

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 195 748**

② Número de solicitud: 200102609

⑤ Int. Cl.7: **C07K 7/02**

C12P 21/02

C12N 1/20

// (C12N 1/20

C12R 1:545)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **23.11.2001**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2003**

Fecha de la concesión: **31.01.2005**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **01.03.2005**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2005**

⑦ Titular/es:  
**Consejo Superior Investigaciones Científicas  
Serrano, 117  
28006 Madrid, ES  
Biomar, S.A. y  
Universidad de Salamanca**

⑦ Inventor/es: **Santamaría Sánchez, Ramón;  
González Holgado, Gloria;  
Fernández Abalos, José Manuel;  
Díaz Martínez, Margarita;  
Castro Rodríguez, Julián y  
Cañedo Hernández, Librada M.**

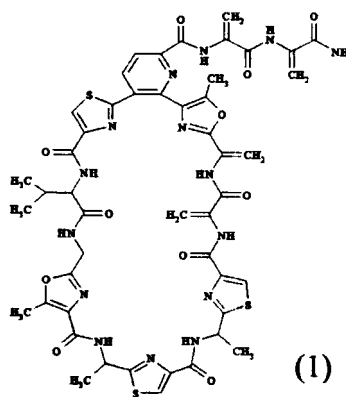
⑦ Agente: **Represa Sánchez, Domingo**

⑤ Título: **Radamicina, un proceso para su producción y su uso como inductor del promotor TtpA.**

⑦ Resumen:

Radamicina, un proceso para su producción y su uso como inductor del promotor TtpA.

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 estereométricas y tautoméricas, como inductor del promotor *tip A*. 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 *tip A*. 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).



ES 2 195 748 B1

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

## DESCRIPCION

Radamicina, un proceso para su producción y su uso como inductor del promotor Tipa.

## 5 Sector de la técnica

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 técnica

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 *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 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*sv. *J Bacteriol* 171, 1459-66), como sistema de escrutinio para la selección de moléculas activadoras del promotor *tipA* (Yun, B. S., Hidaka, T., Furihata, K. & Seto, H. (1994) Microbial metabolites with *tipA* promoter inducing activity. 11. 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*. 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., Katoh, T., Puglia, A. M., Vohradsky, J., Yun, B. S., Seto, H. & Thompson, C. J. (1999) Broad spectrum thiopeptide recognition specificity of the *Streptomyces* 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 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.

60

## Descripción de la invención

### Descripción breve

5 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 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*.  
 10 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).

### 15 Descripción detallada

En la presente invención se describe un nuevo microorganismo terrestre, *Streptomyces* sp RSP9, identificado mediante la secuenciación del DNA que codifica el RNAr 16S (Ejemplo 1), perteneciente a la especie *Streptomyces griseus*, productor de un nuevo compuesto tiopeptídico cuya estructura ha sido  
 20 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 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  
 25 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 radamicina, y forman parte de la presente invención.

Como se describe más adelante (Ejemplo 2 y 3) el procedimiento de producción de radamicina por  
 30 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.  
 35 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  
 40 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  
 45 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 frac-  
 50 ciones mediante solventes orgánicos como *n*-BuOH, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, distintas mezclas de CHCl<sub>3</sub>-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 cen-  
 55 trifugación 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).

60 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

## ES 2 195 748 B1

análisis de HPLC se ha realizado en un equipo Waters 991 con un detector de fotodiodos, utilizando un cartucho Radial Pack Resolve C18 (10 $\mu$ , Waters Chromatography) y como fase móvil CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O 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.

5

Mediante un estudio detallado de los datos espectroscópicos (ver los datos 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 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y DEPT de radamicina se pueden ver en las Figuras 2, 3 y 4, respectivamente. Los espectros de RMN bidimensionales de COSY, HSQC y HMBC aparecen en las Figuras 5, 6 y 7, respectivamente. El espectro de ESI-MS de radamicina presenta un ión molecular (M+Na)<sup>+</sup> a *m/z* 1128, como se puede ver en la Figura 8. Todos los datos de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se detallan en la Tabla 1.

15

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 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.

20

La radamicina purificada en la presente invención no presenta actividad antibiótica frente microorganismos G<sup>+</sup> 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 tipA a concentraciones nanomolares como se puede ver en la Figura 9A.

25

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 tiopeptídicos con actividad antibiótica.

30

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.

35

40

45

50

(Ver Tabla 1 en página siguiente)

55

60

TABLA 1  
 Datos de RMN<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de radamicina

Posición	<sup>13</sup> C(δ)	<sup>1</sup> H(δ)	Posición	<sup>13</sup> C(δ)	<sup>1</sup> H(δ)
<b>Tiazol (1)</b>					
2-C	165.4		Deshidroalanina (1)		
4-C	150.1		NH		8.01 (s)
5-CH	126.1	8.29 (s)	αC	134.7	
CO	160.9		βCH <sub>2</sub>	102.9	6.66 (d, 2.0), 5.01 (s)
			CO	162.1	
<b>Valina</b>					
NH		7.72 (d, 9.2)	Metiloxazol (2)		
αCH	59.2	4.36 (t, 8.4)	NH		9.86 (s)
βCH	30.6	2.25 (m)	αC	127.8	
γCH <sub>3</sub>	19.5	0.95 (d, 6.8)	βCH <sub>2</sub>	102.7	6.39 (s), 5.66 (s)
γCH <sub>3</sub>	18.5	0.97 (d, 6.8)	2-C	154.9	
CO	171.3		4-C	133.5	
			5-C	152.8	
			5-CH <sub>3</sub>	13.3	2.91 (s)
<b>Metiloxazol (1)</b>					
NH		6.92 (t, 5.6)	Piridina		
CH <sub>2</sub>	36.6	4.45 (dd, 16.8, 6.0) 4.30 (dd, 16.8, 6.0)	2-C	148.6	
2-C	157.8		3-C	130.1	
4-C	128.8		4-CH	141.3	8.11 (d, 8.0)
5-C	154.4		5-CH	120.7	8.28 (d, 8.0)
5-CH <sub>3</sub>	11.8	2.48 (s)	6-C	150.0	
CO	161.0		CO	162.2	
<b>Tiazol (2)</b>					
NH		8.28 (d, 8.4)	Deshidroalanina (2)		
αCH	46.5	5.62 (t, 7.2)	NH		10.63 (s)
βCH <sub>3</sub>	21.7	1.79 (d, 7.0)	αC	134.3	
2-C	171.5		βCH <sub>2</sub>	103.3	6.82 (d, 2.0), 5.55 (s)
4-C	149.1		CO	162.2	
5-CH	124.1	8.05 (s)	<b>Deshidroalanina (3)</b>		
CO	160.2		NH		9.01 (s)
			αC	133.1	
			βCH <sub>2</sub>	103.5	6.63 (d, 2.0), 5.44 (s)
			CO	165.9	
<b>Tiazol (3)</b>					
NH		7.68 (d, 8.4)			
αCH	46.5	5.48 (t, 7.2)			
βCH <sub>3</sub>	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.

