 842

Fórmula molecular: $C_{48}H_{75}NO_{11}$

60 UV (mediante detección de arreglo de diodos durante el análisis de HPLC): 268 nm, 278 nm, 288 nm

MS electrospray: m/z para MNa^+ = 864, m/z para $M-H$ = 840

65 Fragmentación MS: El aducto de sodio (m/z 864,5) se fragmentó para proporcionar tres fragmentos: C8-C42, m/z MNa^+ 735; C1-C27, m/z MNa^+ 556; C28-C42+C1-C14, m/z MNa^+ 614, C1-C14, m/z MNa^+ 306. Se determinó la m/z esperada para estos fragmentos mediante comparación con la fragmentación reportada para la rapamicina (J. A Reather, Ph.D. Dissertation, University of Cambridge, 2000). Los fragmentos poseen la misma m/z predicha para la fragmentación de la 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina.

ES 2 296 063 T3

Ejemplo 30

Aislamiento del producto de la fermentación de S. hygroscopicus MG2-10 suplementado con ácido ciclohexano carboxílico

5 Se obtuvo 9-Deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina al suplementar ácido ciclohexano carboxílico a *S. hygroscopicus* MG2-10 y aislar los productos generados en la fermentación. La mutasíntesis resultante demostró que es posible complementar químicamente mediante la conjugación de la cepa MG2-10 en ausencia del iniciador natural endógeno, con el resultado de la producción de un análogo de rapamicina que carece de modificaciones 10 post-PKS.

10 Se fermentó *S. hygroscopicus* MG2-10 (pSGsetKL_{his}) (ver Materiales y Métodos), se suplementó (ver Materiales y Métodos) y se extrajo y aisló empleando el Método (B), como se describe en Materiales y Métodos.

15 El sistema de solvente isocrático empleado para la HPLC preparativa fue 60% de CH3CN/H2O. La 9-Deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina (Compuesto 47) posee las características siguientes:

Rendimiento del aislamiento: 12 mg

20 Peso molecular: 826

Fórmula molecular: C₄₈H₇₅NO₁₀

UV (mediante detección de arreglo de diodos durante el análisis de HPLC): 268 nm, 278 nm, 288 nm

25 MS electrospray: m/z para MNa⁺ = 848,5, m/z para M-H = 825

30 Fragmentación MS: El aducto de sodio (m/z 848,5) se fragmentó para proporcionar cuatro fragmentos: C8-C42, m/z MNa⁺ 735; C1-C27, m/z MNa⁺ 556; C28-C42+C1-C14, m/z MNa⁺ 598, C1-C14, m/z MNa⁺ 306. Estos datos ilustran que la diferencia entre el Compuesto 47 y la 9-Deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina (Compuesto 1) se localiza en la región de C28-C42. Este fragmento es menor en 16 unidades de masa para el Compuesto 47 que lo que lo es para el Compuesto 1, lo que es consistente con el hecho de que el Compuesto 47 sea la 9-Deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina.

Ejemplo 31

Aislamiento del producto de la fermentación de S. hygroscopicus MG2-10 (pSGsetKNOLh)

40 Se obtuvo 9-Deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina mediante la conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* con pSGsetKN/OL_{his}, como se describió en el Ejemplo 1, y el aislamiento de los productos generados en la fermentación. Esto demostró que era posible la complementación de la delección de rapK, rapN/O y rapL en la cepa MG2-10 con la producción de análogos de rapamicina que carecen de alguna de las modificaciones post-PKS.

45 Se fermentó *S. hygroscopicus* MG2-10 (pSGsetKN/OL_{his}) (ver Materiales y Métodos), se extrajo y se aisló empleando el Método (B), como se describió en Materiales y Métodos.

El sistema de solvente isocrático empleado para la HPLC preparativa fue 60% de CH3CN/H2O.

50 La 9-Deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina (Compuesto 2) posee las características siguientes:

Peso molecular: 858

55 Fórmula molecular: C₄₈H₇₅NO₁₂

UV (mediante detección de arreglo de diodos durante el análisis de HPLC): 268 nm, 278 nm, 288 nm

MS electrospray: m/z para MK⁺ = 896, m/z para M-H = 856.

Ejemplo 32

Identificación del producto de la fermentación de S. hygroscopicus MG2-10 (pSGsetKJNOLh)

65 Se obtuvo 16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina mediante la conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* con pSGsetKJN/OL_{his}, como se describió en el Ejemplo 1, y el análisis de los productos generados en la fermentación. Esto demostró que era posible la complementación de la delección de rapK, rapJ, rapN/O y rapL en la cepa MG2-10 con la producción de análogos de rapamicina que carecen de alguna de las modificaciones post-PKS.

ES 2 296 063 T3

Se trató el sobrenadante de la fermentación (1 mL) como se describe en el Método (B) de extracción, aislamiento y análisis, descrito en Materiales y Métodos. El cromatograma de HPLC (280 nm) contenía un pico que poseía el trieno característico de la rapamicina (268 nm, 278 nm, 288 nm). Este pico no se observó en el cromatograma de la muestra de control extraída de *S. hygroscopicus* MG2-10 en ausencia del casete. La LC/MS (ver Materiales y Métodos, Método 5 B) del pico correspondiente al análogo novedoso de la rapamicina produjo iones de m/z 895 (mNa⁺) y 871 (M-H). Estos iones confirman que la masa molar del análogo novedoso de la rapamicina es 872, superior en 30 unidades de masa a la 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina (Compuesto 1), lo que es consistente con la oxidación en C9 (rapJ) y la hidroxilación en C27 (rapN/O). Estos datos son consistentes con el hecho de que el compuesto sea la 16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina (Compuesto 7).

10

Ejemplo 33

Aislamiento del producto de la fermentación de S. hygroscopicus MG2-10 (pSGsetKJNOLh)

15 Se obtuvo 16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina mediante la conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* con pSGsetKJN/OL_{his}, como se describió en el Ejemplo 1, y el aislamiento de los productos generados en la fermentación. Esto demostró que era posible la complementación de la delección de rapK, rapJ, rapN/O y rapL en la cepa MG2-10 con la producción de un análogo de rapamicina que carece de alguna de las modificaciones post-PKS.

20

Se fermentó *S. hygroscopicus* MG2-10 (pSGsetKJN/OL_{his}) (ver Materiales y Métodos), se extrajo y se aisló empleando el Método (B), como se describió en Materiales y Métodos.

25 El sistema de solvente isocrático empleado para la HPLC preparativa fue 60% de CH3CN/H2O.

30

La 9-Deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina (Compuesto 2) posee las características siguientes:

Peso molecular: 872

35

Fórmula molecular: C₄₈H₇₃NO₁₃

UV (mediante detección de arreglo de diodos durante el análisis de HPLC): 268 nm, 278 nm, 288 nm

40

MS electrospray: m/z para MK+ = 895, m/z para M-H = 871

Ejemplo 34

Identificación del producto de la fermentación de S. hygroscopicus MG2-10 (pSGsetKIJNOQLh)

45

Se obtuvo 16-O-desmetilo rapamicina mediante la conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* con pSGsetKIJN/OQL_{his}, como se describió en el Ejemplo 1, y el análisis de los productos generados en la fermentación. Esto demostró que era posible la complementación de la delección de rapK, rapI, rapJ, rapN/O, rapQ y rapL en la cepa MG2-10 con la producción de un análogo de rapamicina que carece de la mutilación en C16-OH. Además, esto identificó de manera clara a RapQ como la O-metiltransferasa dependiente de SAM, que es responsable de la metilación de C27-OH.

50

Se fermentó *S. hygroscopicus* (pSGsetKIJN/OQL_{his}) (ver Materiales y Métodos), se extrajo y se analizó empleando el Método (B) como se describió en Materiales y Métodos.

55

Se trató el sobrenadante de la fermentación (1 mL) como se describe en el Método (B) de extracción, aislamiento y análisis, descrito en Materiales y Métodos. El cromatograma de HPLC (280 nm) contenía un pico que poseía el trieno característico de la rapamicina (268 nm, 278 nm, 288 nm). Este pico no se observó en el cromatograma de la muestra de control extraída de *S. hygroscopicus* MG2-10 en ausencia del casete. La LC/MS (ver Materiales y Métodos, Método B) del pico correspondiente al análogo novedoso de la rapamicina produjo iones de m/z 923 (mNa⁺) y 899 (M-H). Estos iones confirman que la masa molar del análogo novedoso de la rapamicina es 900, inferior en 14 unidades de masa a la rapamicina. Se ha establecido ya que el único gen post-PKS no incluido en el casete, rapM, actúa para mutilar el C16-OH, por tanto, el análogo novedoso de la rapamicina es la 16-O-desmetilo rapamicina (Compuesto 20), y se muestra que rapQ es funcional y que actúa para O-metilar en C27.

60

Ejemplo 35

Bioensayo de los análogos de rapamicina

65

(1) = 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina (prerapamicina)

(6) = 9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina

ES 2 296 063 T3

- (16) = 9-deoxo-27-desmetoxi-rapamicina,
 (3) = 16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetilo rapamicina
 5 (9) = 9-deoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetilo rapamicina
 (8) = 9-deoxo-27-O-desmetil-39-O-desmetilo rapamicina

Líneas celulares cancerosas

10 La inhibición del crecimiento de líneas celulares tumorales humanas adherentes de tumores maligno sólidos HT29 (colon) y MCF-7 (mama) se ensayó *in vitro* empleando un ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) empleando placas de microtítulo (Sieuwerts, A.M., *et al.*, 1995). Todas las líneas celulares se obtuvieron bien a partir de ATCC (*American Type Culture Collection*), o bien de ECACC (*European Collection of Cell Cultures*). Todas las líneas celulares se cultivaron a partir de almacenamientos congelados y se les hizo un pase al menos una vez antes de su empleo en RPMI 1640. Se colectaros las células a partir de los cultivos subconfluentes empleando tripsinización mínima. Se diluyeron las células hasta la densidad apropiada para cada línea celular (en dependencia del tiempo de duplicación del número celular) en RPMI 1640, y se plantaron en 60 pocillos de una placa de 96 pocillos en un volumen de 100 μ l por pocillo (o sea, no se emplearon los pocillos externos de la placa). Se 15 incubaron las placas durante toda la noche a 37°C. A continuación de esta incubación, se realizaron diluciones de referencia en escala log y se añadieron las sustancias de ensayo en 900 μ l por pocillo, se emplearon 6 réplicas para ensayar todos los compuestos de prueba, los compuestos de referencia y los controles de medio. Se incubaron las placas durante otro período de 72 horas antes del análisis. Se añadió MTT (5 mg/ml) a cada pocillo y se reincubaron las placas durante 3-4 h. Se eliminó de las placas el MTT que no había reaccionado y se disolvieron los cristales 20 de fromazan formados a partir del MTT en DMSO y se leyó la absorbancia característica a 570 nm. Se calculó la concentración (nM) de cada compuesto de prueba y de cada compuesto de referencia, que dio como resultado un 50% de inhibición máxima (IC_{50}) para cada línea celular y se reportó junto al porcentaje máximo de inhibición observado (I_m), ver Tabla XIII. Para referencia, la rapamicina posee un IC_{50} de 200 nM y un I_m de 40% en la línea celular HT29 y un IC_{50} de 0,03 nM y un I_m de 56% en la línea celular MCF-7.

25

30

TABLA XIII

Ensayo	1		6		16		3		9		8	
	IC_{50}	I_m										
HT29	50,1	38	25	38	15,8	25	63,1	37	12,6	35	63	30
rIC ₅₀												
MCF-7	3,2	38	126	48	2	32	20	38	17,8	40	20	38
rIC ₅₀												

Reacción mixta de linfocitos

45

Desarrollada originalmente para evaluar la compatibilidad de tejidos con anterioridad a los alotrasplantes, la MLR ofrece un modelo establecido para la reacción inmune *in Vitro* (SOULILLOU, J.P., *et al.* (1975); T. Meo. "Immunological Methods", L. Lefkovits and B. Pernis, Eds., Academic Press, N.Y. pp. 227-239 (1979)). La MLR se llevó a cabo mediante la mezcla de linfocitos esplénicos aislados a partir de ratones C57BU6 (5×10^5 células) con linfocitos esplénicos inhibidos a partir de ratones CBA ($2,5 \times 10^5$ células). Los linfocitos CBA inhibidos inducen una respuesta proliferativa en linfocitos C57BU6 y esto se determinó mediante la incorporación de timidita (3H) al ADN, como medida de la proliferación de linfocitos esplénicos aislados a partir de ratones C57BL/6. Se ensayó el efecto antiproliferativo para analizar la presencia de diluciones en escala log de compuestos de referencia, compuestos de prueba y controles de medios durante un período de 72 h a 37°C. Se calculó la concentración de cada compuesto de prueba y de cada compuesto de referencia que inhibía la proliferación de los linfocitos en 50% (IC_{50}), en comparación con la proliferación del control, para cada línea celular, y se reportó como el cociente de la concentración de rapamicina requerida para inhibir la proliferación de los linfocitos en 50% (rIC₅₀), ver Tabla XIV.

50

55

60

TABLA XIV

Ensayo	1	6	16	3	9	8
MLR rIC ₅₀	9,4	8,8	>14,7	7,9	6,5	4,1

65

Ensayo antifúngico

Las actividades antifúngicas comparativas de los compuestos de prueba y de referencia se determinaron con los hongos patogénicos *Candida albicans* DSM5816, *Candida albicans* DSM 1386 y *Candida glabrata* DSM 11226.

5 Esto se llevó a cabo empleando una adaptación de las placas de microtitulación del Método NCCLS de Referencia para la prueba de susceptibilidad a la dilución del caldo de cultivo antifúngico para levaduras: Estándar aprobado (M27-A, vol. 17 No. 9. (1997). Se inocularon las cepas de levadura (10^4 cfu/ml) a medio RPMI 1640 que contenía 0,165 mM de MOPS, pH 7. Se determinó el crecimiento en presencia de diluciones de escala log de los compuestos de referencia, los compuestos de prueba y los controles de los medios luego de la incubación con agitación a 37°C,

10 durante 24 h. Se determinaron la concentración inhibitoria mínima (MIC) y la actividad fungicida mínima (MFC) para los compuestos de prueba y se expresó como el cociente de la concentración inhibitoria mínima de la rapamicina (rMIC respectivamente), ver Tabla XV.

15

TABLA XV

Ensayo	1	6	16	3	9	8
C. albicans DSM 5816 rMIC	1	1	1	1	1	1
C. albicans DSM 1386 rMIC	5	5	5	1	1	1
C. glabrata DSM 11226 rMIC	5	5	5	1	1	1

25 **Referencias**

- Alarcon, C.M., Heitman, J., y Cardenas, M.E. (1999) Protein kinase activity and identification of a toxic effector domain of the target of rapamycin TOR proteins in yeast. *Molecular Biology of the Cell* 10: 2531-2546.
- Aparicio, J.F., Molnár, I., Schwecke, T., König, A., Haydock, S.F., Khaw, L.E., Staunton, J., y Leadlay, P.F. (1996) Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene* 169: 9-16.
- Baker, H., Sidorowicz, A., Sehgal, S.N., y Vézina, C. (1978) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. III. *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Journal of Antibiotics* 31: 539-545.
- Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E.T., Nagaraja Rao, R., y Schoner, B.E. (1992) Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* 116: 43-49.
- Blanc, V., Lagneaux, D., Didier, P., Gil, P., Lacroix, P., y Crouzet, J. (1995) Cloning and analysis of structural genes from *Streptomyces pristinaespiralis* encoding enzymes involved in the conversion of pristinamycin IIB to pristinamycin IIA (PIIA): PIIA synthase and NADH: riboflavin 5'-phosphate oxidoreductase. *Journal of Bacteriology* 177: 5206-5214.
- 45 Blanc, V., Gil, P., Bamas-Jacques, N., Lorenzon, S., Zagorec, M., Schleuniger, J., Bisch, D., Blanche, F., De-bussche, L., Crouzet, J., y Thibaut, D. (1997) Identification and analysis of genes from *Streptomyces pristinaespiralis* encoding enzymes involved in the biosynthesis of the 4-dimethylamino-L-phenylalanine precursor of pristinamycin I. *Molecular Microbiology* 23: 191-202.
- Box, S.J., Shelley, P.R., Tyler, J.W., Verrall, M.S., Warr, S.R.C., Badger, A.M., Levy, M.A., y Banks, R.M. (1995) 27-O-Demethylrapamycin, an immunosuppressant compound produced by a new strain of *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Antibiotics* 48:1347-1349.
- Brown, E.J., Albers, M.W., Shin, T.B., Ichikawa, K., Keith, C.T., Lane, W.S., y Schreiber, S.L (1994) A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369: 756-758.
- 60 Brunn, G.J., Williams, J., Sabers, C., Wiederrecht, G., Lawrence, J.C., y Abraham, R.T. (1996) Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO Journal* 15: 5256-5267.
- Cao, W., Mohacs, P., Shorthouse, R., Pratt, R. y Morris, R.E. (1995). Effects of rapamycin on growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis. Inhibition of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor action and antagonism of rapamycin by FK506. *Transplantation* 59(3): 390-395.
- 65 Carlson, R.P., Hartman, D.A., Tomchek, L.A., Walter, T.L., Lugay, J.R., Calhoun, W., Sehgal, S.N., Chang, J.Y. (1993). Rapamycin, a potential disease-modifying antiarthritic drug. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266(2):1125-38.

- Chambraud, B., Radanyi, C., Camonis, J.H., Shazand, K., Rajkowski, K., y Baulieu, E.E. (1996)** FAP48, a new protein that forms specific complexes both immunophilins FKBP59 and FKBP12. Prevention by the immunosuppressant drugs FK506 and rapamycin. *Journal of Biological Chemistry* 271: 32923-32929.
- 5 **Chang, J.Y., Sehgal, S.N., y Bansbach, C.C. (1991)** FK506 and rapamycin: novel pharmacological probes of the immune response. *Trends in Pharmacological Sciences* 12: 218-223.
- 10 **Chen, J., Zheng, X.F., Brown, E.J., y Schreiber, S.L. (1995)** Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 4947-4951.
- 15 **Chini, M., Crotti, P., Gardelli, C., y Macchia, F. (1992)**, *Tetrahedron*, 48, 3805-3812
- 20 **Choi, J.W., Chen, J., Schreiber, S.L., y Clardy, J. (1996)** Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* 273: 239-242.
- 25 **Chung, L., Liu, L., Patel, S., Carney, J.R., y Reeves, C.D. (2001)** Deletion of rapQNML from the rapamycin gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* gives production of the 16-O-desmethyl-27-desmethox analog. *Journal of Antibiotics* 54: 250-256.
- 30 **Corey, E. J. y Huang, H., (1989)** *Tetrahedron Lett.*, 30, 5235-5238
- 35 **DiLella, A.G., y Craig, R.J. (1991)** Exon organization of the human FKBP-12 gene: correlation with structural and functional protein domains. *Biochemistry* 30: 8512-8517.
- 40 **Du, L.C., Sánchez, C., Chen, M., Edwards, D.J., y Shen, B. (2000)** The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chemistry & Biology* 7: 623-642.
- 45 **Dudkin, L., Dilling, M.B., Cheshire, P.J., Harwood, F.C., Hollingshead, M., Arbuck, S.G., Travis, R., Sausville, E.A., Houghton, P.J. (2001)**. Biochemical correlates of mTOR inhibition by the rapamycin ester CCI-779 and tumor growth inhibition. *Clin. Cancer Res.* 7(6):1758-64
- 50 **Fehr, T., Sanglier, J.-J., Schuler, W., Gschwind, L., Ponelle, M., Schilling, W., Wioland, C. (1996)**. Antascomicins A, B, C, D and E: Novel FKBP12 binding compounds from a Micromonospora strain. *J. Antibiot.* 49(3): 230-233.
- 55 **Ferrari, S., Pearson, R.B., Siegmann, M., Kozma, S.C., y Thomas, G. (1993)** The immunosuppressant rapamycin induces inactivation of P70s6k through dephosphorylation of a novel set of sites. *Journal of Biological Chemistry* 268: 16091-16094.
- 60 **Findlay J.A, y Radics, L. (1980)** *Canadian Journal of Chemistry* 58:579.
- 65 **Fishbein, T.M., Florman, S., Gondolesi, G., Schiano, T., LeLeiko, N., Tschemia, A., Kaufman, S. (2002)**. Intestinal transplantation before and after the introduction of sirolimus. *Transplantation*. 73(10):1538-42.
- 70 **Foey, A., Green, P., Foxwell, B., Feldmann, M., Brennan, F. (2002)**. Cytokine-stimulated T cells induce macrophage IL-10 production dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and p70S6K: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 4(1):64-70. Epub 2001 Oct 10.
- 75 **Gaißer, S., Reather, J., Wirtz, G., Kellenberger, L., Staunton, J., and Leadlay, P.F. (2000)** A defined system for hybrid macrolide biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *Molecular Microbiology* 36: 391-401.
- 80 **Gaißer, S., Lill, R., Staunton, J., Mendez, C., Salas, J., Leadlay, PF. (2002)** Parallel pathways for oxidation of 14- membered polyketide macrolactones in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol Microbiol* 44:771-81.
- 85 **Galat, A. (2000)** Sequence diversification of the FK506-binding proteins in several different genomes. *European Journal of Biochemistry* 267: 4945-4959.
- 90 **Gregory, C.R., Huie, P., Billingham, M.E. y Morris, R.E. (1993)**. Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury. Its effect on cellular, growth factor and cytokine response in injured vessels. *Transplantation* 55(6):1409-1418.
- 95 **Gregory MA, Till R, Smith, MCM. (En prensa)** Integration site for *Streptomyces* phage Φ BT1 and the development of site-specific integrating vectors. *J Bacteriol*.
- 100 **Guba, M., von Breitenbuch, P., Steinbauer, M., Koehl, G., Flegel, S., Hornung, M., Bruns, C.J., Zuelke, C., Farkas, S., Anthuber, M., Jauch, K.W., y Geissler, E.K. (2002)** Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nature Medicine* 8: 128-135.

- Hamilton, G.S., y Steiner, J.P. (1998)** Immunophilins: Beyond immunosuppression. *Journal of Medicinal Chemistry* 41: 5119-5143.
- 5 **Hara, K., Yonezawa, K., Kozlowski, M.T., Sugimoto, T., Andrabi, K., Weng, Q.P., Kasuga, M., Nishimoto, I., y Avruch, J. (1997)** Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *Journal of Biological Chemistry* 272: 26457-26463.
- 10 **Hardwick, J.S., Kuruvilla, F.G., Tong, J.K., Shamji, A.F., y Schreiber, S.L (1999)** Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 14866-14870.
- 15 **Hatanaka, H., Kino, T., Miyata, S., Inamura, N., Kuroda, A., Goto, T., Tanaka, H., Okuhara, M. (1988).** FR-900520 and FR-900523, novel immunosuppressants isolated from a Streptomyces. II. Fermentation, isolation and physicochemical and biological characteristics. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 41(11):1592-601.
- 20 **Hatanaka H, Kino T, Asano M, Goto T, Tanaka H, Okuhara M. (1989).** FK-506 related compounds produced by *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 42(4):620-2.
- 25 **Hendrickson, B.A., Zhang, W., Craig, R.J., Jin, Y.J., Bierer, B.E., Burakoff, S., y DiLella, A.G. (1993)** Structural organization of the genes encoding human and murine FK506-binding protein (FKBP)13 and comparison to FKBP1. *Gene* 134: 271-275.
- 30 **Hentges, K.E., Sirry, B., Gingeras, A.C., Sarbassov, D., Sonenberg, N., Sabatini, D., y Peterson, A.S. (2001)** FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 13796-13801.
- 35 **Hopwood, D.A. (1997)** Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chemical Reviews* 97: 2465-2497.
- 40 **Hosted, T.J., y Baltz, R.H. (1997)** Use of rpsL for dominance selection and gene replacement in *Streptomyces roseosporus*. *Journal of Bacteriology* 179: 180-186.
- 45 **Hung, D.T. y Schreiber, S.L. (1992)** cDNA cloning of a human 25 kDa FK506 and rapamycin binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 184: 733-738.
- 50 **Hung, D.T., Jamison, T.F., y Schreiber, S.L. (1996)** Understanding and controlling the cell cycle with natural products. *Chemistry & Biology* 3: 623-639.
- 55 **Jain, S., Bicknell, G.R., Whiting, P.H., Nicholson, M.L. (2001).** Rapamycin reduces expression of fibrosis-associated genes in an experimental model of renal ischaemia reperfusion injury. *Transplant Proc.* 33(1-2):556-8.
- 60 **Jin, Y.J., Burakoff, S.J., y Bierer, B.E. (1992)** Molecular cloning of a 25-kDa high affinity rapamycin binding protein, FKBP25. *Journal of Biological Chemistry* 267:10942-10945.
- 65 **Kahan, B.D., Chang, J.Y., y Sehgal, S.N. (1991)** Preclinical evaluation of a new potent immunosuppressive agent, rapamycin. *Transplantation* 52: 185-191.
- 70 **Kahan, B.D., y Camardo, J.S. (2001)** Rapamycin: Clinical results and future opportunities. *Transplantation* 72: 1181-1193.
- 75 **Kallen, J. A., Sedrani, R., y Cottens S. (1996)** X-ray crystal structure of 28-O-methylrapamycin complexed with FKBP12: Is the cyclohexyl moiety part of the effector domain of rapamycin? *Journal of the American Chemical Society* 118: 5857-5861.
- 80 **Kawasome, H., Papst, P., Webb, S., Keller, G.M., Johnson, G.L., Gelfand, E.W., y Terada, N. (1998)** Targeted disruption of p70s6k defines its role in protein synthesis and rapamycin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 5033-5038.
- 85 **Khaw, C.E., Böhm, G.A., Metcalfe, S., Staunton, J., y Leadlay, P.F. (1998)** Mutational biosynthesis of novel rapamycins by a strain of *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 5491 disrupted in rapL, encoding a putative lysine cyclodeaminase. *Journal of Bacteriology* 180: 809-814.
- 90 **Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., y Hopwood, D.A. (2000)** Practical Streptomyces Genetics, *John Innes Foundation*, Norwich.
- 95 **Kirby, B., y Griffiths, C.E.M. (2001)** Psoriasis: the future. *British Journal of Dermatology* 144:37-43.

- 5 **Kirchner, G.I., Winkler, M., Mueller L., Vidal, C., Jacobsen, W., Franzke, A., Wagner, S., Blick, S., Manns M.P., y Sewing K. F.**(2000) Pharmacokinetics of SDZ RAD and cyclosporin including their metabolites in seven kidney graft patients after the first dose of SDZ RAD. *British Journal of Clinical Pharmacology* 50:449-454.
- 10 **König, A., Schwecke, T., Molnar, I., Böhm, G., Lowden, P.A.S., Staunton, J., y Leadlay, P.F.**(1997) The piperolate incorporating enzyme for the biosynthesis of the immunosuppressant rapamycin. Nucleotide sequence analysis, disruption and heterologous expression of rapP from *Streptomyces hygroscopicus*. *European Journal of Biochemistry* 247: 526-534.
- 15 **Kunz, J., Loeschmann, A., Deuter-Reinhard, M., y Hall, M.N.**(2000) FAP1, a homologue of human transcription factor NF-X1, competes with rapamycin for binding to FKBP12 in yeast. *Molecular Microbiology* 37: 1480-1493.
- 20 **Kuo, C.J., Chung, J.K., Fiorentino, D.F., Flanagan, W.M., Blenis, J., y Crabtree, G.R.**(1992) Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. *Nature* 358: 70-73.
- 25 **Lee, M.H. Pascopella, L., Jacobs, W.R., Jr y Hatfull, G.F**(1991). Site specific integration of mycobacteriophage L5: integration-proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis* and Bacille Calmette-Guerin: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:3111-3115.
- 30 **Lee MH, Pascopella L, Jacobs WR Jr, Hatfull GF.**(1991), Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration- proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and bacille Calmette-Guerin. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 88:3111-5.
- 35 **Liang, J., Choi, J., y Clardy, J.**(1999) Refined structure of the FKBP12-rapamycin-FRB ternary complex at 2.2 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 55: 736-744.
- 40 **Lomovskaya, N., Fonstein, L., Ruan, X., Stassi, D., Katz, L., y Hutchinson, C.R.**(1997) Gene disruption and replacement in the rapamycin-producing *Streptomyces hygroscopicus* strain ATCC 29253. *Microbiology-Uk* 143: 875-883.
- 45 **Lowden, P.A.S., Böhm, G., Staunton, J., y Leadlay, P.F.**(1996) The nature of the starter unit for the rapamycin polyketide synthase. *Angewandte Chemie* 35: 2249-2251.
- 50 **Lowden, P. A. S., (1997)** Ph.D. Dissertation, University of Cambridge. "Studies on the biosynthesis of rapamycin".
- 55 **Lowden, P.A.S., Wilkinson, B., Böhm, G.A., Handa, S., Floss, H.G., Leadlay, P.F., y Staunton, J.**(2001) Origin and true nature of the starter unit for the rapamycin polyketide synthase. *Angewandte Chemie-International Edition* 40: 777-779.
- 60 **Luengo, J.L., Yamashita, D.S., Dunnington, D., Beck, A.K., Rozamus, L.W., Yen, H.K., Bossard, M.J., Levy, M.A., Hand, A., Newmantarr, T., Badger, A., Fauchette, L., Johnson, R.K., Dalessio, K., Porter, T., Shu, A.Y.L., Heys, R., Choi, J.W., Kongsaeree, P., Clardy, J., y Holt, D.A.**(1995) Structure-Activity Studies of Rapamycin Analogs-Evidence That the C-7 Methoxy Group is Part of the Effector Domain and Positioned at the Fkbp12-Frap Interface. *Chemistry & Biology* 2: 471-481.
- 65 **Lyons, W.E., George, E.B., Dawson, T.M., Steiner, J.P., y Snyder, S.H.**(1994) Immunosuppressant FK506 promotes neurite outgrowth in cultures of PC12 cells and sensory ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:3191-3195.
- 70 **MacNeil, D.J., Gewain, K.M., Ruby, C.L., Dezeny, G., Gibbons, P.H., y MacNeil, T.**(1992) Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* 111:61-68.
- 75 **Marahiel, M.A., Stachelhaus, T., y Mootz, H.D.**(1997) Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews* 97: 2651-2673.
- 80 **Matsuura, M., Noguchi, T., Yamaguchi, D., Aida, T., Asayama, M., Takahashi, H. y Shirai, M.**(1996). The sre gene (ORF469) encodes a site-specific recombinase responsible for integration of the R4 phage genome. *J Bact.* 178 (11):3374-3376.
- 85 **McAlpine, J. B., Swanson S. J., Jackson, M., Whittem, D.N.**(1991). Revised NMR assignments for rapamycin. *Journal of Antibiotics* 44: 688-690.
- 90 **Meo, T.** in "Immunological Methods", L Lefkovits y B. Pernis, Eds., *Academic Press*, N.Y. pp. 227-239 (1979).
- 95 **Molnár, I., Aparicio, J.F., Haydock, S.F., Khaw, L.E., Schwecke, T., König, A., Staunton, J., y Leadlay, P.F.**(1996) Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of genes flanking the polyketide synthase. *Gene* 169: 1-7.

