



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 165 278**

⑫ Número de solicitud: 009901435

⑮ Int. Cl.⁷: C12N 15/52

C12N 1/21

C12P 19/62

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **24.06.1999**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2002**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.03.2002

⑰ Solicitante/s: **UNIVERSIDAD DE OVIEDO**
Plaza del Riego, 4 - Edificio histórico
33003 Oviedo, Asturias, ES

⑱ Inventor/es:
Aguirrezabalaga González, Ignacio;
Olano Álvarez, Carlos;
Allende Vega, Nerea;
Rodríguez García, Leticia;
Fernández Braña, Alfredo;
Méndez Fernández, Carmen y
Salas Fernández, José Antonio

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Un procedimiento de obtención de productos glicosilados mediante la biosíntesis de los desoxiazúcares: L-olivosa, L-oleandrosa y L-ramnosa.**

㉑ Resumen:

Un procedimiento de obtención de productos glicosilados mediante la biosíntesis de los desoxiazúcares: L-olivosa, L-oleandrosa y L-ramnosa. Se describe un procedimiento de obtención de productos glicosilados a través de la construcción de tres plásmidos capaces de dirigir la biosíntesis de los desoxiazúcares L-olivosa, L-oleandrosa y L-ramnosa. Se describe también la construcción de una cepa de *Streptomyces albus* que posee integrado en su cromosoma el gen de resistencia a eritromicina y un gen (oleGII) que codifica una glicosiltransferasa que la capacita para glicosilar anillos macrocíclicos lactona.

ES 2 165 278 A1

DESCRIPCION

Un procedimiento de obtención de productos glicosilados mediante la biosíntesis de los desoxiazúcares: L-olivosa, L-oleandrosa y L-ramnosa.

Antecedentes

Los actinomicetos, en particular el género *Streptomyces*, son productores de aproximadamente dos tercios de todos los compuestos bioactivos conocidos. Muchos de estos compuestos poseen aplicación farmacéutica dada su actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria y antitumoral. Una característica estructural bastante frecuente en muchos de estos compuestos es la existencia de azúcares unidos a la estructura principal (aglicón) y, en muchos casos, la presencia de estos azúcares es esencial para la actividad biológica del compuesto. Entre éstos podemos mencionar el grupo de los macrólidos que incluye antibióticos principalmente utilizados en el tratamiento de infecciones por bacterias grampositivas como eritromicina, oleandomicina, espiramicina, etc. Estos azúcares pertenecen en su mayoría a la amplia familia de las 6-desoxihexosas. Se han descrito más de 80 azúcares distintos de esta familia (Liu y Thorson, Annu. Rev. Microbiol. 48: 223-256, 1994). Estos azúcares son importantes y, en muchos casos, esenciales para la actividad biológica de estos compuestos. La generación de nuevos macrólidos mediante la modificación de los azúcares es un tema de gran interés para la industria farmacéutica. Hasta el momento actual la única aproximación posible (que no ha dado importantes resultados) es la modificación mediante síntesis química, metodología que presenta grandes dificultades de llevar a cabo por lo que existe una demanda para métodos alternativos. Es en este sentido en donde la presente invención permite disponer de cepas recombinantes capaces de sintetizar tres nuevos desoxiazúcares y la potencialidad de poder generar nuevos derivados glicosilados.

Breve descripción de la invención

El objeto de la invención es un procedimiento de obtención de productos glicosilados a través de una serie de etapas que constituyen dicho procedimiento:

1. Construcción de plásmidos portadores de los genes que codifican L-olivosa, L-oleandrosa y L-ramnosa (pOLV, pOLE y pRHAM, respectivamente).
2. Construcción de una cepa capaz de expresar una glicosiltransferasa.
3. Transformación de la cepa de la etapa 2 con los plásmidos de la etapa 1.
4. Obtención/Purificación de los productos finales glicosilados.

Descripción detallada de la invención

El procedimiento para la obtención de productos glicosilados transcurre a través de una serie de etapas:

1. Construcción de plásmidos portadores de los genes que codifican L-olivosa, L-oleandrosa y L-ramnosa (pOLV, pOLE y pRHAM, respectivamente)

Inicialmente se procedió al aislamiento e identificación de varios genes implicados en la biosíntesis

de L-oleandrosa en *Streptomyces antibioticus* ATCC 11891.

A partir de una serie de clones en cósmidos de una genoteca de ADN total de *S. antibioticus* ATCC 11891 (Rodríguez et al., Mol. Microbiol. 8: 571-582, 1993) se secuenció una región de 9.817 pb localizada corriente arriba de los genes que codifican la policétido sintasa de oleandomicina (Figura 1, en donde se indica también el mapa de restricción de la región secuenciada) clonada a partir de los cósmidos cosAB63 (Quirós et al., Mol. Microbiol. 28: 1177-1185, 1998) y cosAB61 (Rodríguez et al., Mol. Microbiol. 8: 571-582, 1993). La secuencia de nucleótidos (ID SEC. N° 1) se determinó utilizando el método de terminadores de cadena diseñado por Sanger y col. (Sanger et al. PNAS 74: 5463-5467, 1977) y se analizó utilizando el programa CodonPreference (UWGGC; Devereux et al., Nucleic Acid Res. 12: 387-395, 1984) para detectar la existencia de posibles pautas abiertas de lectura. En dicha secuencia se detectó la presencia de 8 pautas abiertas de lectura. Las características genéticas de las distintas pautas abiertas de lectura (numeradas de izquierda a derecha) así como las distintas proteínas que codifican son:

* Pauta abierta de lectura 1. Gen denominado *oleW*. Se inicia en un codón ATG (nt 1.576 en ID SEC.N° 1) y termina en un codón TGA (nt 590 en ID SEC.N° 1). Comprende 987 pares de bases y codifica una proteína de 328 aminoácidos con un peso molecular estimado de 35.834 daltons (ID SEC. N° 2). Esta proteína presenta similitud en bases de datos con LanT (50,8% aminoácidos idénticos; Westrich et al., FEMS Microbiol. Lett. 170: 381-387, 1999), con Graorf26 (49,1% identidad; Ichinose et al., Chem. Biol. 5: 647-659, 1998), con una posible oxidoreductasa de *Amycolatopsis mediterranei* (48,9%; August et al., Chem. Biol. 5: 69-79, 1998) y con RdmF (48,9%; Niemi y Mantsala, J. Bacteriol 177: 2942-2945, 1995) (Fig. 2A). En base a ello, se le atribuye una función 3-cetoreductasa en la síntesis de L-oleandrosa.

* Pauta abierta de lectura 2. Gen denominado *oleV*. Se inicia en un codón ATG (nt 3.020 en ID SEC.N° 1) y termina en un codón TGA (nt 1.596 en ID SEC N° 1). Sus 1.425 nucleótidos codifican para una proteína de 474 aminoácidos y un peso molecular estimado de 53.149 daltons (ID SEC N° 3). Al comparar la proteína en las bases de datos se encuentra homología con LanS (55,2% de identidad; Westrich et al., FEMS Microbiol. Lett. 170: 381-387, 1999), con DnmT (52,8%; Scotti y Hutchinson, J. Bacteriol. 178:7316-7321, 1996), con SnoH (51,5%; Ylihono et al., Mol. Gen. Genet. 251: 113-120, 1996), con EryBVI (51,1%; Gaisser et al., Mol. Gen. Genet. 256: 239-251, 1997; Summers et al., Microbiology 143: 3251-3262, 1997) y con Graorf27 (50,7%; Ichinose et al., Chem. Biol. 5: 647-659, 1998) (Fig. 2B). Se le atribuye una función de 2,3-deshidratasa en la síntesis de L-oleandrosa.

* Pauta abierta de lectura 3. Gen denominado *oleL*. Se inicia en un codón ATG (nt 3.356 en ID SEC. N° 1) y termina en un codón TGA (nt 3.970 en ID SEC. N° 1), con un tamaño de 615 pares de bases. Codifica para un péptido de 204 aminoácidos y un peso molecular estimado de 22.248 daltons (ID SEC N° 4). En las bases de datos muestra homología con distintas dTDP-4-ceto-6-desoxiglucosa 3,5-epimerasas como StrM (50% identidad; Pissowotzki et al., Mol. Gen. Genet. 231:113-123, 1991), DnmU (42,8%; Otten et al., J. Bacteriol. 179: 4446-4450) y EryBVII (42,4%; Gaisser et al., Mol. Gen. Genet. 256: 239-251, 1997; Summers et al., Microbiology 143: 3251-3262, 1997) (Fig. 2C). Se le asigna como función la epimerización de los carbonos 3 y 5 en la síntesis de L-oleandrosa.

* Pauta abierta de lectura 4. Gen denominado *oleS*. Se inicia con un codón GTG (nt 3.967 en ID SEC. N° 1) y termina en un codón TGA (nt 5.037 en ID SEC. N° 1). Con un tamaño de 1.061 pares de bases, este gen codifica para una proteína de 356 aminoácidos con un peso molecular estimado de 38.109 daltons (ID SEC N° 5). Esta proteína muestra una gran homología con dTDP-glucosa sintasas de estreptomicetos como MtmD (70,2% de identidad; Lombó et al., J. Bacteriol. 179: 3354-3357, 1997), StrD (68,2%; Pissowotzki et al., Mol. Gen. Genet. 231:113-123, 1991) y DnmL (58,1%; Gallo et al., Microbiology 142: 269-275, 1996) (Fig. 2D). Se le supone involucrada en la activación de glucosa-1-fosfato a dTDP-D-glucosa como primer paso en la síntesis de L-oleandrosa y D-desosamina para incorporarse luego al anillo macrolactona de la oleandomicina en *S. antibioticus*.

* Pauta abierta de lectura 5. Gen denominado *oleE*. Su codón de iniciación ATG (nt 5.034 en ID SEC. N° 1) se solapa con el codón de parada de *oleS*, terminando en el nucleótido 6.041. Codifica para una proteína de 335 aminoácidos con un peso molecular estimado de 36.664 daltons (ID SEC N° 6). Posee una gran similitud con dTDP-glucosa 4,6-deshidratasas como MtmE (70,2% de identidad; Lombó et al., J. Bacteriol. 179: 3354-3357, 1997), StrE (64,7%; Pissowotzki et al., Mol. Gen. Genet. 231:113-123, 1991) y TylA2 (63%; Merson-Davies y Cundliffe, Mol. Microbiol. 13: 349-355, 1994) y todas ellas mantienen un motivo conservado de unión a NAD⁺ (Fig. 2E). En base a estas homologías se le asigna la función de dTDP-glucosa 4,6-deshidratasa en la biosíntesis de D-desosamina y L-oleandrosa.

* Pauta abierta de lectura 6. Gen denominado *oleU*. Su codón de iniciación ATG (nt 6.038 en ID SEC. N° 1), muestra un solapamiento con el codón de terminación de *oleE*. El gen *oleU* se extiende a lo largo de 888 nucleótidos terminando en un codón TGA (nt

6.925 en ID SEC. N° 1). Codifica para una proteína de 295 aminoácidos con un peso molecular estimado de 32.098 daltons (ID SEC NO 7). Esta proteína muestra similitud con 4-cetoreductasas de azúcares de antibióticos como StrL (57,4% de identidad; Pissowotzki et al., Mol. Gen. Genet. 231:113-123, 1991), DnmV (27,8%; Otten et al., J. Bacteriol. 179: 4446-4450, 1997) y EryBIV (24,8%; Gaisser et al., Mol. Gen. Genet. 256: 239-251, 1997; Summers et al., Microbiology 143: 3251-3262, 1997) (Fig. 2F). Todas comparten dos motivos conservados, uno de unión a nucleótido y otro de unión a cofactor. Para la proteína OleU se propone un papel de 4-cetoreductasa en la síntesis de L-oleandrosa.

* Pauta abierta de lectura 7. Gen denominado *oleNI*. Se inicia con un ATG (nt 6.922 en ID SEC. N° 1) que solapa con el codón de terminación de *oleU* y termina en un TGA (nt 8.103 en ID SEC. N° 1). Se extiende a lo largo de 1.182 nucleótidos y codifica para una proteína de 393 aminoácidos con un peso molecular estimado de 42.645 daltons (ID SEC N° 8). Muestra similitud con aminotransferasas que actúan sobre 6-desoxiazúcares en las rutas de biosíntesis de varios antibióticos. Este es el caso de EryCIV y EryCI (65% y 34,6% de identidad, respectivamente; Gaisser et al., Mol. Gen. Genet. 256: 239-251, 1997; Summers et al., Microbiology 143: 3251-3262, 1997), TyIB (32,1%; Merson-Davies y Cundliffe, Mol. Microbiol. 13: 349-355, 1994), LmbS (32,6%; Peschke et al., Mol. Microbiol. 16: 1137-1156, 1995) y DnrJ (29,8%; Stutzman-Engwall et al., J. Bacteriol. 174: 144-154, 1992) (Fig. 2G). En base a estas similitudes se le asigna un papel como aminotransferasa implicada en la biosíntesis de D-desosamina.

* Pauta abierta de lectura 8. Gen denominado *oleT*. Se inicia con un codón GTG (nt 8.225 en ID SEC. N° 1) y acaba en un TGA (nt 9.688 en ID SEC. N° 1). Tiene una longitud de 1.464 pares de bases y codifica para una proteína de 487 aminoácidos con un peso molecular estimado de 53.984 daltons (ID SEC N° 9). La proteína OleT probablemente catalice una 3,4-reducción que se produce como uno de los pasos finales en la síntesis de D-desosamina, dada su similitud con las proteínas DesII (57,2% identidad; Xue et al., PNAS 95: 12111-12116, 1998) y EryCV (56,7%; Gaisser et al., Mol. Gen. Genet. 256: 239-251, 1997; Summers et al., Microbiology 143: 3251-3262, 1997) (Fig. 2H).

Una vez que se dispuso de esta información se procedió a la construcción de los plásmidos portadores de los genes que codifican para la biosíntesis de L-olivosa (pOLV), L-oleandrosa (pOLE) y L-ramnosa (pRHAM).

Construcción del plásmido pOLV

El plásmido pOLV posee la capacidad de dirigir la biosíntesis del desoxiazúcar L-olivosa. Para

su construcción se procede de la siguiente forma. A partir del cósmido cosAB61, se aisló un fragmento de ADN *SstI* de 7,6 kb mediante digestión total del ADN del cósmido con este enzima de restricción y aislamiento del fragmento de un gel de agarosa de bajo punto de fusión mediante electroelución. El fragmento una vez aislado fué clonado en el sitio *SstI* del plásmido pLAG0 previa digestión total del plásmido con ese enzima de restricción y ligación del fragmento al plásmido con ADN ligasa del fago T4 en presencia de iones magnesio y ATP. pLAG0 es un vector bifuncional (*E. coli-Streptomyces*) de 7,5 Kb derivado de pWHM3 (Vara et al., J. Bacteriol. 171: 5872-5881, 1989) conteniendo el promotor del gen de resistencia a eritromicina (*ermE*) de *Saccharopolyspora erythraea* (Bibb et al., Gene 38: 215-226) como un fragmento *KpnI-BamHI* de 0.28 kb insertado en los mismos sitios de restricción de pWHM3. El fragmento *SstI* de 7,6 Kb queda de este modo insertado delante de dicho promotor y los genes que contiene están bajo el control de sus propios promotores. El ADN así ligado se introdujo en *Escherichia coli* XL2-Blue (Stratagene) por transformación de células competentes. Los transformantes se seleccionaron por resistencia al antibiótico ampicilina (100 µg/ml) en placas de medio LB sólido (Sambrook et al., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) y las colonias conteniendo plásmidos recombinantes se identificaron por su incapacidad de hidrolizar X-gal en presencia de IPTG. Los clones recombinantes que contenían el fragmento *SstI* fueron identificados mediante preparación del ADN plasmídico de las colonias recombinantes, digestión con el enzima *SstI* y análisis mediante electroforesis en gel de agarosa, utilizando técnicas standard de Biología Molecular (Sambrook et al., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Uno de los clones aislados que contenía la construcción correcta se designó pOLV (Fig. 3) y la cepa de *E. coli* que la contenía se denominó EOLV.

