

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
30 de Mayo de 2003 (30.05.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 03/044046 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C07K 7/02,
C12P 21/02, C12N 1/20 // (C12N 1/20, C12R 1:545)

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES02/00552

(22) Fecha de presentación internacional:
22 de Noviembre de 2002 (22.11.2002)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 0102609
23 de Noviembre de 2001 (23.11.2001) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS [ES/ES]; C/Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). INSTO. BIOMAR, S.A. [ES/ES]; Polígono Industrial, Edificio C.E.I. - Mód. 2.03, E-24231 Onzonilla (León) (ES). UNIVERSIDAD DE SALAMANCA [ES/ES]; Patio Escuelas, 1, E-37008 Salamanca (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): SANTA-MARÍA SÁNCHEZ, Ramón [ES/ES]; Insto. Microbiología Bioquímica, Consejo Superior De Investigaciones Científicas, Edif. Departamental, Avda. Campo Charro, E-37007 Salamanca (ES). GONZÁLEZ HOLGADO, Gloria [ES/ES]; Insto. Microbiología Bioquímica, Consejo Superior De Investigaciones Científicas, Edif.

Departamental, Avda. Campo Charro, E-37007 Salamanca (ES). FERNÁNDEZ ABALOS, José, Manuel [ES/ES]; Universidad de Salamanca, Patio Escuelas, 1, E-37008 Salamanca (ES). DÍAZ MARTÍNEZ, Margarita [ES/ES]; Universidad de Salamanca, Patio Escuelas, 1, E-37008 Salamanca (ES). CASTRO RODRÍGUEZ, Julián [ES/ES]; Polígono Industrial, Edificio C.E.I. - Mód. 2.03, E-24231 Onzonilla (León) (ES). CAÑEDO HERNÁNDEZ, Librada, M. [ES/ES]; Polígono Industrial, Edificio C.E.I. - Mód. 2.03, E-24231 Onzonilla (León) (ES).

(74) Mandatario: REPRESA SANCHEZ, Domingo; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Oficina de Transferencia de Tecnología, C/Serrano, 113 - 2ª planta, E-28006 Madrid (ES).

(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: RADAMICINE, A PRODUCTION METHOD THEREOF AND THE USE OF SAME AS AN INDUCER OF THE TIP A PROMOTOR

(54) Título: RADAMICINA, UN PROCESO PARA SU PRODUCCIÓN Y SU USO COMO INDUCTOR DEL PROMOTOR TIP A

(57) Abstract: The invention relates to a novel tiopeptidic compound which has a determined structure and which is known as radamicine (1). The invention also relates to a method of producing radamacine and the use of said radamacine and the salts and derivatives thereof, in all their stereoisomeric and tautomeric forms, as an inducer of the tipA promoter. The compound thus described is obtained from *Streptomyces* sp RSP9 culture and differs from other tiopeptidic compounds in that it is a powerful inducer of the tipA promoter. Moreover, the radamicine compound differs from all inducers of the promoter hitherto described in that it does not present an antibiotic activity against any of the Gram-positive micro-organisms sensitive to all of the other tiopeptidic compounds which have been tested before now (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, etc).

(57) Resumen: Esta invención describe un nuevo compuesto tiopeptídico cuya estructura ha sido determinada denominado radamicina (1). Asimismo, se describe el proceso de su producción y su uso, así como el de sus sales y derivados en todas sus formas estereoisoméricas y tautoméricas, como inductor del promotor tipA. El compuesto aquí descrito se obtiene a partir de cultivo de *Streptomyces* sp RSP9 y difiere del resto de los compuestos tiopeptídicos en que es un potente inductor del promotor tipA. Además, el compuesto radamicina difiere de todos los inductores del promotor descritos hasta la fecha en que no presenta actividad antibiótica frente a ninguno de los microorganismos Gram positivos sensibles al resto de los compuestos tiopeptídicos probados hasta la fecha (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* etc).



WO 03/044046 A1



Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

RADAMICINA, UN PROCESO PARA SU PRODUCCION Y SU USO COMO INDUCTOR DEL PROMOTOR TIP A

5 SECTOR DE LA TECNICA

Industria farmacéutica y alimentaria, biotecnología, expresión de proteínas de interés industrial, vectores de expresión, compuestos químicos inductores de promotores, promotor *tipA*. *Streptomyces*, antibióticos tiopeptídicos, radamicina.

10 ESTADO DE LA TECNICA

Las bacterias del género *Streptomyces* son habitantes comunes del suelo, donde participan en la degradación de materiales biológicos (restos animales y vegetales), contribuyendo al reciclado de nutrientes. Esta capacidad degradativa les viene dada por su conocida versatilidad nutricional, pues producen sistemas enzimáticos extracelulares que les permiten hidrolizar polímeros carbonados, lipídicos y protéicos. Además, estas bacterias, en su conjunto, son los productores más relevantes de antibióticos, moléculas derivadas de su metabolismo secundario que han encontrado usos destacados en la lucha contra las enfermedades infecciosas del hombre, los animales y las plantas. La capacidad de producir enzimas extracelulares y antibióticos ha convertido a diferentes especies del género *Streptomyces* en microorganismos de uso frecuente en la industria farmacéutica o alimentaria, y se han desarrollado metodologías para su cultivo a gran escala y su modificación genética, bien para producir moléculas propias, o para expresar genes procedentes de otros organismos (Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. & Hopwood, D. A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich).

En *Streptomyces* se han empleado diversos promotores para expresar genes de interés bajo su control. Entre ellos cabe resaltar el promotor del gen *ermE*, que es un promotor fuerte y constitutivo (siempre activo). El promotor del gen *ssi* se ha empleado para expresar un número elevado de genes (Brawner, M. E. (1994) Advances in heterologous gene expression by *Streptomyces*. *Curr Opin Biotechnol* 5, 475-81) y existen otros promotores recogidos en el libro "Practical *Streptomyces Genetics*" (Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. & Hopwood, D. A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich). Sin embargo, la expresión constitutiva de

un gen puede generar efectos negativos en el crecimiento del microorganismo hospedador. Un modo de evitar estos efectos es el empleo de promotores regulados que permitan la expresión únicamente en el momento deseado. Son varios los promotores regulados que se han empleado en el desarrollo de vectores de expresión para

5 *Streptomyces* (Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. & Hopwood, D. A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich). El promotor *tipA*, procedente del gen *tipA* de *Streptomyces lividans*, es uno de ellos y es un promotor fuerte y regulable cuya inducción depende de la adición al medio de cultivo del antibiótico tiopeptídico tioestreptona. El nivel de expresión de este promotor depende de la dosis de inductor

10 añadido así como del número de copias del vector empleado. Durante la última década se ha empleado la inducción de este promotor, observada por la expresión de un gen de resistencia a neomicina controlado por él (plásmido pAK114) (Murakami, T., Holt, T. G. & Thompson, C. J. (1989) Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* 171, 1459-66), como sistema de escrutinio para la

15 selección de moléculas activadoras del promotor *tipA* (Yun, B. S., Hidaka, T., Furihata, K. & Seto, H. (1994) Microbial metabolites with *tipA* promoter inducing activity. II. Geninthiocin, a novel thiopeptide produced by *Streptomyces* sp. DD84. *J Antibiot (Tokyo)* 47, 969-75; Yun, B. S., Hidaka, T., Furihata, K. & Seto, H. (1994) Promothiocins A and B novel thiopeptides with a *tipA* promoter inducing activity produced by *Streptomyces* sp. SF2741. *J Antibiotics* 47, 510-4; Yun, B. S. & Seto, H. (1995) Promoinducin, a novel thiopeptide produced by *Streptomyces* sp. SF2741. *Biosci Biotechnol Biochem* 59, 876-80). Esta selección ha permitido el aislamiento de varias moléculas tiopeptídicas que presentan distintas estructuras químicas y todas ellas presentan actividad antibiótica frente a bacterias Gram + (Chiu, M. L., Folcher, M.,

25 Katoh, T., Puglia, A. M., Vohradsky, J., Yun, B. S., Seto, H. & Thompson, C. J. (1999) Broad spectrum thiopeptide recognition specificity of the *Streptomyces lividans* TipAL protein and its role in regulating gene expression. *J Biol Chem* 274, 20578-86). La necesidad de emplear un antibiótico como inductor del promotor *tipA* ha limitado su uso para la expresión de proteínas de interés fuera del ámbito básico y ha originado que

30 varios grupos busquen moléculas que sin tener capacidad antibiótica posean actividad inductora del promotor *tipA*. La molécula descrita en esta patente es la primera de este tipo: no tiene actividad antibiótica y posee una clara actividad inductora del promotor

tipA lo que abre nuevas posibilidades para el empleo de este tipo de vectores para la expresión de proteínas.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

5 Descripción breve

Esta invención describe un nuevo compuesto tiopeptídico cuya estructura ha sido determinada y que se ha denominado radamicina (Figura 10). Asimismo, se describe el proceso de su producción y su uso, así como el de sus sales y derivados en todas sus formas esterioméricas y tautoméricas, como inductor del promotor *tipA*. El compuesto
10 aquí descrito se obtiene a partir de cultivo de *Streptomyces* sp RSP9 y difiere del resto de los compuestos tiopeptídicos en que es un potente inductor del promotor *tipA*. Además, el compuesto radamicina difiere de todos los inductores del promotor descritos hasta la fecha en que no presenta actividad antibiótica frente a ninguno de los microorganismos Gram positivos sensibles al resto de los compuestos tiopeptídicos
15 probados hasta la fecha (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* etc).

