



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 341 403**

(51) Int. Cl.:

C12P 19/62 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **99928126 .4**

(96) Fecha de presentación : **29.06.1999**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1091971**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2001**

(54) Título: **Síntesis de policétidos.**

(30) Prioridad: **29.06.1998 GB 9814006**

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

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.06.2010

(72) Inventor/es: **Leadlay, Peter, Francis;
Staunton, James;
Cortés, Jesús y
McArthur, Hamish, Alastair, Irvine**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.06.2010

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 341 403 T3

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

DESCRIPCIÓN

Síntesis de policétidos.

5 La presente invención se refiere a procedimientos para preparar macrólidos de 14 miembros mediante síntesis recombinante. Los genes biosintéticos de policétidos o porciones de los mismos que pueden derivarse de diferentes agrupaciones de genes biosintéticos de policétidos se manipulan para permitir la producción de policétidos novedosos específicos de estructura predicha. Esta invención se refiere particularmente a la sustitución de material genético que codifica la unidad de iniciador natural con otros genes con el fin de preparar macrólidos de 14 miembros con preferencialmente una unidad de iniciador de acetato, a la vez que se minimiza la formación de subproductos que contienen una unidad de iniciador diferente.

10 Los policétidos son una clase grande y estructuralmente diversa de productos naturales que incluye muchos compuestos que poseen propiedades antibióticas u otras farmacológicas tales como eritromicina, tetraciclinas, rapamicina, avermectina, monensina, epotilonas y FK506. En particular, los policétidos se producen abundantemente por *Streptomyces* y bacterias de actinomicetos relacionadas. Se sintetizan por la condensación en etapas repetida de acil-tioésteres de un modo análogo al de la biosíntesis de ácidos grasos. La mayor diversidad estructural encontrada entre los policétidos naturales surge de la selección de (normalmente) acetato o propionato como unidades de iniciador o "extendedor"; y del diferente grado de procesamiento del grupo β -ceto observado después de cada condensación.

15 Ejemplos de etapas de procesamiento incluyen reducción a β -hidroxiacil-, reducción seguida de deshidratación a 2-enoil- y reducción completa al acil-tioéster saturado. El resultado estereoquímico de estas etapas de procesamiento también se especifica para cada ciclo de extensión de cadenas.

20 La biosíntesis de policétidos se inicia por un grupo de enzimas formadoras de cadenas conocidas como policétido sintetas. Se han descrito dos clases de policétido sintasa (PKS) en actinomicetos. Una clase, llamada PKS de tipo I, representada por las PKS para los macrólidos eritromicina, oleandomicina, avermectina y rapamicina, está constituida por un conjunto diferente o "módulo" de enzimas para cada ciclo de extensión de cadenas de policétidos. Para un ejemplo véase la Figura 1 (Cortés, J. y col. *Nature* (1990) 348:176-178; Donadio, S. y col. *Science* (1991) 252:675-679; Swan, D.G. y col. *Mol. Gen. Genet.* (1994) 242:358-362; MacNeil, D. J. y col. *Gene* (1992) 115:119-125; Schwecke, T. y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:7839-7843).

25 El término "módulo de extensión" como se usa en este documento se refiere al conjunto de dominios contiguos desde un dominio β -cetoacil-ACP sintasa ("AKS") hasta el siguiente dominio proteína portadora de acilos ("ACP") que realiza un ciclo de extensión de cadenas de policétidos. El término "módulo de carga" se usa para referirse a 30 cualquier grupo de dominios contiguos que realiza la carga de la unidad de iniciador sobre la PKS y así hace que esté disponible para el dominio KS del primer módulo de extensión. La longitud del policétido formado se ha modificado, en el caso de la biosíntesis de eritromicina, por la relocalización específica usando ingeniería genética del dominio enzimático de la PKS productora de eritromicina que contiene la cadena que libera la actividad de tioesterasa/ciclasa (Cortés y col. *Science* (1995) 268:1487-1489; Kao, C.M. y col. *J. Am. Chem. Soc.* (1995) 117:9105-9106).

35 40 Se ha mostrado que la delección en el marco del ADN que codifica parte del dominio cetoreductasa en el módulo 5 de la pKS productora de eritromicina (también conocida como 6-desoxieritronolida B sintasa, DEBS) conduce a la formación de análogos de eritromicina 5,6-didesoxi-3- α -micarosil-5-oxoeritronolida B, 5,6-didesoxi-5-oxoeritronolida B y 5,6-didesoxi-6 β -epoxi-5-oxoeritronolida B (Donadio, S. y col. *Science* (1991) 252:675-679). Asimismo, la alteración de residuos de sitios activos en el dominio enoilreductasa de módulo 4 en DEBS, por ingeniería genética del 45 ADN que codifica la PKS correspondiente y su introducción en *Saccharopolyspora erythraea*, condujo a la producción de 6,7-anhidroeritromicina C (Donadio, S. y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90:7119-7123).

50 La solicitud de patente internacional número WO 93/13663 describe tipos adicionales de manipulación genética de los genes de DEBS que pueden producir policétidos cambiados. Sin embargo, se ha notificado que muchos esfuerzos han sido improductivos (Hutchinson, C. R. y Fujii, I. *Annu. Rev. Microbiol.* (1995) 49:201-238, en la pág. 231). Se ha desvelado la secuencia de ADN completa de los genes de *Streptomyces hygroscopicus* que codifican la PKS de tipo I modular que gobierna la biosíntesis del policétido inmunodepresor macrocíclico rapamicina (Schwecke, T. y col. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7839-7843). La secuencia de ADN está depositada en la base de datos 55 EMBL/Genbank con el número de registro X86780.

La segunda clase de PKS, llamada PKS de tipo II, está representada por las sintetas para compuestos aromáticos. Las PKS de tipo II sólo contienen un único conjunto de actividades enzimáticas para la extensión de cadenas y éstas se vuelven a usar como apropiadas en ciclos sucesivos (Bibb, M. J. y col. *EMBO J.* (1989) 8:2727-2736; Sherman, D. H. y col. *EMBO J.* (1989) 8:2717-2725; Fernandez-Moreno, M.A. y col. *J. Biol. Chem.* (1992) 267:19278-19290). Las unidades de "extendedor" para las PKS de tipo II son normalmente unidades de acetato y la presencia de ciclasas específicas impone la ruta preferida para la ciclación de la cadena completa en un producto aromático (Hutchinson, C. R. y Fujii, I. *Annu. Rev. Microbiol.* (1995) 49:201-238). Los policétidos híbridos se han obtenido mediante la 60 introducción de clones de ADN que contiene genes de PKS de tipo II en otro cepa que contiene una agrupación de genes de PKS de tipo II diferente, por ejemplo, mediante la introducción de ADN derivado del agrupamiento de genes para actinorrodina, un policétido pigmentado de azul de *Streptomyces coelicolor*, en una cepa productora de policétidos antraquinona de *Streptomyces galileus* (Bartel, P. L. y col. *J. Bacteriol.* (1990) 172:4816-4826).

ES 2 341 403 T3

- El número mínimo de dominios requeridos para la extensión de cadenas de policétidos en una PKS de tipo II cuando se expresa en una célula huésped de *Streptomyces coelicolor* (la “PKS mínima”) se ha definido, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional número WO 95/08548 de forma que contiene los tres siguientes polipéptidos que son productos de los genes act I: primer KS; en segundo lugar un polipéptido llamando CLF con similitud de secuencias de aminoácidos de extremo a extremo respecto a la KS pero en la que el residuo del sitio activo esencial de la KS, concretamente un residuo de cisteína, está sustituido o bien por un residuo de glutamina, o en el caso de la PKS para un pigmento de espora tal como el producto génico whiE (Chater, K. F. y Davis, N. K. Mol. Microbiol. (1990) 4:1679-1691) por un residuo de ácido glutámico (Figura 2); y finalmente una ACP. Se ha establecido, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional número WO 95/08548 que el CLF es un factor que determina la longitud de la cadena de la cadena de policétido que se produce por la PKS mínima. Sin embargo, se ha encontrado (Shen, B. y col. J. Am. Chem. Soc. (1995) 117:6811-6821) que cuando el CLF para el octacétido actinorrodina se usa para sustituir el CLF por el decacétido tetracenomicina en células huésped de *Streptomyces glaucescens* no se encuentra que se haya cambiado el producto de policétido de un decacétido a un octacétido, por lo que queda poco clara la función exacta del CLF. Se ha propuesto una nomenclatura alternativa en la que la KS se designa KS α y el CLF se designa KS β para reflejar esta falta de conocimiento (Meurer, G. y col. Chemistry and Biology (1997) 4:433-443). El mecanismo por el que las unidades de iniciador de acetato y las unidades de extendedor de acetato se cargan sobre la PKS de tipo II no es conocido, pero se especula que la malonil-CoA:ACP aciltransferasa de la ácido graso sintasa de la célula huésped puede cumplir la misma función para la PKS de tipo II (Revill, W. P. y col. J. Bacteriol. (1995) 177:3946-3952).
- La solicitud de patente internacional número WO 95/08548 describe la sustitución de genes de PKS actinorrodina por ADN heterólogo de otras agrupaciones de genes de PKS de tipo II para obtener policétidos híbridos. La misma solicitud de patente internacional WO 95/08548 describe la construcción de una cepa de *Streptomyces coelicolor* que sustancialmente carece de la agrupación de genes nativos para actinorrodina y el uso en esa cepa de un vector de plásmido pRM5 derivado del vector de bajo número de copias SCP2* aislado de *Streptomyces coelicolor* (Bibb, M. J. y Hopwood, D. A. J. Gen. Microbiol. (1981) 126:427) y en el que el ADN que codifica PKS heterólogo puede expresarse bajo el control de la región promotora divergente act II/act III del agrupamiento de genes de actinorrodina (Fernandez-Moreno, M.A. y col. J. Biol. Chem. (1992) 267:19278-19290). El plásmido pRM5 también contiene ADN del agrupamiento de genes biosintéticos de actinorrodina que codifica el gen para una proteína de activador específica, ActII-orf4. La proteína Act II-orf4 se requiere para la transcripción de los genes colocados bajo el control del promotor bidireccional de actI/act II y activa la expresión génica durante la transición de fase de crecimiento a estacionaria en el micelio vegetativo (Hallam, S. E. y col. Gene (1988) 74:305-320).
- Las agrupaciones de tipo II en *Streptomyces* son conocidas por estar activadas por los genes de activador específicos de la ruta (Narva, K. E. y Feitelson, J. S. J. Bacteriol. (1990) 172:326-333; Stutzman-Engwall, K. J. y col. J. Bacteriol. (1992) 174:144-154; Fernandez-Moreno, M.A. y col. Cell (1991) 66:769-780; Takano, E. y col. Mol. Microbiol. (1992) 6:2797-2804; Takano, E. y col. Mol. Microbiol. (1992) 7:837-845). El producto génico Dnrl complementa una mutación en el gen actII-orf4 de *S. coelicolor* implicando que las proteínas de Dnrl y ActII-orf4 actúan sobre dianas similares. Se ha descrito un gen (srmR) (documento EP 0 524 832 A2) que se localiza próximo al agrupamiento de genes de PKS de tipo I para el policétido macrólido espiramicina. Este gen activa específicamente la producción del antibiótico macrólido espiramicina, pero no se han encontrado otros ejemplos de un gen tal. Por tanto, no se han descrito homólogos de la familia de ActII-orf4/Dnrl/RedD de activadores que actúen sobre los genes de PKS de tipo I.
- Aunque se ha identificado un gran número de policétidos terapéuticamente importantes, sigue existiendo la necesidad de obtener policétidos novedosos que tengan propiedades potenciadas o posean bioactividad completamente novedosa. Los policétidos complejos producidos por las PKS de tipo I son particularmente valiosos porque incluyen compuestos con utilidad conocida como agentes antihelmínticos, insecticidas, inmunodepresores, antifúngicos o antibacterianos. Debido a su complejidad estructural, tales policétidos novedosos no pueden obtenerse fácilmente por síntesis química total o por modificaciones químicas de policétidos conocidos.
- También existe la necesidad de desarrollar rutas fidedignas y específicas para utilizar módulos individuales en la práctica de manera que todos, o una gran fracción de genes de PKS híbridos que están construidos, sean viables y produzcan el producto de policétido deseado.
- La solicitud de patente internacional en trámite número PCT/GB97/01819, documento WO 98/01546, desvela que un ensamblaje de genes de PKS (particularmente de tipo I) codifica un módulo de carga que va seguido de al menos un módulo de extensión. Por tanto, la Figura 1 muestra la organización de los genes de DEBS. El primer marco de lectura abierto codifica la primera multienzima o casete (DEBS 1) que está constituido por tres módulos: el módulo de carga (carga de ery) y dos módulos de extensión (módulos 1 y 2). El módulo de carga comprende una aciltransferasa y una proteína portadora de acilos. Esto pueden contrastarse con la Fig. 1 del documento WO 93/13663 (citado anteriormente). Ésta muestra que ORF1 sólo está constituido por dos módulos, el primero de los cuales es de hecho tanto el módulo de carga como el primer módulo de extensión. El documento WO 98/01546 describe en términos generales la producción de un ensamblaje de genes de PKS híbridos que comprende un módulo de carga y al menos un módulo de extensión. El documento WO 98/01546 también describe (véase también Marsden, A. F. A. y col. Science (1998) 279:199-202) la construcción de un ensamblaje de genes de PKS híbridos injertando el módulo de carga de amplia especificidad para la policétido sintasa productora de avermectina en el primer componente de multienzima (DEBS 1) para la PKS eritromicina en lugar del módulo de carga normal. Pueden prepararse ciertos policétidos novedosos usando el ensamblaje de genes de PKS híbridos como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente interna-

ES 2 341 403 T3

cional en trámite WO 98/01571, número (PCT/GB97/01810). La solicitud de patente WO 98/01546 describe además la construcción de un ensamblaje de genes de PKS híbridos injertando el módulo de carga para la policétido sintasa productora de rapamicina en el primer componente de multienzima (DEBS 1) para la PKS eritromicina en lugar del módulo de carga normal. El módulo de carga de la PKS rapamicina se diferencia de los módulos de carga de DEBS 5 y la PKS avermectina en que comprende un dominio CoA ligasa, un dominio enoilreductasa ("ER") y una ACP de manera que ácidos orgánicos adecuados que incluyen la unidad de iniciador natural ácido 3,4-dihidroxiciclohexano-carboxílico pueden activarse *in situ* en el dominio de carga PKS y con o sin reducción por el dominio ER transferirse a la ACP para la carga intramolecular de la KS de módulo de extensión 1 (Schwecke, T. y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:7839-7843).

Las secuencias de ADN se han desvelado para varios agrupamientos de genes de PKS de tipo I que gobiernan la producción de policétidos macrólidos de 16 miembros que incluyen la PKS tilosina de *Streptomyces fradiae* (documento EP 0 791 655 A2), la PKS nidamicina de *Streptomyces caelestis* (Kavakas, S. J. y col. J. Bacteriol. (1998) 179:7515-7522) y la PKS espiramicina de *Streptomyces ambofaciens* (documento EP 0791 655 A2). Todas estas secuencias de genes tienen en común que muestran que el módulo de carga de la PKS se diferencia del módulo de carga de DEBS y de la PKS avermectina en que están constituidos por un dominio que se parece a los dominios KS de los módulos de extensión, un dominio AT y una ACP (Figura 3). El dominio similar a KS del extremo N adicional se ha llamado KSq porque se diferencia en cada caso de una KS de extensión por la sustitución específica del residuo de cisteína de sitio activo esencial para la actividad de β -cetoacil-ACP sintasa por un residuo de glutamina (Q en la notación de una sola letra). La función del dominio KSq es desconocida (Kavakas, S. J. y col. J. Bacteriol. (1998) 179:7515-7522), pero su presencia en estas PKS para macrólidos de 16 miembros es sorprendente porque las unidades de iniciador de tilosina, nidamicina y espiramicina parecen ser propionato, acetato y acetato respectivamente, es decir, el mismo tipo de unidad de iniciador que en DEBS. El dominio AT adyacente al KSq se llama en este caso el dominio ATq.

Cuando el módulo de carga entero de la PKS tilosina se usó para sustituir el módulo de carga análogo en la PKS espiramicina en *S. ambofaciens* (Kuhstoss y col. Gene (1996) 183:231-236) se estableció que la naturaleza de la unidad iniciadora estaba cambiado de acetato a propionato. Debido a que no se entendía la función del dominio KSq no se hizo divulgación específica que revelara ni la importancia del dominio KSq ni la posible utilidad de estos módulos 30 de carga que contienen KSq para asegurar la pureza del producto de policétido con respecto a la unidad de iniciador, incluso a altos niveles de producción de macrólidos. La interpretación de sus resultados se estableció como: "Por tanto, creemos que los experimentos aquí descritos proporcionan un fuerte apoyo experimental para la hipótesis que los dominios AT en sistemas de PKS de tipo I seleccionan el sustrato apropiado en cada etapa en la síntesis" (Kuhstoss y col. Gene (1996) 183:231-236, at p. 235). Estos autores observaron la analogía con la proteína CLF en sistemas de 35 PKS de tipo II y que se cree que la última proteína participa en la determinación de la longitud de cadena. Establecen: "KSq puede cumplir una función similar, aunque está poco claro por qué tal función sería necesaria en la síntesis de estos policétidos de 16 miembros cuando no se necesita para la síntesis de otros policétidos complejos tales como 6-DEB o rapamicina. En cualquier caso, es poco probable que la KSq participe en la elección del sustrato en cada etapa de síntesis". (Kuhstoss y col. Gene (1996) 183:231-236).

