



2 165 278 (11) Número de publicación:

(21) Número de solicitud: 009901435

(51) Int. Cl.7: C12N 15/52 C12N 1/21

C12P 19/62

(12)PATENTE DE INVENCION

B1

- (22) Fecha de presentación: 24.06.1999
- (43) Fecha de publicación de la solicitud: 01.03.2002

Fecha de concesión: 16.05.2003

- (45) Fecha de anuncio de la concesión: 16.06.2003
- Fecha de publicación del folleto de patente: 16.06.2003

- Titular/es: UNIVERSIDAD DE OVIEDO Plaza del Riego, 4 - Edificio Histórico 33003 Oviedo, Asturias, ES
- (72) Inventor/es: Agirrezabalaga González, Ignacio; Olano Alvarez, Carlos; Allende Vega, Nerea; Rodríguez García, Leticia; Fernández Braña, Alfredo;

Méndez Fernández, Carmen y Salas Fernández, José Antonio

(74) Agente: No consta

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

Un procedimiento de obtención de productos glico-silados 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 cro-mosoma el gen de resistencia a eritromicina y un gen (oleGII) que codifica una glicosiltransferasa que la capacita para glicosilar anillos macrocíclicos lactona.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

1 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 bioac-Muchos de estos compuestos tivos conocidos. 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:

- 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.
- 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 biosín-

tesis 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 (Rodriguez 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 cos AB63 (Quirós et al. Mol. Microbiol. 28: 1177-1185, 1998) y cosAB61 (Rodriguez 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 (UWGCG; 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 codiffican son:

Pauta abierta de lectura 1. Gen denominado ole W. Se inicia en un codón ATG (nt 1.576 en ID SEC.N° 1) y termina en un codón TGA (nt 590 én 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. 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 3cetoreductasa en la síntesis de L-oleandrosa. Pauta abierta de lectura 2. Gen denominado ole V. Se inicia en un codeen ATG (nt 3.020 en ID SEC.N° 1) y termina en un codón TGA (nt 1.596 en ID SEC N° 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 Lan
S $(55,\!2\,\%$ 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%; Ylihonko 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.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- 3
- 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 ÍD 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. Genet. 231:113-123, 1991), DnmU (42,8%; Otten et I., 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 basés, 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. antibioti-
- 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 dTDPglucosa 4,6-deshidratasa en la biosíntesis de D-desosamina y L-oleandrosa.
- * Pauta abierta de lectura 6. Gen denominado ole U. Su codón de iniciación ATG (nt 6.038 en ID SEC.N° 1), muestra un solapamiento con el codón de terminación de ole E. El gen ole U 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 v 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 ole T. 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 Ole T 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 Desll (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

20

45

50

65

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 ŠstI 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. plAGO es un vector bifuncio-nal (*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 estandard 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

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 ole Y 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-GĂTTAATTAÂCTAGTTGTCGTTCCAGAAC-GGCTCCCGGG); lleva un sitio de restricción para el enzima \acute{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 volúmen 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 μ l de aceite mineral y la reacción de polimerización se llevó a cabo en un termociclador MinyCycler 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 ole Y utilizando los sitios de restricción NheI y XbaI presentes en los cebadores, y aislando el fragmento que contiene el gen ole Y 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 μ g/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 $ole\,Y$ se reconocieron por obtención de ADN plasmídico de colonias transformantes y su posterior digestión doble con los enzimas $S \tilde{s} t I y \tilde{X} b a I y$ análisis mediante electroforesis en gel de agarosa, utilizando técnicas estandard de biología molecular. Esta digestión permitió reconocer la inserción del fragmento y a la vez comprobar la orientación del gen ole Y 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-ramno-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 pL-RHA. 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 $(100 \ \mu \text{g/ml})$ 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 estándard 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 \hat{Xba} I 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. 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

υ.

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 μ g/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.) v 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 *Hind*III v EcoRI v análisis mediante electroforesis en gel de agarosa de ésta y otras digestiones, utilizando técnicas estandard 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 ole GII precedido del promotor ermE*p, a partir de la digestión total de pNAG2-1 con *Hind*III y *Eco*RI 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 B g/II, se procedió a subclonar el fragmento Bq/II resultante conteniendo $ermE^*p$ y oleGII en el vector bifuncional e integrativo pKCE digerido también con Bg/II. 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 pÑAG2-3 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 (ilvsal -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 μ g/ml). De varios de los transformantes aislados se probó su sensibilidad a apramicina (25 μ g/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.

20

25

30

35

45

50

55

60

65

albus, lo cual se ha comprobado obteniendo el ADN total de la cepa, digiriéndolo con $Bg/{\rm II}$, realizando una transferencia Southern según procedimientos estándard (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 $(\alpha\text{-P}^{32})\text{dCTP}$ (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. Åm. Chem. Soc. 120: 10596-10601, 1998), seleccionándose los transformantes por su resistencia a apramicina ($25~\mu \text{g/ml}$) y a tioestreptona ($25~\mu \text{g/ml}$). Uno de los clones transformantes se escogió para establecer la cepa LRR.