Construcción del plásmido pOLE

El plásmido pOLE posee la capacidad de dirigir la biosíntesis del desoxiazúcar L-oleandrosa. Para su construcción se procede de la siguiente forma. El gen *oleY* codifica una 3-O-metiltransferasa implicada en la metilación del hidroxilo en el carbono 3 de la L-oleandrosa durante la biosíntesis de oleandomicina por *S. antibioticus* (Olano et al., Mol. Gen. Genet. 259: 299-308, 1998). Este gen fué amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Saiki et al, Science 239: 487-491, 1988) utilizando los siguientes oligonucleótidos como cebadores: (a) oligonucleótido para el extremo 5' (AGAGAAGCTTGCT-AGCCCGGACCACGCGAAGGACCTTTCAC-ATG); lleva sitios de restricción para los enzimas *HindIII* y *NheI* (indicados en letra negrilla) y (b) oligonucleótido para el extremo 3' (AGTCTA-GATTAAATTAAGTGTGTCGTTCCAGAAC-GGCTCCCGG); lleva un sitio de restricción para el enzima *XbaI* (indicado en negrilla). Se mezclaron 100 ng de ADN molde con 30 pmoles

de cada cebador y 2 unidades de Vent DNA Polimerasa (New England Biolabs) en un volumen de reacción de 50 µl conteniendo 2mM de cada dNTP, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 2mM MgSO₄ y 0,1 % Triton X-100. La mezcla se cubrió con 50 µl de aceite mineral y la reacción de polimerización se llevó a cabo en un termociclador Minicycler de MJResearch bajo las siguientes condiciones: 3 min. a 98°C, seguidos de 30 ciclos de 30 seg. a 98°C, 1 min. a 67°C y 3 min a 72°C. Terminados los 30 ciclos se sometió la mezcla de reacción a una extensión final de 5 min a 72°C. Una vez amplificado, el fragmento de ADN de 1.155 pares de bases se digirió con *HindIII* y *XbaI* y fué subclonado en los sitios *HindIII* y *XbaI* del plásmido pUC18. A partir de esta construcción se rescató el gen *oleY* utilizando los sitios de restricción *NheI* y *XbaI* presentes en los cebadores, y aislando el fragmento que contiene el gen *oleY* de un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Este fragmento de ADN se subclonó en el sitio *XbaI* de pOLV (a continuación del promotor del gen de resistencia a eritromicina) previa digestión total del plásmido con ese enzima de restricción y ligación del fragmento al plásmido con ADN ligasa del fago T4 en presencia de iones magnesio y ATP. El ADN producto de la ligación se introdujo en *Escherichia coli* XL2-Blue (Stratagene) por transformación de células competentes. El reconocimiento de los transformantes se realizó por selección con ampicilina (100 µg/ml) en placas de LB sólido (Sambrook et al., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Los transformantes que eran recombinantes y contenían el gen *oleY* se reconocieron por obtención de ADN plasmídico de colonias transformantes y su posterior digestión doble con los enzimas *SstI* y *XbaI* y análisis mediante electroforesis en gel de agarosa, utilizando técnicas standard de biología molecular. Esta digestión permitió reconocer la inserción del fragmento y a la vez comprobar la orientación del gen *oleY* a continuación y a favor del promotor del gen de resistencia a la eritromicina (*ermE*) presente en pOLV. Uno de los clones aislados conteniendo la construcción correcta se denominó pOLE (Fig. 4) y a la cepa de *E. coli* que lo contenía EOLE.

Construcción del plásmido pRHAM

El plásmido pRHAM posee la capacidad de dirigir la biosíntesis del desoxiazúcar L-ramnosa. Para su construcción se procede de la siguiente forma. Procedente de la digestión total del cósmido cosAB63 (Quirós et al, Mol. Microbiol. 28: 1177-1185, 1998) con los enzimas de restricción *SphI* y *XmnI*, se aisló un fragmento *SphI-XmnI* de 4,1 Kb por elución del fragmento de un gel de agarosa mediante electroelución. Estos sitios de restricción se localizan a partir de los nucleótidos 3.286 (*SphI*) y 7.422 (*XmnI*) de la secuencia descrita en la Figura 2. Este fragmento de ADN contiene las regiones codificadoras de los genes *oleL*, *oleS*, *oleE* y *oleU*, así como parte de *oleNI*. Con la intención de generar los sitios de restricción adecuados a ambos lados del fragmento de 4,1 Kb, el fragmento *SphI-XmnI* fue clonado en los sitios *SphI* y *SmaI* del plásmido pUK21 (Vieira

y Messing, Gene 100: 189-194, 1991) previamente digerido totalmente con dichos enzimas y ligado a él con ADN ligasa del fago T4 en presencia de iones magnesio y ATP para dar el plásmido pLRHA. El ADN de la ligación se introdujo en *E. coli* XL2-Blue (Stratagene) mediante transformación de células competentes. Los transformantes fueron seleccionados por resistencia a kanamicina (100 µg/ml) en placas de medio sólido LB (Sambrook et al., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) y las colonias conteniendo plásmidos recombinantes se reconocieron por su incapacidad de hidrolizar X-Gal en presencia de IPTG. Los clones recombinantes que contenían el fragmento (*SphI-XmnI*) fueron identificados por digestión con *SpeI* de su ADN plasmídico y posterior análisis de los fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa, utilizando técnicas estándar de Biología Molecular (Sambrook et al., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Después de obtener DNA plasmídico de la construcción pLRHA, éste se digirió con los enzimas *SpeI* y *XbaI* y el fragmento de 4,1 Kb *SpeI-XbaI* rescatado se subclonó en el sitio *XbaI* del vector bifuncional pEM4 (Quirós et al., Mol. Microbiol. 28: 1177-1185, 1998) detrás del promotor del gen de resistencia a eritromicina (*ermE**p) y en la orientación adecuada para quedar bajo su control transcripcional. A la construcción así generada se denominó pRHAM (Fig. 5) y a la cepa de *E. coli* que la contenía ERHAM. 2. Construcción de una cepa capaz de expresar una glicosiltransferasa

Una segunda etapa consiste en la construcción de una cepa de *S. albus* (denominada NAG2) productora de la glicosiltransferasa OleG2. Esta cepa posee ahora la capacidad de reconocer distintos azúcares y transferirlos a un anillo macrocíclico lactona. La generación de las construcciones plasmídicas intermediarias necesarias para construir la cepa final NAG2 se muestra en la Figura 6.

A partir del cósmido cosAB35 (Olano et al., Mol. Gen. Genet. 259: 299-308, 1998), se aisló un fragmento de ADN *BglII* de 5,84 Kb mediante digestión total del ADN del cósmido con este enzima de restricción y aislamiento del fragmento de un gel de agarosa de bajo punto de fusión mediante electroelución. Este fragmento, que contiene los genes *oleGII*, *oleGI* y *olePI* completos (Olano et al., Mol. Gen. Genet. 259: 299-308, 1998) además de parte de la policétido sintasa (Swan et al., Mol. Gen. Genet. 242: 358-362, 1994), se subclonó en el sitio *BamHI* del vector pUC18 por digestión total de pUC18 con *BamHI* y ligación con el fragmento con el enzima T4 DNA ligasa en presencia de magnesio y ATP, para dar lugar a la construcción pUC2G. El ADN ligado se introdujo en *Escherichia coli* TG1recO1504::Tn5 (Kolodner et al., J. Bacteriol. 163: 1060-1066, 1985) por transformación de células competentes. Los transformantes se seleccionaron por resistencia al antibiótico ampicilina (100 µg/ml) en placas de medio LB sólido (Sambrook et al., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual,

2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) y las colonias conteniendo plásmidos recombinantes se identificaron por su incapacidad de hidrolizar X-gal en presencia de IPTG. Los clones recombinantes que contenían el fragmento 5,84 Kb *BglII* fueron identificados mediante digestión doble del ADN plasmídico de las colonias recombinantes con *HindIII* y *EcoRI* y análisis mediante electroforesis en gel de agarosa de ésta y otras digestiones, utilizando técnicas estándar de biología molecular (Sambrook et al., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Procedente de digerir la construcción pUC2G con *BamHI* y *EcoRI*, se aisló un fragmento de ADN de 1,45 Kb que contiene el gen *oleGII* y se subclonó en los mismos sitios del vector bifuncional (*E. coli-Streptomyces*) pEM4 (Quirós et al., Mol. Microbiol. 28: 1177-1185, 1998) bajo el control transcripcional del promotor del gen de resistencia a eritromicina (*ermE**p), nombrándose esta construcción como pNAG2-1. Con la intención de generar sitios de restricción apropiados a ambos lados del gen *oleGII* precedido del promotor *ermE**p, a partir de la digestión total de pNAG2-1 con *HindIII* y *EcoRI* se aisló por elución de un gel de agarosa un fragmento de 1,72 Kb conteniendo *ermE**p y *oleGII* y se subclonó en el vector pIJ2925 (Janssen y Bibb, Gene 124: 133-134, 1993) digerido con los mismos enzimas para dar lugar a la construcción pNAG2-2. Después de digestión total de pNAG2-2 con el enzima *BglII*, se procedió a subclonar el fragmento *BglII* resultante conteniendo *ermE**p y *oleGII* en el vector bifuncional e integrativo pKCE digerido también con *BglII*. Este vector pKCE proviene del vector integrativo pKC796 (Kuhstoss et al., Gene 97: 143-146, 1991) que contiene el gen de resistencia a apramicina y en él se ha clonado en el sitio *BamHI* del linker el gen de resistencia a eritromicina (*ermE*; Thompson et al., Gene 20-51-62, 1982) con su propio promotor. Con ello se obtiene la construcción pNAG2-3 en la cual coexisten dos *ermE**p divergentes, controlando uno la transcripción de *oleGII* y el otro la de *ermE*. Con el propósito de inactivar el gen de resistencia a apramicina, se digirió ADN de la construcción pNAG2-3 con el enzima *XhoI* (que tiene un sitio único de reconocimiento en pNAG2-3 localizado dentro del gen de resistencia a apramicina), se crearon extremos romos por acción del fragmento klenow de la DNA polimerasa 1 de *E. coli* y se religó con T4 DNA ligasa en presencia de magnesio y ATP para dar la construcción pNAG2-4. El ADN de esta ligación se usó para transformar protoplastos de *Streptomyces albus* J1074 (*ilv*⁻1, *sal*⁻2), que es un mutante R⁻ M⁻ de *S. albus* G (Chater y Wilde, J. Gen. Microbiol. 116: 323-334, 1980), y se seleccionaron los transformantes por su resistencia a eritromicina (200 µg/ml). De varios de los transformantes aislados se probó su sensibilidad a apramicina (25 µg/ml) y se escogió un clon eritromicina resistente-apramicina sensible para establecer la línea NAG2, la cual será usada como huésped en estudios posteriores. Esta cepa NAG2 contiene el gen *oleGII* integrado de forma estable en el cromosoma de *S.*

albus, lo cual se ha comprobado obteniendo el ADN total de la cepa, digiriéndolo con *Bgl*/II, realizando una transferencia Southern según procedimientos estándar (Hopwood *et al.*, Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual; The John Innes Foundation: Norwich, U.K., 1985) a una membrana de nylon (Hybond N+, Amersham) y realizando una hibridación frente a un fragmento de DNA de 1,72 Kb conteniendo (*ermE**p + *oleGII*) marcado radiactivamente con (α -P³²)dCTP (Amersham) y posterior autoradiografía.

3. Transformación de la cepa de la etapa 2 con los plásmidos de la etapa 1

El siguiente paso consiste en la introducción de forma individual de los tres plásmidos portadores de genes que codifican la biosíntesis de L-olivosa, L-oleandrosa y L-ramnosa en la cepa NAG2 generada en la etapa 2.

Se utilizó ADN del plásmido pOLV para transformar protoplastos de la cepa NAG2, seleccionándose los transformantes por su resistencia a tioestreptona (25 μ g/ml). Uno de los clones transformantes se escogió para establecer la cepa IAGS1.

Se utilizó ADN del plásmido pOLE para transformar protoplastos de la cepa NAG2, seleccionándose los transformantes por su resistencia a tioestreptona (25 μ g/ml). Uno de los clones transformantes se escogió para establecer la cepa IAGS2.

Se utilizó ADN del plásmido pRHAM para transformar protoplastos de la cepa (*S. lividans* TK21 + cos16F4) (Wohlert *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 120: 10596-10601, 1998), seleccionándose los transformantes por su resistencia a apramicina (25 μ g/ml) y a tioestreptona (25 μ g/ml). Uno de los clones transformantes se escogió para establecer la cepa LRR.

4. Obtención/Purificación de los productos finales glicosilados

La siguiente etapa consiste en la incorporación de los azúcares a un anillo macrocíclico lactona. A partir de esporas y micelio obtenidos de una placa Petri sembrada con las cepas generadas en la etapa 3, se inoculan 25 ml de medio SCM (Pareda *et al.*, Microbiology 144: 543-553, 1998) conteniendo 25 μ g/ml thio y se incuban a 30°C con agitación (300 r.p.m.). A las 24 horas se separan 10 ml a otro matraz y se añaden 10 μ g/ml de EB y se continúa la incubación 4 días más (total, 5 días). Pasado este tiempo de incubación se toman 5 ml de cultivo y se extraen con un volumen igual de acetato de etilo agitando, centrifugando y evaporando la fase orgánica. El sedimento se resuspende entonces en 10 μ l de acetona de donde se utilizan las correspondientes alícuotas para su análisis por TLC y HPLC.

Abreviaturas

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

IPTG: isopropil β -D-tiogalactopiranosido

pb: pares de bases

Kb: kilobases

r.p.m.: revoluciones por minuto

TLC: cromatografía en capa fina

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

thio: tioestreptona

EB: eritronólido B

ATCC American Type Culture Collection

dTDP deoxitimidin difosfato

dNTP deoxinucleótido

ATP adenosin 5'-trifosfato

PCR reacción en cadena de la polimerasa

Los siguientes ejemplos describen el invento con fines de ilustración, sin que en ningún caso deban considerarse como limitativos del mismo.

Ejemplo 1

Incorporación de L-olivosa al eritronólido B por la cepa IAGS1 (S. albus + oleGII + pOLV)

Uno de los ejemplos que muestra la potencialidad de esta invención es la incorporación del azúcar L-olivosa al anillo macrocíclico lactona de la eritromicina (eritronólido B). Para ello, se inoculan 25 ml de medio SCM conteniendo 25 μ g/ml thio con esporas de la cepa IAGS1. Tras incubarlo a 30°C con agitación (300 r.p.m.) durante 24 horas, se separan 10 ml del cultivo a otro matraz y se añaden 10 μ g/ml de EB, continuándose la incubación durante otros 4 días (total, 5 días). Transcurrido este tiempo se toman 5 ml de cultivo y se extraen con un volumen igual de acetato de etilo agitando, centrifugando y evaporando la fase orgánica. El sedimento se resuspende entonces en 10 μ l de acetona de donde se utilizan las correspondientes alícuotas para su análisis por TLC y HPLC.

Para la TLC se utilizó como adsorbente gel de sílice sobre un soporte de aluminio (SDS, Francia), siendo la fase móvil utilizada una mezcla de diclorometano y metanol en proporción 9:1 v/v. Para el análisis por HPLC se usó una columna Symmetry C18 (Waters) con acetonitrilo y agua como solventes. La elución de las muestras se llevó a cabo con un gradiente desde 10 % al 50 % de acetonitrilo en 20 minutos seguidos de 10 minutos mantenidos en las condiciones finales. La tasa de flujo fue de 1 ml/min realizándose el monitoreo por la absorción a 201 nm.

Como resultado de este experimento (Fig. 7) se observó por TLC la aparición de una mancha nueva que migraba por debajo del EB. Además, mediante HPLC se identificó la aparición de un nuevo pico de absorción en el cromatograma con un tiempo de retención ligeramente inferior al del EB (Fig. 8), el cual se purificó con varias inyecciones usando 30 % de acetonitrilo en agua como fase móvil. El producto aislado se sometió a análisis por HPLC utilizando un sistema de cromatografía líquida GILSON equipado con un detector de longitud de onda variable y una columna Kromasil C18 5 μ m (250x4.6 mm diámetro interno). The fase móvil fue acetonitrilo:metanol:acetato amónico 0.065 M pH 6.7 (35:15:50, v/v). El flujo de la fase móvil fue de 1 ml/min y el análisis se desarrolló a 30°C. El análisis por HPLC acoplado a un espectrómetro de masas se realizó en un sistema cromatográfico Waters equipado con un espectrómetro Finnigan TSQ 7000 (con un rango de escala de masa de 0 a 750). El análisis HPLC-espectrometría de masas mostró un metabolito

eluyendo a 30 min. El material presente en este pico mostró dos picos a 555 y 550 m/z para los iones sodio y amonio, respectivamente, así como un pico a 515 m/z para la forma H^+ deshidratada (Fig. 9A). Un pico de fragmentación presente a 385 m/z puede ser interpretado como el eritronólido B deshidratado (ión H^+). La diferencia de 130 en comparación con el pico de 515 puede ser explicada por un residuo de azúcar neutro que podría representar olivosa y en consecuencia el producto correspondería a L-olivósil-eritronólido B (Fig. 9B).