Se ha mostrado que cuando se usa ingeniería genética para eliminar el módulo de carga de DEBS, la DEBS truncada resultante en *Sacch. erythraea* continúa produciendo bajos niveles de eritromicinas que contienen una unidad de iniciador de propionato (Pereda, A. y col. Microbiology (1995) 144:543-553). La misma publicación muestra que cuando en esta DEBS truncada la AT específica de metilmalonil-CoA de módulo de extensión 1 se sustituyó por una AT específica de malonil-CoA de un módulo de extensión de la PKS rapamicina, los productos también tenían bajos niveles de eritromicinas que contenían una unidad de iniciador de propionato demostrando que el origen de las unidades de iniciador no es la descarboxilación de los grupos (metil)malonilo cargados en la enzima por la AT de módulo 1, sino de la acilación directa de la KS de módulo de extensión 1 por propionil-CoA. Ésta es, a diferencia de un informe previo usando DEBS1+TE parcialmente purificado, una PKS bimodular truncada derivada de DEBS 50 (Kao, C. M. y col. J. Am. Chem. Soc. (1995) 117:9105-9106) y funcionalmente equivalente a DEBS1-TE (Brown, M. J. B. y col., J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1995) 1517-1518; Cortés, J. y col. Science (1991) 252:675-679) que estableció que los orígenes de las unidades de iniciador para DEBS pueden incluir unidades de malonato de metilo que se cargan en el módulo 1 y son descarboxiladas por la KS de módulo 1 (Pieper, R. y col. Biochemistry (1997) 36:1846-1851). Ahora se ha encontrado que cuando la proteína DEBS1-TE se purifica completamente de extractos 55 de *Sacch. erythraea* recombinante no contiene tal actividad descarboxilasa específica (Weissmann, K. y col. (1998) Biochemistry, 37, 11012-11017), confirmando adicionalmente que las unidades de iniciador no se producen de hecho a partir de la descarboxilación de unidades de extensión mediadas por la KS de módulo de extensión 1.

Se sabe que el módulo de carga de DEBS tiene una especificidad ligeramente más ancha que el propionato solo, 60 y en particular unidades de iniciador de acetato se usan tanto *in vitro* como *in vivo* cuando la PKS que contiene este módulo de carga es parte de una PKS que se expresa tanto en *Sacch. Erythraea*, el huésped natural para la producción de eritromicina (véase, por ejemplo, Cortés, J. y col. Science (1995) 268:1487-1489), como en un huésped heterólogo tal como *S. coelicolor* (Kao, C. M. y col. J. Am. Chem. Soc. (1994) 116:11612-11613; Brown, M. J. B. y col. J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1995) 1517-1519). Experimentos *in vitro* usando DEBS1-TE purificado han demostrado que la 65 propionil-CoA y la acetil-CoA son sustratos alternativos que suministran eficazmente unidades de propionato y acetato respectivamente al módulo de carga (Weissmann, K. E. H. y col. Chemistry and Biology (1995) 2:583-589; Pieper, R. y col. J. Am. Chem. Soc. (1995) 117:11373-11374). El resultado de la competencia entre unidades de iniciador de acetato y propionato está influenciado por las concentraciones intracelulares respectivas de propionil-CoA y acetil-

ES 2 341 403 T3

CoA que prevalecen en la célula huésped usada (véase, por ejemplo, Kao, C. M. y col. *Science* (1994) 265:509-512; Pereda, A. y col. *Microbiology* (1995) 144:543-553). También está determinado por el nivel de expresión de la PKS huésped de manera que como se desvela, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional en trámite número PCT/GB97/01819, cuando la DEBS recombinante u otra PKS híbrida que contiene el módulo de carga de DEBS se sobreexpreza en *Sacch. erythraea*, los productos son generalmente mezclas cuyos componentes sólo se diferencian en la presencia de o bien una unidad de iniciador de acetato o de propionato.

El documento WO 91/16334 desvela la producción de G-desoxi-15-noreritromicinas modificando genéticamente la región responsable de la G-hidroxilación. Liu y col., JACS 1997 (119) 10559-10554 desvelan G-desoxi-2-nor-15-noreritronolida B producida por un procedimiento en el que la AT en el módulo G está sustituida por una AT específica de malonilo.

Existe la necesidad de desarrollar procedimientos fidedignos para evitar la formación de mezclas de policétidos con unidades de iniciador tanto de acetato como de propionato y de permitir la incorporación específica de unidades de iniciador inusuales. Ahora se ha encontrado sorprendentemente que la función de los dominios de carga en las PKS para los macrólidos de 16 miembros tilosina, nidamicina y espiramicina es diferente de la de los dominios de carga de la PKS avermectina y de DEBS. Se ha comprobado que el dominio KSq de la PKS tilosina y el dominio AT asociado, que aquí se llama ATq, juntos son responsables de la producción altamente específica de unidades de iniciador de propionato porque la ATq es específica para la carga de metilmalonil-CoA y no de propionil-CoA como se pensaba previamente; y la KSq es responsable de la descarboxilación altamente específica de la unidad de malonato de metilo unida a enzima para formar la unidad de propionato unida al dominio ACP del módulo de carga y situada apropiadamente para ser transferida a la KS del módulo de extensión 1 para la iniciación de la extensión de cadenas. En un modo similar, la ATq de las PKS espiramicina y nidamicina, y la KSq adyacente, son responsables de la carga específica de unidades de malonato en vez de unidades de acetato como se creía previamente, y de su posterior descarboxilación específica para proporcionar unidades de iniciador de acetato para la extensión de cadenas de policétidos.

Se ha encontrado ahora aquí que no sólo las PKS para los macrólidos de 16 miembros anteriormente mencionados, sino también las PKS para ciertos macrólidos de 14 miembros, particularmente la PKS oleandomicina de *Streptomyces antibioticus* (Figura 4) y también las PKS para ciertos policétidos ionóforos de poliéster, particularmente la PKS monensina putativa de *Streptomyces cinnamonensis* (Figura 4), poseen un dominio de carga que comprende un dominio KSq, un dominio ATq y una ACP. En la Figura 4 se muestra un alineamiento de secuencias de los dominios KSq y de los dominios ATq ligados adyacentes que se han identificado, que muestran el sitio activo conservado residuo de glutamina (Q) en los dominios KSq y un residuo de arginina que está conservado en todos los dominios AT de extensión y también está completamente conservado en los dominios ATq. Este residuo no es característicamente arginina en los dominios AT de ni los módulos de carga de DEBS ni de PKS avermectina, en los que el sustrato para la AT es un éster de acil-CoA no carboxilado (Haydock, S. F. y col. FEBS Letters (1995) 374:246-248). La abreviatura ATq se usa aquí para distinguir simplemente los dominios AT encontrados inmediatamente al extremo C de Ksq de AT de extensión, y la marca no tiene otro significado.

40 Esta invención proporciona un procedimiento para producir un macrólido de 14 miembros que tiene un grupo 13-metilo como se explica en la reivindicación 1.

El dominio KSq puede ser “natural” o genéticamente manipulado, por ejemplo, resultante de mutagénesis dirigida al sitio de ácido nucleico que codifica una KS diferente tal como una KS de un módulo de extensión.

La funcionalidad de carga se proporciona por un dominio de tipo AT (aciltransferasa) que se parece a un dominio AT de un módulo de extensión convencional que tiene un residuo de arginina en el sitio activo, que no es el caso con los dominios AT de módulos de cargadores que cargan acetato o propionato, por ejemplo, en sistemas de DEBS o de PKS avermectina. Puede llamarse Atq. De nuevo, puede ser "natural" o genéticamente manipulado, por ejemplo, por mutagénesis de una AT de un módulo de extensión.

El módulo de carga es de la forma:

$$55 \quad K_{Sg} - ATg = ACP$$

en la que ACP es proteína portadora de acilos

Una realización preferida usa un cultivo que produce un policétido de 14 miembros que tiene una unidad de iniciador de acetato deseada caracterizada por la ausencia sustancial de policétidos con diferentes unidades de iniciador. Por tanto, por ejemplo, C13-metil-eritromicina puede producirse sustancialmente libre de análogos naturales que resultan de la adición de una sola unidad de iniciador.

65 Es particularmente útil proporcionar un módulo de carga del tipo KSq-ATq-ACP para un ensamblaje de genes de PKS que produce un macrólido de 14 miembros con el fin de preparar un macrólido de 14 miembros que contiene

ES 2 341 403 T3

PKS se expresa a altos niveles en una célula huésped de actinomiceto. Las PKS particularmente adecuadas para este fin son los componentes de PKS para la biosíntesis de eritromicina, metimicina, oleandomicina, tilosina, espiramicina, midecamicina y nidamicina para todos los cuales es conocida al menos en parte la organización génica y modular. Las fuentes particularmente adecuadas de los genes que codifican un módulo de carga del tipo KSq-ATq-ACP son los 5 módulos de carga de oleandomicina, espiramicina, nidamicina, metimicina y monensina que son específicos para la carga de unidades de malonato que luego se descarboxilan a unidades de iniciador de acetato.

En el módulo de carga del tipo KSq-ATq-ACP, los dominios o porciones de los mismos pueden derivarse de las 10 mismas fuentes o de diferentes y comprenden tanto dominios naturales como manipulados. Por ejemplo, el dominio ATq puede sustituirse por un dominio AT derivado de cualquier módulo de extensión de una PKS de tipo I que tiene especificidad para cargar unidades de malonato, mientras que el dominio KSq se elige por tener una especificidad de apareamiento hacia unidades de malonato.

El módulo de carga del tipo KSq-ATq-ACP puede ligarse a una PKS híbrida producida, por ejemplo, como en 15 los documentos WO 98/01546 y WO 98/01571. Es particularmente útil ligar un módulo de carga tal a ensamblajes de genes que codifican PKS híbridas que producen derivados novedosos como se describen, por ejemplo, en los documentos WO 98/01546 y WO 98/01571.

Los organismos transformantes usados en la invención pueden albergar plásmidos recombinantes, o los plásmidos 20 pueden integrarse. Un plásmido con una secuencia int se integrará en un sitio de unión específico (att) del cromosoma del huésped. Los organismos transformantes pueden modificar los productos iniciales, por ejemplo, llevando a cabo todas o algunas de las modificaciones biosintéticas normales en la producción de eritromicinas (como se muestra en la Figura 5) y para otros policétidos. Puede hacerse uso de organismos mutantes de forma que se bloqueen algunas de 25 las rutas normales, por ejemplo, para producir productos sin uno o más grupos hidroxi "naturales" o grupos de azúcar.

La invención puede usarse para proporcionar tanto macrólidos de 14 miembros de anillo previamente obtenidos como macrólidos de 14 miembros de anillo novedosos en una forma más pura con respecto a la naturaleza de la unidad de iniciador de acetato que la que hasta ahora era posible. Éstos incluyen macrólidos de 14 miembros de anillo que son tanto "naturales" como que pueden diferenciarse del compuesto "natural" correspondiente:

- 30 a) en el estado de oxidación de una o más de las unidades de cétidos (es decir, selección de alternativas del grupo: -CO-, -CH(OH)-, alqueno -CH-, y -CH₂-) en las que la estereoquímica de cualquier -CH(OH)- también es independientemente seleccionable;
- b) en ausencia de una cadena lateral de metilo "natural"; o
- c) en la estereoquímica de metilo "natural"; y/o sustituyentes de anillo distintos de metilo.

40 También es posible preparar derivados de macrólidos de 14 miembros de anillo que tienen las diferencias del producto natural identificado en dos o más de los puntos a) a c) anteriores.

También puede prepararse derivados de cualquiera de los policétidos anteriormente mencionados que se han sometido adicionalmente a procesamiento por enzimas de no PKS, por ejemplo, una o más de hidroxilación, epoxidación, 45 glicosilación y metilación.

La presente invención proporciona un procedimiento novedoso de obtención de macrólidos de 14 miembros complejos tanto conocidos como novedosos que tienen una unidad de iniciador de acetato prácticamente libre de productos que sólo se diferencian en que tienen una unidad de iniciador de propionato.

50 Los vectores de plásmido adecuados y las células genéticamente modificadas adecuadas para la expresión de genes de PKS que incorporan un módulo de carga cambiado son aquellos descritos en el documento WO 98/01546 como adecuados para la expresión de genes de PKS híbridos de tipo I. Ejemplos de huéspedes eficaces son *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces griseofuscus*, *Streptomyces cinnamoneensis*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces hygroscopicus*, *Micromonospora griseorubida*, *Streptomyces lasaliensis*, *Streptomyces venezuelae*, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces albus*, *Amycolatopsis mediterranei* y *Streptomyces tsukubaensis*. Éstos incluyen huéspedes en los que los plásmidos derivados de SCP2* son conocidos por replicarse autónomamente tales como, por ejemplo, *S. coelicolor*, *S. avermitilis* y *S. griseofuscus*; y otros huéspedes tales como *Saccharopolyspora erythraea* en 55 la que los plásmidos derivados de SCP2* se integran en el cromosoma mediante recombinación homóloga entre secuencias en el inserto de plásmido y en el cromosoma; y todos aquellos vectores que se transforman integrativamente mediante vectores de plásmido suicidas.

Aunque previamente se han notificado algunas 13-metileritromicinas (también conocidas como 15-noreritromicinas) (Kibwage y col., J. Antibiotics, 40, 1-6, 1987; Weber & McAlpine, patente de EE.UU. 5.141.926), éstas se han limitado a 15-noreritromicina C y 6-desoxi-15-noreritromicinas B y D. Además, no sólo se han encontrado éstas 60 15-noreritromicinas como componentes extremadamente menores coexpresados con altos niveles de eritromicinas "naturales" (13-etileritromicinas), sino que los homólogos de 13-metilo (15-noreritromicinas A y B) para las eritromicinas mediante vectores de plásmido suicidas.

ES 2 341 403 T3

“naturales” más deseables y biológicamente activas (eritromicina A y B) nunca se han aislado previamente. La modificación química de eritromicinas “naturales” ha demostrado ser un medio extremadamente eficaz para potenciar la bioeficacia de las moléculas “naturales”. Por tanto, sería concebible que la modificación química de eritromicinas novedosas produjera similarmente compuestos con bioeficacias deseables y potenciadas. El documento WO 98/01546 5 describe en términos generales la producción de policétidos novedosos mediante tecnologías de ADN recombinante y el uso de estas tecnologías para generar eritromicinas novedosas, muchas de las cuales tienen diferentes unidades de iniciador respecto a la unidad de iniciador de propionato característica de las eritromicinas “naturales”, se describe en la solicitud de patente internacional en trámite WO 98/01546. Alguna modificación química de estas eritromicinas novedosas también se describe en las solicitudes de patente internacional en tramitación junto con la presente 10 PCT/IB98/02100 y PCT/IB98/02099, es decir, los documentos WO 99/35157 y WO 99/35156. Sin embargo, es evidente que la capacidad para producir eritromicinas novedosas con buenos niveles de expresión y en ausencia sustancial de eritromicinas novedosas o naturales con diferentes unidades de iniciador es esencial para facilitar la capacidad para lograr una amplia variedad de modificaciones químicas para tales eritromicinas novedosas. La capacidad potenciada para producir policétidos con buenos niveles de expresión y en ausencia sustancial de policétidos con diferentes 15 unidades de iniciador se ha descrito en esta solicitud son miembros de familias y los inventores describen ahora la capacidad para producir 13-metileritromicinas con buenos niveles de expresión y en ausencia sustancial de eritromicinas con diferentes unidades de iniciador. El uso de esta tecnología ha permitido ahora la preparación de grandes cantidades de 13-metileritromicinas que por primera vez ha permitido a los inventores llevar a cabo una amplia variedad de modificaciones químicas que previamente sólo habían sido posibles partiendo de las eritromicinas “naturales”. 20

Algunas realizaciones de la invención se describirán ahora con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La Fig 1 es un diagrama que muestra el funcionamiento de 6-desoxieritronolida B sintasa (DEBS), una 6-desoxieritronolida B (6-DEB) productora de PKS modular, un precursor de eritromicina A.

La Fig 2 proporciona la comparación de secuencias de aminoácidos de los dominios KS y los dominios CLF de agrupaciones de genes de PKS de tipo II representativas. El sitio activo cisteína (C) de los dominios KS está señalado con una flecha en la figura y se alinea con la glutamina (Q) o ácido glutámico (E) de los dominios CLF. Las abreviaturas usadas y los números de registro relevantes de Genbank/EMBL son: GRA: granaticina de *Streptomyces violaceoruber* (X63449); HIR: policétido desconocido de *Saccharopolyspora hirsuta* (M98258); ACT, actinorrodina de *Streptomyces coelicolor* (X63449); CIN: policétido desconocido de *Streptomyces cinnamomensis* (Z11511); VNZ: jadomicina de *Streptomyces venezuelae* (L33245); NOG: antraciclinas de *Streptomyces nogalater* (Z48262); TCM: te-tracenomicina de *S. glaucescens* (M80674); DAU: daunomicina de *Streptomyces sp. C5* (L34880); PEU, doxorubicina de *Streptomyces peuceti* (L35560); WHI: pigmentos de esporas WhiE de *Streptomyces coelicolor* (X55942).

La Fig 3 muestra la organización de genes de las PKS para tres macrólidos de 16 miembros de anillo, tilosina, espiramicina y nidamicina.

La Fig 4 muestra el alineamiento de secuencias de aminoácidos de didominios de carga KSq-ATq de las PKS para nidamicina, platenolida (espiramicina), monensina, oleandomicina y tilosina. Las secuencias para los didominios de carga monensina y oleandomicina no se han desvelado previamente.

La Fig. 5. Las etapas enzimáticas que convierten 6-desoxieritronolida B en eritromicina A en *Saccharopolyspora erythraea*

La Fig. 6 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pJLK117.

La Fig. 7 muestra las estructuras de dos oligonucleótidos.

La presente invención se ilustrará ahora, pero no pretende limitarse, por medio de algunos ejemplos.

Todos los espectros de RMN se midieron en CDCl_3 usando un espectrómetro Bruker 500 MHz DMX a menos que se indique lo contrario y las posiciones de los picos se expresan en partes por millón (ppm) a campo bajo de tetrametilsilano. El número atómico mostrado en la estructura de RMN no es representativo de la nomenclatura estándar, pero 55 los datos de RMN guardan relación con ese ejemplo particular.