Descripción detallada

En la presente invención se describe un nuevo microorganismo terrestre, *Streptomyces* sp RSP9, identificado mediante la secuenciación del DNA que codifica el
20 RNAr 16S (Ejemplo 1), perteneciente a la especie *Streptomyces griseus*, productor de un nuevo compuesto tiopeptídico cuya estructura ha sido determinada y que se ha denominado radamicina (Figura 10). Este compuesto radamicina, así como sus sales y derivados en todas sus formas estereoisoméricas y tautoméricas, forma parte de la presente invención. Por otro lado, esta cepa - *Streptomyces* sp RSP9 - ha sido
25 depositada bajo condiciones de patente en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 3356 y forma parte de la presente invención. Por otro lado, nuevas cepas transformadas o mutadas a partir de la descrita en la presente - *Streptomyces* sp RSP9 - pueden obtenerse a partir del conocimiento existente en el estado de la técnica de la ingeniería genética con mejores niveles de producción de
30 radamicina, y forman parte de la presente invención.

Como se describe más adelante (Ejemplo 2 y 3) el procedimiento de producción de radamicina por la cepa *Streptomyces* sp RSP9 se realiza en condiciones aerobias y a

temperaturas entre 24 y 37 °C y entre pH 6 y 9; siendo preferido el cultivo a 28°C y pH cercano a la neutralidad, y forma parte dicho procedimiento de la presente invención.

Para su producción se pueden emplear medios líquidos como los usados para producir antibióticos. Dentro de estos medios la producción es mayor en medios complejos con fuentes de carbono y nitrógeno asimilables por el microorganismo y sales inorgánicas y elementos traza necesarios para el buen crecimiento del microorganismo. Fermentaciones a pequeña escala pueden realizarse bajo agitación en matraces indentados o fermentadores de pequeño volumen que pueden inocularse con esporas o con micelio vegetativo precrecido en el mismo o en diferente medio. La temperatura de crecimiento más usada es la de 28°C y los cultivos pueden recogerse desde las 48 a las 200 horas no siendo necesario normalmente más de 72-96 horas para obtener una producción máxima. La producción aumenta cuando los medios se suplementan con distintas fuentes de carbono como almidón, xilano, carboximetilcelulosa, sacarosa, glucosa, xilosa o galactosa en concentraciones que oscilan del 0,5 al 5%, siendo una fuente de carbono preferida xilosa. Respecto al efecto de sales inorgánicas la producción de este compuesto se ve afectada positivamente por la presencia de magnesio en el medio de cultivo en concentraciones que varían desde 0,5 mM a 100 mM siendo las concentraciones preferidas de 2 a 5 mM y forma parte de la presente invención.

En la presente invención se ha observado que la radamicina se encuentra tanto en el sobrenadante de cultivo como en el interior de las células o unido a éstas y puede ser recuperado de las distintas fracciones mediante solventes orgánicos como *n*-BuOH, (CH₃)₂CO, distintas mezclas de CHCl₃-MeOH, etc, añadidos en distintas proporciones al caldo de fermentación o al cultivo completo.

El método preferido en la presente invención para la purificación de este compuesto ha sido la extracción del cultivo en conjunto, células y sobrenadante, con un volumen de *n*-BuOH seguido de centrifugación y recuperación de la fase orgánica que es evaporada en rotavapor obteniéndose un residuo aceitoso (Ejemplo 4). La purificación de radamicina contenida en el extracto butanólico se ha llevado a cabo mediante separaciones cromatográficas usuales (cromatografía rápida a vacío y cromatografía en gel de sílice de fase reversa C18).

El seguimiento analítico de las fracciones cromatográficas se ha realizado mediante TLC y HPLC. La producción de radamicina se ha determinado en los cultivos mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), utilizándose columnas que permitan la separación de compuestos tiopeptídicos. El análisis de HPLC se ha realizado en un
5 equipo Waters 991 con un detector de fotodiodos, utilizando un cartucho Radial Pack Resolve C18 (10 μ , Waters Chromatography) y como fase móvil CH₃CN-H₂O 97:3, un flujo de 2.0 ml/min y una longitud de onda de 250nm. La radamicina en estas condiciones presenta un tiempo de retención de 2.5 minutos.

Mediante un estudio detallado de los datos espectroscópicos (ver los datos
10 reproducidos en las Figuras 2-9), el compuesto puro ha sido identificado como radamicina, cuya estructura se describe en la Figura 10. El espectro de UV presentó una absorción característica a 250 nm, como se puede ver en la Figura 1. Los espectros de RMN monodimensionales de ¹H, ¹³C y DEPT de radamicina se pueden ver en las Figuras 2, 3 y 4, respectivamente. Los espectros de RMN bidimensionales de COSY, HSQC y
15 HMBC aparecen en las Figuras 5, 6 y 7, respectivamente. El espectro de ESI-MS de radamicina presenta un ión molecular (M+Na)⁺ a m/z 1128, como se puede ver en la Figura 8. Todos los datos de RMN de ¹H y ¹³C se detallan en la Tabla 1.

En la presente invención se ha observado que el crudo del que se parte para la purificación de radamicina contiene también metilsulfomicina I, que es un compuesto
20 tiopeptídico con elevado poder antibiótico frente a bacterias Gram positivas. Este compuesto ha sido protegido recientemente por las patentes EP0818539 y EP0818464 como producido por un microorganismo - *Streptomyces* sp. HIL Y-9420704- diferente al que es motivo de esta patente. Así pues, el microorganismo aislado y descrito en la presente invención (*Streptomyces* sp RSP9) produce radamicina y metilsulfomicina I.

25 La radamicina purificada en la presente invención no presenta actividad antibiótica frente microorganismos G⁺ como lo hacen otros compuestos tiopeptídicos. Sin embargo, posee una elevada capacidad inductora del promotor tipA (Ejemplo 5, Figura 9) y en ello estriba el interés de esta molécula ya que es la primera molécula descrita que, sin tener capacidad antibiótica, posee capacidad de inducir el promotor
30 tipA a concentraciones nanomolares como se puede ver en la Figura 9A.

Así pues, la radamicina es el primer inductor no antibiótico del promotor tipA y puede emplearse como inductor de este promotor en los experimentos de expresión de

genes de interés bajo su control y dicho uso forma parte de la presente invención. Esto evita la adición de sustancias antibióticas al medio de cultivo y la presencia en la cepa hospedadora de un gen de resistencia a antibiótico, lo cual genera modificaciones fisiológicas indeseables y puede hacer que se distribuyan incontroladamente genes de resistencia a compuestos tiopéptidicos con actividad antibiótica.

Por otro lado, y basado en los conocimientos y experiencias actuales en el estado de la técnica de la síntesis química o enzimática de compuestos la radamicina, así como sus sales y derivados en todas sus formas estereoisoméricas y tautoméricas, puede ser obtenida por procedimientos distintos al descrito en la presente invención, los cuales forman parte de la presente invención.

