

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 624**

51 Int. Cl.:

C07D 493/18 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/76 (2006.01)

C12P 17/18 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01)

C07D 471/18 (2006.01)

C07K 14/36 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C07D 498/18 (2006.01)

C07D 487/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2003 E 03764029 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 1521828**

54 Título: **Producción de policétidos**

30 Prioridad:

16.07.2002 GB 0216509

25.10.2002 GB 0224922

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.09.2015

73 Titular/es:

**BUCK INSTITUTE FOR RESEARCH ON AGING
(100.0%)**

**8001 Redwood Boulevard
Novato, CA 94945, US**

72 Inventor/es:

GREGORY, MATTHEW ALAN;

GAISSER, SABINE;

PETKOVIC, HRVOJE y

MOSS, STEVEN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 544 624 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

Producción de policétidos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la producción de policétidos y otros productos naturales y a bibliotecas de compuestos y nuevos compuestos individuales. Un área importante es el aislamiento y uso potencial de nuevos análogos de ligandos de FKBP y células hospedadoras que producen estos compuestos. La invención se refiere en particular a métodos para la transformación eficaz de cepas que producen análogos de FKBP y células recombinantes en las que se expresan genes o clonados o casetes de genes para generar nuevos compuestos tales como análogos de ligandos FKBP policétidos (especialmente rapamicina), y a procesos para su preparación, y a medios usados en los mismos (por ejemplo, ácidos nucleicos, vectores, casetes de genes y cepas modificadas genéticamente).

15 **Antecedentes de la invención**

La rapamicina (sirolimus) (Figura 1) es un macrólido lipófilo producido por NRRL 5491 de *Streptomyces hygroscopicus* (Sehgal et al., 1975; Vézina et al., 1975; documento de Patente de Estados Unidos N° 3.929.992; documento de Patente de Estados Unidos N° 3.993.749) con un resto de 1,2,3-tricarbonilo unido a una lactona del ácido pipecólico (Paiva et al., 1991). Otros macrólidos relacionados (Figura 2) incluyen FK506 (tacrolimus) (Schreiber y Crabtree, 1992), FK520 (ascomicina o inmunomicina) (Wu et al., 2000), FK525 (Hatanaka H, et al., 1989, FK523 (Hatanaka, H., et al., 1988), antascomicinas (Fehr, T., et al., 1996) y meridamicina (Salituro et al., 1995). Para el propósito de la presente invención, la rapamicina se describe con la convención de numeración de McAlpine et al. (1991) con preferencia a las convenciones de numeración de Findlay et al. (1980) o Chemical Abstracts (11th Cumulative Index, 1982-1986 p60719CS).

El modo versátil de acción de la rapamicina demuestra el valor farmacológico del compuesto y hace hincapié en la necesidad de aislar nuevos derivados del fármaco. La rapamicina muestra actividad antifúngica moderada, principalmente frente a especies de *Candida*, y además frente a hongos filamentosos (Baker et al., 1978; Sehgal et al., 1975; Vézina et al., 1975; documento de Patente de Estados Unidos N° 3.929.992; documento de Patente de Estados Unidos N° 3.993.749). La rapamicina inhibe la proliferación celular mediante la orientación de las vías de transducción de señales en varios tipos de células, por ejemplo, mediante la inhibición de las vías de señalización que permiten la progresión desde la G₁, a la fase S del ciclo celular (Kuo et al., 1992). En los linfocitos T, la rapamicina inhibe la señalización del receptor de IL-2 y la posterior autoproliferación de los linfocitos T resultantes en la inmunosupresión. Los efectos inhibidores de la rapamicina no se limitan a los linfocitos T, ya que la rapamicina inhibe la proliferación de muchos tipos de células de mamíferos (Brunn et al., 1996). La rapamicina es, por lo tanto, un potente inmunosupresor con aplicaciones terapéuticas establecidas o predichas en la prevención del rechazo de aloinjertos de órganos y en el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Kahan et al., 1991). Parece que causa menos efectos secundarios que los tratamientos convencionales contra el rechazo (Navia, 1996). La 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina (SDZ RAD, Certican, Everolimus) es un análogo semisintético de la rapamicina que muestra efectos farmacológicos inmunosupresores (Sedrani, R. et al., 1998; documento de Patente de Estados Unidos N° 5.665.772). La eficacia clínica del fármaco en la actualidad está en investigación en ensayos clínicos de Fase III (Kirchner et al., 2000). El éster de rapamicina, CCI-779 (Wyeth-Ayerst) inhibe el crecimiento celular *in vitro* e inhibe el crecimiento del tumor *in vivo* (Yu et al., 2001). En la actualidad, el fármaco se encuentra en ensayos clínicos de Fase III. El valor de la rapamicina en el tratamiento de la psoriasis con placas crónica (Kirby y Griffiths, 2001), el uso potencial de efectos tales como la estimulación del crecimiento de neuritas en células PC12 (Lyons et al., 1994), el bloque de las respuestas proliferativas a citoquinas por las células vasculares y del músculo liso después de lesión mecánica (Gregory et al., 1993) y su papel en la prevención de la fibrosis por aloinjerto (Waller y Nicholson, 2001) son áreas de intensa investigación (Kahan y Camardo, 2001). Informes recientes revelan que la rapamicina está asociada con menor incidencia de cáncer en pacientes con aloinjerto de órganos en la terapia inmunosupresora a largo plazo que los de otros regímenes inmunosupresores, y que esta reducción de la incidencia del cáncer se debe a la inhibición de la angiogénesis (Guba et al., 2002). Se ha informado que las actividades neurotróficas de los ligandos de inmunofilina son independientes de su actividad inmunosupresora (Steiner et al., 1997) y que la estimulación de crecimiento nervioso está promovida por la interrupción del complejo del receptor de esteroides madura como se describe en la solicitud de patente WO01/03692. Se han informado efectos secundarios tales como hiperlipidemia y trombocitopenia, así como posibles efectos teratógenos (Hentges et al., 2001; Kahan y Camardo, 2001).

La estructura principal de policétido de rapamicina se sintetiza mediante condensación de cabeza a cola de un total de siete unidades de propionato y siete unidades de acetato a una unidad iniciadora de ácido ciclohexano carboxílico derivada de shikimato (Paiva et al., 1991). El aminoácido derivado de L-lisina, el ácido pipecólico, se condensa mediante un enlace amida en el último acetato de la estructura principal de policétido (Paiva et al., 1993) y va seguido de lactonación para formar el macrociclo. Se ha secuenciado una región genómica de 107 kb que contiene el grupo de genes biosintéticos (Schwecke et al., 1995). El análisis de los marcos de lectura abiertos reveló tres grandes genes que codifican la policétido sintasa modular (PKS) (Aparicio et al., 1996; Schwecke et al., 1995). Entre

los genes de PKS se encuentra embebido el gen *rapP* que codifica una proteína con similitud de secuencia a dominios de activación de péptido sintetasas no ribosómicas y se cree que actúa de forma análoga (Konig et al., 1997). La región que codifica los genes de PKS está flanqueada en ambos lados con 24 marcos de lectura abierta adicionales que codifican enzimas que se cree que son necesarias para la biosíntesis de la rapamicina (Molnar et al., 1996). Estos incluyen las siguientes enzimas de modificación post-policétido: dos P-450 monooxigenasas citocromo, denominadas RapJ y RapN, una ferredoxina RapO asociada y tres posibles potenciales O-metiltransferasas dependientes de SAM, RAPL, RAPM y RapQ. Otros genes adyacentes tienen papeles supuestos en la reglamentación y la exportación de la rapamicina (Molnar et al., 1996). El grupo también contiene el gen *rapL* cuyo producto RAPL se propone para catalizar la formación del ácido L-pipecólico precursor de rapamicina a través de la ciclodesaminación de la L-lisina (Khaw et al., 1998; Paiva et al., 1993). La introducción de una mutación de desplazamiento de marco en *rapL* dio lugar a un mutante incapaz de producir cantidades significativas de rapamicina y la alimentación de ácido L-pipecólico a los niveles de tipo silvestre restaurados del medio de crecimiento de la producción de rapamicina (Khaw et al., 1998). Los precursores biosintéticos para el anillo de ciclohexano de rapamicina se origina a partir de la ruta del ácido shikímico (Lowden et al., 1996; Lowden et al., 2001). Otros macrólidos estrechamente relacionados, tales como FK506 (tacrolimus) (Schreiber y Crabtree, 1992), FK520 (ascomicina o inmunomicina) (Wu et al., 2000), antascomicina (Fehr, T., et al., 1996) y meridamicina (Salituro et al., 1995) comparten un farmacóforo común que interactúa con las proteínas de unión FK506 (FKBP) (Figura 2). Por lo tanto, la rapamicina y compuestos relacionados por ejemplo, pero no se limitan a, FK506, FK520, 'hyg', FK523, meridamicina, antascomicina, FK525 y tsukubamicina se pueden considerar "ligandos de FKBP". Se ha publicado la secuencia parcial del grupo de genes FK506 (Motamedi et al., 1996; Motamedi et al., 1997; Motamedi y Shafiee, 1998), el grupo 'hyg' (Ruan et al., 1997) y la secuencia completa del grupo de genes FK520 (Wu et al., 2000; documento de Patente de Estados Unidos N° 6.150.513). Existe una homología significativa entre genes dentro de estos grupos y el grupo de genes biosintéticos de rapamicina y similitud en la función enzimática (Motamedi et al., 1996).

Se cree que las acciones farmacológicas de la rapamicina caracterizadas hasta la fecha están mediadas por la interacción con receptores citosólicos denominados FKBP o inmunofilinas. Las inmunofilinas (este término se usa para indicar proteínas de unión inmunosupresoras) catalizan la isomerización de enlaces *cis* y *trans* peptidil-prolina y pertenecen a una familia altamente conservada de enzimas que se encuentran en una gran diversidad de organismos (Rosen y Schreiber, 1992). Dos grandes grupos de enzimas que pertenecen a la familia de inmunofilinas están representados por FKBP y ciclofilinas (Schreiber y Crabtree, 1992). El principal receptor de rapamicina intracelular en los linfocitos T eucariotas es FKBP12 (DiLella y Craig, 1991) y el complejo resultante interactúa de forma específica con proteínas diana para inhibir la cascada de transducción de señales de la célula. FK506, un agente inmunosupresor relacionado estructuralmente con la rapamicina, también se une específicamente a FKBP12 pero realiza la inmunosupresión a través de un mecanismo diferente (Chang et al., 1991; Sigal y Dumont, 1992). La rapamicina y FK506 compiten por el mismo sitio de unión, por lo tanto FK506 puede tener un efecto antagonístico con la rapamicina cuando se usan los dos fármacos juntos (Cao et al., 1995). El análisis de la estructura cristalina del complejo FKBP12-rapamicina ha identificado un farmacóforo de unión a rapamicina denominado "dominio de unión" (Van Duyne et al., 1993) (véase la Figura 1). El 'dominio de unión' se requiere para la interacción con la inmunofilina y consiste, tanto para FK506 como para rapamicina, en la región C-1 a C-14 que incluye el enlace éster, el anillo pipercolínico, el dicarbonilo y el anillo hemicetal (véase la Figura 2). La interacción se caracteriza por muchos contactos hidrofóbicos y algunos enlaces de hidrógeno incluyendo uno con el grupo hidroxilo en el anillo de ciclohexano. El anillo de pipercolínico (C2 a N7) produce la penetración más profunda en la proteína cuando está rodeado por restos de aminoácidos aromáticos altamente conservados que recubren la cavidad de unión hidrofóbica. Los grupos carbonilo tanto C1 como C8 están implicados en la formación de enlaces de hidrógeno y el grupo carbonilo C9 sobresale en un bolsillo es formado por tres restos de aminoácidos aromáticos completamente conservados (una tirosina y dos restos ácidos de fenilalanina) en FKBP12. El dominio del complejo inmunofilina-ligando interactúa con la proteína diana que se proyecta más allá de FKBP.

La diana del complejo rapamicina-FKBP12 se ha identificado en la levadura como TOR (diana de rapamicina) (Alarcon et al., 1999) y la proteína de mamífero se conoce como FRAP (proteína asociada a FKBP-rapamicina) o mTOR (diana de rapamicina en mamíferos) (Brown et al., 1994). Estas proteínas muestran una similitud significativa a los dominios fosfotransferasa de las fosfatidilinositol 3-quinasas y la observación de que una mutación puntual en el dominio de unión de FKBP12-rapamicina (FRB) de mTOR suprime la actividad de quinasa de mTOR proporciona evidencias de la participación de FRB en la función del dominio de quinasa (Vilella-Bach et al., 1999). La estructura cristalina de FKBP12-rapamicina con una forma truncada de mTOR que contiene el dominio FRB (Chen et al., 1995) se ha obtenido de este modo definiendo el dominio 'efector' de la rapamicina (Choi et al., 1996; Liang et al., 1999). El análisis de la estructura cristalina reveló que los contactos proteína-proteína son relativamente limitados en comparación con la interacción entre rapamicina y cada proteína. No se identificaron enlaces de hidrógeno entre rapamicina y FRB. La interacción se concentra en una serie de contactos hidrofóbicos entre la región trieno de rapamicina y restos principalmente aromáticos de FRB (Liang et al., 1999). El átomo más profundamente oculto de la rapamicina es el metilo unido a C23 (véase la Figura 2). Las regiones C23 a C34 y el anillo de ciclohexilo de la rapamicina hacen contactos hidrofóbicos superficiales con FRB. Un pequeño cambio conformacional en la rapamicina era evidente entre los complejos binarios y ternarios (Liang et al., 1999).

Se detectaron divergencias entre los efectos biológicos de los análogos de rapamicina del grupo metoxi C16 y se postuló su capacidad para unirse a FKBP12 y la ubicación de los sustituyentes C16 en el espacio de interfacial entre FKBP12 y mTOR (Luengo et al., 1995). El análisis de la estructura cristalina de FKBP12 con la 28-O-metil rapamicina no inmunosupresora reveló una diferencia significativa en la orientación del anillo de ciclohexilo que puede resultar la interrupción de la unión de mTOR (Kallen et al., 1996).

La rapamicina influye en la señalización de cascadas dentro de la célula a través de la inhibición de la p70^{S6k} quinasa, una serina/treonina quinasa en eucariotas superiores que fosforila la proteína S6 ribosómica (Ferrari et al., 1993; Kuo et al., 1992). La proteína S6 se localiza en la subunidad 40S ribosómica y se cree que es un sitio funcional importante implicado en la unión del ARNt y el ARNm. Se ha postulado una función reguladora para la traducción del ARNm a través de la fosforilación de S6 por p70^{S6k} (Kawasome et al., 1998). La rapamicina inhibe la síntesis de proteínas a través de su efecto sobre otros sucesos relacionados con el crecimiento, incluyendo la actividad de quinasas dependientes de ciclina, fosforilación del elemento modulador sensible a cAMP (CREM) y fosforilación de la proteína de unión 4E-BP1 al factor de elongación (PHAS1) (Hung et al., 1996). El fármaco induce la acumulación de las especies desfosforiladas de 4E-BP1 que se une al factor de inicio de la traducción eIF-4E, y por lo tanto, suprime el inicio de la traducción de los ARNm dependientes de protección (Hara et al., 1997; Raught et al., 2001).

Se ha descrito un enlace entre la señalización de mTOR y la síntesis de proteínas localizado en las neuronas; el efecto en el estado de fosforilación de las proteínas implicadas en el control de la traducción; la abundancia de componentes de la maquinaria de traducción en los niveles de transcripción y traducción; control de la actividad de aminoácido permeasa y la coordinación de la transcripción de muchas enzimas implicadas en rutas metabólicas (Raught et al., 2001). También parece que las rutas de señalización sensibles a rapamicina desempeñan un papel importante en el desarrollo del cerebro embrionario, aprendizaje y formación de la memoria (Tang et al., 2002). La investigación sobre proteínas TOR en levadura también reveló sus papeles en la modulación de las rutas de señalización sensibles a nutrientes (Hardwick et al., 1999). De forma análoga, se ha identificado mTOR como una diana directa para la acción de la proteína quinasa B y que tiene un papel fundamental en la señalización de la insulina (Shepherd et al., 1998; Nave et al., 1999). El TOR de mamífero también se ha visto implicado en la polarización del citoesqueleto de actina y en la regulación del inicio de la traducción (Alarcon et al., 1999). Las fosfatidilinositol 3-quinazas, tales como mTOR, son funcionales en varios aspectos de la patogénesis de tumores tales como progresión del ciclo celular, adhesión, supervivencia celular y angiogénesis (Roymans y Slegers, 2001).

No parece que la mayoría de las inmunofilinas estén implicadas directamente en actividades inmunosupresoras y se sabe relativamente poco con respecto al sus ligandos naturales aunque se ha informado de candidatos para los ligandos naturales de los FKBP denominados proteínas asociadas a FKBP (FAP) tales como FAP48 y FAP1 han sido reportados. La interacción específica de los FAP con los FKBP durante la formación de complejos se editó por la rapamicina de una forma dependiente de la dosis (Chambraud et al., 1996; Kunz et al., 2000). Parece que las inmunofilinas funcionan en una amplia gama de actividades celulares, tales como plegamiento de proteínas; ensamblaje y el tráfico de proteínas; corregulación de complejos moleculares que incluyendo proteínas de choque térmico; receptores de esteroides; canales iónicos; interacciones de célula a célula y transcripción y traducción de genes (Galat 2000; Hamilton y Steiner 1998). Todas las inmunofilinas poseen la propiedad de plegamiento de proteínas de peptidil-prolil cis-trans isomerización y se encuentra que varios inmunofilinas se encuentran ubicados en el retículo endoplásmico, un sitio principal de la síntesis de proteínas en la célula. Además de FKBP12 (documento de Patente de Estados Unidos N° 5.109.112) otras inmunofilinas incluyen FKBP12.6 (documento de Patente de Estados Unidos N° 5.457.182), FKBP13 (Hendrickson et al., 1993; documento de Patente de Estados Unidos N° 5.498.597), FKBP25 (Hung y Schreiber, 1992; Jin et al., 1992), FKBP14.6 (documento de Patente de Estados Unidos N° 5.354.845), FKBP52 (documento de Patente de Estados Unidos N° 5.763.590), FKBP60 (Yem et al., 1992) y FKBP65 (Patterson et al., 2000).

La multitud de los FKBP que están presentes en diferentes tipos de células también subrayan la utilidad de aislar nuevos análogos de ligando de FKBP condominios de unión y/o efectores potencialmente cambiados.

Los estudios farmacocinéticos de rapamicina y análogos de rapamicina han demostrado la necesidad de desarrollo de nuevos compuestos de rapamicina que pueden ser más estables en solución, más resistentes al ataque metabólico y que presentan una mejora de la biodisponibilidad. Se ha abordado la modificación usando posiciones químicamente disponibles en la molécula, sin embargo, este enfoque tiene una utilidad limitada ya que los sitios disponibles para la modificación química son limitados y existe menos posibilidad de modificar selectivamente una posición en particular. Algunos enfoques biológicos para la producción de nuevos análogos de rapamicina han tenido menos éxito debido a las dificultades encontradas para trabajar con el organismo (Lomovskaya et al., 1997; Kieser et al., 2000) a pesar de la disponibilidad de la secuencia del grupo de genes biosintéticos de rapamicina de *S. hygroscopicus* (Schwecke et al., 1995).

Se ha informado de una serie de análogos de rapamicina sintetizados que usan los sitios químicamente disponibles de la molécula. La descripción de los siguientes compuestos se adaptó para el sistema de numeración de la molécula de rapamicina que se describe en la Figura 1. Los sitios químicamente disponibles en la molécula para derivatización o reemplazo incluyen grupos hidroxilo C40 y C28 (por ejemplo, documento de Patente de Estados

Unidos N° 5.665.772; documento de Patente de Estados Unidos N° 5.362.718), grupos metoxi C39 y C16 (por ejemplo, documento de patente WO96/41807; documento de Patente de Estados Unidos N° 5.728.710), grupos ceto C32, C26 y C9 (por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N° 5.378.836; documento de Patente de Estados Unidos N° 5.138.051; documento de Patente de Estados Unidos N° 5.665.772). A hidrogenación en C17, C19 y/o C21, dirección del trieno, dio como resultado la retención de la actividad antifúngica pero la pérdida de la inmunosupresión (por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N° 5.391.730; documento de Patente de Estados Unidos N° 5.023.262). Se han conseguido mejoras significativas en la estabilidad de la molécula (por ejemplo, formación de oximas en C32, C40 y/o C28, documento de Patente de Estados Unidos N° 5.563.145, documento de Patente de Estados Unidos N° 5.446.048), resistencia al ataque metabólico (por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N° 5.912.253), biodisponibilidad (por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N° 5.221.670; documento de Patente de Estados Unidos N° 5.955.457; documento de patente WO98/04279) y la producción de profármacos (por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N° 6.015.815; documento de Patente de Estados Unidos N° 5.432.183) a través de derivatización. Sin embargo, la modificación química requiere cantidades significativas de molde de rapamicina y, como una base y compuesto lábil ácido, es difícil trabajar con ellos. Cuando la derivatización química puede ser selectiva de grupo, a menudo es difícil ser selectiva de sitio. En consecuencia, la modificación química requiere de forma invariable múltiples etapas de protección y desprotección y produce productos mixtos con rendimientos variables.

También se ha descrito el aislamiento de análogos de rapamicina usando métodos biológicos tales como biotransformación y modificación genética basada en fagos. El aislamiento de metabolitos menores tanto de cepas mutantes como de cepas productoras de rapamicina ha proporcionado pequeñas cantidades de un número de análogos de rapamicina. A menudo estas cepas tienen bajo rendimiento y producen mezclas de análogos de rapamicina. El aislamiento de 27-O-desmetilrapamicina y 27-desmetoxirapamicina se informó a partir del sobrenadante cultivo de *S. hygroscopicus*, NCIMB 40319 (Box et al., 1995). La actividad antifúngica de la 27-O-desmetilrapamicina fue menor que la de la rapamicina pero la inhibición de la actividad de la FKBP12 PPIasa parecía estar aumentada. La inhibición de la proliferación estimulada por ConA de linfocitos T esplénicos de murino y la inhibición de la proliferación estimulada por LPS de linfocitos B esplénicos de murino se redujo en comparación con la rapamicina (Box et al., 1995). De forma análoga, las actividades antifúngicas de los derivados de rapamicina prolilrapamicina, 27-O-desmetilrapamicina y 27-desmetoxirapamicina eran inferiores que las de la rapamicina (Wong et al., 1998). Los análogos de rapamicina (16-O-desmetilrapamicina, 27-O-desmetilrapamicina, 39-O-desmetilrapamicina, 16,27-O-bisdesmetilrapamicina, prolilrapamicina, 26-O-desmetilprolilrapamicina, 9-desoxorapamicina, 27-desmetoxirapamicina, 27-desmetoxi-39-O-desmetilrapamicina, 9-desoxo-27-desmetoxirapamicina, 28-deshidrorapamicina, 9-desoxo-27-desmetoxi-39-O-desmetilrapamicina) también se aislaron de N902-109 de *Actinoplanes* sp después de la adición de inhibidores P450 del citocromo y/o precursores que alimentan el cultivo o después de biotransformación de la rapamicina aislada (Nishida et al., 1995). El uso de tales inhibidores, sin embargo, solamente permite el direccional miento de una función enzimática en particular y no es selectivo del sitio. La producción racional de un solo análogo seleccionado no es posible a través de este método. La producción resultante de mezclas de análogos de rapamicina en lugar de un solo producto deseado también influye en el rendimiento. La actividad inhibitoria de la reacción de linfocitos mixtos (MLR) de los compuestos se evaluó y se detectó poco efecto en la actividad después de la pérdida del grupo metilo en C27 o/y C16. Además, la 9-desoxorapamicina mostró una disminución de la actividad más significativa en la actividad en la pérdida del grupo metoxi en C27, el grupo hidroxilo en C28 y la sustitución de un grupo pipercolinilo para un grupo prolilo dio como resultado una reducción de la potencia (Nishida et al., 1995). De forma análoga, se ha informado de la biotransformación de la rapamicina y el aislamiento de la 16,39-O-bisdesmetilrapamicina (documento de patente WO 94/09010). La retención de la actividad inhibitoria en ensayos de proliferación celular con compuestos modificados en el anillo de ciclohexilo, por ejemplo 39-O-desmetilrapamicina y modificaciones en C40 tales como SDZ RAD, identifican esta región de la molécula como una diana para la generación de nuevos análogos de rapamicina. Se informó de nuevos análogos de rapamicina después de alimentación de ácido ciclohexanocarboxílico, ácido cicloheptanocarboxílico, ácido ciclohex-1-enocarboxílico, ácido 3-metilciclohexanocarboxílico, ácido ciclohex-3-enocarboxílico, ácido 3-hidroxiciclohex-4-enocarboxílico y ácido ciclohept-1-enocarboxílico a cultivos de *S. hygroscopicus* demostrando de este modo la flexibilidad en el módulo de carga de la rapamicina policétido sintasa (P.A.S. Lowden, tesis doctoral PhD, Universidad de Cambridge, 1997). Estos nuevos análogos de rapamicina se produjeron en competición con el iniciador natural, ácido 4, 5-dihidroxiciclohex-1-enocarboxílico, dando como resultado rendimientos reducidos y productos mixtos.

Se ha informado del aislamiento de cepas recombinantes de *S. hygroscopicus* que producen diversos análogos de rapamicina, usando métodos biológicos mediados por tecnología de fagos (Lomovskaya et al., 1997). En presencia de derivados de prolina añadidos, un montante de supresión *rapL* de *S. hygroscopicus* sintetizó los nuevos análogos de rapamicina, prolilrapamicina, 4-hidroxi prolilrapamicina y 4-hidroxi prolil-26-desmetoxi-rapamicina (Khaw et al., 1998). De forma análoga, se han identificado las nuevas rapamicinas, 3-hidroxi-prolil-rapamicina, 3-hidroxi-prolil-26-desmetoxi-rapamicina, y ácido trans-3-aza-biciclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico rapamicina como se describe en el documento de patente WO98/54308. La actividad de prolilrapamicina y 4-hidroxi prolil-26-desmetoxi-rapamicina se evaluó en ensayos de proliferación y la actividad inhibitoria de este último compuesto era significativamente menor que la de la rapamicina (Khaw et al., 1998). La supresión de cinco genes contiguos, *rapQONML* (responsable de modificaciones post-policétido en C16, C27 y la producción de ácido L-pipecólico) y su sustitución con un marcador de resistencia a neomicina en el 29253 de *S. hygroscopicus* de la ATCC usando metodología basada en fagos dio

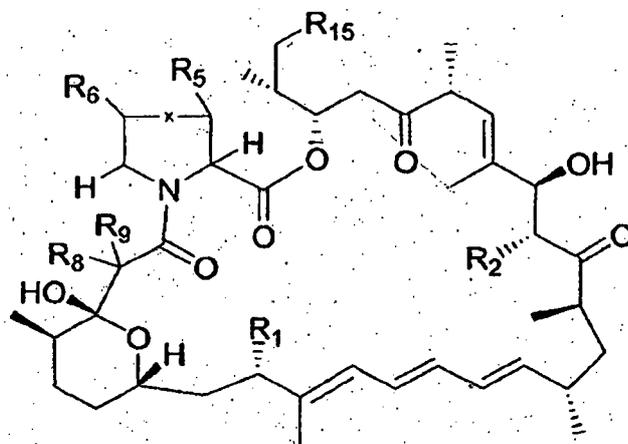
como resultado la producción de 16-O-desmetil-27-desmetoxirapamicina cuando se alimentaba con ácido pipercolico (Chung et al., 2001). No se ha demostrado complementación alguna de este mutante de supresión usando esta tecnología. Además, la funcionalidad específica del sitio de rapM y rapQ sigue siendo poco clara; por lo tanto, no se ha habilitado el diseño racional de análogos de rapamicina que requieren metilación en C16-OH o C27-OH. La metodología basada en fagos adolece de una serie de inconvenientes como se describe con más detalle a continuación. Ofrece un proceso difícil y prolongado para obtener cepas modificadas por ingeniería y tiene una versatilidad reducida en comparación con la metodología que se desvela dentro de esta patente actual.

Algunos enfoques convencionales para manipular genes que codifican la rapamicina usando métodos biológicos comprenden la mutación o supresión de genes individuales en el cromosoma de una cepa hospedadora o/y la inserción de genes individuales como copias extra de genes homólogos o heterólogos individualmente o como casetes de genes (documento de patente WO01/79520, documento de patente WO 03/048375). Sin embargo, el aislamiento de nuevos análogos de rapamicina que usan tales métodos biológicos se ha limitado debido a las dificultades en la transformación del organismo que produce rapamicina, *S. hygroscopicus*. Se ha informado que los métodos usados normalmente de transformación con ADN plásmido o transferencia de conjugados no fueron satisfactorios con la cepa que produce rapamicina (Lomovskya et al., 1997, Schweke et al., 1995, Kieser et al., 2000). El estado actual de la técnica acusa la metodología de Lomovskya et al. (1997), un método basado en fagos de trabajo intensivo que está extremadamente limitado por el tamaño de los fragmentos de ADN clonados transferidos en *S. hygroscopicus* (Kieser et al., 2000). Esta tecnología se limita a la transferencia de un máximo de 6,4 kb de ADN clonado. Por lo tanto, cuando se complementa un mutante de supresión usando esta tecnología, el experto en la materia está limitado a la inclusión de ~2 genes funcionales además del promotor deseado, regiones de homología y marcador de resistencia. La información genética para el grupo de genes biosintéticos de rapamicina ha estado disponible desde 1995 (Schwecke et al., 1995), sin embargo, se ha realizado un progreso limitado en este área (Khaw et al., 1998; Chung et al., 2001; documento de patente WO01/34816).

Wong et al. (1998) Journal of Antibiotics 51:487-491 informan de las actividades antifúngicas de la rapamicina y sus derivados, prolilrapamicina, 32-desmetilrapamicina y 32-desmetoxirapamicina.

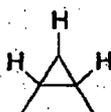
Sumario de la Invención

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula:

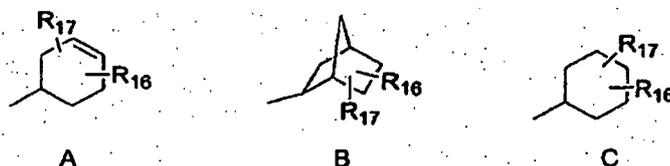


en la que

x = enlace o CH₂, o -CHR₆-x-CHR₅- es



R₁₅ =





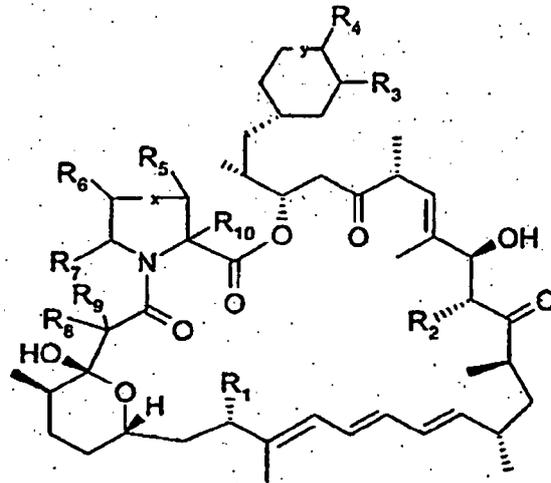
$R_1 = \text{OH, OCH}_3$
 $R_2 = \text{H, OH, OCH}_3$
 $R_3 = \text{F, Cl y } R_4 = \text{H, OH, CH}_3, \text{F, C; o}$
 $R_4 = \text{F, Cl y } R_3 = \text{H, OH, CH}_3, \text{F, Cl, OCH}_3$;
 $R_{18} = \text{OH, OCH}_3$
 $R_{17} = \text{Cl, F}$
 $R_5 = \text{H, ON}$
 $R_6 = \text{H, OH}$
 $R_8 \text{ y } R_3 \text{ en conjunto son } =\text{O o H,H; e}$
 $y = \text{enlace, CH}_2$.

En una realización preferente, el compuesto puede ser un compuesto en el que R_{15} es G y R_3 es F, Cl y R_4 es H, OH, CH_3 , F, Cl; o R_4 es F, Cl y R_3 es H, OH, CH_3 , F, Cl, OCH_3 .

En una realización más preferente, el compuesto se pueden seleccionar entre el grupo que consiste en

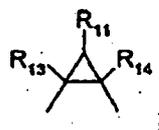
8-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-fluoro-4-hidroxiciclohexil) rapamicina;
 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-hidroxi-4-fluorociclohexil) rapamicina;
 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-cloro-4-hidroxiciclohexil) rapamicina; y
 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-hidroxi-4-clorociclohexil) rapamicina.

La presente invención también proporciona un compuesto que tiene la fórmula



en la que

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

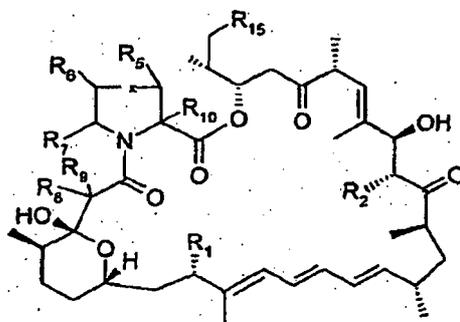


$y = \text{enlace o CHR}_{12}$;
 $R_1 = \text{OH, OCH}_3$;
 $R_2 = \text{H, OH, OCH}_3$;

R₃ = halo y R₄ = H, OH, OCH₃, alquilo, halo, amino, tiol; o
 R₄ = halo y R₃ = H, OH, OCH₃, alquilo, halo, amino, tiol;
 R₅, R₆, R₇, R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃ y R₁₄ son cada uno independientemente H, alquilo, halo, hidroxi; y
 R₈ y R₉ en conjunto son =O o H,H.

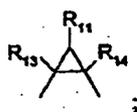
5

La presente invención también proporciona un compuesto que tiene la fórmula



10 en la que

x = enlace o CHR₁₁, o -CHR₆-x-CHR₅- es

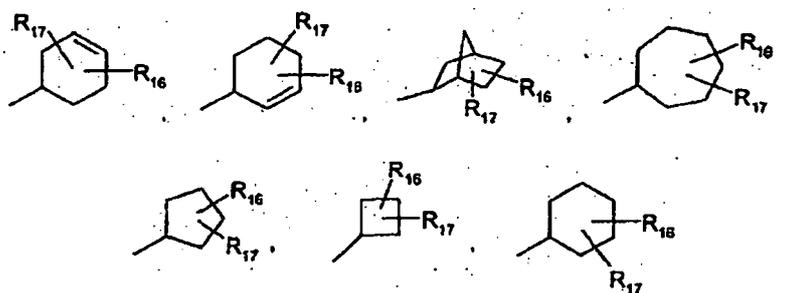


15

R₁ = OH, OCH₃;
 R₂ = H, OH, OCH₃;
 R₅ = H, alquilo, halo, hidroxi;
 R₆ = H, alquilo, halo, hidroxi;
 R₇ = H, alquilo, halo, hidroxi;
 R₈, R₉ = =O o H,H
 R₁₀ = H, alquilo, halo, hidroxi;
 R₁₁ = H, alquilo, halo, hidroxi;
 R₁₂ = H, alquilo, halo, hidroxi;
 R₁₃ = H, alquilo, halo, hidroxi;
 R₁₄ = H, alquilo, halo, hidroxi;
 R₁₅ =

20

25



30

R₁₈ = OH; y
 R₁₇ = halo.

35

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para generar un compuesto de acuerdo con la presente invención que comprende las etapas de:

40

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

En una realización, el método puede comprender una o más de las siguientes etapas adicionales seleccionadas entre el grupo que consiste en suprimir uno o más genes auxiliares adicionales; restaurar por complementación uno o más de los genes suprimidos; e aislar y purificar los compuestos generados.

45

En una realización preferente, dicha unidad iniciadora natural se selecciona entre el grupo que consiste en

5 ácido 3-*trans*-hidroxi-4-*cis*-fluorociclohexano carboxílico;
 ácido 4-*trans*-hidroxi-3-*cis*-fluorociclohexano carboxílico;
 ácido 3-*cis*-hidroxi-4-*trans*-fluorociclohexano carboxílico;

10 ácido 4-*cis*-hidroxi-*trans*-fluorociclohexano carboxílico;
 ácido 3-*cis*-hidroxi-4-*trans*-clorociclohexano carboxílico;
 ácido 4-*cis*-hidroxi-3-*trans*-clorociclohexano carboxílico;
 ácido 3-*trans*-hidroxi-4-*cis*-clorociclohexano carboxílico; y
 ácido 4-*trans*-hidroxi-3-*cis*-clorociclohexano carboxílico,

o ésteres simples o sales de los mismos.

15 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de la presente invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, el tratamiento de infecciones fúngicas, el tratamiento de enfermedades autoinmunes, proliferativas y/o hiperproliferativas, el mantenimiento de inmunosupresión, el tratamiento de diabetes, rechazo agudo o crónico de un trasplante de órganos o tejidos, asma, tumores, psoriasis, eccema, artritis reumatoide, fibrosis, alergias o para uso en relación con mecanismos antifibróticos, neuroregenerativos y/o antiangiogénicos.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de la presente invención en la fabricación de una endoprótesis vascular.

25 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una endoprótesis vascular que comprende un compuesto de acuerdo con la presente invención.

En el presente documento también se describen métodos recombinantes para la transformación eficaz de cepas que contienen un grupo biosintético que codifica un ligando de FKBP, por ejemplo, pero no se limita a, *Streptomyces hygroscopicus subsp. hygroscopicus* NRRL 5491, *Actinoplanes sp.* N902-109 FERM BP-3832, *Streptomyces sp.* AA6554, *Streptomyces hygroscopicus var. ascomyceticus* MA 6475 ATCC 14891, *Streptomyces hygroscopicus var. ascomyceticus* MA 6678 ATCC 55087, *Streptomyces hygroscopicus var. ascomyceticus* MA 6674, *Streptomyces hygroscopicus var. ascomyceticus* ATCC 55276, *Streptomyces tsukubaensis* N° 9993 FERM BP-927, *Streptomyces hygroscopicus subsp. yakushimaensis*, *Streptomyces sp.* DSM 4137, *Streptomyces sp.* DSM 7348, *Micromonospora n.sp.* A92-306401 DIM 8429, *Streptomyces sp.* MA 6858 ATCC 55098, *Streptomyces sp.* MA 6848, dichos métodos comprenden:

- (a) construcción de un plásmido de supresión de conjugado en una cepa de *E. coli* que es dam^- , dcm^- o dam^- y que dcm^- .
- 40 (b) generación de esporas de dicha cepa adecuadas para conjugación en la que dicha cepa se cultiva con una humedad entre un 10 % y un 40 % y las esporas se cosechan entre 5 y 30 días;
- (c) conjugación de la cepa de *E. coli* de la etapa (a) con las esporas de la etapa (b) en un medio que comprende por litro:
- 45 i) de 0,5 g a 5 g de polvo de macerado de maíz,
 ii) de 0,1 g a 5 g de extracto de levadura,
 iii) de 0,1 g a 10 g de carbonato cálcico; y
 iv) de 0,01 g a 0,5 g de sulfato de hierro;
- 50 dichos medios contienen adicionalmente BACTO-agar y almidón y se han secado para dar como resultado una pérdida de peso de un 1-20 %; y
 (d) opcionalmente cultivar la cepa en condiciones adecuadas para producción de policétidos.

Los métodos de acuerdo con la presente invención y los métodos que se describen en el presente documento se pueden usar para la transformación de *Streptomyces hygroscopicus subsp. hygroscopicus* (por ejemplo, NRRL 5491), *Actinoplanes sp.* N902-109 (por ejemplo, FERM BP-3832), *Streptomyces sp.* AA6554, *Streptomyces hygroscopicus var. ascomyceticus* (por ejemplo, MA 6475 ATCC 14891), *Streptomyces hygroscopicus var. ascomyceticus* (por ejemplo, MA 6678 ATCC 55087), *Streptomyces hygroscopicus var. ascomyceticus* (por ejemplo MA 6674), *Streptomyces hygroscopicus var. ascomyceticus* (por ejemplo, ATCC 55276), *Streptomyces tsukubaensis* N° 9993 (por ejemplo, FERM BP-927), *Streptomyces hygroscopicus subsp. yakushimaensis*, *Streptomyces sp.* (por ejemplo, DSM 4137), *Streptomyces sp.* (por ejemplo, DSM 7348), *Micromonospora n.sp.* A92-306401 (por ejemplo, DSM 8429) o *Streptomyces sp.* (por ejemplo, MA 6858 ATCC 55098). Por ejemplo, los métodos se usan para la transformación de: *S. hygroscopicus subsp. hygroscopicus* (por ejemplo, NRRL 5491) o *S. hygroscopicus var. ascomyceticus* (por ejemplo, ATCC 14891). Preferentemente, los métodos se usan para la transformación de *S. hygroscopicus subsp. hygroscopicus* productor de rapamicina (por ejemplo, NRRL 5491).

Por lo tanto, la presente divulgación también describe una cepa recombinante que contiene grupos biosintéticos que codifican ligandos de FKBP en los que uno o más genes auxiliares se han suprimido o inactivado usando los métodos como se describe en el presente documento. Además, en el presente documento se describen métodos recombinantes y materiales para expresar combinaciones de enzimas de modificación de policétido. Con el fin de producir nuevos análogos de policétidos. Por ejemplo, la presente divulgación describe métodos recombinantes y materiales para expresar las combinaciones de enzimas responsables de la modificación post-PKS y/o suministro de precursor de grupos biosintéticos que codifican ligandos de FKBP por ejemplo, pero no limitados a, rapamicina, FK523, FK525, antascomicina, meridamicina, tsukubamicina y análogos de los mismos y métodos para la producción de análogos en células hospedadoras recombinantes. Mayo se inicia preferentemente, los métodos recombinantes y materiales se usan para expresar las combinaciones de enzimas responsables de la modificación post-PKS y/o suministro de precursor en la biosíntesis de rapamicina, FK520, FK506 e 'hyg' y métodos para la producción de análogos de rapamicina, FK520, FK506 e 'hyg' en células hospedadoras recombinantes. Más preferentemente, los métodos recombinantes y materiales se usan para expresar las combinaciones de enzimas responsables de la modificación post-PKS y/o suministro de precursor en la biosíntesis de la rapamicina y métodos para la producción de análogos de rapamicina en células hospedadoras recombinantes.

En su sentido más amplio, la presente divulgación se refiere a la alteración de un sistema genético que tiene una parte núcleo responsable de la producción de un producto básico, y una multiplicidad de genes de modificación responsables de la realización de modificaciones relativamente pequeñas al producto básico - por ejemplo, realización de glicosilación, oxidación, reducción, alquilación, desalquilación, acilación o ciclación del producto básico, y una multiplicidad de genes de suministro de precursores que están implicados en la producción de compuestos precursores en particular (por ejemplo, pipecolato; ácido 4,5 dihidroxiciclohex-1-eno carboxílico). Por lo tanto, el producto básico puede ser un policétido modular y los genes de modificación se pueden relacionar con la glicosilación y/u otras modificaciones de una cadena de policétido, y los genes de suministro de precursor pueden estar implicados en la producción y/o incorporación de precursores naturales o no naturales (por ejemplo, pipecolato y/o ácido 4,5 dihidroxiciclohex-1-eno carboxílico en el sistema de rapamicina).

La parte núcleo puede no funcionar adecuadamente o incluso en absoluto en ausencia de un gen de suministro de precursor (a menos que se proporcione un compuesto precursor natural o no natural o esté disponible de otro modo).

En un aspecto, la divulgación describe métodos para la alteración de un sistema genético con una parte núcleo para la alteración del sistema genético con una parte núcleo que no puede funcionar debido a una supresión o inactivación de un gen de suministro de precursor. Algunos sistemas genéticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los grupos biosintéticos de rapamicina, antascomicina, 'hyg', FK523, meridamicina, FK525 y tsukubamicina. Un ejemplo, el gen precursor que carece de suministro es preferentemente *rapK* o un homólogo de *rapK*. El sistema de genes usados en la presente invención es el grupo de rapamicina. El gen precursor que carece de suministro es preferentemente *rapK*. Este aspecto de la invención proporciona métodos para la producción eficaz de una multiplicidad de productos básicos a través de la incorporación de precursores naturales o no naturales (por ejemplo, ácido 4,5-dihidroxiciclohex-1-eno carboxílico).

Otro tipo de sistema es un sistema de péptido no ribosómico ("NRP") en el que el producto básico es un péptido y los genes de modificación son genes responsables de modificaciones a un péptido (glicosilación, reducción etc), y los genes de suministro de precursores son genes implicados en la producción de restos de aminoácidos no habituales a incorporar en el péptido. Los sistemas también pueden ser de tipo mixto, por ejemplo que tienen una parte de policétido y una parte con un origen biosintético diferente, por ejemplo NRP. De hecho, la rapamicina se puede contemplar como un ejemplo de esto ya que el resto de pipecolato es un resto de aminoácido añadido por una enzima similar a los encontrados en sistemas de NRP.

Estos genes de modificación y genes de suministro de precursor se pueden contemplar como "genes auxiliares" para síntesis de policétidos y la expresión "genes auxiliares" como se usa en el presente documento se puede referir a genes de modificación, genes de suministro de precursor o ambos.

La alteración del sistema genético implica la creación de un sistema de funcionamiento alterado en el que se ha alterado el conjunto de genes auxiliares. Por lo tanto, se pueden haber suprimido uno o más genes auxiliares (y preferentemente dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más o siete o más) (o convertido en los funcionales) y/o reemplazados con diferentes genes.

Esto puede implicar un "sistema de supresión" que comprende ácidos nucleicos que codifican un sistema genético que carece de una multiplicidad de genes auxiliares funcionales. Este sistema de supresión se puede complementar a continuación con uno o más genes auxiliares funcionales (que pueden ser los mismos o diferentes de los genes a los que reemplazan). Esto se puede realizar de forma combinatoria, un sistema de supresión que está complementado con una multiplicidad de genes y conjuntos de genes diferentes.

Un sistema alterado que difiere del sistema natural en la carencia de una o más funciones de modificación se podría producir (a) mediante la producción de un sistema de supresión y restauración por complemento de menos de todos

los genes suprimidos; o (b) mediante supresión o inactivación selectiva de genes de un sistema existente. En un sistema alterado producido de acuerdo con (b) los genes se pueden activar mediante mutagénesis dirigida al sitio de un sitio activo importante en la función de la proteína (mutación puntual del sitio activo), por truncamiento del gen a través de una mutación del desplazamiento de marco, mediante una supresión en marco de una sección del gen importante para su función, tal como un sitio activo; supresión parcial o inactivación por mutación puntual. Esto se podría realizar mediante doble recombinación y selección del genotipo mutante, o mediante recombinación individual. En una realización preferente, el sistema alterado se produce con el método (a). Tales métodos también se podrían usar en la producción de un sistema de suspensión. El enfoque de "complemento" (a) es preferentemente homólogo, por que los genes "restaurados" son del mismo grupo de genes, sin embargo, el complemento heterólogo, en el que los genes "restaurados" se seleccionan entre un grupo biosintético diferente que codifica ligandos de FKBP, también se contempla en la presente invención. En una realización preferente, los genes "restaurados" son básicamente los mismos que los genes suprimidos, o son variantes de los mismos, que realiza funciones similares.

En un aspecto más de la invención, un sistema alterado con un gen de suministro de precursor suprimido (o no funcional) se puede alimentar con precursores alternativos de modo que produce productos variables.

Como se aplica a un sistema de policétido sintasa ("PKS"), un tipo de realización preferente es un método para producir policétidos que comprenden: (a) proporcionar una cepa de un organismo que contiene uno o más genes de PKS que se pueden expresar para que produzcan una PKS de funcionamiento que puede generar un policétido en el organismo, por ejemplo genes de PKS que codifican un ligando de FKBP, el organismo que carece de uno o más (y preferentemente una pluralidad) de genes auxiliares funcionales asociados de forma natural con dichos genes de PKS que codifican productos genéticos capaces de realizar las modificaciones respectivas del policétido; y (b) realizar el complemento haciendo que dicho organismo exprese uno o más genes auxiliares, constituyendo los genes de modificación expresados un conjunto incompleto de genes auxiliares asociados de forma natural con dichos genes de PKS y/o que comprende uno o más genes auxiliares variables; y (c) cultivar dicha cepa y opcionalmente aislar los análogos de policétidos producidos.

La etapa de proporcionar una cepa de un organismo que contiene uno o más genes de PKS puede incluir una etapa de proporcionar ácido nucleicos decodifica un grupo de genes que comprende dicho uno o más genes de PKS y que carece de dicho uno o más genes auxiliares; e introducir dicho ácido nucleico en el organismo.

Los genes de PKS son genes de rapamicina. Los genes auxiliares que son de carencia son preferentemente uno o más de *rapK*, *rapI*, *rapQ*, *rapM*, los genes contiguos *rapN* y *O* (denominados en el presente documento *rapN/O*), *rapL* y *rapJ*. En realizaciones específicas contempladas en la presente invención:

i) un agente auxiliar tiene carencia, por ejemplo *rapK*; *rapI*; *rapQ*; *rapM*; *rapL*, *rapN/O* o *rapJ* tiene carencia; preferentemente en el que un gen auxiliar que tiene carencia se selecciona entre el grupo que consiste en *rapK*; *rapI*; *rapQ*; *rapM*; *rapN/O* y *rapJ*;

ii) dos genes auxiliares tienen carencia por ejemplo: *rapKrapI*; *rapKrapQ*; *rapKrapM*; *rapKrapN/O*; *rapKrapL*; *rapKrapJ*; *rapKrapQ*; *rapKrapM*; *rapKrapN/O*; *rapKrapL*; *rapKrapJ*; *rapQrapM*; *rapQrapN/O*; *rapQrapL*; *rapQrapJ*; *rapMrapN/O*; *rapMrapL*; *rapMrapJ*; *rapN/OrapL*; *rapN/OrapJ* o *rapLrapJ* tienen carencia;

iii) tres genes auxiliares tienen carencia por ejemplo: *rapKrapIrapQ*; *rapKrapIrapM*; *rapKrapIrapN/O*; *rapKrapIrapL*; *rapKrapIrapJ*; *rapKrapQrapM*; *rapKrapQrapN/O*; *rapKrapQrapL*; *rapKrapQrapJ*; *rapKrapMrapN/O*; *rapKrapMrapL*; *rapKrapMrapJ*; *rapKrapN/OrapL*; *rapKrapN/OrapJ*; *rapKrapLrapJ*; *rapIrapQrapM*; *rapIrapQrapN/O*; *rapIrapQrapL*; *rapIrapQrapJ*; *rapIrapMrapN/O*; *rapIrapMrapL*; *rapIrapMrapJ*; *rapIrapN/OrapL*; *rapIrapN/OrapJ*; *rapIrapLrapJ*; *rapQrapMrapN/O*; *rapQrapMrapL*; *rapQrapMrapJ*; *rapQrapN/OrapL*; *rapQrapN/OrapJ*; *rapQrapLrapJ*; *rapM- rapN/OrapL*; *rapMrapN/OrapJ*; *rapMrapLrapJ* o *rapN/OrapLrapJ* tienen carencia,

iv) cuatro genes auxiliares tienen carencia, por ejemplo: *rapKrapIrapQrapM*; *rapKrapIrapQrapN/O*; *rapKrapIrapQrapL*; *rapKrapIrapQrapJ*; *rapKrapIrapMrapN/O*; *rapKrapIrapMrapL*; *rapKrapIrapMrapJ*; *rapKrapIrapN/OrapL*; *rapKrapIrapN/OrapJ*; *rapKrapIrapLrapJ*; *rapKrapQrapMrapN/O*; *rapKrapQrapMrapL*; *rapKrapQrapMrapJ*; *rapKrapQrapN/OrapL*; *rapK*, *rapQ*, *rapN/O*, *rapJ*; *rapKrapQrapLrapJ*; *rapKrapMrapN/OrapL*; *rapKrapMrapN/OrapJ*; *rapKrapMrapLrapJ*; *rapKrapN/OrapLrapJ*; *rapIrapQrapMrapN/O*; *rapIrapQrapMrapL*; *rapIrapQrapMrapJ*; *rapIrapQrapN/OrapL*; *rapIrapQrapN/OrapJ*; *rapIrapQrapLrapJ*; *rapIrapMrapN/OrapL*; *rapIrapMrapN/OrapJ*; *rapIrapMrapLrapJ*; *rapIrapN/OrapLrapJ*; *rapQrapMrapN/OrapL*; *rapQrapMrapN/OrapJ*; *rapQrapMrapLrapJ*; *rapQrapN/OrapLrapJ* o *rapMrapN/OrapLrapJ* tienen carencia;

v) cinco genes auxiliares tienen carencia, por ejemplo: *rapKrapIrapQrapMrapL*; *rapKrapIrapQrapMrapJ*; *rapKrapIrapQrapN/OrapL*; *rapKrapIrapQrapN/OrapJ*; *rapKrapIrapQrapLrapJ*; *rapKrapIrapMrapN/OrapL*; *rapKrapIrapMrapN/OrapJ*; *rapKrapIrapMrapLrapJ*; *rapKrapIrapN/OrapLrapJ*; *rapKrapQrapMrapN/OrapL*; *rapKrapQrapMrapN/OrapJ*; *rapKrapQrapMrapLrapJ*; *rapKrapQrapN/OrapLrapJ*; *rapKrapMrapN/OrapLrapJ*; *rapIrapQrapMrapN/OrapL*; *rapIrapQrapMrapN/OrapJ*; *rapIrapQrapMrapLrapJ*; *rapIrapQrapN/OrapLrapJ*; *rapIrapMrapN/OrapLrapJ*; *rapQrapMrapN/OrapLrapJ* o *rapIrapQrapMrapLrapJ* tienen carencia;

vi) seis genes auxiliares tienen carencia por ejemplo: *rapKrapIrapQrapMrapN/OrapL*; *rapKrapIrapQrapMrapN/OrapJ*; *rapKrapIrapQrapMrapLrapJ*; *rapKrapIrapQrapN/OrapLrapJ*; *rapKrapIrapMrapN/OrapLrapJ*; *rapKrapIrapMrapN/OrapJ*; *rapKrapIrapMrapLrapJ*; *rapKrapQrapMrapN/OrapLrapJ*; *rapKrapQrapMrapN/OrapJ*; *rapKrapQrapMrapLrapJ*; *rapKrapQrapN/OrapLrapJ*; *rapIrapQrapMrapN/OrapLrapJ*; *rapIrapQrapMrapN/OrapJ*; *rapIrapQrapMrapLrapJ*; *rapIrapQrapN/OrapLrapJ*; *rapIrapMrapN/OrapLrapJ*; *rapQrapMrapN/OrapLrapJ* o *rapIrapQrapMrapLrapJ* tienen carencia;

vii) siete genes auxiliares tienen carencia, por ejemplo *rapKrapIrapQrapMrapN/OrapLrapJ* tienen carencia.

La expresión "que carece de uno o más genes auxiliares funcionales" incluye tanto la carencia de un gen como la presencia de un gen y la presencia de un gen pero en un estado de no funcionamiento, por ejemplo por que se ha discapacitado de forma específica.

5 En un aspecto, la invención proporciona una ruta nueva y diligente para la incorporación eficaz de precursores naturales o no naturales que proporcionan nuevos análogos de rapamicina.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para generar análogos de ligandos de FKBP que incorpora una unidad iniciadora no natural, comprendiendo dicho método:

10

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

15

En una realización preferente, la cepa recombinante se genera usando los métodos que se describen en el presente documento.

