

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 645**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

C12R 1/465 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2014 PCT/KR2014/012457**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15093839**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014 E 14871523 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 3085772**

54 Título: **Nueva variante de Streptomyces filamentosus y método para producir daptomicina utilizando dicha variante**

30 Prioridad:

18.12.2013 KR 20130158715

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

10.10.2018

73 Titular/es:

**DONG KOOK PHARM. CO., LTD (100.0%)
7 Teheran-ro 108-gil
Gangnam-gu, Seoul 135-502, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, KANG HEE;
LEE, KYE WAN y
CHA, KYUNG HOI**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 685 645 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

Nueva variante de *Streptomyces filamentosus* y método para producir daptomicina utilizando dicha variante

5 [Campo técnico]

[0001] La presente divulgación se refiere a una nueva cepa de *streptomyces filamentosus* con productividad de daptomicina mejorada, y un método para producir daptomicina usando dicha cepa.

[Antecedentes de la técnica]

10 [0002] En todo el mundo, el mal uso o el abuso de antibióticos para tratar infecciones bacterianas ha llevado al rápido crecimiento de bacterias mutantes, lo que aumenta el interés por desarrollar nuevas clases de antibióticos que tengan una excelente eficacia como alternativas a los fármacos existentes. Entre ellos, la daptomicina es un material lipopéptido cíclico producido como metabolito secundario por un actinomiceto del suelo, *streptomyces filamentosus*, también llamado *Streptomyces roseosporus*. La daptomicina tiene una estructura que consta de 13 aminoácidos y el acoplamiento de la cadena lateral de decanoilo al triptófano N-terminal. En la actualidad, la daptomicina está aprobada como un agente terapéutico para las infecciones complicadas de la piel y la estructura de la piel (cSSSI) de patógenos gram-positivos. Debido a una estructura peculiar del antibiótico lipopéptido cíclico, la daptomicina se une a la pared celular de las bacterias gram-positivas para causar la despolarización. La daptomicina es un agente de acción rápida que tiene una excelente actividad bactericida, pero depende de la importación en la cantidad total.

15 [0003] En general, las cepas de tipo salvaje aisladas de fuentes naturales muestran baja productividad y generan materiales similares en complejos y, por lo tanto, no son adecuadas para la producción de los antibióticos deseados. En consecuencia, existe demanda de un método capaz de producir antibióticos con un alto rendimiento. Se informó de que una cepa de *streptomyces filamentosus* con productividad de daptomicina mejorada se puede desarrollar mediante ingeniería de ribosomas con el fin de aumentar la productividad de daptomicina (Biomed Res Int. 2013, 2013, Artículo ID 479742) Sin embargo, este método se usa para desarrollar una cepa cuya productividad de daptomicina solo se mejora en aproximadamente un 30 %, en comparación con una cepa progenitora de la misma. Por consiguiente, sigue existiendo una demanda de una cepa que tenga una productividad de daptomicina notablemente mejorada.

25 [Divulgación]

[Problema técnico]

35 [0004] Los presentes inventores han realizado muchos esfuerzos para desarrollar una cepa que tenga una productividad de daptomicina mejorada, en comparación con una cepa de tipo salvaje de la misma. Como resultado, los presentes inventores desarrollaron una nueva cepa mutante de *streptomyces filamentosus* que tiene una productividad de daptomicina 12 veces mayor que la de la cepa de tipo salvaje, y también descubrieron que es posible la producción comercial de daptomicina a gran escala optimizando el método para producir daptomicina usando esta cepa, completando así la presente invención.

40 [Solución técnica]

[0005] Un objetivo de la presente invención es proporcionar una cepa de *streptomyces filamentosus* de número de acceso KCTC12267BP, en el que la cepa tiene una productividad de daptomicina.

45 [0006] Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un uso de la cepa en la producción de daptomicina.

[0007] Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar un método para producir daptomicina usando la cepa.

50 [Efectos ventajosos]

[0008] Una cepa DKB108 de *streptomyces filamentosus* según la presente invención tiene una alta productividad de daptomicina enormemente mejorada, proporcionando de ese modo daptomicina pura aplicable a ingredientes farmacéuticos activos mediante fermentación en tanques a gran escala. En consecuencia, se espera que la cepa tenga un gran efecto dominó en los mercados nacionales y extranjeros de fármacos contra bacterias resistentes gram-positivas, cuya cantidad total depende de la importación debido a una estructura de mercado monopolística.

[Descripción de los dibujos]

[0009]

