

(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
6 de julio de 2017 (06.07.2017)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2017/115000 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/01* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2017/070002

(22) Fecha de presentación internacional:
2 de enero de 2017 (02.01.2017)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201531949
31 de diciembre de 2015 (31.12.2015) ES
P201531950
31 de diciembre de 2015 (31.12.2015) ES

(71) Solicitantes: **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, 41071 Sevilla (ES). **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, 28006 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD DE SEVILLA** [ES/ES]; Pabellón de Brasil, Pº de las Delicias, s/n, 41013 Sevilla (ES).

(72) Inventores: **BLÁZQUEZ GÓMEZ, Jesús**; Instituto de Biomedicina de Sevilla, Campus Hospital Universitario "Virgen del Rocío", Avda. Manuel Siurot, s/n, 41013 Sevilla (ES). **CASTAÑEDA GARCÍA, Alfredo**; Instituto de Biomedicina de Sevilla, Campus Hospital Universitario "Virgen del Rocío", Avda. Manuel Siurot, s/n, 41013 Sevilla (ES). **PRIETO MÁRQUEZ, Ana Isabel**; Instituto de Biomedicina de Sevilla, Campus Hospital Universitario "Virgen del Rocío", Avda. Manuel Siurot, s/n, 41013 Sevilla (ES). **ROJAS MENDOZA, Ana**; Instituto de Biomedicina de Sevilla, Campus Hospital Universitario "Virgen del Rocío", Avda. Manuel Siurot, s/n, 41013 Sevilla (ES). **WADEL, Simon**; Instituto de Biomedicina de Sevilla, Campus Hospital Universitario "Virgen del Rocío", Avda. Manuel Siurot, s/n, 41013 Sevilla (ES). **CANTILLON, Daire**; Instituto de Biomedicina de Sevilla, Campus Hospital Universitario "Virgen del Rocío", Avda.

Manuel Siurot, s/n, 41013 Sevilla (ES). **DOHERTY, Aidan**; Instituto de Biomedicina de Sevilla, Campus Hospital Universitario "Virgen del Rocío", Avda. Manuel Siurot, s/n, 41013 Sevilla (ES). **PAGET, Mark**; Instituto de Biomedicina de Sevilla, Campus Hospital Universitario "Virgen del Rocío", Avda. Manuel Siurot, s/n, 41013 Sevilla (ES).

(74) Mandatario: **FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo**; Hoffmann Eitle, S.L.U., Paseo de la Castellana, 140, 3º planta. Edificio LIMA, 28046 Madrid (ES).

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: GENETICALLY HYPERVARIABLE PROKARYOTE STRAINS

(54) Título : CEPAS DE PROCARIOTAS GENÉTICAMENTE HIPERVARIABLES

(57) Abstract: The present invention relates to a new mismatch repair (MMR) system for Actinobacteria. The phased inactivation of the archaeon gene nucS (or an orthologous thereof) in Actinobacteria (including *Mycobacterium* and *Streptomyces*) increases by two orders of magnitude the mutation rate and by one order of magnitude the recombination of DNA sequences which are not completely identical. This new MMR is present in all Actinobacteria, in some Terrabacteria and in many Archaeobacteria (a complete list is provided). The present invention also describes the construction of genetically hypervariable organisms of certain species and the possible biomedical and industrial use thereof.

(57) Resumen: En la presente invención caracterizamos un nuevo sistema de reparación de bases desapareadas (mismatch repair -MMR) en Actinobacteria. La inactivación en fase del gen de origen arqueano nucS (o un ortólogo del mismo) en actinobacterias (incluyendo *Mycobacterium* y *Streptomyces*), aumenta dos órdenes de magnitud la tasa de mutación y un orden de magnitud la recombinación entre secuencias de ADN no completamente idénticas. Este nuevo MMR está presente en todas las actinobacterias, algunas terrabacterias y en muchas arqueobacterias (se proporciona un listado completo). Asimismo a lo largo de la presente invención, describimos la construcción de organismos genéticamente hipervariables en determinadas especies y su posible uso biomédico e industrial.



WO 2017/115000 A1

Cepas de procariotas genéticamente hipervariables**CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención se refiere al campo de la medicina y la producción industrial, en particular al hecho de que la inactivación en Actinobacterias, particularmente *Mycobacterium* y *Streptomyces*, de un homólogo del gen de origen arqueano *nucS* (también conocido como *endoMS* y que codifica una endonucleasa) aumenta dos órdenes de magnitud la tasa de mutación y cerca de un orden de magnitud la frecuencia de recombinación entre secuencias de
10 ADN no perfectamente homólogas. Por tanto, la inactivación de dicho gen o cualquiera de sus homólogos conducirá a la construcción de cepas genéticamente hipervariables en las que se pueden seleccionar fácilmente variantes con características biomédicas y/o industriales beneficiosas.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Todos los seres vivos aseguran el mantenimiento de su estabilidad genética mediante el uso de una plétora de procesos de vigilancia y corrección del ADN. Estos procesos incluyen la selección de base, la edición durante la polimerización, la corrección de bases desapareadas
20 (mismatch repair-MMR), la reparación por excisión de base o nucleótido, la reparación por reparación y el "non-homologous end joining". Hasta la fecha, el proceso de MMR está altamente conservado entre los seres vivos. En todos los casos, miembros de las familias proteicas MutS y MutL desempeñan etapas clave en la corrección de bases desapareadas. Este sistema MMR, basado en MutS-L (que a partir de aquí llamaremos MMR canónico), es un
25 sistema altamente sofisticado que detecta y elimina las bases apareadas incorrectamente en el DNA. La pérdida de esta actividad tiene consecuencias muy importantes en los seres vivos, como altas tasas de mutación y la elevación de la frecuencia de recombinación entre secuencias de ADN no idénticas (homeólogas), lo que conduce a la pérdida de estabilidad genética y a la reducción del aislamiento genético entre especies.

30 Curiosamente, pese a la casi ubicuidad del sistema MMR canónico entre los seres vivos, existen notables excepciones. Los genomas de muchas especies del dominio Archaea y de casi todos los miembros del filo Actinobacteria (dominio Bacteria), incluyendo las especies de los géneros *Mycobacterium* y *Streptomyces*, secuenciados completamente carecen de
35 homólogos de MutS y MutL. Sin embargo, estos procariotas exhiben tasas y espectros mutacionales similares a aquellas especies que poseen el sistema MMR canónico, lo cual sugiere la existencia de un/unos mecanismo/s responsable/s de la corrección de bases desapareadas en el ADN no identificados hasta el momento.

En particular, *Mycobacterium tuberculosis*, la causa de la tuberculosis (TB), es el patógeno más común conocido y la principal causa de muerte en todo el mundo debido a un solo patógeno bacteriano que infecta a un tercio de la población mundial. Aunque el control de la enfermedad mejoró durante años, con una disminución en el número absoluto de casos de tuberculosis desde 2006, el aumento de cepas multi-resistentes a los medicamentos (MDR-TB), que se define como resistentes al menos a las dos drogas más poderosas anti-TB, isoniazida y rifampicina, está amenazando los esfuerzos de control. Cada año, alrededor de 480.000 personas adquieren esta forma complicada de tuberculosis (5% de todos los casos de TB son MDR-TB) y 210.000 mueren. Las cepas MDR-TB muestran tasas de mortalidad más altas y requieren tratamientos más largos con antibióticos de "segunda línea" menos eficaces y más costosos. Por otra parte, la tuberculosis extremadamente resistente (XDR-TB), una forma de tuberculosis totalmente resistente a casi todos los fármacos antituberculosos ha sido reportada en todo el mundo. XDR-TB (9% de todos los casos de MDR-TB) se está convirtiendo en una enfermedad letal que no pueden ser tratadas con éxito con los antibióticos antituberculosos actuales.

Las fuerzas evolutivas que impulsan la aparición y propagación de *M. tuberculosis* resistente a fármacos son extrínsecas, incluidos las que según el diagnóstico, el tratamiento y la idiosincrasia del paciente, e intrínseca, incluyendo sus características genéticas y de la población. Entre los factores intrínsecos que pueden modular la evolución a la resistencia se ha sugerido que la tasa de mutación es de gran importancia.

Como se ha indicado anteriormente, *M. tuberculosis* exhibe tasas de mutación similar a otras especies bacterianas tales como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, tanto *in vitro* como *in vivo*. Mientras que un amplio conjunto de genes mutadores está bien caracterizado en *E. coli* y *P. aeruginosa*, los mecanismos que cooperan para evitar la adquisición y fijación de mutaciones en *M. tuberculosis* siguen siendo en gran medida desconocidos. Dado que las especies *M. tuberculosis* parecen estar genéticamente aisladas, adquieren resistencia a los antibióticos exclusivamente a través de mutaciones cromosómicas (la mayoría de los cuales son polimorfismos de un solo nucleótido, SNP), podría hipotetizarse que, como otros patógenos bacterianos que producen infecciones crónicas como *P. aeruginosa* en la fibrosis quística (CF) y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la selección de cepas de *M. tuberculosis* con las tasas de mutación más altas debería verse favorecida bajo terapia con antibióticos. Sin embargo, este tipo de cepas hipermutables no se han caracterizado hasta ahora en *M. tuberculosis*.

