

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 045**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2001 E 01989109 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 1341414**

54 Título: **Taxón de actionomiceto marino para el descubrimiento de fármacos y de productos de fermentación**

30 Prioridad:

16.11.2000 US 249356 P

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

26.04.2013

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (100.0%)
1111 FRANKLIN STREET, 5TH FLOOR
OAKLAND, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**FENICAL, WILLIAM;
JENSEN, PAUL, R.;
MINCER, TRACY, J. y
FELING, ROBERT H.R.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 402 045 T3

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

DESCRIPCIÓN

Taxón de actinomiceto marino para el descubrimiento de fármacos y de productos de fermentación

Campo de la invención

5 La invención se refiere al descubrimiento de un nuevo taxón de bacterias marinas del orden Actinomycetales y al uso de este taxón para el descubrimiento y la producción de proteínas, metabolitos secundarios y biomoléculas para usar como composiciones farmacéuticas, productos agroquímicos, inmunomodificadores, enzimas e inhibidores de enzimas.

Antecedentes de la invención

10 Los microorganismos que pertenecen a la clase Actinobacteria, comúnmente denominados actinomicetos, residen taxonómicamente dentro de las bacterias Gram-positivas y se ubican en ambientes terrestres. Los actinomicetos son una fuente prolífica de diversos metabolitos biológicamente activos. Han sido una fuente de numerosos productos de utilidad incluyendo productos farmacéuticos, agroquímicos, inhibidores de enzimas de bajo peso molecular, inmunomodificadores y enzimas para emplear en una cantidad de aplicaciones industriales, desde la industria alimenticia a la preparación del papel. Estos microorganismos también han sido de utilidad en agricultura como un
15 medio de protección de agentes patógenos y mejora del crecimiento. A pesar de que se han descubierto muchas sustancias útiles a partir de los actinomicetos del suelo durante los últimos 60 años, el rendimiento de los nuevos productos se redujo drásticamente ya que las especies de suelo comunes dan continuamente los metabolitos previamente descubiertos. Por esta razón, se ha realizado un gran esfuerzo en descubrir nuevos taxones de actinomicetos con la esperanza de que estos microorganismos proporcionen una nueva fuente de productos de
20 utilidad (Bull et al., 2000).

Las actinobacterias son una de una cantidad de clases de bacterias. La clase Actinobacteria se puede subdividir posteriormente en seis órdenes, incluyendo Actinomycetales que se pueden dividir en 10 subórdenes. Los procedimientos clásicos para determinar la novedad taxonómica incluyen criterios morfológicos y fisiológicos, tales como color, presencia o ausencia de micelios, características de hifas ramificadas, patrón de esporas y motilidad,
25 tolerancia de variación en la temperatura, salinidad y pH y la capacidad de utilizar diversos sustratos. A pesar de que estos criterios son un importante componente de análisis taxonómicos, un novedoso procedimiento y más definitivo para establecer la exclusividad de cepa es el análisis de secuencias de rADN 16S, que también proporciona información evolutiva acerca del aislado (Stackebrandt, et al., 1997).

La composición de una cepa dentro de la clase Actinobacteria está indicada por los valores de similitud de secuencia
30 de rADN 16S de más del 80%, tal como se determina en comparación con las secuencias de rADN 16S casi completas con los miembros de ramificación más profundos de la clase y la presencia de nucleótidos de firma (Stackebrandt, 1997). Los nucleótidos de firma específicos de un grupo taxonómico se seleccionan respecto de su presencia en más del 95% de los miembros de ese grupo. Las secuencias de nucleótidos de firma 16S se pueden
35 usar en diversos niveles taxonómicos, desde la definición de un orden de bacterias hasta la subdivisión de familias en géneros. Este procedimiento proporciona un poderoso modelo matemático de evolución bacteriana y un grupo de reglas objetivas más que subjetivas por las cuales se pueden asignar a las bacterias un status taxonómico dentro del sistema de clasificación.

A pesar del hecho de que el océano cubre el 70% de la superficie de la Tierra, todos los géneros de actinomicetos conocidos descubiertos hasta la fecha han sido los habitantes de tierra. De hecho, sólo una especie de actinomiceto marino fue descrita (Helmke y Weyland, 1984) y pertenece a un género terrestre bien conocido. A pesar de que los actinomicetos se cultivaron de sedimentos marinos, se cree ampliamente que los aislados marinos se derivan de esporas terrestres latentes que se lavaron en el mar (Goodfellow y Haynes, 1984). La teoría de "lavado" se postuló porque los aislados marinos no requerían agua marina para el crecimiento, estaban íntimamente relacionados con las especies terrestres y tendían a reducirse en cantidad con una mayor distancia a la tierra (Goodfellow y Williams,
45 1983). Como muchos actinomicetos terrestres pueden tolerar una alta salinidad y presión y debido a su distribución y fisiología, se concluyó que la mayoría de los actinomicetos fueron lavados en el mar y se recolectan en sedimentos donde pueden sobrevivir durante largos períodos como esporas (Goodfellow y Haynes, 1984). Este tipo de estudios llevó a creer en general que los actinomicetos marinos no son significativamente diferentes de aquellos en tierra y, en consecuencia, tienen poca utilidad como fuente de nuevos productos industriales.

Resumen de la invención

La invención es el descubrimiento, el aislamiento y la caracterización del primer taxón de actinomiceto marino obligado mayor para el cual se propone el nombre de *Salinospora* gen. nov. Los miembros de este género se reconocen con facilidad por medio de una serie de propiedades características que incluyen:

1. Exigencia absoluta de sodio (agua de mar) para el crecimiento.

55 2. Presencia de al menos 4 de los 5 nucleótidos de firma de rARN 16S (Tabla 3) y estrecha relación filogenética con el clado de *Salinospora* usando procedimientos de ramificación de rARN 16S.

3. Características morfológicas que típicamente incluyen:

a.) color de colonia que va de anaranjado a marrón,

b.) ningún o escaso micelio aéreo,

c.) pigmentos de tipo melanina difundibles y esporas que ennegrecen la superficie de la colonia,

5 d.) hifas que se ramifican finamente y no se fragmentan con esporas que se producen solas o en grupos.

4. Comparación con un depósito de un tipo de cepa en la ATCC (American Type Culture Collection; 12301 Parklawn Drive; Rockville, Maryland 20852) el 27 de septiembre de 2000 bajo el número ATCC PTA-2501.

10 El descubrimiento del grupo *Salinospora* refuta las nociones anteriores acerca de los actinomicetos en el ambiente marino y proporciona la primera evidencia inequívoca de que mayores poblaciones de actinomicetos marino obligatorios exclusivos se producen ampliamente en sedimentos oceánicos. Estudios químicos de miembros del grupo de *Salinospora* llevaron al aislamiento de nuevos compuestos y una tasa excepcionalmente alta de extractos biológicamente activos que indican que estos microorganismos tienen utilidad para el descubrimiento de fármacos y otras aplicaciones industriales.