- 5 **Morice, M.C., Serruys, P.W., Sousa, J.E., Fajadet, J., Ban Hayashi, E., Perin, M., Colombo, A., Schuler, G., Barragan, P., Guagliumi, G., Molnar, F., Falotico, R.** (2002). RAVEL Study Group. Randomized Study with the Sirolimus-Coated Bx Velocity Balloon-Expandable Stent in the Treatment of Patients with *de Novo* Native Coronary Artery Lesions. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N. Eng. J. Med.* 346(23):1773-80.
- 10 **Motamedi, H., Shafiee, A., Cai, S.J., Streicher, S.L., Arisen, B.H., y Miller, R.R.** (1996) Characterization of methyltransferase and hydroxylase genes involved in the biosynthesis of the immunosuppressants FK506 and FK520. *Journal of Bacteriology* 178: 5243-5248.
- 15 **Motamedi, H., Cai, S.J., Shafiee, A., y Elliston, K.O.** (1997) Structural organization of a multifunctional polyketide synthase involved in the biosynthesis of the macrolide immunosuppressant FK506. *European Journal of Biochemistry* 244: 74-80.
- 20 **Motamedi, H., y Shafiee, A.** (1998) The biosynthetic gene cluster for the macrolactone ring of the immunosuppressant FK506. *European Journal of Biochemistry* 256: 528-534.
- 25 **Myckatyn, T.M., Ellis, R.A., Grand, A.G., Sen, S.K., Lowe, J.B. 3rd, Hunter, D.A., Mackinnon, S.E.** (2002). The effects of rapamycin in murine peripheral nerve isografts and allografts. *Plast. Reconstr. Surg.* 109(7):2405-17.
- 30 **Navé, B.T., Ouwens, D.M., Withers, D.J., Alessi, D.R., y Sheperd, P.R.** (1999) Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and aminoacid deficiency on protein translation. *Biochemical Journal* 344:427-431.
- 35 **Navia, M.A.** (1996) Protein-drug complexes important for immunoregulation and organ transplantation. *Current Opinion in Structural Biology* 6: 838-847.
- 40 NCCLS Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing for Yeasts: Approved Standard M27-A, vol. 17 No. 9. (1997).
- 30 **Nishida, H., Sakakibara, T., Aoki, F., Saito, T., Ichikawa, K., Inagaki, T., Kojima, Y., Yamauchi, Y., Huang, L.H., Guadliana, M.A., Kaneko, T., y Kojima, N.** (1995) Generation of novel rapamycin structures by microbial manipulations. *Journal of Antibiotics* 48: 657-666.
- 35 **Nielsen, J.B., Hsu, M.J., Byme, K.M., y Kaplan, L.** (1991) Biosynthesis of the immunosuppressant immunomycin: the enzymology of pipecolate incorporation. *Biochemistry* 30: 5789-5796.
- 40 **Paget, M.S.B., Chamberlin, L., Atrih, A., Foster, S.J., y Buttner, M.J.** (1999) Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor σ E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*. 181: 204-211.
- 45 **Paiva, N.L., Demain, A.L., y Roberts, M.F.** (1991) Incorporation of acetate, propionate, and methionine into rapamycin By *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Natural Products* 54: 167-177.
- 50 **Paiva, N.L., Demain, A.L., y Roberts, M.F.** (1993) The immediate precursor of the nitrogen-containing ring of rapamycin is free pipecolic acid. *Enzyme and Microbial Technology* 15: 581-585.
- 55 **Patterson, C.E., Schaub, T., Coleman, E.J., y Davies E.C.** (2000) Developmental regulation of FKBP65. An ER localized extracellular matrix binding-protein. *Molecular Biology of the Cell* 11:3925-3935.
- 50 **Pfeifer, B.A., Admiraal, S.J., Gramajo, H., Cane, D.E., y Khosla, C.** (2001) Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*. *Science* 291: 1790-1792.
- 55 **Powell, N., Till, S., Bungre, J., Corrigan, C.** (2001). The immunomodulatory drugs cyclosporin A, mycophenolate mofetil, and sirolimus (rapamycin) inhibit allergen-induced proliferation and IL-5 production by PBMCs from atopic asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108(6):915-7.
- 60 **Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L., Shapiro, A.M., Rajotte, R.V., Power, R.** (2002). Combination therapy with sirolimus and interleukin-2 prevents spontaneous and recurrent autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 51 (3):638-45.
- 65 **Raught, B., Gingras, A.C., y Sonenberg, N.** (2001) The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 7037-7044.
- 65 **Rawlings, B.J.** (2001) Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part A). *Natural Product Reports* 18: 190-227.
- 65 **Reather, J. A., (2000)**, Ph.D. Dissertation, University of Cambridge. "Late steps in the biosynthesis of macrocyclic lactones".

- Reitamo, S., Spuls, P., Sassolas, B., Lahfa, M., Claudy, A., Griffiths, C.E.; Sirolimus European Psoriasis Study Group. (2001). Efficacy of sirolimus (rapamycin) administered concomitantly with a subtherapeutic dose of cyclosporin in the treatment of severe psoriasis: a randomized controlled trial. *Br. J. Dermatol.* 145(3):438-45.
- 5 Rosen, M.K., y Schreiber, S.L. (1992) Natural products as probes of cellular function: studies of immunophilins. *Angewandte Chemie-International Edition in English* 31: 384-400.
- 10 Roymans, D., y Slegers, H. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *European Journal of Biochemistry* 268:487-498.
- 15 Ruan, X.A., Stass, D., Lax, S.A., y Katz, L. (1997) A second type-I PKS gene cluster isolated from *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253, a rapamycin-producing strain. *Gene* 203: 1-9.
- 20 Salituro, G.M., Zink, D.L., Dahl, A., Nielsen, J., Wu, E., Huang, L., Kastner C., Dumont, F. (1995) Meridamycin: a novel nonimmunosuppressive FKBP12 ligand from *Streptomyces hygroscopicus*. *Tetrahedron letters* 36: 997-1000.
- 25 Schwarzer, D., y Marahiel, M.A. (2001) Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften* 88: 93-101.
- 30 Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, N.Y.
- 35 Schreiber, S.L., y Crabtree, G.R. (1992) The mechanism of action of cyclosporine A and FK506. *Immunology Today* 13: 136-142.
- 40 Schwecke, T., Aparicio, J.F., Molnár, I., König, A., Khaw, L.E., Haydock, S.F., Oliynyk, M., Caffrey, P., Cortés, J., Lester, J.B., Böhm, G.A., Staunton, J., y Leadlay, P.F. (1995) The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 7839-7843.
- 45 Sedrani, R., Cottens, S., Kallen, J., y Schuler, W. (1998) Chemical modifications of rapamycin: the discovery of SDZ RAD. *Transplantation Proceedings* 30: 2192-2194.
- 50 Sehgal, S.N., Baker, H., y Vézina, C. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic II. Fermentation, isolation and characterization. *The Journal of Antibiotics* 28: 727-733.
- 55 Shepherd, P.R., Withers, D.J., y Siddle K. (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochemical Journal* 333: 471-490.
- 60 Shima, J., Hesketh, A., Okamoto, S., Kawamoto, S., y Ochi, K. (1996) Induction of actinorhodin production by rpsL (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology* 178: 7276-7284.
- 65 Sigal, N.H., y Dumont, F.J. (1992) Cyclosporine A, FK-506, and rapamycin: pharmacological probes of lymphocyte signal transduction. *Annual Review of Immunology* 10: 519-560.
- 70 Sieuwerts, A.M., Klijn, J.G., Peters, H.A., Fockens, J.A. (1995). The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *Eur. J Clin. Chem. Clin. Biochem.* 33(11):813-23.
- 75 Smovkina, T., Mazodier, P., Boccard, F., Thompson, C.J. y Guerineau, M. (1990) Construction of a series of pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes. *Gene* 94: 53-59.
- 80 SOULILLOU, J.P., CARPENTER, C.B., LUNDIN, A.P. y STROM, T.B. (1975) Augmentation of proliferation and *in vitro* production of cytotoxic cells by 2-ME in the rat. *J Immunol.* 115(6):1566-71.
- 85 Staunton, J., y Weissman, K.J. (2001) Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Product Reports* 18: 380-416.
- 90 Steiner, J.P., Hamilton, G.S., Ross, D. T., Valentine, H.L., Guo, H., Connolly, M.A., Liang, S., Ramsey, C., Li, J.-H.J., Huang, W., Howorth, P., Soni, R., Fuller, M., Sauer, H., Nowotnik, A.C., y Suzdak, P.D. (1997) Neutrophic immunophilin ligands stimulate structural and functional recovery in neurodegenerative animal models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:2019-2024.
- 95 Tang, S.J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A.-C., Sonenberg, N., y Schuman, E.M. (2002) A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1:467-472.

ES 2 296 063 T3

- Van Duyne, G.D., Standaert, R.F., Karplus, P.A., Schreiber, S.L., y Clardy, J. (1993) Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *Journal of Molecular Biology* 229: 105-124.
- Van Mellaert, L., Mei, L., Lammertyn, E., Schacht, S., y Anné, J. (1998) Site-specific integration of bacteriophage VWB genome into *Streptomyces venezuelae* and construction of a VWB-based integrative vector. *Microbiology* 144:3351-3358.
- Vézina, C., Kudelski, A., y Sehgal, S.N. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of Antibiotics* 28: 721-726.
- Vilella-Bach, M., Nuzzi, P., Fang, Y.M., y Chen, J. (1999) The FKBP12-rapamycin-binding domain is required for FKBP12-rapamycin-associated protein kinase activity and G1 progression. *Journal of Biological Chemistry* 274: 4266-4272.
- Waller, J.R., y Nicholson, M.L. (2001) Molecular mechanisms of renal allograft fibrosis. *British Journal of Surgery* 88:1429-1441.
- Warner, L.M., Adams, L.M., Chang, J.Y., Sehgal, S.N. (1992). A modification of the *in vivo* mixed lymphocyte reaction and rapamycin's effect in this model. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 64(3):242-7.
- Weber, T., y Marahiel, M.A. (2001) Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases. *Structure* 9: R3-R9
- Welch, J. T. y Seper, K., W., (1988), *J. Org. Chem.*, 53, 2991-2999
- Wilkinson, B., Foster, G., Rudd, B.A.M., Taylor, N.L., Blackaby, A.P., Sidebottom, P.J., Cooper, D.J., Dawson, M.J., Buss, A.D., Gaisser, S., Böhm, I.U., Rowe, C.J., Cortés, J., Leadlay, P.F. y Staunton, J. (2000). Novel octaketide macrolides related to 6-deoxoerythronolide B provide evidence for iterative operation of the erythromycin polyketide synthase. *Chemistry & Biology* 7: 111-117.
- Wong, G.K., Griffith, S., Kojima, I., y Demain, A.L. (1998) Antifungal activities of rapamycin and its derivatives, prolylrapamycin, 32-desmethylrapamycin, and 32-desmethoxyrapamycin. *Journal of Antibiotics* 51: 487-491.
- Wu, K., Chung, L., Revill, W.P., Katz, L, y Reeves, C.D. (2000) The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units. *Gene* 251: 81-90.
- Yern, A.W., Tomasselli, A.G., Heinrikson, R.L., Zurcher-Neely, H., Ruff, V.A., Johnson, R.A., y Deibel, M.R. (1992) The Hsp56 component of steroid receptor complexes binds to immobilized FK506 and shows homology to FKBP-12 and FKBP-13. *Journal of Biological Chemistry* 267: 2868-2871.
- Yu, K., Toral-Barza, L., Discafani, C., Zhang, W.G., Skotnicki, J., Frost, P., Gibbons, J.J. (2001) mTOR, a novel target in breast cancer: the effect of CCI-779, an mTOR inhibitor, in preclinical models of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 8:249-258.
- Zhu, J., Wu J., Frizell, E., Liu, S.L., Bashey, R., Rubin, R., Norton, P., Zern, M.A. (1999). Rapamycin inhibits hepatic stellate cell proliferation *in vitro* and limits fibrogenesis in an *in vivo* model of liver fibrosis. *Gastroenterology*. 117(5): 1198-204.
- Referencias citadas en la descripción**
- Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en la compilación de las referencias, los errores u omisiones no pueden ser excluidos y la OEP niega toda responsabilidad a este respecto.
- Documentos de patentes citados en la descripción**
- | | |
|--|-----------------------|
| • US 3929992 A [0002] [0003] | • US 5221670 A [0013] |
| • US 3993749 A [0002] [0003] | • US 5955457 A [0013] |
| • US 5665772 A, Sedrani, R. [0003] [0013] [0013] | • WO 9804279 A [0013] |
| • WO 0103692 A [0003] | • US 6015815 A [0013] |
| • US 6150513 A, Wu [0004] | • US 5432183 A [0013] |

- US 5109112 A [0010]
- US 5457182 A [0010]
- 5 • US 5498597 A [0010]
- US 5354845 A [0010]
- US 5763590 A [0010]
- 10 • US 5362718 A [0013]
- WO 9641807 A [0013]
- US 5728710 A [0013]
- 15 • US 5378836 A [0013]
- US 5138051 A [0013]
- 20 • US 5391730 A [0013]
- US 5023262 A [0013]
- US 5563145 A [0013]
- 25 • US 5446048 A [0013]
- US 5912253 A [0013]
- WO 9409010 A [0014]
- WO 9854308 A [0015] [0080]
- WO 0179520 A [0016] [0061] [0073] [0163] [0179]
- WO 03048375 A [0016] [0061]
- WO 0134816 A [0016]
- WO 98101571 A [0060]
- WO 9313663 A [0076]
- WO 9792358 A [0076]
- WO 9801546 A [0076]
- WO 0000618 A [0076]
- WO 0001827 A [0076]
- WO 0214482 A [0076]
- WO 05075774 A [0274]
- GB 0216509 A [0274]
- GB 0224922 A [0274]

Literatura no-patentada citada en esta descripción

- 30 • FINDLAY *et al.* Cumulative Index. *Chemical Abstracts*, 1980, 1982-1986 [0002]
- SOULILLOU, J.P.; T. MEO. *et al.* Immunological Methods. *Academic Press*, 1975, 227-239 [0271]
- 35 • ALARCON, C.M.; HEITMAN, J.; CARDENAS, M.E. Protein kinase activity and identification of a toxic effector domain of the target of rapamycin TOR proteins in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 1999, vol. 10, 2531-2546 [0273]
- 40 • APARICIO, J.F.; MOLNÁR, L; SCHWECKE, T.; KÖNIG, A; HAYDOCK, S.F.; KHAW, L.E.; STAUNTON, J.; LEADLAY, P.F. Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene*, 1996, vol. 169, 9-16 [0273]
- 45 • BAKER, H; SIDOROWICZ, A.; SEHGAL, S.N.; VÉZINA, C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. III. *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Journal of Antibiotics*, 1978, vol. 31, 539-545 [0273]
- BIERMAN, M.; LOGAN, R.; O'BRIEN, K.; SENO, E.T.; NAGARAJA RAO, R.; SCHONER, B.E. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 1992, vol. 116, 43-49 [0273]
- 50 • BLANC, V.; LAGNEAUX, D.; DIDIER, P.; GIL, P.; LACROIX, P.; CROUZET, J. Cloning and analysis of structural genes from *Streptomyces pristinaespiralis* encoding enzymes involved in the conversion of pristinamycin IIB to pristinamycin TIA (PITA): PIZA synthase and NADH:riboflavin 5'-phosphate oxidoreductase. *Journal of Bacteriology*, 1995, vol. 177, 5206-5214 [0273]
- 55 • BLANC, V.; GIL, P.; BAMAS-JACQUES, N.; LORENZON, S.; ZAGOREC, M.; SCHLEUNIGER, J.; BISCH, D.; BLANCHE, F.; DEBUSSCHE, L.; CROUZET, J. Identification and analysis of genes from *Streptomyces pristinaespiralis* encoding enzymes involved in the biosynthesis of the 4-dimethylamino-L-phenylalanine precursor of pristinamycin I. *Molecular Microbiology*, 1997, vol. 23, 191-202 [0273]
- 60 • BOX, S.J.; SHELLEY, P.R.; TYLER, J.W.; VERRALL, M.S.; WARR, S.R.C.; BADGER, A.M.; LEVY, M.A.; BANKS, R.M. 27-O-Demethylrapamycin, an immunosuppressant compound produced by a new strain of *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Antibiotics*, 1995, vol. 48, 1347-1349 [0273]
- 65 • BROWN, E.J.; ALBERS, M.W.; SHIN, T.B.; ICHIKAWA, K.; KEITH, C.T.; LANE, W.S.; SCHREIBER, S.L. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*, 1994, vol. 369, 756-758 [0273]

- BRUNN, G.J.; WILLIAMS, J.; SABERS, C.; WIEDERRECHT, G.; LAWRENCE, J.C.; ABRAHAM, R.T. Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO Journal*, 1996, vol. 15, 5256-5267 [0273]
- 5 • CAO, W.; MOHACSI, P.; SHORTHOUSE, R.; PRATT, R.; MORRIS, R.E. Effects of rapamycin on growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis. Inhibition of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor action and antagonism of rapamycin by FK506. *Transplantation*, 1995, vol. 59 (3), 390-395 [0273]
- 10 • CARLSON, R.P.; HARTMAN, DA.; TOMCHEK, L.A.; WALTER, T.L.; LUGAY, J.R.; CALHOUN, W.; SEHGAL, S.N.; CHANG, J.Y. Rapamycin, a potential disease-modifying antiarthritic drug. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1993, vol. 266 (2), 1125-38 [0273]
- 15 • CHAMBRAUD, B.; RADANYI, C.; CAMONIS, J.H.; SHAZAND, K.; RAJKOWSKI, K.; BAULIEU, E.E. FAP48, a new protein that forms specific complexes both immunophilins FKBP59 and FKBP12. Prevention by the immunosuppressant drugs FK506 and rapamycin. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, vol. 271, 32923-32929 [0273]
- 20 • CHANG, J.Y.; SEHGAL, S.N.; BANSBACH, C.C. FK506 and rapamycin: novel pharmacological probes of the immune response. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1991, vol. 12, 218-223 [0273]
- 25 • CHEN, J.; ZHENG, X.F.; BROWN, E.J.; SCHREIBER, S.L. Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, vol. 92, 4947-4951 [0273]
- CHINI, M.; CROTTI, P.; GARDELLI, C.; MACCHIA, F. *Tetrahedron*, 1992, vol. 48, 3805-3812 [0273]
- 30 • CHOI, J.W.; CHEN, J.; SCHREIBER, S.L.; CLARDY, J. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science*, 1996, vol. 273, 239-242 [0273]
- CHUNG, L.; LIU, L.; PATEL, S.; CARNEY, J.R.; REEVES, C.D. Deletion of rapQNML from the rapamycin gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* gives production of the 16-O-desmethyl-27-desmethox analog. *Journal of Antibiotics*, 2001, vol. 54, 250-256 [0273]
- 35 • COREY, E. J.; HUANG, H. *Tetrahedron Lett.*, 1989, vol. 30, 5235-5238 [0273]
- DILELLA, A.G.; CRAIG, R.J. Exon organization of the human FKBP-12 gene: correlation with structural and functional protein domains. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 8512-8517 [0273]
- 40 • DU, L.C.; SÁNCHEZ, C.; CHEN, M.; EDWARDS, D.J.; SHEN, B. The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between non-ribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chemistry & Biology*, 2000, vol. 7, 623-642 [0273]
- 45 • DUDKIN, L.; DILLING, M.B.; CHESHIRE, P.J.; HARWOOD, F.C.; HOLLINGSHEAD, M.; ARBUCK, S.G.; TRAVIS, R.; SAUSVILLE, E.A.; HOUGHTON, P.J. Biochemical correlates of mTOR inhibition by the rapamycin ester CCI-779 and tumor growth inhibition. *Clin. Cancer Res.*, 2001, vol. 7 (6), 1758-64 [0273]
- 50 • FEHR, T.; SANGLIER, J.-J.; SCHULER, W.; GSCHWIND, L.; PONELLE, M.; SCHILLING, W.; WIO-LAND, C. Antascomicinc A, B, C, D and E: Novel FKBP1 2 binding compounds from a Micromonospora strain. *J. Antibiot.*, 1996, vol. 49 (3), 230-233 [0273]
- 55 • FERRARI, S.; PEARSON, R.B.; SIEGMANN, M.; KOZMA, S.C.; THOMAS, G. The immunosuppressant rapamycin induces inactivation of P70s6k through dephosphorylation of a novel set of sites. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, vol. 268, 16091-16094 [0273]
- FINDLAY J.A; RADICS, L. Canadian *Journal of Chemistry*, 1980, vol. 58, 579 [0273]
- 60 • FISHBEIN, T.M.; FLORMAN, S.; GONDOLESI, G.; SCHIANO, T.; LELEIKO, N.; TSCHEMIA, A.; KAUFMAN, S. Intestinal transplantation before and alter the introduction of sirolimus. *Transplantation*, 2002, vol. 73 (10), 1538-42 [0273]
- 65 • FOEY, A.; GREEN, P.; FOXWELL, B.; FELDMANN, M.; BRENNAN, F. Cytokine-stimulated T cells induce macrophage IL-10 production dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and p70S6K: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.*, 10 October 2001, vol. 4 (1), 64-70 [0273]

- GAISSER, S.; REATHER, J.; WIRTZ, G.; KELLENBERGER, L.; STAUNTON, J.; LEADLAY, P.F. A defined system for hybrid macrolide biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *Molecular Microbiology*, 2000, vol. 36, 391-401 [0273]
- 5 • GAISSER, S.; LILL, R.; STAUNTON, J.; MENDEZ, C.; SALAS, J.; LEADLAY, P.F. Parallel pathways for oxidation of 14-membered polyketide macrolactones in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol Microbiol*, 2002, vol. 44, 771-81 [0273]
- 10 • GALAT, A. Sequence diversification of the FK506-binding proteins in several different genomes. *European Journal of Biochemistry*, 2000, vol. 267, 4945-4959 [0273]
- 15 • GREGORY, C.R.; HUIE, P.; BILLINGHAM, M.E.; MORRIS, R.E. Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury. Its effect on cellular, growth factor and cytokine response in injured vessels. *Transplantation*, 1993, vol. 55 (6), 1409-1418 [0273]
- 20 • GREGORY MA; TILL R; SMITH, MCM. Integration site for *Streptomyces* phage ΦBT1 and the development of site-specific integrating vectors. *J Bacteriol*. [0273]
- 25 • GUBA, M.; VON BREITENBUCH, P.; STEINBAUER, M.; KOEHL, G.; FLEGEL, S.; HORNUNG, M.; BRUNS, C.J.; ZUELKE, C.; FARKAS, S.; ANTHUBER, M. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor-growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nature Medicine*, 2002, vol. 8, 128-135 [0273]
- 30 • HAMILTON, G.S.; STEINER, J.P. Immunophilins: Beyond immunosuppression. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1998, vol. 41, 5119-5143 [0273]
- 35 • HARA, K.; YONEZAWA, K.; KOZLOWSKI, M.T.; SUGIMOTO, T.; ANDRABI, K.; WENG, Q.P.; KASUGA, M.; NISHIMOTO, I.; AVRUCH, J. Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, vol. 272, 26457-26463 [0273]
- 40 • HARDWICK, J.S.; KURUVILLA, F.G.; TONG, J.K.; SHAMJI, A.F.; SCHREIBER, S.L. Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, vol. 96, 14866-14870 [0273]
- 45 • HATANAKA, H.; KINO, T.; MIYATA, S.; INAMURA, N.; KURODA, A.; GOTO, T.; TANAKA, H.; OKUHARA, M. FR-900520 and FR-900523, novel immunosuppressants isolated from a *Streptomyces*. II. Fermentation, isolation and physicochemical and biological characteristics. *J. Antibiot.*, 1988, vol. 41 (11), 1592-601 [0273]
- 50 • HATANAKA H; KINO T; ASANO M; GOTO T; TANAKA H; OKUHARA M. FK-506 related compounds produced by *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993. *J. Antibiot.*, 1989, vol. 42 (4), 620-2 [0273]
- 55 • HENDRICKSON, B.A; ZHANG, W.; CRAIG, R.J.; JIN, Y.J.; BIERER, B.E.; BURAKOFF, S.; DILELLA, A.G. Structural organization of the genes encoding human and murine FK506-binding protein (FKBP)13 and comparison to FKBP1. *Gene*, 1993, vol. 134, 271-275 [0273]
- 60 • HENTGES, K.E.; SIRRY, B.; GINGERAS, A.C.; SARBASSOV, D.; SONENBERG, N.; SABATINI, D.; PETERSON, A.S. FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, vol. 98, 13796-13801 [0273]
- 65 • HOPWOOD, D.A. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chemical Reviews*, 1997, vol. 97, 2465-2497 [0273]
- 70 • HOSTED, T.J.; BALTZ, R.H. Use of rpsL for dominante selection and gene replacement in *Streptomyces roseosporus*. *Journal of Bacteriology*, 1997, vol. 179, 180-186 [0273]
- 75 • HUNG, D.T.; SCHREIBER, S.L. cDNA cloning of a human 25 kDa FK506 and rapamycin binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1992, vol. 184, 733-738 [0273]
- 80 • HUNG, D.T.; JAMISON, T.F.; SCHREIBER, S.L. Understanding and controlling the cell cycle with natural products. *Chemistry & Biology*, 1996, vol. 3, 623-639 [0273]
- 85 • JAIN, S.; BICKNELL, G.R.; WHITING, P.H.; NICHOLSON, M.L. Rapamycin reduces expression of fibrosis-associated genes in an experimental model of renal ischaemia reperfusion injury. *Transplant Proc*, 2001, vol. 33 (1-2), 556-8 [0273]
- 90 • JIN, Y.J.; BURAKOFF, S.J.; BIERER, B.E. Molecular cloning of a 25-kDa high affinity rapamycin binding protein, FKBP25. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, vol. 267, 10942-10945 [0273]

