

(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
26 de Febrero de 2004 (26.02.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/016730 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: **C12N**

Centro Nacional Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC. Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2003/000411

(22) Fecha de presentación internacional:
6 de Agosto de 2003 (06.08.2003)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200201895 9 de Agosto de 2002 (09.08.2002) ES

(74) Mandatario: **REPRESA SÁNCHEZ, Domingo**; Consejo Superior De Investigaciones Científicas, Oficina De Transferencia De Tecnología, C/Serrano, 113, E-28006 Madrid (ES).

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

(71) Solicitante (*para todos los Estados designados salvo US*): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): **PEREZ MELLADO, Rafael** [ES/ES]; Centro Nacional Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC. Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **PALACÍN GÓMEZ, Aránzazu** [ES/ES]; Centro Nacional Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC. Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **PARRO GARCÍA, Victorino** [ES/ES];

(84) Estados designados (*regional*): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe*

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.

(54) Title: BACTERIA THAT CAN OVERPRODUCE AND SECRETE PROTEINS

(54) Título: BACTERIAS CON CAPACIDAD PARA LA SOBREPDUCCIÓN Y SECRECIÓN DE PROTEÍNAS.

(57) Abstract: The invention relates to bacteria that can overproduce and secrete proteins. In one form of the invention, the extracellular protease activity of the *Streptomyces lividans* strain is greatly reduced and, as a result, the stability of the proteins in the extracellular medium increases over time.

(57) Resumen: La presente invención describe unas bacterias con capacidad para la sobreproducción y secreción de proteínas. En una realización particular de esta invención, la actividad proteasa extracelular de la estirpe de *Streptomyces lividans* se encuentra seriamente disminuida con lo que la estabilidad de las proteínas en el medio extracelular es mayor a lo largo del tiempo.



WO 2004/016730 A2

TITULO**BACTERIAS CON CAPACIDAD PARA LA SOBREPRODUCCIÓN Y SECRECIÓN DE PROTEÍNAS****5 SECTOR DE LA TÉCNICA**

La invención se encuadra dentro del área de biotecnología, más concretamente en el sector de ingeniería genética de microorganismos, factorías celulares y producción de enzimas extracelulares. Esta invención se refiere a una bacteria con una actividad proteasa extracelular disminuída que confiere mayor estabilidad a las proteínas en el medio extracelular a lo largo del tiempo. Esta bacteria es útil para la sobreproducción y secreción de proteínas homólogas y/o heterólogas.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Streptomyces lividans es una bacteria Gram positiva, filamentosa y aeróbia, cuyo hábitat natural es el suelo, donde descompone gran cantidad de material orgánico [Korn-Wendisch y Kutzner (1992). The family Streptomycetaceae. The Prokaryotes, Vol. 1, Springer Verlag, New York, 921]. Su capacidad de degradar biopolímeros está ligada a la producción de gran variedad de enzimas extracelulares [Gilbert, M. y col. (1995). Cloning of a *secA* homolog of *Streptomyces lividans* 1326 and overexpression in both *S.lividans* and *E.coli*. Biochem. Biophys. Acta 1296:9-12], lo que hace que sea un microorganismo idóneo para la secreción de proteínas de interés comercial.

Para producir proteínas extracelulares e intracelulares se recurre a metodologías de ingeniería metabólica y optimización de producción a gran escala que es siempre dependiente de las características genéticas y bioquímicas del microorganismo usado como factoría celular.

Debido a que *S.lividans* es una bacteria no patógena que secreta directamente proteínas al medio y cuyo cultivo a escala industrial está bien establecido, se ha utilizado para la sobreproducción y secreción de proteínas homólogas y heterólogas. *S.lividans* ha sido empleado en la producción de interleucina 1.beta. humana, .beta.-galactosidasa de *E. coli*, fosfatasa alcalina de *E. coli*, factor de necrosis tumoral humano, e interferón alfa-1 humano [Bender et al., (1990) Gene, vol. 86, pp: 227-232; Lichenstein et al., (1988) J. Bact., vol 170, pp: 3924-3929; Noack et al., (1988) Gene, vol. 68, pp: 53-62; Chang et

al. in T. Okami et al., (1988) Biology of Actinomycetes, Japan Soc. Press, Tokyo, pp: 103-107].

Algunas patentes relacionadas con la producción de proteínas mediante *S.lividans* son: [ES2117591, 1-8-1998, Consejo Superior Investigación (ES), Process for the overproduction, purification and use of Streptomyces coelicor agarase; IE912623, 29-1-1992, American Cyanamid Co (USA), Cloning of the biosynthetic pathway genes for the chlortetracycline production from streptomyces aureofaciens and their expression in Streptomyces lividans; US2001034046, 25-10-2001, Kosan Biosciences Inc (USA), Production of 8,8a-dihydroxy-6-deoxyerythronolide B; US5268290, 7-2-1990, Kyowa Hakko Kogyo KK (JP), Process for producing neuraminidase; US4717666, 5-1-1998, Smithkline Beckman Corp (US) Cloned streptomycete lividans excretable .beta-galactosidase gene; US20020090687, 11-7-2002, Council of Scientific & Industrial Research (IN)].

