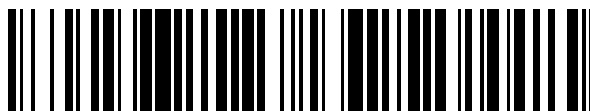


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 714**

51 Int. Cl.:
A01N 43/04 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12P 19/62 (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03713546 .4**
96 Fecha de presentación: **19.02.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1492404**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.01.2005**

54 Título: **NUEVAS POLIQUÉTIDO-SINTETASAS PRODUCTORAS DE ESPINOSINA.**

30 Prioridad:
19.02.2002 US 358075 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.03.2012

73 Titular/es:
DOW AGROSCIENCES LLC
9330 ZIONSVILLE ROAD
INDIANAPOLIS, INDIANA 46268, US

72 Inventor/es:
SHEEHAN, Lesley S.;
GRAUPNER, Paul, R.;
LEWER, Paul;
MARTIN, Christine J.;
VOUSDEN, William A.;
WALDRON, Clive y
WILKINSON, Barrie

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 375 714 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevas poliquétido-sintetasas productoras de espinosina.

Sumario de la invención

5 La presente invención proporciona compuestos biológicamente activos producidos por organismos hospedadores que incluyen, pero sin carácter limitante, cepas de *Saccharopolyspora spinosa* transformadas por incorporación de DNA híbrido de poliquétido-sintetasa.

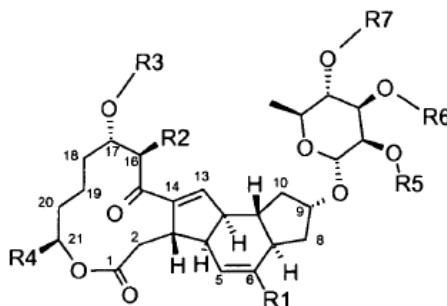
Antecedentes de la invención

10 Como se describe en US Pat. No. 5.362.634, el producto de fermentación A83543 es una familia de compuestos afines producidos por *Saccharopolyspora spinosa*. La familia de compuestos naturales de espinosina que han sido aislados previamente se describe en US Pat. No. 6.274.350 B1 y WO 01/19840, junto con sus actividades en una diversidad de ensayos de control de insectos. Cierta número de análogos semi-sintéticos de espinosina se describen también en US Pat. No. 6.001.981, en los cuales las áreas químicamente accesibles de la molécula de espinosina estaban sustituidas con éxito de diversas maneras.

15 Los miembros conocidos de esta familia se han dado a conocer como factores o componentes, y cada uno de ellos ha recibido una letra de designación identificadora. A estos compuestos se hace referencia en lo sucesivo como espinosina A, B, etc. Los compuestos de espinosina son útiles para el control de arácnidos, nematodos e insectos, en particular especies de Lepidópteros y Dípteros, son totalmente respetuosos con el medio ambiente y tienen un perfil toxicológico atractivo. El producto comercial Spinosad es una mixtura de espinosinas A y D (Pesticide Manual, edición 11ª, p. 1272).

20 Las Tablas 1 y 2 identifican las estructuras de algunos compuestos de espinosina conocidos:

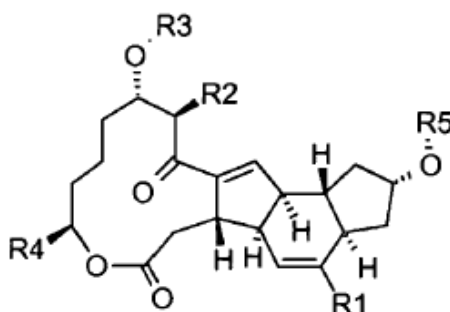
Tabla 1



Factor	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
espinosina A	H	CH3	<p>(a)</p>	C2H5	CH3	CH3	CH3
espinosina B	H	CH3	<p>(b)</p>	C2H5	CH3	CH3	CH3
espinosina C	H	CH3	<p>(c)</p>	C2H5	CH3	CH3	CH3

Factor	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
espinosina D	CH3	CH3	(a)	C2H5	CH3	CH3	CH3
espinosina E	H	CH3	(a)	CH3	CH3	CH3	CH3
espinosina F	H	H	(a)	C2H5	CH3	CH3	CH3
espinosina A 17-Psa	H	CH3	H	C2H5	CH3	CH3	CH3
espinosina D 17-Psa	CH3	CH3	H	C2H5	CH3	CH3	CH3
espinosina E 17-Psa	H	CH3	H	CH3	CH3	CH3	CH3
espinosina F 17-Psa	H	H	H	C2H5	CH3	CH3	CH3

Tabla 2



Factor	R1	R2	R3	R4	R5
espinosina A 9- Psa	H	CH3	 (a)	C2H5	H
espinosina D 9- Psa	CH3	CH3	(a)	C2H5	H
espinosina A aglicona	H	CH3	H	C2H5	H
espinosina D aglicona	CH3	CH3	H	C2H5	H

- 5 Los compuestos de espinosina producidos naturalmente están constituidos por un sistema de anillos 5,6,5-tricíclico, fusionado a una lactona macrocíclica de 12 miembros, un azúcar neutro (ramnosa) y un aminoazúcar (forosamina) (véase Kirst et al., (1991)). Cuando no está presente el aminoazúcar, se hace referencia a los compuestos como pseudoaglicona de A, D, etc., y si no está presente el azúcar neutro se hace referencia entonces a los compuestos como la pseudoaglicona inversa de A, D, etc. Una nomenclatura más preferida consiste en hacer referencia a las pseudoagliconas como espinosina A 17-Psa, espinosina D 17-Psa, etc., y a las pseudoagliconas inversas como espinosina A 9-Psa, espinosina D 9-Psa, etc.
- 10 Los compuestos de espinosina producidos naturalmente pueden producirse por fermentación de los cultivos NRRL 18395, 18537, 18538, 18539, 18719, 18720, 18743 y 18823. Estos cultivos han sido depositados y forman parte de la condición de cultivos stock del Midwest Area Northern Regional Research Center, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, 1815 North University Street, Peoria, IL 61604.
- 15 U.S. Pat. No. 5.362.634 y la Solicitud de Patente Europea correspondiente No. 375316 A1 describen las espinosinas A, B, C, D, E, F, G, H y J. Estos compuestos se describen como producidos por cultivo de una cepa del nuevo

microorganismo *Saccharopolyspora spinosa* seleccionado de NRRL 18395, NRL 18537, NRRL 18538, y NRRL 18539.

5 WO 93/09126 describía las espinosinas L, M, N, Q, R, S y T. En dicho documento se describen también dos cepas productoras de espinosina J: NRRL 18719 y NRRL 18720, y una cepa que produce las espinosinas Q, R, S, y T: NRRL 18823.

WO 94/20518 y US Pat. No. 5.670.486 describen las espinosinas K, O, P, U, V, W, e Y, y derivados de las mismas. Se describe también la cepa productora de espinosina K NRRL 18743.

WO 01/19840 describe análogos de espinosina producidos por cultivo de la especie de *Saccharopolyspora* LW107129 (NRRL30141).

10 WO 99/46387 y US Pat. No. 6.143.526 describen los genes biosintéticos de espinosina de *Saccharopolyspora spinosa*.

La naturaleza de los genes implicados en la biosíntesis de espinosina, junto con estudios previos de incorporación de precursores (Broughton et al., 1991), indican que las espinosinas son producidas por la condensación gradual de ácidos carboxílicos de 2 carbonos y 3 carbonos para generar un poliquétido que se cicla y se puentea. El producto aglicona tetracíclico de estas reacciones se convierte en la pseudoaglicona por adición de un residuo ramnosilo, y la síntesis se completa por la adición del azúcar di-metilado en N, forosamina. En algunos aspectos, este proceso es similar al camino de biosíntesis por el cual se producen otros macrólidos (tales como el antibiótico eritromicina, el antihelmíntico avermectina, y el inmunosupresor rapamicina). En particular, el núcleo del poliquétido está ensamblado por una proteína multifuncional muy grande, que es una poliquétido-sintetasa Tipo I (*spn* PKS). Este polipéptido complejo comprende un módulo de carga y diez módulos de extensión, siendo cada módulo responsable tanto de la adición de un precursor acil-CoA específico a la cadena del poliquétido en crecimiento, y del grado de reducción del grupo β -ceto-carbonilo. Cada módulo realiza varias reacciones bioquímicas que son llevadas a cabo por dominios específicos del polipéptido. Todos los módulos de extensión contienen un dominio acil-transferasa (AT) que dona el grupo acilo de un precursor a un dominio de proteína portadora de acilo (ACP) y un dominio β -cetosintetasa (KS) que añade la cadena de poliquétido pre-existente a la nueva acil-ACP por condensación descarboxilante. En algunos módulos de extensión están presentes dominios adicionales: los dominios β -cetereductasa (KR) reducen los grupos β -ceto a hidroxilos, los dominios deshidratasa (DH) eliminan hidroxilos para dejar enlaces dobles, y el dominio enoil-reductasa (ER) reduce un enlace doble para dejar un carbono saturado. El módulo de carga de la *spn* PKS es diferente de los módulos de extensión por el hecho de que contiene un dominio KS variante (KSq), así como dominios AT y ACP. El dominio KSq, que se encuentra también en algunos otros módulos de carga PKS Tipo I (pero no en todos), se cree que proporciona la unidad iniciadora requerida por descarboxilación de una cadena acilo unida a ACP (Bisang et al., 1999). El módulo de extensión terminal contiene un dominio de tioesterasa/ciclasa (TE) que libera la cadena de poliquétido de la PKS.

35 La región de DNA de la espinosina PKS está constituida por 5 ORFs con codones de parada en marco al final de algunos dominios ACP, similares a los ORFs de la PKS en las otras bacterias productoras de macrólidos. Los cinco genes de espinosina PKS están dispuestos cabeza con cola, sin ninguna función interpuesta distinta de PKS tal como el elemento de inserción encontrado entre los genes PKS de eritromicina A1 y A11 (Donadio et al., 1993). Los mismos se designan *spnA*, *spnB*, *spnC*, *spnD* y *spnE*. La secuencia de nucleótidos para cada uno de los cinco genes PKS de espinosina, y los polipéptidos correspondientes, se identifican en el documento US Pat. No. 40 6.143.526 y en Waldron et al., 2001. Se identifican también en estas fuentes los productos de traducción predichos de los genes PKS, y los límites de los dominios y módulos.

Después de su síntesis, el precursor del poliquétido espinosina se condensa para formar una lactona macrocíclica, a la que se hace referencia en lo sucesivo como el núcleo del poliquétido. La producción de espinosinas activas con insecticidas requiere el procesamiento adicional del núcleo del poliquétido. En primer lugar, tienen que formarse puentes carbono-carbono entre C3 y C14, C4 y C12, y C7 y C11, para generar la aglicona intermedia. Posibles mecanismos para estas reacciones no usuales han sido sugeridos (Waldron et al., 2001), pero las características estructurales del sustrato de poliquétido que se requieren para que se produzcan las mismas no son conocidas. En segundo lugar, tiene que incorporarse una tri-O-metil-ramnosa en C9 para generar la pseudoaglicona. No se sabe si la ramnosa se metila normalmente antes o después de su adición a la aglicona, pero *S. spinosa* es capaz de añadir los grupos metilo después que el resto ramnosa se ha conjugado a la aglicona (Broughton et al., 1991). Las metilaciones tienen que ocurrir en una secuencia particular (2', luego 3', luego 4') o no tendrán lugar todas ellas, lo que indica que las metiltransferasas tienen requerimiento de sustrato muy específicos. El tercer paso del procesamiento, la adición de forosamina en C17, es necesario para producir las espinosinas más activas. Las enzimas implicadas en este paso tienen también requerimientos estrictos de sustrato: la forosaminil-transferasa no utilizará la aglicona como sustrato, y la N-metiltransferasa no actuará sobre la forosamina después que se ha unido a la pseudoaglicona. Esta especificidad de sustrato de enzimas biosintéticas posteriores puede ser una barrera para producir nuevas espinosinas biológicamente activas a partir de precursores con estructuras químicas diferentes.

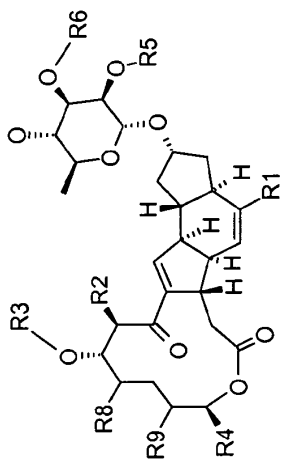
En ciertos casos, se han manipulado previamente genes de poliquétido-sintetasa (PKS) con el objetivo de producir nuevos poliquétidos. Se ha demostrado que la delección en marco de la parte codificante de DNA del dominio KR en

- 5 el módulo 5 de las PKS productoras de eritromicina (*ery*) conduce a la formación de análogos de eritromicina, a saber 5,6-didesoxi-3alfa-micarosil-5-oxoeritronolida B y 5,6-didesoxi-5-oxoeritronolida B (Donadio et al., 1991). Análogamente, la alteración de residuos de sitios activos en el dominio ER del módulo 4 de la *ery* PKS, por ingeniería genética del DNA codificante de PKS correspondiente y su introducción en *Saccharopolyspora erythraea*, condujeron a la producción de 6,7-anhidroeritromicina C (Donadio et al., 1993). WO 93/13663 describe tipos adicionales de manipulación genética de los genes *ery* PKS que son capaces de producir poliquétidos alterados.
- WO 98/01546 describe el reemplazamiento del módulo de carga de la *ery* PKS con el módulo de carga de la avermectina (*ave*) PKS, para producir un gen de PKS híbrido Tipo I que incorpora unidades iniciadoras diferentes para producir nuevos análogos de eritromicina.
- 10 Sin embargo, se ha encontrado también que no todas las manipulaciones de los genes PKS producen los nuevos análogos buscados como objetivo. Cuando Donadio et al. (1993) desactivaron un dominio ER de la *ery* PKS, el anhidro-derivado resultante no pudo procesarse completamente debido a que ya no era un sustrato para la micarosa-O-metiltransferasa. El cambio de la unidad de poliquétido iniciadora impedía la elongación y elaboración completas de un análogo de rifamicina en *Amycolatopsis mediterranei* (Hunziker et al., 1998). Dado el extenso
- 15 procesamiento específico de sustrato que se requiere para generar espinosinas con actividad insecticida, no es obvio que las modificaciones genéticas que cambian la estructura de un poliquétido de espinosina permitan la síntesis de una molécula totalmente procesada con actividad biológica útil. No obstante, si pudieron producirse tales análogos, y tuvieran un espectro de actividad insecticida diferente, serían sumamente deseables debido a que las espinosinas conocidas no controlan todas las plagas.

20 **Breve Descripción de la Invención**

La invención proporciona los compuestos biológicamente activos seleccionados de la Tabla 3.