- KAHAN, B.D.; CHANG, J.Y.; SEHGAL, S.N. Preclinical evaluation of a new potent immunosuppressive agent, rapamycin. *Transplantation*, 1991, vol. 52, 185-191 [0273]
- 5 • KAHAN, B.D.; CAMARDO, J.S. Rapamycin: Clinical results and future opportunities. *Transplantation*, 2001, vol. 72, 1181-1193 [0273]
- 10 • KALLEN, J. A.; SEDRANI, R.; COTTENS S. X-ray crystal structure of 28-O-methylrapamycin complexed with FKBP12: Is the cyclohexyl moiety part of the effector domain of rapamycin?. *Journal of the American Chemical Society*, 1996, vol. 118, 5857-5861 [0273]
- 15 • KAWASOME, H.; PAPST, P.; WEBB, S.; KELLER, G.M.; JOHNSON, G.L.; GELFAND, E.W.; TERADA, N. Targeted disruption of p70s6k defines its role in protein synthesis and rapamycin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, vol. 95, 5033-5038 [0273]
- 20 • KHAW, C.E.; BÖHM, G.A.; METCALFE, S.; STAUNTON, J.; LEADLAY, P.F. Mutational biosynthesis of novel rapamycins by a strain of *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 5491 disrupted in rapL, encoding a putative lysine cyclodeaminase. *Journal of Bacteriology*, 1998, vol. 180, 809-814 [0273]
- 25 • KIESER, T.; BIBB, M.J.; BUTTNER, M.J.; CHATER, K.F.; HOPWOOD, D.A. Practical Streptomyces Genetics. *John Innes Foundation*, 2000 [0273]
- 30 • KIRBY, B.; GRIFFITHS, C.E.M. Psoriasis: the future. *British Journal of Dermatology*, 2001, vol. 144, 37-43 [0273]
- 35 • KIRCHNER, G.I.; WINKLER, M.; MUELLER L.; VIDAL, C.; JACOBSEN, W.; FRANZKE, A.; WAGNER, S.; BLICK, S.; MANNS M.P.; SEWING K. F. Pharmacokinetics of SDZ RAD and cyclosporin including their metabolites in seven kidney graft patients after the first dose of SDZ RAD. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2000, vol. 50, 449-454 [0273]
- 40 • KÖNIG, A.; SCHWECKE, T.; MOLNAR, I.; BÓHM, G.; LOWDEN, P.A.S.; STAUNTON, J.; LEADLAY, P.F. The pipecolate-incorporating enzyme for the biosynthesis of the immunosuppressant rapamycin. Nucleotide sequence analysis, disruption and heterologous expression of rapP from *Streptomyces hygroscopicus*. *European Journal of Biochemistry*, 1997, vol. 247, 526-534 [0273]
- 45 • KUNZ, J.; LOESCHMANN, A.; DEUTER-REINHARD, M.; HALL, M.N. FAP1, a homologue of human transcription factor NF-X1, competes with rapamycin for binding to FKBP12 in yeast. *Molecular Microbiology*, 2000, vol. 37, 1480-1493 [0273]
- 50 • KUO, C.J.; CHUNG, J.K.; FLORENTINO, D.F.; FLANAGAN, W.M.; BLENIS, J.; CRABTREE, G.R. Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. *Nature*, 1992, vol. 358, 70-73 [0273]
- 55 • LEE, M.H.; PASCOPELLA, L.; JACOBS, W.R., JR; HATFULL, G.F. Site specific integration of mycobacteriophage L5: integration-proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis* and Bacille Calmette-Guerin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1991, vol. 88, 3111-3115 [0273]
- 60 • LEE MH; PASCOPELLA L; JACOBS WR JR; HATFULL GF. Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration-proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and bacille Calmette-Guerin. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, vol. 88, 3111-5 [0273]
- 65 • LIANG, J.; CHOI, J.; CLARDY, J. Refined structure of the FKBP12-rapamycin-FRB ternary complex at 2.2 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 1999, vol. 55, 736-744 [0273]
- 70 • LOMOVSKAYA, N.; FONSTEIN, L.; RUAN, X.; STASSI, D.; KATZ, L.; HUTCHINSON, C.R. Gene disruption and replacement in the rapamycin-producing *Streptomyces hygroscopicus* strain ATCC 29253. *Microbiology-Uk*, 1997, vol. 143, 875-883 [0273]
- 75 • LOWDEN, P.A.S.; BÓHM, G.; STAUNTON, J.; LEADLAY, P.F. The nature of the starter unit for the rapamycin polyketide synthase. *Angewandte Chemie*, 1996, vol. 35, 2249-2251 [0273]
- 80 • LOWDEN, P. A. S. Ph.D. Dissertation, University of Cambridge. *Studies on the biosynthesis of rapamycin*, 1997 [0273]
- 85 • LOWDEN, P.A.S.; WILKINSON, B.; BÓHM, G.A.; HANNA, S.; FLOSS, H.G.; LEADLAY, P.F.; STAUNTON, J. Origin and true nature of the starter unit for the rapamycin polyketide synthase. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2001, vol. 40, 777-779 [0273]

- LUENGO, J.L.; YAMASHITA, D.S.; DUNNINGTON, D.; BECK, A.K.; ROZAMUS, L.W.; YEN, H.K.; BOSSARD, M.J.; LEVY, M.A.; HAND, A.; NEWMANTARR, T. Structure-Activity Studies of Rapamycin Analogs - Evidence That the C-7 Methoxy Group is Part of the Effector Domain and Positioned at the Fkbp12-Frap Interface. *Chemistry & Biology*, 1995, vol. 2, 471-481 [0273]
- 5 • LYONS, W.E.; GEORGE, E.B.; DAWSON, T.M.; STEINER, J.P.; SNYDER, S.H. Immunosuppressant FK506 promotes neurite outgrowth in cultures of PC12 cells and sensory ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, vol. 91, 3191-3195 [0273]
- 10 • MACNEIL, D.J.; GEWAIN, K.M.; RUBY, C.L.; DEZENY, G.; GIBBONS, P.H.; MACNEIL, T. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*, 1992, vol. 111, 61-68 [0273]
- 15 • MARAHIEL, M.A.; STACHELHAUS, T.; MOOTZ, H.D. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews*, 1997, vol. 97, 2651-2673 [0273]
- 20 • MATSUURA, M.; NOGUCHI, T.; YAMAGUCHI, D.; AIDA, T.; ASAYAMA, M.; TAKAHASHI, H.; SHIRAI, M. The sre gene (ORF469) encodes a site-specific recombinase responsible for integration of the R4 phage genome. *J Bact.*, 1996, vol. 178 (11), 3374-3376 [0273]
- 25 • MCALPINE, J. B.; SWANSON, S. J.; JACKSON, M.; WHITTEM, D.N. Revised NMR assignments for rapamycin. *Journal of Antibiotics*, 1991, vol. 44, 688-690 [0273]
- MEO, T. Immunological Methods. *Academic Press*, 1979, 227-239 [0273]
- 30 • MOLNÁR, I.; APARICIO, J.F.; HAYDOCK, S.F.; KHAW, L.E.; SCHWECKE, T.; KÓNIG, A.; STAUNTON, J.; LEADLAY, P.F. Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of genes flanking the polyketide synthase. *Gene*, 1996, vol. 169, 1-7 [0273]
- 35 • MORICE, M.C.; SERRUYS, P.W.; SOUSA, J.E.; FAJADET, J.; BAN HAYASHI, E.; PERIN, M.; COLOMBO, A.; SCHULER, G.; BARRAGAN, P.; GUAGLIUMI, G. RAVEL Study Group. Randomized Study with the Sirolimus-Coated Bx Velocity Balloon-Expandable Stent in the Treatment of Patients with *de Novo* Native Coronary Artery Lesions. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N. Eng. J. Med.*, 2002, vol. 346 (23), 1773-80 [0273]
- 40 • MOTAMEDI, H.; SHAFIEE, A.; CAI, S.J.; STREICHER, S.L.; ARISEN, B.H.; MILLER, R.R. Characterization of methyltransferase and hydroxylase genes involved in the biosynthesis of the immunosuppressants FK506 and FK520. *Journal of Bacteriology*, 1996, vol. 178, 5243-5248 [0273]
- 45 • MOTAMEDI, H.; CAI, S.J.; SHAFIEE, A.; ELLISTON, K.O. Structural organization of a multifunctional polyketide synthase involved in the biosynthesis of the macrolide immunosuppressant FK506. *European Journal of Biochemistry*, 1997, vol. 244, 74-80 [0273]
- MOTAMEDI, H.; SHAFIEE, A. The biosynthetic gene cluster for the macrolactone ring of the immunosuppressant FK506. *European Journal of Biochemistry*, 1998, vol. 256, 528-534 [0273]
- 50 • MYCKATYN, T.M.; ELLIS, R.A.; GRAND, A.G.; SEN, S.K.; LOWE, J.B. The effects of rapamycin in murine peripheral neme isografts and allografts. *Plast. Reconstr. Surg.*, 2002, vol. 109 (7), 2405-17 [0273]
- 55 • NAVIA, M.A. Protein-drug complexes important for immunoregulation and organ transplantation. *Current Opinion in Structural Biology*, 1996, vol. 6, 838-847 [0273]
- NCCLS Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing for Yeasts. *Approved Standard M27-A*, 1997, vol. 17 (9) [0273]
- 60 • NISHIDA, H.; SAKAKIBARA, T.; AOKI, F.; SAITO, T.; ICHIKAWA, K.; INAGAKI, T.; KOJIMA, Y.; YAMAUCHI, Y.; HUANG, L.H.; GUADLIANA, M.A. Generation of novel rapamycin structures by microbial manipulations. *Journal of Antibiotics*, 1995, vol. 48, 657-666 [0273]
- 65 • NIELSEN, J.B.; HSU, M.J.; BYME, K.M.; KAPLAN, L. Biosynthesis of the immunosuppressant immunomycin: the enzymology of pipecolate incorporation. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 5789-5796 [0273]

- PAGET, M.S.B.; CHAMBERLIN, L; ATRIH, A.; FOSTER, S.J.; BUTTNER, M.J. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor 6E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2. *Journal of Bacteriology*, 1999, vol. 181, 204-211 [0273]
- 5 • PAIVA, N.L.; DEMAIN, A.L.; ROBERTS, M.F. Incorporation of acetate, propionate, and methionine into rapamycin By *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Natural Products*, 1991, vol. 54, 167-177 [0273]
- PAIVA, N.L.; DEMAIN, A.L.; ROBERTS, M.F. The immediate precursor of the nitrogen-containing ring of rapamycin is free pipecolic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 1993, vol. 15, 581-585 [0273]
- 10 • PATTERSON, C.E.; SCHAUB, T.; COLEMAN, E.J.; DAVIES E.C. Developmental regulation of FKBP65. An ER-localized extracellular matrix binding-protein. *Molecular Biology of the Cell*, 2000, vol. 11, 3925-3935 [0273]
- 15 • PFEIFER, B.A.; ADMIRAAL, S.J.; GRAMAJO, H.; CAN E, D.E.; KHOSLA, C. Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*. *Science*, 2001, vol. 291, 1790-1792 [0273]
- 20 • POWELL, N.; TILL, S.; BUNGRE, J.; CORRIGAN, C. The immunomodulatory drugs cyclosporin A, mycophenolate mofetil, and sirolimus (rapamycin) inhibit allergen-induced proliferation and IL-5 production by PBMCs from atopic asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001, vol. 108 (6), 915-7 [0273]
- 25 • RABINOVITCH, A.; SUAREZ-PINZON, W.L.; SHAPIRO, A.M.; RAJOTTE, R.V.; POWER, R. Combination therapy with sirolimus and interleukin-2 prevents spontaneous and recurrent autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*, 2002, vol. 51 (3), 638-45 [0273]
- 30 • RAUGHT, B.; GINGRAS, A.C.; SONENBERG, N. The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, vol. 98, 7037-7044 [0273]
- RAWLINGS, B.J. Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part A. *Natural Product Reports*, 2001, vol. 18, 190-227 [0273]
- 35 • REATHER, J. A.; PH.D. Late steps in the biosynthesis of macrocyclic lactones. *Dissertation, University of Cambridge*, 2000 [0273]
- REITAMO, S.; SPULS, P.; SASSOLAS, B.; LAHFA, M.; CLAUDY, A.; GRIFFITHS, C.E. Efficacy of sirolimus (rapamycin) administered concomitantly with a subtherapeutic dose of cyclosporin in the treatment of severe psoriasis: a randomized controlled trial. *Br. J. Dermatol. Sirolimus European Psoriasis Study Group*, 2001, vol. 145 (3), 438-45 [0273]
- 40 • ROSEN, M.K.; SCHREIBER, S.L. Natural products as probes of cellular function: studies of immunophilins. *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 1992, vol. 31, 384-400 [0273]
- ROYMANS, D.; SLEGERS, H. Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *European Journal of Biochemistry*, 2001, vol. 268, 487-498 [0273]
- 45 • RUAN, X.A.; STASS, D.; LAX, S.A.; KATZ, L. A second type-I PKS gene cluster isolated from *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253, a rapamycin-producing strain. *Gene*, 1997, vol. 203, 1-9 [0273]
- 50 • SALITURO, G.M.; ZINK, Di.; DAHL, A.; NIELSEN, J.; WU, E.; HUANG, L.; KASTNER C.; DUMONT, F. Meridamycin: a novel nonimmunosuppressive FKBP12 ligand from *Streptomyces hygroscopicus*. *Tetrahedron letters*, 1995, vol. 36, 997-1000 [0273]
- SCHWARZER, D.; MARAHIEL, M.A. Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften*, 2001, vol. 88, 93-101 [0273]
- 55 • SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0273]
- SCHREIBER, S.L.; CRABTREE, G.R. The mechanism of action of cyclosporine A and FK506. *Immunology Today*, 1992, vol. 13, 136-142 [0273]
- 60 • SCHWECKE, T.; APARICIO, J.F.; MOLNÁR, I.; KÓNIG, A.; KHAW, L.E.; HAYDOCK, S.F.; OLIYNYK, M.; CAFFREY, P.; CORTÉS, J.; LESTER, J.B. The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, vol. 92, 7839-7843 [0273]
- SEDRANI, R.; COTTENS, S.; KALLEN, J.; SCHULER, W. Chemical modifications of rapamycin: the discovery of SDZ RAD. *Transplantation Proceedings*, 1998, vol. 30, 2192-2194 [0273]

- SEHGAL, S.N.; BAKER, H.; VÉZINA, C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic II. Fermentation, isolation and characterization. *The Journal of Antibiotics*, 1975, vol. 28, 727-733 [0273]
- 5 • SHEPHERD, P.R.; WITHERS, D.J.; SIDDLE K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochemical Journal*, 1998, vol. 333, 471-490 [0273]
- 10 • SHIMA, J.; HESKETH, A.; OKAMOTO, S.; KAWAMOTO, S.; OCHI, K. Induction of actinorhodin production by rpsL (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor*A3(2). *Journal of Bacteriology*, 1996, vol. 178, 7276-7284 [0273]
- 15 • SIGAL, N.H.; DUMONT, F.J. Cyclosporine A, FK-506, and rapamycin: pharmacological probes of lymphocyte signal transduction. *Annual Review of Immunology*, 1992, vol. 10, 519-560 [0273]
- 20 • SIEUWERTS, A.M.; KLIJN, J.G.; PETERS, H.A.; FOEKENS, J.A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *Eur. J Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1995, vol. 33 (11), 813-23 [0273]
- 25 • SMOVKINA, T; MAZODIER, P.; BOCCARD, F.; THOMPSON, C.J.; GUERINEAU, M. Construction of a series of pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes. *Gene*, 1990, vol. 94, 53-59 [0273]
- 30 • SOULLILLOU, J.P.; CARPENTER, C.B.; LUNDIN, A.P.; STROM, T.B. Augmentation of proliferation and *in vitro* production of cytotoxic cells by 2-ME in the rat. *J Immunol.*, 1975, vol. 115 (6), 1566-71 [0273]
- 35 • STAUNTON, J.; WEISSMAN, K.J. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Product Reports*, 2001, vol. 18, 380-416 [0273]
- 40 • STEINER, J.P.; HAMILTON, G.S.; ROSS, D. T.; VALENTINE, H.L.; GUO, H.; CONNOLLY, M.A.; LIANG, S.; RAMSEY, C.; LI, J.-H.J.; HUANG, W. Neurotrophic immunophilin ligands stimulate structural and functional recovery in neurodegenerative animal models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, vol. 94, 2019-2024 [0273]
- 45 • TANG, S.J.; REIS, G.; KANG, H.; GINGRAS, A. C.; SONENBERG, N.; SCHUMAN, E.M. A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, vol. 1, 467-472 [0273]
- 50 • VAN DUYNE, G.D.; STANDAERT, R.F.; KARPLUS, P.A.; SCHREIBER, S.L.; CLARDY, J. Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *Journal of Molecular Biology*, 1993, vol. 229, 105-124 [0273]
- 55 • VAN MELLAERT, L.; MEI, L.; LAMMERTYN, E.; SCHACHT, S.; ANNÉ, J. Site-specific integration of bacteriophage VWB genome into *Streptomyces venezuelae* and construction of a VWB-based integrative vector. *Microbiology*, 1998, vol. 144, 3351-3358 [0273]
- 60 • VÉZINA, C.; KUDELSKI, A.; SEHGAL, S.N. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of Antibiotics*, 1975, vol. 28, 721-726 [0273]
- 65 • VILELLA-BACH, M.; NUZZI, P.; FANG, Y.M.; CHEN, J. The FKBP12-rapamycin-binding domain is required for FKBP12-rapamycin-associated protein kinase activity and G1 progression. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, vol. 274, 4266-4272 [0273]
- 70 • WALLER, J.R.; NICHOLSON, M.L. Molecular mechanisms of renal allograft fibrosis. *British Journal of Surgery*, 2001, vol. 88, 1429-1441 [0273]
- 75 • WARNER, L.M.; ADAMS, L.M.; CHANG, J.Y.; SEHGAL, S.N. A modification of the *in vivo* mixed lymphocyte reaction and rapamycin's effect in this model. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1992, vol. 64 (3), 242-7 [0273]
- 80 • WEBER, T.; MARAHIEL, M.A. Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases. *Structure*, 2001, vol. 9, R3-R9 [0273]
- 85 • WELCH, J. T.; SEPER, K., W. *J. Org. Chem.*, 1988, vol. 53, 2991-2999 [0273]
- 90 • WILKINSON, B.; FOSTER, G.; RUDD, B.A.M.; TAYLOR, N.L.; BLACKABY, A.P.; SIDEBOTTOM, P.J.; COOPER, D.J.; DAWSON, M.J.; BUSS, A.D.; GAISSER, S. Novel octaketide macrolides related to 6-deoxyerythronolide B provide evidence for iterative operation of the erythromycin polyketide synthase. *Chemistry & Biology*, 2000, vol. 7, 111-117 [0273]

ES 2 296 063 T3

- **WONG, G.K.; GRIFFITH, S.; KOJIMA, I.; DEMAIN, A.L.** Antifungal activities of rapamycin and its derivatives, prolylrapamycin, 32-desmethylrapamycin, and 32-desmethoxyrapamycin. *Journal of Antibiotics*, 1998, vol. 51, 487-491 [0273]
- 5 • **WU, K; CHUNG, L.; REVILL, W.P.; KATZ, L; REEVES, C.D.** The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCV 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units. *Gene*, 2000, vol. 251, 81-90 [0273]
- 10 • **YERN, A.W.; TOMASSELLI, A.G.; HEINRIKSON, R.L.; ZURCHER-NEELY, H.; RUFF, V.A.; JOHN-SON, RA.; DEIBEL, M.R.** The Hsp56 component of steroid receptor complexes binds to immobilized FK506 and shows homology to FKBP-12 and FKBP-13. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, vol. 267, 2868-2871 [0273]
- 15 • **YU, K.; TORAL-BARZA, L.; DISCAFANI, C.; ZHANG, W.G.; SKOTNICKI, J.; FROST, P.; GIBBONS, J.J.** mTOR, a novel target in breast cancer: the effect of CCI-779, an mTOR inhibitor, in preclinical models of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 2001, vol. 8, 249-258 [0273]
- 20 • **ZHU, J.; WU J.; FRIZELL, E.; LIU, S.L.; BASHEY, R.; RUBIN, R.; NORTON, P.; ZERN, M.A.** Rapamycin inhibits hepatic stellate cell proliferation *in vitro* and limits fibrogenesis in an *in vivo* model of liver fibrosis. *Gastroenterology*, 1999, vol. 117 (5), 1198-204 [0273]

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para la generación de análogos de ligandos de FKBP que incorpora una unidad de partida no natural, 5 dicho método comprende:
- (a) la generación de una cepa recombinante en la que al menos el homólogo de rapK se ha suprimido o inactivado; y
- 10 (b) la suplementación de una unidad de partida no natural a dicha cepa.
2. El método de la reivindicación 1, que incluye, de manera adicional, la supresión de uno o más genes auxiliares.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que incluye, de manera adicional el restablecimiento, 15 mediante complementación, de uno o más de los genes suprimidos.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3, que incluye, de manera adicional, el paso de aislamiento y purificación de los análogos de los ligandos de FKBP generados.
- 20 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, donde dicha unidad de partida no natural se selecciona del grupo que consta de: ácido 2-norbornano carboxílico; ácido 2-(cis/trans)-hidroxiciclohexano carboxílico; ácido 3-(cis/trans)-hidroxiciclohexano carboxílico; ácido 4-(cis/trans)-hidroxiciclohexano carboxílico; ácido 2-(cis/trans)-metilciclohexano carboxílico; ácido 4-(cis/trans)-metilciclohexano carboxílico; ácido 3-(cis/trans)-metoxiciclohexano carboxílico; ácido 4-(cis/trans)-metoxiciclohexano carboxílico; ácido 4-oxo ciclohexano carboxílico; ácido 2-oxo ciclohexano carboxílico; ácido 4-trans-n-pentilciclohexano carboxílico; ácido 2-trans-aminociclohexano 25 carboxílico; ácido 4-cis-aminociclohexano carboxílico; ácido 4-(cis/trans)-aminometilciclohexano carboxílico; ácido ciclopentano carboxílico; ácido ciclobutano carboxílico; ácido 1-metilciclohexano carboxílico; ácido 3-trans-hidroxi-4-cis-fluorociclohexano carboxílico y ácido 4-trans-hidroxi-3-cis-fluorociclohexano carboxílico; ácido 3-cis-hidroxi-4-trans-fluorociclohexano carboxílico y ácido 4-cis-hidroxi-3-trans-fluorociclohexano carboxílico; ácido 3-cis-hidroxi-4-trans-clorociclohexano carboxílico y ácido 4-cis-hidroxi-3-trans-clorociclohexano carboxílico; ácido 3-trans-hidroxi-4-cis-clorociclohexano carboxílico y ácido 4-trans-hidroxi-3-cis-clorociclohexano carboxílico; ácido 3-trans-ciclohexeno oxido carboxílico; ácido 3-cis-ciclohexeno oxido carboxílico; ácido 3,4-cis-dihidroxiciclohexano carboxílico y ácido 3,4-trans-dihidroxiciclohexano carboxílico; ácido ciclohexanopropiónico y ácido 4-cis/trans-ter-butilciclohexano carboxílico o los ésteres simples o sales de los mismos.
- 35 6. El método según la reivindicación 5, donde dicha unidad de partida no natural se selecciona del grupo que consta de: ácido 3-(cis/trans)-hidroxiciclohexano carboxílico; ácido 4-(cis/trans)-hidroxiciclohexano carboxílico; ácido 3-(cis/trans)-metoxiciclohexano carboxílico; ácido 4-(cis/trans)-metoxiciclohexano carboxílico; ácido 4-oxo ciclohexano carboxílico; ácido ciclobutano carboxílico; ácido 3-trans-hidroxi-4-cis-fluorociclohexano carboxílico y ácido 4-trans-hidroxi-3-cis-fluorociclohexano carboxílico; ácido 3-cis-hidroxi-4-trans-fluorociclohexano carboxílico y ácido 4-cis-hidroxi-3-trans-fluorociclohexano carboxílico; ácido 3-cis-hidroxi-4-trans-clorociclohexano carboxílico y ácido 4-cis-hidroxi-3-trans-clorociclohexano carboxílico; ácido 3-trans-hidroxi-4-cis-clorociclohexano carboxílico y ácido 4-trans-hidroxi-3-cis-clorociclohexano carboxílico; ácido 3-trans-ciclohexeno oxido carboxílico; ácido 3-cis-ciclohexeno oxido carboxílico; ácido 3,4-cis-dihidroxiciclohexano carboxílico; ácido ciclohexanopropiónico; ácido 4-cis/trans-ter-butilciclohexano carboxílico, o ésteres simples o sales de los mismos.
- 40 7. El método según la reivindicación 5, siempre que el iniciador no natural con el que se suplementa dicha cepa recombinante no sea: ácido ciclohexano carboxílico, ácido 3-cis,4-trans-dihidroxiciclohexano carboxílico, ácido 1-ciclohexeno carboxílico, ácido 3-ciclohexeno carboxílico, ácido cicloheptano carboxílico, ácido 3-(cis/trans)-metilciclohexano carboxílico, ácido 4-(cis/trans)-metilciclohexano carboxílico, ácido 1-ciclohepteno carboxílico o ácido 5-cis-hidroxil-3-ciclohexeno carboxílico.
- 45 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 7, en el que la cepa recombinante del inciso (a) se genera según un método que comprenda:
- (a) la construcción de un plasmidio de conjugación de delección en una cepa de *E. coli* que sea *dam*⁻, *dcm*⁻ o *dam*⁻ y *dcm*⁻.
- 50 (b) la generación de esporas a partir de dicha cepa hospedera, adecuadas para la conjugación, en la que dicha cepa se cultiva en una humedad entre 10% y 40% y las esporas se cosechan entre los días 5 y 30;
- 55 (c) la conjugación de la cepa de *E. coli* del paso (a) con las esporas del paso (b) en un medio que incluye, por litro:
- 60 i) 0,5 g a 5 g de polvo de maíz pulido,
- 65 ii) 0,1 g a 5 g de extracto de levadura,

ES 2 296 063 T3

- iii) 0,1 g a 10 g de carbonato de calcio; y
 - iv) 0,01 g a 0,5 g de sulfato de hierro;
- 5 dicho medio puede contener de modo adicional agar BACTO y almidón y puede secarse para producir una pérdida en peso de 1-20%; y
- (d) de manera opcional, el cultivo de la cepa recombinante bajo condiciones adecuadas para la producción de poliquétidos.
- 10 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicha cepa se selecciona entre el grupo que consta de: *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NRRL 5491, *Actinoplanes* sp. N902-109 FERM BP-3832, *Streptomyces* sp. AA6554, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6475 ATCC 14891, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6674, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* ATCC 55276, *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *ascomyceticus* ATCC 14891, *Streptomyces tsukubaensis* No.9993 FERM BP-927, *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *yakushimaensis*, *Streptomyces* sp. DSM 4137, *Streptomyces* sp. DSM 7348, *Micromonospora* n.sp. A92-306401 DSM 8429 y *Streptomyces* sp. MA 6858 ATCC 55098.
- 20 10. El método de la reivindicación 9, donde las cepas se seleccionan entre el grupo que consta de: *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NRRL 5491 y *S. hygroscopicus* var. *ascomyceticus* ATCC 14891.
11. El método de la reivindicación 10, donde la cepa es *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NRRL 5491 productora de rapamicina.
- 25 12. El método según la reivindicación 3, donde el proceso de restablecer los genes suprimidos incluye:
 - (a) la construcción de un casete génico que contenga uno o más de los genes suprimidos y
 - (b) la transformación de dicha cepa recombinante que contiene clusters de biosíntesis que codifican para ligandos de FKBP con dicho casete génico.
- 30 13. El método según la reivindicación 12, donde dicho casete génico se ensambla directamente en un vector de expresión.
- 35 14. El método según las reivindicaciones 12 ó 13, donde la complementación es homóloga.
15. El método según las reivindicaciones 12 ó 13, donde la complementación es heteróloga.
- 40 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 15, donde dicho gen o genes auxiliares suprimidos o inactivados se seleccionan entre el grupo que consta de genes de suministro de la unidad de partida, genes de suministro del precursor aminoácido, monooxigenasas citocromo P-450, ferredoxinas y O-metiltransferasas dependientes de SAM.
- 45 17. El método de la reivindicación 16, donde los genes suprimidos o inactivados se seleccionan entre el grupo que consta de rapL, rapN, rapO, rapM, rapQ, rapI y rapJ.
18. Una cepa recombinante que contiene clusters de biosíntesis que codifican para ligandos de FKBP, donde al menos el homólogo de rapK se ha suprimido o inactivado.
- 50 19. La cepa recombinante, según la reivindicación 18, donde al menos el homólogo de rapK se ha suprimido o inactivado en una cepa seleccionada entre el grupo que consta de *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NRRL 5491, *Actinoplanes* sp. N902-109 FERM BP-3832, *Streptomyces* sp. AA6554, *Streptomyces hygroscopicus* var. *Ascomyceticus* MA 6475 ATCC 14891, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6678 ATCC 55087, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6674, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* ATCC55276, *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *ascomyceticus* ATCC 14891, *Streptomyces tsukubaensis* No.9993 FERM BP-927, *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *yakushimaensis*, *Streptomyces* sp. DSM 4137, *Streptomyces* sp. DSM 7348, *Micromonospora* n.sp. A92-306401 DSM 8429 y *Streptomyces* sp. MA 6858 ATCC 55098.
- 60 20. La cepa recombinante según la reivindicación 19, donde las cepas se seleccionan entre el grupo que consta de *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NRRL 5491 y *S. hygroscopicus* var. *ascomyceticus* ATCC 14891.
21. La cepa recombinante según la reivindicación 20, donde la cepa es el productor de rapamicina *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NRRL 5491.
- 65 22. La cepa recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, donde otros genes auxiliares suprimidos o inactivados se seleccionan entre el grupo que consta de: rapL, rapN/O, rapQ, rapM, rapI y rapJ, donde dicha delección no sea rapQrapN/OrapMrapL.