20

Además, en el presente documento se describen bibliotecas de compuestos y compuestos individuales disponibles usando tales sistemas. Por lo tanto, un compuesto habitual es una variable de un compuesto producido de forma natural por un sistema genético que tiene una parte núcleo responsable de la producción de un producto básico, y una multiplicidad de genes auxiliares responsables de la realización de modificaciones relativamente pequeñas al producto básico, pudiéndose reproducir la variable con un sistema alterado de modo que uno o más de los genes auxiliares están ausentes, no son funcionales, o están reemplazados con variables funcionales. Una clase preferente de compuestos son los análogos de rapamicina que corresponden a productos de un sistema de rapamicina en el que uno o más de los genes que se seleccionan entre el grupo que consiste en genes de *rapK*, *rapI*, *rapQ*, *rapM*, *rapN*, *rapQ*, *rapL* y *rapJ* están ausentes, no son funcionales o variables.

25

30

En un aspecto, la presente invención proporciona nuevos análogos de rapamicina. Tales compuestos pueden tener una o más propiedades útiles, por ejemplo, pero no se limitan a, utilidad como inmunosupresores, agentes antifúngicos, agentes anticáncer, agentes neuroregenerativos, o agentes para el tratamiento de psoriasis, artritis reumatoide, fibrosis y otras enfermedades hiperproliferativas.

Definiciones:

35

Como se usa en el presente documento, la expresión "gen o genes de modificación" incluye los genes necesarios para modificaciones de post-policétido sintasa del policétido, por ejemplo, pero no se limitan a, monooxigenasas de citocromo P-450, ferredoxinas y O-metiltransferasas dependientes de SAM. En el sistema de rapamicina, estos genes de modificación incluyen *rapN/O*, *rapM*, *rapI*, *rapQ*, y *rapJ* pero una persona experta en la materia observará que algunos sistemas de PKS relacionados con la rapamicina (por ejemplo, pero no limitados a: antascomicina, 'hyg', FK523, meridamicina, FK525 y tsukubamicina) tendrán homólogos de al menos un subconjunto de estos genes, algunos de los cuales se analizan con detalle a continuación.

40

45

Como se usa en el presente documento, la expresión "gen o genes de suministro de precursor" los genes necesarios para el suministro de los precursores naturales o naturales, los genes necesarios para la síntesis de cualquier precursor incorporado por vía natural o por vía no natural y los genes necesarios para la incorporación de cualquier precursor incorporado por vía natural o por vía natural. Por ejemplo pero no limitado a, estos genes del sistema de rapamicina incluyen *rapL*, *rapK* y *rapP* era una persona experta en la materia observará que sistemas de PKS relacionados con la rapamicina (por ejemplo pero no limitados a: antascomicina, 'hyg', FK523, meridamicina, FK525 y tsukubamicina) tendrán homólogos de estos genes, algunos de los cuales se analizan con detalle a continuación.

50

Como se usa en el presente documento, la expresión "gen o genes auxiliares" incluye referencias a genes de modificación, genes de suministro de precursor o tanto genes de modificación como genes de suministro de precursor.

55

Como se usa en el presente documento, el término "precursor" incluye las unidades iniciado las naturales (es decir ácido 4,5-dihidroxiclohex-1-eno carboxílico), unidades iniciadoras no naturales, y aminoácidos incorporados por vía natural (es decir, ácido piperólico) y aminoácidos incorporados por vía no natural.

60

Como se usa en el presente documento, la expresión "unidad iniciadora no natural" se refiere a cualquier compuesto que se puede incorporar como una unidad iniciadora en la síntesis de policétidos que no son la unidad iniciadora normalmente elegida por ese PKS.

65

Como se usa en el presente documento, la expresión "ligandos de FKBP " se refiere a compuestos que se unen a la inmunofilina FKBP, y tales compuestos contienen preferentemente una α , β -diceto amida en la que el β -ceto está enmascarado como un hemiacetal. Tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, rapamicina, antascomicina, 'hyg', FK523, meridamicina, FK525 y tsukubamicina.

Como se usa en el presente documento, la expresión "grupos biosintéticos que codifican ligandos de FKBP" incluye, pero no se limita a los grupos de genes que dirigen la síntesis de rapamicina, 'hyg', FK523, antascomicina, meridamicina, FK525 y tsukubamicina.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "cepas que contienen grupos biosintéticos que codifican ligandos de FKBP" incluye, pero no se limita a: *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* (por ejemplo, NRRL 5491), *Actinoplanes* sp. N902-109 (por ejemplo, FERM BP-3832), *Streptomyces* sp. AA6554, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6475 (por ejemplo, ATCC 14891), *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6678 (por ejemplo, ATCC 55087), *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6674, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (por ejemplo, ATCC 55276), *Streptomyces tsukubaenses* N° 9993 (por ejemplo, FERM BP-927), *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *yakushimaensis*, *Streptomyces* sp. (por ejemplo, DSM 4137), *Streptomyces* sp. (por ejemplo, DSM 7348). *Micromonospora n.sp.* A92-306401 (por ejemplo, DSM 8429) o *Streptomyces* sp. MA 6858 (por ejemplo, ATCC 55098).

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "homólogo de *rapK*" se refiere a homólogos del gen *rapK* de rapamicina de otros grupos biosintéticos que codifican ligandos de FKBP, por ejemplo, pero no se limitan a el *Orf5* en el grupo 'hyg'. tales homólogos de *rapK* realizan la misma función que *rapK* en la síntesis de estos ligandos de FKBP relacionados, es decir, son esenciales para el suministro de la unidad iniciadora natural. Preferentemente, tales homólogos de *rapK* tienen una identidad de secuencias de al menos un 40 %, preferentemente al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % Con la secuencia de *rapK* como se muestra en la Figura 27 (SEC ID N°: 13).

Descripción detallada

25 En el presente documento se describe un método nuevo y diligente para la transformación de *S. hygroscopicus*. El uso de tecnología de fagos para el aislamiento de cepas modificadas genéticamente de *S. hygroscopicus* se ha descrito anteriormente (Khaw et al., 1998; Lomovskaya et al., 1997). Sin embargo, no se ha informado de método alguno aparte de la transfección para la introducción de ADN en la cepa de *S. hygroscopicus* que produce rapamicina. De hecho, se ha afirmado anteriormente que los métodos de transformación usados normalmente con ADN plásmido o transferencia de conjunto no eran satisfactorios con la cepa que produce rapamicina (Lomovskaya et al., 1997, Kieser et al., 2000; Schweke et al., 1995).

35 De forma sorprendente, se estableció un protocolo de conjugación para transformar *S. hygroscopicus* de forma satisfactoria como se describe en el Ejemplo 1. La metodología se ejemplificó mediante el aislamiento del mutante de supresión en MG2-10 de *S. hygroscopicus* (Ejemplo 2) y mediante la expresión de genes y combinaciones de genes como se describe en los Ejemplos 3, 5 y 15.

40 Por lo tanto, la presente divulgación describe un método para producir una cepa recombinante que contiene grupos biosintéticos que codifican ligandos de FKBP en los que se han suprimido o inactivado uno o más genes auxiliares y dicho método comprende:

(a) construcción de un plásmido de conjugación en una cepa de *E. coli* que es *dam⁻ dcm⁻* o *dam⁻ y dcm⁻*;
 (b) generación de esporas de dicha cepa adecuadas para conjugación en el que dicha cepa se cultiva con una humedad entre un 10 % y un 40 % y las esporas se cosechan entre 5 y 30 días;
 45 (c) conjugación de la cepa de *E. coli* de la etapa (a) con las esporas de la etapa (b) en un medio que comprende por litro:

i) de 0,5 g a 5 g de polvo de macerado de maíz,
 ii) de 0,1 g a 5 g de extracto de levadura,
 50 iii) de 0,1 g a 10 g de carbonato cálcico; y
 iv) de 0,01 g a 0,5 g de sulfato de hierro;

dichos medios contienen adicionalmente BACTO-agar y almidón y se han secado para dar como resultado una pérdida de peso de un 1-20 %; y

55 (d) opcionalmente cultivar la cepa en condiciones adecuadas para la producción de policétido.

Preferentemente la cepa de *E. coli* de la etapa (a) es *dam⁻ y dcm⁻*.

60 Preferentemente, en la etapa (b) las esporas se cosechan entre 10 y 25 días o entre 14 y 21 días. En otra realización, en la etapa (b) la cepa se cultiva con una humedad entre un 10 % y un 20 %.

En un ejemplo específico, el almidón usado en los medios de la etapa (c) es almidón de trigo.

65 En ejemplos preferentes, el medio usado en la etapa (c) comprende de 1 g a 4 g de polvo de macerado de maíz, de 1 g a 4 g de extracto de levadura, de 1 g a 5 g de carbonato cálcico; y de 0,2 g a 0,4 g de sulfato de hierro por litro. En realizaciones a modo de ejemplo más preferentes, el medio comprende por litro: 2,5 g de polvo de macerado de

maíz, 3 g de extracto de levadura, 3 g de carbonato cálcico; y 0,3 g de sulfato de hierro;

La estrategia de complemento que se describe en el presente documento proporciona un diligente para evaluar e identificar la función de cada gen auxiliar, es decir *rapK*, *rapQ*, *rapN/O*, *rapM*, *rapL*, *rapJ* y/o *rapI* en la biosíntesis de la rapamicina. El producto genético RapK ser identificado anteriormente como un candidato interesante para una dioxigenasa dependiente de pteridina que también podría catalizar una etapa oxidativa en la biosíntesis de la rapamicina (Molnar et al., 1996). El gen homólogo *fkfO* se identificó en el grupo de genes biosintéticos de FK506 y debido a la similitud estructural de la rapamicina y FK506 se postuló un papel para *rapK* en la oxidación del grupo OH en la posición C9 (Motamedi et al., 1996). Los hallazgos de los Ejemplos 3, 4 y 6, que describen la producción dependiente de *rapK* de pre-rapamicina por MG2-10[pSGsetrapK] de *S. hygroscopicus* sugieren que la RapK tiene al menos una función adicional en la biosíntesis de la rapamicina.

Por lo tanto, los métodos que se describen en el presente documento conducen a la elucidación de la función de RapK, es decir que la expresión del gen *rapK* es esencial para la acumulación de cualquier producto macrolídico ciclado. En un aspecto adicional, la presente divulgación describe el complemento de MG2-10 de *S. hygroscopicus* con *fkfO*, el homólogo de *rapK* para el grupo FK520, con la observación sorprendente de la producción dependiente de *fkfO* de la pre-rapamicina por MG2-10[pMG169-1] de *S. hygroscopicus* (Ejemplo 11). Un experto en la materia puede observar que *fkfO* cumple con una función similar en la producción de FK520 como *rapK* y *fkfO* en la producción de pre-rapamicina. Además, un experto en la materia observará que otros homólogos de *rapK*, que incluyen, pero no se limitan a, *fkfO* en el grupo FK506, *fkfO* en el grupo FK520 y *Orf5* en el grupo 'hyg' también puede cumplir con la misma función. Por ejemplo, algunos homólogos de *rapK* en grupos biosintéticos que codifican ligandos de FKBP, que incluyen, pero no se limitan a, FK506, FK520, FK525, antascomicina, FK523, tsukubamicina, y 'hyg' se pueden suprimir o inactivar, proporcionando cepas incapaces de preparar sus respectivos productos naturales conocidos. De forma análoga, la estrategia de complemento que sea indicado anteriormente proporciona un método diligente para investigar la función, especificidad y orden para los productos expresados de genes auxiliares en la biosíntesis de otros policétidos o péptidos no ribosómicos.

En el presente documento se describe un método para la producción de una cepa hospedadora recombinante capaz de producir análogos de rapamicina, que implica adicionalmente la construcción de supresiones genómicas, que incluyen, pero no se limitan a *rapQONMLKJI* introducida en *S. hygroscopicus* y complemento o complemento parcial mediante genes individuales o combinaciones de genes de expresión, que incluyen, pero no se limitan a *rapK*, *rapI*, *rapQ*, *rapM*, los genes contiguos *rapN* y *O* (denominados en el presente documento *rapN/O*), *rapL* y *rapJ*, en casetes de genes. Además, la divulgación describe un método para producir dichos análogos de rapamicina por cultivo de dicha cepa hospedadora recombinante, y opcionalmente aislando los análogos de rapamicina producidos. Por lo tanto, la cepa recombinante MG2-10[pSGsetrapK], producida por complementación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* de supresión genómica, con *rapK*, se cultivó para producir 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina (pre-rapamicina).

La estrategia implica la integración de un vector que comprende un subconjunto de genes que incluyen, pero no se limitan a, *rapK*, *rapI*, *rapQ*, *rapM*, *rapN*, *rapO*, *rapL* y *rapJ* en el mutante de supresión de *S. hygroscopicus* mencionado anteriormente. Tal integración se puede realizar usando diversas variables de integración disponibles que incluyen, pero no se limita: vectores basados en Φ C31, vectores basados en la pSAM2 integrasa (por ejemplo, en pPM927 (Smovkina et al., 1990)), R_4 integrasa (por ejemplo, en pAT98 (Matsuura et al., 1996)), Φ VVVB integrasa (por ejemplo, en pKT02 (Van Mellaert et al., 1998)), Φ BT1 integrasa ((por ejemplo, pRT801) Gregory et al., en artículos) y L5 integrasa (por ejemplo, Lee et al., 1991). En algunos casos esto puede necesitar la alteración de la cepa hospedadora mediante la adición del sitio de *attB* específico para la integrasa para permitir una integración de eficacia elevada. También se podrían usar vectores de replicación, como sustituciones para, o además de vectores basados en Φ C31. Estos incluyen, pero no se limitan a, vectores basados en pJJ101 (por ejemplo, pJJ487, Kieser et al., 2000), pSG5 (por ejemplo, pKC1139, Bierman et al., 1992) y SCP2* (por ejemplo, pJJ698, Kieser et al., 2000). Esta metodología se ha usado a modo de ejemplo en el presente documento mediante el uso de las funciones de integración específicas del sitio Φ BT1 y Φ C31.

Aunque la introducción de casetes de genes en *S. hygroscopicus* se ha usado a modo de ejemplo usando las funciones de integración específicas del sitio Φ BT1 y Φ C31, los expertos en la materia observarán que existe un número de estrategias diferentes que se describen en la bibliografía, incluyendo las que se han mencionado anteriormente que también se podrían usar para introducir tales casetes genéticos en cepas hospedadoras procariontas, o más preferentemente actinomicetos. Estas incluyen el uso de lectores de integración específicos del sitio como se ha descrito anteriormente y en los siguientes artículos (Kieser et al., 2000; Van Mellaert et al., 1998; Lee et al., 1991; Smovkina et al., 1990; Matsuura et al., 1996). Como alternativa, los plásmidos que contienen los casetes de genes se pueden integrar en un sitio neutro en el cromosoma usando sitios de recombinación homóloga. Además, para un número de cepas hospedadoras de actinomicetos, que incluyen *S. hygroscopicus*, los casetes de genes se pueden introducir en plásmidos de autorreplicación (Kieser et al., 2000; documento de patente WO98/01571).

En el presente documento se describen adicionalmente casetes de genes para el complemento de las cepas de supresión de *S. hygroscopicus* recombinante. Anteriormente se han descrito métodos para construir casetes de

genes y su uso heterólogo para producir macrólidos glicosilados híbridos (Gaisser et al., 2002; documento de patente WO01/79520, documento de patente WO 03/048375). El método de clonación usado para aislar los casetes de genes de la presente invención difiere de forma significativa del enfoque que se ha descrito anteriormente en que el casete de genes se ensambla directamente en un vector de expresión en lugar de ensamblar previamente los genes producidos entre plásmidos de pUC18/19, proporcionando de este modo un procedimiento de clonación rápida. El enfoque se usa a modo de ejemplo como se describe en los Ejemplos 3, 4, 5, 9 y 15. Como se describe en el presente documento, se puede construir un vector adecuado (por ejemplo, pero no limitado a pSGLit1) para uso en la construcción de dichos casetes de genes en los que un sitio de restricción adecuado (por ejemplo, pero no limitado a *Xba*I), sensible metilación de dam se inserta en la posición 5' al gen a genes de interés y un segundo sitio de restricción (por ejemplo *Xba*I) se puede insertar en la posición 3' a los genes de interés. El experto en la materia observará que se pueden usar otros sitios de restricción como una alternativa a *Xba*I y que el sitio sensible a metilación puede estar en la posición 5' o 3' del gen o genes de interés.

El uso de casetes de genes permite la generación rápida y en paralelo de múltiples cepas recombinantes suprimidas en cualquier combinación de genes de modificación de una cepa de supresión de *S. hygroscopicus* individual. La estrategia de clonación facilita el ensamblaje de una biblioteca de casetes de genes en cualquiera de una forma dirigida o aleatoria, y por lo tanto es una herramienta potente para la producción combinatoria de nuevos análogos de rapamicina que incluyen, pero no se limitan en exclusiva a, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina (pre-rapamicina), 9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina, 16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina, 16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina, 9-desoxo-27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina, 27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-rapamicina, "eoxo-39-O-desmetil-rapamicina, 8-desoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina (pre-prolilrapamicina), 8-desoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 8-desoxo-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 8-desoxo-15-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 8-desoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-prolilrapamicina, 15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 8-desoxo-26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 8-desoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 15-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 15-O-desmetil-26-desmetoxi-prolilrapamicina, 15-O-desmetil-26-O-desmetil-prolilrapamicina, 15-O-desmetil-26-desmetoxi-prolilrapamicina, 26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 8-desoxo-15-O-desmetil-prolilrapamicina, 8-desoxo-26-O-desmetil-prolilrapamicina, 8-desoxo-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 15-O-desmetil-prolilrapamicina, 38-O-desmetil-prolilrapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina, 16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina, 9-desoxo-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina, 16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina, 9-desoxo-27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina, 27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina, 9-desoxo-39-desmetoxi-rapamicina, 8-desoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 8-desoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 8-desoxo-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 8-desoxo-15-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 8-desoxo-26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 15-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 8-desoxo-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 38-desmetoxi-prolilrapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(hidroxiciclohexenil)rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(dihidroxi ciclohexil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(hidroxinorbnil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-metil-4-hidroxiciclohexil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(4-metil hidroxi ciclohexil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-fluoro-4-hidroxiciclohexil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-hidroxi-4-fluorociclohexil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-cloro-4-hidroxiciclohexil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-hidroxi-4-clorociclohexil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-cis-4-cis-dihidroxiciclohexil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-trans-4-trans-dihidroxiciclohexil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetil rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(hidroxiciclohexenil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(hidroxinorbnil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(4-metil hidroxiciclohexil) rapamicina.

Además se describe un sistema para la producción combinatoria de células hospedadoras recombinantes capaces de producir análogos de rapamicina, implica la construcción de una supresión genómica *rapQONMLKJI* introducida en *S. hygroscopicus* y su complemento parcial mediante una biblioteca combinatoria de casetes de genes que comprenden uno o una pluralidad de los genes suprimidos auxiliares *rapQ*, *rapN/O*, *rapM*, *rapL*, *rapK*, *rapJ*, y *rapI*.

El enfoque que se ha expuesto comprender cómo una parte de la estrategia de clonación combinar genes que incluyen, pero no se limitan de forma exclusiva a *rapK*, *rapI*, *rapQ*, *rapM*, *rapN/O*, *rapL* y *rapJ*, y/o genes con funciones genéticas similares, en cualquier combinación de genes orden de genes posible.

5 La mencionada anteriormente permite el aumento de la expresión genética cambiando el orden de los genes en un casete de genes. Como se aplica a la clase preferente, los genes pueden comprender uno o más de *rapK*, *rapI*, *rapQ*, *rapM*, *rapN/O*, *rapL* y *rapJ* y/o genes con funciones similares, permitiendo la reorganización de los genes en una multitud de permutaciones se expone en el Ejemplo 5.

10 La estrategia de clonación que se ha expuesto en la presente invención también permite la introducción de una marca de histidina en combinación con una secuencia terminadora en la posición 3' del casete de genes para aumentar la expresión genética. Los expertos en la materia observarán que se podrían usar otras secuencias terminadoras.

15 En el presente documento también se describen los múltiples usos de secuencias promotoras en el casete de genes ensamblados para optimizar la expresión genética.

Ahora será evidente para un experto en la materia que las cepas de supresión de *S. hygroscopicus*, la supresión que comprende, pero no se limita a, se podría construir un gen o un subconjunto de los genes *rapQ*, *rapN/O*, *rapM*, *rapL*, *rapK*, *rapJ* y *rapI*. En este caso, los casetes de genes para complemento o complemento parcial por lo general comprenderían genes individuales o una pluralidad de genes seleccionados entre el subconjunto de los genes suprimidos.

20 Los expertos en la materia saben bien que existen homólogos para varios de los genes de modificación y de suministro precursor de rapamicina en los grupos de genes de sistemas muy relacionados que incluyen FK506 (Motamedi *et al.*, 1996; Motamedi *et al.*, 1997; Motamedi y Shafiee, 1998) y FK520 (Wu *et al.*, 2000). Estos incluyen los siguientes como se describe en la Tabla I que sigue a continuación:

Tabla I

Gen de rapamicina	homólogo de FK506	homólogo de FK520	'hyg'
<i>rapI</i> (Nº de Ref CAA60470)	<i>fkbM</i> (Nº de Ref AAC44360)	<i>fkbM</i> (Nº de Ref AAF86398)	
<i>rapJ</i> (Nº de Ref CAA60469)	<i>fkbD</i> (Nº de Ref AAC44359)	<i>fkbD</i> (Nº de Ref AAF86397)	
<i>rapK</i> (Ace No CAA60468)	<i>fkbO</i> (Nº de Ref AAC68817)	<i>fkbO</i> (Nº de Ref AAF86394)	<i>Orf5</i> (Nº de Ref AAC38060)
<i>rapL</i> (Nº de Ref CAA60467)	<i>fkbL</i> (Motamedi y Shafiee, 1998)	<i>fkbL</i> (Nº de Ref AAF86391)	

30 Aunque los grupos de genes de otros sistemas muy relacionados, que incluyen, pero no se limitan a aquellos para la biosíntesis de FK523, meridamicina, FK525, antascomicina y tsukubamicina todavía no se han secuenciado, se puede prever que éstos mostrarán que portan una similitud cercana a las secuencias que se han determinado, y, en particular, que estos grupos de genes contendrán homólogos cercanos de varios de los genes de modificación y de suministro precursor de rapamicina. En el presente documento también se espera que los genes de grupos de genes heterólogos de tales sistemas muy relacionados, que incluyen, pero no se limitan a FK506, FK520, FK523, antascomicina, meridamicina, FK525, 'hyg' y tsukubamicina se pueden incluir en casetes de genes en lugar de o además de sus homólogos de rapamicina para complemento y/o complemento parcial de una cepa productora de rapamicina que contiene una supresión o supresiones de genes que incluyen, pero no se limitan a, los genes *rapK*, *rapI*, *rapQ*, *rapM*, *rapN/O*, *rapL* y *rapJ*.

40 Los expertos en la materia saben bien que policétidos se pueden expresar grupos de genes en hospedadores heterólogos (Pfeifer y Khosla, 2001). Por consiguiente, la presente divulgación describe la transferencia del grupo de genes biosintéticos de rapamicina con o sin resistencia de genes reguladores, completos o que contienen supresiones, para complemento en hospedadores heterólogos. En la técnica se conocen bien métodos y directores para la transferencia como se ha definido anteriormente de tales piezas grandes de ADN (Rawlings, 2001; Staunton y Weissman, 2001) o se proporcionan el presente documento en los métodos que se desvelan. En este contexto, una cepa de células hospedadoras preferentes es una procariota, más preferentemente un actinomiceto o *Escherichia coli*, todavía más preferentemente incluyen, pero no se limitan a *S. hygroscopicus*, *S. hygroscopicus sp.*, *S. hygroscopicus var. ascomyceticus*, *Streptomyces tsukubaensis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces lividans*, *Saccharopolispora erythraea*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cinnamonensis*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseofuscus*, *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces venezuelae*, *Micromonospora griseorubida*, *Amycolatopsis mediterranei* o *Actinoplanes sp. N902-109*.

Los análogos de rapamicina de la invención se pueden obtener con un proceso que comprende las etapas de:

- a) construcción de la cepa de supresión, con los métodos de la invención, la supresión incluye, pero no se limita a, los genes *rapK*, *rapQ*, *rapN/O*, *rapM*, *rapL*, *rapJ* y *rapI*, o un subconjunto de los mismos;
- b) cultivo de la cepa en condiciones adecuadas para producción de policétidos;
- c) opcionalmente, aislamiento del producto intermedio análogo de rapamicina producido;
- d) construir una cepa de biotransformación que contiene un casete de genes que comprende todos o un subconjunto de los genes suprimidos;
- e) alimentación del producto intermedio análogo de rapamicina en sobrenadante de cultivo o aislado, en la etapa c) a un cultivo de la cepa de biotransformación en condiciones de biotransformación adecuadas
- f) opcionalmente aislamiento del análogo de rapamicina producido.

Algunas cepas hospedadoras para la construcción de la cepa de biotransformación incluyen la cepa hospedadora nativa en la que se ha suprimido el grupo de genes biosintéticos de rapamicina, o se ha suprimido o inactivado básicamente, con el fin de eliminar la síntesis de policétidos, o una cepa hospedadora heteróloga. En el documento de patente WO 01/79520 se describen métodos para la expresión de casetes de genes que comprenden uno o una pluralidad de genes de modificación o precursores en hospedadores heterólogos. En este contexto, los espectadores heterólogos adecuados para la biotransformación de dichos productos intermedios análogos de ligandos de FKBP incluyen, pero no se limitan a, *S. hygroscopicus*, *S. hygroscopicus sp.*, *S. hygroscopicus var. ascomyceticus*, *Streptomyces tsukubaensis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces lividans*, *Saccharopolispora erythraea*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cinnamomensis*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseofuscus*, *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces venezuelae*, *Micromonospora griseorubida*, *Amycolatopsis mediterranei*, *Escherichia coli* y *Actinoplanes sp. N902-109*.

La relación estructural cercana entre rapamicina y FK506, FK520, FK523, 'hyg', meridamicina, antascomicina, FK525 y tsukubamicina, entre otros, y las homologías establecidas entre genes implicados en la biosíntesis de rapamicina y FK506 y FK520 (véase lo mencionado anteriormente), hace evidente la aplicación de los métodos de la presente invención a estos sistemas relacionados muy de cerca. Por lo tanto, en el presente documento también se describe la construcción de cepas de supresión de las cepas productoras de compuestos muy relacionados, que incluyen, pero no se limitan a FK506, FK520, FK523, 'hyg', antascomicina, meridamicina, FK525 y tsukubamicina que contienen una supresión o supresiones de genes de modificación y/o genes de suministro precursores, y más particularmente incluyen, pero no se limitan a genes con funciones similares como *rapK*, *rapI*, *rapQ*, *rapM*, *rapN/O*, *rapL* y *rapJ*, y su complemento o complemento parcial con un gen o casetes de genes que comprenden todos o un subconjunto de los genes homólogos suprimidos, o sus homólogos funcionales de grupos de genes heterólogos, que incluyen, pero no se limitan a *rapK*, *rapI*, *rapQ*, *rapM*, *rapN/O*, *rapL* y *rapJ* para producir cepas recombinantes capaces de producir análogos de policétido que varían del policétido precursor en la incorporación de precursores alternativos y/o del alcance de la modificación post-PKS. Además, en el presente documento también se describe un método para producir dichos análogos de policétido por cultivo de dichas cepas hospedadoras recombinantes, y opcionalmente aísla los análogos de policétido producidos.

Además, la divulgación describe un método para la producción de células hospedadoras recombinantes capaces de producir análogos de ligando de policétido-FKBP (distintos de la rapamicina) que varían del policétido precursor en la incorporación de precursores alternativos y/o el alcance de la modificación post-PKS, que comprende la construcción de una cepa de supresión genómica a partir de la que se han retirado todos o una parte de los genes auxiliares, y su complemento parcial mediante un casete de genes que comprende una o una pluralidad de los genes suprimidos y/o sus homólogos, y además un método para producir dichos análogos de policétido por cultivo de dicha cepa hospedadora recombinante, y opcionalmente aislar los análogos de policétido producidos. En la técnica se sabe bien que en la mayoría de los casos los genes auxiliares se co-localizan con genes de policétido sintasa en un grupo de genes (Hopwood, 1997; Motamedi, y Shafiee, 1998; Wu et al., 2000) facilitando de este modo la creación de la cepa de supresión. Los genes auxiliares a suprimir pueden formar o no de forma natural una secuencia contigua, sin embargo, una vez que se ha creado la cepa de supresión, el complemento parcial mediante casetes de genes proporciona un enfoque diligente a la producción de cepas recombinantes en el que se ha suprimido uno o una pluralidad de dichos genes. Por lo tanto, la divulgación describe un método para la producción combinatoria de células hospedadoras recombinantes capaces de producir análogos de ligando de FKBP policétido (distintos de la rapamicina) que varían del policétido precursor en la incorporación de precursores alternativos y/o del alcance de la modificación post-PKS, que comprende el complemento parcial de dicha cepa de supresión genómica mediante una biblioteca combinatoria de casetes de genes que comprende una o una pluralidad de los genes suprimidos, y adicionalmente un método para producir dichos análogos de policétidos por cultivo de dichas células hospedadoras recombinantes en condiciones adecuadas para la producción de policétidos, y opcionalmente aislar los análogos de policétido producidos. En este contexto, una cepa de célula hospedadora recombinante es un procarionta, más preferentemente un actinomiceto, aún más preferentemente una cepa seleccionada entre *S. hygroscopicus*, *S. hygroscopicus sp.*, *S. hygroscopicus var. ascomyceticus*, *Streptomyces tsukubaensis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces lividans*, *Saccharopolispora erythraea*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cinnamomensis*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseofuscus*, *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces venezuelae*, *Micromonospora griseorubida*, *Amycolatopsis mediterranei* o *Actinoplanes sp. N902-109*.

Los expertos en la materia observarán que los métodos que se desvelan en el presente documento se podrían aplicar a células hospedadoras recombinantes en las que la policétido sintasa (PKS) sea alterado mediante ingeniería genética para expresar una rapamicina modificada u otro análogo de policétido. La técnica anterior describe varios métodos para la producción de nuevos policétidos mediante la supresión o inactivación de dominios individuales (documento de patente WO93/13663, documento de patente WO97/92358), construcción de policétido tasas híbridas (documento de patente WO98/01546, documento de patente WO00/00618, documento de patente WO00/01827) o alteración de especificidad de dominio mediante mutagénesis dirigida al sitio (documento de patente WO02/14482).

En la técnica se sabe bien que algunos péptidos no ribosómicos se biosintetizan mediante Péptido Sintetas No Ribosómicas (NRPS) a través de el modo en etapas de condensación de sucesivos componentes básicos de aminoácidos, en un proceso análogo al de la biosíntesis de policétidos (para una revisión véase Marahiel et al., 1997; Schwarzer y Marahiel, 2001). Se sabe bien que varios péptidos no ribosómicos incluyen de restos de aminoácidos no habituales (aminoácidos modificados, proteinogénicos y/o aminoácidos no proteinogénicos) y carboxi ácidos, los genes biosintéticos para los que se co-localizan con los genes de la péptido sintasa no ribosómica en el grupo de genes de péptidos no ribosómicos (Marahiel et al., 1997; Konz y Marahiel, 1999; Blanc et al., 1997). En varios casos, el producto peptídico no ribosómico liberado inicialmente de la NRPS se modifica adicionalmente con un conjunto de enzimas, que incluyen, pero no se limitan a glicosil transferasas, reductasas, acilación o formación de anillos heterocíclicos (Konz y Marahiel, 1999; Blanc et al., 1995). Estos incluyen los antibióticos cloroeremomicina, pristinamicina, vancomicina y bleomicina (Konz y Marahiel, 1999; Du et al., 2000). Los genes para estas enzimas post-NRPS también se colocan por lo general en el grupo de genes biosintéticos (Marahiel, et al., 1997; Schwarzer y Marahiel, 2001). Por lo tanto, en el presente documento se describe un método para la producción de análogos de péptidos no ribosómicos, quedarían del péptido no ribosómico precursor en la incorporación de aminoácidos precursores alternativos y/o el alcance de la modificación post-NRPS, que comprende la construcción de una cepa de supresión genómica a partir de la que sea retirado toda o una parte de los genes que codifican la síntesis precursora de aminoácidos nativos y/o enzimas post-NRPS, y su complemento parcial mediante un casete de genes que comprende una o una pluralidad de los genes suprimidos y/o sus homólogos, y adicionalmente un método para producir dichos análogos de péptidos no ribosómicos por cultivo de dicha cepa hospedadora recombinante, y opcionalmente aislar los análogos de péptidos no ribosómicos producidos. Los genes de biosíntesis post-NRPS y precursores a suprimir pueden formar o no de forma natural una secuencia contigua, sin embargo, una vez que se ha creado la cepa de supresión, el complemento parcial mediante casetes de genes proporciona un enfoque diligente para la producción de cepas recombinantes en las que se ha suprimido uno o una pluralidad de dichos genes. Por lo tanto, en el presente documento se describe un método para la producción combinatoria de células hospedadoras recombinantes capaz de producir análogos de péptidos no ribosómicos que varían del péptido péptidos no ribosómico precursor en la incorporación de precursores alternativos y/o el alcance de la modificación post-NRPS, que comprende el complemento parcial de dicha cepa de supresión genómica mediante una biblioteca combinatoria de casetes de genes que comprende una o una pluralidad de los genes suprimidos y adicionalmente un método para producir dichos análogos de péptidos no ribosómicos por cultivo de dichas células hospedadoras recombinantes en condiciones adecuadas para producción de péptidos no ribosómicos, y opcionalmente aislar los análogos de péptidos no ribosómicos producidos. En este contexto, una cepa de célula huésped recombinante hospedadora es un procarionota, más preferentemente un actinomiceto, aún más preferentemente una cepa seleccionada entre *S. hygrosopicus*, *S. hygrosopicus* sp., *S. hygrosopicus* var. *ascomyeticus*, *Streptomyces tsukubaensis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces lividans*, *Saccharopolispora erythraea*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cinnamomensis*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseofuscus*, *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces venezuelae*, *Micromonaspora griseorubida*, *Amycolatopsis mediterranei* o *Actinoplanes* sp. N902-109.

Se sabe bien que muchos actinomicetos contienen múltiples grupos de genes biosintéticos para diferentes metabolitos secundarios, que incluyen policétidos y péptidos sintetizados de forma no ribosómica. De forma específica, se ha demostrado que las cepas de *S. hygrosopicus* producen diversos policétidos y péptidos sintetizados de forma no ribosómica además de rapamicina, FK506, FK520, FK523, meridamicina, FK525, antascomicina y tsukubamicina. Estos incluyen, pero no se limitan a, elaiofilina, bialafos, higromicina, augustmicina; endomicina (A, B), glebomicina, higroscopina, osamicina y nigericina. Estos grupos de genes biosintéticos adicionales representan un requisito de competición por los precursores biosintéticos y una demanda metabólica adicional sobre la cepa hospedadora. Con el fin de mejorar la producción de la rapamicina deseada, u otro policétido, análogos, por lo tanto puede ser ventajoso eliminar o inactivar cualquier otro grupo de genes biosintéticos presentes en la cepa hospedadora. Los métodos para la supresión o inactivación de grupos de genes biosintéticos se conocen bien en la técnica.

En el presente documento también se describe una metodología de mutasíntesis para el complemento de cepas de supresión recombinante de cepas de *S. hygrosopicus* que contienen una supresión de *rapL* se puede alimentar con análogos del aminoácido incorporado de forma natural, el ácido L-pipecólico, para producir nuevos análogos de rapamicina en los que se sustituye el resto de pipecolilo. La técnica anterior describe que un mutante de *rapL* se puede complementar mediante la adición de ácido L-pipecólico al cultivo (Khaw et al. 1998). De forma análoga, se demostró que los análogos de rapamicina se aislaron después de la alimentación y la incorporación de análogos del ácido L-pipecólico, L-prolina, L-*trans*-4-hidroxi-prolina, L-*cis*-4-hidroxi-prolina, L-*cis*-3-hidroxi-prolina, ácido *trans*-3-aza-

biciclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico (documento de patente WO98/54308). Usando MG2-10 de *S. hygrosopicus* como cepa de fondo para expresar genes o casetes de genes que codifican etapas de modificación post-PKS que no incluyen homólogos de *rapL* o *rapL*, se genera una biblioteca de cepas de *S. hygrosopicus*, capaces de producir una pluralidad de productos modificados en la alimentación con análogos del ácido L-pipecólico. Algunos análogos del ácido L-pipecólico adecuados incluyen ácidos pipecólicos y prolinas sustituidos con alquilo, halo, hidroxilo y amino, y más particularmente L-prolina, L-*trans*-4-hidroxi-prolina, L-*cis*-4- hidroxi-prolina, L-*cis*-3-hidroxi- prolina, ácido *trans*-3-aza-biciclo[3.1.0]hexano-2-carboxílico y análogos del ácido L-pipecólico que se demuestra que catalizan el intercambio de PP-ATP medido por una modificación del método de Lipmann (Nielsen et al., 1991) que incluye L-4-hidroxi-prolina, 1-hidroxi-prolina, 2-hidroxi-prolina, 3-hidroxi-prolina, *trans*-3-metil-L-prolina, *cis*-3-metilprolina, *cis*-3-metil-DL-prolina, *cis,trans*-4-metilprolina, *cis*-4-metil-DL-prolina, *trans*-4-metil-DL-prolina, *trans*-4-aminoprolinea, *cis*-4-cloro-L-prolina, clorhidrato de 5-iminoprolinea, *cis*-5-metil-DL-prolina, ácido (+)-piperázico, ácido 5-cloropipecólico, ácido 5-hidroxi-pipecólico, ácido *cis*-4-hidroxi-L-pipecólico, ácido *trans*-4-hidroxi-D-pipecólico, 4-ácido hidroxialopipecólico, ácido tiazolidina-4-carboxílico (Nielsen et al., 1991). Este enfoque se ejemplifica en el Ejemplo 7.

La producción de un número limitado de nuevos análogos de rapamicina después de la alimentación de análogos estructurales próximos de la unidad iniciadora del ácido 4,5-dihidroxiciclohex-1-enocarboxílico natural a cultivos de *S. hygrosopicus* se ha descrito anteriormente, demostrando de este modo que el módulo de carga de la rapamicina policétido sintasa tiene una cierta flexibilidad con respecto al ácido iniciador (P.A.S. Lowden, tesis doctoral PhD, Universidad de Cambridge, 1997). Sin embargo, estos métodos conducen a la producción de una mezcla de productos. Los presentes métodos que se describen en el presente documento permiten la producción de rapamicina y análogos de ligandos de FKBP relacionados mediante la alimentación de cepas de la presente invención con análogos de la unidad iniciadora del ácido 4,5-dihidroxiciclohex-1-enocarboxílico incorporada por vía natural para producir análogos de rapamicina que incorporan unidades iniciadoras alternativas que incluyen, pero no se limitan a, ácido ciclohexano carboxílico, ácido 3-*cis*,4-*trans*-dihidroxiciclohexano carboxílico, ácido 1-ciclohexano carboxílico, ácido 3-ciclohexano carboxílico, ácido cicloheptano carboxílico, ácido 2-norbornano carboxílico, ácido 3-hidroxiciclohexano carboxílico, ácido 4-hidroxiciclohexano carboxílico, ácido 3-metilciclohexano carboxílico, 4- ácido metilciclohexano carboxílico, ácido 3-(*cis/trans*)metoxiciclohexano carboxílico, ácido 4-(*cis/trans*)metoxiciclohexano carboxílico, ácido 4-oxociclohexano carboxílico, ácido 3-fluoro-4-hidroxicarboxílico y ácido 4-fluoro-3-hidroxicarboxílico, ácido 3-ciclohexano óxido carboxílico, ácido 3,4-*cis*-dihidroxiciclohexano carboxílico, ácido 3-cloro-4-hidroxicarboxílico y ácido 4-cloro-3-hidroxicarboxílico (y el par de diastereómeros opuestos), ácido ciclohexilpropiónico, ácido 4-*terc*-butilciclohexano carboxílico y ésteres simples y sales de los mismos. Este enfoque se ejemplifica en los Ejemplos 8, 19 y 20.

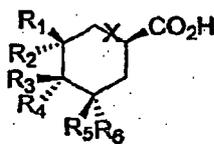
Además, se pueden alimentar análogos estructurales de precursores biosintéticos de la unidad iniciadora de ácido 4,5-dihidroxiciclohex-1-enocarboxílico (Lowden et al., 2001), lo que conduce la producción de nuevos análogos de rapamicina que incorporan unidades iniciadoras alternativas.

Sin embargo, estos métodos pueden conducir a la producción de grupos de productos mixtos; por lo tanto, en el presente documento se describe un método para eliminar la competición entre la unidad iniciadora producida de forma endógena y los análogos de ácido iniciador alternativo que se alimentan para mejorar la eficacia de la producción de los nuevos análogos de rapamicina.

Para retirar la competición entre la unidad iniciadora natural producida de forma endógena y los análogos del ácido iniciador alternativo alimentados, es preferente interrumpir la biosíntesis de la unidad iniciadora del ácido 4,5-dihidroxiciclohex-1-enocarboxílico natural. Esto se puede conseguir mediante la supresión o inactivación de uno o más de dos genes implicados en la biosíntesis de la unidad iniciadora del ácido 4,5-dihidroxiciclohex-1-enocarboxílico natural del ácido shikímico (Lowden et al., 2001) o la biosíntesis del ácido shikímico en sí mismo. En el último caso, puede ser necesario complementar cultivos con aminoácidos aromáticos (fenilo alanina, tirosina, triptófano). Como alternativa, la producción endógena de la unidad iniciadora de ácido 4,5-dihidroxiciclohex-1-eno carboxílico natural se puede suprimir mediante la adición de un inhibidor químico de la biosíntesis del ácido shikímico. Tales inhibidores se conocen bien en la bibliografía.

En un aspecto adicional, la invención hacer uso del descubrimiento sorprendente de que *rapK* está implicada en el suministro del precursor o precursores biosintéticos, por ejemplo la unidad iniciadora ácido 4,5-dihidroxiciclohex-1-eno carboxílico de la rapamicina y por lo tanto esa supresión o inactivación de *rapK* o un homólogo de *rapK* proporciona una cepa que carece de competición entre la unidad iniciadora natural y las unidades iniciadoras no naturales. En el presente documento se describe un método para la incorporación eficaz de ácidos alimentados que incluyen, pero no se limitan a los que se describen a continuación.

Por lo tanto, el método que se describe en la invención puede comprender unidades iniciadoras de alimentación de fórmula



5 en la que X = enlace o CH₂ y R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ pueden ser iguales o diferentes y pueden ser independientemente Cl, F, OH, SH, H, alquilo, CN, Br, R₇, OR⁷, C(O)R₇ o HNR₇ en el que R₇ es un alquilo C₁-C₄; R₁ y R₃, R₂ y R₄, R₃ y R₅, R₄ y R₆, R₁ y R₅, o R₂ y R₆ se pueden unir como cualquiera de un enlace metileno sustituido o sin sustituir, un enlace éter, un enlace tia o un enlace amino, R₁ y R₂, R₃ y R₄ o R₅ y R₆ se pueden tomar en conjunto como una cetona; con la condición de que no más de 4 de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ pueden ser Cl; no más de 2 de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ pueden ser HNR₇; no más de 2 de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ pueden ser SH y ambos grupos R de un carbono en el anillo no son OH.

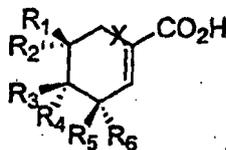
10 Preferentemente, la unidad iniciadora no se selecciona entre el grupo que consiste en: ácido ciclohexano carboxílico, ácido 3-*cis*,4-*trans*-dihidroxiclohexano carboxílico, ácido cicloheptano carboxílico y ácido 3-(*cis/trans*)-metiliclohexano carboxílico.

15 Preferentemente: cuando R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son una combinación de sustitución de F y OH no más de 3 de R₁₋₆ están sustituidos y el resto son H. Cuando R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son una combinación de sustitución de Cl y OH no más de 3 de R₁₋₆ están sustituidos y el resto son H. Cuando cualesquiera dos de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son OH y cualesquiera dos grupos R restantes son F en un carbono en el resto son H. Cuando dos de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son Cl el resto son H. Cuando dos de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son Cl, que no se originan en el mismo carbono, y un R adicional es OH el resto son H. Cuando uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es alquilo y el resto son H; el grupo alquilo tendrá una longitud lineal no superior a 3 carbonos. Cuando uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es NHR₇ el resto son H.

20 Más preferentemente: cuando dos de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son OH y un tercer grupo R es F, el resto son H. Cuando dos de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son F el resto son H. Cuando dos de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son OH el resto son H. Cuando dos de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son OH y un tercer grupo R es Cl el resto son H. Cuando dos de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son F, y un tercer grupo R es OH el resto son H. Cuando uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es SH el resto son H. Cuando uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es SH y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H.

25 Incluso más preferentemente: cuando uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es F el resto son H. Cuando R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son Cl el resto son H. Cuando uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆, son F y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H. Cuando uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es Cl y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H. Cuando uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es alquilo y el resto son H; el grupo alquilo no contendrá más de 4 carbonos y tendrá una longitud lineal no superior a 3 carbonos. Cuando uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es alquilo y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) y el resto son H; el grupo alquilo no contendrá más de 4 carbonos y tendrá una longitud lineal no superior a 3 carbonos.

30 Los métodos que se describen en el presente documento pueden comprender unidades iniciadoras de alimentación de fórmula



35 en la que X = enlace o CH₂ y R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ pueden ser iguales o diferentes y pueden ser independientemente Cl, F, OH, SH, H, alquilo, CN, Br, R₇, OR⁷, C(O)R₇ o NHR₇ en el que R₇ es un alquilo C₁-C₄; R₁ y R₃, R₂ y R₄, R₃ y R₅, R₄ y R₆, R₁ y R₅, o R₂ y R₆ se pueden unir como cualquiera de un enlace metileno sustituido o sin sustituir, un enlace éter, un enlace tia o un enlace amino, R₁ y R₂, R₃ y R₄ o R₅ y R₆ se pueden tomar en conjunto como una cetona; con la condición de que no más de 4 de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ pueden ser Cl; no más de 2 de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ pueden ser HNR₇; no más de 2 de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ pueden ser SH y ambos grupos R de un carbono en el anillo no son OH.

40 Preferentemente, la unidad iniciadora no se selecciona entre el grupo que consiste en: ácido 1-ciclohexeno carboxílico y ácido 1-ciclohepteno carboxílico

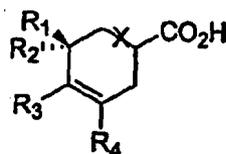
55 Preferentemente: cuando R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son una combinación de sustitución de F y OH no más de 3 de R₁₋₆ están sustituidos y el resto son H. Cuando R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son una combinación de sustitución de Cl y OH no

más de 3 de R₁₋₆ están sustituidos y el resto son H. Cuando cualesquiera dos de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son OH y dos de los grupos R restantes son F en el mismo carbono el resto son H. Cuando dos de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son Cl el resto son H. Cuando dos de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son Cl, que no se originan en el mismo carbono, y un grupo R adicional es OH el resto son H. Cuando uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es alquilo y el resto son H; el grupo alquilo tendrá una longitud lineal no superior a 3 carbonos. Cuando uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es NHR₇ el resto son H.

Más preferentemente: cuando dos de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son OH y un tercer grupo R es F, el resto son H. Cuando dos de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son F el resto son H. Cuando dos de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son OH el resto son H. Cuando dos de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son OH y un tercer grupo R es Cl el resto son H. Cuando dos de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son F, y un tercer grupo R es OH el resto son H. Cuando uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es SH el resto son H. Cuando uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es SH y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H.

Incluso más preferentemente: cuando uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es F el resto son H. Cuando uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ son Cl el resto son H. Cuando uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆, son F y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H. Cuando uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es Cl, un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H. Cuando uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es alquilo y el resto son H; el grupo alquilo no contendrá más de 4 carbonos y tendrá una longitud lineal no superior a 3 carbonos. Cuando uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ es alquilo y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H; y el grupo alquilo no contendrá más de 4 carbonos y tendrá una longitud lineal no superior a 3 carbonos.

Los métodos que se describen en el presente documento pueden comprender unidades iniciadoras de alimentación de fórmula:



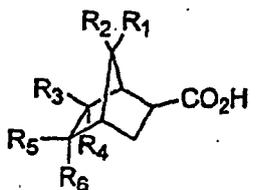
en la que X = enlace o CH₂, R₁ y R₂, pueden ser iguales o diferentes y pueden ser independientemente F, Cl, OH, SH, H, CN, OR₇, C(O)R₇, o NHR₇ en el que R₇ es un alquilo C₁₋₄; R₁ y R₂ también se pueden tomar en conjunto para formar una cetona, un grupo espirociclopropilo o con -OCH₂-, -CH₂O-, -SCH₂- o -CH₂S-; además R₃, y R₄ pueden ser iguales o diferentes y pueden ser independientemente F, Cl, Br, OR₇, H o CN; con la condición de que ambos grupos R de un carbono en el anillo no son OH.

Preferentemente la unidad iniciadora no será el ácido 5-cis-hidroxi-3-ciclohexeno carboxílico.

Preferentemente: Cuando dos de R₁, R₂, R₃, o R₄ son F el resto son H. Cuando uno de R₁, R₂, R₃, o R₄ es Cl el resto son H. Cuando uno de R₃, o R₄ es F y uno de R₁ o R₂ es OH el resto son H. Cuando uno de R₃ o R₄ es Cl y uno de R₁ o R₂ es OH el resto son H. Cuando uno de R₁ o R₂ es SH el resto son H. Cuando uno de R₁, R₂, R₃, o R₄ es alquilo y el resto son H; el grupo alquilo no contendrá más de 4 carbonos y tendrá una longitud lineal no superior a 3 carbonos. Cuando uno de R₃ o R₄ es alquilo y R₁ o R₂ es OH el resto son H; y el grupo alquilo no contendrá más de 4 carbonos y tendrá una longitud lineal no superior a 3 carbonos.

Más preferentemente: cuando uno de R₁, R₂, R₃, o R₄ es F el resto son H. Cuando uno de R₁, R₂, R₃, o R₄ es Cl el resto son H.

Los métodos que se describen en el presente documento pueden comprender unidades iniciadoras de alimentación de fórmula

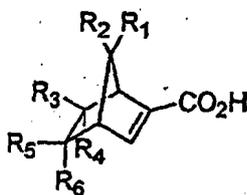


en la que R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ o R₆ pueden ser iguales o diferentes y pueden ser independientemente Cl, F, OH, SH, H, alquilo, CN, Br, R₇, OR₇, C(O)R₇ o NHR₇ en el que R₇ es un alquilo C₁₋₄; R₁ y R₃, R₂ y R₄, R₃ y R₅, R₄ y R₆, R₁ y R₅, o R₂ y R₆ se pueden unir como cualquiera de un enlace metileno sustituido o sin sustituir, un enlace éter, un enlace tia o un enlace amino, R₃ y R₄ o R₅ y R₆ se pueden tomar en conjunto como una cetona; con la condición de que ambos grupos R de un carbono en el anillo no son OH.

Preferentemente: Cuando dos de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 son F el resto son H. Cuando dos de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 son OH, el resto son H. Cuando dos de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 son OH, y un tercer grupo R es F el resto son H. Cuando dos de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 son OH, y un tercer grupo R es Cl el resto son H. Cuando dos de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 son F y un tercer grupo R es OH el resto son H. Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 es Br el resto son H. Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 es Br y un segundo grupo R es OH el resto son H.

Más preferentemente: Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 es F el resto son H. Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 son Cl el resto son H. Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 es F y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H. Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 es Cl y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H. Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 es SH el resto son H. Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 es SH y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H. Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 es alquilo y el resto son H; el grupo alquilo no contendrá más de 4 carbonos y tendrá una longitud lineal no superior a 3 carbonos. Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 alquilo y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H; y el grupo alquilo no contendrá más de 4 carbonos y tendrá una longitud lineal no superior a 3 carbonos.

Los métodos que se describen en el presente documento pueden comprender unidades iniciadoras de alimentación de fórmula



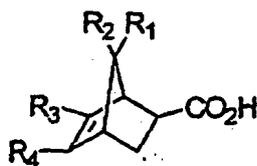
en la que R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 pueden ser iguales o diferentes y pueden ser independientemente de Cl, F, OH, SH, H, alquilo, CN; Br, $R_1, OR_7, C(O)R_7$ o NHR_7 en el que R_7 es un alquilo C₁-C₄; R_1 y R_3, R_2 y R_4, R_3 y R_5, R_4 y R_6, R_1 y R_5, R_2 y R_6 se pueden unir como cualquiera de un enlace metileno sustituido o sin sustituir, un enlace éter, un enlace tía o un enlace amino, R_3 y R_4 o R_5 y R_6 se pueden tomar en conjunto como una cetona; con la condición de que ambos grupos R de un carbono en el anillo no son OH.

Preferentemente: cuando R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 son una combinación de sustitución de F y OH no más de 3 de R_{1-6} están sustituidos y el resto son H. Cuando R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 son una combinación de sustitución de Cl y OH no más de 3 de R_{1-6} están sustituidos y el resto son H. Cuando dos de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 son OH y dos de los grupos R restantes son F en un carbono el resto son H. Cuando dos de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 son Cl el resto son H. Cuando dos de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 son Cl (que no se origina en el mismo carbono) y un tercer grupo R es OH, el resto son H. Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 es alquilo y el resto son H; el grupo alquilo tendrá una longitud lineal no superior a 3 carbonos. Cuando dos de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 son SH el resto son H. Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 es HNR_7 el resto son H.

Más preferentemente: Cuando dos de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 son F el resto son H. Cuando dos de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 son OH el resto son H. Cuando dos de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 son OH y un tercer grupo R es F, el resto son H. Cuando dos de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 son OH y un tercer grupo R es Cl el resto son H. Cuando dos de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 son F, y un tercer grupo R es OH el resto son H. Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 es Br el resto son H. Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 es Br y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H. Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 es SH el resto son H. Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 es SH y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H.

Incluso más preferentemente: Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 es F el resto son H. Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 es Cl el resto son H. Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 es F y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H. Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 es Cl y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H. Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 es alquilo y el resto son H; el grupo alquilo no contendrá más de 4 carbonos y tendrá una longitud lineal no superior a 3 carbonos. Cuando uno de R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 o R_6 es alquilo y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H; y el grupo alquilo no contendrá más de 4 carbonos y tendrá una longitud lineal no superior a 3 carbonos.

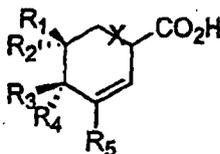
Los métodos que se describen en el presente documento pueden comprender unidades iniciadoras de alimentación de fórmula



5 en la que R_1 y R_2 , pueden ser iguales o diferentes y pueden ser independientemente F, Cl, OH, SH, H, CN, OR_7 , $C(O)R_7$, o NHR_7 en el que R_7 es un alquilo C_1-C_4 , R_1 y R_2 también se pueden tomar en conjunto para formar una cetona, un grupo espirociclopropilo o con $-OCH_2-$, $-CH_2O-$, $-SCH_2-$ o $-CH_2S-$; además R_3 , y R_4 pueden ser iguales o diferentes y pueden ser independientemente F, Cl, Br, OR_7 , H o CN; con la condición de que ambos grupos R de un carbono en el anillo no son OH.

