(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
8 de Febrero de 2007 (08.02.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2007/014971 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 15/52 (2006.01) *C12P 17/12* (2006.01)
C12N 15/76 (2006.01) *C07K 14/36* (2006.01)
C12N 15/69 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2006/000455

(22) Fecha de presentación internacional:
1 de Agosto de 2006 (01.08.2006)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200501932 2 de Agosto de 2005 (02.08.2005) ES

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados salvo US)*: **PHARMA MAR, S.A.** [ES/ES]; Polígono Industrial La Mina-Norte, Avda. De Los Reyes, 1, E-28770 Colmenar Viejo - Madrid (ES).

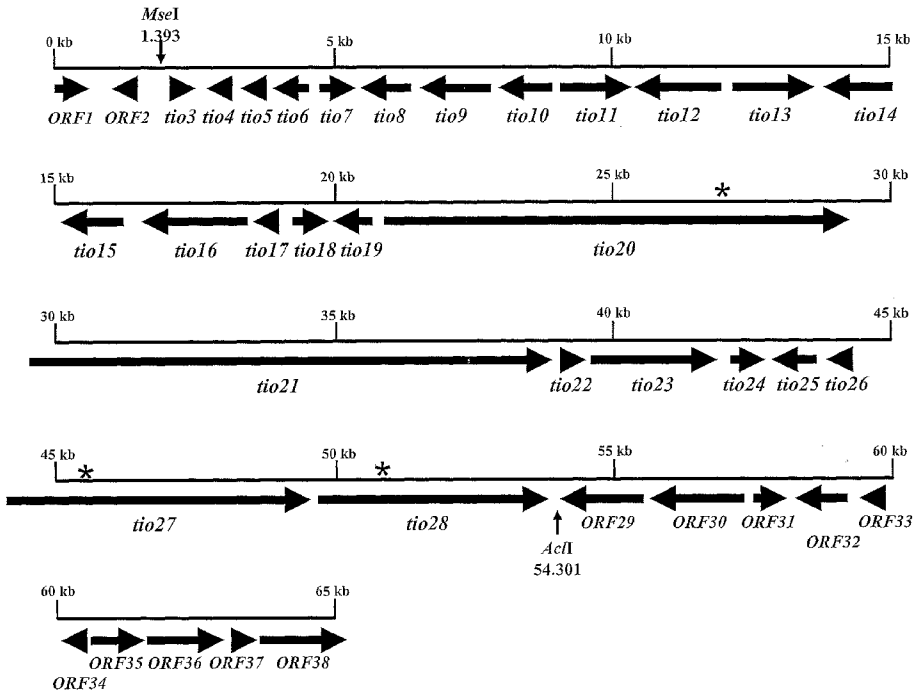
(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes *(para US solamente)*: **RAMOS CASTRO, Angelina** [ES/ES]; Universidad de Oviedo, Área De Microbilogía, Departamento De Biología Funcional, Facultad De Medicina, E-33006 Oviedo (ES). **FERNÁNDEZ BRAÑA, Alfredo** [ES/ES]; Universidad de Oviedo, Área De Microbilogía, Departamento De Biología Funcional, Facultad De Medicina, E-33006 Oviedo (ES). **LOMBÓ BRUGOS, Felipe** [ES/ES]; Universidad de Oviedo, Área De Microbiología, Departamento De Biología Funcional, Facultad De Medicina, E-33006 Oviedo (ES). **MÉNDEZ FERNÁNDEZ, Carmen** [ES/ES]; Universidad de Oviedo, Área De Microbiología, Departamento De Biología Funcional, Facultad De Medicina, E-33006 Oviedo (ES). **SALAS FERNÁNDEZ, José Antonio** [ES/ES]; Universidad de Oviedo, Área De Microbiología, Departamento De Biología Funcional, Facultad De Medicina, E-33006 Oviedo (ES). **VELASCO IGLESIAS, Ana** [ES/ES]; Pharma Mar, S.A., Polígono Industrial La

[Continúa en la página siguiente]

(54) **Title:** GENES INVOLVED IN THE BIOSYNTHESIS OF THIOCORALINE AND HETEROLOGOUS PRODUCTION OF SAME

(54) **Título:** GENES INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE TIOCORALINA Y PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA MISMA



(57) **Abstract:** The invention relates to genes involved in the biosynthesis of thiocoraline and to the heterologous production of same. According to the invention, the cluster of genes responsible for the biosynthesis of thiocoraline was identified and cloned. Said gene cluster can be used in the heterologous production of thiocoraline which has an antitumour and antibacterial activity.

