

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 615**

21 Número de solicitud: 200930550

51 Int. Cl.:

C07H 17/08 (2006.01)

C12P 19/62 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

C12R 1/465 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **31.07.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **05.01.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
05.01.2012

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

72 Inventor/es: **Malpartida Romero, Francisco;**
Seco Martín, María Elena y
Miranzo Navarro, Domingo

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Macrólidos polienos con actividad antimicrobiana y su procedimiento biotecnológico de obtención.**

57 Resumen:

Macrólidos polienos con actividad antimicrobiana y su procedimiento biotecnológico de obtención.

La presente invención se engloba en el campo de la biología molecular y la biotecnología y se refiere a genes que codifican para la actividad amidotransferasa, implicados en la biosíntesis de macrólidos polienos, a una célula hospedadora que comprende estos genes y a un procedimiento de obtención de macrólidos polienos mediante dicha célula hospedadora. También se refiere a macrólidos polienos con actividad antibiótica obtenidos mediante este proceso biotecnológico.

DESCRIPCIÓN

Macrólidos polienos con actividad antimicrobiana y su procedimiento biotecnológico de obtención.

5 Estado de la técnica anterior

En las últimas décadas se han producido progresos importantes en el área de la sanidad humana, se han desarrollado tratamientos satisfactorios para graves enfermedades, bien mediante técnicas quirúrgicas, con la aplicación de nuevos agentes químicos ó con ambos procedimientos simultáneamente. Particularmente dos áreas se han visto favorablemente influenciadas: tratamientos oncológicos y trasplantes de órganos. Paralelo al progreso conseguido en estos campos, se ha producido un notable incremento en ciertas enfermedades infecciosas, tales como micosis severas, ocasionadas por microorganismos “oportunistas”, que han encontrado un nuevo nicho en pacientes oncológicos o trasplantados sometidos a quimioterapias agresivas. El incremento de estas infecciones fúngicas constituyen una de las mayores amenazas para el éxito de las terapias aplicadas en las poblaciones de riesgo. A diferencia de los antibacterianos, el arsenal de compuestos antifúngicos disponibles es escaso. Tradicionalmente los compuestos macrolidos polienos vienen siendo utilizados, con eficacia probada, desde hace 50 años; en los últimos años los derivados de azoles se han sumado al arsenal de compuestos antifúngicos. A diferencia de los macrolidos polienos, los azoles adolecen de un problema importante: incremento en la aparición de microorganismos resistentes que, en algunos casos los hacen inoperante como drogas antifúngicas. Esta situación contrasta fuertemente con el uso de macrolidos polienos, particularmente Anfotericina B, para la que la aparición de formas resistentes parece ser un evento muy raro. A pesar de la excelente eficacia de Anfotericina B como agente fungicida, su uso clínico se ve fuertemente comprometido debido, fundamentalmente, a una considerable nefrotoxicidad y su muy baja solubilidad en agua. Por ello se han realizado por parte de diferentes laboratorios numerosos esfuerzos en la búsqueda de antifúngicos alternativos.

Varias han sido las aproximaciones para la obtención de polienos alternativos con menor toxicidad. Numerosos análogos se han obtenido tanto por vía semisintética como por ingeniería genética de rutas biosintéticas conocidas. Muchos derivados de Anfotericina B se han obtenido por síntesis orgánica, centrándose en la modificación del grupo carboxílico exocíclico ó en el grupo amino de la molécula del azúcar micosamina. Pese a que los cambios introducidos han servido para conocer las relaciones estructura-función y aspectos importantes para incrementar significativamente la toxicidad selectiva hacia los microorganismos diana, ningún derivado nuevo de Anfotericina B ha salido al mercado. No obstante, el conocimiento adquirido con las nuevas estructuras obtenidas, sugieren que el cambio de carga en el grupo carboxilo tiene un efecto importante sobre la actividad hemolítica. Todo ello permitió establecer que el diseño de nuevos derivados podría orientarse a la modificación bien en el grupo carboxílico como en el amino del azúcar; de esta forma derivados catiónicos de Anfotericina B serían compuestos potencialmente más activos que los parentales. En ausencia de nuevos derivados catiónicos, las nuevas formulaciones de Anfotericina B, asociadas a liposomas han permitido lanzar al mercado preparaciones para su aplicación como antifúngico con una sustancial reducción en sus niveles de toxicidad. Pese a esa reducción en los niveles de toxicidad, la toxicidad remanente es aún muy alta y su uso queda reducido a situaciones extremas donde otros tratamientos son infructuosos. Todo ello permite establecer que la obtención de nuevos compuestos macrolidos polienos para sanidad humana supone un campo prometedor para incrementar la disponibilidad de nuevas drogas aprovechando las ventajas ofrecidas por los macrolidos polienos.

Descripción de la invención

La presente invención se basa en el aislamiento y caracterización de genes que han sido capaces de modificar tanto *in vivo* como *in vitro* compuestos antifúngicos del grupo de los polienos carboxilados para generar nuevos macrolidos polienos amidados. Las secuencias nucleotídicas de estos genes codifican para una actividad amidotransferasa, dependiente de ATP capaz de amidar polienos carboxilados convencionales para obtener los correspondientes derivados amidados con ciertas propiedades biológicas optimizadas respecto a los parentales. La utilización de los genes permite obtener recombinantes genéticos que incrementan la capacidad para la producción de los polienos amidados y facilitar el proceso de producción y purificación de los polienos amidados de interés; los recombinantes genéticos que se obtengan pueden ser usados industrialmente para la producción, con alta eficiencia, de macrolidos polienos amidados.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado, de ahora en adelante polinucleótido de la invención, capaz de traducirse a la secuencia aminoacídica que se selecciona de la lista que comprende:

a) la SEQ ID NO: 1,

b) la SEQ ID NO: 2,

o a una variante o a un fragmento biológicamente activo de dichas secuencias.

Las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 presentan una identidad de aproximadamente un 87%, estando estructuralmente relacionadas, y tienen una actividad biológica común, la conversión del grupo carboxilo de ciertos polienos en sus amidas derivadas (actuando como polienos carboxamida sintasas).

ES 2 371 615 A1

La secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 3 engloba la secuencia parcial del gen *pgm* (nucleótidos 1 a 524), la secuencia del gen *pcsA* (nucleótidos 759 a 2606), del gen *phoU* (nucleótidos 3561 a 4238), del gen *phoR* (nucleótidos 4472 a 5746), y la secuencia parcial del gen *phoP* (nucleótidos 5800 a 6079), de *Streptomyces diastaticus* var. 108.

5 La secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 4 engloba la secuencia parcial del ORF1 (nucleótidos 1 a 323), la secuencia del gen *pgm* (nucleótidos 572 a 1333), la secuencia del gen *pcsB* (nucleótidos 1587 a 3434), del ORF2 (nucleótidos 3599 a 3922), del ORF3 (nucleótidos 3919 a 4620), del gen *phoU* (nucleótidos 5278 a 5958), y la secuencia parcial del gen *phoR* (nucleótidos 6155 a 7391), de *Streptomyces* sp. cepa RGU5.3.

10 El término “aislado”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a nucleótidos o péptidos que: 1) se encuentran sustancialmente libres de componentes que normalmente acompañan o interaccionan con él en la naturaleza, o 2) si se encuentran en su medio natural, han sido sintéticamente (no naturalmente) alterados por la intervención humana y/o introducidos en una célula que no los posee de forma nativa. Por ejemplo, un nucleótido natural se convierte en “aislado” si se ha alterado, o si proviene de un ADN que ha sido alterado por medio de la intervención humana (por medio de, por ejemplo pero sin limitarnos, mutagénesis dirigida, inserciones, deleciones, etc). De la misma manera, un nucleótido natural se convierte en “aislado” si se introduce por medios no naturales en un genoma no nativo a dicho nucleótido (transfección). Por tanto, el término “aislado” en este último caso, es equivalente al término “heterólogo”.

20 El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas o aminoacídicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12: 287 (1984) Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI); BLAST, BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1999)).

30 En el sentido utilizado en esta descripción, el término “variante” se refiere a una secuencia aminoacídica sustancialmente homologa a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. En general, una variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. El término “variante” incluye también a las proteínas resultantes de modificaciones postranslacionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación.

40 El término “homología”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, o a una función común, y más concretamente, a la semejanza entre dos o más secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Puesto que dos secuencias se consideran homologas si tienen el mismo origen evolutivo o si tienen función y estructura similares, en general, se asume que valores superiores de similitud o identidad del 30% indicarían homología. Tal como aquí se utiliza, una proteína es “sustancialmente homologa” a cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con dichas secuencias, respectivamente; es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2, respectivamente de, al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferentemente de, al menos un 90%, más preferentemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferentemente de, al menos, un 99%. Las secuencias homologas a cualquiera de secuencias SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 pueden ser identificadas fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

45 Un experto en la materia conoce que:

- 50 a) debido a la degeneración del código genético, varias secuencias nucleotídicas podrían dar lugar a una misma secuencia aminoacídica con la actividad biológica de interés,
- b) variantes que comprenden sustituciones, adiciones o deleciones individuales de un ácido nucléico, péptido, polipéptido o proteína puede alterar, adicionar o deleccionar un solo aminoácido o un grupo de aminoácidos, conservando la actividad biológica de dicho péptido, o una actividad similar (al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% del péptido original), especialmente cuando se sustituye uno o varios aminoácidos por otros químicamente similares. Estas variantes serían funcionalmente equivalentes a las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

60 La expresión “funcionalmente equivalente”, tal como aquí se utiliza, significa que los péptidos o el/los fragmento/s de lo/s péptido/s en cuestión mantiene/n esencialmente las propiedades biológicas descritas en este documento. Dicha capacidad se puede determinar mediante métodos convencionales tales como los descritos en los ejemplos que acompañan a esta descripción.

65 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una construcción genética de ADN o ARN, de ahora en adelante construcción genética de la invención, que comprende uno de los siguientes tipos de secuencias:

- a. secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, un polinucleótido según descrito anteriormente, para su transcripción *in vitro* o *in vivo*, o

ES 2 371 615 A1

- b. secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende el polinucleótido de la invención, operativamente enlazado con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, y opcionalmente con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar.

5

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN ó DNA).

10

Un “vector” es un replicón, o un vector integrativo, al que se ha unido otro segmento polinucleótido, para realizar la replicación y/o expresión del segmento unido.

15

Un “replicón” es cualquier elemento genético que se comporta como una unidad autónoma de replicación polinucleotídica dentro de una célula; esto es, capaz de replicarse bajo su propio control.

Un vector integrativo es cualquier elemento genético que se integra y se mantiene estable en el genoma de una célula.

20

Como se usa aquí, el término “promotor” hace referencia a una región del ADN aguas arriba del punto de inicio de la transcripción, y en el particular, que es capaz de iniciar la transcripción en una célula, sea el origen del promotor un microorganismo o no. Ejemplos de promotores incluyen, pero no se limitan a promotores de *Streptomyces* conocidos en el estado de la técnica, como *ermE***p* o *tipA*. Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, el promotor es *ermE***p* (Kieser *et al.*, 2000, Practical *Streptomyces* Genetics, The John Innes Foundation, Norwich UK). En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el promotor es *tipA* (Kieser *et al.*, 2000, Practical *Streptomyces* Genetics, The John Innes Foundation, Norwich UK). En otra realización aún más preferida, la construcción genética es el plásmido pHJL401 (Larson & Hershberger 1986, *Plasmid* 15:199-209). En otra realización aún más preferida, la construcción genética es el plásmido pIJ941 (Lydiate *et al.*, 1985, *Gene* 35:223-235).