Debido a la falta de un sistema MMR reconocible en micobacterias, la regla de la hipermutación por inactivación natural de alguno de los componentes del sistema de MMR queda descartada en *M. tuberculosis*. Por ello, durante años se ha buscado una posible vía para la hipermutación en aislados naturales de *M. tuberculosis*. La deficiencia en los genes que pertenecen al sistema GO, un sistema que evita mutaciones por 8-oxo-GTP, particularmente *mutT* y *mutY*, se sugirió como responsable de las tasas de mutación elevadas en las cepas "Beijing" de *M. tuberculosis*, ya que albergan diversas sustituciones no sinónimas en el gen *mutT*. Sin embargo, la redundancia en los genes *mutT* y el efecto leve en la tasa de mutación cuando se inactivan en micobacterias, sugieren un papel de menor importancia de estas sustituciones en el aumento de las tasas de mutación en *M. tuberculosis*. Recientemente, se ha demostrado que la inactivación del dominio DnaE1 PHP en *M. tuberculosis* aumenta la tasa de mutación en tres órdenes de magnitud. Análisis de secuencias de *DnaE1* de un gran número de *M. tuberculosis* aislados en clínica se identificaron 3 SNP sin sentido en aproximadamente 3% de todos los aislamientos. Sin embargo, cuando el efecto de estos cambios en la tasa de mutación se estudió en el modelo sustituto de *M. smegmatis*, sólo se detectó un modesto aumento de 3 veces. Finalmente, la mutagénesis inducible se atribuye a una ADN polimerasa micobacteriana especializada, DnaE2, que actúa como una enzima propensa a errores que pueden contribuir a la aparición de mutaciones de resistencia a antibióticos cuando se induce en condiciones de estrés. Por lo tanto, hasta la fecha, ninguna asociación entre hipermutabilidad estable (es decir, no inducible) y reparación del ADN o polimorfismos de genes antimutadores se ha demostrado en aislados clínicos de *M. tuberculosis*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Para testar la hipótesis de la existencia de un nuevo sistema MMR (no-canónico), se construyó y se cribó una librería de inserciones del transposón Φ MycoMarT7 en *Mycobacterium smegmatis* mc² 155. El chequeo de la librería rindió un clon con una tasa de mutación incrementada dos órdenes de magnitud. El estudio en profundidad de la inserción y sus consecuencias ha llevado al descubrimiento de un nuevo sistema de reparación de bases desapareadas, prácticamente alternativo al MMR canónico, y que está presente principalmente en especies del filo Actinobacteria (dominio Bacteria), algunas terrabacterias y muchas especies del dominio Archaea.

En particular, se analizó en primer lugar si el genoma de micobacterias podría producir alelos mutantes fuertes. Tras el cribado de una gran biblioteca de transposones en mc² 155 *M. smegmatis* (~11,000 clones), se caracterizó un gen (MSMEG_4923 o *nucS/endoMS*) que producía un fenotipo hipermutador e hiper-recombinador cuando se inactiva. El gen ortólogo, SCO5388, se inactivó en *Streptomyces coelicolor*, mostrando el mismo fenotipo hipermutador.

El análisis de la distribución taxonómica de NucS entre 3.942 proteomas demostró que NucS y MutS-L son prácticamente excluyentes en la naturaleza (solo en 28 especies coexisten NucS y MutSL). NucS está totalmente ausente en eucariotas y virus.

Análisis in silico de la secuencia del gen MT_1321 (el ortólogo de *nucS* en *M. tuberculosis*) en
5 $\approx$ 1.600 genomas de *M. tuberculosis* y la secuenciación directa de 63 aislados clínicos se
identificaron 10 SNPs sin sentido. Cinco de ellos que confieren un fenotipo hipermutable claro,
con aumentos en la frecuencia de mutantes de uno a dos órdenes de magnitud por encima del
tipo silvestre, en el sistema heterólogo de *M. smegmatis*. Estas observaciones se correlacionan
con las de un modelado estructural integral de los SNPs, que ayuda a comprender los efectos
10 producidos por estas mutaciones.

Basándose en estos hallazgos, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un
método para la producción de cepas hipermutables en microorganismos que comprende:

- a. Identificación de la existencia del gen o genes que codifican para la/s
endonucleasa/s NucS (secuencia de referencia NCBI: NP_215837.1), o de un
15 gen homólogo u ortólogo de *nucS* (secuencia de referencia MT_1321), en un
microorganismo perteneciente a los dominios Bacteria o Archaea; y
- b. inactivar dichos gen o genes;

donde la inactivación de dicho gen/es cause que dicho microorganismo sea una cepa
20 hipermutable/hiper-recombinable (genéticamente hipervariable) en comparación con la cepa en
la que no se ha realizado tal inactivación.

En este sentido, se hace notar que la inactivación de dicho gen/es causa un aumento de las
frecuencias de mutación y recombinación homeóloga de secuencias de ADN parcialmente
25 divergentes en *M. smegmatis*, y en todos los organismos que posean un sistema de reparación
de ADN basado en NucS. Estos resultados hacen que sea plausible que tal inactivación en
procariotas, en particular en cualquier actinobacteria y muchas especies del dominio Archaea
incluidos, entre otros, *Bifidobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Pyrococcus*, *Thermococcus* y
Halobacterium (ver listado de especies en la tabla a continuación), proporcione el mismo efecto
30 técnico, en particular, la generación de cepas modificadas genéticamente hipervariables. Estas
cepas modificadas genéticamente hipervariables pueden ser a su vez utilizadas para mejorar
las fermentaciones, la creación de rutas híbridas para obtener nuevos metabolitos, incluyendo
antibióticos, aminoácidos, azúcares, proteínas, etc y la biorremediación de los productos
recalcitrantes.

A continuación mostramos una extensa lista de organismos procariotas donde la inactivación de dichos gen/es causará que dicho organismo sea una cepa hipermutable en comparación con la cepa en la que no se ha realizado tal inactivación:

Actinobacteria (Acidimicrobiia_class)	Ilumatobacter_coccineus_YM16-304
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Acidothermus_cellulolyticus_(strain_ATCC_43068_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinobacteria_bacterium_IMCC26256
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinobacteria_bacterium_OK006
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinobacteria_bacterium_OK074
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinobacteria_bacterium_OV320
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinobacteria_bacterium_OV450
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinomyces_graevenitzii_C83
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinomyces_massiliensis_F0489
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinomyces_neuui_BVS029A5
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinomyces_sp._oral_taxon_175_str._F0384
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinomyces_sp._oral_taxon_178_str._F0338
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinomyces_sp._oral_taxon_180_str._F0310
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinomyces_sp._oral_taxon_448_str._F0400

Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinomyces_sp._oral_taxon_848_str._F0332
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinomyces_turicensis_ACS-279-V-Col4
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinomyces_urogenitalis_DSM_15434
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinoplanes_friuliensis_DSM_7358
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinoplanes_missouriensis_(strain_ATCC_14538_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinoplanes_sp._(strain_ATCC_31044_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinoplanes_sp._N902-109
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinosynnema_mirum_(strain_ATCC_29888_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Actinotignum_schaalii
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Aeromicrobium_marinum_DSM_15272
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Amycolatopsis_mediterranei_(strain_S699)_(Nocardia_mediterran ei)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Amycolatopsis_orientalis_HCCB10007
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Amycolicoccus_subflavus_(strain_DSM_45089_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Arcanobacterium_haemolyticum_(strain_ATCC_9345_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Arthrobacter_arilaitensis_(strain_DSM_16368_

Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Arthrobacter_aurescens_(strain_TC1)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Arthrobacter_chlorophenolicus_(strain_ATCC_700700_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Arthrobacter_globiformis_NBRC_12137
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Arthrobacter_sp._(strain_FB24)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Arthrobacter_sp._PAMC25486
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Austwickia_chelonae_NBRC_105200
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Beutenbergia_cavernae_(strain_ATCC_BAA-8_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Bifidobacterium_adolescentis_(strain_ATCC_15703_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Bifidobacterium_angulatum_DSM_20098_= _JCM_7096
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Bifidobacterium_animalis_subsp._lactis_(strain_AD011)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Bifidobacterium_asteroides_(strain_PRL2011)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Bifidobacterium_bifidum_BGN4
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Bifidobacterium_breve_DSM_20213_= _JCM_1192
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Bifidobacterium_dentium_(strain_ATCC_27534_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Bifidobacterium_gallicum_DSM_20093_= _LMG_11596

Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Bifidobacterium_kashiwanohense_PV20-2
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Bifidobacterium_longum_(strain_NCC_2705)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Bifidobacterium_longum_subsp._longum_F8
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Bifidobacterium_pseudolongum_PV8-2
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Bifidobacterium_scardovii
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Bifidobacterium_thermophilum_RBL67
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Blastococcus_saxobsidens_(strain_DD2)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Brachybacterium_faecium_(strain_ATCC_43885_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Brachybacterium_sp._SW0106-09
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Brevibacterium_mcbrellneri_ATCC_49030
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Catenulispora_acidiphila_(strain_DSM_44928_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Cellulomonas_fimi_(strain_ATCC_484_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Cellulomonas_flavigena_(strain_ATCC_482_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Cellulomonas_gilvus_(strain_ATCC_13127_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Clavibacter_michiganensis_subsp._sepedonicus_(strain_ATCC_331 13_

Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_argentoratense_DSM_44202
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_atypicum
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_aurimucosum_(strain_ATCC_700975_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_camporealensis
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_casei_LMG_S-19264
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_diphtheriae_(strain_ATCC_700971_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_doosanense_CAU_212_=_DSM_45436
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_efficiens_(strain_DSM_44549_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_epidermidicanis
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_falsenii_DSM_44353
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_genitalium_ATCC_33030
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_glucuronolyticum_ATCC_51866
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_glutamicum_(strain_ATCC_13032_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_glyciniphilum_AJ_3170
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_halotolerans_YIM_70093_=_DSM_44683

Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_humireducens_NBRC_106098=_DSM_45392
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_imitans
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_jeikeium_(strain_K411)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_kroppenstedtii_(strain_DSM_44385_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_kutscheri
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_lipophiloflavum_DSM_44291
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_marinum_DSM_44953
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_maris_DSM_45190
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_matruchotii_ATCC_14266
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_mustelae
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_pseudotuberculosis_(strain_C231)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_resistens_(strain_DSM_45100_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_sp._ATCC_6931
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_sp._KPL1855
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_sp._KPL1989

Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_striatum_ATCC_6940
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_testudinatoris
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_urealyticum_(strain_ATCC_43042_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_ureicelerivorans
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_uterequi
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_variabile_(strain_DSM_44702_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_vitaeruminis_DSM_20294
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Corynebacterium_xerosis
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Curtobacterium_flaccumfaciens_UCD-AKU
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Dermacoccus_nishinomiyaensis
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Dietzia_cinnamea_P4
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Frankia_alni_(strain_ACN14a)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Frankia_sp._(strain_Ccl3)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Frankia_sp._(strain_EAN1pec)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Frankia_sp._(strain_Eul1c)

Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Frankia_sp._EUN1f
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Frankia_symbiont_subsp._Datisca_glomerata
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Frigoribacterium_sp._RIT-PI-h
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Gardnerella_vaginalis_(strain_ATCC_14019_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Gardnerella_vaginalis_JCP8481B
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Geodermatophilus_obscurus_(strain_ATCC_25078_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Gordonia_amarae_NBRC_15530
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Gordonia_bronchialis_(strain_ATCC_25592_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Gordonia_polyisoprenivorans_(strain_DSM_44266_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Gordonia_rhizosphaera_NBRC_16068
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Gordonia_sihwensis_NBRC_108236
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Gordonia_sp._KTR9
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Gordonia_sputi_NBRC_100414
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Intrasporangium_calvum_(strain_ATCC_23552_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Isoptericola_variabilis_(strain_225)

Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Janibacter_hoylei_PVAS-1
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Janibacter_sp._HTCC2649
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Jonesia_denitrificans_(strain_ATCC_14870_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Kineococcus_radiotolerans_(strain_ATCC_BAA-149_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Kineosphaera_limosa_NBRC_100340
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Kitasatospora_setae_(strain_ATCC_33774_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Kocuria_rhizophila_(strain_ATCC_9341_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Kocuria_sp._UCD-OTCP
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Kribbella_flavida_(strain_DSM_17836_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Kutzneria_albida_DSM_43870
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Kytococcus_sedentarius_(strain_ATCC_14392_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Lechevalieria_aerocolonigenes_(Nocardia_aerocolonigenes)_ (Saccharothrix_aerocolonigenes)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Leifsonia_xyli_subsp._xyli_(strain_CTCB07)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Leucobacter_sp._Ag1
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	marine_actinobacterium_PHSC20C1

Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Microbacterium_azadirachtae
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Microbacterium_chocolatum
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Microbacterium_foliorum
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Microbacterium_ginsengisoli
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Microbacterium_hydrocarbonoxydans
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Microbacterium_ketosireducens
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Microbacterium_laevaniformans_OR221
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Microbacterium_oxydans
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Microbacterium_sp._Ag1
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Microbacterium_sp._SA39
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Microbacterium_testaceum_(strain_StLB037)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Microbacterium_trichothecenolyticum
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Micrococcus_luteus_(strain_ATCC_4698_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Microlunatus_phosphovorus_(strain_ATCC_700054_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Micromonospora_aurantiaca_(strain_ATCC_27029_

Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Micromonospora_lupini_str._Lupac_08
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Micromonospora_sp._HK10
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Micromonospora_sp._NRRL_B-16802
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mobilicoccus_pelagius_NBRC_104925
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mobiluncus_curtisii_(strain_ATCC_43063_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mobiluncus_mulieris_ATCC_35239
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Modestobacter_marinus_(strain_BC501)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_abscessus_(strain_ATCC_19977_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_bovis
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_elephantis
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_haemophilum
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_hassiacum_DSM_44199
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_kansasii_ATCC_12478
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_leprae_(strain_TN)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_marinum_(strain_ATCC_BAA-535_

Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_neoaurum_VKM_Ac-1815D
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_obuense
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_parascrofulaceum_ATCC_BAA-614
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_paratuberculosis_(strain_ATCC_BAA-968_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_phlei_RIVM601174
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_rhodesiae_(strain_NBB3)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_sinense_(strain_JDM601)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_smegmatis_(strain_ATCC_700084_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_sp._(strain_KMS)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_sp._EPa45
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_sp._VKM_Ac-1817D
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_spJS623
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_thermoresistibile_ATCC_19527
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_tuberculosis_(strain_ATCC_25618_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_vanbaalenii_(strain_DSM_7251_

Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Mycobacterium_xenopi_RIVM700367
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Nakamurella_multipartita_(strain_ATCC_700099_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Nocardia_brasiliensis_ATCC_700358
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Nocardia_cyriacigeorgica_(strain_GUH-2)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Nocardia_farcinica_(strain_IFM_10152)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Nocardia_nova_SH22a
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Nocardia_sp._NRRL_S-836
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Nocardioides_luteus
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Nocardioides_simplex_(Arthrobacter_simplex)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Nocardioides_sp._(strain_BAA-499_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Nocardioides_sp._CF8
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Nocardiopsis_alba_(strain_ATCC_BAA-2165_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Nocardiopsis_dassonvillei_(strain_ATCC_23218_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Nocardiopsis_sp._NRRL_B-16309
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Parascardovia_denticolens_DSM_10105_JCM_12538

Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Propionibacterium_acidipropionici_(strain_ATCC_4875_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Propionibacterium_acnes_(strain_KPA171202_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Propionibacterium_freudenreichii_subsp._shermanii_ (strain_ATCC_9614_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Propionibacterium_propionicum_(strain_F0230a)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Propionimicrobium_lymphophilum_ACS-093-V-SCH5
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Pseudonocardia_dioxanivorans_(strain_ATCC_55486_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Renibacterium_salmoninarum_(strain_ATCC_33209_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Rhodococcus_aetherivorans
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Rhodococcus_equi_ATCC_33707
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Rhodococcus_erythropolis_(strain_PR4_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Rhodococcus_jostii_(strain_RHA1)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Rhodococcus_pyridinivorans_SB3094
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Rhodococcus_sp._B7740
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Rhodococcus_sp._RD6.2
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Rothia_dentocariosa_(strain_ATCC_17931_

Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Rothia_mucilaginosa_(strain_DY-18)_(Stomatococcus_mucilaginosus)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Saccharomonospora_glauca_K62
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Saccharomonospora_marina_XMU15
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Saccharomonospora_viridis_(strain_ATCC_15386_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Saccharopolyspora_erythraea_(strain_ATCC_11635_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Saccharothrix_espanaensis_(strain_ATCC_51144_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Saccharothrix_sp._NRRL_B-16348
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Saccharothrix_sp._ST-888
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Salinispora_tropica_(strain_ATCC_BAA-916_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Sanguibacter_keddieii_(strain_ATCC_51767_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Scardovia_inopinata_F0304
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Scardovia_wiggisiae_F0424
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Segniliparus_rotundus_(strain_ATCC_BAA-972_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Stackebrandtia_nassauensis_(strain_DSM_44728_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_albulus

Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_albus_(strain_ATCC_21838_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_auratus_AGR0001
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_avermitilis_(strain_ATCC_31267_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_bingchenggensis_(strain_BCW-1)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_caelestis
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_cattleya_(strain_ATCC_35852_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_clavuligerus_(strain_ATCC_27064_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_coelicolor_(strain_ATCC_BAA-471_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_collinus_(strain_DSM_40733_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_cyaneogriseus_subsp._noncyanogenus
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_davawensis_JCM_4913
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_ghanaensis_ATCC_14672
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_glaucescens
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_griseoaurantiacus_M045
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_griseoflavus_Tu4000

Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_griseus_subsp._griseus_(strain_JCM_4626_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_himastatinicus_ATCC_53653
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_hygroscopicus_subsp._jinggangensis_(strain_5008)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_incarnatus
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_katrae
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_lydicus_A02
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_mangrovisoli
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_niveus_NCIMB_11891
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_nodosus
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_pluripotens
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_pratensis_(strain_ATCC_33331_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_pristinaespiralis_ATCC_25486
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_rimosus_subsp._rimosus_ATCC_10970
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_roseochromogenus_subsp._oscitans_DS_12.976
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_rubellomurinus

Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_scabiei_(strain_87.22)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._(strain_SirexAA-E_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._(strain_SPB074)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._769
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._AA4
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._AS58
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._C
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._CNQ-509
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._e14
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._Mg1
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._MMG1121
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._MMG1533
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._MUSC119T
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._MUSC136T
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._NRRL_F-4428

Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._NRRL_F-6491
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._NRRL_F-6602
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._NRRL_S-444
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._NRRL_S-495
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._NRRL_WC-3618
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._PBH53
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._PVA_94-07
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._Tu6071
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._WM4235
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._WM6372
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._WM6378
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sp._WM6386
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_sviceus_ATCC_29083
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_tsukubensis_NRRL18488
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_variegatus

Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_venezuelae_(strain_ATCC_10712_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_vietnamensis
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_violaceusniger_Tu_4113
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_viridochromogenes
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_viridochromogenes_(strain_DSM_40736_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_xiamenensis
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptomyces_zinciresistens_K42
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Streptosporangium_roseum_(strain_ATCC_12428_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Terrabacter_sp._28
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Thermobifida_fusca_(strain_YX)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Thermobispora_bispora_(strain_ATCC_19993_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Thermomonospora_curvata_(strain_ATCC_19995_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Trueperella_pyogenes
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Tsukamurella_paurometabola_(strain_ATCC_8368_
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Turicella_otitidis_ATCC_51513

Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Verrucosipora_maris_(strain_AB-18-032)
Actinobacteria (Actinobacteria_class)	Xylanimonas_cellulosilytica_(strain_DSM_15894_
Actinobacteria (Thermoleophilia_class)	Conexibacter_woesei_(strain_DSM_14684_
Actinobacteria (Thermoleophilia_class)	Patulibacter_medicamentivorans
Other-Terrabacteria	'Deinococcus_soli'_Cha_et_al._2014
Other-Terrabacteria	Deinococcus_gobiensis_(strain_DSM_21396_
Other-Terrabacteria	Deinococcus_maricopensis_(strain_DSM_21211_
Other-Terrabacteria	Deinococcus_peraridilitoris_(strain_DSM_19664_
Other-Terrabacteria	Deinococcus_proteolyticus_(strain_ATCC_35074_
Other-Terrabacteria	Deinococcus_swuensis
Other-Terrabacteria	Marinithermus_hydrothermalis_(strain_DSM_14884_
ARCHAEA	
Euryarchaeota (Halobacteria)	Halalkalicoccus_jeotgali_(strain_DSM_18796_
Euryarchaeota (Halobacteria)	Haloarcula_marismortui_(strain_ATCC_43049_
Euryarchaeota (Halobacteria)	Halobacterium_salinarum_(strain_ATCC_700922_
Euryarchaeota (Halobacteria)	Halobacterium_sp._DL1
Euryarchaeota (Halobacteria)	Haloferax_volcanii_(strain_ATCC_29605_
Euryarchaeota (Halobacteria)	Halogeometricum_borinquense_(strain_ATCC_700274_
Euryarchaeota (Halobacteria)	Halomicrobium_mukohataei_(strain_ATCC_700874_
Euryarchaeota (Halobacteria)	Halopiger_xanaduensis_(strain_DSM_18323_
Euryarchaeota (Halobacteria)	Haloquadratum_walsbyi_(strain_DSM_16790_
Euryarchaeota (Halobacteria)	Halorhabdus_tiamatea_SARL4B
Euryarchaeota (Halobacteria)	Halorubrum_lacusprofundi_(strain_ATCC_49239_

Euryarchaeota (Halobacteria)	Halostagnicola_larsenii_XH-48
Euryarchaeota (Halobacteria)	Haloterrigena_turkmenica_(strain_ATCC_51198_
Euryarchaeota (Halobacteria)	Natrialba_magadii_(strain_ATCC_43099_
Euryarchaeota (Halobacteria)	Natrinema_pellirubrum_(strain_DSM_15624_
Euryarchaeota (Halobacteria)	Natrinema_sp._(strain_J7-2)
Euryarchaeota (Halobacteria)	Natronobacterium_gregoryi_(strain_ATCC_43098_
Euryarchaeota (Halobacteria)	Natronococcus_occultus_SP4
Euryarchaeota (Halobacteria)	Natronomonas_moolapensis_(strain_DSM_18674_
Euryarchaeota (Halobacteria)	Natronomonas_pharaonis_(strain_ATCC_35678_
Euryarchaeota (Methanobacteria)	Methanobacterium_lacus_(strain_AL-21)
Euryarchaeota (Methanobacteria)	Methanobacterium_paludis_(strain_DSM_25820_
Euryarchaeota (Methanobacteria)	Methanobacterium_sp._MB1
Euryarchaeota (Methanobacteria)	Methanobrevibacter_ruminantium_(strain_ATCC_35063_
Euryarchaeota (Methanobacteria)	Methanobrevibacter_smithii_(strain_PS_
Euryarchaeota (Methanobacteria)	Methanobrevibacter_sp._AbM4
Euryarchaeota (Methanobacteria)	Methanosphaera_stadtmanae_(strain_ATCC_43021_
Euryarchaeota (Methanobacteria)	Methanothermobacter_thermautotrophicus_(strain_ATCC_29096_
Euryarchaeota (Methanocellales)	Methanocella_arvoryzae_(strain_DSM_22066_
Euryarchaeota (Methanocellales)	Methanocella_paludicola_(strain_DSM_17711_
Euryarchaeota (Methanococci)	Methanocaldococcus_jannaschii_(strain_ATCC_43067_
Euryarchaeota (Methanopyri)	Methanopyrus_kandleri_(strain_AV19_
Euryarchaeota (Thermococci)	Pyrococcus_abyssi_(strain_GE5_

Euryarchaeota (Thermococci)	Pyrococcus_furiosus_(strain_ATCC_43587_
Euryarchaeota (Thermococci)	Thermococcus_barophilus_(strain_DSM_11836_
Euryarchaeota (Thermococci)	Thermococcus_gammatolerans_(strain_DSM_15229_
Euryarchaeota (Thermococci)	Thermococcus_kodakarensis_(strain_ATCC_BAA-918_
Euryarchaeota (Thermococci)	Thermococcus_litoralis_(strain_ATCC_51850_
Other_archeas	archaeon_GW2011_AR10
Other_archeas	halophilic_archaeon_DL31
Other_archeas	miscellaneous_Crenarchaeota_group-1_archaeon_SG8-32-1
Other_archeas	miscellaneous_Crenarchaeota_group-6_archaeon_AD8-1
TACK-Crenoarchaeota (Desulfurococcales)	Aeropyrum_pernix_(strain_ATCC_700893_
TACK-Crenoarchaeota (Desulfurococcales)	Hyperthermus_butylicus_(strain_DSM_5456_
TACK-Crenoarchaeota (Desulfurococcales)	Ignisphaera_aggregans_(strain_DSM_17230_
TACK-Crenoarchaeota (Desulfurococcales)	Pyrolobus_fumarii_(strain_DSM_11204_
TACK-Crenoarchaeota (Desulfurococcales)	Staphylothermus_marinus_(strain_ATCC_43588_
TACK-Crenoarchaeota (Desulfurococcales)	Thermogladius_cellulolyticus_(strain_1633)
TACK-Crenoarchaeota (Desulfurococcales)	Thermosphaera_aggregans_(strain_DSM_11486_
TACK-Crenoarchaeota (Sulfolobales)	Acidianus_hospitalis_(strain_W1)
TACK-Crenoarchaeota (Sulfolobales)	Sulfolobus_acidocaldarius_(strain_ATCC_33909_

TACK-Crenoarcheota (Sulfolobales)	<i>Sulfolobus_solfataricus_(strain_ATCC_35092_</i>
TACK-Crenoarcheota (Sulfolobales)	<i>Sulfolobus_tokodaii_(strain_DSM_16993_</i>
TACK-Crenoarcheota (Thermoproteales)	<i>Caldivirga_maquilingensis_(strain_ATCC_700844_</i>
TACK-Crenoarcheota (Thermoproteales)	<i>Pyrobaculum_aerophilum_(strain_ATCC_51768_</i>
TACK-Crenoarcheota (Thermoproteales)	<i>Thermofilum_pendens_(strain_Hrk_5)</i>
TACK-Crenoarcheota (Thermoproteales)	<i>Thermofilum_sp._1910b</i>
TACK-Crenoarcheota (Thermoproteales)	<i>Thermoproteus_sp._AZ2</i>
TACK-Crenoarcheota (Thermoproteales)	<i>Vulcanisaeta_distributa_(strain_DSM_14429_</i>
TACK-Thaumarchaeota	<i>Candidatus_Caldiarchaeum_subterraneum</i>

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la metodología de primer aspecto de la invención se efectúa sobre una cepa procariotica perteneciente al dominio Bacteria, género *Mycobacterium*, preferiblemente al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, o al género *Streptomyces*. También preferiblemente, la cepa bacteriana se refiere a otros tipos de actinobacteria, incluyendo, entre otros, *Bifidobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*. También la cepa se refiere al dominio Archaea incluyendo, entre otros los géneros, *Pyrococcus*, *Thermococcus* y *Halobacterium*.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la cepa bacteriana se refiere a una bacteria seleccionada de la lista que consiste en: *Mycobacterium smegmatis* o *Mycobacterium tuberculosis*. Preferiblemente, dicha cepa bacteriana es *Mycobacterium smegmatis* y el locus del gen inactivado de la etapa b) es MSMEG_4923. Preferiblemente, dicha cepa bacteriana es *Mycobacterium tuberculosis* y el método comprende la inactivación de MT_1321. Más preferiblemente, dicha cepa bacteriana es *Mycobacterium tuberculosis* y dicha

inactivación consiste en la producción de un mutante con la regulación negativa (transcripcional y/o post-transcripcional) de la expresión de gen *nucS*.