10 Preferentemente: Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 y R_4 es F el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 y R_4 es Cl el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 y R_4 es F y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 y R_4 es Cl y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 y R_4 es SH el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 y R_4 es alquilo el resto son H; y el grupo alquilo no contendrá más de 4 carbonos y tendrá una longitud lineal no superior a 3 carbonos. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 y R_4 es alquilo y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H; y el grupo alquilo no contendrá más de 4 carbonos y tendrá una longitud lineal no superior a 3 carbonos. Cuando dos de R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son F el resto son H.

20 Los métodos que se describen en el presente documento pueden comprender unidades iniciadoras de alimentación de fórmula

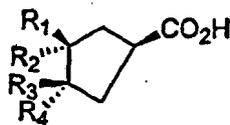


25 en la que $X =$ enlace o CH_2 ; y R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 pueden ser iguales o diferentes y pueden ser independientemente Cl, F, OH, SH, H, alquilo, CN, Br, R_7 , OR_7 , $C(O)R_7$ o NHR_7 en el que R_7 es un alquilo C_1-C_4 , R_1 y R_3 , R_2 y R_4 , se pueden tomar en conjunto como una cetona o unir como cualquiera de un enlace metileno sustituido o sin sustituir, un enlace éter, un enlace tía o un enlace amino en la que R_1 y R_2 o R_3 y R_4 están unidos como un grupo espirociclopropilo o con $-OCH_2-$ o $-CH_2O-$ o $-SCH_2-$ o $-CH_2S-$, R_5 puede ser F, Cl, OR_7 , H o CN; con la condición de que no más de dos de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son SH y que ambos grupos R unidos a un carbono no son OH.

30 Preferentemente: cuando R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son una combinación de F y OH no más de 3 de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 están sustituidos y el resto son H. Cuando R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son una combinación de Cl y OH no más de 3 de R_{1-5} están sustituidos y el resto son H. Cuando R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son una combinación de dos son OH (no en el mismo carbono) y dos son F en un carbono en el resto son H. Cuando dos de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son Cl el resto son H. Cuando dos de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son Cl (que no se origina en el mismo carbono) y un tercer grupo R es OH el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es alquilo el resto son H; y el grupo alquilo tendrá una longitud lineal no superior a 3 carbonos. Cuando dos de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son SH el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es NHR_7 el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es SH el resto son H.

40 Más preferentemente: cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es OH el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es F el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es Cl el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es F y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es Cl y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es SH y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es alquilo el resto son H; y el grupo alquilo no contendrá más de 4 carbonos y tendrá una longitud lineal no superior a 3 carbonos. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 es alquilo y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H; y el grupo alquilo no contendrá más de 4 carbonos y tendrá una longitud lineal no superior a 3 carbonos. Cuando dos de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son F el resto son H. Cuando dos de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son OH el resto son H. Cuando dos de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son OH y un tercer grupo R es F el resto son H. Cuando dos de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son OH y un tercer grupo R_5 es Cl el resto son H. Cuando dos de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 son F y un tercer grupo R es OH el resto son H.

50 Los métodos que se describen en el presente documento pueden comprender unidades iniciadoras de alimentación de fórmula



en la que R_1 , R_2 , R_3 y R_4 pueden ser iguales o diferentes y pueden ser independientemente Cl, F, OH, SH, H, alquilo, CN, Br, R_7 , OR_7 , $C(O)R_7$ o NHR_7 en el que R_7 es un alquilo C_1 - C_4 , R_1 y R_2 o R_3 y R_4 se pueden tomar en conjunto para formar una cetona, con la condición de que dos grupos R unidos al mismo carbono no son ambos OH.

Preferentemente: Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 es F el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 es Cl el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 es Br el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 es OH el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 es F y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 es Cl y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 es SH el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 es un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 es alquilo el resto son H; y el grupo alquilo no contendrá más de 4 carbonos y tendrá una longitud lineal no superior a 3 carbonos. Cuando uno de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 es alquilo y un segundo grupo R es OH (que no se origina en el mismo carbono) el resto son H; y el grupo alquilo no contendrá más de 4 carbonos y tendrá una longitud lineal no superior a 3 carbonos. Cuando dos de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 son F el resto son H. Cuando dos de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 son OH el resto son H. Cuando dos de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 son OH y un tercer grupo R es F el resto son H. Cuando dos de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 son OH y un tercer grupo R es Cl el resto son H. Cuando dos de R_1 , R_2 , R_3 o R_4 son F y un tercer grupo R es OH el resto son H.

En el presente documento se describe adicionalmente un método para la incorporación eficaz de: ácido 2-norbornano carboxílico; ácido 2-(*cis/trans*)-hidroxíciclohexano carboxílico; ácido 3-(*cis/trans*)-hidroxíciclohexano carboxílico; ácido 4-(*cis/trans*)-hidroxíciclohexano carboxílico; ácido 2-(*cis/trans*)-metilciclohexano carboxílico; ácido 4-(*cis/trans*)-metilciclohexano carboxílico; ácido 3-(*cis/trans*)-metoxíciclohexano carboxílico; ácido 4-(*cis/trans*)-metoxíciclohexano carboxílico; ácido 4-oxociclohexano carboxílico; ácido etil 2-oxociclohexano carboxílico; ácido 4-*trans*-n-pentilciclohexano carboxílico; ácido 2-*trans*-aminociclohexano carboxílico; ácido 4-*cis*-aminociclohexano carboxílico; ácido 4-(*cis/trans*)-aminometilciclohexano carboxílico; ácido ciclopentano carboxílico; ácido ciclobutano carboxílico; ácido 1-metilciclohexano carboxílico; ácido 3-*trans*-hidroxi-4-*cis*-fluorociclohexano carboxílico y ácido 4-*trans*-hidroxi-3-*cis*-fluorociclohexano carboxílico; ácido 3-*cis*-hidroxi-4-*trans*-fluorociclohexano carboxílico y ácido 4-*cis*-hidroxi-3-*trans*-fluorociclohexano carboxílico; ácido 3-*cis*-hidroxi-4-*trans*-clorociclohexano carboxílico y ácido 4-*cis*-hidroxi-3-*trans*-clorociclohexano carboxílico; ácido 3-*trans*-hidroxi-4-*cis*-clorociclohexano carboxílico y ácido 4-*trans*-hidroxi-3-*cis*-clorociclohexano carboxílico; ácido 3-*trans*-ciclohexenoóxido carboxílico; ácido 3-*cis*-ciclohexenoóxido carboxílico; ácido 3,4-*cis*-dihidroxíciclohexano carboxílico y ácido 3,4-*trans*-dihidroxíciclohexano carboxílico; ácido ciclohexanoacético; ácido ciclohexanopropiónico o ácido 4-*cis/trans*-terc-butilciclohexano carboxílico o ésteres simples o sales de los mismos en análogos de ligando de FKBP mediante una cepa con *rapK* o un *homólogo de rapK* suprimido o inactivado. En una realización más preferente la presente invención proporciona un método para la incorporación eficaz de: ácido 3-(*cis/trans*)-hidroxíciclohexano carboxílico; ácido 4-(*cis/trans*)-hidroxíciclohexano carboxílico; ácido 3-(*cis/trans*)-metoxíciclohexano carboxílico; ácido 4-(*cis/trans*)-metoxíciclohexano carboxílico; ácido 4-oxociclohexano carboxílico; ácido ciclobutano carboxílico; ácido 3-*trans*-hidroxi-4-*cis*-fluorociclohexano carboxílico y ácido 4-*trans*-hidroxi-3-*cis*-fluorociclohexano carboxílico; ácido 3-*cis*-hidroxi-4-*trans*-fluorociclohexano carboxílico y ácido 4-*cis*-hidroxi-3-*trans*-fluorociclohexano carboxílico; ácido 3-*cis*-hidroxi-4-*trans*-clorociclohexano carboxílico y ácido 4-*cis*-hidroxi-3-*trans*-clorociclohexano carboxílico; ácido 3-*trans*-hidroxi-4-*cis*-clorociclohexano carboxílico y ácido 4-*trans*-hidroxi-3-*cis*-clorociclohexano carboxílico; ácido 3-*trans*-ciclohexenoóxido carboxílico; ácido 3-*cis*-ciclohexenoóxido carboxílico; ácido 3,4-*cis*-dihidroxíciclohexano carboxílico y ácido 3,4-*trans*-dihidroxíciclohexano carboxílico; ácido ciclohexanopropiónico; ácido 4-*cis/trans*-terc-butilciclohexano carboxílico o ésteres simples o sales de los mismos en análogos de ligando de FKBP mediante una cepa con *rapK* o un *homólogo de rapK* suprimido o inactivado.

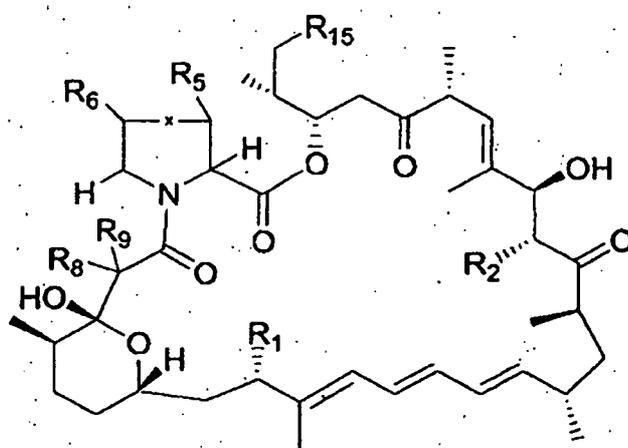
Preferentemente en los métodos que se describen en el presente documento, las unidades iniciadoras alimentadas no son: ácido ciclohexano carboxílico, ácido 3-*cis*,4-*trans*-dihidroxíciclohexano carboxílico, ácido 1-ciclohexeno carboxílico, ácido 3-ciclohexano carboxílico, ácido cicloheptano carboxílico, ácido 3-(*cis/trans*)-metilciclohexano carboxílico, ácido 4-(*cis/trans*)-metilciclohexano carboxílico, 1-ácido cicloheptano carboxílico o ácido 5-*cis*-hidroxil-3-ciclohexeno carboxílico.

Las cepas para uso en los métodos descritos anteriormente se seleccionan entre el grupo que comprende: *Streptomyces hygrosopicus subsp. hygrosopicus* NRRL 5491, *Actinoplanes sp.* N902-109 FERM BP-3832, *Streptomyces sp.* AA6554, *Streptomyces hygrosopicus var. ascomyceticus* MA 6475 ATCC 14891, *Streptomyces hygrosopicus var. ascomyceticus* MA 6678 ATCC 55087, *Streptomyces hygrosopicus var. ascomyceticus* MA 6674, *Streptomyces hygrosopicus var. ascomyceticus* ATCC 55276, *Streptomyces hygrosopicus subsp. ascomyceticus* ATCC 14891, *Streptomyces tsukubaensis* N° 9993 FERM BP-927, *Streptomyces hygrosopicus subsp. yakushimaensis*, *Streptomyces sp.* DSM 4137, *Streptomyces sp.* DSM 7348, *Micromonospora n.sp.* A92-306401 DSM 8429, *Streptomyces sp.* MA 6858 ATCC 55098, *Streptomyces sp.* MA 6848. En una realización

preferente dicha cepa se selecciona entre el grupo que consiste en: *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NRRL 5491, *Actinoplanes* sp. N902-109 FERM BP-3832, *Streptomyces* sp. AA6554, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6475 ATCC 14891, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6678 ATCC 55087, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* MA 6674, *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* ATCC 55276, *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *ascomyceticus* ATCC 14891, *Streptomyces tsukubaenses* N° 9993 FERM BP-927, *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *yakushimaensis*, *Streptomyces* sp. DSM 4137, *Streptomyces* sp. DSM 7348, *Micromonospora* n.sp. A92-306401 DSM 8429 o *Streptomyces* sp. MA 6858 ATCC 55098. En una realización más altamente preferente la cepa es la productora de rapamicina S. *hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus*.

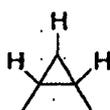
En los métodos para la incorporación eficaz de ácidos carboxílicos alimentados que se han descrito anteriormente los compuestos producidos son análogos de los ligandos de FKBP como se describe en el presente documento, por ejemplo pero no se limitan a: rapamicina, FK523, FK525, antascomicina, meridamicina y tsukubamicina. Los compuestos producidos son análogos de rapamicina. Como alternativa, los compuestos producidos son análogos de rapamicina; estos compuestos corresponden a la Fórmula II o la Fórmula III como se describe a continuación.

En una realización de la presente invención, los compuestos producidos son análogos de rapamicina de fórmula:

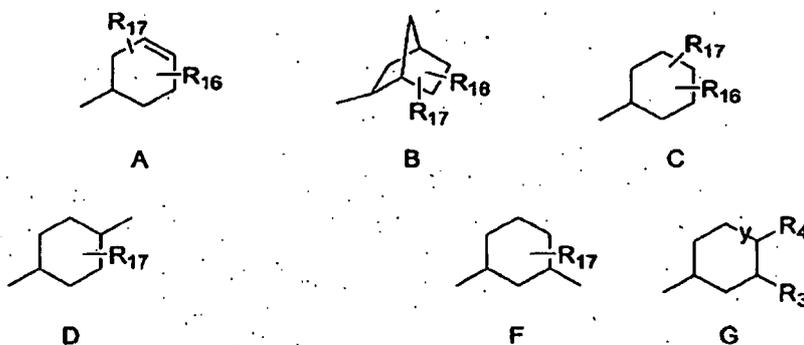


en la que

x = enlace o CH₂, o -CHR₆-x-CHR₅- es



R₁₅ =

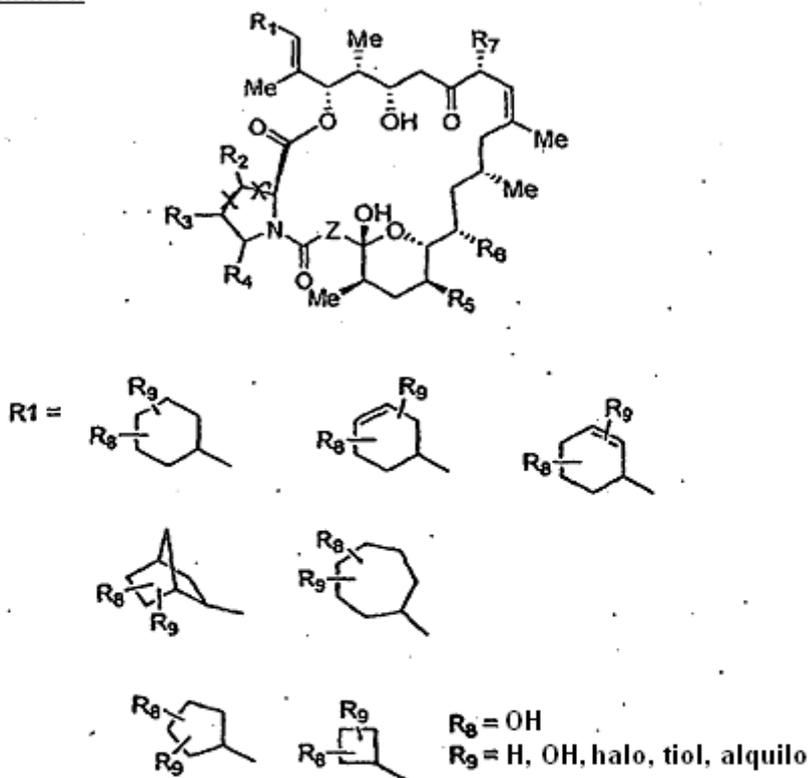


R₁ = OH, OCH₃
 R₂ = H, OH, OCH₃
 R₃ = F, Cl y R₄ = H, OH, CH₃, F, Cl; o
 R₄ = F, Cl y R₃ = H, OH, CH₃, F, Cl, OCH₃; R₁₆ = OH, OCH₃
 R₁₇ = Cl, F

R₅ = H, OH
 R₆ = H, OH
 R₈ y R₉ en conjunto son =O o H,H; e
 y = enlace, CH₂.

5 Además, los métodos descritos anteriormente se pueden usar para generar nuevos análogos de FK506 y FK520 que corresponden a la Fórmula I que sigue a continuación.

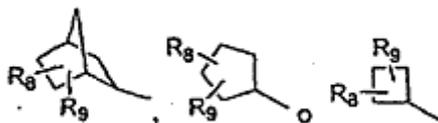
Fórmula I:



R₂ = H, alquilo, halo, hidroxilo, tior
 R₃ = H, alquilo, halo, hidroxilo, tior
 R₄ = H, alquilo, halo, hidroxilo, tior
 R₅ = OMe, Me o H
 R₆ = OMe, Me o H

10 R₇ = CH₂CH₃ o CH₂CH=CH₂
 Z = ceto o CH₂
 X = X' = enlace; X = enlace y X' = CH₂, S, O o X = CH₂, S, O, unidad de ciclopropilo condensado y X' = enlace

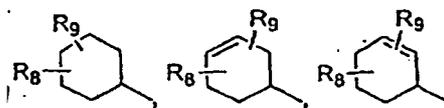
15 Por ejemplo, R₁ =



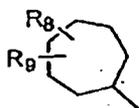
en los que R₈ = OH y R₉ = H, OH, halo, alquilo o tior.

20

En otro ejemplo R₁ es



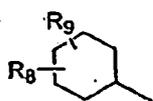
5 o



en los que R₈ = OH y R₉ = halo.

FK520 =

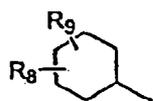
10



en el que R₈ = 4-*trans*-OH, R₉ = 3-*cis*-OCH₃, y R₂ = R₃ = R₄ = H, X = CH₂, X' = enlace, Z = ceto, R₅ = R₈ = OCH₃ y R₇ = CH₂CH₃

15

FK506 =



20

en el que R₈ = 4-*trans*-OH, R₉ = 3-*cis*-OCH₃, y R₂ = R₃ = R₄ = H, X = CH₂, X' = enlace, Z = ceto, R₅ = R₆ = OCH₃ y R₇ = CH₂CH=CH₂.

25 Por lo tanto, por ejemplo, la cepa recombinante MG2-10 de *S. hygrosopicus* se puede cultivar en presencia de ácido ciclohexano carboxílico para producir 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina (Ejemplo 12). Un experto en la materia puede observar que homólogos de *rapK* en otros grupos biosintéticos que codifican ligandos de FKBP, que incluyen, pero no se limitan a, FK523, FK525, meridamicina, tsukubamicina, antascomicina y 'hyg' también se pueden suprimir o inactiva permitiendo una alimentación eficaz de unidades iniciadoras de ácidos carboxílicos que conduce a la protección de nuevos análogos.

30 Por ejemplo, se pueden alimentar cepas de *S. hygrosopicus* (incluyendo *rapL* u homólogos de *rapL* o que no incluyen *rapL* u homólogos de *rapL* y/o que incluyen *rapK* u homólogos de *rapK* o que no incluyen *rapK* u homólogos de *rapK*) con análogos del ácido L-pipecólico, como se ha descrito anteriormente, en combinación con análogos de la unidad iniciadora de ácido 4,5-dihidroxiclohex-1-enocarboxílico natural, como se ha descrito anteriormente, para producir análogos de rapamicina en los que se han reemplazado tanto la unidad iniciadora como el resto de pipecolilo. Este enfoque se ejemplifica en los Ejemplos 10, 11 y 12.

35 En el presente documento se describe un proceso para producir análogos de ligando de FKBP quedarían en el alcance de la modificación post-PKS y/o en los que el resto de ácido pipecólico se ha sustituido, y opcionalmente el resto de ácido 4,5-dihidroxiclohex-1-enocarboxílico iniciador se ha sustituido. Este proceso comprende la etapa de suprimir o inactivar uno o más genes en la célula hospedadora del microorganismo implicado en la producción de del compuesto precursor, ácido L-pipecólico y/o ácido 4,5-dihidroxiclohex-1-eno carboxílico, necesarios para la biosíntesis del molde de rapamicina policétido/NRPS y/o en su posterior modificación post-PKS, para suprimir de este modo la producción del producto natural. El proceso comprende adicionalmente la transformación de las células hospedadoras el microorganismo con genes que codifican policétido que codifica ácido nucleico para restablecer la producción de policétido, cultivar las células hospedadoras transformadas en condiciones adecuadas para producción de policétido y opcionalmente aislar los análogos de rapamicina producidos.

40 La presente divulgación describe un proceso para la producción de análogos de ligando de FKBP que incluyen, pero no se limitan a FK523, FK525, tsukubamicina, antascomicina, meridamicina e 'hyg', que varían en el alcance de la modificación post-PKS y/o en los que el resto de aminoácidos se ha sustituido, y opcionalmente la unidad iniciadora se ha sustituido. Este proceso comprende la etapa de suprimir o inactivar uno o más genes en la célula hospedadora del microorganismo implicados en la producción del resto de aminoácido precursor y/o unidad iniciadora, necesarios para la biosíntesis del molde de policétido/NRPS y/o en su modificación post-PKS posterior, para suprimir de este

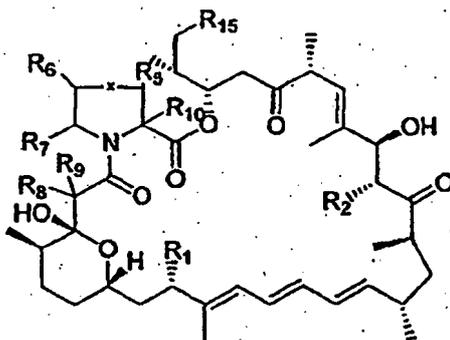
modo la producción del producto natural. El proceso comprende adicionalmente la transformación de las células hospedadoras del microorganismo con genes que modifican policétidos que codifican ácidos nucleicos para restablecer la producción de policétido, cultivo de las células hospedadoras transformadas en condiciones adecuadas para la producción de policétidos y opcionalmente aislar los análogos de policétido producidos.

5

La presente divulgación describe nuevos análogos de ligando de FKBP.

En el presente documento se describen adicionalmente:

10 A: Compuestos de fórmula:



en la que

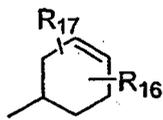
15

x = enlace o CHR₁₁, o -CHR₆-x-CHR₅- es



20

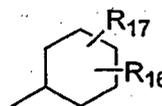
R₁₅ =



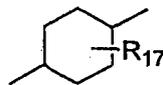
A



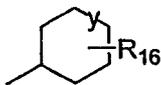
B



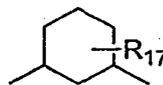
C



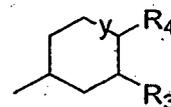
D



E



F



G

25

R₁ = OH, OCH₃
 R₂ = H, OH, OCH₃
 R₃ = H, OH, CH₃, F, Cl, OCH₃
 R₄ = H, OH, CH₃, F, Cl
 R₅ = H, OH
 R₆ = H, OH
 R₇ = H
 R₈ = H, ceto
 R₉ = H, ceto
 R₁₀ = H
 R₁₁ = H
 R₁₃ = H
 R₁₄ = H
 R₁₆ = OH, OCH₃
 R₁₇ = H, OH, Cl, F e
 y = enlace, CH₂

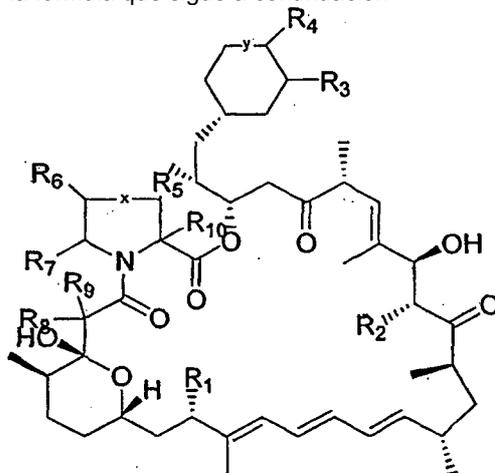
30

35

40

combinación con $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{H}$, $R_5 = \text{H}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{H}$, $R_{11} = \text{H}$, $x = \text{CHR}_{11}$, $R_8, R_9 = \text{ceto}$, $R_{10} = \text{H}$

B. Compuestos de acuerdo con la fórmula que sigue a continuación



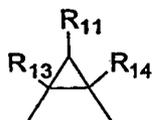
5

en la que

- $R_1 = \text{OH}, \text{OCH}_3$
 $R_2 = \text{H}, \text{OH}, \text{OCH}_3$
 $R_3 = \text{H}, \text{OH}, \text{CH}_3, \text{OCH}_3$
 $R_4 = \text{H}, \text{OH}$
 $R_5 = \text{H}$
 $R_6 = \text{H}, \text{OH}$
 $R_7 = \text{H}$
 $R_8 = \text{H}, \text{ceto}$
 $R_9 = \text{H}, \text{ceto}$
 $R_{10} = \text{H}$
 $x = \text{enlace}, \text{CH}_2 \text{ o } -\text{CHR}_6-x-\text{CHR}_5-$ es

10

15



20

- $R_{11} = \text{H}$
 $R_{13} = \text{H}$
 $R_{14} = \text{H}$
 $y = \text{enlace}, \text{CH}_2$

25

con la condición de que los compuestos no incluyen los siguientes:

- i) en la que $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{trans-OH}$, $y = \text{enlace}$, en combinación con $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OCH}_3$, $R_5 = \text{H}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{H}$, $x = \text{CH}_2$, $R_8, R_9 = \text{ceto}$, $R_{10} = \text{H}$
 ii) en la que $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OH}$, $y = \text{CH}_2$ en combinación con $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OCH}_3$, $R_5 = \text{H}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{H}$, $x = \text{CH}_2$, $R_8, R_9 = \text{ceto}$, $R_{10} = \text{H}$
 iii) en la que $R_3 = \text{cis-OH}$, $R_4 = \text{H}$, $y = \text{enlace}$, en combinación con $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OCH}_3$, $R_5 = \text{H}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{H}$, $x = \text{CH}_2$, $R_8, R_9 = \text{ceto}$, $R_{10} = \text{H}$
 iv) en la que $R_3 = \text{CH}_3$, $R_4 = \text{OH}$, $y = \text{enlace}$, en combinación con $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OCH}_3$, $R_5 = \text{H}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{H}$, $x = \text{CH}_2$, $R_8, R_9 = \text{ceto}$, $R_{10} = \text{H}$
 v) en la que $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OH}$, $y = \text{CH}_2$, en combinación con $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_5 = \text{H}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{H}$, $x = \text{CH}_2$, $R_8 = R_9 = \text{H}$, $R_{10} = \text{H}$
 vi) en la que $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OH}$, $y = \text{CH}_2$, en combinación con $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OCH}_3$, $R_5 = \text{H}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{H}$, $x = \text{CH}_2$, $R_8 = R_9 = \text{H}$, $R_{10} = \text{H}$
 vii) en la que $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OH}$, $y = \text{CH}_2$, en combinación con $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OCH}_3$, $R_5 = \text{H}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{H}$, $x = \text{CH}_2$, $R_8 = R_9 = \text{H}$, $R_{10} = \text{H}$
 viii) en la que $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OH}$, $y = \text{CH}_2$, en combinación con $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_5 = \text{H}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{H}$, $x = \text{CH}_2$, $R_8 = R_9 = \text{H}$, $R_{10} = \text{H}$;
 ix) en la que $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OH}$, $y = \text{CH}_2$, en combinación con $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OCH}_3$, $R_5 = \text{H}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{H}$, $x = \text{CH}_2$, $R_8, R_9 = \text{ceto}$, $R_{10} = \text{H}$
 x) en la que $R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OH}$, $y = \text{CH}_2$, en combinación con $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{H}$, $R_5 = \text{H}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{H}$, $x =$

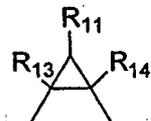
45

CH₂, R₈, R₉ = ceto, R₁₀ = H

xi) en la que R₃ = OCH₃, R₄ = OH, y = enlace, en combinación con R₁ = OCH₃, R₂ = H, R₅ = H, R₆ = OH, R₇ = H, x = enlace, R₈, R₉ = ceto, R₁₀ = H

xii) en la que -CHR₆-x-CHR₅- es

5



y R₁₁ = H, R₁₃ = H, R₁₄ = H, en combinación con R₁ = OCH₃, R₂ = OCH₃, R₃ = OCH₃, R₄ = OH, R₇ = H, R₈, R₉ = ceto, R₁₀ = H

xiii) en la que R₁ = OCH₃ en combinación con R₂ = H, R₃ = OCH₃, R₄ = OH, R₅ = H, R₆ = H, R₇ = H, R₈ = H, R₉ = H, R₁₀ = H, x = enlace, y = enlace

xiv) en la que R₁ = OCH₃ en combinación con R₂ = OCH₃, R₃ = OCH₃, R₄ = OH, R₅ = H, R₆ = H, R₇ = H, R₈ = H,

R₉ = H, R₁₀ = H, x = enlace, y = enlace

xv) en la que R₁ = OCH₃ en combinación con R₂ = OH, R₃ = OCH₃, R₄ = OH, R₅ = H, R₆ = H, R₇ = H, R₈, R₉ = ceto, R₁₀ = H, x = enlace, y = enlace

xvi) en la que R₁ = OCH₃ en combinación con R₂ = H, R₃ = OCH₃, R₄ = OH, R₅ = H, R₆ = H, R₇ = H, R₈, R₉ = ceto, R₁₀ = H, x = enlace, y = enlace

xvii) en la que R₁ = OCH₃, R₂ = H, R₃ = OH, R₄ = OH, R₈ = H, R₉ = H

xviii) en la que R₁ = OCH₃, R₂ = H, R₃ = OCH₃, R₄ = OH, R₈ = H, R₉ = H

xix) en la que R₁ = OCH₃, R₂ = H, R₃ = OH, R₄ = OH, R₈, R₉ = ceto

xx) en la que R₁ = OH, R₂ = OH, R₃ = OCH₃, R₄ = OH, R₈, R₉ = ceto

xxi) en la que R₁ = OCH₃, R₂ = OCH₃, R₃ = OH, R₄ = OH, R₈, R₉ = ceto

xxii) en la que R₁ = OCH₃, R₂ = OH, R₃ = OCH₃, R₄ = OH, R₈, R₉ = ceto

xxiii) en la que R₁ = OCH₃, R₂ = OCH₃, R₃ = OCH₃, R₄ = OH, R₈ = H, R₉ = H

C. Un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina (pre-rapamicina), 9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina, 16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina, 16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina, 9-desoxo-27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-rapamicina, 27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-rapamicina, 9-desoxo-39-O-desmetil-rapamicina, 8-desoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina (pre-prolilrapamicina), 8-desoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 8-desoxo-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 8-desoxo-15-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 15-O-desmetil-26-O-desmetil-prolilrapamicina, 15-O-desmetil-26-desmetoxi-prolilrapamicina, 26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 8-desoxo-15-O-desmetil-prolilrapamicina, 8-desoxo-26-O-desmetil-prolilrapamicina, 8-desoxo-38-O-desmetil-prolilrapamicina, 15-O-desmetil-prolilrapamicina, 38-O-desmetil-prolilrapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina, 16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina, 9-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina, 16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina, 9-desoxo-27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina, 16-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina, 27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina, 27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina, 9-desoxo-39-desmetoxi-rapamicina, 8-desoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 8-desoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 8-desoxo-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 8-desoxo-15-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 15-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 8-desoxo-38-desmetoxi-prolilrapamicina, 38-desmetoxi-prolilrapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(hidroxiciclohexenil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(dihidroxiciclohexil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(hidroxinorbomil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-metil-4-hidroxiciclohexil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(4-metilhidroxiciclohexil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-fluoro-4-hidroxiciclohexil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-hidroxi-4-fluorociclohexil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-cloro-4-hidroxiciclohexil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-

60

5 hidrox ciclohexil)-36-(3-hidroxi-4-clorociclohexil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidrox ciclohexil)-36-(3-cis-4-cis-dihidrox ciclohexil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidrox ciclohexil)-36-(3-trans-4-trans-dihidrox ciclohexil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetil rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidrox ciclohexil)-36-(hidrox ciclohexenil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidrox ciclohexil)-36-(hidrox inornbornil) rapamicina, 9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidrox ciclohexil)-36-(4-metil hidrox ciclohexil) rapamicina.

10 En el presente documento se describen adicionalmente métodos para producir y opcionalmente aislar los siguientes compuestos (Figura 10, Figura 11, Figura 12, Figura 13, y Figuras 14, 15, 16 y Figura 17):

Tabla II

Compuesto N°:	Nombre:
1.	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina (pre Rapamicina)
2.	9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina
3.	16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina
4.	9-desoxo-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina
5.	9-desoxo-16-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina
6.	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina
7.	16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina
8.	9-desoxo-27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina
9.	9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-rapamicina
10.	16-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina
11.	16-O-desmetil-27-O-desmetil-rapamicina
12.	16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina
13.	27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina
14.	27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina
15.	9-desoxo-16-O-desmetil-rapamicina
16.	9-desoxo-27-desmetoxi-rapamicina
17.	9-desoxo-27-O-desmetil-rapamicina
18.	9-desoxo-39-O-desmetil-rapamicina
19.	9-desoxo-rapamicina
20.	16-O-desmetil-rapamicina
21.	27-O-desmetil-rapamicina
22.	27-desmetoxi-rapamicina
23.	39-O-desmetil-rapamicina

ES 2 544 624 T3

24.	8-desoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina (pre-prolilrapamicina)
25.	8-desoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina
26.	15-D-desmetil-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina
27.	8-desoxo-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina
28.	8-desoxo-15-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina
29.	8-desoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-prolilrapamicina
30.	15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina
31.	8-desoxo-26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina
32.	8-desoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-prolilrapamicina
33.	15-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina
34.	15-O-desmetil-26-O-desmetil-prolilrapamicina
35.	15-O-desmetil-25-desmetoxi-prolilrapamicina
36.	26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina
37.	26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina
38.	8-desoxo-15-O-desmetil-prolilrapamicina
39.	8-desoxo-26-desmetoxi-prolilrapamicina
40.	8-desoxo-26-O-desmetil-prolilrapamicina
41.	8-desoxo-38-O-desmetil-prolilrapamicina
42.	8-desoxo-prolilrapamicina
43.	15-O-desmetil-prolilrapamicina
44.	26-O-desmetil-prolilrapamicina
45.	26-desmetoxi-prolilrapamicina
46.	38-O-desmetil-prolilrapamicina
47.	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina
48.	9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina
49.	16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina
50.	9-desoxo-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina
51.	9-desoxo-16-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina
52.	16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina

ES 2 544 624 T3

53.	9-desoxo-27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina
54.	16-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina
55.	27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina
56.	27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina
57.	9-desoxo-39-desmetoxi-rapamicina
58.	39-O-desmetoxi-rapamicina
59.	8-desoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina
60.	8-desoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina
61.	15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina
62.	8-desoxo-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina
63.	8-desoxo-15-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina
64.	15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina
65.	8-desoxo-26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina
66.	15-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina
67.	26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina
68.	26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina
69.	8-desoxo-38-desmetoxi-prolilrapamicina
70.	38-desmetoxi-prolilrapamicina
71	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(hidroxiciclohexenil) rapamicina
72	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(dihidroxi ciclohexil) rapamicina
73	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(hidroxinorbornil) rapamicina
74	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-metil-4-hidroxiciclohexil) rapamicina
75	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(4-metil hidroxiciclohexil) rapamicina
76	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-fluoro-4-hidroxiciclohexil) rapamicina
77	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-hidroxi-4-fluorociclohexil) rapamicina

ES 2 544 624 T3

78	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-cloro-4-hidroxiciclohexil) rapamicina
79	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-hidroxi-4-clorociclohexil) rapamicina
80	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-cis-4-cis-dihidroxiciclohexil) rapamicina
81	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-trans-4-trans-dihidroxiciclohexil) rapamicina
82	9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetil rapamicina
83	9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(hidroxiciclohexenil) rapamicina
84	9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(hidroxinorbornil) rapamicina
85	9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(4-metil hidroxiciclohexil) rapamicina
86	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-O-trans-hidroxiciclohexil)-36-(hidroxicicloheptil) rapamicina
87	9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(hidroxicicloheptil) rapamicina

En el presente documento se describen adicionalmente nuevos análogos de rapamicina

Tabla III

Compuesto N°:	Nombre:
1.	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina (pre-rapamicina)
2.	9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina
3.	16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina
5.	9-desoxo-16-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina
6.	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina
7.	16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina
8.	9-desoxo-27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina
9.	9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-rapamicina
14.	27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina
15.	9-desoxo-16-O-desmetil-rapamicina
18.	9-desoxo-39-O-desmetil-rapamicina

ES 2 544 624 T3

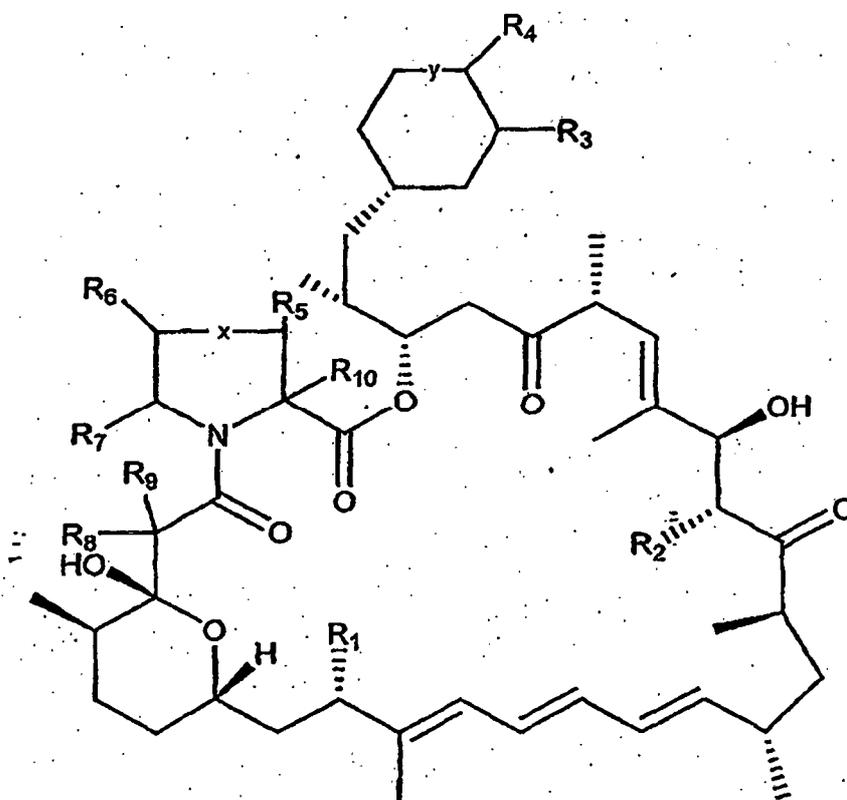
24.	8-desoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina (pre-prolilrapamicina)
25.	8-desoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina
26.	15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina
27.	8-desoxo-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina
28.	8-desoxo-15-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina
29.	8-desoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-prolilrapamicina
30.	15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina
31.	8-desoxo-26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina
32.	8-desoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-prolilrapamicina
33.	15-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina
34.	15-O-desmetil-26-O-desmetil-prolilrapamicina
35.	15-O-desmetil-26-desmetoxi-prolilrapamicina
36.	26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina
37.	26-O-desmetil-38-O-desmetil-prolilrapamicina
38.	8-desoxo-15-O-desmetil-prolilrapamicina
40.	8-desoxo-26-O-desmetil-prolilrapamicina
41.	8-desoxo-38-O-desmetil-prolilrapamicina
43.	15-O-desmetil-prolilrapamicina
46.	38-O-desmetil-prolilrapamicina
47.	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina
48.	9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina
49.	16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina
50.	9-desoxo-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina
51.	9-desoxo-16-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina
52.	16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina
53.	9-desoxo-27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina
54.	16-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina
55.	27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina
56.	27-O-desmetil-39-desmetoxi-rapamicina

ES 2 544 624 T3

57.	9-desoxo-39-desmetoxi-rapamicina
59.	8-desoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina
60.	8-desoxo-15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina
61.	15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina
62.	8-desoxo-26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina
63.	8-desoxo-15-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina
64.	15-O-desmetil-26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina
65.	8-desoxo-26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina
66.	15-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina
67.	26-desmetoxi-38-desmetoxi-prolilrapamicina
68.	26-O-desmetil-38-desmetoxi-prolilrapamicina
69.	8-desoxo-38-desmetoxi-prolilrapamicina
70.	38-desmetoxi-prolilrapamicina
71	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(hidroxiciclohexenil) rapamicina
72	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(dihidroxi ciclohexil) rapamicina
73	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(hidroxinorbornil) rapamicina
74	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-metil-4-hidroxiciclohexil) rapamicina
75	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(4-metil hidroxiciclohexil) rapamicina
76	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-fluoro-4-hidroxiciclohexil) rapamicina
77	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-hidroxi-4-fluorociclohexil) rapamicina
78	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-cloro-4-hidroxiciclohexil) rapamicina
79	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-hidroxi-4-clorociclohexil) rapamicina
80	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-cis-4-cis-dihidroxiciclohexil) rapamicina

81	9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(3-trans-4-trans-dihidroxiciclohexil) rapamicina
82	9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetil rapamicina,
83	9-desoxo-16-O-desmetil-27O-desmetil-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(hidroxiciclohexenil) rapamicina
84	9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(hidroxinorbornil) rapamicina
85	9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidroxiciclohexil)-36-(4-metil hidroxiciclohexil) rapamicina

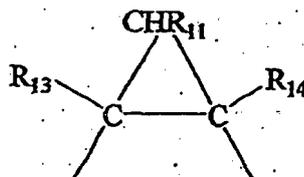
En el presente documento se describen adicionalmente nuevos análogos de rapamicina de Fórmula II:



5

en la que

x = enlace o CHR₁₁, o -CHR₆-x-CHR₅- es



10

y = enlace o CHR₁₂

R₁ = OH, OCH₃

R₂ = H, OH, OCH₃

15

R₃ = H, OH, OCH₃, resto de alquilo, halo, amino, tiol

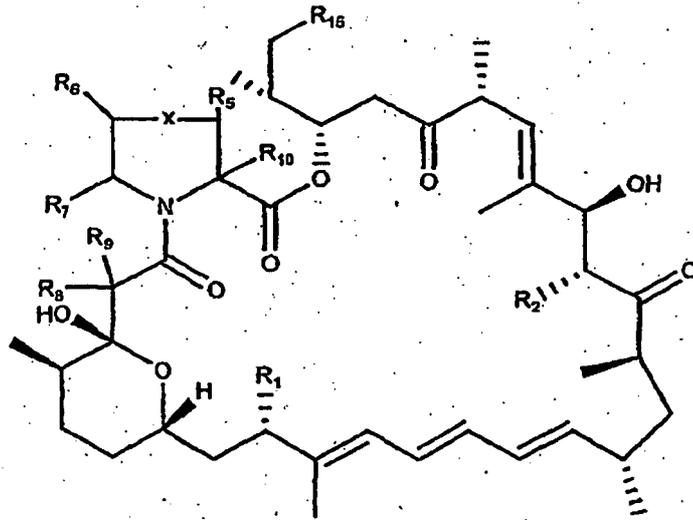
R₄ = H, OH, OCH₃, resto de alquilo, halo, amino, tiol

- R₅ = H, resto de alquilo, halo, hidroxi
- R₆ = H, resto de alquilo, halo, hidroxi
- R₇ = H, resto de alquilo, halo, hidroxi
- R₈, R₉ = =O o H,H
- R₁₀ = H, resto de alquilo, halo, hidroxi
- R₁₁ = H, resto de alquilo, halo, hidroxi
- R₁₂ = H, resto de alquilo, halo, hidroxi
- R₁₃ = H, resto de alquilo, halo, hidroxi
- R₁₄ = H, resto de alquilo, halo, hidroxi,

5

10

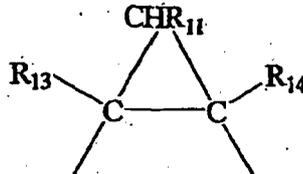
y nuevos análogos de rapamicina de Fórmula III:



15

en la que

x = enlace o CHR₁₁, o -CHR₆-x-CHR₅- es

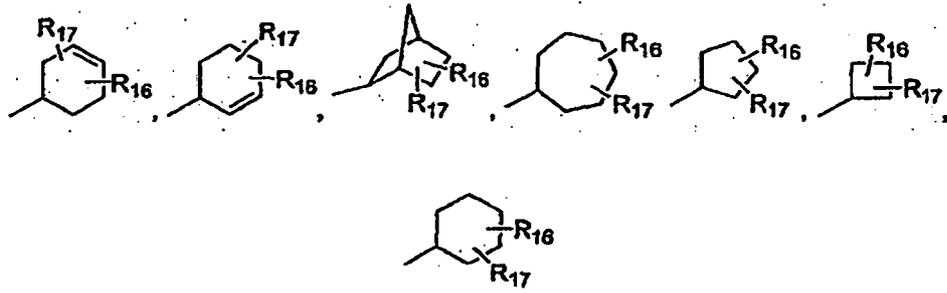


20

- R₁ = OH, CH₃
- R₂ = H, OH, OCH₃
- R₅ = H, resto de alquilo, halo, hidroxi
- R₆ = H, resto de alquilo, halo, hidroxi
- R₇ = H, resto de alquilo, halo, hidroxi
- R₈, R₉ = =O o H,H
- R₁₀ = H, resto de alquilo, halo, hidroxi
- R₁₁ = H, resto de alquilo, halo, hidroxi
- R₁₂ = H, resto de alquilo, halo, hidroxi
- R₁₃ = H, resto de alquilo, halo, hidroxi
- R₁₄ = H, resto de alquilo, halo, hidroxi
- R₁₅ =

25

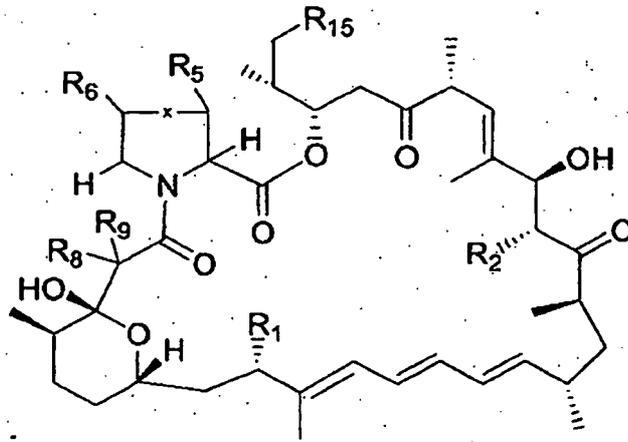
30



R₁₆ = OH
 R₁₇ = H, OH, halo-, tiol-, alquil-

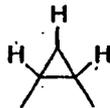
5

La presente invención proporciona compuestos de fórmula:



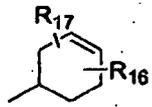
10 en la que

x = enlace o CH₂, o -CHR₆-x-CHR₅- es



15

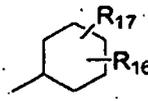
R₁₅ =



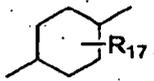
A



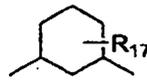
B



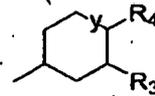
C



D



F



G

20

25

R₁ = OH, OCH₃
 R₂ = H, OH, OCH₃
 R₃ = F, Cl y R₄ = H, OH, CH₃, F, Cl; o
 R₄ = F, Cl y R₃ = H, OH, CH₃, F, Cl, OCH₃;
 R₁₆ = OH, OCH₃
 R₁₇ = Cl, F
 R₅ = H, OH
 R₆ = H, OH

R₈ y R₉ en conjunto son =O o H,H; e
y = enlace, CH₂.

5 Los nuevos análogos de rapamicina que se describen en el presente documento son útiles directamente, y como
moldes para sen y síntesis adicional o bioconversión para producir compuestos útiles, como inmunosupresores,
agentes antifúngicos, agentes anticáncer, agentes neuroregenerativos o agentes para el tratamiento de psoriasis,
artritis reumatoide, fibrosis y otros trastornos hiperproliferativos.

10 Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de los análogos de ligando de FKBP
generados en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, el tratamiento de infecciones
fúngicas, el tratamiento de enfermedades autoinmunes, inflamatorias, proliferativas e hiperproliferativas o el
mantenimiento de inmunosupresión.

15 Un experto en la materia sería capaz mediante experimentación de rutina de determinar la capacidad de estos
compuestos para inhibir el crecimiento fúngico (por ejemplo, Baker, H., et al., 1978; NCCLS Reference method for
broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts: Approved standard M27-A, 17 (9). 1997), y por ejemplo pero
no limitado al uso de los métodos que se describen en el Ejemplo 19. Además, un experto en la materia sería capaz
mediante experimentación de rutina de determinar la capacidad de estos compuestos para inhibir el crecimiento de
20 células tumorales, por ejemplo pero no limitado al uso de los métodos descritos en el Ejemplo 19, (véase también
Dudkin, L., et al., 2001; Yu et al. 2001). En un aspecto más los compuestos de la presente invención son útiles para
inducir inmunosupresión y por lo tanto se refiere a métodos de para inducir de forma terapéutica o profiláctica una
supresión de un sistema inmune de un ser humano, o un animal para el tratamiento o prevención del rechazo de
órganos o tejidos trasplantados, el tratamiento de enfermedades autoinmunes, inflamatorias, proliferativas e
hiperproliferativas (algunos ejemplos incluyen pero no se limitan de forma inclusiva a enfermedades autoinmunes,
25 diabetes tipo I, rechazo agudo o crónico de un trasplante de órganos o tejidos, asma, tumores o trastornos
hiperproliferativos, psoriasis, eccema, artritis reumatoide, fibrosis, alergias y alergias almacenadas con alimentos). Tales
ensayos son bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, pero no se limitan a: Actividad
inmunosupresora - Warner, L.M., et al., 1992, Kahan et al. (1991) y Kahan y Camardo, 2001); Aloinjertos - Fishbein,
T.M., et al., 2002, Kirchner et al. 2000; Autoinmune / Inflamatorio / Asma - Carlson, R.P. et al., 1993, Powell, N. et al.,
30 2001; Diabetes I - Rabinovitch, A. et al., 2002; Psoriasis - Reitamo, S. et al., 2001; Artritis reumatoide - Foey, A., et
al., 2002; Fibrosis - Zhu, J. et al., 1999, Jain, S., et al., 2001, Gregory et al. 1993

35 La capacidad de los compuestos de la presente invención para inducir inmunosupresión se puede demostrar en
ensayos convencionales usados para este fin, por ejemplo, pero no limitado al uso de los métodos descritos en el
ejemplo 19. En un aspecto adicional los compuestos de la presente invención son útiles con relación a la
mecanismos antifibróticos, neuroregenerativos y antiangiogénicos, un experto en la materia sería capaz de
determinar, mediante experimentación de rutina, la capacidad de estos compuestos para prevenir la angiogénesis
(por ejemplo, Guba, M., et al., 2002.). Un experto en la materia sería capaz de determinar, mediante
40 experimentación de rutina, la utilidad de estos compuestos en endoprótesis vasculares (por ejemplo, Morice, M.C., et
al., 2002). Además, un experto en la materia sería capaz de determinar, mediante experimentación de rutina, la
capacidad neuroregenerativa de estos compuestos (por ejemplo, Myckatyn, T.M., et al., 2002, Steiner et al. 1997).

45 Cuando cualquiera de los siguientes compuestos y ejemplos enumerados no entra dentro del alcance de las
reivindicaciones adjuntas, se debe entender que se desvelan para los fines de comprensión de la invención, y por lo
tanto se proporcionan en un sentido ilustrativo.

Breve descripción de las Figuras

- 50 Figura 1 Estructura de rapamicina, las secciones a la izquierda de la línea representan el dominio de unión y
las de la derecha indican el dominio receptor.
Figura 2 Estructura de rapamicina (A), FK-506 (B), FK-520 (C) y meridamicina (D)
Figura 3 Mapa de plásmidos de pMG55, un vector de recombinación doble con selección positiva para RpsL y
oriT para conjugación.
55 Figura 4 Un diagrama de flujo que demuestra la estrategia de clonación para el aislamiento de pMAG144-16
para crear MG2-10.
Figura 5 Visión de conjunto con respecto a los casetes de genes
Figura 6 Estructura de 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil rapamicina
Figura 7 Estructura de 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil prolirapamicina
Figura 8 Estructura de 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi rapamicina
60 Figura 9 Estructura de 16-O-desmetil-27-desmetoxi rapamicina
Figura 10 Estructuras de los compuestos 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 15, 16, 17, 18 y 19
Figura 11 Estructuras de los compuestos 3, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 20, 21,22 y 23
Figura 12 Estructuras de los compuestos 24, 25, 27, 28, 29, 31,32, 38, 39, 40, 41 y 42
Figura 13 Estructuras de los compuestos 26, 30, 33, 34, 35, 36, 37, 43, 44, 45, y 46
65 Figura 14 Estructuras de los compuestos 47, 48, 50, 51,53 y 57
Figura 15 Estructuras de los compuestos 49, 52, 54, 55, 56, y 58

- Figura 16 Estructura de los compuestos 61,64, 66, 67, 68, y 70
 Figura 17 Estructura de los compuestos 59, 60, 62, 63, 65, y 69
 Figura 18 Coherencia heteronuclear de enlace múltiple HMBC de pre-rapamicina
 Figura 19 Coherencia cuántica múltiple heteronuclear HMQC de pre-rapamicina
 5 Figura 20 Espectroscopia de correlación (COSY) de pre-rapamicina indicada con flechas sólidas, espectroscopia de correlación total (TOCSY) de pre-rapamicina indicada con flechas punteadas.
 Figura 21 Correcciones en la secuencia de ADN de *rapN*, la secuencia corregida se muestra en la parte superior (SEC ID N°: 1) y la secuencia publicada (N° de ref: X86780, nt 91764-92978) se muestra debajo (SEC ID N°: 2).
 10 Figura 22 Correcciones en la secuencia de aminoácidos de RapN, la secuencia corregida se muestra en la parte superior (SEC ID N°: 3) y la secuencia publicada (N° de ref: X86780) se muestra debajo (SEC ID N°: 4).
 Figura 23 Correcciones en la secuencia de ADN de *rapM*, la secuencia corregida se muestra en la parte superior (SEC ID N°: 5) y la secuencia publicada (N° de ref: X86780, complemento de nt 92992-93945) se muestra debajo (SEC ID N°: 6).
 15 Figura 24 Correcciones en la secuencia de aminoácidos de RapM, la secuencia corregida se muestra en la parte superior (SEC ID N°: 7) y la secuencia publicada (N° de ref: X86780) se muestra debajo (SEC ID N°: 8).
 Figura 25 Correcciones en la secuencia de ADN de *rapL*, la secuencia corregida se muestra en la parte superior (SEC ID N°: 9), la secuencia publicada (N° de ref: X86780, complemento de nt 94047-95078) se muestra en la parte inferior (SEC ID N°: 10).
 20 Figura 26 Correcciones en la secuencia de aminoácidos de RapL, la secuencia corregida se muestra en la parte superior (SEC ID N°: 11) y la secuencia publicada (N° de ref: X86780) se muestra debajo (SEC ID N°: 12).
 25 Figura 27 Correcciones en la secuencia de ADN de *rapK*, la secuencia corregida se muestra en la parte superior (SEC ID N°: 13) y la secuencia publicada (N° de ref: X86780, nt 95430-96434) se muestra en la parte inferior (SEC ID N°: 14).
 Figura 28 Correcciones en la secuencia de aminoácidos de RapK, la secuencia corregida se muestra en la parte superior (SEC ID N°: 15) y la secuencia publicada (N° de ref: X86780) se muestra debajo (SEC ID N°: 16).
 30 Figura 29 Correcciones en la secuencia de ADN de *rapJ*, la secuencia corregida se muestra en la parte superior (SEC ID N°: 17) y la secuencia publicada (N° de ref: X86780, nt 96465-97625) se muestra en la parte inferior (SEC ID N°: 18).
 Figura 30 Correcciones en la secuencia de aminoácidos de RapJ, la secuencia corregida se muestra en la parte superior (SEC ID N°: 19) y la secuencia publicada (N° de ref: X86780) se muestra debajo (SEC ID N°: 20).
 35 Figura 31 Correcciones en la secuencia de ADN de *rapI*, la secuencia corregida se muestra en la parte superior (SEC ID N°: 21) y la secuencia publicada (N° de ref: X86780, nt 97622-98404) se muestra en la parte inferior (SEC ID N°: 22).
 40 Figura 32 Correcciones en la secuencia de aminoácidos de RapI, la secuencia corregida se muestra en la parte superior (SEC ID N°: 23) y la secuencia publicada (N° de ref: X86780) se muestra debajo (SEC ID N°: 24).
 Figura 33 Correcciones en la secuencia de ADN de *rapQ*, la secuencia corregida se muestra en la parte superior (SEC ID N°: 25) y la secuencia publicada (N° de ref: X86780, nt 90798-91433) se muestra en la parte inferior (SEC ID N°: 26).
 45 Figura 34 Correcciones en la secuencia de aminoácidos de RapQ, la secuencia corregida se muestra en la parte superior (SEC ID N°: 27) y la secuencia publicada (N° de ref: X86780) se muestra debajo (SEC ID N°: 28).
 50 Figura 35 Un diagrama de flujo que demuestra la estrategia de clonación para el aislamiento de pMG278-1 para crear MG3.
 Figura 36 Un diagrama de flujo que demuestra la estrategia de clonación para el aislamiento de pMG267-1 para crear MG4.