Tabla 3



Comp. no.	Nombre	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
1	21-desetil-21-ciclopropil-espinosina A	H	CH ₃	(a)	ciclopropilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
2	21-desetil-21-ciclopropil-espinosina D	CH ₃	CH ₃	(a)	ciclopropilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
3	21-desetil-21-ciclobutil-espinosina A	H	CH ₃	(a)	ciclobutilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
4	21-desetil-21-ciclobutil-espinosina D	CH ₃	CH ₃	(a)	ciclobutilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
5	21-desetil-21-metiltiometil-espinosina A	H	CH ₃	(a)	metiltiometilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
6	21-desetil-21-metiltiometil-espinosina D	CH ₃	CH ₃	(a)	metiltiometilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
7	21-desetil-21-cianometil-espinosina A	H	CH ₃	(a)	cianometilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
8	5,6-dihidro-21-desetil-21-ciclobutil-	H	CH ₃	(a)	ciclobutilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H

ES 2 375 714 T3

Comp. no.	Nombre	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
	espinosina A									
9	21-desetil-21-isopropil-espinosina A	H	CH ₃	(a)	isopropilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
10	21-desetil-21-isopropil-espinosina D	CH ₃	CH ₃	(a)	isopropilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
11	21-desetil-21-sec-butil-espinosina A	H	CH ₃	(a)	sec-butilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
12	21-desetil-21-sec-butil-espinosina D	CH ₃	CH ₃	(a)	sec-butilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
13	21-desetil-21-metilciclopropil-espinosina A	H	CH ₃	(a)	metilciclo-propilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
14	21-desetil-21-metilciclopropil-espinosina D	CH ₃	CH ₃	(a)	metilciclo-propilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
15	21-desetil-21-(3-furil) espinosina A	H	CH ₃	(a)	3-furilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
16	21-desetil-21-(3-furil) espinosina D	CH ₃	CH ₃	(a)	3-furilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
17	21-desetil-21-ciclopropil-espinosina A 17-pseudoaglicona	H	CH ₃	H	ciclopropilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
18	21-desetil-21-ciclopropil-espinosina D 17-pseudoaglicona	CH ₃	CH ₃	H	ciclopropilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
19	21-desetil-21-ciclobutil-espinosina A 17-pseudoaglicona	H	CH ₃	H	ciclobutilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
20	21-desetil-21-ciclobutil-espinosina D 17-pseudoaglicona	CH ₃	CH ₃	H	ciclobutilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H

Los compuestos biológicamente activos de la invención proporcionan un método de control de plagas que comprende suministrar a una plaga una cantidad eficaz de un compuesto de la reivindicación 1.

5 Los compuestos biológicamente activos de la invención pueden utilizarse también para proporcionar una composición plaguicida que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de la reivindicación 1 como ingrediente activo en combinación con un diluyente o vehículo apropiado.

Breve Descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra la construcción de pCJR81.

La Figura 2 muestra la construcción de los vectores pLSB2 y pLSB3 utilizados para expresión de genes en *S. spinosa*.

10 La Figura 3 muestra la construcción de pLSB62, un vector para introducir la carga *ery* en el camino de espinosina.

La Figura 4 muestra el camino híbrido *ery/spn* PKS de *S. spinosa* 13E.

La Figura 5 muestra la construcción de pLSB29, un vector para introducir la carga *ave* en el camino de espinosina.

La Figura 6 muestra el camino híbrido *ave/spn* PKS de *S. spinosa* 21K2.

Breve Descripción de las Secuencias

15 SEQ ID NO. 1 es oligo PRIS1.

SEQ ID NO. 2 es oligo PRIS2.

SEQ ID NO. 3 es la secuencia de DNA del promotor para resistencia a pristinamicina.

SEQ ID NO. 4 es oligo CR311.

SEQ ID NO. 5 es oligo CR312.

20 SEQ ID NO. 6 es oligo SP28.

SEQ ID NO. 7 es oligo SP29.

SEQ ID NO. 8 es el fragmento de DNA que codifica el módulo de carga *ery* PKS que se utilizó para clonación, con los sitios de enzimas de restricción introducidos en pb 1-6 y pb 1680-1685.

SEQ ID NO. 9 es oligo SP14.

25 SEQ ID NO. 10 es oligo SP15.

Descripción Detallada de la Invención

Descripción del Cultivo

30 Las cepas derivadas de *Saccharopolyspora spinosa* NRRL 18537 o *Saccharopolyspora spinosa* NRRL 18538 y que producen los compuestos de la invención se identifican en la tabla siguiente. Los cultivos han sido depositados de acuerdo con los términos del tratado de Budapest en el Midwest Area Regional Center, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, 815 North University Street, Peoria, IL 61604. Las cepas se depositaron el 15 de enero de 2001 y les fueron asignados los números de depósito que se detallan en la Tabla 4 siguiente.

Tabla 4

Número de Depósito	Cepa	Cepa Parental
NRRL 30539	<i>Saccharopolyspora spinosa</i> 7D23	NRRL 18538
NRRL 30540	<i>Saccharopolyspora spinosa</i> 13E	NRRL 18537
NRRL 30541	<i>Saccharopolyspora spinosa</i> 21K2	NRRL 18538
NRRL 30542	<i>Saccharopolyspora spinosa</i> 36P4	NRRL 18538

Características del Cultivo

Las cepas derivadas de *Saccharopolyspora spinosa* NRRL 18537 o *Saccharopolyspora spinosa* NRRL 18538 y que producían los compuestos de la invención tenían las características de cultivo siguiente:

5 Todos los cultivos crecían satisfactoriamente en ISP2 y agar de Bennett y se producían hifas aéreas en todos los medios utilizados. La masa de esporas aéreas era predominantemente blanca (desarrollando una tonalidad rosa pálida con el tiempo). El micelio sustrato era de color crema a canela claro, sin que fuera aparente pigmento distintivo alguno. Se liberó en el medio un pigmento pardo soluble. No se observó diferencia significativa alguna en ninguno de los medios utilizados.

Manipulación del camino de las espinosinas y genes accesorios

10 Con objeto de facilitar la manipulación del camino biosintético de las espinosinas, se obtuvieron los cósmidos pRHB9A6 y pRHB3E11, y se describen en US Pat. No. 6.274.350 B1 y en Waldron et al. (2001).

15 No es inmediatamente evidente a partir de la secuencia de los genes biosintéticos de espinosina el modo en que se regula la producción de espinosinas. Con objeto de evitar posibles complicaciones asociadas con la regulación de la agrupación de genes, se utilizaron varios promotores heterólogos para activar la totalidad o parte de la porción de poliquétido-sintetasa (genes *spnA*, *spnB*, *spnC*, *spnD* y *spnE*). Se encontró que los promotores siguientes eran al menos tan eficientes en la producción de espinosina PKS como el promotor natural (juzgado por la producción de los productos finales espinosina A, espinosina D, espinosina A C17-pseudoaglicona, y espinosina D C17-pseudoaglicona): el promotor *actI* de la agrupación biosintética de actinorrodina de *S. coelicolor*, utilizado junto con su activador cognado, *actII-ORF4*, (como se describe en WO 98/01546, WO 98/01571, Rowe et al., 1998) y el
20 promotor para la resistencia a pristinamicina. Se ha informado anteriormente que el último activa la sobreexpresión de los genes de poliquétidos de *S. erythraea* (Blanc et al., 1995; Sala-Bey et al., 1995). Es un promotor que puede ser inducido por fenómenos de estrés fisiológico en *Streptomyces* spp. El uso de promotores heterólogos en *S. spinosa* no se limita a los arriba descritos, y podría incluir otros que podría esperarse funcionaran en *S. spinosa*.

Espinosina PKS híbrida utilizando módulo de carga heterólogo

25 La invención describe PKSs híbridas que son funcionales en *Saccharopolyspora spinosa* para generar poliquétidos que se procesan para dar espinosinas biológicamente activas. Los poliquétidos resultantes se extendieron a la misma longitud que las espinosinas naturales, y se procesaron por "cross-bridging" y glicosilación para generar nuevas espinosinas insecticidas. Preferiblemente, la PKS híbrida comprende los módulos de extensión de la *spn* PKS con un módulo de carga heterólogo que conduce a un poliquétido de espinosina que tiene una unidad
30 iniciadora diferente. Los genes de espinosina PKS híbrida que contienen los módulos extendedores de *spn* detrás de un módulo de carga heterólogo pueden promocionar nuevas espinosinas con cadenas laterales diferentes en C21. La naturaleza de esta cadena lateral está determinada por la unidad iniciadora que selecciona el módulo de carga para iniciar la síntesis del poliquétido. Los cambios en la cadena lateral pueden alterar las propiedades físicas o la actividad biológica de la espinosina resultante. Es particularmente útil proporcionar un gen de PKS híbrida en el cual
35 el módulo de carga acepte muchos ácidos carboxílicos diferentes, con inclusión de ácidos no naturales. Un gen de este tipo puede utilizarse para generar muchas espinosinas diferentes por incorporación de unidades iniciadoras diferentes. Por ejemplo, el módulo de carga de la *spn* PKS puede reemplazarse por el módulo de carga de la *ave* PKS, que se sabe acepta una gran diversidad de unidades iniciadoras (Dutton et al., 1991). Se sabe también que el módulo de carga de la *ery* PKS acepta unidades iniciadoras alternativas (Pacey et al., 1998). Así, un organismo que exprese tales genes de espinosina PKS híbrida puede producir nuevas espinosinas en las cuales la naturaleza de la cadena lateral en C21 está determinada por el ácido carboxílico que se alimenta al organismo. Las cadenas laterales pueden ser de longitudes diferentes, con ramificaciones o anillos, y/o pueden contener heteroátomos.

Más preferiblemente, la PKS híbrida incluye un módulo de carga que acepta muchos ácidos carboxílicos diferentes de tal modo que el ensamblaje del gen híbrido puede utilizarse para producir muchas espinosinas diferentes.
45 Ejemplos particularmente útiles contienen los módulos de extensión de *spn* con el módulo de carga de la eritromicina (*ery*) PKS.

a. Espinosina PKS híbrida utilizando el módulo de carga *ery*

El módulo de carga de la agrupación biosintética de eritromicina (*eryAT0ACP0*) gobierna la introducción de propionil-CoA en el iniciador de la molécula de eritromicina. Se ha demostrado previamente que pueden incorporarse
50 iniciadores alternativos en la molécula de eritromicina por alimentación de ácidos libres al medio de producción (Pacey et al., 1998).

Como se muestra en los ejemplos siguientes, la generación de un gen híbrido *spnA* en el cual el módulo de carga de eritromicina reemplaza el módulo de carga de espinosina conduce a una espinosina PKS que puede aceptar ácidos libres en la unidad iniciadora. En el ejemplo ilustrativo que sigue, se sometió a remodelación el módulo de carga de
55 eritromicina en el comienzo de la espinosina KS1 exactamente dentro del dominio KS en la región conservada. Nuevas conexiones de dominios o módulos se hacen preferiblemente en secuencias de DNA conservadas dentro de

los dominios, o próximas a los bordes de los mismos; sin embargo, una poliquétido-sintetasa activa puede generarse alternativamente por manipulación genética de sitios de remodelación en las regiones interdominio (WO 98/01546).

El fragmento de carga *ery* se clonó en marco con, y aguas arriba de, una región de *spn* A para permitir recombinación homóloga con la *spn* PKS nativa. Aguas arriba de la carga *ery* se encontraba el promotor *actI* (P_{actI}) o el promotor para resistencia a pristinamicina (P_{ptr}), dando lugar a los plásmidos pLSB61 y pLSB62 respectivamente. Estos plásmidos están basados en pKC1132 y son por tanto resistentes a apramicina. Los mismos llevan también *oryT* para transferencia conyugal de DNA en actinomicetos (Bierman et al., 1992, Matsushima et al. 1994). Estos constructos se transformaron en *S. spinosa* NRRL 18537 por conjugación. Se confirmó que los exconjugantes contenían el híbrido *ery/spn* PKS bajo el promotor apropiado por amplificación PCR.

10 La *S. spinosa* NRRL 18537:pLSB62 se designó *S. spinosa* 13E, y se utilizó para análisis de la producción de espinosina.

Como se demuestra en los ejemplos que siguen, cuando se cultivaba en medios de producción, *S. spinosa* 13E producía principalmente espinosina A y espinosina E, en cantidades aproximadamente iguales. Se estimó que el rendimiento total de espinosinas era aproximadamente 10-25% de los niveles de espinosina A de tipo salvaje, lo que representaba un aumento en el rendimiento de espinosina E de aproximadamente 10 veces. Esta ratio alterada de productos puede ser un reflejo de la especificidad más débil del módulo de carga *ery* con relación al módulo de carga *spn*, o un reflejo del suministro diferente de sustrato en *S. spinosa* comparada con *S. erythraea*, o una combinación de ambos. Se ha observado la incorporación de acetato por la carga *ery* en *S. erythraea* cuando el camino de eritromicina está regulado en sentido creciente (Rowe et al. 1998). El aumento del rendimiento de espinosina E en la cepa 13E con respecto a los niveles de tipo salvaje significa que ésta podría ser una cepa preferida para producción de espinosina E.

Se alimentaron varios ácidos carboxílicos a *S. spinosa* 13E, conduciendo a la producción de nuevos análogos de espinosina con unidades iniciadoras alteradas. Entre las nuevas espinosinas identificadas se encontraban las 21-desetil-21-ciclopropil-espinosinas A y D (por incorporación de ácido ciclopropano-carboxílico), 21-desetil-21-ciclobutil-espinosinas A y D (por incorporación de ácido ciclobutano-carboxílico) y 21-desetil-21-metilmetil-espinosinas A y D (a partir de ácido metiltioacético). Los nuevos análogos exhibían tiempos de retención cromatográficos razonables, cromóforos UV y patrones de fragmentación MS característicos, y las estructuras predichas se vieron respaldadas por medidas exactas de masas. Las asignaciones estructurales de los compuestos 21-ciclopropil y 21-ciclobutil aislados se confirmaron por caracterización NMR total. Los compuestos aislados eran activos en ensayos de control de insectos.

El uso de la cepa *S. spinosa* 13E no está limitado a la producción de estos compuestos. Se espera que numerosos otros análogos de espinosina puedan ser identificados por alimentación de otros ácidos, tales como los utilizados para producir las nuevas eritromicinas (Pacey et al. 1998).

Ejemplo 1: Construcción de pCJR81

35 Véase la Figura 1.

El plásmido pCJR81 es un vector para expresión de genes de poliquétido bajo el promotor de resistencia a pristinamicina. El mismo se construyó como sigue:

Se diseñaron dos oligos solapantes para realizar una reacción PCR en la cual actúan ambos como iniciadores y molde. Se diseñaron los mismos para introducir un sitio de restricción *NdeI* que incorporaba el codón de partida ATG, de tal modo que pueden clonarse genes con espaciamiento óptimo a partir del sitio de fijación de ribosoma. Se incorporó un sitio de restricción *SpeI* para facilitar la clonación ulterior. Los oligos son PRIS1 (SEQ ID NO: 1) y PRIS2 (SEQ ID NO: 2).

