



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 133 109**

② Número de solicitud: 9701662

⑤ Int. Cl.⁶: C12N 15/52
C12N 9/00

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **22.07.97**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.99**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.08.99

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Oviedo**
Pza. del Riego, 4 (Edificio Histórico)
33003 Oviedo, Asturias, ES

⑦ Inventor/es: **Salas Fernández, José Antonio;**
Fernández Braña, Alfredo;
Lombo Brugos, Felipe y
Méndez Fernández, Carmen

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Un fragmento de ADN de *Streptomyces argillaceus* que incrementa la producción del antitumoral mitramicina y otros compuestos policetónicos aromáticos.**

⑦ Resumen:

Un fragmento de ADN de *Streptomyces argillaceus* que incrementa la producción del antitumoral mitramicina y otros compuestos policetónicos aromáticos. La invención describe el aislamiento y clonación de un fragmento de ADN productor de la droga antitumoral mitramicina, *Streptomyces argillaceus*. Este fragmento contiene un gen activador de la biosíntesis de mitramicina. Mediante la clonación de este fragmento en un vector plasmídico de expresión génica y su introducción en el propio productor de mitramicina se logra un incremento en la producción de la droga de unas cinco veces. Asimismo el fragmento clonado estimula la producción de otros policétidos aromáticos como la actinorrodina.

ES 2 133 109 A1

DESCRIPCION

Un fragmento de ADN de *Streptomyces argillaceus* que incrementa la producción del antitumoral mitramicina y otros compuestos policetónicos aromáticos.

5 La invención tiene por objeto aislar un fragmento de ADN cromosómico del productor de la droga antitumoral mitramicina, *Streptomyces argillaceus* ATCC 12956, y su utilización para aumentar la producción de mitramicina y otros compuestos policetónicos aromáticos. Un fragmento de ADN de 2,1 kb *SmaI* se clonó inicialmente en el plásmido pUC18 obteniéndose el plásmido recombinante pFL-11R. A partir de este plásmido se secuenció una región de 1.201 pares de bases identificándose una pauta abierta de lectura que codifica para un gen regulador de la biosíntesis de mitramicina. Un fragmento de ADN *SmaI-SphI* de 1,8 kb, obtenido del fragmento *SmaI* de 2,1 kb se subclonó en el plásmido bifuncional (*Escherichia coli-Streptomyces*) pWHM3 de alto número de copias, vector de expresión para estreptomicetos, generando el plásmido recombinante pFL3R. La introducción de este plásmido en el productor de mitramicina, *S. argillaceus*, mediante transformación de protoplastos induce un incremento de unas 5 veces en la producción de mitramicina en relación a la cepa salvaje. Del mismo modo se obtuvo una activación de la producción de actinorrodina por *Streptomyces lividans* TK21.

Antecedentes

20 La producción de metabolitos secundarios por especies del género *Streptomyces* está sometida a una serie de procesos de regulación de la expresión génica cuya base molecular no está claramente entendida. Dado el enorme interés farmacéutico e industrial de la producción de compuestos con actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria y antitumoral, resulta de gran interés el aislamiento de genes activadores de la biosíntesis de estos compuestos y su utilización para incrementar la producción de los mismos en los microorganismos productores, facilitando de este modo una mejora en la producción y un abaratamiento en los costes de producción con la subsecuente repercusión en el mercado. La mitramicina, también designada mitracina, plicamicina, L.A.7017 y ácido aureólico es una droga que posee actividad antibacteriana frente a bacterias gram-positivas y también actividad antitumoral frente a distintas líneas celulares tumorales. Esta invención presenta el aislamiento mediante tecnología de ADN recombinante de un fragmento de ADN del productor de mitramicina, *Streptomyces argillaceus* ATCC 12956, que contiene un gen regulador que incrementa la producción de mitramicina y otros compuestos policetónicos aromáticos.