Procedimientos de HPLC

60 Procedimiento A

Columna Waters Symmetry 5_C18 2,1 mm X 150 mm

Flujo 0,29 ml/min

Fase móvil Gradiante: A:B (22:78) a A:B (38:62) durante 12 minutos, luego a A:B (80:20) por el minuto 15. Mantener durante 1 minuto. Reequilibrar antes de la siguiente muestra. En la que A = acetonitrilo y B = acetato de amonio 0,01 M en 10% de acetonitrilo y 0,02% de TFA

ES 2 341 403 T3

Instrumento Adquirido con un cromatógrafo de líquidos Hewlett-Packard 1050 con interfaz a un espectrómetro de masas VG Platform II equipado con una fuente de APCI

5 Procedimiento B

Columna Waters Symmetry 5_ C18 2,1 mm X 150 mm

Flujo 0,29 ml/min

10 Fase móvil Gradiante: 28:72 de acetonitrilo: NH4OAc 10 mM a 50:50 en 18 minutos. 50:50 hasta 25 minutos. De Nuevo a 28:72, reequilibrar durante 7 minutos

15 Instrumento Adquirido con EM/CL de Hewlett Packard 1100 con fuente de APCI

Medio de agua de grifo

20 Glucosa 5 g/litro

Triptona 5 g/litro

Extracto de levadura 2,5 g/litro

25 EDTA 36 mg/litro

Agua de grifo hasta volumen total de 1 l

30 Medio ERY - P

Dextrosa 50 g/litro

35 Harina NutrisoyTM 30 g/litro

(NH₄)₂SO₄ 3 g/litro

NaCl 5 g/litro

40 CaCO₃ 6 g/litro

Agua de grifo hasta volumen total de 1 l con pH ajustado a 7,0

45 Ejemplo 1

Construcción del vector recombinante pPFL43

Se preparó el plásmido pCJR24 como se describe en el documento PCT/GB97/01819. pPFL43 es un plásmido basado en pCJR24 que contiene el gen que codifica una policétido sintasa híbrida que contiene el módulo de carga de la PKS monensina putativa (aislado de *S. cinnamonensis*), los módulos de extensión de DEBS 1 y 2 y la tioesterasa terminadora de cadena. El plásmido pPFL43 se construyó del siguiente modo:

55 Los siguientes oligonucleótidos sintéticos: 5'-CCATATGGCCGCATCCGCGTCAGCGT-3' y 5'-GGCTAGCG GGTCTCGTCCGTGCCGAGGTCA-3' se usan para amplificar el ADN que codifica el módulo de carga productor de monensina putativa usando un cósmido que contiene el extremo 5' de los genes de PKS productores de monensina putativa de *S. cinnamonensis* o ADN cromosómico de *S. cinnamonensis* como molde. El producto de PCR de 3,3 kpb se purifica por electroforesis en gel, se trata con T4 polinucleótido cinasa y se liga al plásmido pUC18, que se ha linearizado por digestión con *Sma* I y luego se trata con fosfatasa alcalina. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y los clones individuales se examinaron para el plásmido deseado pPFL40. El plásmido pPFL40 se identificó por patrón de restricción y análisis de secuencias.

65 El plásmido pHD30HIS es un derivado de pNEWAVETE (documento PCT/GB97/01810) que contiene el modulo de carga de avermectina, los módulos de extensión de eritromicina 1 y 2 y el dominio de tioesterasa ery. El plásmido pNEWAVETE se cortó con EcoRI y HinDIII y se introdujo un ligador de oligonucleótidos sintético que codifica la adición de una cola de polihistidina del extremo C al polipéptido. Los siguientes oligonucleótidos:

ES 2 341 403 T3

5'-AATTACACATCACCATACCACCACTAGTAGGAGGTCTGCCATCTAGA-3'

y

5 5'-AGCTTCTAGATGGCCAGACCTCCTACTAGTGATGGTGATGGTGATGTG-3' se hibridaron juntos y el dúplex se ligó a pNEWAVETE cortado con EcoRI y HinDIII. El plásmido resultante se cortó con NdeI y XbaI y se ligó en el plásmido pCJR24 que previamente había sido cortado con las dos mismas enzimas para producir el plásmido pND30His.

10 El plásmido pPFL40 se digirió con *Nde* I y *Nhe* I y el fragmento de 3,3 kpb se purificó por electroforesis en gel y se ligó a pND30-His previamente digerido con *Nde* I y *Nhe* I y se trató con fosfatasa alcalina. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y los clones individuales se examinaron para el plásmido deseado pPFL43. El plásmido pPFL43 se identificó por análisis de restricción.

15

Ejemplo 2

Construcción de NRRL2338/pPFL43 de *S. erythrae*a

20 El plásmido pPFL43 se usó para transformar protoplastos de NRRL2338 de *S. erythrae*a. Se seleccionaron colonias resistentes a tiostreptona en medio R2T20 que contenía 10 µg/ml de tiostreptona. Se probaron varios clones para la presencia de pPFL43 integrado en el cromosoma por hibridación por transferencia de Southern de su ADN genómico con ADN marcado con DIG que contenía el fragmento de PKS mon que codificaba el módulo de carga. De esta forma 25 se seleccionó un clon con una copia integrada de pPFL43.

Ejemplo 3

Producción de 13-metil-eritromicina A y B usando 2338/pPFL43 de NRRL de *Sacch. erythrae*a

30 El cultivo *Saccharopolyspora erythrae*a NRRL2338 (pPFL43), construido con el dominio de carga natural desplazado por un inserto de ADN de cargador de monensina-D1 TE, producido como se describe en el Ejemplo 2 se inoculó en 30 ml de medio de agua de grifo con 50 ug/ml de tiostreptona en un matraz Erlenmeyer de 300 ml. Después de tres 35 días de incubación a 29°C, este matraz se usó para inocular 300 ml de medio ERY-P en un matraz de 300 ml. El caldo se incubó a 29°C a 200 rpm durante 6 días. Despues de este tiempo, todo el caldo se ajustó a pH 8,5 con NaOH, luego se extrajo con un volumen igual de acetato de etilo. El extracto de acetato de etilo se evaporó a sequedad a 45°C bajo una corriente de nitrógeno usando un evaporador Zymark TurboVap LV, luego se reconstituyó en 0,0625 volúmenes de metanol para concentrar el extracto 16 veces. Las estructuras de los productos se confirmaron por EM/CL, Procedimiento A. Como componente principal se observó un pico de tiempo de retención de 4,0 min, con valor de m/z de 40 720 ($M+H$)⁺, requerido para 13-metil-eritromicina A. Se observó un segundo pico con un tiempo de retención de 6,4 min y con valor de m/z de 704 ($M+H$)⁺, requerido para 13-metil-eritromicina B.

Ejemplo 4

Producción y recuperación de 13-metil-eritromicina A y B usando NRRL-2338 (pPFL43) de *Sacch. erythrae*a a escala 8 l

50 Se inoculó NRRL2338 (pPFL43) de *Saccharopolyspora erythrae*a en 1000 ml de medio de agua de grifo con 50 µg/ml de tiostreptona en un matraz Fernbach de 2,8 l. Despues de tres días de incubación a 29°C, este matraz se usó para inocular 8 l de medio ERY-P en un recipiente de fermentador Microferm de 14 l (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ). El caldo se incubó a 28°C con una tasa de aireación de 8 l/min, agitación a 800 rpm y con pH mantenido entre 6,9 y 7,3 con NaOH o H₂SO₄ (15%). Se añadió agua para mantener el volumen al nivel de volumen de 24 horas. 55 La fermentación continuó durante 167 horas. Despues de este tiempo, la presencia de 13-metil-eritromicina A y B se confirmó ajustando una muestra de caldo del fermentador a pH 8,5 con NaOH, luego extrayendo con un volumen igual de acetato de etilo. El extracto de acetato de etilo se evaporó a sequedad a 45°C bajo una corriente de nitrógeno usando un evaporador Zymark TurboVap LV, luego se reconstituyó en 0,25 volúmenes de metanol para concentrar el extracto 4 veces. Las estructuras de los productos se confirmaron por EM/CL, Procedimiento A. Como componente principal se observó un pico de tiempo de retención de 4,1 min, con valor de m/z de 720 ($M+H$)⁺, requerido para 13-metil-eritromicina A. Se observó un segundo pico con un tiempo de retención de 6,6 min y con valor de m/z de 704 ($M+H$)⁺, requerido para 13-metil-eritromicina B.

60 Se procesaron aproximadamente 35 litros de caldo que contenía aproximadamente 2,8 gramos de 13-metil-eritromicina A para la recuperación de producto. El caldo se filtró a través de una unidad cerámica Ceraflo de tamaño piloto y se cargó en una columna de resina XAD-16 de 500 ml. El producto se eluyó usando 100% de metanol. Se preparó una columna de adsorción CG-161 de 175 ml y se equilibró con 20% de metanol/agua. Una parte de la disolución del producto se ajustó con 20% de metanol y se cargó en la columna, no se observó un gran avance del producto. El lavado

ES 2 341 403 T3

de la columna con hasta el 40% de metanol/agua fracasó en eliminar cualquier nivel significativo de impurezas. La elución con 50% de metanol/agua logró la separación cromatográfica del producto de las dos impurezas principales, 13-metil-eritromicina B y un producto de degradación, 13-metil-deshidroeritromicina A. Los cortes más puros se combinaron y se redujeron en volumen a aproximadamente el 75% usando evaporación para lograr una concentración de

- 5 metanol < 10%. Para potenciar la extracción de la 13-metil-eritromicina A se añadió bicarbonato sódico sólido hasta que se obtuvo una concentración total de 250 mM. La fase de producto acuosa se extrajo 2x con cloruro de metileno usando cada vez la mitad del volumen total. El volumen se redujo a sólidos de color amarillo claro mediante evaporación. La 13-metil-eritromicina A se purificó disolviendo los cristales brutos en cloruro de metileno a temperatura ambiente y diluyendo al 15% de cloruro de metileno con hexano. La disolución turbia se colocó a -10°C durante ~30
10 minutos cuando el líquido se decantó a un 2º matraz quedando atrás la mayoría de las impurezas como un aceite. El matraz se dejó durante la noche a -10°C, seguido por filtración de los cristales blanquecinos de 13-metil-eritromicina A al día siguiente. Se aislaron aproximadamente 300 miligramos de 13-metil-eritromicina A del tratamiento final parcial del volumen de caldo de 35 l.

- 15 Se utilizaron aproximadamente 100 gramos de aguas madres evaporadas adicionalmente para aislar 13-metil-eritromicina B. La 13-metil-eritromicina A residual se eliminó con extracción repetitiva de la muestra inicial con ácido acético acuoso (pH 5). La posterior fase de cloruro de metileno se purificó por cromatografía en 700 g de gel de sílice usando 20% de metanol en cloruro de metileno. Las fracciones enriquecidas en 13-metil-eritromicina B, como se determina por EM/CL, se combinaron y se evaporaron para dar ~11,0 gramos de aceite oscuro. El aceite se disolvió
20 en una cantidad mínima de metanol y se cargó en 500 ml de resina CG-161 de Amberchrom. La 13-metil-eritromicina B se eluyó con 2 volúmenes de lecho por hora con 40% de metanol en agua desionizada. Las fracciones de volumen de un lecho se recogieron y se ensayaron por EM/CL. Las fracciones 42 a 62 se combinaron, se diluyeron con ~20% de metanol con agua desionizada y se neutralizaron a pH 7,5 con bicarbonato sódico. La disolución resultante se extrajo una vez con 4 l de cloruro de metileno, se concentró hasta ~500 ml y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro.
25 Despues de eliminar el MgSO₄ por filtración, el filtrado se evaporó para dar ~110 mg de sólidos de color marrón claro. Los 110 mg de 13-metil-eritromicina B bruta se disolvieron en ~3,0 mililitros de acetonitrilo de calidad para HPLC y se cargaron en una placa de cromatografía preparativa en capa fina (PTLC) de gel de sílice de 20 cm x 20 cm, 2 mm de espesor. La placa se reveló con 60:40 de metanol:acetonitrilo. La porción deseada de sílice de la placa de PTLC (visualización con yodo) se eliminó y se extrajo con acetona de calidad para HPLC. El extracto de acetona se evaporó para dar 12,1 mg de sólido transparente.

La identificación de las muestras de 13-metil-eritromicina A y 13-metil-eritromicina B se confirmó por espectroscopía de masas (Procedimiento B de EM/CL) y espectroscopía de RMN. Un pico de muestra de 13-metil-eritromicina tenía un tiempo de retención de 4,7 min, con valor de m/z de 720 (M+H)⁺, requerido para 13-metil-eritromicina A. El pico de muestra de 13-metil-eritromicina B tenía un tiempo de retención de 7,6 min, con valor de m/z de 704 (M+H)⁺, requerido para 13-metil-eritromicina B.

40

(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

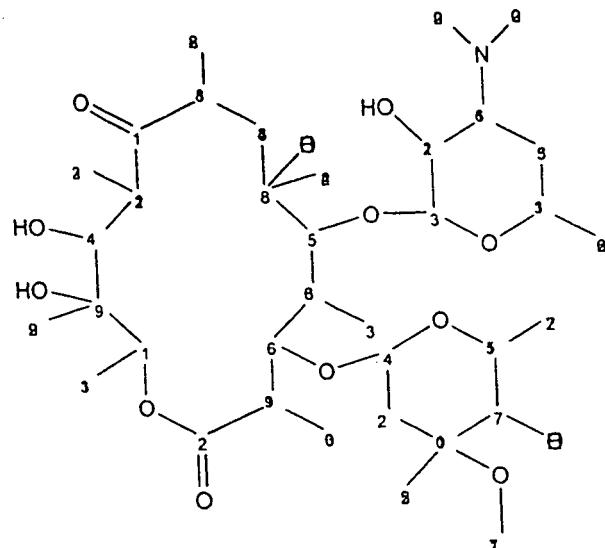
55

60

65

ES 2 341 403 T3

RMN, 13-metil-eritromicina A



	Nº	13C - ppm	Nº H	1H - ppm
25	1	221,91	0	
30	2	175,99	0	
	3	103,63	1	4,45
	4	96,81	1	4,88
35	5	83,76	1	3,60
	6	79,86	1	4,10
	7	78,36	1	3,05
40	8	75,50	0	
	9	74,87	0	
	10	73,07	0	
45	11	72,25	1	5,19
	12	71,25	1	3,26
	13	69,53	1	3,53
50	14	69,24	1	3,97
	15	66,16	1	4,06
	16	65,96	1	2,48
55	17	49,96	3	3,36
	18	45,36	1	2,79
	19	45,07	1	2,81
60	20	40,73	3	2,32
	21	39,00	1	3,15
65	22	35,30	2	2,42/1,61

ES 2 341 403 T3

	24	27,20	3	1,50
5	25	21,92	3	1,28
	26	21,82	3	1,27
	27	18,99	3	1,32
10	28	18,60	3	1,22
	29	16,07	3	1,19
	30	15,08	3	1,19
15	31	14,23	3	1,26
	32	12,12	3	1,19
	33	9,60	3	1,15
20	34	39,00	2	1,98/1,75
	35	28,90	2	1,72/1,27
	36	40,94	1	2,05

25

RMN, 13-metil-eritromicina B

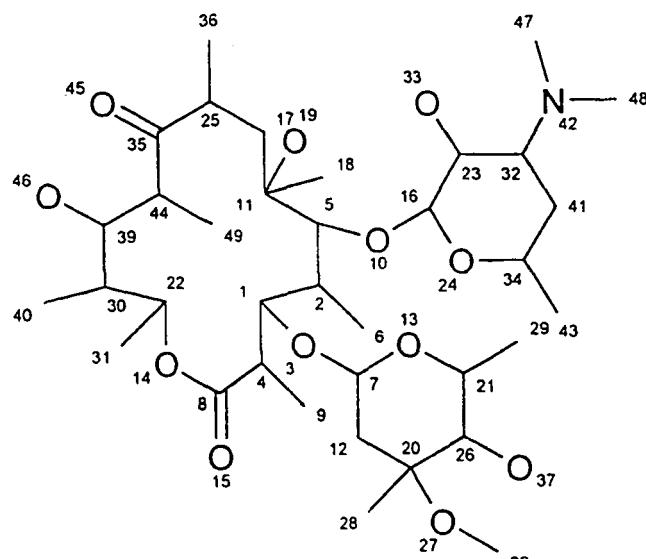
30

35

40

45

50



55

60

65

Nº	13C-PPM	Nº de H unidos	1H-PPM
1	80,50	1	4,15
2	40,62	1	2,15
4	45,17	1	2,84
5	84,08	1	3,62
6	9,86	3	1,18
7	97,26	1	4,88

ES 2 341 403 T3

	8	176,48	0	
5	9	15,25	3	1,22
	11	75,98	0	
10	12	35,43	2	2,42/1,61
	16	103,75	1	4,46
15	17	38,77	2	2,09/1,72
	18	27,67	3	1,51
20	20	73,09	0	
	21	66,20	1	4,06
25	22	70,27	1	5,58
	23	71,24	1	3,28
30	25	45,49	1	2,81
	26	78,29	1	3,06
35	28	21,91	3	1,28
	29	19,03	3	1,33
40	30	41,61	1	1,65.
	31	18,73	3	1,29
45	32	65,94	1	2,53
	34	69,52	1	3,55
50	35	219,92	0	
	36	19,03	3	1,21
55	38	49,97	3	3,36
	39	70,17	1	3,88
	40	9,27	3	0,95
	41	29,12	2	1,73/1,28
	43	21,80	3	1,27
	44	39,87	1	3,07
	47	40,74	3	2,35
	48	40,74	3	2,35
	49	9,62	3	1,04

Ejemplo 5

60 *Construcción del plásmido pPFL35*

El plásmido pPFL35 es un plásmido basado en pCJR24 que contiene un gen de PKS que comprende un módulo de carga, el primer y segundo módulos de extensión de DEBS y la tioesterasa terminadora de cadenas. El módulo de carga comprende el ADN del dominio KSq del módulo de carga de la PKS oleandomicina fusionada a la AT específica de malonil-CoA de módulo 2 de la PKS rapamicina, ligado a su vez a la ACP del dominio de carga de DEBS. El plásmido pPFL35 se construyó por medio de varios plásmidos intermedios del siguiente modo:

ES 2 341 403 T3

Un segmento de ADN de 411 pb del gen eryAI de *S. erythraea* que se extendía desde el nucleótido 1279 hasta el nucleótido 1690 (Donadio, S. y col., Science (1991) 2523:675-679) se amplificó por PCR usando los siguientes cebadores de oligonucleótidos sintéticos:

5' -TGGACCGCCGCCAATTGCCTAGGCAGGCCGAACCCGGCT-3' y
5' -CCTGCAGGCCATCGCGACGACCGCGACCGGTTGCC-3'

10 Como molde se usó el ADN de un plásmido designado pKSW, derivado de pT7-7 y DEBS1-TE en los que se habían introducido nuevos sitios Pst I y *HindIII* para flanquear la KS1 del primer módulo de extensión. El producto de PCR de 441 pb se trató con T4 polinucleótido cinasa y se ligó al plásmido pUC18, que había sido linealizado por digestión con *Sma* I y luego se trató con fosfatasa alcalina. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y los clones individuales se examinaron para el plásmido deseado, pPFL26. Los 15 nuevos sitios Mfe I/Avr II que limitan con el inserto son adyacentes al sitio Eco RI en el polilíquido de pUC18. El plásmido pPFL26 se identificó por patrón de restricción y análisis de secuencias.