Ejemplo 2

Incorporación de L-oleandrosa al eritronólido B por la cepa IAGS2 (S. albus + oleGII + pOLE)

Un segundo ejemplo lo constituye la incorporación de un derivado metilado de la L-olivosa, L-oleandrosa al anillo macrocíclico lactona de la eritromicin (eritronólido B). Se inoculan 25 ml de medio SCM conteniendo 25 $\mu\text{g/ml}$ thio con esporas de la cepa IAGS2 y se incuban a 30°C con agitación (300 r.p.m.). Tras 24 horas de incubación se separan 10 ml a otro matraz y se añaden 10 $\mu\text{g/ml}$ de EB, continuándose la incubación 4 días más (total, 5 días). Pasado este tiempo de incubación se toman 5 ml de cultivo y se extraen con un volumen igual de acetato de etilo agitando, centrifugando y evaporando la fase orgánica. El sedimento se resuspende entonces en 10 μl de acetona de donde se utilizan las correspondientes alícuotas para su análisis por TLC y HPLC.

Para la TLC se utilizó como adsorbente gel de sílice sobre un soporte de aluminio (SDS, Francia), siendo la fase móvil utilizada una mezcla de diclorometano y metanol en proporción 9:1 v/v. Para el análisis por HPLC se usó una columna Symmetry C18 (Waters) con acetonitrilo y agua como solventes. La elución de las muestras se llevó a cabo con un gradiente desde 10 % al 50 % de acetonitrilo en 20 minutos seguidos de 10 minutos mantenidos en las condiciones finales. La tasa de flujo fue de 1 ml/min realizándose el monitoreo por la absorción a 201 nm.

Como resultado de este experimento (Fig. 10) se observó por TLC la aparición de una mancha nueva que migraba por delante del EB control. Además, mediante HPLC se identificó la aparición de un nuevo pico de absorción en el cromatograma con un tiempo de retención claramente superior al del EB (Fig. 11), el cual se purificó con sucesivas inyecciones usando un gradiente lineal del 25 % al 50 % en 30 minutos. El compuesto purificado se analizó mediante HPLC-espectrometría de masas como se describió en el ejemplo 1. El análisis mostró un nuevo metabolito eluyendo a 26.36 min. El material presente en este pico mostró dos picos parentales a 569 y 564 m/z para los iones sodio y amonio, respectivamente, así como un pico a 529 m/z para la forma H^+ deshidratada (Fig. 12A). Un pico de fragmentación presente a 385 m/z puede ser interpretado como el eritronólido B deshidratado (ión H^+). La diferencia de 144 en comparación con el pico de 529 puede ser explicada por la pérdida del azúcar neutro que podría representar oleandrosa y en consecuencia el producto correspondería a L-oleandrosil-eritronólido B (Fig. 12B).

Ejemplo 3

Incorporación de L-ramnosa a la 8-demetil-tetracenomicina C por la cepa LRR (S. lividans + cos16F4 + pRRHAM)

Un tercer ejemplo consiste en la incorporación del azúcar L-ramnosa al anillo aromático de la eloramycin, 8-demethyl-tetracenomicina C. El cósmido 16F4 lleva como marca de selección la resistencia a apramicina y procede de una librería génica de *Streptomyces olivaceus* Tü2353. Contiene un inserto de 25 kb con genes de la ruta de biosíntesis de eloramycin (Fig. 15) que codifica la capacidad de sintetizar 8-demetil-tetracenomicina C (Fig. 15) en otras especies de *Streptomyces* (Decker et al., Gene 166:121-126, 1995). Este cósmido confiere además resistencia a tetracenomicina C y a eloramycin en *S. lividans* TK64. Dentro del inserto del cósmido se encuentra la glicosiltransferasa que transfiere L-ramnosa a su sustrato aglicón, 8-demetil-tetracenomicina C (Wohlert et al., J. Am. Chem. Soc. 120: 10596-10601, 1998). Sin embargo, el inserto carece de los genes necesarios para la biosíntesis de L-ramnosa. Por otra parte, *S. lividans* TK21 es una cepa que no produce policétidos conocidos al menos de forma espontánea (Hopwood et al., Genetic Manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual; The John Innes Foundation: Norwich, U.K., 1985). Cuando a esta cepa se le introdujo el cósmido 16F4, se comprobó que producía 8-demetil-tetracenomicina C (Decker et al., Gene 166:121-126, 1995; Wohlert et al., J. Am. Chem. Soc. 120: 10596-10601, 1998).

En este experimento se sembraron placas de medio R5 sólido (conteniendo 25 $\mu\text{g/ml}$ apramicina y 25 $\mu\text{g/ml}$ tioestreptona) con una suspensión de esporas de la cepa LRR y se incubaron durante 4-5 días a 30°C. Pasado el tiempo de incubación, se realiza una extracción orgánica del medio con acetato de etilo, para posteriormente evaporar la fase orgánica en una centrífuga de vacío y resuspender el residuo en 20 μl de acetato de etilo. De ahí se tomaron alícuotas para su análisis por TLC y HPLC.

Para la TLC se utilizó como adsorbente gel de sílice sobre un soporte de aluminio (SDS, Francia), siendo la fase móvil utilizada una mezcla de diclorometano y metanol en proporción 9:1 v/v. Para el análisis por HPLC se usó una columna Symmetry C18 (Waters) con acetonitrilo y 0,1 % trifluoro-acético en agua como solventes. La elución de las muestras se llevó a cabo con un gradiente desde 10 % al 100 % de acetonitrilo en 30 minutos. La tasa de flujo fue de 1 ml/min realizándose el monitoreo por la absorción a 280 nm.

En el análisis por TLC se observó la aparición de una mancha que se correspondía con la de eloramycin pura cargada en el gel como control (Fig. 13). En cuanto al análisis por HPLC, se detectó un pico claramente mayoritario cuyo tiempo de retención y espectro de absorción coincidían con el de la eloramycin utilizada como control (Fig. 14).

Descripción de las figuras

Figura 1. Esquema del mapa genético de la ruta de biosíntesis de oleandomicina en *Streptomyces antibioticus*, mostrando las pautas abier-

tas de lectura correspondientes a los distintos genes y las regiones cromosómicas en los insertos presentes en los clones cosAB61, cosAB63 y cosAB35. Se indican las regiones correspondientes a los fragmentos *Sst*I de 7,6 Kb, *Sph*I-*Xmn*I de 4,1 Kb y *Bg*/I de 5,84 Kb. Las abreviaturas de la figura son convencionales para endonucleasas de restricción. B = *Bam*HI; S = *Sst*I, L = *Sal*I; H = *Sph*I; X = *Xmn*I; G = *Bg*/II.

Figura 2. Alineamientos entre las proteínas reivindicadas y distintas proteínas homólogas de otros organismos productores de antibióticos. A: OleW. B: OleV; C: OleL; D: OleS; E: OleE; F: OleU; G: OleN1; H: OleT.

Figura 3. A: Plásmido pOLV. B: Mapa de restricción del inserto en pOLV. Las abreviaturas de la figura son convencionales para endonucleasas de restricción. B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; G, *Bg*/II; K, *Kpn*I; P, *Sph*I; S, *Sst*I; X, *Xmn*I.

Figura 4. A: Plásmido pOLE. B: Mapa de restricción del inserto en pOLE. Las abreviaturas de la figura son convencionales para endonucleasas de restricción. B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; G, *Bg*/II; K, *Kpn*I; P, *Sph*I; S, *Sst*I; X, *Xmn*I.

Figura 5. A: Plásmido pRHAM. B- Mapa de restricción del inserto en pRHAM. Las abreviaturas de la figura son convencionales para endonucleasas de restricción. B, *Bam*HI; E, *Eco*RI, G, *Bg*/II; K, *Kpn*I; P, *Sph*I; X, *Xmn*I.

Figuras 6. A y B. Construcciones generadas como pasos intermedios en la creación de la cepa NAG2. Las abreviaturas de la figura son convencionales para endonucleasas de restricción.

Figura 7. Análisis por cromatografía en capa fina (TLC) de los productos de la biotransformación de eritronólido B en L-olivossil-eritronólido B. La flecha indica la movilidad del L-olivossil-eritronólido B. EB, eritronólido B. 5 y 6 corresponden a dos clones independientes. Los signos + y -- indican que el clon IAGS1 se incubó en presencia y ausencia, respectivamente del EB.

Figura 8. Análisis por HPLC de los productos de la biotransformación de eritronólido B en L-olivossil-eritronólido B. EB, eritronólido B. a, nuevo compuesto glicosilado (L-olivossil-eritronólido B).

Figura 9. A: Análisis por HPLC-espectrometría de masas del nuevo compuesto glicosilado. B: Estructura del nuevo compuesto glicosilado (L-olivossil-eritronólido B).

Figura 10. Análisis por cromatografía en capa fina (TLC) de los productos de la biotransformación de eritronólido B en L-oleandrosil-eritronólido B. La flecha indica la movilidad del L-oleandrosil-eritronólido B. EB, eritronólido B. 1 y 2 corresponden a dos clones independientes. Los signos + y -- indican que el clon IAGS2 se incubó en presencia y ausencia, respectivamente del EB.

Figura 11. Análisis por HPLC de los productos de la biotransformación de eritronólido B en L-oleandrosil-eritronólido B. EB, eritronólido B. b, nuevo compuesto glicosilado (L-oleandrosil-eritronólido B).

Figura 12. A: Análisis por HPLC-espectrometría de masas del nuevo compuesto glicosilado. B: Estructura del nuevo compuesto glicosilado (L-oleandrosil-eritronólido B).

Figura 13. Análisis por cromatografía en capa fina (TLC) de los productos extraídos de la cepa LRR.

Figura 14. Análisis por HPLC de los productos extraídos de la cepa LRR.

Figura 15. Estructura de la 8-demetil-tetracenomicina C y de la eloramicina.

REIVINDICACIONES

1. Un fragmento de ADN de 9.6 kb del cromosoma de *Streptomyces antibioticus* ATCC 11891 con la configuración de sitios de restricción que se muestra en la Figura 1.

2. Un plásmido pOLV productor de L-olivosa **caracterizado** por portar el fragmento de ADN *Sst*I de 7.6 kb en el vector plasmídico pAGO.

3. Un plásmido pOLE, derivado de pOLV, productor de L-oleandrosa **caracterizado** por portar, además del fragmento de ADN *Sst*I de 7,6 kb, el gen *oleY* de la ruta de biosíntesis de oleanomicina bajo el control del promotor *ermE***p*.

4. Un plásmido pRHAM productor de L-ramnosa **caracterizado** por portar el fragmento de ADN *Sph*I-*Xmn*I de 4.1 kb en el vector plasmídico pEM4 bajo el control del promotor *ermE***p*.

5. La cepa de *Escherichia coli* que contiene el plásmido pOLV denominada EOLV.

6. La cepa de *Escherichia coli* que contiene el plásmido pOLE denominada EOLE.

7. La cepa de *Escherichia coli* que contiene el plásmido pRHAM denominada ERHAM.

8. Un plásmido pNAG2-3 productor de la glicosiltransferasa OleG2, que confiere a la cepa que lo porta la capacidad de glicosilar anillos macrocíclicos lactona y **caracterizado** por portar el fragmento de ADN *Hind*III-*Eco*RI de 1.72 kb con el gen *oleGII* bajo el control del promotor *ermE***p*, en el plásmido pKCE.

9. Una cepa de *Streptomyces albus*, denominada NAG2, portando el gen *oleGII* y capaz de glicosilar anillos macrocíclicos lactona.

10. Una cepa de *Streptomyces albus*, denominada IAGS1, obtenida al transformar la cepa NAG2 con el plásmido recombinante pOLV.

11. Una cepa de *Streptomyces albus*, denominada IAGS2, obtenida al transformar la cepa NAG2 con el plásmido recombinante pOLE.

12. Una cepa de *S. albus*, denominada LRS1, obtenida al transformar *S. albus* (cos16F4) con el plásmido pRHAM.

Figura 1

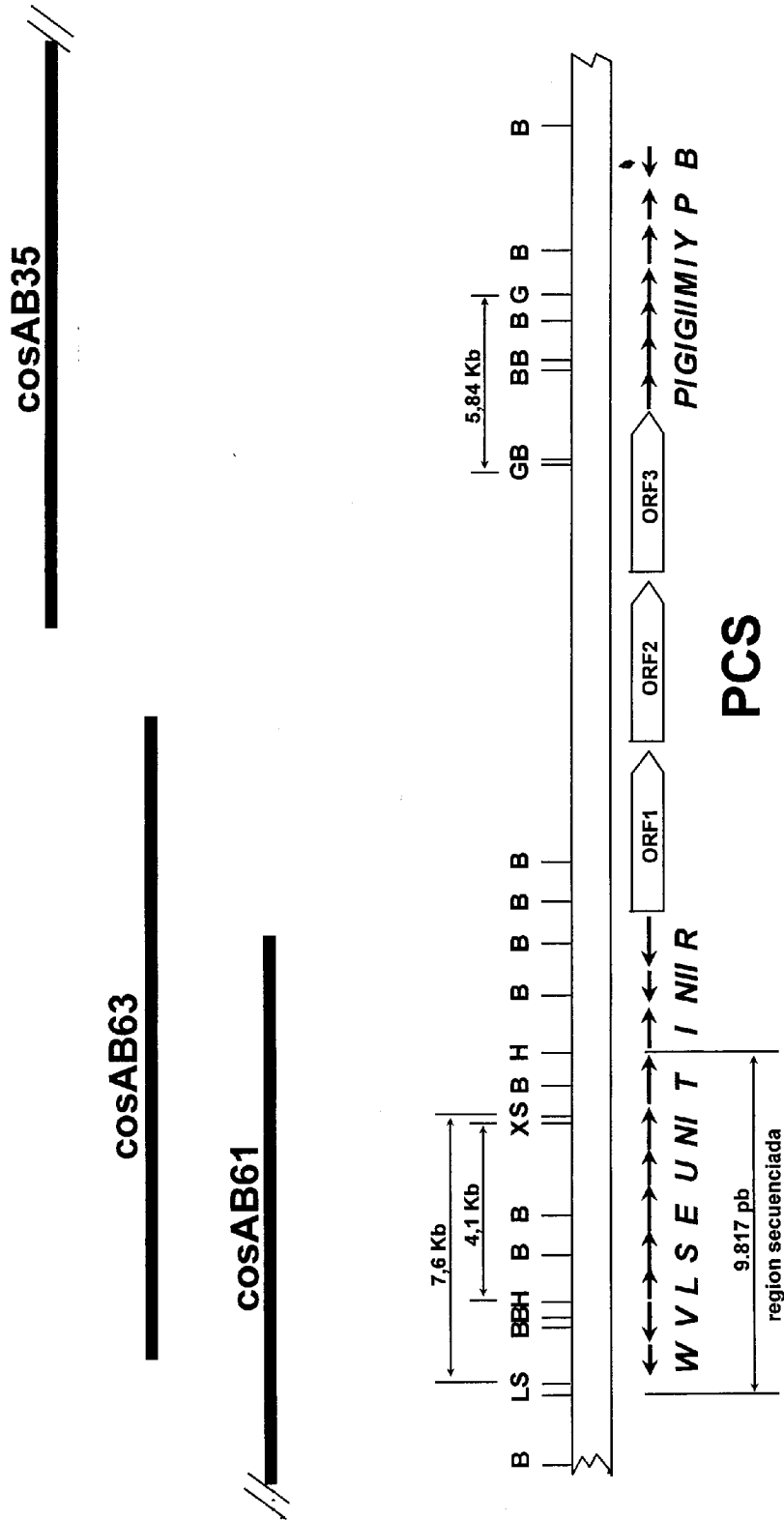


FIGURA 2A

```

LanT      1 .....MKTVRIGVLGCADIARRRMLPAMAAEPGIIIAAVALRDSARAGELAG
Oxidoreductase 1 .....MAPLRIGIMGCASIAVRKVLPAAMAASPRTEITATASRNFGKAAEIAH
GraORF26  1 MNAGHTETVRLRIGVAGCADIALRRMLPAFAASPHTEPTAVASRSSEKARAAAE
OleW      1 .....MPSPRLLRFVGLGADIALRRITVPALLAHDPVTVVAVGSRDTARAARFAA
RdmF      1 .PMPEHRQQRALRMGVICTANIAIRRTMPVLAHHDHVDLVAVARDKARAERVGA
consensus 1          mk lRiGvIGcAdIAVRrmlPamaA priei AvaRdsarAg lag