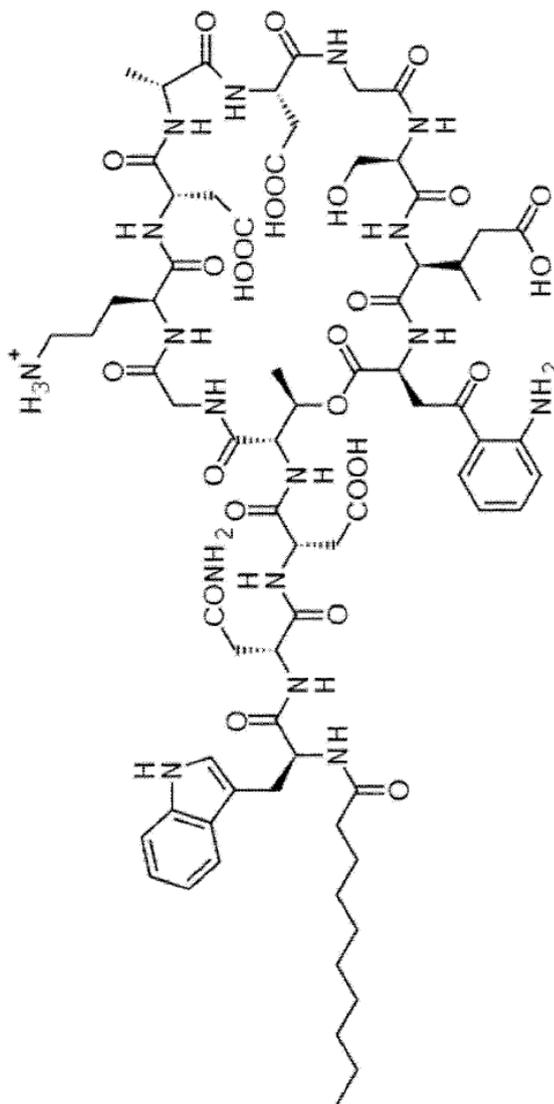
FIG. 1 es una imagen que muestra la morfología de DKB108 de la presente invención; y
 FIG. 2 muestra cambios en la masa celular (volumen de micelios empaquetados, PMV), la concentración de
 5 daptomicina y el pH a lo largo del tiempo, cuando se cultiva DKB108 de la presente invención en un medio y
 temperatura optimizados.

[Mejor modo]

[0010] Un aspecto de la presente invención proporciona una cepa de *streptomyces filamentosus* de número de
 10 acceso KCTC12267BP, en el que la cepa tiene una productividad de daptomicina.

[0011] Tal como se usa en este documento, el término «daptomicina» se refiere a un antibiótico lipopéptido
 usado para el tratamiento de infecciones sistémicas potencialmente mortales causadas por bacterias gram-
 positivas. La daptomicina es un miembro del tipo de antibióticos factor A-21978C0 y tiene la estructura de la
 siguiente fórmula química 1, en la que un resto lipídico unido covalentemente a un resto peptídico está
 15 compuesto de una cadena lateral de decanoilo. La daptomicina es uno de los compuestos naturales que se
 encuentran en una bacteria saprófita del suelo, *streptomyces filamentosus*. Además, la daptomicina es un
 compuesto antibiótico de eficacia comprobada que está aprobado como agente terapéutico para las infecciones
 complicadas de la piel y la estructura de la piel (cSSSI) de patógenos gram-positivos.

[Fórmula química 1]



[0012] La daptomicina es un antibiótico contra las bacterias gram-positivas. Su efecto bactericida es excelente,

pero existe una dificultad en su producción de alto rendimiento. En consecuencia, en la presente invención, como cepa progenitora, ATCC 31568 *streptomyces filamentosus* con productividad de daptomicina, pero productividad baja, se somete a radiación UV y a mutación NTG, preparando así una nueva cepa mutante *streptomyces filamentosus*. La productividad del antibiótico daptomicina se examinó midiendo una zona de inhibición del crecimiento de una cepa indicadora de *Staphylococcus aureus*, es decir, aplicando un caldo de cultivo del microorganismo a un pozo de agar para examinar el efecto. A continuación, se seleccionaron cepas mutantes de alta calidad. Además, las distribuciones del título de las cepas mutantes así seleccionadas se midieron de manera continuada para bloquear la regresión de la productividad de las cepas mutantes de alta calidad debido a la mutación espontánea. Las cepas mutantes, de las que se verifica su seguridad, se sometieron repetidamente a una mutación artificial para seleccionar cepas mutantes con una productividad mejorada. Los presentes inventores designaron la cepa seleccionada como DKB108, que se depositó en el Instituto Coreano de Investigación en Biociencia y Biotecnología el 20 de agosto de 2012, en virtud del Tratado de Budapest con el número de acceso KCTC12267BP (ejemplo 1). La DKB108 es una cepa que tiene una productividad de daptomicina 12 veces mayor que la de la cepa progenitora, ATCC 31568. La DKB108 produce daptomicina a una concentración de 0,48 g/l y también mantiene una productividad de daptomicina alta y estable incluso aunque el subcultivo se realice varias veces (ejemplo 4). Tras la fermentación en tanque, la concentración de producción fue 2,75 g/l sin un gran cambio en el número de microorganismos vivos incluso a las 209 horas después del cultivo (ejemplo 5) y, por lo tanto, la cepa DKB108 de la presente invención se puede aplicar de forma útil a la producción comercial de daptomicina. DKB108 y KCTC12267BP pueden usarse indistintamente, en la presente invención.

[0013] La cepa DKB108 tiene (1) características morfológicas que muestran una forma ovalada similar a un cilindro dispuesto en cadenas, formación de esporas, gram positivas, formación de colonias gris rosado oscuro; (2) características fisiológicas de la tirosina hidrolasa -, ureasa +, amilasa +, caseinasa +, nitrato reductasa +, gelatinasa +, tolerancia NaCl 8,5 % +, formación de pigmento melanina en medio ISP-6 (-), formación de pigmento melanina en medio ISP- 7 (+); y (3) características de la utilización de la fuente de carbono: glucosa +, xilosa +, fructosa +, inositol -, lactosa -, sacarosa +, manitol +, arabinosa -, rafinosa +, galactosa +, manosa +.