La amplificación para obtener el fragmento promotor se realizó con DNA-polimerasa termoestable *Pwo* utilizando las condiciones del fabricante. El fragmento de 112 pb se fosforiló con polinucleótido-quinasa T4, y se clonó en pUC18 disponible comercialmente digerido con *SmaI* y desfosforilado. Los plásmidos que contenían inserciones se secuenciaron. Un solo plásmido que contenía la secuencia correcta se designó pRIS4.

La inserción de 94 pb de pRIS4 se escindió como un fragmento *SpeI/NdeI* (SEQ ID NO: 3) y se clonó en pCJR24 (WO 98/01546, WO 98/01571, Rowe et al., 1998) que se había digerido previamente con *SpeI* y *NdeI*. Un solo plásmido correcto se designó pCJR81.

50 **Ejemplo 2: Construcción de plásmidos para expresión de *S. spinosa***

Véase la Figura 2.

Se construyeron los plásmidos pLSB2 y pLSB3 para expresión de genes de poliquétidos o genes accesorios en *S. spinosa*. El plásmido pLSB2 contiene el promotor *actI* (P_{actI}) y su activador cognado (*actII*-ORF4). El plásmido pLSB3 contiene el promotor para resistencia a pristinamicina (P_{ptr}). Estos plásmidos se construyeron como sigue:

El plásmido pKC1132 (Bierman et al., 1992) contiene un origen de transferencia (*oriT*), y un marcador de resistencia a apramicina para selección en *E. coli* y en actinomicetos. El mismo puede utilizarse por tanto para manipulaciones del DNA en *E. coli*, y permite que los plásmidos finales se introduzcan en *S. spinosa* por conjugación. El polienlazador de pKC1132 se reemplazó por un enlazador de dos oligos CR311 (SEQ ID NO: 4) y CR312 (SEQ ID NO: 5) a fin de proporcionar sitios de restricción EcoRV/Spel/NdeI/XbaI apropiados.

Se digirió el plásmido pKC1132 con *PvuII* y los extremos se desfosforilaron con fosfatasa alcalina de camarón. Los oligos CR311 y CR312 se fosforilaron con polinucleótido-quinasa T4, se reasociaron y se clonaron en pKC1132_ *PvuII* para generar pLSB1. Un fragmento *Spel/NdeI* que contenía el activador específico del camino de actinorrodina, *actII-ORF4* y el promotor *actI* se aisló de pCJR24 (WO 98/01546, WO 98/01571, Rowe et al., 1998) y un fragmento *Spel/NdeI* que contenía el promotor para resistencia a pristinamicina se aisló de pCJR81 (arriba descrito, Ejemplo 1). Cada uno de estos fragmentos se clonó independientemente en pLSB1 digerido con *Spel* y *NdeI* para generar pLSB2 (que contenía *actII-ORF4* y P_{actI}) y pLSB3 (que contenía P_{ptr}).

Ejemplo 3: Construcción de un vector para incorporar el módulo de carga de la eritromicina-poliqúetido-sintetasa en la espinosina-poliqúetido-sintetasa

Véase la Figura 3.

El vector para incorporar el módulo de carga de la eritromicina-poliqúetido-sintetasa en la espinosina-poliqúetido-sintetasa contiene el módulo de carga de eritromicina (ATOACPO), seguido por una región del primer módulo de la espinosina PKS para proporcionar homología para integración. El vector se designa pLSB62 y se construyó como sigue.

Se amplificó el módulo de carga de eritromicina por PCR utilizando pCJR26 (Rowe et al., 1998) como el molde, y los oligos SP28 (SEQ ID NO: 6) y SP29 (SEQ ID NO: 7). SP28 incorpora un sitio *NdeI* en el codón de partida de la secuencia *ery*, y SP29 incorpora un sitio *NheI* al comienzo del dominio KS1.

El fragmento PCR se fosforiló, se purificó en gel y se clonó en pUC18 que se había digerido previamente con *SmaI* y desfosforilado. Los clones se cribaron respecto a la presencia de inserciones y se secuenciaron. Un clon que contenía la secuencia correcta se designó pLSB44. El mismo contenía la inserción en la orientación con el sitio *NheI* próximo al sitio *EcoRI* del polienlazador. La secuencia del fragmento del módulo de carga de eritromicina utilizado, desde el sitio *NdeI* al sitio *NheI* se muestra en SEQ ID NO: 8.

El plásmido pLSB8 (descrito en el Ejemplo 11) contiene un fragmento de *spnA* que comienza con el sitio *NheI* en *spnKS1*. El fragmento que contiene el módulo de carga de eritromicina se escindió de pLSB44 como un fragmento *NdeI/NheI* y se clonó en pLSB8 digerido previamente con *NdeI* y *NheI* para dar pLSB56. El fragmento contenido en pLSB56 contiene el módulo de carga de eritromicina remodelado en marco a la espinosina KS1, con una región de homología a *spnA* que es suficiente para que ocurra la integración.

Esta región se separó como un fragmento *NdeI/XbaI* y se clonó en pLSB3 para dar pLSB62. Esto sitúa el nuevo fragmento híbrido *ery/spn* bajo P_{ptr} , en un vector que puede transferirse en *S. spinosa* por conjugación y seleccionarse utilizando el marcador de resistencia a apramicina.

Ejemplo 4: Generación de una cepa de *S. spinosa* que alberga una poli-qúetido-sintetasa híbrida que comprende el módulo de carga de eritromicina fusionado al KS1 de la Espinosina PKS.

Véase la Figura 4.

Se transformó *Saccharopolyspora spinosa* NRRL 18537 por conjugación (Matsushima et al. 1994) de *E. coli* S17-1 (Simon et al., 1983) con pLSB62. Se seleccionaron transformantes respecto a resistencia a apramicina y se cribaron por PCR. Un solo transformante se designó cepa *S. spinosa* 13E.

Ejemplo 5: Análisis químico de fermentaciones de *S. spinosa*

El método HPLC siguiente es útil para analizar fermentaciones respecto a la producción de espinosinas naturales y nuevas espinosinas no naturales modificadas por ingeniería genética.

En un tubo Eppendorf de 2 ml, una parte alícuota de caldo de fermentación (1 ml) se ajustó a pH ~ 10 por la adición de solución de amoníaco al 20% (aprox. 20 µl). Se añadió acetato de etilo (1 ml) a la muestra y se mezcló enérgicamente durante 60 segundos utilizando un agitador Vortex. La mixtura se separó por centrifugación en una microcentrífuga y la fase superior se retiró a un tubo Eppendorf limpio de 2 ml. El acetato de etilo se eliminó por evaporación utilizando un Speed-vac. Los residuos se disolvieron en metanol (250 µl) y se clarificaron utilizando una microcentrífuga. El análisis se realizó por el sistema HPLC siguiente:

Volumen de inyección: 50 µl

Fase estacionaria de la columna: columna de 150 x 4,6 mm, gel de sílice de 3 µm desactivado con bases (Hypersil C₁₈-BDS).

Fase móvil A: 10% acetonitrilo: 90% agua, que contenía acetato de amonio 10 mM y 0,15% de ácido fórmico.

Fase móvil B: 90% acetonitrilo: 10% agua, que contenía acetato de amonio 10 mM y 0,15% de ácido fórmico.

Gradiente de la fase móvil: T = 0 min, 10% B; T = 1, 10% B; T = 25, 95% B; T = 29, 95% B; T = 29,5, 10% B.

Régimen de flujo: 1 ml/min.

- 5 Detección: UV a 254 nm; MS a lo largo del intervalo m/z 100-1000.

Ejemplo 6: Producción de metabolitos por fermentación de *S. spinosa* 13E

Se cultivó *S. spinosa* 13E a partir de un stock vegetativo congelado (cultivo 1:1 CSM: crioconservante, donde el crioconservante es 10% lactosa, 20% glicerol p/v en agua). Se dejó crecer un precultivo primario en medio CSM (caldo tripsina-soja 30 g/l, extracto de levadura 3 g/l, sulfato de magnesio 2 g/l, glucosa 5 g/l, maltosa 4 g/l, Hosted y Baltz 1996, US Pat. No. 5.362.634), en un cultivo de 50 ml en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con un adaptador de acero, agitado a 250 rpm con una carrera de 2 pulgadas a 30°C, y 75% de humedad relativa durante 3 días. Se utilizó éste para inocular un precultivo secundario en medio vegetativo (glucosa 10 g/l, N-Z-amina A 30 g/l, extracto de levadura 3 g/l, sulfato de magnesio 2 g/l, Strobel y Nakatsukasa 1993; US Pat. No. 5.362.634) a 5% v/v, que se cultivó en las mismas condiciones durante 2 días más. El precultivo vegetativo secundario se utilizó para inocular el medio de producción (glucosa 67 g/l, harina de algodón Proflo 5 g/l, nutriente de leche peptonizada 22 g/l, licor de maceración de maíz 12 g/l, oleato de metilo 40 g/l, carbonato de calcio 5 g/l, pH hasta 7,0 con hidróxido de sodio; Strobel y Nakatsukasa 1993) a 5% v/v. Los cultivos de producción en pequeña escala se fermentaron en las mismas condiciones que los precultivos, pero durante 7-10 días. Para la producción inicial de *S. spinosa* 13E, se dejaron crecer los cultivos en pequeña escala en 30 ml de medio de producción en matraces Erlenmeyer de 250 ml con adaptadores durante 7 días.

Para la identificación de los metabolitos producidos, se analizó una parte alícuota de 1 ml de caldo de fermentación por LC-MS como se describe en el Ejemplo 5. Por comparación con estándares auténticos, y con un extracto de fermentación de la cepa no transformada de *S. spinosa* NRRL 18537, los compuestos principales producidos por *S. spinosa* 13E se identificaron como espinosinas A y E (que se producen en cantidades aproximadamente iguales) y espinosina D (que se observaba como un producto menor). El título de la cepa *S. spinosa* 13E era ~ 10-15 mg/l de las espinosinas totales. La ratio de productos a *S. spinosa* 13E era diferente a la de NRRL 18537, estando la producción relativa de espinosina E significativamente incrementada.

Ejemplo 7: Producción dirigida por precursores de nuevas espinosinas de *S. spinosa* 13E (Producción de los Compuestos 1-6)

30 Se utilizó la *ery/spn* PKS híbrida para generar nuevos metabolitos de espinosina por alimentación de ácidos carboxílicos a cultivos de producción. El módulo de carga *ery* incorporaba el ácido carboxílico dentro del iniciador de la molécula.

Matraces de producción paralelos (30 ml en matraz Erlenmeyer de 250 ml con adaptador) se inocularon como se describe en el Ejemplo 6 anterior. Después de 24 h se alimentó cada uno de éstos con un ácido carboxílico (soluciones stock preparadas en agua con pH ajustado a 6,5 con hidróxido de sodio) a una concentración final de 2-6 mM. Después de 7 días, se analizó por LC-MS una parte alícuota de 1 ml del caldo de fermentación como se describe en el Ejemplo 5. La incorporación de ácido ciclobutil-carboxílico, ácido ciclopropil-carboxílico y ácido metiltioacético para generar nuevas espinosinas modificadas en C21 se indicaba por la aparición de nuevos picos en los cromatogramas UV y MS (Tabla 5). Los espectros MS de los nuevos compuestos daban iones para las especies $[M+H]^+$ y para el fragmento de forosamina (142,3).

Tabla 5

Ácido alimentado	carboxílico	Compuesto (véase Tabla 3)	No.	Tiempo de retención (min)	Datos espectrales de masas fundamentales (m/z)
ácido ciclopropil-carboxílico		1		23,5	744,4 $[M+H]^+$; 142,4
ácido ciclopropil-carboxílico		2		25,0	758,5 $[M+H]^+$; 142,3
ácido ciclobutil-carboxílico		3		25,7	758,5 $[M+H]^+$; 142,3
ácido ciclobutil-carboxílico		4		27,3	772,5 $[M+H]^+$; 142,2
ácido metiltio-acético		5		22,9	764,4 $[M+H]^+$; 142,3
ácido metiltio-acético		6		24,3	778,5 $[M+H]^+$; 142,3

Ejemplo 8: Producción y aislamiento de 21-desetil-21-ciclobutil-espinosinas A y D (Compuestos 3 y 4)

5 Cepas vegetativas congeladas de *S. spinosa* 13E se inocularon en precultivos vegetativos primarios en CSM (50 ml incubados en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con adaptador). Se prepararon precultivos secundarios en medio vegetativo (250 ml incubados en un matraz Erlenmeyer de 2 l con adaptador) y se incubaron como se describe en el Ejemplo 6, pero a 300 rpm con una carrera de 1 pulgada.

10 Se prepararon de 12 a 14 l de medio de producción, como en el Ejemplo 6, con la adición de 0,01% v/v de antiespumante Pluronic L-0101 (BASF). El medio de producción se inoculó con el precultivo vegetativo secundario a 5% v/v, y se dejó fermentar en un biorreactor agitado de 20 l durante 7-10 días a 30°C. El flujo de aire se ajustó a 0,75 vvm, y la sobrepresión se ajustó a 0,5 bares manométricos o inferior, y la velocidad en la punta de la hélice se controló entre 0,39 y 1,57 ms⁻¹ a fin de mantener una tensión de oxígeno disuelto de 30% de saturación de aire o superior. Se añadió Pluronic L0101 adicional (BASF) para controlar la formación de espuma en caso necesario.

Se alimentó ácido ciclobutil-carboxílico al biorreactor al cabo de 25 horas, a una concentración final de 5 mM.

15 El caldo de fermentación se recogió después de 7 días y se clarificó por centrifugación para proporcionar sobrenadante y células. Las células (1 l) se extrajeron por mezclado concienzudo con un volumen igual de metanol y se dejaron luego en reposo durante 30 min. La suspensión células-metanol se centrifugó, y el sobrenadante se separó por decantación. El procedimiento se repitió. El sobrenadante de fermentación (12 l) se ajustó a pH ~ 10 por adición de NaOH 5 N y se agitó moderadamente con 0,75 volúmenes de acetato de etilo durante 8 horas. La fase superior se retiró por aspiración y se repitió la extracción. Las fracciones de acetato de etilo y metanol se combinaron y los disolventes se eliminaron a vacío para producir una mezcla aceite/agua de color amarillo-pardo (1 l). Se mezcló ésta con acetato de etilo (2 l) y se extrajo con una solución de ácido tartárico 50 mM (3 x 1,5 l). Los extractos de ácido tartárico se combinaron, se ajustaron a pH ~ 10 con NaOH 5 N, y se extrajeron con acetato de etilo (3 x 1,5 l). Los extractos de acetato de etilo se combinaron y el disolvente se eliminó a vacío para dejar un residuo aceitoso pardo (7,5 g). El residuo se disolvió en acetato de etilo (500 ml) y se extrajo 3 veces con ácido tartárico 50 mM (350 ml). Las fracciones de ácido tartárico se combinaron, se ajustaron a pH ~ 10 y se reextrajeron con acetato de etilo (3 x 500 ml). Las fracciones de acetato de etilo se combinaron y el disolvente se eliminó a vacío para producir un residuo aceitoso pardo (0,5 g).