```

```

LanT      48 RFGARPVTGYAELLERDDIDAVYVPLPAALHARWTEAALRRGKVLAEKPLTTSL
Oxidoreductase 48 AYGCRAVEGYSALLDLDEVEAVYIPLPNAHHAGWIELALTACKVLAEKPLTTSV
GraORF26  56 TFGCAAVEGYDALLERDVDAVYIPLPVALHAPWTERALRAGKVLAEKPLTARA
OleW      50 AFGCEAVPGHQALLDRDDIDALYVPLPVMVHTPWVEAALLRGRVLEKPLTATR
RdmF      55 AFGCGVGDYAALVERDDIDAVYIPLPPGMHHEWALRALRSGKVLVEKPMSDTY
consensus 56 afGc aV gy aLlerddidAvYiPLP alHa W e ALr GkVLaeKPlt s

```

```

LanT      103 AESRRLLIALAQESGLALMENVMFIHHSQHDVVRKLVWDCVIGETRAFHAFAIPR
Oxidoreductase 103 SRICELIAAAGAAGLVLMENVMFLHHSQHTAVRDLACGAIGELRAFHAFAVPA
GraORF26  111 ADTARLLDLARERGLVLAEENYLFVHHSAYTAVRDLVDACAIGDRAISASFTIPP
OleW      105 SGAEDLIALARSRGLVMENFTSLHHAQHGTVDLLRDTGTIGERSLSAFTIPP
RdmF      110 EKTLELMSTASELGLVLAEENFMFLHHSQHAAVRAMLDSEVGEIRLFGSGFAVPP
consensus 111 t eLialA e GLvLmENymflHHSqh aVrdll dg iGeIRafsaafaiPp

```

```

LanT      158 LPDDDIRYVPELGGGALWDITGVYPVRAALHFLGDNLOVLGAMLIQEPGRVRVDTAG
Oxidoreductase 158 RPAGDIRHRAELGGGALDITGVYPVRAAMSFLGSEVDVMSAVLIRRHCRPVDSAG
GraORF26  166 RSADDIRYRADLDGGGALLDITGVYPLRLASLLLGSELVRCAVLHDTVRGVDLGG
OleW      160 KPEGDIRYQPDVGGGALLDITGYPLRAALHFLGPDLHAAGAVLIRRRNRNVVVS
RdmF      164 LAPESFRYQALGGGALLDVGVYPLRAAQLYLTGELDVLGACLEVDETTADVAG
consensus 166 rp ddiRy pelgGGALLDiGvYPLRaAl fLg el vlgAvLre r vdlag

```

```

LanT      213 SALLRTPE.GVGVQLTFGLDHGYRSAYELWGSQGRITVERAFTHPADHRPLIRVE
Oxidoreductase 213 QALLCTAD.GVSASATFGIDHAYRSQVELWGSEGRIVLDHAFTPPADHLPVVRIE
GraORF26  221 SALLGDPGTGVSAQLVFCMEHAYTAGWRLLGSEGLTLDRAYSQAPACHRPVIRIE
OleW      215 HVLLITTPH.GVVAELAFGMEHAYRSEYILEGTAGRLRLDRAFTPETHRPVRVEIH
RdmF      219 SVLLSD.DRGVTAQLDFGFEHSYRSTYALWGNRGRVSVVRAFTPEQLKPVVRIE
consensus 221 saLL tpe GVsaql FGleHaYrsay lwGs GritldrAftPa hrPvvrie

```

```

LanT      267 RR.GVEEISLSPDDQVAATLRAFTAAVRDG.....AAR SVCV.RQAEIL
Oxidoreductase 267 RRSQVDEILPLPDDQVANTLTAFAAAVRSG.....RLPNDNDVARQAVLV
GraORF26  276 RPDGTEERILPAHQDATAAFAAEAVRRAGQGAGQDKGRSSGAAAVLROAELV
OleW      269 QQDALDITDLPPDAQFANLVRDFVLAVREGP.....GRLTQHADAVROADLV
RdmF      273 QQDVVTERSLPEDNOVENAMDAFVRAALTNTG.....PLTTSATQOQALLI
consensus 276 r dgveei LppddQvan l aF Avr g v RQAElv

```

```

LanT      310 HELRERA.....LPSRF.....
Oxidoreductase 312 DDIRTKARLYVDHAPEPVG.....
GraORF26  331 DAVRQAAHLVKI.....
OleW      317 BRVMAVARVRWC*.....
RdmF      320 DRVRRARLIGDPKSRPHDVLAQDTGLS
consensus 331 d vr Arl p

```

FIGURA 2B

DnmT	1	MTAQIARSVLARDGLCSGMDRFWAWYADRSAQVVHRTE
ORF3C5	1	MRRHSAAATTVQLARSVLARDGLCSGMDRFWAWYADERSARVVHRTE
SnoH	1	MTKLSAHPAAPHGAVPDPLRLAASARSAGVWLPRTTEVHHWLTIVGQHARAQVE
LanS	1	MLSSLVRTGSGTGRRLRPDHPDPSVAERIAASAAAVTGASLRTEDEFPQWLEGERRAHRFTVD
OleV	1	MIWGIPAMSERMGSVPTAGSEVS.STCARLSWLDARRRANRLTVE
GraORF27	1	MRITDTAGAHAWFAERGAHRYRIT
EryBVI	1	MGDRTGDRITIPESQATATRFLLGCGIPTATAETHDWLFRNGAEQRLLEVA
consensus	1	h t i a s a g l s t f w l a r a r v e

DnmT	39	RTPLDILKGSRHVVTGTVSHHTGRFFSIEGLDVHIPCAPVPRNSQPIINOPE.VGILGF
ORF3C5	47	RTPLDILKGSRHVVTGTVSHHTGRFFSIEGLDVHIPCAPVPRNSQPIINOPE.VGILGF
SnoH	56	RVPLAELDGWLRDPATGNTAHRSGCFFTVVEGLDVTIPRAPVPHWEQPIINOPE.VGILGT
LanS	61	RIPFDALDGWSFDDATGNLVHESGRFFSVEGLHVTRDEGPHRETYQPIIKOPE.VGILGI
OleV	45	HVPFRELSCWQFDENTGNLRHTSGRFFSIEGLRVTRDHCWFGSWTQPIIRATGKIGILGL
GraORF27	26	RTPLHDLGWTDBASGDVHRHESGRFFSIEGLRYGRQEPDGPANTQPIIROPE.TGVLEV
EryBVI	51	RVPFSAMDRWSFQPEDGRLAHESGRFFSIEGLHVTRNFGWRRDWIQPIIVOPE.TGFLCL
consensus	61	riPl dldgws dp tg v HhsGrFFSiEGLhvh ap p WsQPIi qpe vGILGi

DnmT	98	LVKERHGVHLHCLVQAKFEPGNPGGLQLSPTVQATRSNYTRVHGSKATPVLHERDTABR.
ORF3C5	106	LVKERGGILHCLVQAKFEPGNPGGLQLSPTVQATRSNYTRVPGGKTIPSWTSATPPDR.
SnoH	115	VVKEFDGVLHCLVQAKLEPGNCNGTQLSPTVQATRSNYTRVHRCRPVPVYLEHFQDPARRS
LanS	120	LVKEFDGVLHFLVQAKMEPGNRRNLQLSPTVQATRSNYTKVHKCADVKVLEYETQP.GRG
OleV	105	LVKRFDCILHVLVQAKNEPGNIGGLQLSPTVQATRSNYTRVHRCGGVRLLEYFASPRCRG
GraORF27	85	LTKWFDGVPHLLVQAKMEPGNINILQVSPTVQATESNYTRVHHCSPVRVIDHELTPGAGD
EryBVI	110	LVKEFDGVLHVLVQAKAEPGNINAVQLSPTVQATRSNYTVHRCGSKVRITIEYENGTR.PS
consensus	121	lvKefdgvlh lvQAK EPGN ngiQLSPTVQATrSNYTrVhrG vkyle f p r

DnmT	157	QVVADVLOSEQGSWFYRKRNRNMIVQVIDEVPLHEDFHWLTGLQLHRLIGVENLVNMDAR
ORF3C5	165	QVVADVLOSEQGSWFYRKRNRNMIVQVFDEVPLREDFHWLTGLQLHRLIGVENLVNMDAR
SnoH	175	RILADVROSEQGSWFHHKRNRMVVEVEDIDVHDGFCWLSLGLHRLITVDNLINMDTR
LanS	179	RFIADVLOSEQGSWFHKKRNRMIVAVGDVPLDDDFCNLTGLQIGQLHRDNVNMDSR
OleV	165	RVLADVLOSEQGSWFLHKKRNRMVVBALDDVPLDDDFHWISLGLRKLILRPHLVNMDTR
GraORF27	145	RVHYDALQSEQGSWFLGKRNRNTVVETTGEIPVHEDFCWVPRPVMAELLRVNINNMDSR
EryBVI	169	RTIADVLOSEQGAWFLRKRNRNMVVEVFDDLEBHPNFRWLTVAQLRAMHHDNVNMMDR
consensus	181	rvvaDvlQSeqGSWF rKrNRNMvVev ddvplhedFhwltlgqlh l vdnlvNMdTr

DnmT	217	TVLACLFASEGAHPLADAEPAGADPPGG.GHPVVPARPDDGGEG.RVDTGFRHSLSVRSCA
ORF3C5	225	TVLACLESRARERARWPTRSPPELTAPGASHPVVPVSLGPTAAGLRWTGHHHSLSVRSCA
SnoH	235	TVLSCLE.....FAHGLAAVAEPGADP.....ERRALVASCA
LanS	239	TVLAC.....APFPD.....D.....
OleV	225	TVLSCLEPDPAPDGRQPPAPAAPFAA.....AVTRSLT
GraORF27	205	TVLACLEDDPGEGSVPRRAVEKP.....
EryBVI	229	TVLACMPTAVERD..RADDVLARLPEGS.....EQARLLHSFI
consensus	241	TVLacIp a a g f lvrs

DnmT	275	AAEGSLHSTVDIVSWIADLRRTDVVT.RPA.ALNALPHWYERDG..AAAHESGRFLEV
ORF3C5	285	AAEGSLHSTVDIVSWIAT..CAAGPMW.SPARGANSPLHWIERDG..VATRAGRFLLEV
SnoH	268	PDGYSRHSGLDLLSWITDVRTTTE.VR.TEMVPLDGLRSWRRTE..RISHEDGGFFDVI
LanS	250	.GADALLSDTELWSWFTAERSRHDVRAERVPLHD..LPCWVRGTS..TIDHELGRYFRVV
OleV	258	RGATALHTMGEILGWITDERSRRELVOORVPLEETAFAFGWRRDDH..ATAHKDGDYFRVI
GraORF27	228	LHDTAALLHWFTIGARVRH..RPERTTLPISRVCGWRRDDORGETVHETGRYFRIT
EryBVI	265	GAGTPANMNSLLSWISDVRARREFVQRGRPLDIERSCWIRDD..GHEHEKKYFDFV
consensus	301	ag lhs dllswitd rsrhd v r v l gw r d i he gryfevm

ES 2 165 278 A1

DnmT	331	AVDVTAA	SREVPGWSQPMIEPKDQGVAAFLVRRIDGVLHVL	AHARVEPCYVDV	VETAPT
ORF3C5	340	AVDVTAA	SREVPGWSQPMIEPKGRGVAAFLVRRIDGVLHVL	GTARVEPCYVDV	VETAPT
SnoH	324	GVRVTR	GREVAEWTPMIEPHAKGVVAFVRFIEGVLHVL	VHARVEPCYVDI	VELAPT
LanS	305	AVSVEAG	SREVITGWTQPLFEPLGLGVTAFLTRRIGGVPHVL	VHARVEGCFLD	TVELGPTV
OleV	316	GVSVRAS	SREVSSWSQPLAPVGPGLAAFVTRRIRGVHVL	LHARTEAGLLNG	PEMAPTV
GraORF27	281	GVDVEAD	SREVTSSWSQPLAPVGRGVVAFVSKEIHGERHLLV	QARAEACTFD	AVELGPTV
EryBVI	323	GVTVATSD	REVNSWMQPLLSPANNGLLALLVKDIGGTLHALV	QLRTEAGMDVA	EELAPT
consensus	361	gV	a sREV WsQPMieP g Gv AflvrrI GvlHvLvhaRvEgGyv	dvvelaPTV	

DnmT	391	QCTPGSLHALPAE	ARPRFLDAVLEAPPERVRYATV	.LAE	EGGRFYHAVNTY	MIVEA.DHD
ORF3C5	400	QCTPGSLHALPAG	ARPRFLDAVLEAPPEAACATITDLAE	EGGRFFHAVNTY	MIVEA.DDD	
SnoH	384	QCTPDSYERLP	ARARPLFLDEVLPARADRVREDA	.EL	SEEGGRFYHARRYLVAET	.DLA
LanS	365	QYTPDNYGHLT	GEDRPPFLDLVLDADPARIQYEAVH	.SEE	GRFLNAESRYLLTEADEEQ	
OleV	376	QCRPLNYRAVPA	EYRPAAYLDYVLSADPGRIYDTLQ	.SEE	GRFFHAENRYVVVEA.EDD	
GraORF27	341	QCNPGNLPD	.CAPRPPYLDITVLTRPEQVLEDTVH	.SEE	GRFYHAENRYLVLDG..DD	
EryBVI	383	HCQPDNYADAP	EEFRPAYVDYVLNVPRSQVRYDAWH	.SEE	GRFYRNEHRYMLIEVPA.D	
consensus	421	qctP ny lpae	RP fld VL a pervrydtv	SEEGRFYhaenryMivea	ddd	

DnmT	449	IP.DGG.EYRWLTLHQLVGLLRHSHYVNVQARTLVACLS	SVG.SP	VTS	AVPSAPPRR
ORF3C5	459	IP.DGG.EFRWLTLHQLVELLRHSHYVNVQARTLVACLS	SVGHRPS	TS	AVPSAPPRR
SnoH	442	AGFDHP.DFRWVTLAQLVELLRHSHYVNTQARSLVACLYGL		AT	APPRR
LanS	424	APLDPPAGFQWVTPAQLTSLVRHGCHYVNVQARTLLACL	NATAVLSG		
OleV	434	FPVEVPDRDFRWLTLHQLLALLHSHYVNVVEARSLVACTQALS*			
GraORF27	396	VPVDVPEDYTWMTVYRQLTRAGRIGNLVDFVEARTLLACV	RTLDPHGASR		
EryBVI	441	FDASAAPDHRWMTFDQITYLLGHSHYVNIHVRSILACAS	AVYTRTAG		
consensus	481	p d p dfrWlTlhQlv lrrhshyVnvqArtlvACl	gl		

FIGURA2C

DnmU	1	MKARELAVQ	GAYTFEPEVFP	DERGLFVSP	FREDAFTA	AAVGHPLFP	VRQ	N
EryBVII	1	M	AGGFETPD	PKQDRRGL	FVSPLQDE	AFVGAVGHR	.FPVAQ	N
OleL	1	..MELLDV	DGAWLYTPE	IMRDERGE	FLEWFRGR	TFQEKIGHPL	.SLAQAN	
StrM	1	..MRPLSV	QGAWLSE	TRAFADD	RGEFQELY	SARSLRGAL	GYDP.GVAQ	VN
consensus	1		v Gay	D RG F		VG	v Q N	

DnmU	51	HSRSRRGV	VRGVHYT	VTTPPGSA	KYVYCARG	RSLDIVVD	VVRVGSPT	YGRWD
EryBVII	43	HIVSARGV	LRGLHFT	TTTPPGQ	KYVYCARG	RALDIVVD	IRVGSPT	FGKID
OleL	48	CSVSRKA	FCAAST	SPTPPPGQ	AKYVTCAS	GTVLDVV	VDRVGSPT	FGRA
StrM	48	RSVSRRGV	LRGVHFA	QLPPSQAK	YVTCLSG	AVLDVV	VDIRTGSPT	YRADE
consensus	51	S rg	g	PP	KYV C	G	LDivVDv	GSPTY W

DnmU	101	AVELEPRE	FRAVYFP	VGVGHA	FVALEDD	TVMSYMLS	GGEYVQAN	ELAVSVL
EryBVII	93	AVEMDTEH	FRAVYFP	RGTAAHAF	IALEDDT	LMSYLIV	STPYVAEY	EQAIDF
OleL	98	AVRLDAAR	HQGLYLA	EGLGHAF	MALTD	DATVVYL	CSQPYVAE	AERAVDPL
StrM	98	AVRLDDP	.HRSLY	VEAGLGH	SFMALTD	DAVVVYL	TSQGYAAG	REHGVPFL
consensus	101	AV le	vY	G gH	FvAL	DD	m Ym S	Y E av