15 La invención es el uso del nuevo taxón para el descubrimiento y la producción de proteínas, metabolitos secundarios y otras biomoléculas para usar en composiciones farmacéuticas, agroquímicos, inmunomodificadores, enzimas e inhibidores de enzimas. Las moléculas activas se pueden purificar de actinomicetos en sí o metabolitos se pueden purificar de los medios de cultivo. Este género es una fuente rica de biomoléculas activas con muchas actividades farmacológicas demostradas (por ejemplo, antifúngicas, antimicrobianas, anticáncer). Los extractos y productos se pueden usar en una cantidad de ensayos bien conocidos por los expertos en la técnica para determinar la actividad de diversos compuestos derivados de los actinomicetos.

20 La invención es el uso del genoma del taxón para la producción de biomoléculas en el contexto de la cepa de actinomiceto endógeno o en otros organismos. Los genes se pueden expresar de forma individual o en grupos bajo el control de promotores constitutivos o inducibles. Los genes de la invención se pueden expresar en huéspedes heterólogos como cepas recombinantes o de superproducción. Otras partes del genoma, tales como elementos de regulación transcripcional, también se pueden utilizar en contextos heterólogos para el control de la transcripción. El genoma puede ser de tipo salvaje o mutante. Las mutaciones pueden ser espontáneas o se pueden crear de una manera aleatoria o dirigida a sitio por medio de procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica.

25 La invención es el uso del taxón para la producción de productos génicos de organismos heterólogos. Los genes se pueden insertar ya sea de forma individual o en grupos en cepas de actinomicetos de la invención para la expresión de proteínas, metabolitos secundarios u otras biomoléculas. Los compuestos se pueden aislar de los actinomicetos o los medios de crecimiento.

30 La invención es el uso del taxón para protección contra agentes patógenos y plagas, insecticidas, herbicidas, microbiocidas, promoción del crecimiento en aplicaciones de agricultura y acuicultura. Los actinomicetos de la presente invención pueden competir con microorganismos nocivos en el ambiente de las plantas proporcionando un medio no tóxico de plantas de protección.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se comprenderá mejor mediante la siguiente descripción detallada de una forma de realización ejemplar de la invención, tomada junto con los dibujos acompañantes en los que los mismos números de referencia se refieren a las mismas partes y en los que:

40 **Figura 1.** Estructura de salinosporamida A, el primer metabolito bioactivo nuevo obtenido del grupo de *Salinospora*. El aislamiento de este compuesto prueba que el grupo de *Salinospora* es un recurso para metabolitos biológicamente activos exclusivos. La cepa de producción se cultivó en un medio a base de agua de mar y el compuesto se obtuvo en forma pura siguiendo una serie de etapas cromatográficas. La estructura de salinosporamida A se elucidó usando resonancia magnética nuclear 1D y 2D y análisis de datos de espectros de masa de alta resolución.

50 **Figura 2.** Dendograma filogenético creado usando el procedimiento de unión con el vecino que muestra siete diversos miembros del clado de *Salinospora* junto con representantes de todos los géneros que pertenecen oficialmente a la familia de Micromonosporaceae (Koch, et al; 1996). La barra de distancia indica 1 sustitución de nucleótidos por cada 100 nucleótidos. El clado de *Salinospora* se muestra entre paréntesis. Entre paréntesis al lado de las denominaciones de la cepa de *Salinospora* se hallan las ubicaciones y las fechas de los suministros de los que se obtuvieron los aislados. El grupo de *Salinospora* incluye hasta la fecha 400-500 aislados que muestran las propiedades características 1 y 3 (enumeradas en la sección de Antecedentes). Estas cepas son de tres suministros que se agruparon primero por ubicación y datos obtenidos, luego por diversidad morfológica dentro de cada grupo. De cada uno de estos subgrupos, los aislados se seleccionaron por una secuenciación génica de rARN 16S casi

completa (de más del 95% del gen). Los programas filogenéticos contenidos en los paquetes Philip y Clustal W se usaron para el análisis y el árbol se trazó usando Treeview 1.6.1.

- 5 Se realizaron los siguientes depósitos biológicos en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, Estados Unidos y la International Depository Authority (IDA) bajo los términos del Tratado de Budapest acerca del Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento de Patentes:

Definición:

Actinomycete *Salinospora*, cepa CNH646

ATCC N.º: PTA-2501

- 10 Fecha del depósito: 27 de septiembre de 2000

Descripción detallada y formas de realización preferentes

- 15 Las cepas de *Salinospora* se pueden aislar consistentemente de sedimentos marinos y se distinguen por nucleótidos característicos de firma, una exigencia absoluta de agua de mar (más específicamente, Na⁺) para el crecimiento y características morfológicas. Los aislados que pertenecen a este grupo se obtuvieron en cinco ocasiones separadas de sedimentos tropicales a subtropicales cercanos a la costa del Océano Atlántico, el Mar Rojo y el Mar de Cortez, indicando una distribución a nivel mundial. En estos estudios, se evaluó un total de 147 muestras de sedimentos independientes y 51 de ellos dio un total de 182 aislados de *Salinospora* de los cuales siete se sometieron a evaluación fisiológica en profundidad y filogenética (Tabla 1). Posteriormente, más de 1000 cepas fueron obtenidas de colecciones adicionales.
- 20 *Ubicación natural de cepas.* Se usaron aislados seleccionados diversos que representan más de 1000 cepas con morfología de *Salinospora* para análisis filogenéticos en profundidad y fisiológicos. Se obtuvieron secuencias de rADN 16S casi completas (>95% del gen entero) para todas las cepas enumeradas. Observar que CNB394 y CNB512 son aislados de *Micromonospora* derivados del mar y se utilizaron en análisis para ilustrar diferencias fundamentales entre los géneros de *Salinospora* y *Micromonospora*.

25 **Tabla 1**

| Cepa | Año y ubicación | Descripción del hábitat y profundidad | Género |
|--------|-----------------------------------|--|-----------------------|
| CNH643 | 1999 Bahamas, Sweetings Cay | Arena gruesa, 1 m | <i>Salinospora</i> |
| CNH646 | 1999 Bahamas, Andros Island | Espolón y arboleda, 10 m | <i>Salinospora</i> |
| CNH725 | 2000 Red Sea, Sha'b el utal | Arena gruesa, 20 m | <i>Salinospora</i> |
| CNH898 | 2000 Bahamas, Little San Salvador | Arena gruesa, 30 m | <i>Salinospora</i> |
| CNH964 | 2000 Sea de Cortez Caleta Partida | Arena gruesa, 30 m | <i>Salinospora</i> |
| CNB440 | 1989 Bahamas, Chub Cay | Espolón y arboleda, 20 m | <i>Salinospora</i> |
| CNB536 | 1989 Bahamas, Acklins Island | Arena gruesa y fanerógamas marinas, 10 m | <i>Salinospora</i> |
| CNB394 | 1989 Bahamas, Chub Cay | Arena gruesa y fanerógamas marinas, 1 m | <i>Micromonospora</i> |
| CNB512 | 1989 Bahamas, San Salvador Is | Espolón y arboleda, 30 m | <i>Micromonospora</i> |