Tabla 1.- Datos de RMN ^1H y ^{13}C de radamicina

Posición	$^{13}\text{C}(\delta)$	$^1\text{H}(\delta)$	Posición	$^{13}\text{C}(\delta)$	$^1\text{H}(\delta)$
Tiazol (1)			Deshidroalanina (1)		
2-C	165.4		NH		8.01 (s)
4-C	150.1		αC	134.7	
5-CH	126.1	8.29 (s)	βCH_2	102.9	6.66 (d, 2.0), 5.01 (s)
CO	160.9		CO	162.1	
Valina			Metiloxazol (2)		
NH		7.72 (d, 9.2)	NH		9.86 (s)
αCH	59.2	4.36 (t, 8.4)	αC	127.8	
βCH	30.6	2.25 (m)	βCH_2	102.7	6.39 (s), 5.66 (s)
γCH_3	19.5	0.95 (d, 6.8)	2-C	154.9	
γCH_3	18.5	0.97 (d, 6.8)	4-C	133.5	
CO	171.3		5-C	152.8	
			5- CH_3	13.3	2.91 (s)
Metiloxazol (1)			Piridina		
NH		6.92 (t, 5.6)	2-C	148.6	
CH_2	36.6	4.45 (dd, 16.8, 6.0) 4.30 (dd, 16.8, 6.0)	3-C	130.1	
2-C	157.8		4-CH	141.3	8.11 (d, 8.0)
4-C	128.8		5-CH	120.7	8.28 (d, 8.0)
5-C	154.4		6-C	150.0	
5- CH_3	11.8	2.48 (s)	CO	162.2	
CO	161.0		Deshidroalanina (2)		
			NH		10.63 (s)
Tiazol (2)			αC	134.3	
NH		8.28 (d, 8.4)	βCH_2	103.3	6.82 (d, 2.0), 5.55 (s)
αCH	46.5	5.62 (t, 7.2)	CO	162.2	
βCH_3	21.7	1.79 (d, 7.0)	Deshidroalanina (3)		
2-C	171.5		NH		9.01 (s)
4-C	149.1		αC	133.1	
5-CH	124.1	8.05 (s)	βCH_2	103.5	6.63 (d, 2.0), 5.44 (s)
CO	160.2		CO	165.9	
Tiazol (3)					
NH		7.68 (d, 8.4)			
αCH	46.5	5.48 (t, 7.2)			
βCH_3	22.4	1.72 (d, 6.8)			
2-C	171.2				
4-C	149.2				
5-CH	125.1	8.15 (s)			
CO	159.9				

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Cromatograma de HPLC/UV y espectro de UV de radamicina pura.

5 Figura 2.- Espectro de RMN de protón (^1H) de radamicina pura.

Figura 3.- Espectro de RMN de carbono (^{13}C) de radamicina pura.

Figura 4.- Espectro de RMN DEPT de radamicina pura.

Figura 5.- Espectro de RMN bidimensional de COSY 45 de radamicina pura.

Figura 6.- Espectro de RMN bidimensional de HMQC de radamicina pura.

Figura 7.- Espectro de RMN bidimensional de HMBC de radamicina pura.

Figura 8.- Cromatograma de HPLC/MS y espectro de ESI-MS de radamicina pura.

Figura 9.- Inducción del promotor *tipA* por radamicina.

A) Expresión del gen *aphII(neo)* bajo el control del promotor *tipA* en el vector de expresión pAK114 (panel izquierdo) inducido por distintas cantidades de radamicina: 0, 5, 10, 20 y 30 ng/pocillo. B) Expresión del gen *xysA* bajo el control del promotor *tipA* inducido por distintas cantidades de radamicina (2,5 y 10 µg/ml). Panel izquierdo, plásmido vector pGG016 obtenido a partir del vector pIJ8600 y que contiene el gen *xysA*. Panel derecho, western blot a partir de cultivos de células transformadas por
5
10 ambos plásmidos pIJ8600 y pGG016.

Figura 10.- Estructura química de la radamicina.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

Ejemplo 1.- Identificación de *Streptomyces* sp RSP9

15 La identificación se abordó mediante la secuenciación del DNA que codifica el RNAr 16S (16S DNAr). Para ello, se realizó una reacción de PCR, utilizando los oligonucleótidos descritos para este fin por Lane (**Lane, D. J. (1991)** 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 125-175. Edited by Stackebrandt. & M. Goodfellow. Chichester: Willey). La comparación de la
20 secuencia obtenida con otras depositadas en la base de datos dió una identidad del 99,87% (a lo largo de 1518 nucleótidos) con dos especies de *Streptomyces*: *Streptomyces* sp AA8321.1 y *Streptomyces griseus*, diferenciándose en ambos casos en dos bases del total de 1518 secuenciadas. Por ello el microorganismo aislado se considera una nueva cepa de *Streptomyces griseus*.

25 Esta nueva cepa, la cepa *Streptomyces* sp RSP9 ha sido depositada, bajo condiciones de patente, en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT-3356.

Ejemplo 2.- Mantenimiento del cultivo y obtención de esporas

30 El microorganismo *Streptomyces* sp RSP9 se mantiene habitualmente en medio R2YE o en placas de SFM (**Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. & Hopwood, D. A. (2000)** *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich). Las placas se cultivan en estufa a 28°C y las esporas se recogen después de 4-7 días de incubación

siguiendo el protocolo descrito para *Streptomyces* .(Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. & Hopwood, D. A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich) Este microorganismo esporula abundantemente en ambos medios y las esporas cuantificadas se mantienen a -20°C en presencia de glicerol 20%.

5 Esporas de medio líquido se obtienen empleando como medio de esporulación medio YES (Extracto de levadura 1%, Sacarosa 10,3% pH 7,2) suplementado con 1% xilosa y 2mM Mg_2Cl . Los cultivos se recogen después de 4-6 días en los que prácticamente todo el cultivo son esporas y se procesan como las esporas de medio sólido manteniéndose en presencia de 20% glicerol a -20°C .

10 **Ejemplo 3.- Optimización de la producción de radamicina**

La producción de radamicina se realizó en medio YES suplementado con 1% xilosa y 2mM Mg_2Cl . Tres litros de este medio se inocularon con una suspensión de esporas para obtener 10^6 esporas/ml y se repartieron a razón de 150 ml/matraz en matraces de 500 ml con cuatro indentaciones. Los cultivos se mantuvieron a 28°C bajo
15 agitación (200 rpm) en un agitador Adolf Kühner durante 96 horas y pasado este tiempo se mezclaron con el mismo volumen de n-butanol.

Ejemplo 4.- Aislamiento de radamicina

3 litros de caldo de fermentación (cultivo completo) fueron extraídos con 3 litros de n-BuOH. Separada la fase orgánica por centrifugación, el extracto butanólico se llevó a
20 sequedad mediante evaporación a vacío, obteniéndose un residuo aceitoso de 3.0 g. Dicho extracto se disolvió en 500 ml de $\text{NaCl}(10\%)\text{-MeOH}$ 1:1 y la mezcla hidroalcohólica se extrajo dos veces con 500 ml de CHCl_3 , los extractos fueron reunidos y llevados a sequedad obteniéndose 1.1g de extracto clorofórmico. El extracto fue cromatografiado sobre sílicagel utilizando un sistema de cromatografía rápida a vacío y como eluyente
25 mezclas de $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$. Las fracciones que por TLC y HPLC contenían radamicina (60 mg) fueron eluidas con $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ 97:3. La purificación final del compuesto se realizó mediante cromatografía en gel de sílice de fase reversa C18, obteniéndose 28 mg de compuesto puro, eluido con $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ 85:15.

La pureza de las fracciones fue confirmada mediante técnicas analíticas de TLC y
30 HPLC.

Ejemplo 5.- Inducción del promotor *tipA*.

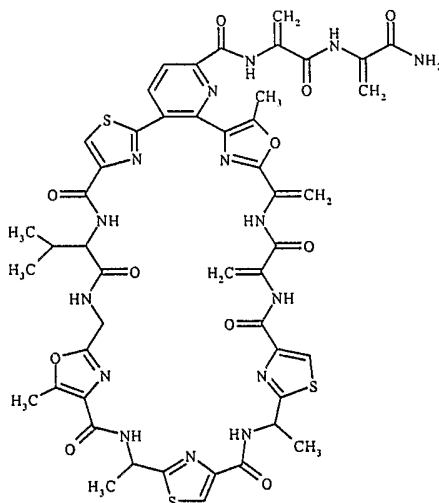
El efecto de la radamicina sobre el promotor *tipA* se estudió mediante dos tipos de experimentos. En el primero se empleó la cepa de *Streptomyces lividans* transformada con el plásmido pAK114 (Murakami, T., Holt, T. G. & Thompson, C. J. (1989) Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* 171, 1459-66). En este plásmido la resistencia a neomicina proveniente del transposon Tn5, está bajo el control del promotor *tipA* por lo que únicamente se expresa cuando el promotor está inducido por una molécula adecuada. El efecto inductor de cantidades variables, desde 0 a 30 ng de radamicina depositadas en pocillos se observó como un halo de crecimiento alrededor de los pocillos. El tamaño de este halo respondió directamente a la dosis de radamicina ensayada y fue visible incluso en la concentración mínima ensayada (Figura 9A).