55 Materiales y Métodos

Materiales

Todas las enzimas y reactivos de biología molecular eran de fuentes comerciales. El ácido D/L pipercolico se obtuvo en Sigma.

60 Materiales de partida

La Tabla IV resume las fuentes de los ácidos usados en los experimentos de alimentación que se describen en la sección de Ejemplos. Para los compuestos que se adquirieron, se proporcionan detalles de la fuente. Se proporciona un breve método de síntesis para los ácidos de partida que se sintetizaron en las instalaciones. Una persona experta en la materia observará que las variaciones en los métodos que se describen son de rutina y están dentro del

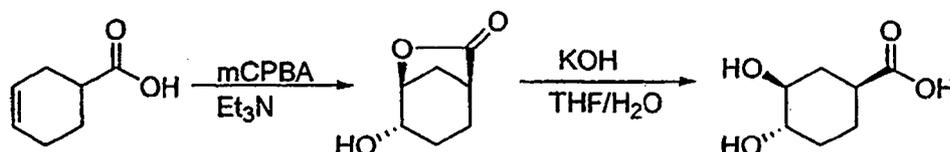
alcance de la presente invención.

Tabla IV

Ácido	Compañía	Número de Stock	síntesis
ácido ciclohexano carboxílico	Aldrich	10.183-4	
ácido 3- <i>cis</i> ,4- <i>trans</i> -dihidroxiciclohexano carboxílico			en las instalaciones con el método de la tesis doctoral PhD de Lowden
ácido 1-ciclohexeno carboxílico	Aldrich	32.836-7	
ácido 3-ciclohexeno carboxílico	Aldrich	45.375-7	
ácido cicloheptano carboxílico	Aldrich	C9.850-0	
carboxilato de metil-2-norbornano	Aldrich	S40.932-4	
ácido 2-(<i>cis/trans</i>)-hidroxiciclohexano carboxílico	U. Nottingham		Sin por el Dr R Goss
ácido 3-(<i>cis/trans</i>)-hidroxiciclohexano carboxílico	U. Nottingham		Sin por el Dr R Goss
ácido 4-(<i>cis/trans</i>)-hidroxiciclohexano carboxílico	U. Nottingham		Sin por el Dr R Goss
ácido 2-(<i>cis/trans</i>)-metilciclohexano carboxílico	Aldrich	33.060-4	
ácido 3-(<i>cis/trans</i>)-metilciclohexano carboxílico	Aldrich	33.061-2	
ácido 4-(<i>cis/trans</i>)-metilciclohexano carboxílico	Aldrich	33.062-0	
ácido 3-(<i>cis/trans</i>)-metoxiciclohexano carboxílico	Aldrich	33.283-6	
ácido 4-(<i>cis/trans</i>)-metoxiciclohexano carboxílico	Aldrich	33.284-4	
carboxilato de etil 4-ciclohexanona	Aldrich	32.062-5	
carboxilato de etil 2-ciclohexanona	Aldrich	16.699-5	
ácido 4- <i>trans</i> -n-pentilciclohexano carboxílico	Aldrich	26.160-2	
ácido 2- <i>trans</i> -aminociclohexano carboxílico	Aldrich	A7331	
ácido 4- <i>cis</i> -aminociclohexano carboxílico	Aldrich	40.485-3	
ácido 4-(<i>cis/trans</i>)-(aminometil)-ciclohexano carboxílico	Aldrich	S42.955-4	
Ácido ciclopentano carboxílico	Aldrich	C11.200-3	
Ácido ciclobutano carboxílico	Aldrich	C9.560-9	
ácido 1-metilciclohexano carboxílico	Aldrich	14.282-4	

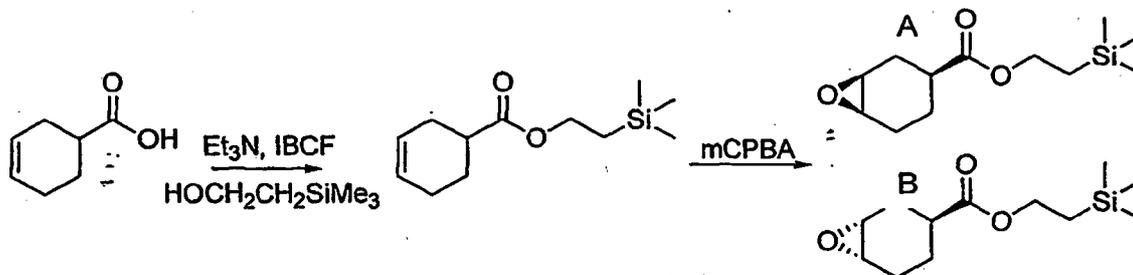
Mezcla de ácido 3- <i>trans</i> -hidroxi-4- <i>cis</i> -fluorociclohexano carboxílico y ácido 4- <i>trans</i> -hidroxi-3- <i>cis</i> -fluorociclohexano carboxílico O mezcla de ácido 3- <i>cis</i> -hidroxi-4- <i>trans</i> -fluorociclohexano carboxílico y ácido 4- <i>cis</i> -hidroxi-3- <i>trans</i> -fluorociclohexano carboxílico			en las instalaciones, Método B
mezcla de ácido 3- <i>cis</i> -hidroxi-4- <i>trans</i> -clorociclohexano carboxílico y ácido 4- <i>cis</i> -hidroxi-3- <i>trans</i> -clorociclohexano carboxílico			en las instalaciones, Método C
Mezcla de ácido 3- <i>trans</i> -hidroxi-4- <i>cis</i> -clorociclohexano carboxílico y ácido 4- <i>trans</i> -hidroxi-3- <i>cis</i> -clorociclohexano carboxílico			en las instalaciones, Método C
ácido 3- <i>trans</i> -ciclohexenoóxido carboxílico			en las instalaciones, Método A
ácido 3- <i>cis</i> -ciclohexenoóxido carboxílico			en las instalaciones, Método A
Mezcla de ácido 3,4- <i>cis</i> -dihidroxiciclohexano carboxílico y ácido 3,4- <i>trans</i> -dihidroxiciclohexano carboxílico			en las instalaciones, Método D
Ácido ciclohexanoacético	Aldrich	C10.450-7	
Ácido ciclohexanopropiónico	Aldrich	16.147	
ácido 4- <i>cis</i> / <i>trans</i> - <i>terc</i> -butilciclohexano carboxílico	Aldrich	37.493-8	

Síntesis de ácido 3-*cis*,4-*trans*-dihidroxiciclohexano carboxílico



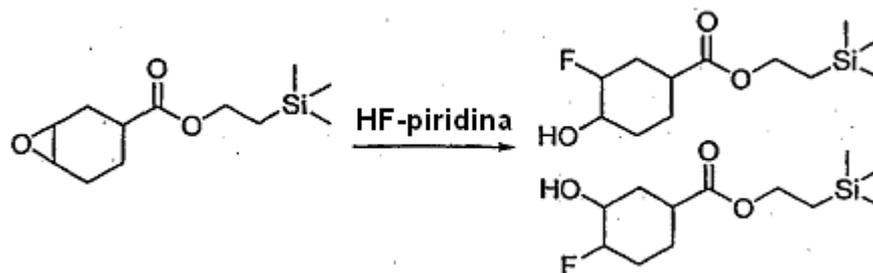
5 El ácido 3-*cis*,4-*trans*-dihidroxiciclohexano carboxílico racémico se pudo conseguir fácilmente a partir de ácido 3-ciclohexeno carboxílico racémico disponible en el mercado. Este ácido se epoxidó a través de tratamiento con ácido *meta*-cloroperbenzoico y se convirtió en la lactona *in situ* mediante la adición de base (trietilamina), estableciendo de este modo las estereoquímicas relativas. Esta lactona se hidrolizó a continuación mediante la acción de hidróxido potásico acuoso, y el producto final se purificó sobre una resina de intercambio iónico, (véase PAS Lowden Thesis 10 1997, Corey, E. J. y Huang, H., 1989).

Método A:

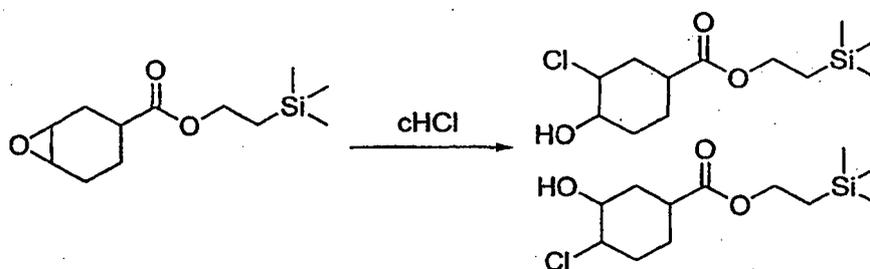


15 Los epóxidos A y B se sintetizaron mediante etapas convencionales. El ácido ciclohex-3-eno carboxílico se protegió con 2-trimetilsililetanol seguido de activación con cloroforniato de isobutilo y trietilamina. El éster resultante se trató con ácido *meta*-cloroperbenzoico y la mezcla racémica resultante de diastereómeros se separó en sílice en fase normal. Los epóxidos se hicieron reaccionar en (véase a continuación) o seres protegieron directamente con el tratamiento de ácido trifluoroacético, para liberar los respectivos ácidos libres.

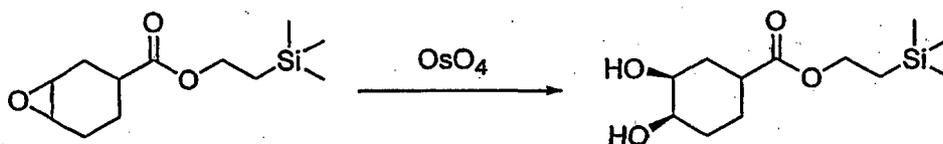
20

Método B:

- 5 Un epóxido protegido se trató con HF-piridina anhidra para realizar la apertura del anillo para producir un par de regiómeros racémicos, que contienen F y OH en una transposición *trans* (como se ha demostrado anteriormente para el óxido de ciclohexeno). Los ésteres se desprotegeron a continuación con ácido trifluoroacético para liberar los ácidos libres, (véase Welch, J. T. y Seper, K., W., 1988)

Método C

- 15 Un epóxido protegido se trató con disolvente orgánico suspendido en ácido clorhídrico concentrado para influir en la apertura del anillo para producir un par de regiómeros racémicos, que contienen Cl y OH en una transposición *trans* (como se ha demostrado anteriormente para el óxido de ciclohexeno). Los ésteres se desprotegeron a continuación con ácido trifluoroacético para liberar los ácidos libres, (véase Chini, M., Crotti, P., et al., 1992)

Método D

- 25 Se generaron ácidos cis-dihidroxiciclohexanocarboxílicos por tratamiento de epóxidos protegidos con una cantidad catalítica de tetraóxido de osmio junto con un co-oxidante. Los ésteres se desprotegeron a continuación con ácido trifluoroacético para liberar los ácidos libres.

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

- 30 Se cultivó DH10B de *Escherichia coli* (GibcoBRL) en medio 2xTY como se describe en Sambrook et al. (1989) y ET12567(pUB307) de *E. coli* como se describe en MacNeil et al. (1992) y ET12567(pUZ8002) de *E. coli* como se describe en Paget et al. (1999) en medio 2xTY con kanamicina (25 µg/ml). Los vectores pUC18 y Litmus28 se obtuvieron en New England Biolabs. El vector pSET152 se describe en Bierman et al., (1992a). Se seleccionaron transformantes de *E. coli* con 100 µg/ml de ampicilina o 50 µg/ml de apramicina.
- 35 El *S. hygroscopicus* productor de rapamicina de la ATCC 29253 y sus derivados se mantuvieron en placas de agar de medio 1 (véase a continuación) a 26 °C, y se cultivaron en TSBGM (Caldo de Cultivo de Soja Tríplico con glucosa al 1,0 % y MES 100 mM, pH 6,0) como se describe en (Khaw et al., 1998), complementado con 100 µg/ml de apramicina cuando sea necesario.
- 40 Los cultivos líquidos se cultivaron a 25 °C en matraces Erlenmeyer con tabique deflector lateral con agitación a 300 rpm.

ES 2 544 624 T3

El mutante MG1 C de *S. hygrosopicus* resistente a estreptomycin se seleccionó usando procedimientos convencionales y se mantuvo en medio 1 con estreptomycin (50µg/ml).

Métodos de alimentación:

Se prepararon soluciones de reserva de esporas de todas las cepas después de crecimiento del medio 1, conservado en glicerol al 20 % en p/v: lactosa al 10 % en p/v en agua destilada y se almacenó a -80 °C. Se prepararon cultivos vegetativos por inoculación de 100 µl de solución de reserva congelada en 50 ml de medio 6 en un matraz de 250 ml. El cultivo se incubó de 36 a 48 horas a 28 °C, 250 rpm.

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

Medio 1: Medio A modificado

Componente	Fuente	Nº de Catálogo	g/l
Polvo de macerado de maíz	Sigma	C-8160	2,5 g
Extracto de levadura	Difoc	0127-17	3 g
Carbonato cálcico	Sigma	C5929	3 g
Sulfato de hierro	Sigma	F8633	0,3 g
BACTO agar			20 g
Almidón de trigo	Sigma	S2760	10 g
Agua hasta			1 l

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

Medio 2 (Box et al., 1995)

Componente	g/l
<i>Peptona-SL de soja (Marcor)</i>	10
Glucosa (Sigma G-7021)	20
Levadura de Panadería	5
NaCl (Sigma)	2
<i>Elementos Traza</i>	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,05
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,125
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,01
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,02
Ajustar pH a 7,0	

ES 2 544 624 T3

Medio 3 (Wilkinson et al., 2000)

Componente	g/l
Dextrosa (Sigma)	15
Glicerol (BDH-Merck)	15
Peptona de soja (Marcor-SL)	15
NaCl (Fisher)	3
CaCO ₃ (Sigma)	1

Medio 4 (Patente de Estados Unidos Nº 3.993.749)

5

Componente	g/l
<i>Harina de haba de soja (Arkasoy 50)</i>	30
Glucosa (Sigma G-7021)	20
Sulfato amónico	15
KH ₂ PO ₄ (Sigma)	5
<i>Elementos Traza</i>	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,05
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,125
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,01
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,02
Ajustar pH a 6,0	

Medio 5 (Box et al., 1995)

Componente	g/l
<i>Harina de semilla de soja (Arkasoy 50)</i>	20
Glucosa (Sigma G-7021)	20
Levadura de Panadería	6
K ₂ HPO ₄ (Sigma)	2,5
KH ₂ PO ₄ (Sigma)	2,5
NaCl (Sigma)	5
Glicerol (BDH)	30

ES 2 544 624 T3

Aceite de semilla de soja	10
<i>Elementos Traza</i>	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,05
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,125
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,01
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,02
Ajustar pH a 6,4	

Medio 6: Medio de Semilla de RapV7

Componente	Por l
Harina de semilla de soja (Nutrisoy)	5 g
Dextrina (Blanca, Prolab)	35 g
Sólidos de macerado de maíz (Sigma)	4 g
Glucosa	10 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
Ácido láctico (80 %)	1,6 ml
CaCO ₃ (Sigma)	7 g
Ajustar pH a 7,5 con NaOH 1 M.	

5 Medio 7: Medio MD6 (Medio de fermentación)

Componente	Por l
Harina de semilla de soja (Nutrisoy)	30 g
Almidón de maíz (Sigma)	30 g
Dextrina (Blanca, Prolab)	19 g
Fructosa	20 g
Levadura (Allinson)	3 g
Sólidos de macerado de maíz (Sigma)	1 g
L-Lisina	2,5 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g

ES 2 544 624 T3

(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
NaCl	5 g
CaCO ₃ (Caltec)	10 g
MnCl ₂ x 4H ₂ O	10 mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	2,5 mg
FeSO ₄ x 7H ₂ O	120 mg
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	50 mg
MES (monohidrato del ácido 2-morfolinoetano sulfúrico)	21,2 g
el pH se corrige a 6,0 con NaOH 1 M	

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

5 Medio 8: Medio MD3 (medio de fermentación)

Componente	Por l
Harina de soja (Nutrisoy)	31,25 g
Dextrina Blanca (Prolab)	18,75 g
KH ₂ PO ₄	5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,25 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	10 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,5 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	120 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	50 mg
SAG 417	1,2 ml
pH a 6,4 con NaOH	
L-lisina	0,625 g
Glucosa (40 % en p/v)	50 ml

Descripción de Cepas

10 Todas las cepas compartían la morfología del tipo silvestre, con micelios vegetativo de crema, hifas aéreas de color blanco, que desarrollan esporas grises que se vuelven de color negro y característicamente higroscópicas.

15 Preferentemente las esporas para uso en la generación de las cepas recombinantes como se describe en el presente documento eran de color gris oscuro, como se define en Fan 4, 202 C a B, más preferentemente son como se definen en Fan 4, 202 B (Royal Horticultural Society Colour Chart 2001, disponible en The Royal Horticultural Society, 80 Vincent Square, Londres, SW1 P 2PE).

Manipulación y secuenciación de ADN

Se realizaron procedimientos de manipulaciones de ADN, PCR y electroporación como se describe en Sambrook et al. (1989). Se realizaron hibridaciones de Southern con sondas marcadas con digoxigenina usando el kit de marcado de ADN DIG como lo describe el fabricante (Boehringer Mannheim). La secuenciación del ADN se realizó como se ha descrito anteriormente (Gaisser et al., 2000).

Fermentación de cepas de Streptomyces hygroscopicus.

Las cepas de *Streptomyces hygroscopicus* se cultivaron a partir de una solución de reserva de esporas congeladas en agente crioconservante (glicerol al 20 %, lactosa al 10 % en p/v en agua destilada) en el Medio 1 (véase Materiales y Métodos) y las esporas se cosecharon después de 10-20 días de crecimiento a 29 °C. Como alternativa, las esporas de soluciones de reserva de trabajo congeladas se inocularon directamente en medio de cultivo previo. Un cultivo previo primario se inoculó con las esporas cosechadas y se cultivó en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contienen 50 ml de Medio 6 (véase Materiales y Métodos), se agitó a 250 rpm con un torno de cinco centímetros, a 30 °C, durante dos días. El cultivo previo primario se usó para inocular cultivos previos secundarios de Medio 6 (véase Materiales y Métodos), a un 10 % en v/v, que se agitó a 300 rpm con un torno de tres centímetros, a 28 °C, durante un periodo adicional de 24 h. Los cultivos previos secundarios se usaron para inocular, a un 10 % en v/v, Medio de producción 8 (véase Materiales y Métodos) que contiene antiespuma SAG 417 al 0,01 % en v/v y se permitió que fragmentara en un biorreactor agitado de cinco a siete días a 26 °C. El flujo de aire se ajustó a 0,75 vvm, con una presión a 50 kPa y la velocidad de la punta del impulsor se controló entre 0,98 ms⁻¹ y 2,67 ms⁻¹. Se añadió SAG 417 adicional a demanda. El pH se controló a 6 - 7 con amonio (10 % en v/v) o ácido sulfúrico (1 M) y una solución de glucosa (40 % en p/v) se alimentó por goteo al inicio de la demanda de amonio.

Método (A) de análisis de Extracción y Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC)

La centrifugación se realizó en 50 ml del caldo de fermentación y el sobrenadante y el micelio se extrajeron por separado como sigue a continuación. Los micelios se lavaron con H₂O y se extrajeron con 50 ml de metanol durante 16 horas a 4 °C. El residuo celular se retiró por centrifugación, el metanol se evaporó a sequedad a continuación se disolvió en 200 µl de metanol. El sobrenadante del caldo de fermentación se extrajo dos veces con un volumen igual de acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se evaporó a sequedad y a continuación se disolvió en 200 µl de metanol. El análisis de HPLC se realizó en un aparato de cromatografía líquida HP1100 de Hewlett Packard con detector de longitud de onda variable o un instrumento MAT LCQ de Finnigan (Finnigan, CA). Los espectros de alta resolución se obtuvieron en un espectrómetro de masas de Resonancia de Ciclotrónica de Iones procesada con Transformada de Fourier BioApex II 4.7 T (FT-ICR) de Bruker (Bruker, Bremen, FRG).

Para el análisis de RMN, el caldo bacteriano se centrifugó, el sobrenadante se extrajo con tres volúmenes iguales de acetato de etilo y los micelios se extrajeron con metanol como se ha descrito anteriormente. Los extractos se combinaron, se secaron (Na₂SO₄) y se evaporaron a presión reducida para producir un sólido de color blanco.

Los espectros de RMN de Protón detectados (¹H, DQF-COSY, TOCSY, HMQC, HMBC, NOESY) se registraron en un espectrómetro Advance DRX500 de Bruker que funcionaba a 500 MHz a 27 °C, con la excepción del ejemplo 6, en el que el espectrómetro Advance DRX500 de Bruker funcionaba a 500 MHz a 10 °C. Los desplazamientos químicos se describen en partes por millón (ppm) en la escala δ y se denominan CHCl₃ a δ_H 7.26 (¹H) y CHCl₃ a δ_C 77,0 (¹³C). Los valores de *J* se proporcionan en Hercios (Hz).

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

El caldo de fermentación se aclaró por centrifugación para proporcionar sobrenadante y células. El sobrenadante se aplicó a una columna (16 x 15 cm) de resina HP20 Diaion® (Supelco), se lavó con agua seguido de MeOH al 75 %/H₂O y a continuación se eluyó con MeOH. Las células se mezclaron hasta homogeneidad con un volumen igual de acetona. Después de al menos 30 minutos, la suspensión de acetona se aclaró por centrifugación y el sobrenadante se decantó. Las células sedimentadas se extrajeron del mismo modo dos veces más con acetona. El extracto de acetona se combinó con el MeOH de la columna HP20 y el disolvente se retiró al vacío para dar un concentrado acuoso. El concentrado acuoso (por lo general de 1-2 l) se extrajo con EtOAc (3 x 1-2 l) y el disolvente se retiró al vacío para dar un extracto en bruto oleoso (por lo general de 20 g). El residuo oleoso se disolvió en un volumen mínimo de EtOAc y se secó sobre sílice. La sílice revestida se aplicó a una columna de sílice (400 g, 36 x 6 cm) que se eluyó secuencialmente con mezclas de acetona/hexano que varían de acetona al 25 % inicialmente hasta acetona al 100 %. Las fracciones que contienen análogos de rapamicina se identificaron por HPLC (280 nm) usando las condiciones que se describen en:

Las fracciones que contienen análogos de rapamicina se combinaron y el disolvente se retiró al vacío. El residuo se cromatografió adicionalmente sobre Sephadex LH20, eluyendo con cloroformo/heptano/etanol a 10:10:1. Los análogos de rapamicina semipurificados se purificaron por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa

(C18) usando un Gilson HPLC, eluyendo en una columna de 21,2 x 250 mm Luna C18 BDS de 5 µm de Phenomenex a 21 ml/min, elución isocrática con mezclas de CH₃CN/H₂O de un 50 % a un 70 % dependiendo de la polaridad del análogo de rapamicina.

5 *Análisis de caldos de cultivo*

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

Análisis por LCMS

20 El sistema de HPLC que sea descrita anteriormente se acopló a un espectrómetro de masas con electronebulización Daltonics Esquire3000 de Bruker. Se usó la misma columna y gradiente de elución como se ha descrito anteriormente. La fase móvil A era agua, la fase móvil B era acetonitrilo. Se usó intercambio positivo negativo sobre un intervalo de barrido de 500 a 1000 Dalton.

25 Ejemplo 1

Conjugación de S. hygroscopicus

El plásmido a conjugar en *S. hygroscopicus* se transformó por electroporación en la cepa *dam⁻ dcm⁻* ET12567 de *E. coli* que contiene cualquiera de pUB307 como se describe en MacNeil et al. (1992) o pUZ8002 como se describe en Paget et al. (1999). Se usó un cultivo previo (cultivo durante una noche culture, 30 °C) para inocular 2xTY recién preparado (con 50 µg/ml de apramicina y 25 µg/ml kanamicina) a una dilución de 1/25 y su cultivo con agitación a 37 °C hasta una densidad óptica de 0,25-0,6 a 595 nm. Las células de este caldo se lavaron dos veces con 2xTY, a continuación se volvieron a suspender con 0,5 ml de 2xTY por 25 ml del cultivo original. La calidad de la solución de esporas usada es crítica para el éxito de este método. En este contexto, el envejecimiento de las esporas cuando se cosechan y el uso de medio 1 son cruciales para el aislamiento de suspensión de esporas de alta calidad. Para aislar suspensiones de esporas de alta calidad de *S. hygroscopicus*, placas secadas previamente de agar de medio 1 (véase la sección Materiales y Métodos) se extendieron con esporas o micelios de *S. hygroscopicus* usando técnicas microbiológicas convencionales seguido de incubación a 26 °C-28 °C durante 14-21 días. Las esporas se cosecharon mediante la adición de 1-2 ml de solución estéril de glicerol al 20 % en p/v o agua mediante técnicas convencionales. Una alícuota de 200 µl de la suspensión de esporas de *S. hygroscopicus* se lavó en 500 µl de 2xTY, se volvió a suspender en 500 µl de 2xTY, se sometió a choque térmico a 50 °C durante 10 minutos y a continuación se enfrió en hielo. Una alícuota de 0,5 ml de la suspensión de *E. coli* se mezcló con las esporas tratadas con choque térmico y esta mezcla se sembró en placas de agar de medio 1. Estas placas se incubaron a 26 °C-28°C durante 16 horas antes de la superposición con 1 mg de ácido nalidíxico y 1 mg de apramicina por placa. Normalmente aparecen colonias de exconjugados después de 3-7 días.

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

50 La conjugación también se realizó usando el vector de integración pRT801 basado en ΦBT1 en MG2-10 de *S. hygroscopicus* como se ha descrito anteriormente. Los exconjugados se reordenaron de forma intracromosómica en el medio 1 que contiene 50 µg/ml apramicina y 50 µg/ml de ácido nalidíxico, y se muestra que son resistentes a la apramicina.

55 Ejemplo 2

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

60 Se construyó un mutante (MG2-10) de *S. hygroscopicus* en el que se suprimieron los genes de modificación de rapamicina *rapQ*, *rapO/N*, *rapM*, *rapL*, *rapK*, *rapJ* y *rapI*, como se describe a continuación.

Aislamiento del mutante MG1 C resistente a estreptomycin:

65 Se extendieron micelios NRRL5491 de *S. hygroscopicus* en placas de medio 1 que contiene 50 mg/ml de estreptomycin. Se aislaron tres colonias se marcaron como MG1A, MG1 B y MG1C. Estas se conjugaron al igual

que en el ejemplo 1 con el plásmido pMG49, un derivado de pSET152 que contiene el gen *rpsL* de TK24 de *S. lividans*. Los exconjugados de cada una de estas conjugación es se reordenaron en una placa en el medio 1 que contiene 50 mg/ml de apramicina y 50 mg/ml de ácido nalidíxico, para confirmar la presencia del plásmido pMG49. A continuación se sembraron en estrías, junto con las cepas originales de MG1A, MG1B y MG1C, tanto en una placa de medio 1 que no contiene antibiótico como en una placa de medio 1 que contiene 50 mg/ml de estreptomina. Se observó crecimiento en todos los casos excepto en las estrías de MG1A [pMG49], MG1 B [pMG49] y MG1C [pMG49] en estreptomina, lo que indica que el gen *w.t. rpsL* de TK24 de *S. lividans* confería sensibilidad a la estreptomina dominante en estas cepas. La producción de pre-rapamicina se midió en MG1A, MG1B y MG1C y el mejor productor, MG1C, se mantuvo para trabajo adicional.

Conjugación de MG1C de *S. hygroscopicus*

Las conjugaciones se realizaron como se describe en el ejemplo 1 usando el MG1C de *S. hygroscopicus* resistente a estreptomina y constructos derivados del vector pMG55.

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

Los cebadores MAG47 5'-GCAAGCTTGGTACCGACACGCTCGCCGAACAGG-3' (SEC ID N°: 29) y MAG48 5'-GCGCATGCCCTAGGGTGTACATTACTTCTCC-3' (SEC ID N°: 30) se usaron para amplificar el gen *rpsL* de *S. lividans* usando el plásmido pRPSL21 (Shima et al., 1996) como un molde. El fragmento de PCR se digirió con *SphI* y *HindIII*, se aisló y se ligó con el fragmento de pSET152 de 3,2 kb (Bierman et al., 1992b), que se había digerido con *SphI* y *HindIII*. Después de transformación en DH10B de *E. coli*, se aisló el plásmido pMG55. Este plásmido se confirmó por secuenciación. El plásmido pMG55 contiene el gen *rpsL* para permitir la selección de recombinantes dobles (Hosted y Baltz, 1997).

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

Los cebadores MAG23 5'-TATCTAGACTTCGCACGTGCCTGGGACA-3' (SEC ID N°: 31) y MAG24 5'-AGAAGCTTACCCAATTCCAACATCACCT-3' (SEC ID N°: 32) se usaron para amplificar la región izquierda de homología (a partir del nt 89298 hasta el nt 90798 en el grupo de rapamicina como se describe en Schwecke et al. (Schwecke et al., 1995) usando ADN genómico preparado a partir de NRRL5491 de *S. hygroscopicus* como un molde. El producto de PCR de 1,5 kb se digirió con *XbaI* y *HindIII* y se ligó en pUC18 cortado con *XbaI* y *HindIII*. Después de transformación en DH10B de *E. coli*, se aisló el plásmido pMAG127-8. Los cebadores MAG25 5'-GGAAGCTTTGACCACACGCCGCCGTTTC-3' (SEC ID N°: 33) y MAG26 5'-ATGCATGCCCGCCGCAACCCGCTGGCCT-3' (SEC ID N°: 34) se usaron para amplificar la región derecha de homología (del nt 98404 al nt 99904 en el grupo de rapamicina como se describe en Schwecke et al. (1995)) usando ADN genómico preparado a partir de NRRL5491 de *S. hygroscopicus* como un molde. El producto de 1,5 kb de PCR se digirió con *HindIII* y *SphI* y se ligó en pUC18 cortado con *HindIII* y *SphI*. Después de transformación en DH10B de *E. coli*, se aisló el plásmido pMAG128-2 (Figura 4). Ambos plásmidos se comprobaron mediante análisis de secuencias. El plásmido pMAG127-8 se digirió con *SphI* y *HindIII*, el plásmido pMAG128-2 se digirió con *XbaI* y *HindIII* y los fragmentos de 1,5 kb se aislaron de ambos plásmidos. Estos fragmentos se ligaron en pUC18 cortado con *SphI* y *XbaI* y se usaron para transformar DH10B de *E. coli*. El plásmido pMAG131-1 se aisló. Este plásmido se digirió con *SphI* y *XbaI*, el fragmento de 3 kb se aisló y se ligó en pMG55 cortado con *SphI* y *AvrII* y el ADN se usó para transformar DH10B de *E. coli*. El plásmido pMAG144-16 se aisló y se usó para conjugar MG1C de *S. hygroscopicus*. Una colonia de *S. hygroscopicus* resistente a apramicina se aisló, se cultivó durante 24 horas en TSBGM con agitación a 26 °C, y se extendió en placas de agar de medio 1 que contienen 50 µg/l de estreptomina. Se aislaron colonias resistentes a estreptomina y se mostró que eran sensibles a apramicina. La supresión cromosómica de 7606 nt de la región rapQONMLKJI del grupo de rapamicina se verificó en el mutante MG2-10 mediante el uso del producto de PCR de 1,5 kb de MAG23 y MAG24 para sondear el ADN cromosómico digerido con *EcoRI* y *BamHI*. El análisis de *S. hygroscopicus* de tipo silvestre presentaba la banda esperada de 5,8 kb de *EcoRI* y de 5,9 kb de *BamHI* después de la hibridación. Cuando el ADN cromosómico de MG2-10 se trató del mismo modo, se detectaron las bandas de 9,6 kb de *EcoRI* y de 7,6 kb de *BamHI*, lo que indica que rapQONMLKJI se había retirado.

Ejemplo 3

Expresión de *rapK* en el mutante MG2-10 de *S. hygroscopicus* que porta la supresión cromosómica de rapQONMLKJI (Figura 4)

Construcción del vector de expresión pSGset1

El vector pCJR336 (proporcionado amablemente por Christine Martin y Corinne Squire) derivado de pSET152 (Bierman et al., 1992a) se creó por clonación del dímero de CR347 5'-TAAACTAGTCCATCTGAGAGTTTCATATGGCCCTATTCTGCCAGCCGCTCTAG AAAT-3' (SEC ID N°: 35) y CR348 5'-ATTTCTAGAGCGGCTGGGCAGAATAGGGCCATATGAAACTCTCAGATGGACTAG TTTA -3' (SEC ID

Nº: 36) en pSET152 digerido con *PvuII* usando técnicas convencionales de biología molecular, introduciendo de este modo sitios para las enzimas de restricción *SpeI*, *NdeI*, y *XbaI* en pSET152. La orientación del inserto se confirmó por secuenciación. El plásmido pCJR336 se digirió usando las enzimas de restricción *NdeI/SpeI* y el vector pSG142 (Gaisser et al., 2000) se digirió del mismo modo. Las bandas del ADN resultantes de aproximadamente 5,4 kb para pCJR336 y de 1,2 kb para pSG142 se aislaron seguido de una ligación que se usó para transformar DH10B de *E. coli*. El constructo del vector que contiene la región reguladora *actII-ORF4* se aisló y se digirió usando la enzima de restricción *XbaI* seguido de un tratamiento con fosfatasa alcalina de acuerdo con protocolos convencionales. El ADN aislado se ligó con un fragmento de aproximadamente 200 pb del plásmido pEXoleG2cas (derivado de pSG142 que contiene el fragmento de aproximadamente 1,2 kb de *NdeI/BglII* de pSGcasOleG2 (documento de patente WO01/79520) digerido con las enzimas de restricción *XbaI* y *NheI*. El vector pSGset1 se aisló y la orientación correcta del inserto se verificó usando digestiones de restricción y análisis de secuencias. El plásmido pSGset1 contiene el regulador *actII-ORF4*, el promotor P_{actI} y la secuencia de codificación de 6xHis-marca así como la región de terminación de la transcripción lambda t_0 (que se origina a partir del plásmido pQE-16) y se puede integrar específicamente en el sitio en el sitio de unión de $\Phi C31$.

Clonación de *rapK*

El gen *rapK* se amplificó por PCR usando los cebadores BIOSG8 5'-GGGCATATGAGGCAATTGACTCCGCCGGTACACGGCACCGTACTGCC-3' (SEC ID Nº: 37) y BIOSG9 5'-GGGGTCTAGAGGTCACGCCACCACACCCTCGATCTCGACC -3' (SEC ID Nº: 38), que introducen un sitio *NdeI* en el extremo en la posición 5' y un sitio *XbaI* en el extremo de la posición 3' de *rapK*. El plásmido pR19 (Schwecke et al., 1995) se usó como un molde. Después de tratamiento con la T4 polinucleótido quinasa usando técnicas convencionales, el producto de PCR se ligó con pUC18 cortado con *SmaI* y se usó para transformar DH10B de *E. coli*. La secuencia de ADN de *rapK* en el plásmido pUCrapK aislado se verificó mediante análisis de secuencias. Las diferencias en la secuencia de ADN en comparación con la secuencia publicada (Nº de ref. X86780) se muestran en la Figura 27. Los cambios resultantes en RapK se muestran en la Figura 28.

Aislamiento de pSGsetrapK

El plásmido pUCrapK se digirió con *NdeI* y *XbaI* y los fragmentos del inserto se aislaron y se ligaron en pSGset1 digerido de forma idéntica. La ligación se usó para transformar DH10B de *E. coli* usando procedimientos convencionales y los transformantes se analizaron. El plásmido pSGsetrapK se aisló y el constructo se verificó usando digestiones de restricción y análisis de secuencias.

Ejemplo 4

Identificación de 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina (pre-rapamicina, Figura 6)

La 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina (pre-rapamicina) se obtuvo por conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* como se describe en el Ejemplo 1 con pSGsetrapK y aislando dos productos producidos en la fermentación. Esto demuestra que es posible complementar la supresión de *rapK* en la cepa MG2-10 y que, si la cepa se alimenta con ácido pipécólico, se produce pre-rapamicina, un análogo que carece de las modificaciones post-PKS.

El plásmido pSGsetrapK se conjugó en MG2-10 de *S. hygroscopicus* y las cepas el cultivo en TSBGM alimentado con 2 mg/l de ácido pipécólico a 25 °C con agitación. Los micelios se extrajeron con metanol y el caldo de cultivo se extrajo con acetato de etilo como se ha descrito anteriormente.

El análisis del caldo de cultivo del mutante MG2-10[pSGsetrapK] de *S. hygroscopicus* alimentado con ácido pipécólico mediante HPLC con detección UV a 280 nm reveló la presencia de dos nuevos picos de tales con tiempos de retención de 4,0 y 5,1 minutos. La espectroscopía de masas con electronebulización de estos picos reveló que ambos sillones contenidos correspondían a la un compuesto con un PM de 841,5. No se observó ninguno de estos picos en las acciones del cultivo de la cepa NRRL 5491 de *S. hygroscopicus* ni la cepa mutante MG2-10 sin el plásmido pSGsetrapK de expresión de *rapK*. El análisis de MS/MS del ión con m/z de 864 (que corresponde al aducto de sodio de la pre-rapamicina) reveló que se fragmentaba en un ión con m/z de 735 que corresponde a la pérdida de m/z de 129 (ácido pipécólico), o un ión con m/z de 556 que corresponde a la pérdida de m/z de 308 (C28-C42 de la pre-rapamicina). Este ión en sí mismo se fragmentó adicionalmente a un ión con m/z de 306, que corresponde a la pérdida de m/z de 250 (de C14 a C27 de pre-rapamicina). Este patrón de fragmentación era idéntico al patrón observado para la rapamicina pero con la segunda pérdida de m/z (-308) reducida en 14, que corresponde a la ausencia del grupo O-metilo en C39, la tercera pérdida de m/z (-250) reducida en 44, que corresponde a la ausencia de los grupos metoxi en C27 y O-metilo en C16 y el ión final (306) que tiene una masa reducida en 14 que corresponde a la ausencia del grupo cetona en C9. Esto era la evidencia de que el compuesto con el PM 841,5 representa a la 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina (pre-rapamicina).

Ejemplo 5

Preparación de casetes de genes para expresión en MG2-10 de *S. hygroscopicus*

- 5 Se construyeron casetes de genes capaces de dirigir la expresión de diversos genes que modifican y combinaciones de genes que modifican la rapamicina como se describe a continuación.

Clonación de rapN/O

- 10 Los genes contiguos *rapN* y *rapO*, denominados en lo sucesivo en el presente documento *rapN/O*, se amplificaron por PCR usando los cebadores BIOSG2 5'-GGGCATATGTCGACGACCGATCAGGGTGAGACCGGAAAGGCCTG-3' (SEC ID N°: 39) y BIOSG3 5'-GGGGTCTAGAGGTCAGTCCTGGGGTTCGAGAAGCTCGCCGGTCTCCTT-3' (SEC ID N°: 40), que introducen un sitio de *NdeI* en el extremo en la posición 5' y un sitio de *XbaI* en el extremo de la posición 3' de *rapN/O*. El plásmido pR19 (Schwecke et al., 1995) se usó como un molde. Después de tratamiento con la T4 polinucleótido quinasa usando técnicas convencionales, el producto de PCR se ligó en pUC18 cortado con *SmaI* y se usó para transformar DH10B de *E. coli*. La secuencia de ADN de *rapN/O* en el plásmido aislado pUCrapN/O se verificó mediante análisis de secuencias. Las diferencias en la secuencia de ADN en comparación con la secuencia publicada (N° de ref. X86780) se muestran en la Fig 21. Los cambios resultantes en RapN se muestran en la Fig 22.

Clonación de rapM

- 25 El gen *rapM* se amplificó por PCR usando los cebadores BIOSG4 5'-GGGCATATGATCCAACCCGACGTCGTGACCGCCTTCACAGCGG -3' (SEC ID N°: 41) y BIOSG5 5'-GGGGTCTAGAGGTCACACGCGGACGGCGATCTGGTGCCGATAGG-3' (SEC ID N°: 42), que introducen un sitio de *NdeI* en el extremo en la posición 5' y un sitio de *XbaI* en el extremo de la posición 3' de *rapM*. El plásmido pR19 (Schwecke et al., 1995) se usó como un molde. Después de tratamiento con la T4 polinucleótido quinasa usando técnicas convencionales, el producto de PCR se ligó en pUC18 cortado con *SmaI* y se usó para transformar DH10B de *E. coli*. La secuencia de ADN de *rapM* en el plásmido aislado pUCrapM se verificó mediante análisis de secuencias. Las diferencias en la secuencia de ADN en comparación con la secuencia publicada (N° de ref. X86780) se muestran en la Fig 23. Los cambios resultantes en RapM se muestran en la Fig 24.

Clonación de rapL

- 35 El gen *rapL* se amplificó por PCR usando los cebadores BIOSG6 5'-GGGCATATGCAGACCAAGGTTCTGTGCCAGCGTGACATCAAG-3' (SEC ID N°: 43) y BIOSG7 5'-GGGGTCTAGAGGTCAGTACTACAGCGAGTACGGATCGAGGACGTCTCGGGCG-3' (SEC ID N°: 44), que introducen un sitio *NdeI* en el extremo en la posición 5' y un sitio *XbaI* en el extremo en la posición 3' de *rapL*. El plásmido pR19 (Schwecke et al., 1995) se usó como un molde. Después de tratamiento con la T4 polinucleótido quinasa usando técnicas convencionales, el producto de PCR se ligó en pUC18 cortado con *SmaI* y se usó para transformar DH10B de *E. coli*. La secuencia de ADN de *rapL* en el plásmido aislado pUCrapL se verificó mediante análisis de secuencias. Las diferencias en la secuencia de ADN en comparación con la secuencia publicada (N° de ref. X86780) se muestran en la Fig 25. Los cambios resultantes en RapL se muestran en la Fig 26.

Clonación de rapL_{his}

- 50 El gen *rapL* se amplificó por PCR usando los cebadores BIOSG6 5'-GGGCATATGCAGACCAAGGTTCTGTGCCAGCGTGACATCAAG-3' (SEC ID N°: 43) y BIOSG45 5'-GGAGATCTCAGCGAGTACGGATCGAGGACGTC- CTCGGGCG-3' (SEC ID N°: 45), que introducen un sitio *NdeI* en el extremo en la posición 5' y un sitio *BglII* en el extremo en la posición 3' de *rapL*. El plásmido pR19 (Schwecke et al., 1995) se usó como un molde. Después de tratamiento con la T4 polinucleótido quinasa usando técnicas convencionales, el producto de PCR se ligó en pUC19 cortado con *SmaI* y se usó para transformar DH10B de *E. coli*. La secuencia de ADN de *rapL* en el plásmido aislado pUC19rapL_{his} se verificó mediante análisis de secuencias.

Clonación de rapK

- 60 El gen *rapK* se amplificó por PCR usando los cebadores BIOSG8 5'-GGGCATATGAGGCAATTGACTCCGCCGGTACGGCACCGTACTGCC-3' (SEC ID N°: 37) y BIOSG9 5'-GGGGTCTAGAGGTCACGCCACACACCCTCGATCTCGACC-3' (SEC ID N°: 38), que introducen en un sitio *NdeI* en el extremo en la posición 5' y un sitio *XbaI* en el extremo en la posición 3' de *rapK*. El plásmido pR19 (Schwecke et al., 1995) se usó como un molde. Después de tratamiento con la T4 polinucleótido quinasa usando técnicas convencionales, el producto de PCR se ligó en pUC18 cortado con *SmaI* y se usó para transformar DH10B de *E. coli*. La secuencia de ADN de *rapK* en el plásmido aislado pUCrapK se verificó mediante análisis de secuencias. Las diferencias en la secuencia de ADN en comparación con la secuencia publicada (N° de ref. X86780) se muestran en la Fig 27. Los cambios resultantes en RapK se muestran en la Fig 28.

- 65

Aislamiento de pSGsetraN/O, pSGsetraJ, pSGsetraM, pSGsetraQ, pSGsetraI, pSGsetraK, y pSGsetraL

Los plásmidos pUCrapN/O, pUCrapJ, pUCrapM, pUCrapI, pUCrapL, pUCrapK y pAHL42 se digirieron con *NdeI* y *XbaI* y los fragmentos del inserto, que tienen un tamaño que varía de aproximadamente 1,3 kb a 0,7 kb, se aislaron y se ligaron en pSGset1 digerido de forma idéntica. Las ligaciones se usaron para transformar DH10B de *E. coli* usando procedimientos convencionales y los transformantes se analizaron. Los plásmidos pSGsetraN/O, pSGsetraJ, pSGsetraM, pSGsetraQ, pSGsetraI, pSGsetraK, y pSGsetraL se aislaron y los constructos se verificaron usando digestiones de restricción y análisis de secuencias.

10 *Clonación de rapJ*

El gen *rapJ* se amplificó por PCR usando los cebadores BIOSG10 5'-GGGCATATGAGCACCGAAGCTCAGCAAGAGAGCACGCCACCGCACGCT-3' (SEC ID N°: 46) y BIOSG11 5'-GGGGTCTAGAGGTCACTCCGCTCCCCAGGTGACCCGGAGCTCGGC-3' (SEC ID N°: 47), que introducen un sitio *NdeI* en el extremo en la posición 5' y un sitio *XbaI* en el extremo en la posición 3' de *rapJ*. El plásmido pR19 (Schwecke et al., 1995) se usó como un molde. Después de tratamiento con la T4 polinucleótido quinasa usando técnicas convencionales, el producto de PCR se ligó en pUC18 cortado con *SmaI* y se usó para transformar DH10B de *E. coli*. La secuencia de ADN de *rapJ* en el plásmido aislado pUCrapJ se verificó mediante análisis de secuencias. Las diferencias en la secuencia de ADN en comparación con la secuencia publicada (N° de ref. X86780) se muestran en la Fig 29. Los cambios resultantes en RapJ se muestran en la Fig 30.

Clonación de rapI

El gen *rapI* se amplificó por PCR usando los cebadores BIOSG12 5'-GGGCATATGAGCGCGTCCGTGCAGACCATCAAGCTGCC-3' (SEC ID N°: 48) y BIOSG13 5'-GGGGTCTAGAGGTCAAGCGTCCCCGCGGGCGACGACCT-3' (SEC ID N°: 49), que introducen un sitio *NdeI* en el extremo en la posición 5' y un sitio *XbaI* en el extremo en la posición 3' de *rapI*. El plásmido pAHL2 (proporcionado amablemente por Huai-Lo Lee) se deriva de pUC18 que contiene el gen *rapI* y se usa como un molde. Después de tratamiento con la T4 polinucleótido quinasa usando técnicas convencionales, el producto de PCR se ligó en pUC18 cortado con *SmaI* y se usó para transformar DH10B de *E. coli*. La secuencia de ADN de *rapI* en el plásmido aislado pUCrapI se verificó mediante análisis de secuencias. Las diferencias en la secuencia de ADN en comparación con la secuencia publicada (N° de ref. X86780) se muestran en la Fig 31. Los cambios resultantes en RapI se muestran en la Fig 32.

35 *Clonación de rapQ*

El gen *rapQ* se amplificó por PCR usando los cebadores AHL21 5'-CATATGTTGGAATTGGGTACCCGCCTG-3' (SEC ID N°: 50) y AHL22 5'-TCTAGACGCTCACGCCTCCAGGGTG-3' (SEC ID N°: 51), que introducen un sitio *NdeI* en el extremo en la posición 5' y un sitio *XbaI* en el extremo en la posición 3' de *rapQ*. El plásmido pR19 (Schwecke et al., 1995) se usó como un molde. Después de tratamiento con la T4 polinucleótido quinasa usando técnicas convencionales, el producto de PCR se ligó con pUC18 cortado con *SmaI* y se usó para transformar DH10B de *E. coli*. La secuencia de ADN de *rapQ* en el plásmido aislado pAHL42 se verificó mediante análisis de secuencias. Las diferencias en la secuencia de ADN en comparación con la secuencia publicada (N° de ref. X86780) se muestran en la Fig 33. Los cambios resultantes en RapQ se muestran en la Fig 34.

Aislamiento de pUC18eryBVcas

El gen *eryBV* se amplificó por PCR usando los cebadores casOleG2I (documento de patente WO01/79520) y 7966 5'-GGGGAATTCAGATCTGGTCTAGAGGTCAGCCGGCGTGGCGGGCGCGTG
50 AGTTCCTCCAGTCGCGGGACGATCT-3' (SEC ID N°: 52) y pSG142 (Gaisser et al., 2000) como molde. El fragmento de se clonó usando procedimientos convencionales y el plásmido pUC18eryBVcas se aisló con un sitio *NdeI* que solapa el codón de inicio de *eryBV* y un sitio *XbaI* y *BglII* después del codón de parada. El constructo se verificó mediante análisis de secuencias.

55 *Aislamiento del vector pSGLit1*

El gen *eryBV* se amplificó por PCR usando los cebadores BIOSG1 5'-GGGTCTAGATCCGGACGAACGCATCGATTAATTAAGGAGGACACATA-3' (SEC ID N°: 53) y 7966 5'-GGGGAATTCAGATCTGGTCTAGAGGTCAGCCGGCGTGGCGGGCGCGTGAGTTC CTCCAGTCGCGGGACGATCT-
60 3' (SEC ID N°: 52), que introduce un sitio *XbaI* sensible a la metilación de Dam en el extremo en la posición 5' y un sitio *XbaI* y un sitio *BglII* en el extremo en la posición 3' de *eryBV*. El plásmido pUC18eryBVcas se usó como un molde. Después de tratamiento con la T4 polinucleótido quinasa usando técnicas convencionales, el producto de PCR se ligó con pUC18 cortado con *SmaI* y se usó para transformar DH10B de *E. coli*. El constructo se digirió a continuación usando *BamHI/BglII* y una banda de ADN de aproximadamente 1,3 kb se aisló de un gel de agarosa seguido de la ligación con vector de ADN de Litmus 28 digerido con *BamHI/BglII* usando procedimientos convencionales. El vector pSGLit1 se aisló y la secuencia de ADN del inserto se verificó mediante análisis de

secuencias.

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

5 Los plásmidos pUCrapN/O, pUCrapJ, pUCrapM, pUCrapI, pUCrapL, pUCrapK y pAHL42 se digirieron con *NdeI* y *XbaI* y los fragmentos del inserto que tienen un tamaño que varía de aproximadamente 1,3 kb a 0,7 kb se aislaron y se ligaron en pSGset1 digerido de forma idéntica. Las ligaciones se usaron para transformar DH10B de *E. coli* usando procedimientos convencionales y los transformantes se analizaron. Los plásmidos pSGsetrapN/O, pSGsetrapJ, pSGsetrapM, pSGsetrapQ, pSGsetrapI, pSGsetrapK, y pSGsetrapL se aislaron y los constructos se verificaron usando digestiones de restricción y análisis de secuencias.

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

15 Los plásmidos pSGsetrapN/O, pSGsetrapJ, pSGsetrapM, pSGsetrapQ, pSGsetrapI, pSGsetrapK, pSGsetrapL, y pUC19rapL_{his} se digirieron usando *NdeI/BglII* enzimas de restricción y se aislaron las bandas que varían de aproximadamente 0,7 a 1,3 kb seguido de ligaciones con pSGLit1 digerido con *NdeI/BglII*. Las ligaciones se usaron para transformar ET12567 de *E. coli* y los transformantes se analizaron. Los plásmidos pSGLitrapN/O, pSGLitrapJ, pSGLitrapM, pSGLitrapQ, pSGLitrapI, pSGLitrapK, pSGLitrapL y pSGLitrapL_{his} se aislaron.

Aislamiento de los plásmidos pSGsetrapKI, pSGsetrapKM, pSGsetrapKN/O, pSGsetrapKL, pSGsetrapKQ y pSGrapKJ

20 Los plásmidos pSGLitrapN/O, pSGLitrapJ, pSGLitrapM, pSGLitrapQ, pSGLitrapI, y pSGLitrapL se difirieron usando *XbaI* y los fragmentos quedarían de aproximadamente 0,8 a 1,3 kb se aislaron seguido de ligaciones con pSGsetrapK digerido con *XbaI* y tratado con fosfatasa alcalina usando técnicas convencionales de biología molecular. Las ligaciones se usaron para transformar DH10B de *E. coli* y los transformantes se analizaron. Los plásmidos pSGsetrapKI, pSGsetrapKM, pSGsetrapKN/O, pSGsetrapKL, pSGsetrapKQ y pSGrapKJ se aislaron y la orientación del inserto se verificó mediante análisis de digestión de restricción. Para la adición de rapL_{his} estos constructos se digirieron con *BglII/XbaI* seguido de digestión parcial con *BglII* cuando sea apropiado y los fragmentos de vector aislados se ligaron con el fragmento de *XbaI/BglII* de ~ 1 kb de pSGLitrapL_{his}.

Aislamiento de los plásmidos pSGsetrapKIJ, pSGsetrapKIM y pSGsetrapKIQ

35 Los plásmidos pSGLitrapJ, pSGLitrapM, y pSGLitrapQ se digirieron usando *XbaI* y los fragmentos que varían de aproximadamente 0,8 a 1,3 se aislaron seguido de ligaciones con pSGsetrapKI digerido con *XbaI* y tratado con fosfatasa alcalina usando técnicas convencionales de biología molecular. Las ligaciones se usaron para transformar DH10B de *E. coli* y los transformantes se analizaron. Los plásmidos pSGsetrapKIJ, pSGsetrapKIM, y pSGrapKIQ se aislaron y la orientación del inserto se verificó mediante análisis de digestión de restricción. Para la adición de rapL_{his} estos constructos se digirieron con *BglII/XbaI* seguido de digestión parcial con *BglII* cuando sea apropiado y los fragmentos de vector aislados se ligaron con el fragmento de *XbaI/BglII* de ~ 1 kb de pSGLitrapL_{his}.

