



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21), (22) Заявка: 2005122950/13, 19.12.2003

(30) Приоритет: 20.12.2002 GB 0229793.5

(43) Дата публикации заявки: 27.01.2006 Бюл. № 03

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 20.07.2005

(86) Заявка РСТ:  
GB 03/05563 (19.12.2003)(87) Публикация РСТ:  
WO 2004/056998 (08.07.2004)Адрес для переписки:  
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры", пат.пов. Г.Б. Егоровой(71) Заявитель(и):  
ФАРМА МАР, С.А. (ES)(72) Автор(ы):  
ВЕЛАСКО ИГЛЕСИАС Ана (ES),  
ДЕ ЛЯ КАЛЛЕ Фернандо (ES),  
АПАРИСИО ПЕРЕС Томас (ES),  
ШЛЯЙССНЕР САНЧЕС Кармен (ES),  
АСЕБО ПАИС Палома (ES),  
РОДРИГЕС РАМОС Пилар (ES),  
РЕЕС БЕНИТЕС Фернандо (ES),  
ЭНРИКЕС ПЕЛАЕС Рубен (ES)(74) Патентный поверенный:  
Егорова Галина Борисовна(54) **ГЕННЫЙ КЛАСТЕР, УЧАСТВУЮЩИЙ В БИОСИНТЕЗЕ САФРАЦИНА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

## Формула изобретения

1. Генный кластер, содержащий открытые рамки считывания, который кодирует полипептиды, достаточные для осуществления синтеза молекул сафрацина.

2. Последовательность нуклеиновой кислоты, включающая

a) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере одну нерибосомальную пептидсинтетазу, которая катализирует по меньшей мере одну стадию биосинтеза сафрацина;

b) последовательность нуклеиновой кислоты, которая является комплементарной последовательности a); или

c) варианты или части последовательности a) или b).

3. Последовательность нуклеиновой кислоты по п.2, которая, по существу, соответствует SEQ ID No: 1, ее вариантам или частям.

4. Последовательность нуклеиновой кислоты по п. 2, которая включает по меньшей мере один из генов sacA, sacB, sacC, sacD, sacE, sacF, sacG, sacH, sacI, sacJ, orf1, orf2, orf3, orf4, включая их варианты или части.

5. Последовательность нуклеиновой кислоты по п.2, отличающаяся тем, что данная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который по своей аминокислотной последовательности по меньшей мере на 30% идентичен полипептиду, кодируемому любой открытой рамкой считывания генного кластера сафрацина sacA-sacJ и orf1-orf4 (SEQ ID No: 1 и гены, кодируемые SEQ ID No: 1), или кодируется ее вариантом или частью.

6. Последовательность нуклеиновой кислоты по п.2, отличающаяся тем, что кодирует

любой белок SacA, SacB, SacC, SacD, SacE, SacF, SacG, SacH, SacI, SacJ, Orf1, Orf2, Orf3 и Orf4 (SEQ ID No: 2-15), и его варианты, мутанты или части.

7. Последовательность нуклеиновой кислоты по п.2, которая кодирует пептидсинтетазу, производное L-Тур гидролазы, производное L-Тур метилазы, производное L-Тур O-метилазы, метилтрансферазу или монооксигеназу или белок резистентности к сафрацину.

8. Последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп.3-6, отличающаяся тем, что длина указанной части составляет примерно 50 нуклеотидов.

9. Последовательность нуклеиновой кислоты по п.8, отличающаяся тем, что длина указанной части находится в диапазоне от 100 до 5000 нуклеотидов.

10. Последовательность нуклеиновой кислоты по п.8, отличающаяся тем, что длина указанной части находится в диапазоне от 100 до 2500 нуклеотидов

11. Зонд для гибридизации, включающий последовательность нуклеиновой кислоты по любому из предшествующих пунктов.

12. Зонд для гибридизации по п.11, который включает последовательность по меньшей мере из 10 нуклеотидных остатков.