Uno de los objetivos del entorno industrial es el establecimiento de nuevos procedimientos que incrementen la rentabilidad en la producción de enzimas extracelulares. Con el fin de conseguir una mejora en el rendimiento de proteínas heterólogas producidas por *S.lividans* en algunos casos ha sido añadido ácido casamino al medio de cultivo [US5223418, 29-6-1993, Smithkline Beecham Corp (US), Method of improving the yield of heterologous proteins produced by *Streptomyces lividans*]. Sin embargo, uno de los grandes problemas es la degradación extracelular de estas proteínas, debido al gran número de genes que codifican para proteasas extracelulares en estas bacterias. Una posible estrategia para solucionar este problema es la generación de mutantes de *S.lividans* con deficiencia en actividad proteolítica mediante la delección en el gen que codifica la Proteasa X [US5516685, 14-5-1996, Amgen, Isolation and characterization of a novel protease from *Streptomyces lividans*]. Sin embargo, la acumulación de mutaciones en genes codificantes de proteasas intra y extracelulares siempre produce estirpes más débiles y con mayores dificultades en su crecimiento.

Las proteínas que van a ser secretadas, son sintetizadas con una extensión de aminoácidos en su extremo amino terminal, el péptido señal o péptido líder, que las distingue de las proteínas citoplásmicas y permite su entrada en la ruta. Una vez que el péptido señal ha sido reconocido la proteína se transloca a través de la membrana

citoplasmática.

Uno de los componentes necesarios durante las últimas etapas del transporte de proteínas es una enzima de membrana; la peptidasa señal tipo I (SPasa). Las peptidasas señal tipo I son endopeptidasas de membrana que eliminan el péptido señal de las proteínas exportadas, durante o después de la translocación a través de la membrana. Enzimas de este tipo han sido identificadas en arqueas, bacterias Gram positivas y Gram negativas, en la membrana interna de las mitocondrias de levadura, en la membrana interna de los tilacoides de los cloroplastos y en la membrana del retículo endoplasmático de levaduras y eucariotas superiores.

Después de la eliminación del péptido señal por las SPasas, la proteína madura puede ser liberada de la membrana y se pliega para ser una proteína funcional.

La presente invención describe unas bacterias modificadas en una peptidasa señal tipo I para la sobreproducción de proteínas con estabilidad extracelular. En una realización concreta, esta invención se describe una estirpe de *S.lividans* capaz de crecer en medios de crecimiento tanto definidos como complejos. Esta estirpe es un mutante en una peptidasa señal tipo I, SipY (la mayoritaria), que reduce considerablemente la actividad proteolítica extracelular, porque el péptido señal de las proteasas no puede ser eliminado y por ello no pueden ser exportadas al medio, mientras que permite la síntesis y secreción de proteínas extracelulares sobreproducidas. Aunque la mutación en una peptidasa señal tipo I puede afectar la secreción de otras proteínas distintas de la proteasas, las proteínas que han sido secretadas son más estables en el medio debido a la disminución de la actividad proteolítica, por ello el balance final es la sobreproducción de la proteína de interés.

La presente invención también describe un procedimiento para la sobreproducción y secreción de proteínas mediante el empleo de bacterias con una actividad proteolítica disminuída debido a una modificación en una peptidasa señal tipo I.

DESCRIPCIÓN

Breve descripción

La presente invención se enfrenta con el problema de la degradación extracelular de las proteínas producidas por bacterias debido a las proteasas extracelulares. La solución
5 proporcionada por esta invención se basa en la sobreproducción de proteínas mediante bacterias modificadas en alguno de los genes que codifican para las peptidasas señal tipo I para lograr una deficiencia de actividad proteasa celular.

Esta invención describe una nueva estirpe bacteriana para la sobreproducción de proteínas, en la cual la deficiencia de actividad proteasa extracelular permite que las
10 proteínas secretadas se mantengan estables extracelularmente, asegurando un mejor rendimiento a escala industrial en la producción de proteínas, sin necesidad de utilizar estirpes bacterianas de difícil crecimiento.

Para la construcción de esta nueva estirpe se ha utilizado el plásmido pSN425 (Figura 1) que contiene un fragmento de ADN que contiene los genes que codifican las cuatro
15 peptidasas señal tipo I de *S.lividans* TK21 [Parro y col. (1999). Four genes encoding different type I signal peptidases are organized in a cluster in *Streptomyces lividans* TK21. Microbiology. 145: 2255-63]. Este fragmento de ADN ha sido reivindicado en la presente invención (SEQ ID NO:1).

El plásmido pSN425 tras ser digerido para deleccionar el gen *sipY* se le clonó el gen de
20 resistencia a thioestrepton (*tsr*), dando lugar al plásmido pSNY (Figura 2), que se usó para la generación del mutante en *sipY* en *S.lividans*.

La estirpe mutante *S.lividans* Y62 ha sido reivindicada en la presente invención. Así como los plásmidos pSN425 y pSNY han sido reivindicados en la presente invención.

Las secuencias de aminoácidos de Sip W, Sip X, Sip Y y Sip Z presentan una gran
25 similitud con las peptidasas señal tipo I de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, así como de origen eucariótico. [Parro y col. (1999). Four genes encoding different type I signal peptidases are organized in a cluster in *Streptomyces lividans* TK21. Microbiology. 145: 2255-63]. La presente invención reivindica también otras bacterias modificadas en alguno de sus genes que codifican para peptidasas para su
30 empleo en la sobreproducción de proteínas extracelulares.

Un objeto adicional de la presente invención lo constituye un procedimiento para producir proteínas extracelulares mediante la estirpe mutante en un gen de la peptidasa

señal tipo I. La utilidad de la estirpe *S.lividans* Y62 se ejemplifica para la sobreproducción de agarasa extracelular. El plásmido pAGAs5 construido para la sobreproducción de la agarasa también ha sido reivindicado en la presente invención.