25

30

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una célula hospedadora, de ahora en adelante célula hospedadora de la invención, que comprende el polinucleótido de la invención, o la construcción genética de la invención, según se han descrito anteriormente.

35

Un “hospedador”, “célula hospedadora” ó “célula hospedante” como se emplea en esta memoria se refiere a un organismo, célula o tejido, particularmente a una célula bacteriana, que sirve como diana o recipiente de los elementos transfectados (por ejemplo, los polinucleótidos o las construcciones genéticas de la invención). Una célula hospedadora u hospedador puede indicar, también, una célula u hospedador que expresa una proteína recombinante de interés (por ejemplo, el producto de la expresión del polinucleótido de la invención) donde la célula hospedadora se transforma con un vector de expresión conteniendo el polinucleótido de la invención, o también, los promotores de la invención que dirigen la expresión de un gen de interés.

40

En una realización preferida, la célula hospedadora es una bacteria, más preferiblemente una bacteria perteneciente al género *Streptomyces* y aún más preferiblemente a la especie *Streptomyces diastaticus* var. 108.

45

Los organismos del género *Streptomyces* pertenecen al superreino Bacteria, phylum *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales* y familia *Streptomycetaceae*.

50

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de obtención de macrolidos polienos que comprende cultivar la célula hospedadora de la invención en un medio adecuado. Medios de cultivo adecuados son conocidos en el estado de la técnica, y dependerán de la célula hospedadora.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de la célula hospedadora según descrita anteriormente para la obtención de macrolidos polienos.

55

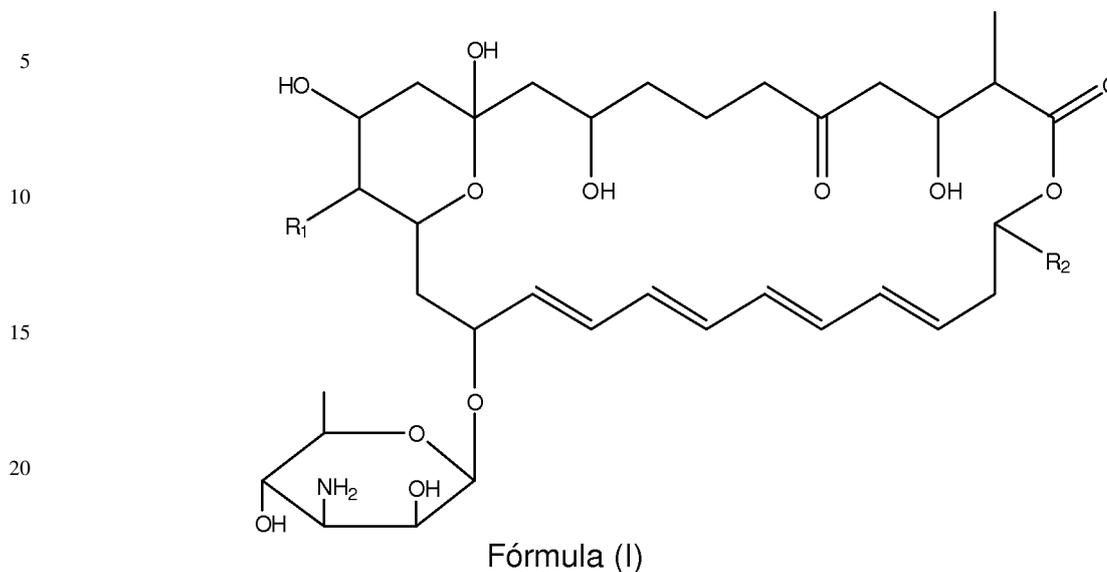
En la presente invención se entiende como “macrólido polieno” un compuesto formado por un anillo lactónico macrocíclico con un número de carbonos de entre 10 a 30, más preferiblemente entre 20 y 30, y que contiene varios enlaces dobles, al que se unen una o varios desoxiazúcares tales como, pero sin limitarse a, micosamina.

60

65

ES 2 371 615 A1

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I)



25 donde

R_1 se selecciona entre $-COOH$ ó $-CONH_2$.

R_2 se selecciona entre alquilo C_1-C_4 .

35 El término “alquilo” se refiere, en la presente invención, a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 4 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azida, ácido carboxílico o un grupo sustituido o no sustituido seleccionado de entre amino, amido, éster carboxílico, éter, tiol, acilamino o carboxamido. Cuando el grupo alquilo está sustituido, lo está preferentemente por un o varios grupos amina, amida o éter, que a su vez pueden estar o no sustituidos por grupos alquilo, amida, cicloalquilo o éteres y estos a su vez, pueden estar igualmente sustituidos o no.

45 En una realización preferida, en el compuesto de fórmula (I) R_1 es $-CONH_2$. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el compuesto de fórmula (I) se encuentra en forma de sal, profármaco, derivado o análogo, o cualquiera de sus combinaciones.

50 Tal como aquí se utiliza, el término “derivado” incluye tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como derivados farmacéuticamente no aceptables, ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables.

55 Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos de los compuestos de fórmula (I). El término “profármaco” tal como aquí se utiliza incluye a cualquier compuesto derivado de un compuesto de fórmula (I), por ejemplo, ésteres, incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc., carbamatos, amidas, etc., que, cuando se administra a un individuo es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, dicho compuesto de fórmula (I) en dicho individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

60 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento, o alternativamente al compuesto de fórmula (I) para su uso como medicamento.

65 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección, o alternativamente al compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de una infección. Preferiblemente, dicha infección es producida por hongos.

El compuesto de fórmula (I) de la invención, puede formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, puede estar, sin limitarse, en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, el compuesto de fórmula (I) de la invención puede prepararse para su administración en forma sólida. El compuesto de fórmula (I) de la invención puede combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo.

El compuesto de fórmula (I) de la invención, preparaciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores (como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia, estado del sistema inmune, tipo de agente infeccioso y gravedad de la infección) del animal, preferiblemente mamífero, y más preferiblemente humano. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de compuesto de fórmula (I) de la invención, profármacos, derivados o análogos de dicho compuesto que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos profármacos, derivados o análogos y el efecto terapéutico a conseguir. Los “adyuvantes” y “vehículos farmacéuticamente aceptables” que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) como antibiótico, preferiblemente como antifúngico.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) junto a un vehículo farmacéutico. En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) y, adicionalmente, otro principio activo.

Como se emplea aquí, el término “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” ó “ingrediente farmacéuticamente activo” significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos como desoxiribonucleótidos.

Los términos “péptido”, “oligopéptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig. 1. Muestra los dominios conservados en las diferentes Asparaginas sintasas, utilizados para el diseño de los oligonucleótidos degenerados que se citan en la parte experimental de la presente invención.

Fig. 2. Muestra el análisis comparativo, por cromatografía de HPLC, de producción de polienos de *S. diastaticus* var. 108 y su recombinante con copias adicionales del gen *pcsA*. Los cromatogramas visualiza la señal integrada a 304 nm. Los números sobre los picos cromatográficos corresponden a: 1, CE-108B; 2, CE-108; 3, rimocidina B; 4, rimocidina; 5. CE-108E y 6, CE-108D.

Fig. 3. Perfil cromatográfico en HPLC de los caldos de fermentación de *Streptomyces* sp. RGU5.3 silvestre, (A) y recombinante con copias adicionales del gen *pcsB*. Los números corresponden a: 1, pimaricina; 2, AB-400; 3, deepoxipimaricina y 4, 4,5 deepoxiAB-400. Los cromatogramas visualiza la señal integrada a 304 nm.

ES 2 371 615 A1

Fig. 4. Alineamiento de las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 de interés.

Ejemplos

5 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad del método de obtención de macrolidos polienos descrito en la presente invención.

10 Dado que la actividad de amidotransferasa es una herramienta susceptible de introducir mejoras farmacológicas en compuestos polienos, se ha abordado el aislamiento de los genes responsable de la actividad amidotransferasa de *S. diastaticus* var. 108 y de *Streptomyces* sp. RGU5.3. La diferencia en el reconocimiento de sustratos entre la amidotransferasa de *S. diastaticus* y la de *Streptomyces* sp. RGU5.3, valoradas a partir de los correspondientes extractos acelulares, abre la posibilidad para que una vez manipulado “*in vitro*” el gen correspondiente, sea posible incrementar el rango de reconocimiento de sustratos y facilitar la conversión de un mayor número de polienos carboxilados a sus correspondientes carboxamidas.

15 La estrategia utilizada para el aislamiento de ambos genes amidotransferasa (el de *S. diastaticus* var. 108 y el de *Streptomyces* sp. RGU5.3), se ha basado en “genética reversa”. Inicialmente se alinearon varios genes codificantes de amidotransferasas, pertenecientes a la familia de “asparagina sintetasa” Tipo II a la que con toda probabilidad, en base a los datos previos obtenidos a partir de las valoraciones de los extractos acelulares, pertenecerían ambos genes. 20 A partir de los alineamientos obtenidos se estableció una secuencia consenso. Se localizaron diferentes regiones con un alto grado de conservación: una de ella localizada en el dominio “glutaminasa” y dos en el dominio “sintetasa” (Figura 1). De esa forma se diseñaron dos parejas de oligonucleóticos “degenerados”, adaptados al uso de codones de *Streptomyces* y que permitieran amplificación por la técnica de PCR. Las parejas de oligonucleótidos diseñados fueron:

25 **AsnB-deg1/AsnB-deg3rev:** SEQ ID NO: 5/ SEQ ID NO: 6

AsnB-deg2/AsnB-deg4rev: SEQ ID NO: 7/ SEQ ID NO: 8.

30 El DNA total de *Streptomyces diastaticus* var. 108 y *Streptomyces* sp. RGU5.3 se utilizó como molde para la amplificación mediante la técnica de PCR, utilizando los “primers” diseñados según se describe anteriormente y en las siguientes combinaciones: AsnB-deg1/AsnB-deg3rev; AsnB-deg1/AsnB-deg4rev; AsnB-deg2/AsnB-deg3rev; AsnB-deg2/AsnB-deg4rev. Se obtuvieron amplificaciones del DNA con los pares de “primers”: AsnB-deg1/AsnB-deg3rev 35 y AsnB-deg2/AsnB-deg3rev. A partir de la pareja de “primers” AsnB-deg1/AsnB-deg3rev se obtuvo un fragmento de amplificación del DNA de *S. diastaticus* var. 108 de 1.143 pares de bases y a partir de la pareja de “primers” AsnB-deg2/AsnB-deg3rev se obtuvo un fragmento de amplificación, a partir del DNA de *Streptomyces* sp. RGU5.3, de 668 pares de bases.