[0014] Específicamente, la cepa DKB108 tiene características morfológicas que muestran una forma ovalada similar a un cilindro dispuesto en cadenas, formación de esporas y formación de colonias aeróbica, como la cepa progenitora, pero de color gris rosado más oscuro que la de la cepa progenitora.

[0015] La cepa DKB108 muestra las características fisiológicas provenientes de no tener tirosina hidrolasa y producir enzimas como ureasa, amilasa, caseinasa, amilasa, nitrato reductasa y gelatinasa, como la cepa progenitora, pero de sobrevivir en 8,5 % de NaCl, a diferencia de la cepa progenitora que no puede sobrevivir en 8,5% de NaCl. La cepa DKB108 tiene melanina negativa en medio ISP-6, al igual que la cepa progenitora, pero forma pigmentos solubles de color púrpura oscuro en el medio ISP-7, a diferencia de la cepa progenitora que forma pigmentos de color púrpura claro en el medio ISP-7.

[0016] En particular, la cepa DKB108 de la presente invención muestra la utilización de glucosa, xilosa, fructosa, sacarosa, manitol, rafinosa, galactosa y manosa como fuente de carbono en los patrones de utilización de fuentes de carbono, pero no utiliza inositol, lactosa y arabinosa como fuente de carbono. Existe una diferencia en los patrones de utilización de fuentes de carbono entre la cepa DKB108 y la cepa progenitora que utiliza lactosa como fuente de carbono. Es decir, la cepa DKB108 de la presente invención muestra color de colonia, tolerancia al cloruro sódico y utilización de fuentes de carbono diferentes de los de la cepa progenitora.

[0017] Otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de una cepa de *streptomyces filamentosus* de número de acceso KCTC12267BP en la producción de daptomicina.

[0018] La cepa de *streptomyces filamentosus* con n.º de acceso KCTC12267BP tiene productividad de daptomicina, por lo que se usa en la producción de la misma.

[0019] Otro aspecto más de la presente invención proporciona un método para producir daptomicina, que incluye el paso de cultivar la cepa de *streptomyces filamentosus* con número de acceso KCTC12267BP en un medio.

[0020] Además, el método puede incluir las etapas de cultivo de la cepa en un medio; y recuperación de daptomicina de la cepa o el medio cultivados.

[0021] Tal como se usa en el presente documento, el término «cultivo» se refiere al cultivo de un microorganismo en condiciones ambientales controladas artificialmente. Un medio usado para hacer crecer la cepa DKB108 de la presente invención puede ser cualquiera de los diversos medios de cultivo utilizados en la técnica. Sin embargo, para la viabilidad económica en la producción, el rendimiento óptimo y la fácil separación de un producto deseado de 12 o más impurezas relacionadas identificadas en productos de fermentación, es necesario optimizar una composición de medio adecuada para la producción usando un medio específico. Se pueden usar medios tales como glucosa, xilosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manosa, harina de semilla de