- 30 Todas las 182 cepas de *Salinospora* ensayadas fallaron al crecer en un medio de agar cuando el agua de mar se reemplazó con agua desionizada. Luego se caracterizaron siete cepas filogenéticamente diversas y mostraron que requerían sodio para crecer (Tabla 2), una característica fisiológica comúnmente asociada con bacterias marinas obligadas. Los requerimientos de sodio se han estudiado extensamente en bacterias marinas Gram-negativas y son indicativas de adaptaciones marinas muy evolucionadas como bomba iónica de sodio dependiente de la respiración y/o un mecanismo de transporte de membrana dependiente de sodio. El requerimiento de agua de mar (sodio) para el crecimiento es extremadamente raro en bacterias Gram-positivas y nunca fue informado con anterioridad para un actinomiceto con excepción de *Rhodococcus marinonascens* (Helmke y Weyland, 1984)

Ensayo para el crecimiento dependiente de sodio. El análisis de crecimiento fisiológico que ilustra diferencias fundamentales de crecimiento entre *Salinospora* (en negrita) y aislados de *Micromonospora* derivados del mar (CNB394, CNB512) se muestran en la Tabla 2. Se realizaron ensayos en el medio M1 que se halló óptimo para el crecimiento y el mantenimiento de los géneros de *Salinospora* y *Micromonospora*. Los aislados se analizaron usando un hisopo de algodón estéril para inocular micelios vegetativos macerados sobre cada medio analítico que luego se incubó a 25-28 °C durante seis a ocho semanas. El crecimiento se controló periódicamente usando un estereoscopio Leica con una magnificación de 10-64X. Todas las cepas crecieron igual de bien en agua de mar natural (NSW) o agua de mar artificial (ASW Na⁺). No se observó un crecimiento detectable para cualquiera de los aislados de *Salinospora* en M1 preparado con agua desionizada (DI). Los dos aislados de *Micromonospora*, CNB394 y CNB512, crecieron mejor en agua DI M1 que en medio a base de agua marina. Los requerimientos de crecimiento en sodio se ensayaron en M1 preparado con ASW en donde todas las fuentes de sodio fueron reemplazadas por cantidades equimolares de potasio (M1, ASW K⁺). La concentración de sodio en agua de mar de salinidad 35 (usado para medio M1, NSW en este estudio) es de 450 mM. A fin de determinar los límites superiores de la tolerancia de cloruro de sodio, las cepas se ensayaron respecto del crecimiento en agua DI M1 en donde el cloruro de sodio se añadió para obtener concentraciones finales de sodio de 600 y 1000 mM. Los aislados de *Salinospora* no mostraron un crecimiento en estos niveles de sodio elevados, mientras que el crecimiento era claramente evidente para CNB394 y CNB512 de *Micromonospora* derivados del mar.

Tabla 2.

| Medio | Aislados ensayados | | | | | | | | |
|----------------------------|--------------------|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | CNB 394 | CNB 512 | CNB 440 | CNB 536 | CNB 643 | CNH 646 | CNH 721 | CNH 898 | CNH 964 |
| M1, NSW | + | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| M1, DI H ₂ O | ++ | ++ | - | - | - | - | - | - | - |
| M1 ASW, Na ⁺ | + | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| M1 ASW K ⁺ | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 600 mM [Na ⁺] | +/- | +/- | - | - | - | - | - | - | - |
| 1000 mM [Na ⁺] | +/- | +/- | - | - | - | - | - | - | - |

Los aislados de *Salinospora* se proporcionan como una fuente remarcable de metabolitos secundarios biológicamente activos. Hasta ahora, de las 105 cepas examinadas, el 86% dio extractos de cultivo con una citotoxicidad de células cancerosas significativas (valores de IC₅₀ que van de 0,004 – 16,4 microgramos/ml contra la línea celular de carcinoma de colon humano HCT-116). También se observaron significativas actividades antifúngicas y antibióticas de los extractos de cultivos crecidos en diversas condiciones con el 30% que da valores de MIC de 19,5 microgramos/ml o menos contra *Candida albicans* resistente a anfotericina y el 35% que da valores de concentración inhibitoria mínima de extracto (MIC) de 25 microgramos/ml o menos contra *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina.

Los análisis de cromatografía en capa fina y cromatografía líquida / espectrometría de masa, así como reacción de polimerasa en cadena de palíndromo extragenético repetitivo (REP-PCR) indican una considerable diversidad química y genética de cepa a cepa. El fraccionamiento guiado por bioensayos de un extracto activo llevó al aislamiento de una nueva serie de metabolitos que incluye una potente citotoxina (IC₅₀ = 10 ng/ml contra la línea celular de carcinoma de colon humano HCT-116) que se denominó salinosporamida A (Figura 1). Esta molécula está más íntimamente relacionada con la clasto-lactacistina beta-lactona (también denominada omuralida), el producto intermediario de hidrólisis de lactacistina, un producto antimicrobiano. La salinosporamida A representa el primer producto natural para descubrir que posee un anillo bicíclico de beta-lactona gamma-lactama fusionado y que es un agente anticáncer muy potente.

El grupo de *Salinospora* se reconoció inicialmente después de la caracterización filogenética de actinomicetos derivados de sedimentos aislados durante un suministro a las Bahamas. Las secuencias génicas parciales de rADN 16S de ocho cepas morfológicamente diversas indicaron la presencia de cuatro nucleótidos de firma entre las posiciones 198 a 1424 de los números de acceso a Genbank AY040619, AY040620 y AY040622 o la posición de

nucleótido 207-468 (en base al sistema de numeración de rARN 16s de *E. coli* que se conoce bien por los expertos en la técnica; ver también la tabla 3, que utiliza el sistema de numeración de rARN de 16s de *E. coli* al comparar *Salinospora actinomycetes* de la presente invención con aquellos de los otros géneros de micromonosporaceae). Estas firmas se hallaron posteriormente en todas las 45 cepas de *Salinospora* secuenciadas parcialmente. Dos cepas que mostraban la mayor diversidad filogenética (CNH643 y CNH646) se secuenciaron casi en su totalidad (números de acceso a GenBank AY040619 (SEQ ID No. 3) y AY040620 (SEQ ID No. 4), respectivamente)