Breve descripción de la invención

35 Un objeto del invento es aislar un fragmento de ADN que codifica una proteína activadora de la biosíntesis de la droga antitumoral mitramicina.

40 Otro objeto del invento es introducir ese fragmento en un vector bifuncional (*Escherichia coli-Streptomyces*) que permita la expresión del gen en estreptomicetos productores de antibióticos y antitumorales.

45 Un tercer objeto del invento es introducir ese plásmido recombinante en el productor de mitramicina con objeto de incrementar la producción de esta droga.

Descripción detallada de la invención

50 El primer objeto del invento consistió en aislar un fragmento de ADN de *Streptomyces argillaceus* ATCC 12956, productor de mitramicina, que codificase para la proteína activadora.

55 Se partió de una genoteca de ADN total de *S. argillaceus* (Lombó et al. Gene 172: 87-91, 1996), construida en el cósmido pKC505 (Richardson et al. Gene 61: 231-241, 1987). Por hibridación con genes de la policétido sintasa de mitramicina (Lombó et al. Gene 172: 87-91, 1996), se aislaron una serie de clones. A partir de uno de estos clones (cosAR13) se aisló un fragmento de ADN *SmaI* de 2,1 kb (Fig. 1) mediante digestión total del ADN del cósmido cosAR13 con este enzima de restricción y aislamiento del fragmento de un gel de agarosa de bajo punto de fusión mediante electroelución.

60 El fragmento de ADN *SmaI* de 2,1 kb fue clonado en el sitio *SmaI* del plásmido pUC18 previa digestión total del plásmido con ese enzima de restricción y ligación del fragmento al plásmido con ADN ligasa del fago T4 en presencia de iones magnesio y ATP. El ADN así ligado se introdujo en *Escherichia coli* TG1 recO1504::Tn5 (Kolodner et al. J.Bacteriol 163: 1060-1066,1985) por transformación de células competentes. Los transformantes se seleccionaron por resistencia al antibiótico ampicilina (100 µg/ml)

en placas de medio LB sólido (Sambrook et al., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) y las colonias conteniendo plásmidos recombinantes se identificaron por su incapacidad de hidrolizar X-gal en presencia de IPTG. Los clones recombinantes que contenían el fragmento *SmaI* fueron identificados mediante preparación del ADN plasmídico de las colonias recombinantes, digestión con el enzima *SmaI* y análisis mediante electroforesis en gel de agarosa, utilizando técnicas estándar de biología molecular (Sambrook et al., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Uno de los clones aislados que contenía la construcción correcta se designó pFL11R (Fig. 2).

A partir de este fragmento de ADN *SmaI* se determinó la secuencia de nucleótidos (ID sec. N° 1) de una región de 1.201 pares de bases utilizando el método de terminadores de cadena diseñado por Sanger y col. (Sanger et al. PNAS 74: 5463-5467, 1977). En el análisis de dicha secuencia se identificó una pauta abierta de lectura de 831 pares de bases que codifica una proteína de 276 aminoácidos con un peso molecular estimado de 33.690 daltons (ID sec. N° 1). Esta proteína presenta similitud con algunas proteínas que han sido descritas como activadores de transcripción génica de rutas de biosíntesis de antibióticos.