Figura 1

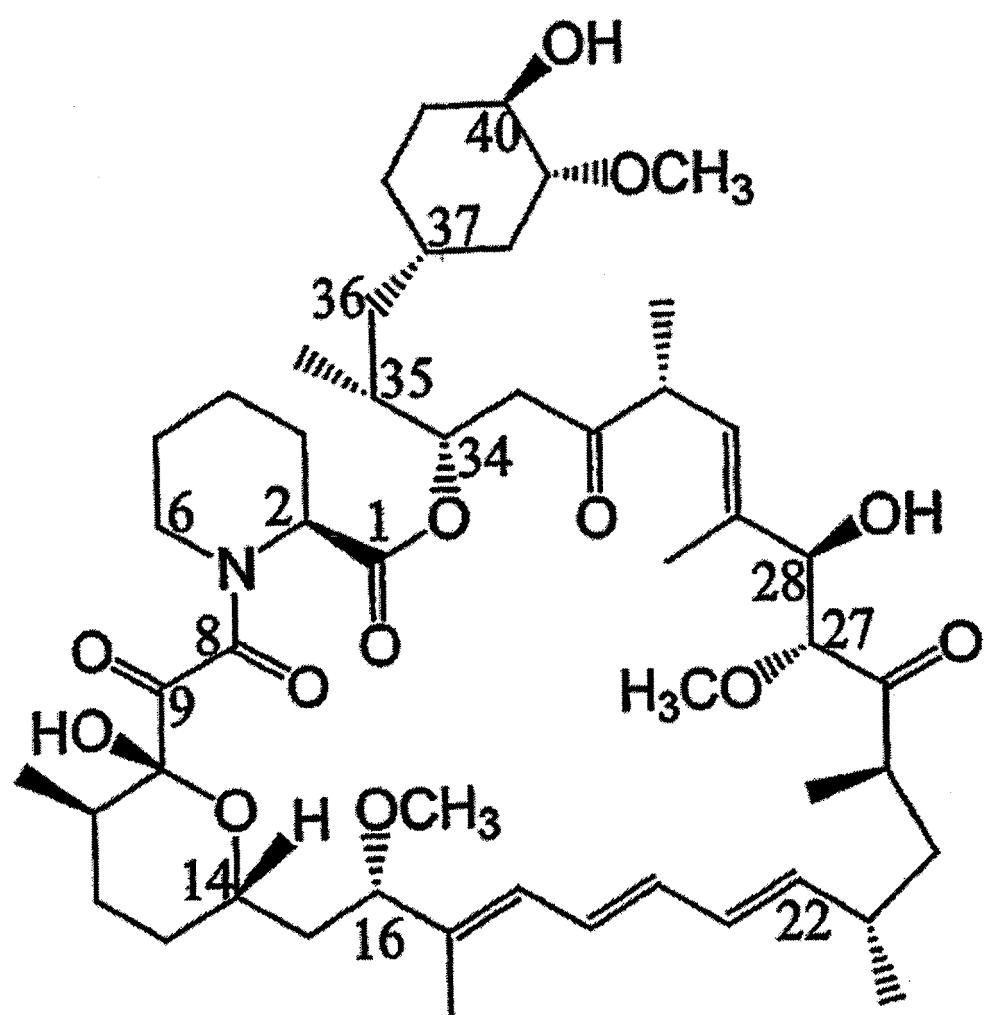


Figura 2

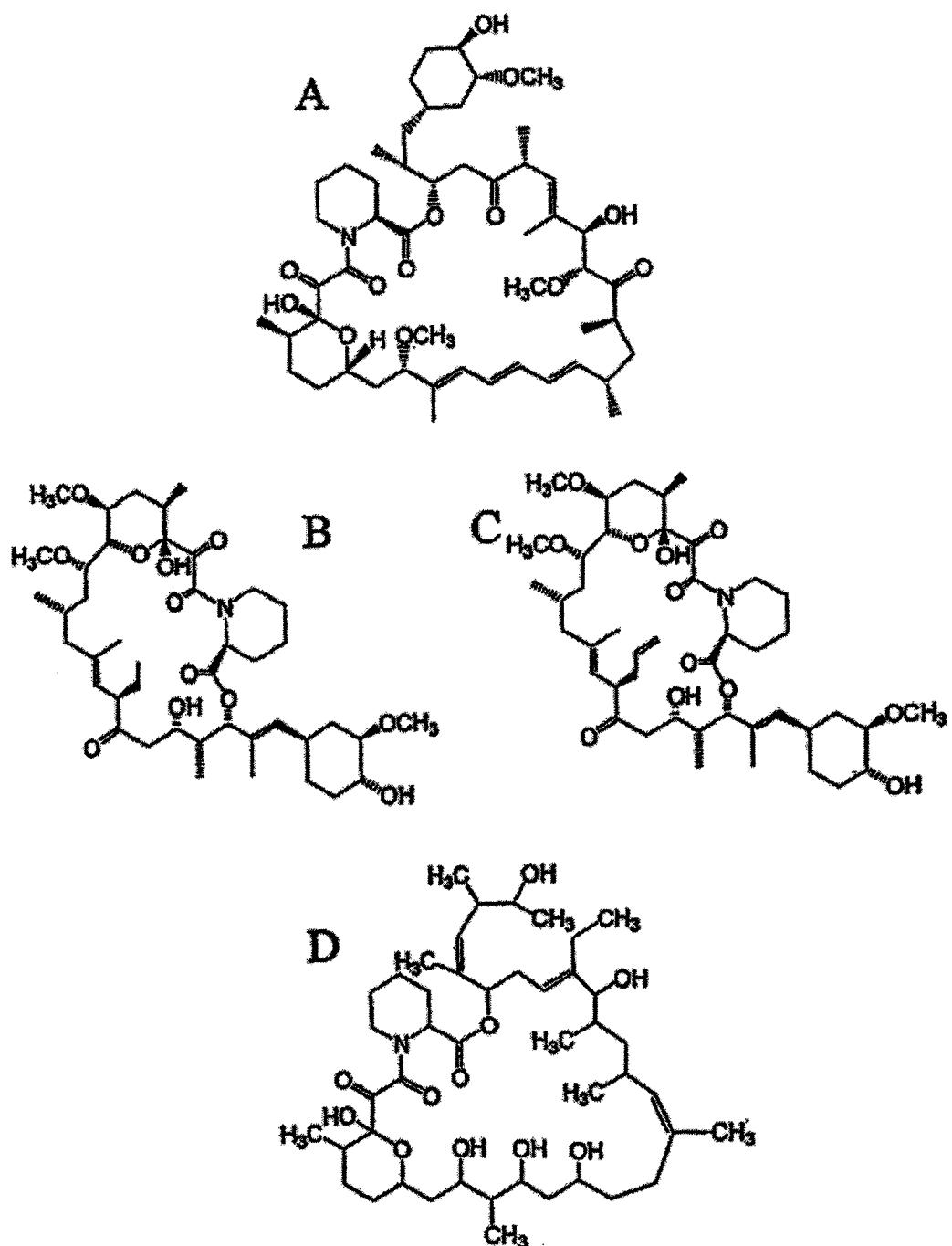


Figura 3

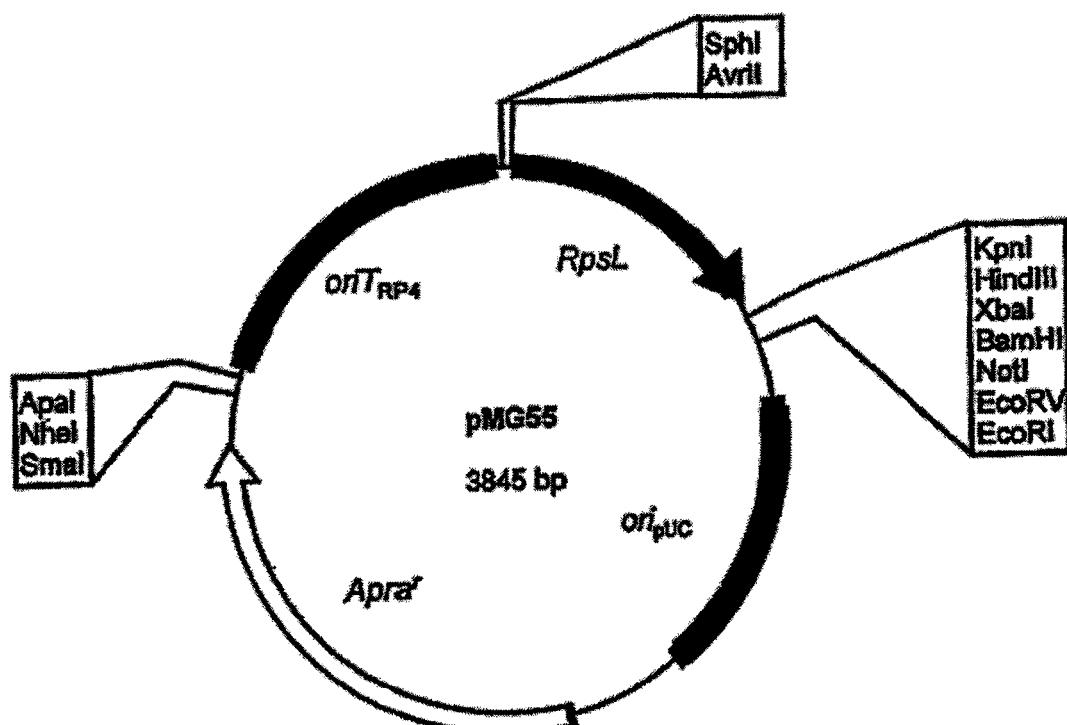


Figura 4

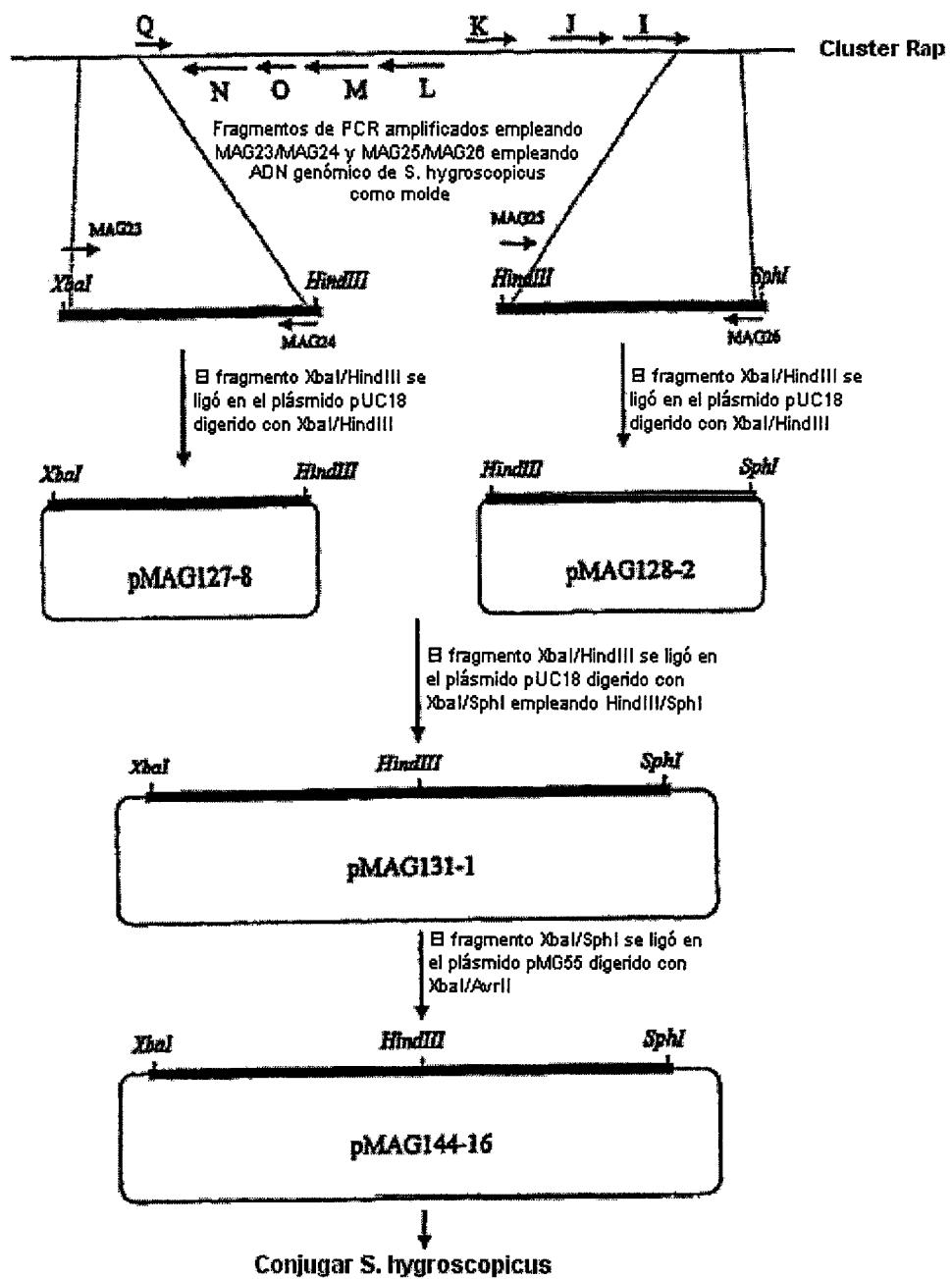


Figura 5

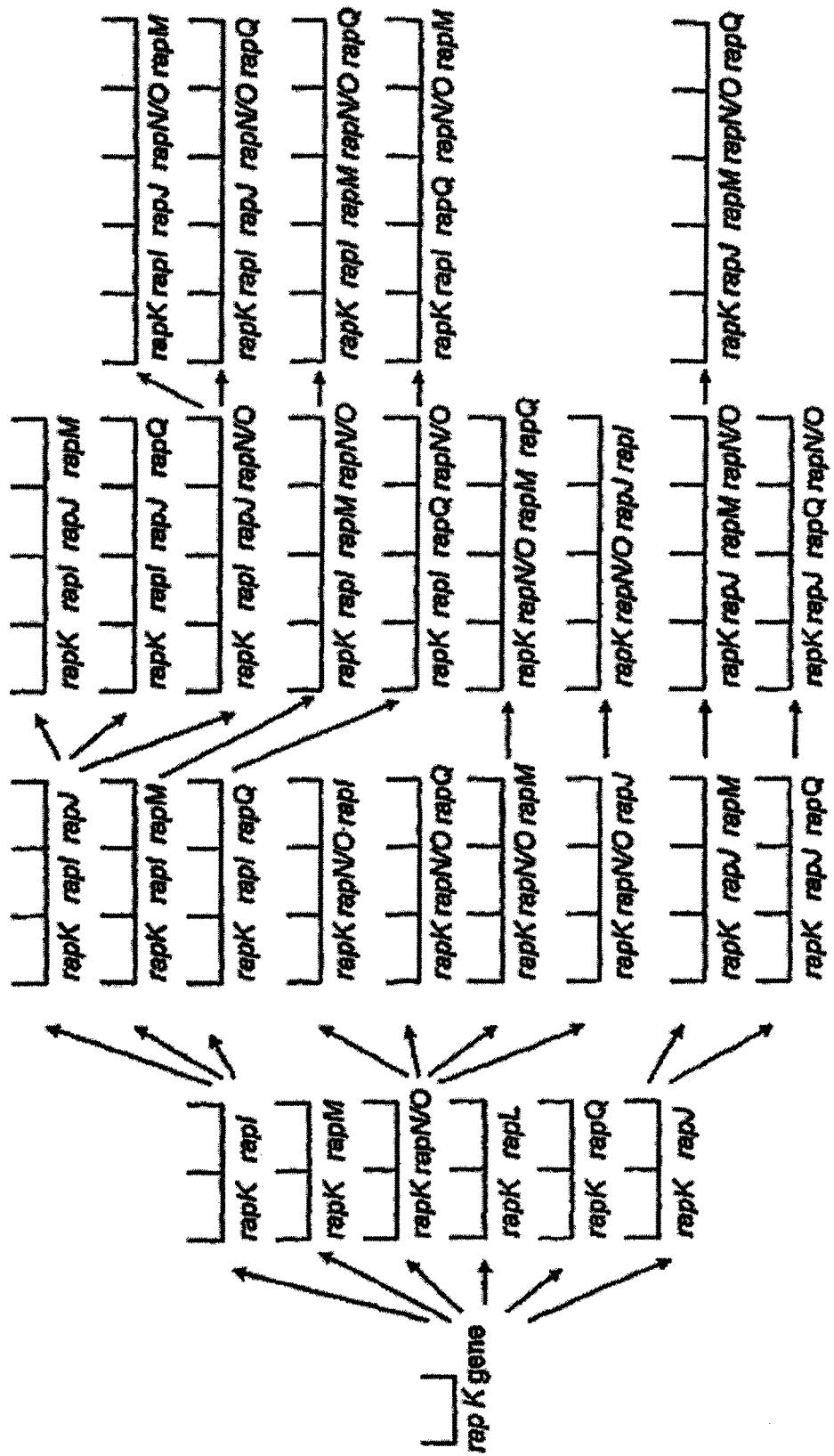
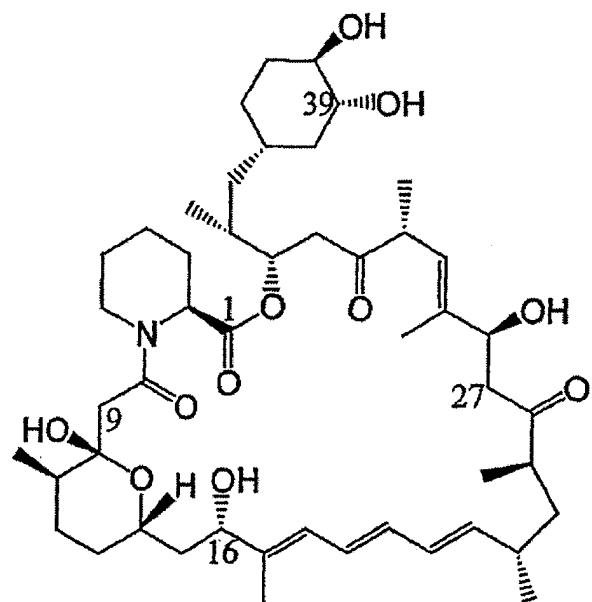
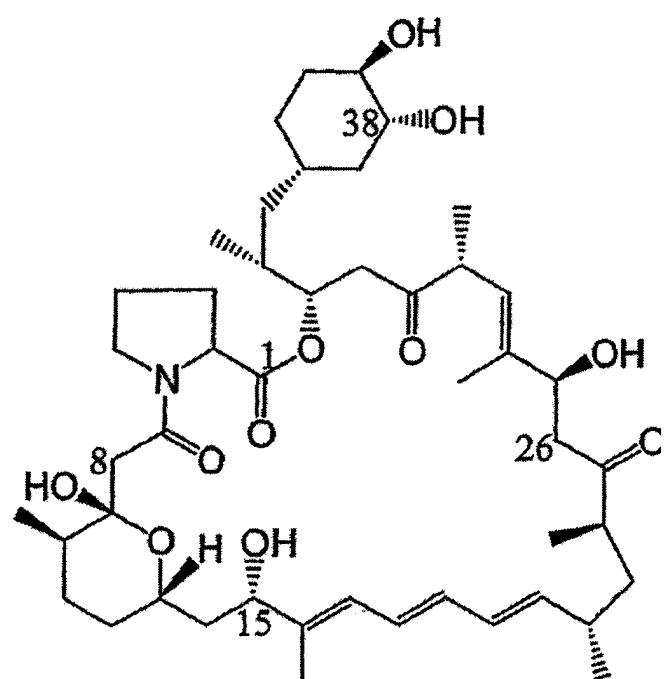


Figura 6



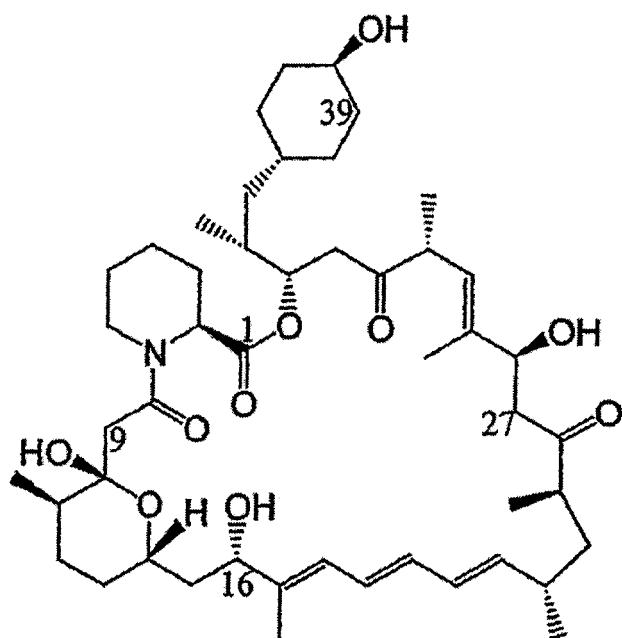
9-deoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil rapamicina

Figura 7



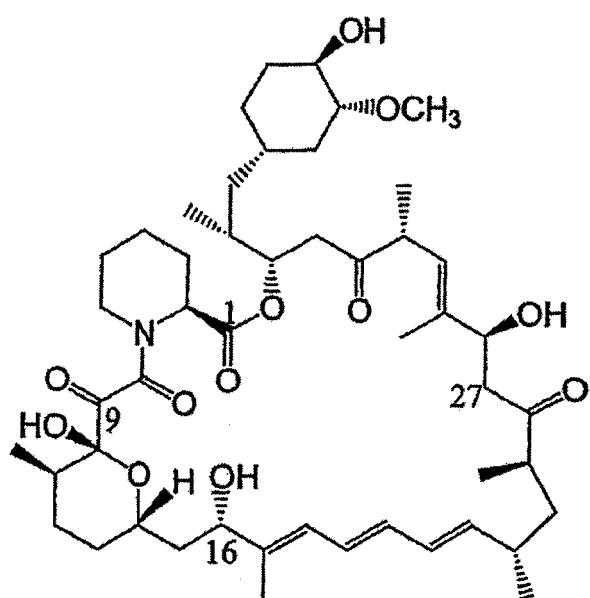
8-deoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-O-desmetil prolijrapamicina

Figura 8

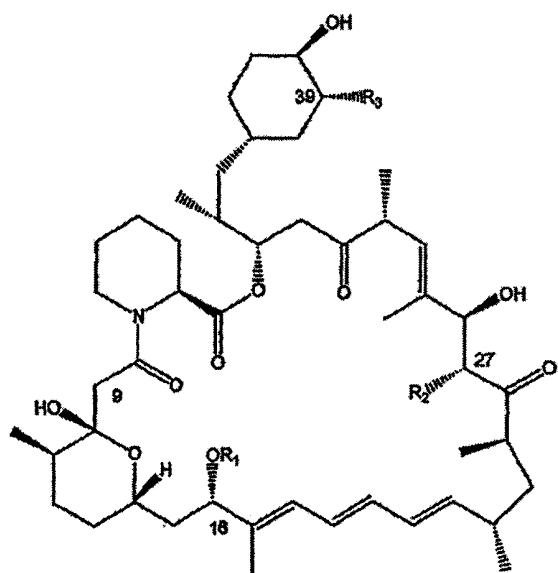


9-deoxo-16-O-desmethyl-27-desmetoxi-39-O-desmethyl rapamycin

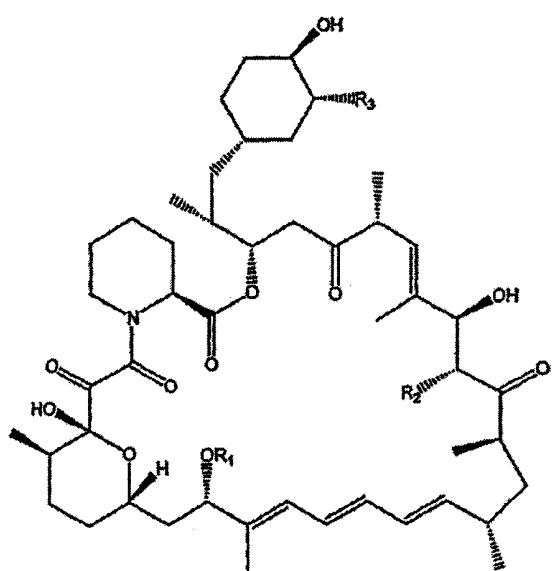
Figura 9



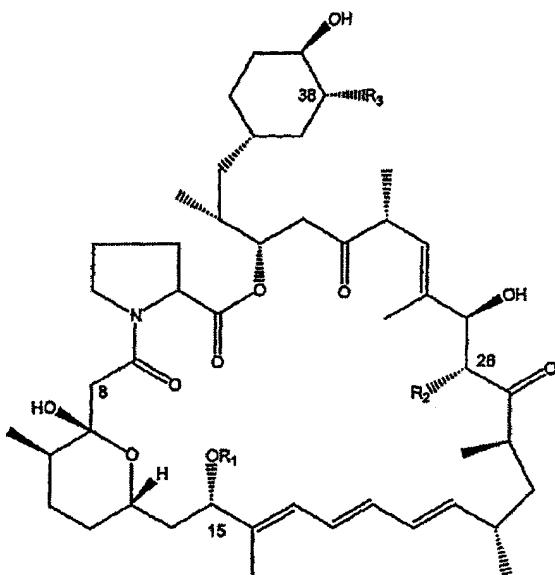
16-O-desmethyl-27-desmetoxi rapamycin

Figura 10

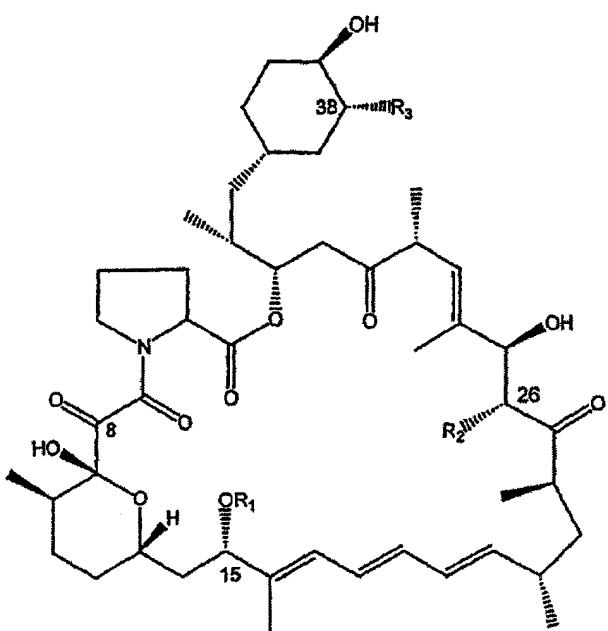
$R_1=H$	$R_2=H$	$R_3=OH$	compuesto 1
$R_1=H$	$R_2=OH$	$R_3=OH$	compuesto 2
$R_1=CH_3$	$R_2=H$	$R_3=OH$	compuesto 4
$R_1=H$	$R_2=OCH_3$	$R_3=OH$	compuesto 5
$R_1=H$	$R_2=H$	$R_3=OCH_3$	compuesto 6
$R_1=CH_3$	$R_2=OH$	$R_3=OH$	compuesto 8
$R_1=H$	$R_2=OH$	$R_3=OCH_3$	compuesto 9
$R_1=H$	$R_2=OCH_3$	$R_3=OCH_3$	compuesto 15
$R_1=CH_3$	$R_2=H$	$R_3=OCH_3$	compuesto 16
$R_1=CH_3$	$R_2=OH$	$R_3=OCH_3$	compuesto 17
$R_1=CH_3$	$R_2=OCH_3$	$R_3=OH$	compuesto 18
$R_1=CH_3$	$R_2=OCH_3$	$R_3=OCH_3$	compuesto 19

Figura 11

$R_1=H$	$R_2=H$	$R_3=OH$	compuesto 3
$R_1=H$	$R_2=OH$	$R_3=OH$	compuesto 7
$R_1=H$	$R_2=OCH_3$	$R_3=OH$	compuesto 10
$R_1=H$	$R_2=OH$	$R_3=OCH_3$	compuesto 11
$R_1=H$	$R_2=H$	$R_3=OCH_3$	compuesto 12
$R_1=CH_3$	$R_2=H$	$R_3=OH$	compuesto 13
$R_1=CH_3$	$R_2=OH$	$R_3=OH$	compuesto 14
$R_1=H$	$R_2=OCH_3$	$R_3=OCH_3$	compuesto 20
$R_1=CH_3$	$R_2=OH$	$R_3=OCH_3$	compuesto 21
$R_1=CH_3$	$R_2=H$	$R_3=OCH_3$	compuesto 22
$R_1=CH_3$	$R_2=OCH_3$	$R_3=OH$	compuesto 23

Figura 12

R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =OH	compuesto 24
R ₁ =H	R ₂ =OH	R ₃ =OH	compuesto 25
R ₁ =CH ₃	R ₂ =H	R ₃ =OH	compuesto 27
R ₁ =H	R ₂ =OCH ₃	R ₃ =OH	compuesto 28
R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =OCH ₃	compuesto 29
R ₁ =CH ₃	R ₂ =OH	R ₃ =OH	compuesto 31
R ₁ =H	R ₂ =OH	R ₃ =OCH ₃	compuesto 32
R ₁ =H	R ₂ =OCH ₃	R ₃ =OCH ₃	compuesto 38
R ₁ =CH ₃	R ₂ =H	R ₃ =OCH ₃	compuesto 39
R ₁ =CH ₃	R ₂ =OH	R ₃ =OCH ₃	compuesto 40
R ₁ =CH ₃	R ₂ =OCH ₃	R ₃ =OH	compuesto 41
R ₁ =CH ₃	R ₂ =OCH ₃	R ₃ =OCH ₃	compuesto 42

Figura 13

R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =OH	compuesto 26
R ₁ =H	R ₂ =OH	R ₃ =OH	compuesto 30
R ₁ =H	R ₂ =OCH ₃	R ₃ =OH	compuesto 33
R ₁ =H	R ₂ =OH	R ₃ =OCH ₃	compuesto 34
R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =OCH ₃	compuesto 35
R ₁ =CH ₃	R ₂ =H	R ₃ =OH	compuesto 36
R ₁ =CH ₃	R ₂ =OH	R ₃ =OH	compuesto 37
R ₁ =H	R ₂ =OCH ₃	R ₃ =OCH ₃	compuesto 43
R ₁ =CH ₃	R ₂ =OH	R ₃ =OCH ₃	compuesto 44
R ₁ =CH ₃	R ₂ =H	R ₃ =OCH ₃	compuesto 45
R ₁ =CH ₃	R ₂ =OCH ₃	R ₃ =OH	compuesto 46