Para la realización del segundo tipo de experimentos fue necesaria la obtención de una construcción plasmídica en la que el promotor *tipA* controla la expresión del gen *xysA* de *Streptomyces halstedii* JM8, que codifica para una xilanasa denominada Xys1 (Ruiz, A. A., Sanchez, P., Calvette, J. J., Raida, M., Fernandez, A. J. M. & Santamaria, R. I. (1997) Analysis of *xysA*, a gene from *Streptomyces halstedii* JM8 that encodes a 45-kilodalton modular xylanase, Xys1. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2983-2988). La construcción se realizó sobre el plásmido pIJ8600, vector integrativo monocopia en *Streptomyces* (Sun, J., Kelemen, G. H., Fernandez-Abalos, J. M. & Bibb, M. J. (1999) Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 145, 2221-7). El plásmido construido se denominó pGG016 y lleva clonado una variante truncada del gen *xysA* que contiene el dominio catalítico de esta proteína (Ruiz-Arribas, A., Zhadan, G. G., Kutysenko, V. P., Santamaria, R. I., Cortijo, M., Villar, E., Fernandez-Abalos, J. M., Calvete, J. J. & Shnyrov, V. L. (1998) Thermodynamic stability of two variants of xylanase (Xys1) from *Streptomyces halstedii* JM8. *Eur J Biochem* 253, 462-8) (Figura 9B, panel izquierdo). La inducción de la expresión se estudió en medio líquido YES (1% extracto de levadura, 10,3% sacarosa, MgCl₂ 5mM) suplementado con distintas cantidades (2 y 10 µg/ml) de Radamicina. Los sobrenadantes de los cultivos de *S.lividans*/pGG016, inducidos con Radamicina o sin inducir fueron analizados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida realizados según el método descrito por Laemmli

(Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685) teñidos con Coomassie Blue o mediante western-blot utilizando anticuerpos anti-xilanasa (Ruiz, A. A., Sanchez, P., Calvette, J. J., Raida, M., Fernandez, A. J. M. & Santamaria, R. I. (1997) Analysis of xysA, a gene from *Streptomyces halstedii* JM8 that encodes a 45-kilodalton modular xylanase, Xys1. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2983-2988). La presencia de la xilanasa en los sobrenadantes se detectó, en los geles teñidos, por medio de la aparición de una banda de 30 kDa, que corresponde con el tamaño esperado así como por la detección de esta banda por los anticuerpos anti-xilanasa empleados (Figura 9B, panel derecho) y por la actividad xilanasa de los sobrenadantes de cultivo cuando estos fueron depositados en pocillos realizados en una placa de R2YE que contenía 0,5% de xilano. La intensidad de la banda de interés así como la actividad xilanasa detectada en la placa fue proporcional a la cantidad de inductor ensayada. Estudios paralelos se realizaron con las mismas cantidades de tioestreptona y se demostraron que el poder inductor de la radamicina era superior al inductor control tioestreptona.

REIVINDICACIONES

1.- Compuesto químico denominado radamicina caracterizado por la fórmula molecular $C_{48}H_{47}N_{15}O_{11}S_3$ y la estructura siguiente:



5 así como sus derivados y sus equivalentes químicos.

2.- Compuesto químico según la reivindicación 1 caracterizado porque se obtiene a partir de un microorganismo de la especie *Streptomyces* de la siguiente forma:

- a) Cultivo de la cepa bacteriana en condiciones idóneas, y
- b) La purificación de radamicina.

10 3.- Compuesto químico según la reivindicación 2 caracterizado porque el microorganismo es la cepa *Streptomyces sp* RSP9 (CECT 3356) y porque las condiciones del cultivo son: condiciones aerobias, a temperatura entre 24 y 37°C, con un pH 6 y 9 y un suplemento de magnesio en el medio de cultivo entre 2 y 5 mM,

15 4.- Compuesto químico según las reivindicaciones 2 y 3 caracterizado porque el microorganismo es una cepa mutada de *Streptomyces sp* RSP9 (CECT 3356).

5.- Compuesto químico según la reivindicación 1 caracterizado porque se obtiene por procedimientos, entre otros, de síntesis química.

20 6.- Uso del compuesto químico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5 como inductor de promotores regulados por moléculas tiopeptídicas en procesos industriales de producción de proteínas.

7.- Uso según la reivindicación 6 caracterizado porque el promotor regulado por moléculas tiopeptídicas es el promotor *tipA*

8.- Microorganismo *Streptomyces* según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a la 5 caracterizado porque produce radamicina.

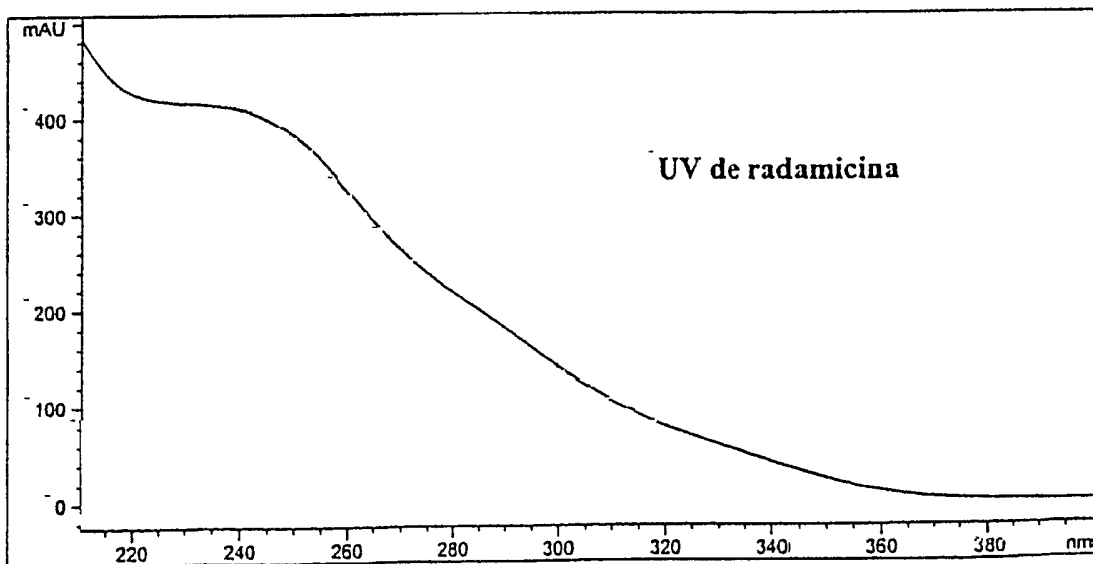
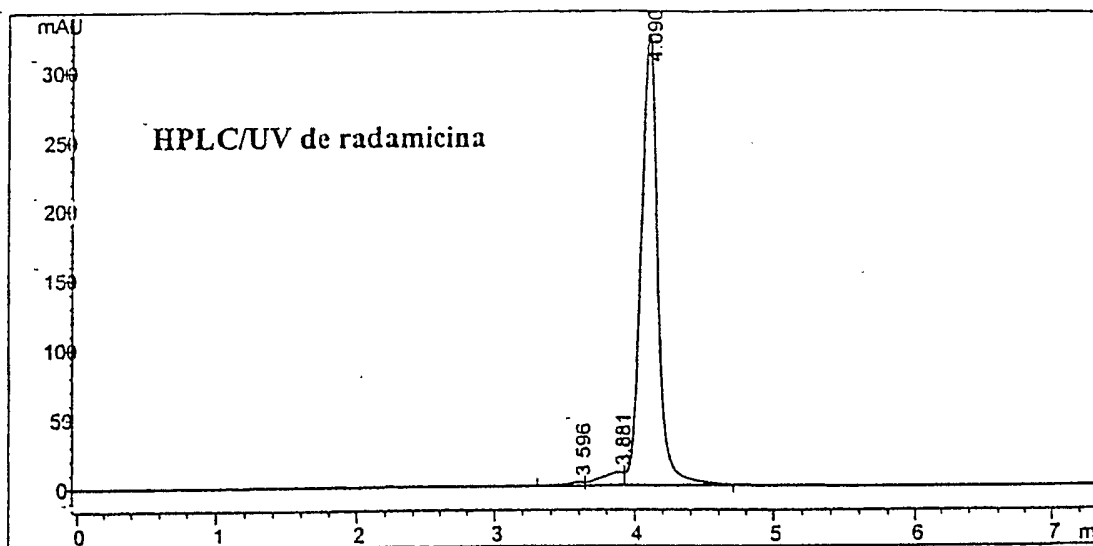
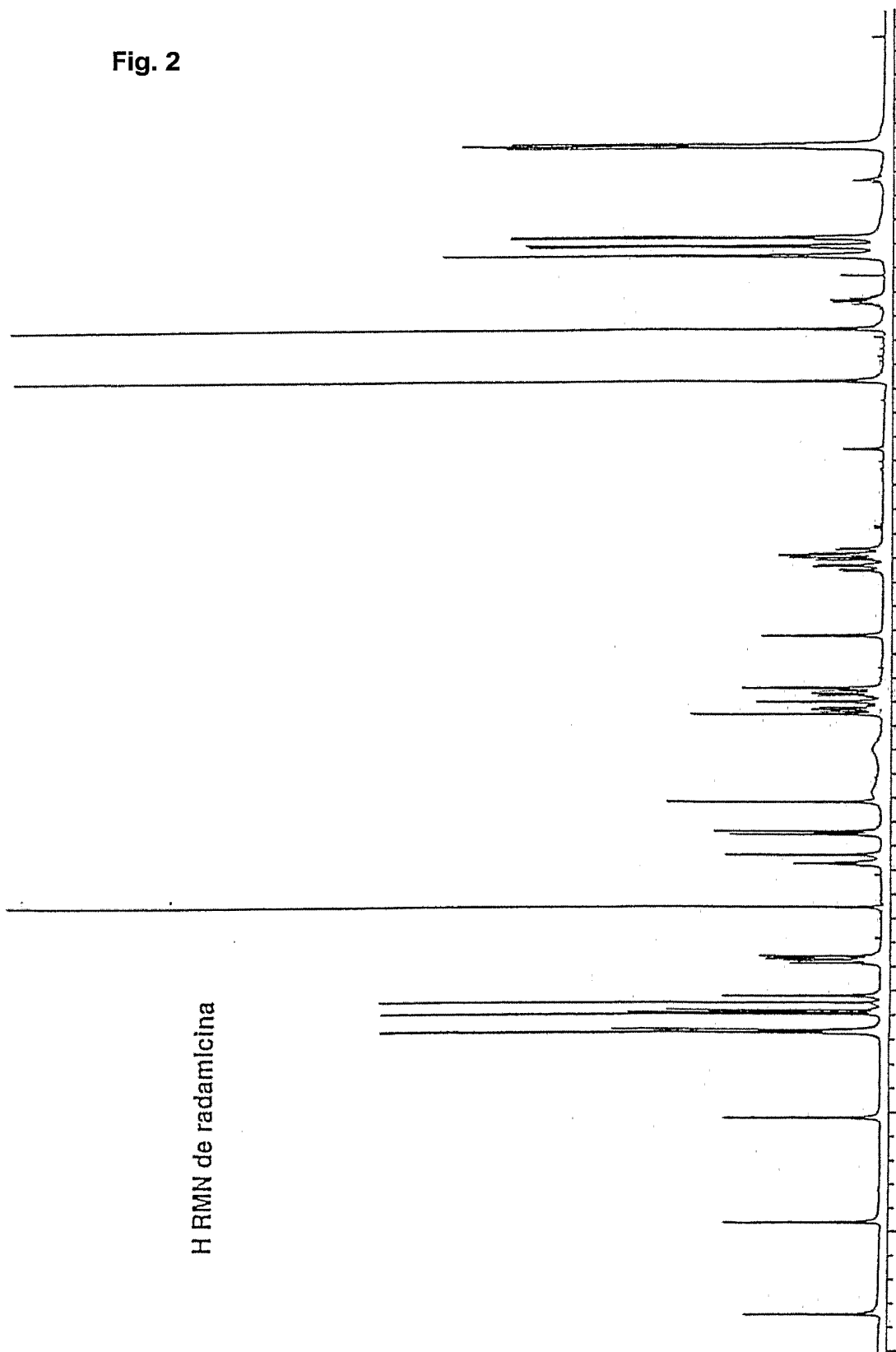