4. Obtención/Purificación de los productos fina-

les 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 (Pereda 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 $10 \mu\text{g/ml}$ 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 volúmen igual de acetato de etilo agitando, centrifugando y evaporando la fase orgánica. El sedimento se resuspende entonces en $10 \mu l$ 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-galactopiranósido

IPTG: isopropil β -D-tiogalactopiranósido

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 potencialida de esta invención es la incorporación del azúcar L-olivosa al anillo macrocíclico lactona de la eritromicina (eritronólido B). Para ello, se inoculan 25 mi de medio SCM conteniendo 25 μ g/ml thio con esporas de la cepa IAGS1. Tras incubar 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 $\mu \mathrm{g/ml}$ 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 volúmen igual de acetato de etilo agitando, centrifugando y evaporando la fase orgánica. El sedimento se resuspende entonces en 10μ 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 invecciones 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 fué acetonitrilo:metanol:acetato amónico 0.065 M pH 6.7 (35:15:50, v/v). El flujo de la fase móvil fué 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 HPLCespectrometría de masas mostró un metabolito

20

30

45

55

65

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 $515 \,\mathrm{m/z}$ para la forma $\mathrm{H^{+}}$ 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-olivosil -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 μ 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 μg/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 volúmen igual de acetato de etilo agitando, centrifugando y evaporando la fase orgánica. El sedimento se resuspende entonces en 10μ 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 mo-

nitoreo 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 invecciones usando un gradiente lineal del 25 % al 50 % en 30 minutos. El compuesto purificado se analizó mediante HPLCespectrometría 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). Ún 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 + $cos16F4 + pR\dot{H}AM)$

Un tercer ejemplo consiste en la incorporación del azúcar L-ramnosa al anillo aromático de la eloramicina, 8-demethyl-tetracenomicina C. El cósmido l6F4 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 eloramicina (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 eloramicina 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 $\mu \mathrm{g/ml}$ apramicina y 25 μ 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 μ l 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 eloramicina 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 eloramicina utilizada como control (Fig.

Descripción de las figuras

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

20

30

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 SstI de 7,6 Kb, SphI-XmnI de 4,1 Kb y Bg/I de 5,84 Kb. Las abreviaturas de la figura son convencionales para endonucleasas de restricción. B $=Bam{\rm HI};$ S $=Sst{\rm I},$ L $=Sat{\rm I};$ H=SphI; X = XmnI; 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, BamHI; E, EcoRI; G, Bg/II; K, KpnI; P, SphI; S, SstI; X, XmnI.

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, BamHI; E, EcoRI; G, Bg/II; K,

KpnI; P, SphI; S, SstI; X, XmnI.

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, BamHI; E, EcoRI, G, Bg/II; K, KpnI; P, SphI; X, XmnI.

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-olivosil-eritronólido B. La flecha indica la movilidad del L-olivosil-eritronólido B. EB, eritronólido B. 5 y 6 corresponden a dos clones independientes. Los signos + v -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-olivosil-eritronólido B. EB, eritronólido B. a, nuevo compuesto glicosilado (L-olivosil-eritronólido B).

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

olivosil-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-eri-

tronólido B).

A: Análisis por HPLC-espectro-Figura 12. metría de masas del nuevo compuesto glicosilado. B: Estructura del nuevo compuesto glicosilado (Loleandrosil-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.

40

35

45

50

55

60

65

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

- SstI de 7.6 kb en el vector plasmídico plAGO. 3. Un plásmido pOLE, derivado de pOLV, productor de L-oleandrosa caracterizado por portar, además del fragmento de ADN SstI de 7,6 kb, el gen ole Y de la ruta de biosíntesis de oleandomicina bajo el control del promotor $ermE^*p$.
- 4. Un plásmido pRHAM productor de L-ramnosa caracterizado por portar el fragmento de ADN SphI-XmnI 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 pÔLE denominada EOLĒ.

7. La cepa de Escherichia coli que contiene el plásmido pŘHAM denominada EŘHAM.

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 ole GII bajo el control del promotor $ermE^*p$, en el plásmido pKCE. 9. Una cepa de $Streptomyces\ albus$, denomi-

nada 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.