13. Зонд для гибридизации по п.11, который включает последовательность, состоящую из 25-60 нуклеотидных остатков.

14. Применение зонда для гибридизации по любому из пп.11-13 при выявлении генов сафрацина или эктеинасцидина.

15. Применение по п.14, отличающееся тем, что выявление гена проводят в *Ecteinascidia turbinata*.

16. Полипептид, кодируемый последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп.2-10.

17. Полипептид по п.16, который включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID No: 2-15.

18. Вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп.2-10.

19. Вектор по п.18, который представляет собой вектор экспрессии.

20. Вектор по п.18, который является космидой.

21. Клетка-хозяин, трансформированная одной или несколькими последовательностями нуклеиновой кислоты по любому из пп.2-10.

22. Клетка-хозяин, содержащая вектор по любому из пп.18-20.

23. Клетка-хозяин по п.22, отличающаяся тем, что указанную клетку-хозяина трансформируют экзогенной нуклеиновой кислотой, содержащей генный кластер, кодирующий полипептиды, достаточные для осуществления синтеза сафрацина.

24. Клетка-хозяин по п.22 или 23, которая представляет собой микроорганизм.

25. Клетка-хозяин по п.24, которая представляет собой бактерию.

26. Рекомбинантная бактериальная клетка-хозяин, в которой по меньшей мере часть последовательности нуклеиновой кислоты по любому из пп.2-10 разрушают с получением рекомбинантной клетки-хозяина, которая продуцирует измененные уровни сафрацинового соединения или аналога сафрацина в сравнении с соответствующей нерекомбинантной бактериальной клеткой-хозяином.

27. Рекомбинантная клетка по п. 26, отличающаяся тем, что указанная разрушенная последовательность нуклеиновой кислоты является эндогенной.

28. Способ получения сафрацинового соединения или аналога сафрацина, который заключается в ферментации организма, в котором увеличено число копий генного кластера по п.1.

29. Способ получения сафрацинового соединения или аналога сафрацина, который заключается в ферментации организма, в котором модулирована экспрессия генов, кодирующих полипептиды, достаточные для осуществления синтеза сафрацина или аналога сафрацина, путем манипуляции или замещения одного или нескольких генов или последовательностей, ответственных за регуляцию такой экспрессии.

30. Способ получения сафрацинового соединения или аналога сафрацина, который заключается во взаимодействии соединения, которое является субстратом для

полипептида, кодируемого одной или несколькими открытыми рамками считывания генного кластера биосинтеза сафрацина по п.1, с указанным полипептидом, где данный полипептид химически модифицирует соединение.

31. Способ по п.28 или 29, отличающийся тем, что данный организм представляет собой *Pseudomonas* sp.