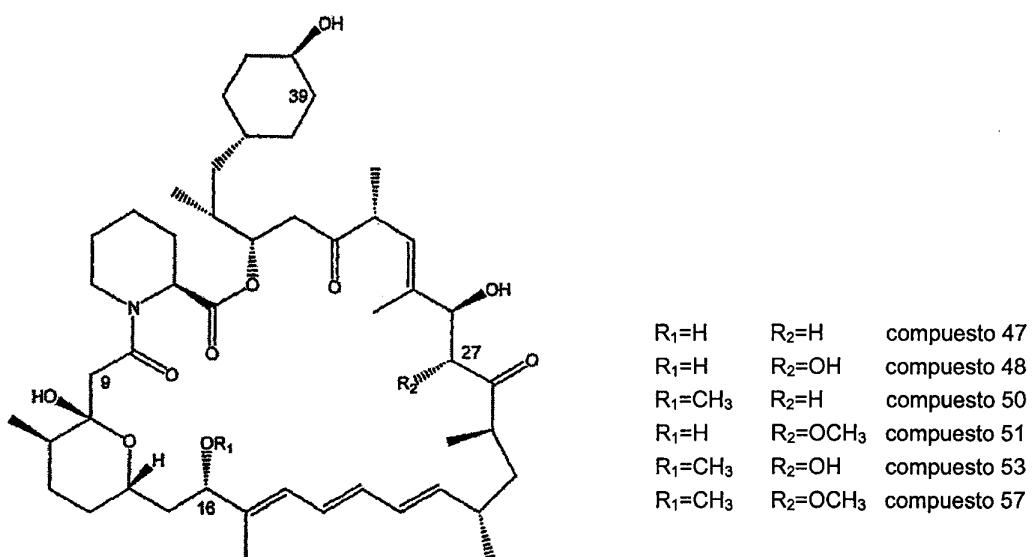
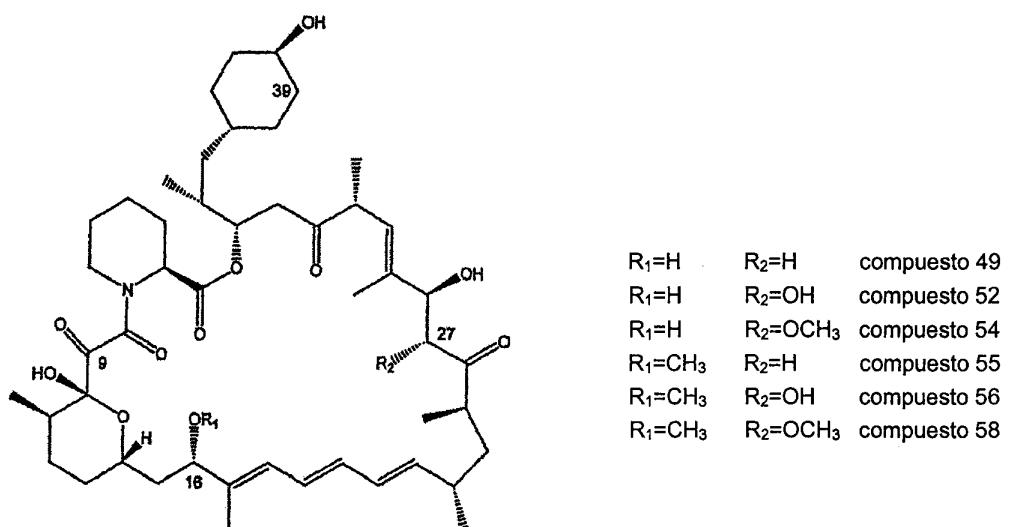
Figura 14Figura 15

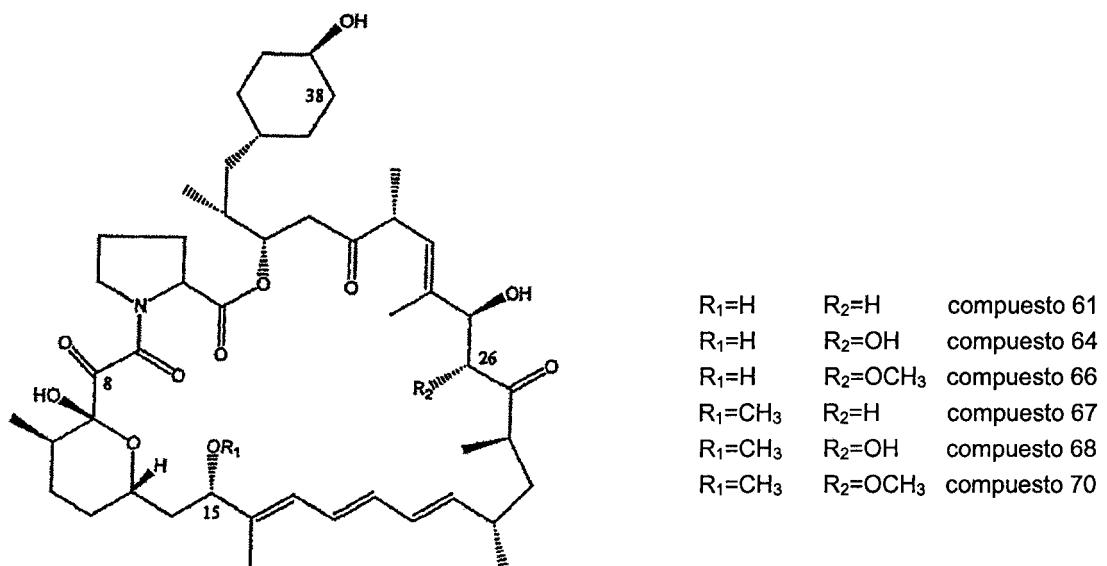
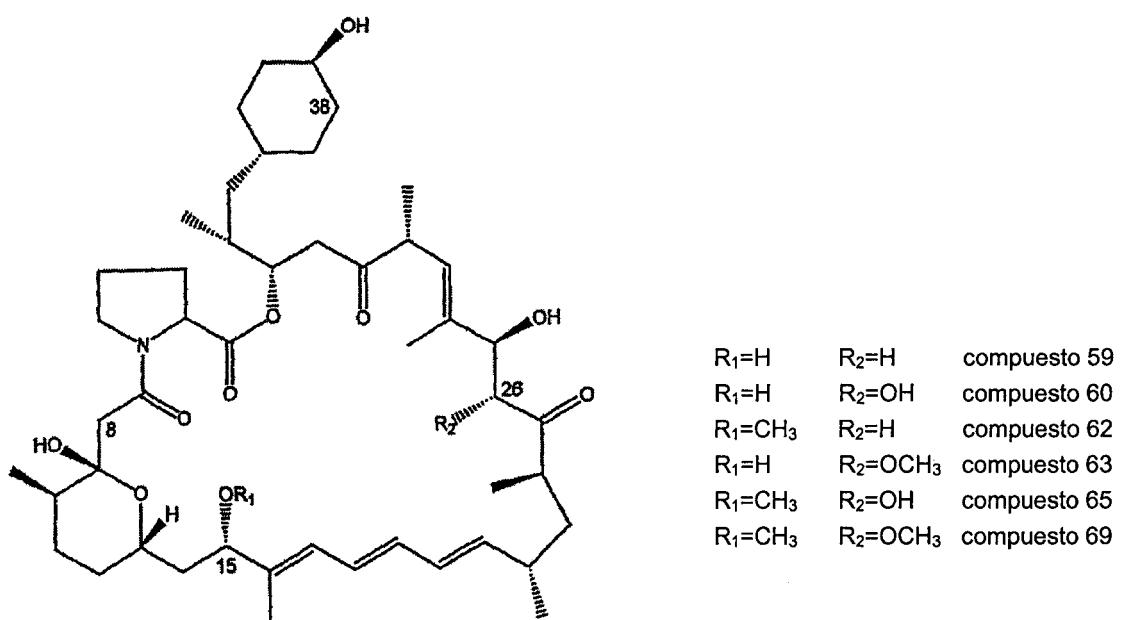
Figura 16Figura 17

Figura 18

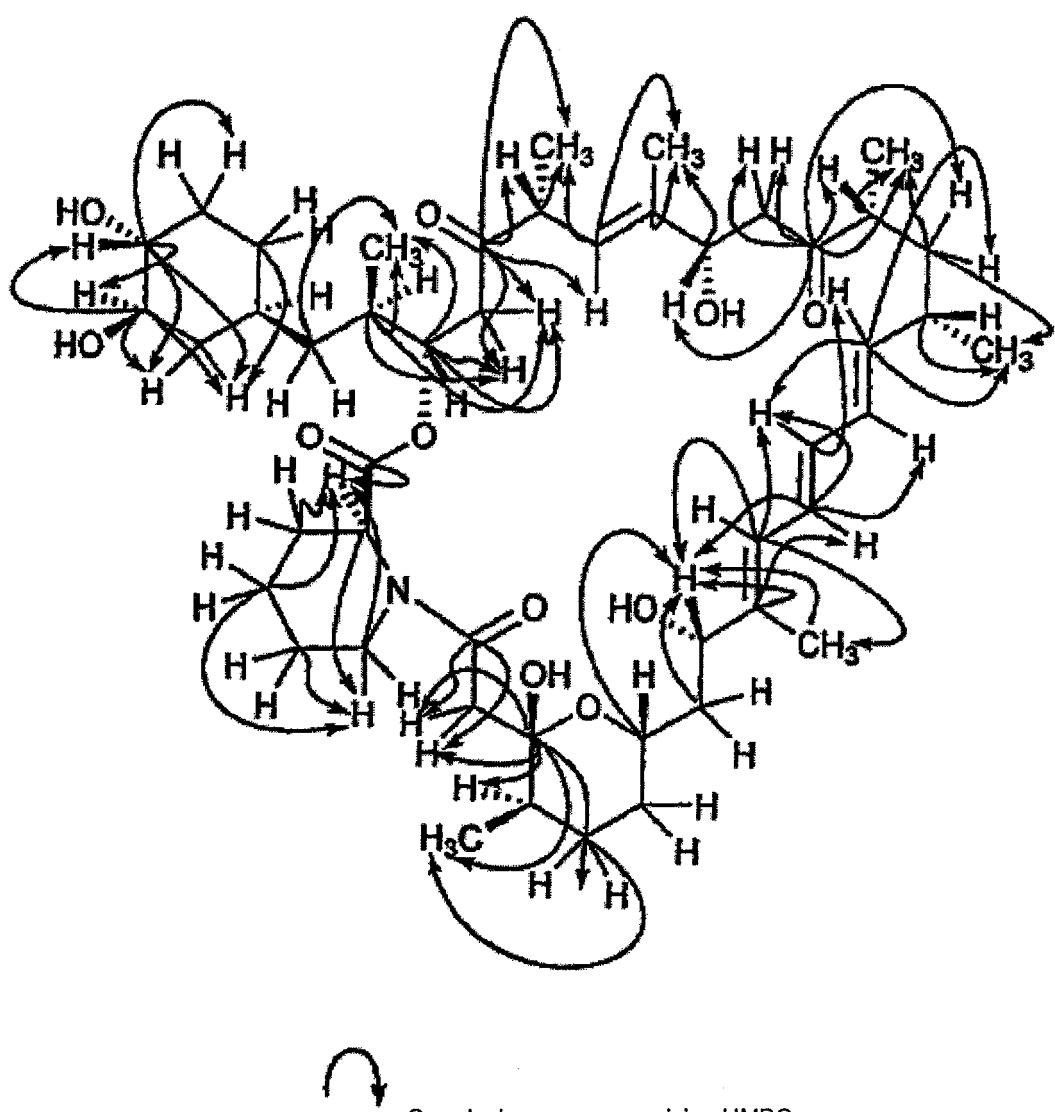
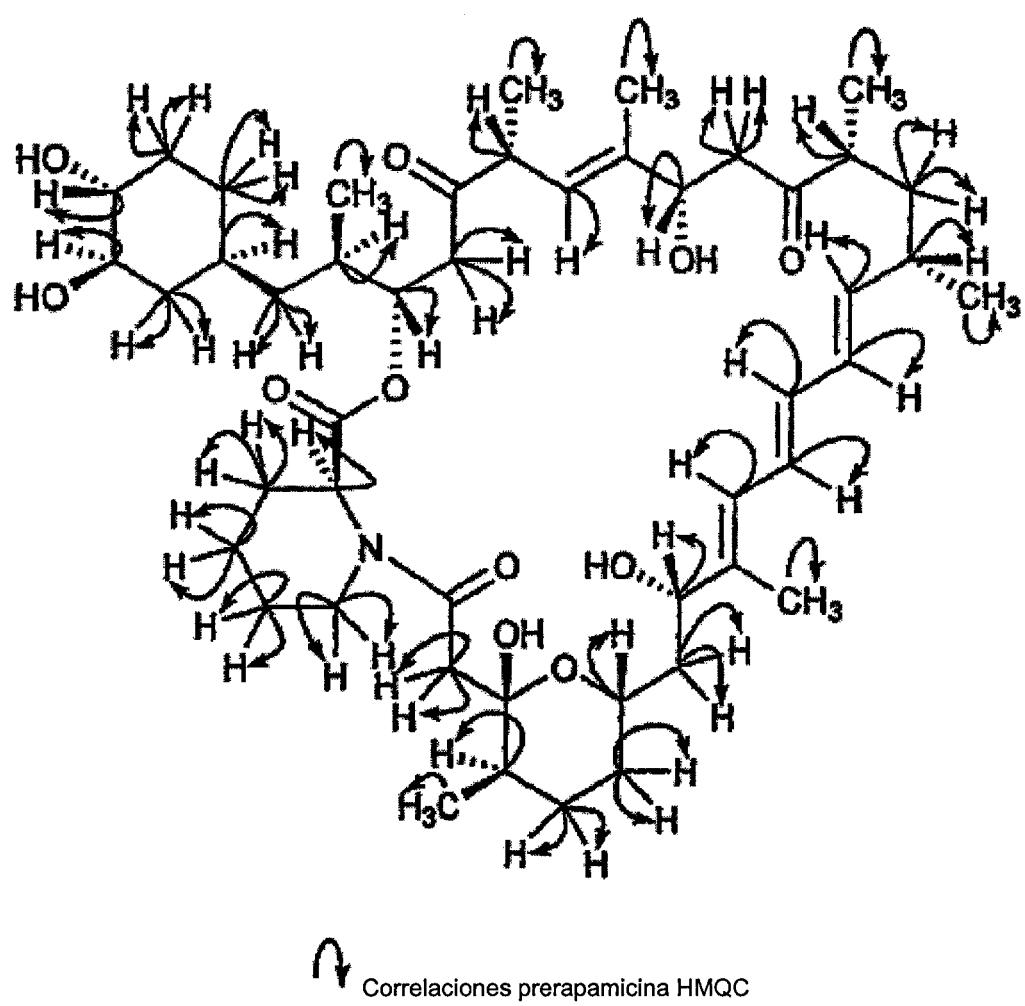
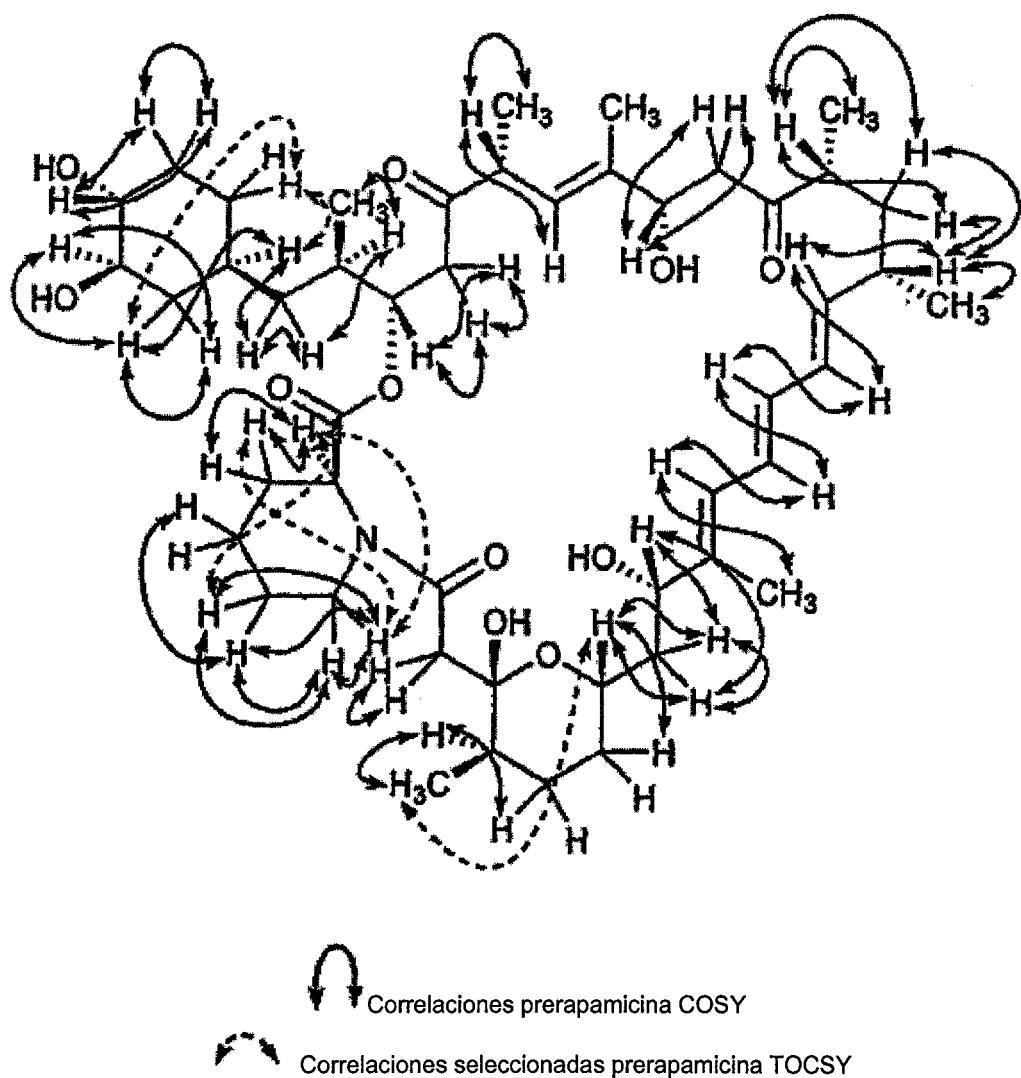


Figura 19



Correlaciones prerapamicina HMQC

Figura 20



ES 2 296 063 T3

Figura 21

646 GCGACCCGAGCAGATCGTTGGTGTCTGCTTCGGCGTTCCGGATCGC 597
 |||||
 92333 GCGACCCGAGCAGATCGTTGGTGTCTGCTTCGGCGTTCCGGATCGC 92382

 596 TCGGAGAGCTAGAGGTAGAGGCTAGCGACTGGCCGGCCCATCAGACATTG 547
 |||||
 92383 TCGGAGAGCTAGAGGTAGAGGCTAGCGACTGGCCGGCCCATCAGACATTG 92432

 546 TGAATTAGGCGCGCTTCCAGAGAGCATCTGGTCCGACCAAGTCCGAACCTG 497
 |||||
 92433 TGAATTAGGCGCGCTTCCAGAGAGCATCTGGTCCGACCAAGTCCGAACCTG 92482

 496 TCTGGCTCTGATCGGACGCCACGCCAGCAGCTCACAGATCATGATCGC 447
 |||||
 92483 TCTGGCTCTGATCGGACGCCACGCCAGCAGCTCACAGATCATGATCGC 92532

 446 AGAGGCAGGGCGAAGTCCTCCATCAGATCGCCGGGGCGCCCTTGGCGAG 397
 |||||
 92533 AGAGGCAGGGCGAAGTCCTCCATCAGATCGCCGGGGCGCCCTTGGCGAG 92582

 396 CATTTCCTGATCAGATCGTCCGGGACCTCCCTGGTGGCGGCGACCGAGGG 347
 |||||
 92583 CATTTCCTGATCAGATCGTCCGGGACCTCCCTGGTGGCGGCGACCGAGGG 92632

 346 CCTCCATCCCGGGCTGGTCAGCGCTTGGCTGGCAACCGGGCGAGCGGG 297
 |||||
 92633 CCTCCATCCCGGGCTGGTCAGCGCTTGGCTGGCAACCGGGCGAGCGGG 92682

 296 CTGTGTTCGGAGGGTCCATCAGATGAGCGGGCTGGCTGGATCGATCGC 247
 |||||
 92683 CTGTGTTCGGAGGGTCCATCAGATGAGCGGGCTGGCTGGATCGATCGC 92732

 246 CGGGGGGAAACGGGGGCAAGCTTTCGGAGGGCTGGCTGGGGCTGGAGCT 197
 |||||
 92733 CGGGGGGAAACGGGGGCAAGCTTTCGGAGGGCTGGCTGGGGCTGGAGCT 92782

 196 GCGGGTCCACGRACACCTTGGGGAGCTCCCGACCTGGTGGCGACCGG 147
 |||||
 92783 GCGGGTCCACGRACACCTTGGGGAGCTCCCGACCTGGTGGCGACCGG 92832

 146 GCTCTCCCCCGTACGGCATCAGCGACCTGGGGGGGGAGCTCACCGGGGG 97
 |||||
 92833 GCTCTCCCCCGTACGGCATCAGCGACCTGGGGGGGGAGCTCACCGGGGG 92882

 96 CAGCCGGTTGTACTCGGGGTGGGATCGGGAGTGGCTCCATTTCGGCGAAG 47
 |||||
 92883 CAGCCGGTTGTACTCGGGGTGGGATCGGGAGTGGCTCCATTTCGGCGAAG 92932

 46 GATAAAGGCAGGCCTTTCGGGTCACCCCTGATGGTGGTGGACAT 1
 |||||
 92933 GATAAAGGCAGGCCTTTCGGGTCACCCCTGATGGTGGTGGACAT 92978

Figura 22

```

1 MTTIDQGETGKACPYRPAEMERLETHPEYNRLDAGELGRVIMPYGGTW 50
1 MTTIDQGETGKACPYRPAEMERLETHPEYNRLDAGELGRVIMLDGRENW 50

51 LATSNEDVAKVFDPRSRSAITLGKDVPKVLPAIQDQPVINIMDPPPEHTR 100
51 LAASNEVAKVFDPRSRSAITLGKDVPKVLPAIQDQPVINIMDPPPEHTR 100

101 LERLAKTALTSRMEALRPRTOEVADDLIDKMLAKGAPDLMEOFALPLP 150
101 LERVAJKAALTSRMEALRPRTOEVADDLIDKMLAKGAPDLMEOFALPLP 150

151 IIMICELLGVPIEDQTKPRTWSDOMLSNGAYSQEVVMAAGQSLVLYLSEL 200
151 IIMICELLGVPIEDQTKPRTWSDOMLSNGAYSQEVVMAAGQSLVLYLSEL 200

201 IAEERKQDTMGLGSLVRAKNDKDRILSETELVGFAVTLLAGYETTANAI 250
201 IAEERKQDTMGLGSLVRAKNDKDRILSETELVGFAVTLLAGYETTANAI 250

251 GNSVYILLTHPERKLAELRKDLSSLIPKAVDELLRTPIAKQASNVRAVED 300
251 GNSVYILLTHPERKLAELRKDLSSLIPKAVDELLRTPIAKQASNVRAVED 300

301 VELSGTTIVKAGEAVAIQTHSANTDPKVDPEEIDPHTTSNPHMSLGHGA 350
301 VELSGTTIVKAGEAVAIQTHSANTDPKVDPEEIDPHTTSNPHMSLGHGA 350

351 HECOMGAQLVXVEMQTAALGSLISRIPALRFAVPEPRKFLRGRLVPSLEAL 400
351 HECOMGAQLVXVEMQTAALGSLISRIPALRFAVPEPRKFLRGRLVPSLEAL 400

401 SLTW* 405
401 PLTW* 405

```

ES 2 296 063 T3

Figura 23

758 CGCGAGTGACTGTCGGGGCATCCGCCGGCGCACCGGGGCGACCGGAGTC 709
93191 CGCGAGTGACTGTCGGGGCATCCGCCGGCGCACCGGGGCGACCGGAGTC 93240
708 ATCGAGAGATGTCGTTGATGGCTGACCCACTTCAGTTGGGTTATTTCCCTG 659
93241 ATCGAGAGATGTCGTTGATGGCTGACCCACTTCAGTTGGGTTATTTCCCTG 93290
658 TGATCCGAGGCGATGCCCTCAAGGCGCTGCCGCGTGCACCGTCAAGTGGC 609
93291 TGATCCGAGGCGATGCCCTCAAGGCGCTGCCGCGTGCACCGTCAAGTGGC 93340
608 GAAAGGGCGGCGACTCGGGCGCGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 559
93341 GAAAGGGCGGCGACTCGGGCGCGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 93390
558 TCCAGAGATGGGTAGGTGCGAGCTCTGATTTGACGAGCACATCA 509
93391 TCCAGAGATGGGTAGGTGCGAGCTCTGATTTGACGAGCACATCA 93440
508 CGAGGGAGTCCTCGAAGGGCACTTCCTCGCGCTCGCGCTCGCGCG 459
93441 CGAGGGAGTCCTCGAAGGGCACTTCCTCGCGCTCGCGCTCGCGCG 93490
458 AGGTTATCGCCCGCGGGACAGCGCTCGCGCTCGCGCTCGCGCG 409
93491 AGGTTATCGCCCGCGGGACAGCGCTCGCGCTCGCGCTCGCGCG 93540
408 CGCCAGGTCCCGCCCGGTCACTCCGGGGCGCTGGGACCGGCGAGGA 359
93541 CGCCAGGTCCCGCCCGGTCACTCCGGGGCGCTGGGACCGGCGAGGA 93590
358 ATTTGAGCCCGCTCGCCCGATTCTCGAAGGGCACTCCAGGAACCTGGCG 309
93591 ATTTGAGCCCGCTCGCCCGATTCTCGAAGGGCACTCCAGGAACCTGGCG 93640
308 TCGCGCTCTCGAGCGCTTCGAGAGCTCGCCAGGGCGCGCGCGCG 259
93641 TCGCGCTCTCGAGCGCTTCGAGAGCTCGCCAGGGCGCGCGCGCG 93690
258 CTGCTCGCTGAACTCGTCGGTGGCGCTACTCGCTGAAATCCGGCGCGCTCG 209
93691 CTGCTCGCTGAACTCGTCGGTGGCGCTACTCGCTGAAATCCGGCGCGCTCG 93740
208 CCTCGATCTCGGCCAGGAACTCGGAATCGTGCACACCCCGAGTCACAGC 159
93741 CCTCGATCTCGGCCAGGAACTCGGAATCGTGCACACCCCGAGTCACAGC 93790
158 TGGCCCTTTCGCGAAGTCGTCGGCGCGCGCGCTGAGTCGAGGAGCTGCG 109
93791 TGGCCCTTTCGCGAAGTCGTCGGCGCGCGCGCTGAGTCGAGGAGCTGCG 93840
108 GGAATTGAGGTGGCGGCCCTCGTCCTCGCCCTCGCGCGCGCGCGCG 59
93841 GGAATTGAGGTGGCGGCCCTCGTCCTCGCCCTCGCGCGCGCGCGCG 93890
58 CGAGATTGATGTCGGCGACACCGCTCGTGAAGGGCGGTCAACGCTCGCGCG 9
93891 CGAGATTGATGTCGGCGACACCGCTCGTGAAGGGCGGTCAACGCTCGCGCG 93937
8 TGGATCAT 1
93938 TGGATCAT 93945

ES 2 296 063 T3

Figura 24

1 MIOPDVVTAPTSVADINLDESGCTPQAETKAATFISASSSIYDLAASMSR 50
 1 MIOPDVVTAPTA.VRDINLDESGCTPQAETKAATFISASSSIYDLAASMSR 49
 51 KGQLWNGVHDSEPVAEIEARLPGPTEYGTDGFSSEQLYYLAEDLPKGLE 100
 50 KGQLWNGVHDSEPVAEIEARLPGPTEYGTDGFSSEQLYYLAEDLPKGLE 99
 101 SCGHTVILEVGCGMGEGLMFLSLRUVPTAATNTGLDLAPKIAASATATLGRG 150
 100 SCGHTVILEVGCGMGEGLMFLSLRUVPTAATNTGLDLAPKIAASATATLGRG 149
 151 DTLRFVQGDAEELPFFEDSSVDLVNIESSEHTYPNLGRPLRKAARVLRPGG 200
 150 DTLRFVQGDAEELPFFEDSSVDLVNIESSEHTYPNLGRPLRKAARVLRPGG 199
 201 ALSHIDVPTQRLAEARREITTEIPELNVVSDHDISDQVRAAVVRRMPPDS 250
 200 ALSHIDVPTQRLAEARREITTEIPELNVVSDHDISDQVRAAVVRRMPPDS 249
 251 HLRSTLINKORMNMRILARTLALHSQITVPGGTADYQPPFASVNLSRIGLVP 300
 250 HLRSTLINKORMNMRILARTLALHSQITVPGGTADYQPPFASVNLSRIGLVP 299
 301 PMDSLPMETTYRHOIAVRV* 319
 300 PMDSLPMETTYRHOIAVRV* 318

Figura 25

Figura 26

1 MOTKVLQORDIKRILSVVGRDVMDRLISEVHAGPARIIGRGETDEPPPR 50
1 MOTKVLQORDIKRILSVVGRDVMDRLISEVHAGPARIIGRGETDEPPPR 50

51 GFARGGGDVPGVVIEPPMPhRASGIGVMTKIVSYPNPERFNLPTIVGT 100
51 GFARGGGDVPGVVIEPPMPhRASGIGC5MKTIVSYPNPERFNLPTIVGT 100

101 LQDDSGSMVALADAATITAMRTGAVAATVTRLLARPGSTTLALIGAGAQ 150
101 LQDDSGSMVALADAATITAMRTGAVAATVTRLLARPGSTTLALIGAGAQ 150

151 VTONHALSKVPLERILISDIKAEEAESFAGRVAFLELPVEVTDAA 200
151 VTONHALSKVPLERILISDIKAEEAESFAGRVAFLELPVEVTDAA 200

201 TADVLCTVTSVPVGGGPVVPAAEPKQAHLYVNGIGADEBQGATELPKAL 250
201 TADVLCTVTSVPVGGGPVVPAAEPKQAHLYVNGIGADEBQGATELPKAL 250

251 AFICVDHPQJARAEGEFOQLPDRRELGPSLADICAAPEIAAPKPERLSV 300
251 AFICVDHPQJARAEGEFOQLPDRRELGPSLADICAAPEIAAPKPERLSV 300

301 STG5APADHIALDVLGLPADIELGLGHOMSTESTPVEDVLPFYL* 344
301 STG5APADHIALDVLGLPADIELGLGHOMSTESTPVEDVLPFYL* 344

Figura 27

201 GCACTGGGGGGGGCGGAGGGACTCGGCGACCCATGATGGCGCTGGCTGG 250
95630 GCACTGGGGGGGGCGGAGGGACTCGGCGACCCATGATGGCGCTGGCTGG 95679

251 CTGGACACCTGACTACCTCTTCGGTGTGGCGCGGTGGCGAGGGCGGC 300
95680 CTGGACACCTGACTACCTCTTCGGTGTGGCGCGGTGGCGAGGGCGGC 95729

301 CGTACCGGGCGGGCGGACGGGAGGGCGCGTCAACCGGAACTCTACGACCTGAT 350
95730 CGTACCGGGCGGGCGGACGGGAGGGCGCGTCAACCGGAACTCTACGACCTGAT 95779