25

20

30

35

40

45

50

55

60

65

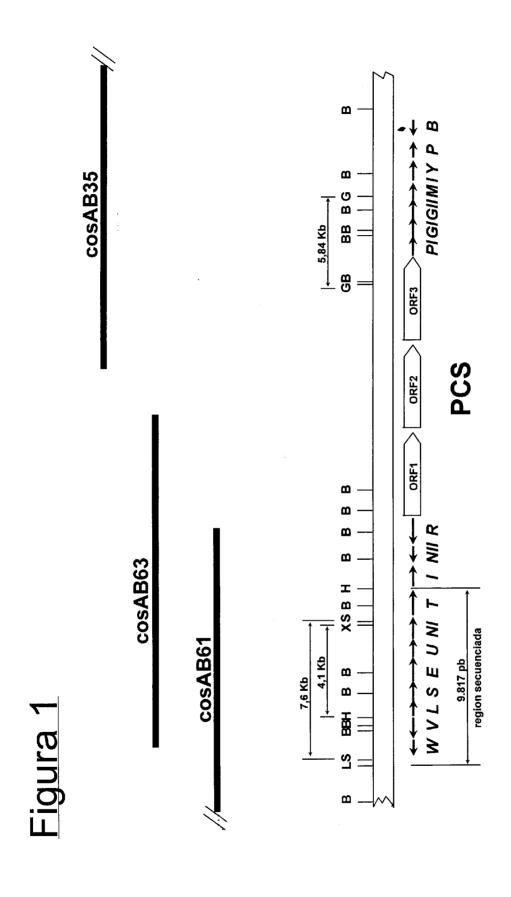


FIGURA 2A

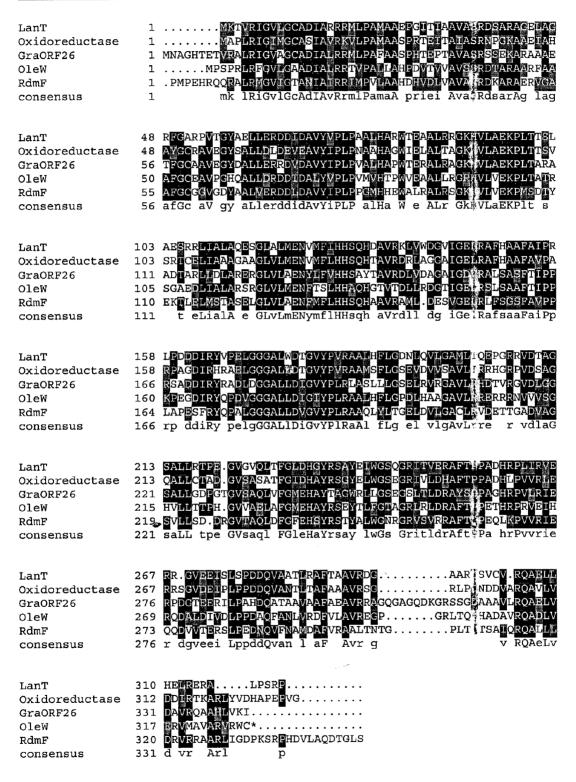
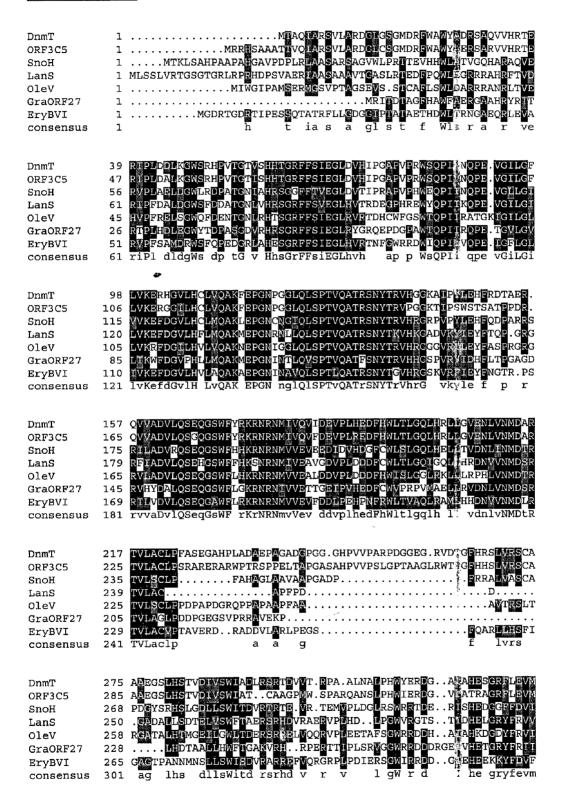


FIGURA 2B



DnmT ORF3C5 SnoH LanS OleV GraORF27 EryBVI consensus	331 340 324 305 316 281 323 361	AVDVTAASREVPGWSQPMIEPKGRGVAAFLVRRIDGVLHALGTARVEPGYVDVVETAPTV
DnmT ORF3C5 SnoH LanS OleV GraORF27 EryBVI consensus	391 400 384 365 376 341 383 421	QCTPGSLHALPAEARPRFLDAVLEAPPERVRYATV.LAEEGGRFYHAVNTYMIVEA.DHD QCTPGSLHALPAGARPRFLDAVLEAPPEAACATTTDLAEEGGRFHHAVNTYMIVEA.DDD QCTPDSYERLPARARPLFLDEVLPARADRVRFDA.ELSEEGGRFYHARVRYLVAET.DLA QYTPDNYGHLTGEDRPPFLDLVLDADPARIQYEAVH.SEEGGRFLNAESRYLLTEADEEQ QCRPLNYRAVPAEYRPAYLDYVLSADPGRIRYDTLQ.SEEGGRFHHAERRYVVVEA.BDD QCNPGNLPDGAPRPPYLDTVLTARPEQVLFDTVH.SEEGGRFYHAERRYLVLDGDD HCQPDNYADAPEEFREAYVDYVLNVPRSQVRYDAWH.SEEGGRFYRNERRYMLIEVPA.D qctP ny lpae RP flD VL a pervrydtv sEEGGRFyhaerrYmivea ddd
DnmT ORF3C5 SnoH LanS OleV GraORF27 EryBVI consensus	434	AGFDHP.DFRWVTLAQLVELLRHSHYVNIQARSLVACLYGLATAPPRR APLDPPAGFQWVTPAQLTSLVRHGHYVNVQARTLLACLNATAVLSG FPVEVPRDFRWLTLHOTLALLHHSNYVNVEARSLVACTQALS* VPVDVPEDYTWMTVRQLTRAGRIGNLVDVEARTLLACVRTLPDHGASR