25 El residuo aceitoso se disolvió en metanol (1,5 ml) y se cromatografió, en dos porciones iguales, sobre gel de sílice de fase inversa desactivado con bases (Hypersil C₁₈-BDS, 5 µm; 21 x 250 mm) eluyendo con un gradiente de fase móvil como se describe a continuación, con un régimen de flujo de 21 ml/min.

30 Gradiente de la fase móvil: T = 0 min, 15% B; T = 5, 35% B; T = 35, 90% B; T = 45, 95% B.

Fase móvil A: 10% acetonitrilo/90% agua, que contenía acetato de amonio 10 mM y 0,15% de ácido fórmico.

Fase móvil B: 90% acetonitrilo/10% agua, que contenía 10 mM acetato de amonio y 0,15% de ácido fórmico.

Se recogieron fracciones cada 30 segundos.

35 Las fracciones del fraccionamiento inicial que contenían 21-desetil-21-ciclobutil-espinosina A se combinaron, y el disolvente se eliminó a vacío. Los residuos se cromatografiaron sobre gel de sílice de fase inversa (Prodigy C₁₈, 5 µm; 10 x 250 mm) eluyendo con un gradiente como se describe a continuación, con un régimen de flujo de 5 ml/min.

T = 0, 55% B; T = 5, 70% B; T = 35, 95% B; T = 45, 95% B.

40 Se recogieron fracciones cada 30 segundos. Las fracciones que contenían la 21-desetil-21-ciclobutil-espinosina A se combinaron, se eliminó el acetonitrilo a vacío, se concentró la muestra utilizando cartuchos C₁₈-BondElute (200 mg). La muestra se aplicó por gravedad, se lavó con agua (10 ml) y se eluyó con metanol (2 x 10 ml), y se eliminó luego el disolvente a vacío.

Las fracciones del fraccionamiento bruto inicial que contenían 21-desetil-21-ciclobutil-espinosina D se combinaron, y el disolvente se eliminó a vacío. Los residuos se cromatografiaron sobre gel de sílice de fase inversa (Prodigy C₁₈, 5 µm; 10 x 250 mm) eluyendo con un gradiente como se describe a continuación, con un régimen de flujo de 5 ml/min.

45 T = 0 min, 25% B; T = 5, 55% B; T = 35, 95% B; T = 45, 95% B.

Se recogieron fracciones cada 30 segundos. Las fracciones que contenían la 21-desetil-21-ciclobutil-espinosina D se combinaron, se eliminó el acetonitrilo a vacío, y la muestra se concentró utilizando cartuchos C₁₈-BondElute (capacidad 200 mg). Se aplicó la muestra por gravedad, se lavó con agua (10 ml) y se eluyó con metanol (2 x 10 ml), y se eliminó luego el disolvente a vacío.

50 Las estructuras químicas de las espinosinas se determinaron por métodos espectroscópicos, con inclusión de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR), espectrometría de masas (MS), espectrometría ultravioleta (UV), cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas acopladas (HPLC-MS), y por comparación con los datos espectrales para los compuestos conocidos espinosinas A, D, E, y F.

ES 2 375 714 T3

La 21-desetil-21-ciclobutil-espinosina A (Compuesto 3) tiene las características siguientes:

Rendimiento aislado: 3,1 mg

Peso molecular: 757

Fórmula molecular: C₄₃H₆₇NO₁₀

5 UV (por detección con sistema de diodos durante el análisis HPLC-MS): 245 nm

MS con pulverización electrónica: m/z para [M+H]⁺ = 758,5; ion del fragmento de azúcar forosamina a m/z = 142,2.

FT-ICR-MS exacta: m/z para [M+H]⁺ = 758,4830 (requiere: 758,4838).

La Tabla 6 muestra los datos de desplazamiento químico ¹H y ¹³C NMR para 21-desetil-21-ciclobutil-espinosina A en CDCl₃.

10

Tabla 6

Posición	¹ H	¹³ C	Posición	¹ H	¹³ C
1	-	172,8	21	4,80	
2a	2,43	33,8	22	2,34	
2b	3,12	33,8	23a	1,65	
3	3,01	47,5	23b	1,65	
4	3,54	41,7	24a	1,76	17,8
5	5,80	128,8	24b	1,76	-
6	5,88	129,3	25a	1,86	24,6
7	2,17	41,1	25b	1,86	-
8a	1,37	36,2	1'	4,85	95,4
8b	1,92	-	2'	3,49	77,7
9	4,31	76,0	3'	3,46	81,0
10a	1,33	37,3	4'	3,12	82,2
10b	2,26	-	5'	3,54	67,9
11	0,91	46,0	6'	1,28	17,8
12	2,88	49,4	2'-OMe	3,49	59,0
13	6,76	147,5	3'-OMe	3,50	57,7
14	-	144,2	4'-OMe	3,56	60,9
15	-	202,9	1"	4,42	103,4
16	3,26	47,8	2"a	1,47	30,8
16-Me	1,17	16,1	2"b	1,98	-
17	3,61	80,6	3"a	1,47	18,5
18a	1,49	34,4	3"b	1,98	

Posición	¹ H	¹³ C	Posición	¹ H	¹³ C
18b	1,49	-	4"	2,26	64,8
19a	-	21,7	5"	3,84	73,5
19b	-	-	6"	1,26	19,0
20a	1,34	28,2	4"-NMe ₂	2,26	40,6
20b	1,44	-			
Los desplazamientos químicos se dan con referencia al protón de CHCl ₃ a 7,26 ppm					

La 21-desetil-21-ciclobutil-epinosina D (Compuesto 4) tenía las características siguientes:

Rendimiento aislado: ~ 1 mg

Peso molecular: 771

Fórmula molecular: C₄₄H₆₉NO₁₀

5 UV (por detección con sistema de diodos durante el análisis HPLC-MS): 245 nm

MS con pulverización electrónica: m/z para [M+H]⁺ = 772,5; ion del fragmento de azúcar forosamina a m/z = 142,2.

10 La pequeña cantidad de material impidió el estudio detallado por NMR de esta molécula, pero los datos acumulados eran consistentes con la estructura esperada. Este análisis se vio facilitado por comparación con los datos para 21-desetil-21-ciclobutil-epinosina A.

Ejemplo 9: Preparación de 5,6-dihidro-21-desetil-21-ciclobutil-epinosina A (Compuesto 8) y 5,6-dihidro-21-desetil-21-n-propil-epinosina A (Compuesto 29)

15 Una solución de 21-desetil-21-ciclobutil-epinosina A (3,1 mg, 0,004 mmol) en 2 ml de tolueno y 0,5 ml de etanol se purgó con una corriente lenta de nitrógeno durante 20 minutos, se añadieron luego 2 mg de clorotris(trifenilfosfina)rodio y la solución se hidrogenó a 60°C y 1 atm durante 16 horas. Después de enfriamiento y eliminación del disolvente, el residuo se cromatografió utilizando una columna de gel de sílice de 10 cm x 2 cm, eluyendo con 5 fracciones de 25 ml de diclorometano que contenían 0%, 2%, 3%, 4%, y 5% de MeOH respectivamente. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron para dar 2,1 mg de 5,6-dihidro-21-desetil-21-ciclobutil-epinosina A. MS M⁺ 760.

20 Se preparó 5,6-dihidro-21-desetil-21-n-propil-epinosina A (Compuesto 29) a partir de 21-desetil-21-n-propil-epinosina A (Compuesto 23) utilizando el mismo procedimiento.

Ejemplo 10: Producción y aislamiento de 21-desetil-21-ciclopropil-epinosinas A y D (Compuestos 1 y 2)

25 Cepas vegetativas congeladas de *S. spinosa* 13E se inocularon en precultivos vegetativos primarios en CSM (50 ml, incubados en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con adaptador). Se prepararon precultivos secundarios en medio vegetativo (250 ml incubados en un matraz Erlenmeyer de 2 l con adaptador) y se incubaron como se describe en el Ejemplo 8.

30 Se prepararon 14 litros de medio de producción, como en el Ejemplo 6, con la adición de 0,01% v/v de antiespumante Pluronic N-0101 (BASF). El medio de producción se inoculó con el precultivo secundario a 5% v/v y se dejó fermentar en un biorreactor agitado de 20 l durante 7-10 días en las condiciones descritas en el Ejemplo 8.

Se alimentó ácido ciclopropil-carboxílico al biorreactor al cabo de 45 horas a una concentración final de 5 mM.

35 El caldo de fermentación se recogió después de 7 días y se extrajo como se describe en el Ejemplo 8. El residuo aceitoso se disolvió en metanol (1,5 ml) y se cromatografió inicialmente de modo grosero como se describe en el Ejemplo 8. Las fracciones de la separación inicial que contenían 21-desetil-21-ciclopropil-epinosina A se combinaron y el disolvente se eliminó a vacío. Los residuos se cromatografiaron sobre gel de sílice de fase inversa (Prodigy C₁₈, 5 μm; 10 x 250 mm) eluyendo con un gradiente como se describe a continuación, con un régimen de flujo de 5 ml/min.

T = 0 min, 55% B; T =, 70% B; T = 30, 95% B; T = 35, 95% B.

ES 2 375 714 T3

Se recogieron fracciones cada 30 segundos. Las fracciones que contenían la 21-desetil-21-ciclopropil-espinosina A se combinaron, se eliminó el acetonitrilo a vacío, y la muestra se concentró utilizando un cartucho C₁₈-BondElute (200 mg). Se aplicó la muestra por gravedad, se lavó con agua (10 ml) y se eluyó con metanol (2 x 10 ml), después de lo cual se eliminó el disolvente a vacío.

5 La 21-desetil-21-ciclopropil-espinosina A (Compuesto 1) tiene las características siguientes:

Rendimiento aislado: ~ 1 mg

Peso molecular: 743

Fórmula molecular: C₄₂H₆₅NO₁₀

UV (por detección con sistema de diodos durante el análisis HPLC-MS): 245 nm

10 MS con pulverización electrónica: m/z para [M+H]⁺ = 744,5; ion del fragmento de azúcar forosamina a m/z = 142,2.

La Tabla 7 resume los datos espectrales ¹H y ¹³C NMR para 21-desetil-21-ciclopropil-espinosina A en CDCl₃.

Tabla 7

Posición	¹ H	¹³ C	Posición	¹ H	¹³ C
1	-	-	20b	1,62	-
2a	2,43	34,0	21	4,18	79,3
2b	3,13	-	22	0,89	16,5
3	3,00	47,3	23a*	0,44	2,3
4	3,49	41,4	23b*	0,14	-
5	5,87	129,1	24a*	0,44	3,7
6	5,79	128,6	24b*	0,14	-
7	2,15	-	25	1,17	16,0
8a	1,34	36,0	1'	4,84	95,2
8b	1,91	-	2'	3,49	77,5
9	4,30	75,9	3'	3,45	80,9
10a	1,32	37,0	4'	3,10	82,1
10b	2,24	-	5'	3,54	67,7
11	0,89	45,9	6'	1,27	17,6
12	2,85	34,0	2'-OMe	3,49	58,8
13	6,74	147,4	3'-OMe	3,48	57,5
14	-	-	4'-OMe	3,55	60,7
15	-	-	1"	4,41	103,4
16	3,26	47,5	2"a	1,47	30,8
17	3,62	80,6	2"b	1,98	-
18a	1,51	34,2	3"a	1,45	18,2
18b	1,51	-	3"b	2,24	-
19a	1,18	22,0	4"	2,24	64,7
19b	1,74	-	5"	3,48	73,4
20a	1,62	30,9	6"	1,27	18,7
			4"-NMe ₂	2,24	40,6
<p>Los desplazamientos químicos se dan con referencia al protón de CHCl₃ a 7,26 ppm.</p> <p>* Estas asignaciones son intercambiables.</p>					

La 21-desetil-21-ciclopropil-espinosina D (Compuesto 2) tiene las características siguientes:

Rendimiento aislado: ~ 0,5 mg

Peso molecular: 757

Fórmula molecular: C₄₃H₆₇NO₁₀

UV (por detección con sistema de diodos durante el análisis HPLC-MS): 245 nm

5 MS con pulverización electrónica: m/z para [M+H]⁺ = 758,5; ion del fragmento de azúcar forosamina a m/z = 142,2.

La pequeña cantidad de material impidió el estudio detallado NMR de esta molécula, pero los datos acumulados eran consistentes con la estructura esperada. Este análisis se vio facilitado por comparación con los datos para 21-desetil-21-ciclopropil-espinosina A.

10 b. Espinosina-PKS híbrida utilizando el dominio de carga ave

El módulo de carga de la agrupación biosintética de avermectina (*adaT0ACP0*) dirige la introducción de las unidades iniciadoras ramificadas C-2 en la molécula de avermectina, derivada de iso-butilil-CoA y 3-metilbutilil-CoA. Existen precedentes del intercambio de este dominio de carga en el camino de la eritromicina PKS para dar nuevos poliquétidos con la especificidad de unidad iniciadora del sistema de avermectina (WO 98/01546, WO 98/01571, Marsden et al., 1998). Se ha demostrado también que el módulo de carga de avermectina incorpora ésteres de CoA de una extensa gama de ácidos libres del medio de producción, sea en su ambiente nativo, o como parte del camino híbrido *ave/ery* (Pacey et al., 1998). El intercambio del módulo de carga de avermectina descrito en la bibliografía es realmente un reemplazamiento de la eritromicina AT0ACP0 por la avermectina AT0ACP0. Esto conduce a una parte de la secuencia de DNA de eritromicina aguas arriba de la avermectina AT0 entre el codón inicial y un sitio *SpeI*. Se incluyó éste en el experimento *ave/ery* debido a que la región N-terminal (aguas arriba del dominio homólogo AT) es mucho mayor en el módulo de carga de eritromicina que en el de avermectina, y puede ser importante para estabilidad de la proteína. Dado que el híbrido resultante había sido productivo, se utilizó la misma región para el híbrido *ave/spn*. De hecho, el gen híbrido resultante es un híbrido *ery/ave/spn*, pero dado que el mismo transfiere la especificidad del módulo de carga de avermectina a la espinosina PKS, ha sido designado híbrido *ave/spn* definitivamente.

El módulo de carga de avermectina (AT0ACP0) se clonó a partir de pIG1 (WO 98/01546, WO 98/01571, Marsden et al. 1998) en marco y aguas arriba del *spnKS1*, bajo el control de *P_{acil}*, o *P_{pir}*. Se utilizó el mismo sitio de remodelación, en el borde de comienzo de la región homóloga KS1, que para el experimento de carga con *ery* arriba descrito. Se incorporó una región de homología para integración a partir de pRHB3E11. Los plásmidos resultantes, pLSB29 (con la región híbrida PKS bajo el control de *P_{acil}*) y pLSB30 (con la región híbrida PKS bajo el control de *P_{pir}*) están basados en pKC1132 y contienen por tanto el marcador de resistencia a apramicina para selección a la vez en *E. coli* y *S. spinosa*, y el *oryT* para transferencia conyugal de DNA de *E. coli* a *S. spinosa* (Bierman et al. 1992, Matsushima et al. 1994). Estos constructos se transformaron en *S. spinosa* NRRL 18538 por conjugación. Se confirmó que los exconjugantes contenían el gen PKS híbrido *ave/spn* bajo el promotor apropiado por análisis PCR.