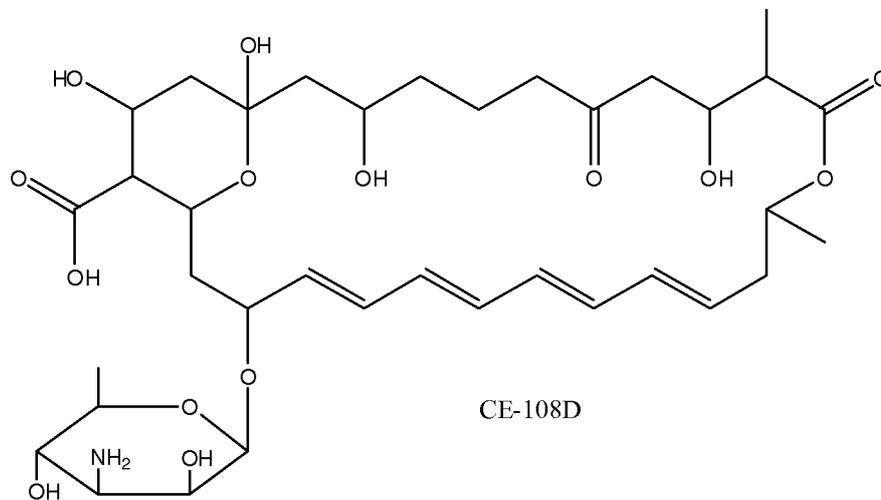
40 Ambos fragmentos se clonaron separadamente en el sitio *Sma*I del plásmido de *Escherichia coli* pUC19. Para cada uno de ellos se obtuvieron diversos plásmidos recombinantes conteniendo distintos fragmentos que se agruparon primariamente en base al patrón de enzimas de restricción. El DNA de los distintos fragmentos se secuenció para determinar el gen codificante y posteriormente los fragmentos de DNA se clonaron independientemente en el vector actinofago PM1 para proceder a la disrupción de cada uno de ellos y así determinar cual de ellos codifica para la 45 amidotransferasa responsable de la amidación de los polienos de *S. diastaticus* var. 108 modificado genéticamente (rimocidina y CE-108 para sintetizar rimocidina B y CE-108B) y de pimaricina en *Streptomyces* sp. RGU5.3 (para generar AB-400). En ambos casos se identificó el fragmento del gen codificante de la actividad amidotransferasa, a los que se han llamado *pcsA* (para el gen procedente de *S. diastaticus* var. 108) y *pcsB* (para el gen procedente de 50 *Streptomyces* sp. RGU5.3). Ambos genes completos se aislaron a partir de las librerías genómicas de *S. diastaticus* var. 108 ó *Streptomyces* sp. RGU5.3, utilizando como sonda, en cada caso, el respectivo fragmento obtenido por amplificación de PCR y, posteriormente, utilizado para la disrupción génica. La región cromosómica solapante a cada uno de los genes se ha identificado por secuenciación de un fragmento solapante, en cada caso, a cada uno de los genes (tanto de *S. diastaticus* var. 108 como de *Streptomyces* sp. RGU5.3). La región cromosómica procedente tanto de *Streptomyces* sp. RGU5.3 como de *S. diastaticus* var. 108 se analizó informáticamente para obtener las posibles 55 fases de lecturas de los genes codificantes. Para ello se utilizó el paquete informático “EMBOSS Suite” utilizado en entorno WEB, (M. Sarachu & M. Colet 2005, *Bioinformatics* 21:540-541; P. Rice *et al.*, 2000, *Trends in Genetics* 6:276-277), utilizando como Tabla para uso de codones la de *Streptomyces coelicolor*.

60 Para analizar “*in vitro*” la expresión de los dos genes codificantes para la amidotransferasa, tanto de *S. diastaticus* var. 108 como de *Streptomyces* sp. RGU5.3, se realizaron sendas ingenierías en los genes codificantes. La región promotora de ambos genes se sustituyó por promotores de *Streptomyces* conocidos, tales como *ermE***p* o *tipA*, de forma que la expresión de cada uno de los genes estuviera fuera del control de los promotores nativos. Los genes recombinantes, tanto *pcsA* ó *pcsB*, se clonaron en vectores adecuados de *Streptomyces*, bien en bajo o número alto de copias. Los plásmidos recombinantes se introdujeron por transformación en las estirpes correspondientes, productoras de los 65 macrolidos polienos (bien *S. diastaticus* var. 108 ó *Streptomyces* sp. RGU5.3). Las cepas transformantes, conteniendo los plásmidos con el gen de la amidotransferasa, se analizaron mediante HPLC para valorar los niveles de producción de los polienos amidados. En la Figura 3 se compara la producción de los polienos amidados producidos por *S. diastaticus* var. 108 en la cepa con el gen *pcsA* recombinante en un plásmido replicativo como pHJL401, respecto a la

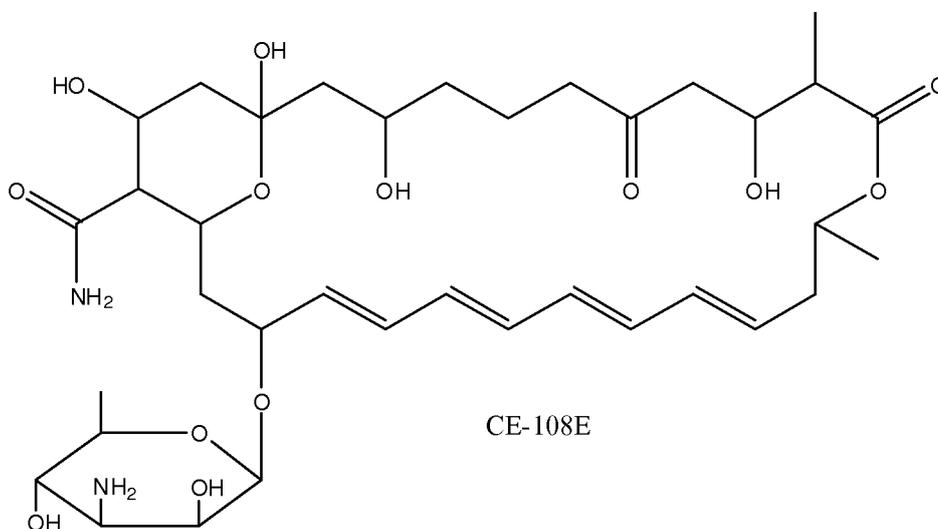
ES 2 371 615 A1

cepa silvestre, se observa una producción sustancialmente mayor en la cepa recombinante respecto a la silvestre. Los valores de producción de los polienos amidados son, incluso, superiores a la cepa de *S. diastaticus* var. 108 a la que se ha introducido por transformación los plásmidos descritos previamente como inductores de la sobreproducción de polienos amidados tal como pSM784.

El análisis de los caldos de fermentación de las cepas recombinantes de *S. diastaticus* var. 108, con copias adicionales del gen *pcsA* en plásmidos replicativos (tales como pHJL401 ó pIJ941) permiten incrementar los niveles de amidación en aquellas moléculas susceptibles de ser amidadas, por lo que se sintetizan nuevos compuestos, no identificados previamente, tal como CE-108E (pico número 5 en el cromatograma B de la Figura 3) en cantidades suficientes para poder ser purificados y analizados. Los análisis previos utilizando espectros de masas, realizados con el compuesto CE-108E, purificado por HPLC, permitió establecer que es un macrólido polieno amidado derivado del compuesto señalado como pico 6 en el cromatograma. La utilización de técnicas habituales de RMN se pudo confirmar la estructura química de ambos polienos que se representan a continuación:



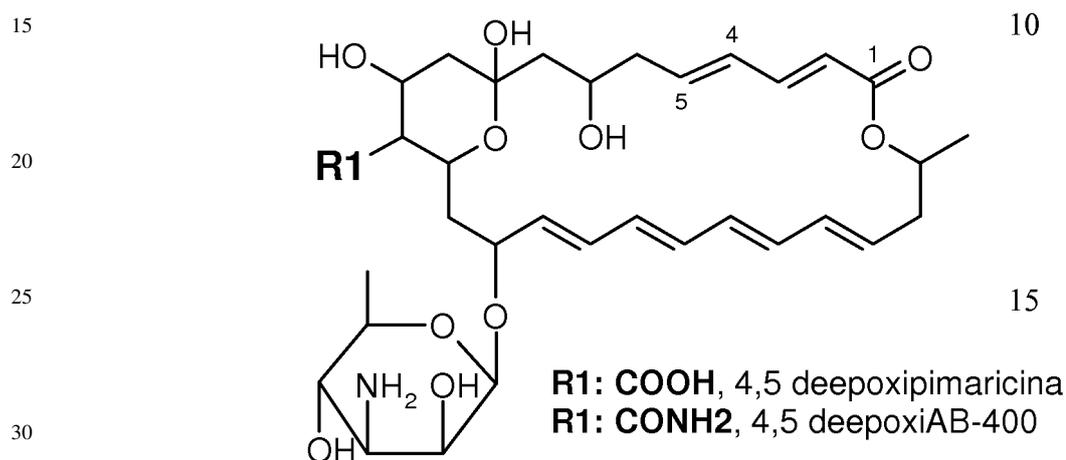
Desde el punto de vista estructural ambos macrolidos polienos (CE-108D y CE-108E) parecen proceder de la incorporación de “metilmalonil-CoA” en el último ciclo de condensación de la poliquétido sintetasa del cluster biosintético de rimocidina y CE-108, en lugar de butiril-CoA. La actividad biológica como fungicida de CE-108E es sustancialmente mayor que la de CE-108D y, aunque la actividad fungicida de CE-108E es menor que la de otros macrolidos similares para la mayoría de los hongos ensayados, la actividad hemolítica de CE-108E es significativamente menor, pudiendo tener una cierta ventaja terapéutica en relación a estos otros macrolidos en función de las distintas aplicaciones.



ES 2 371 615 A1

Similarmente el recombinante genético de *Streptomyces* sp. RGU5.3 obtenido al introducir copias adicionales del gen *pcsB* de *Streptomyces* RGU5.3, responsable de la amidación de pimaricina para generar su derivado amidado AB-400 genera una cepa en la que AB-400 es sintetizado como macrólido polieno mayoritario, a diferencia de la cepa *Streptomyces* sp. RGU5.3 silvestre en la que la proporción de AB-400 producido es similar a pimaricina, sugiriendo una mayor bioconversión de la pimaricina a su derivado amidado en el microorganismo recombinante.

A diferencia de 4,5 deepoxipimaricina, el nuevo compuesto detectado en los caldos de fermentación del recombinante de *Streptomyces* sp. RGU5.3 portando copias adicionales del gen *pcsB* (4,5-deepoxiAB-400) retiene una actividad biológica como antifúngico próxima a la de pimaricina, en lugar de siete veces menor a la de pimaricina como ha sido descrito previamente para el polieno carboxilado 4.5-deepoxipimaricina (Mendes *et al.*, 2001. *Chem&Biol*, 8:635-644). La fórmula química de ambos compuestos es como se muestra a continuación:



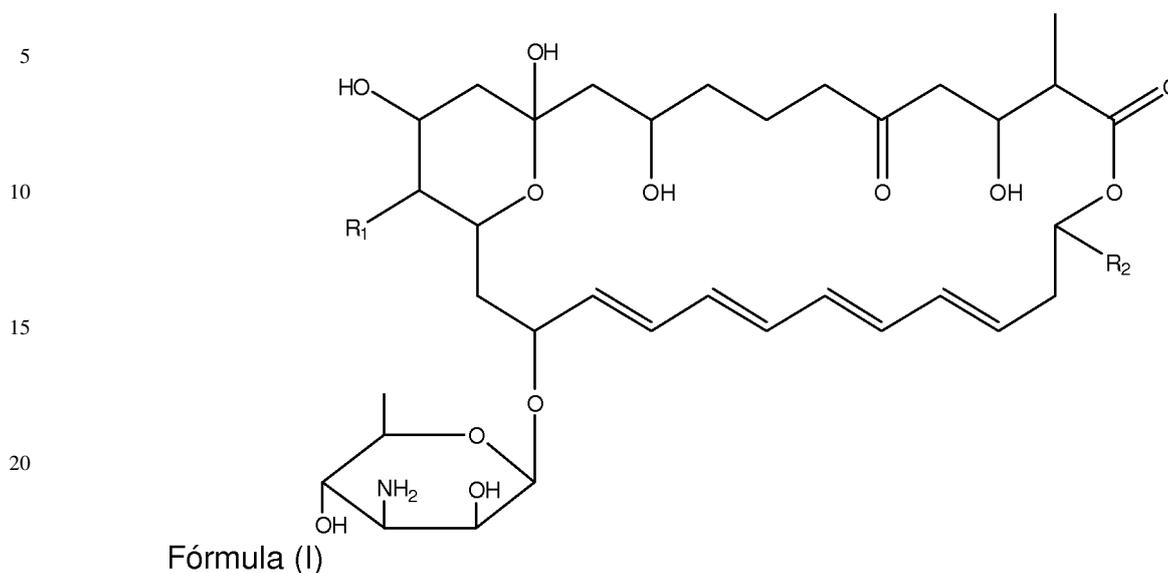
Tanto PcsA como PcsB, en presencia de ATP, Mg y glutamina son capaces de amidar “*in vitro*” los polienos correspondientes, resultando en compuestos con mayor actividad biológica que la de los compuestos parentales. Pese a la diferente especificidad de sustratos valorados “*in vitro*” que muestran ambas proteínas (PcsA y PcsB), los alineamientos realizados entre ambas proteínas, utilizando el programa “Supermatcher” del paquete “EMBOSS Suite” referenciado más arriba, muestran una identidad a lo largo de toda la proteína del 87% con una similitud del 93.5%.