Aislamiento de los plásmidos pSGsetrapKN/OI, pSGsetrapKN/OQ, pSGsetrapKN/OM y pSGsetrapKN/OJ.

45 Los plásmidos pSGLitrapI, pSGLitrapM, pSGLitrapJ, y pSGLitrapQ se digirieron usando *XbaI* y los fragmentos que varían de aproximadamente 0,8 a 1,3 se aislaron seguido de ligaciones con pSGsetrapKN/O digerido con *XbaI* y tratado con fosfatasa alcalina usando técnicas convencionales de biología molecular. Las ligaciones se usaron para transformar DH10B de *E. coli* y los transformantes se analizaron. Los plásmidos pSGsetrapKN/OI, pSGsetrapKN/OQ, pSGsetrapKN/OM and pSGrapKN/OJ se aislaron y la orientación del inserto se verificó mediante análisis de digestión de restricción. Para la adición de rapL_{his} estos constructos se digirieron con *BglII/XbaI* seguido de digestión parcial con *BglII* cuando sea apropiado y los fragmentos de vector aislados se ligaron con el fragmento de *XbaI/BglII* de ~ 1 kb de pSGLitrapL_{his}.

Aislamiento de los plásmidos pSGsetrapKJM y pSGsetrapKJQ

55 Los plásmidos pSGLitrapM y pSGLitrapQ se digirieron usando *XbaI* y los fragmentos que varían de aproximadamente 0,8 a 1,1 se aislaron seguido de una ligación con pSGsetrapKJ digerido con *XbaI* y se trataron con fosfatasa alcalina usando técnicas convencionales de biología molecular. Las ligaciones se usaron para transformar DH10B de *E. coli* y los transformantes se analizaron. Los plásmidos pSGsetrapKJM y pSGrapKJQ se aislaron y la orientación del inserto se verificó mediante análisis de digestión de restricción. Para la adición de rapL_{his} estos constructos se digirieron con *BglII/XbaI* seguido de digestión parcial con *BglII* cuando sea apropiado y los fragmentos de vector aislados se ligaron con el fragmento de *XbaI/BglII* de ~ 1 kb de pSGLitrapL_{his}.

Usando la misma estrategia que se ha expuesto anteriormente, se aislaron los siguientes casetes de genes:

65

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

En la Figura 5 se proporciona una visión general.

- 5 Para la adición de rap_{Lhis}, estos constructos de casete se digirieron con *BglII/XbaI* o con *XbaI* seguido de digestión parcial con *BglII* si fuera apropiado y los fragmentos de vectores aislados se ligaron con el fragmento *XbaI/BglII* de aproximadamente 1 kb de pSGLitrap_{Lhis}.

10 Ejemplo 6

Aislamiento de 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina (pre-rapamicina, Figura 6)

15 La 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina (pre-rapamicina) se obtuvo por conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* con pSGsetrapKL y aislando los productos generados como se describe a continuación. Esto demuestra que es posible complementar la supresión de *rapK* y *rapL* en la cepa MG2-10 y que se produce pre-rapamicina, un análogo que carece de modificación post-PKS. La alimentación de ácido pipercolico no es necesaria cuando *rapL* se complementan lo que confirma que *rapL* desempeña un papel en la provisión de ácido pipercolico en la producción de rapamicina.

20 La cepa MG2-10[pSGsetrapKL] de *S. hygroscopicus* se cultivo a partir de una reserva de esporas de trabajo congelada en medio crioconservante (glicerol al 20 %, lactosa al 10 % en p/v en agua destilada) en el Medio 1 (véase Materiales y Métodos) y las esporas se cosecharon después de 14 días de crecimiento a 29 °C. Un pre-cultivo primario se inóculo con las esporas cosechadas y se cultivó en dos matraces Erlenmeyer de 250 ml que contienen 50 ml de Medio 3 (véase Materiales y Métodos), agitados a 250 rpm con un torno de cinco centímetros, a 30 °C, durante dos días. El pre-cultivo primario se usó para inocular dos pre-cultivos secundarios del Medio 2 (véase 25 Materiales y Métodos) y Medio 3, a un 10 % en v/v, que se agitó a 300 rpm con un torno de tres centímetros, a 25 °C, durante un periodo adicional de 24 h. Se prepararon cuatro litros de Medio 4 (véase Materiales y Métodos) y Medio 5 (véase Materiales y Métodos) que contienen antiespuma Pluronic L101 al 0,01 % en v/v (BASF). El Medio de Producción 4 se inoculó con el pre-cultivo secundario en el Medio 2 y el Medio de Producción 5 se inoculó con el 30 pre-cultivo secundario en el Medio 3 a un 10 % en v/v y se permitió que fermentara en un biorreactor agitado de 7 l durante cinco a siete días a 25 °C. El flujo de aire se ajustó a 0,75 w/m y la velocidad de la punta impulsora se controló entre 0,98 ms⁻¹ y 2,67 ms⁻¹. Se añadió Pluronic L101 adicional a demanda.

35 Para confirmar la estructura de la 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina (pre-rapamicina), se extrajeron caldos del Medio 4 y del Medio 5 se extrajeron con acetato de etilo y se redujeron hasta un extracto en bruto por evaporación. Los extractos se desgrasaron en reparto con hexano:metanol:agua y vaporizaron instantáneamente a través de un cartucho de sílice de 70 g partiendo con hexano y acabando con acetona. Las fracciones de pre-rapamicina de cada fermentación se combinaron y se vaporizaron instantáneamente a través de un cartucho de C18 partiendo con agua y acabando con metanol. La pre-rapamicina (8,5 mg) se aisló después de 40 cromatografía sobre Sephadex LH₂₀ usando heptano:cloroformo:etanol como fase móvil. Este compuesto se analizó y la estructura se confirmó totalmente por RMN (Figura 18-20). Los datos de RMN ¹H y ¹³C se proporcionan en la Tabla V que sigue a continuación.

Tabla V: Datos de RMN ¹H y ¹³C para la pre-rapamicina

Posición	δ _H	multiplicidad	acoplamiento	δ _C
1				171,8
2	5,49			52,7
3a	1,76			25,9
3b	2,21			
4a	1,21			20,9
4b	1,75			
5a	1,47			25,0
5b	1,74			

ES 2 544 624 T3

6a	3,27			45,1
6b	3,87	d a.	12,8	
8				171,6
9a	2,46	d	12,8	41,4
9b	3,23	d	12,8	
10				98,9
11	1,60			38,1
12a	1,52			27,6
12b	1,65t			
13a	1,38			31,6
13b	1,53			
14	4,00			71,5
15a	1,48			40,6
15b	1,70			
16	3,95	d a.	8,1	75,5
17				139,2
18	6,39			122,6
19	6,33			128,1
20	6,17	dd	14,3, 10,7	131,4
21	6,04			130,9
22	5,26			138,1
23	2,21			37,2
24a	1,26			39,8
24b	1,64			
25	2,30			45,8
26				215,3
27a	2,42	dd	15,1, 4,7	44,8
27b	2,89	dd	15,1,5,8	
28	4,32	dd	5,5, 4,9	71,4
29				138,6
30	5,26			123,7
31	3,20			45,5
32				208,2
33a	2,58	dd	18,1,4,3	41,5
33b	2,78	dd	18,1,9,6	
34	5,18			76,0
35	1,72			31,9
36a	1,00			37,3
36b	1,07			
37	1,30			33,1
38a	Ax. 0,62	ddd	11,9, 11,9, 11,9	38,2

38b	eq.	1,83			
39		3,24			74,9
40		3,25			75,9
41a		1,28			31,5
41b		1,94			
42a		0,98			32,2
42b		1,61			
43		0,98	d	6,6	16,5
44		1,61	s		14,1
45		1,04	d	6,8	21,3
46		0,95	d	6,8	15,2
47		1,66	d	0,9	14,1
48		0,99	d	6,8	15,7
49		0,89	d	6,6	17,4

† Asignación provisional

Ejemplo 7

Aislamiento de 8-desoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina (pre-prolilrapamicina, Figura 7)

5 La alimentación de la cepa MG2-10[pSEGrpK] de *S. hygroscopicus* con prolina ácida dio como resultado la producción de pre-prolilrapamicina como se describe a continuación. Esto demostraba que en ausencia de *rapL* se incorporan análogos alternativos del ácido pipecólico.

10 La cepa MG2-10[pSGsetrapK] de *S. hygroscopicus* se cultivó en TSBGM alimentado con 1 mg/l de prolina a 25 °C con agitación. Los micelios se extrajeron con metanol y el caldo de cultivo se extrajo con acetato de etilo como se ha descrito anteriormente.

15 El análisis del caldo de cultivo del mutante MG2-10[pSGpetrapK] de *S. hygroscopicus* alimentado con prolina por HPLC con detección UV a 280 nm reveló la presencia de dos nuevos picos principales con tiempos de retención de 4,5 y 4,6 minutos. La espectroscopía de masas con electronebulización de estos picos reveló que ambos iones contenidos correspondían a la un compuesto con un PM de 827,5. ninguno de estos picos se observó en los cultivos de NRRL 5491 de *S. hygroscopicus*, MG1C de *S. hygroscopicus* o MG2-10 de *S. hygroscopicus* sin el plásmido pSGsetrapK de expresión de rapK. El análisis de MS/MS del ión con m/z de 850 (que corresponde al aducto de sodio de la pre-prolilrapamicina) reveló que se fragmentaba en un ión con m/z de 735 que corresponde a la pérdida de m/z de 115 (prolina), o un ión con m/z de 542 que corresponde a la pérdida de m/z de 308 (C27-C41 de la pre-prolilrapamicina). Este ión se fragmentó en sí mismo adicionalmente hasta un ión con m/z de 292, que corresponde a la pérdida de m/z de 250 (C13 a C26 de la pre-prolilrapamicina). Este patrón de fragmentación era idéntico al patrón observado para la rapamicina pero con la primera pérdida de m/z (-115) reducida en 14 que corresponde al cambio del ácido pipecólico a prolina para el aminoácido, la segunda pérdida de m/z (-308) reducida en 14, que corresponde a la ausencia del grupo O-metilo en la posición C38, la tercera pérdida de m/z (-250) reducida en 44, que corresponde a la ausencia de los grupos metoxi en la posición C26 y O-metilo en la posición C15 y el ión final (306) que tiene una masa reducida en 14 que corresponde a la ausencia del grupo cetona en la posición C8 y el cambio de ácido pipecólico a prolina. Esto era una evidencia de que el compuesto con PM de 827,5 representa a la 8-desoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-O-desmetil-prolilrapamicina (pre-prolilrapamicina).

Ejemplo 8

35 *Aislamiento de 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina (39-deshidroxipre-rapamicina, Figura 8)*

40 La alimentación de la cepa MG2-10[pSGsetrapK] de *S. hygroscopicus* con ácido pipecólico y ácido ciclohexano carboxílico dio como resultado la producción de dos compuestos principales, pre-rapamicina que corresponde a la incorporación de la unidad iniciadora natural y 39-deshidroxipre-rapamicina, que corresponde la incorporación de la unidad iniciadora alimentada.

La cepa MG2-10[pSGsetrapK] de *S. hygrosopicus* se cultivó en TSBGM alimentado con 2 mg/l de ácido piperónico y ácido ciclohexano carboxílico 1 mM a 25 °C con agitación. El caldo de cultivo se extrajo con acetato de etilo como se ha descrito anteriormente.

5 El análisis del caldo de cultivo del mutante MG2-10[pSGsetrapK] de *S. hygrosopicus* alimentado con ácido ciclohexano carboxílico por HPLC con detección UV a 280 nm reveló la presencia de un nuevo pico principal con un tiempo de retención de 5,8 minutos. La espectroscopía de masas con electronebulización de este pico reveló que contenía iones que corresponden a un compuesto con un PM de 825,5. estético no se observaba en el cultivo de NRRL5491 de *S. hygrosopicus*, MG1C de *S. hygrosopicus* o MG2-10 de *S. hygrosopicus* sin el plásmido pSGsetrapK de expresión de rapK. El análisis de MS/MS del ión con m/z de 848 (que corresponde al aducto de sodio de la 39-deshidroxi pre-rapamicina) reveló que se fragmentaba en un ión con m/z de 719 que corresponde a la pérdida de m/z de 129 (ácido piperónico), o un ión con m/z de 556 que corresponde a la pérdida de m/z de 292 (C28-C42 de la 39-deshidroxi pre-rapamicina). Este ión se fragmentó en sí mismo adicionalmente hasta un ión con m/z de 306, que corresponde a la pérdida de m/z de 250 (de C14 a C27 de la 39-deshidroxi pre-rapamicina). Este patrón de fragmentación era idéntico al patrón observado para la pre-rapamicina pero con la segunda pérdida de m/z (-292) reducida en 16, que corresponde a la ausencia del grupo hidroxilo en la posición C39. esto era una evidencia de que el compuesto con PM 825,5 representa a la 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina (39-deshidroxi-pre-rapamicina).

20 Ejemplo 9

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

25 La cepa MG2-10 de *S. hygrosopicus* se conjugó con pSGsetrapKIJ como se describe en el Ejemplo 1. La alimentación de esta cepa con ácido piperónico y el aislamiento de los productos producidos en la fermentación dieron como resultado la producción de la 16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina.

30 El plásmido pSGsetrapKIJ (Figura 5) se conjugó en MG2-10 de *S. hygrosopicus* y la cepa se cultivó en TSB GM alimentado con 2 mg/l de ácido piperónico a 25 °C con agitación. Los micelios se extrajeron con metanol y el caldo de cultivo se extrajo con acetato de etilo como se ha descrito anteriormente.

35 El análisis de los extractos del mutante MG2-10[pSGsetrapKIJ] de *S. hygrosopicus* por espectroscopía de masas con electronebulización reveló un nuevo pico principal de tiempo de retención 4,3 minutos que contenía iones que corresponden a un compuesto con un PM de 869. estético no se observó en los cultivos de NRRL 5491 de *S. hygrosopicus*, MG1C de *S. hygrosopicus*, MG2-10 de *S. hygrosopicus* con o sin el plásmido pSGsetrapK de expresión de rapK. El análisis de MS/MS del ión con m/z de 892 (que corresponde al aducto de sodio de 16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina) reveló que se fragmentaba en un ión con m/z de 763 que corresponde a la pérdida de m/z de 129 (ácido piperónico), o un ión con m/z de 570 que corresponde a la pérdida de m/z de 322 (C28-C42 de la 16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina). Este ión se fragmentó en sí mismo adicionalmente hasta un ión con m/z de 320, que corresponde a la pérdida de m/z de 250 (de C14 a C27 de la 16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina). Este patrón de fragmentación era idéntico al patrón observado para la rapamicina pero con la tercera pérdida de m/z (-250) reducida en 44, que corresponde a la ausencia de los grupos metilo en la posición C16 y metoxi en la posición C27. esto era una evidencia de que el compuesto con PM 869 era la 16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina.

45 Ejemplo 10

Alimentación de matriz

50 Se usó la cepa MG2-10[pSGsetrapKI] de *S. hygrosopicus* para realizar una alimentación de matriz. Se prepararon cultivos vegetativos primarios por inoculación del medio con reserva de esporas como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El medio TSB GM se inoculó a un 10 % en v/v usando métodos que se describen en la sección de materiales y métodos. Los siguientes compuestos se añadieron como se indica en la Tabla VI que sigue a continuación.

55

Tabla VI:

	ácido ciclohexano carboxílico (1 mM)	ácido ciclohex-1-eno carboxílico (1 mM)	ácido cicloheptano carboxílico (1 mM)
L-lisina (25,3 mM)	X	X	X
L-prolina (44,7 mM)	X	X	X
ácido DL-piperónico (39,8 mM)	X	X	X

trans-4-hidroxi prolina (13 mM)	X	X	X
cis-4-hidroxi prolina (0,2 mM)	X	X	X

Los cultivos se incubaron, se extrajeron y se midieron usando técnicas que se describen en la sección de Materiales y Métodos. La Tabla VII muestra los resultados del análisis que muestran el ión (m/z) observado para cada combinación de ácido carboxílico y aminoácido de partida:

5

Tabla VII

	ácido ciclohexano carboxílico	ácido ciclohex-1-eno carboxílico	ácido cicloheptano carboxílico
L-lisina	848,5	848,5	862,4
L-prolina	834,5	834,5	848,5
ácido DL-pipecolínico	848,5	848,5	862,4
trans-4-hidroxi prolina	850,5	850,5	864,5
cis-4-hidroxi prolina	850,5	n. d.	864,5

Estos datos demuestran la incorporación de los compuestos alimentados.

10 Ejemplo 11

Complemento de MG2-10 de S.hygroscopicus con fkbO

15 Para evaluar si genes homólogos de *rapK* tales como *fkbO* en *S.hygroscopicus* var. *ascomyeticus* y *S. tsukubaensis*, y *orf5* en el grupo de 'hyg' secuenciado parcialmente (Ruan et al., 1997) cumplen con funciones similares, se realizaron ensayos de complemento usando *fkbO* como se describe a continuación.

Aislamiento de pMG169-1

20 El gen *fkbO* de *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyeticus* (ATCC 14891), un productor de FK520, se amplificó por PCR usando los cebadores *fkbof* 5'-GGGCATATGACCGATGCCGGACGCCA 3' (SEC ID N°: 54) y *fkbbr* 5'-GGGGTCTAGATCAGCCACCATGCCTTCGA 3' (SEC ID N°: 55), que introducen un sitio *NdeI* en el extremo de la posición 5' y un sitio *XbaI* en el extremo en la posición 3' de *fkbO*. Como un molde se usó el ADN genómico aislado de *S.hygroscopicus* var. *ascomyeticus* (ATCC 14891). El producto de PCR amplificado se sometió a digestión con *NdeI* y *XbaI* y se ligó con pSGset1 cortado con *NdeI-XbaI*. La ligación se usó para transformar DH10B de *E.coli* y los transformantes se analizaron usando métodos que se describen en la sección de Materiales y Métodos. El plásmido pMG169-1 se aisló y se verificó por digestión de restricción y MG2-10 de *S.hygroscopicus* se transformó usando métodos que se describen en la sección de Materiales y Métodos.

30 *Complemento heterólogo de rapK con fkbO*

35 Se cultivó MG2-10[pMG169-1] de *S.hygroscopicus* en TSBGM alimentado con 2 mg/l de ácido pipecólico a 25 °C con agitación. El caldo de cultivo y los micelios se extrajeron usando métodos que se describen en la sección de Materiales y Métodos (Método A). El análisis del extracto con detección UV a 280 nm reveló la presencia de dos nuevos picos principales con tiempos de retención de 4,5 y 4,6 minutos. La espectroscopía de masas con electronebulización de estos picos reveló que ambos contenían iones con un PM de 827,5 que corresponden a dos isómeros de la pre-rapamicina (Ejemplo 7).

40 Ejemplo 12

Producción eficaz de 9-desoxo-16-O-desmetil 27-desmetoxi 39-desmetoxi rapamicina (39-deshidroxi pre-rapamicina, Figura 8) en ausencia de competición por unidad iniciadora endógena mediante alimentación a un mutante de

genosupresión de rapK

La capacidad de las cepas MG2-10 y MG2-10[pSGsetrapK] de *S. hygroscopicus* para incorporar una unidad iniciadora diferente, ácido ciclohexano carboxílico, se comparó como se describe a continuación. Cuando se alimenta con ácido ciclohexano carboxílico y ácido pipercolico, MG2-10 producía solamente un compuesto (39-deshidroxi pre-rapamicina) que corresponde a la incorporación de la unidad iniciadora alimentada solamente, mientras que MG2-10[pSGsetrapK] producía dos compuestos en una proporción de 1:1, 39-deshidroxi pre-rapamicina y pre-rapamicina. Esto demostraba que *rapK* es necesaria para la incorporación de la unidad iniciadora endógena natural y una cepa de genosupresión de *rapK* no tenía competición de la unidad iniciadora endógena con la unidad iniciadora alimentada.

La cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* se cultivó en TSBGM alimentado con 2 mg/l de ácido pipercolico y ácido ciclohexano carboxílico 1 mM a 25 °C con agitación. El caldo de cultivo se extrajo con acetato de etilo como se ha descrito anteriormente. El análisis de los extractos por HPLC con detección UV a 280 nm reveló la presencia de un nuevo pico principal con un tiempo de retención de 5,8 min. Sin embargo, la cepa MG2-10[pSGsetrapK] de *S. hygroscopicus* (Ejemplo 4), producía pre-rapamicina (Figura 6) además de 39-deshidroxi pre-rapamicina en una proporción de ~1:1 cuando se alimentaba con ácido ciclohexano carboxílico (Ejemplo 8, Figura 8). De forma sorprendente, la alimentación de ácido ciclohexano carboxílico a la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* dio como resultado un solo producto, 39-deshidroxi pre-rapamicina. El iniciador endógeno, ácido 4,5-dihidroxiclohex-1-eno carboxílico, no se incorporó en ausencia de *rapK*. Por lo tanto no había competición entre la incorporación del ácido carboxílico alimentado y el iniciador endógeno.

Ejemplo 13Elucidación de la función de RapM

Se cultivaron cultivos de TK24 de *Streptomyces lividans*, TK24[pSGsetrapM] de *S. lividans* y TK24[pSGsetrapQ] de *S. lividans* en TSBGM con agitación a 30 °C y se alimentaron con 20 µg/ml de pre-rapamicina. Los controles permanecieron sin alimentar. Después de un periodo de incubación adicional de 5 días, los cultivos se extrajeron con acetato de etilo y se llevaron a sequedad. La reconstitución y el análisis por LC-MS no identificaban producción de análogos de rapamicina en los controles sin alimentar. Se identificaron dos nuevos picos principales en el extracto de TK24[pSGsetrapM] de *S. lividans* alimentada con pre-rapamicina, uno a 2,5 min y uno a 7,9 min. La espectroscopía de masas con electronebulización de estos picos reveló que ambos contenían iones que corresponden a un compuesto con un PM de 855,6, coherente con la 9-desoxo-16-O-metil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina (16-O-metil-pre-rapamicina). Normalmente se observaban dos isómeros cuando los extractos se analizaban con LC-MS en ausencia de TFA. No se identificaron nuevos picos en los extractos de TK24 de *S. lividans* o TK24[pSGsetrapQ] de *S. lividans*. La pre-rapamicina sin modificar era claramente evidente. RapM era claramente responsable de la metilación en el hidroxilo en la posición C16, RapQ no era específico para este sitio.

Ejemplo 14Elucidación de la función de RapJ

Se cultivaron cultivos de TK24 de *S. lividans*, TK24[pSGsetrapK] de *S. lividans*, TK24[pSGsetrapJ] de *S. lividans* y TK24[pSGsetrapKJ] de *S. lividans* en TSBGM con agitación a 30 °C y se alimentaron con 40 µg/ml de pre-rapamicina. Los controles permanecieron sin alimentar. Después de un periodo de incubación adicional de 5 días, los cultivos se extrajeron con acetato de etilo y se llevaron a sequedad. La reconstitución y el análisis por LC-MS no identificaban producción de análogos de rapamicina en los controles sin alimentar. Se identificó un nuevo pico principal a 4,9 en los extractos de TK24[pSGsetrapKJ] de *S. lividans* y TK24[pSGsetrapJ] de *S. lividans* alimentados con pre-rapamicina. La espectroscopía de masas con electronebulización de este pico reveló que contenía iones que corresponden a un compuesto con un PM de 855,5, coherente con la 16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina (C9 oxo- pre-rapamicina). En extractos de TK24 de *S. lividans* y TK24[pSGsetrapK] de *S. lividans* alimentados con pre-rapamicina, no se identificaron nuevos picos. La pre-rapamicina sin modificar era claramente evidente.

Debido a la homología de RapJ con FkbD del grupo FK506 y FK520, se ha postulado que RapJ oxida a la pre-rapamicina en C9 en 9-hidroxi-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina (C9 OH-pre-rapamicina). Se ha postulado que RapK es responsable de la conversión adicional en la cetona. De forma sorprendente, en presencia de RapJ, pero en ausencia de RapK, se formó 16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina (C9 ceto-pre-rapamicina). RapJ tiene claramente una función oxidante en C9, se observó la conversión completa en la cetona. RapK no tiene una función oxidante en C9.

Ejemplo 15

Se construyeron plásmidos que contienen las siguientes combinaciones de genes que modifican la rapamicina como se describe a continuación: pMG260 (rapI, rapJ, rapN, rapO, y rapL), pMG261 (rapI, rapJ, rapN, rapO, rapM y rapL),

pMG262 (rapI, rapJ, rapN, rapO, rapM, rapQ y rapL) pMG236 (rapN, rapO, rapQ y rapL) y pMG238 (rapJ y rapL).

Aislamiento de los plásmidos pMG236 y pMG238

5 Los plásmidos pSGsetrapNOQ y pSGsetrapJ se digirieron usando BgIII/XbaI y los fragmentos de vector aislado se ligaron con el fragmento de pSGLitrapL_{his} de XbaI/BgIII de 1 kb. Se aislaron los plásmidos pMG236 (que expresan rapN, rapO, rapQ y rapL) y pMG238 (que expresa rapJ y rapL) respectivamente.

Aislamiento de los plásmidos pMG260, pMG261 y pMG262

10 Los plásmidos pSGSetrapKIJNOL, pSGSetrapKIJMNOQL, y pSGSetrapKIJMNOQL se digirieron usando BgIII y los fragmentos del inserto aislado (que contienen los genes del grupo de rapamicina del sitio BgIII en rapI al sitio BgIII después de rapL) se ligaron con el fragmento de pSGSetrapI que contiene vector digerido con BgIII. Se aislaron los plásmidos pMG260 (que expresan rapI, rapJ, rapN, rapO, y rapL), pMG261 (que expresa rapI, rapJ, rapN, rapO, rapM y rapL), y pMG262 (que expresa rapI, rapJ, rapN, rapO, rapM, rapQ y rapL).

Ejemplo 16

20 Se construyó un mutante (MG3) de *S.hygroscopicus* que porta la supresión cromosómica de rapK como se describe a continuación. a continuación, el complemento heterólogo de rapK con *fkbO* se puede realizar como se describe y dará como resultado la restauración de la producción de rapamicina lo que demuestra que *fkbO* es capaz de complementar la función de *rapK* en *S. hygroscopicus*.

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

25 Los cebadores RAPKF1 5'-CAAAGCTTCCTGGCGCGGTTCCGGCCGGCA-3' (SEC ID N°: 56) y RAPKF2 5'-TGGCATGCCCTTCCCCGCCGTTCCCTGGC-3' (SEC ID N°: 57) se usaron para amplificar la región izquierda de homología fuera del gen rapK (a partir del nt 94403 al nt 95429 en el grupo de rapamicina como se describe en Schwecke et al., 1995) usando ADN genómico preparado a partir de la cepa NRRL5491 de *S.hygroscopicus* como un molde. El producto de PCR de 1 kb se fosforiló usando la T4 polinucleótido quinasa y se ligó en pUC18 cortado con SmaI desfosforilado. Después de transformación en DH10B de *E.coli*, el plásmido pMG233-7 se aisló. Los cebadores RAPKR1 5'-TGGCATGCCCGCCGAGCTGACCTGGAA-3' (SEC ID N°: 58) y RAPKR2 5'-GTTCTAGAGCTTACGCGTGATGTCGAACG-3' (SEC ID N°: 59) se usaron para amplificar la región derecha de homología fuera del gen rapK (a partir del nt 96435 al nt 97428 en el grupo de rapamicina como se describe en Schwecke et al., 1995) usando ADN genómico preparado a partir de la cepa NRRL5491 de *S.hygroscopicus* como un molde. El producto de PCR de 1 kb se fosforiló usando la T4 polinucleótido quinasa y se ligó en pUC18 cortado con SmaI desfosforilado. Después de transformación en DH10B de *E.coli*, el plásmido pMG257-7 se aisló. Ambos plásmidos se comprobaron mediante análisis de secuencias. El plásmido pMG233-7 se digirió con *SphI/XbaI* y el fragmento de 3,7 kb se aisló, pMG257-7 se digirió con *SphI/XbaI* y el fragmento de 1 kb se aisló. Estos fragmentos se ligaron y se usaron para transformar DH10B de *E.coli*. El plásmido pMG268-12 se aisló. Este plásmido se digirió con *HindIII/XbaI* el fragmento de 2 kb se aisló y se ligó en pMG55 cortado con *HindIII/XbaI* y el ADN se usó para transformar DH10B de *E.coli*. El plásmido pMG278-1 se aisló y se usó para conjugar la cepa MG1C de *S.hygroscopicus*.

45 Una colonia resistente a apramicina se aísla, y se cultiva durante 24 horas en TSBGM con agitación para 30 °C y se extiende en placas de agar de medio 1 que contienen 50 ug/l de estreptomina. Las colonias resistentes a estreptomina se aíslan y se muestra que son sensibles a la apramicina. La supresión del cromosoma de 1004 nt de rapK se puede verificar en el mutante MG3 por transferencia de Southern. En la Figura 35 se proporciona una visión general.

50 La cepa MG3 de *S.hygroscopicus* se cultiva en TSBGM a 26 °C con agitación. El caldo de cultivo y los micelios se extraen usando métodos que se describen en la sección de Materiales y Métodos. El análisis del extracto con detección UV no revela la presencia de picos con el trieno característico de la rapamicina.

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

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

60 *Complemento heterólogo de rapK con fkbO*

65 La cepa MG3pMG169-1 de *S.hygroscopicus* se cultiva en TSBGM a 26 °C con agitación. El caldo de cultivo y los micelios se extraen usando métodos como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El análisis del extracto con detección UV a 280 nm revela la presencia de dos nuevos picos principales. La espectroscopía de masas con electronebulización de estos picos revela que éstos contienen iones con un PM de 913 que corresponde a la rapamicina.

Ejemplo 17

Aislamiento y complemento heterólogo del mutante MG4 de S.hygroscopicus var ascomyceticus que porta la supresión cromosómica de fkbO

5 Aislamiento del mutante MG4 de *S.hygroscopicus var ascomyceticus* que porta la supresión cromosómica de fkbO

Los cebadores FKOF1 5'-GCTCTAGAGCCC GCGGCTCGCCGGACACG-3' (SEC ID N°: 60) y FKOF2 5'-CCCCTGCAGGCGTCCGGCATCGGTCATCAG-3' (SEC ID N°: 61) se usaron para amplificar la región izquierda de homología (a partir del nt 45750 hasta el nt 46751 en el grupo de ascomicina como se describe en Wu et al., 2000) usando ADN genómico preparado a partir del N° 14891 de la ATCC de *S.hygroscopicus var ascomyceticus* como un molde. El producto de PCR de 1 kb se fosforiló usando la T4 polinucleótido quinasa y se ligó en pUC18 cortado con SmaI defosforilado. Después de transformación en *E.coli*, DH10B, el plásmido pMG258-4 se aisló. Los cebadores FKOR1 5'-CGCCTGCAGGGATACGGTCCGCGGGTCTGC-3' (SEC ID N°: 62) y FKOR2 5'-CCAAGCTTGACGGTTCGCCACGGGCGTGC-3' (SEC ID N°: 63) se usaron para amplificar la región derecha de homología (a partir del nt 47785 hasta el nt 48781 en el grupo de rapamicina como se describe en Wu et al., 2000) usando ADN genómico preparado a partir del N° 14891 de la ATCC de *S.hygroscopicus var ascomyceticus* como un molde. El producto de PCR de 1 kb se fosforiló usando la T4 polinucleótido quinasa y se ligó en pUC18 cortado con SmaI defosforilado. Después de transformación en DH10B de *E coli*, el plásmido pMG259-5 se aisló. Ambos plásmidos se comprobaron mediante análisis de secuencias. El plásmido pMG258-4 se digirió con SbfI/HindIII y el fragmento de 3,7 kb se aisló, pMG259-5 se digirió con SbfI/HindIII y se aisló el fragmento de 1 kb. Estos fragmentos se ligaron y se usaron para transformar DH10B de *E.coli*. El plásmido pMG265-1 se aisló. Este plásmido se digirió con HindIII/EcoRI y se aisló el fragmento de 2 kb y se ligó en pMG55 cortado con HindIII/EcoRI y el ADN se usó para transformar DH10B de *E.coli*. El plásmido pMG267-1 se aisló y se usó para conjugar del N° 14891 de la ATCC de *S.hygroscopicus var ascomyceticus*.

Una colonia resistente a apramicina se aísla y se cultiva durante 24 horas en TSBGM con agitación a 30 °C y se extiende en placas de agar de medio 1 que contienen 50 ug/l de estreptomina. Las colonias resistentes a estreptomina se aíslan y se muestra que son sensibles a la apramicina. La supresión cromosómica del nt 1034 de fkbO se puede verificar en el mutante MG4 por transferencia de Southern. En la Figura 36 se proporciona una visión general.

Expresión de RapK en el mutante MG4 de S.hygroscopicus var ascomyceticus que porta a la supresión cromosómica de fkbO

35 El plásmido pSGsetRapK se transforma en mutante MG4 de *S.hygroscopicus* como se describe en la sección Materiales y Métodos.

Complemento heterólogo de fkbO con rapK

40 La cepa MG4 pSGSetRapK de *S.hygroscopicus var ascomyceticus* se cultiva en TSBGM a 26 °C con agitación. El caldo de cultivo y los micelios se extraen usando métodos que se describen en la sección de Materiales y Métodos. El extracto se analiza por LC-MS para revelar la presencia de un nuevo pico principal y para revelar que este contiene iones que corresponden a FK520 (ascomicina).

Ejemplo 18

Para los expertos en la materia es evidente que otros grupos biosintéticos que codifican ligandos de FKBP por ejemplo, FK506, se puede modificar de modo que el homólogo de rapK se suprime o se inactiva usando los métodos que se describen en el presente documento. En FK506, por ejemplo, esto se podría realizar por amplificación de los productos de PCR frente a las regiones de cualquier lado del gen fkbO (número de referencia de la secuencia AF082099, AF082100), ligando éstos en conjunto en un vector tal como pMG55, transformando la cepa que produce FK506, seleccionando el doble entrecruzamiento y confirmando la retirada del gen fkbO mediante transferencia de Southern.

Ejemplo 19

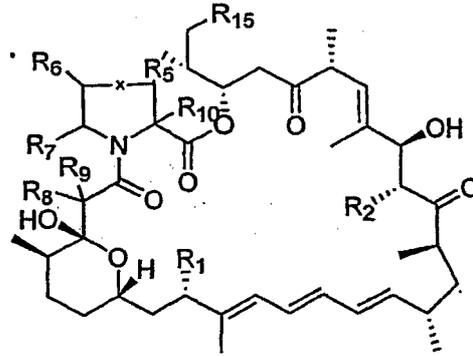
Incorporación de unidades iniciadoras no naturales por la cepa de supresión de rapK, MG2-10 de S. hygroscopicus, en análogos de rapamicina en ausencia de competición por unidad iniciadora natural endógena.

60 Como se demuestra en los ejemplos 10 y 12, el de PKS de rapamicina tiene un alto grado de flexibilidad hacia unidades iniciadoras no naturales y en ausencia de rapK, el sistema está libre de competición del iniciador natural. En este ejemplo, el grado de flexibilidad se demuestra adicionalmente.

65 Se cultivó MG2-10 de *S. hygroscopicus*, se alimentó y se extrajo de acuerdo con los métodos de alimentación, extracción y análisis que se exponen en Materiales y Métodos (Método B). El intervalo de ácidos carboxílicos

alimentados junto con los compuestos generados se enumera a continuación. De forma sorprendente, todos los ácidos carboxílicos enumerados se incorporaron como se determina mediante la observación del cromóforo de UV característico a 278 nm y espectrometría de masas con electronebulización y dio como resultado la producción de análogos de rapamicina.

5 Los análogos de rapamicina generados correspondían a la fórmula que sigue a continuación como se describe en la Tabla VIII:



10 R₁₆ = OH
 R₁₇ = H, OH, halo, tiol, alquilo
 y = enlace, CH₂
 R₁₅ =

15

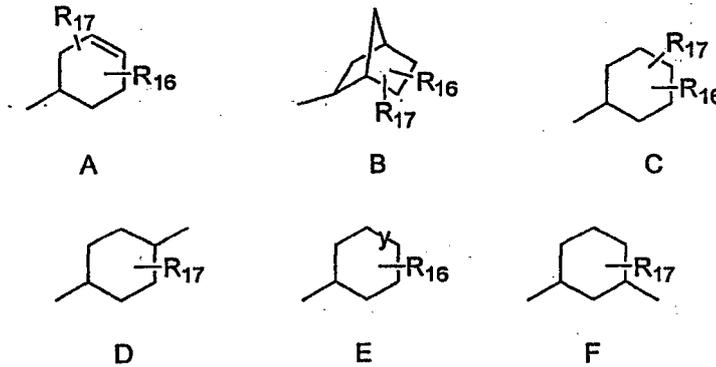


Tabla VIII

Unidad iniciadora de ácido carboxílico alimentada.	M-H	[M+K]	Compuesto generado
ácido ciclohexano carboxílico	824,7	864,6	R ₁₅ = E, R ₁₆ = 4-OH, y = enlace, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
ácido 3- <i>cis</i> ,4- <i>trans</i> -dihidroxiciclohexano carboxílico	840,5	880,4	R ₁₅ = C, R ₁₆ = 3- <i>cis</i> -OH, R ₁₇ = 4- <i>trans</i> -OH, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
ácido 1-ciclohexeno carboxílico	824,4	864,3	R ₁₆ = E, R ₁₆ = 3-OH, y = enlace, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂

ES 2 544 624 T3

ácido 3-ciclohexeno carboxílico	840,5	880,4	R ₁₅ = C, R ₁₆ = OH, R ₁₇ = OH, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
	822,4	862,3	R ₁₅ = A, R ₁₆ = OH, R ₁₇ = H, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
ácido cicloheptano carboxílico	838,4	878,3	R ₁₅ = E, R ₁₆ = OH, y = CH ₂ , en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
carboxilato de metil 2-norbornano	836,2	876,2	R ₁₅ = B, R ₁₆ = OH, R ₁₇ = H, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
ácido 3-hidroxiciclohexano carboxílico	824,7	864,6	R ₁₅ = E, R ₁₆ = 3-OH, y = enlace, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
ácido 4-hidroxiciclohexano carboxílico	824,6	864,6	R ₁₅ = E, R ₁₆ = 4-OH, y = enlace, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
ácido 3-metilciclohexano carboxílico	838,4	878,3	R ₁₆ = F, R ₁₇ = OH, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
ácido 4-metilciclohexano carboxílico	838,4	878,3	R ₁₅ = D, R ₁₇ = OH, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
ácido 3-(<i>cis/trans</i>)metoxiciclo hexano carboxílico	824,3	864,2	R ₁₅ = E, R ₁₆ = 3-OH, y = enlace, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
ácido 4-(<i>cis/trans</i>)metoxiciclo hexano carboxílico	824,2	864,2	R ₁₅ = E, R ₁₆ = 4-OH, y = enlace, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = -H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
carboxilato de etil 4-ciclohexanona	824,3	864,2	R ₁₅ = E, R ₁₆ = 4-OH, y = enlace, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₈ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₉ = H, x = CH ₂
ácido 3-fluoro-4-hidroxi ciclohexano carboxílico y ácido 4-fluoro-3-hidroxi ciclohexano carboxílico	843,0	882,0	R ₁₅ = C, R ₁₆ = OH, R ₁₇ = F, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂

óxido de 3-ciclohexano	841,0	880,8	R ₁₅ = C, R ₁₆ = 3- <i>cis</i> -OH, R ₁₇ = 4- <i>trans</i> -OH, en
ácido carboxílico			combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, R ₁₁ = H, R ₁₂ = H, R ₁₃ = H, R ₁₄ = H, x = CH ₂
ácido 3,4- <i>cis</i> -dihidroxiciclohexano carboxílico	841,2	881,1	R ₁₅ = C, R ₁₆ = 3- <i>cis</i> -OH, R ₁₇ = 4- <i>cis</i> -OH, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
	841,2	881,1	R ₁₅ = C, R ₁₆ = 3- <i>trans</i> -OH, R ₁₇ = 4- <i>trans</i> -OH, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
ácido 3-cloro-4-hidroxi ciclohexano carboxílico y ácido 4-cloro-3-hidroxi ciclohexano carboxílico (y el par de diastereómeros opuestos)	858,8	898,8	R ₁₅ = C, R ₁₆ = OH, R ₁₇ = Cl, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
ácido ciclohexilpropiónico	825,0	864,9	R ₁₅ = C, R ₁₆ = 3- <i>cis</i> -OH, R ₁₇ = 4- <i>trans</i> -OH, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂ TBC

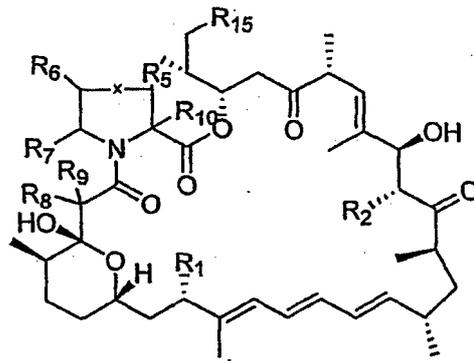
Ejemplo 20

5 *Incorporación de unidades iniciadoras no naturales por la cepa de supresión de rapK, MG2-10[pSGsetrapN/OQL_{his}] de S. hygroscopicus, en análogos de rapamicina en ausencia de competición por unidad iniciadora natural endógena.*

10 Como se demuestra en los ejemplos 10, 12 y 19, el PKS de rapamicina tiene un alto grado de flexibilidad hacia unidades iniciadoras no naturales y en ausencia de rapK, el sistema está libre de competición del iniciador natural. En este ejemplo, el grado de flexibilidad se demuestra adicionalmente.

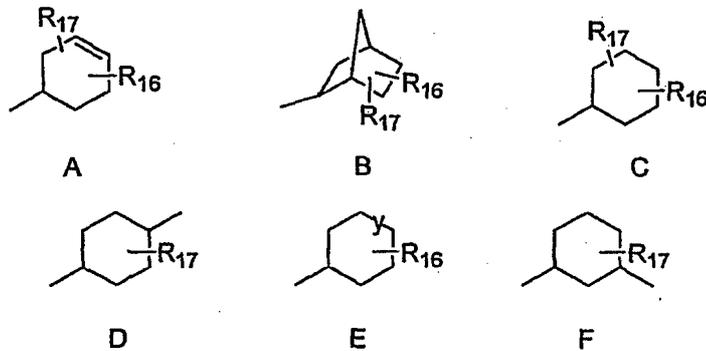
15 Se cultivó MG2-10[pSGsetrapN/OQL_{his}] de *S. hygroscopicus*, se alimentó y se extrajo de acuerdo con los métodos de alimentación, extracción y análisis que se exponen en Materiales y Métodos (Método B). El intervalo de ácidos carboxílicos alimentados junto con los compuestos generados se enumera a continuación. De forma sorprendente, todos los ácidos carboxílicos enumerados se incorporaron como se determina mediante la observación del cromóforo de UV característico a 278 nm y espectrometría de masas con electronebulización y dio como resultado la producción de análogos de rapamicina.

20 Los análogos de rapamicina generados correspondían a la fórmula que sigue a continuación como se describe en la Tabla IX:



R₁₆ = OH
 R₁₇ = H, OH, halo, tiol, alquilo y = enlace, CH₂
 R₁₅ =

5



10

Tabla IX

Unidad iniciadora de ácido carboxílico alimentada.	M-H	[M+K]	Compuesto generado
ácido ciclohexano carboxílico	840,4	880,4	R ₁₅ = E, R ₁₆ = 4-OH, y = enlace, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = OH, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
ácido 3- <i>cis</i> ,4- <i>trans</i> -dihidroxiciclohexano carboxílico	840,4	880,4	R ₁₅ = C, R ₁₆ = 3- <i>cis</i> -OH, R ₁₇ = 4- <i>trans</i> -OH, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
	856,4	896,4	R ₁₅ = C, R ₁₆ = 3- <i>cis</i> -OH, R ₁₇ = 4- <i>trans</i> -OH, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = OH, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
ácido 1-ciclohexeno carboxílico	824,4	864,4	R ₁₅ = E, R ₁₆ = 3-OH, y = enlace, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
	840,4	880,4	R ₁₅ = E, R ₁₆ = 3-OH, y = enlace, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = OH, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
ácido 3-ciclohexeno carboxílico	840,4	880,4	R ₁₅ = C, R ₁₆ = OH, R ₁₇ = OH, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂

ácido 3-ciclohexeno carboxílico	822,4	862,4	R ₁₅ = A, R ₁₆ = OH, R ₁₇ = H, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
	840,4	880,4	R ₁₅ = A, R ₁₆ = OH, R ₁₇ = H, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = OH, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
ácido cicloheptano carboxílico	854,4	894,4	R ₁₅ = E, R ₁₆ = OH, y = CH ₂ , en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = OH, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
ácido metil-2-norbornano carboxílico	852,4	892,4	R ₁₅ = B, R ₁₆ = OH, R ₁₇ = H, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = OH, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
ácido 3-hidroxiciclohexano carboxílico	824,4	864,4	R ₁₅ = E, R ₁₆ = 3-OH, y = enlace, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
ácido 4-hidroxiciclohexano carboxílico	840,4	880,4	R ₁₅ = E, R ₁₆ = 4-OH, y = enlace, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
	824,4	864,4	R ₁₆ = E, R ₁₆ = 4-OH, y = enlace, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = OH, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
ácido 4-metilciclohexano carboxílico	838,4	878,4	R ₁₆ = D, R ₁₇ = OH, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = H, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂
	854,4	894,4	R ₁₅ = D, R ₁₇ = OH, en combinación con R ₁ = OH, R ₂ = OH, R ₅ = H, R ₆ = H, R ₇ = H, R ₈ = H, R ₉ = H, R ₁₀ = H, x = CH ₂

Ejemplo 20

5 *incorporación de unidades iniciadoras no naturales por la cepa de supresión de rapK, MG3 de S. hygrosopicus, en análogos de rapamicina en ausencia de competición por unidad iniciadora natural endógena.*

Como se demuestra en los ejemplos 10, 12 y 19, el PKS de rapamicina tiene un alto grado de flexibilidad hacia unidades iniciadoras no naturales y en ausencia de rapK, el sistema está libre de competición del iniciador natural. En este ejemplo, el grado de flexibilidad se demuestra adicionalmente.

10 Se cultiva MG3 de *S. hygrosopicus*, se alimenta y se extrae de acuerdo con los métodos de alimentación, extracción y análisis que se exponen en Materiales y Métodos (Método B). El intervalo de ácidos carboxílicos alimentados que se puede alimentar se enumera a continuación. La incorporación de los ácidos carboxílicos enumerados y la producción de análogos de rapamicina se determinan mediante la observación del cromóforo de UV característico a 278 nm y espectrometría de masas con electronebulización.

15 Las unidades iniciadoras de ácido carboxílico que se pueden alimentar incluyen, ácido ciclohexano carboxílico, ácido 3-*cis*,4-*trans*-dihidroxiciclohexano carboxílico, ácido 1-ciclohexeno carboxílico, ácido 3-ciclohexeno carboxílico, ácido cicloheptano carboxílico, carboxilato de metil 2-norbornano, ácido 3-hidroxiciclohexano carboxílico, ácido 4-hidroxiciclohexano carboxílico, ácido 3-metilciclohexano carboxílico, ácido 3-metilciclohexano carboxílico, ácido 3-*(cis/trans)*metoxiciclohexano carboxílico, ácido 4-*(cis/trans)*metoxiciclohexano carboxílico, carboxilato de etil 4-ciclohexanona, ácido 3-fluoro-4-hidroxicarboxílico y ácido 4-fluoro-3-hidroxicarboxílico, óxido de 3-ciclohexano ácido carboxílico, ácido 3,4-*cis*-dihidroxiciclohexano carboxílico, ácido 3-cloro-4-hidroxicarboxílico y ácido 4-cloro-3-hidroxicarboxílico (y el par de diastereómeros opuestos), ácido ciclohexilpropiónico y ácido 4-*terc*-butilciclohexano carboxílico

Ejemplo 21

Incorporación de unidades iniciadoras no naturales mediante la cepa de supresión de *fkbO*, *S. hygroscopicus* var. *ascomyeticus* MG4, en análogos de FK520 en ausencia de competición mediante unidad iniciadora natural endógena.

Como se demuestra en los ejemplos 10, 12, 19 y 20, el PKS de rapamicina tiene un alto grado de flexibilidad para unidades iniciadas no naturales. En ausencia de *fkbO*, el sistema FK520 está libre de competición del iniciador natural. En este ejemplo, se investiga el grado de flexibilidad de FK520 PKS, libre de competición del iniciador natural.

Se cultiva de *S. hygroscopicus* var. *ascomyeticus* MG4, se alimenta y se extrae de acuerdo con los métodos de alimentación, extracción y análisis que se exponen en Materiales y Métodos (Método B). En la Tabla IV se proporcionan algunos ejemplos del intervalo de ácidos carboxílicos que se pueden alimentar. La incorporación de los ácidos carboxílicos enumerados y la producción de análogos de FK520 se determinan mediante espectrometría de masas con electronebulización.

Ejemplo 22

Incorporación de ácidos iniciadores naturales en análogos de FK506 mediante un mutante de supresión de *fkbO* de *S. tsukubaensis* en ausencia de competición del iniciador natural.

Se cultiva un mutante de supresión de *fkbO* de *S. tsukubaensis* y se alimenta de acuerdo con los métodos de alimentación que se exponen en Materiales y Métodos. Se alimenta un subconjunto de los ácidos carboxílicos enumerados en la Tabla IV en Materiales y Métodos. El análisis se realiza como se describe en el Método (B) de Materiales y Métodos.

Ejemplo 23

Aislamiento del producto de fermentación de MG2-10[pSGsetrapKIL_h] de *S. hygroscopicus*

Se obtuvo 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina por conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* con pSGsetrapKIL_h y aislando los productos de fermentación generados como se describe a continuación. Esto demuestra que es posible complementar la supresión de *rapK*, *rapI* y *rapL* en la cepa de MG2-10 y que se produce la 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina, un análogo que carece de las modificaciones post-PKS. La alimentación del ácido pipercolico no es necesaria cuando se complementa *rapL* confirmando que *rapL* desempeña un papel en la provisión de ácido pipercolico en la producción de rapamicina.

Se fermentó MG2-10 [pSGsetKIL_{his}] de *S. hygroscopicus* (véase Materiales y Métodos), se extrajo y se aisló usando el método (B) como se expone en Materiales y Métodos. El sistema de disolvente isocrático usado para HPLC preparativa fue CH₃CN/H₂O al 60 %.

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

Rendimiento aislado: 22 mg
 Peso molecular: 856
 Fórmula molecular: C₄₉H₇₇NO₁₁
 UV (con detección de matriz de diodo durante el análisis de HPLC): 268 nm, 278 nm, 288 nm
 Electronebulización MS: m/z para MNa⁺ = 878, m/z para M-H = 854

La Tabla X que sigue a continuación resume los datos de RMN ¹H y ¹³C para la 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi rapamicina en CDCl₃.

Tabla X

Protón	δ_H		multiplicidad	acoplamiento	δ_C	
1					169,0	171,5
2	4,37	5,40			55,6	52,5
3a	1,51	1,75 ^a			26,5	26,3
3b	2,40	2,19				
4a						20,9

ES 2 544 624 T3

4b									
5a	1,30	1,48							25,1
5b	1,68	1,72							
6a	4,45	3,26						39,0	44,4
6b	2,16	3,83							
8								171,7	172,4
9a	2,41	2,54						38,7	40,2
9b	2,67	2,89							
10								98,4	99,7
10-OH	6,62	5,34	s. a						
11	1,37	1,51						38,7	38,7
12a	1,67	1,62						27,3	27,6
12b	1,48	1,48							
13a	1,29	1,32							
13b									
14	4,21	3,87						71,3	69,6
15a	1,47 ^b	1,50							
15b	1,66	1,65							
16	4,21	4,06	dd					76,0	75,6
17								141,6	138,4
18	6,08	6,22	d	d	11,2	11,2		122,5	125,0
19	6,38	6,31	dd	dd	14,0, 11,2	14,7, 11,2		128,6	127,7
20	6,01	6,17		dd				14,5, 10,5	131,1
21	6,04	6,04							130,3
22	5,18	5,30	dd	dd	14,1,9,1	14,9, 9,3		139,4	139,1
23	2,11	2,15						39,5	37,3
24a	1,34	1,35						40,3	40,3
24b	1,68	1,67							
25	2,43	2,44						45,5	46,3
26								215,2	216,1
27a	2,53	2,60						46,7	47,9
27b	2,65	2,43							
28	4,33	4,39	dd		7,9, 3,2			71,7	71,9
29								139,6	139,6
30	5,36	5,45		d			9,9	123,7	125,4

ES 2 544 624 T3

31		3,24	3,37						46,4	45,6
32									209,0	209,1
33a		2,63	2,63						39,4	39,4
33b		2,95	2,95							
34		5,13	5,38						76,0	74,2
35		1,93	1,98 ^b						32,7	32,7
36a		1,04	1,03						37,8	39,8
36b		1,17	1,16							
37		1,34	1,38						33,2	33,2
38a	ax.	0,61	0,73	ddd	ddd	11,9, 11,9, 11,9	11,9, 11,9, 11,9		33,9	34,5
38b	eq.	2,04	2,09							
39		2,90	2,91						84,5	84,4
40		3,37	3,37						73,8	73,8
41a		1,31	1,31						31,2	31,2
41b		1,97	1,97							
42a		0,97	0,97						31,7	31,7
42b										
43		0,93	0,93	d	d	6,5	6,5		16,8 ^c	16,9 ^c
44		1,78	1,63	s	s				15,6	12,7
45		0,98	1,00						21,7	21,7
46		1,00	1,02						16,7	19,1
47		1,58	1,48	s	s				13,1	11,7
48		1,07	1,00	d		6,9			16,2	14,6
49		0,89	0,89	d	d	6,8	6,8		14,6 ^d	15,2 ^d
50		3,37	3,37	s	s				56,5	56,5

a: se puede asignar en lugar de H4a
b: asignación provisional
c: la asignación se puede intercambiar
d: la asignación se puede intercambiar

El compuesto 6 existe como una mezcla 1:1 de confómeros en CDCl₃. Los datos mencionados anteriormente son para ambos confómeros. Cuando se ha dibujado una línea de puntos a través de la tabla no era posible determinar la conectividad entre sistemas de espín, por lo tanto, la asignación de datos a un confómero en particular no es posible.

Ejemplo 24

Aislamiento de producto a partir de fermentación de MG2-10[pSGsetrapKIMLh] de S. hygroscopicus

Se obtuvo 9-desoxo-27-desmetoxi-rapamicina por conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* con pSG-setKIML_{his} como se describe en el Ejemplo 1 y aislando los productos producidos en la fermentación. Esto demostró que era posible complementar la supresión de *rapK*, *rapI*, *rapM* y *rapL* en la cepa MG2-10 con la producción de un análogo de rapamicina que carece de alguna modificación post-PKS.

ES 2 544 624 T3

Se fermentó MG2-10 [pSGsetKIML_{his}] de *S. hygroscopicus* (véase Materiales y Métodos), se extrajo y se aisló usando el método (B) como se expone en Materiales y Métodos.