351 CGGAACTGGGGTACCCGAGTCTGGGGCGCGACTGGAACTACGGTCGGCG 400
95780 CGGAACTGGGGTACCCGAGTCTGGGGCGCGACTGGAACTACGGTCGGCG 95829

401 GAATCAACACCGGACCGGATGGCGCTGAGGTCTACCGGACTCTGAT 450
95830 GAATCAACACCGGACCGGATGGCGCTGAGGTCTACCGGACTCTGAT 95879

451 GTGGGGGGGGCGGAGGGCGCTGGACGGCGCGTGGGATGGACGGGGCGACCAT 500
95880 GTGGGGGGGGCGGAGGGCGCTGGACGGCGCGTGGGATGGACGGGGCGACCAT 95929

501 GCGGGGGGGACGGCATGGCGGCCACGGCGGGCGGCATCGCGTGTACT 550
95930 GCGGGGGGGACGGCATGGCGGCCACGGCGGGCGGCATCGCGTGTACT 95979

551 TCATCGCGACCGCGCGCGTCAACATGGAGAACCGGGCGTG 600
95980 TCATCGCGACCGCGCGCGTCAACATGGAGAACCGGGCGTG 96029

601 CTCAACGGCTCACCGCTACCGCGACCGCGTACCGGGCGGGCGCGTCTT 650
96030 CTCAACGGCTCACCGCTACCGCGACCGGGCGTACCGGGCGGGCGCGTCTT 96079

651 CTCCGGGGCGCCCGTGGCTGCGCGCGGGGGCGGAGCGCGCGCGCGTCTT 700
96080 CTCCGGGGCGCCCGTGGCTGCGCGCGGGGGCGGAGCGCGCGCGCGTCTT 96120

701 TCGTCGCGCGACCGCGCGCGTGGCTGCGCGCGGGGGCGGAGCGCGCGCGTCTT 750
96121 TCGTCGCGCGACCGCGCGCGTGGCTGCGCGCGGGGGCGGAGCGCGCGCGTCTT 96170

Figura 28

```

1 VRQLTPPVTAYCRPEKLGASDLDGDETLLGVIEHRTGHTGVSLAEGCPR 50
1 VRQLTPPVTAYCRPEKLGASDLDGDETLLGVIEHRTGHTGVSLAEGCPR 50

51 TAVHTTTREDESPAAWAEGPKESGSHGVAARTPDTYLFGVARVPEGG 100
51 TAVHTTTREDESPAAWAEGPKESGSHGVAARTPDTYLFGVARVPEGG 100

101 RYAGTAAVYTGIFDLIGTGPSLARTNNVSGINTPNADGLEVYRDPC 150
101 RYAGTAAVYTGIFDLIGTGPSLARTNNVSGINTPNADGLEVYRDPC 150

151 VGRABADAGIDPATMATGIGAHGGTCYIARAGORVMMENPAV 200
151 VGRABADAGIDPATMATGIGAHGGTCYIARAGORVMMENPAV 200

201 LTAHRYPQRIGPRPVFSRATWLSPPGADDGLFVSATAGVGHETVHG 250
201 LTAHRYPQRIGPRPVFSGHLAJAGG...GRLFVSATAGVGQETVHG 247

251 DVAAQCEVSLENIARVIGAENLGRHGLAGTYALADVDHLKYVRHEDIS 300
248 DVAAQCEVSLENIARVIGAENLGRHGLAGTYALADVDHLKYVRHEDIS 297

301 TVRRICAEPLSREATVALHDIATOLLVEIGVVA* 338
300 TVRRICAEPLSREATVALHDIATOLLVEIGVVA* 335

```

ES 2 296 063 T3

Figura 29

401 AGCGOCTGGCGTCCCTGGCCATOCACGACCTCTACGGCTGAAATGAGGAG 450
 96915 AGCGOCTGGCGTCCCTGGCCATOCACGACCTCTACGGCTGAAAT...GAG 96911
 451 GAGGGGCCCGTACTCGAGGGCCAGATGCGGGCCATGGAGGGCGGCACCGA 500
 96912 GAGGGGCCCGTACTCGAGGGCCAGATGCGGGCCATGGAGGGCGGCACCGA 96961
 501 CATGGAGAGCATCAAGAGGCTGACCGACGAACTCTCGGTCTCGTCTGG 550
 96962 CATGGAGAGCATCAAGAGGCTGACCGACGAA...TTCGGTCACGTOCTGG 97008
 551 CGCTGGTGGTGGCGCAAGCGGGAGCAGGGGGCGACAGGGCTCTGCACCGG 600
 97009 CGCTGGTGGTGGCGCAAGCGGGAGCAGGGGGCGACAGGGCTCTGCACCGG 97058
 601 CTGGCGAGCTCCCGAGGGACGAGATCTGCTCAGCGACGGAGGGCGAC 650
 97059 CTGGCGAGCTCCCGAGGGACGAGATCTGCTCAGCGACGGAGGGCGAC 97108
 651 CGGGGTGTTGCCACTCTGCTGTTGCCGGGCACGACTCGATGCAGCAGA 700
 97109 CGGGGTGTTGCCACTCTGCTGTTGCCGGGCACGACTCGATGCAGCAGA 97158
 701 TGGTGGCTACTGTCTGACGCGCTGCTCTCCCATCCCGAGCAGCGGGCG 750
 97159 TGGTGGCTACTGTCTGACGCGCTGCTCTCCCATCCCGAGCAGCGGGCG 97208
 751 GCCTGGGGAGAACCGGACCTGATCGACGGCGGGTCGAGGAGGCTCT 800
 97209 GCCTGGGGAGAACCGGACCTGATCGACGGCGGGTCGAGGAGGCTCT 97258
 801 GCGCTTCTGCCGCTCAACCGACTCGCGCTGCCGGGCTGTTGTCGAGG 850
 97259 GCGCTTCTGCCGCTCAACCGACTCGCGCTGCCGGGCTGTTGTCGAGG 97308
 851 ACCTCGAGCTGACCGCCAGACCATCAGCGCCGGGACAACTGATCCCG 900
 97309 ACCTCGAGCTGACCGCCAGACCATCAGCGCCGGGACAACTGATCCCG 97358
 901 CTCTACTCGACGGCCAACCGGACCCCGTCTCGCGACCCCGACAC 950
 97359 CTCTACTCGACGGCCAACCGGACCCCGTCTCGCGACCCCGACAC 97408
 951 GTTCGACATCACCGCTAACGCGTAAGCCGAAACACAACCTTGTGTTACGGCA 1000
 97409 GTTCGACATCACCGCTAACGCGTAAGCCGAAACACAACCTTGTGTTACGGCA 97458
 1001 TCCACAAAGTGCCGGGGGAGCCACCTCGCCCGGGGTGTTGATCAAGGTGCC 1050
 97459 TCCACGGCTGCCGGGGGAGCCACCTCGCCCGGGGTGTTGATCAAGGTGCC 97508
 1051 ACCTCGGCTGTTGAGCGCTTCCCGGATGTGCGACTGGCGGGGAGGT 1100
 97509 ACCTCGGCTGTTGAGCGCTTCCCGGATGTGCGACTGGCGGGGAGGT 97558
 1101 GCGGATGAACCGAGGGCTCTGGGCTGTTCAAGCCCGGCCAGCTCCGGGTCA 1150
 97559 GCGGATGAACCGAGGGCTCTGGGCTGTTCAAGCCCGGCCAGCTCCGGGTCA 97608
 1151 CCTGGGGAGCGGAGTGA 1167
 97609 CCTGGGGAGCGGAGTGA 97625

Figura 30

1 MSTEAAQEQESTPTARCPPSIQDGHRTILETGTVGAEHLPGVKQWLVAAAED 50
 |||||
 1 MSTEAAQEQESTPTARCPPSIQDGHRTILETGTVGAEHLPGVKQWLVAAAED 50

 51 VKLVTDPRFSSAAPSGILGDRPGWPSGMDSPEHNRYRQKCIARDFTLRA 100
 |||||
 51 VKLVTDPRFSSAAPSGILGDRPGWPSGMDSPEHNRYRQKCIARDFTLRA 100

 101 ARKQEEFIVRAADSCLDDIEASGPGETDLPGYAKRLASLAITHDLYGLNEE 150
 |||||
 101 ARKQEEFIVRAADSCLDDIEASGPGETDLPGYAKRLASLAITHDLYGLNEE 149

 151 EGPVLEQOMRAAMEGGTDMESIKRLTDEFFGEVILALVRAKRDEAGDRLLHR 200
 |||||
 150 EGPVLEQOMRAAMEGGTDMESIKRLTDE.PGRVILALVRAKRDEAGDRLLHR 198

 201 LAESGEDEILLSDEKATGVPATLLFAGHDMSQQMVGYCLYALLSHPEQRA 250
 |||||
 199 LAESGEDEILLSDEKATGVPATLLFAGHDMSQQMVGYSLYALLSHPEQRA 248

 251 ALRENPDLLIDGIAVERLLRFLPLNQLGVPRVCVEDVELEGQITISAGDNVIP 300
 |||||
 249 ALRENPDLLIDGIAVERLLRFLPLNQLGVPRVCVEDVELEGQITISAGDNVIP 298

 301 LYSTANRDPGVFADPDTFDITRKPEHNTFGYGIHRCPGQHLARVLIKVA 350
 |||||
 299 LYSTANRDPGVFADPDTFDITRKPEHNTFGYGIHRCPGQHLARVLIKVA 348

 351 TRLFPERFPDVRLAGDVPMMNEGGLGLFSPAEELRVITWGAE* 389
 |||||
 349 TRLFPERFPDVRLAGDVPMMNEGGLGLFSPAEELRVITWGAE* 387

Figura 31

1 GTGAGCCGTCCGTGACGACATCAAGCTGCCAACGGCAAGACCGTC G 49
 97622 GTGAGCCGTCCGTGACGACATCAAGCTGCCAACGGCAAGACCGTC G 97670
 50 CCCACGTCACCCGGCGAGGCAGTTCCTCTACCCAGGAGATCTTGCC 99
 97671 CCCACGTCACCCGGCGAGGCAGTTCCTCTACCCAGGAGATCTTGCC 97726
 100 GAGCGGTGCTACTTGGGGCGGGCTTGAGCTGCCAGCGGGTGACGTGGT 149
 97721 GAGCGGTGCTACTTGGGGCGGGCTTGAGCTGCCAGCGGGTGACGTGGT 97770
 150 CTTCGAGCTGGCGCAACATCGGCATGTTCTGCTCTTCGCCAACCTGG 199
 97771 CTTCGAGCTGGCGCAACATCGGCATGTTCTGCTCTTCGCCAACCTGG 97820
 200 AGTGCCCGGATGTCACGGTGCACGCCCTTCGAGGCCGGCGCGGTGAC 249
 97821 AGTGCCCGGATGTCACGGTGCACGCCCTTCGAGGCCGGCGCGGTGAC 97870
 250 GCGCGCTCAGGGCCAATGCCGAGCGGTACGGCATCGCGGGCGGTTCGA 299
 97871 GCGCGCTCAGGGCCAATGCCGAGCGGTACGGCATCGCGGGCGGTTCGA 97920
 300 GCACTGCGCGGTCTGGACGTGGCCGGCGCGGCAAGATGACGTTCTACA 349
 97921 GCACTGCGCGGTCTGGACGTGGCCGGCGCGGCAAGATGACGTTCTACA 97970
 350 CGGATACCAACGATGATGTCGGGCTTCACCCGGATCCGGCGACCCGGCG 399
 97971 CGGATACCAACGATGATGTCGGGCTTCACCCGGATCCGGCGACCCGGCG 98020
 400 GAGCTGCTGCCAGGCTGCCATCAACGGGGTACAGTGCCGAGGCCGC 449
 98021 GAGCTGCTGCCAGGCTGCCATCAACGGGGTACAGTGCCGAGGCCGC 98070
 450 CGACCGGATGCTGGCGAGGCTGCCAGCAGCGACAGGTGATCGAGACGT 499
 98071 CGACCGGATGCTGGCGAGGCTGCCAGCAGCGACAGGTGATCGAGACGT 98120
 500 CGCTCGTACGCCCTCCGACGTCATCGCGAGCGGGCATCACCTCGATC 549
 98121 CGCTCGTACGCCCTCCGACGTCATCGCGAGCGGGCATCACCTCGATC 98170
 550 GGACTGCTCAAGATGATGTCGGAGAAGAACGAGCGGCATGTGATGGCGG 599
 98171 GGACTGCTCAAGATGATGTCGGAGAAGAACGAGCGGCATGTGATGGCGG 98220
 600 GATCGACGCGGGCGACTGGCGCGCATCCGCCAGGTGCGCACCGAGGTGC 649
 98221 GATCGACGCGGGCGACTGGCGCGCATCCGCCAGGTGCGCACCGAGGTGC 98270

ES 2 296 063 T3

Figura 32

1 VSASVOTIKLPGKTVAVNPGEAQFLVQEIFAERCYLRRGILELAGDVV 50
|||||
1 VSASVOTIKLPGKTVAVNPGEAQFLVQEIFAERCYLRRGILELAGDVV 50

51 FDVGANTIGMPSLPAHLECPDVTVAFFPAPVPAALRANAAERYGIAGRPF 100
|||||
51 FDVGANTIGMPSLPAHLECPDVTVAFFPAPVPAALRANAAERYGIAGRPF 100

101 QCAVSDVAGRKIMTFYTDITMSGFHDPPATRAELLRRRAINGGYSAEAA 150
|||||
101 QCAVSDVAGRKIMTFYTDITMSGFHDPPATRAELLRRRAINGGYSAEAA 150

151 DRMLAELPDTSQVIETSVVRLSDVIAERGITSIGLLKIDVERNEPHVMAG 200
|||||
151 DRMLAELPDTSQVIETSVVRLSDVIAERGITSIGLLKIDVERNEPHVMAG 200

201 IDRADNPRIQVVTTEVHDIDGRLDEVLTLLRGQGFTVLSBQEPPLPAGTDI 250
|||||
201 IDAGDNPRIQVVTTEVHDIDGRLDEVLTLLRGQGFTVLSBQEPPLPAGTDI 250

251 YQVVARRGDA* 261
|||||
251 YQVVARRGDA* 261

Figura 33

201 GGCCACCTCCATCGATCTGTCACCCGAACCTGACCCGGTAGGCCGCGCA 250
90998 GGCCACCTCCATCGATCTGTCACCCGAACCTGACCCGGTAGGCCCGCA 91047

251 AGTTGGCTCGCGGGGATCGATAACGTCACCCCTGGTCGAGGGTGACGTT 300
91048 AGTTGGCTCGCGGGGATCGATAACGTCACCCCTGGTCGAGGGTGACGTT 91057

Figura 34

1 NLELGTRLKFRFTGPIIIEAVNPRLOQHPYDVLMLRLLEGGRRIENVLELCGG 50
|||||
2 NLELGTRLKFRFTGPIIIEAVNPRLOQHPYDVLMLRLLEGGRRIENVLELCGG 51

51 TGFASRMLAERHSKVQATSIDLSPELTAVGPRKLA SRGIDNVTLVEGDVS 100
|||||
52 TGFASRMLAERHSKVQATSIDLSPELTAVGPRKLA SRGIDNVTLVEGDVS 101

101 TLPYPDDSFDTVMSA PGLHEVPTAGRLSAIR ESRVRLKPGGRFVIVDLDR 150
102 TLPYPDDSFDTVMSA PGLHEVPTAGRLSAIR ESRVRLKPGGRFVIVDLDR 151

151 RTKYGWTMDLFMKVMEPKPAP EPVPGTGLVDRLKENGFTIDHESAGPNW 200
152 RTKYGWTMDLFMKVMEPKPAP EPVPGTGLVDRLKENGFTIDHESAGPNW 201

201 TQ SIVATLEA* 211
|||||
202 TQ SIVATLEA* 212

Figura 35

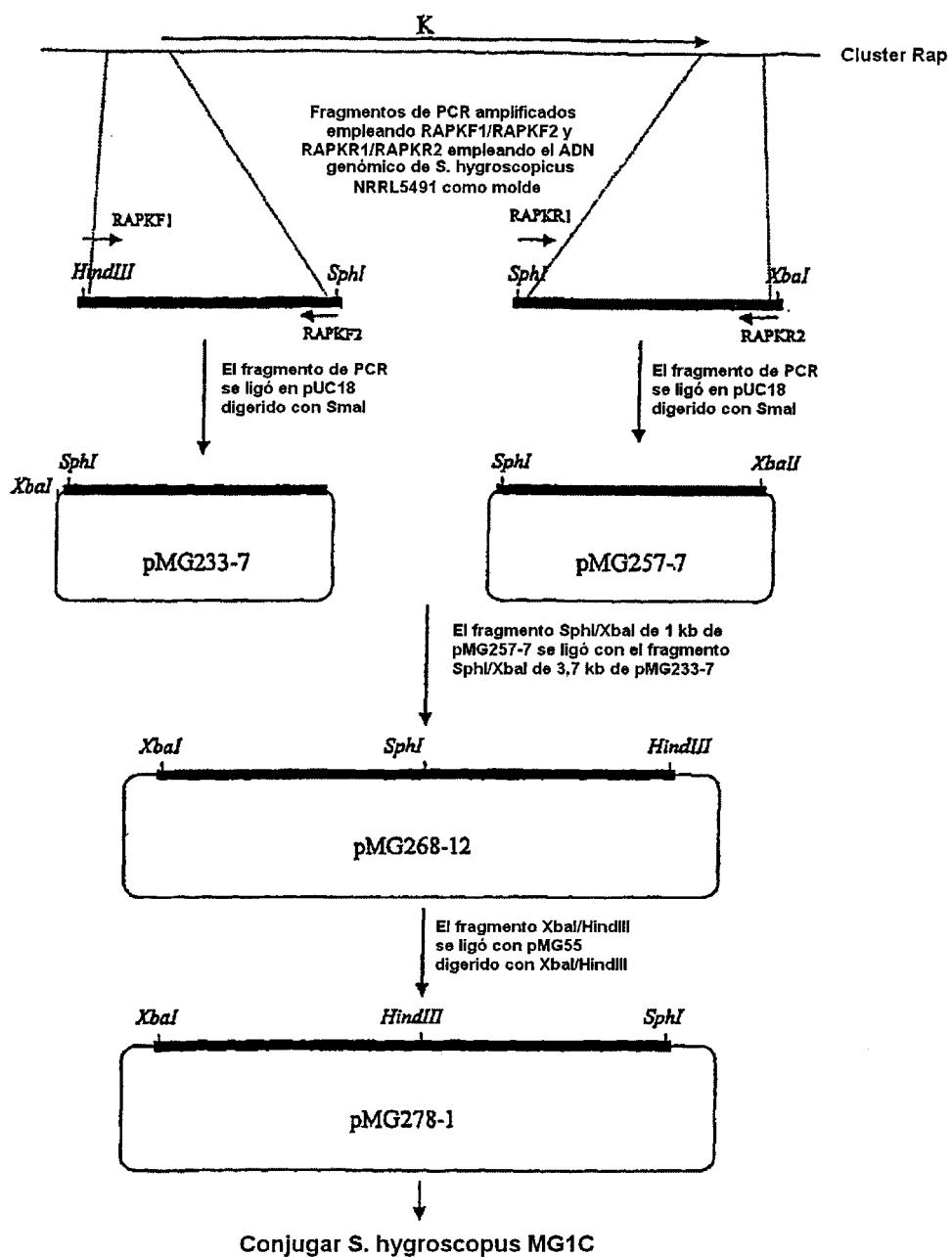
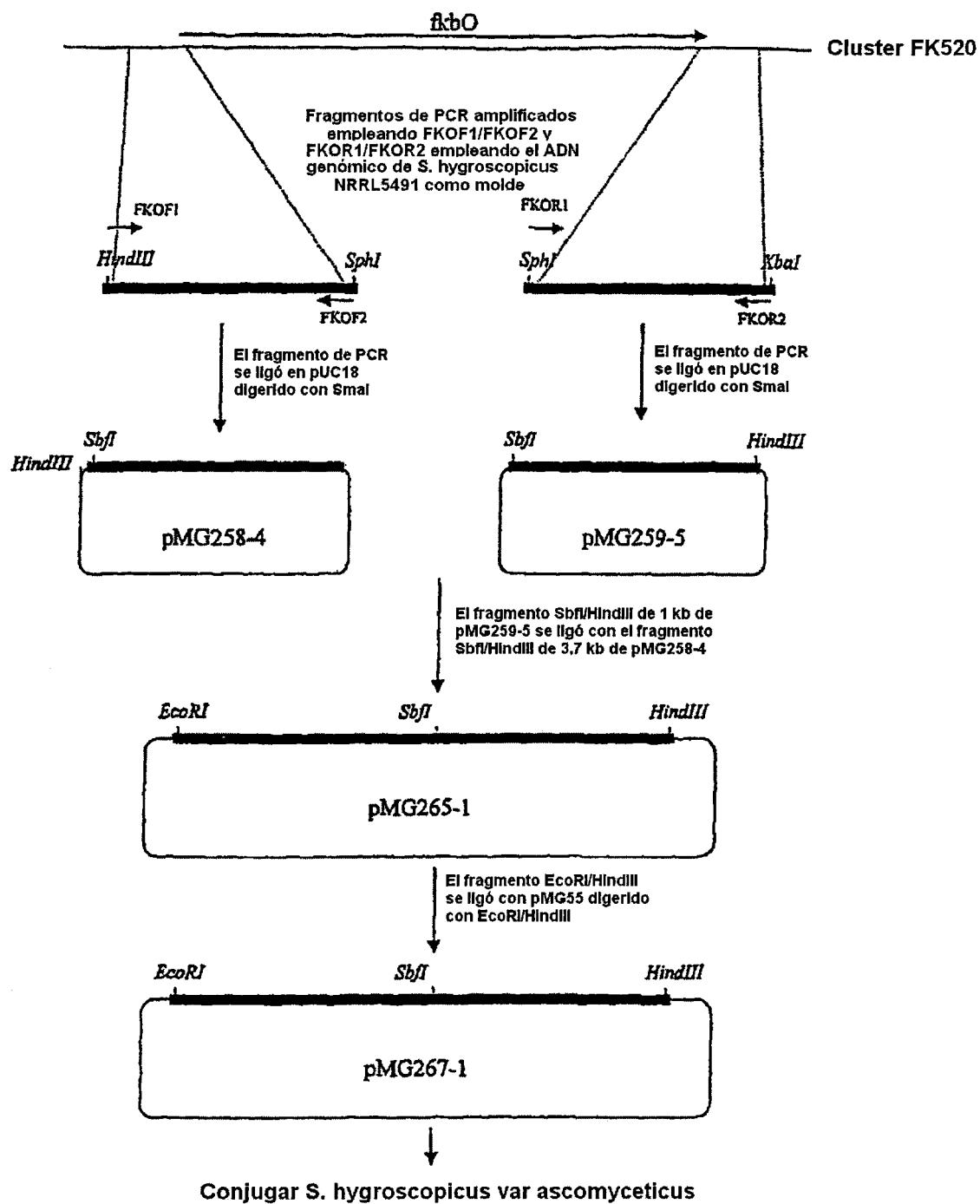


Figura 36



ES 2 296 063 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Biotica Technology Ltd
 Gregory, Matthew A
 Gaißer, Sabine
 Petkovic, Hrvoje
 Moss, Steven

10 <120> Producción de poliquétidos y otros productos naturales

15 <130> BITBY/P3-0717.E.Pdiv1

20 <140> 05075774.9
 <141> 2005-04-04

25 <150> GB0216509.0
 <151> 2002-07-16

30 <150> GB0224922.5
 <151> 2002-10-25

35 <160> 63

40 <170> Versión de la patente 3.1

45 <210> 1
 <211> 646
 <212> ADN
 <213> *Streptomyces hygroscopicus*

50 <400> 1

55 40 gcgacccgag cagatcggtg gtgtcctgct tgccggcggtc cgcgatcagc tcggagaggt 60
 agaggttagag cgactggcccg gcccgcattca cgacttcctg tgagtaggcgc cccgttcgaga 120
 gcatctggtc cgaccagggtc cggaaacttgg tctggtcctc gatccggcactc cccagcagct 180
 cacagatcat gatgatcggtc agaggcaggg cgaagtcctc catcagatcg gccccggcgc 240
 ccttggccag cattttgtcg atcagatcg tggcgacctc ctgggtgcgc ggacgcaggg 300
 cctccatccg gcccgtggtc agccgcattgg tcgccaacccg gcccggccgg gtgtgttccg 360
 gagggtccat cagcatgatg acgggctgggt cctggatcgc cggggaggacc cggggcacgt 420
 ccttggccag cgtcgccgtc cggctgaacc gcccgtccac gaacaccccttgc gacgttcct 480
 cccagctgggt gcccggccag gtctccccgc cgtacggcat caggaccggccgg cccggagctcac 540
 cggcgcccccg cagccgggttg tactcggttggatctcgag tcgtccatt tcggcgaaag 600
 gataaggcaggca ggcctttcccg gtctcacccct gatcggtcgt cgacat 646

60 65 <210> 2
 <211> 646
 <212> ADN
 <213> *Streptomyces hygroscopicus*

ES 2 296 063 T3

<400> 2

```

gcgacccgag cagatcgttg gtgtcctgct tgcgacgttc cgcgatcagc tcggagaggt      60
5      agaggtagag cgactggccg gccgccatca cgacttcctg tgagtaggcg ccgttcgaga      120
      gcatctggtc cgaccaggc tcgaaacttgg tctggccctc gatcggcacg cccagcagct      180
      cacagatcat gatgatcggc agaggcaggg cgaagtcctc catcagatcg gcggggcgc      240
10     ccttggccag cattttgtcg atcagatcg cggcgacctc ctgggtgcgc ggacgcaggg      300
      cctccatccg gcggctggc agcccttgg tcgcccacccg gcgcagccgg gtgtgttccg      360
      gagggtccat cagcatgatg acgggctggt cctggatcgc cgggaggacc cggggcacgt      420
15     ccttggccag cgtcgcgctg cggctgaacc gcgggtccac gaacaccttgc ggcacgtcct      480
      cccagctggc gcgcagccag gcctcccgcc cgtccaaacat caggaccgg ccgagctcac      540
      cggcgccccg cagccgggtt tactcggggtt ggatctcgag tcgctccatt tcggcgaaag      600
20     gataagggca ggccttcggt ctctaccct gatcggtcgt cgacat      646

```

<210> 3

<211> 404

25 <212> PRT

<213> *Streptomyces hygroscopicus*

<400> 3

30	Met Ser Thr Thr Asp Gln Gly Glu Thr Gly Lys Ala Cys Pro Tyr Pro
	1 5 10 15
35	Phe Ala Glu Met Glu Arg Leu Glu Ile His Pro Glu Tyr Asn Arg Leu
	20 25 30
40	Arg Asp Ala Gly Glu Leu Gly Arg Val Leu Met Pro Tyr Gly Gly Glu
	35 40 45
45	Thr Trp Leu Ala Thr Ser Trp Glu Asp Val Ala Lys Val Phe Val Asp
	50 55 60
50	Pro Arg Phe Ser Arg Ser Ala Thr Leu Gly Lys Asp Val Pro Arg Val
	65 70 75 80
55	Leu Pro Ala Ile Gln Asp Gln Pro Val Ile Met Leu Met Asp Pro Pro
	85 90 95
60	Glu His Thr Arg Leu Arg Arg Leu Ala Thr Lys Ala Leu Thr Ser Arg
	100 105 110
65	Arg Met Glu Ala Leu Arg Pro Arg Thr Gln Glu Val Ala Asp Asp Leu
	115 120 125
70	Ile Asp Lys Met Leu Ala Lys Gly Ala Pro Ala Asp Leu Met Glu Asp
	130 135 140
75	Phe Ala Leu Pro Leu Pro Ile Ile Met Ile Cys Glu Leu Leu Gly Val
	145 150 155 160