Figura 2.- Espectro de RMN de protón (<sup>1</sup>H) de radamicina pura.

Figura 3.- Espectro de RMN de carbono (<sup>13</sup>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.

5

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

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

10 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  $\mu\text{g/ml}$ ). 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 ambos  
15 plásmidos pIJ8600 y pGG016.

Figura 10.- Estructura química de la radamicina.

### Ejemplos de la invención

20

#### Ejemplo 1

##### *Identificación de Streptomyces sp RSP9*

25

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  
30 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*.

35

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*

40

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.,  
45 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%.

50

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<sub>2</sub>Cl. 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.

#### Ejemplo 3

55

##### *Optimización de la producción de radamicina*

60

La producción de radamicina se realizó en medio YES suplementado con 1% xilosa y 2mM Mg<sub>2</sub>Cl. Tres litros de este medio se inocularon con una suspensión de esporas para obtener 10<sup>6</sup> 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 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*

5 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 sequedad mediante evaporación a vacío, obteniéndose un residuo aceitoso de 3.0 g. Dicho extracto se disolvió en 500 ml de NaCl(10%)-MeOH 1:1 y la mezcla hidroalcohólica se extrajo dos veces con 500 ml de CHCl<sub>3</sub>, los extractos fueron  
10 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 mezclas de CHCl<sub>3</sub>-MeOH. Las fracciones que por TLC y HPLC contenían radamicina (60 mg) fueron eluidas con CHCl<sub>3</sub>-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 MeOH-H<sub>2</sub>O 85:15.

15 La pureza de las fracciones fue confirmada mediante técnicas analíticas de TLC y 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  
25 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 Xysl (*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, Xysl. 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).  
40 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. L., Cortijo, M., Villar, E., Fernandez-Abalos, J. M., Calvete, J. J. & Shnyrov, V. L. (1998) Thermodynamic stability of two variants of xylanase (Xysl) from Streptomyces halstedii JM8. Eur J Biochem* **253**, 462-8) (Figura 913, panel izquierdo). La inducción de la expresión se estudió en  
45 medio líquido YES (1% extracto de levadura, 10,3% sacarosa, MgCl<sub>2</sub> 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  
50 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, Xysl. 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 913, panel derecho) y por la actividad  
55 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 por 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  
60 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

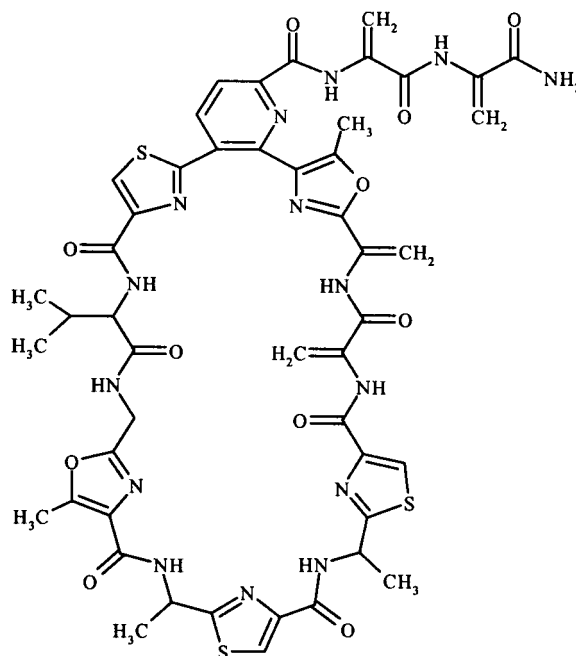
10

15

20

25

30



así como sus sales, formas estereoisoméricas, formas tautoméricas y sus equivalentes químicos.

2. Procedimiento para obtener el compuesto químico de la reivindicación 1 **caracterizado** porque se utiliza un microorganismo productor del género *Streptomyces*

35

3. Procedimiento para obtener el compuesto químico de la reivindicación 1, según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el microorganismo utilizado es la cepa *Streptomyces sp* RSP9 (CECT 3356).

40

4. Procedimiento para obtener el compuesto químico de la reivindicación 1, según las reivindicaciones 2 y 3, **caracterizado** porque el microorganismo utilizado es una cepa transformada o mutada de *Streptomyces sp* RSP9 (CECT 3356).

45

5. Procedimiento para obtener el compuesto químico de la reivindicación 1, según las reivindicaciones 2 a 4, **caracterizado** porque el cultivo de la cepa bacteriana se realiza en condiciones aerobias, a temperaturas entre 24 y 37°C, a un pH entre 6 y 9 y con un suplemento de magnesio en el medio de cultivo entre 2 mM y 5 mM.

50

6. Procedimiento para obtener el compuesto químico de la reivindicación 1 **caracterizado** porque se realiza por síntesis química o enzimática.