Fig. 1

Fig. 2



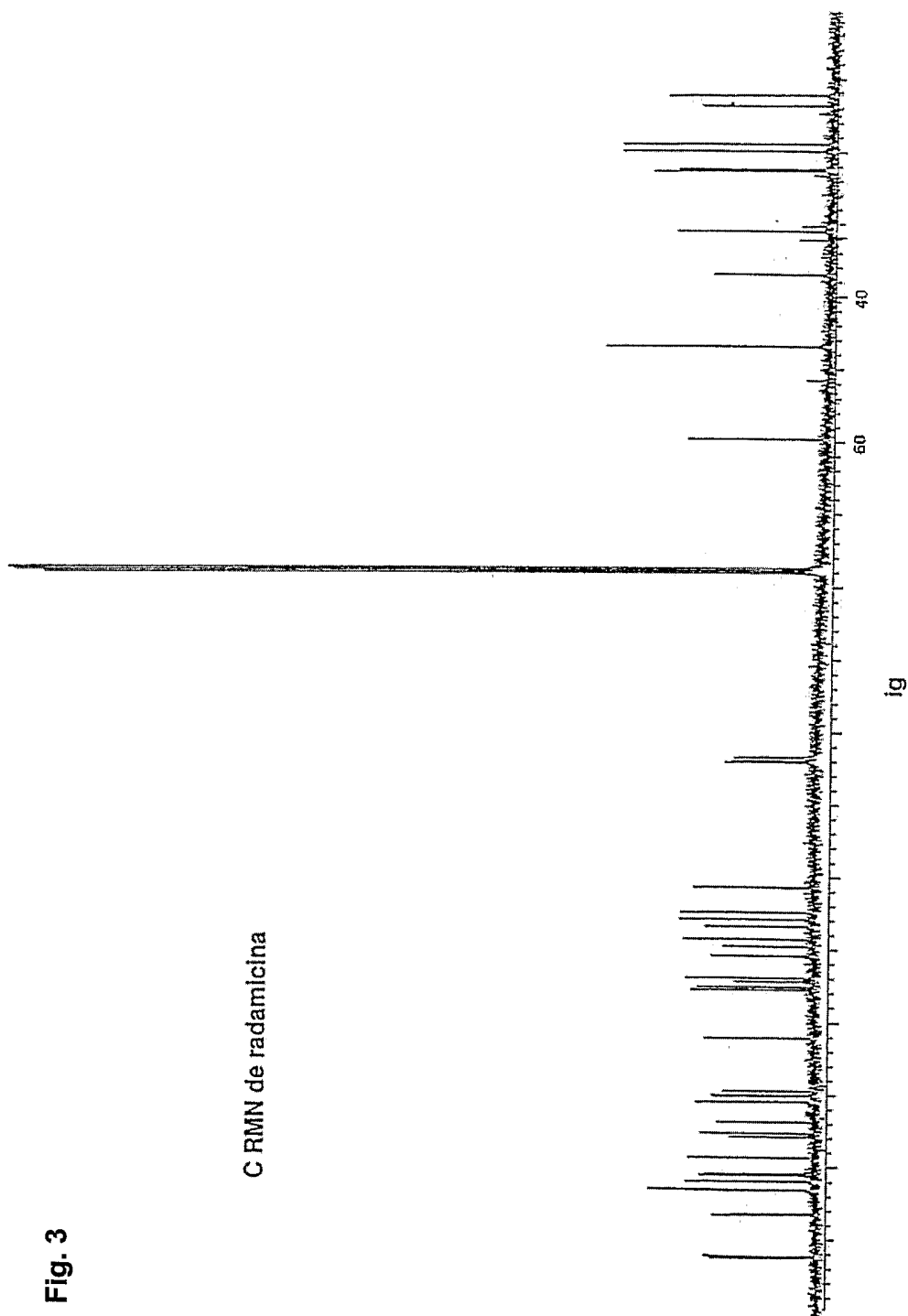
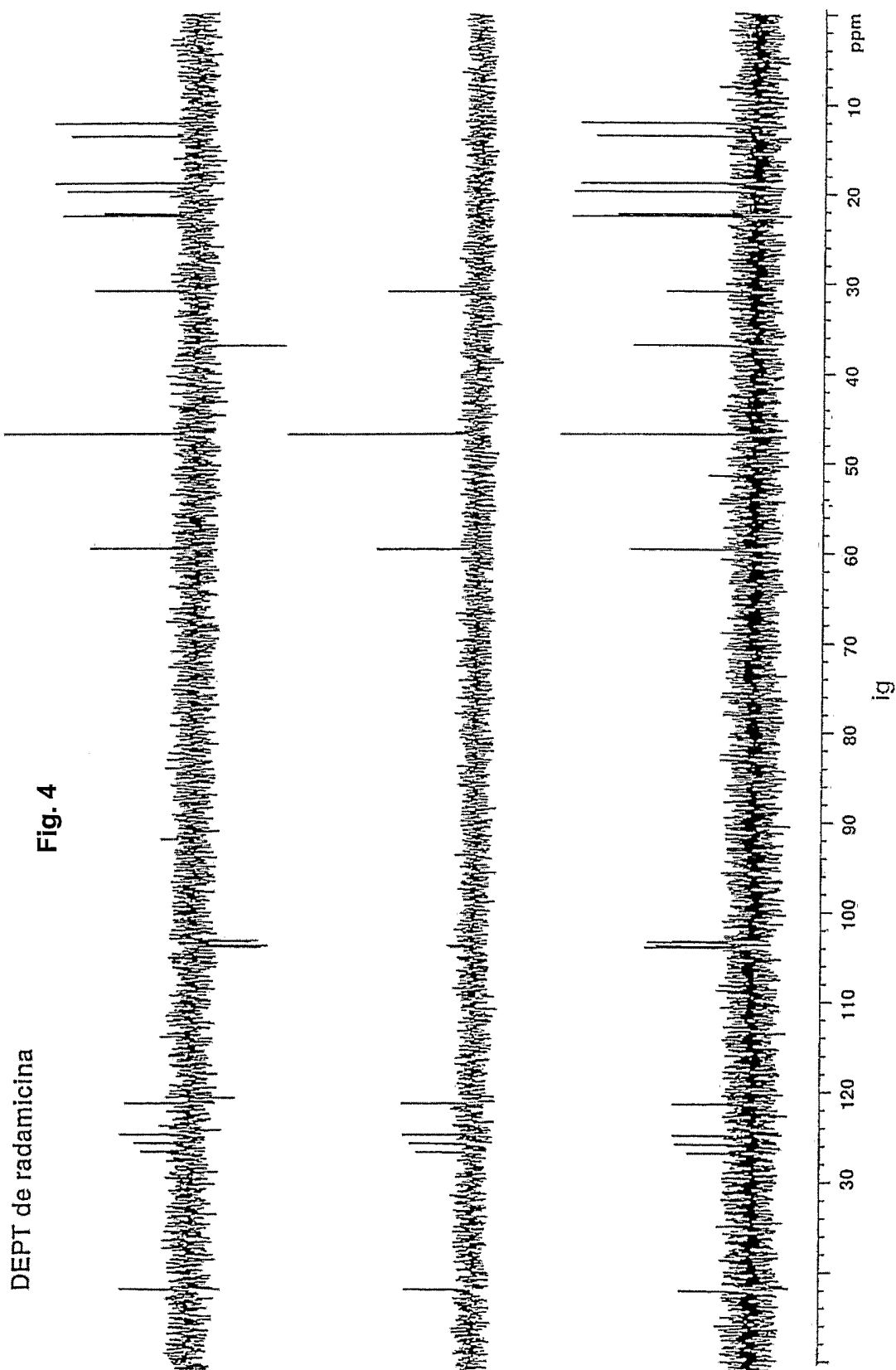
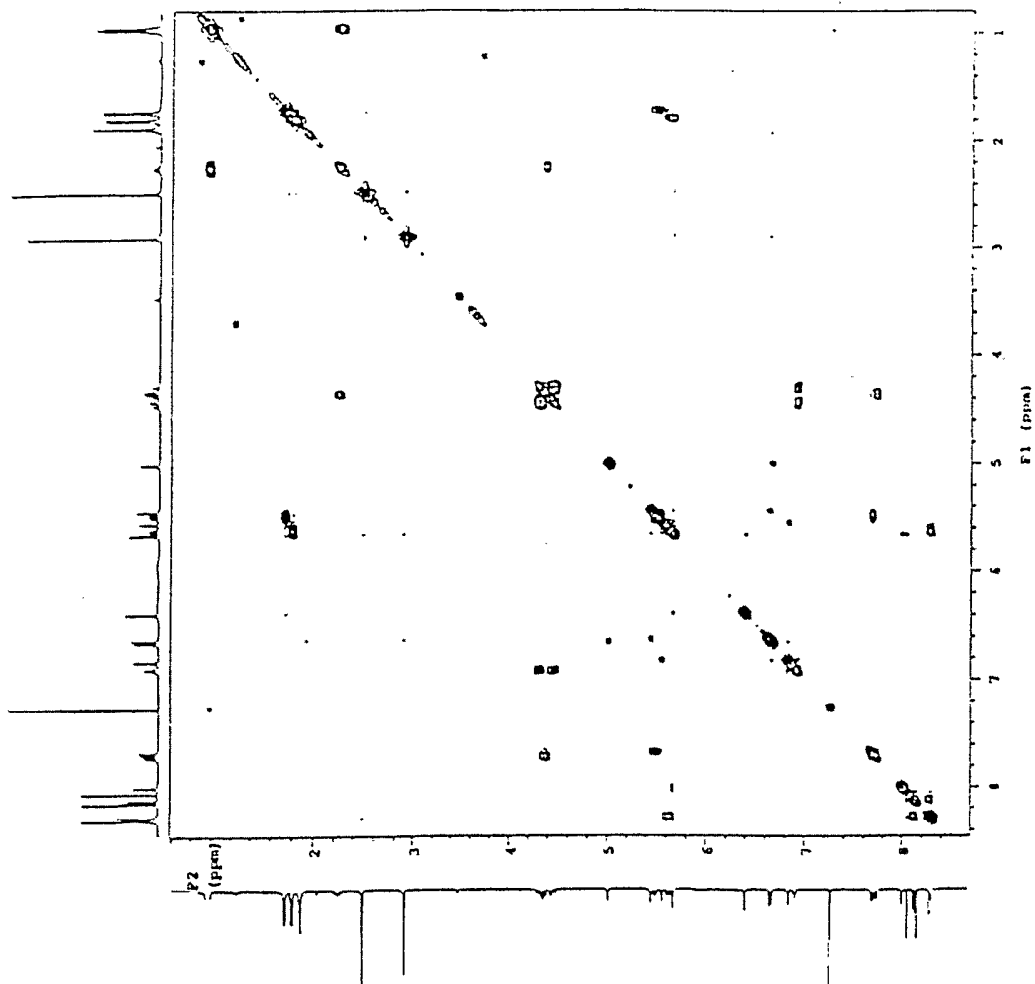