ES 2 371 615 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polinucleótido aislado capaz de traducirse a la secuencia aminoacídica que se selecciona de la lista que comprende:
- a. la SEQ ID NO: 1,
 - b. la SEQ ID NO: 2,
- 10 o a una variante o a un fragmento biológicamente activo de dichas secuencias.
2. Construcción genética de ADN o ARN que comprende uno de los siguientes tipos de secuencias:
- 15 c. secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, un polinucleótido según la reivindicación 1, para su transcripción *in vitro* o *in vivo*, o
 - 20 d. secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende un polinucleótido según la reivindicación 1, operativamente enlazado con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos.
3. Construcción genética según la reivindicación 2, donde el promotor es *ermE***p*.
- 25 4. Construcción genética según la reivindicación 2, donde el promotor es *tipA*.
5. Construcción genética según la reivindicación 2, que es el plásmido replicativo pHJL401.
- 30 6. Construcción genética según la reivindicación 2, que es el plásmido replicativo pIJ941.
7. Célula hospedadora que comprende un polinucleótido según la reivindicación 1, o una construcción genética según cualquiera de las reivindicaciones 2-6.
- 35 8. Célula según la reivindicación 7 que es una bacteria.
9. Célula según la reivindicación 8 que pertenece al género *Streptomyces*.
10. Célula hospedadora según la reivindicación 8 que pertenece a la especie *Streptomyces diastaticus*.
- 40 11. Método de obtención de macrolidos polienos que comprende cultivar la célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10.
- 45 12. Uso de la célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 para la obtención de macrolidos polienos.
- 50
- 55
- 60
- 65

13. Compuesto de fórmula (I)



25 donde

30 R_1 se selecciona entre $-COOH$ ó $-CONH_2$.

R_2 se selecciona entre alquilo C_1-C_4 .

14. Compuesto según la reivindicación 13 donde R_1 es $-CONH_2$.

15. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 13-14 en forma de sal, profármaco, derivado o análogo, o cualquiera de sus combinaciones.

16. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 13-15 para la fabricación de un medicamento.

17. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 13-15 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección.

18. Uso según la reivindicación 17 donde la infección está producida por hongos.

19. Uso del compuesto de fórmula (I) según las reivindicaciones 13-15 como antibiótico.

20. Uso del compuesto de fórmula (I) según las reivindicaciones 13-15 como antifúngico.

21. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 13-15 junto a un vehículo farmacéuticamente aceptable.

22. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 13-15 y, adicionalmente, otro principio activo.