FIGURA2C

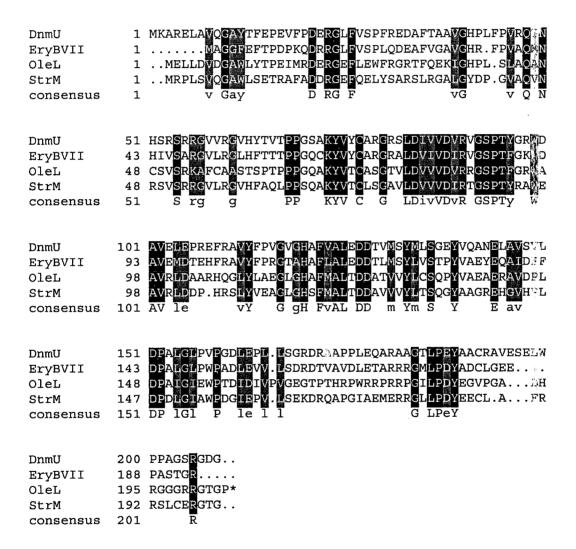


FIGURA 2D

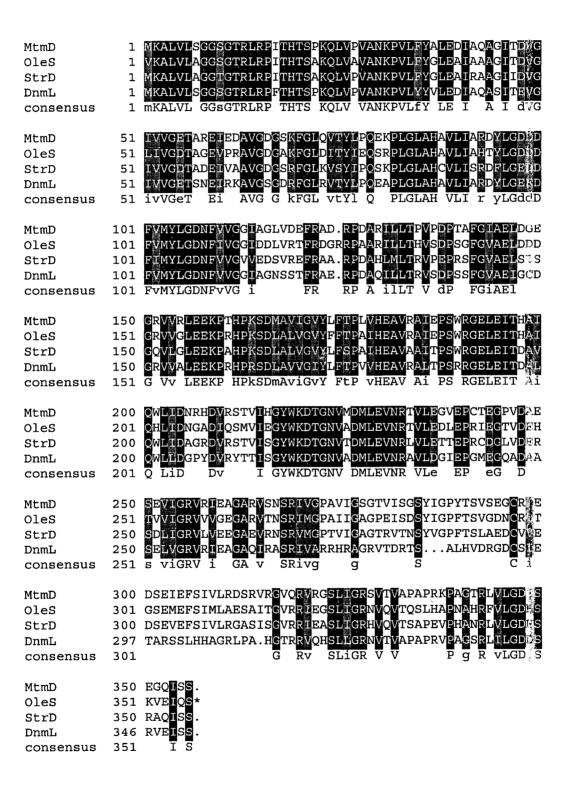


FIGURA 2E

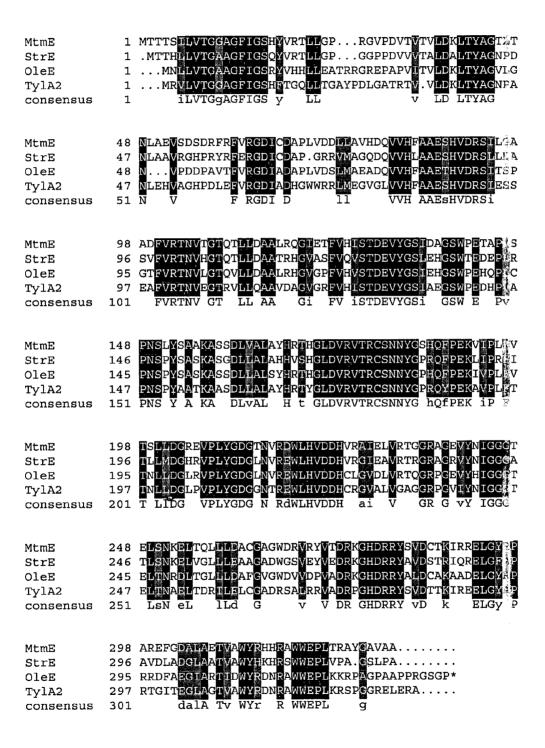
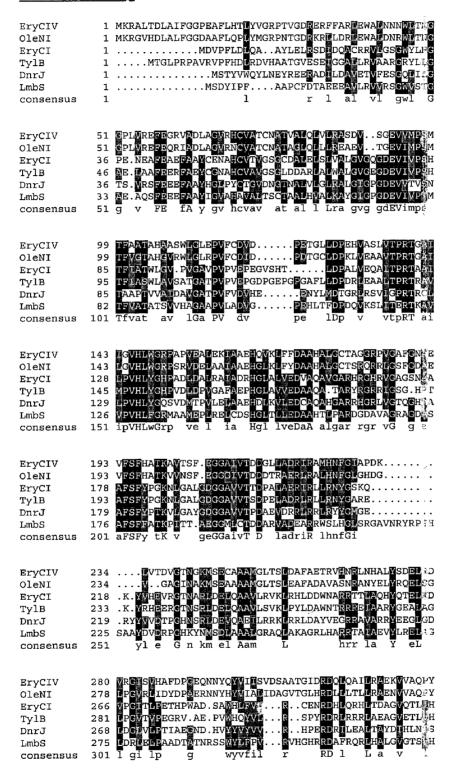