Una vez identificada la presencia de un gen activador en el fragmento *SmaI* de 2,1 kb y secuenciada la región correspondiente a dicho gen, el siguiente paso consistió en la clonación de un fragmento *SmaI-SphI* de 1,8 kb (Fig. 3) a partir de pFL11R en un vector que permitiese la expresión del gen activador en estreptomicetos productores de antibióticos y antitumorales. El vector utilizado fue el plásmido pWHM3 que posee capacidad de replicación autónoma en *Streptomyces* y en *Escherichia coli* y que permite la expresión de genes en estreptomicetos bajo el control de las señales de regulación de los propios genes (Vara et al., J. Bacteriol. 171: 5872-5881, 1989). Para ello, el fragmento *SmaI-SphI* de 1,8 kb de pFL11R fue clonado como un fragmento *SphI-XbaI* (el sitio *SphI* está situado a 0,3 kb de uno de los extremos *SmaI* del inserto de ADN en pFL11R y el sitio *XbaI* pertenece al vector pUC18) en el vector bifuncional pWHM3. El fragmento *SmaI-SphI* se obtuvo mediante digestión del plásmido pFL11R con *SphI* y *XbaI* y electroelución del fragmento de un gel de agarosa de bajo punto de fusión. El fragmento se ligó al plásmido pWHM3 digerido con *XbaI* y *SphI*. La ligación se usó para transformar células competentes de *E.coli* TG1 rec0 y las colonias recombinantes se seleccionaron por resistencia a ampicilina e incapacidad de hidrolizar X-gal. De entre los clones recombinantes conteniendo la construcción adecuada (pFL3R; Fig. 4) se seleccionó uno que se denominó FL3R, procediéndose a su depósito en la Colección Española de Cultivos Tipo. El número asignado fue CECT 4879 con fecha de 20 de Mayo de 1997.

Una vez lograda la construcción plasmídica pFL3R conteniendo el gen activador en el vector bifuncional pWHM3, se procedió a su introducción en el productor de mitramicina, *S. argillaceus*. Para ello se preparó ADN del plásmido pFL3R a partir del clón FL3R utilizando técnicas estándar y se introdujo en *S. argillaceus* mediante transformación de protoplastos utilizando metodologías previamente descritas (Hopwood et al. Genetic manipulation of Streptomyces: a laboratory manual. Norwich: John Innes Institute. England. 1985). Los transformantes fueron seleccionados por resistencia al antibiótico de selección del plásmido para estreptomicetos, tioletreptona (50 µg/ml) en placas de medio R5 (Hopwood et al. Genetic manipulation of Streptomyces: a laboratory manual. Norwich: John Innes Institute. England. 1985) y tras cultivarlos durante 7 días a 30°C las esporas se recolectaron en glicerol al 30 % (p/v) y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

Abreviaturas

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

IPTG: isopropil β-D-tiogalactopiranosido

kb: kilobases

r.p.m.: revoluciones por minuto

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

ml.: mililitro

µl.: microlitro

µg.: microgramo

v/v: volumen/volumen

p/v: peso/volumen

Los siguientes ejemplos describen el invento con fines de ilustración, sin que en ningún caso deban considerarse como limitativos del mismo:

Ejemplo 1

Incremento en la producción de mitramicina en Streptomyces argillaceus por introducción del plásmido pFL3R

5 Se compararon los niveles de producción de mitramicina por la cepa salvaje de *S. argillaceus* ATCC 12956 conteniendo el plásmido pFL3R y la misma cepa conteniendo (como control) el plásmido pWHM3 sin inserto. Para ello ambas cepas (salvaje y recombinante) se cultivaron en placas de medio de esporulación (Braña et al. Can. J. Microbiol. 31: 736-743, 1983) durante 4 días a 30°C. La mitramicina
10 presente en un 1 cm² de medio de cultivo se extrajo dos veces con 400 µl de acetonitrilo y 100 µl de este extracto se analizaron mediante HPLC en una columna µBondapak C18 utilizando un sistema de detección de diodos. La fase móvil fue un gradiente de acetonitrilo: agua (conteniendo un 1 % de ácido fórmico) en proporción 10%:90% (v/v) hasta 100% acetonitrilo en 30 minutos. La elución se llevó a
15 cabo a un flujo de 1.5 ml/min. En estas condiciones la mitramicina presenta un tiempo de retención de 17 minutos y se identifica por su espectro de absorción característico con máximos a 289 y 412 nm.

Los resultados (Fig. 5) indicaron que la cepa que contenía el plásmido recombinante pFL3R producía aproximadamente unas 5 veces más mitramicina que la cepa salvaje en la que se había introducido como control el vector plasmídico (pWHM3) sin ningún inserto.