SEQ ID No. 4:

```

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgagc
ggaaggccc ttcgggggtac tcgagcggcg aacgggtgag taacacgtga gtaacctgcc
ccaggccttg ggataacccc gggaaaccgg ggctaatacc ggatatgacc atctgtcgca
tggtgggtgg tggaaagatt ttttggcttg ggatgggctc gcggcctatc agcttgttgg
tggtgggtgag gcctaccaag gcggcgacgg gtagecggcc tgagagggcg accggccaca
ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat ctgtcaccaat
ggcgggaagc ctgatgcagc gatgcccgct gagggatgac ggccttcggg ttgtaaacct
cttcagcag ggacgaagcg tttgtgacgg tacctgcaga agaagcgccg gccaaactag
tgccagcagc cggcgtaaga cgtaggggcg aagcgttgtc cggatttatt gggcgtaagc
agctcgtagg cggcttgtcg cgtcgactgt gaaaaccctg ggctcaactg cgggcttgca
gtcgatacgg gcaggctaga gttcggtagg ggagactgga attcctggtg tagcggtgaa
atgcgagat atcaggagga acaccggtgg cgaaggcggg tctctgggcc gatactgacg
ctgaggagcg aaagcgtggg gagcgaacag gattagatac cctggtagtc cagcgtgtaa
acgttgggcg ctagggtgtg ggggcctctc cgttctctctg tgccgcagct aacgcattaa
gcgccccgcc tggggagtac ggccgcaagg ctaaaactca aaggaattga cgggggcccg
cacaaagcgg ggagcatgcg gattanttcg atgcaacgcg aagaacctta cctgggttgg
acatogccgg aaatocctca gagatggggg gtccttcggg gccggtgaca ggtggtgcat
ggctgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt
gttcgatgtt gccagcgcgt tatggcgggg actcatcgaa gactgccggg gtcaactcgg
aggnaaggtg ggatgacgtc aagtcacat gcccttatg tccagggctt cagcagatgt
acaatggccg gtacagtggt ctgcgatacc gtgaggtgga gcgaatccca aaaagccggt
ctcagttcgg atcgggggtc gcaactcgac cccgtgaagt cggagtcgct agtaactgca
gatcagcaac gctgcgggtg atacgttccc gggccttgtc cacaccgccc gtcacgtcac
gaaagtccgc aacaccgaa gccggtggtc taacccttgt ggggggagcc gtcgaaggtg
gggctggcga ttgggacgaa gtcgtaacaa ggtagccgt

```

y se halló que poseen un nucleótido de firma adicional (posición 1456) que también es característico de este grupo (Tabla 3). Los análisis filogenéticos de secuencias alineadas de estas cepas indican que forman un clado distinto y coherente dentro de Micromonosporaceae (Figura 2). Los nucleótidos de firma unifican este clado y un alto valor de arranque soporta la clara separación de los nueve géneros actualmente descritos dentro de la familia.

Nucleótidos de firma rARN 16S. Los nucleótidos de firma rARN 16S para el género *Salinospora* y los nueve géneros actualmente aceptados dentro de Micromonosporaceae se muestran en la Tabla 3. 45 diversos aislados de *Salinospora* se secuenciaron parcialmente y se confirmó que tenían los cuatro nucleótidos de firma en las posiciones 207-468. El nucleótido de firma en la posición 1456 se descubrió después de 3 secuenciaciones posteriores del gen de rARN 16S de diversos (20) aislados de *Salinospora*. Son firmas originales observadas en este estudio (además de aquellas previamente publicadas por Koch et al. 1996) que definen la coherencia del clado de *Salinospora* y lo separan de otros miembros de la familia. Los nucleótidos de firma se alinearon en las posiciones de *E. coli* 27-1492 usando todos los miembros existentes de Micromonosporaceae en el proyecto de la base de datos ribosomal. Los miembros del género *Salinospora* muestran máxima homología con *Micromonospora olivasterospora* (97,1-97,7% de similitud), el miembro más profundamente arraigado de ese género, con el que comparten ocho de las doce posiciones de nucleótido de firma previamente publicadas. Así, las cepas de *Salinospora* divergen mucho más de su vecino filogenético más cercano que el género *Verrucosipora gifomensis* recién descrito que muestra el 98,0% de similitud con *Micromonospora olivasterospora* y comparte 11 de 12 nucleótidos de firma previamente publicados.

Se llevó a cabo un estudio de seguimiento en las Bahamas para determinar la persistencia del grupo de *Salinospora*. De 20 muestras recolectadas de cuatro transectos (0-30 m), se observaron 355 actinomicetos y más del 90% de estas morfologías características mostradas de *Salinospora* sugerían que este grupo puede ser el actinomiceto numéricamente dominante en los sedimentos marinos. De las observadas, 100 cepas se aislaron para posterior estudio. Los números promedio de unidades formadoras de colonias de *Salinospora* (cfu) variaban de 1,2-2,3 x 10³ cfu/ml de sedimento. Más del 50% de los aislados de *Salinospora* aparecieron en un medio nutriente bajo (M4) indicando la importancia de usar técnicas de aislamiento apropiadas. Treinta representantes de ocho diferentes morfotipos de colonias se secuenciaron parcialmente y el aislado más filogenéticamente diverso (CNH898) se secuenció caso en su totalidad (número de acceso a GenBank AY040622, SEQ ID No. 5,

```

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgagc
ggaaaggccc ttcgggggtac tcgagcggcg aacgggtgag taacacgtga gtaacctgcc
ccaggctttg ggataacccc gggaaaccgg ggctaatacc ggatatgact ggctgcccga
tggtggttgg tggaaagatt ttttggcttg ggaatgggctc gcggcctatc agcttgttgg
tggggtgatg gcctaccaag gcggcgacgg gtagccggtc tgagagggcg accggccaca
ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat cttgcacaat
gggcggaagc ctgatgcage gacgccgctg gagggatgac ggccttcggg ttgtaaactc
ctttcagcag ggaaggaagc tttgtgacgg tacctgcaga agaagcggcg gccaaactacg
tgccagcagc cgcggttaaga cgtagggcgc aagcgttgtc cggatttatt gggcgtaaaag
agctcgtagg cggcttctgc cgtcactgtg gaaaaccctg ggctcaactg cgggcttga
gtcgtatcgg gcaggataga gttcggtagg ggagaactgga attcctggtg tagcggtgaa
atgagcagat atcaggagga acaccggtgg cgaaggcggg tctctggggc gatactgacg
ctgaggagcg aaagcgtggg gagcgaacag gattagatac cctggtagtc cacgctgtaa
acgttgggcg ctagggtgtg ggagcctctc cggttctctg tgccgcagct aacgcattaa
gcgcccgcgc tggggagtac ggccgcaagg ctaaaactca aaggaattga cgggggcccg
cacaagcggc ggagcatgag gattaattcg atgcaacgag aagaacctta cctgggtttg
acatcgccgg aatccttca gagatggggg gtccttcggg gccggtgaca ggtggtgcat
ggctgtcgtc agctcgtgtc gtgagatggt gggttaagtc ccgcaacgag cgcaccctt
gttcgatggt gccagcgcgt tatggcgggg actcatcga gactgcccgg gtcaactcgg
aggaaggtgg ggatgacgtc aagtcactat gcccttatg tccagggctt cacgcatgct
acaatggccg gtacaatggg ctgagatacc gtgaggtgga gcgaatcca aaaagccggt
ctcagttcgg atcggggtct gcaactcgac cccgtgaagt cggagtcgct agtaatcgca
gatcagcaac gctgagggtga atacgttccc gggcettgta cacaccgcc gtcacgtcac
gaaagtcggc aacaccgaa gccgggtggc taaccottgt ggggggagcc gtcgaaggtg
gggctggcga ttgggacgaa gtcgtaacaa ggtagccgt
    
```

).