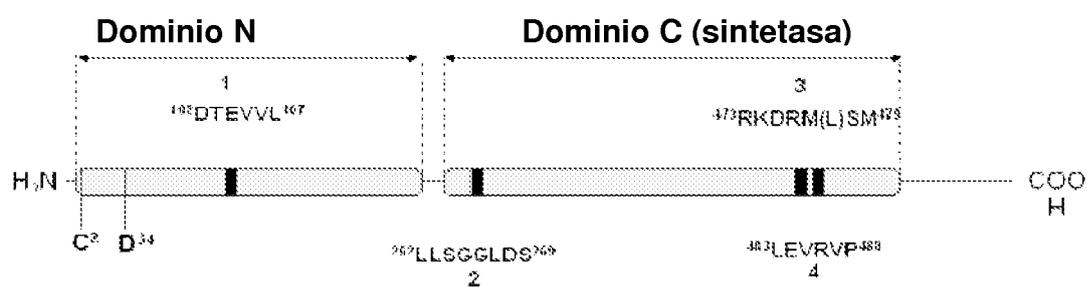


FIG. 1

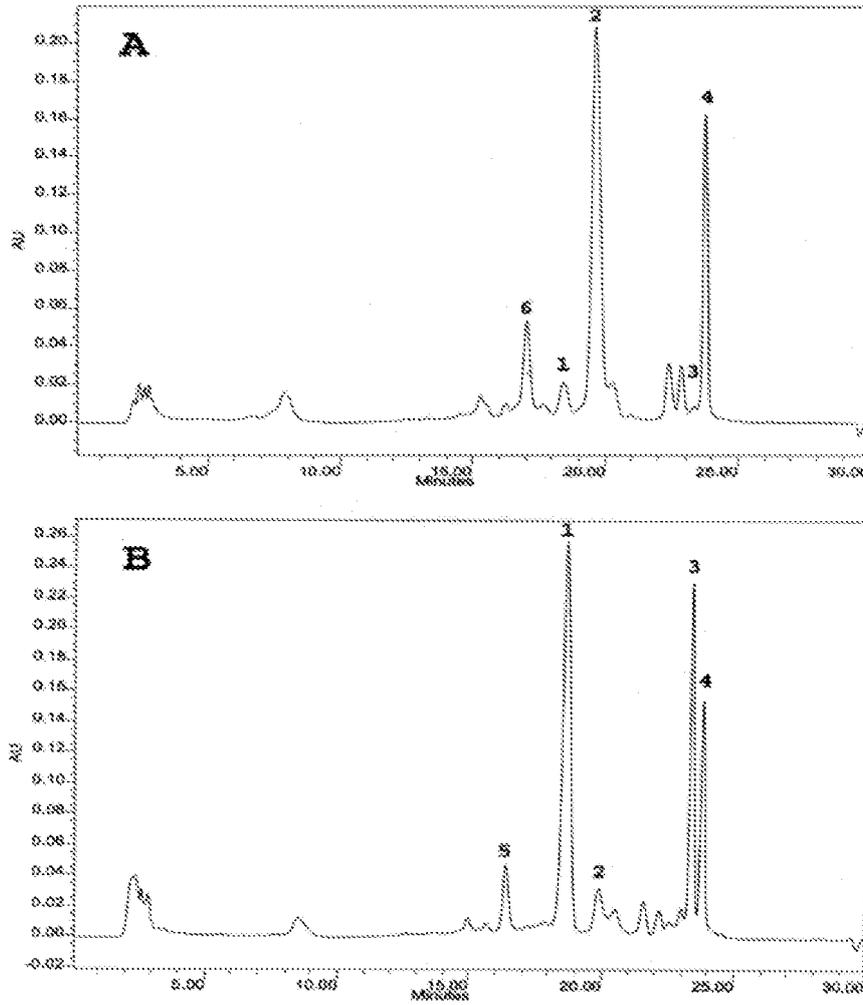


FIG. 2

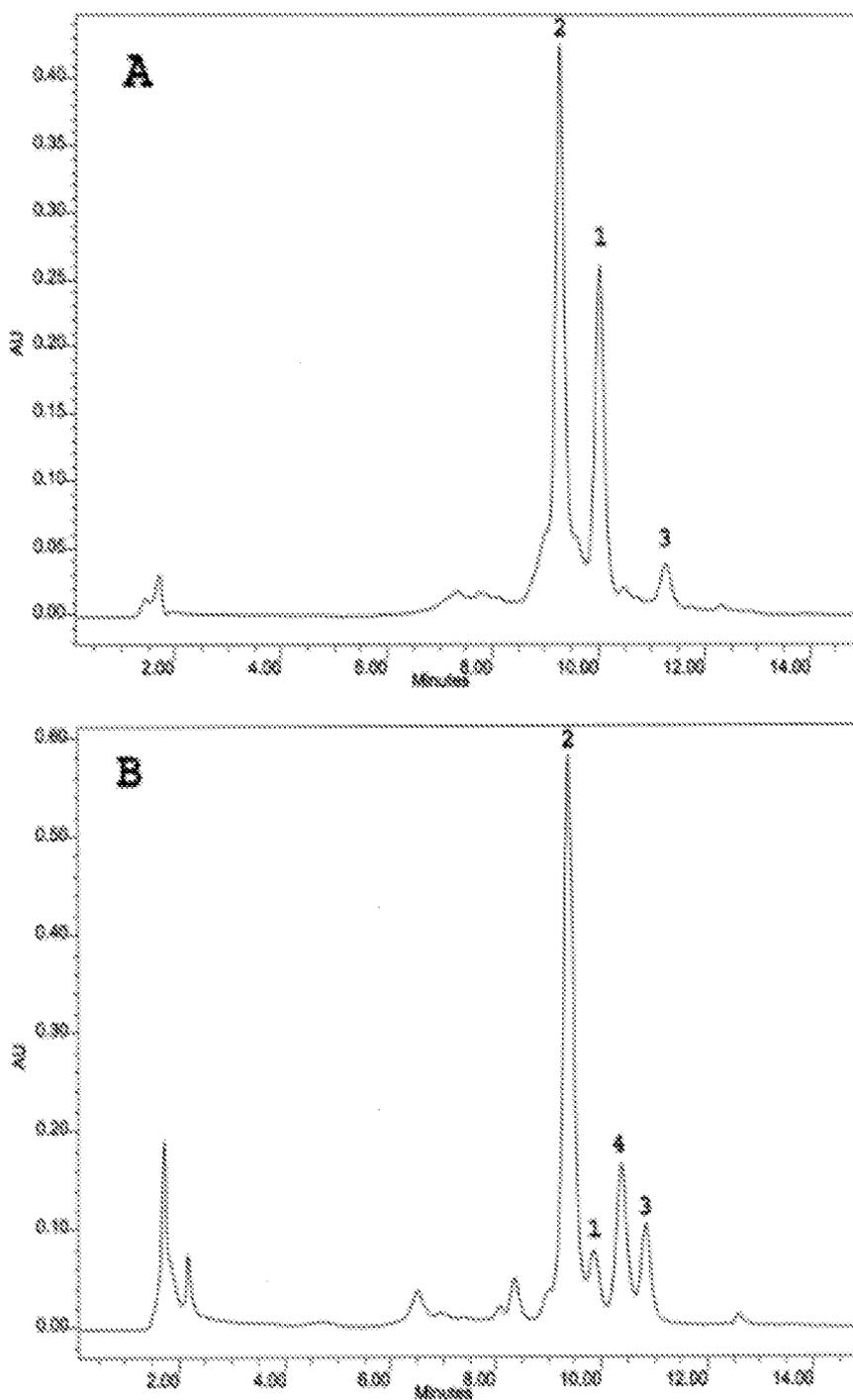


FIG. 3

ES 2 371 615 A1

PcsA	1 MCGIISGWLAFDRDLTKKCAIVDAMTGTMAVYRGPFDAGSTWVDRHVALGHRK	50
PcsB	1 MCGIISGWLAFDHDHLETKKQATVDMPTDTMAYRGPDPGRGTWVDRHVALGHRK	50
	51 LAVIDIEGGTQPMRVDTFNGEVAITYSGEVYMFTELREELRRHGHRFTA	100
	LAVIDIEGGTQPMRVDTFNGPVIITYSGEAYNFTELREELRRHGHRFTA	100
	101 SDTEVVLRGYLGGEALADELNGMYAFAIKDRNEKLVNIRDKMGKIKPFY	150
	101 SDTEVVLHAYLEWGEAMADRLNGMYAFAIWDARSEKLVNIRDKMGKIKPFY	150
	151 FHPTADGVLFGESEPKAILAHPMFRVIEADGLFELLSVCKTPEGHAIWSDM	200
	151 FHPTADGVLFGESEPKAILAHPMFKRAVIDAEGFLFELLSVCKTPEGHAIWSDM	200
	201 REVRPGLVVDVDRAGLRERTYKLTTCQENTDDBRDTTGTKIRELLEDIVRR	250
	201 REVRPGLVVDVDRSGVPERERTYKLESREHEDDLEDTTIATIRDLLEGDEVR	250
	251 QLVAADVPCQVLLSGGLDSSSITALEARELAAHGKVRSGFVDFVGLADNF	300
	251 QLVAADVPCQVLLSGGLDSSSLTALAARELAHQKVRSGFVDFVGLADNF	300
	301 RPDNMRATPDSFPVHDVADHVGSLHEDIVLPHTALDTPDARRAVLAAKDF	350
	301 RPDNMRATPDSFPVHDVADHVGSLHEDIVLPHTALDLDARRAVMAAKDF	350
	351 PGGIADVDVSLYKLPFAIREHSTVALSGETADELFGGYFWFQDFVAQRAG	400
	351 PGGIADVDVSLYKLPFAIREHSTVALSGETADELFGGYFWFRDFVAQRAG	400
	401 IFPNVPEVYLSSEWSKANALGLLNPDLIAMSGLQTVYKDRYSEAVAEVEPLF	450
	401 IFPNVPEVYLSSEWSKANALGLLNPDLIAMSGLQTVYKDRYSEAVAEVEPLF	450
	451 GEDVQERRMRVMSHLHLTRFLQVLLDRKDRISMVGLVVRVFPYCDHRLVE	500
	451 GEDVQERRMRVMSHLHLTRFLQVLLDRKDRISMVGLVVRVFPYCDHRLVE	500
	501 YVYNTFWAMKSFDRGKSLLRAAAQDLEPRGVVERLKSFPYFSTQDPPYAG	550
	501 YVYNTFWAMKSFDRGKSLLRAAAQDLEPRGVVERLKSFPYFSTQDPPYAG	550
	551 GLQGMGKQLLSEPDHPIFQLVTRASLDPMVKLDPKAMPDAIREQLDRMMD	600
	551 GLQGMGKQLLSEPDHPIFQVVERTTIDEMVKLDPKAMPDAIREQLDRMMD	600
	601 IATWLEMYQPEIRMS 615	
	601 IATWMDMHQPDIRVA 615	

FIG. 4

ES 2 371 615 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de investigaciones Científicas (CSIC)

5 <120> Macrolidos polienos con actividad antimicrobiana y su procedimiento biotecnológico de obtención

<130> ES1641.434

10 <160> 8

<170> PatentIn version 3.4

15 <210> 1

<211> 615

<212> PRT

<213> *Streptomyces diastaticus* var. 108

20 <400> 1

25 Met Cys Gly Ile Ser Gly Trp Leu Ala Phe Asp Arg Asp Leu Thr Lys
1 5 10 15

Glu Gln Ala Thr Val Asp Ala Met Thr Gly Thr Met Ala Tyr Arg Gly
20 25 30

30 Pro Asp Ala Gly Gly Thr Trp Val Asp Arg His Val Ala Leu Gly His
35 40 45

35 Arg Arg Leu Ala Val Ile Asp Ile Glu Gly Gly Thr Gln Pro Met Arg
50 55 60

40 Val Asp Thr Pro Asn Gly Pro Val Ala Ile Thr Tyr Ser Gly Glu Val
65 70 75 80

45 Tyr Asn Phe Thr Glu Leu Arg Glu Glu Leu Arg Arg His Gly His Arg
85 90 95

50 Phe Arg Thr Ala Ser Asp Thr Glu Val Val Leu Arg Gly Tyr Leu Gln
100 105 110

55 Trp Gly Glu Ala Leu Ala Asp Arg Leu Asn Gly Met Tyr Ala Phe Ala
115 120 125

60 Ile Trp Asp Ser Arg Asn Glu Lys Leu Val Met Ile Arg Asp Arg Met
130 135 140

65 Gly Ile Lys Pro Phe Tyr Phe His Pro Thr Ala Asp Gly Val Leu Phe
145 150 155 160

70 Gly Ser Glu Pro Lys Ala Ile Leu Ala His Pro Met Phe Lys Arg Val
165 170 175

75 Ile Glu Ala Asp Gly Leu Phe Glu Leu Leu Ser Val Cys Lys Thr Pro
180 185 190

ES 2 371 615 A1

Gly His Ala Ile Trp Ser Asp Met Arg Glu Val Arg Pro Gly Ser Leu
 195 200 205

5
 Val Val Val Asp Arg Ala Gly Leu Arg Glu Arg Thr Tyr Trp Lys Leu
 210 215 220

10
 Thr Thr Gln Glu His Thr Asp Asp Arg Asp Thr Thr Val Thr Lys Ile
 225 230 235 240

15
 Arg Glu Leu Leu Glu Asp Ile Val Arg Arg Gln Leu Val Ala Asp Val
 245 250 255

20
 Pro Gln Cys Val Leu Leu Ser Gly Gly Leu Asp Ser Ser Ser Ile Thr
 260 265 270

25
 Ala Leu Ser Ala Arg Glu Leu Ala Ala His Gly Glu Lys Val Arg Ser
 275 280 285

30
 Phe Ser Val Asp Phe Val Gly Leu Ala Asp Asn Phe Arg Pro Asp Asn
 290 295 300

35
 Met Arg Ala Thr Pro Asp Ser Pro Phe Val His Asp Val Ala Asp His
 305 310 315 320

40
 Val Gly Ser Leu His Glu Asp Ile Val Leu Pro His Thr Ala Leu Thr
 325 330 335

45
 Asp Pro Asp Ala Arg Arg Ala Val Leu Ala Ala Lys Asp Phe Pro Ser
 340 345 350

50
 Gly Leu Ala Asp Val Asp Val Ser Leu Tyr Met Leu Phe Lys Ala Ile
 355 360 365

55
 Arg Glu His Ser Thr Val Ala Leu Ser Gly Glu Thr Ala Asp Glu Leu
 370 375 380

60
 Phe Gly Gly Tyr Pro Trp Phe Gln Asp Pro Val Ala Gln Arg Ala Gly
 385 390 395 400

65
 Ile Phe Pro Trp Met Val Pro Val Leu Ser Glu Trp Ser Lys Ala Asn
 405 410 415

70
 Ala Leu Gly Leu Leu Asn Pro Asp Leu Ile Ala Met Ser Asp Leu Gly
 420 425 430

75
 Thr Tyr Val Lys Asp Arg Tyr Ser Glu Ala Val Ala Gly Val Glu Pro
 435 440 445

80

ES 2 371 615 A1

Leu Pro Gly Glu Asp Val Gln Glu Arg Arg Met Arg Val Met Ser His
 450 455 460

5 Leu His Leu Thr Arg Phe Leu Gln Val Leu Leu Asp Arg Lys Asp Arg
 465 470 475 480

10 Ile Ser Met Ala Val Gly Leu Glu Val Arg Val Pro Tyr Cys Asp His
 485 490 495

15 Arg Leu Val Glu Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Trp Ala Met Lys Ser Phe
 500 505 510 515

20 Asp Gly Arg Glu Lys Ser Leu Leu Arg Ala Ala Ala Gly Asp Leu Leu
 515 520 525

25 Pro Arg Ser Val Val Glu Arg Leu Lys Ser Pro Tyr Pro Ser Thr Gln
 530 535 540 545

30 Asp Pro Gly Tyr Ala Gly Gly Leu Gln Gln Met Gly Lys Gln Leu Leu
 545 550 555 560

35 Ser Glu Pro Asp His Pro Ile Phe Gln Leu Val Thr Arg Ala Ser Leu
 565 570 575

40 Asp Lys Met Val Lys Leu Asp Pro Ala Lys Met Pro Asp Ala Ile Arg
 580 585 590

45 Glu Gln Leu Asp Arg Met Met Asp Ile Ala Thr Trp Leu Glu Met Tyr
 595 600 605

50 Gln Pro Glu Ile Arg Met Ser
 610 615

<210> 2
 45 <211> 615
 <212> PRT
 <213> *Streptomyces* sp. RGU5.3

55 Met Cys Gly Ile Ser Gly Trp Leu Ala Phe Asp His Asp Leu Thr Lys
 1 5 10 15

60 Glu Gln Ala Thr Val Asp Ala Met Thr Asp Thr Met Ala Tyr Arg Gly
 20 25 30

65 Pro Asp Gly Arg Gly Thr Trp Val Asp Arg His Val Ala Leu Gly His
 35 40 45

70 Arg Arg Leu Ala Val Ile Asp Ile Glu Gly Gly Thr Gln Pro Met Arg
 50 55 60

ES 2 371 615 A1

	Val 65	Asp	Thr	Pro	Asn	Gly 70	Pro	Val	Val	Ile	Thr 75	Tyr	Ser	Gly	Glu	Ala 80
5	Tyr	Asn	Phe	Thr	Glu 85	Leu	Arg	Glu	Glu	Leu 90	Arg	Arg	Arg	Gly	His 95	Arg
10	Phe	Arg	Thr	Ser 100	Ser	Asp	Thr	Glu	Val 105	Val	Leu	His	Ala	Tyr 110	Leu	Glu
15	Trp	Gly	Glu 115	Ala	Met	Ala	Asp	Arg 120	Leu	Asn	Gly	Met	Tyr 125	Ala	Phe	Ala
20	Ile	Trp 130	Asp	Ala	Arg	Ser	Glu 135	Lys	Leu	Val	Met	Ile 140	Arg	Asp	Arg	Met
25	Gly 145	Ile	Lys	Pro	Phe	Tyr 150	Phe	His	Pro	Thr	Ala 155	Asp	Gly	Val	Leu	Phe 160
30	Gly	Ser	Glu	Pro	Lys 165	Ala	Ile	Leu	Ala	His 170	Pro	Met	Phe	Lys	Arg 175	Val
35	Ile	Asp	Ala	Glu 180	Gly	Leu	Phe	Glu	Leu 185	Leu	Ser	Val	Cys	Lys 190	Thr	Pro
40	Gly	Asn	Ala 195	Ile	Trp	Ser	Asp	Met 200	Arg	Glu	Val	Arg	Pro 205	Gly	Ser	Leu
45	Val	Val 210	Val	Asp	Arg	Ser	Gly 215	Val	Arg	Glu	Arg	Thr 220	Tyr	Trp	Lys	Leu
50	Glu 225	Ser	Arg	Glu	His	Thr 230	Asp	Asp	Leu	Asp	Thr 235	Thr	Ile	Ala	Thr	Ile 240
55	Arg	Asp	Leu	Leu	Gly 245	Asp	Thr	Val	Arg	Arg 250	Gln	Leu	Val	Ala	Asp 255	Val
60	Pro	Gln	Cys	Val 260	Leu	Leu	Ser	Gly	Gly 265	Leu	Asp	Ser	Ser	Ser 270	Leu	Thr
65	Ala	Leu	Ala 275	Ala	Arg	Glu	Leu	Ala 280	Ala	Gln	Gly	Glu	Lys 285	Val	Arg	Ser
70	Phe	Ser 290	Val	Asp	Phe	Glu	Gly 295	Leu	Ala	Asp	Asn	Phe 300	Arg	Pro	Asp	Asp
75	Met 305	Arg	Ala	Thr	Pro	Asp 310	Ser	Pro	Phe	Val	His 315	Asp	Val	Ala	Asp	His 320
80	Val	Gly	Ser	Leu	His	Glu	Asp	Ile	Val	Leu	Pro	His	Thr	Ala	Leu	Thr