7. Procedimiento para obtener el compuesto químico de la reivindicación 1, según las reivindicaciones 2 a la 5, **caracterizado** porque incluye un proceso de purificación del compuesto.

55

8. Procedimiento para purificar el compuesto químico de la reivindicación 1, según la reivindicación 7, **caracterizado** porque incluye los siguientes pasos:

60

- a) extracción del cultivo (el conjunto de células y sobrenadante) con un volumen de solventes orgánicos, que pueden ser entre otros, *n*-BuOH,  $(CH_3)_2CO$  o distintas mezclas de  $CHCl_3$ -MeOH;
- b) recuperación de la fase orgánica y evaporación de la misma;
- c) separaciones cromatográficas, entre otras, cromatografía rápida a vacío y cromatografía en gel de sílice de fase reversa C18.



9. Uso del compuesto químico de la reivindicación 1 como inductor de promotores regulados por moléculas tiopeptídicas en procesos industriales de producción de proteínas.

10. Uso según la reivindicación 9 **caracterizado** porque el promotor regulado por moléculas tiopeptídicas es el promotor *tipA*.

11. Microorganismo *Streptomyces sp* RSP9 (CECT 3356) que se utiliza en el procedimiento según las reivindicaciones 2 a la 5 y reivindicaciones 7 y 8, **caracterizado** porque produce el compuesto de la reivindicación 1.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