Fig. 3

C RMN de radamicina





COSY 45 de radamlicina

Fig. 5

HSQC de radámicina

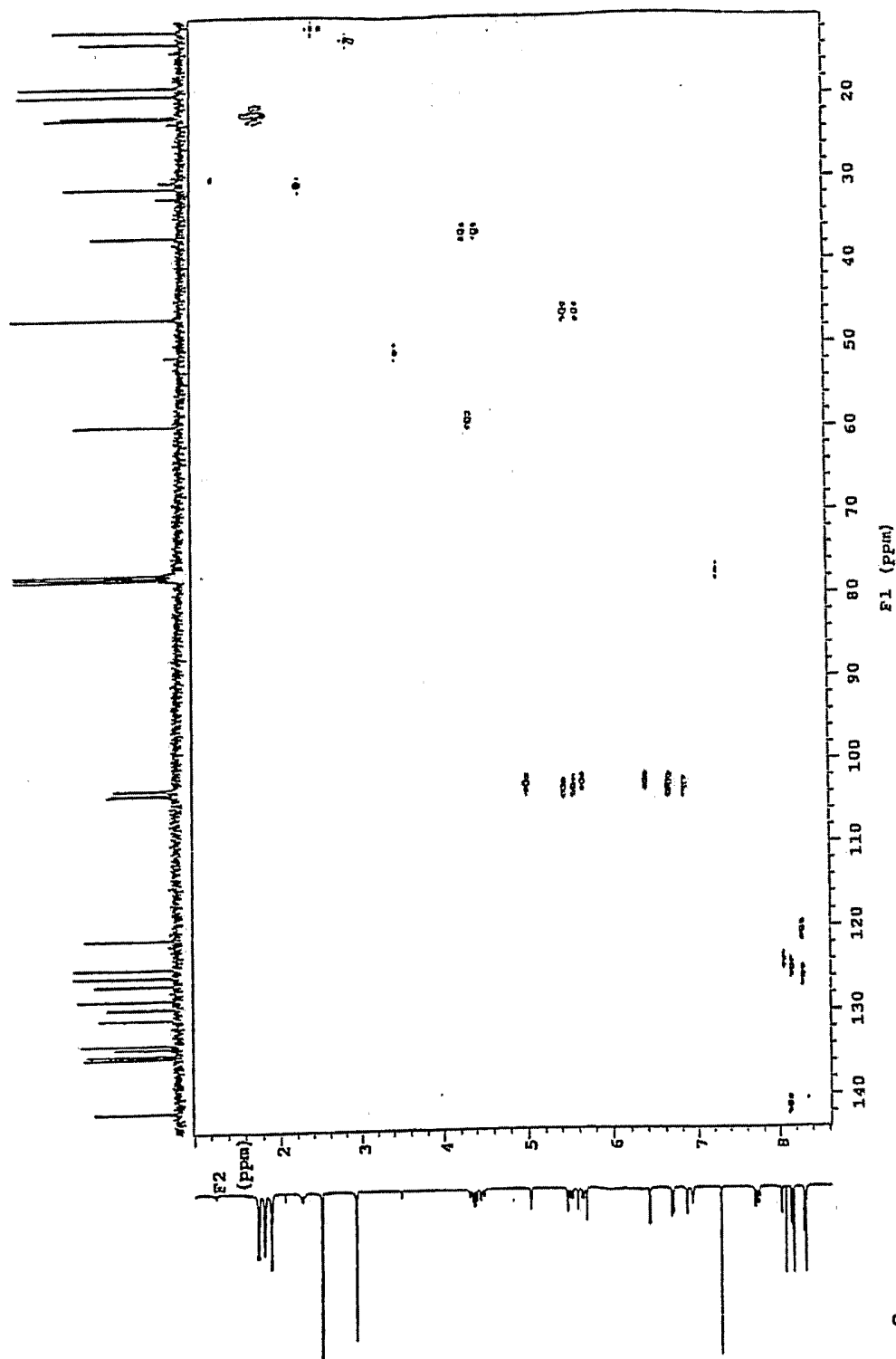


Fig. 6

HMBC de radamlicina

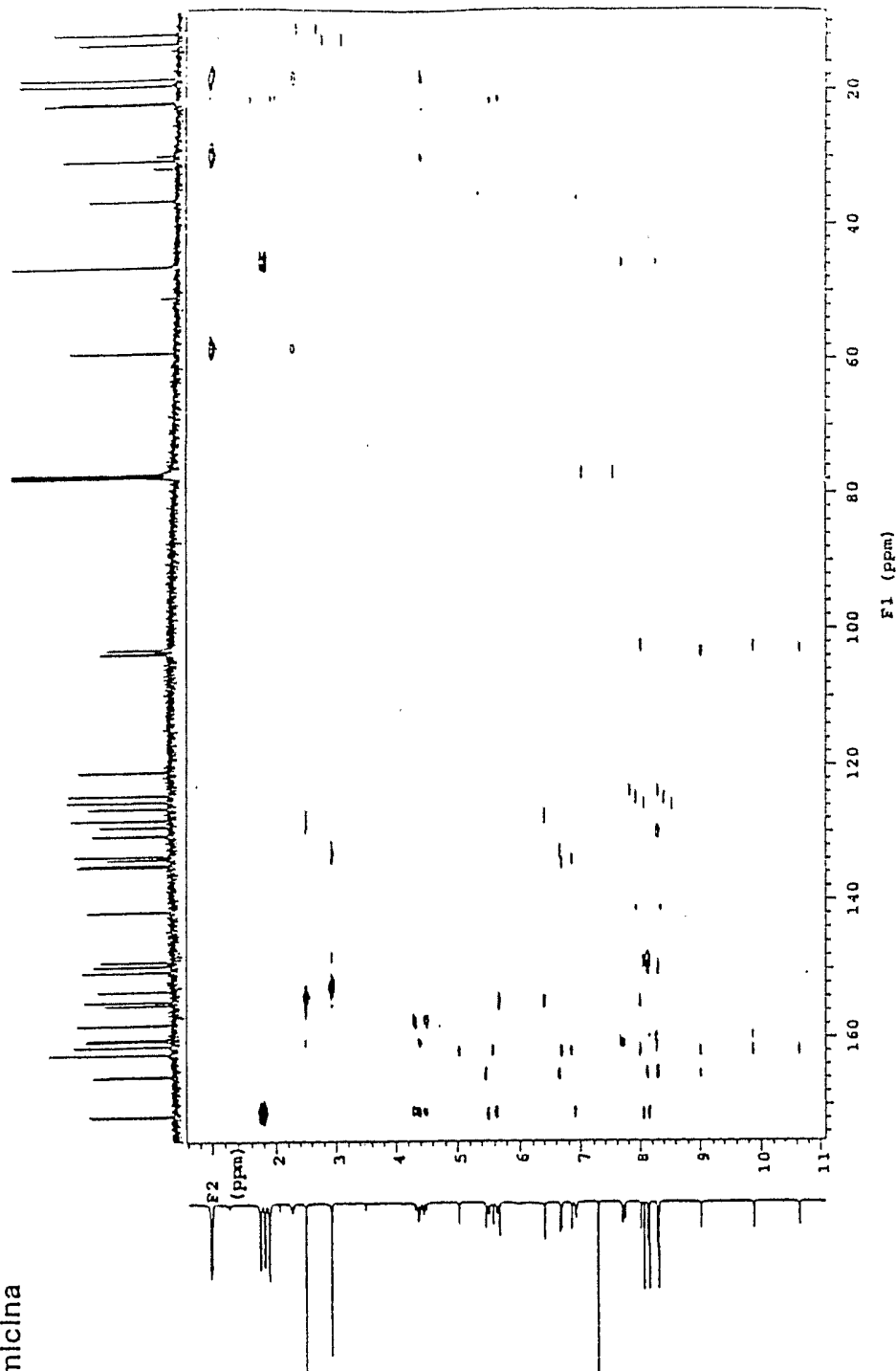


Fig. 7

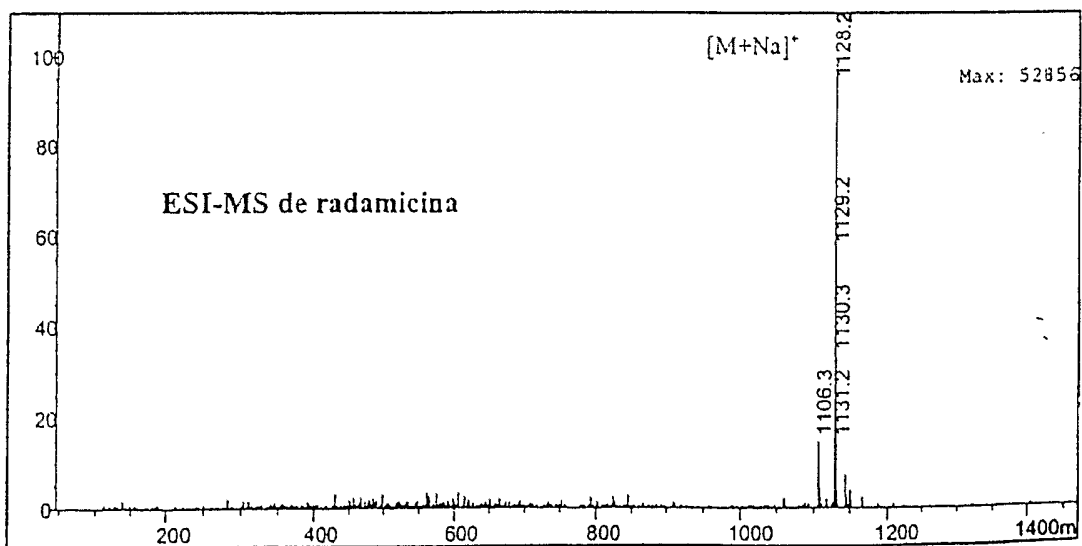
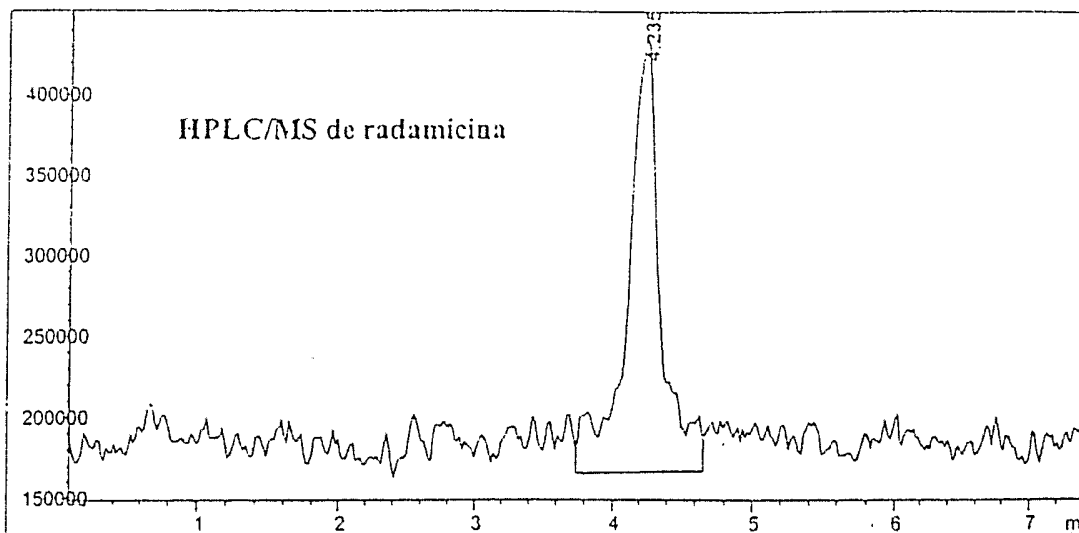
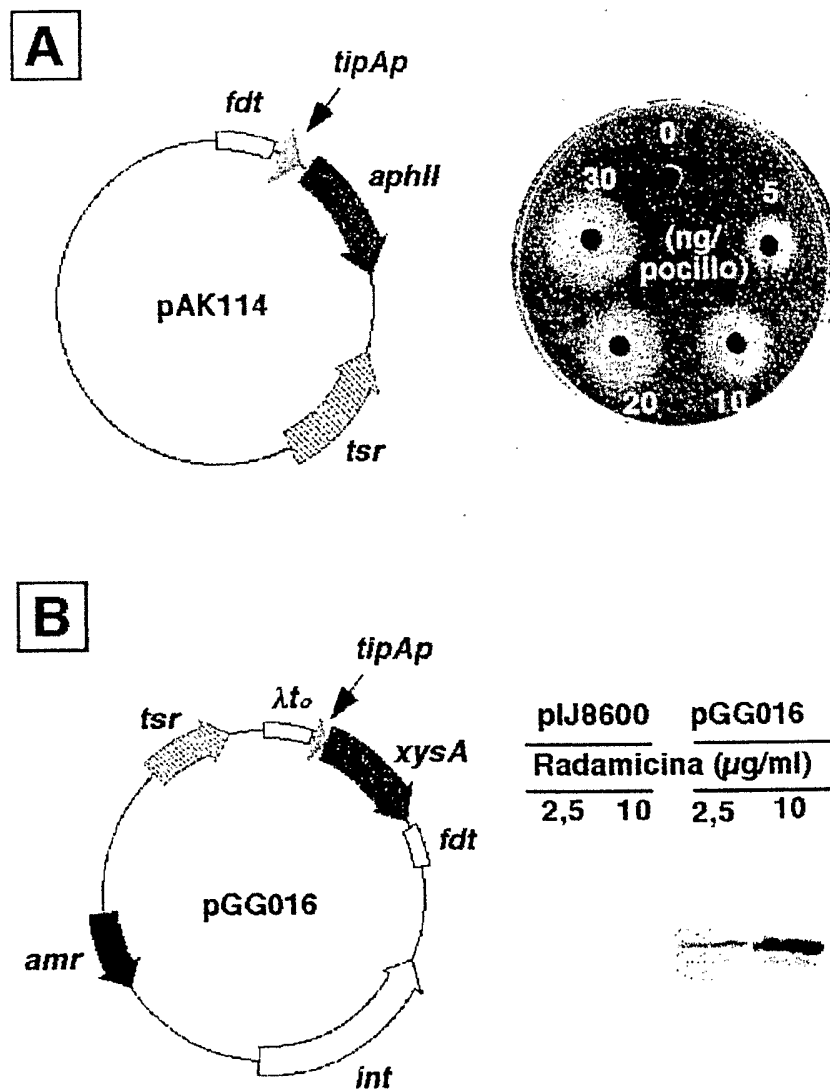


Fig. 8

Figura 9



A) Expresión del gen *aphII* (*neo*) bajo el control del promotor *tipA* inducido por distintas cantidades de radamicina.

B) Expresión del gen *xysA* bajo el control del promotor *tipA* inducido por distintas cantidades de radamicina. pIJ8600, plasmido vector.

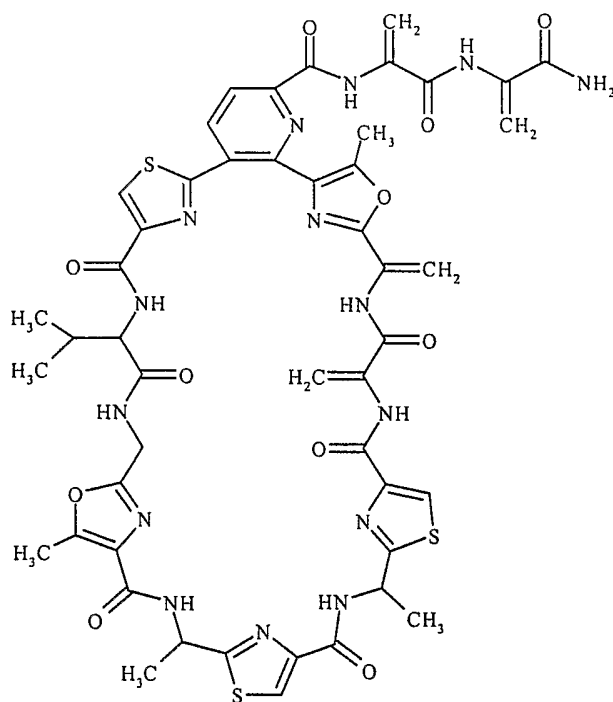


Figura 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 02/00552

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 : C07K 7/02, C12P 21/02, C12N 1/20 //(C12N1/20, C12R 1:545)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 : C07K, C12P, C12N, C12R		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CIBEPAT, EPODOC, PAJ, WPIL, REG, HCAPLUS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0818464 A (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT), 14.01.1998, the whole document .	1-8
PX	GONZÁLEZ HOLGADO, G. et al. "Radamycin, a novel thiopeptide produced by <i>Streptomyces</i> sp. RSP9. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity". THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS. Vol. 55, n° 4, april 2002, pages 383-390, the whole document	1-8
PX	CASTRO RODRÍGUEZ, J. et al. "Radamycin, a novel thiopeptide produced by <i>Streptomyces</i> sp. RSP9. II. Physico-chemical properties and structure determination". THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS. Vol. 55, n° 4, april 2002, pages 391-395, the whole document	1-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
25 February 2003 (25.02.03)		26 February 2003 (26.02.03)
Name and mailing address of the ISA/ S.P.T.O		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ES 02/00552