5 Descripción detallada

Las pre-proteínas que van a ser secretadas por la GSP (“General Sec Pathway”) [Van Mellaert, L. y J. Anné. (1994). Protein secretion in Gram positive bacteria with high GC-content. Recent Res. Dev. Microbiol.3: 324-340] son sintetizadas con una extensión de aminoácidos en su extremo amino terminal, el péptido señal o péptido líder, que las distingue de las proteínas citoplásmicas y permite su entrada en la ruta de secreción y su correcta translocación a través de la membrana plasmática. Las peptidasas señal tipo I se encargan del procesamiento del péptido señal permitiendo que la proteína sea translocada [Dalbey R. E. y W. Wickner. (1985). Leader peptidase catalyses the release of exported proteins from the outer surface of the *Escherichia coli* plasma membrane. J Biol Chem 260: 15925-31].

Las peptidasas señal tipo I (SPasas) son proteínas integrales de membrana. Las peptidasas señal tipo I se encargan de procesar específicamente las preproteínas “etiquetadas” con péptidos señal tipo I, eliminando éstos durante o inmediatamente después de su translocación a través de la membrana. [Pugsley, A.P. (1993) The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. Microbiol. Rev. 57: 50-108.; Driessen, A.J.M. (1994). How proteins cross the bacterial cytoplasmic membrane. J. Membr. Biol. 142: 145-159; Dalbey y col, (1997) The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. Protein Science 6: 1129-1138].

En *S.lividans* se han localizado cuatro genes (*sipW*, *sipX*, *sipY* y *sipZ*) que codifican cuatro SPasas tipo I [Parro y col. (1999). Four genes encoding different type I signal peptidases are organized in a cluster in *Streptomyces lividans* TK21. Microbiology. 145: 2255-63].

Para la construcción de la estirpe de la presente invención se ha construido previamente un vector, pSN425 (Figura 1), que contiene un fragmento de 3,45 kb, que engloba desde el oligonucleótido sn30 [Parro y col. (1999). Four genes encoding different type I signal peptidases are organized in a cluster in *Streptomyces lividans* TK21. Microbiology. 145: 2255-63] hasta el sitio de restricción *SphI*, y que contiene los cuatro genes para

peptidasa señal tipo I existentes en *S.lividans*, el gen de resistencia a ampicilina y origen de replicación para *E.coli*. El vector fue digerido con *Pst*I eliminándose un fragmento de 399 pb que fue remplazado por el gen de resistencia a tiosstrepton. Plásmido (pSN425) e inserto (*tsr*) fueron ligados y transformados en células *E.coli* ET12567 y los transformantes se seleccionaron por la técnica de hibridación en filtro. El plásmido resultante se muestra en la figura 2 y se denominó pSNY.

El mutante en *sipY*, que codifica la peptidasa mayoritaria, se ha construido por transformación de protoplastos de *S.lividans* TK21 con el plásmido pSNY convenientemente linealizado y purificado. La región relevante del cromosoma de la estirpe objeto de esta invención (Y62) se muestra en la figura 3.

El efecto del mutante *sipY* en el procesamiento de pre-proteínas, y su comportamiento en condiciones de sobreproducción se ha estudiado mediante la construcción del plásmido recombinante pAGAs5 (Figura 4) el cual deriva de pAGAs1 [Parro V. and R. P. Mellado. 1994. Effect of glucose on agarase overproduction by *Streptomyces*. Gene 145: 49-55] y contiene el gen de la agarasa de *S.coelicolor* (*dagA*) para ser propagado en la estirpe de esta invención, *S.lividans* Y62.

En la estirpe *S.lividans* Y62 [pAGAs5] la actividad proteasa extracelular se ve seriamente disminuida (Ejemplo 2). Esta nueva estirpe produce agarasa extracelular en mayor cantidad que la estirpe salvaje *S.lividans* TK21 [pAGAs5] lo que determina que *S.lividans* Y62 sea de utilidad para la sobreproducción y secreción de proteínas extracelulares (Ejemplo 3).

De acuerdo con el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes, un cultivo de la bacteria derivada de *Streptomyces lividans*, portadora de la mutación en el gen *sipY* y denominada *Streptomyces lividans* Y62 ha sido depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjassot, 46100 Burjassot, Valencia, España, el 17 de Julio de 2002, correspondiéndole el número de depósito CECT 3361.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Esquema del plásmido pSN425. Se indica el tamaño del plásmido y la orientación relativa de los diversos genes; *Amp^R*, gen de resistencia a ampicilina; sipW, sipX, sipY y sipZ, los cuatro genes que codifican para peptidasas señal tipo I en *S.lividans*.

Figura 2.- Esquema del plásmido pSNY. Se indica el tamaño del plásmido y la orientación relativa de los diversos genes; *Amp^R*, gen de resistencia a ampicilina; sipW, sipX, sipY y sipZ.

Figura 3.- Esquema de la región relevante del cromosoma de la estirpe objeto Y62. Se indican las cajas que se mantienen en la estirpe; AI, B, C y AII. Así como las endonucleasas de restricción usadas para su construcción; *Pst*I (P₂-P₃), los genes anterior y posterior; *sipX* y *sipY* y el gen de resistencia a tiostrepton; *tsr^R*.

Figura 4.- Esquema del plásmido pAGAs5. Se indica el tamaño del plásmido y la orientación relativa de los diversos genes; *neo^R*, gen de resistencia a kanamicina; *dagA*, gen de la agarasa de *S.coelicolor*.

Figura 5.- Curvas de crecimiento de la estirpe *S.lividans* Y62 en comparación con la estirpe *S.lividans* TK21. A) Crecimiento en medio NMMP + manitol 0,5%. B) Crecimiento en medio YEME.

Figura 6.- Actividad proteasa extracelular. Se representa el porcentaje de la actividad proteasa extracelular a lo largo del crecimiento en la estirpe Y62 en relación con *S.lividans* TK21.