FIGURA 2F

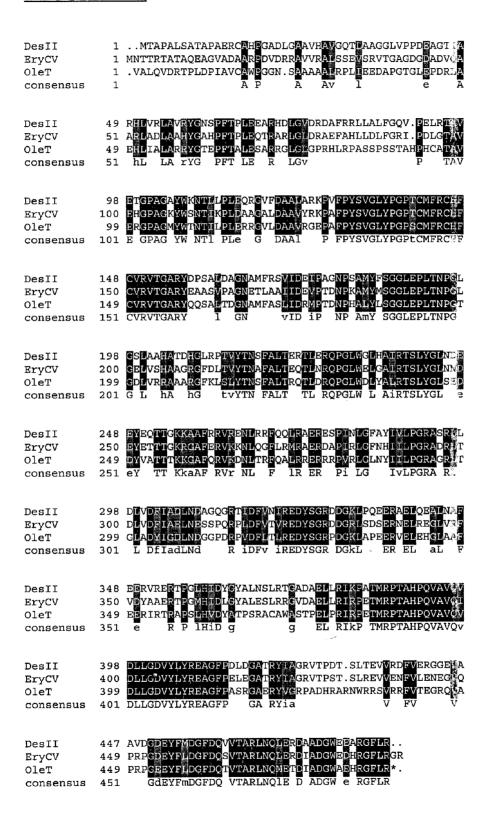
OleU StrL DnmV EryBIV consensus	1 1 1 1	MRWLITGAAGMIGRELVRRIAENEEDVAALGEDMSPYPRPRWLVTGASGMIGRELTPLIDRRGAAVTALGRGMRVVVLGATGSVGRQVCAAYQAHGWDVHGVARRPAPHLS&C MNGISDSPRQLITLLGASGFVGSAVLRETRDHPVRLRAVSRGGAPAVP&G r li GASG lgr l l r v algr
OleU StrL DnmV EryBIV consensus	40 42	HIDVTRPSAVRAALAEHRPGIVVNCAAYTAVDDAETDEAAAHLDITDGAAVRSAVAEHRPAVVVNCAAWTAVDEAESEPABA GFTELDLAAAAPGRIATVLGDLPADVVVNAAGGWGDTEEEMT AAEVEDURADLLEPGRAAAAIEDADVIVHLVAHAAGGSTWRSATSDPEAE L RAa ivv a A aetd
OleU StrL DnmV EryBIV consensus	84	ALLNÆAPRLLÆGLRPHRRHGLVHLSTDYVF.PGDARTPYÆDHPTAUR MAVNÆGPRHLÆQACRA.VGAVLLQLSTDYVF.PGSGGRPYREDHPTGER YSHLRLVRRLVÆALALLPFRPRLVHLGSVHEYGPVPÆGTLLHÆDLLPÆRV RVNVGLMHDLVGALHDRPRSTPPVLLVASTAQAANPSAA a rlla r lv l t vf p ag ed
OleU StrL DnmV EryBIV consensus	124 129 134 140 151	TVYGCTKRAGERAVLEVLPDTGYIVRTAWLYGAGGPNFV&K TPYARVKLETSSAVLTAARAGVLDAVVLRAANMSGPHPPQESF.LAAL%A
OleU StrL DnmV EryBIV consensus	164 170 183 190 201	MIRLEADEDTVLVVDDQHGQPTWTADLADRLAALGAAALAGTAPAGIYAA RISTAFAHGGRLELSVADARRDFI.DVRDVAQAVVRA.GRAPAVGGLVVN MIRRALAGEPLTMWHDGGVRRDLL.HVEDVATAFAAALEHHDALAGGTWA
OleU StrL DnmV EryBIV consensus	210 220 231 239 251	IGRGDAVPIGDLVGWLLEAAAFPEDRVDRREAPVRSKGGDWTRL
OleU StrL DnmV EryBIV consensus	265 277	LGHDRWRGTGLAPLRDWRSALREAFPDILAAEHPPTRRGAA* LDQSRWKAAGLEPLRHWRAALTESFPALCGRAGRPVPGPR GRARRLLSWAPRIGLRDSVHSMWRTAHGAPA DSTEFRSRTGWRPRVSLTDGIDRTVAALTPTEEH r g P R aL e i Aa p r