ES 2 371 615 A1

	ccagctcgat	cacggcgctg	tccgcgcggg	agctggccgc	gcacggcgag	aaggtgcgca	1620
	gcttctccgt	cgacttcgtc	gggctggccg	acaacttccg	gcccgacaac	atgcggggcca	1680
5	ccccggactc	gccgttcgtg	cacgacgtgg	ccgatcacgt	cggctccctg	cacgaggaca	1740
	tcgtgctgcc	ccacaccgcg	ctcaccgacc	ccgacgcgcg	cagggcggtc	ctggcggcca	1800
	aggacttccc	cagcggcctc	gccgacgtgg	acgtatcgct	gtacatgctg	ttcaaggcga	1860
10	tccgcgagca	ctccacggtc	gcgctctccg	gtgagacggc	ggacgagctc	ttcggcggct	1920
	accctgtggt	ccaggacccg	gtggcgcagc	gcgccggcat	cttcccgtgg	atggtccccg	1980
15	tgctgtccga	gtggtccaag	gcgaacgcgc	tggggctgct	caacccggac	ctgatcgcca	2040
	tgagtgacct	ggggacgtac	gtcaaggacc	ggtacagcga	ggcggtcgcc	ggcgtcgagc	2100
	cgttgcccgg	ggaggacgta	caggaacggc	gcatgcgcgt	catgtcccat	ctgcacctca	2160
20	cccggttcct	ccagggtgctg	ctcgaccgca	aggaccggat	cagcatggcg	gtcggcctgg	2220
	aggtccgggt	gccgtactgc	gaccaccggc	tggtgagta	cgtctacaac	accccgtggg	2280
25	cgatgaagag	cttcgacggc	cgggagaaga	gcctgctccg	cgcggccgcc	ggcgatctgc	2340
	tcccgcgatc	ggtggtgga	cgctgaaga	gcccctacc	gtccaccag	gacccgggct	2400
	acgcgggcgg	actccagcag	atgggcaagc	aactgctctc	cgagccggac	catccgatct	2460
30	tccagctggt	gacccgcgca	tcgctcgaca	agatggtgaa	actggacccg	gcgaagatgc	2520
	cggacgccat	ccgcgagcag	ctcgaccgga	tgatggacat	cgcgacctgg	ctggagatgt	2580
35	atcaaccgga	gatccggatg	tcctgaccga	ttggtgtcag	ggtcgatggc	gggccctgaa	2640
	ccgggcctga	gcctcctgcc	tgcggcttct	ccgccggcag	ggggctttgc	cgtttacggg	2700
	gccgcccggg	cgtccggcgc	tgcgcgtctc	gtgctcctcc	tcggccggac	ctccccgc	2760
40	ggaggagcgt	ccggcggcag	ccgagcccgg	tccagggggt	tcggccggtc	cgtgtaccga	2820
	taccggaaga	ggacgtgatc	attgatcacc	gcgtactcgt	ccctcgcacg	tcccgcattg	2880
45	ccccgcccag	ctcccgtgca	gggtccgcca	ggttcgcgcg	tgccgcttcc	gcgagcgtgg	2940
	agccgtatga	gctccgcttc	ttcagccgcg	ccgcgaggtg	ggtgttgta	cgtgtgacag	3000
	gtgcgccaag	cgcttacaag	ggaactgggg	gcgcacacga	agctcgtctg	cgtcttcttc	3060
50	acagccgatg	tggagagcgg	catccacgtc	atccactggg	gggaagcca	cctcgaactc	3120
	gaccgcacct	tcacctggct	gcacagcgaa	gagcttcctg	tcaccggtcc	gcccgtcggg	3180
	tgaccgcggg	caagggcccc	ggtcggcggg	gtgccgagcg	gggcccgtcc	ctcccgccgc	3240
55	agtcgtcccc	caaacacccg	ccggaacggt	tgggcgggac	tgccggcggg	agccggccgc	3300
	ggcgacggcc	ctgaatcagc	cgcagctgcc	gccgcaactg	cacgggccgc	cggactggca	3360
60	gccgcaggag	cagccggggc	cgcagccgca	gttggagagg	tggggctcgg	gggtggagggt	3420
	gcgcggcatg	ggttgccctc	ttgggaagag	gggcatcggg	tgtcgtcctc	ttcattgga	3480
	ggcccgtcgc	atgaggcgca	tcaacggcgc	gcggtggcac	ggcgcgccgt	cgaacgagtc	3540

65

ES 2 371 615 A1

	ctggacggag	ccgggcgccg	ctacgcgccc	tccaccggtg	ccggcgcggc	gatctcgtcc	3600
	gcgtgctcgc	cggtgaccag	gtagacgacg	cgcttggcga	ccgacaccgc	gtggtcggcg	3660
5	aaccgctcgt	agtagcggcc	gagcagcgtc	acgtccacgg	cggtctcgat	gccgtgcttc	3720
	cagcggtcgt	ccatcaggtg	ctggaggagg	gtgcggtgga	ggaggccat	cgcgtcgctg	3780
10	tcctgttcca	gctgcagcgc	caggtcgcgc	tccttgggta	tgatgacctc	gccggccttg	3840
	gccatcaggc	gctgggagag	ctggcccatc	tccaggatcg	tggcgtgcag	gtcccgcggt	3900
	acggcgcgct	cggggaaccg	cagccggggc	agcttggcca	cgtgctgggc	caggtcgcgc	3960
15	gagcgttcca	ggtcggcgct	catccgcagg	gaggtgacga	ctatccgcag	gtcgggtggcg	4020
	accggctcgt	ggcgcgccag	cagggctatc	gcgcgggcct	ccaggctccg	ctggagatcg	4080
20	tccaccttct	cgtcggcggc	gatgacggcc	tcggccagct	tcaggctccg	gtcgagtatc	4140
	gccgtggtgg	cgccccgat	cgcgagaccg	acgagcctgg	ccatctcgac	gaggccctcg	4200
	ccgatcgaat	ccagctcctc	gtggtacgcg	tcccgcacga	gtgaccttct	ctcggttcgg	4260
25	ggggtgccgt	gtcggccggg	aatgatccgg	tgtccggggg	ggtgctcgtg	gggcccgaat	4320
	ccccacgctc	ccacgttccg	ggccgaacgc	gaccggttct	gccacccgga	gtgaaccggc	4380
	gccgacacca	aggtgaactc	tgggcgacgt	atgttcgagc	aggccctcga	acggctgggg	4440
30	aagtgtcaca	gccgacgat	aacctggagt	catgaacgtg	gacgcggccg	tcgccgcagt	4500
	ggcagcgatc	gccggtttgt	gcaccggcgt	cttcgccatg	ctggcgttcc	gctggagtga	4560
35	gcgggatcag	gccaagccca	cccgtacctc	cctgcacacc	gacgcggtgc	tgccacccgg	4620
	tgtcgacacg	gtcctgtccg	tgctgcgctc	ctcggccgtc	gtcctggacg	aggccgacgc	4680
	cgctgtcaag	gccagctccg	ccgcgtacgc	cctcgggctc	gtacgcggcg	gcaagctggc	4740
40	cgctgagccg	atgctccaga	tggcccgcga	gacccgccgc	gacggcgaga	tacgccagat	4800
	cgagctggac	ctgccgcgcc	ggggcacggg	ccggggcggc	gacgccctgg	cggtctccgc	4860
45	gcgggtcgcg	cccctcggct	cgcggtcgtg	gctgctcctg	gtcgaggacc	tgaccgaggc	4920
	ccggcgcata	gaagcggtag	gccgcgactt	cgctgcacaac	gtcagccatg	agctcaagac	4980
	cccggtcggc	gcgctgtcgc	tgctgtccga	ggcggatcatg	gacgcgagcg	acgacccgga	5040
50	ggccgtcgag	cgcttcgcgg	gccggatgca	gaacgaggcc	acgcgcctga	ccaacctcgt	5100
	ccaggaactg	atcgacctct	cccgggtgca	gaacgacgac	cccctggagg	acgccgagcc	5160
55	ggtgcgcggtg	gacgagctgg	tcgccgaggc	gatcgaccgc	tgccgccagc	aggccggcag	5220
	caagcagatc	accatggccg	ccgccggcac	cgccgacctg	cacgtctggg	gcaaccgcgg	5280
	ccagctcgcc	gccgctctcg	gcaacctcgt	cgagaacgcc	gtcaactact	caccggccccg	5340
60	taccgggtc	ggtatcgcgg	gccgccgtgt	ccaggcacat	gggggcgacc	tcatcgagat	5400
	cgcggtgacc	gaccagggca	tcgggatatc	ggagaaggac	cgggaccgta	tcttcgagcg	5460
65	gttctaccgc	gtggacccgg	cgcgctcgcg	cgccaccggc	gggaccggcc	tcggcctcgc	5520

ES 2 371 615 A1

	catcgtcaaa cacgtggccg cctcgcacgg cggggaggtc accgtatgga gcgctgaggg	5580
	acagggctcc accttcaccc tgcgtctccc ggaggccggc gccgtgctg accgtgctcg	5640
5	cgccgcctcc gacccgtcgg cggagggcct cgacgacgag gaccgcccgt acgagacctt	5700
	caacgatccg ctccctgctc accctgcccc ggaggtcctt ccgtgacccg agtgctcgtc	5760
10	gtcgaggacg aggaatcgtt cagtgcgccc ctgtcgtaca tgctccgcaa ggagggcttc	5820
	gaggtcgcgg tcgcgggccac cggccccgac ggccctggac agttcgagcg caacggcgcc	5880
	gacctggtcc tgctggacct gatgctgccc ggccctgccc gcaccgaggt ctgccgtcag	5940
15	ctgcgcggcc gctccaacgt cccggtcatc atggtgaccg cgaaggacag cgagatcgac	6000
	aaggtggtcg gtctggaaat aggagccgac gactacgtca ccaagccctt ctccaccg	6060
20	gaactggtcg cccggatcc	6079
	<210> 4	
	<211> 7391	
25	<212> DNA	
	<213> <i>Streptomyces</i> sp. RGU5.3	
	<400> 4	
30	tccgccaccc ggacgagaac cacgaagccg tgcaccgctg gtccttgaa cgcaacaccc	60
	gcctgtacgg ggtgagttac gcgatcgaca agctgggcca catctacctc gtcggcaagc	120
35	tgccgctcgc ggccgtcaca ccggacgagc tcgaccgat cctcggcacg gtcctggaaa	180
	acgccgacgg cagcttcaac accctcctgg agatgggctt cgctccgcc atccgcaagg	240
	agtacgagtg gcggtcgcg cggggggaat ccacgcgcaa cctggaggcc ttcagccacc	300
40	tgacgcagcg gccgtccgcc tagcacctca tccgggcagc tcaaccggac acctcatccg	360
	gacgccgcaa tcaggcagct catccgggca cctcgtccgg acacgccaac cgggcacctc	420
45	gtccgggcac ctcatccggg cacgtcaatc ggggaggacc gcccgcgccc acgtaccccc	480
	gcgacgccgc ctgctcgcag agcgtgctgc ccccgcgccc cggcggaccg cgtggcaggc	540
	ccatggccgg aagtggatta cgctcgaagg catggccgac gcaccgtaca agctgatcct	600
50	ccttcgccac ggcgagagcg agtggaacgc gaagaacctg ttcaccggct gggaggacgt	660
	caatctgaac gagaagggcg agaaggaggc ggtccgcggc ggtgagctgc tcaaggacgc	720
	cggcctgctc cccgacgtcg tgcacacctc cgtccagaag cgcgccatcc gcaccgcgca	780
55	gctggccctg gagtccgccc accgccactg gatcccggtc caccgcagct ggcgcctgaa	840
	cgagcggcac tacggagcgc tccagggcaa ggacaaggcg cagaccctcg ccgagttcgg	900
60	cgaagagcag ttcattctct ggcgcccgtc gtacgacacc ccgcccgg ccctcggcca	960
	cgacgcagag ttctcccaga tcgacgacct gcgctacgcg gtcattccca gcgagctg	1020
	cccgcgcacc gactgcctca aggacgtcgt cgtacggatg ctcccgtact ggtacgacag	1080
65	catcgtcccg gacctggcca ccggccgcac cgtcctggtc gccgccacg gcaactcgt	1140