DnmU	151	DPALGLP	VPFGDLE	PL.LSGRDR	APPLEQARA	AGTLPEYA	ACRAVESEL	W
EryBVII	143	DPALGLP	WPADLEV	V.LSDRDT	VAVDLET	ARRRGML	PDYADCL	GEE...
OleL	148	DPALGIE	WPPTDID	IVPVGEG	TPTHRPW	RRPRRPG	ILPDYEG	VPGA...DH
StrM	147	DPDLGIA	WPDGIEP	V.LSEKDR	QAPGIAE	MERRGL	LPDYEEL	.A...FR
consensus	151	DP lGl	P le l l			G LPeY		

DnmU	200	PPAGSRGDG..
EryBVII	188	PASTGR.....
OleL	195	RGGGRRGTGP*
StrM	192	RSLCERGTG..
consensus	201	R

FIGURA 2D

MtmD	1	MKALVLSGGSGTRLRPITHTSPKQLVPVANKPVLfYALEDIAQAGITDVG
OleS	1	VKALVLAGGSGTRLRPITHTSAKQLVAVANKPVLfYGLEAIAAGITDVG
StrD	1	MKALVLAGGTGTRLRPITHTSAKQLVPVANKPVLfYGLEAIRAAGIIDVG
DnmL	1	MKALVLSGGSGTRLRPFTHTSPKQLVPVANKPVLfYVLEDIAQASITEVG
consensus	1	mKALVL GGsGTRLRP THTS KQLV VANKPVLfY LE I A I dVG
MtmD	51	IVVGETAREIIEDAVGDGSKFGLQVTTYLPQEKPLGLAHAVLIARDYLGDdD
OleS	51	LIVGDTAGEVPRAVGDGAKFGLDITYIEQSRPLGLAHAVLIAHTYLGDD
StrD	51	IVVGLTADETVAAVGDGSRFGLKVSYIPOSKPLGLAHCVLISRDFLGEID
DnmL	51	IVVGETSNEIRKAVGSGDRFGLRVTTYLPQEAPLGLAHAVLIARDYLGEID
consensus	51	ivVGeT Ei AVG G kFGL vtYl Q PLGLAH VLI r yLGddD
MtmD	101	FVMYLGDNFVVGGIAGLVDEFRAD.RPDARILLTPVPDPTAFGTAEIDGE
OleS	101	FVMYLGDNFVVGGIDDLVRTFRDGRPAARILLTHVSDPSGFGVAELDDD
StrD	101	FIMYLGDNFVVGVDVSVREFRAA.RPDAHLMLTRVPEPRSFVGAEISIS
DnmL	101	FVMYLGDNFVVGGIAGNSSTFRAE.RPDAQILLTRVSDPSSFGVAEIGCD
consensus	101	FvMYLGDNFvVG i FR RP A illT V dP FGIAEL
MtmD	150	GRVVRLEEKPTHPKSDMAVIGVYLFITPLVHEAVRAIEPSWRGELEITHAI
OleS	151	GRVVGLEEKPRHPKSDIALVGVIFFTPAIHEAVRAIEPSWRGELEITHAI
StrD	150	GOVLGLEEKPAHPKSDIALVGVIYLFSPAIHEAVAAITPSWRGELEITDAV
DnmL	150	GRVVALEEKPRHPRSDIAVVGIIYLFITPVVHEAVRALTPSRRGELEITDAL
consensus	151	G Vv LEEKP HPkSDmAviGvY FtP vHEAV Ai PS RGELEIT Ai
MtmD	200	QWLIDNRHDVVRSTVIHGYSWKDTGNVMDMLEVNRTVLEGVPECTEGPVDAE
OleS	201	QHLIDNGADIQSMVIEGYWKDTGNVADMILEVNRTVLEDLEPRIEGTVDFH
StrD	200	QWLIDAGRDVVRSTVISGYWKDTGNVTDMLEVNRLVLETTETPCDGLVDER
DnmL	200	QWLLIDGPYDVRYTTISGYWKDTGNVADMILEVNRAVLDDGIEPGMEGQADAA
consensus	201	Q LiD Dv I GYWKDTGNV DMLEVNRL VLe EP eG D
MtmD	250	SEVIGRVRIEAGARVNSRIVGPAVIGSGTVISGSYIGPYTSVSEGCRIE
OleS	251	TVVIGRVVVGEGARVTNSRIMGPAIIGAGPEISDSYIGPFTSVGDNCRIT
StrD	250	SDLIGRVLVEEGAEVRNSRVMGPTVIGAGTRVTNSYVGPFTSLAEDCVVE
DnmL	250	SELVGRVRIEAGAQIRASRIVARRHRAGRVTDRTS...ALHVDRGDCSIE
consensus	251	s viGRV i GA v SRivg g S C i
MtmD	300	DSEIEFSIVLRDSRVRCVQRVVRGSLIGRSVIVAPAPRKPACTRLVLGDHS
OleS	301	GSEMEFSIMLAESAITGVRRIEGSLIGRNVQVTQSLHAPNAHRFVLGDHS
StrD	300	DSEVEFSIVLRGASISGVRRIEASLIGRHVQVTSAPEVPHANRLVLGDHS
DnmL	297	TARSSLHHAGRLPA.HGTRRVQHSLLIGRNVIVAPAPRVPAQSRLTLGDHS
consensus	301	G Rv SLiGR V V P g R vLGDHS
MtmD	350	EGQISS.
OleS	351	KVEIQS*
StrD	350	RAQISS.
DnmL	346	RVEISS.
consensus	351	I S

FIGURA 2E

```

MtmE      1 MTTTSLVTGGAGFIGSHYVRTLLGP...RGVPDVTVTVLDKLTYAGTWT
StrE      1 .MTTHLLVTGAAGFIGSQYVRTLLGP...GGPPDVVVLTALDALTAYAGNPD
OleE      1 ...MNLVTGAAGFIGSRYVHHLLLEATRRGREPAPVITVLDKLTYAGVIG
TylA2     1 ...MRVLVTGGAGFIGSHFTGQLLTGAYPDLGATRTV.VLDKLTYAGNFA
consensus 1      iLVTGgAGFIGS y LL v LD LTYAG

```

```

MtmE      48 NLAEVSDSDRFREVRGDI CDAPLVDDLEAVHDQVVHFAAESHVDRSLGA
StrE      47 NLAAVRGHPRYRFERGDI CDAP.GRRVMAGQDQVVHLAAESHVDRSLLA
OleE      48 N...VPDDPAVTFVRGDIADAPLVDSLMAEADQVVHFAAETHVDRSLTEP
TylA2     47 NLEHVAGHPDLEFVRGDIADHGWWRRLEGEVGLVVHFAAESHVDRSLTESS
consensus 51 N V F RGD I D ll VVH AAeshVDRSi

```

```

MtmE      98 ADFVRTNVITGTQTLDDAALRQGIETFVHISTDEVYGSIDAGSWPETAPLS
StrE      96 SVFVRTNVHGTQTLDDAATRHGVASFVQVSTDEVYGSLEHGSWTEDEPR
OleE      95 GTFVRTNVLTGTQVLLDAALRHGVGPFVHVSTDEVYGSIEHGSWPEHQPC
TylA2     97 EAFVRTNVEGTRVLLQAAVDAGVGRFVHISTDEVYGSIAEGSWPEDHPA
consensus 101 FVRTNV GT LL AA Gi FV iSTDEVYGSi GSW E Pv

```

```

MtmE      148 PNSLYSAKASSDLVALAYHRTHGLDVRVTRCSNNYGS HQFPEKVIPLAV
StrE      146 PNSPYSAKASGDLIALAHVSHGLDVRVTRCSNNYGP HQFPEKLIPLRI
OleE      145 PNSPYSAKASSDLLALS YHRTHGLDVRVTRCSNNYGP HQFPEKIVPLAV
TylA2     147 PNSPYAATKAASDLLALAYHRTYGLDVRVTRCSNNYGP HQYPEKAVPLAT
consensus 151 PNS Y A KA DLvAL H t GLDVRVTRCSNNYG hQfPEK iP P

```

```

MtmE      198 TSLLDGREVPLYGDGNTNRDLHVDHVRATELVRTGGRAGEVYNIGGCT
StrE      196 TLLMDGHRVPLYGDGLNVREWLHVDDHVRGIEAVRTRGRAGR VYNIGGCA
OleE      195 TNLLDGLRVPLYGDGLNVREWLHVDDHCLGVDLVRTQGRPGEVYHIGGCT
TylA2     197 TNLLDGLPVPLYGDGNTREWLHVDDHCRGVALVGAGGRPGVTVNIGGCT
consensus 201 T LLDG VPLYGDG N RdWLHVDDH ai V GR G vY IGCC

```

```

MtmE      248 ELSNKELTQLLLACGAGWDRVRYVDRKGHD RRYSV DCTKIRRELGYRP
StrE      246 TLSNKELVGLLLEAAGADWGSVEYVEDRKGHD RRYAVDSTRIQRELGFAP
OleE      245 ELTNRLTGLLLDAFGVGWDVDPVADRKGHD RRYALDCAKADELGYRP
TylA2     247 ELTNAELTDRILELCGADRSALRRVADRKGHD RRYSV DTTKIREELGYRP
consensus 251 LsN eL lLd G v V DR GHDRRY vD k ELGy P

```

```

MtmE      298 AREFGDALAETVAWYRHHRAWWEPLTRAYCAVAA.....
StrE      296 AVDLADGLAATVAWYHKHRSWWEPLVPA.GSLPA.....
OleE      295 RRDFAEGLARTIDWYRDNRAWWEPLKKRPAGPAAPPRGSGP*
TylA2     297 RTGITEGLACTVAWYRDNRAWWEPLKRSPGRELERA.....
consensus 301 daLa Tv WYr R WWEPL g

```


FIGURA 2F

OleU	1	MRWLTGAAAGMLGRELVRRLAENEEDVAALGHD.....
StrL	1	...MSPYPRPRWLVTGASGMLGRELTPLLDRGAAVTALGRG.....
DnmV	1	MRVVVLGATGSGVGRQVCAAYQAHGWDVHGVARRPAPHLSC
EryBIV	1	MNGISDSPRLITLLGASCFVGSAYLRELDRHPVRLRAVSRGGAPAVPG
consensus	1	r li GASG lGr l l r v algr

OleU	34	HLDVTRPSAVRAALAEHRPGIVVNCAAYTAVDD....AETDEAAA
StrL	40	HLDITDGAAVRSVAEHRPAVVVNCAAWTAVDE....AESEPALA
DnmV	42	GFTELDIAAA..APGRIATVL..GDLPAVVVNAAAGG....WGDTEEMT
EryBIV	51	AAEVEDLRADLLEPGRAAAIEDADVIVHLVAHAAGGSTWRSATSDPEAE
consensus	51	L R A a ivv a A aetd

OleU	75	ALLNAEAPRLLAEGLRPHREHGLVHLSTDYVF..PGDARTPYAEDHPTAER
StrL	81	MAVNGEGPRHLAQACRA.VGAVLLQLSTDYVF..PGSCGRPYREDHPTGER
DnmV	84	YSHLRLVRLVEALALLPFRPRLVHLGSVHEYGPVPAGTLLHEDLLPEEV
EryBIV	101	RVNVGLMHDLVGAL.....HDRPRSTPPVLLYASTAQAA.....NPSAA
consensus	101	a rlla r lv l t vf p ag ed

OleU	124	SAYGRTKRDGEQAVLTALP.T...ATVLRATWLYGRTGRS.....FVRT
StrL	129	TVYGCTKRAGERAVLEVL PDT...GYIVRTAWLYGAGGN.....FVAK
DnmV	134	TPYARVKLETSSAVLTARAGVLDVAVLRAANMSPHPPQESF.LAALMA
EryBIV	140	SRYAQQKTEAERILRKATDEGRVRGVLLRLPAVYGQSCPSGPMGRGVMA
consensus	151	s Yg K dge avl a a vlR a lyG gp v

OleU	164	MIEREARGGAIDVVAQRCOPTWTGDLADRIIAYGRHP....GVHGILMA
StrL	170	MIRLEADEDTVLVDDQHQOPTWTADLADRLAALGAAALAGTAPAGIYMA
DnmV	183	RISTAFAHGGRLELSVADARRDEI.DVRDVAQAVVRA.GRAPAVGGLVNN
EryBIV	190	MIRRALAGEPLTWHDGGVRRDLL.HVEDVATAFAAALEHHDALAGGTWA
consensus	201	mI i vv d g w dl D Avg a avaGi a

OleU	210	TNAG.....SATWYDLAQEVFRLLDADPGVRPTTCAAFRRPAPRPAYS
StrL	220	TNTG.....GTTWNAIAPETFRLLGADPARVRPTTSLALARPVRPRY
DnmV	231	IGRGDAVPIGDLV...GWLLEAAAFPEDRVDRREAPVRSKGGDWTRL
EryBIV	239	LGADRSEPLGDIFFRAVSGSVARQTGSPAVDVVTVPAPEHAEANDFRSD
consensus	251	g g w l v r g rv g r a v

OleU	255	LGHDRWRGTGLAPLRDWRSAIREAFPDII..LAEEHPTRRGAA*
StrL	265	LDQSRWKAACGLEPLRHWRAALTESFPALCGRAGRVPVGPGR....
DnmV	277	GRA..RRLLSWAP....RIGLRDSVHSMWRTHAGAPA.....
EryBIV	289	DSTEFRSRTGWRP....RVSLTDGID..RTVAALTPTTEH....
consensus	301	r g P R aL e i Aa p r

FIGURA 2G

```

EryCIV      1 MKRALTDLAIFGGPEAF LHTLVVGRPTVGDRERFFARLEWALNNNLTNG
OleNI       1 MKRGVHDLALFGGDAFLQPLVMGRPNTGDKRLDLRLLEWALDNRWLTNG
EryCI       1 .....MDVPFLDQA..AYLELRSDIDQACRRVLGSGWYLFNG
TylB        1 ....MTGLPRPAVRVPFHDLRDVHAATGVESETGGALLRVAARCRYLNG
DnrJ        1 .....MSTYVWQYLNEYREEADILDAVETVFESCQLIENG
LmbS        1 .....MSDYIPF....AAPCFDTAEEBAVLRVVRSGWVSTG
consensus   1                l          r  l  al  vl  gw  G

```

```

EryCIV      51 GPLVREFEGRVVDLAGVRHCVATCNATVALQLVLRASDV..SGEVMPM
OleNI       51 GPLVREFEQRIADLAGVRNCVATCNATAGLQLLLREAEV..TGEVIMPUM
EryCI       36 PE.NEAFEAFAAYCENAHCVTVGSCDALELSLVALGVGGDEVIWPSH
TylB        46 AE.LAAFEERFAEYCCNAHCVAVGSLDDARLALWALGVGGDEVIWPSH
DnrJ        36 TS.VRSFEEFAAYHGLPYCTGVNCTNALVLGLRALGLGPGDEVVTVSN
LmbS        33 AE.AQSFEFEFAAYIGMAHAVALTSCAAALHVALKAYGIGPGDEVIMP
consensus   51 g v FE fA y gv hcvav at al l Lra gvg gdeVimp

```

```

EryCIV      99 TFAATAHAASWLGLEPVFCDDV.....PETGLDPEHVASIVTPRTGAI
OleNI       99 TFGTAHGVRLGLRPVFCDDV.....PDTCGLDPKLVEAAVTPRTGAI
EryCI       85 TFIATWLGVPVGVAVPVVEPEGVSHT.....LDEALVEQAITPRTAI
TylB        95 TFIASWLAVSATGATPVVPEPGDPGEPGGAFLDLPDRLEAALTPTRTAV
DnrJ        85 TAAPTVAIDAVGATPVFVDVHE.....ENYLMDTGRLRSVIGPRTICL
LmbS        82 TFMATATSVVHAGAAPVLADVG.....PEHLTFDEDOVKSLITERKAV
consensus   101 Tfvat av lGa PV dv          pe lDp v vtpRT ai