5 Un segundo aspecto de la invención se refiere a un microorganismo obtenido u obtenible por medio del método descrito en el primer aspecto de la invención.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un microorganismo perteneciente al filo Actinobacteria, preferentemente perteneciente al género *Mycobacterium*, más preferiblemente al complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, caracterizado porque en dicha cepa del gen o
10 genes capaces de codificar los *nucS* endonucleasa (secuencia de referencia NCBI: NP_215837.1) o una endonucleasa homóloga u ortóloga están inactivados. Preferiblemente, dicha cepa bacteriana es *Mycobacterium smegmatis* y el locus del gen inactivado de la etapa b) es MSMEG_4923. Preferiblemente, dicha cepa bacteriana es *Mycobacterium tuberculosis* y el
15 método comprende la inactivación del gen *MT_1321*. Más preferiblemente, dicha cepa bacteriana es *Mycobacterium tuberculosis* y dicha inactivación consiste en la inducción de cualquiera de los siguientes polimorfismos en el gen *MT_1321*: S39R, A135S, T168A, K184E y S54I.

En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, la cepa bacteriana es *M.*
20 *smegmatis* mc² 155.

En otra realización preferida del tercer aspecto de la invención, las cepas bacterianas son *M. tuberculosis* H37Rv y CDC1551.

25 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende la cepa bacteriana o microorganismo tal y como se define en el segundo o tercer aspecto de la invención.

Un quinto aspecto de la invención se refiere a la cepa bacteriana o microorganismo tal y como
30 se define en cualquiera de los aspectos segundo a cuarto de la invención, para uso como medicamento, en particular como vacuna.

Un sexto aspecto de la invención se refiere a la cepa bacteriana o microorganismo tal como se define en cualquiera de los aspectos segundo a cuarto de la invención, para uso como vacuna
35 para la prevención de una infección con una bacteria de la misma especie que la cepa bacteriana utilizada como vacuna, preferiblemente para uso en la prevención de tuberculosis.

Un séptimo aspecto de la invención se refiere a un método de administración de una cepa bacteriana o microorganismo tal como se define en cualquiera de los aspectos segundo a cuarto de la invención, a un ser humano para prevenir la infección.

- 5 Un octavo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, preferiblemente una vacuna, que comprende las cepas bacterianas o microorganismo tal y como se define en cualquiera de los aspectos segundo a cuarto de la invención.

Un noveno aspecto de la invención se refiere a un método para el cribado de fármacos, que
10 comprende:

- a. Poner en contacto un fármaco, preferiblemente un antibiótico, con una cepa bacteriana hipermutable obtenida u obtenible de acuerdo con el método del primer aspecto de la invención o con una cepa bacteriana hipermutable tal como
15 se define en cualquiera de los aspectos segundo a cuarto de la invención;
- b. Determinar si dicho fármaco tiene un efecto bacteriostático o bactericida *in vitro* sobre la cepa bacteriana específica en el paso a); y
- c. Determinar la probabilidad de la cepa hipermutable para desarrollar resistencia a los fármacos probados; y/o
20 d. Determinar las mutaciones que confieren resistencia, sensibilidad o tolerancia a un determinado fármaco (difícil o imposible en algunos casos con una cepa silvestre).

Un décimo aspecto de la invención se refiere a un kit para llevar a cabo el método *in vitro* del
25 noveno aspecto de la invención, que comprende:

- (i) una cepa bacteriana o una biblioteca de cepas obtenidas u obtenibles de acuerdo con el método del primer aspecto de la invención o una cepa bacteriana tal como se define en cualquiera de los aspectos segundo a cuarto de la invención; y
30 (ii) opcionalmente, un fármaco o una biblioteca de fármacos a probar.

Un undécimo aspecto se refiere al uso de polimorfismos de *nucS* para predecir la capacidad de las cepas clínicas de *Mycobacterium* para desarrollar rápidamente resistencia a antibióticos durante los tratamientos.

35 Un duodécimo aspecto de la invención se refiere al uso de cualquiera de las cepas hipervariables modificadas genéticamente mencionados en la presente invención, incluyendo bacterias y arqueobacterias, para la fermentación o para mejorar las fermentaciones, la

creación de rutas híbridas para obtener nuevos metabolitos, incluyendo antibióticos, aminoácidos, pesticidas, proteínas, etc., y para la biorremediación de productos recalcitrantes.

Un último aspecto de la invención se refiere a la construcción de cepas hipervariables en las que se fuerza mediante ingeniería genética la regulación a voluntad de la expresión del gen *nucS* o la proteína NucS. Incluye silenciado génico transcripcional y/o post-transcripcional y cualquier otra metodología empleada a tal efecto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig 1. Tasas de mutación de resistencia a rifampicina y estreptomicina de las cepas *M. smegmatis* mc²155 (a) y *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 (b) y sus derivados Δ *nucS*.

Fig 2. Cambios de nucleótidos y efectos de los polimorfismos de origen natural de *NucS* en las tasas de mutación. Tasas de mutación a Rif-R de las cepas complementadas (calculados por el método de máxima verosimilitud de Ma, Sarkar, Sandri-mss, que se aplica en el programa FALCOR). *M. smegmatis* Δ *nucS* mutante se complementa con los *NucS* de tipo silvestre de *M. tuberculosis* (*nucS*-TB) y sus alelos mutados. Las barras indican los intervalos de confianza del 95% (IC). El cambio parcial indica el aumento de la tasa de mutación de las cepas que contiene polimorfismo con respecto a la cepa complementada con el alelo *nucS* de la cepa de tipo salvaje de *M. tuberculosis* CDC1551.

Fig 3. Comparación de secuencias y estructuras de *NucS* de *P. abissy* y *M. tuberculosis*. A) La alineación entre las secuencias de *NucS* de *P. abissy* y de *M. tuberculosis* más conservadas. Los cuadros sobre la alineación indican los dominios estructurales. Las letras en rojo indican los SNPs, las letras en púrpura indican los sitios catalíticos en la proteína de arqueas (según Ren et al. 2009). Los asteriscos indican los SNP que confiere una tasa de mutación ≥ 7 veces sobre el control. Las letras o el fondo en amarillo indican los sitios de unión al ADN de la endonucleasa de *P. abissy*. El cuadro de color naranja muestra el dominio de interacción B-clamp. Las letras en verde indican el W esencial para la unión a ADN en la enzima de arqueas. Los residuos aminoácidos conservados se muestran en gris oscuro. B) Representación esquemática de la ubicación y mapeo de SNP en las estructuras homodiméricas. Se muestran vistas delanteras y traseras. Los dibujos en cian es el modelo de *M. tuberculosis*, mientras que el gris es la proteína archaeeana. Las letras en rojo indican los SNPs analizados en este estudio. El verde es el residuo de triptófano (W) esencial para la unión al ADN en la nucleasa de *P. abissy*. Los dibujos en púrpura indican los sitios catalíticos mientras que la cola de unión B-clamp putativa se muestra en naranja.

Fig 4. Frecuencias de recombinación de *M. smegmatis* mc²155 y su derivado Δ nucS. Se muestran resultados para identidades de secuencias de 100% y 90%. La cepa mutante Δ nucS tiene una mayor frecuencia de recombinantes para secuencias con 90% de identidad pero no para aquellas con 100%.

5

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

DEFINICIONES

10 En el contexto de la presente invención, el término "Actinobacteria" incluye, entre otras, cepas de *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Bifidobacterium* y *Rhodococcus* (ver lista de organismos procariotas en la tabla arriba).

15 En el contexto de la presente invención, los términos "Arqueobacteria" y "Archaea" incluyen, entre otras, cepas de *Pyrococcus*, *Thermococcus* y *Halobacterium* (ver lista de organismos procariotas en la tabla de arriba)

20 En el contexto de la presente invención, el término "gen MT_1321" se entiende como la secuencia de ADN que codifica la proteína NucS en *M. tuberculosis*.

En el contexto de la presente invención, el término "polipéptido o proteína NP_215837.1" se entiende como la secuencia de aminoácidos que constituye la proteína NucS en *M. tuberculosis*.

25 En el contexto de la presente invención, el término "MSMEG_4923" se entiende como la secuencia de ADN que codifica las proteínas NucS en *M. smegmatis*.

En el contexto de la presente invención, el término "cepa *M. tuberculosis* H37Rv" se entiende como la cepa modelo del complejo *M. tuberculosis*.

30 En el contexto de la presente invención, el término "cepa *M. tuberculosis* CDC1551" se entiende como la cepa modelo del complejo *M. tuberculosis*.

35 En el contexto de la presente invención, los términos "S39R, A135S, R144S, T168A y K184E" se entienden como los polimorfismos indicados en la Tabla 2.

En el contexto de la presente invención, el término "cepa *M. smegmatis* mc² 155" se entiende como la cepa modelo de *M. smegmatis*.

En el contexto de la presente invención, el término "cepa *Streptomyces coelicolor* A3(2)," se entiende como la cepa modelo de *S. coelicolor*.

5 En el contexto de la presente invención, el término "inactivación" se entiende como el bloqueo de la expresión de un gen específico o de una proteína, ya sea a través de modificación molecular o regulación negativa de uno o ambos. La modificación molecular incluye el uso de técnicas de ADN recombinante convencionales que a su vez incluye: la sustitución de uno o
10 un gen, disrupciones químicamente inducida o inducida por radiación por mutagénesis. La regulación negativa de la expresión de un gen o proteína incluye silenciado génico transcripcional y/o post-transcripcional.

En el contexto de la presente invención, el término " Δ nucS" se define como la ausencia de la
15 endonucleasa NucS en la cepa bacteriana o arqueana.