ES 2 371 615 A1

	ccgcgccctc	gtcaagcacc	tcgacggcgt	ctccgacgcg	gacatcgccg	gcctgaacat	1200
	ccccaccggc	atccccgtct	cctacgagct	cgacgccgac	ttccaccgcg	tcaccccggg	1260
5	cggcacctac	ctcgaccggg	acgccgcaa	ggccgccatc	gaggccgtga	agaaccaggg	1320
	caagaagaag	taagaaccgc	gaccacgccc	ctcacctgca	cgttcgggtg	agatgagggg	1380
10	cgtaggtcttt	tgacgggtacg	aacgcgtccg	tccgcagacc	ctcaaccctg	ctgccgcatg	1440
	gccatccggt	taacctgctc	cgccaacccc	gatcgggaac	atccggcggg	gctctactag	1500
	gcattatattg	aaagaaacac	taatagatcc	aagggacgat	cccggctgta	ggcaatccgg	1560
15	cctatgacga	cgacgggagt	gccgagatgt	gtggaatctc	cggctggctc	gctttcgacc	1620
	acgacctgac	caaagagcag	gcgacggtgg	acgcgatgac	cgacaccatg	gcctaccggg	1680
	gccccgacgg	caggggcacc	tgggtggacc	ggcacgtggc	actcggccac	cgccggctgg	1740
20	cggtgatcga	catcgagggc	ggcacgcagc	cgatgcgtgt	cgacaccctt	aacggcccgg	1800
	tggatcatcac	ctacagcggc	gaggcgtaca	acttcaccga	actgcgcgag	gagctgcgcc	1860
25	gccgcggcca	ccgcttccgg	acgtccagcg	acaccgaggt	ggtgctgcac	gcctacctgg	1920
	agtggggcga	ggccatggcc	gaccgcctca	acggcatgta	cgcttccg	atctgggacg	1980
	cccggagcga	gaagctggtc	atgatccgtg	accggatggg	catcaagccc	ttctacttcc	2040
30	accccaccgc	cgacggtgtg	ctcttcggct	cggagcccaa	ggccatcctg	gcccaccga	2100
	tgttcaagcg	ggtgatcgac	gccgagggcc	tgttcgagct	gctgagcgtg	tgcaagacgc	2160
35	cggggaacgc	catctggtcc	gacatgcgcg	aggtccggcc	gggcagcctc	gtggtggctg	2220
	accgctccgg	tgtgcgcgag	cggacgtact	ggaagctgga	gtcccgggag	cacaccgacg	2280
	acctggacac	cacgatcgcc	acgatccgtg	acctgctcgg	cgacaccgtg	cggcgccagc	2340
40	tcgtcgcgga	cgtgccgcaa	tgcgtgctgc	tctcgggagg	gctggactcc	agctcgctca	2400
	cggcgctggc	cgcgcgggag	ctggccgctc	agggcgagaa	ggtgcgcagc	ttctccgctg	2460
45	acttcgaagg	gctggccgac	aacttccgcc	ccgacgacat	gcgggcccacc	ccggactcgc	2520
	cgttcgtgca	cgacgtggcc	gaccacgtcg	gctcgtgca	cgaggacatc	gtgctgcccc	2580
	acaccgcgct	caccgatctt	gacgcgcgca	gggcagtcac	ggccgcgaag	gacttccccca	2640
50	gcggcatcgc	cgacgtggac	gtatcgctgt	acaagctggt	cacggcgatc	cgcgagcact	2700
	ccacggtcgc	gctctccggt	gagacggcgg	acgaactctt	cggcggctac	ccgtggttcc	2760
55	gggacccggg	ggcgcagcgc	gccggtatct	tcccgtggat	aatccccgtg	atgtccgcgt	2820
	ggaccaaggc	gaaccggaag	ggggcgctcc	acccggacct	ggtggccaac	aacggcctgg	2880
	tgacgtacct	caaggaccgg	tacagcgaag	cggttgccga	agtcgaggtg	ctgcccgggg	2940
60	aggacgaaaa	cgagcggcgc	atgcgtgtca	tgagccacct	gcatctcacc	cggttctctc	3000
	agatgctgct	cgaccgcaag	gaccggatca	gcatggcggg	cggcctggag	gtccgggtgc	3060
65	cgtactgcga	ccaccggctg	gtggagtacg	tctacaacac	cccgtgggag	atgaagagct	3120

ES 2 371 615 A1

	tcgacggcag ggagaagagc ctgctccgcg cagccgccgg cgatctgctc ccgcgctcgg	3180
	tgggtggagcg gctgaagagc ccctacccgt ccacccagga cgcgcgctac gcgagcgggc	3240
5	tgcagcagat gggcaagcag ctgctctccg agcaggacca cccgatcttc caggtcgtca	3300
	cgcgaccac gatcgacgag atggtgaagc tggacccggc agccatgccc ggccccgcgc	3360
10	gcgagcagct cgaccgaatg atcgacatcg ccacctggat ggacatgcac cagccggaca	3420
	tccgagtggc ctgaccagct ggagccaggg gccgaaccgg gcctgccaga cccaggacag	3480
	acagaaccgg gcctgccgga cctaggacaa gaagaagtaa gccccttggc cccgagcccc	3540
15	ctacctgcgg ttttgccgcg agtagggggg ccggtcggcg ctgggcggtc ttgggtggtc	3600
	aggcgcgttc cgggvcgagg tggcvcgagg cggccaggca ggaggagagc caggtggtct	3660
20	ccgcvcgatc gatgatgagg ccggvcgacgg tgatcattcc gtccagttga ccgtcgacc	3720
	gtatcgagtg gtcaccgaca cggaacattt cccaatccgc gtcgctgtgc cacagccggg	3780
	cggctctgctc gccccggcac tgggcgaaga cgagttcttc gccgtgctcg ttccggaagt	3840
25	aaccgacgta gtccctgtgcg gtgatggcgc caccgctcag gcgcgccagg aggggttcga	3900
	tccccgaggg gtcgtggttc atgcggcggc ctccctgccc ggctcggagg ggtctgagtc	3960
30	ctgccgtgcc gacgagaggg ccagcatccg ctccgccgac tccagcaggg tcccgtacgt	4020
	gatcacttct atgcgtgcgg tatgcgtggt gtaggtccgc agcgtttccg cgatctcctg	4080
	tggcgtgacg ctcccgtcc cataccgggg gtgcccgatc acgactgtcg tcgacgcct	4140
35	gcgggtgtcg acgccgtgct ccgcgagaat cgccgggcgg ttctcgtcca tggcccgcag	4200
	gtaattctgt gcctvcgaga ccgcvtgatg gcggggggcg cccagcatga ggtggccgct	4260
	gcgccggatg acgaggtcct tgatgcgggc gagtttgagc tccaccacgt gcagggagcc	4320
40	gtcaccvcgc agcaaccggga tgvcgaggat ggtgtccggg gtgtactggc ggcvggccag	4380
	ctcggtcaca taggcccctc cgaagatcca ctccvtggtc ttcaggcagg cvgtggaggtc	4440
45	actctcggaa ctgtccgggt cctccaccgc ggaaccggagg gcctccaagc cvgtctgcct	4500
	ggctttcagt tcgagcagtt gggccagcat tccggcatcg ataccgcga ggacatcact	4560
	catgatccgc gcggcctccg gggaggccgg ccggggcaga tcacgcagaa ccagctccat	4620
50	gtgcccgtac tcctggagat accgcacgtc cttggtggac agctggacc cvccttcacc	4680
	ggtgccgagc cccagatgtc cvgtggcctg ggcgacgccc cvgaagagat cacvcvcgtc	4740
55	ggcvvcggtc gcaccgggct ggtcccggca caggacatcc agggvcvcga cvtvcvcgca	4800
	gctcagggcc ccgcccggca gtctvcggg cvgggccccg tacgtaccgc ggttvcggcc	4860
	gtggcvggccg ccggaagggg ggccgcaacc gcggccggtg ccggccvcgc cvggcctcgg	4920
60	gggtcagccg cagccvcgc cvcactggca ggcvcvcgg gactggcaac cvcaggagca	4980
	gccggggccg caggvcagvt tgctgggtgc cvggttggga gcaggggaac cvgtcatgac	5040
65	ttgcctctc ggggagaggg tcatccgaat gtcattcgggt gtccattgga tgcccgcvcg	5100

ES 2 371 615 A1

	gcgagggcgca tcaacggcgc gtggtggcac ggcgcgacgc cgtacggctc ttggccgggg	5160
	cgtacgtgcc gtgccgtgcg cggtcgggtg ctgctacgcg ccctccaccg cgtacgcgcc	5220
5	ctccaccgcg tacgcgccct ccaccgcgta cgcgccctcc accacggccg ggcgccgta	5280
	cgcgccctcc accgtggcgg ccggcggggc gatctcgtcc gcgtgctcgc cggtgaccag	5340
10	gtagacgacg cgcttggcga ccgacaccgc gtggtcggcg aagcgctcgt agtagcggcc	5400
	cagcagcgtc acgtccacgg ccgtctcgat gccgtgcttc cagcggtcgt ccatcaggtg	5460
	ctggaagagg gtgcggtgga ggaggtccat cgcgtcgtcg tcctgttcca gctggagcgc	5520
15	gaggtcgacg tccttggtga tgatgacctc ggccgccttg gccatcaggc gctgggcccag	5580
	ctggcccatc tccaggatcg tggcgtgcag gtcccgcggt acggccgcct ccgggaagcg	5640
	cagccgggcc agcttgcca cgtgctgggc caggtcgcgg gaacgttcca ggtcggcgc	5700
20	catgcgcagg gaggtgacga cgatccgcag atcggtgggc accggctgct ggcgcgccag	5760
	cagggctatc gcccgggcct ccaggtcgcg ctggagatcg tcgaccttct cgtcggcggc	5820
25	gatgacggcc tcggccagct tcaggtccgc gtcgagtatc gccgtggtgg cgcgcccgac	5880
	cgcggagccg acgagcctgg ccatctcgac gaggtctctg ccgatcgaat ccagctctc	5940
	gtggtacgcg tcccgcataca gtgaccttct ctcgcttca gtggtggtgt ggggggcccg	6000
30	aatccccacg ctcccacgtt cgggccgga cgcgaccggt tctgacctcc ggaatgaacc	6060
	agcggcgaca ccaaggtgaa ctctgggcga cgtgtgttcg agcagcccct cgaacggctg	6120
35	gggagatgtc acaggtgacg cataacctgg agtcatgaac gtggacgcgg ccgtcgcgc	6180
	agtggcagcg atcggccgac tgtgcaccgg cgtcttcgcc atgctggcgt tccgctggag	6240
	cgagcgggat caggccaagc ccacgcgtac gtccctgcac accgatgccg tcctgccgcc	6300
40	cggcgtggac acggtcctgt cggtgctgcg ctccctcggc gtcgtcctgg acgaggcca	6360
	cgccgtggtc aaggccagct cggcggcgta cgcctcggc ctggtgcgcg gcgggaagct	6420
45	ggccgtcgag ccgatgctcc agatggcccg cgacaccgcg cgcgacggcg agatacgcca	6480
	ggtcgagctg gacctgccgc gcagggggac gggccggggc ggcgacgcc tggcggctc	6540
	ggcgcgcgtc gcgcccctcg gctcgcggct ggtcctgctg ctggtcgagg acctgaccga	6600
50	ggcacggcgc atagaggcgg tacggcgcga cttcgtcgcg aacgtcagcc atgagctcaa	6660
	gacccccggtc ggcgccctgt cgctgctgtc cgaggccgtc atggacgcga gcgacgacc	6720
55	cgaggcggtc gaacgcttcg cgggccgtat gcagaacgag gccaccgcc tgaccaacct	6780
	cgtccaggaa ctgatcgacc tctcccgggt gcagaacgac gacccgctgg aggacgccga	6840
	accggtccgg gtggacgaac tggtcgcgga ggcgatcgac cgctgccgcc agcaggcggg	6900
60	cagcaagcag atcaccatgg ccgcggccgg caccgccgac ctgcacgtct ggggcaaccg	6960
	cggccagctc gccgccgcc tcggcaacct cgtggagaac gccgtcaact actcggcggc	7020
65	ccgcacccgg gtcggtatcg cgggccggcg tgtccaggca cacgggggcg acttgatcga	7080