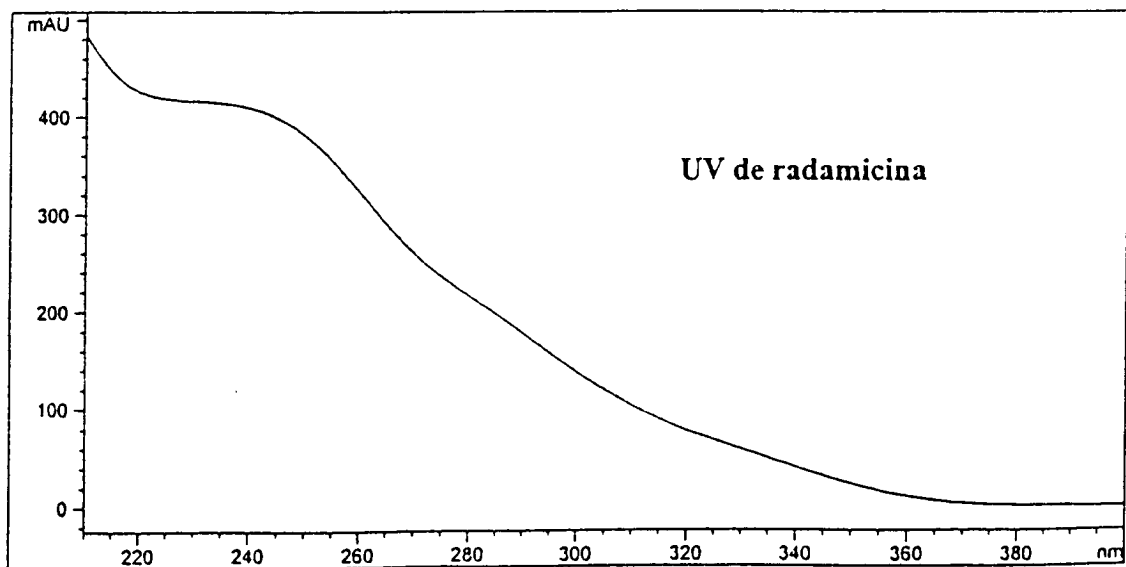
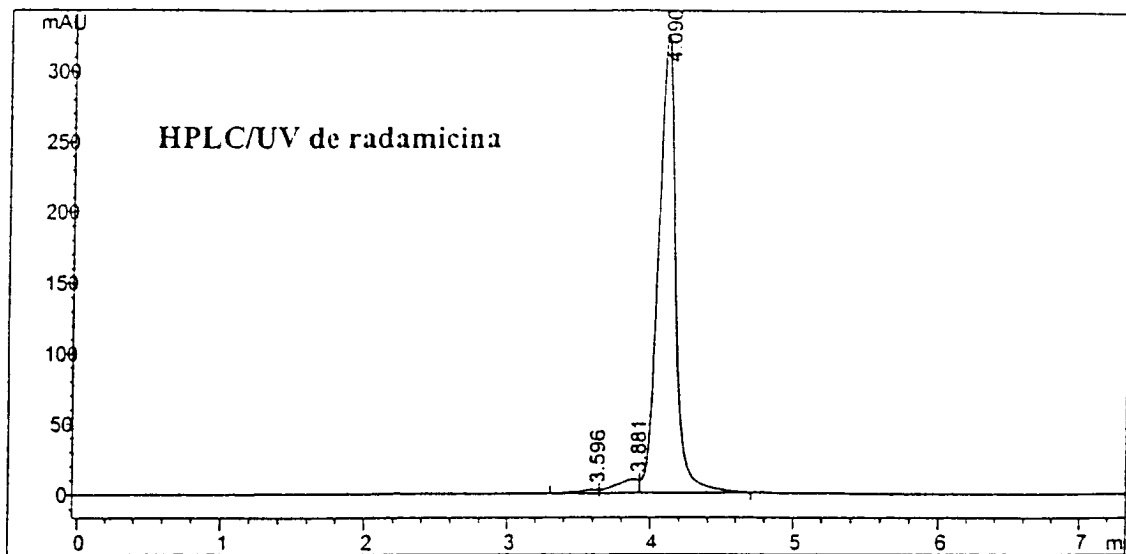