```

```

EryCIV      143 LCVHLWGRPAFVEALEKTAABHQVKLFFDAAHALGCTAGGRPVGAFGNFE
OleNI       143 LCVHLWGRPSRVDELAATAABHGLKLFYDAAHALGCTSRORRIGSGCDAE
EryCI       128 LPVHLYGHPADLDALRAIADRHGLALVEDVAQAVGARHRRHVRGAGSNFA
TylB        145 MPVHLYGHPVDLDLVGAFAEPHGLAVVEDAAQA.TAAYRGRRIGSG.HPT
DnrJ        129 LPVHLYGQSVDMTPVLELAABHDLKVLEDCAQAHGARRHGRLVGTQCHFA
LmbS        126 VPVHLYGGRMAAMEPLRELCDSHGLTLLEDAAHTLPARDGDAVAGRAGDAS
consensus   151 ipVHLWGrp ve l ia Hgl lveDaA algar rgr vg g

```

```

EryCIV      193 VFSFHATKAVTSF.EGGAIIVTDDGLLADRTFAMHNFGIAPDK.....
OleNI       193 VFSFHATKVVNSF.EGGGIVTDDDTAERLRALHNFGLGHDG.....
EryCI       178 AFSFYPGKNL GALGDGGAVVTDPALAEIRLRLRNYGSKQ.....
TylB        193 AFSFYPGKNL GALGDGGAVVTSDEPLADRLRLRLRNYGARE.....
DnrJ        179 AFSFYPTKVLGAYGDGGAVVTPDAEVDRLRLRLRNYGCMGE.....
LmbS        176 AFSFEATKPITT.AEGGMLCTDDARVADEARRWSLHGLSRGAVNRYRPH
consensus   201 aFSFy tK v geGgaivT D ladriR lhnfGi

```

```

EryCIV      234 ....LVTDVGTNGKMSFCAAAAGLTSIDAFATRVENRLNHALYSDELKD
OleNI       234 ....V..GAGINAKMSFAAAAAGLTSLEAFADAVASNRANYELYRQELSG
EryCI       218 .K.YVHEVRGTNARLDELQAAVLRVKLRHLDDWNARRTTLAQHYQTELKD
TylB        233 .K.YRHEERGINSRLDELQAAVLSVKLPYLDWNTRRRTAARYGEALAG
DnrJ        219 .RYVVVDTPGHNLSRLDEVQAEILRRKLRRRLDAYVEGRRAVARRYEEGLGD
LmbS        225 SAAYDVDRPCHKYNMSDLAALGRAQLAKAGRLHARSTATAEVYLRRLAG
consensus   251 yl e G n km el Aam L          hrr la Y eL

```

```

EryCIV      280 VRCISVHAFDPFEQNNYQYVILSVDSAATGIDRDQLQAILRREKVVAQPY
OleNI       278 LPCVRLIDYDPAERNNYHYVIALIDAGVTGLHRDLTLTLRAENVVAQPY
EryCI       266 VPCITLPEHPWAD.SAMHLEVT...R..CENRDHLQRHLTDAGVQTLNH
TylB        281 LPGVTVEEGRV.AE.PVWHQYVL...R..SPYRDRRLRLAEAGVETLGH
DnrJ        268 LDCLVLPTIAEEND.HVYVYVYV...R..HPBRDRLEALTIDYDHLNAG
LmbS        275 LDRLELAADITATNRSSWYLFV...RVHGHRRDAFRQRLHALGVGTSNH
consensus   301 l gi lp g          wyvfil r RD l L a v

```

ES 2 165 278 A1

EryCIV	330	FSPGCHQMOPYRTE...PPLRLENTEQLSDRVLALPTGPAVSSSEDIRRV
OleNI	328	FSPGCHQREPYRTE...HPVSLPHTEHLAEQVIALPTGPAVSREDIRRV
EryCI	310	YPTPVHLSPAYADLGL.PPGSFPPVAESLAGEVLSLPTGPHLSREAADHVT
TylB	324	YPVAVHASGAYAGAGPCPAGGLPRAERLAGEVLSLPTGPHLPDEAVEVVI
DnrJ	312	YPWPVHTMSGFAHLG.YGPGDLPVTERLAGEIFSLPMYPSLRPDAQEKVI
LmbS	322	FE.PLHRFTWLRDHSVVRTGQGFPPVADAAADTLVSLPVFPAMDAAVSRV
consensus	351	f vH y p lp e la vlsLPigP v eai rVi

```

EryCIV      377 DIIRLAATSGELINAQWDQTRNGS*
OleNI       375 DIIRVAAAHGPRITAQAGA*.....
EryCI       359 ATLKAGA.....
TylB        374 AAVQSAALDSWEEGP.....
DnrJ        361 DAVREVVGSL.....
LmbS        371 AAVRRAHDEAGR.....
consensus   401 ir aa

```

FIGURA 2H

```

DesII      1  ..MTAPALSATAPAERCAEEGADLGAAVHAVGQTLAAGGLVPPDEAGTIA
EryCV      1  MNTTTRTATAQEAGVADAAREVDDRRAVVRALSSEVSRVTGAGDGVADVQA
OleT       1  .VALQVDRTPLDPIAVCAWEGGN.SAAAAALRPLIEEDAPGTGLEPDRIA
consensus  1  A P A Av l e A

DesII      49  RHLVRLAVRYGNSPFTPLEEARHDLGVDRDAFRLLALFGQV.PELRTAV
EryCV      51  ARLADLAHYGAHPFTPLEQTRARLGLDRAEFAHLLDLFGRI.PDLGTAV
OleT       49  EHLIALARRYGTETPFTALESARRGLGLGPRHLRPASSPSSSTAHPHCATAV
consensus  51  hL LA rYG PFT LE R LGv P TAV

DesII      98  ETGPAGAYWKNTLPLEQRCVFDAALARKVPFYSVGLYPGPTCMFRCHF
EryCV      100  EHGPAGKYWSNTHKPLDAAGALDAAYRKPAPFYSVGLYPGPTCMFRCHF
OleT       99  ERGPAGMYWTNTLPLERRGVLDAAVRGEPAFYSVGLYPGPTCMFRCHF
consensus  101  E GPAG YW NTl PLe G DAAI P FYSVGLYPGPTCMFRCHF

DesII      148  CVRVVTGARYDPSALDAGNAMFRSVIDEIPAGNPSAMYFSGGLEPLTNPGL
EryCV      150  CVRVVTGARYEAASVPAGNETLAALIDEVPTDNPKAMVSGCLEPLTNPGL
OleT       149  CVRVVTGARYQQSALTDGNAMFASLIDRMPTDNPHALYLSGCLEPLTNPGT
consensus  151  CVRVVTGARY l GN vID iP NP AmY SGGLEPLTNPG

DesII      198  GSLAAHATDHGLRFTVYTNSFALTERTLERQPGLWGLHAIRTSLSYGLNDE
EryCV      200  GELVSHAAGRGFDLTVYTNAFALTEQTLNRQPGLWELGAIRTSLSYGLNND
OleT       199  GDLVRAAARGFKLSLYTNSFALTRTQLDRQPGLWDLYALRTSLSYGLSED
consensus  201  G L hA hG tvYTN FALT TL RQPGLW L AirtsLYGL e

DesII      248  EYEQTTKKAAFRRVRENRRFQQLAERESPINLGFAYIVLPGRASRRL
EryCV      250  EYETTTKRGAFERVKKNLQGFLRMRAERDAPIRLGNHILLPGRADRIT
OleT       249  DYVATTTKKGAFRVKDNLTRFQALRRRRRRVRLCLNYILLPGRAGRIT
consensus  251  eY TT KkaAF RvR NL F lR ER Pi LG IvLPGRAR

DesII      298  DLVDETADLNDAGQGRITDFVNIREDYSGRDDGKLPQEERAELQEALNAF
EryCV      300  DLVDETADLNDESSPQRPLDFVTREDYSGRDDGRLSDSERNELREGLVRF
OleT       299  GLADYIGELNDGGPDRVPDFLTREDYSGRDDGKLAPERVELEHGLAAF
consensus  301  L DfiadLNd R iDFv iREDYSGR DGkL ER EL aL F

DesII      348  EERVRERTFCGLHIDYCYALNSLRTCADAELLRIKPATMRPTAHPOVAVQV
EryCV      350  VDYAAERTPGMHIDLGYALESSLRRGVDAELLRIRPETMRPTAHPOVAVQV
OleT       349  EERIRTRAPSLHVDYATPSRACAWASTPELPRIRPETMRPTAHPOVAVQV
consensus  351  e R P lHiD g g EL RiKp TMRPTAHPOVAVQv

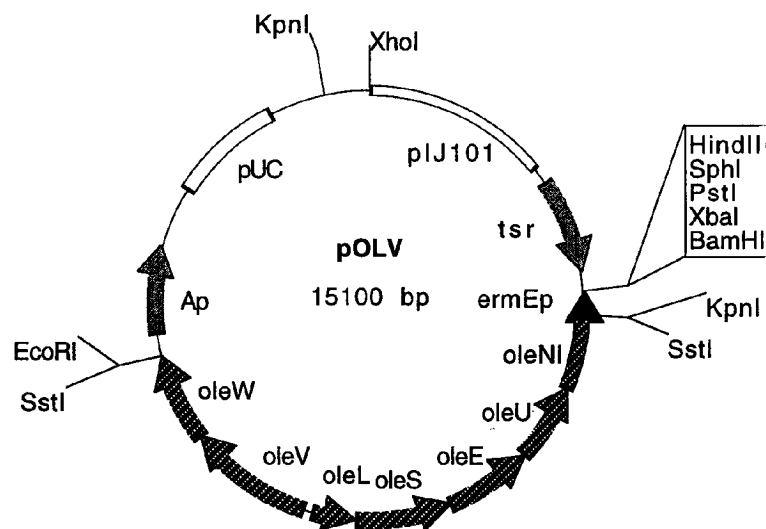
DesII      398  DLLGDVYLYREAGFFDLDGATRYIAGRVTPDT.SLTEVVRDFVERGGEVA
EryCV      400  DLLGDVYLYREAGFPELEGATRYIAGRVTPST.SLREVVENFVLENEGQ
OleT       399  DLLGDVYLYREAGFPASRGAERYVGRPADHRARNWRRSVRRFVTEGRQLA
consensus  401  DLLGDVYLYREAGFP GA RYia V FV V

DesII      447  AVDGEYFMDGFDQVVTARLNQLERDAADGWEBEARGFLR. .
EryCV      449  PRPGDEYFLDGFDQSVVTARLNQLERDADGWEDHRGFLRGR
OleT       449  PRPGEEYFLDGFDQVVTARLNQMETDADGWAEHRGFLR*. .
consensus  451  GdeYFmDGFDQ VTARLNQle D ADGW e RGFLR

```

Figura 3

A



B

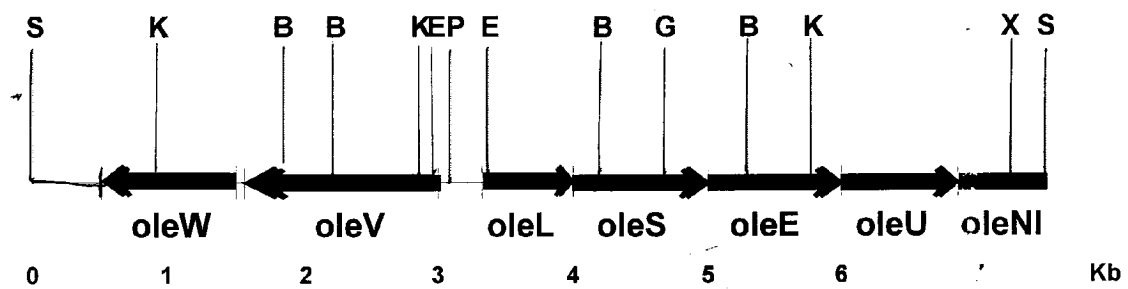
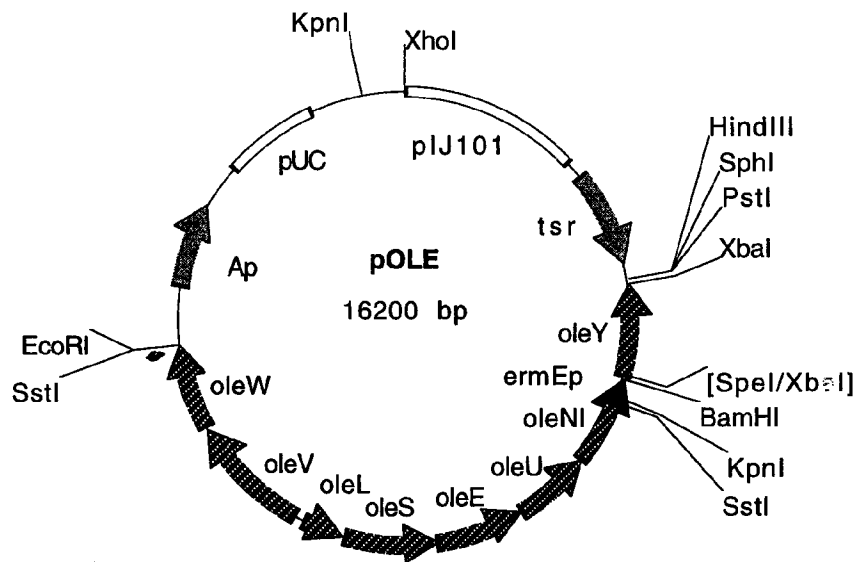


Figura 4

A



B

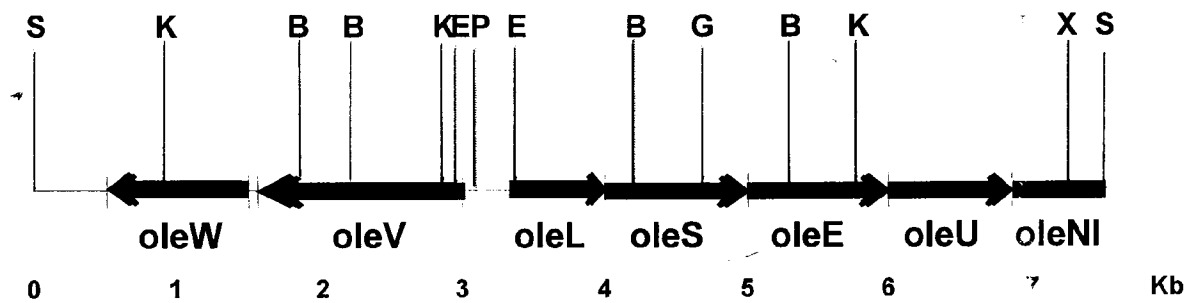
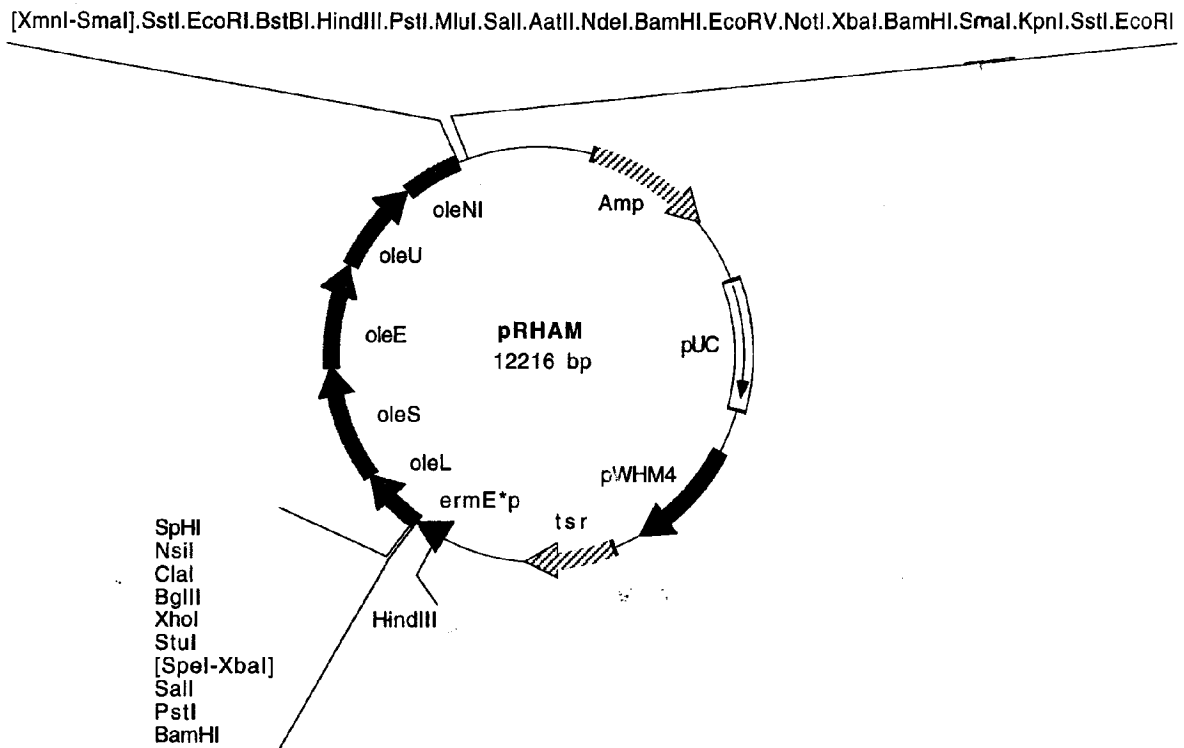