20 Un sitio de restricción *Mfe* I se localiza a 112 pb del extremo 5' del ADN que codifica la propionil-CoA:ACP transferasa del módulo de carga de DEBS. El plásmido pKSW se digirió con *Mfe* I y Pst I y se ligó con el inserto de 411 pb obtenido digiriendo el plásmido pPFL26 con *Mfe* I y Pst I. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y los clones individuales se examinaron para el plásmido deseado, pPFL27. El plásmido pPFL27 contiene un gen de PKS que comprende el módulo de carga de DEBS, el primer y segundo módulos de extensión de DEBS y la tioesterasa terminadora de cadenas de DEBS. El plásmido pPFL27 se identificó por su patrón de restricción.

25 El plásmido pPFL27 se digirió con *Nde* I y Avr II y se ligó a un inserto de 4,6 kpb derivado de digerir el plásmido pMO6 (documento PCT/GB97/01819) con *Nde* I y Avr II. El plásmido pMO6 contiene un gen de PKS que comprende el módulo de carga de DEBS, el primer y segundo módulos de extensión de DEBS y la tioesterasa terminadora de cadenas de DEBS, excepto que el segmento de ADN que codifica la AT específica de malonato de metilo dentro del primer módulo de extensión se ha sustituido específicamente con el ADN que codifica la AT específica de malonato de módulo 2 de la PKS rap. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y los clones individuales se examinaron para el plásmido deseado, pPFL28. El plásmido pPFL28 contiene un gen de PKS híbrido que comprende el módulo de carga de DEBS, la AT específica de malonato de módulo 2 de la PKS rap, la ACP del módulo de carga de DEBS, seguido del primer y segundo módulos de extensión de DEBS y la tioesterasa terminadora de cadenas de DEBS. El plásmido pPFL28 se identificó por análisis de restricción.

40 Un segmento de ADN que codifica el dominio KSq del gen oleAI de *S. antibioticus* que se extiende desde el nucleótido 1671 hasta el nucleótido 3385 se amplificó por PCR usando los siguientes cebadores de oligonucleótidos sintéticos:

5' -CCACATATGCATGTCCCCGGCGAGGAA-3' y
5' -CCCTGTCCGGAGAAGAGGAAGGGCGAGGCCG-3'

45 y ADN cromosómico de *Streptomyces antibioticus* como molde. El producto de PCR se trató con T4 polinucleótido cinasa y se ligó al plásmido pUC18, que había sido linealizado por digestión con *Sma* I y luego se trató con fosfatasa alcalina. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y los clones individuales se examinaron para el plásmido deseado, pPFL31. El nuevo sitio *Nde* I que limita con el inserto es adyacente al sitio Eco RI del polilíquido pUC18, mientras que el nuevo sitio *Bsp* EI limita con el sitio Hin dIII de la región del ligador. El plásmido pPFL31 se identificó por análisis de restricción y de secuencias.

55 El plásmido pPFL31 se digirió con *Nde* I y Avr II y el inserto se ligó con el plásmido pPFL28 que había sido digerido con *Nde* I y Avr II. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y los clones individuales se examinaron para el plásmido deseado, pPFL32. El plásmido pPFL32 se identificó por análisis de restricción.

60 El plásmido pPFL32 se digirió con *Nde* I y *Xba* I y el inserto se ligó al plásmido pCJR24, que había sido digerido con *Nde* I y *Xba* I y purificado por electroforesis en gel. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y los clones individuales se examinaron para el plásmido deseado, pPFL35. El plásmido pPFL35 se identificó por análisis de restricción.

ES 2 341 403 T3

Ejemplo 6

Construcción de NRRL2338/pPFL35 de S. erythraea

5 El plásmido pPFL35 se usó para transformar protoplastos de NRRL2338 de *S. erythraea*. Se seleccionaron colonias resistentes a tiostreptona en medio R2T20 (Yamamoto y col.) que contenía 10 µg/ml de tiostreptona. Se probaron varios clones para la presencia de pPFL35 integrado en el cromosoma por hibridación por transferencia de Southern de su ADN genómico con ADN marcado con DIG que contenía el fragmento de PKS rap que codificaba AT de módulo 2. De esta forma se identificó un clon con una copia integrada de pPFL35.

10

Ejemplo 7

Producción de 13-metil-eritromicina A y B usando NRRL-2338 (pPFL35) de Sacch. erythraea

15 El cultivo NRRL2338 (pPFL35) de *Saccharopolyspora erythraea*, construido con el dominio de carga natural desplazado por un inserto de ADN de KSQ oleandomicina-AT2 de rapamicina-D1TE, preparado como se describe en el Ejemplo 6, se inoculó en 30 ml de medio de agua de grifo con 50 ug/ml de tiostreptona en un matraz Erlenmeyer de 300 ml. Después de dos días de incubación a 29°C, este matraz se usó para inocular 300 ml de medio ERY-P en un
20 matraz de 300 ml. El caldo se incubó a 29°C a 200 rpm durante 6 días. Después de este tiempo, todo el caldo se ajustó a pH 8,5 con NaOH, luego se extrajo con un volumen igual de acetato de etilo. El extracto de acetato de etilo se evaporó a sequedad a 45°C bajo una corriente de nitrógeno usando un evaporador Zymark TurboVap LV, luego se reconstituyó en 0,25 volúmenes de metanol para concentrar el extracto 4 veces. Las estructuras de los productos se confirmaron por EM/CL, Procedimiento A. Se observó un pico con un tiempo de retención de 4,0 min y con un valor de m/z de 25 720 (M+H)⁺, requerido para 13-metil-eritromicina A ($C_{36}H_{65}NO_{13}$). Se observó un segundo pico con un tiempo de retención de 6,4 min y con valor de m/z de 704 (M+H)⁺, requerido para 13-metil-eritromicina B ($C_{36}H_{65}NO_{12}$).

30 Ejemplo 8

Construcción del vector recombinante pPFL44

El plásmido pPFL44 es un plásmido basado en pCJR24 que contiene el gen que codifica una policétido sintasa híbrida que contiene el módulo de carga de PKS espiramicina, los módulos de extensión de eritromicina 1 y 2 y la tioesterasa terminadora de cadenas. El plásmido pPFL44 se construyó del siguiente modo:

35 Los siguientes oligonucleótidos sintéticos:

40 5'-CCATATGTCTGGAGAACTCGCGATTCCCCGAGT-3' y

45 5'-GGCTAGCGGGTCGTCGTCGTCCC GGCTG-3'

se usaron para amplificar el ADN que codifica el módulo de carga productor de espiramicina usando ADN cromosomal de la *S. ambofaciens* productora de espiramicina preparada según el procedimiento descrito por Hopwood y col. (1985). El producto de PCR de 3,3 kpb se purificó por electroforesis en gel, se trató con T4 polinucleótido cinasa y se ligó al plásmido pUC18, que había sido linealizado por digestión con *Sma* I y luego se trató con fosfatasa alcalina. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y los clones individuales se examinaron para el plásmido deseado pPFL41. El plásmido pPFL41 se identificó por patrón de restricción y análisis de secuencias.

50

El plásmido pPFL41 se digirió con *Nde* I y *Nhe* I y el fragmento de 3,3 kpb se purificó por electroforesis en gel y se ligó a pND30 (un plásmido derivado del plásmido pCJR24 que tiene como inserto el módulo de carga de PKS ave y los módulos de extensión 1 y 2 o DEBS y la tioesterasa de DEBS) (documento PCTGB97/01810) previamente digerido con *Nde* I y *Nhe* I y se trató con fosfatasa alcalina. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y los clones individuales se probaron para el plásmido deseado pPFL44. El plásmido pPFL44 se identificó por análisis de restricción.

55

Ejemplo 9

60

Construcción de NRRL2338/pPFL44 de Sacch. erythraea

El plásmido pPFL44 se usó para transformar protoplastos de NRRL2338 de *S. erythraea*. Se seleccionaron colonias resistentes a tiostreptona en medio R2T20 que contenía 10 µg/ml de tiostreptona. Se probaron varios clones para la presencia de pPFL44 integrado en el cromosoma por hibridación por transferencia de Southern de su ADN genómico con ADN marcado con DIG que contenía el fragmento de PKS espiramicina que codificaba el módulo de carga. De esta forma se identificó un clon con una copia integrada de pPFL44.

ES 2 341 403 T3

Ejemplo 10

Producción de 13-metil-eritromicina A y B usando NRRL-2338 (pPFL44) de Sacch. erythraea

5 El cultivo NRRL2338 (pPFL44) de *Saccharopolyspora erythraea*, construido con el dominio de carga natural desplazado por inserto de ADN de cargador de espiramicina-D1TE, se inoculó en 30 ml de medio de agua de grifo con 50 ug/ml de tiostreptona en un matraz Erlenmeyer de 300 ml. Después de tres días de incubación a 29°C, este matraz se usó para inocular 300 ml de medio ERY-P en un matraz de 300 ml. El caldo se incubó a 29°C a 200 rpm durante 6
10 días. Después de este tiempo, todo el caldo se ajustó a pH 8,5 con NaOH, luego se extrajo con un volumen igual de acetato de etilo. El extracto de acetato de etilo se evaporó a sequedad a 45°C bajo una corriente de nitrógeno usando un evaporador Zymark TurboVap LV, luego se reconstituyó en 0,0625 volúmenes de metanol para concentrar el extracto 16 veces. Las estructuras de los productos se confirmaron por EM/CL, Procedimiento A. Como componente principal se observó un pico de tiempo de retención de 4,0 min, con valor de m/z de 720 ($M+H$)⁺, requerido para 13-metil-eritromicina A ($C_{36}H_{65}NO_{13}$). Se observó un segundo pico con un tiempo de retención de 6,4 min y con valor de m/z
15 de 704 ($M+H$)⁺, requerido para 13-metil-eritromicina B ($C_{36}H_{65}NO_{12}$).

Ejemplo 21

Construcción del plásmido pJLK114

20 El plásmido pJLK114 es un plásmido basado en pCJR24 que contiene un gen de PKS que comprende el módulo de carga ery, el primer y segundo módulos de extensión de la PKS ery y la tioesterasa terminadora de cadenas ery, excepto que el segmento de ADN entre el extremo de la aciltransferasa y el inicio de la ACP del segundo módulo de extensión de ery ha sido sustituido por un ligador de oligonucleótidos sintético que contiene los sitios de reconocimiento de 25 las siguientes enzimas de restricción: AvrII, BglII, SnaBI, PstI, SpeI, NsiI, Bsu36I y HpaI. Se construyó por medio de varios plásmidos intermedios del siguiente modo (Figura 6).

Construcción del plásmido pJLK02

30 El fragmento de ADN de aproximadamente 1,47 kpb del gen de eryAI de *S. erythraea* se amplificó por PCR usando como cebadores los oligonucleótidos sintéticos:

5'-TACCTAGGCCGGCCGGACTGGTCGACCTGCCGGTT-3' y

35 5'-ATGTTAACCGGTGCGCGCAGGCTCTCCGTCT-3' y el plásmido pNTEP2 (Oliynyk, M. y col., Chemistry and Biology (1996) 3:833-839; documento WO98/01546) como molde. El producto de PCR se trató con T4 polinucleótido cinasa y luego se ligó con el plásmido pUC18, que había sido linealizado por digestión con SmaI y luego se trató con fosfatasa alcalina. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y las colonias individuales se examinaron para su contenido de plásmidos. El plásmido deseado pJLK02 se identificó por su patrón de restricción y secuenciación de ADN.

Construcción del plásmido pJLK03

45 El fragmento de ADN de aproximadamente 1,12 kpb del gen de eryAI de *S. erythraea* se amplificó por PCR usando como cebadores los oligonucleótidos sintéticos:

5'-ATGTTAACGGGTCTGCCCGTGCCGAGCGGAC-3' y

50 5'-CTTCTAGACTATGAATTCCCTCCGCCAGC-3' y el plásmido pNTEPH como molde. El producto de PCR se trató con T4 polinucleótido cinasa y luego se ligó con el plásmido pUC18, que había sido linealizado por digestión con SmaI y luego se trató con fosfatasa alcalina. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y las colonias individuales se examinaron para su contenido de plásmidos. El plásmido deseado pJLK03 se identificó por su patrón de restricción y secuenciación de ADN.

Construcción del plásmido pJLK04

55 El plásmido pJLK02 se digirió con PstI y HpaI y el inserto de 1,47 kpb se ligó con el plásmido pJLK03 que había sido digerido con PstI y HpaI. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y las colonias individuales se examinaron para su contenido de plásmidos. El plásmido deseado pJLK04 se identificó por su patrón de restricción.

Construcción del plásmido pJLK05

60 El plásmido pJLK01 (documento PCT/GB97/01819) se digirió con PstI y AvrII y el inserto de 460 pb se ligó con el plásmido pJLK04 que había sido digerido con PstI y AvrII. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y las colonias individuales se examinaron para su contenido de plásmidos. El plásmido deseado pJLK05 se identificó por su patrón de restricción.

ES 2 341 403 T3

Construcción del plásmido pJLK07

El plásmido pJLK05 se digirió con ScaI y XbaI y el plásmido pNTEPH se digirió con NdeI y ScaI y estos dos fragmentos se ligaron con el plásmido pCJR24 que había sido digerido con NdeI y XbaI. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y las colonias individuales se examinaron para su contenido de plásmidos. El plásmido deseado pJLK07 se identificó por su patrón de restricción.

Construcción del plásmido pJLK114

Los dos oligonucleótidos sintéticos Plf y Plb (Figura 7) se disolvieron cada uno en tampón TE. Se mezclaron 10 μ l de cada disolución (0,5 nmol/ μ l) y se calentaron durante 2 minutos a 65°C y luego se enfriaron lentamente hasta temperatura ambiente. El plásmido pJLK07 se digirió con AvrII y HpaI y se ligó con los oligonucleótidos hibridados. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y las colonias individuales se examinaron para su contenido de plásmidos. El plásmido deseado pJLK114 se identificó por su patrón de restricción.

El plásmido pJLK117 es un plásmido basado en pCJR24 que contiene un gen de PKS que comprende el módulo de carga de ery, el primer y segundo módulos de extensión de la PKS ery y la tioesterasa terminadora de cadenas de ery, excepto que el segmento de ADN entre el extremo de la aciltransferasa y el inicio de la ACP del segundo módulo de extensión de ery ha sido sustituido por un ligador de oligonucleótidos sintético que contiene los sitios de reconocimiento de las siguientes enzimas de restricción. AvrII, BglII, SnaBI, PstI, SpeI, NsiI, Bsu36I y NheI.

Se construyó por medio de varios plásmidos intermedios del siguiente modo (Figura 6).

Construcción del plásmido pJLK115

El plásmido pJLK114 se digirió con NdeI y XbaI y el inserto de aproximadamente 9,9 kpb se ligó con el plásmido pUC18 que había sido digerido con NdeI y XbaI. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y las colonias individuales se examinaron para su contenido de plásmidos. El plásmido deseado pJLK115 se identificó por su patrón de restricción.

Construcción del plásmido pJLK116

El plásmido pJLK13 (PCT/GB97/01819) se digirió con Bsu36I y XbaI y el fragmento de 1,1 kpb se ligó con el plásmido pJLK115 que había sido digerido con Bsu36I y XbaI. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y las colonias individuales se examinaron para su contenido de plásmidos. El plásmido deseado pJLK116 se identificó por su patrón de restricción.

Construcción del plásmido pJLK117

El plásmido pJLK116 se digirió con NdeI y XbaI y el fragmento de 9,9 kpb se ligó con el plásmido pCJR24 que había sido digerido con NdeI y XbaI. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y las colonias individuales se examinaron para su contenido de plásmidos. El plásmido deseado pJLK117 se identificó por su patrón de restricción.

45 Ejemplo 11

Construcción del plásmido pJLK29

El plásmido pJLK29 es un plásmido basado en pJLK117, excepto que el fragmento de ADN que codifica el bucle reductor de módulo 10 de la PKS rap ha sido insertado en mcs. Se construyó por medio de varios plásmidos intermedios del siguiente modo. (Figura 5)

Construcción del plásmido pJLK121.1

55 El segmento de ADN de aproximadamente 2,2 kpb del gen de rapB de *S. hygroscopicus* que codifica el bucle reductor de módulo 10 se amplificó por PCR usando como cebadores los oligonucleótidos sintéticos:

5'-TAAGATCTTCCGACGTACGCCGTTCCAGC-3' y

60 5'-ATGCTAGCCACTGCGCCGACGAATCACCGGTGG-3' y como molde un fragmento de aproximadamente 7 kpb que había sido obtenido por digestión del cósmido cos 26 (Schwecke, T. y col. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7839-7843) con ScaI y SphI. El producto de PCR se trató con T4 polinucleótido cinasa y luego se ligó con el plásmido pUC18, que había sido linealizado por digestión con SmaI y luego se trató con fosfatasa alcalina. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y las colonias individuales se examinaron para su contenido de plásmidos. El plásmido deseado pJLK121.1 se identificó por su patrón de restricción y secuenciación de ADN.

ES 2 341 403 T3

Construcción del plásmido pJLK29

El plásmido pJLK121.1 se digirió con BglII y NheI y el fragmento de 2,2 kpb se ligó con el plásmido pJLK117 que había sido digerido con BglII y NheI. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y las colonias individuales se examinaron para su contenido de plásmidos. El plásmido deseado pJLK29 se identificó por su patrón de restricción.

Ejemplo 24

Construcción del plásmido pJLK50

El segmento de ADN de aproximadamente 6,1 kpb de la agrupación de genes de PKS eritromicina de *S. erythraea* que codifica el fragmento de ADN desde el inicio de la ACP de módulo 2 hasta el inicio de la ACP de módulo 3 se amplificó por PCR usando como cebadores los oligonucleótidos sintéticos:

5'-TACCTGAGGGACCGGCTAGCGGGCTGCGCGTG-3' y

5'-ATGCTAGCCGTGTGCCGGCTGCCGGTCGGTCC-3' y el plásmido pBAM25 (publicado como pBK25 por Best, D J y col. Eur J Biochem (1992) 204: 39-49) como molde. El producto de PCR se trató con T4 polímero cinasa y luego se ligó con el plásmido pUC18, que había sido linealizado por digestión con SmaI y luego se trató con fosfatasa alcalina. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y las colonias individuales se examinaron para su contenido de plásmidos. El plásmido deseado pJLK50 se identificó por su patrón de restricción y secuenciación de ADN.