Tabla 3.

| Posición de nucleótido relativo OF ARN 16S de E. coli | Todos los otros géneros de Micromonosporaceae | <i>Salinospora</i> | Posición de nucleótido de Y040619*, AY040620 y AY040622 |
|--|---|--------------------|---|
| 207 | (U/C) | A | 198 |
| 366 | (A/G) | C | 351 |
| 467 | (A/G) | U | 442 ó 443* |
| 468 | A | U | 443 ó 444* |
| 1456 | A | G | 1423 ó 1424* |

5 Una examinación de 30 actinomicetos con características morfológicas de *Salinospora* que se aislaron de las Bahamas en 1989 (Jensen et al, 1991) reveló que todas excepto dos de estas cepas tenían una exigencia absoluta de agua de mar (Na⁺) para crecer. Diez cepas que requerían agua de mar que representan seis diferentes morfotipos se secuenciaron parcialmente y se halló que poseen los cinco nucleótidos de firma de *Salinospora* entre las posiciones 207-468 (Tabla 3). La secuencia de rADN 16S casi completa de dos de ellas (CNB440 y CNB536, números de acceso a GenBank AY040617 y AY040618, respectivamente) indica que son diversos miembros del clado de *Salinospora* (Figura 2). Así, las cepas que pertenecen a este nuevo taxón fueron aislados de sedimentos de las Bahamas cercanos a la costa en tres ocasiones separadas durante un período de 11 años, lo que indica que son miembros persistentes de la comunidad bacteriana de los sedimentos.

15 Se halló que las dos cepas que no requerían agua de mar para el crecimiento (CNB394 y CNB512) pero que tenían morfologías de colonias similares a *Salinospora* carecían de las firmas de *Salinospora* en la Tabla 3. Los análisis del rADN 16S casi completo observaron incluso bajas cantidades de Micromonosporaceae (aproximadamente 2%), sin embargo, ninguna de ellas requirió agua de mar para el crecimiento. La incapacidad para recuperar cepas de *Salinospora* de muestras supralitorales sustenta la observación de que estas bacterias se restringen al ambiente marino.

20 Para determinar si los miembros de *Salinospora* tenían una mayor distribución, se recolectaron sedimentos del Mar Rojo y del Mar de Cortez. De 42 muestras de sedimento del Mar Rojo, se obtuvieron 22 aislados con morfologías de *Salinospora* y una exigencia absoluta de agua de mar para el crecimiento. Seis aislados que representan 4 mayores morfotipos se secuenciaron parcialmente y la secuencia de rADN 16S casi completa de una cepa (CNH725, número

de acceso a GenBank AY040621) está representada en la Figura 2. De 36 sedimentos recolectados en el Mar de Cortez, se aislaron 20 cepas de actinomicetos que requieren agua de mar y todas ellas poseían características morfológicas de *Salinospora*. Ocho cepas que representan cinco diferentes morfotipos se secuenciaron parcialmente y el aislado filogenéticamente diverso CNH964 (número de acceso a GenBank AY040625) se secuenció caso en su totalidad (Figura 2). Estos resultados indican claramente que los miembros de *Salinospora* se distribuyen ampliamente en los sedimentos marinos.

Los análisis filogenéticos y las características fisiológicas indican que el clado de *Salinospora* representa un nuevo género dentro de la familia Micromonosporaceae. A pesar de que es improbable que la diversidad dentro de este género se haya revelado en el presente estudio, la similitud de la secuencia intragrupo de rADN 16S (98,6%) y una robusta topología del clado indican que este género está compuesto por múltiples especies (Figura 2). La ubicación del género *Salinospora* dentro de la familia Micromonosporaceae está soportada por la presencia de un grupo completo de nucleótidos de firma rADN 16S específicos de la familia (Stackelbrandt, 1997).

A pesar de la evidencia de que los actinomicetos se pueden recuperar de sedimentos en la profundidad del océano, sólo se describió una especie marina (Helmke y Weyland, 1984) y la inclusión de este grupo dentro de la microflora marina autóctona no fue aceptada ampliamente (Bull et al., 2000). Nuestros datos proporcionan la primera evidencia conclusiva para la difusión y la presencia persistente en sedimentos marinos de poblaciones únicas de actinomicetos marinos obligados. La evidencia filogenética y fisiológica indica que estos actinomicetos comprenden un nuevo taxón y se ha propuesto el epíteto genérico de *Salinospora* gen. nov. Las cepas de *Salinospora* son una fuente prolífica de metabolitos secundarios biológicamente activos que son de utilidad para una variedad de aplicaciones.

Ejemplo 1

Recolección de muestras y aislamiento bacteriano. Las muestras de 1 cm de sedimento superior se recolectaron con SCUBA y se procesaron por estampado, dilución o choque térmico o ambos procedimientos. La dilución y el choque térmico se llevó a cabo de la siguiente manera: 1 ml de sedimento húmedo se añadió a 4 ml de agua de mar estéril, se calentó durante seis minutos a 55 °C, se agitó vigorosamente y las diluciones de 10^{-2} a 10^{-4} se inocularon en medio de agar (M1-M4). Para el estampado, se colocaron asépticamente 10 ml de sedimento húmedo en un plato de aluminio estéril, se secaron (aproximadamente 24 horas) en una campana de flujo laminar, se molieron ligeramente con un mortero, se presionaron en un tapón de espuma estéril (14 mm de diámetro) y se inocularon en medio de agar (M1-M4) por estampado 8-9 veces en sentido horario para dar un efecto de dilución serial. Se prepararon medios de aislamiento con 100% de agua de mar natural filtrada. Los actinomicetos aparecían en general después de 4-6 semanas de incubación a 25-28 °C y fueron considerados como cualquier colonia con una textura de cuero resistente, un aspecto seco o con pliegues y filamentos ramificados con o sin micelios aéreos. Todos los medios de aislamiento tenían concentraciones finales de 100 microgramos/ml de cicloheximida y 5 microgramos/ml de rifampicina añadidas después de autoclave.

Los medios se prepararon por medio de procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica y todos contenían agua de mar. Las recetas de los medios son las siguientes: M1: 10 gramos de almidón, 4 gramos de extracto de levadura, 2 gramos de peptona, 18 gramos de agar, 1 litro de agua de mar natural; M2: 6 ml de glicerol, 1 gramo de arginina, 1 gramo de K_2HPO_4 , 0,5 gramos de $MgSO_4$, 18 gramos de agar, 1 litro de agua de mar natural; M3: 6 gramos de glucosa, 2 gramos de quitina solubilizada, 18 gramos de agar, 1 litro de agua de mar natural; M4: 2 gramos de quitina solubilizada, 18 gramos de agar, 1 litro de agua de mar natural; M5: 18 gramos de agar, 1 litro de agua de mar natural.