- algodón, polvo de soja, licor de maceración de maíz, extracto de levadura, levadura seca, oleato de metilo, ácido decanoico, glicerol, gluten, etc. en fermentación en tanque a gran escala para la producción de daptomicina. Como fuente de carbono preferida, se usa una mezcla de dextrina, melaza y glucosa. Como fuente de nitrógeno son útiles aminoácidos tales como levadura seca, polvo de soja, hidrato de soja, harina de semilla de algodón,
- 5 licor de maceración de maíz, gluten y ácido L-aspártico, pero se prefiere el extracto de levadura. Por ejemplo, cuando el extracto de levadura usado como fuente de nitrógeno se reemplaza por levadura seca similar al mismo, se aumenta la producción de las principales impurezas relacionadas de la daptomicina, y por lo tanto es difícil separar el producto deseado.
- 10 [0022] En lo sucesivo, las condiciones óptimas del medio y las condiciones de cultivo para maximizar la producción de daptomicina de la cepa DKB108 de la invención preestablecida son las siguientes.
- [0023] En el método para producir daptomicina de la presente invención, el cultivo inclinado, el cultivo de semillas y el cultivo principal pueden realizarse en este orden para el crecimiento efectivo de la cepa DKB108. Es preferible que una cepa almacenada se active por cultivo inclinado y cultivo de semillas, seguido de cultivo principal.
- 15 [0024] El cultivo inclinado es un método que usa un medio que se solidifica en una posición inclinada. Un medio utilizado en el cultivo inclinado puede incluir de 5 a 15 g/l de polvo de soja, de 2 a 6 g/l de extracto de levadura, de 2 a 6 g/l de glucosa, de 0,5 a 3,5 g/l de carbonato de calcio y de 15 a 20 g/l de agar.
- 20 [0025] El cultivo de semilla se refiere al cultivo de un microorganismo semilla, que se agrega en una pequeña cantidad para la inoculación de semillas cuando el microorganismo se cultiva utilizando una gran cantidad de medio. En la presente invención, el cultivo de semilla puede realizarse en un medio que incluye de 20 a 40 g/l de caldo de tripticasa de soja, de 20 a 50 g/l de dextrina y de 1 a 5 g/l de extracto de levadura.
- 25 [0026] El medio de cultivo principal para examinar la producción de daptomicina puede incluir de 5 a 10 g/l de melaza, de 5 a 15 g/l de glucosa, de 50 a 150 g/l de dextrina, de 5 a 15 g/l de extracto de levadura, de 2 a 10 g/l de gluten y de 0,5 a 5 g/l de sales minerales.
- 30 [0027] En la etapa de cultivo principal, se restringe la cantidad de inoculación del microorganismo semilla o se inocula la semilla del gránulo homogeneizado recultivado en las mismas condiciones para minimizar 12 o más impurezas relacionadas con daptomicina. Por ejemplo, cuando la cantidad de inoculación del caldo de cultivo de semillas de gránulos homogeneizado es de aproximadamente un 0,1 a un 2 % del volumen del medio de cultivo principal, la producción de las impurezas relacionadas disminuye enormemente.
- 35 [0028] La cepa DKB108 muestra una tasa de crecimiento muy alta y, por lo tanto, es necesario mantener las condiciones aeróbicas en el agua para la producción de daptomicina. En la fase de crecimiento dentro de las 48 horas posteriores al cultivo, la concentración de oxígeno disuelto debe mantenerse al 20 % o superior. La cepa DKB108 es un microorganismo típico del suelo que crece entre los 22 °C y 38 °C, preferiblemente entre 26 y 34 °C, y la temperatura óptima para la producción de daptomicina es de 28 °C y 31 °C. La producción de daptomicina se realiza preferiblemente en condiciones de pH de 5,5 a 7,5, una velocidad de agitación de 150 a 400 rpm y una velocidad de aireación de 0,5 a 1,5 vvm.
- 40 [0029] La producción de daptomicina ocurre a la mitad la fase exponencial (PMV del 15 % o más), y en ese momento, se puede inyectar un ácido decanoico precursor de manera continuada para maximizar la producción de daptomicina. El ácido decanoico precursor se puede inyectar en forma de solución preparada mezclando ácido decanoico con ácido graso oleato de metilo o mezclando ácido decanoico con una solución de amoníaco o con glicerol.
- 45 [0030] Además, el método puede incluir la etapa de recuperación de daptomicina de la cepa o el medio cultivados.
- 50 [0031] Tal como se usa en este documento, el término «medio cultivado» significa un producto obtenido cultivando la cepa, e incluye la cepa cultivada o la cepa no cultivada. El medio cultivado de la cepa que se cultiva para producir daptomicina se aplica a un método que se usa generalmente para el aislamiento y la purificación de daptomicina, recuperando así la daptomicina. Los ejemplos de este método pueden incluir cristalización fraccionada, microfiltración, ósmosis inversa, LPLC (cromatografía líquida de baja presión), HPLC (cromatografía líquida de alta presión), FPLC (cromatografía líquida rápida de proteínas), cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía hidrofóbica o una combinación de las mismas. Siempre que se pueda usar un método para separar o purificar daptomicina, el método no se limita a esto.
- 55 [Modo de la invención]
- 60 [0032] En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes
- 65

ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son solo para fines ilustrativos, y la invención no pretende estar limitada por ellos.

Ejemplo 1: Separación de la cepa mutante DKB108 mediante irradiación UV

5 [0033] Una cepa progenitora de *streptomyces filamentosus* ATCC 31568 se cultivó mediante cultivo inclinado a 30 °C durante 12 días para recoger las esporas, y luego las esporas se suspendieron en una solución salina fisiológica, seguido de una dilución en serie de 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴, y se colocó en medios de placas. Después de la preincubación a 30 °C durante dos horas, las placas se irradiaron durante 118 segundos en una caja de guantes colocada a una distancia de 65 cm de dos bombillas UV de 20 W con 280 nm de longitud de onda. A este respecto, la tasa de mortalidad fue del 99,9 %. Para evitar la reparación por fotoreactivación, la luz se bloqueó inmediatamente, y las placas se mantuvieron a 4 °C durante dos horas. Se recogieron las colonias que sobrevivieron en las placas de agar a 30 °C durante seis días, seguido de cultivo de semilla y cultivo de fermentación según un método del siguiente ejemplo 4. La fermentación se realizó usando un matraz con deflectores de 500 ml en una incubadora bajo condiciones de 30 °C, 260 rpm durante siete días.

15 [0034] Una vez completado el cultivo, el caldo de cultivo se centrifugó. Se utilizó un método de pozo de agar que es un método de detección biológica para examinar la inhibición del crecimiento de una cepa indicadora, *Staphylococcus aureus*. El método del pozo de agar se aplicó al análisis, porque este método es un método fácil y simple con errores menores, en comparación con otros métodos. Este método se basa en el principio de que una velocidad de difusión está determinada por una diferencia en un gradiente de concentración tras la difusión de una muestra en un gel de agar, y se sabe que el radio de la zona de inhibición durante un tiempo predeterminado es proporcional al logaritmo del valor de la concentración. Con base en este principio, se pueden medir las concentraciones de antibióticos en muestras desconocidas. Este método se realizó mediante el siguiente procedimiento: antes de que se solidificara un medio agar de caldo de tripticasa de soja, la cepa indicadora *Staphylococcus aureus* se añadió al mismo y se suspendió uniformemente en él. El medio se vertió en un tubo de ensayo y se dejó solidificar. A continuación, se perforaron pocillos en el agar usando un perforador de acero inoxidable que tenía un diámetro de 5 mm, y el agar en el pocillo se succionó por aspiración al vacío. La cantidad de muestra en el pozo de agar era de 130 µl, y se preparó un grupo de control de daptomicina que se usó en una cantidad de 0, 50, 100, 200, 300 y 1000 µg/ml.