20 Ejemplo 2

Activación de la producción de actinorrodina en Streptomyces lividans TK21

25 Dentro de los estreptomicetos, *S. lividans* es considerado como un estreptomiceto no productor de antibióticos. Sin embargo, bajo determinadas condiciones de cultivo y con una frecuencia muy baja, se pueden observar algunas colonias de *S. lividans* que producen un pigmento azul difusible al medio claramente visible que corresponde a la producción del antibiótico actinorrodina. Se piensa que este microorganismo posee una ruta de biosíntesis de actinorrodina “silenciosa” que puede ser activada por
30 genes activadores de otras rutas de biosíntesis de antibióticos relacionados. Se introdujo el plásmido pFL3R en *S. lividans* TK21 por transformación de protoplastos y se pudo apreciar que todas las colonias transformantes (resistentes a tioestreptona, marcador de resistencia del plásmido) producían el pigmento azul indicativo de la activación de la producción de actinorrodina por pFL3R. Como control se transformó la misma cepa con el vector plasmídico (pWHM3) sin inserto no apreciándose colonias azules de entre
35 aproximadamente 2000 analizadas.

Descripción de las figuras

- Figura 1: Mapa de restricción del fragmento *SmaI* de 2,1 kb de *Streptomyces argillaceus*. Abreviaturas:
40 B, *BamHI*; E, *EcoRI*; P, *PstI*; Sm, *SmaI*; Sp, *SphI*.
Figura 2: Esquema del plásmido pFL11R. Este plásmido contiene un fragmento *SmaI* de 2,1 kb de *Streptomyces argillaceus* clonado en el sitio *SmaI* del plásmido pUC18. Las abreviaturas de la figura son convencionales para endonucleasas de restricción.
Figura 3: Mapa de restricción del fragmento *SmaI-SphI* de 1,8 kb de *Streptomyces argillaceus*. Abreviaturas:
45 B, *BamHI*; E, *EcoRI*; P, *PstI*; Sm, *SmaI*; Sp, *SphI*.
Figura 4: Esquema del plásmido pFL3R. Este plásmido contiene un fragmento *SmaI-SphI* de 1,8 kb procedente de pFL11R clonado como *XbaI-SphI* en los mismos sitios de restricción del plásmido bifuncional pWHM3. Las abreviaturas de la figura son convencionales para endonucleasas de restricción.
50 Figura 5: Análisis por HPLC de la producción de mitramicina por la cepa salvaje de *S. argillaceus* conteniendo los plásmidos pWHM3 (A) ó pFL11R (B).

La flecha indica el pico correspondiente a mitramicina.

55 **Lista de secuencias**

ID sec. N° 1

60 AGGGGGCGCC TGGGATTGCA CCCAGTCAA TAAGGACCGC GATCGTCAGA GATGGTCTCA 60
CATTGATAGA GGGGCTTGAT ATGTCCGTGG AGTCGGAAGG TGTGACAGAA ATGAGT ATG 119
Met 1