Ejemplo 25

*Construcción de la cepa JLK10 de *S. erythraea**

La cepa JLK10 es una variante de la cepa NRRL2338 en la que el bucle reductor de módulo 2 de ery (es decir, el dominio KR) está sustituido por el bucle reductor del módulo 10 de rapamicina. Se construyó usando el plásmido pJLK54 que se construyó del siguiente modo.

Construcción del plásmido pJLK54

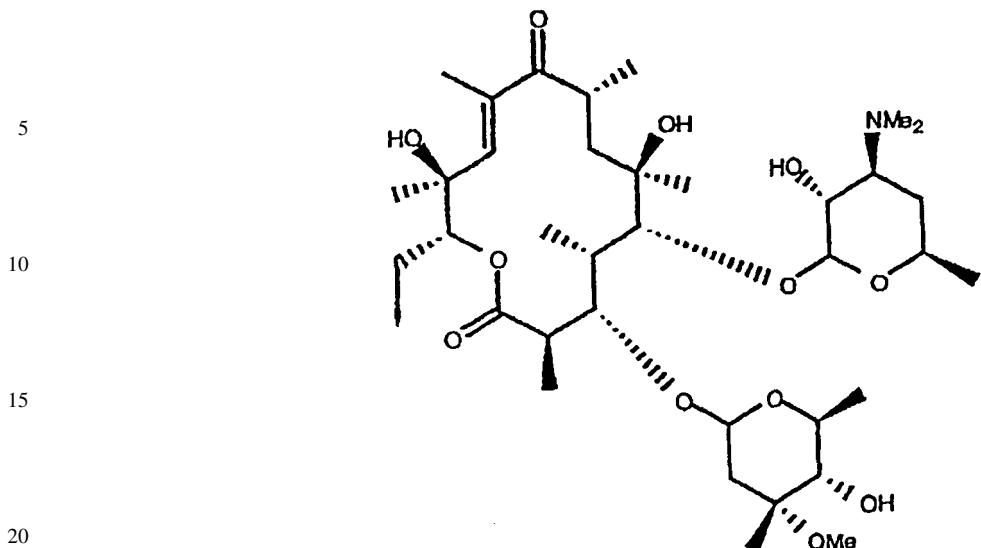
El plásmido pJLK54 es un plásmido basado en pJLK29 que contiene un gen de PKS que comprende el módulo de carga de ery, el primer, el segundo y el tercer módulos de extensión de la agrupación de ery y la tioesterasa terminadora de cadenas de ery, excepto que el segmento de ADN entre el extremo de la aciltransferasa y el inicio de la ACP del segundo módulo de extensión de ery ha sido sustituido por el segmento equivalente de módulo 10 de la PKS rapamicina. Se construyó del siguiente modo.

El plásmido pJLK50 se digirió con NheI y el inserto de 6,1 kpb se ligó con el plásmido pJLK29 que había sido digerido con NheI. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y las colonias individuales se examinaron para su contenido de plásmidos. El plásmido deseado pJLK54 se identificó por su patrón de restricción.

Uso del plásmido pJLK54 para la construcción de NRRL2338/pJLK54 de *S. erythraea* y la producción de derivados de TKL

Se usaron aproximadamente 5 µg de plásmido pJLK54 para transformar protoplastos de NRRL2338 de *S. erythraea* y se aislaron colonias resistentes a tiostreptona estables. A partir de varias colonias se obtiene ADN total y se analiza por hibridación por transferencia de Southern para confirmar que el plásmido se ha integrado en la TE.

Construcción de la cepa JLK10 de *S. erythraea* y su uso en la producción de 13-metil-10,11-deshidro-eritromicina A. La cepa JLK10 de *S. erythraea* es un mutante de NRRL2338 de *S. erythraea* en el que el "bucle reductor" del módulo 2 de ery, es decir, el dominio cetoreductasa, está sustituido por el "bucle reductor" del módulo 10 de rapamicina. Se construyó partiendo de NRRL2338 de *S. erythraea* en la que se había integrado el plásmido pJLK54. NRRL2338/pJLK54 de *S. erythraea* se sometió a varias rondas de crecimiento no selectivo que dieron como resultado un segundo cruzamiento concomitante con la pérdida del plásmido integrado. Los clones en los que se había producido la sustitución del gen de eritromicina que codificaba DEBS1 con la versión mutante se identificaron por hibridación por transferencia de Southern. Uno de éstos se llamó la cepa JLK10 de *S. erythraea* y se usó para inocular medio SM3 (el medio eryP dio resultados similares) y se dejó cultivar durante siete a diez días a 28-30°C. Despues de este tiempo, el caldo se centrifugó y el pH del sobrenadante se ajustó a pH 9. Entonces, el sobrenadante se extrajo tres veces con un volumen igual de acetato de etilo y el disolvente se eliminó mediante evaporación. Los productos se analizaron por HPEM/CL, EM/EM y RMN ¹H. Se identificó el siguiente macrólido C-13-metileritromicina A (acompañado de productos de procesamiento incompleto por enzimas pos-PKS).



Ejemplo 26

25 *Construcción del plásmido pPFL50*

El plásmido pPFL50 es un plásmido basado en pPFL43 del que se ha eliminado un fragmento de ADN que codifica KR1 (en parte), ACP1 y el módulo 2 de la PKS eritromicina y la TE eritromicina. Se construyó del siguiente modo. El plásmido pPFL43 se digirió con SfI y XbaI para eliminar un fragmento de 6,5 kb. Los nucleótidos protuberantes en 5' se llenaron con fragmento de Klenow de ADN polimerasa I y el plásmido se recircularizó. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y las colonias individuales se examinaron para su contenido de plásmidos. El plásmido deseado pPFL50 se identificó por su patrón de restricción.

35 *Construcción de JLR10/pPFL50 de *S. erythraea**

Se usaron aproximadamente 5 µg de plásmido pPFL50 para transformar protoplastos de la cepa JLK10 de *S. erythraea* y se aislaron colonias resistentes a tiostreptona estables. A partir de varias colonias se obtuvo ADN total y se analizó por hibridación por transferencia de Southern para confirmar que el plásmido se había integrado en la región homóloga del ADN cromosómico. La cepa JLK10/pPFL50 de *S. erythraea* se usó para inocular medio SM3 que contenía 5 µg/ml de tiostreptona (el medio eryP que contenía 5 µg/ml de tiostreptona dio resultados similares) y se dejó cultivar durante siete a diez días a 28-30°C. Después de este tiempo, el caldo se centrifugó y el pH del sobrenadante se ajustó a pH 9. Entonces, el sobrenadante se extrajo tres veces con un volumen igual de acetato de etilo y el disolvente se eliminó mediante evaporación. Los productos se analizaron por HPEM/CL, EM/EM y RMN ¹H. Se identificó el macrólido C-13-metil-10,11-deshidro-eritromicina A (acompañado de productos de procesamiento incompleto por enzimas pos-PKS)

50 *Construcción de NRRL2338/pPFL50 de *S. erythraea**

Se usaron aproximadamente 5 µg de plásmido pPFL50 para transformar protoplastos de NRRL2338 de *S. erythraea* y se aislaron colonias resistentes a tiostreptona estables. A partir de varias colonias se obtuvo ADN total y se analizó por hibridación por transferencia de Southern para confirmar que el plásmido se había integrado en la región homóloga del ADN cromosómico. Se usó NRRL2338/pPFL50 de *S. erythraea* para inocular medio SM3 que contenía 5 µg/ml de tiostreptona (el medio eryP que contiene 5 µg/ml de tiostreptona da resultados similares) y se dejó cultivar durante siete a diez días a 28-30°C. Después de este tiempo, el caldo se centrifugó y el pH del sobrenadante se ajustó a pH 9,5. Entonces, el sobrenadante se extrajo tres veces con un volumen igual de acetato de etilo y el disolvente se eliminó mediante evaporación. Los productos se analizaron por HPEM/CL, EM/EM y RMN ¹H. Se identificó el macrólido C-13-metileritromicina A (acompañado de productos de procesamiento incompleto por enzimas pos-PKS).

Construcción del plásmido pCB121

65 El plásmido pCB121 es un plásmido que contiene el módulo de carga de monensina y KS del módulo 1 de monensina seguido de la AT de módulo 1 de eritromicina y parte de la KR de módulo 1 de eritromicina. Se construyó por medio de varios plásmidos intermedios del siguiente modo.

ES 2 341 403 T3

Construcción del plásmido *pPFL45*

El segmento de ADN de aproximadamente 1,8 kpb del agrupamiento de genes de PKS monensina de *Streptomyces cinnamonensis* que codifica parte de la ACP del módulo de carga y KS de módulo 1 se amplificó por PCR usando como cebadores los oligonucleótidos sintéticos:

5'-CGTCCCTGAGGTCGCTGGCCCAGGCGTA-3'

5'-CGAAGCTTGACACCGCGCGCGCGCGGG-5'

y un cósmido que contiene el extremo 5' de los genes de PKS monensina de *S. cinnamonensis* o alternativamente ADN cromosómico de *S. cinnamonensis* como molde. El producto de PCR se trató con T4 polinucleótido cinasa y luego se ligó con el plásmido pUC18, que había sido linealizado por digestión con SmaI y luego se trató con fosfatasa alcalina. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y las colonias individuales se examinaron para su contenido de plásmidos. El plásmido deseado pPFL45 se identificó por su patrón de restricción.

Construcción del plásmido *pPFL47*

El plásmido pPFL45 se digirió con NdeI y Bsu36I y el fragmento de aproximadamente 2,6 kpb se ligó en el plásmido pPFL43 que había sido digerido con NdeI y Bsu36I. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y las colonias individuales se examinaron para su contenido de plásmidos. El plásmido deseado pPFL47 se identificó por su patrón de restricción.

25 Construcción del plásmido *pCB135*

El plásmido pCJR24 se digirió con HindIII, los nucleótidos protuberantes en 5' se llenaron con fragmento de Klenow de ADN polimerasa I y se religaron. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y las colonias individuales se examinaron para su contenido de plásmidos. El plásmido deseado pCB135 se identificó por su patrón de restricción, faltando el sitio de reconocimiento para HindIII.

Construcción del plásmido *pRSWI*

El plásmido pKS1W es un vector derivado de pNTEP2 (documento GB97/01810) que contiene una tricétido sintasa derivada de DEBSITE con los únicos sitios de restricción introducidos en los límites de KS1. El plásmido pKS1W se obtiene por medio de varios plásmidos intermedios del siguiente modo.

Construcción de los plásmidos *pMO09*, *pMO10* y *pMO13*

Para la amplificación por PCR para el plásmido pMO09 se usaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos como cebadores mutagénicos conteniendo uno un sitio MunI y el otro un sitio PstI:

5'-GCGCGCCAATTGCGTGCACATCTCGAT-3' y

5'-CCTGCAGGCCATCGCGACGACCGCGACCGGTTCGCCG-3'

Para la amplificación por PCR para el plásmido pMO10 se usaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos como cebadores mutagénicos conteniendo uno un sitio HindIII y el otro un sitio EcoRV:

5'-GTCTCAAGCTTCGGCATCAGCGCACCAA-3' y

5'-CGTGCATATCCCTGCTCGCGAGCGCA-3'

Para la amplificación por PCR para el plásmido pMO13 se usaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos como cebadores mutagénicos conteniendo uno un sitio PstI y el otro un sitio HindIII:

5'-GATGGCCTGCAGGCTGCCGGCGGTGTGAGCA-3' y

5'-GCCGAAGCTTGAGACCCCCGCCGGCGCGGTGCG-3'

La PCR se llevó a cabo en pNTEP2 (documento GB97/01810) como molde usando Pwo ADN polimerasa y un ciclo de: 96°C (1 min); hibridación a 50°C (3 min); y extensión a 72°C (1 min), y 25 ciclos de: 96°C (1 min); hibridación a 50°C (1 min); y extensión a 72°C (1 min) en presencia de 10% (vol/vol) de dimetilsulfóxido. Los productos se separaron en los extremos y se clonaron en pUC18 digerido con SmaI y la mezcla de ligación se transformó en DH10B de *E. coli*. El ADN de plásmido se preparó a partir de colonias individuales. Los plásmidos deseados para pMO09 (3,8 kpb), pMO10 (3,9 kpb) y pMO13 (4,3 kpb) se identificaron por su patrón de restricción y secuenciación de ADN.

ES 2 341 403 T3

Construcción del plásmido pMO11

El plásmido pMO13 se digirió con HindIII y el inserto de 1,2 kpb se clonó en pMO10 que había sido digerido con HindIII. La mezcla de ligación se transformó en DH10B de *E. coli*. El plásmido deseado (5,0 kpb) se identificó por su patrón de restricción y se designó pMO11.

Construcción del plásmido pMO12

El plásmido pMO09 se digirió con PstI y el inserto de 1,6 kpb se clonó en pMO11 que había sido digerido con PstI. La mezcla de ligación se transformó en DH10B de *E. coli*. El plásmido deseado (6,6 kpb) se identificó por su patrón de restricción y se designó pMO12.

Construcción de pKS1W

El plásmido pMO12 se digirió con MunI y EcoRV y el fragmento de 3,9 kpb se clonó en pNTEPH (véase más adelante) que había sido digerido con MunI y EcoRV. La mezcla de ligación se transformó en DH10B de *E. coli*. El plásmido deseado (13, kpb) se identificó por su patrón de restricción y se designó pKS1W.

Construcción de pNTEPH

El plásmido pNTEPH se obtuvo a partir de pNTEP2 eliminando el sitio HindIII. pNTEP2 se digirió con HindIII, los nucleótidos protuberantes en 5' se llenaron con fragmento de Klenow de ADN polimerasa I y se religaron. El plásmido deseado (13,6 kpb) se identificó por su patrón de restricción.

Construcción del plásmido pCB136

El plásmido pKSW1 se digirió con NdeI y XbaI y el fragmento de aproximadamente 11,2 kpb se ligó con el plásmido pCB135 que había sido digerido con NdeI y XbaI. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y las colonias individuales se examinaron para su contenido de plásmidos. El plásmido deseado pCB136 se identificó por su patrón de restricción.

Construcción del plásmido pCB137

El plásmido pCB136 se digirió con SfuI y XbaI para eliminar un fragmento de 6,5 kb, los nucleótidos protuberantes en 5' se llenaron con fragmento de Klenow de ADN polimerasa I y se religaron. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y las colonias individuales se examinaron para su contenido de plásmidos. El plásmido deseado pCB137 se identificó por su patrón de restricción.

Construcción del plásmido pCB121

El plásmido pPFL47 se digirió con NdeI y HindIII y el inserto de aproximadamente 4,4 kpb se ligó con el plásmido pCB137 que había sido digerido con NdeI y HindIII. La mezcla de ligación se usó para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes y las colonias individuales se examinaron para su contenido de plásmidos. El plásmido deseado pCB121 se identificó por su patrón de restricción.

Ejemplo

*Construcción de JLK10/pCB121 de *S. erythraea**

Se usaron aproximadamente 5 μ g de plásmido pCB121 para transformar protoplastos de JLK10 de *S. erythraea* y se aislaron colonias resistentes a tiostreptona estables. A partir de varias colonias se obtuvo ADN total y se analizó por hibridación por transferencia de Southern para confirmar que el plásmido se había integrado en la región homóloga del ADN cromosómico. La cepa JLK10/pCB121 de *S. erythraea* se usó para inocular medio SM3 que contenía 5 μ g/ml de tiostreptona (el medio eryP que contenía 5 μ g/ml de tiostreptona dio resultados similares) y se dejó cultivar durante siete a diez días a 28-30°C. Después de este tiempo, el caldo se centrifugó y el pH del sobrenadante se ajustó a pH 9. Entonces, el sobrenadante se extrajo tres veces con un volumen igual de acetato de etilo y el disolvente se eliminó mediante evaporación. Los productos se analizaron por HPEM/CL, EM/EM y RMN 1 H. Se identificó el macrólido C13-metil-10,11-deshidro-eritromicina A (acompañado de productos de procesamiento incompleto por enzimas pos-PKS):

Ejemplo

*Construcción de NRRL2338/pCB121 de *S. erythraea**

Se usaron aproximadamente 5 μ g de plásmido pCB121 para transformar protoplastos de NRRL2338 de *S. erythraea* y se aislaron colonias resistentes a tiostreptona estables. A partir de varias colonias se obtuvo ADN total y se analizó por hibridación por transferencia de Southern para confirmar que el plásmido se había integrado en la región homóloga del ADN cromosómico. Se usó NRRL2338/pPFL50 de *S. erythraea* para inocular medio SM3 que contenía

ES 2 341 403 T3

5 µg/ml de tiostreptona (el medio eryP que contenía 5 µg/ml de tiostreptona dio resultados similares) y se dejó cultivar durante siete a diez días a 28-30°C. Después de este tiempo, el caldo se centrifugó y el pH del sobrenadante se ajustó a pH=9. Entonces, el sobrenadante se extrajo tres veces con un volumen igual de acetato de etilo y el disolvente se eliminó mediante evaporación. Los productos se analizaron por HPEM/CL, EM/EM y RMN ¹H. Se identificó el 5 macrólido C13-eritromicina A (acompañado de productos de procesamiento incompleto por enzimas pos-PKS):

Aunque la presente invención se ilustra por los ejemplos enumerados anteriormente, no deben considerarse como limitantes del alcance de la invención. Las descripciones anteriores ilustran por primera vez la construcción de un ensamblaje de genes de PKS de tipo I que contiene un módulo de carga que contiene KSq completa o parcialmente heterólogo y su uso para obtener productos de policétido de utilidad como productos intermedios sintéticos o como materiales bioactivos tales como antibióticos. Al experto en la materia se le ocurrirá fácilmente que un módulo de carga que contiene KSq completa o parcialmente heterólogo de otros conjuntos de genes de PKS podría usarse para sustituir el módulo de carga de DEBS, o de hecho en un conjunto de genes de PKS bastante diferente. También se le ocurrirá fácilmente al experto en la materia que la especificidad adicional proporcionada por la discriminación más eficaz hecha entre metilmalonil-CoA y malonil-CoA por una ATq, seguido de la descarboxilación específica por una KSq, es preferible a la discriminación imperfecta entre propionil-CoA y acetil-CoA que es una característica del módulo de carga de DEBS y de muchos otros módulos de carga de PKS ya que maximiza la producción de un único producto en vez de una mezcla que se diferencia entre sí en la naturaleza de la unidad de iniciador. El evitar tales mezclas aumenta los rendimientos y evita la necesidad de procedimientos de separación tediosos y difíciles.