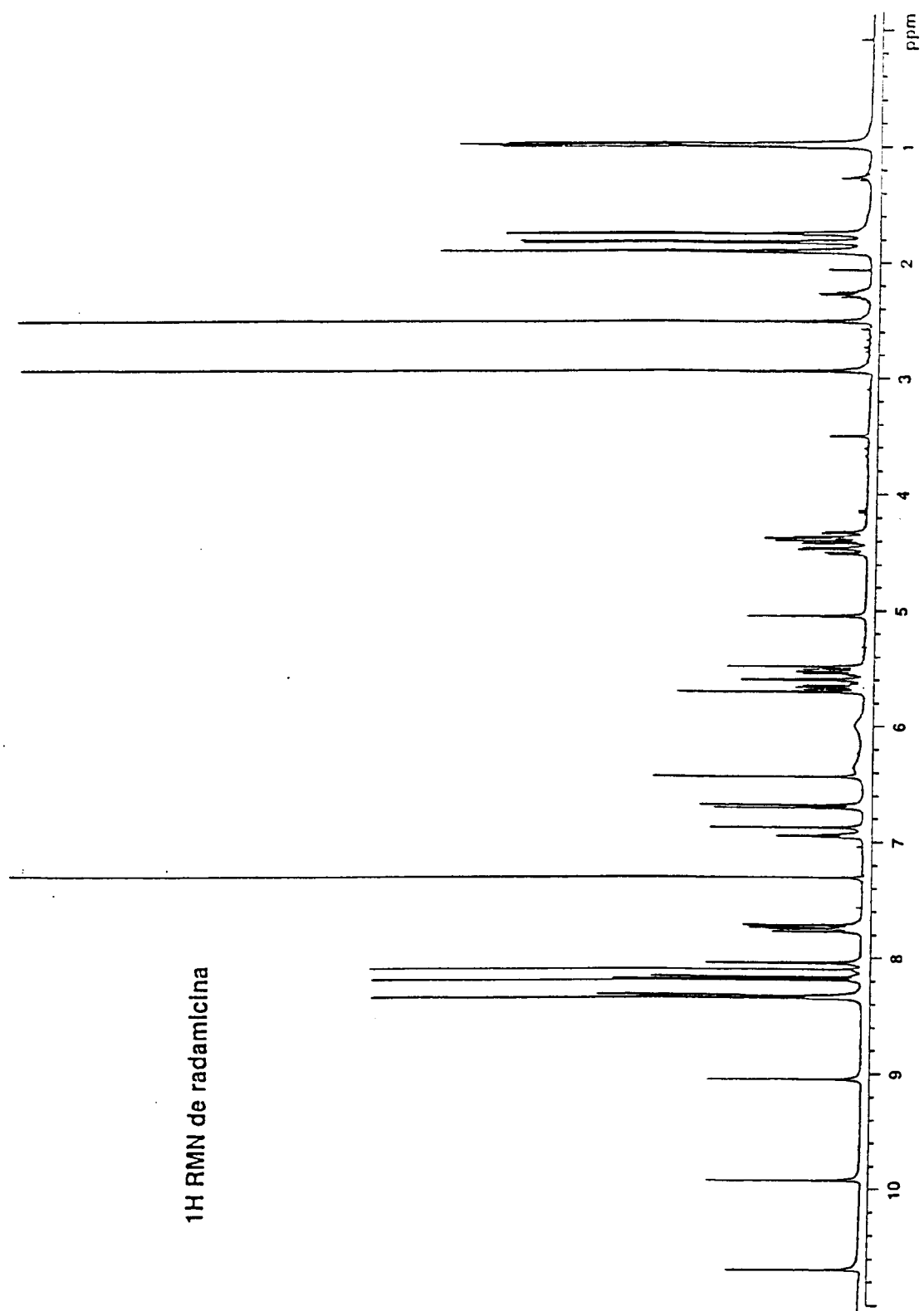
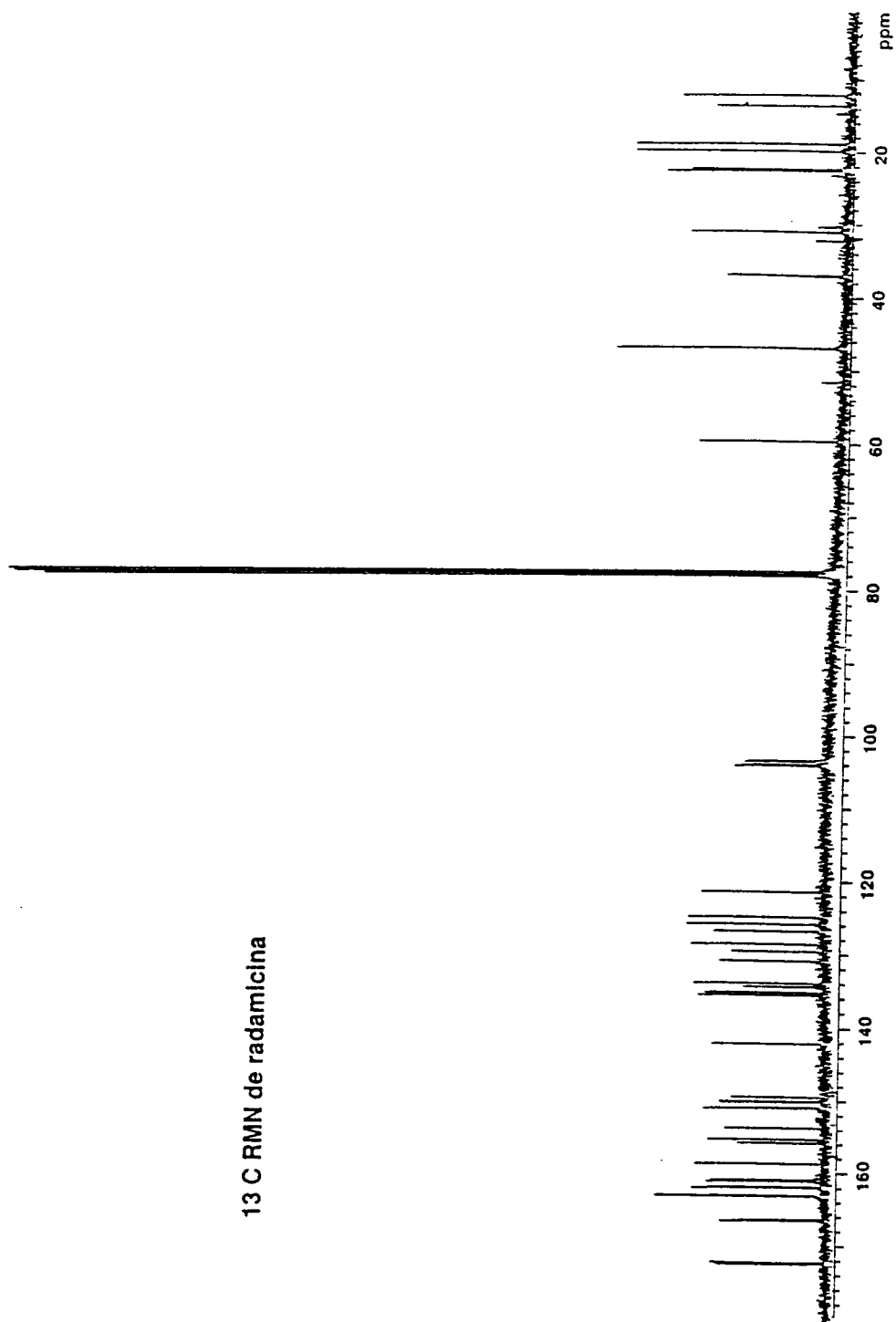