ES 2 133 109 A1

	TCT GTC CTC GGC CCG TTA CGG CTC AGT GTC AAC GGC GTC GAC GTC ACT	167
	Ser Val Leu Gly Pro Leu Arg Leu Ser Val Asn Gly Val Asp Val Thr	17
5	CCT ACC GCG CCG AAG CAG ATG CAG GTT CTC GCG CTC ATG GCG CTC AAT	245
	Pro Thr Ala Pro Lys Gln Met Gln Val Leu Ala Leu Met Ala Leu Asn	33
	GAA GGG CAG GTG GTG ACG GCG TCG AGC TTT GTG GAC GAG CTG TGG GCG	293
	Glu Gly Gln Val Val Thr Ala Ser Ser Phe Val Asp Glu Leu Trp Ala	49
10	GAG TGT CCA CCG CGC AGC GCG AAA ACA ACC CTG CAA ACG TAT ATC CTG	341
	Glu Cys Pro Pro Arg Ser Ala Lys Thr Thr Leu Gln Thr Tyr Ile Leu	65
	CAT CTT CGA AAG CTC ATA TCG AAG GCT TTC AAA GAC GAG TCG CCA GTG	389
15	His Leu Arg Lys Leu Ile Ser Lys Ala Phe Lys Asp Glu Ser Pro Val	81
	GTC CGG GAT ATT CTG CTG ACC CGG CAG GGC GGC TAT CTC CTG CGG CTG	437
	Val Arg Asp Ile Leu Leu Thr Arg Gln Gly Gly Tyr Leu Leu Arg Leu	97
20	CCC ATG GCG CCC TTC GAC CTT CGT CAG TTC AAT GAA TTC TCG ACG GAG	485
	Pro Met Ala Pro Phe Asp Leu Arg Gln Phe Asn Glu Phe Ser Thr Glu	113
	GGG AGA ATT GCA CTT TCT CAG GGG GAT CCG TTC CGG GGA TCC CAG TTG	533
	Gly Arg Ile Ala Leu Ser Gln Gly Asp Pro Phe Arg Gly Ser Gln Leu	129
25	CTG CGT AAG GCA TTG AGC TTC TGG CAG GGG CCT GCT TTG GTG GAC GTG	581
	Leu Arg Lys Ala Leu Ser Phe-Trp Gln Gly Pro Ala Leu Val Asp Val	145
	CCG ACC GGA TCT ATT CTC GGG CCG AAG GTG AGG GGG CTT CAG GCG GAG	629
30	Pro Thr Gly Ser Ile Leu Gly Pro Lys Val Arg Gly Leu Gln Ala Glu	161
	CAT CAG ATC GCA CTG GAA TGC CGT ATC GAA GCC GAC CTG CAG ATG GGC	677
	His Gln Ile Ala Leu Glu Cys Arg Ile Glu Ala Asp Leu Gln Met Gly	177
35	AGG TAC GAC GAC GCC ATA GGC GAC TTG GTC ACG CTG ACC GCC CAG CAG	725
	Arg Tyr Asp Asp Ala Ile Gly Asp Leu Val Thr Leu Thr Ala Gln Gln	193
	CCG CTC AAC GAG AAC ATC CAC GAT CAA TAC ATG CGG GCG CTC CAC CTA	773
	Pro Leu Asn Glu Asn Ile His Asp Gln Tyr Met Arg Ala Leu His Leu	209
40	GCC GGA CGC CGA TCG GAG GCT CTC GGC ATC TTC CAC CGA CTC CGG AAG	821
	Ala Gly Arg Arg Ser Glu Ala Leu Gly Ile Phe His Arg Leu Arg Lys	225
	AAT TTA ATG GAC GAT CTC GGC CTG GAG CCG TCC GAG CAG GTG CAG CGC	869
45	Asn Leu Met Asp Asp Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Gln Val Gln Arg	241
	ACG CAG CAG GTG ATC CTC AGC TCG GCG TCG TCG CGA GAG GAC GGC GCC	917
	Thr Gln Gln Val Ile Leu Ser Ser Ala Ser Ser Arg Glu Asp Gly Ala	257
50	GCC CGG AAC TGG TGG ACC CCC TGG GCG CCG GAC CGA CAT CAC GGG CCG	965
	Ala Arg Asn Trp Trp Thr Pro Trp Ala Pro Asp Arg His His Gly Pro	273
	AGC GCG GCG TAG CGCCGTTCCCT CCCGGATGCT TCGGGCCGCC CTCAAGGCGC	1017
	Ser Ala Ala *	276
55	TGTCAAGGAC GGTCGACCAC CCTCGTACGT GCTCGTGTTT CGCGCAGGCG AGGAGGATCC	1077
	ATGGCCGCGC CACAGCCGAT ACGTCTCTAC TGTTTCGCGC ATGCCGGGGC GGGCGTCTCT	1137
	GCCTTCCACG GGTGGGCGGC CCGCGTCGGC CCCGACGTGG TGCCCGTCCC GGTGCTGCTG	1197
60	CCCGGCCGCG ACCGACGCCG CCGCGAACCC CGGG	1231