20

Referencias citadas en la descripción

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

Documentos de patente citados en la descripción

30

- WO 9313663 A [0006] [0013]
- WO 9508548 A [0008] [0009]
- EP 0524832 A2 [0010]
- GB 9701819 W [0013] [0017] [0040] [0054] [0068] [0074]
- WO 9801546 A [0013] [0027] [0033] [0034] [0065]
- 40 • WO 9801571 A [0013] [0027]
- GB 9701810 W [0013] [0041]
- EP 0791655 A2 [0014]
- 45 • WO 9116334 A [0018]
- US 5141926 A, Weber & McAlpine [0034]
- 50 • JP IB9802100 W [0034]
- JP IB9802099 W [0034]
- WO 9935157 A [0034]
- 55 • WO 9935156 A [0034]
- GB 9701810 A [0093] [0097]

60

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

65

- Cortés, J. et al. *Nature*, 1990, vol. 348, 176-178 [0003]
- Donadio, S. et al. *Science*, 1991, vol. 2523, 675-679 [0003] [0051]
- Swan, D.G. et al. *Mol. Gen. Genet.*, 1994, vol. 242, 358-362 [0003]

ES 2 341 403 T3

- **MacNeil**, D. J. *et al. Gene*, 1992, vol. 115, 119-125 [0003]
- **Schwecke**, T. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 7839-7843 [0003] [0006] [0013] [0077]
- 5 • **Cortés** *et al. Science*, 1995, vol. 268, 1487-1489 [0004]
- **Kao**, C.M. *et al. J. Am. Chem. Soc.*, 1995, vol. 117, 9105-9106 [0004]
- 10 • **Donadio**, S. *et al. Science*, 1991, vol. 252, 675-679 [0005]
- **Donadio**, S. *et al. Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 7119-7123 [0005]
- 15 • **Hutchinson**, C. R.; **Fujii**, I. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1995, vol. 49, 201-238 [0006] [0007]
- **Bibb**, M. J. *et al. EMBO J.*, 1989, vol. 8, 2727-2736 [0007]
- **Sherman**, D. H. *et al. EMBO J.*, 1989, vol. 8, 2717-2725 [0007]
- 20 • **Fernandez-Moreno**, M.A. *et al. J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 19278-19290 [0007] [0009]
- **Bartel**, P. L. *et al. J. Bacteriol.*, 1990, vol. 172, 4816-4826 [0007]
- 25 • **Chater**, K. F.; **Davis**, N. K. *Mol. Microbiol.*, 1990, vol. 4, 1679-1691 [0008]
- **Shen**, B. *et al. J. Am. Chem. Soc.*, 1995, vol. 117, 6811-6821 [0008]
- **Meurer**, G. *et al. Chemistry and Biology*, 1997, vol. 4, 433-443 [0008]
- 30 • **Revill**, W. P. *et al. J. Bacteriol.*, 1995, vol. 177, 3946-3952 [0008]
- **Bibb**, M. J.; **Hopwood**, D. A. *J. Gen. Microbiol.*, 1981, vol. 126, 427 [0009]
- **Hallam**, S. E. *et al. Gene*, 1988, vol. 74, 305-320 [0009]
- 35 • **Narva**, K. E.; **Feitelson**, J. S. *J. Bacteriol.*, 1990, vol. 172, 326-333 [0010]
- **Stutzman-Engwall**, K. J. *et al. J. Bacteriol.*, 1992, vol. 174, 144-154 [0010]
- 40 • **Fernandez-Moreno**, M.A. *et al. Cell*, 1991, vol. 66, 769-780 [0010]
- **Takano**, E. *et al. Mol. Microbiol.*, 1992, vol. 6, 2797-2804 [0010]
- **Takano**, E. *et al. Mol. Microbiol.*, 1992, vol. 7, 837-845 [0010]
- 45 • **Marsden**, A. F. A. *et al. Science*, 1998, vol. 279, 199-202 [0013]
- **Kavakas**, S. J. *et al. J. Bacteriol.*, 1998, vol. 179, 7515-7522 [0014]
- **Kuhstoss** *et al. Gene*, 1996, vol. 183, 231-236 [0015]
- 50 • **Pereda**, A. *et al. Microbiology*, 1995, vol. 144, 543-553 [0016] [0017]
- **Kao**, C. M. *et al. J. Am. Chem. Soc.*, 1995, vol. 117, 9105-9106 [0016]
- **Brown**, M. J. B. *et al. J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1995, 1517-1518 [0016]
- 55 • **Cortés**, J. *et al. Science*, 1991, vol. 2523, 675-679 [0016]
- **Pieper**, R. *et al. Biochemistry*, 1997, vol. 36, 1846-1851 [0016]
- 60 • **Weissmann**, K. *et al. Biochemistry*, 1998, vol. 37, 11012-11017 [0016]
- **Cortés**, J. *et al. Science*, 1995, vol. 268, 1487-1489 [0017]
- 65 • **Kao**, C. M. *et al. J. Am. Chem. Soc.*, 1994, vol. 116, 11612-11613 [0017]
- **Brown**, M. J. B. *et al. J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1995, 1517-1519 [0017]

ES 2 341 403 T3

• **Wiessmann**, K. E. H. *et al.* *Chemistry and Biology*, 1995, vol. 2, 583-589 [0017]

5 • **Pieper**, R. *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, vol. 117, 11373-11374 [0017]

• **Kao**, C. M. *et al.* *Science*, 1994, vol. 265, 509-512 [0017]

10 • **Liu** *et al.* *JACS*, 1997, 10559-10554 [0018]

• **Haydock**, S. F. *et al.* *FEBS Letters*, 1995, vol. 374, 246-248 [0020]

15 • **Kibwage** *et al.* *J. Antibiotics*, 1987, vol. 40, 1-6 [0034]

• **Oliynyk**, M. *et al.* *Chemistry and Biology*, 1996, vol. 3, 833-839 [0065]

20 • **Best**, D J *et al.* *Eur J Biochem*, 1992, vol. 204, 39-49 [0079]

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

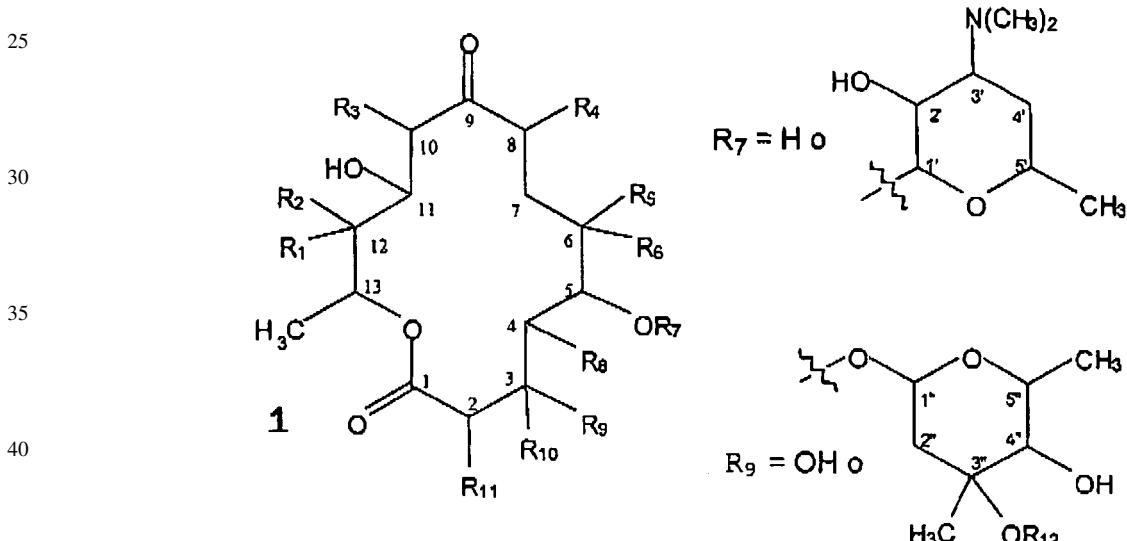
REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para producir un macrólido de 14 miembros que tiene un grupo 13-metilo, comprendiendo dicho procedimiento cultivar un organismo transformante que contiene ADN que codifica y está dispuesto para expresar una multienzima PKS (policétido sintasa) que produce un macrólido de 14 miembros, comprendiendo dicha multienzima PKS un módulo de carga y una pluralidad de módulos de extensión; en el que dicho módulo de carga está adaptado para cargar un residuo de malonilo y para efectuar luego la descarboxilación del residuo cargado para proporcionar una unidad de iniciador de acetato que se transfiere a una adyacente de dichos módulos de extensión; en el que dicho módulo de carga es de la forma KSq-ATq-ACP en la que:

- 10 (a) KSq representa un dominio de tipo cetosintasa que se diferencia de un dominio KS de un módulo de extensión por tener un residuo de glutamina en lugar de una cisteína en el sitio activo;
- 15 (b) ATq representa un dominio aciltransferasa que carga un malonilo y tiene un residuo de arginina en el sitio activo; y
- (c) ACP representa una proteína portadora de acilos; y en el que los módulos de extensión no están naturalmente asociados a un módulo de carga que efectúa la descarboxilación de un residuo de malonilo.

20

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el compuesto producido es un compuesto de fórmula 1:



45

en la que:

50 R₁ es H o OH; R₂-R₄ son cada uno independientemente H, CH₃ o CH₂CH₃; R₅ es H o OH; y R₆ es H, CH₃ o CH₂CH₃; R₇ es H o desosamina; R₈ es H, CH₃ o CH₂CH₃; R₉ es OH, micarosa (R₁₂ es H) o cladinososa (R₁₂ es CH₃); R₁₀ es H; o R₉ = R₁₀ = O; y R₁₁ es H, CH₃ o CH₂CH₃, con la condición de que cuando R₂-R₄ sea CH₃, R₆ sea CH₃, R₈ sea CH₃ y R₁₁ sea CH₃, entonces R₁ y R₅ no son H y R₁₂ no es H; o también cuando R₂-R₄ sea CH₃, R₆ sea CH₃, R₈ sea CH₃ y R₁₁ sea CH₃, entonces R₁ y R₅ no son OH y R₁₂ no es H.

55

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el compuesto producido es 15-noreritromicina A.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el compuesto producido es 15-noreritromicina B.

60

5. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el dominio KSq se deriva por mutagénesis de un dominio KS de un módulo de extensión.

6. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el dominio ATq es un dominio AT de módulo de extensión natural de una PKS de tipo I.

65

7. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho módulo de carga se corresponde con el módulo de carga de la multienzima PKS de oleandomicina, espiramicina, nidamicina, metimicina o monensina.

ES 2 341 403 T3

8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la pluralidad de módulos de extensión se corresponde con los módulos de extensión de una PKS seleccionada de eritromicina, nARBomicina, picromicina, lancamicina, kujimicina o megalomicina.
- 5 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la pluralidad de módulos de extensión se corresponde con los módulos de extensión de la PKS eritromicina.
- 10 10. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el organismo transformante se selecciona de: *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces griseofuscus*, *Streptomyces cinnamonensis*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces hygroscopicus*, *Micro-monospora griseorubida*, *Streptomyces lasaliensis*, *Streptomyces venezuelae*, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces albus*, *Amycolatopsis mediterranei* y *Streptomyces tsukubaensis*.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

La PKS eritromicina

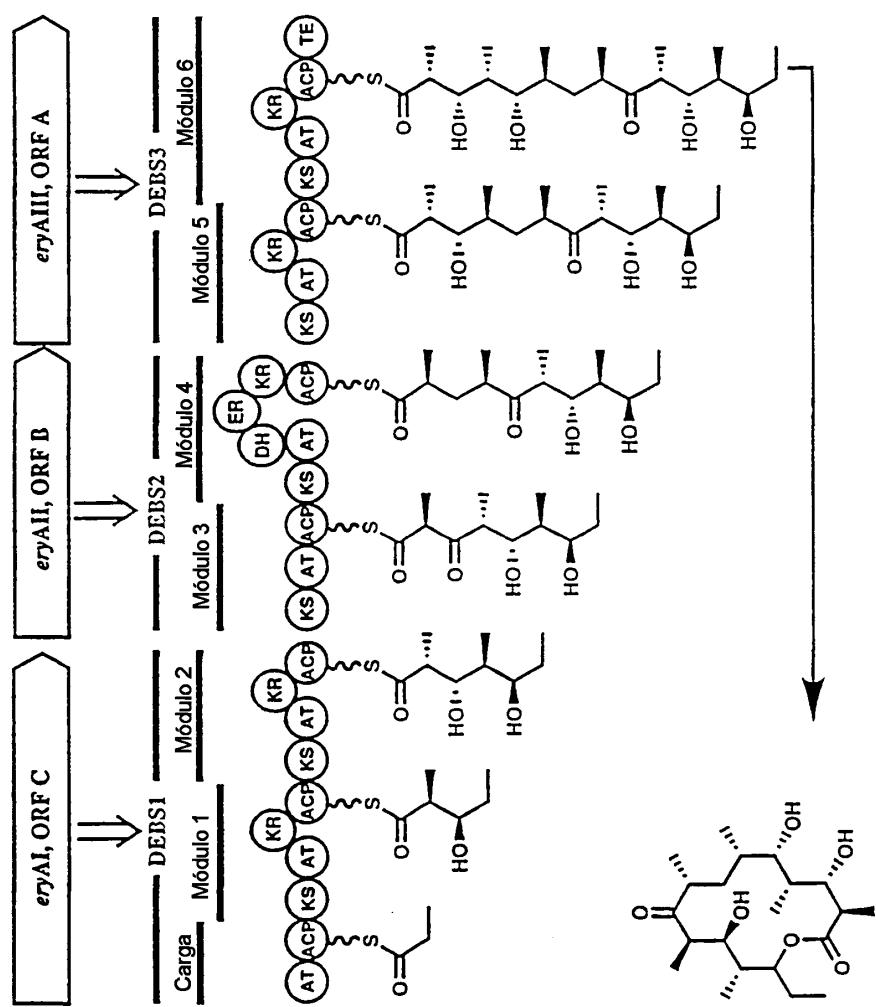


Fig. 1

ES 2 341 403 T3

KCLFDAU	MVTGLGIVAPNGLGVGAIWDAVLNGRNGIGPLR
KCLFPEU	MTGTAARTASQLIASPAGRRGLRGRAVTTGLGIVAPNGLGVGAYWDAVLNGRNGIGPLR
KCLFACT	-----MSVLITGVGVVAPNGLGLAPYWSAVLDGRHGLGPVT
KCLFHIR	-----MSTWVTGMGVVAPNGLGADDHWAAATLKGRHGISRLS
KCLFGRA	-----MSTPDERRRAWTGLSVAAPGGLGTERYWKSLLTGENGIAELS
KCLFNOG	-----MTAAVVVTGLGVAPTGLGVREHWSSTVRGASAIGPVT
KCLFTCM	-----MSAPAPVVVTGLGIVAPNNGTGTTEYWAATLAGKSGIDVIQ
KCLFCIN	-----MTP-VAVTGMGLAAPNGLGRPTTGRPPWAAPRASAAST
KCLFVNZ	-----MSASVVVTGLGVAAPNGLGREDFWASTLGGKSGIGPLT
KCLFWHIE	-----MSGPQRTGTGGGSRAAVTGLGVLSPHGTGVREAHKAVALDGTSLLGPVT
KSGRA	-----MTRRRVITGVGVRAPGGSGTKEFWDLLTAGRTATRPIS
KSHIR	-----MTRRRVITGVGVRAPGGGLGAKNFWELLTSGRATARRIS
KSACT	-----MKRVRVITGVGVRAPGGNGTRQFWELLTSGRATARRIS
KSCIN	-----MTQRRVAITGIEVLAPEGGLGRKEFWQOLLSEGRTATRGIT
KSVNZ	-----MTARRVITGIEVLAPEGGTGSKAFWNLLSEGRTATRGIT
KSONG	-----MKESINRRVITGIGIVAPDAGVKPFWDLLTAGRTATRTIT
KSTCM	-----MTRHAEKRVVITGIGIVGVRAPGGAGTAASFWDLLTAGRTATRTIS
KSDAU	-----MNRRVITGMGVVAPGAIGIKSFWELLLSGTTATRAIS
KSPEU	-----MNRRVITGIGGVVAPGAVGTVKPFWELLLSGTTATRAIS
KSWHI	-----MTRRRVAVTIGIGVVAPGGIQTQFWRLLSEGRTATARRIS
	: * : : * :
KCLFDAU	RFADDGRLGRLAGEVSDFVP-EDHLPKRLLVQTDPMTQMTALAAAEWALREAGCAPSS--
KCLFPEU	RFTGDGRLGRLAGEVSDFVP-EDHLPKRLLAQTDPMTOY-ALAAAEWALRESCCSPSS--
KCLFACT	RFDVSRYPATLAGQIDDFA-PDHIPGRLLPQTDPSTRL-ALTAADWALQDAKADPES-L
KCLFHIR	RFDPTGYPAELAGQVLDFDA-TEHLPKRLLPQTDPVSTRF-ALAAAADWALADAEVDPAE-L
KCLFGRA	RFDASRYPSRLAGQIDDFA-SHLPSSRLLPQTDPVSTRY-ALAAAADWALADAGVGCPESGL
KCLFNOG	RFDAGRYPSTKLAGEVPGFVP-EDHLPSSRLMPQTDMTRL-ALVAADWAFQDAAVDPSK-L
KCLFTCM	RFDPHGYPVVRVCGEVLAFFDA-AAHLPGRLLPQTDRMTH-ALVAAEWALADAGLEPEK-Q
KCLFCIN	RFDPSGYPAQLAGEIPGFRA-AEHLPGRLVPQTDRVTRL-SLAAADWALADAGVEVAA-F
KCLFVNZ	RFDPTGYPARLAGEVPGFAA-EEHLPSRLLPQTDRMTRL-ALVAADWALADAGVRPEE-Q
KCLFWHIE	REGCAHILPLRVAGEVHGFDA-AETVEDRFLVQTDRFTHF-ALSATQHALADARFGRADVD
KSGRA	FFDASPRSRILAGEI-DFDAVAEGFSPREVRMDRATQF-AVACTRDALADSGLDTGAL
KSHIR	FFDPTPNRSQIAAEC-DFDPHEGLSPREIRRMDRAAQF-AVVCTRDAVADSGLEFEQ-V
KSACT	FFDPSPYRSQVAAEA-DFDPVVAEGFGPRELDRMDRASQF-AVACAREAFAASGLDPDT-L
KSCIN	FFDPAPFRSKVAAEA-DFCGLENLSPQEVRMDRAAQF-AVVTAR-AVEDSGAELAA-H
KSVNZ	FFDPTPFRSRVAAEI-DFDPEAHGLSPQEIRRMDRAAQF-AVVAAR-AVADSGIDLAA-H
KSONG	AFDPSPRSRILAGEI-DFDPLAEGLTPQQIRRMDRATQF-AVVSARESLEDSGLDLGAL
KSTCM	LFDAAPIYRSRILAGEI-DFDPIGEGLSPRQASTYDRATQL-AVVCAREALKDSDLDPAA-V
KSDAU	TFDATPFRSRILAAEC-DFDPVAAGLSAEQARRLDRAGQF-ALVAGQEALTDGRLIGE-D
KSPEU	TFDATPFRSRILAAEC-DFDPVAAGLSAEQARRLDRAGQF-ALVAGQEALADSGLRIDE-D
KSWHI	LFDPGSLRSQIAAEC-DFEPSPDHGLGLATAQRCDRYVQF-ALVAASEAVRDANLDMNR-E
	: . : : : . : :