ES 2 371 615 A1

gatcgcggtg accgaccagg gcatcgggat atcggagaag gaccgggacc gcgtcttcga 7140
 gcggttctac cgcgtggacc cggcgcgctc gcgcgccacc ggcgggaccg gcctcgggtct 7200
 5 cgccatcgtc aagcacgtgg ccgcctcgca cggcggggag gtcacggtct ggagcgctga 7260
 gggacagggc tccaccttca ccctgcgtct cccggaggcc ggtgccgtgc gcgaccgcgc 7320
 10 gcgtgccgcc tccgacctgt cggcgggaagg cctcgacgaa gaggaccgcc cgtacgagac 7380
 cttcaacgat c 7391

15 <210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador AsnB-deg1

25 <400> 5

gayacsgarg tsgtsctgc 19

30 <210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 35 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador AsnB-deg3rev

40 <400> 6

catgctcarw cggtccttgc g 21

45 <210> 7
 <211> 23
 50 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 55 <223> cebador AsnB-deg2

<220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (15)..(15)
 <223> n es a, c, g, t o u

65 <400> 7

ctgctstcsg gcggnmtsga ytc 23

ES 2 371 615 A1

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> AsnB-deg4rev

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

15

<223> n e s a, c, g, t o u

<220>

<221> misc_feature

20

<222> (11)..(11)

<223> n e s a, c, g, t o u

<220>

25

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n e s a, c, g, t o u

30

<400> 8

awggwacncg nacytcangg c

35

21

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930550

②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.07.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2006100330 A2 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 28.09.2006, página 7, línea 33 – página 8, línea 4; página 12, líneas 1-6; página 19, línea 15 – página 22, línea 10; página 25, línea 30 – página 29, línea 2; tabla 1; reivindicaciones 1-27.	13-22
X	ELENA M. SECO et al. "Two polyene amides produced by genetically modified <i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108" CHEMISTRY & BIOLOGY, vol. 12, mayo 2005, páginas 535-543. Resumen, figura 1, tabla 1 y página 541.	13-22
X	ELENA M. SECO et al. "A tailoring activity is responsible for generating polyene amide derivatives in <i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108" CHEMISTRY & BIOLOGY, vol. 12, octubre 2005, páginas 1093-1101. Figura 1, tabla 1, página 1098, columna derecha y página 1099.	13-22
X	ELENA M. SECO et al. "Starter unit choice determines the production of two tetraene macrolides, rimocidin and CE-108, in <i>Streptomyces diastaticus</i> var.108" CHEMISTRY & BIOLOGY, vol. 11, marzo 2004, páginas 357-366. Página 357; página 358, columna izquierda, segundo párrafo; página 364 y figura 6.	13-22

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
07.12.2011

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07H17/08 (2006.01)
C12P19/62 (2006.01)
C12N15/54 (2006.01)
A61P31/00 (2006.01)
A61P31/10 (2006.01)
C12R1/465 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07H, C12P, C12N, A61P, C12R

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

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 07.12.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-22	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones 13-22	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2006100330 A2 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS)	28.09.2006
D02	ELENA M. SECO et al. "Two polyene amides produced by genetically modified <i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108" CHEMISTRY & BIOLOGY, vol. 12, mayo 2005, páginas 535-543. Resumen, figura 1, tabla 1 y página 541.	
D03	ELENA M. SECO et al. "A tailoring activity is responsible for generating polyene amide derivatives in <i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108" CHEMISTRY & BIOLOGY, vol. 12, octubre 2005, páginas 1093-1101. Figura 1, tabla 1, página 1098, columna derecha y página 1099.	
D04	ELENA M. SECO et al. "Starter unit choice determines the production of two tetraene macrolides, rimocidin and CE-108, in <i>Streptomyces diastaticus</i> var.108" CHEMISTRY & BIOLOGY, vol. 11, marzo 2004, páginas 357-366. Página 357; página 358, columna izquierda, segundo párrafo; página 364 y figura 6.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente, tal y como ha sido redactada se refiere a genes que codifican para la actividad amidotransferasa, implicados en la biosíntesis de macrólidos polienos. Hace referencia concretamente a un polinucleótido aislado capaz de traducirse a la secuencia aminoacídica que se selecciona de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, o a una variante o a un fragmento biológicamente activo de dichas secuencias (reivindicación 1). Se refiere también a una construcción genética de ADN o ARN que comprende dichas secuencias (reivindicación 2), en la que el promotor es ermE*p (reivindicación 3), o tipA (reivindicación 4), el plásmido replicativo es pHJL401 (reivindicación 5), o piJ941 (reivindicación 6). Además, reivindica una célula hospedadora que comprende dicho polinucleótido o dicha construcción genética (reivindicación 7); siendo dicha célula una bacteria (reivindicación 8), del género *streptomyces* (reivindicación 9) perteneciente a la especie *Streptomyces diastaticus* (reivindicación 10) y a su uso (reivindicación 12). Y por último, hace referencia al método de obtención de macrólidos polienos (reivindicación 11), a macrólidos polienos de fórmula (I) (reivindicaciones 13-15), al uso de dichos compuestos como medicamento (reivindicación 16), para el tratamiento de una infección (reivindicación 17), producida por hongos (reivindicación 18), como antibiótico (reivindicación 19) y como antifúngico (reivindicación 20) y a la composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable (reivindicación 21) y adicionalmente otro principio activo (reivindicación 22).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA .LP ARTS. 6 Y 8

El documento D01 trata sobre polienos amidados de fórmula (I) en la R1 es alquilo C1-C3 y R2 es un grupo funcional elegido entre CH₃ – ó CONH₂ (véase página 12, líneas 1-6), y un compuesto de fórmula (I-1) derivado amidado del polieno de fórmula (I) (Véase página 12, línea 5), que tienen actividad biocida (véase página 7, línea 33-página 8, línea 4) y terapéutica (véase página 19, línea 15-página 22, línea 10)), obtenidos mediante manipulación genética de *Streptomyces diastaticus* var. 108, por transformación con vectores derivados de SCP2* que portan el gen de resistencia a eritromicina (ermE) (véase página 25, línea 30-página 29, línea 2 y Tabla 1 y reivindicaciones 1-27).

El documento D02 hace referencia al estudio de *Streptomyces diastaticus* var. 108 como cepa productora de dos macrólidos (rimocidina y CE-108) y a un cluster de genes biosintético. Se detectaron dos macrólidos, no caracterizados previamente, cuando se sometió a fermentación a la cepa productora modificada genéticamente mediante transformación con algunos vectores derivados de SCP2* que llevaban el gen ermE, y dichos macrólidos se caracterizaron químicamente como las amidas de los ácidos carboxílicos de los polienos parentales (véase resumen, figura 1, tabla 1 y página 541).

El documento D03 caracteriza la rimocidina B (3b) y el compuesto CE-108B (4b) como dos polienos amidados con propiedades farmacológicas mejoradas, producidos por *Streptomyces* var. 108, genéticamente modificada. Mediante el análisis genético y bioquímico de la cepa productora se muestra que las dos amidas se obtienen a partir de los polienos parentales de rimocidina (3a) y CE-108 (4a) mediante modificación post-PKS de la cadena lateral libre de ácido carboxílico, esta modificación se lleva a cabo por medio de actividad aminotransferasa (véase figura 1; Tabla 1; página 1098, columna derecha y página 1099).

El documento D04 describe como especies del género *Streptomyces* producen una gran variedad de metabolitos secundarios que son policétidos con actividades biológicas diferentes como antibacterianas, antifúngicas, inmunosupresoras, antitumorales, etc. De entre estos policétidos destacan ciertos polienos con actividad antifúngica (véase página 357). Así *Streptomyces diastaticus* var. 108 produce dos tetraenos muy relacionados entre sí: rimocidina y CE-108 (véase Figura 6). Además, en dicho artículo se indica que a partir de *S. diastaticus* var.108 mediante manipulación genética se podría crear un cluster de los dos polienos que podría servir como herramienta para modificar los genes de biosíntesis de los polienos y así obtener un nuevo compuesto bioactivo (véase página 358, columna izquierda, segundo párrafo, y página 364).

A la vista de los documentos citados anteriormente, se considera que las reivindicaciones 1 -12 presentan novedad y actividad inventiva porque no se ha encontrado el polinucleótido aislado capaz de traducirse a la secuencia aminoacídica que se selecciona de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, ni la construcción genética de ADN o ARN que comprende dichos tipos de secuencias, ni la célula hospedadora que comprende dicho polinucleótido. En cuanto a las reivindicaciones 13-22, se considera que tienen novedad pero carecen de actividad inventiva. Tienen novedad porque no se ha encontrado el compuesto de fórmula (I) de la invención, pero si se han encontrado en los documentos D01-D04 compuestos que sólo se diferencian en el radical alquilo que se encuentra en la posición 2 del anillo macrocíclico, tratándose en la presente solicitud de patente de un radical metilo, frente al radical etilo presente en el resto de los documentos. El radical de la posición 14 del anillo macrocíclico puede ser en todos los casos o un grupo carboxílico o amida, como el de la presente invención. Por lo que las reivindicaciones 13-15 se consideran que carecen de actividad inventiva ya que, el hecho de que un compuesto tenga un grupo metilo en lugar de un grupo etilo no le confiere actividad inventiva, sobretodo porque en dicha solicitud de patente no se indica que dicho grupo metilo confiera ninguna característica técnica especial al compuesto. En cuanto a las reivindicaciones de uso 16-20 y de composición 21-22, carecen igualmente de actividad inventiva ya que el uso del compuesto de la presente solicitud de patente es el mismo que el de los compuestos recogidos en los documentos D01-D04, y las composiciones farmacéuticas resultan evidentes para un experto en la materia.

Por lo tanto, las reivindicaciones 1-12 son nuevas y tienen actividad inventiva y las reivindicaciones 13-22 son nuevas, pero carecen de actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la LP.