Figura 7.- Secreción de agarasa en condiciones de sobreproducción. Se ha analizado tanto agarasa asociada a la célula, en su forma precursora y madura, como la secreción de agarasa madura. 1, 2, 3 y 4 representan las diferentes fases del crecimiento; 12h, 22h, 36h y 45h respectivamente.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo del alcance de la misma.

Ejemplo 1.- Construcción de la estirpe *S.lividans* Y62.

5 Los métodos empleados para el crecimiento y la manipulación de las cepas se han realizado según Hopwood y colaboradores [Hopwood, Bibb, Chater, Kieser, Lydiate, Smith, Ward y Schrempf.1985.Genetic manipulation of *Streptomyces*.A Laboratory Manual. Norwich, John Innes Foundation].

La construcción de la estirpe se realizó mediante la construcción de un vector, pSN425,
10 que contiene un fragmento de 3,45 kb (SEQ ID NO:1) con los cuatro genes para peptidasa señal tipo I de *S.lividans*, desde el nucleótido sn30 hasta el sitio de restricción *Sph*I, el gen resistencia para ampicilina y el origen de replicación para *E.coli*. Un fragmento de 399 pb (SEQ ID NO:2) fue eliminado mediante la digestión con *Pst*I y fue remplazado por el gen de resistencia a tiosstrepton al cual se le había eliminado el
15 terminador para evitar posibles efectos polares. El plásmido (pSN425) y el inserto (*tsr*) fueron ligados y transformados en células *E.coli* ET12567 y los transformantes obtenidos en LB con ampicilina 100 mg/ml se seleccionaron por la técnica de hibridación en filtro. El ADN se desnaturalizó e inmovilizó en una membrana de nylon (Hybond-N+ de Amersham) y se hibridó en una solución SSC 2X, SDS 0,1%, 6mg/ml
20 de esperma de Salmón, con el gen *tsr* marcado con el fragmento *klenow* de la ADN polimerasa en sus extremos 5'OH con α dCTP(P³²). Después de la hibridación la adsorción no específica se lavó y se autorradiografió el filtro para identificar los clones positivos. La correcta orientación se comprobó mediante el análisis de los fragmentos de ADN resultantes de los patrones de digestión con distintas endonucleasas de
25 restricción. El plásmido resultante se denominó pSNY, ver figura 2.

El mutante en *sipY* se ha construido por transformación de protoplastos [Kieser, Bibb, Buttner, Keith, Chater y Hopwood. (2000) Practical *Streptomyces* Genetics. John innes Center, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, England] de *S.lividans* TK21 con el plásmido pSNY convenientemente linealizado y purificado. La correcta
30 integración en el genoma se ha verificado por Southern blot.

La estirpe de la presente invención, *S.lividans* Y62, no ve afectado su crecimiento cuando se cultiva en medio definido NMMP suplementado con manitol 0,5% y con

tiostrepton 5 µg/ml, ni cuando se hace en medio nutritivo YEME con tiostrepton 10 µg/ml. (Figura 5a y 5b respectivamente).

Ejemplo 2.- Efecto de la estirpe *S.lividans* Y62 en la secreción de proteasas extracelulares.

- 5 Para determinar la actividad proteasa extracelular, se ha seleccionado el medio definido NMMP donde la secreción de proteasas es mayor, y donde el efecto de la mutación debería ser más patente que en otros medios. Los sobrenadantes procedentes de 20 ml de cultivo en medio NMMP en las diferentes fases de crecimiento, fueron concentradas con sulfato amónico al 80% de saturación. Las proteínas precipitadas fueron recogidas por centrifugación a 13000 x g durante 30 minutos y disueltas en 0,1M Tris-HCl pH 8. Diferentes alícuotas fueron llevadas a un volumen final de 1 ml con 0,1M-imidazol-HCl pH 7,2 en presencia de 7 mg de Hide Powder Azure (Sigma Chemical Co.) e incubadas a 37 °C hasta el viraje a color azul [Parro V. and R. P. Mellado. 1994. Effect of glucose on agarase overproduction by *Streptomyces*. Gene 145: 49-55]. Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 mg de Hide Powder Azure en 30 minutos de incubación a 37 °C.

La inactivación de SipY provoca una considerable reducción en la actividad proteolítica extracelular, que mayoritariamente ocurre en las fases de transición y estacionaria (Figura 6), lo que podría permitir que las proteínas sobreproducidas se mantengan estables en el medio extracelular sin ser degradadas.

Ejemplo 3.- Efecto de la estirpe *S.lividans* Y62 en la secreción de agarasa en condiciones de sobreproducción.

- Para correlacionar el efecto del mutante *sipY* en el procesamiento de pre-proteínas, y su comprometimiento en condiciones de sobreproducción, ha sido construido el plásmido recombinante pAGAs5 (Figura 4) conteniendo la agarasa (DagA) de *S.coelicolor* y se le ha inactivado el gen de resistencia a tiostrepton mediante un cambio en su fase de lectura, para poder ser propagado en *S.lividans* Y62.

La síntesis y secreción de DagA ha sido monitorizada mediante experimentos de Western-blot. En el caso de la estirpe *S.lividans* Y62 [pAGAs5] se observa agarasa precursora y madura asociada a la célula. Sin embargo, a pesar de esta acumulación intracelular los niveles relativos de agarasa extracelular sobreproducida son mayores que en la estirpe *S.lividans* TK21 [pAGAs5] debido a la ausencia de proteasa

extracelular, indicando que la estabilidad de las proteínas en el medio extracelular es mayor a lo largo del tiempo. Por lo tanto la estirpe *S.lividans* Y62 resulta muy apropiada para la sobreproducción de proteínas extracelulares (Figura 7).