Ejemplo 2

Purificación de ADN, amplificación, secuenciación y análisis filogenético.

Se preparó el ADN genómico de la siguiente manera: 10 mg de micelios vegetativos crecidos en agar M1 se maceraron durante 2-4 semanas a 25-28 °C y se precipitó un lisado clarificado acuoso creado por medio de procedimientos estándar con 0,7 volúmenes de isopropanol. El pellet de ADN resultante se lavó luego con 70% de etanol y se resuspendió en 10 mM de tampón de Tris (pH 8,5) hasta una concentración final de 100 ng/ml. Se amplificaron las plantillas de secuenciación de rADN 16S a partir de 10-50 ng de la plantilla de ADN genómico por PCR usando los cebadores FC27 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) (SEQ ID 1) y RC1492 (5' TACGGCTACCTTGTTACGACTT) (SEQ ID 2). Los productos de PCR se purificaron con un kit Qiagen QIAquick PCR clean-up kit usando los protocolos del fabricante. Se obtuvieron secuencias parciales de cepas morfológicamente diversas de nucleótidos 80-480 (sistema de numeración de *E. coli*) usando el cebador FC27. Se secuenciaron amplicones seleccionados de rADN 16S casi en su totalidad tanto en la cadena superior como inferior usando un total de diez cebadores. Los diez contigios se reunieron luego para dar secuencias gónicas de 1479 a 1483 nucleótidos no ambiguos. Se excluyeron las regiones hipervariables en las secuencias de rADN 16S para dar un total de 1408 nucleótidos alineados. Se calcularon valores de similitud de rADN 16S por medio del análisis en línea de matriz de similitud de RDP y se compararon con los tres vecinos más cercanos en la base de datos RDP. Las secuencias se alinearon a la estructura secundaria de miembros de los Micromonosporaceae en RDP (Maidak et al, 2001) usando el software BioEdit (Hall, 1999). Se realizaron análisis filogenéticos usando los algoritmos a base de unión de vecinos y parsimonia en los paquetes de software Clustal W y PHYLIP, respectivamente (Thompson et

al., 1994; Felsenstein, 1993). El dendograma (Figura 2) se trazó usando Treeview 1.6.1 (Page, 1996).

Ejemplo 3

Análisis genético por reacción en cadena de polimerasa palindrómico extragénico repetitivo (REP-PCR).

5 La diversidad genética de cepas de *Salinospora* se analizó usando REP-PCR (Versalovic et al., 1991). Esta técnica, al aplicarla al grupo de *Salinospora*, implica el uso de ADN genómico total como una plantilla y cebadores de PCR específicos de secuencias repetitivas presentes en los genomas de alto contenido de G+C de bacterias Gram-positivas. La longitud de los productos de PCR para cualquier cepa variará con la posición de las secuencias repetitivas en el genoma y resulta en una población de amplicones de diversas longitudes que cuando se separan en un gen de agarosa gel crean patrones de banda específicos de la cepa. Este procedimiento de alto rendimiento
10 permite la detección de cepas genéticamente distintas y es más sensible que los análisis génicos de rARN 16S como un procedimiento para evaluar la diversidad genética. Los patrones de banda de REP-PCR se usan para clasificar cepas en distintos grupos que pueden producir diferentes productos génicos. El agrupamiento de cepas en base a patrones de banda de REP-PCR se correlaciona bien con grupos a base de la producción de metabolitos secundarios.

15 Ejemplo 4

Producción y aislamiento de productos útiles.

Se cultivaron cepas de *Salinospora* en múltiples medios a base de agua marina incluyendo M1 y CKA (almidón 5 g, hidrosolubles de pescado 4 ml, comida de sábalo 2 g, algas en polvo 2 g, quitosano 2 g, agua de mar 1 L). Una resina adsorbente (XAD-16) se añadió a la fermentación 24 horas antes de la cosecha (día 11). La resina se recolectó por filtración, se enjuagó con agua desionizada y se eluyó con acetona. De modo alternativo, se recolectaron células por filtración, se liofilizaron y se extrajeron con acetona. El extracto se concentró por evaporación rotativa y el residuo se sometió a cromatografía flash C-18 seguido de HPLC. Las estructuras de nuevos productos de fermentación se resolvieron usando una variedad de procedimientos incluyendo RMN uni- y bidimensional y espectroscopia de masa.
20

25 Ejemplo 5

Ensayo antibacteriano.

Se ensayaron extractos de cepas cultivadas de *Salinospora* usando procedimientos estándar para demostrar su actividad antibiótica contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. El procedimiento usado para ensayar contra *Stafilococcus aureus* se detalla a continuación. Se usan procedimientos similares para ensayar la actividad antimicrobiana contra otros organismos. Los extractos se compararon con antibióticos conocidos y se determinaron los niveles de actividad relativos. Los extractos con una potente actividad antibiótica se analizaron luego respecto de la presencia de nuevos metabolitos.
30

Brevemente, se dejaron crecer cultivos de *S. aureus* durante la noche en fase estacionaria. La cantidad de bacterias por ml se calculó y se plantaron una cantidad uniforme de bacterias en cavidades individuales que contenían medio fresco. Se añadieron los compuestos de interés, incluyendo agentes antibióticos conocidos (por ejemplo, oxacilina en DMSO a 0,04 mg/mL) a una fila simple de cavidades y se diluyeron serialmente en la placa para determinar la concentración requerida para matar a las bacterias. Se incubaron las placas durante la noche a 37 °C para permitir el crecimiento de células. Se leyeron las muestras en un lector de placas automatizado a 600 nm y se determinaron las concentraciones de MIC.
35

40 Ejemplo 6

Ensayo antifúngico. Se ensayaron extractos de cepas cultivadas de *Salinospora* usando procedimientos estándar para demostrar la actividad antifúngica contra *Candida albicans*. Se compararon los extractos con antibióticos conocidos y se determinaron sus actividades relativas. Luego se analizaron los extractos con una potente actividad antifúngica respecto de la presencia de nuevos metabolitos.

45 Brevemente, se dejó crecer un cultivo de *C. albicans* durante la noche en fase estacionaria. Se calculó la cantidad de células por ml y la suspensión se diluyó y se añadió a cavidades individuales de placas de 96 cavidades. Se añadió Alamar blue a cada cavidad como un indicador de viabilidad. Los extractos de ensayo se añadieron a una fila simple de cavidades y se diluyeron serialmente en la placa para determinar la concentración requerida para matar las células fúngicas. Los agentes antifúngicos conocidos como anfotericina se usaron como un control. Se incubaron las placas durante 12-15 horas a 37 °C. Se determinaron las concentraciones celulares usando un lector de placas automatizado a 600 nm y se determinaron las concentraciones de MIC.
50

Ejemplo 7

Ensayo de la inhibición de crecimiento de células de carcinoma de colon y células de cáncer de ovario in vitro.