[Continúa en la página siguiente]

WO 2007/014971 A3

Mina-norte, Avda. De Los Reyes, 1, E-28770 Colmenar Viejo - Madrid (ES). **SCHLEISSNER SÁNCHEZ, Carmen** [ES/ES]; Pharma Mar, S.A., Polígono Industrial La Mina-norte, Avda. De Los Reyes, 1, E-28770 Colmenar Viejo - Madrid (ES).

(74) Mandatario: ARIAS SANZ, Juan; ABG Patentes, S.L., Orense, 68 7º, E-28020 Madrid (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional*

— *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones*

(88) Fecha de publicación del informe de búsqueda internacional: 10 de Mayo de 2007

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(57) Resumen: Se ha identificado y clonado el grupo de genes (cluster) responsables de la biosíntesis de tiocoralina. Dicho grupo de genes puede ser utilizado en la producción heteróloga de tiocoralina. La tiocoralina tiene actividad antitumoral y antibacteriana.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2006/000455

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N, C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, WPI, search-sequence (EBI-site), XPESP, EMBASE, NPL, MEDLINE, BIOSIS.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Lombo F. et al. "Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor thiocoraline from a marine actinomycete and its expression in two streptomyces species". Chembiochem. 2006 Feb; Vol. 7, Nº 2; pages 366-376.	2,3,11-18, 21-26.
A	Fortman JL. et al. "Utilizing the power of microbial genetics to bridge the gap between the promise and the application of marine natural products". Chembiochem. 2005 Jun; Vol. 6, Nº 6; pages 960-978.	2,3,11-18, 21-26.
A	Faircloth G. et al. "Biological activity of thiocoraline, a novel marine depsipeptide". European Journal Of Cancer. 1997 Sep. Vol. 33; page S175.	2,3,11-18, 21-26.

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 march 2007 (12-03-2007)	(14-03-2007)
Name and mailing address of the ISA/ O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Facsimile No. 34 91 3495304	Authorized officer J. Manso Tomico Telephone No. +34 91 349 55 83

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2006/000455

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

2, 3, 11-18, 21-26 (insofar as they relate to the whole of the cluster).

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2006/000455

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Li X et al. "Vector systems allowing efficient autonomous or integrative gene cloning in Micromonospora sp. strain 40027". Appl. Environ. Microbiol. 2003 Jun; Vol. 69, Nº 6; pages 3144-3151.	2,3,11-18, 21-26.
A	Simmons TL. et al. "Marine natural products as anticancer drugs". Mol. Cancer. Ther. 2005 Feb; Vol. 4; Nº 2; page 333-342.	2,3,11-18, 21-26.
A	WO 03044186 A2 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT) 30.05.2003.	2,3,11-18, 21-26.
A	WO 0040704 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OR CALIFORNIA) 13.07.2000.	2,3,11-18, 21-26.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2006/000455

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03044186 A	30.05.2003	AU 2002356704 A	10.06.2003
		EP 1448767 A	25.08.2004
		JP 2005509435 T	14.04.2005
		US 2005118590 A	02.06.2005
WO 0040704 A	13.07.2000	WO 0040596 A	13.07.2000
		US 6927286 B	09.08.2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2006/000455

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/76 (2006.01)
C12N 15/69 (2006.01)
C12P 17/12 (2006.01)
C07K 14/36 (2006.01)

International application No.

PCT/ ES 2006/000455

Invention 1: claims 2, 3, 11-18, 21-26 (insofar as they relate to the whole of the cluster).

Nucleic acid molecule isolated from Micromonospora marina corresponding to the cluster of genes responsible for the synthesis of thiocoraline which codes for the polypeptide (which corresponds to all proteins) of the biosynthetic path, or a biologically active fragment thereof; an isolated nucleic acid molecule which hybridises with the former, an expression vector, a host cell comprising said nucleic acid, an expression method for the proteins of the cluster and a method for producing thiocoraline. All of the above insofar as it relates to the sequence of the entire gene cluster (SEQ ID NO: 1), as responsible for the synthesis of thiocoraline.