ES 2 296 063 T3

Pro Ile Glu Asp Gln Thr Lys Phe Arg Thr Trp Ser Asp Gln Met Leu
163 170 175

5 Ser Asn Gly Ala Tyr Ser Gln Glu Val Val Met Ala Ala Gly Gln Ser
180 185 190

10 Leu Tyr Leu Tyr Leu Ser Glu Leu Ile Ala Glu Arg Arg Lys Gln Asp
195 200 205

15 Thr Asn Asp Leu Leu Gly Ser Leu Val Arg Ala Arg Asp Lys Asp Asp
210 215 220

20 Arg Leu Ser Glu Thr Glu Leu Val Gly Phe Ala Val Thr Leu Ile
225 230 235 240

25 Ala Gly Tyr Glu Thr Thr Ala Asn Ala Ile Gly Asn Ser Val Tyr Thr
245 250 255

Leu Leu Thr His Pro Glu Lys Leu Ala Glu Leu Arg Lys Asp Leu Ser
260 265 270

30 Leu Ile Pro Lys Ala Val Asp Glu Leu Leu Arg Ile Ile Pro Ile Ala
275 280 285

Lys Gln Ala Ser Trp Val Arg Met Ala Val Glu Asp Val Glu Leu Ser
290 295 300

35 Gly Thr Ile Val Lys Ala Gly Glu Ala Val Ala Ile Gln Thr His Ser
305 310 315 320

40 Ala Asn Thr Asp Pro Lys Val Tyr Asp His Pro Glu Glu Ile Asp Phe
325 330 335

His Arg Thr Ser Asn Pro His Met Ser Leu Gly His Gly Ala His His
340 345 350

45 Cys Met Gly Ala Gln Leu Val Arg Val Glu Met Gln Thr Ala Leu Gly
355 360 365

50 Ser Leu Ile Ser Arg Ile Pro Ala Leu Arg Phe Ala Val Pro Glu Pro

<210> 4
<211> 404
<212> PRT
<213> *Streptomyces hygroscopicus*

60

65

ES 2 296 063 T3

<400> 4

Met Ser Thr Thr Asp Gln Gly Glu Thr Gly Lys Ala Cys Pro Tyr Pro
 1 5 10 15

5

Phe Ala Glu Met Glu Arg Leu Glu Ile His Pro Glu Tyr Asn Arg Leu
 20 25 30

10

Arg Asp Ala Gly Glu Leu Gly Arg Val Leu Met Leu Asp Gly Arg Glu
 35 40 45

15

Ala Trp Leu Ala Ala Ser Trp Glu Asp Val Ala Lys Val Phe Val Asp
 50 55 60

20

Pro Arg Phe Ser Arg Ser Ala Thr Leu Gly Lys Asp Val Pro Arg Val
 65 70 75 80

25

Leu Pro Ala Ile Gln Asp Gln Pro Val Ile Met Leu Met Asp Pro Pro
 85 90 95

30

Glu His Thr Arg Leu Arg Arg Val Ala Thr Lys Ala Leu Thr Ser Arg
 100 105 110

35

Arg Met Glu Ala Leu Arg Pro Arg Thr Gln Glu Val Ala Asp Asp Leu
 115 120 125

40

Ile Asp Lys Met Leu Ala Lys Gly Ala Pro Ala Asp Leu Met Glu Asp
 130 135 140

45

Phe Ala Leu Pro Leu Pro Ile Ile Met Ile Cys Glu Leu Leu Gly Val
 145 150 155 160

40

Pro Ile Glu Asp Gln Thr Lys Phe Arg Thr Trp Ser Asp Gln Met Leu
 165 170 175

45

Ser Asn Gly Ala Tyr Ser Gln Glu Val Val Met Ala Ala Gly Gln Ser
 180 185 190

50

Leu Tyr Leu Tyr Leu Ser Glu Leu Ile Ala Glu Arg Arg Lys Gln Asp
 195 200 205

55

Thr Asn Asp Leu Leu Gly Ser Leu Val Arg Ala Arg Asp Lys Asp Asp
 210 215 220

60

Arg Leu Ser Glu Thr Glu Leu Val Gly Phe Ala Val Thr Leu Leu Ile
 225 230 235 240

65

Ala Gly Tyr Glu Thr Thr Ala Asn Ala Ile Gly Asn Ser Val Tyr Thr
 245 250 255

Leu Leu Thr His Pro Glu Lys Leu Ala Glu Leu Arg Lys Asp Leu Ser
 260 265 270

ES 2 296 063 T3

	Lau Ile Pro Lys Ala Val Asp Glu Leu Leu Arg Ile Ile Pro Ile Ala			
	275	280	285	
5	Lys Gin Ala Ser Trp Val Arg Met Ala Val Glu Asp Val Glu Leu Ser			
	290	295	300	
10	Gly Thr Ile Val Lys Ala Gly Glu Ala Val Ala Ile Gln Thr His Ser			
	305	310	315	320
15	Ala Asn Thr Asp Pro Lys Val Tyr Asp His Pro Glu Glu Ile Asp Phe			
	325	330	335	
	His Arg Thr Ser Asn Pro His Met Ser Leu Gly His Gly Ala His His			
	340	345	350	
20	Cys Met Gly Ala Gln Leu Val Arg Val Glu Met Gln Thr Ala Leu Gly			
	355	360	365	
25	Ser Leu Ile Ser Arg Ile Pro Ala Leu Arg Phe Ala Val Pro Glu Pro			
	370	375	380	
	Arg Ile Lys Phe Leu Arg Gly Arg Leu Val Pro Ser Leu Glu Ala Leu			
	385	390	395	400
30	Pro Leu Thr Trp			
	<210> 5			
35	<211> 758			
	<212> ADN			
	<213> <i>Streptomyces hygroscopicus</i>			
40	<400> 5			
	cgaggtgac tgcgggggc catccgggg cgcacccggg cacggacttg atcggagatg		60	
45	tgcgtatcgc tgcacccactt cagttcggtt attccgttg tgatccgacg catgcctca		120	
	aggcgtctgcc gctgtacac gtcgtatgtc gaaaggcgcc caccggggcc cagcacgcgc		180	
	gcggcctccc gcaaggaaacg tcccaagattt gggtaggtgt gctgatcttc gatgttgcacg		240	
50	agcacatcca cccaggagtc ctcgaagggc agtccctcggt cgtcccttcg gacgaaccgc		300	
	agggtatcgc cgccggacacg cgtggcggtt gctgtggcga tcccttcgg cgccagggtcc		360	
	agcccggtca tccgggcgggt gggacgagg cggacagga agttgagccc ctccccccatt		420	
55	ccgcagccga cctccaggac cgtccggcccg tccatgtt ccaagccctt cggaaagggtcg		480	
	ccgcaggccca ggttagtagag ctgtcgctg aatccgtcg tgccgtactc ggtgaatccg		540	
60	ggcagccctgg cctcgatctc ggcacac gtcgtatgtt gtcacacccca gttccacagc		600	
	tggccctttt cccacatgtt ggcggcgagg tccatgtt gggatgttgc ggacttgaag		660	
65	gtggccggact tccatgtt cttccgtt cccatgtt gtcgtatgtt gtcggcgaca		720	
	ccgcgtggta aggcggtcac gacgtcggtt tggatcat		758	

ES 2 296 063 T3

<210> 6

<211> 755

<212> ADN

5 <213> *Streptomyces hygroscopicus*

<400> 6

10	cgagggtgac tgcggggggg catcgggggg cgcacggcgg cacggacttg atcggagatg	60
	tgcgtatcgc tgacccactt cagttcggtt atttccgttg tgatccgacg catcgccctca	120
15	aggcgctgcc gcgtaaacac gtcgtatgtgc gaaaggggcgc cacccggcgc cagcgccgc	180
	ggggcctccc gcaggaaacgg tcccagattg gggtaggtgt gcgagcttcgatgttgacg	240
	agcacatcca ccgaggaggc ctgcgaggcgc agtgcgttcgg cgtcgccctg gacgaaacgc	300
20	agggtatcgc cgcgggacag cgtggcggtg ggcgtggcga tcgcgttcgg cggcagggtcc	360
	agcccggtca tccgggggtt ggggacgagg cgggacagga agttgagccc ctcccccatt	420
25	ccgcagccga ctccaggac cgtccggccg tgcgtatctt ccaaggccctt cggaaagggtcg	480
	cgcaggccca ggttagtagag ctgcgtcgctg aatccgttcgg tgccgtactc ggtgaatccg	540
	ggcagccctgg cctcgatctt ggcgacgaaac tcggaatctt gcacacccca gttccacagc	600
30	tggcccttttgcgcacatgtt ggcggcgagg tcgttagatgg aggagctggc ggacttgaag	660
35	gtggggccct tgcgtatccgc ctgcgggggtg cgggggttcgt cgagattgtat gtcgcgaaacc	720
	gctgtgaagg cggtcacgac gtcgggttgg atcat	755

40 <210> 7

<211> 318

<212> PRT

<213> *Streptomyces hygroscopicus*

45

50

55

60

65

ES 2 296 063 T3

<400> 7

Met Ile Gln Pro Asp Val Val Thr Ala Phe Thr Ser Gly Val Ala Asp
 1 5 10 15

5
 Ile Asn Leu Asp Glu Ser Gly Thr Pro Gln Ala Glu Thr Lys Ala Ala
 20 25 30

10 Thr Phe Lys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Tyr Asp Leu Ala Ala Ser Met
 35 40 45

15 Ser Ala Lys Gly Gln Leu Trp Asn Trp Gly Val His Asp Ser Glu Phe
 50 55 60

20 Val Ala Glu Ile Glu Ala Arg Leu Pro Gly Phe Thr Glu Tyr Gly Thr
 65 70 75 80

25 Asp Gly Phe Ser Glu Gln Leu Tyr Tyr Leu Ala Leu Arg Asp Leu Pro
 85 90 95

30 Lys Gly Leu Gln Ser Cys Asp Gly Arg Thr Val Leu Glu Val Gly Cys
 100 105 110

35 Gly Met Gly Glu Gly Leu Asn Phe Leu Ser Arg Leu Val Pro Thr Ala
 115 120 125

40 Arg Met Thr Gly Leu Asp Leu Ala Pro Lys Ala Ile Ala Ser Ala Thr
 130 135 140

45 Ala Thr Leu Ser Arg Gly Asp Thr Leu Arg Phe Val Gln Gly Asp Ala
 145 150 155 160

50 Glu Glu Leu Pro Phe Glu Asp Ser Ser Val Asp Val Leu Val Asn Ile
 165 170 175

55 Glu Ser Ser His Thr Tyr Pro Asn Leu Gly Arg Phe Leu Arg Glu Ala
 180 185 190

60 Ala Arg Val Leu Arg Pro Gly Gly Ala Leu Ser His Ile Asp Val Phe
 195 200 205

65 Thr Arg Gln Arg Leu Glu Ala Met Arg Arg Ile Thr Thr Glu Ile Pro
 210 215 220

70 Glu Leu Lys Trp Val Ser Asp His Asp Ile Ser Asp Gln Val Arg Ala
 225 230 235 240

75 Ala Val Arg Arg Arg Met Ala Pro Asp Ser His Leu Arg Ser Thr Leu
 245 250 255

80 Asn Lys Gln Arg Met Asn Arg Leu Ala Arg Thr Leu Ala Leu His Ser
 260 265 270

ES 2 296 063 T3

Gln Ile Thr Val Phe Gly Gly Thr Phe Ala Asp Tyr Gln Pro Pro Ala
 275 280 285

5 Ser Val Lys Met Leu Ser Arg Leu Gly Leu Val Pro Pro Met Asp Ser
 290 295 300

10 Leu Pro Met Glu Thr Tyr Arg His Gln Ile Ala Val Arg Val
 305 310 315

<210> 8

<211> 317

15 <212> PRT

<213> *Streptomyces hygroscopicus*

<400> 8

20 Met Ile Gln Pro Asp Val Val Thr Ala Phe Thr Ala Val Arg Asp Ile
 1 5 10 15

25 Asn Leu Asp Glu Pro Gly Thr Pro Gln Ala Glu Thr Lys Ala Ala Thr
 20 25 30

30 Phe Lys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Tyr Asp Leu Ala Ala Ser Met Ser
 35 40 45

Ala Lys Gly Gln Leu Trp Asn Trp Gly Val His Asp Ser Glu Phe Val
 50 55 60

35 Ala Glu Ile Glu Ala Arg Leu Pro Gly Phe Thr Glu Tyr Gly Thr Asp
 65 70 75 80

40 Gly Phe Ser Glu Gln Leu Tyr Tyr Leu Ala Leu Arg Asp Leu Pro Lys
 85 90 95

45 Gly Leu Glu Ser Cys Asp Gly Arg Thr Val Leu Glu Val Gly Cys Gly
 100 105 110

50 Met Gly Glu Gly Leu Asn Phe Leu Ser Arg Leu Val Pro Thr Ala Arg
 115 120 125

55 Met Thr Gly Leu Asp Leu Ala Pro Lys Ala Ile Ala Ser Ala Thr Ala
 130 135 140

60 Thr Leu Ser Arg Gly Asp Thr Leu Arg Phe Val Gln Gly Asp Ala Glu
 145 150 155 160

65 Glu Leu Pro Phe Glu Asp Ser Ser Val Asp Val Leu Val Asn Ile Glu
 165 170 175

70 Ser Ser His Thr Tyr Pro Asn Leu Gly Arg Phe Leu Arg Glu Ala Ala
 180 185 190

75 Arg Ala Leu Arg Arg Gly Gly Ala Leu Ser His Ile Asp Val Phe Thr
 195 200 205

ES 2 296 063 T3

	Arg Gln Arg Leu Glu Ala Met Arg Arg Ile Thr Thr Glu Ile Pro Glu			
	210	215	220	
5	Leu Lys Trp Val Ser Asp His Asp Ile Ser Asp Gln Val Arg Ala Ala			
	225	230	235	240
10	Val Arg Arg Arg Met Pro Pro Asp Ser His Leu Arg Ser Thr Leu Asn			
	245	250	255	
15	Lys Gln Arg Met Asn Arg Leu Ala Arg Thr Leu Ala Leu His Ser Gln			
	260	265	270	
20	Ile Thr Val Phe Gly Gly Thr Phe Ala Asp Tyr Gln Pro Pro Ala Ser			
	275	280	285	
25	Val Lys Met Leu Ser Arg Leu Gly Leu Val Pro Pro Met Asp Ser Leu			
	290	295	300	
	Pro Met Glu Thr Tyr Arg His Gln Ile Ala Val Arg Val			
	305	310	315	
30	<210> 9			
	<211> 300			
	<212> ADN			
	<213> <i>Streptomyces hygroscopicus</i>			
	<400> 9			
35	gatcagggcg agggtgtgc tccccggccg ggcgagcagc cgggtggcga cggccgcgac	60		
	cgcgcggcgc cgcatggcgg tggatggtggc cgcgtggcgc agcgcgacca tgcttccgt	120		
	gtcgctcgccg agccgcgaca cgggtcccgac gatgggtggc aggttgaagc gctcgaaagtt	180		
40	ctgcggactg tagctgaccg tcttcatcgat cacaccgatg cccgacgcgc ggtgcggcat	240		
	gaactcgatg acgccccggaa cgtcgccgcgc gctggcaaaag cccgtacgcg gtggcggttc	300		
	<210> 10			
45	<211> 300			
	<212> ADN			
	<213> <i>Streptomyces hygroscopicus</i>			
50	<400> 10			
	gatcagggcg agggtgtgc tccccggccg ggcgagcagc cgggtggtgc cggacgcgcac	60		
	cgcgcggcgc cgcacatgcgg tggatggtggc cgcgtggcgc agcgcgacca tgcttccgt	120		
55	gtcgctcgccg agccgcgaca cgggtcccgac gatgggtggc aggttgaagc gctcgaaagtt	180		
	ctccggactg tagctgaccg tcttcatcgat cacaccgatg cccgacgcgc ggtgcggcat	240		
60	gaactcgatg acgccccggaa cgtcgccgcgc gctggcaaaag cccggacgcg gtggcggttc	300		
	<210> 11			
	<211> 343			
	<212> PRT			
65	<213> <i>Streptomyces hygroscopicus</i>			

ES 2 296 063 T3

<400> 11

Met	Gln	Thr	Lys	Val	Leu	Cys	Gln	Arg	Asp	Ile	Lys	Arg	Ile	Leu	Ser
1															
															15

5

Val	Val	Gly	Arg	Asp	Val	Met	Met	Asp	Arg	Leu	Ile	Ser	Glu	Val	His
															30

10

Ala	Gly	Phe	Ala	Arg	Leu	Gly	Arg	Gly	Glu	Thr	Asp	Glu	Pro	Pro	Pro
															45

15

Arg	Thr	Gly	Phe	Ala	Arg	Gly	Gly	Asp	Val	Pro	Gly	Val	Ile	Glu	Phe
															60

20

Met	Pro	His	Arg	Ala	Ser	Gly	Ile	Gly	Val	Thr	Met	Lys	Thr	Val	Ser
															80

25

Tyr	Ser	Pro	Gln	Asn	Phe	Glu	Arg	Phe	Asn	Leu	Pro	Thr	Ile	Val	Gly
															95

30

Thr	Val	Ser	Arg	Leu	Asp	Asp	Asp	Ser	Gly	Ser	Met	Val	Ala	Leu	Ala
															110

35

Asp	Ala	Ala	Thr	Ile	Thr	Ala	Met	Arg	Thr	Gly	Ala	Val	Ala	Ala	Val
															125

40

Ala	Thr	Arg	Leu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ser	Thr	Leu	Ala	Leu	Ile	
															140

45

Gly	Ala	Gly	Ala	Gln	Ala	Val	Thr	Gln	Ala	His	Ala	Leu	Ser	Arg	Val
															160

50

Leu	Pro	Leu	Glu	Arg	Ile	Leu	Ile	Ser	Asp	Ile	Lys	Ala	Glu	His	Ala
															175

55

Glu	Ser	Phe	Ala	Gly	Arg	Val	Ala	Phe	Leu	Glu	Leu	Pro	Val	Glu	Val
															190

60

Thr	Asp	Ala	Ala	Thr	Ala	Met	Ala	Thr	Ala	Asp	Val	Leu	Cys	Thr	Val
															205

65

Thr	Ser	Val	Pro	Val	Gly	Gly	Pro	Val	Val	Pro	Ala	Glu	Pro	Arg	
															220

70

Gln	Ala	His	Leu	His	Val	Asn	Gly	Ile	Gly	Ala	Asp	Glu	Gln	Gly	Lys
															240

75

Thr	Glu	Leu	Pro	Lys	Ala	Leu	Leu	Asp	Asp	Ala	Phe	Ile	Cys	Val	Asp
															255

80

Nis	Pro	Gly	Gln	Ala	Arg	Ala	Glu	Gly	Glu	Phe	Gln	Gln	Leu	Pro	Asp
															270

85

Arg	Glu	Leu	Gly	Pro	Ser	Leu	Ala	Asp	Leu	Cys	Ala	Ala	Pro	Glu	Ile
															285

ES 2 296 063 T3

Thr Val Ser Arg Leu Asp Asp Asp Ser Gly Ser Met Val Ala Leu Ala
 100 105 110

5 Asp Ala Ala Thr Ile Thr Ala Met Arg Thr Gly Ala Val Ala Ala Val
 115 120 125

10 Ala Thr Arg Leu Leu Ala Arg Pro Gly Ser Thr Thr Leu Ala Leu Ile
 130 135 140

15 Gly Ala Gly Ala Gln Ala Val Thr Gln Ala His Ala Leu Ser Arg Val
 145 150 155 160

20 Leu Pro Leu Glu Arg Ile Leu Ile Ser Asp Ile Lys Ala Glu His Ala
 165 170 175

25 Glu Ser Phe Ala Gly Arg Val Ala Phe Leu Glu Leu Pro Val Glu Val
 180 185 190

30 Thr Asp Ala Ala Thr Ala Met Ala Thr Ala Asp Val Leu Cys Thr Val
 195 200 205

35 Thr Ser Val Pro Val Gly Gly Pro Val Val Pro Ala Glu Pro Arg
 210 215 220

40 Gln Ala His Leu His Val Asn Gly Ile Gly Ala Asp Glu Gln Gly Lys
 225 230 235 240

45 Thr Glu Leu Pro Lys Ala Leu Leu Asp Asp Ala Phe Ile Cys Val Asp
 245 250 255

50 His Pro Gly Gln Ala Arg Ala Glu Gly Glu Phe Gln Gln Leu Pro Asp
 260 265 270

Arg Glu Leu Gly Pro Ser Leu Ala Asp Leu Cys Ala Ala Pro Glu Ile
 275 280 285

Ala Ala Pro His Pro Glu Arg Leu Ser Val Phe Asp Ser Thr Gly Ser
 290 295 300

55 Ala Phe Ala Asp His Ile Ala Leu Asp Val Leu Leu Gly Phe Ala Asp
 305 310 315 320

Glu Leu Gly Leu Gly His Lys Met Ser Ile Glu Ser Thr Pro Glu Asp
 325 330 335

60 Val Leu Asp Pro Tyr Ser Leu
 340

<210> 12
 <211> 343
 65 <212> PRT
 <213> *Streptomyces hygroscopicus*

ES 2 296 063 T3

<400> 12

Met Gln Thr Lys Val Leu Cys Gln Arg Asp Ile Lys Arg Ile Leu Ser
 1 5 10 15

5

Val Val Gly Arg Asp Val Met Met Asp Arg Leu Ile Ser Glu Val His
 20 25 30

10

Ala Gly Phe Ala Arg Leu Gly Arg Gly Glu Thr Asp Glu Pro Pro Pro
 35 40 45

15

Arg Pro Gly Phe Ala Arg Gly Gly Asp Val Pro Gly Val Ile Glu Phe
 50 55 60

20

Met Pro His Arg Ala Ser Gly Ile Gly Cys Ser Met Lys Thr Val Ser
 65 70 75 80

25

Tyr Ser Pro Glu Asn Phe Glu Arg Phe Asn Leu Pro Thr Ile Val Gly
 85 90 95

30

Thr Val Ser Arg Leu Gly Asp Asp Ser Gly Ser Met Val Ala Leu Ala
 100 105 110

35

Asp Ala Ala Thr Ile Thr Ala Met Arg Thr Gly Ala Val Ala Ser Val
 115 120 125

Thr Thr Arg Leu Leu Ala Arg Pro Gly Ser Thr Thr Leu Ala Leu Ile
 130 135 140

40

Gly Ala Gly Ala Gln Ala Val Thr Gln Ala His Ala Leu Ser Arg Val
 145 150 155 160

45

Leu Pro Leu Glu Arg Ile Leu Ile Ser Asp Ile Lys Ala Glu His Ala
 165 170 175

50

Glu Ser Phe Ala Gly Arg Val Ala Phe Leu Glu Leu Pro Val Glu Val
 180 185 190

55

Thr Asp Ala Ala Thr Ala Met Ala Thr Ala Asp Val Leu Cys Thr Val
 195 200 205

60

Thr Ser Val Pro Val Gly Gly Pro Val Val Pro Ala Glu Pro Arg
 210 215 220

Gln Ala His Leu His Val Asn Gly Ile Gly Ala Asp Glu Gln Gly Lys
 225 230 235 240

65

Thr Glu Leu Pro Lys Ala Leu Leu Asp Asp Ala Phe Ile Cys Val Asp
 245 250 255

ES 2 296 063 T3

	His Pro Gly Gin Ala Arg Ala Glu Gly Glu Phe Gin Gin Leu Pro Asp			
	260	265	270	
5	Arg Glu Leu Gly Pro Ser Leu Ala Asp Leu Cys Ala Ala Pro Glu Ile			
	275	280	285	
10	Ala Ala Pro His Pro Glu Arg Leu Ser Val Phe Asp Ser Thr Gly Ser			
	290	295	300	
15	Ala Phe Ala Asp His Ile Ala Leu Asp Val Leu Leu Gly Phe Ala Asp			
	305	310	315	320
	Glu Leu Gly Leu Gly His Lys Met Ser Ile Glu Ser Thr Pro Glu Asp			
	325	330	335	
20	Val Leu Asp Pro Tyr Ser Leu			
	340			
	<210> 13			
	<211> 550			
25	<212> ADN			
	<213> <i>Streptomyces hygroscopicus</i>			
	<400> 13			
30	gcacgcggag gggccgagg agtcggcag ccatgatggc gtcgcctggg ctcggacacc		60	
	tgactacctc ttccgggtcg cgccgggtgcc cgagggcggc cggtaacgcgg cccggcaccgc		120	
35	ggccgtctac accggaatct tcgacctgat cgggacgctg gggtaaccca gtcgtggcccg		180	
	cacctggaac tacgtcagcg gaatcaacac gccgaacgccc gatggcctcg aggtctaccg		240	
	ggacttctgt gtggggcccg cgaggccgtt ggacgcctgt gggatcgacc cggcgaccat		300	
40	gcccggcccg accggcattcg gcccacgg cggccgcattc acgtgtact tcattgcgc		360	
	acggcgccgtt gacccgggtca acatggagaa cccggccgtg ctcacggctc accgttaccc		420	
	gcaggcgtac ggcccccggcc cgccggcttt ctcggggcc accgtgtctt cgccgggg		480	
45	ggcggacgac ggccggctct tctgttcggc gacccgggc atcgatcgatc acgagacgtt		540	
	gcaccacggc		550	
50	<210> 14			
	<211> 541			
	<212> ADN			
	<213> <i>Streptomyces hygroscopicus</i>			
55	<400> 14			
	gcacgcggag gggccgagg agtcgtcgag gcatgatggc gtcgcctggg ctcggacacc		60	
60	tgactacctc ttccgggtcg cgccgggtgcc cgagggcggc cggtaacgcgg cccggcaccgc		120	
	ggccgtctac accggaatct tcgacctgat cgggacgctg gggtaaccca gtcgtggcccg		180	
	cacctggaac tacgtcagcg gaatcaacac gccgaacgccc gatggcctcg aggtctaccg		240	

ES 2 296 063 T3

	ggacttctgt gtggggcgcg ccggggcgct ggacggccgt gggatcgacc cggcgaccat	300
	gcggcgccg accggcateg ggcggccacgg cgccgcgcac acgtgtact tcatcgccgc	360
5	acggcgccgtt gacggggtca acatggagaa cccggccgtg ctcacggctc acggatcccc	420
	gcagcggtac ggcccccgcc cgccggctt ctccggccac ctggctctcg ccggccggggg	480
10	cggacggctc ttgtcteog cgaccggccgg categtcggt caggagacgg tgcaccacgg	540
	c	541

<210> 15

15 <211> 337

<212> PRT

<213> *Streptomyces hygroscopicus*

20 <400> 15

	Val Arg Gln Leu Thr Pro Pro Val Thr Ala Pro Tyr Cys Arg Phe Glu	15
	1 5 10	

25

	Lys Leu Gly Ala Ser Asp Leu Asp Gly Asp Glu Thr Leu Leu Gly Val	30
	20 25 30	

30

	Ile Glu His Arg Thr Gly His Thr Gly Val Ser Leu Ala Glu Gly Cys	45
	35 40 45	

35

	Pro Arg Thr Ala Val His Thr Thr Arg Glu Asp Glu Ser Phe Ala	60
	50 55 60	

40

	Glu Ala Trp His Ala Glu Gly Pro Lys Glu Ser Gly Ser His Asp Gly	80
	65 70 75 80	

45

	Val Ala Trp Ala Arg Thr Pro Asp Tyr Leu Phe Gly Val Ala Arg Val	95
	85 90 95	
	Pro Glu Gly Gly Arg Tyr Ala Ala Gly Thr Ala Ala Val Tyr Thr Gly	110
	100 105 110	

50

	Ile Phe Asp Leu Ile Gly Thr Leu Gly Tyr Pro Ser Leu Ala Arg Thr	125
	115 120 125	

55

	Trp Asn Tyr Val Ser Gly Ile Asn Thr Pro Asn Ala Asp Gly Leu Glu	140
	130 135 140	

60

	Val Tyr Arg Asp Phe Cys Val Gly Arg Ala Glu Ala Leu Asp Ala Arg	160
	145 150 155 160	
	Gly Ile Asp Pro Ala Thr Met Pro Ala Ala Thr Gly Ile Gly Ala His	175
	165 170 175	

65

ES 2 296 063 T3

Gly Gly Gly Ile Thr Cys Tyr Phe Ile Ala Ala Arg Ala Gly Asp Arg
 180 185 190
 Val Asn Met Glu Asn Pro Ala Val Leu Thr Ala His Arg Tyr Pro Gin
 5 195 200 205
 Arg Tyr Gly Pro Arg Pro Pro Val Phe Ser Arg Ala Thr Trp Leu Ser
 10 210 215 220
 Pro Pro Gly Ala Asp Asp Gly Arg Leu Phe Val Ser Ala Thr Ala Gly
 225 230 235 240
 Ile Val Gly His Glu Thr Val His His Gly Asp Val Ala Ala Gln Cys
 15 245 250 255
 Glu Val Ser Leu Glu Asn Ile Ala Arg Val Ile Gly Ala Glu Asn Leu
 20 260 265 270
 Gly Arg His Gly Leu Arg Arg Gly Tyr Ala Leu Ala Asp Val Asp His
 275 280 285
 Leu Lys Val Tyr Val Arg His Arg Glu Asp Ile Ser Thr Val Arg Arg
 290 295 300
 Ile Cys Ala Glu Arg Leu Ser Arg Glu Ala Thr Val Ala Val Leu His
 30 305 310 315 320
 Thr Asp Ile Ala Arg Thr Asp Leu Leu Val Glu Ile Glu Gly Val Val
 35 325 330 335
 Ala
 <210> 16
 40 <211> 334
 <212> PRT
 <213> *Streptomyces hygroscopicus*
 45 <400> 16
 Val Arg Gin Leu Thr Pro Pro Val Thr Ala Pro Tyr Cys Arg Phe Glu
 1 5 10 15
 50 Lys Leu Gly Ala Ser Asp Leu Asp Gly Asp Glu Thr Leu Leu Gly Val
 20 25 30
 Ile Glu His Arg Thr Gly His Thr Gly Val Ser Leu Ala Glu Gly Cys
 55 35 40 45
 Pro Arg Thr Ala Val His Thr Thr Arg Glu Asp Glu Ser Phe Ala
 60 50 55 60
 Glu Ala Trp His Ala Glu Gly Pro Lys Glu Ser Ser Arg His Asp Gly
 65 65 70 75 80
 65 Val Ala Trp Ala Arg Thr Pro Asp Tyr Leu Phe Gly Val Ala Arg Val
 85 85 90 95