20 [0035] Las cepas mutantes primarias seleccionadas por el método del pozo de agar se sometieron a una mutación secundaria usando NTG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) bajo la condición de una tasa de mortalidad del 70 % de la misma manera que en el anterior método de irradiación UV. Las cepas mutantes seleccionadas por la mutación secundaria se sometieron a fermentación mediante un método del ejemplo 4, y un caldo de cultivo de las mismas se sometió a análisis de HPLC y al método de detección biológica, método del pozo de agar, seleccionando cepas mutantes que tenían una productividad de daptomicina excelente. Las cepas seleccionadas por la mutación secundaria se sometieron repetidamente a mutaciones en serie de UV y NTG dos o más veces para separar una cepa mutante con la mayor productividad de daptomicina y también con productividad de daptomicina estable incluso después de varios subcultivos. La cepa mutante se designó como DKB108, que se depositó en el Instituto Coreano de Investigación en Biociencia y Biotecnología el 20 de agosto de 2012, en virtud del Tratado de Budapest con el número de acceso KCTC12267BP.

25 [0036] Los resultados del experimento del pozo de agar de DKB108 investigado en la presente invención se dan en la siguiente tabla 1, y la DKB108 de la presente invención muestra un efecto de inhibición del crecimiento 1,5 veces mayor en *Staphylococcus aureus*, en comparación con la cepa progenitora ATCC 31568.

[Tabla 1]

	Daptomicina (mg / ml)							ATCC 31568	DKB108
	0,00	0,05	0,10	0,20	0,30	1,00	16,00		
Radio de la zona de inhibición (mm)	5,00	8,60	10,60	12,00	13,20	16,00		10,2	15,2

Ejemplo 2: caracterización de la cepa mutante DKB108

50 [0037] Se examinaron las características de cultivo, morfológicas y fisiológicas de la cepa mutante DKB108 seleccionada en el ejemplo 1.

55 [0038] La cepa progenitora de *streptomyces filamentosus* ATCC 31568 y la cepa mutante DKB108 se cultivaron en un medio de agar de extracto de levadura • extracto de malta, medio de agar de harina de avena, medio de agar de sal inorgánica • almidón, medio de agar de glicerina • asparagina, medio de agar de peptona • extracto de levadura • hierro y medio de agar de tirosina a 30 °C durante 4 días, y su crecimiento se observó bajo un microscopio óptico y un microscopio electrónico de barrido. Las características así observadas se dan en la siguiente tabla 2. Los colores se describieron de acuerdo con un documento [Methuen Handbook of Colour,

Methuen, Londres, 1978].

[Tabla 2]

Medio	Propiedades del medio	
	Cepa progenitora (ATCC 31568)	Cepa mutante DKB108
Agar triptona · extracto de levadura (ISP-1)	G: bueno	G: bueno
	A: abundante	A: abundante
	R: marrón claro	R: marrón
	S: ninguno	S: ninguno
Agar de extracto de levadura · extracto de malta (ISP-2)	G: excelente	G: excelente
	A: abundante	A: abundante
	R: gris rosáceo	R: gris rosáceo
	S: marrón claro	S: marrón oscuro
Agar de harina de avena (ISP-3)	G: bueno	G: bueno
	A: deficiente	A: deficiente
	R: incoloro	R: incoloro
	S: ninguno	S: ninguno
Agar de sal inorgánica · almidón (ISP-4)	G: bueno	G: bueno
	A: deficiente	A: deficiente
	R: marrón claro	R: marrón claro
	S: ninguno	S: ninguno
Agar de glicerina · asparagina (ISP-5)	G: bueno	G: bueno
	A: deficiente	A: deficiente
	R: marrón	R: marrón oscuro
	S: marrón claro	S: marrón oscuro
Agar de peptona · extracto de levadura · hierro (ISP-6)	G: bueno	G: bueno
	A: deficiente	A: deficiente
	R: incoloro	R: incoloro
	S: ninguno	S: ninguno
Agar de tirosina (ISP-7)	G: bueno	G: bueno
	A: deficiente	A: deficiente
	R: incoloro	R: incoloro
	S: morado claro	S: morado oscuro

Abreviatura; G: crecimiento, A: hifas aéreas, R: color inverso, S: pigmento soluble

5 [0039] Las características comunes de la cepa progenitora y la cepa mutante DKB108 en los medios de ISP son las siguientes. La morfología de las hifas mostró que las esporas se generaron en forma oval cerca del cilindro dispuestas en cadenas (figura 1) y positivas en la tinción de Gram según el manual de Burgey (1994). Se observaron buenos crecimientos en la mayoría de los medios ISP. Se observó una formación de hifas aéreas deficiente o ausencia de formación de esporas en la mayoría de los medios, excepto ISP-1 e ISP-2.

10 [0040] Por el contrario, la cepa mutante DKB108 mostró color inverso y pigmento soluble diferentes de la cepa progenitora. La cepa mutante DKB108 mostró un color oscuro inverso en ISP-1 e ISP-5, en comparación con la cepa progenitora, y un pigmento oscuro soluble en ISP-2, ISP-5 e ISP-7, en comparación con la cepa progenitora.