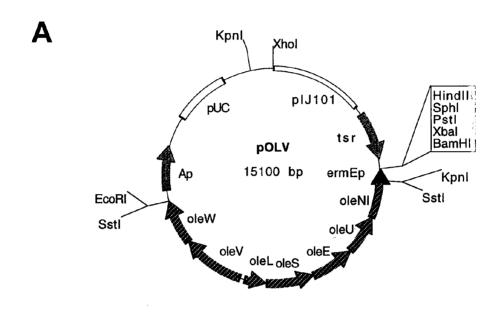
FIGURA 2G



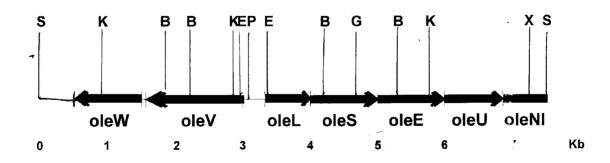
EryCIV	330	FSPGCHQMQPYRTEPPLRLENTEQLSDRVLALPTGPAVSSEDIRE
OleNI	328	FSPGCHQREPYRTEHPVSLPHTEHLAEQVTALPTGPAVSREDLRRVC
EryCI	310	YPTPVHLSPAYADLGL.PPGSFPVAESLAGEVLSLPIGPHLSREAADHYI
TylB	324	YPVAVHASGAYAGAGPCPAGGLPRAERLAGEVLSLPIGPHLPDEAVEVYI
DnrJ	312	YPWPVHTMSGFAHLG.YGPGDLPVTERLAGEIFSLPMYPSLRPDAQEKVI
LmbS	322	FE.PLHRFTWLRDHVVRTGQGFPVADAAADTLVSLPVFPAMDDAAVSRVV
consensus		f vH y p lp e la vlsLPigP v eai rVi
EryCIV	377	DITRLAATSGELINAQWDQRTRNGS*
OleNI	375	DITRVAAAHGPRITAQAGA*
EryCI	359	AT <mark>LK</mark> AÇA
TylB	374	AAVQSAALDSWEEGP
DnrJ	361	DAVREVVGSL
LmbS	371	AAVRRAHDEAGR
consensus	401	ir aa

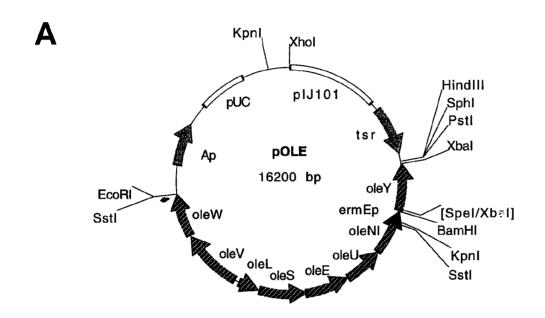
FIGURA 2H



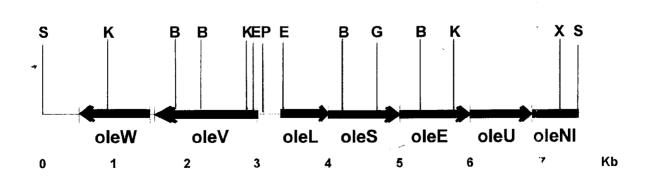


В



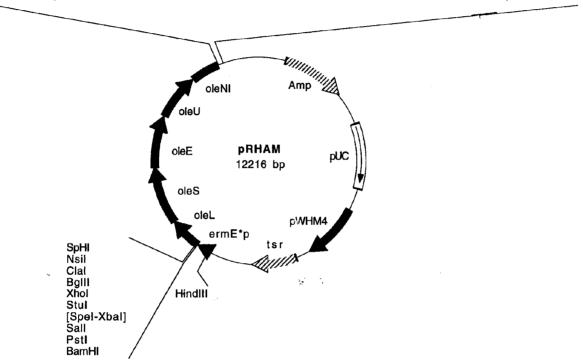


В

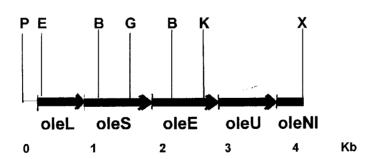


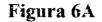
Α

[Xmnl-Smal]. Sstl. EcoRI. BstBl. Hind III. Pstl. Mlul. Sall. Aat II. Ndel. Bam Hl. EcoRV. Not I. Xbal. Bam Hl. Smal. Kpnl. Sstl. EcoRII. Bam Hl. Small. Aat III. Ndel. Bam Hl. EcoRV. Not I. Xbal. Bam Hl. Small. Kpnl. Sstl. EcoRIII. Bam Hl. EcoRV. Not I. Xbal. Bam Hl. Small. Kpnl. Sstl. EcoRIII. Bam Hl. EcoRV. Not I. Xbal. Bam Hl. Small. Kpnl. Sstl. EcoRIII. Bam Hl. EcoRV. Not I. Xbal. Bam Hl. EcoRV. Bam Hl. EcoRV. Not I. Xbal. Bam Hl. EcoRV. Bam