La citotoxicidad de los extractos de células o medios de cultivo se evaluaron in vitro contra la línea celular de carcinoma de colon humano HCT116 y la línea celular de carcinoma ovárico humano A2780 por ensayo de MTS. Las células se plaquearon a 4.000 células por cavidad en placas de microlitros de 96 cavidades y, después de 24 horas, se añadió el extracto (disuelto en DMSO u otro disolvente apropiado) y se diluyó serialmente. Las células se incubaron con el compuesto a 37 °C durante 72 horas, luego se añadió tintura de tetrazolio MTS a una concentración final de 333 µg/ml y se añadió el agente de acoplamiento de electrones metosulfato de fenazina a una concentración final de 25 µM. Una vez reducido, MTS se convirtió en un formazano de cristal azul insoluble en agua y que se leyó a una absorbancia a 490 nm con un lector de microplacas. Como las células muertas eran incapaces de reducir MTS, la cantidad de formazano se correlaciona con la cantidad de células viables. La IC₅₀, la concentración de fármaco requerida para inhibir la proliferación del 50% de las células, se usó como una medida de eficacia.

Ejemplo 8

Ensayo del Anti-Herpes Simplex Virus (HSV-1).

También se puede determinar la actividad antiviral usando un ensayo MTS. Se plaquearon las células vero en placas duplicadas de 96 cavidades para la infección con virus y control de citotoxicidad. Se incubó una placa de cavidades con virus durante una hora a 37 °C. Ambas placas se cubrieron con una serie de concentraciones del extracto de interés y las placas se incubaron durante cinco días. La solución de MTS se añadió a las placas y las placas se incubaron durante tres horas tal como se describió con anterioridad. La absorbancia a 490 nm se leyó con un lector de microplacas y se correlacionaron con la actividad antiviral y la toxicidad celular.

Ejemplo 9

Mutagénesis química de cepas de Salinospira para generar cepas superproductoras.

La mutagénesis química de cepas de *Salinospira* se puede llevar a cabo para generar cepas que sobreproducen un producto deseado. Por ejemplo, una cepa que produce un antibiótico a un bajo nivel se trata con etilmetilsulfonato (EMS) durante la fase de crecimiento mid-log. Los cultivos mutagenizados se sembraron en placas para permitir el aislamiento de clones individuales. A partir de los clones individuales, se dejan crecer los cultivos y se aísla el antibiótico en forma cruda o pura. Los rendimientos relativos de los compuestos de interés producidos por las cepas mutagenizadas se comparan con la cepa original para seleccionar una cepa sobreproducida.

Ejemplo 10

Expresión de genes heterólogos. Las cepas de actinomicetos fueron de utilidad como huéspedes para la producción de metabolitos secundarios de otros organismos de crecimiento más lento (Tang, et al., 2000). Los genes, ya sea solos o en grupos, se pueden expresar en cepas de *Salinospira* para la producción de proteínas o metabolitos secundarios. Los procedimientos para transferir ácidos nucleicos en bacterias son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Ejemplo 11

Aislamiento y expresión de grupos de genes. La síntesis de una cantidad de antibióticos de actinomicetos (por ejemplo, actinorrodina, frenolicina, granaticina, griseusina, octatetraciclina y tetracenomicina) se producen por genes en grupos de policeturo sintetasa (PKS) (Hopwood, 1995). Los genes de PKS se clasifican en dos tipos de proteínas multifuncionales grandes. En genes PKS de tipo I, el sustrato progresa a través de una cantidad de sitios activos en una proteína simple. En genes PKS de tipo II, se producen complejos multiproteína y el sustrato progresa de una proteína a la otra. Los genes PKS de tipo II se clonaron y expresaron en sistemas heterólogos, ya sea en sus agrupamientos nativos o en nuevas combinaciones. La combinación de genes para la síntesis de metabolitos secundarios de *Salinospira* con genes de otros actinomicetos proporciona un nuevo procedimiento de química combinatoria biológicamente asistida que puede llevar a la producción de nuevas moléculas pequeñas. Además, los genes biosintéticos de *Salinospira* se pueden mezclar y expresar en un huésped heterólogo que lleva a la producción de nuevos metabolitos. Los genes PKS no son los únicos que se producen en módulos. Por ejemplo, las péptido sintetasa no ribosomales también son modulares y están presentes con frecuencia en los actinomicetos. Los grupos de genes biosintéticos del nuevo grupo de *Salinospira* se pueden usar como materia prima genética para la expresión de nuevas moléculas en cepas heterólogas o para la sobreproducción de productos génicos nativos y recombinantes.

Ejemplo 12

Ensayo para la actividad antiinflamatoria. Se ensayan extractos de cultivos de *Salinospira* midiendo la inhibición de inflamación inducida por forbol (edema) en un ensayo en la oreja del ratón. Este es un ensayo convencional que fue aceptado por demostrar la eficacia de un compuesto en la reducción de la inflamación. El compuesto se aplica tópicamente en acetona a los pabellones internos de las orejas de los ratones en una solución que contenía un irritante que causa edema, es decir, 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA). Se aplica PMA solo (2 microgramos por oreja) o en combinación con diversas cantidades del extracto a la oreja izquierda (5 ratones por grupo de

tratamiento) mientras que una acetona (control) se aplica a la oreja derecha. Después de una incubación de 3 horas y 20 minutos a 23 °C, los ratones se sacrifican, las orejas se retiran y se hacen perforaciones y se pesan. El edema se mide sustrayendo el peso de la oreja derecha (control) del peso de la oreja izquierda (tratamiento). Los resultados se registran como una reducción en porcentaje (inhibición) o aumento en porcentaje (potenciación) en el edema respecto a PMA.

Ejemplo 13

Ensayo de inhibición de enzimas. Los extractos de cepas de *Salinospora* se pudieron ensayar respecto de su capacidad para inhibir la actividad enzimática. Los extractos se pudieron preparar tal como se describió con anterioridad y se añadieron diluciones seriales del extracto a las mezclas de enzima-sustrato para determinar una IC₅₀ para la reacción.

Ejemplo 14

Ensayo de actividad enzimática. Los ensayos de la actividad enzimática se pueden llevar a cabo por crecimiento de cepas de *Salinospora* en presencia de sustratos de interés incluyendo, pero sin limitación, quitina, lignina, celulosa y otros biopolímeros recalcitrantes, etc. Según el sustrato, los ensayos se pueden llevar a cabo para determinar la cantidad de sustrato residual o la cantidad de producto generado.

Ejemplo 15

Ensayo de protección de agricultura/acuicultura. Los ensayos para la protección de plantas de agentes patógenos y mejora del crecimiento general se pueden llevar a cabo en un ensayo en invernadero estándar. La cepa de interés se puede aplicar a la planta directamente o se puede incorporar al medio de crecimiento. Las plantas se podían estimular sometiéndolas a un gen patógeno y comparando su crecimiento con los grupos de control tratados con un patógeno solo, tratados con una cepa de *Salinospora* sola o no tratados. Las tasas de crecimiento se pudieron comparar para seleccionar las cepas con las actividades deseadas.