Figura 5

A



B

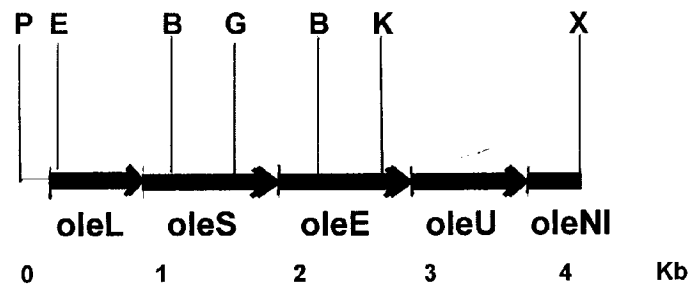


Figura 6A

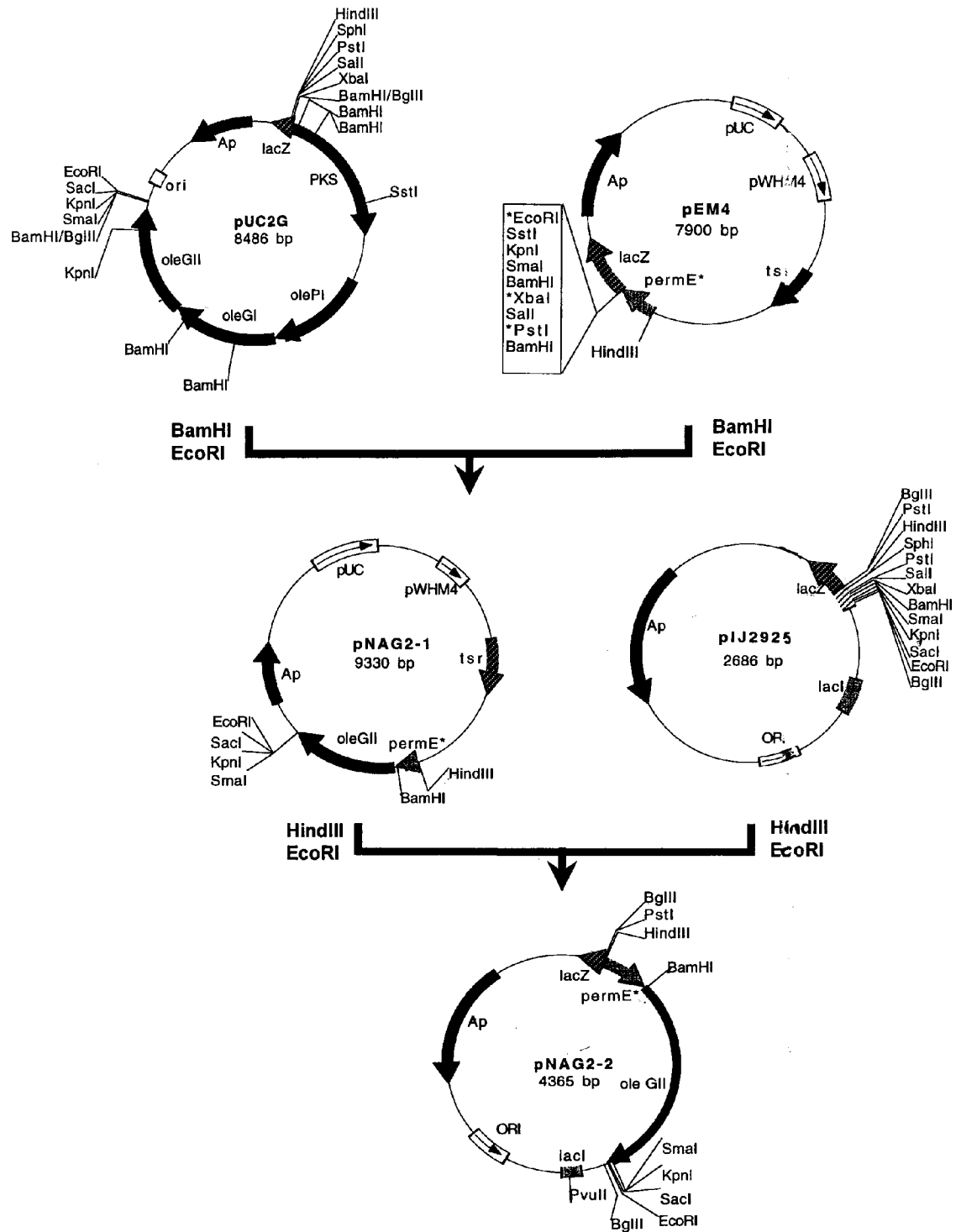


Figura 6B

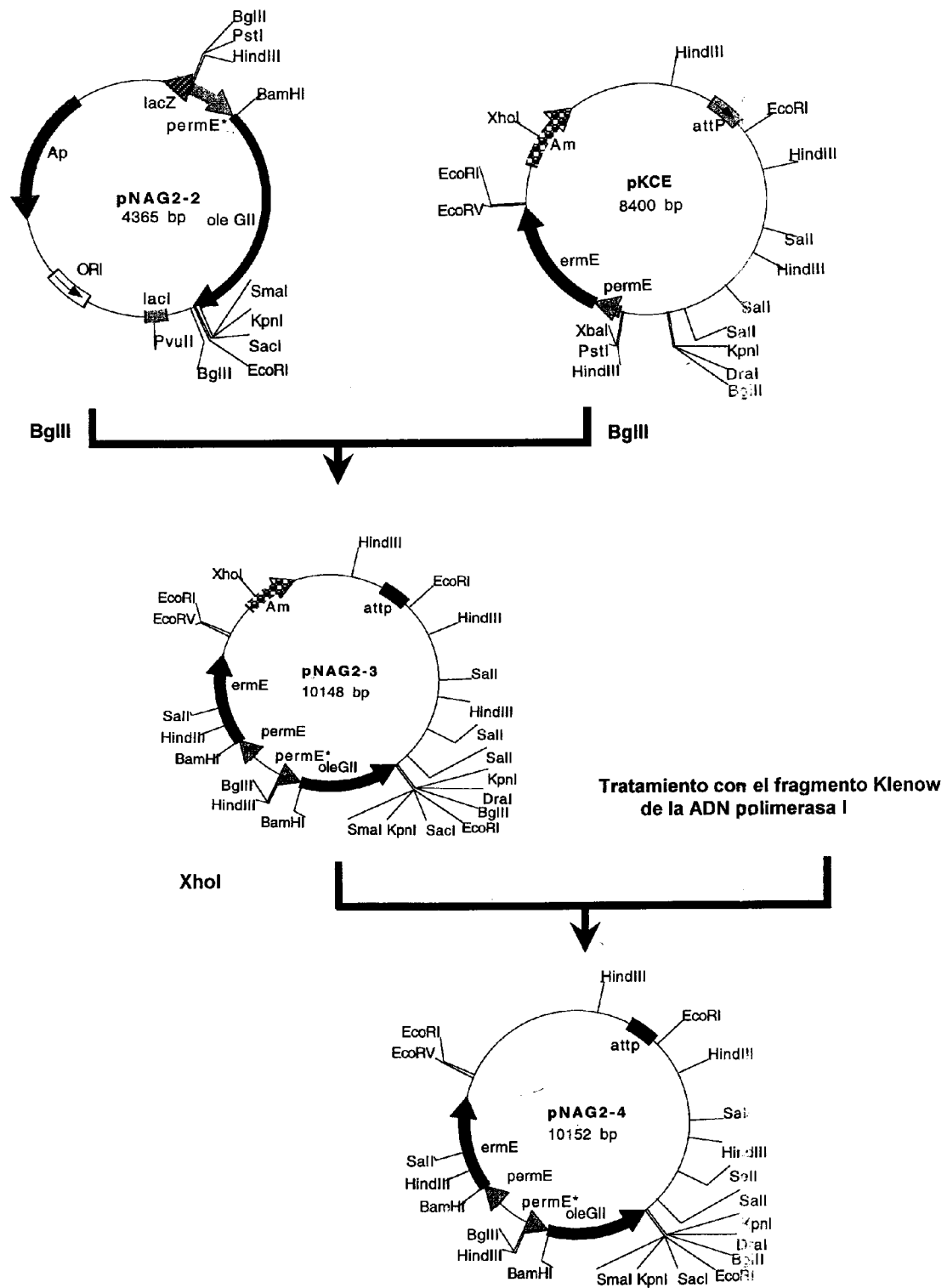


Figura 7

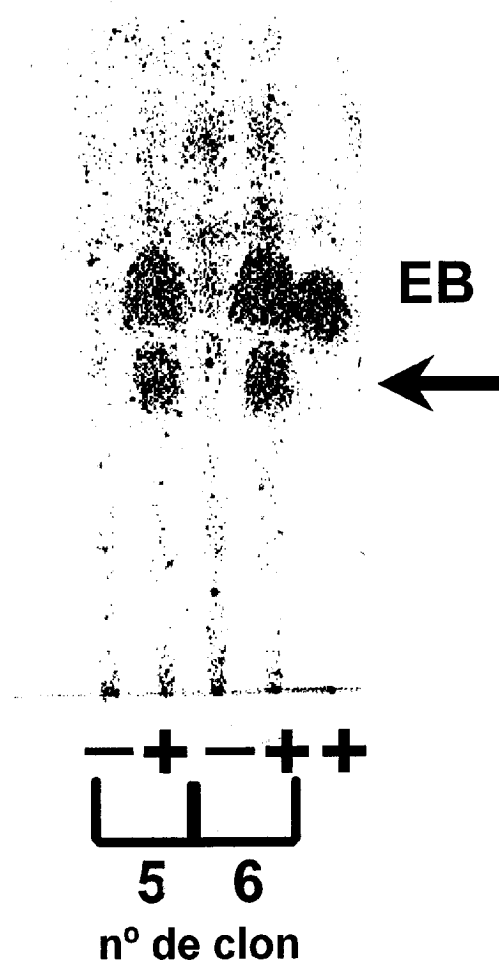


Figura 8

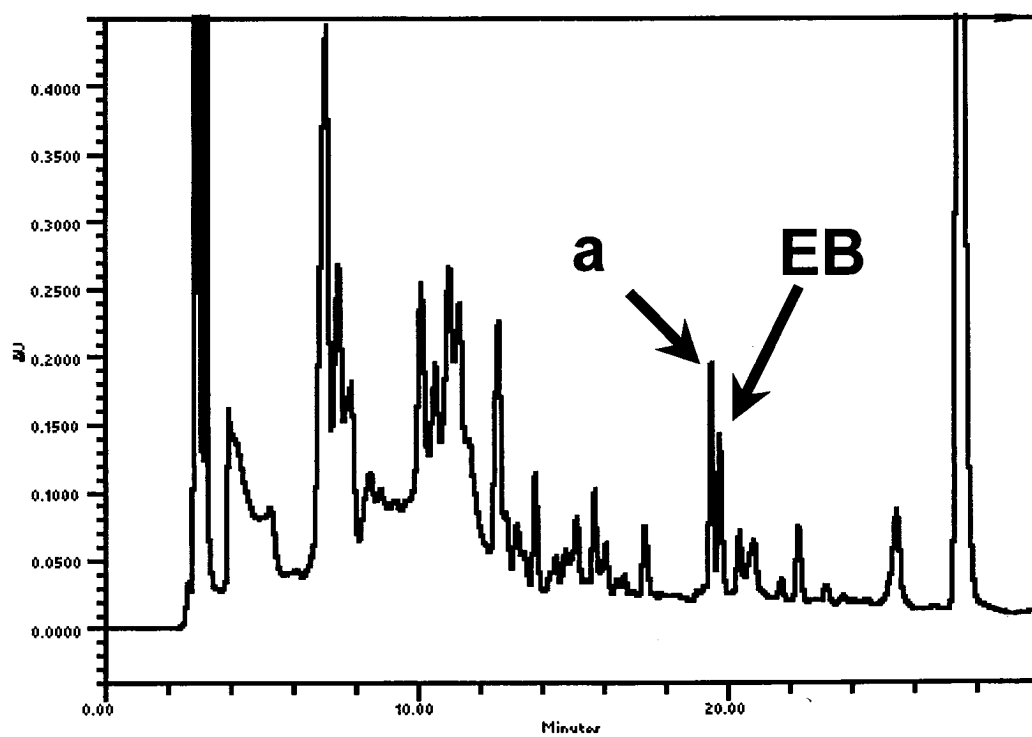
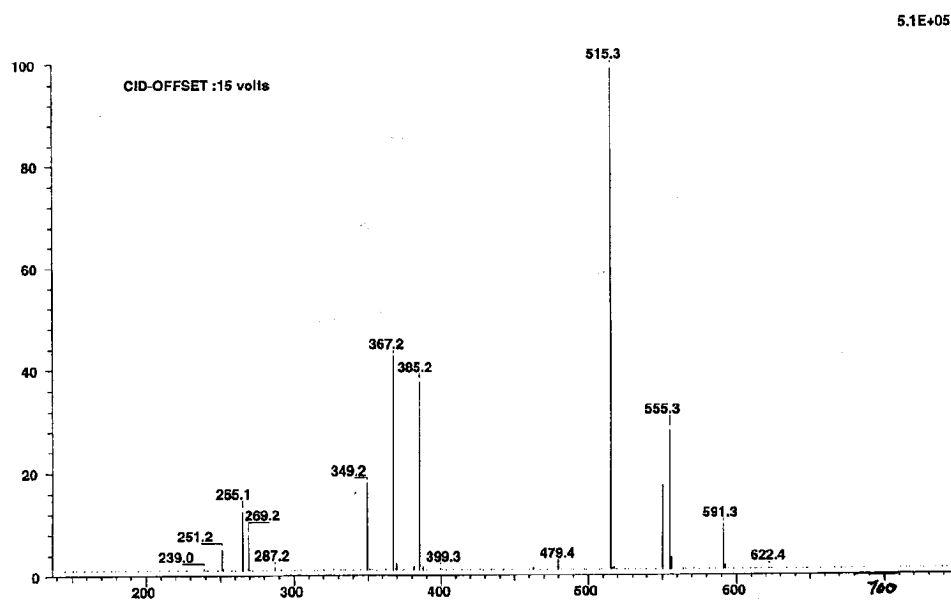