15 [0041] Para examinar las características fisiológicas de la cepa mutante *streptomyces filamentosus* DKB108 de la presente invención y la cepa progenitora *streptomyces filamentosus* ATCC 31568, fueron colocadas en los medios ISP (proyecto internacional streptomyces). En los medios, la producción de enzimas tales como tirosina hidrolasa, ureasa, amilasa, caseinasa, amilasa, nitrato reductasa y gelatinasa se examinó mediante degradación de componentes particulares. La tolerancia osmótica contra el cloruro sódico y la producción de melanoides también se examinaron, y se resumen en la siguiente tabla 3.

[Tabla 3]

Características	<i>Streptomyces filamentosus</i> ATCC 31568	<i>Streptomyces filamentosus</i> DKB 108
Morfología	Esporas ovaladas dispuestas en cadenas en hifas	Esporas ovaladas dispuestas en cadenas en hifas
Color de la colonia	Gris rosáceo	Gris rosáceo oscuro
Tinción de Gram	Positiva	Positiva
Demanda de	Aerobio	Aerobio

oxígeno		
Pigmento melanina	ISP6 (-), ISP7 (±)	ISP6 (-), ISP7 (+)
Degradación de la tirosina	-	-
Degradación de la urea	+	+
Degradación del almidón	+	+
Degradación de la caseína	+	+
Reducción de nitrato	+	+
Actividad proteasa	+	+
NaCl 0 %	+	+
NaCl 4 %	+	+
NaCl 7 %	+	+
NaCl 8,5%	-	+
-: por debajo o reacción negativa		
+: por encima o reacción positiva		

[Tabla 4]

Fuente de carbono	<i>Streptomyces filamentosus</i> ATCC 31568	<i>Streptomyces filamentosus</i> DKB108
Glucosa	+	+
Xilosa	+	+
Fructosa	+	+
Inositol	-	-
Lactosa	+	-
Sacarosa	+	+
Manitol	+	+
Arabinosa	-	-
Rafinosa	+	+
Galactosa	+	+
Manosa	+	+

5 [0042] Las diferencias leves en las características fisiológicas entre la cepa mutante DKB108 y la cepa progenitora son las siguientes.

10 [0043] La cepa mutante DKB108 cultivada en medio de placa ISP-7 (Shinobu, 1958) durante 21 días formó pigmentos solubles de color morado oscuro tras dos semanas, mientras que la cepa progenitora formó pigmentos de color morado claro. Sin embargo, tanto la cepa progenitora como la cepa mutante mostraron melanina negativa en los medios de placa ISP-6 (Tresner y Danga, 1958).

15 [0044] La cepa mutante DKB108 muestra patrones de utilización de fuentes de carbono y tolerancia osmótica ligeramente diferentes de los de la cepa progenitora. Los patrones de utilización de la fuente de carbono mostraron los mismos patrones en la prueba utilizando medios de placa que contienen caldo de soja Trptic (Difco™) y diferentes fuentes de carbono. Sin embargo, la cepa mutante DKB108 mostró un crecimiento bajo en la utilización de lactosa.

20 [0045] Los resultados del cultivo líquido usando un caldo de tripticasa de soja mostraron que se observó crecimiento de la cepa mutante DKB108 en cloruro sódico al 8,125 %, pero no se observó crecimiento de la cepa progenitora. Sin embargo, se observó crecimiento en un cultivo líquido de cloruro sódico al 6,5 %, lo que indica tolerancia. En cultivo sólido usando un caldo de tripticasa de soja, la cepa mutante DKB108 mostró tolerancia frente al cloruro sódico al 8,5 %, mientras que el crecimiento de la cepa progenitora se inhibió. De acuerdo con las directrices de ISP, tanto la cepa progenitora como la cepa mutante tenían tolerancia contra el cloruro sódico al 7 % (manual de Burgey, 1994).

25 [0046] La TLC mostró que la pared celular de la cepa mutante DKB108 era del tipo 1 compuesta por ácido L-diaminopimélico y glicina.

30 [0047] La temperatura de crecimiento de la cepa fue de 24 a 37 °C, y la temperatura óptima para el crecimiento celular y la producción de daptomicina fue de 30 °C. Además, la *streptomyces filamentosus* ATCC 31568 mostró una baja productividad de daptomicina y produjo muchas impurezas relacionadas en forma de complejo de

lipopéptido, mientras que la cepa mutante DKB108 produjo daptomicina como metabolito biosintético principal. La prueba de utilización de la fuente de carbono se realizó de acuerdo con el método de Pridham, T.G y D. Gotrlib (J. Bacteriol., 56, págs. 107-114, 1948) Después de cultivar a 30 °C durante 12 días, se examinaron. Los resultados se dan en la siguiente tabla 4.

[0048] Estas caracterizaciones morfológicas y bioquímicas enseñaron que la cepa mutante *streptomyces filamentosus* DKB108 de la presente invención mostró patrones similares a los de la cepa progenitora *streptomyces filamentosus* ATCC 31568, pero hay pequeñas diferencias en el tamaño y el color de la formación de colonias, la tolerancia al cloruro sódico y la utilización de fuentes de carbono.