El sistema de disolvente isocrático usado para HPLC preparativa fue CH₃CN/H₂O al 75 %. La 9-desoxo-27-desmetoxi rapamicina (Compuesto 16) tiene las siguientes características:

5

Rendimiento aislado: 24 mg

Peso molecular: 870

Fórmula molecular: C₅₀H₇₉NO₁₁

UV (con detección de matriz de diodo durante el análisis de HPLC): 268 nm, 278 nm, 288 nm

10

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

La Tabla XI que sigue a continuación resume los datos de RMN ¹H y ¹³C para 9-desoxo-27-desmetoxi rapamicina en CDCl₃

<u>Tabla XI</u>				
Posición	δ _H	multiplicidad	acoplamiento	δ _C
1				171,0
2	5,37	m		52,0
3a	1,73	m		26,8
3b	2,22	m		
4a	1,39	m		20,5
4b	1,73	m		
5a	1,56	m		25,1
5b	1,77	m		
6a	3,34	m		43,5
6b	3,85	d a.	12,9	
8				173,4
9a	2,43	d	14,4	38,8
9b	2,74	d	14,4	
10				98,0
10-OH	6,02	s		
11	1,43	m		39,1
12a	1,44	m		27,5
12b	1,58	m		
13a	1,28	m		32,2
13b	1,45	m		
14	3,61	m		65,8
15a	1,55	m		38,6
15b	1,64	m		
16	3,70	dd	10,8, 4,7	84,5
17				134,8
18	5,98	d	9,2	130,8
19	6,34	m		126,9
20	6,32	m		133,1
21	6,11	dd	15,3, 9,0	130,6
22	5,46	dd	15,2, 8,6	139,3
23	2,22	m		35,7
24a	1,28	m		40,2
24b	1,49	m		
25	2,58	m		44,8
26				215,0
27a	2,65	m		46,2
27b	2,65	m		
28	4,37	m		73,1
29				139,8
30	5,32	d	9,9	124,5

31		3,38	m		46,3
32					208,9
33a		2,59	m		41,4
33b		2,59	m		
34		5,04	ddd	5,2, 5,2, 5,2	75,7
35		1,97	m		33,4
36a		1,11	m		38,6
36b		1,26	m		
37		1,41	m		33,1
38a	ax.	0,69	ddd	12,3, 12,3, 12,3	34,1
38b	eq.	2,11	m		
39		2,93	m		84,4
40		3,37	m		73,9
41a		1,32	m		31,2
41b		1,97	m		
42a		1,00	m		31,6
42b		1,68	m		
43		0,88	d	6,4	16,9
44		3,10	s		55,6
45		1,59	s		9,9
46		1,02	d	7,2	20,5
47		1,03	d	7,1	15,7
48		1,67	s		12,2
49		1,12	d	6,8	16,3
50		0,92	d	6,8	15,8
51		3,39	s		56,5

Ejemplo 25

Aislamiento de producto a partir de fermentación de MG2-10[pSGsetKIN/OLh] de *S. hygrosopicus*

5

La 9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-rapamicina se obtuvo por conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygrosopicus* con pSGsetKIN/OL_{his} como se describe en el Ejemplo 1 y aislando los productos producidos en la fermentación. Esto demostró que era posible complementar la supresión de *rapK*, *rapI*, *rapN/O* y *rapL* en la cepa MG2-10 con la producción de un análogo de rapamicina que carece de alguna modificación post-PKS.

10

Se fermentó MG2-10 [pSGsetKIN/OL_{his}] de *S. hygrosopicus* (véase Materiales y Métodos), se extrajo y se aisló usando el método (B) como se expone en Materiales y Métodos.

El sistema de disolvente isocrático usado para HPLC preparativa fue CH₃CN/H₂O al 60 %. La 9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetilrapamicina (Compuesto 9) tiene las siguientes características:

15

Rendimiento aislado: 77 mg

Peso molecular: 872

Fórmula molecular: C₄₉H₇₇NO₁₂

UV (con detección de matriz de diodo durante el análisis de HPLC): 268 nm, 278 nm, 288 nm

20

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

La Tabla XII que sigue a continuación resume los datos de RMN ¹H y ¹³C para 9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetilrapamicina en CDCl₃.

Posición	δ _H	multiplicidad	acoplamiento	δ _C
1				172,1
2	5,55	m		52,8
3a	1,74	m		26,0
3b	2,21	m		
4a	1,18	m		21,1
4b	1,73	m		
5a	1,44	m		25,2

ES 2 544 624 T3

5b	1,73	m		
6a	3,28	m		45,7
6b	3,87	m		
8				171,6
9a	2,41	d	12,5	42,3
9b	3,34	d	12,5	
10				99,2
10-OH	4,15	m		
11	1,61	m		38,3
12a	1,50	m		27,9
12b	1,61	m		
13a	1,36	m		31,5
13b	1,52	m		
14	3,99	m		72,5
15a	1,45	m		40,9
15b	1,70	m		
16	3,86	m		75,3
17				140,0
18	6,44	d	11,4	121,9
19	6,33	dd	14,4, 11,4	128,6
20	6,20	dd	14,8, 10,6	131,2
21	6,02	dd	14,9, 10,6	131,2
22	5,25	m		137,4
23	2,26	m		35,3
24a	1,21	m		41,1
24b	1,21	m		
25	2,37	m		40,9
26				212,8
27	4,55	d	2,3	74,9
28	4,20			77,3
29				135,8
30	5,25	m		124,9
31	3,29	m		44,9
32				208,0
33a	2,53	dd	18,2, 4,0	42,2
33b	2,81	dd	18,2, 10,6	
34	5,28	ddd	, 4,0, 4,0	75,8
35	1,71	m		31,2
36a	0,92	m		36,9
36b	1,04	m		
37	1,23	m		32,6
38a	ax. 0,28	ddd	11,9, 11,9, 11,9	34,2
38b	eq. 1,88	m		
39	2,85			84,8
40	3,29	m		74,1
41a	1,26	m		31,3
41b	1,92	m		
42a	0,88	m		32,3
42b	1,57	m		
43	0,98	d	6,2	16,6
44	1,59	s		14,6
45	1,01	d	6,4	21,4
46	0,89	d	6,4	12,0
47	1,90	s		15,7
48	0,92	d	6,4	15,6
49	0,84	d	6,8	17,6
50	3,37	s		57,5

Ejemplo 26

Aislamiento de producto a partir de fermentación de MG2-10[pSGsetKJLh] de S. hygroscopicus

- 5 Se obtuvo 16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina por conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* con pSGsetKJL_{his} como se describe en el Ejemplo 1 y aislando los productos producidos en la fermentación. Esto demostró que era posible complementar la supresión de *rapK*, *rapJ* y *rapL* en la cepa MG2-10 con la producción de un análogo de rapamicina que carece de alguna modificación post-PKS.
- 10 Se fermentó MG2-10 [pSGsetKJL_{his}] de *S. hygroscopicus* (véase Materiales y Métodos), se extrajo y se aisló usando el método (B) como se expone en Materiales y Métodos.
El sistema de disolvente isocrático usado para HPLC preparativa fue CH₃CN/H₂O al 55 %. La 16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil rapamicina (Compuesto 3) tiene las siguientes características:
- 15 Rendimiento aislado: 176 mg (mezcla de 2 isómeros de interconversión)
Peso molecular: 856
Fórmula molecular: C₄₈H₇₃NO₁₂
UV (con detección de matriz de diodo durante el análisis de HPLC): 268 nm, 278 nm, 288 nm
Electronebulización MS: m/z para MNa⁺ = 878, m/z para M-H = 854
- 20 Fragmentación de MS: El aducto sodiado (m/z 878) se fragmentó para proporcionar tres fragmentos: C8-C42, m/z MNa⁺ 749; C1-C27, m/z MNa⁺ 570; C28-C42+C1-C14, m/z MNa⁺ 628. Los iones del fragmento 628 y 570 se fragmentaron adicionalmente para dar el mismo fragmento: C1-C14, m/z MNa⁺ 320. La masa de este fragmento C1-C14 es 14 unidades de masa más elevada que la del fragmento equivalente de la fragmentación del aducto sodiado de 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil rapamicina (Compuesto 1) coherente con
- 25 oxidación en C9.

Ejemplo 27

Aislamiento de producto a partir de fermentación de MG2-10[pSGsetKMNOLh] de S. hygroscopicus

- 30 Se obtuvo 9-desoxo-27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina por conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* con pSGsetKMN/OL_{his} como se describe en el Ejemplo 1 y aislando los productos producidos en la fermentación. Esto demostró que era posible complementar la supresión de *rapK*, *rapM*, *rapN/O* y *rapL* en la cepa MG2-10 con la producción de un análogo de rapamicina que carece de alguna modificación post-PKS.
- 35 Se fermentó MG2-10 [pSGsetKMN/OL_{his}] de *S. hygroscopicus* (véase Materiales y Métodos), se extrajo y se aisló usando el método (B) como se expone en Materiales y Métodos.
El sistema de disolvente isocrático usado para HPLC preparativa fue CH₃CN/H₂O al 60 %. La 9-desoxo-27-O-desmetil-39-O-desmetil rapamicina (Compuesto 8) tiene las siguientes características:
- 40 Rendimiento aislado: 6 mg
Peso molecular: 872
Fórmula molecular: C₄₉H₇₇NO₁₂
UV (con detección de matriz de diodo durante el análisis de HPLC): 268 nm, 278 nm, 288 nm
- 45 Electronebulización MS: m/z para MNa⁺ = 894, m/z para M-H = 870
Fragmentación de MS: El aducto sodiado (m/z 894) se fragmentó para proporcionar tres fragmentos: C8-C42, m/z MNa⁺ 765; C1-C27, m/z MNa⁺ 586; C28-C42+C1-C14, m/z MNa⁺ 614. Los iones del fragmento 614 y 586 se fragmentaron adicionalmente para dar el mismo fragmento: C1-C14, m/z MNa⁺ 306. El fragmento C1-C14 es idéntico al obtenido a partir de la fragmentación del aducto sodiado de la 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil rapamicina; el compuesto es 9-desoxo. El fragmento C1-C27 es 30 unidades de masa más elevada que la del fragmento equivalente de la 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil rapamicina, coherente con una hidroxilación y una metilación. La RapM metila el grupo hidroxilo en C-16 (véase el Ejemplo 22 para pSGsetKIL_{his} junto con pSGsetKIML_{his} del Ejemplo 23) y RapN en combinación con RapO hidroxila C27 de modo que los datos son coherentes con el compuesto que es 9-desoxo-27-O-desmetil-39-O-desmetil rapamicina
- 50 (Compuesto 8).
- 55

Ejemplo 28

Aislamiento de producto a partir de fermentación de MG2-10[pSGsetKIJLh] de S. hygroscopicus

- 60 Se obtuvo 16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina por conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* con pSGsetKIJL_{his} como se describe en el Ejemplo 1 y aislando los productos producidos en la fermentación. Esto demostró que era posible complementar la supresión de *rapK*, *rapI*, *rapJ* y *rapL* en la cepa MG2-10 con la producción de un análogo de rapamicina que carece de alguna modificación post-PKS.
- 65

Se fermentó MG2-10 [pSGsetKIJL_{his}] de *S. hygrosopicus* (véase Materiales y Métodos), se extrajo y se aisló usando el método (B) como se expone en Materiales y Métodos.

El sistema de disolvente isocrático usado para HPLC preparativa fue CH₃CN/H₂O al 60 %.

En la 16-O-desmetil-27-desmetoxi rapamicina (Compuesto 12) tiene las siguientes características:

Rendimiento aislado: 11 mg

Peso molecular: 870

Fórmula molecular: C₄₉H₇₅NO₁₂

UV (con detección de matriz de diodo durante el análisis de HPLC): 268 nm, 278 nm, 288 nm

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

Ejemplo 29

Aislamiento de producto a partir de fermentación de MG2-10[pSGsetKL_{his}] de S. hygrosopicus

La 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina se obtuvo por conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygrosopicus* con pSGsetKL_{his} como se describe en el Ejemplo 1 y aislando los productos producidos en la fermentación. Esto demostró que era posible complementar la supresión de *rapK* y *rapL* en la cepa MG2-10 con la producción de un análogo de rapamicina que carece de la modificación post-PKS (pre-rapamicina).

Se fermentó MG2-10 [pSGsetKL_{his}] de *S. hygrosopicus*, se extrajo y se aisló usando los métodos que se exponen en Materiales y Métodos.

El sistema de disolvente isocrático usado para HPLC preparativa fue CH₃CN/H₂O al 60 %.

La 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil rapamicina (Compuesto 1) tiene las siguientes características:

Rendimiento aislado: 24 mg

Peso molecular: 842

Fórmula molecular: C₄₈H₇₅NO₁₁

UV (con detección de matriz de diodo durante el análisis de HPLC): 268 nm, 278 nm, 288 nm

Electronebulización MS: m/z para MNa⁺ = 864, m/z para M-H = 840

Fragmentación de MS: El aducto sodiado (m/z 864.5) se fragmentó para proporcionar cuatro fragmentos: C8-C42, m/z MNa⁺ 735; C1-C27, m/z MNa⁺ 556; C28-C42+C1-C14, m/z MNa⁺ 614, C1-C14, m/z MNa⁺ 306. m/z El esperado para estos fragmentos se determinó por comparación con la fragmentación informada de la rapamicina (J. A. Reather, tesis doctoral PhD, Universidad de Cambridge, 2000). Estos fragmentos tienen el mismo m/z como el m/z predicho para la fragmentación de la 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil rapamicina.

Ejemplo 30

Aislamiento de producto a partir de fermentación de MG2-10 de S. hygrosopicus alimentado con ácido ciclohexano carboxílico

La 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi-rapamicina se obtuvo alimentando ácido ciclohexano carboxílico a MG2-10 de *S. hygrosopicus* y aislando los productos producidos en la fermentación. La mutasíntesis resultante demostró que era posible complementar químicamente la supresión de *rapK* en la cepa MG2-10, en ausencia de iniciador endógeno natural, con la producción resultante de un análogo de rapamicina que carece de modificación post-PKS.

Se fermentó MG2-10 de *S. hygrosopicus* (véase Materiales y Métodos), se alimentó (véase Materiales y Métodos), se extrajo y se aisló usando el método (B) como se expone en Materiales y Métodos.

El sistema de disolvente isocrático usado para HPLC preparativa fue CH₃CN/H₂O al 60 %.

La 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi rapamicina (Compuesto 47) tiene las siguientes características:

Rendimiento aislado: 12 mg

Peso molecular: 826 Fórmula molecular: C₄₈H₇₅NO₁₀

UV (con detección de matriz de diodo durante el análisis de HPLC): 268 nm, 278 nm, 288 nm

Electronebulización MS: m/z para MNa⁺ = 848.5, m/z para M-H = 825

Fragmentación de MS: El aducto sodiado (m/z 848.5) se fragmentó para proporcionar cuatro fragmentos: C8-C42, m/z MNa⁺ 719; C1-C27, m/z MNa⁺ 556; C28-C42+C1-C14, m/z MNa⁺ 598, C1-C14, m/z MNa⁺ 306. Estos datos ilustran que la diferencia entre el Compuesto 47 y la 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil

rapamicina (Compuesto 1) se localiza en la región de C28-C42. Este fragmento tiene 16 unidades de masa menos para el Compuesto 47 que para el Compuesto 1, coherente con el Compuesto 47 que es la 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi rapamicina.

5 Ejemplo 31

Aislamiento de producto a partir de fermentación de MG2-10[pSGsetKNOLh] de S. hygroscopicus

10 La 9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina se obtiene por conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* con pSGsetKN/OL_{his} como se describe en el Ejemplo 1 y aislando los productos producidos en la fermentación. Esto demuestra que es posible complementar la supresión de *rapK*, *rapN/O* y *rapL* en la cepa MG2-10 con la producción de un análogo de rapamicina que carece de alguna modificación post-PKS.

15 Se fermenta MG2-10 [pSGsetKN/OL_{his} de *S. hygroscopicus*] (véase Materiales y Métodos), se extrae y se aísla usando el método (B) como se expone en Materiales y Métodos.

El sistema de disolvente isocrático usado para HPLC preparativa es CH₃CN/H₂O al 60 %.

20 La 9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetil rapamicina (Compuesto 2) tiene las siguientes características:

Peso molecular: 858

Fórmula molecular: C₄₈H₇₅NO₁₂

UV (con detección de matriz de diodo durante el análisis de HPLC): 268 nm, 278 nm, 288 nm

25 Electronebulización MS: m/z para MK⁺ = 896, m/z para M-H = 856

Ejemplo 32

Identificación del producto de fermentación de MG2-10[pSGsetKJNOLh] de S. hygroscopicus

30 Se obtuvo 16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina por conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* con pSGsetKJN/OL_{his} como se describe en el ejemplo 1 y analizando los productos producidos en la fermentación. Esto demostró que era posible complementar la supresión de *rapK*, *rapJ*, *rapN/O* y *rapL* en la cepa MG2-10 con la producción de un análogo de rapamicina que carece de alguna modificación post-PKS.

35 El caldo de fermentación (1 ml) se trató como se ha descrito en el Método (B) de extracción, aislamiento y análisis que se describe en Materiales y Métodos. El cromatograma de HPLC (280 nm) contenía un pico que tenía el trieno característico de la rapamicina (268 nm, 278 nm, 288 nm). Este pico no se observó en el cromatograma de la muestra de control extraída de MG2-10 de *S. hygroscopicus* en ausencia del casete. La LCMS (véase Materiales y Métodos, Método B) del nuevo pico del análogo de rapamicina proporcionó los iones m/z 895 (MNa⁺) y 871 (M-H). Estos iones confirman que el peso molecular del nuevo análogo de rapamicina es 872,30 unidades de masa más elevado que el de la 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil rapamicina (Compuesto 1), coherente con oxidación en C9 (*rapJ*) e hidroxilación en C27 (*rapN/O*). Estos datos son coherentes con el compuesto que es 16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetil rapamicina (Compuesto 7).

45 Ejemplo 33

Aislamiento de producto a partir de fermentación de MG2-10[pSGsetKJNOLh] de S. hygroscopicus

50 La 16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina se obtiene por conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygroscopicus* con pSGsetKJN/OL_{his} como se describe en el Ejemplo 1 y aislando los productos producidos en la fermentación. Esto demuestra que es posible complementar la supresión de *rapK*, *rapJ*, *rapN/O* y *rapL* en la cepa MG2-10 con la producción de un análogo de rapamicina que carece de alguna modificación post-PKS.

55 Se fermenta MG2-10 [pSGsetKJN/OL_{his}] de *S. hygroscopicus* (véase Materiales y Métodos), se extrae y se aísla usando el método (B) como se expone en Materiales y Métodos.

El sistema de disolvente isocrático usado para HPLC preparativa es CH₃CN/H₂O al 60 %.

60 La 16-O-desmetil-27-O-desmetil-39-O-desmetil rapamicina (Compuesto 7) tiene las siguientes características:

Peso molecular: 872

Fórmula molecular: C₄₈H₇₃NO₁₃

UV (con detección de matriz de diodo durante el análisis de HPLC): 268 nm, 278 nm, 288 nm

65 Electronebulización MS: m/z para MNa⁺ = 895, m/z para M-H = 871

Ejemplo 34

Identificación del producto de fermentación de MG2-10 [pSGsetKIJNOQLh] de S. hygrosopicus

5 La 16-O-desmetil-rapamicina se obtuvo por conjugación de la cepa MG2-10 de *S. hygrosopicus* con pSGsetKI-JN/OQL_{his} como se describe en el Ejemplo 1 y analizando los productos producidos en la fermentación. Esto demostró que era posible complementar la supresión de *rapK*, *rapI*, *rapJ*, *rapN/O*, *rapQ* y *rapL* en la cepa MG2-10 con la producción de un análogo de rapamicina que carece de metilación en C16-OH. Además, identificó claramente a RapQ como la O-metiltransferasa dependiente de SAM responsable de la metilación de C27-OH.

10 Se fermentó MG2-10 [pSGsetKIJN/OQL_{his}] de *S. hygrosopicus* (véase Materiales y Métodos), se extrajo y se analizó usando el método (B) como se expone en Materiales y Métodos.

15 El caldo de fermentación (1 ml) se trató como se describe en Materiales y Métodos. El cromatograma de HPLC (280 nm) contenía un pico que tenía el trieno característico de la rapamicina (268 nm, 278 nm, 288 nm). Este pico no se observó en el cromatograma de la muestra de control extraída de MG2-10 de *S. hygrosopicus* en ausencia del casete. La LCMS (véase Materiales y Métodos) del nuevo pico del análogo de rapamicina proporcionó los iones m/z 923 (MNa⁺) y 899 (M-H). Estos iones confirman que el peso molecular del nuevo análogo de rapamicina es 900,14 unidades de masa más elevado que el de la rapamicina. Ya se ha establecido que el único gen post-PKS no incluido en el casete, *rapM*, actúa para metilar el C16-OH, por lo tanto, el nuevo análogo de rapamicina es la 16-O-desmetil rapamicina (Compuesto 20) y se muestra que *rapQ* es funcional y actúa para O-metilar en C27.

Ejemplo 35

25 Bioensayo de análogos de rapamicina:

- (1) = 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina (pre-rapamicina)
- (6) = 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-rapamicina
- (16) = 9-desoxo-27-desmetoxi-rapamicina,
- 30 (3) = 16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil-rapamicina
- (9) = 9-desoxo-16-O-desmetil-27-O-desmetil-rapamicina
- (8) = 9-desoxo-27-O-desmetil-39-O-desmetil-rapamicina.

Líneas de Células Cancerosas:

35 La inhibición del crecimiento de líneas de células tumorales humanas adherentes de neoplasias sólidas HT29 (colon) y MCF-7 (mama) se sometieron a ensayo *in vitro* usando un ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) usando placas de microtitulación (Siewerts, A.M., et al., 1995). Todas las líneas celulares se obtuvieron de cualquiera de ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo) o ECACC (Colección Europea de Cultivos Tipo). Todas las líneas celulares se cultivaron a partir de reservas congeladas y se pasaron al menos una vez antes de su uso en RPMI 1640. Las células se cosecharon a partir de cultivos subconfluentes usando tripsinización mínima. Las células se diluyeron hasta la densidad apropiada para cada línea celular (dependiente del tiempo de duplicación celular) en RPMI 1640, y se sembraron en 60 pocillos de una placa de 96 pocillos en un volumen de 100 µl por pocillo (es decir, fuera de los pocillos de la placa no se usaron). Las placas se incubaron a 45 37 °C durante una noche. Después de esta incubación, se añadieron diluciones a escala logarítmico de sustancias de referencia y de ensayo en 100 µl por pocillo, se usaron 6 replicados para someter a ensayo todos los compuestos de ensayo, compuestos de referencia y controles de medio. Las placas se incubaron durante un periodo adicional de 72 h antes del análisis. Se añadió MTT (5 mg/ml) a cada pocillo y las placas se volvieron a incubar durante 3-4 h. El MTT sin reaccionar se retiró de los pocillos y se formaron cristales de formazano a partir del MTT y se disolvieron en 50 DMSO y la Absorbancia característica se leyó a 570 nm. La concentración (nM) de cada compuesto de ensayo y compuesto de referencia, que dio como resultado un 50 % de la inhibición máxima (CI₅₀), se calculó para cada línea celular y se mencionó junto con el porcentaje máximo de inhibición observado (I_m), véase la Tabla XIII. Para referencia, la rapamicina tiene una CI₅₀ de 200 nM y una I_m de un 40 % en la línea celular HT-29 y una CI₅₀ de 0,03 nM y una I_m de un 56 % en la línea celular MCF-7.

55

Tabla XIII

Ensayo	1		6		16		3		9		8	
	CI ₅₀	I _m										
HT29	50,1	38	25	38	15,8	25	63,1	37	12,6	35	63	30
rCI ₅₀												
MCF-7	3,2	38	126	48	2	32	20	38	17,8	40	20	38
rCI ₅₀												

Reacción Mixta de Linfocitos (MLR):

Originalmente desarrollado para evaluar la compatibilidad tisular antes de aloinjertos, la MLR ofrece un modelo establecido para reacción inmune *in vitro* (SOULILLOU, J.P., et al. (1975); T. Meo. "Immunological Methods", L. Lefkovits y B. Pernis, Eds., Academic Press, N.Y. pp. 227-239 (1979). La MLR se realizó mezclando linfocitos esplénicos aislados a partir de ratones C57BL/6 (5×10^5 células) con linfocitos esplénicos inhibidos de ratones CBA ($2,5 \times 10^5$ células). Los linfocitos CBA inhibidos indujeron una respuesta proliferativa en linfocitos C57BL/6 y esto se determinó mediante la incorporación de [3 H] timidina en ADN como una medida de la proliferación de linfocitos esplénicos aislados de ratones C57BL/6. El efecto antiproliferativo se sometió a ensayo en presencia de diluciones a escala logarítmica de compuestos de referencia, compuestos de ensayo y controles de medios con un periodo de aproximadamente 72 h a 37 °C. La concentración de cada compuesto de ensayo y compuesto de referencia, que inhibía a la proliferación de linfocitos en un 50 % (CI_{50}), en comparación con la proliferación de control, se calculó para cada línea celular y se mencionó como una proporción de la concentración de rapamicina necesaria para inhibir la proliferación de linfocitos en un 50 % (rCI_{50}), véase la Tabla XIV.

Tabla XIV

Ensayo	1	6	16	3	9	8
MLR	9,4	8,8	> 14,7	7,9	6,5	4,1
rCI_{50}						

Ensayo Antifúngico

Las actividades antifúngicas comparativas de compuestos de referencia y ensayo se determinaron frente a hongos patógenos DSM 5816 de *Candida albicans*, DSM 1386 de *Candida albicans* y DSM 11226 de *Candida glabrata*. Esto se consiguió usando una adaptación de la placa de micro titulación del Método de Referencia de NCCLS para Ensayo de Susceptibilidad Antifúngica de Dilución de Caldo de Cultivo para Levaduras: Patrón Aprobado (M27-A, vol. 17 N° 9. (1997)). Las cepas de levaduras inocularon (10^4 cfu/ml) a medios de RPMI 1640 que contienen MOPS 0,165 mM, pH 7. El crecimiento se determinó en presencia de diluciones a escala logarítmica de compuestos de referencia, compuestos de ensayo y controles de medios después de incubación con agitación a 37 °C, 24 h. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (MIC) y la actividad fungicida mínima (MFC) para compuestos de ensayo y se expresó como una proporción de la concentración inhibitoria mínima de rapamicina ($rMIC$ respectivamente), véase la Tabla XV.

Tabla XV

Ensayo	1	6	16	3	9	8
DSM 5816 de <i>C. albicans</i> $rMIC$	1	1	1	1	1	1
DSM 1386 de <i>C. albicans</i> $rMIC$	5	5	5	1	1	1
DSM 11226 de <i>C. glabrata</i> $rMIC$	5	5	5	1	1	1

Referencias

- Alarcon, C.M., Heitman, J., y Cardenas, M.E. (1999) Protein kinase activity and identification of a toxic effector domain of the target of rapamycin TOR proteins in yeast. *Molecular Biology of the Cell* 10: 2531-2546.
- Aparicio, J.F., Molnár, I., Schwecke, T., König, A., Haydock, S.F., Khaw, L.E., Staunton, J., y Leadlay, P.F. (1996) Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene* 169: 9-16.
- Baker, H., Sidorowicz, A., Sehgal, S.N., y Vézina, C. (1978) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. III. *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Journal of Antibiotics* 31: 539-545.
- Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E.T., Nagaraja Rao, R., y Schoner, B.E. (1992) Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* 116: 43-49.
- Blanc, V., Lagneaux, D., Didier, P., Gilo, P., Lacroix, P., y Cruzet, J. (1995) Cloning and analysis of structural genes from *Streptomyces pristinaespiralis* encoding enzymes involved in the conversion of pristinamycin IIB to pristinamycin IIA (PIIA): PIIA synthase and NADH:riboflavin 5'-phosphate oxidoreductase. *Journal of Bacteriology* 177: 5206-5214.
- Blanc, V., Gil, P., Bamas-Jacques, N., Lorenzon, S., Zagorec, M., Schleuniger, J., Bisch, D., Blanche, F., Debussche, L., Cruzet, J., y Thibaut, D. (1997) Identification and analysis of genes from *Streptomyces pristinaespiralis* encoding enzymes involved in the biosynthesis of the 4-dimethylamino-L-phenylalanine precursor of pristinamycin I. *Molecular Microbiology* 23: 191-202.

- Box, S.J., Shelley, P.R., Tyler, J.W., Verrall, M.S., Warr, S.R.C., Badger, A.M., Levy, M.A., y Banks, R.M. (1995) 27-O-Demethylrapamycin, an immunosuppressant compound produced by a new strain of *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Antibiotics* 48: 1347-1349.
- 5 Brown, E.J., Albers, M.W., Shin, T.B., Ichikawa, K., Keith, C.T. Lane, W.S., y Schreiber, S.L. (1994) A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369: 756-758.
- Brunn, G.J., Williams, J., Sabers, C., Wiederrecht, G. Lawrence, J.C., y Abraham, R.T. (1996) Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO Journal* 15: 5256-5267.
- 10 Carlson, R.P., Hartman, D.A., Tomchek, L.A., Walter, T.L., Lugay, J.R., Calhoun, W., Sehgal, S.N., Chang, J.Y. (1993). Rapamycin, a potential disease-modifying antiarthritic drug. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266 (2): 1125-38.
- Chambraud, B., Radanyi, C., Camonis, J.H., Shazand, K., Rajkowski, K., y Baulieu, E.E. (1996) FAP48, a new protein that forms specific complexes both immunophilins FKBP59 and FKBP12. Prevention by the immunosuppressant drugs FK506 and rapamycin. *Journal of Biological Chemistry* 271: 32923-32929.
- 15 Chang, J.Y., Sehgal, S.N., y Bansbach, C.C. (1991) FK506 and rapamycin: novel pharmacological probes of the immune response. *Trends in Pharmacological Sciences* 12: 218-223.
- Chen, J., Zheng, X.F., Brown, E.J., y Schreiber, S.L. (1995) Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 4947-4951.
- 20 Chini, M., Crotti, P., Gardelli, C., y Macchia, F., (1992), *Tetrahedron*, 48, 3805-3812
- Choi, J.W., Chen, J., Schreiber, S.L., y Clardy, J. (1996) Estructura de the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* 273: 239-242.
- Chung, L., Liu, L., Patel, S., Carney, J.R., y Reeves, C.D. (2001) Deletion of rapQNM1 from the rapamycin gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* gives production of the 16-O-desmethyl-27-desmethoxy analog. *Journal of Antibiotics* 54: 250-256.
- 25 Corey, E., J. y Huang, H., (1989) *Tetrahedron Lett.*, 30, 5235-5238
- DiLella, A.G., y Craig, R.J. (1991) Exon organization of the human FKBP-12 gene: correlation with structural and functional protein domains. *Biochemistry* 30: 8512-8517.
- Du, L.C., Sánchez, C., Chen, M., Edwards, D.J., y Shen, B. (2000) The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chemistry & Biology* 7: 623-642.
- 30 Dudkin, L., Dilling, M.B., Cheshire, P.J., Harwood, F.C., Hollingshead, M., Arbuck, S.G., Travis, R., Sausville, E.A., Houghton, P.J. (2001). Biochemical correlates of mTOR inhibition by the rapamycin ester CCI-779 and tumor growth inhibition. *Clin. Cancer Res.* 7 (6): 1758-64
- Fehr, T., Sanglier, J.-J., Schuler, W., Gschwind, L., Ponelle, M., Schilling, W., Wioland, C. (1996). Antascomycin A, B, C, D and E: Novel FKBP12 binding compounds from a *Micromonospora* strain. *J. Antibiot.* 49 (3): 230-233.
- 35 Ferrari, S., Pearson, R.B., Siegmann, M., Kozma, S.C., y Thomas, G. (1993) The immunosuppressant rapamycin induces inactivation of P70s6k through dephosphorylation of a novel set of sites. *Journal of Biological Chemistry* 268: 16091-16094.
- Findlay J.A, y Radics, L. (1980) *Canadian Journal of Chemistry* 58: 579.
- 40 Fishbein, T.M., Florman, S., Gondolesi, G., Schiano, T., LeLeiko, N., Tschernia, A., Kaufman, S. (2002). Intestinal transplantation before and after the introduction of sirolimus. *Transplantation*. 73 (10): 1538-42.
- Foey, A., Green, P., Foxwell, B., Feldmann, M., Brennan, F. (2002). Cytokine-stimulated T cells induce macrophage IL-10 production dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and p70S6K: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 4 (1): 64-70. Epub 2001 Oct 10.
- 45 Gaisser, S., Reather, J., Wirtz, G., Kellenberger, L., Staunton, J., y Leadlay, P.F. (2000) A defined system for hybrid macrolide biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *Molecular Microbiology* 36: 391-401.
- Gaisser, S., Lill, R., Staunton, J., Mendez, C., Salas, J., Leadlay, P.F. (2002) Parallel pathways for oxidation of 14-membered polyketide macrolactones in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol Microbiol* 44: 771-81.
- Galat, A. (2000) Sequence diversification of the FK506-binding proteins in several different genomes. *European Journal of Biochemistry* 267: 4945-4959.
- 50 Gregory, C.R., Huie, P., Billingham, M.E. y Morris, R.E. (1993). Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury. Its effect on cellular, growth factor and cytokine response en injured vessels. *Transplantation* 55 (6): 1409-1418.
- Gregory MA, Till R, Smith, MCM. (in Press) Integration site for *Streptomyces* phage Φ BT1 and the development of site-specific integrating vectors. *J Bacteriol.*
- 55 Guba, M., von Breitenbuch, P., Steinbauer, M., Koehl, G., Flegel, S., Hornung, M., Bruns, C.J., Zuelke, C., Farkas, S., Anthuber, M., Jauch, K.W., y Geissler, E.K. (2002) Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nature Medicine* 8: 128-135.
- Hamilton, G.S., y Steiner, J.P. (1998) Immunophilins: Beyond immunosuppression. *Journal of Medicinal Chemistry* 41: 5119-5143.
- 60 Hara, K., Yonezawa, K., Kozłowski, M.T., Sugimoto, T., Andrabi, K., Weng, Q.P., Kasuga, M., Nishimoto, I., y Avruch, J. (1997) Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *Journal of Biological Chemistry* 272: 26457-26463.
- Hardwick, J.S., Kuruvilla, F.G., Tong, J.K., Shamji, A.F., y Schreiber, S.L. (1999) Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 14866-14870.
- 65

- Hatanaka, H., Kino, T., Miyata, S., Inamura, N., Kuroda, A., Goto, T., Tanaka, H., Okuhara, M. (1988). FR-900520 and FR-900523, novel immunosuppressants isolated from a *Streptomyces*. II. Fermentation, isolation and physicochemical and biological characteristics. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 41 (11): 1592-601.
- 5 Hatanaka H, Kino T, Asano M, Goto T, Tanaka H, Okuhara M. (1989). FK-506 related compounds produced by *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 42 (4): 620-2.
- Hendrickson, B.A., Zhang, W., Craig, R.J., Jin, Y.J., Bierer, B.E., Burakoff, S., y DiLella, A.G. (1993) Structural organization of the genes encoding human and murine FK506-binding protein (FKBP)13 and comparison to FKBP1. *Gene* 134: 271-275.
- 10 Hentges, K.E., Sirry, B., Gingeras, A.C., Sarbassov, D., Sonenberg, N., Sabatini, D., y Peterson, A.S. (2001) FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 13796-13801.
- Hopwood, D.A. (1997) Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chemical Reviews* 97: 2465-2497.
- 15 Hosted, T.J., y Baltz, R.H. (1997) Use of *rpsL* for dominance selection and gene replacement in *Streptomyces roseosporus*. *Journal of Bacteriology* 179: 180-186.
- Hung, D.T., y Schreiber, S.L. (1992) cDNA cloning of a human 25 kDa FK506 and rapamycin binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 184: 733-738.
- Hung, D.T., Jamison, T.F., y Schreiber, S.L. (1996) Understanding and controlling the cell cycle with natural products. *Chemistry & Biology* 3: 623-639.
- 20 Jain, S., Bicknell, G.R., Whiting, P.H., Nicholson, M.L. (2001). Rapamycin reduces expression of fibrosis-associated genes in an experimental model of renal ischaemia reperfusion injury. *Transplant Proc.* 33 (1-2): 556-8.
- Jin, Y.J., Burakoff, S.J., y Bierer, B.E. (1992) Molecular cloning of a 25-kDa high affinity rapamycin binding protein, FKBP25. *Journal of Biological Chemistry* 267: 10942-10945.
- 25 Kahan, B.D., Chang, J.Y., y Sehgal, S.N. (1991) Preclinical evaluation of a new potent immunosuppressive agent, rapamycin. *Transplantation* 52: 185-191.
- Kahan, B.D., y Camardo, J.S. (2001) Rapamycin: Clinical results and future opportunities. *Transplantation* 72:1181-1193.
- 30 Kallen, J. A., Sedrani, R., y Cottens S. (1996) X-ray crystal structure of 28-O-methylrapamycin complexed with FKBP12: Is the cyclohexyl moiety part of the effector domain of rapamycin? *Journal of the American Chemical Society* 118: 5857-5861.
- Kawasome, H., Papst, P., Webb, S., Keller, G.M., Johnson, G.L., Gelfand, E.W., y Terada, N. (1998) Targeted disruption of p70s6k defines its role in protein synthesis and rapamycin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 5033-5038.
- 35 Khaw, L.E., Böhm, G.A., Metcalfe, S., Staunton, J., y Leadlay, P.F. (1998) Mutational biosynthesis of novel rapamycins by a strain of *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 5491 disrupted in *rapL*, encoding a putative lysine cyclodeaminase. *Journal of Bacteriology* 180: 809-814.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., y Hopwood, D.A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics*, John Innes Foundation, Norwich.
- 40 Kirby, B., y Griffiths, C.E.M. (2001) Psoriasis: the future. *British Journal of Dermatology* 144: 37-43.
- Kirchner, G.I., Winkler, M., Mueller L., Vidal, C., Jacobsen, W., Franzke, A., Wagner, S., Blick, S., Manns M.P., y Sewing K.-F. (2000) Pharmacokinetics of SDZ RAD and cyclosporin including their metabolites in seven kidney graft patients after the first dose of SDZ RAD. *British Journal of Clinical Pharmacology* 50: 449-454.
- 45 König, A., Schwecke, T., Molnár, I., Böhm, G., Lowden, P.A.S., Staunton, J., y Leadlay, P.F. (1997) The pipecolate-incorporating enzyme for the biosynthesis of the immunosuppressant rapamicina. Nucleotide sequence analysis, disruption and heterologous expression of *rapP* from *Streptomyces hygroscopicus*. *European Journal of Biochemistry* 247: 526-534.
- Kunz, J., Loeschmann, A., Deuter-Reinhard, M., y Hall, M.N. (2000) FAP1, a homologue of human transcription factor NF-X1, competes with rapamycin for binding to FKBP12 in yeast. *Molecular Microbiology* 37: 1480-1493.
- 50 Kuo, C.J., Chung, J.K., Fiorentino, D.F., Flanagan, W.M., Blenis, J., y Crabtree, G.R. (1992) Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. *Nature* 358: 70-73.
- Lee, M.H. Pascopella, L, Jacobs, W.R., Jr y Hatfull, G.F (1991). Site specific integration of mycobacteriophage L5: integration-proficient vectors para *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Bacille Calmette-Guerin*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 3111-3115.
- 55 Lee MH, Pascopella L, Jacobs WR Jr, Hatfull GF. (1991), Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration-proficient vectors para *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and *bacille Calmette-Guerin*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 88: 3111-5.
- Liang, J., Choi, J., y Clardy, J. (1999) Refined structure of the FKBP12-rapamycin-FRB ternary complex at 2.2 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 55: 736-744.
- 60 (Lomovskaya, N., Fonstein, L., Ruan, X., Stassi, D., Katz, L., y Hutchinson, C.R. (1997) Gene disruption and replacement in the rapamycin-producing *Streptomyces hygroscopicus* strain ATCC 29253. *Microbiology-Uk* 143: 875-883.
- Lowden, P.A.S., Böhm, G., Staunton, J., y Leadlay, P.F. (1996) The nature of la unidad iniciadora for the rapamycin polyketide synthase. *Angewandte Chemie* 35: 2249-2251.
- 65 Lowden, P. A. S., (1997) Ph.D. Dissertation, University of Cambridge. "Studies on the biosynthesis of rapamycin".
- Lowden, P.A.S., Wilkinson, B., Böhm, G.A., Handa, S., Floss, H.G., Leadlay, P.F., y Staunton, J. (2001) Origin

- and true nature of la unidad iniciadora for the rapamycin polyketide synthase. *Angewandte Chemie-International Edition* 40: 777-779.
- Luengo, J.I., Yamashita, D.S., Dunnington, D., Beck, A.K., Rozamus, L.W., Yen, H.K., Bossard, M.J., Levy, M.A., Hand, A., Newmantarr, T., Badger, A., Faucette, L., Johnson, R.K., Dalessio, K., Porter, T., Shu, A.Y.L., Heys, R., Choi, J.W., Kongsaree, P., Clardy, J., y Holt, D.A. (1995) Structure-Activity Studies of Rapamycin Analogs - Evidence That the C-7 Methoxy Group Is Part of the Effector Domain and Positioned at the Fkbp12-Frap Interface. *Chemistry & Biology* 2: 471-481.
- Lyons, W.E., George, E.B., Dawson, T.M., Steiner, J.P., y Snyder, S.H. (1994) Immunosuppressant FK506 promotes neurite outgrowth in cultures of PC12 cells and sensory ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 3191-3195.
- MacNeil, D.J., Gewain, K.M., Ruby, C.L., Dezeny, G., Gibbons, P.H., y MacNeil, T. (1992) Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* 111: 61-68.
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T., y Mootz, H.D. (1997) Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews* 97: 2651-2673.
- Matsuura, M., Noguchi, T., Yamaguchi, D., Aida, T., Asayama, M., Takahashi, H. y Shirai, M. (1996). The ser gene (ORF469) encodes a site-specific recombinase responsible for integration of the R₄ phage genome. *J Bact.* 178 (11): 3374-3376.
- McAlpine, J. B., Swanson S. J., Jackson, M., Whittern, D.N. (1991). Revised NMR assignments for rapamycin. *Journal of Antibiotics* 44: 688-690.
- Meo, T. in "Immunological Methods", L. Lefkowitz y B. Pernis, Eds., Academic Press, N.Y. pp. 227-239 (1979).
- Molnár, I., Aparicio, J.F., Haydock, S.F., Khaw, L.E., Schwecke, T., König, A., Staunton, J., y Leadlay, P.F. (1996) Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamicina en *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of genes flanking the policétido synthase. *Gene* 169: 1-7.
- Morice, M.C., Serruys, P.W., Sousa, J.E., Fajadet, J., Ban Hayashi, E., Perin, M., Colombo, A., Schuler, G., Barragan, P., Guagliumi, G., Molnar, F., Falotico, R. (2002). RAVEL Study Group. Randomized Study with the Sirolimus-Coated Bx Velocity Balloon-Expandable Stent in the Treatment of Patients with de Novo Native Coronary Artery Lesions. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N. Eng. J. Med* 346 (23): 1773-80.
- Motamedi, H., Shafiee, A., Cai, S.J., Streicher, S.L., Arison, B.H., y Miller, R.R. (1996) Characterization of methyltransferase and hydroxylase genes involved in the biosynthesis of the immunosuppressants FK506 and FK520. *Journal of Bacteriology* 178: 5243-5248.
- Motamedi, H., Cai, S.J., Shafiee, A., y Elliston, K.O. (1997) Structural organization of a multifunctional polyketide synthase involved in the biosynthesis of the macrolide immunosuppressant FK506. *European Journal of Biochemistry* 244: 74-80.
- Motamedi, H., y Shafiee, A. (1998) The biosynthetic gene cluster for the macrolactone ring of the immunosuppressant FK506. *European Journal of Biochemistry* 256: 528-534.
- Mykатыn, T.M., Ellis, R.A., Grand, A.G., Sen, S.K., Lowe, J.B. 3rd, Hunter, D.A., Mackinnon, S.E. (2002). The effects of rapamycin in murine peripheral nerve isografts and allografts. *Plast. Reconstr. Surg.* 109 (7): 2405-17.
- Navé, B.T., Ouwens, D.M., Withers, D.J., Alessi, D.R., y Sheperd, P.R. (1999) Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and aminoacid deficiency on protein translation. *Biochemical Journal* 344: 427-431.
- Navia, M.A. (1996) Protein-drug complexes important for immunoregulation and organ transplantation. *Current Opinion in Structural Biology* 6: 838-847. NCCL Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing for Yeasts: Approved Standard M27-A, vol. 17 No. 9. (1997).
- Nishida, H., Sakakibara, T., Aoki, F., Saito, T., Ichikawa, K., Inagaki, T., Kojima, Y., Yamauchi, Y., Huang, L.H., Guadliana, M.A., Kaneko, T., y Kojima, N. (1995) Generation of novel rapamycin structures by microbial manipulations. *Journal of Antibiotics* 48: 657-666.
- Nielsen, J.B., Hsu, M.J., Byrne, K.M., y Kaplan, L. (1991) Biosynthesis of the immunosuppressant immunomycin: the enzymology of pipecolate incorporation. *Biochemistry* 30: 5789-5796.
- Paget, M.S.B., Chamberlin, L., Atrih, A., Foster, S.J., y Buttner, M.J. (1999) Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor σ^E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of Bacteriology*. 181: 204-211)
- Paiva, N.L., Demain, A.L., y Roberts, M.F. (1991) Incorporation of acetate, propionate, and methionine into rapamycin By *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Natural Products* 54: 167-177.
- Paiva, N.L., Demain, A.L., y Roberts, M.F. (1993) The immediate precursor of the nitrogen-containing ring of rapamycin is free pipercolic acid. *Enzyme and Microbial Technology* 15: 581-585.
- Patterson, C.E., Schaub, T., Coleman, E.J., y Davies E.C. (2000) Developmental regulation of FKBP65. An ER-localized extracellular matrix binding-protein. *Molecular Biology of the Cell* 11:3925-3935.
- Pfeifer, B.A., Admiraal, S.J., Gramajo, H., Cane, D.E., y Khosla, C. (2001) Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*. *Science* 291: 1790-1792.
- Powell, N., Till, S., Bungre, J., Corrigan, C. (2001). The immunomodulatory drugs cyclosporin A, mycophenolate mofetil, and sirolimus (rapamycin) inhibit allergen-induced proliferation and IL-5 production by PBMCs from atopic asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108 (6): 915-7
- Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L., Shapiro, A.M., Rajotte, R.V., Power, R. (2002). Combination therapy with sirolimus and interleukin-2 prevents spontaneous and recurrent autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 51

(3): 638-45.

Raught, B., Gingras, A.C., y Sonenberg, N. (2001) The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 7037-7044.

Rawlings, B.J. (2001) Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part A). *Natural Product Reports* 18: 190-227.

Reather, J. A., (2000), Ph.D. Dissertation, University of Cambridge. "Late steps in the biosynthesis of macrocyclic lactones".

Reitamo, S., Spuls, P., Sassolàs, B., Lahfa, M., Claudy, A., Griffiths, C.E.; Sirolimus European Psoriasis Study Group. (2001). Efficacy of sirolimus (rapamycin) administered concomitantly with a subtherapeutic dose of cyclosporin in the treatment of severe psoriasis: a randomized controlled trial. *Br. J. Dermatol.* 145 (3): 438-45.

Rosen, M.K., y Schreiber, S.L. (1992) Natural products as probes of cellular function: studies of immunophilins. *Angewandte Chemie-International Edition in English* 31: 384-400.

Roymans, D., y Slegers, H. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *European Journal of Biochemistry* 268: 487-498.

Ruan, X.A., Stass, D., Lax, S.A., y Katz, L. (1997) A second type-I PKS gene cluster isolated from *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253, a rapamycin-producing strain. *Gene* 203: 1-9.

Salituro, G.M., Zink, D.L., Dahl, A., Nielsen, J., Wu, E., Huang, L., Kastner C., Dumont, F. (1995) Meridamycin: a novel nonimmunosuppressive FKBP12 ligand from *Streptomyces hygroscopicus*. *Tetrahydron letters* 36: 997-1000.

Schwarzer, D., y Marahiel, M.A. (2001) Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften* 88: 93-101.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.

Schreiber, S.L., y Crabtree, G.R. (1992) The mechanism of action of cyclosporine A and FK506. *Immunology Today* 13: 136-142.

Schwecke, T., Aparicio, J.F., Molnár, I., König, A., Khaw, L.E., Haydock, S.F., Oliynyk, M., Caffrey, P., Cortés, J., Lester, J.B., Böhm, G.A., Staunton, J., y Leadlay, P.F. (1995) The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 7839-7843.

Sedrani, R., Cottens, S., Kallen, J., y Schuler, W. (1998) Chemical modifications of rapamycin: the discovery of SDZ RAD. *Transplantation Proceedings* 30: 2192-2194.

Sehgal, S.N., Baker, H., y Vézina, C. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic II. Fermentation, isolation and characterization. *The Journal of Antibiotics* 28: 727-733.

Shepherd, P.R, Withers, D.J., y Siddle K. (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochemical Journal* 333: 471-490.

Shima, J., Hesketh, A., Okamoto, S., Kawamoto, S., y Ochi, K. (1996) Induction of actinorhodin production by rpsL (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of Bacteriology* 178: 7276-7284. Sigal, N.H., y Dumont, F.J. (1992) Cyclosporine A, FK-506, and rapamycin: pharmacological probes of lymphocyte signal transduction. *Annual Review of Immunology* 10: 519-560.

Sieuwerts, A.M., Klijn, J.G., Peters, H.A., Foekens, J.A. (1995). The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *Eur. J Clin. Chem. Biochem.* 33 (11): 813-23.

Smovkina, T., Mazodier, P., Boccard, F., Thompson, C.J. y Guerineau, M. (1990) Construction of a series of pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes. *Gene* 94: 53-59.

SOULILLOU, J.P., CARPENTER, C.B., LUNDIN, A.P. Y STROM, T.B. (1975) Augmentation of proliferation and in vitro production of cytotoxic cells by 2-ME in the rat. *J Immunol.* 115 (6): 1566-71.

Staunton, J., y Weissman, K.J. (2001) Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Product Reports* 18: 380-416.

Steiner, J.P., Hamilton, G.S., Ross, D. T., Valentine, H.L., Guo, H., Connolly, M.A., Liang, S., Ramsey, C., Li, J.-H.J., Huang, W., Howorth, P., Soni, R., Fuller, M., Sauer, H., Nowotnik, A.C., y Suzdak, P.D. (1997) Neurotrophic immunophilin ligands stimulate structural and functional recovery in neurodegenerative animal models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:2019-2024.

Tang, S.J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A.-C., Sonenberg, N., y Schuman, E.M. (2002) A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1: 467-472.

Van Duyne, G.D., Standaert, R.F., Karplus, P.A., Schreiber, S.L., y Clardy, J. (1993) Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *Journal of Molecular Biology* 229: 105-124.

Van Mellaert, L., Mei, L., Lammertyn, E., Schacht, S., y Anné, J. (1998) Site-specific integration of bacteriophage VWB genome into *Streptomyces venezuelae* and construction of a VWB-based integrative vector. *Microbiology* 144: 3351-3358.

Vézina, C., Kudelski, A., y Sehgal, S.N. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of Antibiotics* 28: 721-726.

Vilella-Bach, M., Nuzzi, P., Fang, Y.M., y Chen, J. (1999) The FKBP12-rapamycin-binding domain is required for FKBP12-rapamycin-associated protein kinase activity and G1 progression. *Journal of Biological Chemistry* 274: 4266-4272.

Waller, J.R., y Nicholson, M.L. (2001) Molecular mechanisms of renal allograft fibrosis. *British Journal of Surgery*

88: 1429-1441.

Warner, L.M., Adams, L.M., Chang, J.Y., Sehgal, S.N. (1992). A modification of the in vivo mixed lymphocyte reaction and rapamycin's effect in this model. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 64 (3): 242-7.

Weber, T., y Marahiel, M.A. (2001) Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases. *Structure* 9: R3-R9

Welch, J. T. y Seper, K., W., (1988), *J. Org. Chem.*, 53, 2991-2999

Wilkinson, B., Foster, G., Rudd, B.A.M., Taylor, N.L., Blackaby, A.P., Sidebottom, P.J., Cooper, D.J., Dawson, M.J., Buss, A.D., Gaisser, S., Böhm, I.U., Rowe, C.J., Cortés, J., Leadlay, P.F. y Staunton, J. (2000). Novel octaketide macrolides related to 6-deoxyerythronolide B provide evidence for iterative operation of the erythromycin polyketide synthase. *Chemistry & Biology* 7: 111-117.

Wong, G.K., Griffith, S., Kojima, I., y Demain, A.L. (1998) Antifungal activities of rapamycin and its derivatives, prolirapamycin, 32-desmethylrapamycin, and 32-desmethoxyrapamycin. *Journal of Antibiotics* 51: 487-491.

Wu, K., Chung, L., Revill, W.P., Katz, L., y Reeves, C.D. (2000) The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units. *Gene* 251: 81-90.

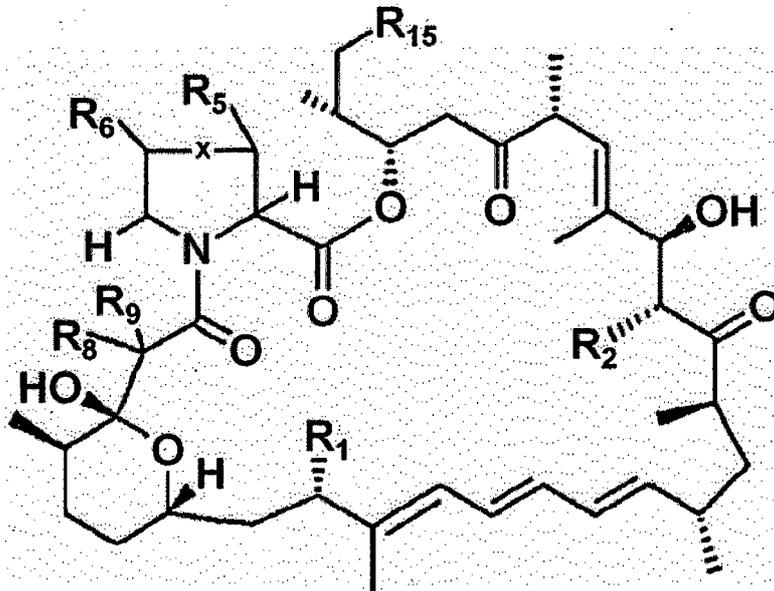
Yem, A.W., Tomasselli, A.G., Heinrikson, R.L., Zurcher-Neely, H., Ruff, V.A., Johnson, R.A., y Deibel, M.R. (1992) The Hsp56 component of steroid receptor complexes binds to immobilized FK506 and shows homology to FKBP-12 and FKBP-13. *Journal of Biological Chemistry* 267: 2868-2871.

Yu, K., Toral-Barza, L., Discafani, C., Zhang, W.G., Skotnicki, J., Frost, P., Gibbons, J.J. (2001) mTOR, a novel target in breast cancer: the effect of CCI-779, an mTOR inhibitor, in preclinical models of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 8:249-258.