Figura 9

A



B

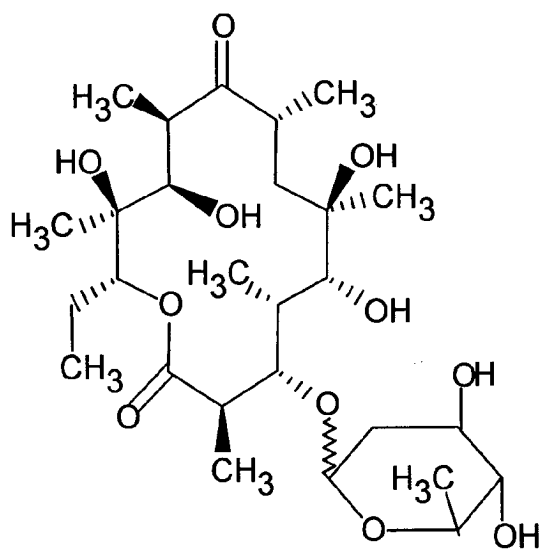


Figura 10

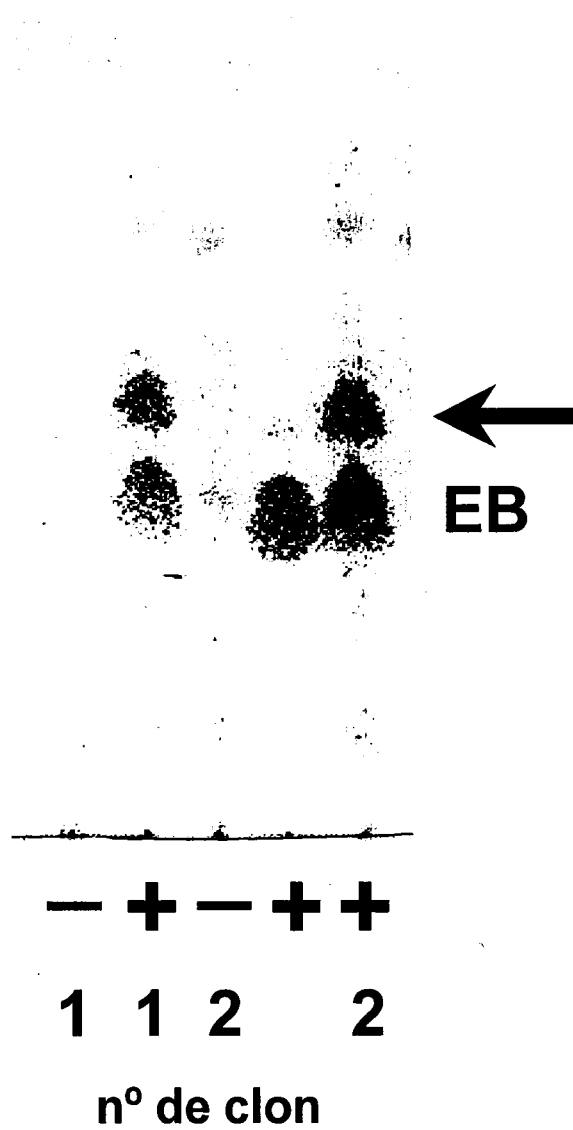


Figura 11

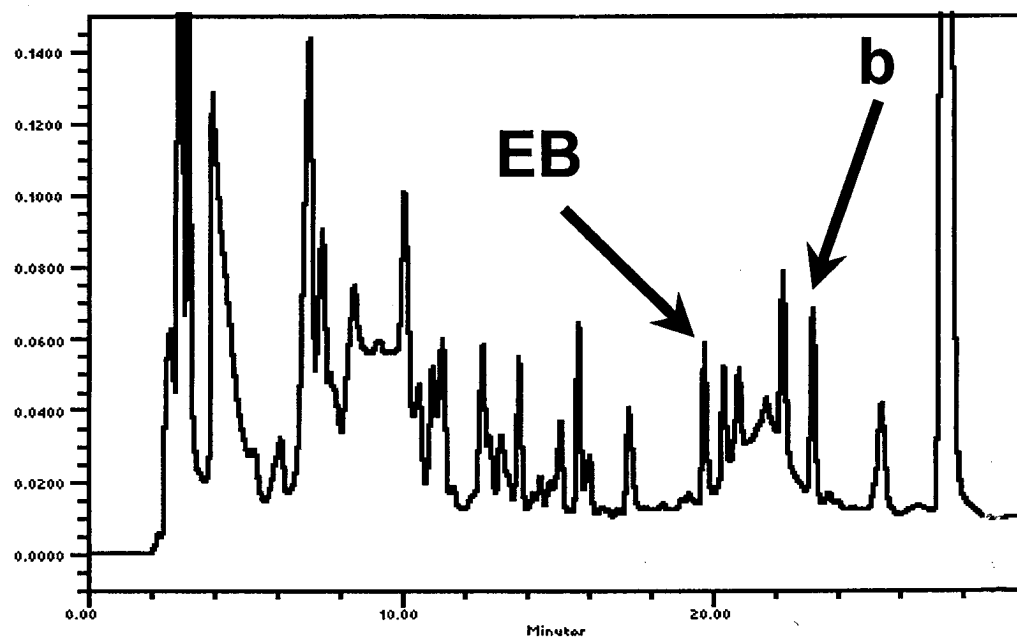
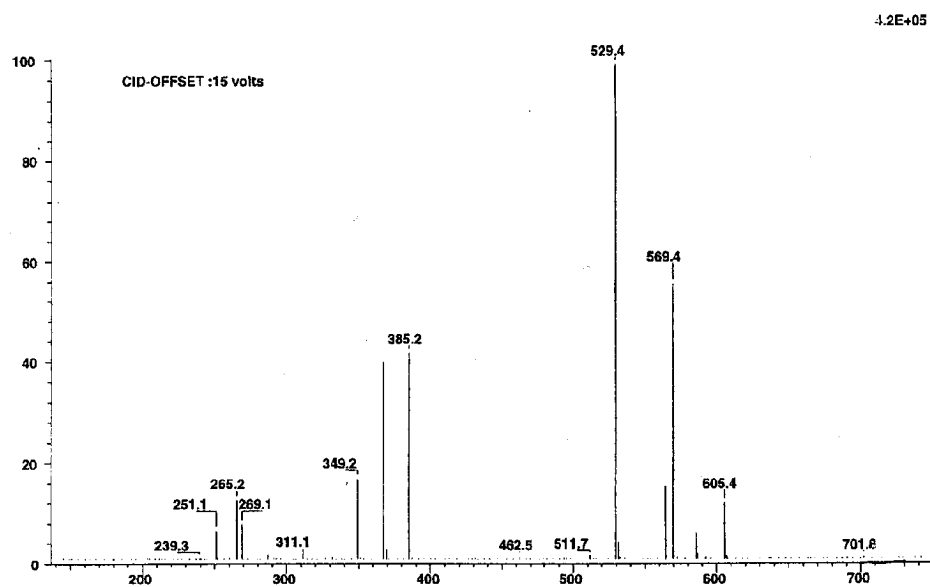


Figura 12

A



B

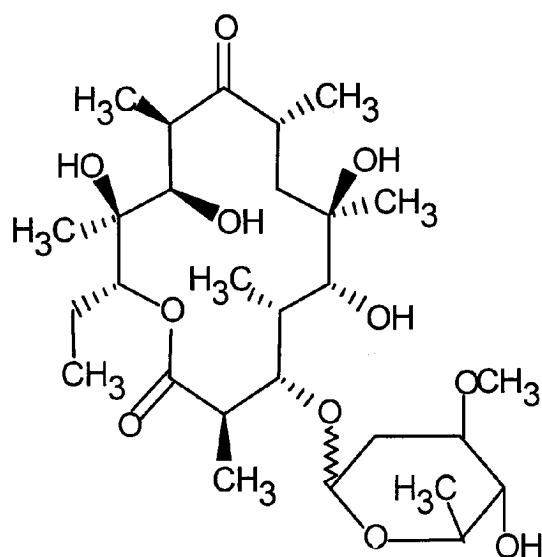


Figura 13

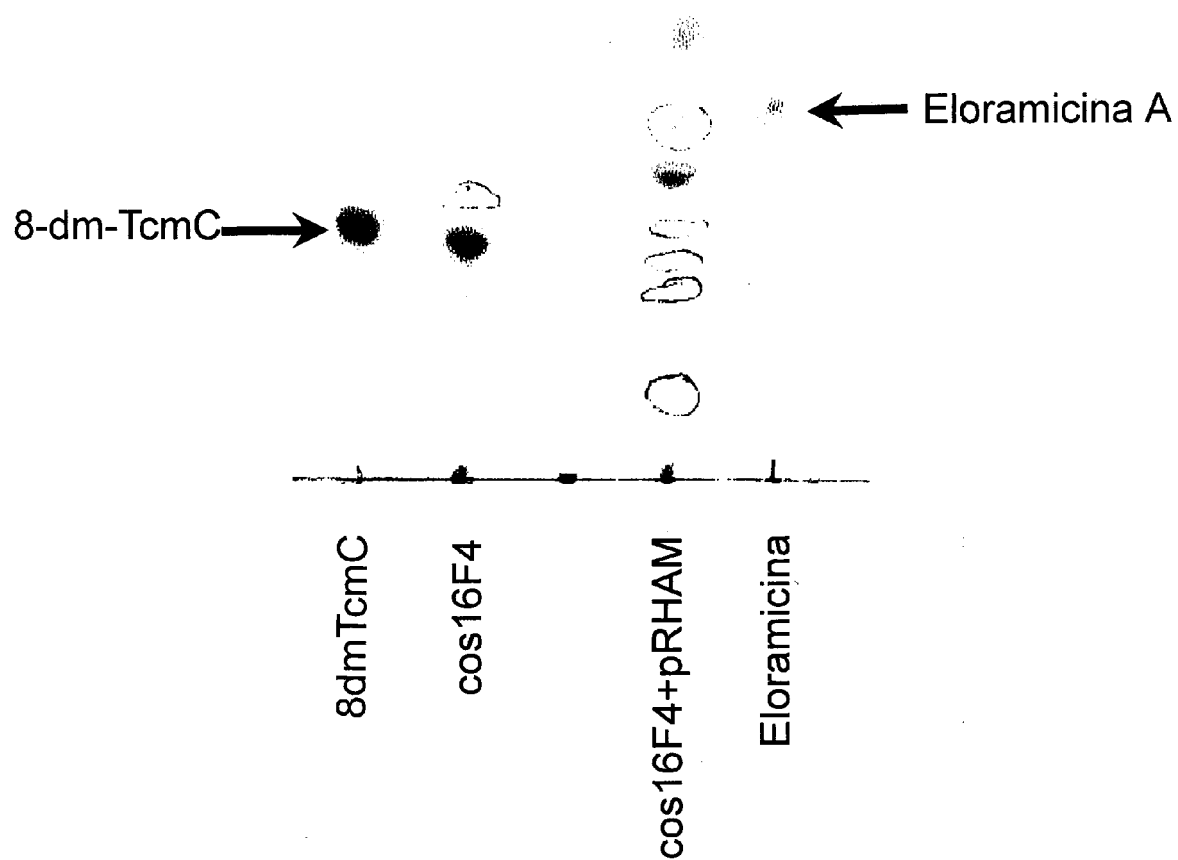


Figura 14

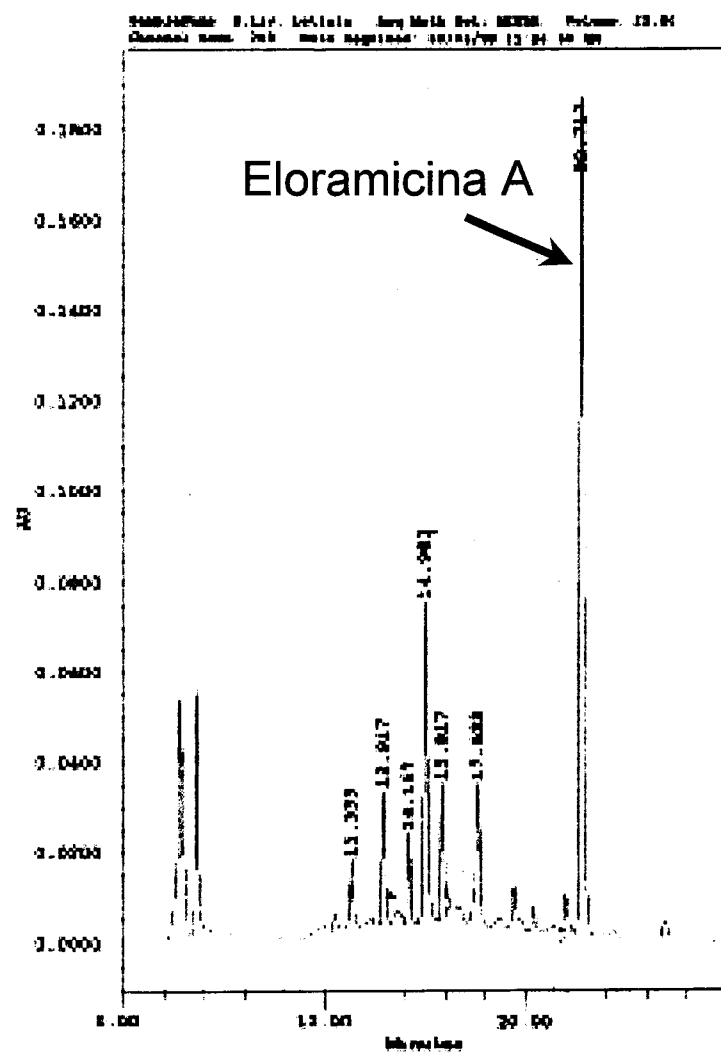
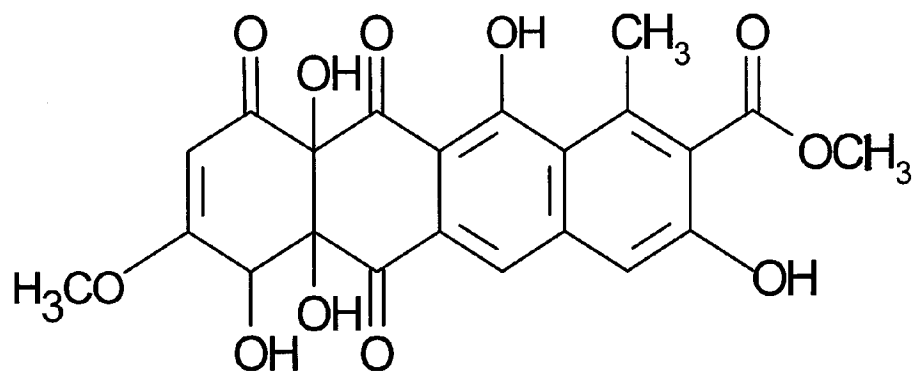
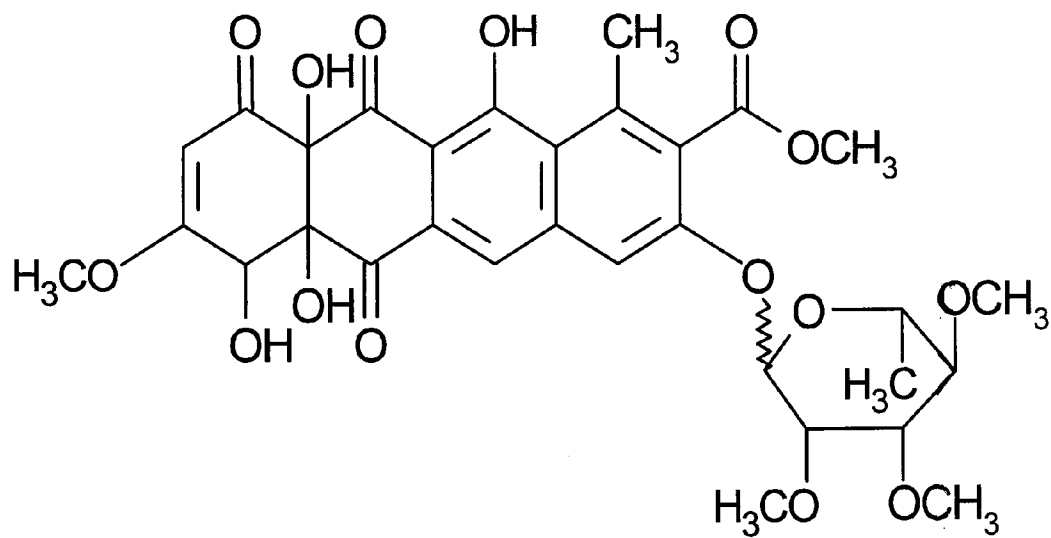


Figura 15



8-demetil-Tetracenomicina C



Eloramicina A



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 165 278
⑫ N.º solicitud: 009901435
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 24.06.1999
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: C12N 15/52, 1/21, C12P 19/62

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9905283 A (HOECHST MARION ROUSSEL) 04.02.1999, figura 20; página 10, línea 32 - página 12, línea 30; página 15, línea 17 - página 16, línea 12; ejemplo 31; reivindicaciones 18-25.	1-12
Y	Todo el documento.	
Y	WO 9723630 A (ABBOTT LABORATORIES) 03.07.1997, todo el documento.	1-12
X	QUIROS, L.M. et al. "Two glycosyltransferases and a glycosidase are involved in oleandomycin modification during its biosynthesis by Streptomyces antibioticus", MOLECULAR MICROBIOLOGY, 1998, Vol. 28, N° 6, páginas 1177-1185. Todo el documento.	1-7
X	YOO, JIN-CHEOL et al. "Expression of orf7(oxi III) as dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase gene cloned from Streptomyces antibioticus Tü99 and biochemical characteristic of expressed protein", J. MICROBIOL. BIOTECHNOL., 1999, Vol. 9, N° 2, páginas 206-212. Todo el documento; figura 2.	1-7
X	OLANO, C. et al. "Analysis of a Streptomyces antibioticus chromosomal region involved in oleandomycin biosynthesis, which encodes two glycosyltransferases responsible for glycosylation of the macrolactone ring", MOL. GEN. GENET., 1998, Vol. 259, páginas 299-308. Todo el documento.	8,9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
28.01.2002

Examinador
J.L. Vizán Arroyo

Página
1/1