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria con capacidad para la sobreproducción y secreción de proteínas, caracterizada porque es una bacteria con una modificación en un gen que codifica una peptidasa.
- 5 2. Bacteria según la reivindicación 1, caracterizada porque es una bacteria con una modificación en un gen que codifica una peptidasa señal tipo I.
3. Bacteria según la reivindicación 2, caracterizada porque la modificación en un gen que codifica una peptidasa señal tipo I, es una mutación que incluye delección, inserción, o substitución de los aminoácidos naturalmente presentes.
- 10 4. Bacteria según la reivindicación 3, caracterizada porque es una bacteria Gram-negativa.
5. Bacteria según la reivindicación 3, caracterizada porque es una bacteria Gram-positiva.
- 15 6. Bacteria según la reivindicación 4, caracterizada porque es una bacteria del género *Escherichia*.
7. Bacteria según la reivindicación 5, caracterizada porque es una bacteria del género *Streptomyces* o *Bacillus*.
8. Bacteria según la reivindicación 7, caracterizada porque es la bacteria *Streptomyces lividans* Y62, depositada en la CECT con el número de depósito 3361 y porque presenta una delección en el gen que codifica la peptidasa señal tipo I, Sip Y.
- 20 9. Bacteria según la reivindicación 7, caracterizada porque una bacteria derivada de *S. lividans* Y62.
10. Un fragmento purificado y aislado de ADN, caracterizado porque es una secuencia de ácido nucleico de 3450 pb que codifica los genes para las cuatro peptidasas señal tipo I de *S. lividans* TK21 (SEQ ID NO:1).
- 25 11. Un plásmido (pSN425), caracterizado porque contiene el fragmento de ADN de la reivindicación 10 para el clonaje y la propagación de peptidasas señal tipo I de *S. lividans* TK21.
- 30 12. Un plásmido (pSNY), caracterizado porque ha sido construido a partir del plásmido pSN425 según la reivindicación 11 al que se ha delecionado un fragmento de 399 pb (SEQ ID NO:2) en el gen *sipY* que codifica la peptidasa

señal tipo I Sip Y y que ha sido remplazado por el gen de resistencia a tiosstrepton.

13. Un plásmido para la propagación del gen de la agarasa (DagA) de *S.coelicor* y la sobreproducción de agarasa.
- 5 14. Un procedimiento para la obtención de una bacteria según las reivindicaciones 8 y 9, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:
 - a) los protoplastos de la bacteria son transformados con el plásmido pSYN de la reivindicación 12, y
 - b) el plásmido pSYN linealizado se integra en el genoma de la bacteria.
- 10 15. El uso de las bacterias según las reivindicaciones de la 1 a la 9 para la sobreproducción y secreción de proteínas extracelulares.