Fig 2A

ES 2 341 403 T3

Fig 2B

ES 2 341 403 T3

KSGRA	TTPRNDDPAHASRPFDGTRNGFVLAEQ-AAMFVLEEEYEAQRRG-AHIYAEVGGYATRSQ
KSHIR	TTPRNDDPEHASRPFDNSRNGFVLAEQ-AALFVLEELEHARARG-AHVYAEISGCATRLN
KSACT	TTARNDDPEHASRPFDGTRDGFVLAEQ-AAMFVLEDYDSALARG-ARIHAEISGYATRCN
KSCIN	TTPRHDAPATASRPFDSTRNGFVLGEQ-AAFFVLEELHSARRRG-AHIYAELAGYATRSN
KSVNZ	TINRYDDPAHASRPFDGTRNGFVLGEQ-AAVFVLEELESARARG-AHIYAELAGYATRSN
KSONG	TTPRNDTPAEASRPFDRTRNGFVLGEQ-AAVFVLEEFIHARRRG-ALVYAEIAGFATRCN
KSTCM	TSANNDDDPAHASRPFDRNRDGFVLGEQ-SAVFVLEELSARRG-AHAYAEVRGFATRSN
KSDAU	TSDHNDTTPETLA-PFSRSRNGFVLGEQ-GAIVVLEEEAAVRRG-ARIYAEIGGYASRGN
KSPEU	TSPNNDDPAHASRPFADRNFGVMGEQ-AAVLVLEEDLEHARARG-ARIYAEIGGYASRGN
KSWHI	TSPNNDDPAHASRPFADRNFGVMGEQ-AAVLVLEEDLEHARARG-ADYCEVSGYATFGN
* * * *	
KCLFDAU	-PPPGSGRP---SALARAVETALADAGLDRSDIAVVFADGAA-VGELDVAEAEALASVFG
KCLFPEU	-PPPGSGRP---SALARAVETALADAGLDGSIDIAVVFADGAA-VPELDAEAEALASVFG
KCLFACT	-PAPGSGRP---AGLERAIRALALADGTGPEDDVVFADGAG-VPELDAEAEARAIGRVFG
KCLFHIR	-PAPGSGRP---PALRAIELALADAELRPPEQVDVVFADGAG-VAELDAIEAAAIRELFG
KCLFGRA	-PAPGSGRP---PALGRAEELALAEAGLTPADI SVVFADGAG-VPELDRAEADTLARLFG
KCLFNOG	-PPPGSGRP---PNLLRAAAQALDDAEVGPEAVDVVFADASG-TPDDEAAEADAVRRLFG
KCLFTCM	-ARPCTGRP---TGPARAIRLALEEAVAPEDDVVFADASG-VPALDRAEAEALAEVFG
KCLFCIN	-PAPHSGRG---STRAHAIRTALEDDAGTAPGDIRRVFADGGGRYPN-DRAEAEAISEVFG
KCLFVNZ	-PRPGSGRE---PGLRKAIELALADAGAAPGIDVVVFADAAA-VPELDRVEAEALNAVFG
KCLFWHIE	GAGRWAESR---EGLARAIQGALAEAGCRPEEVDFVVFADALG-VPEADRAEALALADLG
KSGRA	-AYHMTGLKKDGREMAESIRALAIDEARLDRTAVIDYVNAHSG-TRQNDRHETAAFKRSLG
KSHIR	-AYHMTGLKTDGREMAEAIVALIDLARIDPTIDYVNAHSG-TRQNDRHETAAFKRSLG
KSACT	-AYHMTGLKADGREMAETIRVALDESRTDATIDYVNAHSG-TRQNDRHETAAYKRALG
KSCIN	-AYHMTGLR-DGAEMAEAIRLAIDEARLNPEOVDYVNAHSG-TRQNDRHETAFFKALG
KSVNZ	-AYHMTGLRPDGAEEMAIAIRVALDEARMNPTIEDYVNAHSG-TRQNDRHETAFFKSLG
KSONG	-AFHMTGLRPDGREMAEAIGVALAQAGKAPADVDYVNAHSG-TRQNDRHETAAFKRSLG
KSTCM	-AFHMTGLKPDGREMAEAITAALDQARRTGDDLHYVNAHSG-TRQNDRHETAAFKRSLG
KSDAU	-AYHMTGLRADGAEMAAAITAALDEARRDPDVDFVNAHGT-TRQNDRHETSAFKRSLG
KSPEU	-AYHMTGLRADGAEMAAAITAALDEARRDPDVDFVNAHGT-TRQNDRHETSAFKRSLG
KSWHI	-AYHMTGLTKEGLEMARAIIDALDMAELDGSIAIDYVNAHSG-TQQNDRHETAAVKRSLG
. : * * : : : * * : : : * :	

Fig 2C

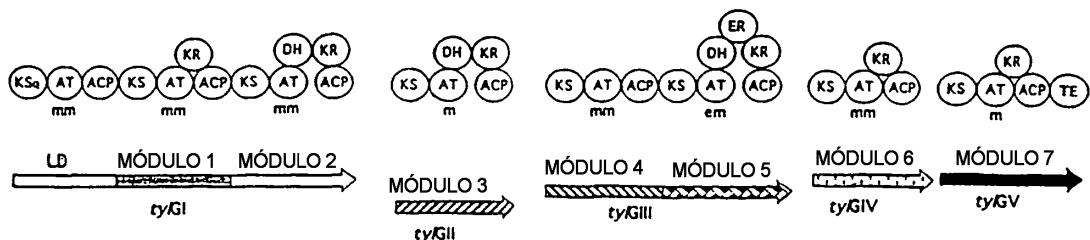
ES 2 341 403 T3

KCLFDAU	P--HRVPVTVPKLTGRLYSGAGPLDVATGLLALRDEVVPAKGHVH-PDPDLPLDWTG
KCLFPEU	P--RRVPVTVPKLTGRLYSGAGPLDVATALLALRDEVVPAHVD-PDPDLPLDWTG
KCLFACT	R--EGVPVTVPKTTGRLYSGGGPLDVVTALMSLREGVIAPTAGVTSVPREYGIDLVLGE
KCLFHIR	P--SGPVTAPKMTGRLYSGGGPLDLVAALLAIRDGVIPTVHTAEPVPEHQDLVTGD
KCLFGRA	P--RGPVTAPKALTGRLCAGGGPADLAAALLRDOVIPATGRHRAVPDAYALDLVTG
KCLFNOG	P--YGVPTA朴KMTGRLSAGGAALDVATALLREGVVPPTVNSRPRPEYELDLVLA-
KCLFTCM	P--GAVPVTA朴KMTGRLYAGGAALDVATALLSIRDCCVPPVTGAPAPGLGIDLVLHQ
KCLFCIN	P--GRVPVTCPTMTGRLHSGAAPLDVACALLAMRAGVIPPTVHID-PCPEYDLDLVLYQ
KCLFVNZ	T--GAVPVTA朴KMTGRLYSGAAPLDLAAFLAMDEGVIPPTVNE-PDAAYGLDLVVG
KCLFWHIE	PHAARPVTA朴KGTGRAYCAAPVLDVATAVLAMEHGLIPTPHVL-DVCHDLDLV
KSGRA	EHAYAVPVSSIKSMGVGHSLGAIGSIEIAASVLAIEHNVPPPTANLHTPDPEC
KSHIR	EHAYRTPVSSIKSMGVGHSLGAIGSIEVAACALAIHGVVPPPTANLHEPDPEC
KSACT	EHARRTPVSSIKSMGVGHSLGAIGSLEIAACVLAIEHGVVPPPTANLRTSDPEC
KSCIN	EHAYRTPVSSIKSMGVGHSLGAIGSIEIAASALAMEYDVPPPTANLHTPDPEC
KSVNZ	DHAYRTPVSSIKSMGVGHSLGAIGSIEIAASALAMEHNVPPGTGNLHTPDPEC
KSNOG	DHAYRVPVSSIKSMIGHSLGAIGSLEIAASVLAITHDVPPPTANLHEPDPEC
KSTCM	QRADVPVSSIKSMIGHSLGAIGSLEIAACALAIHGVIPTPANYEEDPEC
KSDAU	DHAYRVPISSVKSIMGHSLGAAGSLEVAATALAVEYGAIPPTANLHDPDPEL
KSPEU	EHAYRTPVSSIKSMIGHSLGAVGSLEVAATALAVEYGVIPPTANLHDPDPEL
KSWHI	EHAYATPMSSIKSMGVGHSLGAIGSIELAACVLAAMAHQVPPTANYTTPDPEC
	* * : * : * . : * : * : * : * : * : * :
KCLFDAU	PRAMADARAALVVARGHGGFNSALVVRGAA-----
KCLFPEU	PRSLADARAALLVARGYGGFNSALVVRGAA-----
KCLFACT	PRSTAPRTA-LVLARGRWGFNSAAVLRFAPTP---
KCLFHIR	PRHQQLRTA-LVLARGKWGFNSAVVVRGVIG-----
KCLFGRA	PREAALSAA-LVLARGRHGFNSAVVTLRGSDHRRPT
KCLFNOG	PRPTPLARA-LVLARGRGFFNAAMVAVGPRAETr-----
KCLFTCM	PRELRVDTA-LVVARGMGGFNSALVVRHG-----
KCLFCIN	VRPAALRTA-LGGARGHGGFNSALVVRAGO-----
KCLFVNZ	PRTAEVNTA-LVLARGHGGFNSAMVVRSAN-----
KCLFWHIE	ARPAEPRTA-LVLARGLMGSNSALVLRGAVPPEGR-----
KSGRA	AREQRVDTV-LTVGSGFGGFQSAMVLHREEAA-----
KSHIR	AREQRVDTV-LSVGSGFGGFQSAMVLRLGGANS---
KSACT	ARERKLRSV-LTVGSGFGGFQSAMVLRDAETAGAAA-
KSCIN	ARDQRVDSV-LTVGSGFGGFQSAMVLTSQ---RSTV
KSVNZ	CREQLTDSV-LTVGSGFGGFQSAMVLARPE---RKIA
KSNOG	ARACPVDTV-LTVGSGFGGFQSAMVLCPGPGSRGRSA
KSTCM	ARBQRVDTV-LSVGSGFGGFQSAAVLARPKETr---
KSDAU	AREKRVRHA-LTVGSGFGGFQSAMLLSRPER-----
KSPEU	AREKRVRHA-LTVGSGFGGFQSAMLLSRLER-----
KSWHI	ARERTLHV-LSVGSGFGGFQSAAVVLSEGGLR---
	* * . * * : * : * :

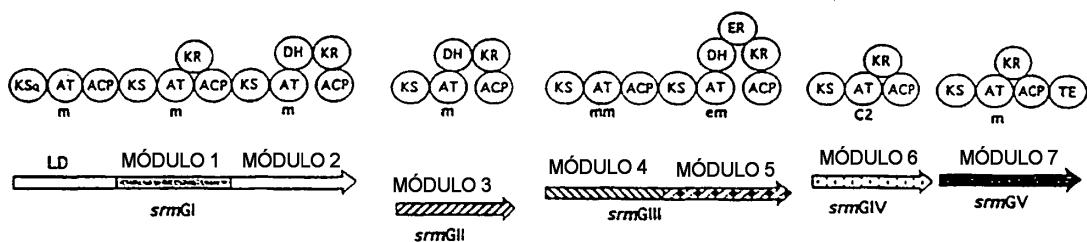
mol: -/ks²

Fig 2D

ORGANIZACIÓN DE LA POLICÉTIDO SINTASA PRODUCTORA DE TILOSINA



ORGANIZACIÓN DE LA POLICÉTIDO SINTASA PRODUCTORA DE ESPIRAMICINA



ORGANIZACIÓN DE LA POLICÉTIDO SINTASA PRODUCTORA DE NIADAMICINA

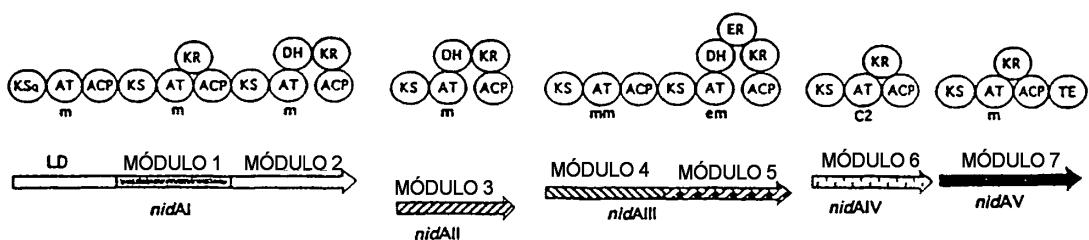


Fig 3

m: malonil transferasa
mm: metilmalonil transferasa
em: etilmalonil transferasa
C2: transferasa de unidad C2 desconocida

Fig. 4A

	1	50
nidamicina	-----	MAGHGDATAQ KAQDAEKSED GSDAIAVIGM
platenolida	-----	MS GELAISRSDD RSDAVAVVGM
monensina	-----	MAAS ASASPSGPSA GPDPIAVVGM
oleandomicina	-----	MHVPGEE NGHSIAIVGI
tilosina	MSSALRRAVQ SNCGYGDLMT SNTAAQNTGD	QEDVDGPDST HGGEIAVVGM
	51	100
nidam . . .	SCRFPGAPGT AEFWQLLSSG ADAVVTAAADG RRR.....	GTIDA
platenol . . .	ACRFPGAPGI AEFWKLLTDG RDAIGRDAVG RRR.....	GMIEA
monensina	ACRLPGAPDP DAFWRLLSEG RSAVSTAPPE RRRADSGLHG P...GGYLDR	
oleandom	ACRLPGSATP QEFWRLLADS ADALDEPPAG RFPTGSLSPP PAPRGGLDLS	
tilosina	SCR LPGAAGV EEFWELLRSG RGM PTRQDDG TWRAA.....	LED
	101	150
nidam . . .	PADFDAAFFG MSPREAAATD PQQLVLLELG WEALEDAGIV PESLRGEAAS	
platenol . . .	PGDFDAAFFG MSPREAAETD PQQLMLLELG WEALEDAGIV PGSLRGEAVG	
monensina	IDGFDADFFH ISPREAVAMD PQQLLLELS WEALEDAGIR PPTLARSRTG	
oleandom	IDTFDADFFN ISPREAGVLD PQQLALELG WEALEDAGIV PRHLRGTRTS	
tilosina	HAGFDAGFFG MNARQAAATD PQHRLMLELG WEALEDAGIV PGDLTGTDTG	
	151	200
nidam . . .	VFGAMNDDY ATLLH.RAGA PTDTYTATGL QHSMIANRLS YFLGLRGPSL	
platenol . . .	VFGAMHDDY ATLLH.RAGA PVGPHTATGL QRMLANRLS YVLGTRGPSL	
monensina	VFGAFWDDY TDVNLNRAPG AVTRHMTGV HRSILANRIS YAYHLAGPSL	
oleandom	VFMGAMWDDY AHLAHARGEA ALTRHSLTG HRGMIANRLS YALGLQGDSL	
tilosina	VFAGVASDDY A.VLTRRSSAV SAGGYTATGL HRALAANRLS HFLGLRGPSL	
	201	250
nidam . . .	VVDTGQSSSL VAVALAVESL RGTTSGIALA GGVNLVLAEE GS.AAMERVG	
platenol . . .	AVDTAQSSSL VAVALAVESL RAGTSRVAVA GGVNLVLADE GT.AAMERLG	
monensina	TVDTAQSSSL VAVHLACESI RSGDSIAFA GGVNLICSPR TTELAAARFG	
oleandom	TVDTGQSSSL AAVHMACESL ARGESDLALV GGVNLVLDPA GT.TGVERFG	
tilosina	VVDSAQSASL VAVQLACESL RRGETSLAVA GGVNLILTEE ST.TVMERMG	
	251	300
nidam . . .	ALSPDGRCHT FDARANGYVR GEGGAIIVVLK PLADALADGD RVYCVVRGVA	
platenol . . .	ALSPDGRCHT FDARANGYVR GEGGAIVVLK PLADALADGD PVYCVVRGVA	
monensina	GLSAAGRCHT FDARADGFVR GEGGLIVVLK PLAAARRDGD TVYCVIRGSA	
oleandom	ALSPDGRCYT FDSRANGYAR GEGGVVVVLK PTHRALADGD TVYCEILGSA	
tilosina	ALSPDGRCHT FDARANGYVR GEGGGAVVLK PLDAALADGD RVYCVIKGGA	
	301	350
nidam . . .	TGNDGGGPGL TVPDRAQQA VLRAACDQAG VRPADVRFVE LHGTGTPAGD	
platenol . . .	VGNDGGGPGL TAPDREGQEA VLRAACAQAR VDPAEVRFVE LHGTGTPVGD	
monensina	VNSDGTTDGI TLPSCQAQQD VVRLACRRAR ITPDQVQYVE LHGTGTPVGD	
oleandom	LNNDGATEGL TVPSARAQAD VLHQAWERAR VAPTDVQYVE LHGTGTPAGD	
tilosina	VNNNDGGASL TTPDREAQEA VLHQAYRRAG VSTGAVRYVE LHGTGTRAGD	