Zhu, J., Wu J., Frizell, E., Liu, S.L., Bashey, R., Rubin, R., Norton, P., Zern, M.A. (1999). Rapamycin inhibits hepatic stellate cell proliferation in vitro and limits fibrogenesis in an in vivo model of liver fibrosis. *Gastroenterology*. 117 (5): 1198-204.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula:

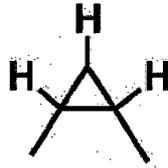


5

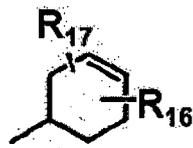
donde:

x = enlace o CH₂, o -GHR₆-x-CHR₅-- es

10



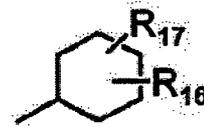
R₁₅ =



A



B



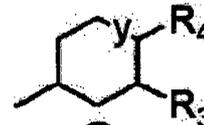
C



D



F



G

15

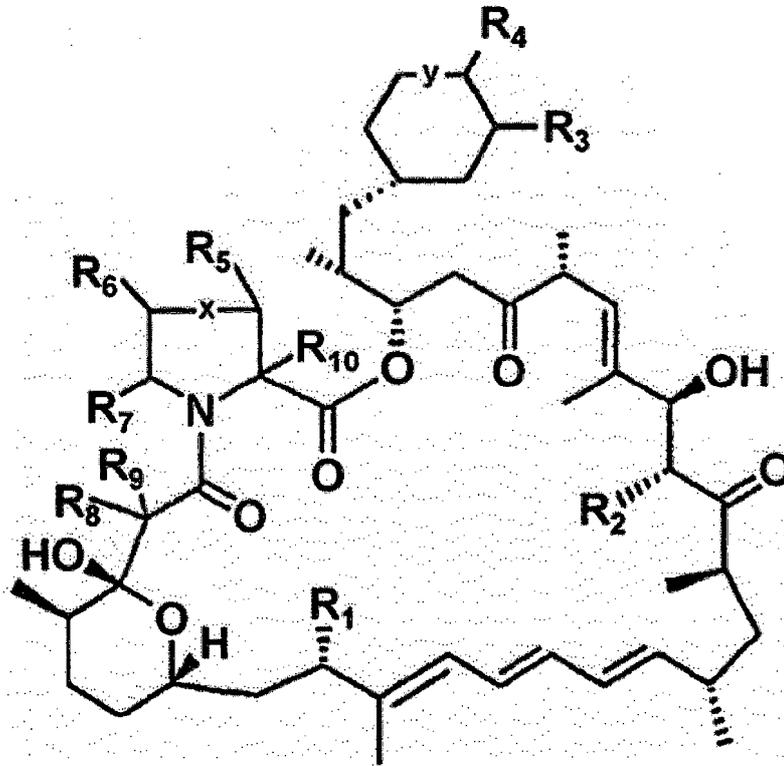
R₁ = OH, OCH₃;
 R₂ = H, OH, OCH₃;
 R₃ = F, Cl y R₄ = H, OH, CH₃, F, Cl; o
 R₄ = F, Cl y R₃ = H, OH, CH₃, F, Cl, OCH₃;
 R₁₆ = OH, OCH₃;
 R₁₇ = Cl, F;
 R₅ = H, OH;
 R₆ = H, OH;
 R₈ y R₉ en conjunto son =O o H, H; e

20

25

y = enlace, CH₂.

2. Un compuesto de fórmula:

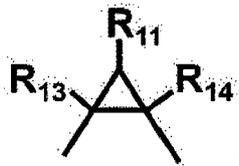


5

donde:

x = enlace o CR₁₁, o -CHR₆-x-CHR₅- es

10



y = enlace o CHR₁₂;

R₁ = OH, OCH₃;

R₂ = H, OH, OCH₃;

R₃ = halo y R₄ = H, OH, OCH₃, alquilo, halo, amino, tior;

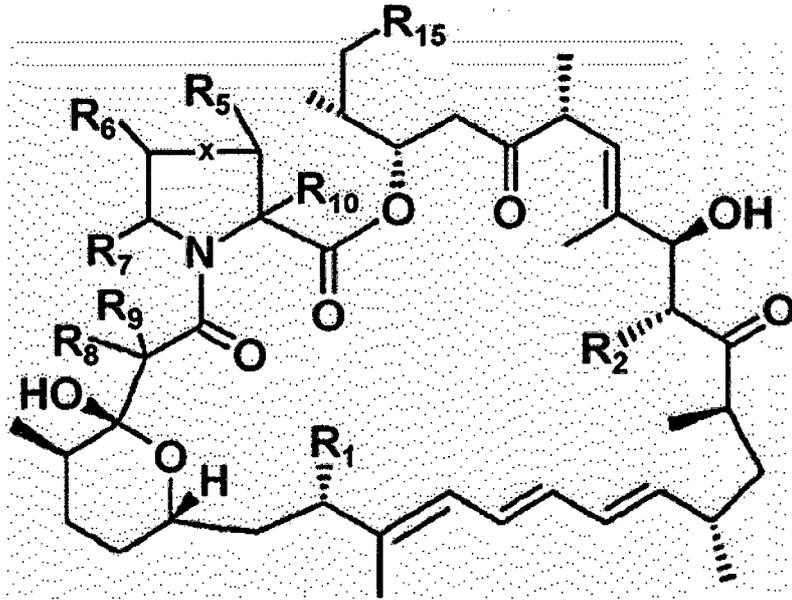
R₄ = halo y R₃ = H, OH, OCH₃, alquilo, halo, amino, tior;

R₅, R₆, R₇, R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃, y R₁₄ son cada uno independientemente H, alquilo, halo, hidroxilo; y

R₈ y R₉ en conjunto son =O o H, H.

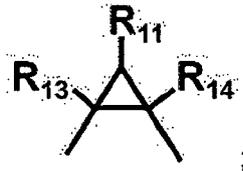
20

3. Un compuesto de fórmula:

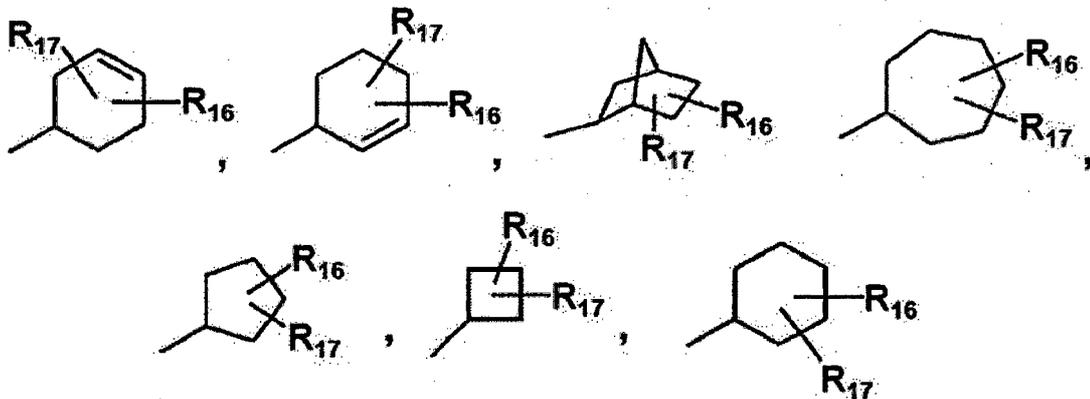


donde:

5 x = enlace o CR₁₁, o -CHR₆-x-CHR₅- es



10 R₁ = O, OCH₃; R₂ = H, OH, OCH₃;
 R₅ = H, alquilo, halo, hidroxi;
 R₆ = H, alquilo, halo, hidroxi;
 R₇ = H, alquilo, halo, hidroxi;
 R₈, R₉ = =O, o H, H;
 15 R₁₀ = H, alquilo, halo, hidroxi;
 R₁₁ = H, alquilo, halo, hidroxi;
 R₁₂ = H, alquilo, halo, hidroxi;
 R₁₃ = H, alquilo, halo, hidroxi;
 R₁₄ = H, alquilo, halo, hidroxi;
 20 R₁₅ =



R₁₆ = OH; y

R₁₇ = halo.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1:
donde

5

R₁₅ es G; y

R₃ = F, Cl y R₄ = H, OH, CH₃, F, Cl o

R₄ = F, Cl y R₃ = H, OH, CH₃, F, Cl, OCH₃.

10 5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidrox ciclohexil)-36-(3-fluoro-4-hidrox ciclohexil) rapamicina.

15 6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidrox ciclohexil)-36-(3-hidroxi-4-fluorociclohexil) rapamicina.

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidrox ciclohexil)-36-(3-cloro-4-hidrox ciclohexil) rapamicina.

20 8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es 9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-36-des(3-cis-metoxi-4-trans-hidrox ciclohexil)-36-(3-hidroxi-4-clorociclohexil) rapamicina.

9. Un método para generar un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo dicho método:

25 (a) generar una cepa recombinante, en la que al menos el homólogo de rapK se ha suprimido o inactivado; y
(b) alimentar una unidad iniciadora no natural a dicha cepa.

30 10. El método de la reivindicación 9, que comprende adicionalmente suprimir uno o más genes auxiliares adicionales.

11. El método de las reivindicaciones 9 o 10, que comprende adicionalmente restaurar por complementación uno o más de los genes suprimidos.

35 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, que comprende adicionalmente la etapa de aislar y purificar los compuestos generados.

13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que dicha unidad iniciadora no natural se selecciona entre el grupo que consiste en:

40 ácido 3-trans-hidroxi-4-cis-fluorociclohexano carboxílico;
ácido 4-trans-hidroxi-3-cis-fluorociclohexano carboxílico;
ácido 3-cis-hidroxi-4-trans-fluorociclohexano carboxílico;
ácido 4-cis-hidroxi-3-trans-fluorociclohexano carboxílico;
45 ácido 3-cis-hidroxi-4-trans-clorociclohexano carboxílico;
ácido 4-cis-hidroxi-3-trans-clorociclohexano carboxílico;
ácido 3-trans-hidroxi-4-cis-clorociclohexano carboxílico; y
ácido 4-trans-hidroxi-3-cis-clorociclohexano carboxílico,

o ésteres simples o sales de los mismos.

50

14. El uso de un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, el tratamiento de infecciones fúngicas, el tratamiento de enfermedades autoinmunes, proliferativas y/o hiperproliferativas, el mantenimiento de inmunosupresión, el tratamiento de diabetes, rechazo agudo o crónico de un trasplante de órganos o tejidos, asma, tumores, psoriasis, eccema, artritis reumatoide, fibrosis, alergias o para uso en relación con mecanismos antifibróticos, neuroregenerativos y/o antiangiogénicos.

15. El uso de un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la fabricación de una endoprótesis vascular.

60

16. Una endoprótesis vascular que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

65 17. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso en el tratamiento de cáncer, el tratamiento de infecciones fúngicas, el tratamiento de enfermedades autoinmunes, proliferativas y/o hiperproliferativas, el mantenimiento de inmunosupresión, el tratamiento de diabetes, rechazo agudo o crónico de un

trasplante de órganos o tejidos, asma, tumores, psoriasis, eccema, artritis reumatoide, fibrosis, alergias o para uso en relación con mecanismos antifibróticos, neuroregenerativos y/o antiangiogénicos.

Figura 1

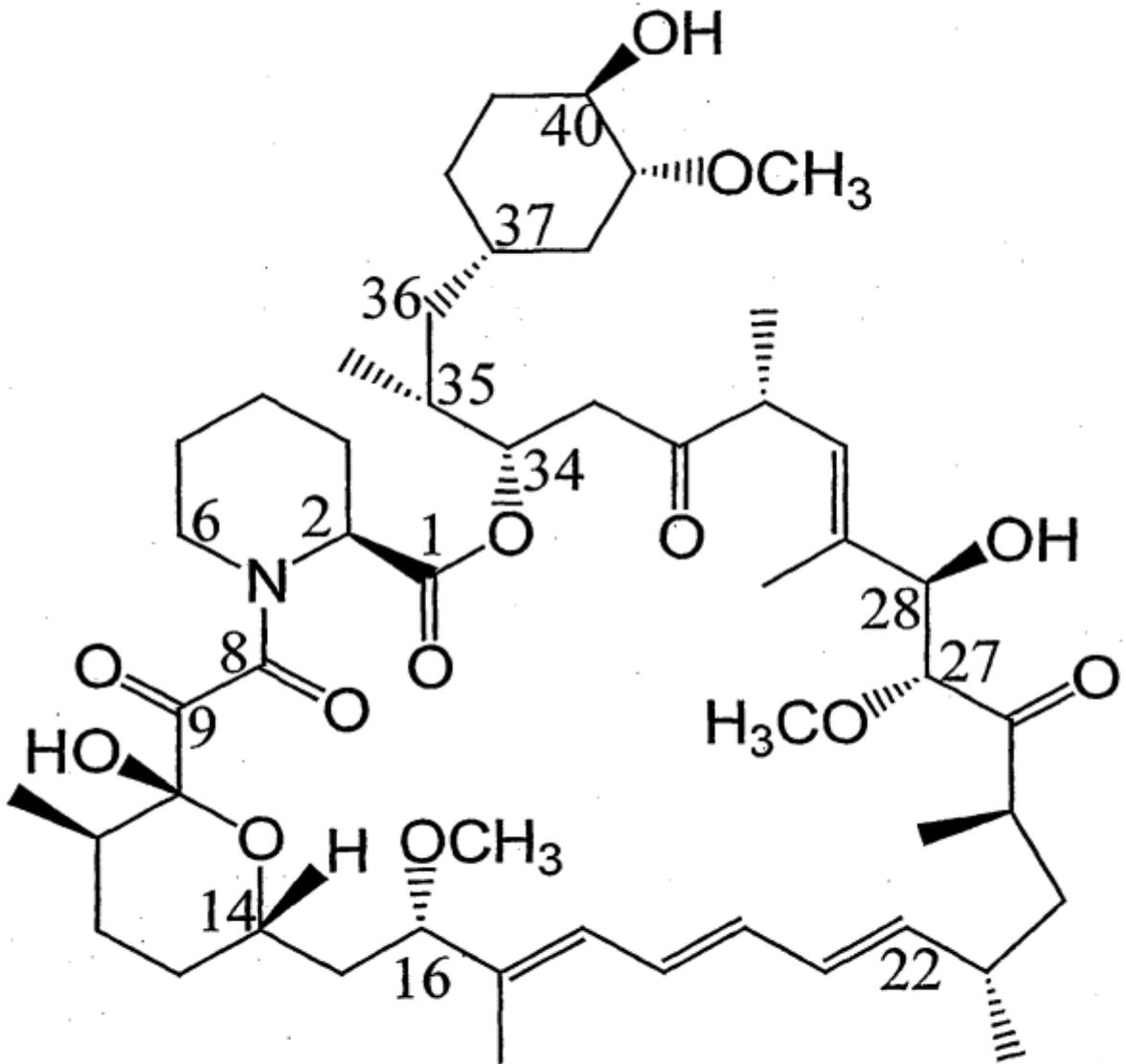


Figura 2

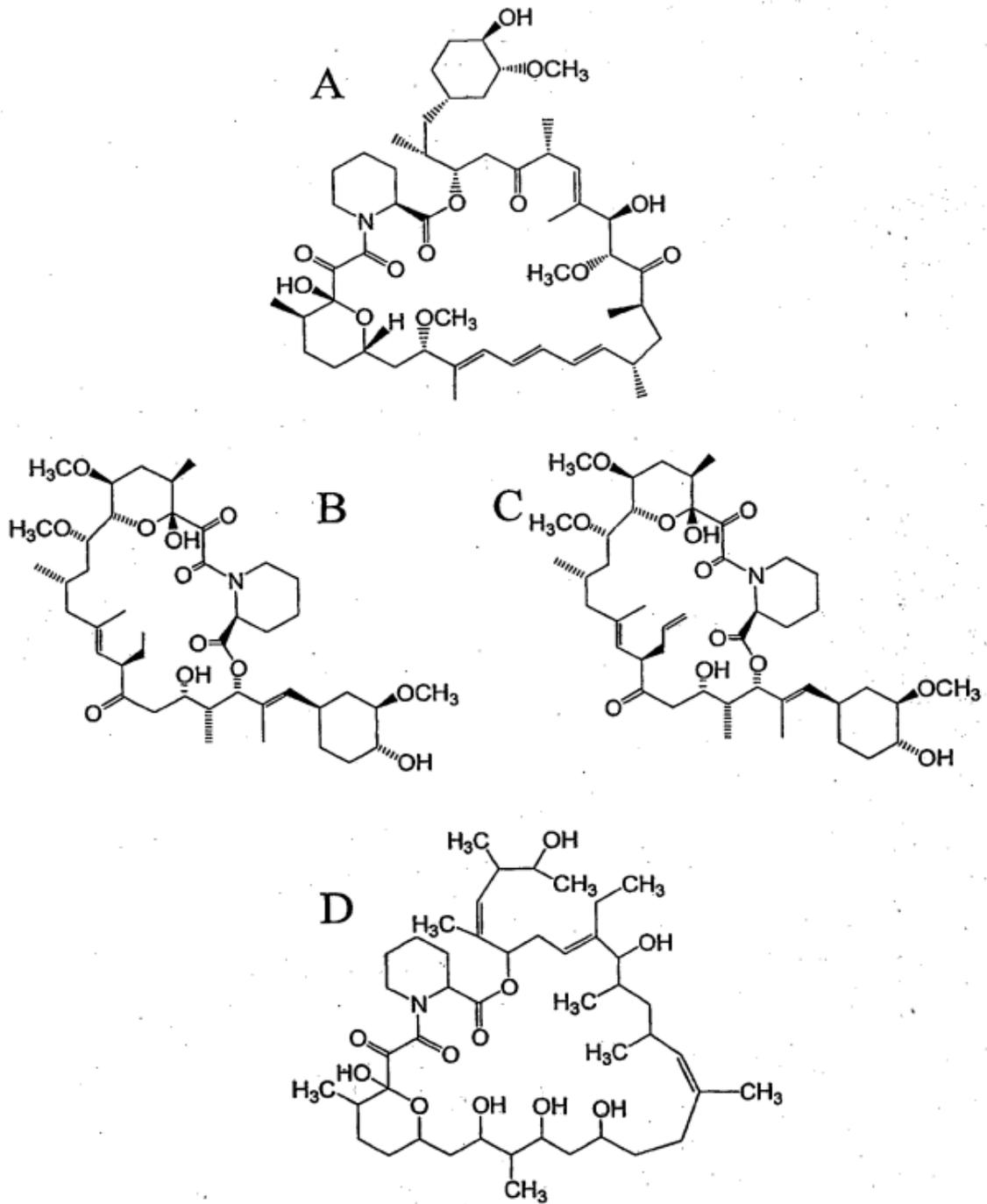


Figura 3

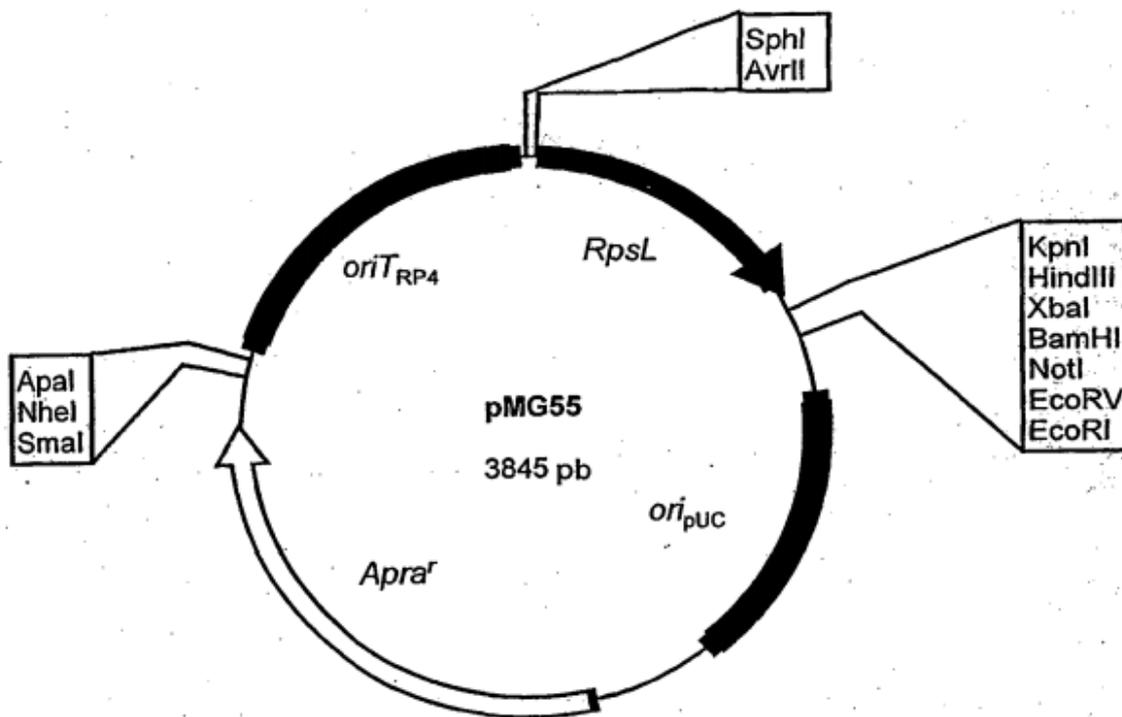


Figura 4

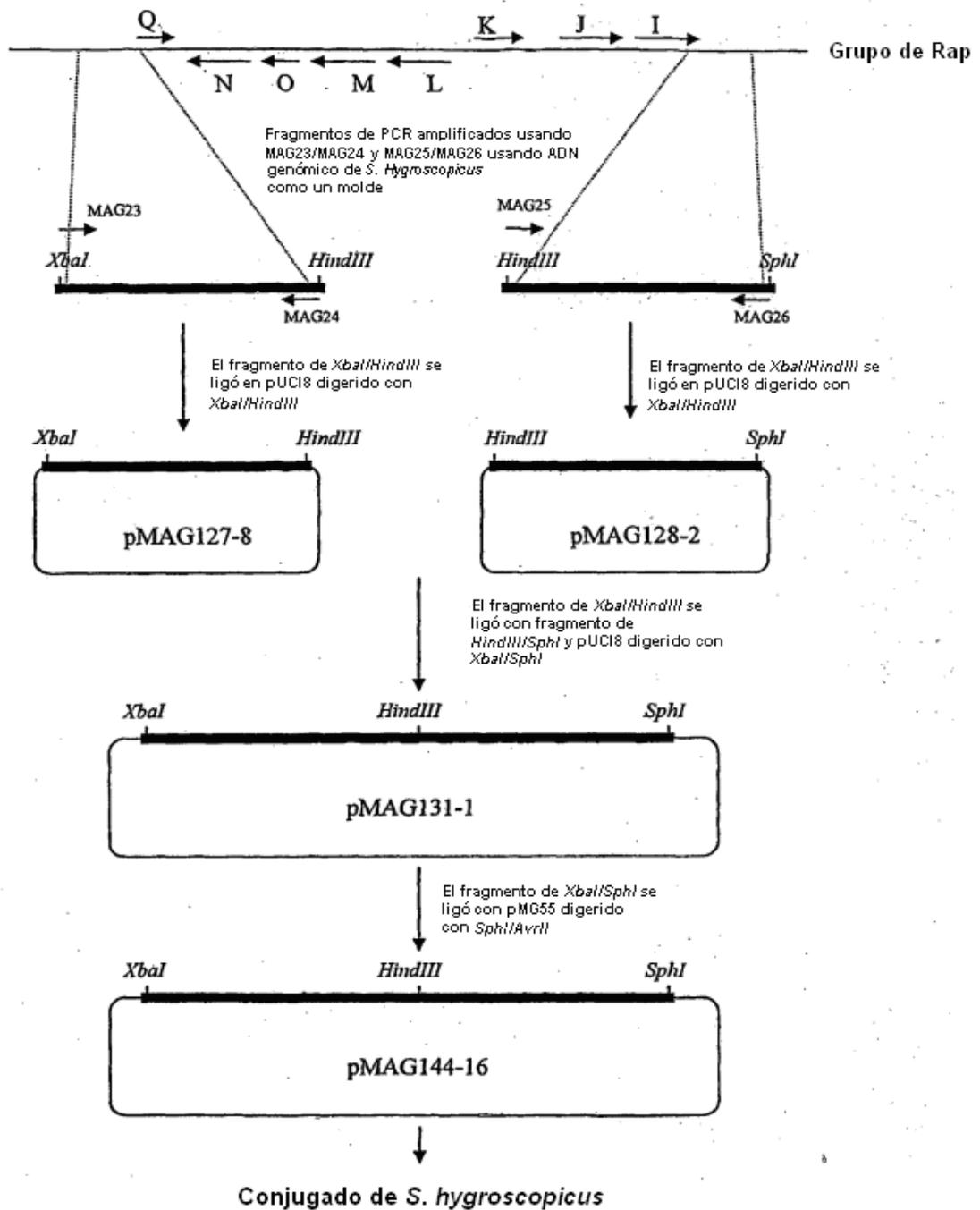


Figura 5

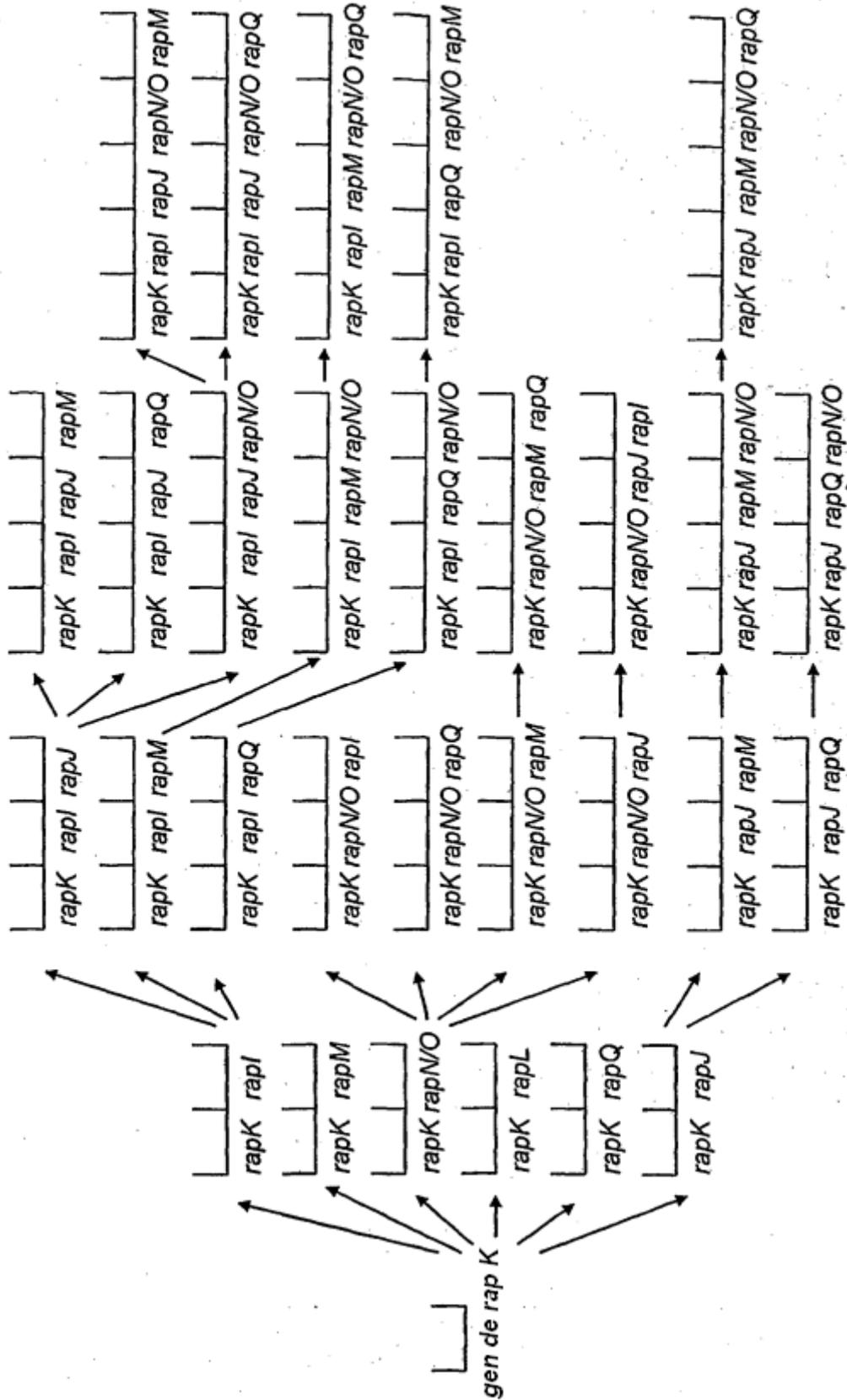
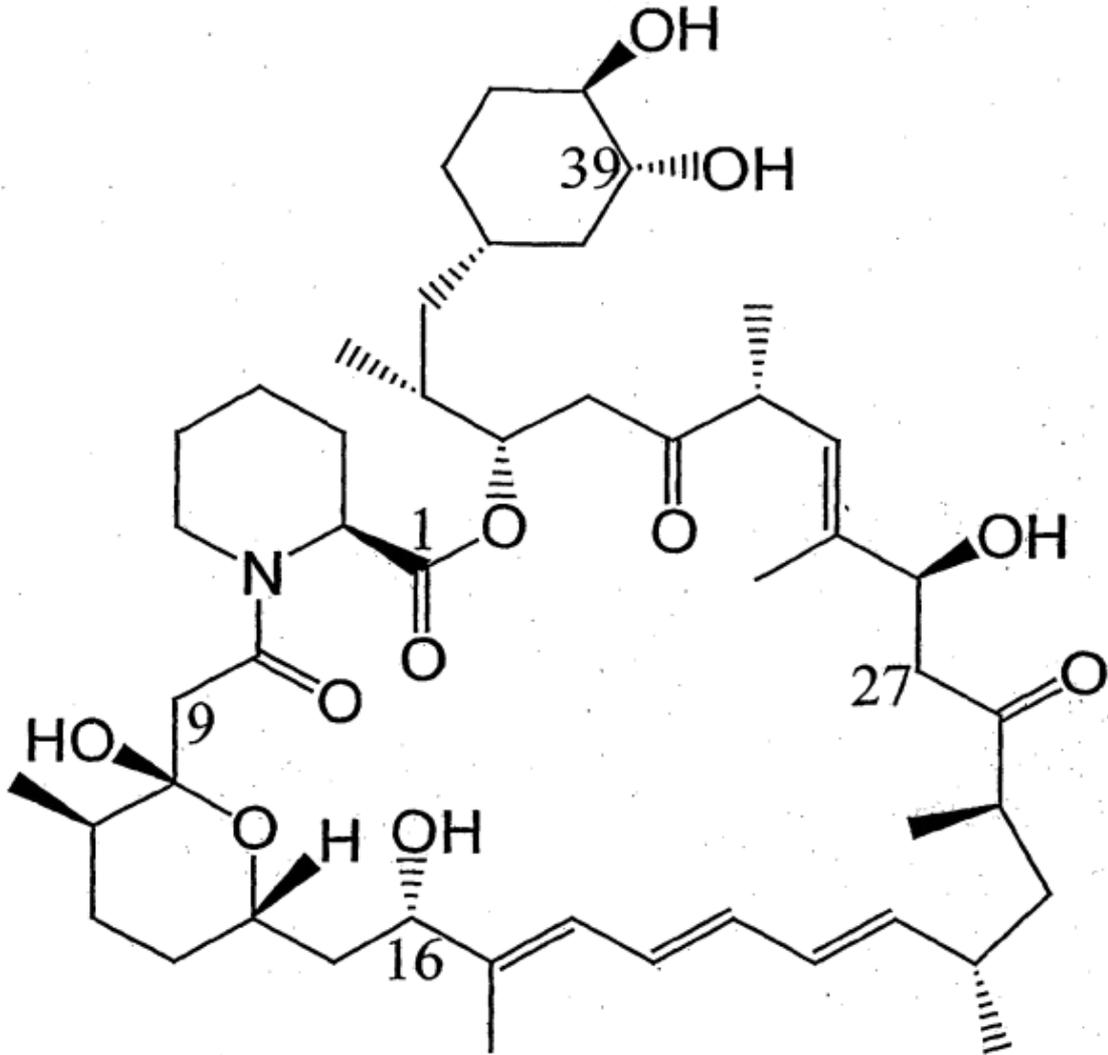
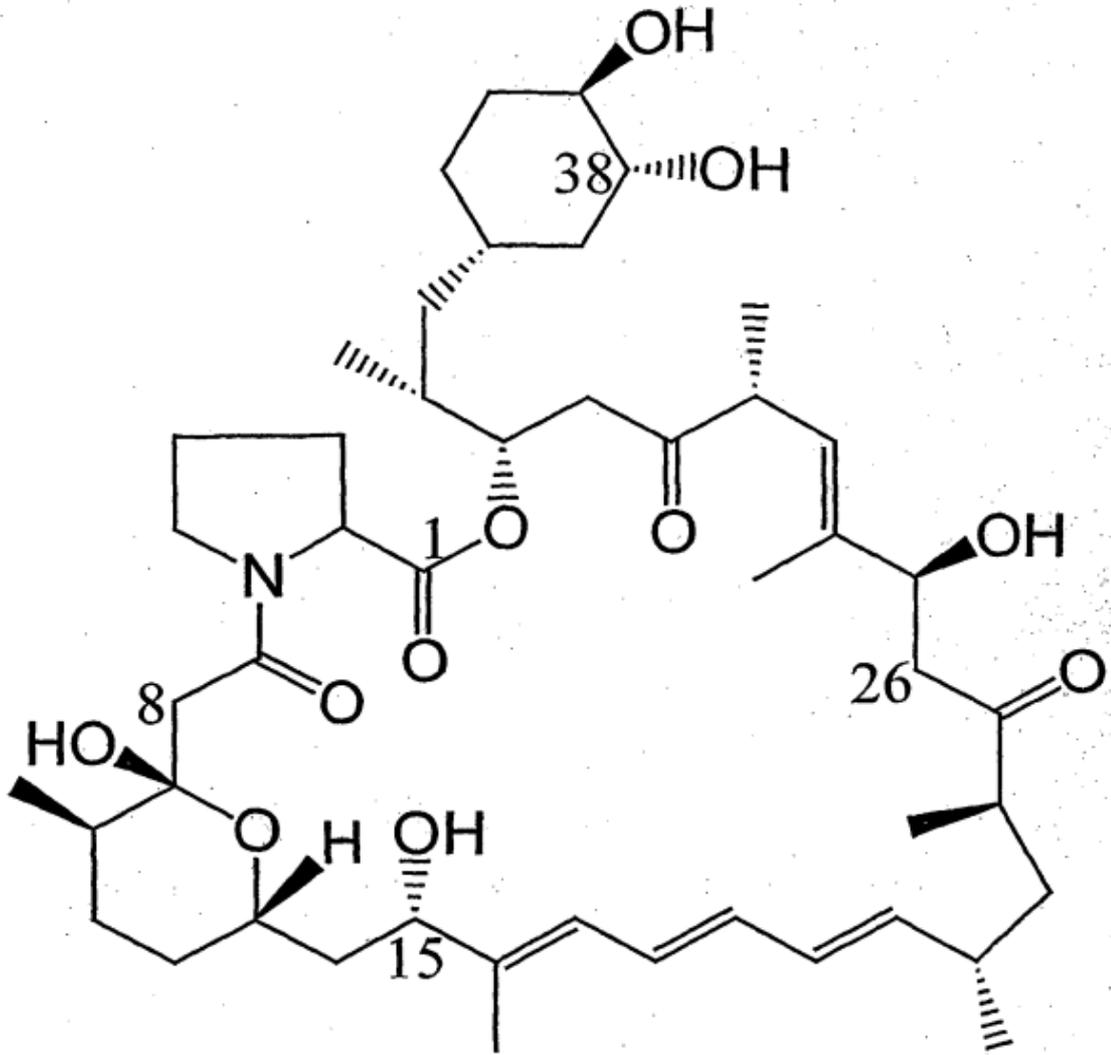


Figura 6



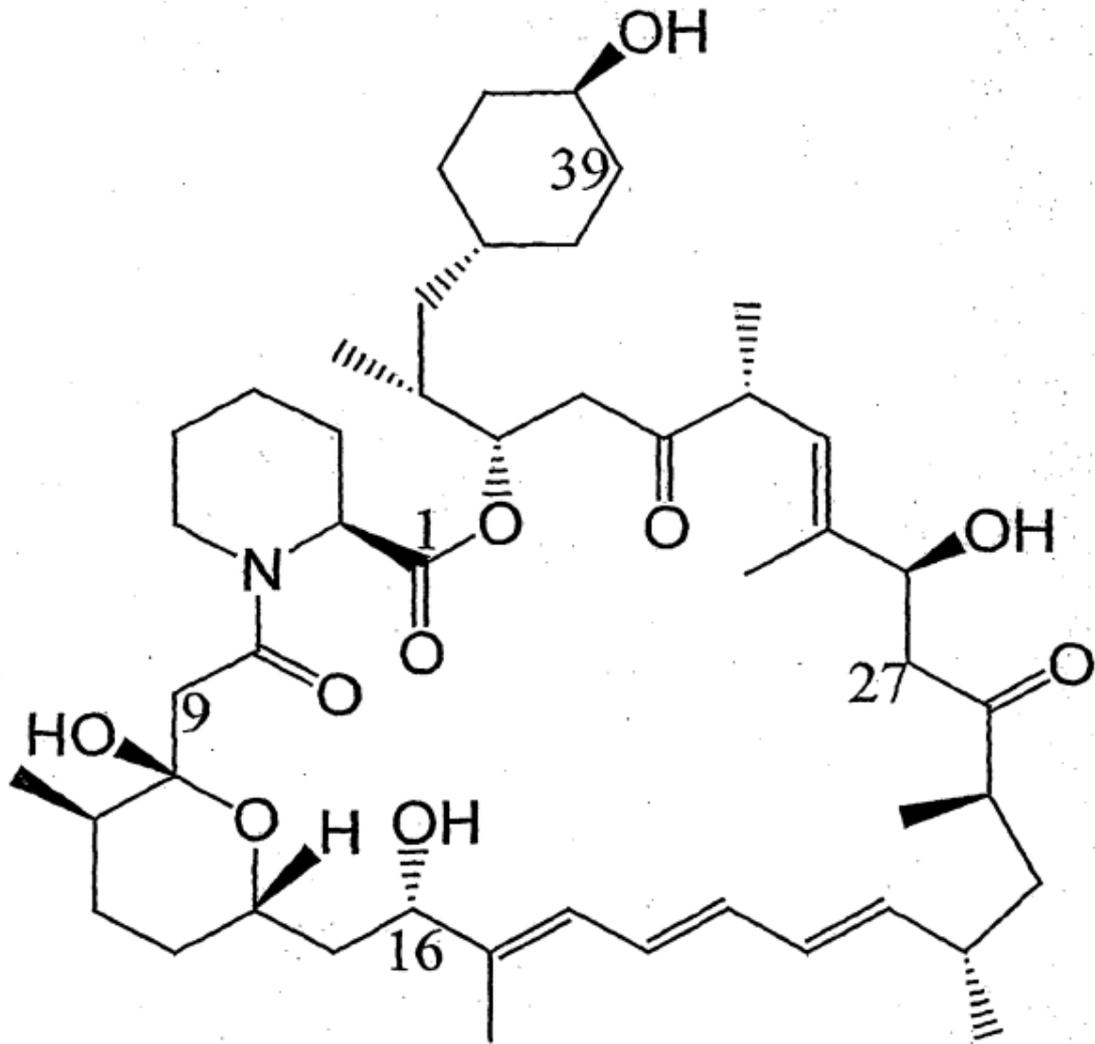
9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-O-desmetil rapamicina

Figura 7



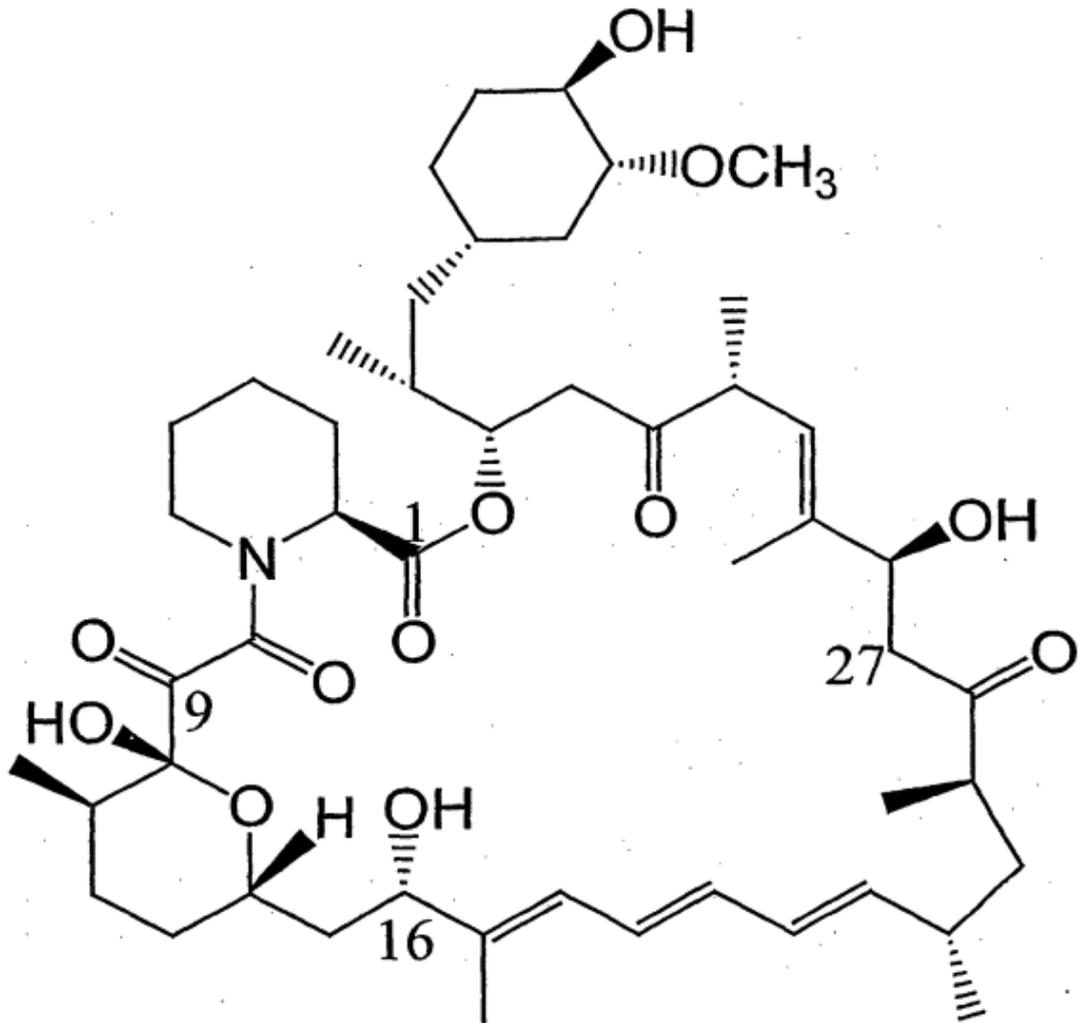
8-desoxo-15-O-desmetil-26-desmetoxi-38-O-desmetil propilrapamicina

Figura 8



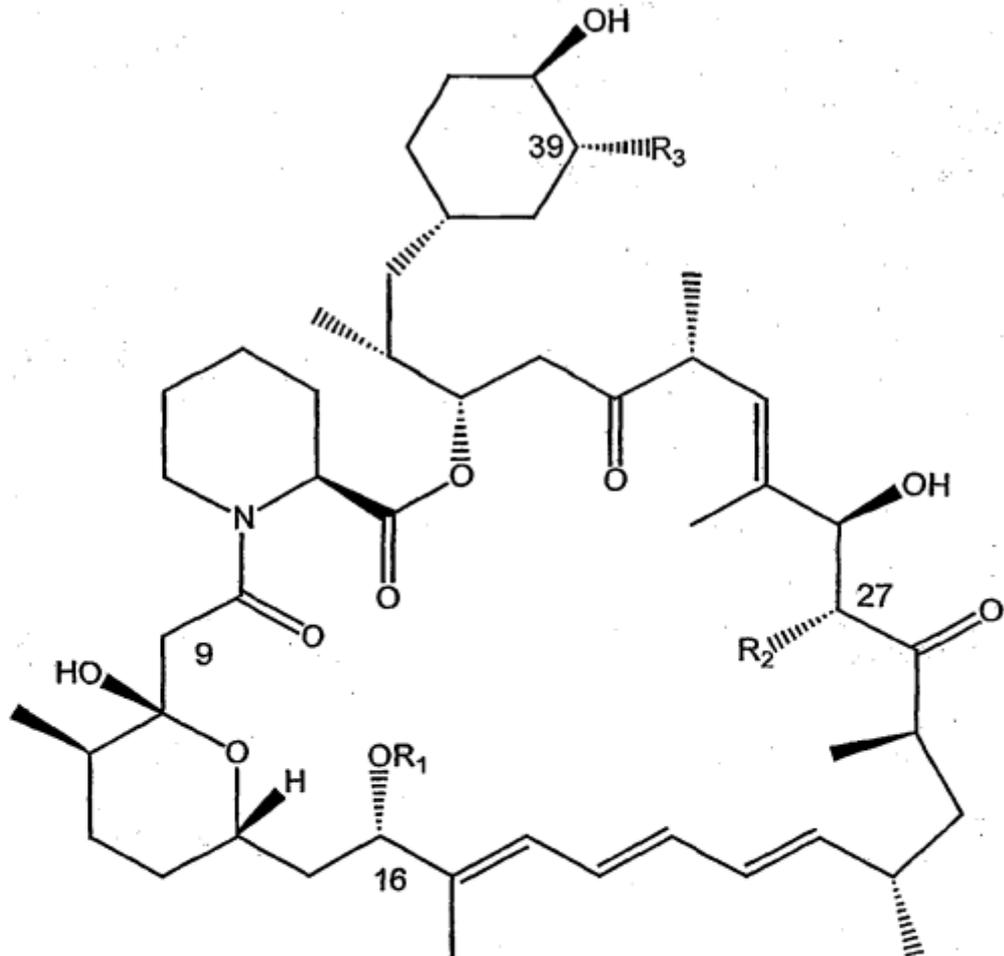
9-desoxo-16-O-desmetil-27-desmetoxi-39-desmetoxi rapamicina

Figura 9



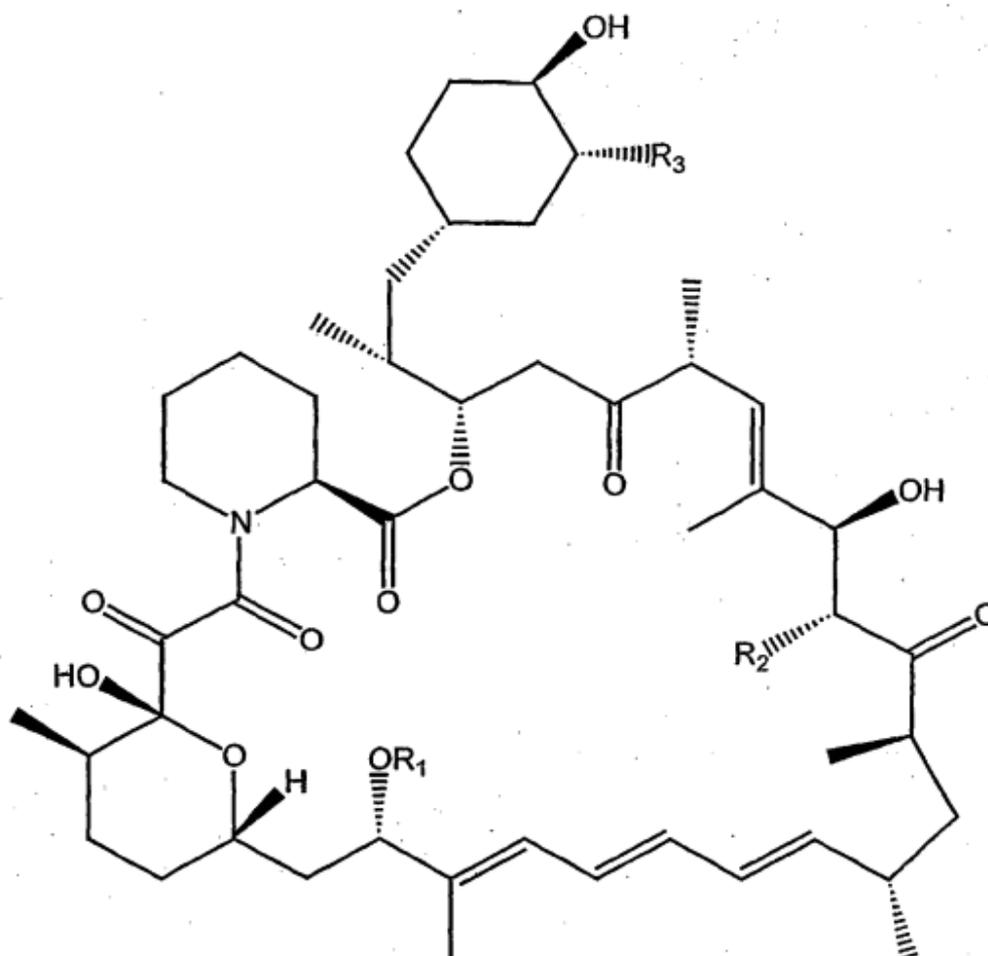
16-O-desmetil-27-desmetoxi rapamicina

Figura 10



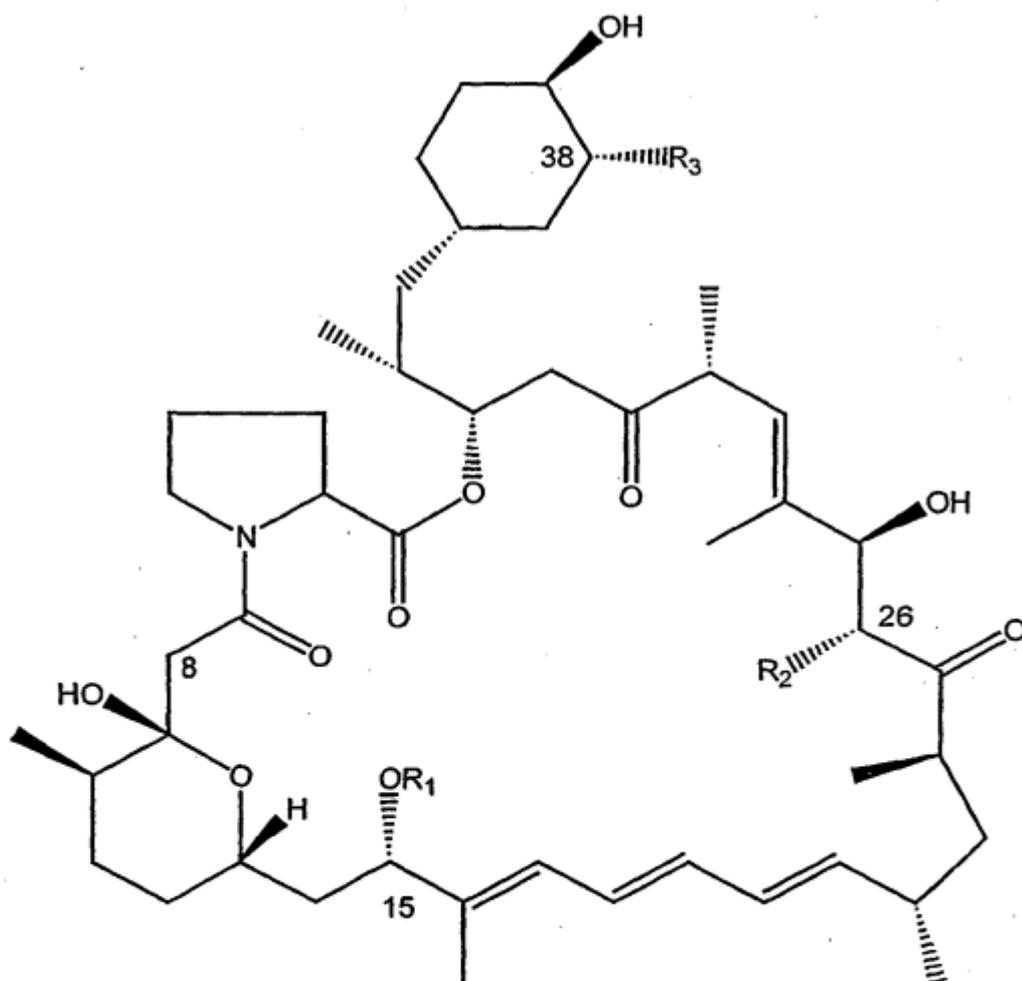
R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =OH	compuesto 1
R ₁ =H	R ₂ =OH	R ₃ =OH	compuesto 2
R ₁ =CH ₃	R ₂ =H	R ₃ =OH	compuesto 4
R ₁ =H	R ₂ =OCH ₃	R ₃ =OH	compuesto 5
R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =OCH ₃	compuesto 6
R ₁ =CH ₃	R ₂ =OH	R ₃ =OH	compuesto 8
R ₁ =H	R ₂ =OH	R ₃ =OCH ₃	compuesto 9
R ₁ =H	R ₂ =OCH ₃	R ₃ =OCH ₃	compuesto 15
R ₁ =CH ₃	R ₂ =H	R ₃ =OCH ₃	compuesto 16
R ₁ =CH ₃	R ₂ =OH	R ₃ =OCH ₃	compuesto 17
R ₁ =CH ₃	R ₂ =OCH ₃	R ₃ =OH	compuesto 18
R ₁ =CH ₃	R ₂ =OCH ₃	R ₃ =OCH ₃	compuesto 19