Fig. 1



**<sup>13</sup>C RMN de radamolina**



**Fig. 3**

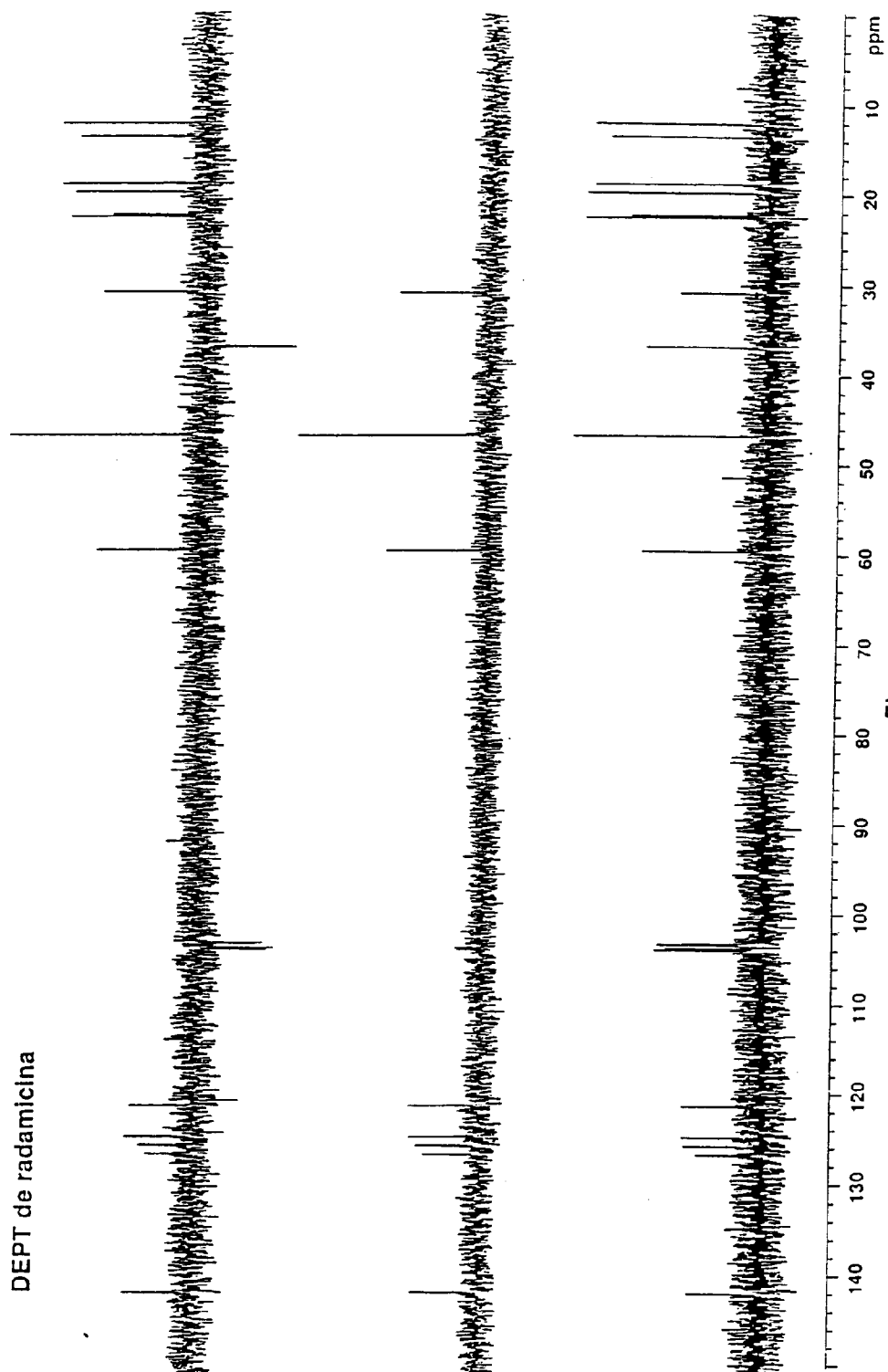
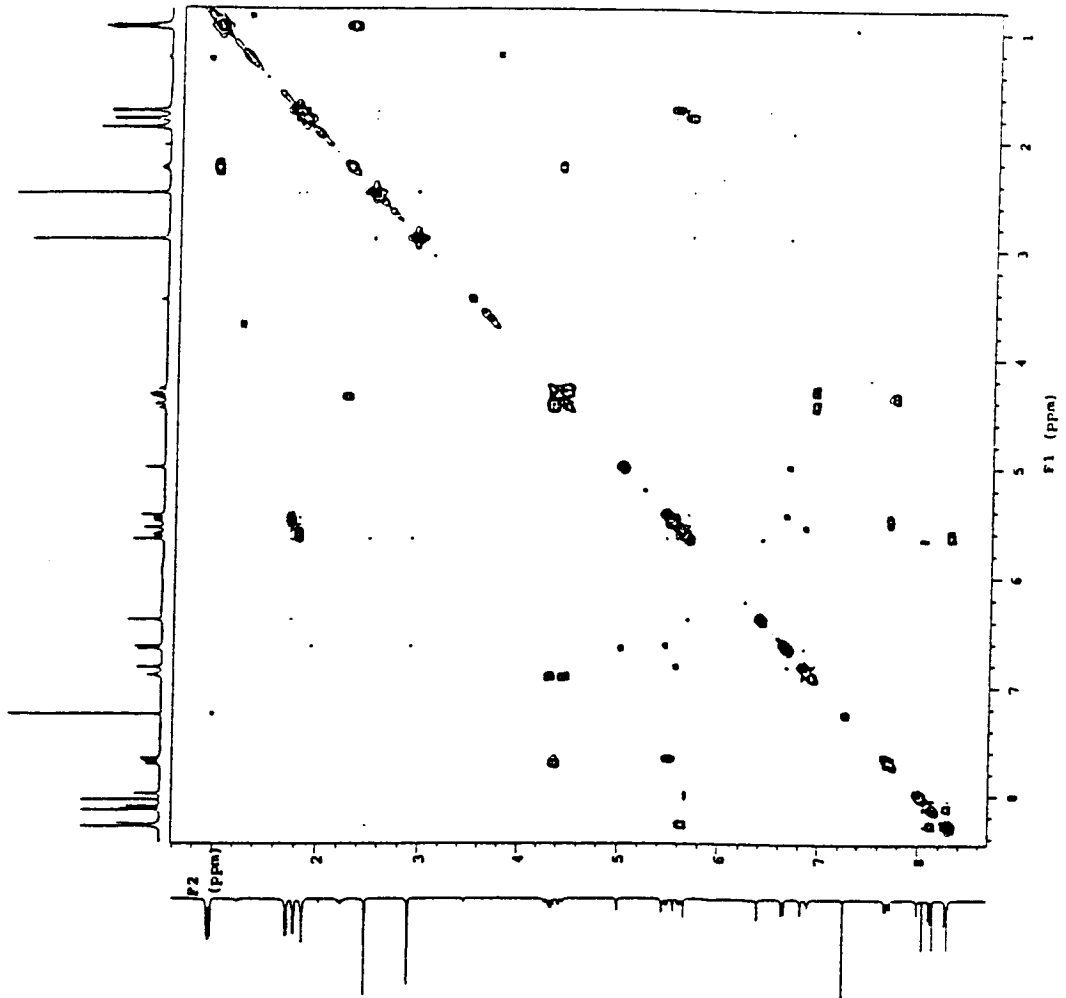