ES 2 341 403 T3

nidam . .	PVEAEALGAV YGTGRP..AN EPLLGVSVKT NIGHLEGAAG IAGFVKAALC	351
platenol . .	PVEAHALGAV HGSGRP..AD DPULLGVSVKT NIGHLEGAAG IAGLVKAALC	
monensina	PIEAAAALGAA LGODAA..RA VPLAVGSAKT NVGHLEAAAG IVGLLKTAWS	
oleandom	PVEAEGLGT A LGTARP..AE APULLGVSVKT NIGHLEGAAG IAGLLKTVLS	
tilosina	PVEAAAALGAV LGAGADSGRS TPLAVGSVKT NVGHLEGAAG IVGLIKATLC	
nidam . .	401	450
platenol . .	LHERALPASL NFETPNPAIP LERLRLKVQT AHAALQPGTG GGPLLAGVSA	
monensina	LRERTLPGSL NFATPSPAIP LDQLRLKVQT AAAELPLAPG GAPLLAGVSS	
oleandom	IHHRRRLAPSL NFTTPNPAIP LADLGLTVQQ DLADWP..RP EQPLIAGVSS	
tilosina	IKNRHLPLASL NFTSPNPRID LDALRLRVHT AYGPWP..SP DRPLVAGVSS	
	VRKGELVPSL NFSTPNPDIP LDDLRLRVQT ERQEW.NEED DRPRVAGVSS	
nidam . .	451	500
platenol . .	FGMGGTNCHV VLEETPGG..... ROPAE.T	
monensina	FGIGCGTNCHV VLEHLPSR..... PTPAV.S	
oleandom	FGMGGTNGHV VVA....AAP DSVAVPEPVG VPERVEVPEP VVVSEPVVVP	
tilosina	FGMGGTNCHV VLSELRNAGG DGAGKGPYTG TEDRLGATEA EKRDPATGN	
	FGMGGTNVHL VIAEAPAAAAG SSGAGGSGAG SGAGISAVSG VV.....	
nidam . .	501	550
platenol . .	GQADACLFSA SPMLLLSSARS EQALRAQAAR LREHL..EDS GADPLDIAYS	
monensina	VAAS...LPD VPPLLLSSARS EGALRAQAVR LGETV..ERV GADPRDVAYS	
oleandom	TPWP..... VSAHS ASALRAQAGR LRTHLAAHRP TPDAARVGHA	
tilosina	GPDPAQDTHR YPALILSARS DAALRAQAER LRHHL.EHSP GQRRLDTAYS	
 PVVVSGRS RVVVREAAGR LAE..VVEAG GVGLADVAVT	
nidam . .	551	600
platenol . .	LATTRTRFEH RAAVPCGDPD RLSSALAALA AGQTPRGVRI GS..TDADGR	
monensina	LASTRTLFEH RAVVPCGGRG ELVAALGGFA AGRVSGGVR GR..A.VPGG	
oleandom	LATTRAPLAH RAVLLGGDTA ELLGSDLALA EGAETASIVR GEAYT..EGR	
tilosina	LATTRRQVFER HAVVTGHDR DLLNGLRDLE NGLPAPQVLL GRTPTPEPGG	
	MAD.RSRFGY RAVVLARGEA ELAGRLRALA GGDPDAGVVT G...AVLDGG	
nidam . .	601	650
platenol . .	LALLLFTGQGA QHPGMGQELY TTDPHFAAL DEVCEELQRC GTQNLREVMF	
monensina	VGVLIFTGQGA QWVGMGRGLY AGGGVFAEVL DEVLSMVGEV DGRSLRDVMF	
oleandom	TAFLFSGQGA QRLGMGRELY AVFPVFADAL DEAFAALDVH LDRPLREIVL	
tilosina	LAFLFSGQGS QQPGMGKRLH QVFPGFRDAL DEVCAELDTH LGRLL.....	
	VVVGAAAPGGA GAAGGAGAGAG GAGGGVVVLV FPGQGTQWVG MGAGLLGSSE	
nidam . .	651	700
platenol . .	TPDQPD..... LLDRTEYTQP ALFALQITALY	
monensina	GDVDVDAGAG ADAGAGAGAG VGSGSGSVGG LLGRTEFAQP ALFALEVALF	
oleandom	GETDSGGNVS GENVIGEGA..... DHQA LLDQTAYTQP ALFAIETSLY	
tilosina	.GPEAGPPLR DVMFAERGT..... AHSA LLSETHYTQA ALFALETAFLF	
	VFAASMRECA RALSVHVGWD LLEVSGGAG .LERVDDVQP VTWAVMVSLA	
nidam . .	701	750
platenol . .	RTLTARGTQA HLVLGHHSVGE ITAAHIAGVL DLPDAARLIT ARAHVMGQLP	
monensina	RALEARGVEV SVVLGHHSVGE VAAATVAGVL SLGDAVRLVV ARGGLMGGLP	
oleandom	RLAASFGLKP DYVLGHHSVGE IAAAHVAGVL SLPDASALVA TRGRLMQAVR	
tilosina	RLLVQWGLKP DHLAGHHSVGE IAAAHAAGIL DLSDAAELVA TRGALMRSLP	
	RYWQAMGVDV AAVVGHQSQE IAAATVAGAL SLEDAAAVVA LRAGLIGRYL	

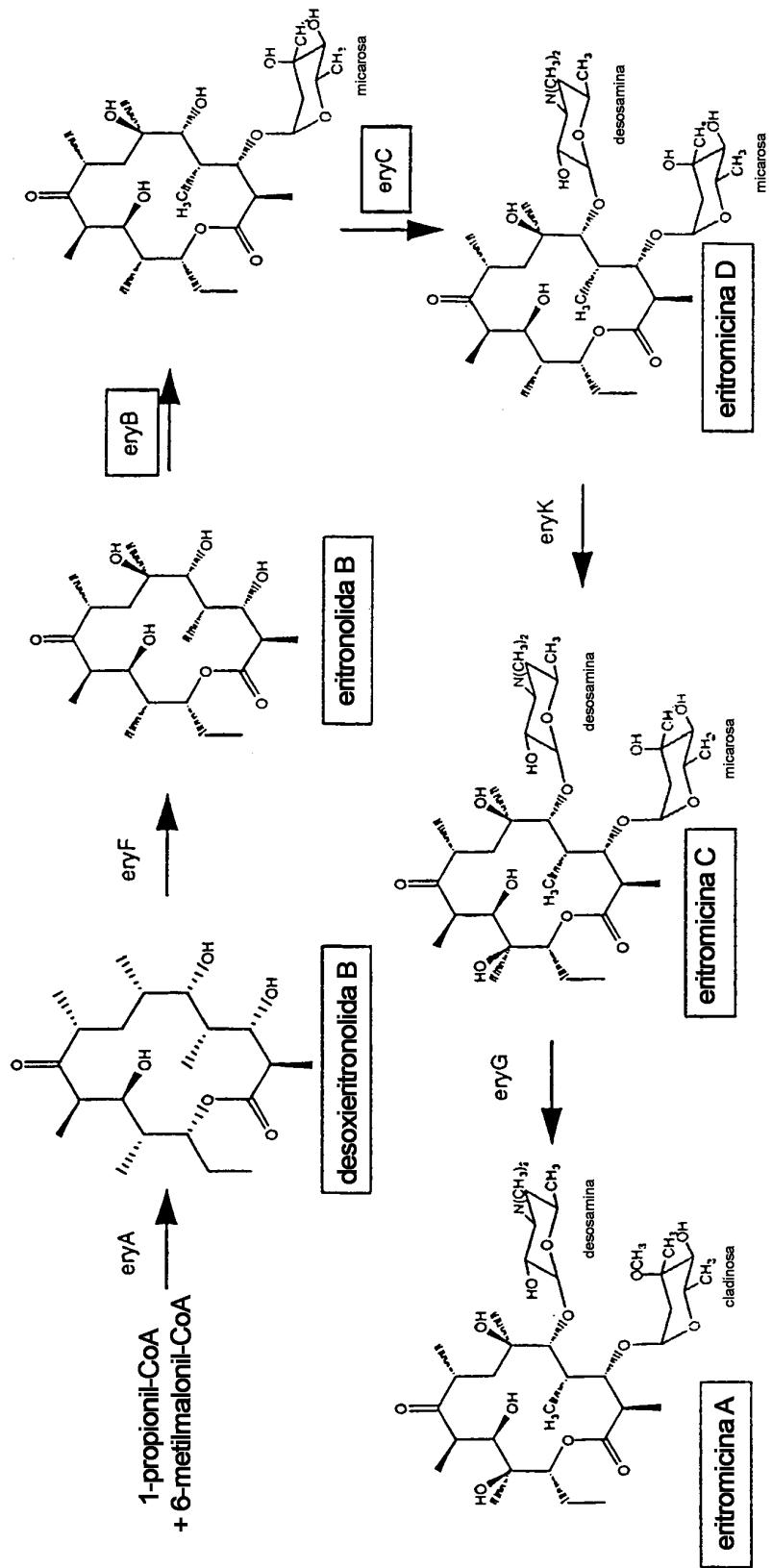
Fig 4B

ES 2 341 403 T3

	751	800
nidam . . .	HG.GAMLSVQ AAEHDLDQLA HTHG..VEIA AVNGPTHCVL SGPRTALEET	
platenol . . .	VG.GGMWSVG ASESVVRGVV EGLGEWVSVA AVNGPRSVVL SGDVGVLESV	
monensina . . .	AP.GAMAAWQ ATADEAAEQL AGHERHVTVA AVNGPDSVVV SGDRATVDEL	
oleandom . . .	GG.GVMLSVQ APESEVAPLL LGREAHVGLA AVNGPDAVVV SGERGHVAAI	
tilosina . . .	AGRGAAMAVP LPAGEVEAGL .AKWPGVEVA AVNGPASTVV SGDRRAVAGY	
	801	850
nidam . . .	AQHLREQNVR HTWLKVSHAF HSALMDPMLG AFRDTLNLTN Y..QPPTIPL	
platenol . . .	VASLMGDGVE YRRLDVSHGF HSVLMEPVLG EFRGVVESLE FGRVRPGVVV	
monensina . . .	TAAWRGRGRK AHHLKVSHAF HSPHMDPILD ELRAVAAGLT FHE..PVIPV	
oleandom . . .	EQILRDRGRK SRYLRVSHAF HSPLMEPVLE EFAEAVAGLT FRA..PTTPL	
tilosina . . .	VAVCQAEGVQ ARLIPVDYAS HSRHVEDLKG ELERVLSGI. .RPRSPRVPV	
	851	900
nidam . . .	ISNLTGQIA. DPNHL CTPDYWIDHA RHTVRFADAV QTAHHQGTTT	
platenol . . .	VSGVSGGVV. GSGEL GDPGYWVRHA REAVRFADGV GVVRGLGVGT	
monensina . . .	VSNVTGELVT ATATGSGAGQ ADPEYWARHA REPVRFLSGV RGLCERGVTT	
oleandom . . .	VSNLTG.... APVDDRTM ATPAYWVRHV REAVRGDGI RALGKLGTGS	
tilosina . . .	CSTVAGEQPG EPVF..... DAGYWFRNL RNRVEFSAVV GGLLEEGHRR	
	901	950
nidam . . .	YLEIGPHPTL TTLLHHTL.. .DNP..... T TIPTLHRERP	
platenol . . .	LVEVGPHGVL TGMAGECLGA GDDV..... V VVPAMRRGRA	
monensina . . .	FVELGPDAPl SAMARDCFP AADRSRPRPA AIATCRRGRD	
oleandom . . .	FLEVGPDGVL TAMARACVTA APEPGHRGEQ GADADAHTAL LLPALRRGRD	
tilosina . . .	FIEVSAHPVL V..... HAI EQ TAEAADRSVH ATGTLRRQDD	
	951	
nidam . . .	EPETLTQAIA AVGVRTDGID WAVLCGASRP RRVELPTYAF	
platenol . . .	EREVFEAALA TVFTRDAGLD ATALHTGSTG RRIDLPTTPF	
monensina . . .	EVATFLRSLA QAYVRGADVD FTRAYGATAT RRFPLPTYPF	
oleandom . . .	EARSLTEAVA RLHLHGVPMD WTSVLLGGDVS .RVPLPTYAF	
tilosina . . .	SPHRLLTSTA EAWAHGATLT WDPAL..PPG HLTTLPYTF	

nidam: nidamicina; platenol: platenolida I (espiramicina); oleandom: oleandomicina.

FIG. 4C

**Fig. 5**

ES 2 341 403 T3

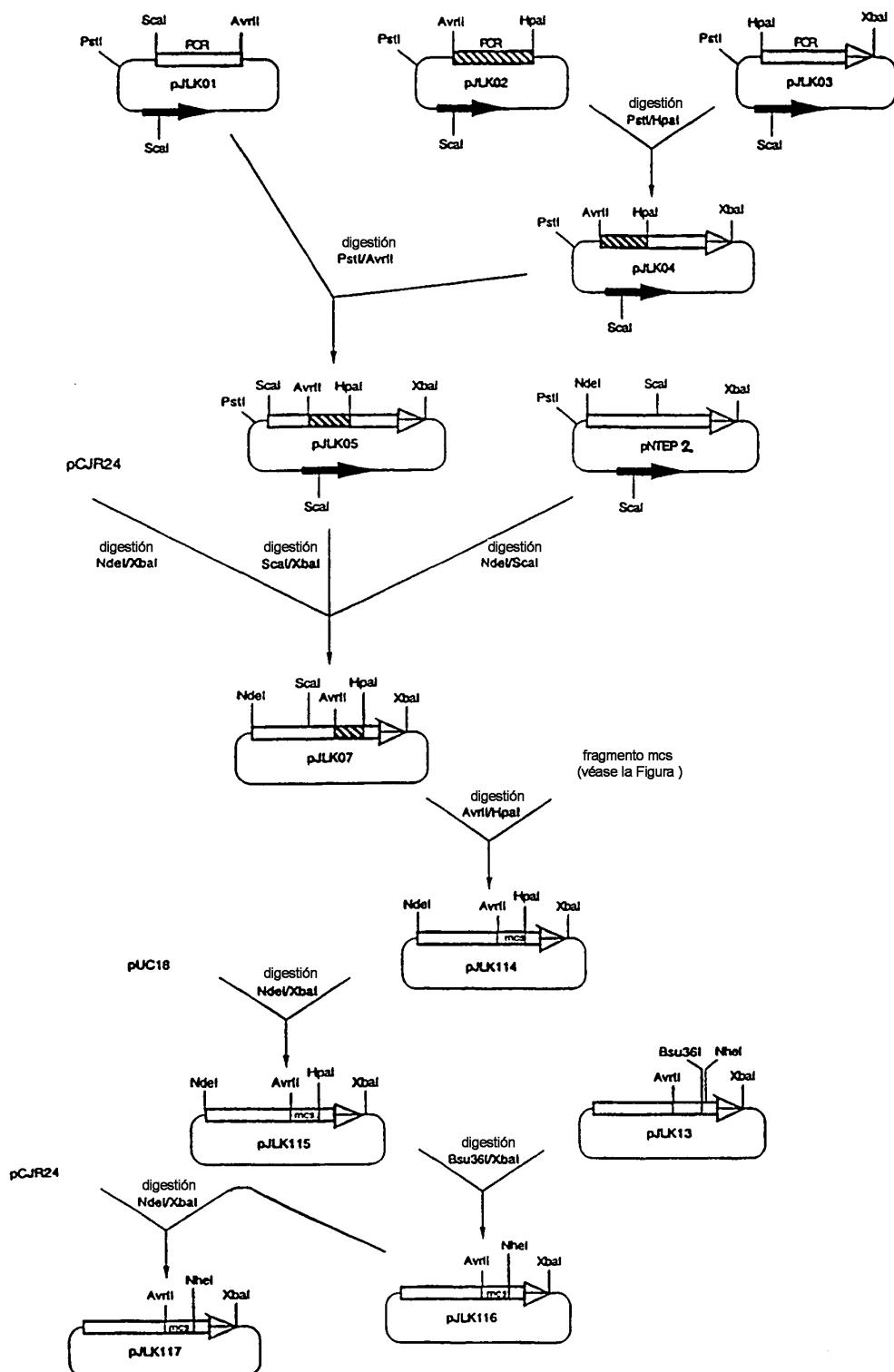


Fig 6

Figura 7

Directo (P1b):

5'-CTA CGG CCC GCA CGG GAT CTG CCT ACG TAT CCT CAG GGC AAG CGG TTC TGG CTG CAG CCG ACT AGT CCT CGT CGT GAC GAG
GGA GAT CGA TCG AGC CTG AGG GAC CGG TT-3'

Inverso (P1b):

5'-AAC CGG TCC CTC AGG CTC GAT GCA TCT CCC TCG TCA CGA GGA CTA GTG CGG TCC GGC TGC AGC CAG AAC CGC TTG CCC TGG AAA GGA TAC GTA
GCC AGA TCT ACC AGT CGG GCC CGG C-3'

Inverso (P1b): Oligonucleótidos hibridados

CTAGGCCGGCGGACTGGATGCTTCCAGGGCAAGCGGTTCTGGGTGAGGCCGACCGCACTAGTCCCTCGTGACGAGGGAGATGCACTCGAGCCTGAGGGACCGTT
CGGCCGGCGCTGACCATCTGACGGATGCTAGGAAAGTCCCCTGGCAAGACCGAACGTGGCTGGGTGATCGGAGCACTGCTCCCTACGTAGCTGGACTCCCTGGCAA
----- ----- -----
AvrII BglII SmaI PstI SpeI Bsu36I NsiI HpaI