Inventions 2-38: claims 1, 4-20 (all in part)

The same as claim 1, but relating to the protein identified as ORF1 (SEQ ID NO: 2), the function of which, deduced from table 1, is that of a transposase; in relation to the protein identified as ORF2 (SEQ ID NO: 3) and so on up to the protein identified as ORF38 (SEQ ID NO: 39).

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2006/000455

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12N, C12P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, WPI, search-sequence (EBI-site), XPESP, EMBASE, NPL, MEDLINE, BIOSIS.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P,X	Lombo F. et al. "Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor thiocoraline from a marine actinomycete and its expression in two streptomyces species". Chembiochem. 2006 Feb; Vol. 7, Nº 2; páginas 366-376.	2,3,11-18, 21-26.
A	Fortman JL. et al. "Utilizing the power of microbial genetics to bridge the gap between the promise and the application of marine natural products". Chembiochem. 2005 Jun; Vol. 6, Nº 6; páginas 960-978.	2,3,11-18, 21-26.
A	Faircloth G. et al. "Biological activity of thiocoraline, a novel marine depsipeptide". European Journal Of Cancer. 1997 Sep. Vol. 33; página S175.	2,3,11-18, 21-26.

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
12 marzo 2007 (12-03-2007)	14 marzo 2007 (14-03-2007)
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Nº de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado J. Manso Tomico Nº de teléfono +34 91 349 55 83

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2006/000455

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones nºs:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. ☐ Las reivindicaciones nºs:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

3. ☐ Las reivindicaciones nºs:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:
Ver Hoja Adicional.

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.

3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones nºs:

4. ☒ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones nºs: 2,3,11-18, 21-26. (En la medida que se refieren al cluster de genes en su totalidad)

Indicación en cuanto a la protesta

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecidopara ello.

☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2006/000455

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	Li X et al. "Vector systems allowing efficient autonomous or integrative gene cloning in Micromonospora sp. strain 40027". Appl. Environ. Microbiol. 2003 Jun; Vol. 69, Nº 6; páginas 3144-3151.	2,3,11-18, 21-26.
A	Simmons TL. et al. "Marine natural products as anticancer drugs". Mol. Cancer. Ther. 2005 Feb; Vol. 4; Nº 2; página 333-342.	2,3,11-18, 21-26.
A	WO 03044186 A2 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT) 30.05.2003.	2,3,11-18, 21-26.
A	WO 0040704 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OR CALIFORNIA) 13.07.2000.	2,3,11-18, 21-26.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2006/000455

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 03044186 A	30.05.2003	AU 2002356704 A	10.06.2003
		EP 1448767 A	25.08.2004
		JP 2005509435 T	14.04.2005
		US 2005118590 A	02.06.2005
WO 0040704 A	13.07.2000	WO 0040596 A	13.07.2000
		US 6927286 B	09.08.2005

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2006/000455

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/76 (2006.01)
C12N 15/69 (2006.01)
C12P 17/12 (2006.01)
C07K 14/36 (2006.01)

Invención 1. Reivndicaciones: 2,3,11-18, 21-26 (en la medida que se relaciona con la totalidad del cluster).

Molécula de ácido nucleico aislada de Micromonospora marina correspondiente al cluster de genes responsable de la síntesis de tiocoralina que codifica el polipeptido (que corresponde a la totalidad de las proteinas) de la ruta biosintética, o un fragmento biológicamente activo del mismo; una molécula aislada de ácido nucleico que hibrida con la anterior, un vector de expresión, una célula huesped que comprenda dicho ácido nucleico, un método de expresión de las proteinas del cluster, un método para producir tiocoralina. Todo lo anterior en la medida que se relaciona con la secuencia de la totalidad del cluster de genes (SEQ. ID. Nº1), como responsable de la síntesis de tiocoralina.

Invención 2-38. Reivindicaciones: 1,4- 20.(Todas parcialmente)

Lo mismo que la invención 1, pero en relación a la proteina identificada como ORF1 (SEQ. ID .Nº 2) cuya función deducida según tabla 1 sería la de una transposasa; en relación a la proteina identificada como ORF2 (SEQ.ID.Nº3), y así hasta proteina identificada como ORF38 (SEQ. ID. Nº 39).