A pesar de haber descrito una forma de realización ejemplar de la invención de modo ilustrativo solamente, los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar modificaciones a la forma de realización revelada sin apartarse del alcance de la invención, que está definido por las reivindicaciones adjuntas.

Referencias

Bull, A. T., A. C. Ward y M. Goodfellow. 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: The paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64:573-606.

Felsenstein, J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) versión 3.5c. (Distribuido por el autor. Departamento de Genética, Universidad de Washington, Seattle., 1993).

Goodfellow, M. y J. A. Haynes. 1984. Actinomycetes in marine sediments, p. 453-472. En L. Ortiz-Ortiz, L. F. Bojalil y V. Yakoleff (ed.), *Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes*. Academic Press, Inc. Orlando.

Goodfellow M. y S. T. Williams. 1983. Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37:189-216.

Helmke, E. y Weyland, H. 1984. *Rhodococcus marinonascens* sp. nov., an actinomycete from the Sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:127-38.

Hopwood, D. A. 1995. Genetic manipulation of *Streptomyces* polyketide synthase genes for novel secondary metabolite production. *FEMS Microbiol. Rev.* 16:233-4.

Jensen, P. R., Dwight, R. y Fenical, W. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1102-8.

Koch, C., R. M. Kroppenstedt, F. A. Rainey y E. Stackebrandt. 1996. 16S ribosomal DNA analysis of the genera *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Catellatospora*, *Catenuloplanes*, *Couchioplanes*, *Dactylosporangium* and *Pilimelia* and emendation of the family *Micromonosporaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 46:765-768.

Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12, 357-358.

Stackebrandt, E., F. A. Rainey y N. L. Ward-Rainey. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis nov.* *International Journal of Systematic Bacteriology.* 47:479-491.

Takizawa, M., Colwell, R. R. & Hill, R. T. 1993. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 997-1002.

Tang, L., Shah, S., Chung, L., Carney, J., Katz, L., Khosla, C. y Julien, B. 2000. Cloning and heterologous expression of the epotilone gene cluster. *Science.* 287:640-2.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

5 Versalovic, J., T. Koet y J. R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19:6823-6831.

Weyland, H. 1981. Distribution of actinomycetes on the sea floor. *Actinomycetes, Zbl. Bakt. Suppl.* 11:185-193.

Listado de secuencias

<110> Fenical, William Jensen, Paul R. Mincer, Tracy J

10 <120> TAXÓN DE ACTINOMICETO MARINO PARA EL DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS Y DE PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN

<130> 6627-PA1022

<150> 60/249.356

<151> 2000-11-16

<160> 2

15 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Escherichia coli

20 <400> 1

agagtttgat cctggctcag 20

<210> 2

<211> 22

<212> ADN

25 <213> Escherichia coli

<400> 2

tacggctacc ttgttacgac tt 22

REIVINDICACIONES

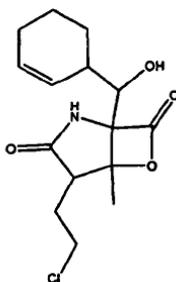
1. Un actinomiceto marino aislado de la cepa *Salinospora* que tiene una exigencia absoluta de sodio para el crecimiento, que comprende secuencias de ARN 16Sr tal como se establece en SEQ ID NO: 4 y 5.

5 2. Un actinomiceto marino aislado de la cepa *Salinospora con depósito en la ATCC N.º PTA-2501* o una de sus variantes o mutantes.

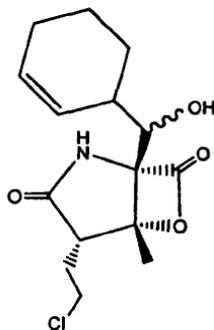
3. El actinomiceto marino aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cepa de *Salinospora* se obtiene del sedimento.

10 4. El actinomiceto marino aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende uno o varios nucleótidos de firma seleccionados del grupo que consiste en: U-A²⁰⁷, C-A²⁰⁷, A-C³⁶⁶, G-C³⁶⁶, A-U⁴⁶⁷, G-U⁴⁶⁷, A-U⁴⁶⁸ y AG¹⁴⁵⁶.

5. Un compuesto que tiene la estructura:



6. Un compuesto que tiene la estructura:



15 7. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un portador farmacéuticamente aceptable y un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6.

8. Una cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1-4 para su uso en el tratamiento de uno o más de cáncer, infección bacteriana e infección fúngica.

9. Un procedimiento para producir una biomolécula que comprende:

20 crecimiento de una cepa de un actinomiceto marino con una exigencia absoluta de sodio para el crecimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la biomolécula es producida por la cepa de *Salinospora*;

la recolección de la cepa de *Salinospora* o el medio de crecimiento con contenido de sodio que contiene la biomolécula; y

25 la extracción de la biomolécula de la cepa de *Salinospora* o el medio de crecimiento que contiene el medio, produciendo así la biomolécula.

10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la biomolécula es un agente farmacéutico.

11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el agente farmacéutico está seleccionado del grupo que comprende un agente antibiótico, un agente antifúngico y un agente anticáncer.

30 12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la biomolécula es un producto de un gen de un organismo heterólogo.

13. Un procedimiento para el descubrimiento de fármacos que comprende:

el crecimiento de una cepa de un actinomiceto marino con una exigencia absoluta de sodio para el crecimiento de acuerdo con la reivindicación 1;

5 la recolección de la cepa de *Salinospora* o el medio de crecimiento con contenido de sodio que contiene la biomolécula;

la extracción de la biomolécula de la cepa de *Salinospora* o el medio de crecimiento que contiene el medio; y

el análisis de la biomolécula o el medio de crecimiento que contiene sodio respecto de la actividad farmacológica.

14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el análisis de la biomolécula comprende un ensayo seleccionado del grupo que comprende un ensayo respecto de la actividad antibacteriana, un ensayo respecto de la actividad antiviral, un ensayo respecto de la actividad anticáncer y un ensayo respecto de la actividad antifúngica.

15. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes 9-14, en el que, al recolectar el medio de crecimiento, la concentración del sodio del medio de crecimiento es de 450 mM.

16. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes 5 ó 6 o una composición de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento de uno o más de cáncer, infección bacteriana e infección fúngica.

Figura 1

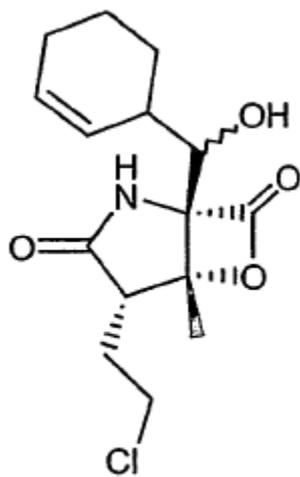


Figura 2