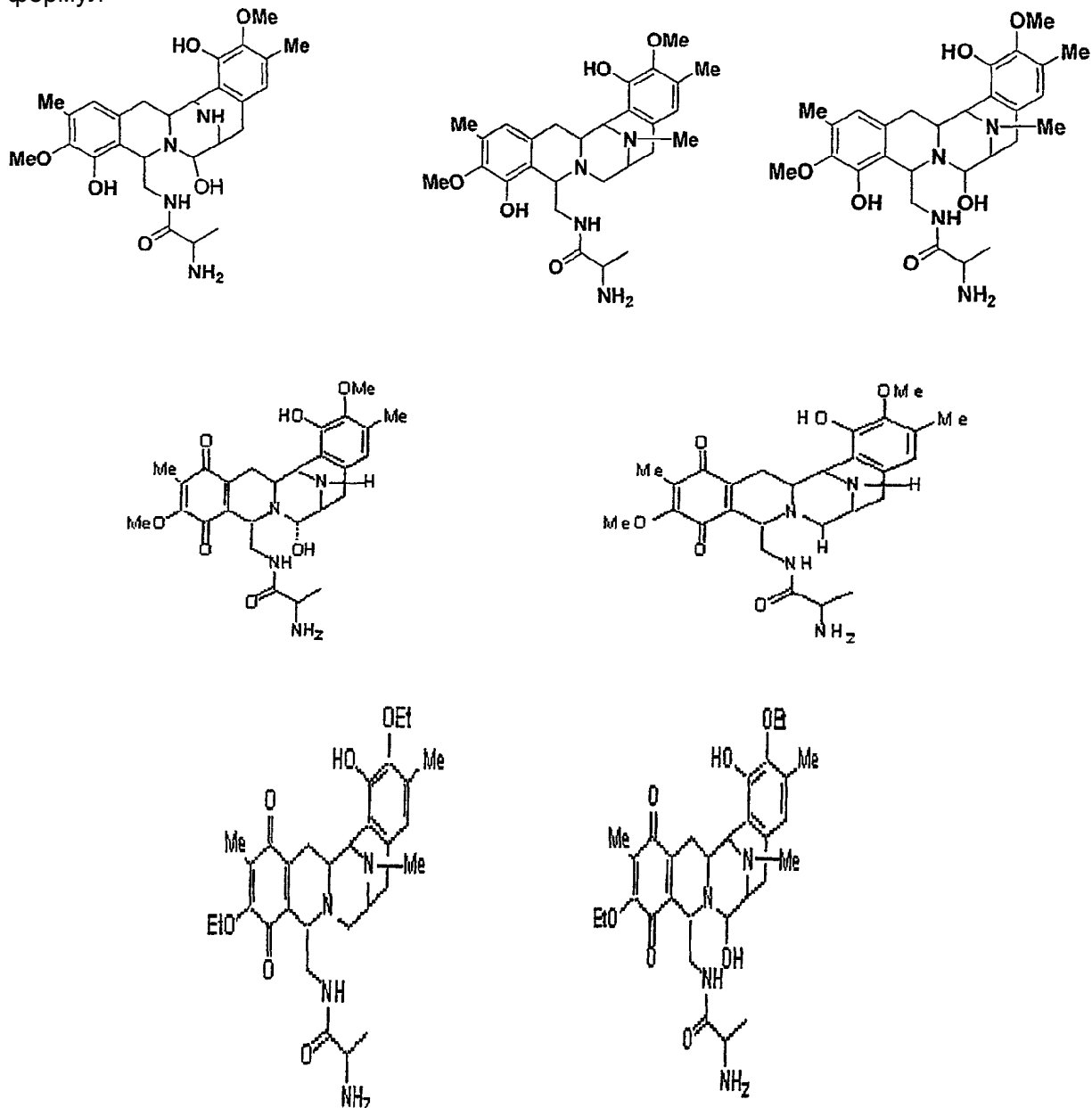
32. Композиция, включающая по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп.2-10.

33. Применение композиции по п.32 для комбинаторного биосинтеза одной или нескольких нерибосомальных пептидсинтетаз, дикетопиперазиновых колец и сафрацинов.

34. Использование P2, P14 их аналогов и производных в комбинаторном биосинтезе одной или нескольких нерибосомальных пептидсинтетаз, дикетопиперазиновых колец и сафрацинов.

35. Сафрациновое соединение, получаемое с помощью способа по пп.28-31.

36. Сафрациновое соединение по п.35, где соединение имеет одну из приведенных ниже формул



37. Применение соединения по п.35 или 36 в качестве противоопухолевого средства.

38. Применение соединения по п.35 или 36 при получении лекарственного средства для лечения рака.

39. Применение соединения по п.35 или 36 в качестве противомикробного средства.

40. Применение соединения по п.35 или 36 при получении лекарственного средства для

лечения микробных инфекций.

41. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п.35 или 36 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или наполнитель.

42. Применение соединения по п.35 или 36 в синтезе эктеинасцидиновых соединений.

R U 2 0 0 5 1 2 2 9 5 0 A

R U 2 0 0 5 1 2 2 9 5 0 A