35 *S. spinosa* NRRL 18538:pLSB29 se designó *S. spinosa* 21K2. La misma producía principalmente espinosinas E, A y D por incorporación de acetato y propionato en el módulo de carga. Se observaron pequeños picos adicionales en la LC-MS, con masas que eran consistentes con los nuevos productos naturales 21-desetil-21-iso-propil-espinosina A y 21-desetil-21-sec-butil-espinosina A y los análogos D equivalentes. Estos productos menores eran resultado de la incorporación de iso-butilato y 2-metil-butilato respectivamente en el iniciador. En la biosíntesis de avermectina propiamente dicha, el módulo de carga *ave* aporta únicamente estos iniciadores ramificados. En cambio, se observó un espectro de productos más amplio cuando el módulo de carga *ave* se remodeló aguas arriba del KS1 en la eritromicina PKS, lo que indicaba que dicho híbrido puede incorporar asimismo acetato y propionato. Los autores de la presente invención observaron por tanto la gama esperada de productos a partir de esta cepa de *S. spinosa* modificada por ingeniería genética.

45 La estructura de la 21-desetil-21-iso-propil-espinosina A aislada se confirmó por caracterización NMR. Se aisló 21-desetil-21-*n*-propil-espinosina A como un componente menor del cultivo de producción de 21-desetil-21-iso-propil-espinosina A. El análogo 21-*n*-propilo, producido probablemente por la incorporación de butirato por el módulo de carga a partir del medio, se caracterizó también plenamente. Ambos eran activos en ensayos de control de insectos.

50 Algo de la versatilidad natural del módulo de carga de la avermectina PKS se había transferido previamente al sistema de eritromicina, por lo que se alimentó una amplia gama de ácidos libres a *S. spinosa* 21K2 para generar espinosinas con unidades iniciadoras alteradas. Se identificaron nuevos compuestos de espinosina sobre la base de cromóforo UV, masa y fragmentación espectral de masas, junto con el conocimiento del ácido que se alimentaba y por consiguiente de qué compuestos eran de esperar de cada experimento. Para confirmar las predicciones de estructura hechas, se aislaron varios análogos de espinosina con nuevos grupos iniciadores C21 y se caracterizaron plenamente.

55 Los ácidos libres que pueden utilizarse de este modo incluyen, pero sin carácter limitante, los siguientes: ácidos orgánicos cíclicos que incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, y 2-metilciclopropilo; ácidos orgánicos cíclicos que contienen heteroátomos, con inclusión de ácido 2-furoico, ácido 3-furoico, ácido

tiofeno-carboxílico y ácido metil-tiofeno-carboxílico; ácidos carboxílicos de cadena ramificada; y algunos otros ácidos que incluían ácido metiltioacético, ácido cloroacético, ácido cianoacético y ácido metoxiacético.

5 Tales experimentos de alimentación conducen a análogos de espinosina (siendo una espinosina un macrólido con un núcleo tetracíclico de 22 miembros del tipo ilustrado en las Tablas 1 y 2 y en la Fórmula I) en la cual C21 lleva una cadena lateral distinta de etilo, por regla general un grupo C₂-C₅ alquilo ramificado en alfa, un grupo C₃-C₈ cicloalquilo o cicloalqueno (opcionalmente sustituido, v.g. con uno o más grupos hidroxilo, C₁-C₄ alquilo o alcoxi, o átomos de halógeno), o un heterociclo de 3-6 miembros que contiene O o S, saturado o total o parcialmente insaturado, opcionalmente sustituido (como en el caso de cicloalquilo). Candidatos preferidos para el sustituyente C21 son los grupos de unidades carboxilato utilizables como sustratos por los módulos de carga *ery* o *ave*. Sustratos preferidos incluyen ácido ciclobutano-carboxílico y ácido ciclopropano-carboxílico. Otras posibilidades incluyen ácido *n*-butírico, ácido iso-propil-carboxílico, ácido 2-(S)-metilbutírico, ácido 2-metilciclopropano-carboxílico, ácido 3-furoico y ácido metiltioacético.

15 La alimentación de los ácidos de cadena ramificada ácido iso-propil- y 2-metil-butil-carboxílico no alteraba el rendimiento de nuevos productos naturales producidos debido a la especificidad normal de la carga de *ave*. Estos productos se observaron en todos los cultivos prósperos de *S. spinosa* 21K2 con rendimiento bajo.

20 El ácido ciclobutil-carboxílico fue aceptado por el módulo de carga *ave* para dar los análogos A y D, y una proporción sustancial de la C17-pseudoaglicona del análogo A. Los productos que contenían ciclobutilo se observaron a niveles mayores que en el sistema de alimentación híbrida *ery/spn*, con 21-desetil-21-ciclobutil-espinosina A a ~ 5-10 mg/litro, 21-desetil-21-ciclobutil-espinosina D a niveles menores pero significativos y 21-desetil-21-ciclobutil-espinosina A 17-pseudoaglicona a ~ 10-15 mg/litro. El ácido ciclopropil-carboxílico alimentado tuvo también éxito, produciendo las 21-desetil-21-ciclopropil-espinosinas A y D. Se observó que los dos análogos de ciclobutilo y el análogo de ciclopropilo A eran idénticos a los compuestos purificados aislados a partir del experimento de carga *ery*.

25 Se incorporó ácido metiltioacético para dar la 21-desetil-21-metiltioacético-espinosina A, con rendimientos comparables a los del experimento con ciclobutilo anterior. Esto representaba una mejora importante en rendimiento con respecto a la producción del mismo compuesto a partir del experimento de carga de *ery*. Se incorporaron también ácido 2-furoico y ácido metilciclopropil-carboxílico para dar los nuevos productos esperados.

Ejemplo 11: Construcción de un vector para incorporar el módulo de carga de la avermectin-poliqúetido-sintetasa en la espinosin-poliqúetido-sintetasa

Véase la Figura 5.

30 El vector para incorporar el módulo de carga de la avermectina-poliqúetido-sintetasa en la espinosina-poliqúetido-sintetasa contiene el módulo de carga de avermectina (ATOACP0) seguido por una región del primer módulo de la espinosina PKS para proporcionar homología para integración. El vector se designó pLSB29 y se construyó como sigue:

35 El módulo de carga de avermectina se había remodelado previamente aguas arriba del módulo 1 de eritromicina (WO 98/01546, WO 98/01571, Marsden et al., 1998). En este híbrido *ave/ery*, el módulo de carga tenía el DNA codificante para la secuencia de aminoácidos de *ery* al comienzo, seguida por el ATOACP0 del *ave* PKS. Este fragmento híbrido confería la especificidad del dominio de carga de avermectina, aunque incluía una pequeña cantidad de la secuencia *ery*. Se utilizó el mismo fragmento en este experimento, y conduce a una proteína híbrida *ery/ave/spn*. Los autores de la presente invención describen el mismo simplemente como un híbrido *ave/spn* dado que es a la especificidad del dominio de carga de avermectina a la que se confiere el camino de espinosina. El fragmento comienza con un sitio *NdeI* que incorpora el codón de partida, y termina con un sitio *NheI* modificado por ingeniería genética al comienzo del KS1. Esto introduce un cambio conservador de aminoácidos (Ile-Leu) en la secuencia de espinosina KS1.

45 Para introducir el sitio *NheI*, la región de *spnA* desde el comienzo de la KS1 se amplificó por PCR utilizando pRHB3E11 (US 6.274.350 B1, Waldron et al. 2001) como el molde, y los oligos SP14 (SEQ ID NO: 9) y SP15 (SEQ ID NO: 10). SP14 introduce un sitio *NheI* en las bases 24107-24112 (los números se refieren a SEQ ID NO: 1 de US 6.274.350). SP15 fija aproximadamente 1500 pb aguas abajo, en un sitio *BstE11* (25646-25652). Se incorporó también un sitio *NotI* en SP15 para el paso de clonación subsiguiente. La PCR se llevó a cabo utilizando la polimerasa termoestable *Pwo* en condiciones estándar.

50 El producto PCR se fosforiló, se purificó en gel y se clonó en pUC19 que se había digerido previamente con *SmaI* y desfosforilado. Se secuenciaron varios clones que contenían inserciones. Un clon que contenía la inserción en la orientación que coloca el sitio *NheI* próximo al sitio *EcoRI* en el vector se designó pLSB5.

Para proporcionar una región de homología lo bastante grande para integración, se clonó un fragmento de aproximadamente 2,6 kpb (desde *BstE11* a *NotI*) de pRHB3E11 en pLSB5, para dar pLSB8.

55 Se clonó luego el módulo de carga de avermectina a partir de pIG1 (WO 98/01546, WO 98/01571, Marsden et al. 1998) como un fragmento *NdeI/NheI* y se ligó en pLSB8 digerido previamente con *NdeI* y *NheI*. La secuencia de

DNA del fragmento del módulo de carga de avermectina utilizado, desde el sitio *NdeI* al sitio *NheI* se muestra en SEQ ID NO: 11. El plásmido resultante se designó pLSB14.

El fragmento contenido en pLSB14 contiene el módulo de carga de avermectina remodelado en marco a la espinosina KS1, con una región de homología a *spnA* que es suficiente para que ocurra la integración.

- 5 Este fragmento se retiró luego como un fragmento *NdeI/XbaI* y se clonó en pLSB2 para dar pLSB29. Esto pone el nuevo fragmento híbrido *ave/spn* bajo P_{actI} , en un vector que puede transferirse a *S. spinosa* por conjugación y seleccionarse luego utilizando el marcador de resistencia a apramicina.

Ejemplo 12: Generación de una cepa de *S. spinosa* que alberga una poliquétido-sintetasa híbrida que comprende el módulo de avermectina fusionado a la KS1 de la espinosina PKS

- 10 Véase la Figura 6.

Se transformó *Saccharopolyspora spinosa* NRRL 18538 por conjugación (Matsushima et al. 1994) a partir de *E. coli* S17-1 (Simon et al., 1983) con pLSB29. Se seleccionaron transformantes por resistencia a apramicina y se cribaron por análisis mediante transferencia Southern. Un transformante individual que exhibía el patrón de hibridación correcto demostrando que el plásmido se había integrado en el cromosoma por recombinación homóloga se designó cepa *S. spinosa* 21K2.

Ejemplo 13: Producción de metabolitos por fermentación de *S. spinosa* 21K2 (Producción de los Compuestos 9-12)

- Se cultivó *S. spinosa* 21K2 a partir de un stock vegetativo congelado utilizado para inocular medio CSM (Hosted y Baltz 1996; US 5.362.634). Este precultivo se dejó crecer en matraces de sacudidas a 300 rpm con una carrera de una pulgada a una temperatura de 30°C durante 3 días. Se utilizó este precultivo para inocular medio vegetativo (Strobel y Nakatsukasa 1993; US Pat. No. 5.362.634) a 5% v/v y se cultivó en las mismas condiciones durante 2 días más. El cultivo vegetativo se utilizó para inocular medio de producción (Strobel y Nakatsukasa 1993) a 5% v/v. Cultivos de producción en pequeña escala se fermentaron en las mismas condiciones que los precultivos, pero durante 7-10 días a 250 rpm con una carrera de 2 pulgadas y 75% de humedad relativa. Los cultivos de producción iniciales en pequeña escala se dejaron crecer en 6 ml de medio de producción en matraces Erlenmeyer de 25 ml con adaptadores durante 7 días.

- Para identificar los metabolitos producidos, una parte alícuota de 1 ml de caldo de fermentación se analizó por LC-MS como se describe en el Ejemplo 5. Por comparación con estándares auténticos, y con un extracto de fermentación de la cepa de *S. spinosa* NRRL 18538, los compuestos principales producidos por *S. spinosa* 21K2 eran las espinosinas A, D y E. La espinosina A era el componente principal producido, y el rendimiento total de espinosinas fue ~ 50 mg/ml.

- Además de las espinosinas conocidas A, D y E, estaban claramente presentes cuatro compuestos nuevos. El tiempo de retención cromatográfico y los datos espectrales de masas para estos nuevos compuestos (Tabla 8) eran consistentes con sus síntesis por la incorporación de unidades iniciadoras de cadena ramificada (ácido iso-propil-carboxílico y ácido 2-metilbutírico). Los espectros MS de los nuevos compuestos daban iones para las especies $[M+H]^+$ y para el fragmento de forosamina (142,3). Los compuestos derivados de una alimentación de ácido iso-propil-carboxílico estaban presentes a niveles 2-3 veces mayores que los derivados de ácido 2-metilbutírico. Los nuevos compuestos no representaban más de 5% de las espinosinas totales presentes.

Tabla 8

Unidad iniciadora de ácido carboxílico	Compuesto No. véase Tabla 3)	Tiempo de retención (min)	Datos espectrales de masas fundamentales (m/z)
ácido iso-propil-carboxílico	9	25,1	746,5 $[M+H]^+$; 142,3
ácido iso-propil-carboxílico	10	26,3	760,5 $[M+H]^+$; 142,3
ácido 2-metilbutírico	11	26,7	760,4 $[M+H]^+$; 142,3
ácido 2-metilbutírico	12	27,5	774,5 $[M+H]^+$; 142,3

- 40 **Ejemplo 14: Producción dirigida por precursores de nuevas espinosinas a partir de *S. spinosa* 21K2 (Producción de los Compuestos 1-6 y 13-20)**

Se utilizó la PKS híbrida *ave/spn* para generar nuevos metabolitos de espinosina por alimentación de ácidos carboxílicos a los cultivos de producción. El módulo de carga de avermectina incorporaba el ácido carboxílico dentro del iniciador de la molécula.

- 5 Se inocularon matraces de producción paralelos de 6 ml como se describe en el Ejemplo 13 anterior. Después de 24 horas, cada uno de estos se alimentó con un ácido carboxílico (soluciones stock preparadas en agua y ajustadas en pH a 6,5 con hidróxido de sodio) a una concentración final de 3 mM. Después de 7 días, se analizó por LC-MS una parte alícuota de 1 ml de caldo de fermentación como se describe en los Ejemplos 6 y 12. La incorporación de ácido ciclobutil-carboxílico, ácido ciclopropil-carboxílico, ácido 2-metilciclopropil-carboxílico, ácido metiltio-acético y ácido 3-furoico proporcionó nuevas espinosinas modificadas en C21, como se indicaba por la aparición de nuevos picos en los cromatogramas UV y MS (Tabla 9). Los espectros de masas de los nuevos compuestos daban iones para las especies $[M+H]^+$ y para el fragmento de forosamina (142,3). Adicionalmente, la alimentación de ácidos ciclobutil- y ciclopropil-carboxílicos causaba también una acumulación importante de las 17-pseudoagliconas correspondientes.