Ejemplo 3: prueba de producción de daptomicina de la cepa mutante DKB108

[0049] La daptomicina se cuantificó usando una columna (Optimapak C8 4.6 x 250 mm, RStech co., Ltd.) y HPLC (Waters), y se usó una daptomicina liofilizada, CUBICIN® comercializada por Cubist Pharmaceuticals, Inc. como material estándar. Se preparó una muestra centrifugando (5000 rpm, 15 min) el líquido de fermentación, añadiendo una cantidad igual de etanol anhidro al sobrenadante, seguido de centrifugación a 10 000 rpm durante cinco minutos. El sobrenadante se filtró usando un filtro de 0,45 µm, y se usó como líquido de prueba. Para la identificación y cuantificación de daptomicina, se pesaron con precisión 10 mg del material estándar y se disolvieron en agua para preparar 10 ml del material estándar. La cromatografía líquida se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento.

Detector: Espectrofotómetro UV (longitud de onda de medición: 214 nm)
 Columna: Optimapak C8 4.6x250mm, RStech co., Ltd., RStech, Corea)
 Velocidad de flujo: 1,5 ml/min
 Temperatura del inyector automático: 3-7 °C
 Rango de medición: 30 min
 Inyección de muestra: 20 µl

<Condición de funcionamiento 1>

[0050] Fase móvil: se controló una relación de la fase móvil A y la fase móvil B de modo que el tiempo máximo de mantenimiento de la daptomicina llegara a ser de aproximadamente 15 minutos.

[0051] Fase móvil A: se pesaron 9 g de dihidrogenofosfato de amonio y se disolvieron en 1500 ml de agua. Su pH se ajustó a 3,25 usando 0,1 mol/l de fosfato, y se le añadió agua hasta un volumen de 2000 ml. Se agregaron 1000 ml de acetonitrilo a 1000 ml de esta solución.

[0052] Fase móvil B: se pesaron 9 g de dihidrogenofosfato de amonio y se disolvieron en 1500 ml de agua. Su pH se ajustó a 3,25 usando 0,1 mol/l de fosfato, y se le añadió agua hasta un volumen de 2000 ml. Se agregaron 400 ml de acetonitrilo a 1600 ml de esta solución.

<Condición de funcionamiento 2>

[0053] Fase móvil: se controló una relación de la fase móvil A y la fase móvil B de modo que el tiempo máximo de mantenimiento de la daptomicina llegara a ser de aproximadamente 15 minutos.

[0054] Fase móvil A: se añadieron 1000 ml de acetonitrilo a 1000 ml de agua destilada.

[0055] Fase móvil B: se pesaron 9 g de acetato de amonio y se disolvieron en 1500 ml de agua. Su pH se ajustó a 3,25 usando ácido acético glacial, y se le añadió agua hasta un volumen de 2000 ml. Se agregaron 400 ml de acetonitrilo a 1600 ml de esta solución.

Ejemplo 4: producción de daptomicina mediante la cepa mutante DKB108

Paso 1: cultivo inclinado

[0056] La cepa mutante de *Streptomyces filamentosus* DKB108 almacenada mediante liofilización se usó e inoculó en un medio inclinado estéril de la siguiente tabla 5, seguido de cultivo estático a 30°C durante seis días.

[Tabla 5]

Componentes	Concentración (g/l)
Polvo de soja	10
Extracto de levadura	4
Glucosa	4

Carbonato de calcio	2
Agar	20

Paso 2: cultivo de semillas

5 [0057] Se recogieron colonias que mostraban abundante formación de esporas y colores gris y marrón rojo oscuro en el medio inclinado y se inocularon en 50 ml de un medio de activación de crecimiento estéril de la siguiente tabla 6. El medio de activación de crecimiento inoculado se cultivó en un matraz con deflectores de 500 ml 30 °C, 260 rpm durante 24 horas.

[Tabla 6]

Componentes	Concentración (g/l)
Caldo de soja tripticasa	30
Dextrina	35
Extracto de levadura	3

10 **Paso 3: cultivo principal**

15 [0058] Se inoculó un caldo cultivado en el medio de cultivo de semillas a una concentración del 1 % en 50 ml de un medio de cultivo principal estéril de la siguiente tabla 7. El medio de cultivo principal inoculado se cultivó en un matraz Erlenmeyer con deflectores de 500 ml a 30 °C, 150 ~ 280 rpm durante 8 días. La cantidad de producción de daptomicina de la cepa mutante DKB108 fue de 480 mg/l, que es 12 veces mayor que la de la cepa progenitora (Tabla 8).