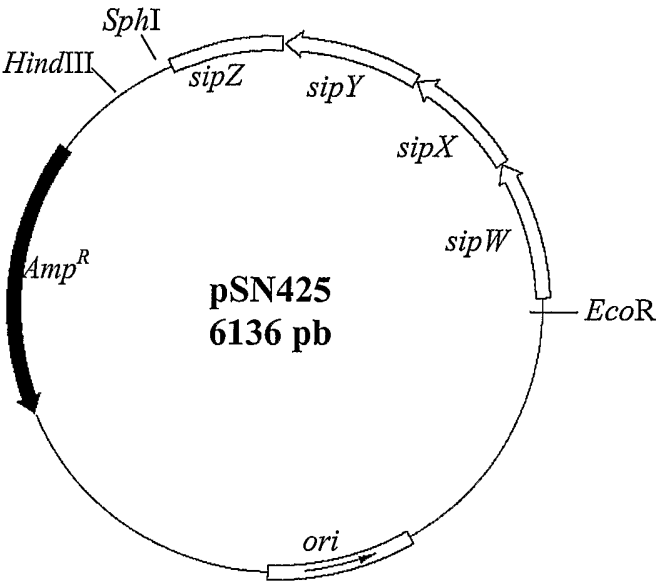


Figura 1

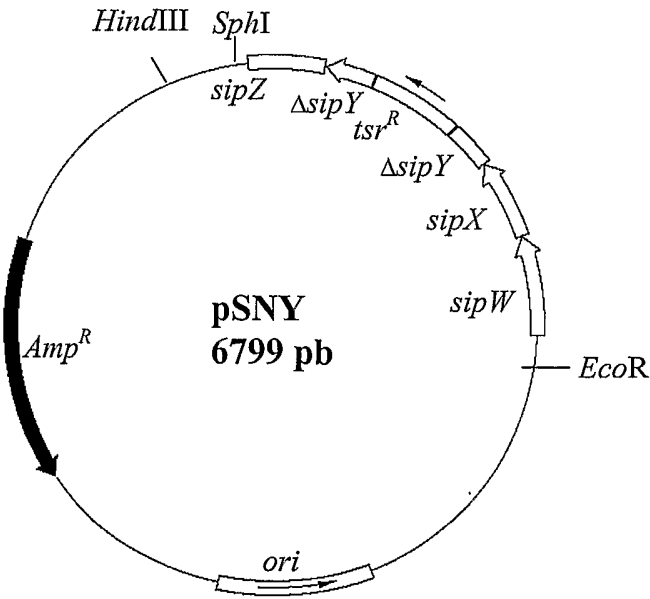


Figura 2

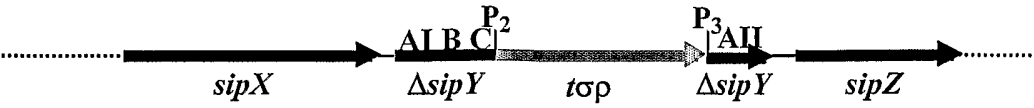


Figura 3

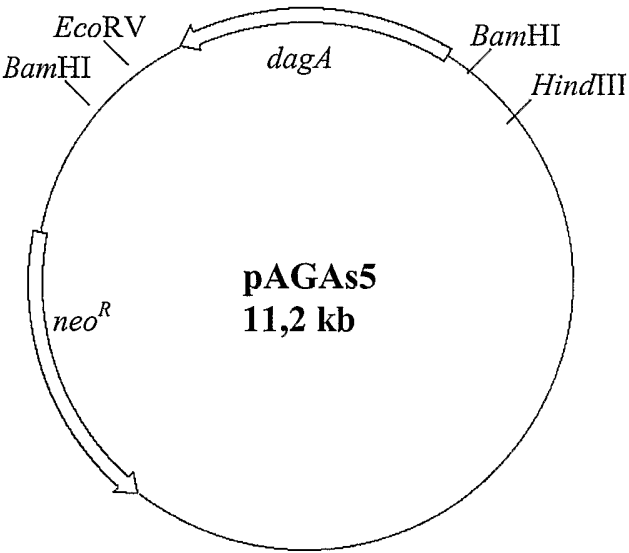
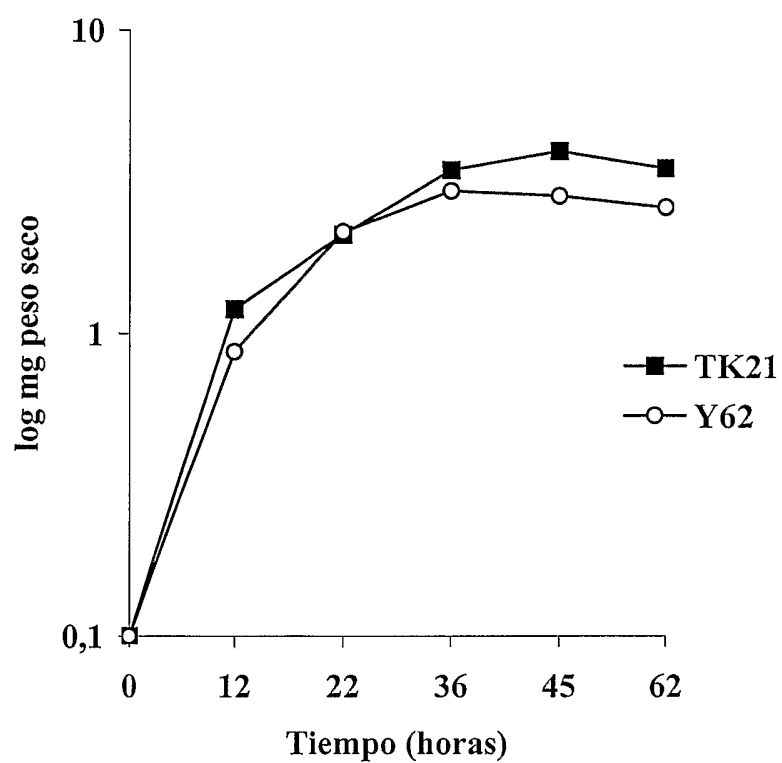


Figura 4

3/4

A)



B)