REIVINDICACIONES

1. Un fragmento de ADN *SmaI* de 2,1 kb del cromosoma de *Streptomyces argillaceus* ATCC 12956, productor del antitumoral mitramicina, **caracterizado** por contener la secuencia de nucleótidos ID sec. N° 1 que incluye una región codificadora de un activador transcripcional.

2. Un fragmento de ADN *SmaI* de 2,1 kb según reivindicación 1 y cuya configuración de sitios de restricción se indica en la figura 1.

3. Un vector recombinante denominado pFL11R que contiene el fragmento *SmaI* de 2,1 kb de la reivindicaciones 1 y 2 clonado en el vector plasmídico pUC18.

4. Un fragmento de ADN *SmaI-SphI* de 1,8 kb obtenido de pFL11R con la configuración de sitios de restricción que se muestra en la figura 3 incluido en el fragmento de las reivindicaciones 1 y 2.

5. Un vector recombinante denominado pFL3R que contiene el fragmento *SmaI-SphI* de 1,8 kb en el vector plasmídico pWHM3 y la cepa de *E.coli* que lo contiene denominada FL3R.

6. La secuencia aminoacídica que se presenta en la lista de secuencias (ID N° 1) y que corresponde al producto del gen activador descrito en la reivindicación 1.

7. Una cepa recombinante de *S. argillaceus* conteniendo el plásmido pFL3R.

8. Un procedimiento para incrementar y detectar la producción de mitramicina en *S. argillaceus* conteniendo el plásmido recombinante pFL3R.

9. Un procedimiento para activar la producción de actinorrodina en *Streptomyces lividans* TK21 conteniendo el plásmido recombinante pFL3R.