En el contexto de la presente invención, el término "gen o genes que codifican para la/s endonucleasa/s NucS" se entiende como cualquier gen con homología de secuencia de ADN o polipeptídica, obtenida esta última mediante traducción de la secuencia génica. Igualmente,
20 cualquier gen cuyo producto polipeptídico tenga homología estructural con la proteína NucS de *M. tuberculosis* NP_215837.1 (Publicado en Castañeda-García et al. Nat. Comm. 2017).

En el contexto de la presente invención, el término "un gen homólogo u ortólogo de nucS" se entiende como cualquier gen con homología de secuencia de ADN o cualquier gen cuyo
25 producto polipeptídico tenga homología de secuencia o estructural con la proteína NucS de *M. tuberculosis* (Publicado en Castañeda-García et al. Nat. Comm. 2017), tenga o no la actividad nucleasa definida para NucS. Preferiblemente, se consideran que dos genes son homólogos cuando comparten al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% de
30 identidad sobre la totalidad de la secuencia aminoacídica del producto polipeptídico para el que codifica la secuencia del gen MT_1321 (polipéptido NP_215837.1) y realizan la misma función o una función similar.

En el contexto de la presente invención, el término "cepa hipermutable en comparación con una
35 cepa en la que no se ha realizado una inactivación del gen *nucS* o un gen homólogo u ortólogo de *nucS*" se entiende como cualquier individuo procariota que poseyendo un gen homólogo u ortólogo a *nucS*, se ha transformado en hipermutable mediante la inactivación parcial o completa del gen *nucS*.

En el contexto de la presente invención, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de anticuerpos de la invención o de las cepas bacterianas atenuadas de la invención que permiten producir el efecto deseado. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son portadores conocidos por los expertos en la técnica. Las composiciones proporcionadas por esta invención se pueden facilitar a través de cualquier vía de administración, para lo cual dicha composición se formulará en la forma de dosificación adecuada y con los excipientes que son farmacológicamente aceptables para la vía de administración elegida.

En el contexto de la presente invención, el término "vacuna" se refiere a una preparación de antígeno utilizado para establecer la respuesta del sistema inmune a una enfermedad.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención da a conocer los factores que promueven un fenotipo hipermutable e hiper-recombinable (genéticamente hipervariable) en actinobacterias y arqueobacterias.

En la presente invención, se analizó en primer lugar si el genoma de micobacterias podría producir alelos mutantes fuertes. Tras el cribado de una gran biblioteca de transposones en mc^2 155 *M. smegmatis* (~11,000 clones), se caracterizó una inserción en un gen (MSMEG_4923 o *nucS/endoMS*) que produce un fenotipo hipermutador (tasa de mutación incrementada dos órdenes de magnitud) e hiper-recombinador (aumento de un orden de magnitud de secuencias de ADN no idénticas -homeólogas) cuando se inactiva. Además, la delección precisa del gen MSMEG_4923 produjo un aumento de la tasa de mutación (más de dos órdenes de magnitud más alta que la cepa de tipo salvaje) que podrían ser rescatado por complementación cromosómico con MSMEG_4923. El gen ortólogo, SCO5388, se inactivó en *Streptomyces coelicolor*, mostrando el mismo fenotipo hipermutador. Este gen codifica una proteína homóloga de una endonucleasa arqueana, NucS o EndoMS. El espectro mutacional del mutante nulo de *nucS* de *M. smegmatis* consiste casi exclusivamente en transiciones, en contraste con la alta variabilidad que se encuentra en la cepa de tipo silvestre. La hipermutación, la hiper-recombinación y el espectro mutacional específico de transiciones son características específicas de la inactivación del sistema MMR en especies con un sistema canónico (basado en MutS-L) de reparación de bases desapareadas. Estos resultados desvelan el primer gen anti-mutador fuerte en micobacterias, la existencia de un sistema MMR alternativo en la naturaleza, y constituyen el núcleo de la presente invención.

Además, el análisis de la distribución taxonómica de NucS entre 3.942 proteomas demostró que NucS está presente en 370 organismos (60 arqueas y 310 bacterias), siendo prácticamente excluyente con MutS-L (solo en 28 especies coexisten NucS y MutSL).

El análisis *in silico* de la secuencia del gen MT_1321 en ≈ 1.600 genomas de *M. tuberculosis* y la secuenciación directa de 63 aislados clínicos se identificaron 10 SNPs sin sentido, cinco de ellos que confieren un fenotipo hipermutable claro, con aumentos en la frecuencia de mutantes de uno a dos órdenes de magnitud por encima del tipo silvestre, en el sistema heterólogo de *M. smegmatis*. Estas observaciones se correlacionan con los de un modelado estructural integral de los SNPs, que ayuda a comprender los efectos producidos por estas mutaciones.

Para predecir si algunos de estos polimorfismos podrían afectar a la actividad NucS, se desarrolló y se analizó un modelado estructural integral de estos SNPs. El modelo bacteriano de NucS (ID uniprot P9WIY5, en el que la serina-144, S144, fue sustituido por arginina, R, presente en la mayoría de las secuencias de NucS *M. tuberculosis*) produjo puntuaciones $Z > 1$ en los diez mejores alineaciones de plantilla (de 2,36 a 10,17) que indica que esta proteína se puede modelar de forma fiable. Por otra parte, el modelo presenta una topología global y correcta, y por lo tanto se puede realizar la mutagénesis *in silico*. La figura 3A representa la alineación estructural de NucS de la arquea *P. abissy* y la actinobacteria *M. tuberculosis*, y muestra los polimorfismos estudiados en esta invención. Los residuos de serina-39 (S39), serina-54 (S54), y la alanina-67 (A67) se encuentran en el dominio N-terminal, la región putativa de unión a ADN. S54 se encuentra en la región bisagra entre los dominios, mientras que aspártico-162 (D162), treonina-168 (T168) y lisina-184 (K184) se encuentran en el dominio C-terminal. Residuo de valina-69 (V69) se encuentra en los límites estructurales del dominio N-terminal mientras que el residuo de alanina-135 (A135) está situado entre los dos dominios en un bucle (Figura 2B).

La mayoría de las mutaciones no tenían ($1 < \Delta\Delta G < 0$) efectos en la estabilidad de la proteína o presentaron un efecto leve ($2 < \Delta\Delta G < 1$). Por otra parte, ninguno mostró enfrentamientos significativos en las energías de Van der Waals, lo que sugiere que todos los polimorfismos son adecuados para el modelado. Nuestro análisis mutacional *in silico* de S39R, indica que las podrían establecerse interacciones adicionales con residuos vecinos, produciendo probablemente una distorsión de la estabilidad local. La mutación S54I se encuentra en un bucle expuesto, donde no se establecen más interacciones dentro de la proteína, aunque la interacción con la prolina-68 vecina podría perderse. No se ganan o pierden interacciones en la mutación A135S. El cambio A67S crea nuevas interacciones, mientras que D162H está cambiando el sitio expuesto a un grupo reactivo. La mutación T168A ha perdido todas las interacciones con la hélice vecina R203, y la exposición también podría ser un objetivo para la

fosforilación de Thr. K184E es un gran cambio en tamaño y carga y, dependiendo de la colocación espacial de E, las interacciones con Y126 podrían perderse. Por último, el polimorfismo R144S podría producir pérdida de interacciones de mantenimiento de la estructura local.

5

Por tanto, la modelización *in silico* de la proteína NucS de *M. tuberculosis* sugiere posibles efectos de varios de los 10 polimorfismos que se encuentran en las secuencias de *M. tuberculosis* ensayadas. Por lo tanto, se decidió estudiar estos efectos sobre la actividad NucS en la tasa de mutación, utilizando el sistema heterólogo de *M. smegmatis* mc² 155 Δ nucS. En primer lugar, probamos la capacidad del gen silvestre MT_1321 de la cepa *M. tuberculosis* CDC1551 (que contiene la secuencia *nucS* más común en las bases de datos de *M. tuberculosis*, nombrada aquí como *nucS*-TB) para rescatar el fenotipo normo-mutador en la cepa *M. smegmatis* mc² 155 Δ nucS. El gen silvestre *nucS* de *M. tuberculosis* (*nucS*-TB) redujo la tasa de mutación de 2.36×10^{-7} a 4.17×10^{-9} (una reducción de más del 98% con respecto a *M. smegmatis* mc² 155 Δ nucS), un valor prácticamente idéntico al producido por la complementación con el gen NucS-Sm (procedente de *M. smegmatis*). Esto demuestra que tanto *nucS*-TB como *nucS*-Sm son capaces de complementar la supresión de *nucS* de una manera similar (Tabla 2, Figura 2). Por lo tanto, este sistema heterólogo se puede utilizar para estudiar el efecto de los polimorfismos naturales de NucS de las cepas clínicas de *M. tuberculosis* en la tasa de mutación.