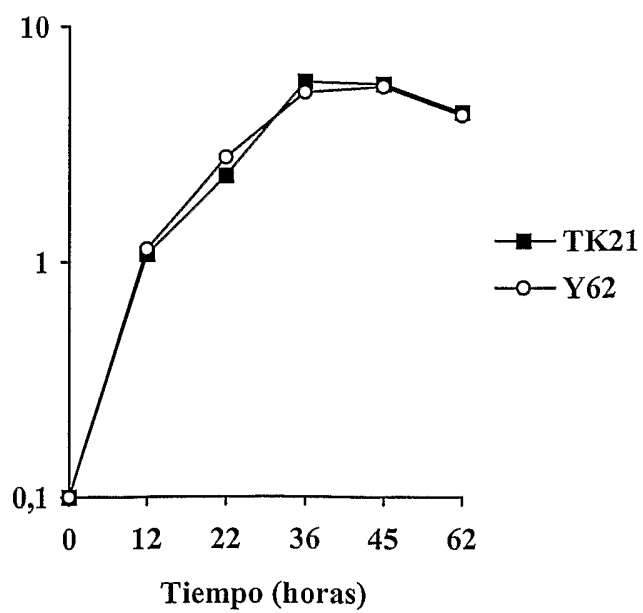


Figura 5

4/4

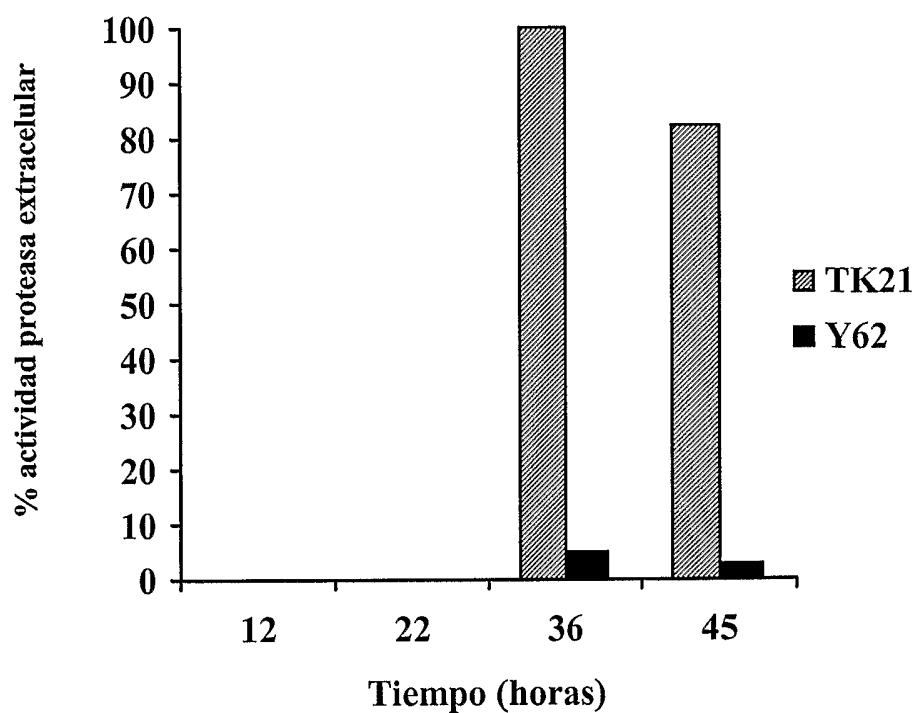


Figura 6

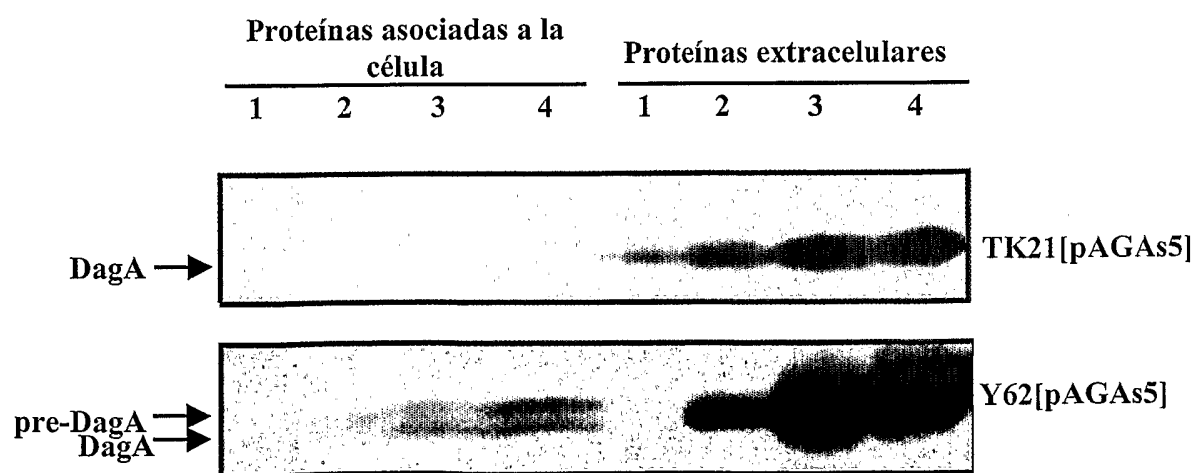


Figura 7

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas	
	<120> Bacterias con capacidad para la sobreproducción y secreción de proteínas	
10	<130> Sobreproducción y secreción de proteínas en <i>S.lividans</i>	
15	<160> 2	
	<170> PatentIn version 3.1	
20	<210> 1	
	<211> 3450	
	<212> DNA	
25	<213> <i>Streptomyces lividans</i>	
30	<400> 1	
	gcgcgacagc tgcgatggac accgaaacac agcacacgga gcgcgaccgc tcctcccgcc 60	
	cttccgactc cgagcagccc tcggagcccg agggcccgga ggaacggtcg cgttccgcgt 120	
35	tcacggggcg gatcggggac tggtgcccg gcggccggat caccgtgacc ctgctgatcc 180	
	tcctgctgtt cctgctgctg gtcagcacct tcgtcctgca gccgttccag atccccagtg 240	
40	gatcgatgga acgtggattg aggatcggcg accgggttct cgtaaataag ttggcgtacc 300	
	gtttcgacgg tcggccgcgc aggggagaca tcgtcgtctt cgacggcacc gggagcttcg 360	
	ggcacggcga ctacatcaaa cgcgttgctg gtgtgggcgg ggaccacgtg gtgtgctgcg 420	
45	acgaggaggg gagggtcggg gtgaacggcc agccggtcga cgagtcggcg ttctgtacc 480	
	ccggcgaccg cccgtccacg gtgcctttcg acgtcgtcgt ccccgacggc accctcttcg 540	
50	tcctcggcga ccaccggtcc gactccagcg actcccgcga ccacctgggc tccccggggg 600	
	gcgggatggt tccgctggac gacgtgatag gccgcgccga ctggatcgtc tggcccttcg 660	
	gccatgccac ccgcctcgac cgccccgacg cctacgcgcg cgtaccggac gcggaggccg 720	
55	gcgccggggc cgcgtccggc gccggagcgg cggccgaccc cggagcggcg cccgacgggg 780	
	acgccgatgg gtagccgggg caagccgcgg ggagcgccca gcagccccgc ggagaacctg 840	
	ctgcccaccg ggtccaggcg caccgcgcgc ccgtccggcg gccgctcgcg cgccgagcgc 900	