Tabla 9

Ácido carboxílico alimentado	Compuesto No. (véase Tabla 3)	Tiempo de retención (min)	Datos espectrales de masas fundamentales (m/z)
ciclobutil CA	2	25,7	758,4 $[M+H]^+$; 142,4
ciclobutil CA	3	27,2	772,5 $[M+H]^+$; 142,4
ciclopropil CA	1	23,5	744,5 $[M+H]^+$; 142,4
ciclopropil CA	2	25,1	758,5 $[M+H]^+$; 142,4
2-metil-ciclopropil CA	13	25,7	758,5 $[M+H]^+$; 142,4
2-metil-ciclopropil CA	14	26,9	772,5 $[M+H]^+$; 142,4
ácido metiltio-acético	5	22,9	764,5 $[M+H]^+$; 142,4
ácido metiltio-acético	6	24,4	778,4 $[M+H]^+$; 142,4
ácido 3-furoico	15	22,9	770,5 $[M+H]^+$; 142,4
ácido 3-furoico	16	24,3	784,5 $[M+H]^+$; 142,4
ciclobutil CA	19	27,1	639,4 $[M+Na]^+$
ciclobutil CA	20	28,6	653,4 $[M+Na]^+$

- 15 Los compuestos de 21-ciclobutilo y -ciclopropilo se confirmaron como las estructuras correctas en comparación con los compuestos aislados a partir de la alimentación de la cepa de carga *ery*, *S. spinosa* 13E.

Ejemplo 15: Aislamiento de nuevos metabolitos a partir de la fermentación en gran escala de *S. spinosa* 21K2

- 20 Se inocularon Cepas vegetativas congeladas de *S. spinosa* 21K2 en precultivos vegetativos primarios de *S. spinosa* 21K2 en CSM (50 ml incubados en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con adaptador). Se prepararon precultivos secundarios en medio vegetativo (250 ml incubados en un matraz Erlenmeyer de 2 l con adaptador) y se incubaron como se describe en el Ejemplo 6.

Se prepararon 14 litros de medio de producción, como en el Ejemplo 6, con la adición de 0,01% v/v de antiespumante Pluronic L-0101 (BASF). El medio de producción se inoculó con el precultivo secundario a 5% v/v y se dejó fermentar en un biorreactor agitado de 20 l durante 7-10 días en las condiciones descritas en el Ejemplo 8.

- 25 Se alimentó ácido 2-metil-butírico, a una concentración final de 2 mM, al biorreactor al cabo de 26 y 37,5 horas, conduciendo a una concentración total final de 4 mM.

El caldo de fermentación se recogió después de 7 días y se extrajo como se describe en el Ejemplo 8. El residuo aceitoso se disolvió en metanol (1,5 ml) y se cromatografió inicialmente como se describe en el Ejemplo 8.

ES 2 375 714 T3

Las fracciones de la separación inicial que contenían 21-desetil-21-iso-propil-epinosina A se combinaron y el disolvente se eliminó a vacío. Los residuos se cromatografiaron sobre gel de sílice de fase inversa (Prodigy C₁₈, 5 µm; 10 x 250 mm) eluyendo con un gradiente como se describe a continuación, a un régimen de flujo de 5 ml/min.

T = 0, 55% B; T = 5, 70% B; T = 35, 95% B; T = 54, 95% B.

- 5 Se recogieron fracciones cada 30 segundos. Las fracciones que contenían la 21-desetil-21-iso-propil-epinosina A se combinaron, se eliminó el acetonitrilo a vacío, y la muestra se concentró utilizando cartuchos C₁₈-BondElute (200 mg). Se aplicó la muestra por gravedad, se lavó con agua (10 ml) y se eluyó con metanol (2 x 10 ml), después de lo cual se eliminó el disolvente a vacío.

- 10 La muestra secada se disolvió en metanol (0,5 ml) y se cromatografió sobre gel de sílice de fase inversa desactivado con bases (Hypersil-C18-PBDS, 4,6 x 250 mm; 5 µm). La columna se eluyó isocráticamente con un régimen de flujo de 1 ml/min con acetato de amonio (10 mM) - metanol - tetrahidrofurano 40:45:15), y se recogieron los tres componentes principales después de detección UV (244 nm). En estas condiciones, los tiempos de retención eran como sigue: epinosina-D: 64,4 min, 21-desetil-21-iso-propil-epinosina A: 67,8 mins y 21-desetil-21-*n*-propil-epinosina A: 75,3 min. Cada muestra se secó a vacío para dar un sólido blanco, que se identificó por sus espectros
- 15 NMR y de masas.

La 21-desetil-21-iso-propil-epinosina A (Compuesto 9) tiene las características siguientes:

Peso molecular: 745

Fórmula molecular: C₄₂H₆₇NO₁₀

UV (por detección con sistema de diodos durante el análisis HPLC): 244 nm

- 20 MS con pulverización electrónica: m/z para [M+H]⁺ = 746,5; ion del fragmento de azúcar forosamina a m/z = 142,2.

La Tabla 10 resume los datos de desplazamiento químico ¹H y ¹³C NMR para 21-desetil-21-iso-propil-epinosina A en CDCl₃.

Tabla 10

Posición	¹ H	¹³ C	Posición	¹ H	¹³ C
1	-	173	20a	1,52	27
2 ^a	3,15	34	20b	1,52	-
2b	2,43	-	21	4,66	80
3	3,03	48	22	1,80	33
4	3,55	42	23	0,85	18
5	5,82	129	22-Me	0,83	18
6	5,90	129			
7	2,19	42	1'	4,87	96
8 ^a	1,94	36	2'	3,51	78
8b	1,35	-	3'	3,47	81
9	4,32	76	4'	3,13	82
10 ^a	2,28	37	5'	3,56	68
10b	1,38		6'	1,30	19
11	0,93	46	2'-OMe	3,51	59
12	2,90	50	3'-OMe	3,51	58
13	6,78	144	4'-OMe	3,58	61

14	-	147	1"	4,43	104
15	-	204	2"a	1,99	31
16	3,28	48	2"b	1,49	-
16-Me	1,19	16	3"a	1,38	19
17	3,63	81	3"b	1,50	-
18	1,52	35	4"	2,25	65
18b	1,52	-	5"	3,49	74
19 ^a	1,80	22	6"	1,28	18
19b	1,19	-	4"-NMe ₂	2,26	41
Los desplazamientos químicos se dan con referencia al protón de CHCl ₃ a 7,26 ppm; los datos ¹³ C son de experimentos 2D.					

Las fracciones del fraccionamiento inicial que contenían la 21-desmetil-21-sec-butil-espinosina A supuesta se combinaron, se eliminó el acetonitrilo a vacío, y se concentraron utilizando cartuchos C₁₈-BondElute (200 mg). Se aplicó la muestra por gravedad, se lavó con agua (10 ml) y se eluyó con metanol (2 x 10 ml), después de lo cual se eliminó el disolvente a vacío.

- 5 La 21-desmetil-21-sec-butil-espinosina A supuesta (Compuesto 11) tiene las características siguientes:

Peso molecular: 759

Fórmula molecular: C₄₃H₆₉NO₁₀

UV (por detección con sistema de diodos durante el análisis HPLC): 244 nm

MS con pulverización electrónica: m/z para [M+H]⁺ = 760,5; ion del fragmento de azúcar forosamina a m/z = 142,2.

10 Actividad Plaguicida de las Espinosinas

Los compuestos reivindicados en esta memoria son útiles para el control de insectos y ácaros. Se incluyen todos los isómeros de los compuestos.

- 15 Los compuestos exhiben actividad contra numerosos insectos y ácaros. Más específicamente, los compuestos exhiben actividad contra miembros del orden de insectos Lepidópteros tales como la larva de esciara de la remolacha, la oruga de los brotes del tabaco, la larva del manzano y el geómetra de la col. Los mismos exhiben también actividad contra miembros del orden Coleópteros (los escarabajos y gorgojos) y Dípteros (las moscas comunes). Los compuestos exhiben actividad también contra miembros del orden Hemípteros (bichos propiamente dichos), Homópteros (pulgonos y saltones), Tisanópteros (Trípidos), Ortópteros (cucarachas), Sifonápteros (pulgas), Isópteros (termitas), y miembros del orden de los Himenópteros Formicidae (hormigas). Los compuestos exhiben
- 20 también actividad contra el ácaro-araña de dos manchas, que es un miembro del orden de Arácnidos Acarina.

- Los compuestos biológicamente activos de la presente invención pueden utilizarse también en métodos para inhibición de un insecto o ácaro. Un insecto susceptible puede ser inhibido por aplicación de una cantidad del compuesto eficaz como desactivadora de insectos a una planta. Los compuestos reivindicados se aplican en la forma de composiciones. Estas composiciones comprenden una cantidad del compuesto desactivadora de insectos
- 25 o ácaros en un vehículo inerte. El componente activo puede estar presente como un compuesto reivindicado simple, una mezcla de dos o más compuestos o una mezcla de cualquiera de los compuestos junto con la porción desecada del medio de fermentación en el que se produce la misma. Las composiciones se preparan de acuerdo con los procedimientos y fórmulas que son convencionales en la técnica agrícola o de control de las plagas. Las composiciones pueden ser formulaciones concentradas, que se dispersan en agua o pueden encontrarse en forma
- 30 de un polvo, cebo o formulación granular utilizada sin tratamiento ulterior.

- La acción de las composiciones puede aumentarse considerablemente por adición de otros ingredientes, activos por ejemplo como insecticidas, acaricidas, y/o nematocidas. Por ejemplo, uno o más de los compuestos siguientes pueden combinarse convenientemente con los compuestos de la invención: compuestos organofosforados, carbamatos, piretroides, acilureas, otros tipos de reguladores de control de los insectos y análogos de hormonas de
- 35 insecto, neonicotinoides y otros compuestos nicotínicos, macrólidos y otros compuestos o principios activos insecticidas, acaricidas, molusquicidas y nematocidas. WO 00/56156 en "Synergistic Insecticide Mixtures" describe el uso de ciertos compuestos de espinosina conocidos anteriormente en combinación con agonistas o antagonistas

de los receptores nicotínicos de acetilcolina para el control de plagas de los animales. WO 00/35282 en "Combination of *Active Ingredients*" describe el uso de spinosad en combinación con un compuesto activo como fungicida. WO 00/35286 en "Combinations of *Active Ingredients*" describe el uso de una combinación de spinosad con otros compuestos para controlar plagas de los animales y hongos. WO 99/60856 en "Use of Spinosyns as Soil Insecticides" describe el uso de ciertas espinosinas conocidas anteriormente para tratamiento de semillas y para aplicación a plantas a través del suelo o por irrigación para control de los insectos. WO 99/33343 en "Use of Macrolides in Pest Control" describe el uso de espinosinas para controlar plagas en cosechas transgénicas, uso de espinosinas para proteger materiales de propagación de las plantas y los órganos de las plantas formados en un momento posterior contra el ataque de las plagas, y el uso de espinosinas para el control de plagas de la madera y moluscos. Los compuestos de la Tabla 3 pueden utilizarse también para estos propósitos.

Los compuestos de la presente invención son útiles también para el tratamiento de los animales a fin de controlar artrópodos, es decir, insectos y arácnidos, con inclusión de diversas moscas y larvas de mosca, pulgas, piojos, ácaros, y garrapatas, que constituyen plagas en los animales. Los métodos para el suministro de ectoparasitocidas son bien conocidas por los expertos en la técnica. En general, se aplica un compuesto de esta invención a la superficie exterior de un animal mediante pulverizaciones, baños o espolvoreos. Los compuestos pueden suministrarse también a los animales utilizando identificadores de oreja, un método de suministro descrito en US Pat. No. 4.265.876.

Los compuestos de la presente invención pueden utilizarse también para controlar insectos y arácnidos que constituyen plagas en las heces del ganado y otros animales. Los compuestos se administran por vía oral y los compuestos se desplazan a lo largo del tracto intestinal y salen en las heces. El control de las plagas en las heces protege indirectamente a los animales contra las plagas.

Los compuestos de la invención son útiles también como productos farmacéuticos humanos para control de parásitos, por ejemplo, piojos. Los compuestos pueden utilizarse, por ejemplo, en las formulaciones para controlar piojos que se describen en WO 00/01347.

Ejemplo 16: Demostración de que las nuevas espinosinas purificadas son insecticidas

La actividad biológica de los compuestos de la invención se demostró por un ensayo tópico en el cual se aplicó el compuesto a larvas reproducidas en laboratorio (peso medio 22 mg) a la tasa de 1 microg/larva. Cada compuesto se aplicó en solución acetónica (1 mg/ml), a lo largo del dorso de 6 larvas de la oruga de los brotes del tabaco (*Heliothis virescens*) y 6 larvas de la esciara de la remolacha (*Spodoptera exigua*). Las larvas tratadas se mantuvieron luego durante dos días a 21°C, 60% RH en placas de cultivo de plástico de 6 pocillos. Se suministró a cada una de las larvas 1 cm³ de dieta para lepidópteros basada en agar para mantenimiento durante el intervalo de 2 días posterior a la exposición. El porcentaje de mortalidad se determinó al final de un periodo de 2 días (Tabla 11).

Tabla 11

Compuesto	Compuesto No. (Véase Tabla 3)	Oruga de los Brotes del Tabaco		Larva de la Esciara de la Remolacha	
		Tasa (micro/ larva)	Mortalidad (%)	Tasa (micro/ larva)	Mortalidad (%)
Disolvente sólo		0	0	0	0
21-ciclopropilo	1	1	100	1	33
21-ciclobutilo	3	1	83	1	83
21-ciclobutil, 6-metilo	4	1	100	1	83
21-ciclobutil, 5,6- dihidro	8	1	100	1	83
21-isopropilo	9	1	100	1	100

Los compuestos de la Tabla 3 pueden utilizarse como compuestos intermedios en los procesos descritos en US 6.001.981 para producir análogos de espinosina semi-sintéticos, que se espera también tengan actividad insecticida.

Referencias

1) Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, ET., Nagaraja Rao, R. and Schoner, BE. (1992) "Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from Escherichia coli to Streptomyces spp." Gene 116: 43-49.