Figura 11



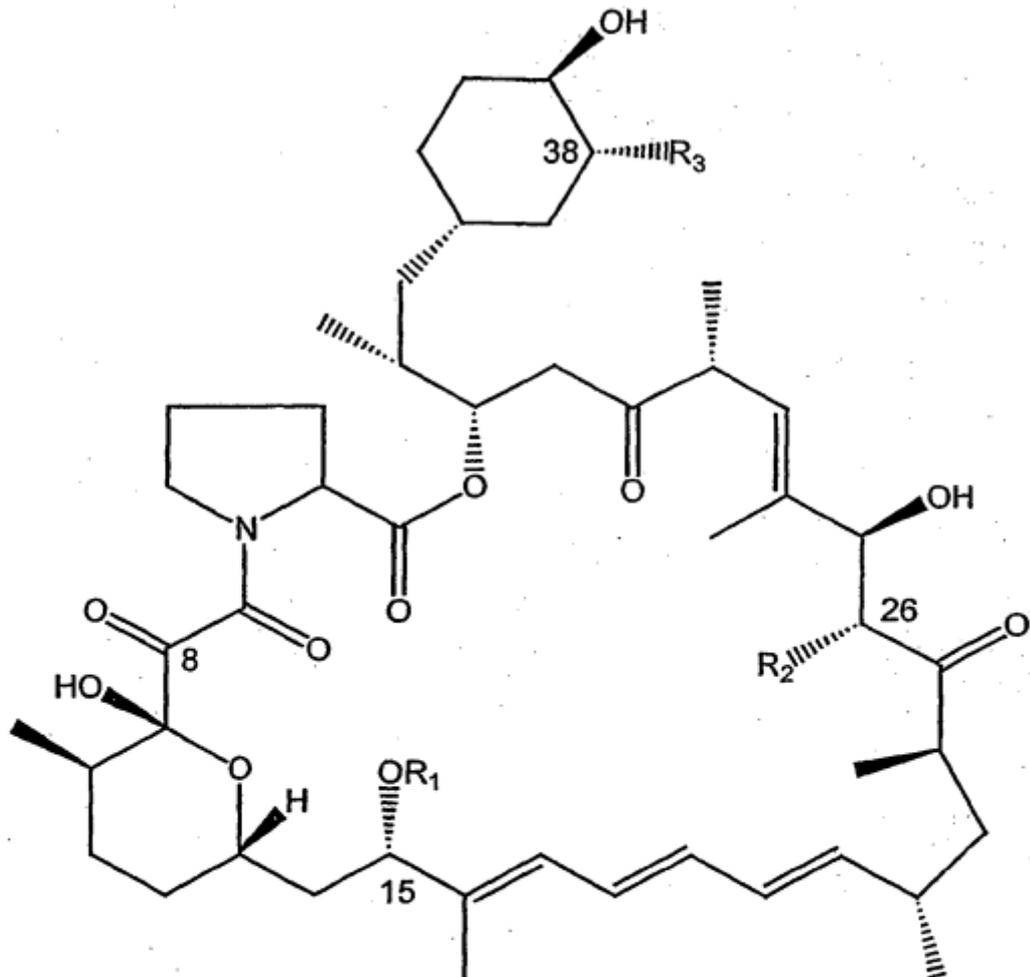
R ₁ = H	R ₂ = H	R ₃ = OH	compuesto 3
R ₁ = H	R ₂ = OH	R ₃ = OH	compuesto 7
R ₁ = H	R ₂ = OCH ₃	R ₃ = OH	compuesto 10
R ₁ = H	R ₂ = OH	R ₃ = OCH ₃	compuesto 11
R ₁ = H	R ₂ = H	R ₃ = OCH ₃	compuesto 12
R ₁ = CH ₃	R ₂ = H	R ₃ = OH	compuesto 13
R ₁ = CH ₃	R ₂ = OH	R ₃ = OH	compuesto 14
R ₁ = H	R ₂ = OCH ₃	R ₃ = OCH ₃	compuesto 20
R ₁ = CH ₃	R ₂ = OH	R ₃ = OCH ₃	compuesto 21
R ₁ = CH ₃	R ₂ = H	R ₃ = OCH ₃	compuesto 22
R ₁ = CH ₃	R ₂ = OCH ₃	R ₃ = OH	compuesto 23

Figura 12



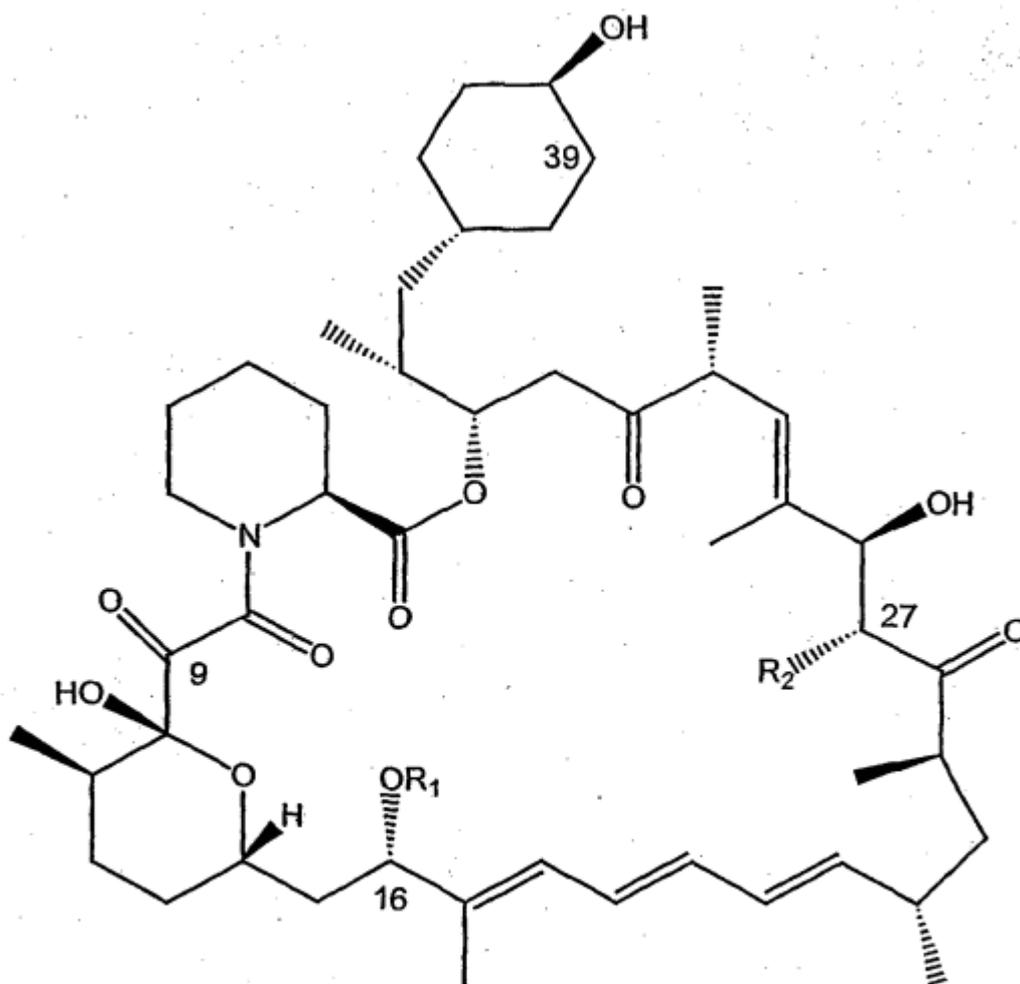
$R_1 = H$	$R_2 = H$	$R_3 = OH$	compuesto 24
$R_1 = H$	$R_2 = OH$	$R_3 = OH$	compuesto 25
$R_1 = CH_3$	$R_2 = H$	$R_3 = OH$	compuesto 27
$R_1 = H$	$R_2 = OCH_3$	$R_3 = OH$	compuesto 28
$R_1 = H$	$R_2 = H$	$R_3 = OCH_3$	compuesto 29
$R_1 = CH_3$	$R_2 = OH$	$R_3 = OH$	compuesto 31
$R_1 = H$	$R_2 = OH$	$R_3 = OCH_3$	compuesto 32
$R_1 = H$	$R_2 = OCH_3$	$R_3 = OCH_3$	compuesto 38
$R_1 = CH_3$	$R_2 = H$	$R_3 = OCH_3$	compuesto 39
$R_1 = CH_3$	$R_2 = OH$	$R_3 = OCH_3$	compuesto 40
$R_1 = CH_3$	$R_2 = OCH_3$	$R_3 = OH$	compuesto 41
$R_1 = CH_3$	$R_2 = OCH_3$	$R_3 = OCH_3$	compuesto 42

Figura 13



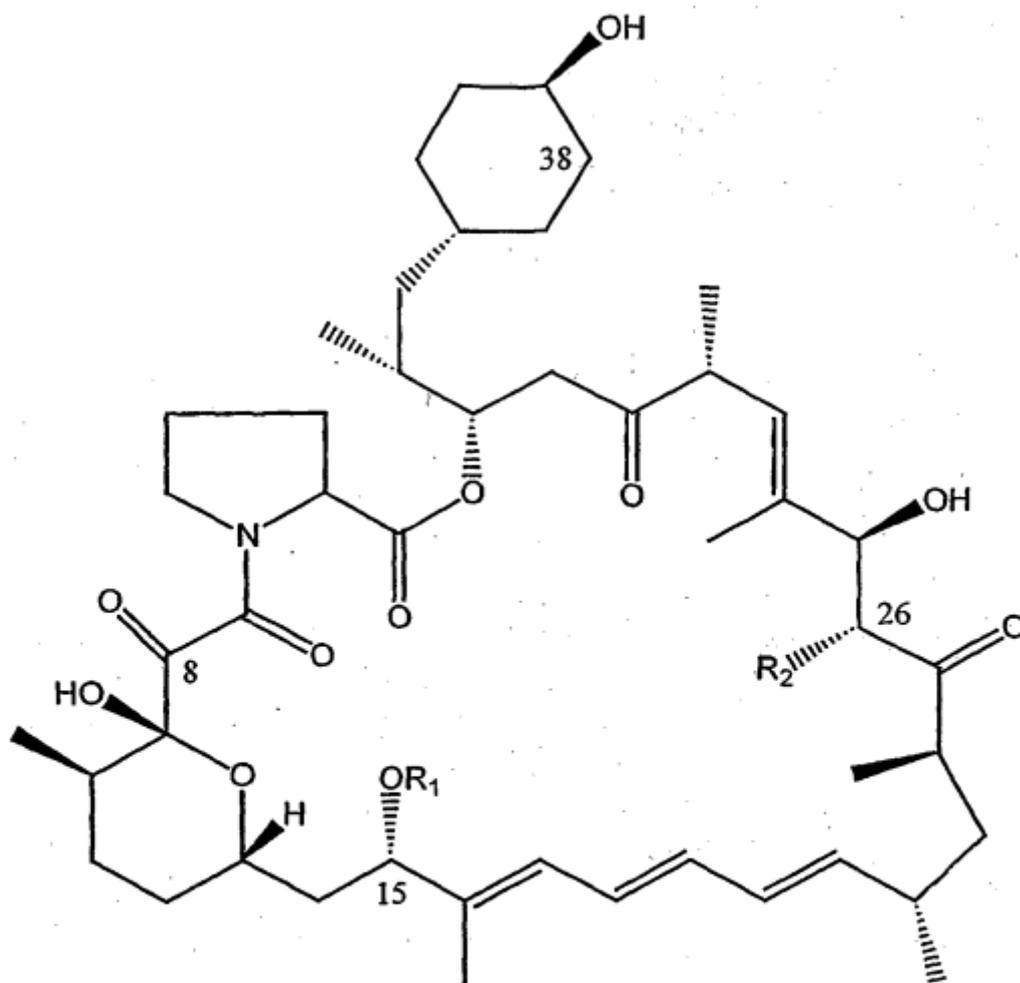
$R_1 = H$	$R_2 = H$	$R_3 = OH$	compuesto 26
$R_1 = H$	$R_2 = OH$	$R_3 = OH$	compuesto 30
$R_1 = H$	$R_2 = OCH_3$	$R_3 = OH$	compuesto 33
$R_1 = H$	$R_2 = OH$	$R_3 = OCH_3$	compuesto 34
$R_1 = H$	$R_2 = H$	$R_3 = OCH_3$	compuesto 35
$R_1 = CH_3$	$R_2 = H$	$R_3 = OH$	compuesto 36
$R_1 = CH_3$	$R_2 = OH$	$R_3 = OH$	compuesto 37
$R_1 = H$	$R_2 = OCH_3$	$R_3 = OCH_3$	compuesto 43
$R_1 = CH_3$	$R_2 = OH$	$R_3 = OCH_3$	compuesto 44
$R_1 = CH_3$	$R_2 = H$	$R_3 = OCH_3$	compuesto 45
$R_1 = CH_3$	$R_2 = OCH_3$	$R_3 = OH$	compuesto 46

Figura 15



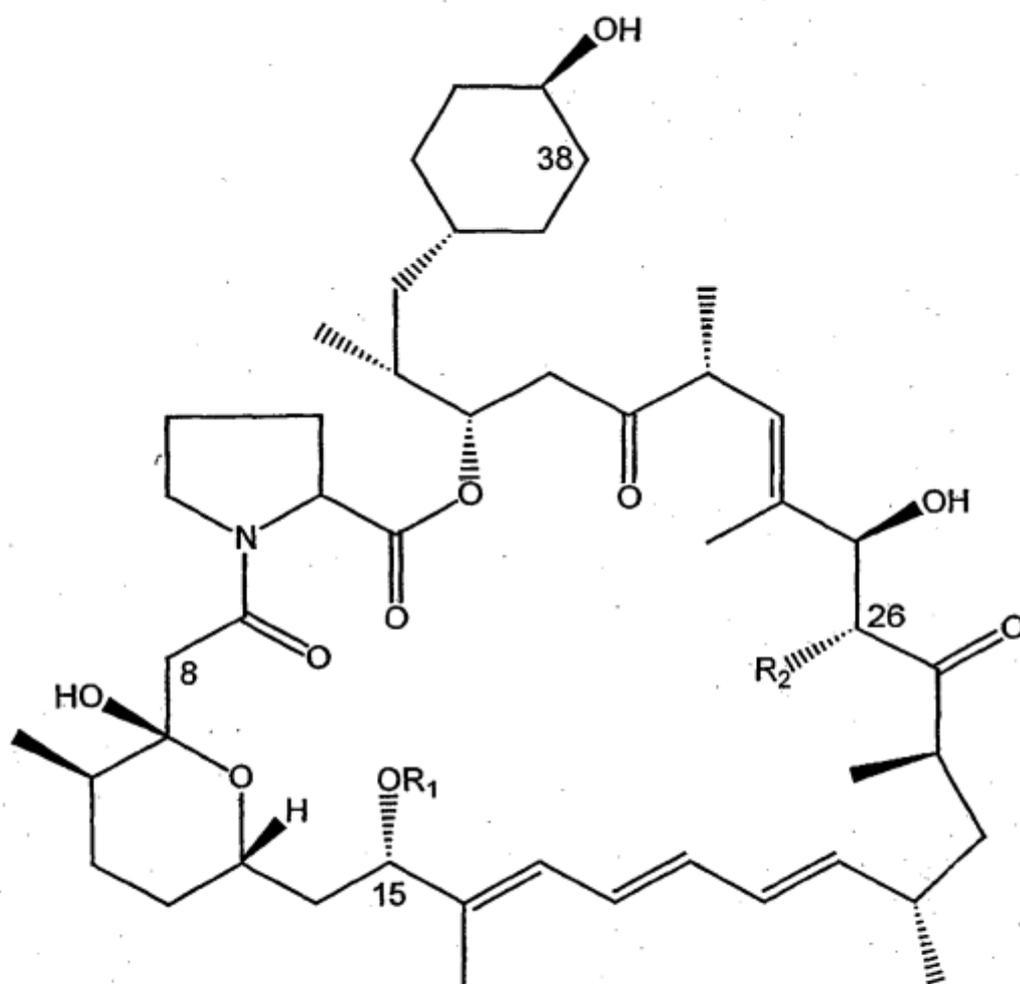
$R_1 = H$	$R_2 = H$	compuesto 49
$R_1 = H$	$R_2 = OH$	compuesto 52
$R_1 = H$	$R_2 = OCH_3$	compuesto 54
$R_1 = CH_3$	$R_2 = H$	compuesto 55
$R_1 = CH_3$	$R_2 = OH$	compuesto 56
$R_1 = CH_3$	$R_2 = OCH_3$	compuesto 58

Figura 16



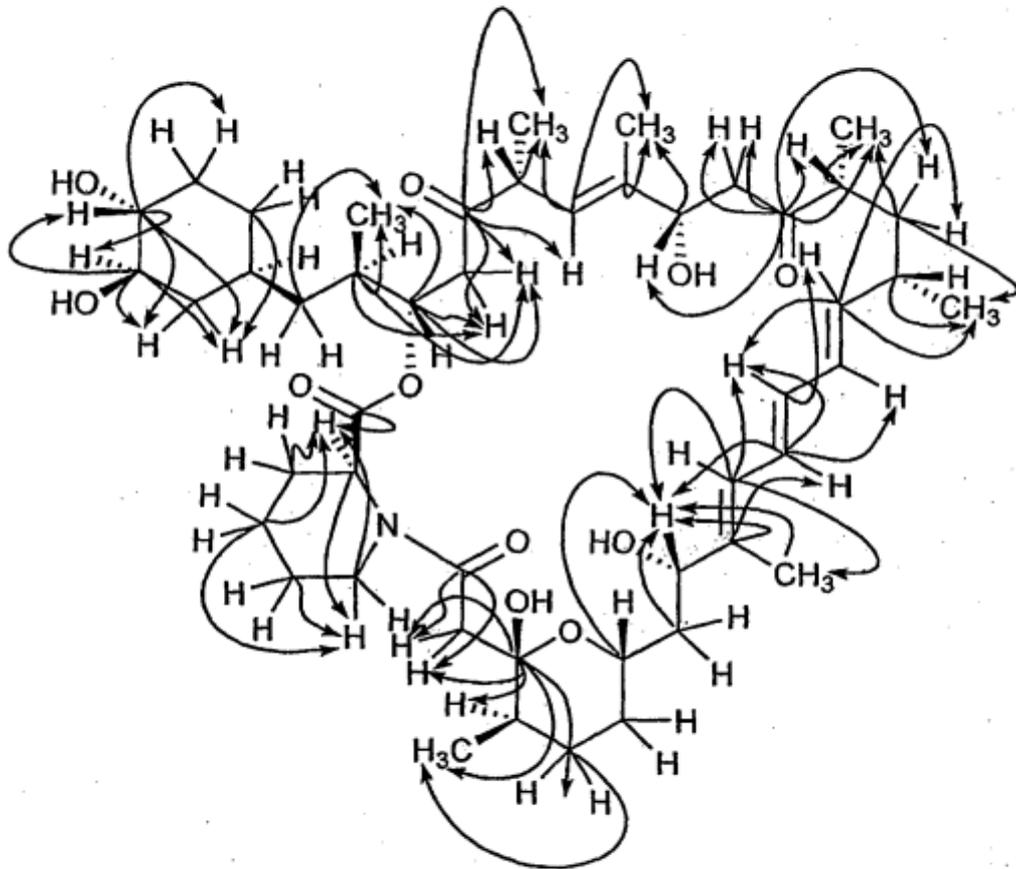
$R_1 = H$	$R_2 = H$	compuesto 61
$R_1 = H$	$R_2 = OH$	compuesto 64
$R_1 = H$	$R_2 = OCH_3$	compuesto 66
$R_1 = CH_3$	$R_2 = H$	compuesto 67
$R_1 = CH_3$	$R_2 = OH$	compuesto 68
$R_1 = CH_3$	$R_2 = OCH_3$	compuesto 70

Figura 17



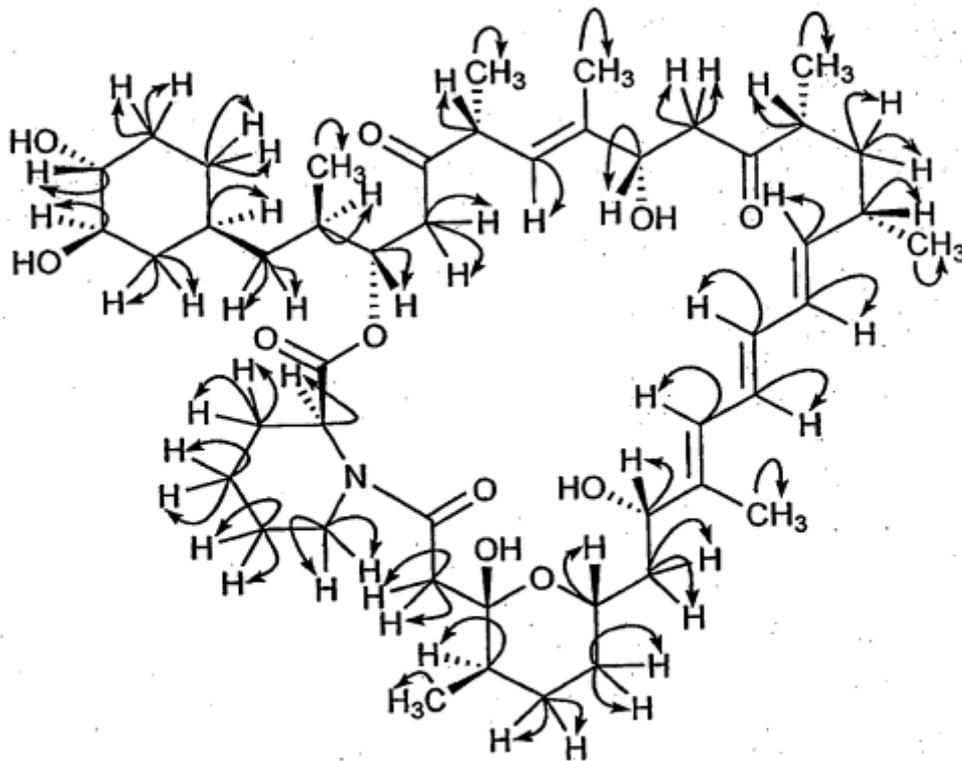
$R_1 = H$	$R_2 = H$	compuesto 59
$R_1 = H$	$R_2 = OH$	compuesto 60
$R_1 = CH_3$	$R_2 = H$	compuesto 62
$R_1 = H$	$R_2 = OCH_3$	compuesto 63
$R_1 = CH_3$	$R_2 = OH$	compuesto 65
$R_1 = CH_3$	$R_2 = OCH_3$	compuesto 69

Figura 18



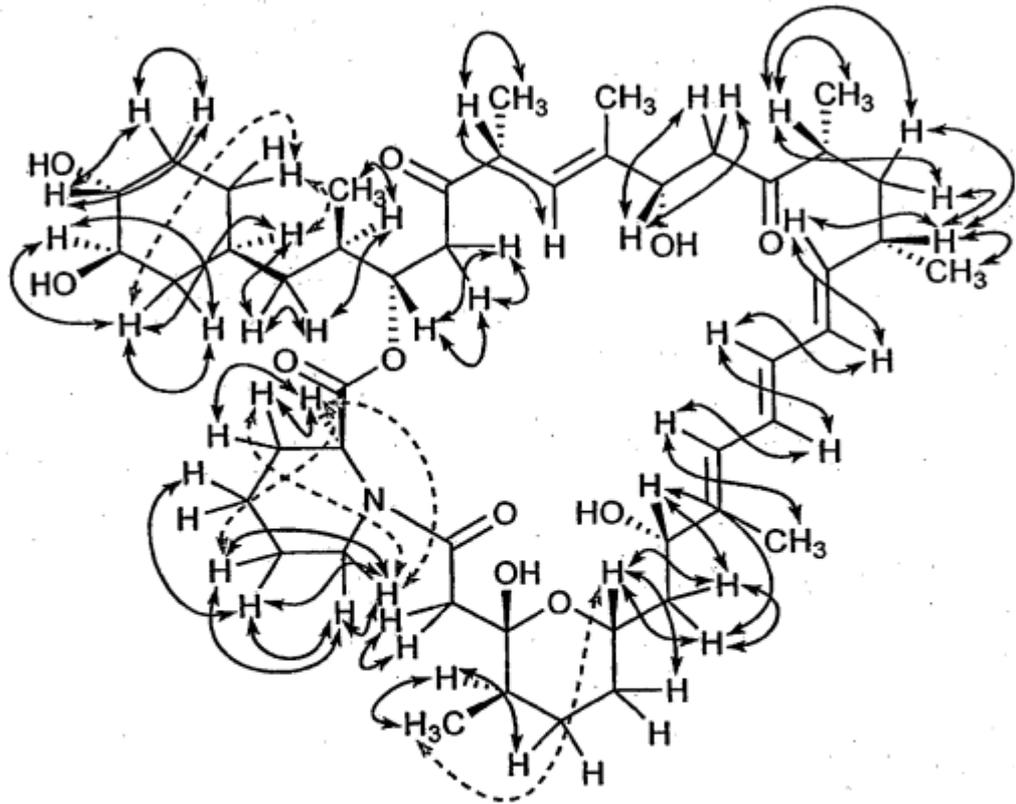
 correlaciones de pre-rapamicina HMBC

Figura 19



↪ correlaciones de pre-rapamicina HMQC

Figura 20



correlaciones de pre-rapamicina COSY



correlaciones seleccionadas de pre-rapamicina TOCSY

Figura 21

```

646 GCGACCCGAGCAGATCGTTGGTGTCTGCTTGCGGCGTTCGCGATCAGC 597
|||||
92333 GCGACCCGAGCAGATCGTTGGTGTCTGCTTGCGGCGTTCGCGATCAGC 92382

596 TCGGAGAGGTAGAGGTAGAGCGACTGGCCGGCCGATCAGACTTCCTG 547
|||||
92383 TCGGAGAGGTAGAGGTAGAGCGACTGGCCGGCCGATCAGACTTCCTG 92432

546 TGAGTAGGCGCCGTTTCGAGAGCATCTGGTCCGACCAGGTCGGAACTTGG 497
|||||
92433 TGAGTAGGCGCCGTTTCGAGAGCATCTGGTCCGACCAGGTCGGAACTTGG 92482

496 TCTGGTCCTCGATCGGCACGCCAGCAGCTCACAGATCATGATGATCGGC 447
|||||
92483 TCTGGTCCTCGATCGGCACGCCAGCAGCTCACAGATCATGATGATCGGC 92532

446 AGAGGCAGGGCGAAGTCTCCATCAGATCGGCGGGGGCGCCCTTGGCCAG 397
|||||
92533 AGAGGCAGGGCGAAGTCTCCATCAGATCGGCGGGGGCGCCCTTGGCCAG 92582

396 CATTTTGTGATCAGATCGTCGGCGACCTCCTGGGTGCGCGGACGCAGGG 347
|||||
92583 CATTTTGTGATCAGATCGTCGGCGACCTCCTGGGTGCGCGGACGCAGGG 92632

346 CCTCCATCCGGCGGCTGGTCAGCGCCTTGGTCGCCAACCGGCGCAGCCGG 297
|||||
92633 CCTCCATCCGGCGGCTGGTCAGCGCCTTGGTCGCCAACCGGCGCAGCCGG 92682

296 GTGTGTTCCGGAGGGTCCATCAGCATGATGACGGGCTGGTCTGGATCGC 247
|||||
92683 GTGTGTTCCGGAGGGTCCATCAGCATGATGACGGGCTGGTCTGGATCGC 92732

246 CGGGAGGACCCGGGGCACGTCTTGCCGAGCGTCGCGCTGCGGCTGAACC 197
|||||
92733 CGGGAGGACCCGGGGCACGTCTTGCCGAGCGTCGCGCTGCGGCTGAACC 92782

196 GCGGGTCCACGAACACCTTGGCGACGTCTCCAGCTGGTGGCCAGCCAG 147
|||||
92783 GCGGGTCCACGAACACCTTGGCGACGTCTCCAGCTGGTGGCCAGCCAG 92832

146 GTCTCCCGCCGTACGGCATCAGGACCCGGCCGAGCTCACCGCGTCCCG 97
|||||
92833 GCCTCCCGCCGTCCAAACATCAGGACCCGGCCGAGCTCACCGCGTCCCG 92882

96 CAGCCGGTTGTAICTCGGGGTGGATCTCGAGTCGCTCCATTTCGGCGAAAG 47
|||||
92883 CAGCCGGTTGTAICTCGGGGTGGATCTCGAGTCGCTCCATTTCGGCGAAAG 92932

46 GATAAGGGCAGGCCTTCCGGTCTCACCTGATCGGTCGTCGACAT 1
|||||
92933 GATAAGGGCAGGCCTTCCGGTCTCACCTGATCGGTCGTCGACAT 92978

```

Figura 22

```

1  MSTTDQGETGKACYPYFAEMERLEIHPEYNRLRDAGELGRVLMMPYGGETW 50
  |||
1  MSTTDQGETGKACYPYFAEMERLEIHPEYNRLRDAGELGRVLMMLDGREAW 50

51  LATSWEDEVAKVFVDPRFSRSATLGKDVPRVLP AIQDQPVIIMLMDPPEHTR 100
  |||
51  LAASWEDEVAKVFVDPRFSRSATLGKDVPRVLP AIQDQPVIIMLMDPPEHTR 100

101 LRR L ATKALTSRRMEALRPR TQEVADDLIDKMLAKGAPADLMEDFALPLP 150
  |||
101 LRRVATKALTSRRMEALRPR TQEVADDLIDKMLAKGAPADLMEDFALPLP 150

151 IIMICEL LGVPIEDQTKFR TWS DQML SNGAYSQEVVMAAGQSLYLYLSEL 200
  |||
151 IIMICEL LGVPIEDQTKFR TWS DQML SNGAYSQEVVMAAGQSLYLYLSEL 200

201 IAERRKQDTNDLLGSLVRARDKDDRLSETELVGF AVTLLIAGYETTANAI 250
  |||
201 IAERRKQDTNDLLGSLVRARDKDDRLSETELVGF AVTLLIAGYETTANAI 250

251 GNSVY TLLTHPEKLAELRKDLSLIPKAVDELLRIPIAKQASWVRMAVED 300
  |||
251 GNSVY TLLTHPEKLAELRKDLSLIPKAVDELLRIPIAKQASWVRMAVED 300

301 VELSGTIVKAGEAVAIQTHSANTDPKVYDHPEEIDFHRTSNPHMSLGHGA 350
  |||
301 VELSGTIVKAGEAVAIQTHSANTDPKVYDHPEEIDFHRTSNPHMSLGHGA 350

351 HHCMGAQLVRVEMQTALGSLISRI PALRF AVPEPR IKFLRGRLVPSLEAL 400
  |||
351 HHCMGAQLVRVEMQTALGSLISRI PALRF AVPEPR IKFLRGRLVPSLEAL 400

401 PLTW* 405
  |||
401 PLTW* 405

```

Figura 23

```

758 CGGAGGTGACTGTCCGGGGCCATCCGCCGGCGCACCGCGGCACGGACTTG 709
|||||
93191 CGGAGGTGACTGTCCGGGGCCATCCGCCGGCGCACCGCGGCACGGACTTG 93240

708 ATCGGAGATGTCGTGATCGCTGACCCACTTCAGTTCGGGTATTTCCGTTG 659
|||||
93241 ATCGGAGATGTCGTGATCGCTGACCCACTTCAGTTCGGGTATTTCCGTTG 93290

658 TGATCCGACGCATCGCCTCAAGGCGCTGCCGCGTGAACACGTCGATGTGC 609
|||||
93291 TGATCCGACGCATCGCCTCAAGGCGCTGCCGCGTGAACACGTCGATGTGC 93340

608 GAAAGGGCGCCACCCGGGCGCAGCACGCGCGCGGCCTCCCGCAGGAAACG 559
|||||
93341 GAAAGGGCGCCACCCGGGCGCAGCACGCGCGCGGCCTCCCGCAGGAAACG 93390

558 TCCCAGATTGGGGTAGGTGTGCGAGCTCTCGATGTTGACGAGCACATCCA 509
|||||
93391 TCCCAGATTGGGGTAGGTGTGCGAGCTCTCGATGTTGACGAGCACATCCA 93440

508 CCGAGGAGTCCTCGAAGGGCAGTTCCTCGGCGTCGCCCTGGACGAAACCGC 459
|||||
93441 CCGAGGAGTCCTCGAAGGGCAGTTCCTCGGCGTCGCCCTGGACGAAACCGC 93490

458 AGGGTATCGCCGCGGGACAGCGTGGCGGTGGCGCTGGCGATCGCCTTCGG 409
|||||
93491 AGGGTATCGCCGCGGGACAGCGTGGCGGTGGCGCTGGCGATCGCCTTCGG 93540

408 CGCCAGGTCCAGCCCAGTTCATCCGGGCGGTGGGGACGAGGCGGGACAGGA 359
|||||
93541 CGCCAGGTCCAGCCCAGTTCATCCGGGCGGTGGGGACGAGGCGGGACAGGA 93590

358 AGTTGAGCCCCTCCCCATTCCGCAGCCGACCTCCAGGACCGTCCGGCCG 309
|||||
93591 AGTTGAGCCCCTCCCCATTCCGCAGCCGACCTCCAGGACCGTCCGGCCG 93640

308 TCGCAGCTCTCCAAGCCCTTCGGAAGGTCGCGCAGGGCCAGGTAGTAGAG 259
|||||
93641 TCGCAGCTCTCCAAGCCCTTCGGAAGGTCGCGCAGGGCCAGGTAGTAGAG 93690

258 CTGCTCGCTGAATCCGTCGGTGCCGTA TCGGTGAATCCGGGCAGCCTGG 209
|||||
93691 CTGCTCGCTGAATCCGTCGGTGCCGTA TCGGTGAATCCGGGCAGCCTGG 93740

208 CCTCGATCTCGGCGACGAACTCGGAATCGTGACACCCCAGTTCCACAGC 159
|||||
93741 CCTCGATCTCGGCGACGAACTCGGAATCGTGACACCCCAGTTCCACAGC 93790

158 TGGCCCTTTGCGGACATGCTGGCGGCGAGGTCGTAGATGGAGGAGCTGGC 109
|||||
93791 TGGCCCTTTGCGGACATGCTGGCGGCGAGGTCGTAGATGGAGGAGCTGGC 93840

```

```
108 GGACTTGAAGGTGGCGGCCTTCGTCTCCGCCTGCGGGGTGCCGGATTCGT 59
    |||
93841 GGACTTGAAGGTGGCGGCCTTCGTCTCCGCCTGCGGGGTGCCGGATTCGT 93890
    |||
    58 CGAGATTGATGTCGGCGACACCGCTGGTGAAGGCGGTCACGACGTCGGGT 9
    |||
93891 CGAGATTGATGTC.GCGA.ACCGCT.GTGAAGGCGGTCACGACGTCGGGT 93937
    |||
    8 TGGATCAT 1
    |||
93938 TGGATCAT 93945
```

Figura 24

```

1 MIQPDVVTAFTSGVADINLDESGTPQAETKAATFKSASSSIYDLAASMSA 50
  |||
1 MIQPDVVTAFTA.VRDINLDEPGTPQAETKAATFKSASSSIYDLAASMSA 49

51 KGQLWNWGVHDSEFVAEIEARLPGFTEYGTDFSEQLYYLALRDLPKGLE 100
  |||
50 KGQLWNWGVHDSEFVAEIEARLPGFTEYGTDFSEQLYYLALRDLPKGLE 99

101 SCDGRTVLEVGCGMGEGLNFLSRLVPTARMTGLDLAPKAIASATATLSRG 150
  |||
100 SCDGRTVLEVGCGMGEGLNFLSRLVPTARMTGLDLAPKAIASATATLSRG 149

151 DTLRFVQGDAAELPFEDSSVDVLVNI ESSHTYPNLGRFLREAAARVLRPGG 200
  |||
150 DTLRFVQGDAAELPFEDSSVDVLVNI ESSHTYPNLGRFLREAAARALRRGG 199

201 ALSHIDVFTRQRLEAMRRITTEIPELKWVSDHDISDQVRAAVRRRMAPDS 250
  |||
200 ALSHIDVFTRQRLEAMRRITTEIPELKWVSDHDISDQVRAAVRRRMPPDS 249

251 HLRSTLNKQRMNRLARTLALHSQITVFGGTFADYQPPASVKMLSRGLGLVP 300
  |||
250 HLRSTLNKQRMNRLARTLALHSQITVFGGTFADYQPPASVKMLSRGLGLVP 299

301 PMDSLPMETYRHQIAVRV* 319
  |||
300 PMDSLPMETYRHQIAVRV* 318
  
```

Figura 25

```

432 GATCAGGGCGAGGGTGGTGTCTCCCGGCCGGGCGAGCAGCCGGGTGGCGA 383
|||||
94647 GATCAGGGCGAGGGTGGTGTCTCCCGGCCGGGCGAGCAGCCGGGTGGTGA 94696

382 CGGCCGCGACCGCGCCGGTCCGCATGGCGGTGATGGTGGCCGCGTCGGCG 333
||| |||
94697 CGGACGCGACCGCGCCGGTCCGCATGGCGGTGATGGTGGCCGCGTCGGCG 94746

332 AGCGCGACCATGCTTCCGCTGTCGTGTCGAGCCGCGACACGGTCCCGAC 283
|||||
94747 AGCGCGACCATGCTTCCGCTGTCGTGTCGAGCCGCGACACGGTCCCGAC 94796

282 GATGGTGGGCAGGTTGAAGCGCTCGAAGTTCTCGGACTGTAGCTGACCG 233
|||||
94797 GATGGTGGGCAGGTTGAAGCGCTCGAAGTTCTCGGACTGTAGCTGACCG 94846

232 TCTTCATCGTCACACCGATGCCCGACGCGCGGTGCGGCATGAACTCGATG 183
|||||
94847 TCTTCATCGAGCACCCGATGCCCGACGCGCGGTGCGGCATGAACTCGATG 94896

182 ACGCCCGGAACGTCGCCCGCCGCGGGCAAAGCCGGTACGCGGTGGCGGCTC 133
|||||
94897 ACGCCCGGAACGTCGCCCGCCGCGGGCAAAGCCGGTACGCGGTGGCGGCTC 94946

```


Figura 27

```

201 GCACGCGGAGGGGCCGAAGGAGTCGGGCAGCCATGATGGCGTCGCCTGGG 250
    |||
95630 GCACGCGGAGGGGCCGAAGGAGTCGTCGAGGCATGATGGCGTCGCCTGGG 95679

251 CTCGGACACCTGACTACCTCTTCGGTGTTCGCGCGGGTGCCCGAGGGCGGC 300
    |||
95680 CTCGGACACCTGACTACCTCTTCGGTGTTCGCGCGGGTGCCCGAGGGCGGC 95729

301 CGGTACGCGGCCGGCACCAGCGCCGTCTACACCGGAATCTTCGACCTGAT 350
    |||
95730 CGGTACGCGGCCGGCACCAGCGCCGTCTACACCGGAATCTTCGACCTGAT 95779

351 CGGGACGCTGGGGTACCCAGTCTGGCCCGCACCTGGAACCTACGTCAGCG 400
    |||
95780 CGGGACGCTGGGGTACCCAGTCTGGCCCGCACCTGGAACCTACGTCAGCG 95829

401 GAATCAACACGCCGAACCGCGATGGCCTCGAGGTCTACCGGGACTTCTGT 450
    |||
95830 GAATCAACACGCCGAACCGCGATGGCCTCGAGGTCTACCGGGACTTCTGT 95879

451 GTGGGCCGCGCCGAGGCGCTGGACGCCCGTGGGATCGACCCGGCGACCAT 500
    |||
95880 GTGGGCCGCGCCGAGGCGCTGGACGCCCGTGGGATCGACCCGGCGACCAT 95929

501 GCCGGCGGGCGACCGGCATCGGCGCCACGGCGGGCATCACGTGCTACT 550
    |||
95930 GCCGGCGGGCGACCGGCATCGGCGCCACGGCGGGCATCACGTGCTACT 95979

551 TCATCGCCGCACGCGCCGGTGACCGGGTCAACATGGAGAACCCGGCCGTG 600
    |||
95980 TCATCGCCGCACGCGCCGGTGACCGGGTCAACATGGAGAACCCGGCCGTG 96029

601 CTCACGGCTCACCGTACCCGAGCGGTACGGCCCCCGCCGCGCGTCTT 650
    |||
96030 CTCACGGCTCACCGTACCCGAGCGGTACGGCCCCCGCCGCGCGTCTT 96079

651 CTCCCGGGCCACCTGGCTCTCGCCGCGGGGGCGGACGACGGCCGGCTCT 700
    |||
96080 CTCC..GGCCACCTGGCTCTCGCCGCGGGGGCGGA.....CGGCTCT 96120

701 TCGTCTCCGCGACCCCGGCATCGTTCGGTACGAGACGGTGCACCACGGC 750
    |||
96121 TCGTCTCCGCGACCCCGGCATCGTTCGGTACGAGACGGTGCACCACGGC 96170
    
```

Figura 28

```

1 VRQLTPPVVTAPYCRFEKLGASDLLDGDDETLGVIERTGHTGVSLEAGCPR 50
  |||
1 VRQLTPPVVTAPYCRFEKLGASDLLDGDDETLGVIERTGHTGVSLEAGCPR 50

51 TAVHTTTREDESFAEAWHAEGPKESGSHDGVAWARTPDYLFVAVRVEGG 100
  |||
51 TAVHTTTREDESFAEAWHAEGPKESRHDGVAWARTPDYLFVAVRVEGG 100

101 RYAAGTAAVYTGIFDLIGTLGYPSLARTWNYVSGINTPNADGLEVYRDFC 150
  |||
101 RYAAGTAAVYTGIFDLIGTLGYPSLARTWNYVSGINTPNADGLEVYRDFC 150

151 VGRAEALDARGIDPATMPAATGIGAHGGGITCYFIAARAGDRVMENPAV 200
  |||
151 VGRAEALDARGIDPATMPAATGIGAHGARITCYFIAARAGDRVMENPAV 200

201 LTAHRYPQRYGPRPPVFSRATWLSPPGADDGRLFVSATAGIVGHETVHHG 250
  |||
201 LTAHRYPQRYGPRPPVFSGHLALAAGG...GRLFVSATAGIVGQETVHHG 247

251 DVAAQCEVSLENIARVIGAENLGRHGLRRGYALADV DHLKVYVRHREDIS 300
  |||
248 DVAAQCEVSLENIARVIGAENLGRHGLRRGYALADV DHLKVYVRHREDIS 297

301 TVRRI CAERLSREATVAVLHTDIARTDLLVEIEGVVA* 338
  |||
298 TVRRI CAERLSREATVAVLHTDIARTDLLVEIEGVVA* 335

```

Figura 29

```

401 AGCGCCTGGCGTCCCTGGCCATCCACGACCTCTACGGCCTGAATGAGGAG 450
|||||
96865 AGCGCCTGGCGTCCCTGGCCATCCACGACCTCTACGGCCTGAAT...GAG 96911

451 GAGGGGCCCGTACTCGAGGGCCAGATGCGGGCCATGGAGGGCGGCACCGA 500
|||||
96912 GAGGGGCCCGTACTCGAGGGCCAGATGCGGGCCATGGAGGGCGGCACCGA 96961

501 CATGGAGAGCATCAAGAGGCTGACCGACGAATTCCTCGGTACGTCCTGG 550
|||||
96962 CATGGAGAGCATCAAGAGGCTGACCGACGAA...TCGGTCACGTCCTGG 97008

551 CGCTGGTGCGTGCCAAGCGGGAGCAGGCGGGCGACAGGCTTCTGCACCGG 600
|||||
97009 CGCTGGTGCGTGCCAAGCGGGAGCAGGCGGGCGACAGGCTTCTGCACCGG 97058

601 CTGGCCGAGTCCGGCGAGGACGAGATCCTGCTCAGCGACGAGGAGGCGAC 650
|||||
97059 CTGGCCGAGTCCGGCGAGGACGAGATCCTGCTCAGCGACGAGGAGGCGAC 97108

651 CGGGGTGTTGCGCCACTCTGCTGTTGCGCCGGGCACGACTCGATGCAGCAGA 700
|||||
97109 CGGGGTGTTGCGCCACTCTGCTGTTGCGCCGGGCACGACTCGATGCAGCAGA 97158

701 TGGTCGGCTACTGTCTGTACGCGCTGCTCTCCCATCCCAGCAGCGGGCG 750
|||||
97159 TGGTCGGCTACAGTCTGTACGCGCTGCTCTCCCATCCCAGCAGCGGGCG 97208

751 GCGCTGCGGGAGAACCCGGACCTGATCGACGGCGCGGTGAGGAGCTGCT 800
|||||
97209 GCGCTGCGGGAGAACCCGGACCTGATCGACGGCGCGGTGAGGAGCTGCT 97258

801 GCGCTTCTGCCGCTCAACCAGCTCGGCGTGCCGCGGGTCTGTGTGCGAGG 850
|||||
97259 GCGCTTCTGCCGCTCAACCAGCTCGGCGTGCCGCGGGTCTGTGTGCGAGG 97308

851 ACGTCGAGCTGCACGGCCAGACCATCAGCGCCGGCGACAACGTGATCCCG 900
|||||
97309 ACGTCGAGCTGCACGGCCAGACCATCAGCGCCGGCGACAACGTGATCCCG 97358

901 CTCTACTCGACGGCCAACCGCGACCCCGGCGTCTTCGCCGACCCCGACAC 950
|||||
97359 CTCTACTCGACGGCCAACCGCGACCCCGGCGTCTTCGCCGACCCCGACAC 97408

951 GTTCGACATCACGCGTAAGCCCGAACACAACCTTCGCTTTCGGGTACGGCA 1000
|||||
97409 GTTCGACATCACGCGTAAGCCCGAACACAACCTTCGCTTTCGGGTACGGCA 97458

1001 TCCACAAGTGCCCGGGGCAGCACCTCGCCCGCGTGTTGATCAAGGTCGCC 1050
|||||
97459 TCCACGGCTGCCCGGGGCAGCACCTCGCCCGCGTGTTGATCAAGGTCGCC 97508

1051 ACGCTGCGCCTGTTGAGCGCTTCCCGGATGTGCGACTGGCGGGCGACGT 1100
||
97509 ACCGTGCGCCTGTTGAGCGCTTCCCGGATGTGCGACTGGCGGGCGACGT 97558

```

```
1101 GCCGATGAACGAGGGTCTGGGCCTGTTTCAGCCCGGCCGAGCTCCGGGTCA 1150
      |||
97559 GCCGATGAACGAGGGTCTGGGCCTGTTTCAGCCCGGCCGAGCTCCGGGTCA 97608

1151 CCTGGGGAGCGGAGTGA 1167
      |||
97609 CCTGGGGAGCGGAGTGA 97625
```

Figura 30

```

1  MSTEAQQESTPTARCPFSIQDGHRTILETGTVGAHELFGVKQWLVA AAED 50
  |||
1  MSTEAQQESTPTARCPFSIQDGHRTILETGTVGAHELFGVKQWLVA AAED 50

51  VKLVTNDPRFSSAAPSGILGDRRPGWFSGMDSPEHNRYRQKIARDFTLRA 100
  |||
51  VKLVTNDPRFSSAAPSGILGDRRPGWFSGMDSPEHNRYRQKIARDFTLRA 100

101 ARKQEEFIVRAADSCLEDDIEASGPGTDLVPGYAKRLASLAIHDLYGLNEE 150
  |||
101 ARKQEEFIVRAADSCLEDDIEASGPGTDLVPGYAKRLASLAIHDLYGLN . E 149

151 EGPVLEGQMRAMEGGTDMESIKRLTDEFFGHVLAALVRAKREQAGDRL LHR 200
  |||
150 EGPVLEGQMRAMEGGTDMESIKRLTDE . FGHVLAALVRAKRDEAGDRL LHR 198

201 LAESGEDEILLSDEEATGVFATLLFAGHDSMQQMVGYCLYALLSHPEQRA 250
  |||
199 LAESGEDEILLSDEEATGVFATLLFAGHDSMQQMVGYSLYALLSHPEQRA 248

251 ALRENPDLIDGAVEELLRFLPLNQLGVPRVCVEDVELHGQTISAGDNVIP 300
  |||
249 ALRENPDLIDGAVEELLRFLPLNQLGVPRVCVEDVELHGQTISAGDNVIP 298

301 LYSTANRDPGVFADPDTFDITRKPEHNFAFGYGIHKCPGQHLARVLIKVA 350
  |||
299 LYSTANRDPGVFADPDTFDITRKPEHNFAFGYGIHGCPGQHLARVLIKVA 348

351 TLRLFERFPDVRLAGDVPMNEGLGLFSPAELRVTWGAE* 389
  |||
349 TVRLFERFPDVRLAGDVPMNEGLGLFSPAELRVTWGAE* 387

```

Figura 31

```

1 GTGAGCGCGTCCGTGCAGACCATCAAGCTGCCGAACGGCAAGACCGTC.G 49
  |||
97622 GTGAGCGCGTCCGTGCAGACCATCAAGCTGCCGTACGGC.AGACCGTCGG 97670

50 CCCACGTCAACCCGGGCGAGGCGCAGTTCCTCTACCAGGAGATCTTCGCC 99
  |||
97671 CCCACGTCAACCCGGGCGAGGCGCAGTTCCTCTACCAGGAGATCTTCGCC 97720

100 GAGCGGTGCTACTTGCGGGCGGGCCTTGAGCTGCGAGCGGGTGACGTGGT 149
  |||
97721 GAGCGGTGCTACTTGCGGGCGGGCCTTGAGCTGCGAGCGGGTGACGTGGT 97770

150 CTTGACGTCGGCGCGAACATCGGCATGTTCTCGCTCTTCGCCCACCTGG 199
  |||
97771 CTTGACGTCGGCGCGAACATCGGCATGTTCTCGCTCTTCGCCCACCTGG 97820

200 AGTGCCCCGATGTCACGGTGCACGCCTTCGAGCCGGCGCCGGTGCCGTAC 249
  |||
97821 AGTGCCCCGATGTCACGGTGCACGCCTTCGAGCCGGCGCCGGTGCCGTAC 97870

250 GCCGCGCTCAGGGCCAATGCCGAGCGGTACGGCATCGCGGGCCGGTTCGA 299
  |||
97871 GCCGCGCTCAGGGCCAATGCCGAGCGGTACGGCATCGCGGGCCGGTTCGA 97920

300 GCAGTGCGCGGTCTCGGACGTGGCCGGCCGGCAAGATGACGTTCTACA 349
  |||
97921 GCAGTGCGCGGTCTCGGACGTGGCCGGCCGGCAAGATGACGTTCTACA 97970

350 CGGATACCACGATGATGTCGGGCTTCCACCCGGATCCGGCGACCCGCGCG 399
  |||
97971 CGGATACCACGATGATGTCGGGCTTCCACCCGGATCCGGCGACCCGCGCG 98020

400 GAGCTGCTGCGCAGGCTCGCCATCAACGGCGGGTACAGTGCCGAGGCCGC 449
  |||
98021 GAGCTGCTGCGCAGGCTCGCCATCAACGGCGGGTACAGTGCCGAGGCCGC 98070

450 CGACCGGATGCTGGCCGAGCTGCCGGACACCAGCCAGGTGATCGAGACGT 499
  |||
98071 CGACCGGATGCTGGCCGAGCTGCCGGACACCAGCCAGGTGATCGAGACGT 98120

500 CCGTCGTACGCCTCTCCGACGTCATCGCGGAGCGGGGCATCACCTCGATC 549
  |||
98121 CCGTCGTACGCCTCTCCGACGTCATCGCGGAGCGGGGCATCACCTCGATC 98170

550 GGACTGCTCAAGATCGATGTGGAGAAGAACGAGCGGCATGTGATGGCCGG 599
  |||
98171 GGACTGCTCAAGATCGATGTGGAGAAGAACGAGCGGCATGTGATGGCCGG 98220

600 GATCGACGCGGCCGACTGGCCGCGCATCCGCCAGGTGTCACCGAGGTGC 649
  |||
98221 GATCGACGCGGCCGACTGGCCGCGCATCCGCCAGGTGTCACCGAGGTGC 98270

```


Figura 33

201 GGCCACCTCCATCGATCTGTCACCCGAACTGACCGCGGTAGGCCGCCGCA 250
|||||
90998 GGCCACCTCCATCGATCTGTCACCCGAACTGACCGCGGTAGGCCCCCA 91047
251 AGTTGGCCTCGCGGGGATCGATAACGTCACCCTGGTCGAGGGTGACGTT 300
|||||
91048 AGTTGGCCTCGCGGGGATCGATAACGTCACCCTGGTCGAGGGTGACGTT 91097

Figura 34

```

1 MLELGTRLKFRFTGPLEAVNPRLQGHYPYDVLMLRLLLEGGRIENVLELCGG 50
  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
2 MLELGTRLKFRFTGPLEAVNPRLQGHYPYDVLMLRLLLEGGRIENVLELCGG 51

51 TGFASRMLAERHSKVQATSIDLSPELTAVGRRKLASRGIDNVTLVEGDVS 100
  |||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
52 TGFASRMLAERHSKVQATSIDLSPELTAVGPHKLASRGIDNVTLVEGDVS 101

101 TLPYPDDSFDTVMSAFGLHEVPTAGRLSAIRESVRVLKPGGRFVIVDLDR 150
  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
102 TLPYPDDSFDTVMSAFGLHEVPTAGRLSAIRESVRVLKPGGRFVIVDLDR 151

151 RTKYGWTMDLFMKVMEPKFAPEVFGTGLVDRLKENGFTIDHHESAGPNGW 200
  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
152 RTKYGWTMDLFMKVMEPKFAPEVFGTGLVDRLKENGFTIDHHESAGPNGW 201

201 TQSIVATLEA* 211
  ||||||||
202 TQSIVATLEA* 212
  
```

Figura 35

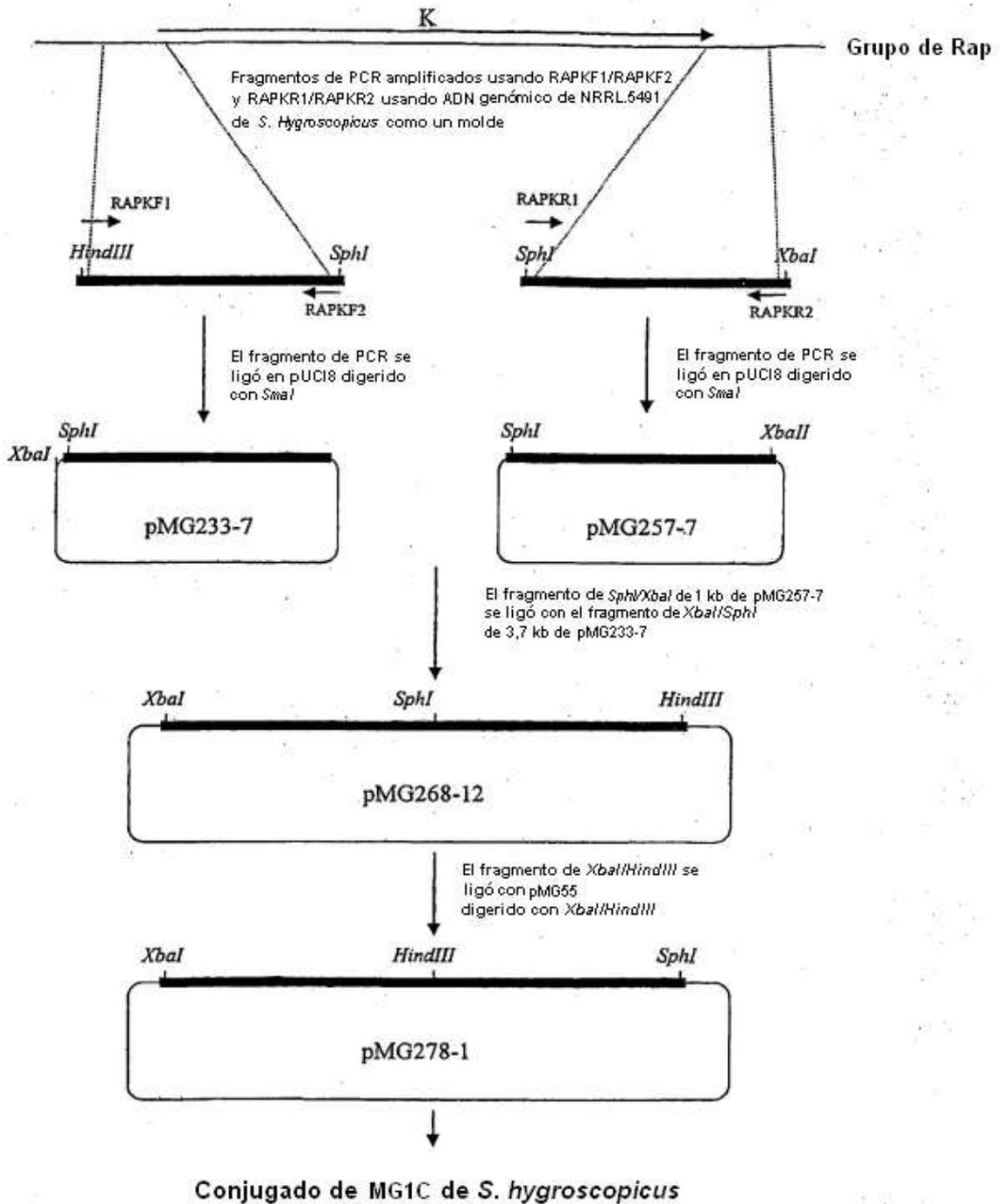


Figura 36