Para caracterizar el efecto de cada polimorfismo, el gen *nucS* silvestre de *M. tuberculosis* (*nucS*-TB) y los 10 *nucS*-TB mutagenizados, conteniendo cada uno de los polimorfismos, se integraron en el cromosoma de *M. smegmatis* mc² 155 Δ nucS para medir el grado de complementación del fenotipo hipermutador. La Figura 2 muestra la variación de las tasas de mutación de resistencia a la rifampicina de las cepas complementadas relacionados con la *M. smegmatis* mc² 155 Δ nucS complementada con el gen silvestre MT_1321 de la cepa de control CDC1551 (*nucS*-TB). Los valores de tasa de mutación se pueden encontrar en la Tabla 2. Siete alelos aumentaron la tasa de mutación más de dos veces, siendo el alelo S39R el mutador más fuerte, con un aumento de 83,7 veces sobre la cepa *M. smegmatis* mc² 155 Δ nucS complementados con el silvestre *nucS*-TB. Los alelos A135S, T168A y K184E produjeron aumentos cerca de un orden de magnitud (8,6, 9,5 y 7,3, respectivamente). Sorprendentemente, el alelo R144S (presente en la cepa H37Rv) produce también un 7,6 veces mayor. Tres alelos, S54I, V69A, y D162H, produjeron bajos, pero estadísticamente significativo ($p < 0,05$), aumento alrededor de 2 veces. Por último, los alelos S39G y A67S no promovieron cambios aparentes en las tasas de mutación.

En resumen, la construcción de cepas genéticamente hipervariables de organismos que poseen este sistema de prevención de mutación constituye una herramienta valiosa para:

- la evaluación de las adaptaciones de *M. tuberculosis* a los tratamientos antimicrobianos, incluyendo nuevos medicamentos, combinaciones de drogas (tanto antiguas como nuevas) y otros regímenes no basados en antibióticos.
- predecir la capacidad de las cepas clínicas de *M. tuberculosis* para desarrollar rápidamente la resistencia a antibióticos durante los tratamientos, mediante la detección de polimorfismos conocidos en NucS.
- Producir cepas genéticamente modificadas de *Streptomyces* para la mejora de cualquier aspecto relacionado con la producción de metabolitos de todo tipo.
- En cuanto a otras especies mencionadas a través de la presente invención, incluyendo bacterias y arqueobacterias, la construcción de variantes hipervariables modificadas genéticamente serían útiles para mejorar las fermentaciones, la creación de rutas híbridas para obtener nuevos metabolitos, incluyendo antibióticos, aminoácidos, pesticidas, proteínas, etc., y la biorremediación de productos recalcitrantes.

Todos estos aspectos, así como muchos otros están claramente identificados como dentro del alcance de protección de la invención en la sección titulada "Breve descripción de la invención".

El propósito de los siguientes ejemplos es simplemente para ilustrar la invención y no para limitar la misma.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Materiales y Métodos

1.1. Cepas bacterianas, medios y condiciones de crecimiento. La cepa silvestre de *M. smegmatis* mc² 155M y sus derivados mutantes se cultivaron a 37 °C en caldo Middlebrook 7H9 o en agar Middlebrook 7H10 (Difco) con 0,5% de glicerol y 0,05% de Tween 80, y enriquecido con albúmina-dextrosa-catalasa al 10% (Difco). Para la selección de cepas, los medios se suplementaron con 25 µg/ml de kanamicina o 50 µg/ml de higromicina B, cuando fue necesario. La cepa de *Escherichia coli* DH5a se cultivó a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) que contiene 50 µg/ml de kanamicina o 100 µg/ml de higromicina, cuando fue apropiado.

1.2. Generación y cribado de biblioteca de inserción *M. smegmatis* φMycoMarT7. El transposón φMycoMarT7, un sistema basado en Mariner, se utilizó para obtener inserciones aleatorias en una cepa de *M. smegmatis*. Para la transducción, los cultivos de *M. smegmatis*

mc² 155 se lavaron con tampón MP (50 mM Tris-HCl pH 7,5, NaCl 150 mM, MgSO₄ 10 mM y CaCl₂ 2 mM), se mezclaron con un caldo de fagos a una multiplicidad de infección de 1:10 y se incubaron (37°C, 3 h). Las células micobacterianas se sembraron en agar Middlebrook 7H10 con kanamicina (25 µg/ml). Los mutantes de inserción se aislaron como colonias resistentes a la kanamicina después de 3 días de incubación (37°C). Aproximadamente 11.000 clones se seleccionaron al azar y se inocularon en pocillos individuales en placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían medio Middlebrook 7H9. Para identificar las cepas hipermutadoras, 10 µl de cada mutante se inocularon en placas de agar 7H10 suplementado con varias concentraciones de rifampicina (5, 10 y 20 µg/ml) que contenían el transposón. Los clones que mostraron mayor número de colonias de resistencia a la rifampicina (RIF-R) frente a la cepa de tipo silvestre se ensayaron de nuevo dos veces y se seleccionaron para una caracterización adicional.

1.3. Localización del sitio de inserción del transposón ϕ MycoMarT7. Para determinar la posición de inserción del transposón en el cromosoma de *M. smegmatis*, el ADN genómico purificado a partir de cada mutante seleccionado se digirió con *Bam*HI y religado con ADN ligasa de T4. Los plásmidos auto-ligados contenían todo el transposón además del ADN cromosómico junto al sitio de inserción. Los plásmidos recircularizados se sometieron a electroporación en *E. coli* DH5 α λ *pir116* y se seleccionaron en LB con kanamicina (50 µg/ml). Después de la purificación, los plásmidos se secuenciaron usando un cebador MycoMar-específico (SecMycomar) que se hibrida al lado de la unión transposón/cromosoma. Las secuencias de ADN adyacentes a cada sitio de inserción se compararon con la secuencia del genoma *M. smegmatis* para identificar el gen interrumpido.

1.4. Estimación de las tasas de mutación. Se utilizó un análisis de fluctuación Luria-Delbruck para calcular la tasa de mutación de diversos ensayos de mutación. La tasa de mutación se estimó mediante el método de Lea-Coulson de la mediana, que se aplicó con el programa FALCOR. Para cada experimento de tasa de mutación, se iniciaron 10-30 cultivos independientes en 1 ml de caldo de Middlebrook 7H9 y el crecimiento durante 24 h (*M. smegmatis*), hasta que llegaron a 10⁷-10⁸ células/ml. Cada cultivo se diluyó con el fin de inocular 1000-10000 células/ml en 5ml de medio fresco Middlebrook 7H9, evitando cualquier mutante espontáneo anterior en los cultivos finales. Todos los cultivos se incubaron a 37 °C con agitación durante 1-2 días (*M. smegmatis*) hasta que alcanzaron la fase estacionaria (10⁸-10⁹ células/ml) y se sembraron en medio Middlebrook 7H10 con antibióticos: rifampicina 100 µg/ml; estreptomina, 50 µg/ml.

En el caso de *Streptomyces coelicolor*, se partió de 20 suspensiones independientes de esporas (<10⁹ esporas/ml) generadas en MS agar. Estas suspensiones se plaquearon en MS agar con y sin rifampicina (100 µg/ml) o estreptomina (50 µg/ml).

1.5 Generación de mutantes *knockout* en *nucS*. Los mutantes de delección *M. smegmatis* Δ *nucS* (*MSMEG_4923*, *nucS-Sm*) y *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 Δ *nucS* (*SCO5388*, *nucS-Sco*) se generaron por sustitución alélica. Brevemente, para el mutante *M. smegmatis* Δ *nucS*, se construyó el plásmido p2NIL- Δ MSMEG_4923, con una delección en fase de *nucS*. El plásmido fue introducido por electroporación en *M. smegmatis* mc² 155. Se seleccionaron clones con doble “cross-over” y se chequearon por PCR y secuenciación.

1.6. Análisis de polimorfismos en *nucS* de cepas de *M. tuberculosis*. Las secuencias del producto génico *MT_1321* se descargaron de la base de datos Ensembl (<http://bacteria.ensembl.org/index.html>), los recursos del varioma de Mycobacterium tuberculosis (<http://genome.igib.res.in/tbvar/>) y datos de Comas et al. Sólo se consideraron las proteínas completas que no mostraron cambios. Alrededor de 1.000 proteínas fueron alineados utilizando MAFFT. El análisis de todas las secuencias de *nucS* en las bases de datos de cepas clínicas de *M. tuberculosis* rindió la existencia de 9 mutaciones simples de cambio de secuencia de aminoácidos. Además, se estudiaron las secuencias de *nucS* en 63 cepas aisladas de hospitales. Las cepas se caracterizaron en términos de su perfil de sensibilidad a los antibióticos y su genotipado en huella de ADN (RFLP y *spoligotyping*). Las cepas clínicas fueron divididas en dos grupos: las cepas de TB totalmente sensibles a la droga y las cepas de tuberculosis resistentes a múltiples fármacos, resistente al menos a isoniacida y rifampicina. Un número seleccionado al azar de 30 cepas de cada grupo se eligieron para su posterior análisis. En estas cepas, la secuencia *nucS* de *M. tuberculosis* se amplificó mediante PCR, incluyendo la región aguas arriba con su promotor, y se secuenció para identificar cualquier SNP en el ORF *MT_1321* y/o la región promotora. Solo se encontró una mutación de cambio de aminoácido. En total se encontraron y estudiaron 10 polimorfismos en NucS.

1.7. Mutagénesis dirigida al sitio. Las 10 mutaciones puntuales específicas se introdujeron en el gen *nucS* de la cepa control de *M. tuberculosis* CDC1551 por mutagénesis dirigida al sitio, usando procedimientos estándar. Brevemente, la secuencia del gen *nucS* *MT_1321* de tipo silvestre se amplificó por PCR y se clonó en pUC19 para ser utilizado como molde para la PCR mutagénica. Las mutaciones específicas individuales se introdujeron en *nucS* por PCR (18 ciclos de amplificación) utilizando la polimerasa Q5 (NEB) con los pares de cebadores mutagénicos apropiados. Después de la reacción PCR, una digestión DpnI se llevó a cabo durante 4 horas a 37 °C. Los plásmidos mutagenizados obtenidos después de la transformación DH5a se verificaron por secuenciación de ADN. Todos los alelos *nucS* (con diferentes mutaciones puntuales) se volvieron a clonar en pMV361 para generar un conjunto de plásmidos de complementación. Para poner a prueba la eficacia de cada alelo *nucS* para restaurar las tasas de mutación normales, los alelos mutados fueron integrados en el cromosoma y se expresaron en *M. smegmatis* Δ *nucS*. La inserción correcta de los alelos se verificó mediante PCR y secuenciación.