B





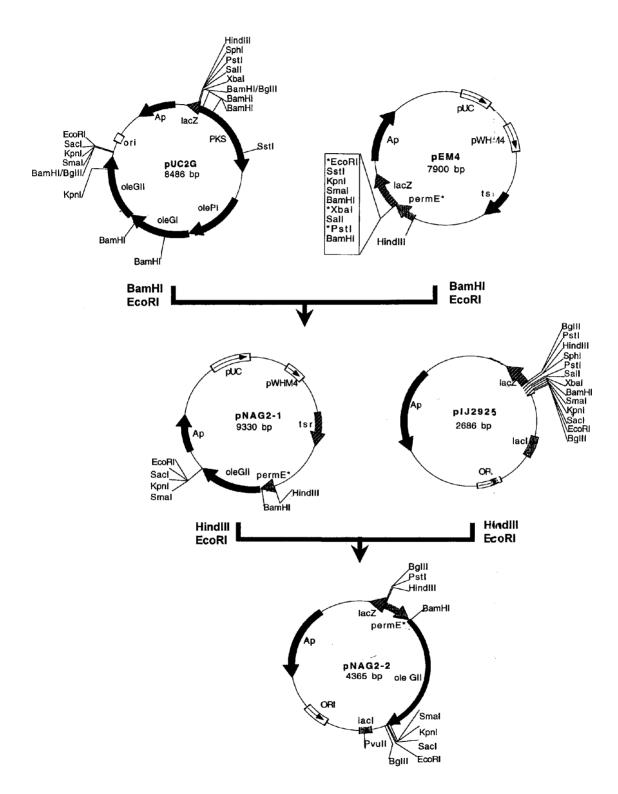
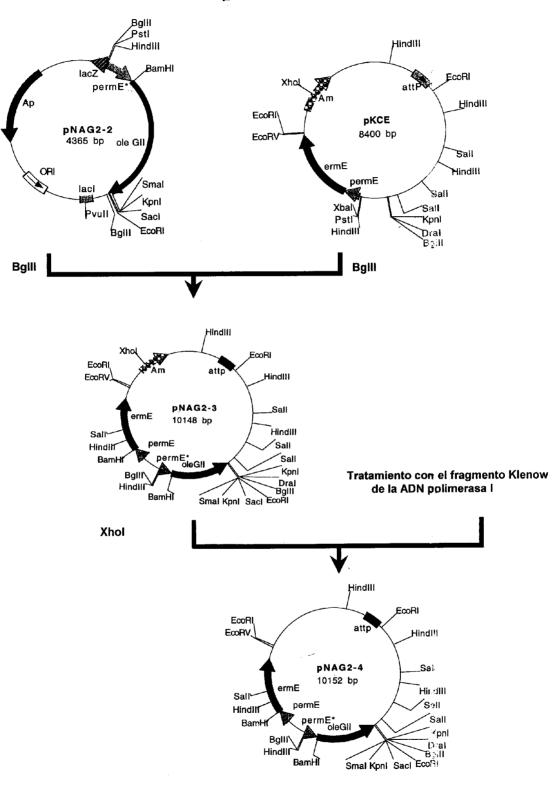
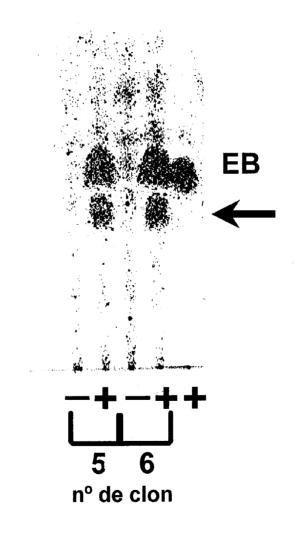
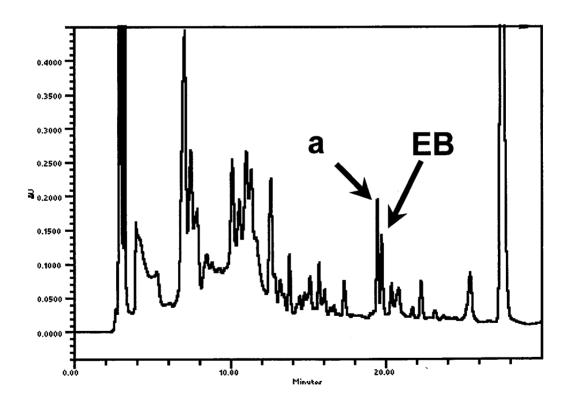