ES 2 296 063 T3

Pro Glu Gly Gly Arg Tyr Ala Ala Gly Thr Ala Ala Val Tyr Thr Gly
 100 105 110

5 Ile Phe Asp Leu Ile Gly Thr Leu Gly Tyr Pro Ser Leu Ala Arg Thr
 115 120 125

10 Trp Asn Tyr Val Ser Gly Ile Asn Thr Pro Asn Ala Asp Gly Leu Glu
 130 135 140

15 Val Tyr Arg Asp Phe Cys Val Gly Arg Ala Glu Ala Leu Asp Ala Arg
 145 150 155 160

Gly Ile Asp Pro Ala Thr Met Pro Ala Ala Thr Gly Ile Gly Ala His
 165 170 175

20 Gly Ala Arg Ile Thr Cys Tyr Phe Ile Ala Ala Arg Ala Gly Asp Arg
 180 185 190

25 Val Asn Met Glu Asn Pro Ala Val Leu Thr Ala His Arg Tyr Pro Gln
 195 200 205

Arg Tyr Gly Pro Arg Pro Pro Val Phe Ser Gly His Leu Ala Leu Ala
 210 215 220

30 Ala Gly Gly Arg Leu Phe Val Ser Ala Thr Ala Gly Ile Val Gly
 225 230 235 240

35 Gln Glu Thr Val His His Gly Asp Val Ala Ala Gln Cys Glu Val Ser
 245 250 255

40 Leu Glu Asn Ile Ala Arg Val Ile Gly Ala Glu Asn Leu Gly Arg His
 260 265 270

45 Gly Leu Arg Arg Gly Tyr Ala Leu Ala Asp Val Asp His Leu Lys Val
 275 280 285

50 Tyr Val Arg His Arg Glu Asp Ile Ser Thr Val Arg Arg Ile Cys Ala
 290 295 300

Glu Arg Leu Ser Arg Glu Ala Thr Val Ala Val Leu His Thr Asp Ile
 305 310 315 320

55 Ala Arg Thr Asp Leu Leu Val Glu Ile Glu Gly Val Val Ala
 325 330

60 <210> 17

<211> 767

<212> ADN

<213> *Streptomyces hygroscopicus*

65

ES 2 296 063 T3

<400> 17

5	agcgccctggc gteccctggcc atccacgacc tctacggcct gaatgaggag gagggggcccg	60
	tactcgaggg ccagatgogg gccatggagg goggcacoga catggagagc atcaagaggc	120
	tgaccgacgaa atttcttggc daatgttctgg agatggggcgg tgccaaagcgg gaggcaggcgg	180
10	gcgacaggt tctgcaccgg ctggccgagt ccggcggagga cgagatcctg ctcagcggacg	240
	aggaggogac cgggggtgttc gccactctgc tggtcggcgg gacgactcg atggagcaga	300
	tggtcggcgt ctgtctgtac gogctgtctt cccatccccg gcaagggggcg gctgtgcggg	360
15	agaacccgga cctgatcgac ggcggggcgt aggacgtgtc gacgttctcg cccatcaacc	420
	agctcgccgt gcccggggtc tggtcggagg acgtcgagct gacggccag accatcageg	480
	ccggcgacaa cgtatccccg ctctactcga cggccaaaccg cggccggcgt gtcttcggcg	540
20	accccgacac gttcgacatc acgcgtaaac ccgaacacaa cttcgtttc ggttacggca	600
	tccacaagtg cccggggcag cacctcgccc gacgtttgat caaggtcgcc acgctgcgcc	660
25		
	tgttcgagcg ctcccggtat gtgcgacttgg cggcggacgt gcccgttgc gagggtatgg	720
	gcctgttcaag cccggcccgag ctccgggtca cctggggagc ggagtga	767
30	<210> 18	
	<211> 761	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	
	<400> 18	
40	agcgccctggc gteccctggcc atccacgacc tctacggcct gaatgaggag gggcccgat	60
	tcgaggggccs gatgcgggccc atggaggggcg gacccgacat ggagagcata aagaggctga	120
	ccgacgaatt cggtcacgtc ctggcgatgg tgcgtgcctt gggggacgag gggggcgaca	180
45	ggcttctgca cccggctggcc ggtccggcg aggacgagat cctgttcagc gacgaggagg	240
	ccacccgggtt gttcgccact ctgtgttgc cccggccacga ctcgtgcag cagatggcg	300
	gtacgttgcgt ctctaccatc ccgacgacgag ggcggcgatc cgggagaacc	360
50	cgacactgtat cggacggcgat gtcgaggagc tgctgcgtt cctgcccgtc aaccagctcg	420
	gcgtgcggcg ggtctgtgtc gaggacgtcg agctgcacgg ccacccatc agcggccggcg	480
	acaacgttat cccgttctac tcgacggccs accgcgacccc cggcgatcc gccgaccccg	540
55	acaacgttca catcacgcgt aagcccaac acaacttcgc ttccgggtac ggcacccacg	600
	gtcgcccgcc gcaacccatc gcccgtgt tgatcaaggt cggccaccgtg cccctgttcg	660
60	agcgcttccc ggtatgtgcga ctggcgcccg acgtgcgtat gacgagggt ctggccgt	720
	tcaacccggc cggacgtccgg gtcacccggg gagcggagtg a	761
	<210> 19	
65	<211> 388	
	<212> PRT	
	<213> <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	

ES 2 296 063 T3

<400> 19

Met Ser Thr Glu Ala Gln Gln Glu Ser Thr Pro Thr Ala Arg Cys Pro
 1 5 10 15
 Phe Ser Ile Gln Asp Gly His Arg Thr Ile Leu Glu Thr Gly Thr Val
 20 25 30

 Gly Ala His Glu Leu Phe Gly Val Lys Gln Trp Leu Val Ala Ala Ala
 35 40 45

 Glu Asp Val Lys Leu Val Thr Asn Asp Pro Arg Phe Ser Ser Ala Ala
 50 55 60

 Pro Ser Gly Ile Leu Gly Asp Arg Arg Pro Gly Trp Phe Ser Gly Met
 65 70 75 80

 Asp Ser Pro Glu His Asn Arg Tyr Arg Gln Lys Ile Ala Arg Asp Phe
 85 90 95

 Thr Leu Arg Ala Ala Arg Lys Gln Glu Glu Phe Ile Val Arg Ala Ala
 100 105 110

 Asp Ser Cys Leu Asp Asp Ile Glu Ala Ser Gly Pro Gly Thr Asp Leu
 115 120 125

 Val Pro Gly Tyr Ala Lys Arg Leu Ala Ser Leu Ala Ile His Asp Leu
 130 135 140

 Tyr Gly Leu Asn Glu Glu Glu Gly Pro Val Leu Glu Gly Gln Met Arg
 145 150 155 160

 Ala Met Glu Gly Gly Thr Asp Met Glu Ser Ile Lys Arg Leu Thr Asp
 165 170 175

 Glu Phe Phe Gly His Val Leu Ala Leu Val Arg Ala Lys Arg Glu Gln
 180 185 190

 Ala Gly Asp Arg Leu Leu His Arg Leu Ala Glu Ser Gly Glu Asp Glu
 195 200 205

 Ile Leu Leu Ser Asp Glu Glu Ala Thr Gly Val Phe Ala Thr Leu Leu
 210 215 220

 Phe Ala Gly His Asp Ser Met Gln Gln Met Val Gly Tyr Cys Leu Tyr
 225 230 235 240

 Ala Leu Leu Ser His Pro Glu Gln Arg Ala Ala Leu Arg Glu Asn Pro
 245 250 255

 Asp Leu Ile Asp Gly Ala Val Glu Glu Leu Leu Arg Phe Leu Pro Leu
 260 265 270

 Asn Gln Leu Gly Val Pro Arg Val Cys Val Glu Asp Val Glu Leu His
 275 280 285

 Gly Gln Thr Ile Ser Ala Gly Asp Asn Val Ile Pro Leu Tyr Ser Thr
 290 295 300

 Ala Asn Arg Asp Pro Gly Val Phe Ala Asp Pro Asp Thr Phe Asp Ile

ES 2 296 063 T3

305	310	315	320
5			
Thr Arg Lys Pro Glu His Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Gly Ile His Lys 325 330 335			
10			
Cys Pro Gly Gln His Leu Ala Arg Val Leu Ile Lys Val Ala Thr Leu 340 345 350			
15			
Arg Leu Phe Glu Arg Phe Pro Asp Val Arg Leu Ala Gly Asp Val Pro 355 360 365			
20			
Met Asn Glu Gly Leu Gly Leu Phe Ser Pro Ala Glu Leu Arg Val Thr 370 375 380			
25			
Trp Gly Ala Glu 385			
<210> 20			
<211> 386			
<212> PRT			
<213> <i>Streptomyces hygroscopicus</i>			
30 <400> 20			
Val Pro Gly Tyr Ala Lys Arg Leu Ala Ser Leu Ala Ile His Asp Leu 130 135 140			
35 Tyr Gly Leu Asn Glu Glu Gly Pro Val Leu Glu Gly Gln Met Arg Ala 145 150 155 160			
Met Ser Thr Glu Ala Gln Gln Glu Ser Thr Pro Thr Ala Arg Cys Pro 1 5 10 15			
40 Phe Ser Ile Gln Asp Gly His Arg Thr Ile Leu Glu Thr Gly Thr Val 20 25 30			
45 Gly Ala His Glu Leu Phe Gly Val Lys Gln Trp Leu Val Ala Ala Ala 35 40 45			
50 Glu Asp Val Lys Leu Val Thr Asn Asp Pro Arg Phe Ser Ser Ala Ala 50 55 60			
55 Pro Ser Gly Ile Leu Gly Asp Arg Arg Pro Gly Trp Phe Ser Gly Met 65 70 75 80			
60 Asp Ser Pro Glu His Asn Arg Tyr Arg Gln Lys Ile Ala Arg Asp Phe 85 90 95			
65 Thr Leu Arg Ala Ala Arg Lys Gln Glu Glu Phe Ile Val Arg Ala Ala 100 105 110			
70 Asp Ser Cys Leu Asp Asp Ile Glu Ala Ser Gly Pro Gly Thr Asp Leu 115 120 125			

ES 2 296 063 T3

Met Glu Gly Gly Thr Asp Met Glu Ser Ile Lys Arg Leu Thr Asp Glu
 165 170 175

5 Phe Gly His Val Leu Ala Leu Val Arg Ala Lys Arg Asp Glu Ala Gly
 180 185 190

10 Asp Arg Leu Leu His Arg Leu Ala Glu Ser Gly Glu Asp Glu Ile Leu
 195 200 205

15 Leu Ser Asp Glu Glu Ala Thr Gly Val Phe Ala Thr Leu Leu Phe Ala
 210 215 220

20 Gly His Asp Ser Met Gln Gln Met Val Gly Tyr Ser Leu Tyr Ala Leu
 225 230 235 240

25 Leu Ser His Pro Glu Gln Arg Ala Ala Leu Arg Glu Asn Pro Asp Leu
 245 250 255

30 Ile Asp Gly Ala Val Glu Glu Leu Leu Arg Phe Leu Pro Leu Asn Gln
 260 265 270

35 Leu Gly Val Pro Arg Val Cys Val Glu Asp Val Glu Leu His Gly Gln
 275 280 285

40 Thr Ile Ser Ala Gly Asp Asn Val Ile Pro Leu Tyr Ser Thr Ala Asn
 290 295 300

45 Arg Asp Pro Gly Val Phe Ala Asp Pro Asp Thr Phe Asp Ile Thr Arg
 305 310 315 320

50 Lys Pro Glu His Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Gly Ile His Gly Cys Pro
 325 330 335

55 Gly Gln His Leu Ala Arg Val Leu Ile Lys Val Ala Thr Val Arg Leu
 340 345 350

60 Phe Glu Arg Phe Pro Asp Val Arg Leu Ala Gly Asp Val Pro Met Asn
 355 360 365

65 Glu Gly Leu Gly Leu Phe Ser Pro Ala Glu Leu Arg Val Thr Trp Gly
 370 375 380

Ala Glu
 385

<210> 21
 <211> 649
 <212> ADN
 <213> *Streptomyces hygroscopicus*

ES 2 296 063 T3

<400> 21

5	gtgagcgcgt ccgtgcagac catcaagctg ccgaacggca agaccgtcgc ccacgtcaac ccggggcgagg cgcaagttcct ctaccaggag atcttcgcgg agcgggtgcta cttgcggcgc ggccttggc tgcgagcggg tgacgtggtc ttgcacgtcg ggcgaaacat cggcatgttc tegcttttcg cccaccttggc gtgcacccat gtcacggtgc acgccttoga gccggcgccg gtgcggtaacg ccgcgttcag ggccaaatgcc gagcggtaacg gcatcgcggg ccggttcgag cagtgcgggg ttcggacgt ggccggccgc ggcaagatga ctttctacac ggataccacg atgatgtcgg gttccaccc ggatccggcg acccgccgcgg agctgctgcg caggctcgcc atcaacggcg ggtacagtgc cgaggccgc gacccggatgc tggccgagct gccggacacc 20 agccaggtaa tcgagacgtc cgtcgtacgc ctctccgacg tcatcgcggc gcggggcato acctcgatcg gactgctcaa gatcgatgtg gagaagaacg agcggcatgt gatggccggg atcgacgcgg cgcactggcc ggcacatccgc caggctgtca ccgaggtgc	60 120 180 240 300 360 420 480 540 600 649
---	--	--

25 <210> 22

<211> 649

<212> ADN

30 <213> *Streptomyces hygroscopicus*

<400> 22

35	gtgagcgcgt ccgtgcagac catcaagctg cgtacggca gacccgtcggc ccacgtcaac ccggggcgagg cgcaagttcct ctaccaggag atcttcgcgg agcgggtgcta cttgcggcgc ggccttggc tgcgagcggg tgacgtggtc ttgcacgtcg ggcgaaacat cggcatgttc tcgttttcg cccaccttggc gtgcacccat gtcacggtgc acgccttoga gccggcgccg gtgcggtaacg ccgcgttcag ggccaaatgcc gagcggtaacg ccatcgcggg ccggttcgag cagtgcgggg ttcggacgt ggccggccgc ggcaagatga ctttctacac ggataccacg atgatgtcgg gttccaccc ggatccggcg acccgccgcgg agctgctgcg caggctcgcc atcaacggcg ggtacagtgc cgaggccgc gacccggatgc tggccgagct gccggacacc 50 agccaggtaa tcgagacgtc cgtcgtacgc ctctccgacg tcatcgcggc gcggggcato acctcgatcg gactgctcaa gatcgatgtg gagaagaacg agcggcatgt gatggccggg 55 atcgacgcgg cgcactggcc ggcacatccgc caggctgtca ccgaggtgc	60 120 180 240 300 360 420 480 540 600 649
----	--	--

<210> 23

60 <211> 260

<212> PRT

<213> *Streptomyces hygroscopicus*

ES 2 296 063 T3

<400> 23

1	Val Ser Ala Ser Val Gln Thr Ile Lys Leu Pro Asn Gly Lys Thr Val
5	5 10 15
20	Ala His Val Asn Pro Gly Glu Ala Gln Phe Leu Tyr Gln Glu Ile Phe
25	25 30
35	Ala Glu Arg Cys Tyr Leu Arg Arg Gly Leu Glu Leu Arg Ala Gly Asp
40	35 40 45
50	Val Val Phe Asp Val Gly Ala Asn Ile Gly Met Phe Ser Leu Phe Ala
55	55 60
65	His Leu Glu Cys Pro Asp Val Thr Val His Ala Phe Glu Pro Ala Pro
70	70 75 80
85	Val Pro Tyr Ala Ala Leu Arg Ala Asn Ala Glu Arg Tyr Gly Ile Ala
90	85 90 95
100	Gly Arg Phe Glu Gln Cys Ala Val Ser Asp Val Ala Gly Arg Gly Lys
105	105 110
115	Met Thr Phe Tyr Thr Asp Thr Thr Met Met Ser Gly Phe His Pro Asp
120	120 125
130	Pro Ala Thr Arg Ala Glu Leu Leu Arg Arg Leu Ala Ile Asn Gly Gly
135	135 140
145	Tyr Ser Ala Glu Ala Ala Asp Arg Met Leu Ala Glu Leu Pro Asp Thr
150	150 155 160
165	Ser Gln Val Ile Glu Thr Ser Val Val Arg Leu Ser Asp Val Ile Ala
170	165 170 175
180	Glu Arg Gly Ile Thr Ser Ile Gly Leu Leu Lys Ile Asp Val Glu Lys
185	185 190
195	Asn Glu Arg His Val Met Ala Gly Ile Asp Ala Ala Asp Trp Pro Arg
200	200 205
210	Ile Arg Gln Val Val Thr Glu Val His Asp Ile Asp Gly Arg Leu Asp
215	215 220
225	Glu Val Leu Thr Leu Leu Arg Gly Gln Gly Phe Thr Val Leu Ser Glu
230	230 235 240
245	Gln Glu Pro Leu Phe Ala Gly Thr Asp Ile Tyr Gln Val Val Ala Arg
250	245 250 255
260	Arg Gly Asp Ala

ES 2 296 063 T3

<210> 24
 <211> 260
 <212> PRT
 5 <213> *Streptomyces hygroscopicus*
 <400> 24

10	Val Ser Ala Ser Val Gln Thr Ile Lys Leu Pro Tyr Gly Arg Pro Ser 1 5 10 15
15	Ala His Val Asn Pro Gly Glu Ala Gln Phe Leu Tyr Gln Glu Ile Phe 20 25 30
	Ala Glu Arg Cys Tyr Leu Arg Arg Gly Leu Glu Leu Arg Ala Gly Asp 35 40 45
20	Val Val Phe Asp Val Gly Ala Asn Ile Gly Met Phe Ser Leu Phe Ala 50 55 60
	His Leu Glu Cys Pro Asp Val Thr Val His Ala Phe Glu Pro Ala Pro 65 70 75 80
25	Val Pro Tyr Ala Ala Leu Arg Ala Asn Ala Glu Arg Tyr Ala Ile Ala 85 90 95
	Gly Arg Phe Glu Gln Cys Ala Val Ser Asp Val Ala Gly Arg Gly Lys 100 105 110
30	Met Thr Phe Tyr Thr Asp Thr Thr Met Met Ser Gly Phe His Pro Asp 115 120 125
	Pro Ala Thr Arg Ala Glu Leu Leu Arg Arg Leu Ala Ile Asn Gly Gly 130 135 140
35	Tyr Ser Ala Glu Ala Ala Asp Arg Met Leu Ala Glu Leu Pro Asp Thr 145 150 155 160
	Ser Gln Val Ile Glu Thr Ser Val Val Arg Leu Ser Asp Val Ile Ala 165 170 175
40	Glu Arg Gly Ile Thr Ser Ile Gly Leu Leu Lys Ile Asp Val Glu Lys 180 185 190
	Asn Glu Arg His Val Met Ala Gly Ile Asp Ala Gly Asp Trp Pro Arg 195 200 205
45	Ile Arg Gln Val Val Thr Glu Val His Asp Ile Asp Gly Arg Leu Asp 210 215 220
	Glu Val Leu Thr Leu Leu Arg Gly Gln Gly Phe Thr Val Leu Ser Glu 225 230 235 240
50	Gln Glu Pro Leu Phe Ala Gly Thr Asp Ile Tyr Gln Val Val Ala Arg 245 250 255
	Arg Gly Asp Ala 260

ES 2 296 063 T3

<210> 25

<211> 100

<212> ADN

5 <213> *Streptomyces hygroscopicus*

<400> 25

10 **ggccacacctcc atcgatctgt caccggaaact gaccgggta ggccggcgca agttggcctc** 60
gcggggggatc gataacgtca ccctggtcga gggtgacgtt 100

15 <210> 26

<211> 100

<212> ADN

20 <213> *Streptomyces hygroscopicus*

<400> 26

25 **ggccacacctcc atcgatctgt caccggaaact gaccgggta ggcccccaca agttggcctc** 60
gcggggggatc gataacgtca ccctggtcga gggtgacgtt 100

30 <210> 27

<211> 210

<212> PRT

<213> *Streptomyces hygroscopicus*

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 296 063 T3

<400> 27

5	Met Leu Glu Leu Gly Thr Arg Leu Lys Phe Arg Phe Thr Gly Pro Leu	1	6	10	15
10	Leu Glu Ala Val Asn Pro Arg Leu Gln Gly His Pro Tyr Asp Val Leu	20	25	30	
15	Met Arg Leu Leu Glu Gly Gly Arg Ile Glu Asn Val Leu Glu Leu Cys	35	40	45	
20	Gly Gly Thr Gly Phe Ala Ser Arg Met Leu Ala Glu Arg His Ser Lys	50	55	60	
25	Val Gln Ala Thr Ser Ile Asp Leu Ser Pro Glu Leu Thr Ala Val Gly	65	70	75	80
30	Arg Arg Lys Leu Ala Ser Arg Gly Ile Asp Asn Val Thr Leu Val Glu	85	90	95	
35	Gly Asp Val Ser Thr Leu Pro Tyr Pro Asp Asp Ser Phe Asp Thr Val	100	105	110	
40	Met Ser Ala Phe Gly Leu His Glu Val Pro Thr Ala Gly Arg Leu Ser	115	120	125	
45	Ala Ile Arg Glu Ser Val Arg Val Leu Lys Pro Gly Gly Arg Phe Val	130	135	140	
50	Ile Val Asp Leu Asp Arg Arg Thr Lys Tyr Gly Trp Thr Met Asp Leu	145	150	155	160
55	Phe Met Lys Val Met Glu Pro Lys Phe Ala Pro Glu Val Phe Gly Thr	165	170	175	
60	Gly Leu Val Asp Arg Leu Lys Glu Asn Gly Phe Thr Ile Asp His His	180	185	190	
65	Glu Ser Ala Gly Pro Asn Gly Trp Thr Gln Ser Ile Val Ala Thr Leu	195	200	205	
	Glu Ala	210			

<210> 28

<211> 210

<212> PRT

<213> *Streptomyces hygroscopicus*

ES 2 296 063 T3

<400> 28

5 Met Leu Glu Leu Gly Thr Arg Leu Lys Phe Arg Phe Thr Gly Pro Leu
1 5 10 15

10 Leu Glu Ala Val Asn Pro Arg Leu Gln Gly His Pro Tyr Asp Val Leu
20 25 30

15 Met Arg Leu Leu Glu Gly Gly Arg Ile Glu Asn Val Leu Glu Leu Cys
35 40 45

20 Gly Gly Thr Gly Phe Ala Ser Arg Met Leu Ala Glu Arg His Ser Lys
50 55 60

25 Val Gln Ala Thr Ser Ile Asp Leu Ser Pro Gln Leu Thr Ala Val Gly
65 70 75 80

30 Pro His Lys Leu Ala Ser Arg Gly Ile Asp Asn Val Thr Leu Val Glu
85 90 95

35 Gly Asp Val Ser Thr Leu Pro Tyr Pro Asp Asp Ser Phe Asp Thr Val
100 105 110

40 Met Ser Ala Phe Gly Leu His Glu Val Pro Thr Ala Gly Arg Leu Ser
115 120 125

45 Ala Ile Arg Glu Ser Val Arg Val Leu Lys Pro Gly Gly Arg Phe Val
130 135 140

50 Ile Val Asp Leu Asp Arg Arg Thr Lys Tyr Gly Trp Thr Met Asp Leu
145 150 155 160

55 Phe Met Lys Val Met Glu Pro Lys Phe Ala Pro Glu Val Phe Gly Thr
165 170 175

60 Gly Leu Val Asp Arg Leu Lys Glu Asn Gly Phe Thr Ile Asp His His
180 185 190

65 Glu Ser Ala Gly Pro Asn Gly Trp Thr Gln Ser Ile Val Ala Thr Leu
195 200 205

55 Glu Ala
210

<210> 29

<211> 33

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> cebador

ES 2 296 063 T3

<400> 29

5 gcaagcttgg taccgacacg ctgcggAAC agg 33

10 <210> 30
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> cebador

20 <400> 30

25 gegcatgecc tagggtgtac attacttctc c 31

30 <210> 31
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador

40 <400> 31

45 tatctagact tcgcacgtgc ctgggaca 28

50 <210> 32
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cebador

60 <400> 32

65 agaagcttac ccaattccaa catcacct 28

70 <210> 33
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <223> cebador

80 <400> 33

85 ggaagcttg accacacgcc gcccgttc 28

90 <210> 34
 <211> 28

ES 2 296 063 T3

<212> ADN		
<213> Secuencia artificial		
5 <220>		
<223> cebador		
<400> 34		
10 atgcatgccc gccgcaaccc gctggcct	28	
<210> 35		
15 <211> 58		
<212> ADN		
<213> Secuencia artificial		
20 <220>		
<223> cebador		
<400> 35		
25 taaactagtc catctgagag tttcatatgg ccctattctg cccagccgct ctagaaat	58	
<210> 36		
30 <211> 58		
<212> ADN		
<213> Secuencia artificial		
35 <220>		
<223> cebador		
<400> 36		
40 atttctagag cggctgggca gaatagggcc atatgaaact ctcagatgga ctagttta	58	
<210> 37		
45 <211> 46		
<212> ADN		
<213> Secuencia artificial		
50 <220>		
<223> cebador		
<400> 37		
55 gggcatatga ggcaattgac tccggcggtc acggcacgt actgcc	46	
<210> 38		
60 <211> 40		
<212> ADN		
<213> Secuencia artificial		
65 <220>		
<223> cebador		

ES 2 296 063 T3

<400> 38

5 ggggtctaga ggtcacgcca ccacaccctc gatctcgacc 40

10 <210> 39
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> cebador

20 <400> 39

25 gggcatatgt cgacgaccga tcagggtgag accggaaagg cctg 44

30 <210> 40
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador

40 <400> 40

45 ggggtctaga ggtcagtctt ggggttcgag aagctcgccg gtctcctt 48

50 <210> 41
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cebador

60 <400> 41

65 gggcatatga tccaaacccga cgtcgtgacc gcttcacag cgg 43

70 <210> 42
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <223> cebador

80 <400> 42

85 ggggtctaga ggtcacacgc ggacggcgat ctggtgccga tagg 44

90 <210> 43
 <211> 42

ES 2 296 063 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> cebador

<400> 43

10 gggcatatgc agaccaaggt tctgtgccag cgtgacatca ag 42

<210> 44

15 <211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> cebador

<400> 44

25 ggggtctaga ggtcaactaca gcgagtacgg atcgaggacg tcctcggcg 50

<210> 45

30 <211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> cebador

<400> 45

40 ggagatctca gcgagtacgg atcgaggacg tcctcggcg 40

<210> 46

45 <211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> cebador

<400> 46

55 gggcatatga gcaccgaagc tcagcaagag agcacgcccc ccgcacgct 49

<210> 47

60 <211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> cebador

ES 2 296 063 T3

<400> 47

5 ggggtctaga ggtcactccg ctccccaggt gacccggagc tcggc 45

10 <210> 48
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> cebador

20 <400> 48

25 gggcatatga gcgcgccgt gcagaccatc aagctgcc 38

30 <210> 49
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador

40 <400> 49

45 ggggtctaga ggtcaggcg ccccgccgcg ggcgacgacc t 41

50 <210> 50
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cebador

60 <400> 50

65 catatgttgg aattgggtac ccgcctg 27

70 <210> 51
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <223> cebador

80 <400> 51

85 tctagacgtt cactgcgttccg ggggtg 25

90 <210> 52
 <211> 72

ES 2 296 063 T3

<212> ADN		
<213> Secuencia artificial		
5 <220>		
<223> cebador		
<400> 52		
10 ggggaattca gatctggtct agaggtcagc cggcgtggcg gcgcggtgagt tcctccagtc		60
gccccacgtat ct		72
15 <210> 53		
<211> 47		
<212> ADN		
<213> Secuencia artificial		
20 <220>		
<223> cebador		
25 <400> 53		
gggtcttagat ccggacgaac gcatcgatta attaaggagg acacata		47
30 <210> 54		
<211> 26		
<212> ADN		
<213> Secuencia artificial		
35 <220>		
<223> cebador		
40 <400> 54		
ggccatatga ccgatgccgg acgcca		26
45 <210> 55		
<211> 30		
<212> ADN		
<213> Secuencia artificial		
50 <220>		
<223> cebador		
55 <400> 55		
ggggctctaga tcacgccacc atgccttcga		30
60 <210> 56		
<211> 29		
<212> ADN		
<213> Secuencia artificial		
65 <220>		
<223> Cebador		

ES 2 296 063 T3

<400> 56

5 caaagcttcc tggcgccgtt cggccggca 29

10 <210> 57
 <211> 29
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador

20 15 <400> 57

25 tggcatgccc ttccccgccg ttccctggc 29
 <210> 58
 <211> 29
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador

35 30 <400> 58

40 tggcatgccc ccgcccagct gacctggaa 29
 <210> 59
 <211> 29
 <212> ADN
 40 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> cebador

50 45 <400> 59

55 gttctagagc ttacgcgtga tgtcgaacg 29
 <210> 60
 <211> 29
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Cebador

65 60 <400> 60

70 gctctagagc ccgcggctcg ccggacacg 29
 <210> 61
 <211> 30

ES 2 296 063 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Cebador

<400> 61

10

ccacctgcagg cgtccggcat cggcatcag

30

<210> 62

15 <211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Cebador

<400> 62

25

cgcctgcagg gatacggtcc gccgggtctg c

31

<210> 63

30 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Cebador

<400> 63

40

ccaagtttgt acggttcgcc acgggcgtgc

30

45

50

55

60

65