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0818464 A1	14.01.1998	AT215561 T DE69711506 D,T DK818464 T EP0818539 A ES2175228 T PT818464 T	15.04.2002 08.05.2002 22.07.2002 14.01.1998 16.11.2002 30.09.2002
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 02/00552

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ C07K 7/02, C12P 21/02, C12N 1/20 //(C12N1/20, C12R 1:545)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ C07K, C12P, C12N, C12R

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, PAJ, WPIL, REG, HCAPLUS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	EP 0818464 A (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT), 14.01.1998, todo el documento.	1-8
PX	GONZÁLEZ HOLGADO, G. et al. "Radamycin, a novel thiopeptide produced by <i>Streptomyces</i> sp. RSP9. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity". THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS. Vol. 55, n° 4, abril 2002, páginas 383-390, todo el documento.	1-8
PX	CASTRO RODRÍGUEZ, J. et al. "Radamycin, a novel thiopeptide produced by <i>Streptomyces</i> sp. RSP9. II. Physico-chemical properties and structure determination". THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS. Vol. 55, n° 4, abril 2002, páginas 391-395, todo el documento.	1-8

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 25 febrero 2003 (25.02.2003)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

26 FEB 2003

26. 02. 03

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.
C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
n° de fax +34 91 3495304

Funcionario autorizado
María Novoa Sanjurjo

n° de teléfono +34 91 349 55 52

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES02/00552

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
EP 0818464 A1	14.01.1998	AT215561 T DE69711506 D,T DK818464 T EP0818539 A ES2175228 T PT818464 T	15.04.2002 08.05.2002 22.07.2002 14.01.1998 16.11.2002 30.09.2002
-----	-----	-----	-----