	cgcaaactcc agcgcaaggt caaacggcgg cgcagacgcg gcgccgtcaa ggagatcccc	960
5	ctcctcgtcg gcgtcgcggt cctcatagcg ctgggtgctga agaccttcct cgtccaggcc	1020
	ttcgtgatcc cgtcgggctc catggagcag accatccgga tcggggaccg ggtcctggtc	1080
	gacaagctga ccccttggtt cgggtccgag ccgcagcgcg gggacgtcgt cgtcttccgg	1140
10	gaccccgcg gctggctcca gggcgagcag accacgaaga aggacgacct cgtcgtcgtc	1200
	aaacaggtca aggaaggcct cgccttcata ggactgctgc cgtccgacga cgagaaggac	1260
15	ctcatcaagc gggtcgtcgg cgtgggcggc gaccacgtca agtgctgcga caaacagggc	1320
	cgcgtcaccg tcaacggcgt acccctgacc gaggactacc tgtaccccg ggaccgccc	1380
	tcccggacgc cgttcgacgt caccgtcccc gaggggcggc tgtgggtgat gggcgaccac	1440
20	cgggtccaact ccgccgactc ccgcgcccac caggagaccg acttcggcac cgtgtcccag	1500
	gacgaggtgg tgggtcgggc catgggtgat gcctggccgt tcgggtcactg gaccaccctg	1560
25	gacgagccga aaacgtacgc gtccgtctcc gacgcggcct ccggttcgac cgccgctccc	1620
	gagctgtcgc atagggttg cccctacgat ccgaacgcga tgatggaact cccgaccctt	1680
	gcggaactcc cgctcgttat gggagtgggt gcctgcgccg tatccggggc aggcggcggc	1740
30	agagagtgag gagttggcgt gggggatgtg gcggttggcg cacgggtccg tcacgacggc	1800
	gaggagaacc gcggacgccc cgaggagagg tcgggtccg ccgcggtcg cgccccgac	1860
35	tccggacacg gctccggaac cgaggacggc aggggtgacga acggacagcg cgggcaggac	1920
	ggacacaacg gcgggacgga ggacgagga gtgcggcgga cgccaccgc gaccccgccc	1980
	gcggccaaga agcagcgtc cttctggaag gagctgccga tcctggtcg catcgcgctg	2040
40	gtgctcgccc tgctgatcaa gacgttcctg gtgcaggcgt tctcgatccc gtcctcctcg	2100
	atggagaaca cccttcagat cggtgaccgg gtccctggtcg acaagctgac cccctggttc	2160
45	ggctcggagc ccgagcgcgg cgaggctgtg gtcttccacg acccgccga ctggctggcg	2220
	ggcgagccga cacctgacct gaacgcgctg cagacggtcc tcagctggat cggcctgatg	2280
	ccgtccgcgg aagagaagga cctgatcaag cgggtcatcg gagtcgccg tgacacggtc	2340
50	gagtgaaca agaccggccc gctcaaggtc aacggcaagg cgctgaacga gccctacgtc	2400
	taccccgga acacgccgtg ctccggacgac gaccagggcg ggcggttcaa ggtcacggtg	2460
55	cccagggga aaatctgggt catgggcgac caccggcaga actcccggga ctcccgtac	2520
	aaccagtcgg acaagaacgg cggcatggtc ccggtggacg aggtcgtcgg ccgcgccatc	2580
	gtggtcgcct ggccgatgaa ccgctggggc accctgccgg tccccgacac cttcgaccag	2640
60	gacgggctgc agggccgatc ctccggccgc gccgcgctgt cggtcgcgcc ccaggggctg	2700

3.

	gccgtcgccg gtgtggtccc gttcgtgtgg tggcgccgtc gtcgcaccgc cccggccgag	2760
5	acccgctgag ccccgcgat cccgccgct gtcccccgcg gttcgaccag ccccttccg	2820
	gcctccggga gggggctgcc ccgttggcgt accgccgggt aagggtgccgc tccatgggtg	2880
	gcgagagcac gacacgtacg gtccccgcg gcgccggagc gaacaagggc ccggtgggca	2940
10	gccggaccgg acagcggctg tccggcatcg cggtaggtct gggcctggtg ctgttcctcg	3000
	gcggcttcgc ctggggagcg gtggtctacc gtccctacac cgtgccgacc agctcgatga	3060
15	cgccgacgat cgacgccggt gaccgggtcc tggcgacgag catcgacggc gccgacgtcc	3120
	gccgtggcga cgtcgtcgtg ttcaaggacg cgacctgggc caacgcccc atggtcaagc	3180
	gggtcgtcgc cgtgggcggg gacaccgtct cctgctgtca gcagggaag ctgaaggta	3240
20	acggcaaggat gatcgacgag ccgtacctgc ccgccggcac cccggccgag atcagcgact	3300
	tccagaccgt gaccgtcccg gagggccgac tgttctctgt gggcgacgag cggcgcaact	3360
25	ccgtggactc caccgcccac ctgaccgacg cggccgcggg caccgtgtcg cgcggcgccg	3420
	tggacgcccc cgtggacgcc gtggcctggc	3450
30	<210> 2	
	<211> 399	
	<212> DNA	
35	<213> Streptomyces lividans	
40	<400> 2	
	tgcagacggt cctcagctgg atcggcctga tgccgtccgc ggaagagaag gacctgatca	60
	agcgggtcat cggagtcgcc ggtgacacgg tcgagtgcaa caagaccggc ccgctcaagg	120
45	tcaacggcaa ggcgctgaac gagccctacg tctaccccg caacacgccg tgctcggacg	180
	acgaccaggg cgggcgggtc aaggtaacgg tgcccagggg caaaatctgg gtcattggcg	240
	accaccggca gaactcccg gactcccgct acaaccagtc ggacaagaac ggcggcatgg	300
50	tcccggtgga cgaggtcgtc ggccgcgcca tcgtggctgc ctggccgatg aaccgctggg	360
	gcacctgcc ggtccccgac accttcgacc aggacgggc	399