[Tabla 7]

Componentes	Concentración (g/l)
Melaza	7
Glucosa	10
Dextrina	93
Extracto de levadura	10
Fe (NH ₄) ₂ SO ₄ · 7H ₂ O	0,5
Gluten	2

[Tabla 8]

Cepa	Concentración de producción de daptomicina (mg/l)
<i>Streptomyces filamentosus</i> ATCC 31568	40
<i>Streptomyces filamentosus</i> DKB108	480

20

Ejemplo 5: producción de fermentación en tanque de daptomicina mediante la cepa mutante DKB108

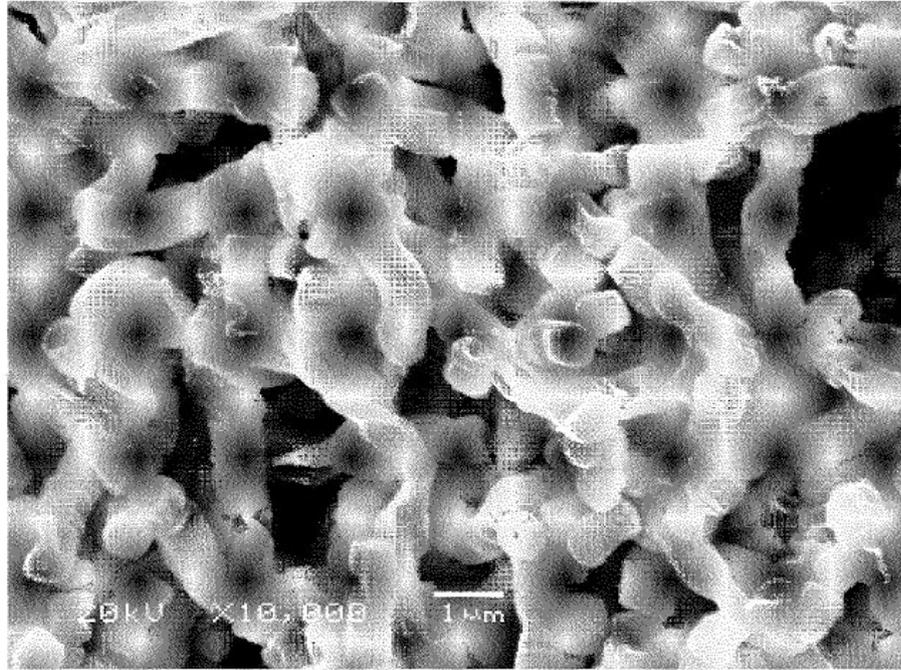
25 [0059] El caldo de cultivo de semillas obtenido por el método del ejemplo 4 se inoculó a una concentración del 1 % en 30 l del medio de cultivo principal estéril de la tabla 7. Este cultivo de fermentación se realizó en un tanque fermentador de 50 L (kobiotech co., Corea) en condiciones de 30 °C, 1 vvm, pH 6,2 ~ 6,8 durante nueve días. El oxígeno disuelto (OD) en agua disminuyó rápidamente de acuerdo con el crecimiento celular y, por lo tanto, para mantener un OD del 20 % o más, el cultivo se realizó aumentando gradualmente la velocidad de agitación hasta 400 rpm. A las 30 horas del cultivo, se inyectó de manera continuada una solución de ácido decanoico al 50 %, y el cultivo de lote alimentado se detuvo en el momento en que el pH del caldo de cultivo aumentó. Una cantidad de producción de daptomicina de la cepa mutante DKB108 fue de 2,75 g/l a las 209 horas después del cultivo (figura 2).

30

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *streptomyces filamentosus* con número de acceso KCTC12267BP, donde la cepa de *streptomyces filamentosus* tiene productividad de daptomicina.
- 5 2. Cepa de la reivindicación 1, donde la cepa tiene
- (1) características morfológicas que muestran una forma ovalada similar a un cilindro dispuesto en cadenas, formación de esporas, Gram positiva, formación de colonias gris rosado oscuro;
- 10 (2) características fisiológicas de la tirosina hidrolasa -, ureasa +, amilasa +, caseinasa +, nitrato reductasa +, gelatinasa +, tolerancia NaCl 8,5 % +, formación de pigmento melanina en medio ISP - 6 (-), formación de pigmento melanina en medio ISP - 7 (+); y
- (3) características de la utilización de fuentes de carbono de glucosa +, xilosa +, fructosa +, inositol -, lactosa -, sacarosa +, manitol +, arabinosa -, rafinosa +, galactosa +, manosa +.
- 15 3. Método para producir daptomicina, que comprende la etapa de cultivar la cepa de la reivindicación 1 en un medio.
4. Método según la reivindicación 3, que comprende además la etapa de recuperación de la daptomicina de la cepa o el medio cultivados.
- 20 5. Método según la reivindicación 3, donde la etapa de cultivo se realiza en cultivo inclinado, cultivo de semillas y cultivo principal en este orden.
- 25 6. Método según la reivindicación 5, donde el cultivo inclinado se realiza en un medio que comprende 5-15 g/l de polvo de soja, 2-6 g/l de extracto de levadura, 2-6 g/l de glucosa, 0,5 ~ 3,5 g/l de carbonato de calcio y 15-20 g/l de agar;
- el cultivo de semilla se realiza en un medio que comprende 20-40 g/l de caldo de tripticasa de soja, 20-50 g/l de dextrina y 1-5 g/l de extracto de levadura; y
- 30 el cultivo principal se realiza en un medio que comprende 5-10 g/l de melaza, 5-15 g/l de glucosa, 50-150 g/l de dextrina, 5-15 g/l de extracto de levadura, 2-10 g/l de gluten, y 0,5-5 g/l de sal inorgánica bajo condiciones de una cantidad de inoculación de semillas del 0,1 ~ 2 %, una temperatura de 26 ~ 34 °C, un pH de 5,5 a 7,5, una velocidad de agitación de 150 a 400 rpm, y una tasa de aireación de 0,5 a 1,5 vvm.

[FIG. 1]



[FIG. 2]