Fig. 4



COSY 45 de radamicina

Fig. 5

HSQC de radamicina

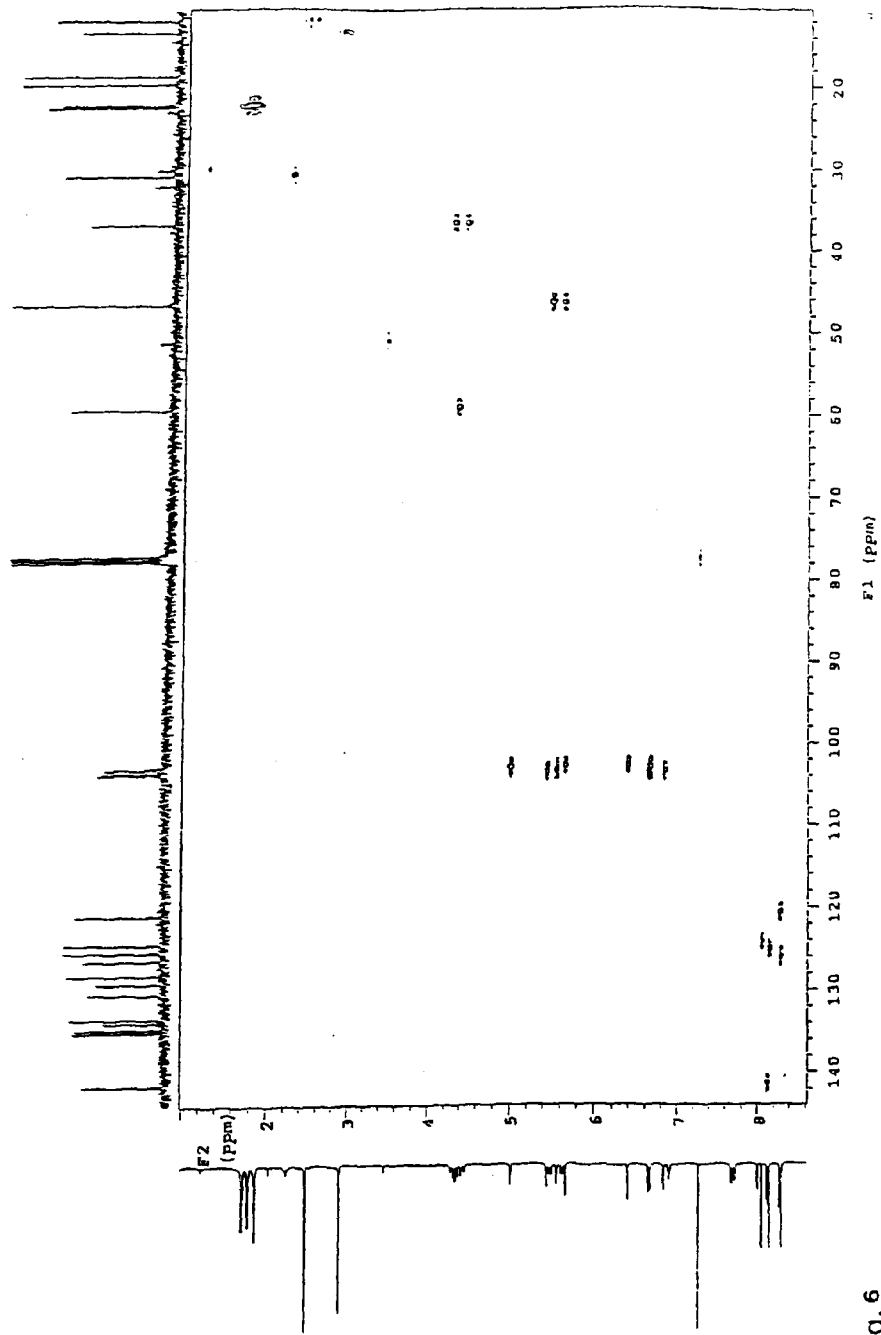


Fig. 6

HMBC de radamicina

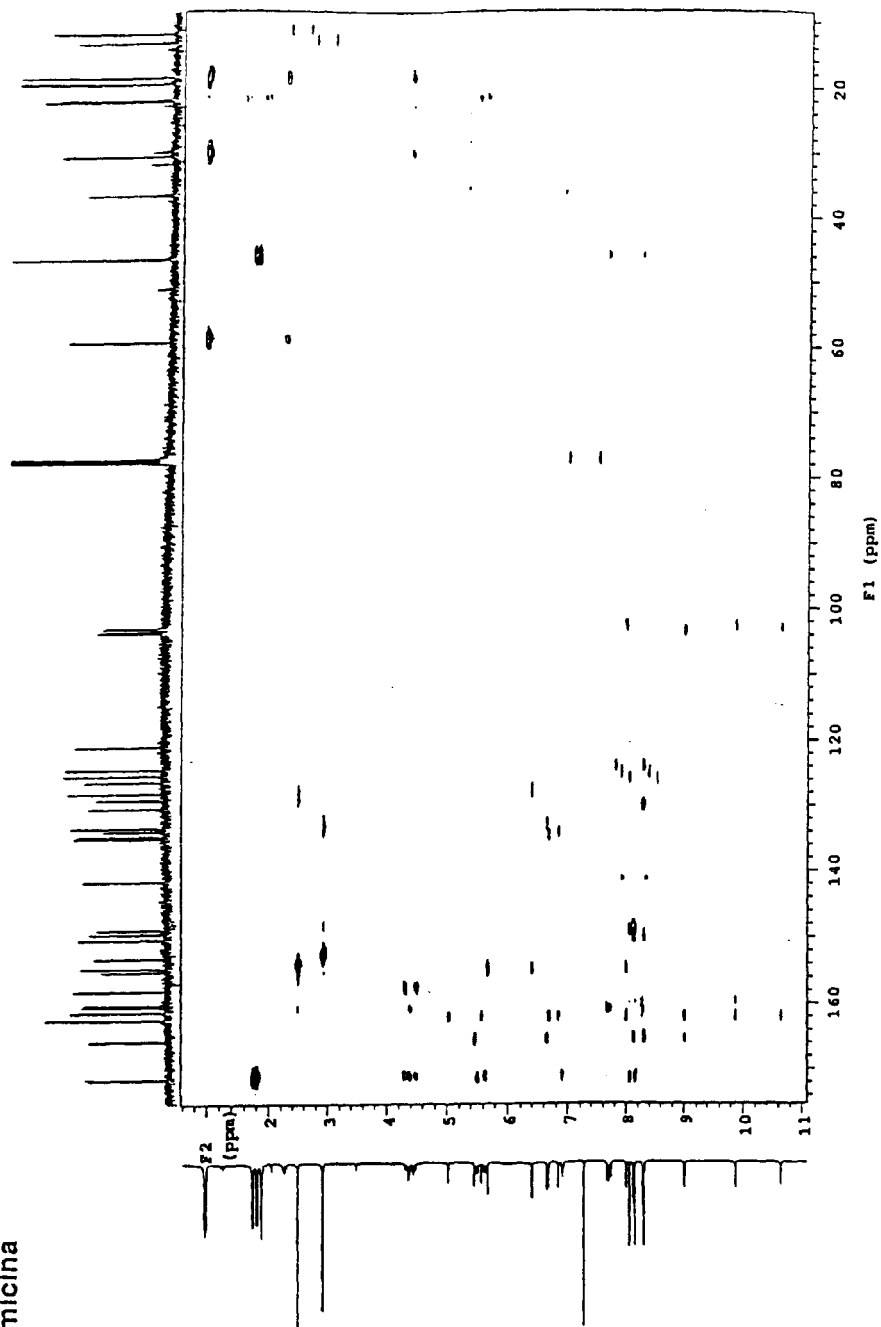


Fig. 7



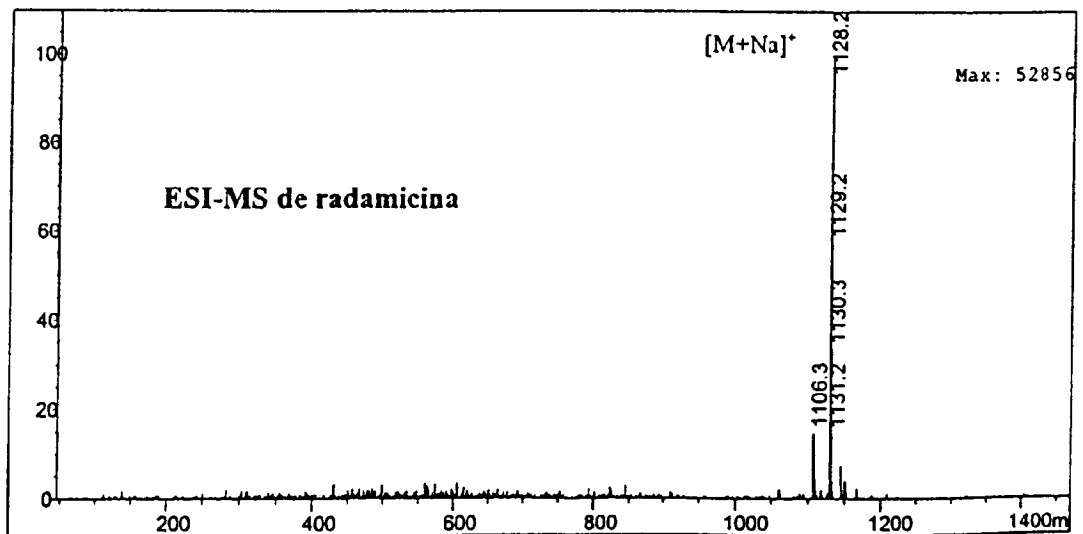
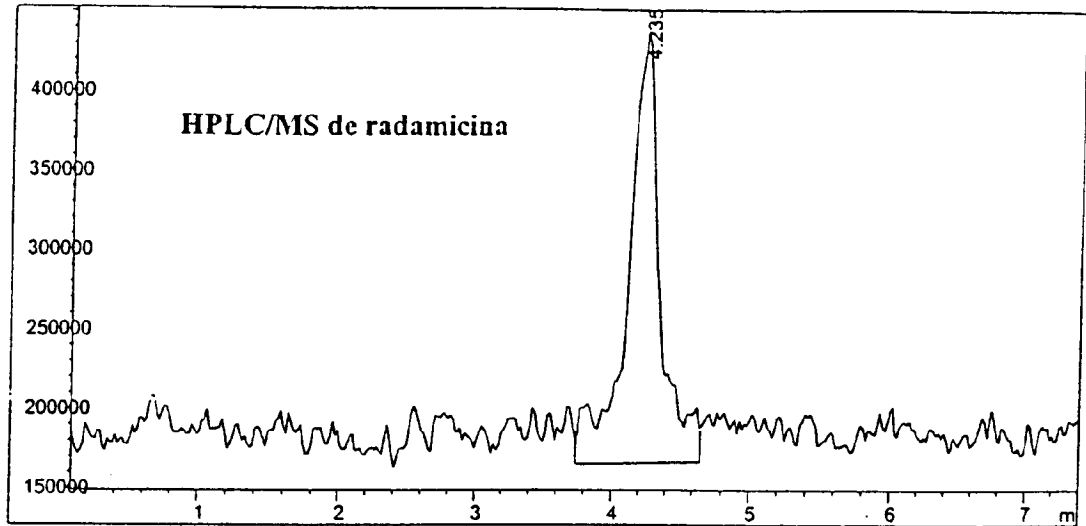
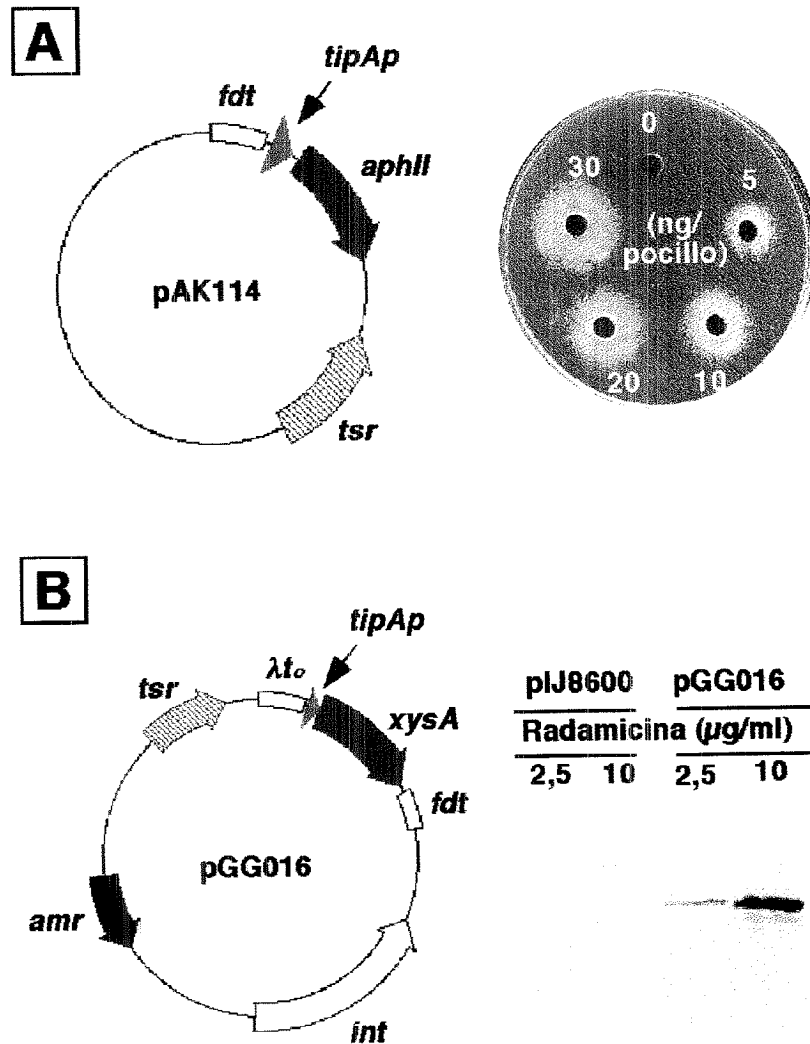


Fig. 8

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.





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 195 748

② Nº de solicitud: 200102609

③ Fecha de presentación de la solicitud: 23.11.2001

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C07K 7/02, C12P 21/02, C12N 1/20 // (C12N 1/20, C12R 1:545)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 0818464 A (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) 14.01.1998, todo el documento.	1-11

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

29.10.2003

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/1