- 2) Bisang, C., Long, PF., Cortés, J., Westcott, J., Crosby, J., Matharu, AL., Cox, RJ., Simpson, TJ., Staunton, J. and Leadlay, PF. (1999) "A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases." *Nature* 401: 502-505.
- 5 3) Blanc, V., Salah-Bey, K., Folcher, M. and Thompson, CJ. (1995) "Molecular characterization and transcriptional analysis of a multidrug resistance gene cloned from the pristinamycin-producing organism, *Streptomyces pristinaespiralis*." *Mol. Microbiol.* 17: 989-999.
- 4) Broughton, MC., Huber, MLB., Creemer, LC., Kirst, HA. and Turner JR. (1991) "Biosynthesis of the macrolide insecticidal compound A83543 by *Saccharopolyspora spinosa*." *Proceedings of Amer. Soc. Microbiol.*, Washington D.C.
- 10 5) Donadio, S., Staver, MJ., McAlpine, JB., Swanson, SJ. and Katz, L. (1991) "Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis." *Science* 252: 675-679.
- 6) Donadio, SA., Stassi, D., McAlpine, JB., Staver, MJ., Sheldon, PJ., Jackson, M., Swanson, SJ., Wendt-Pienkowski, E., Wang, YG., Jarvis, B., Hutchinson, CR. and Katz, L. (1993) "Recent developments in the genetics of erythromycin formation." In *Industrial microorganisms: basic and applied molecular genetics.* (Baltz, RH., Hegeman, GD. and Skatrud, PL., eds), pp. 257-265. *Amer. Soc. Microbiol.*, Washington D.C.
- 15 7) Dutton, CJ., Gibson, SP., Goudie, AC., Holdom, KS., Pacey, MS., Ruddock, JC., Bu'Lock, JD. and Richards, MK. (1991) "Novel avermectins produced by mutational biosynthesis." *J. Antibiot.* 44: 357-365.
- 8) Hosted, TJ. and Baltz, RH. (1996) "Mutants of *Streptomyces roseosporus* that express enhanced recombination within partially homologous genes." *Microbiology* 142: 2803-2813.
- 20 9) Hunziker, D., Yu, TW., Hutchinson, CR., Floss, HG. and Khosla, C. (1998) "Primer unit specificity in rifamycin biosynthesis principally resides in the later stages of the biosynthetic pathway." *J. Am. Chem. Soc.* 12: 1092-1093.
- 10) Kirst, HA., Michel, KH., Martin, JW., Creemer, LC., Chio, EH., Yao, RC., Nakatsukasa, WM., Boeck, LD., Occolowitz, JL., Paschal, JW., Deeter, JB., Jones, ND. and Thompson, GD. (1991) "A83543A-D, unique fermentation-derived tetracyclic macrolides." *Tetrahedron Letts* 32: 4839-4842.
- 25 11) Marsden, AFA., Wilkinson, B., Cortés, J., Dunster, NJ., Staunton, J. and Leadlay, PF. (1998) "Engineering broader specificity into an antibiotic-producing polyketide synthase." *Science* 279: 199-202.
- 12) Matsushima, P., Broughton, MC., Turner, JR. and Baltz, RH. (1994) "Conjugal transfer of cosmid DNA from *Escherichia coli* to *Saccharopolyspora spinosa*: effects of chromosomal insertions on macrolide A83543 production." *Gene* 146: 39-45.
- 30 13) Pacey, MS., Dirlam, JP., Geldart, RW., Leadlay, PF., McArthur, HAI, McCormick, EL., Monday, RA., O'Connell, TN, Staunton, J. and Winchester, TJ. (1998) "Novel erythromycins from a recombinant *Saccharopolyspora erythraea* strain NRRL 2338 pIGI. Fermentation, isolation and biological activity," *J. Antibiot.* 51: 1029-1034.
- 14) Rowe, CJ., Cortés, J., Gaisser, S., Staunton, J. and Leadlay, PF. (1998) "Construction of new vectors for high-level expression in actinomycetes," *Gene* 216: 215-223.
- 35 15) Salah-Bey, K., Blanc, V. and Thompson, CJ. (1995) "Stress-activated expression of a *Streptomyces pristinaespiralis* multidrug resistance gene (ptr) in various *Streptomyces* spp. and *Escherichia coli*." *Mol. Microbiol.* 17: 1001-1012.
- 16) Simon, R., Preifer, U. and Pühler, A. (1983) "A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria." *BiolTechnology* 1: 784-791.
- 40 17) Stassi, DL., Kakavas, SJ, Reynolds, KA, Gunawardana, G., Swanson, S., Zeidner, D., Jackson, M., Liu, H., Buko, A. and Katz, L. (1998) "Ethyl-substituted erythromycin derivatives produced by directed metabolic engineering." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7305-7309.
- 18) Strobel, RJ. and Nakatsukasa WM. (1993) "Response surface methods for optimizing *Saccharopolyspora spinosa*, a novel macrolide producer." *J. Indust. Microbiol.* 11 : 121-127.
- 45 Waldron, C., Matsushima, P., Rosteck, PR., Jr., Broughton, MC., Turner, J., Madduri, K., Crawford, KP., Merlo, DJ. and Baltz, RH. (2001) "Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*." *Chem. Biol.* 8: 487-499.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Martin, Christine J.
 Burns, Lesley S.
 Graupner, Paul R.
 5 Lewer, Paul
 Vousden, William A.
 Wilkinson, Barrie
 Waldron, Clive
- <120> Nuevas PoliQUÉtido-Sintetasas productoras de Espinosina.
- 10 <130> 62069A
- <140>
 <141>
- <150> US 60/358075
 <151> 19-02-2002
- 15 <160> 26
- <170> PatentIn Ver. 2.0
- <210> 1
 <211> 61
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo PRIS1
- <400> 1
- ```

ggggaattca ctagtccgcg gagaaatagc gctgtacagc gtatgggaat ctcttgtacg 60
g 61

```
- 25 <210> 2  
 <211> 68  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
 30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo PRIS2
- <400> 2
- ```

gggggatccc atatgggctc cttgtacggt gtacgggaag atactcgtac accgtacaag 60
agattccc 68
    
```
- <210> 3
 <211> 94
 35 <212> DNA
 <213> Streptomyces pristinaespiralis
- <400> 3
- ```

actagtccgc ggagaaatag cgctgtacag cgtatgggaa tctcttgtac ggtgtacgag 60
tatcttcccg tacaccgtac aaggagccca tatg 94

```
- <210> 4  
 <211> 44  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo CR311
- 45 <400> 4

# ES 2 375 714 T3

cagatatcac tagttcggac gcatatgctg caagtatcta gaac 44

<210> 5  
 <211> 44  
 <212> DNA  
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo CR312

<400> 5  
 gttctagata cttgcagcat atgcgtccga actagtgata tctg 44

10 <210> 6  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo SP28

<400> 6  
 aggacacata tggcggacct gtcaaagctc tc 32

<210> 7  
 <211> 34  
 20 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo SP29

<400> 7  
 25 cccgctagcg gttcgcggg cgccgcttcg ttgg 34

<210> 8  
 <211> 1685  
 <212> DNA  
 <213> Saccharopolyspora erythraea

30 <400> 8

```

catatggcgg acctgtcaaa gctctccgac agtcggactg cacaacctgg gaggatcgtt 60
cgtccgtggc ccctgtcggg gtgcaatgaa tccgccttgc gggcccgtgc gcgccaattg 120
cgtgcacatc tcgatcgatt tcccgatgcc ggtgtcgaag gtgtcggggc cgcgctcgcg 180
cacgacgagc aggcggacgc cggtcgcat cgcgcggtcg tcgtcgcctc ctcgacctcc 240
gagctgctcg acggcctggc cgccgtcgcc gacggccggc cgcacgcctc ggtggtccgc 300
ggcgtggccc ggccgtccgc gccggtggtg ttcgtcttcc cgggccaggg cgcgcaatgg 360
gccgggatgg cgggcgaact cctcggcgag tcaagggttt tcgccgccgc gatggacgcg 420
tgcgcgcggg cgttcgagcc cgtgaccgac tggacgctgg cgcaggtcct ggactctccc 480
gagcagtcgc gccgcgtcga ggtcgtccag cccgccctgt tcgcggtgca gacgtcgtcg 540
gccgcgctct ggcgctcctt cggcgtgacc cccgacgccc tgggtggcca cagcatcggc 600
gagctggccc ccgcgcacgt gtgcggtgcg gccggtgccg ccgacgccgc gcgcgccgcc 660
gcgctgtgga gccgcgagat gattccgttg gtgggcaacg gcgacatggc agccgtcgcg 720
ctctccgccg acgagatcga gccgcgcatc gcccggtggg acgacgacgt ggtgctggcc 780
ggggtcaacg gtccgcgctc ggttctgctg accgggtcgc cggaaaccggt cgcgcgcccg 840
gtccaggagc tctcggccga gggggtcccg gcacaggtca tcaatgtgtc gatggcggcg 900
cactcggcgc aggtcgacga catcgcccgt gggatcgctg cggccctggc gtggttcgcg 960
cccgggtggc cggaggtgcc cttctacgcc agcctcaccg gaggtgcggt cgacacgagg 1020
gagctggtgg ccgactactg gcgccgcagc ttccggctgc cggtgcgctt cgacgaggcg 1080
atccggtccc ccctggaggt. cggtcccggc acgttcgtcg aagcgagccc gcaccgggtg 1140
ctggccgccg cgctccagca gacgtcgcac gccgagggct cctcggcccg ggtggtcccc 1200
acgctgcaac gcgggcaggg cggcatgcgg cggttcctgc tggccgcggc ccaggcgttc 1260
accggcggcg tggccgtcga ctggaccggc gcctacgacg acgtgggggc cgaaccggcg 1320
tctctgcccg agttcgcgcc ggccgaggag gaagacgagc cggccgagtc cgcgctcgac 1380
tggaaacgcgc caccgcacgt gctcgcgcgag cggctgctcg cggtcgtcaa cggcgagacc 1440

```

ES 2 375 714 T3

gccgcgttgg cgggccgcga agccgacgcc gaggccacgt tccgcgagct ggggctggac 1500  
tcggtgctgg ccgcgcagct gcgcgccaag gtgagcgcgc cgatcgggcg cgaggtcaac 1560  
atcgccctgc tctacgacca cccgactccg cgtgcgctcg cggaagcaact cgcggcgggga 1620  
accgaggtcg cacaacggga aaccgcgcgc cggaccaacg aagcggcgcc cggcgaaccg 1680  
ctagc 1685

<210> 9

<211> 32

<212> DNA

5 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo SP14

<400> 9

aagctagccg tgatcgggat gggctgtcgg tt 32

10 <210> 10

<211> 39

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo SP15

<400> 10

atagcggccg cccccagccc ccacagatcc ggtcaccaa 39

**REIVINDICACIONES**

1.- Un compuesto seleccionado de:

- 21-desetil-21-ciclopropil-epinosina A;
- 21-desetil-21-ciclopropil-epinosina D;
- 5 21-desetil-21-ciclobutil-epinosina A;
- 21-desetil-21-ciclobutil-epinosina D;
- 21-desetil-21-metiltiometil-epinosina A;
- 21-desetil-21-metiltiometil-epinosina D;
- 21-desetil-21-cianometil-epinosina A;
- 10 5,6-dihidro-21-desetil-21-ciclobutil-epinosina A;
- 21-desetil-21-isopropil-epinosina A;
- 21-desetil-21-isopropil-epinosina D;
- 21-desetil-21-sec-butil-epinosina A;
- 21-desetil-21-sec-butil-epinosina D;
- 15 21-desetil-21-metilciclopropil-epinosina A;
- 21-desetil-21-metilciclopropil-epinosina D;
- 21-desetil-21-(3-furil)-epinosina A;
- 21-desetil-21-(3-furil)-epinosina D;
- 21-desetil-21-ciclopropil-epinosina A 17-pseudoaglicona;
- 20 21-desetil-21-ciclopropil-epinosina D 17-pseudoaglicona;
- 21-desetil-21-ciclobutil-epinosina A 17-pseudoaglicona;
- 21-desetil-21-ciclobutil-epinosina D 17-pseudoaglicona.