30

35

40

45

50

55

60

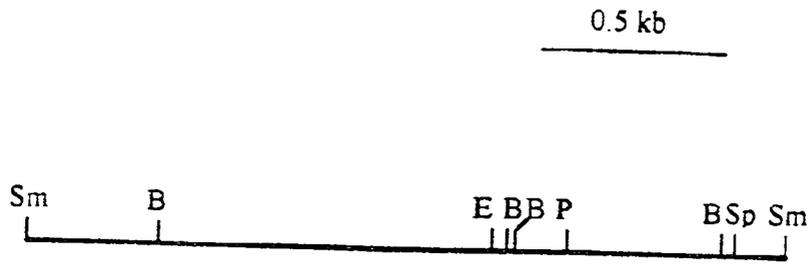


FIGURA 1

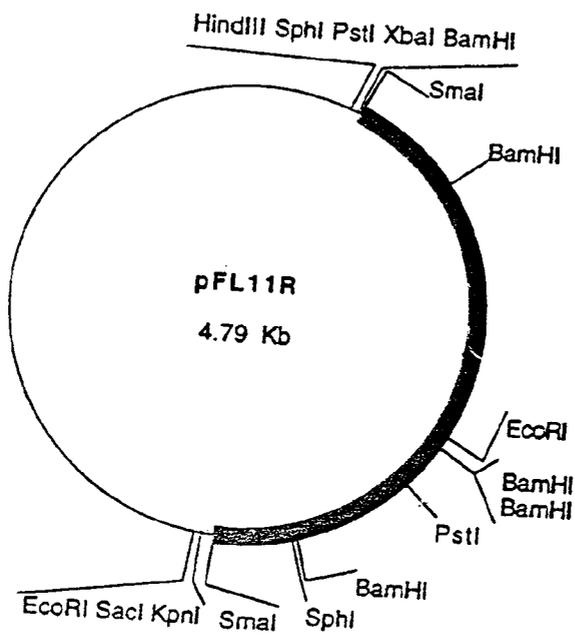


FIGURA 2

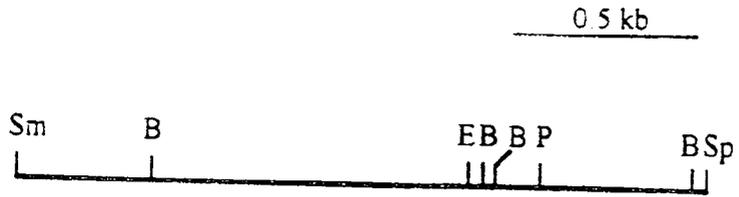


FIGURA 3

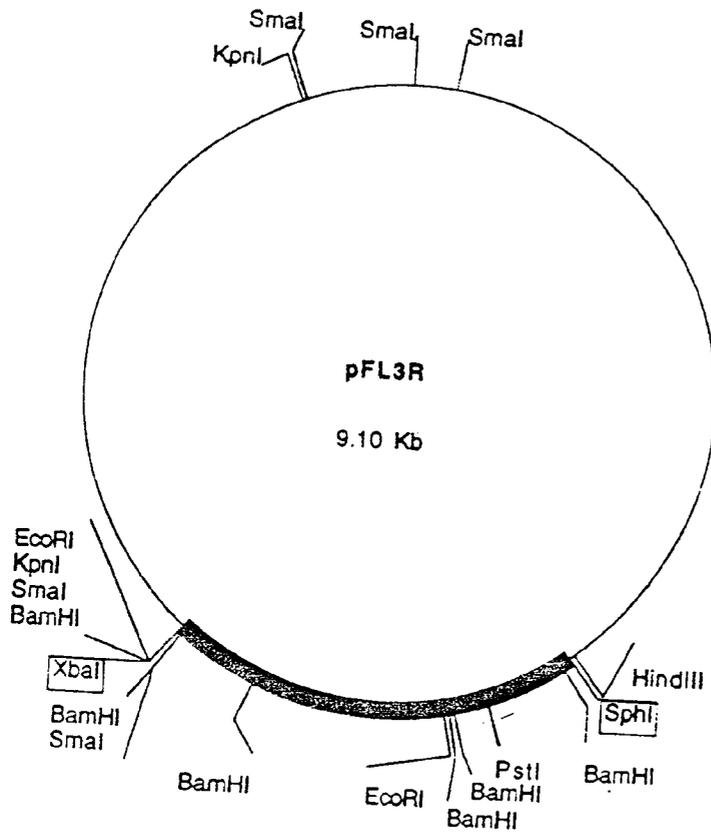


FIGURA 4

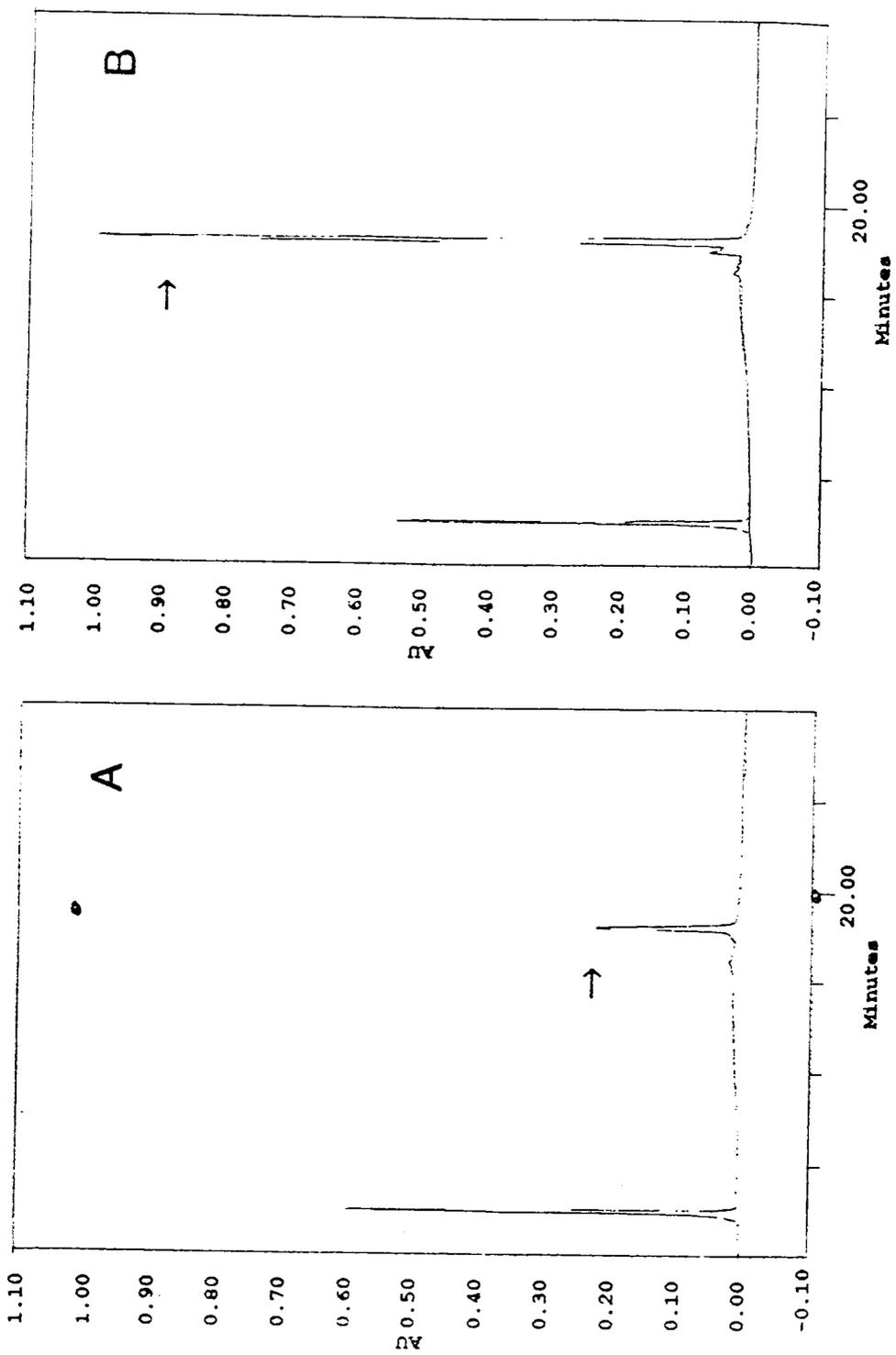


FIGURA 5



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C12N 15/52, 9/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LOMBO, F. et al. "Characterization of Streptomyces argillaceus genes encoding a polyketide synthase involved in the biosynthesis of the antitumor mithramycin", GENE, 1996, Vol. 172, páginas 87-91, todo el documento.	1-9
A	FERNANDEZ, E. et al. "An ABC transporter is essential for resistance to the antitumor agent mithramycin in the producer Streptomyces argillaceus", MOL. GEN. GENET., 1996, Vol. 251, páginas 692-698, todo el documento.	1-9
A	LOMBO, F. et al. "Cloning and Insertional inactivation of Streptomyces argillaceus genes involved in the earliest steps of biosynthesis of the sugar moieties of the antitumor polyketide mithramycin", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, mayo 1997, Vol. 179, N° 10, páginas 3354-3357, todo el documento.	1-9
A	US 3906093 A (SOBIN et al.) 16.09.1975, todo el documento.	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

28.06.99

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1