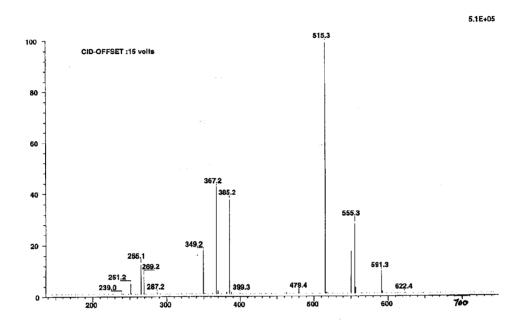
Figura 6B



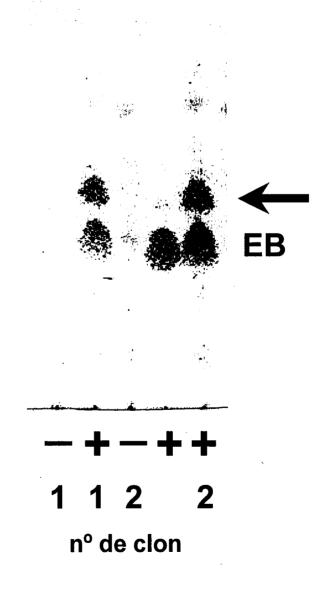


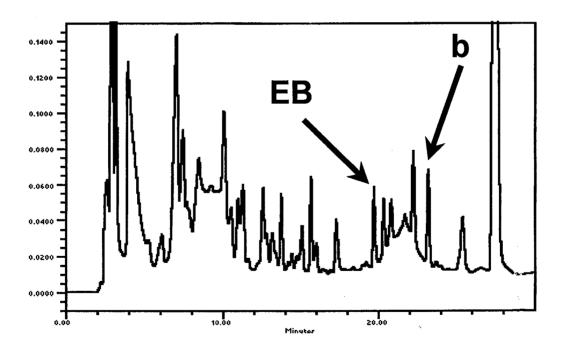


A

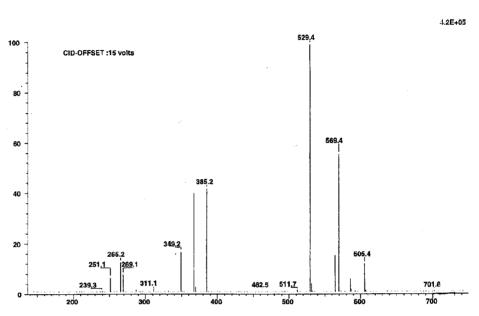


$$H_3$$
C H_3 C



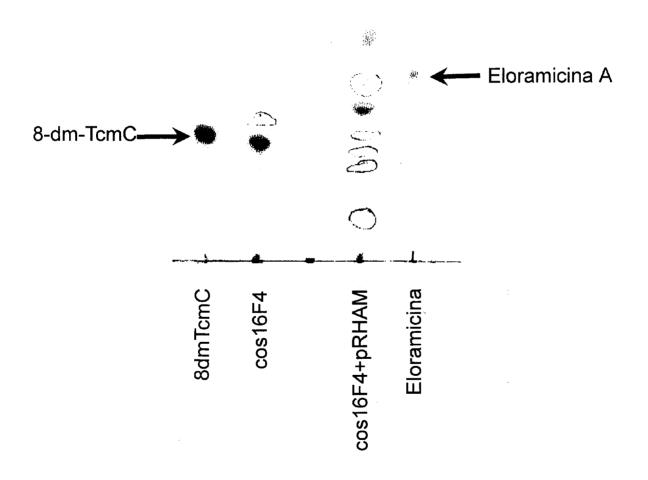


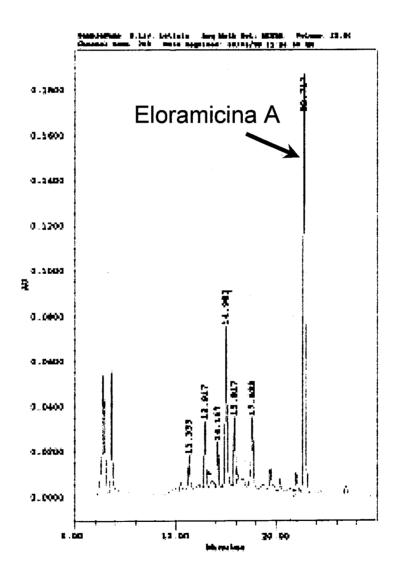




$$H_3$$
C H_3 C

Figura 13





8-demetil-Tetracenomicina C

Eloramicina A



① ES 2 165 278

 $\ensuremath{\textcircled{21}}$ N.° solicitud: 009901435

22) Fecha de presentación de la solicitud: 24.06.1999

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

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

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría		Documentos citados	Reivindicaciones afectadas				
X	WO 9905283 A (HOECHST M página 10, línea 32 - página 12 línea 17 - página 16, línea 12; e reivindicaciones 18-25.	1-12					
Υ	Todo el documento.						
Υ	WO 9723630 A (ABBOTT LAI	1-12					
X	QUIROS, L.M. et al. "Two gly are involved in oleandomycin m by Streptomyces antibioticus", Vol. 28, N° 6, páginas 1177-11	1-7					
X	YOO, JIN-CHEOL et al. "Expr dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase antibioticus Tü99 and biochemi protein", J. MICROBIOL. BIO páginas 206-212. Todo el docu	1-7					
X	OLANO, C. et al. "Analysis of chromosomal region involved in encodes two glycosyltransferase of the macrolactone ring", MO páginas 299-308. Todo el docum	8,9					
X: de Y: de m	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 C: 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 pr	resente informe ha sido realiza para todas las reivindicaciones	do para las reivindicaciones nº:					
Fecha d	le realización del informe 28.01.2002	Examinador J.L. Vizán Arroyo	Página 1/1				