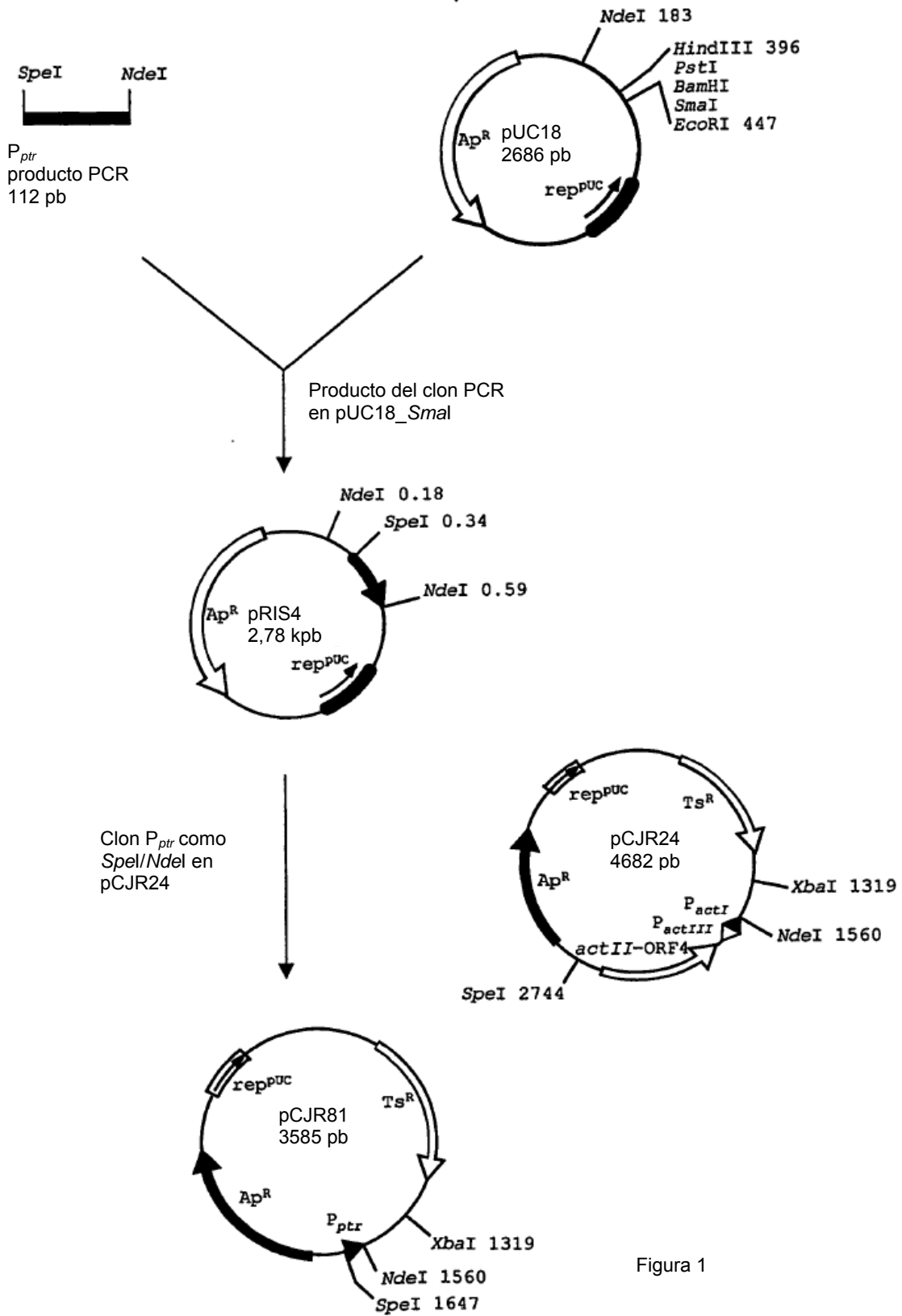


Figura 1

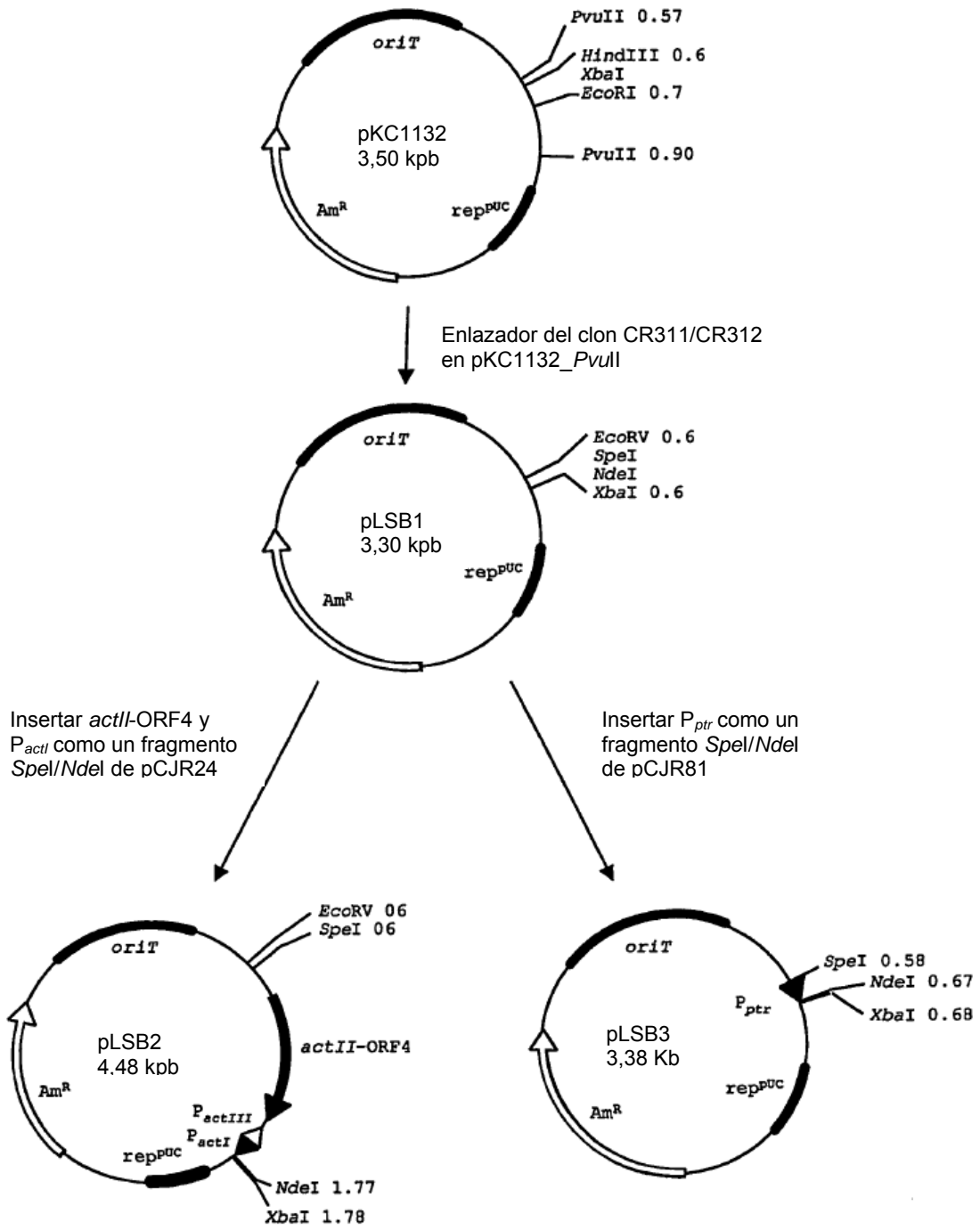


Figura 2

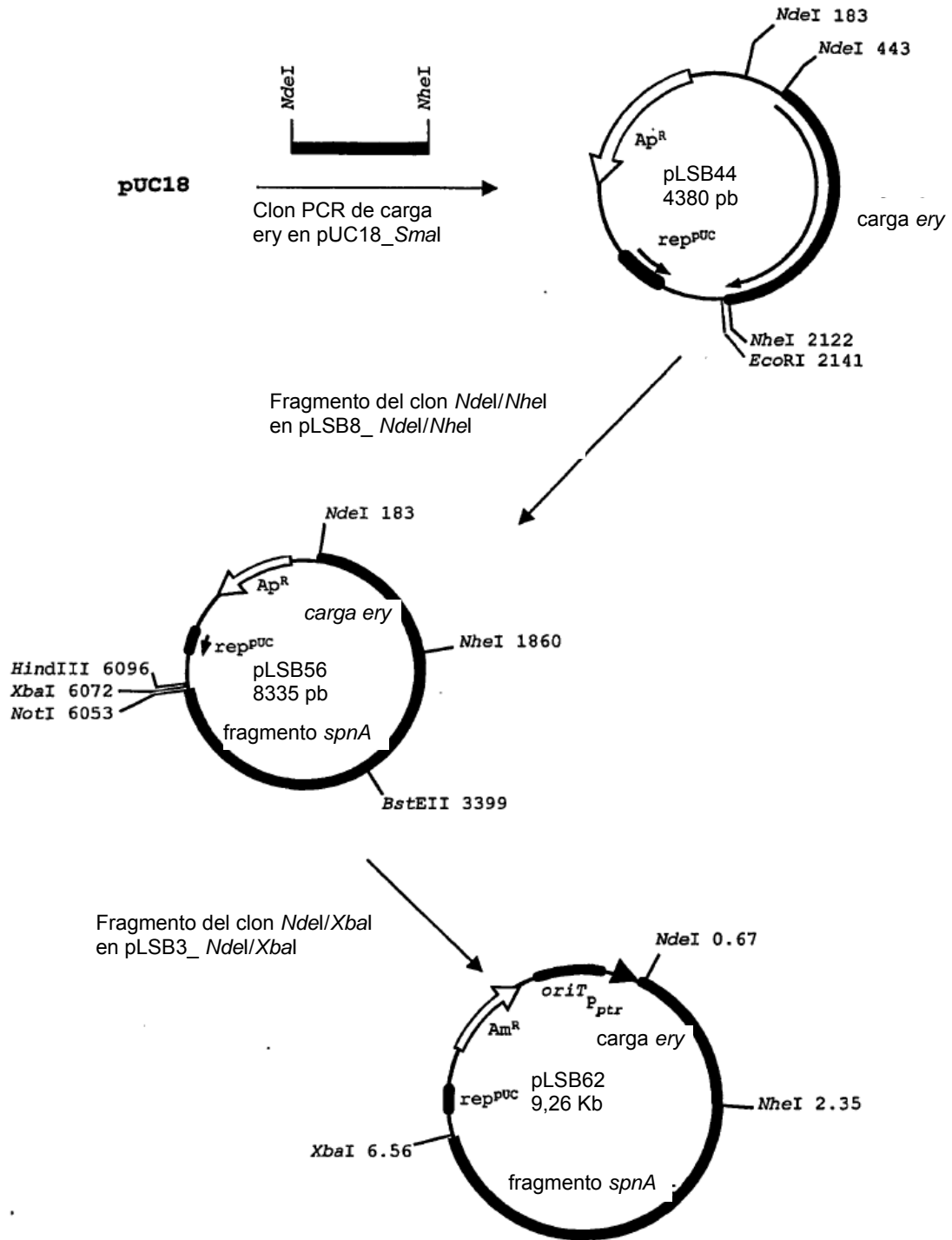


Figura 3



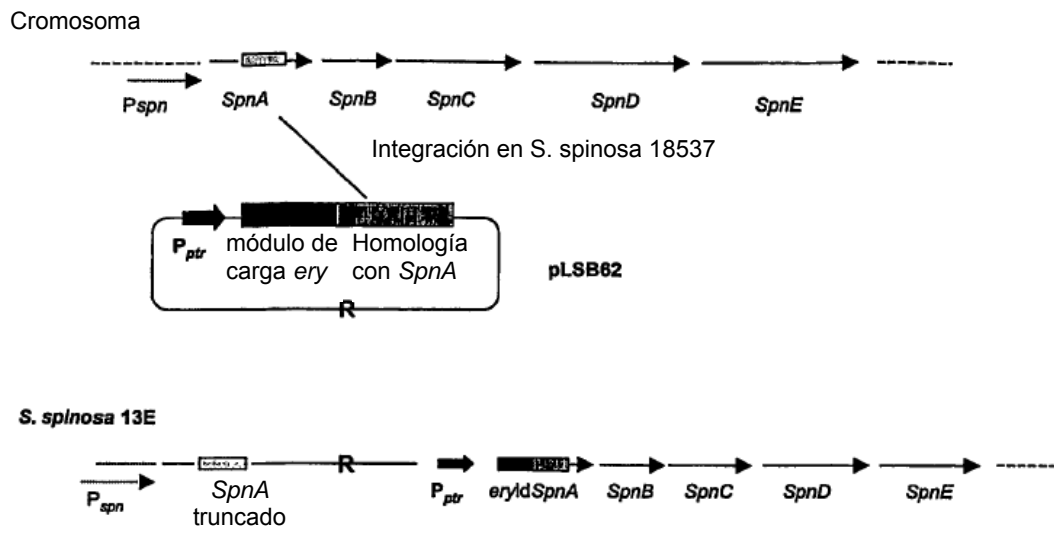


Figura 4

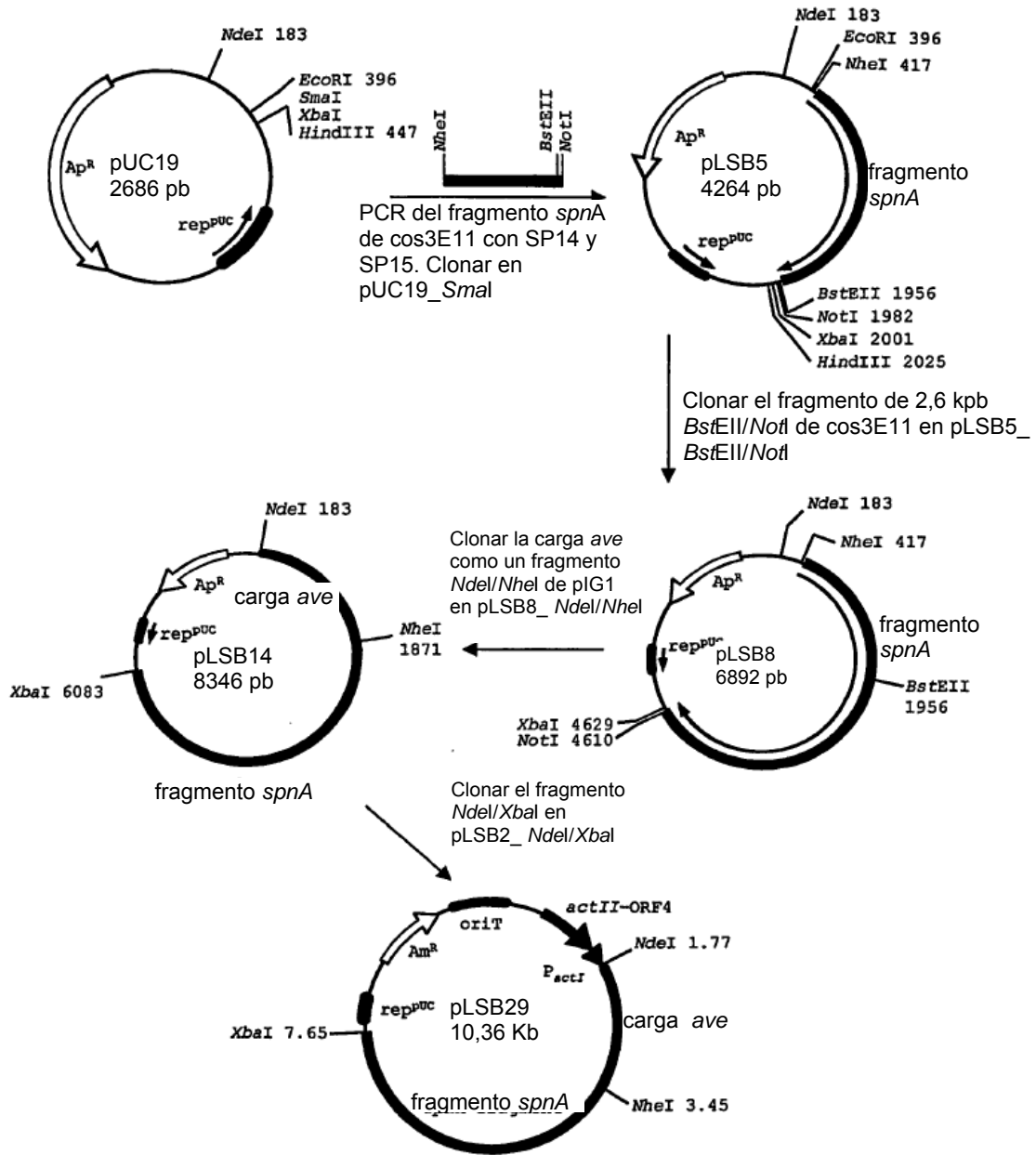


Figura 5

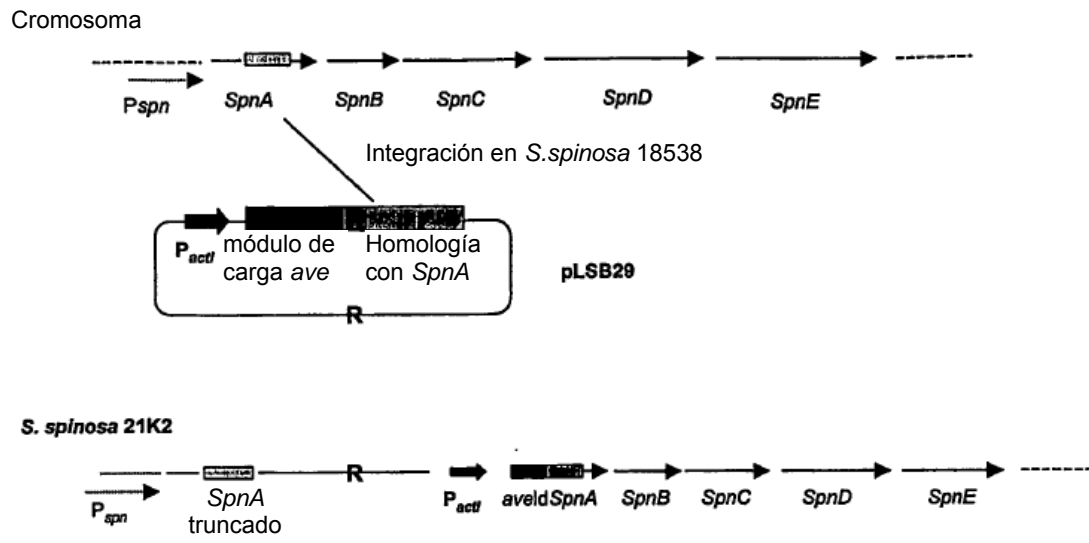


Figura 6