1.8. Análisis computacional de la proteína MT_1321. Dada la ausencia de datos estructurales para la proteína NucS de *M. tuberculosis*, la estructura 3D de la proteína NucS de *P. abyssi* (PDB 2VLD chain B) fue usada como molde para nuestra modelización mediante I-TASSER (Fig. 3). Esta estructura está compuesta de dos regiones distintas: la N-terminal de union a AND (aminoácidos 1-114) y la region catalítica C-terminal (aminoácidos 126-233). El molde y el modelo fueron alineadas estructuralmente usando el algoritmo Combinatorial Extension (CE), construido con PyMOL para identificar residuos relevantes.

WO 2017/115000					PCT/ES2017/070002
Cambio de aminoacido	Cambio de codón	Tasa de Mut	95% CI		cambio (veces)
mc²155 ΔnucS complementado con nucS de <i>M. tuberculosis</i>					
nuc TB-WT	WT (silvestre)	4.17x10 ⁻⁹	3.29-5.12x10 ⁻⁹		1 ^a
S39R	AGC→AG <u>G</u>	3.49x10 ⁻⁷	2.93-4.0x10 ⁻⁷		83.7
S39G	AGC→ <u>G</u> GC	4.93x10 ⁻⁹	3.79-6.15x10 ⁻⁹		1.2
S54I	AGT→A <u>T</u> T	7.94x10 ⁻⁹	5.49-11.07x10 ⁻⁹		1.9
A67S	GCG→ <u>I</u> CG	2.78x10 ⁻⁹	1.87-3.84x10 ⁻⁹		0.7
V69A	GTG→G <u>C</u> G	8.77x10 ⁻⁹	6.50-11.2x10 ⁻⁹		2.1
A135S	GCG→ <u>I</u> CG	3.57x10 ⁻⁸	2.77-4.38x10 ⁻⁸		8.6
R144S (H37Rv)	CGC→A <u>G</u> C	3.16x10 ⁻⁸	2.40-4.0x10 ⁻⁸		7.6
D162H	GAC→ <u>C</u> AC	8.98x10 ⁻⁹	6.42-11.80x10 ⁻⁹		2.2
T168A	ACC→ <u>G</u> CC	3.96x10 ⁻⁸	3.09-4.81x10 ⁻⁸		9.5
K184E	AAG→ <u>G</u> AG	3.06x10 ⁻⁸	2.37-3.75x10 ⁻⁸		7.3
<i>M. smegmatis</i> mc²155					
mc ² 155	wt	4.57x10 ⁻¹⁰	2.51-7.37x10 ⁻¹⁰		1 ^b
mc ² 155 Δ nucS	delección precisa de nucS	2.36x10 ⁻⁷	2.07-2.63x10 ⁻⁷		516.3
mc ² 155 Δ nucS/Sm-nucS	Complem. Con nucS-Sm	8.13x10 ⁻⁹	6.03-10.50x10 ⁻⁹		17.81

Tabla 2

Ejemplo 2. Resultados

2.1. Identificación y caracterización de un nuevo gen antimutador.

Para explorar si el genoma de micobacterias puede albergar alelos hipermutadores fuertes, se generó una extensa biblioteca de mutantes de transposón, que consistía en ~ 11.000 clones independientes de *M. smegmatis* mc² 155, y se cribó para los clones hipermutables. Un mutante, con una inserción localizada en el gen *MSMEG_4923*, mostró un fuerte aumento de la tasa de mutación de resistencia a la rifampicina (RIF-R). La Búsqueda en Blast de la secuencia de proteína traducida rindió un 22,78% de identidad con NucS de la archaea hipertermofila *Pyrococcus abissy* (<http://www.uniprot.org/blast/>). El gen homólogo de *M. tuberculosis* H37Rv RV_1321 presentó una identidad de 26,9% con NucS de *P. abissy*. Artículos previos definieron NucS de *P. abissy* como el primer miembro de una nueva familia de endonucleasas con, un papel importante en la reparación y/o replicación de ADN, aunque sin definir hasta ahora..

Se generó una cepa de *M. smegmatis* mc² 155 que albergaba una delección precisa del gen *MSMEG_4923*, produciendo la cepa *M. smegmatis* Δ nucS. La cepa de tipo silvestre mostró una tasa de mutación de resistencia a la rifampicina (RIF-R) de 4.57×10^{-10} mientras que la del *M. smegmatis* Δ nucS fue 2.36×10^{-7} (516 veces mayor) (Figura 1A). La complementación cromosómica de esta delección con el gen de tipo silvestre *MSMEG_4923* rindió una tasa de mutación de 8.13×10^{-9} , lo que significa una complementación de más de 96%, lo que demuestra una función anti-mutadora para este gen. .

De igual forma, un mutante Δ nucS en *S. coelicolor* rinde un aumento de la tasa de mutación para resistencia a rifampicina y estreptomicina de dos órdenes de magnitud (Fig 1B).

2.2. Caracterización del espectro mutacional de la delección *nucS*

El espectro mutacional conferido por la eliminación *nucS* se caracterizó por la secuenciación de la región que determina la resistencia a rifampicina (RRDR) en el gen diana *rpoB* en los mutantes independientes 41 y 41 Rif-R tanto de *M. smegmatis* mc² 155 como de su derivado Δ nucS. Mientras que las mutaciones espontáneas Rif-R en la cepa de tipo silvestre representan diferentes sustituciones de bases, incluyendo transiciones, transversiones y una delección en fase, todas las mutaciones en Δ nucS fueron específicamente transiciones (A:T→G:C o G:C→A:T), lo que sugiere una actividad muy específica de NucS para evitar la mutación.

2.3. Búsqueda de polimorfismos *nucS* en las bases de datos de secuencias.

Para buscar posible hipermutadores entre las cepas clínicas de *M. tuberculosis*, el gen *MT_1321* de todas las cepas secuenciadas de *M. tuberculosis* se exploró usando la base de datos Ensembl (<http://bacteria.ensembl.org/index.html>), El recurso del varioma *Mycobacterium tuberculosis* v (<http://genome.igib.res.in/tbvar/>) y los datos se obtuvo de Comas et al. Se encontraron un total de 9 polimorfismos de cambio de sentido. Curiosamente, uno de ellos (que conduce al cambio de aminoácido R144S) apareció en un total de varias secuencias independientes, entre ellos el de la clásica cepa modelo de control H37Rv. Por lo tanto, decidimos designar la secuencia más común como el gen de tipo silvestre e incluimos el cambio R144S, presente en H37Rv, como el polimorfismo adicional. Por otra parte, la búsqueda de polimorfismos entre *M. tuberculosis* clínicos aislados se realizó en dos colecciones bien caracterizadas. El gen *MT_1321* de 63 aislamientos, incluyendo 23 susceptible y 40 cepas resistentes a múltiples fármacos, se amplificó por PCR con cebadores específicos. La secuenciación de los productos mostró que cuatro de ellos contenían una mutación en el gen *MT_1321* que conduce al cambio Ser39-Gly en la proteína codificada.

2.4. Análisis computacional de los polimorfismos de NucS

Para predecir si algunos de los polimorfismos podrían afectar a la actividad NucS, se desarrolló y se analizó un modelado estructural integral de estos SNPs. El modelo bacteriano de NucS (P9WY5 ID uniprot, en el que la serina-144, S144, fue sustituido por arginina, R, presente en la mayoría de las secuencias de NucS *M. tuberculosis*) produjo puntuaciones $Z > 1$ en los diez mejores alineamientos (de 2,36 a 10,17) lo que indica que esta proteína se puede modelar de forma fiable. Por otra parte, el modelo presenta una topología global y correcta, y por lo tanto la mutagénesis *in silico* se puede realizar. La figura 2A representa la alineación estructural de NucS de *P. abissus* y *M. tuberculosis*, que muestra los polimorfismos estudiados en este trabajo. Los residuos de serina-39 (S39), serina-54 (S54), y la alanina-67 (A67) se encuentran en el dominio N-terminal, la región putativa de unión a ADN. S54 se encuentra en la región bisagra entre los dominios, mientras que aspártico-162 (D162), treonina-168 (T168) y lisina-184 (K184) se encuentran en el dominio C-terminal. El residuo de valina-69 (V69) se encuentra en los límites estructurales del dominio N-terminal mientras residuo de alanina-135 (A135) está situado entre los dos dominios en un bucle (Figura 2B).

La mayoría de las mutaciones no tenían ($\Delta\Delta G < 0$) o presentaron leves ($2 < \Delta\Delta G < 1$) efectos en la estabilidad de proteínas, según se midió en términos totales. Por otra parte, ninguno mostró enfrentamientos significativos en las fuerzas de Van der Waals, lo que sugiere que todos los polimorfismos son adecuados para el modelado. Nuestro análisis mutacional *in silico* de S39 a R, indica que las interacciones adicionales podrían establecerse con residuos de vecinos, es probable que produce una distorsión de la estabilidad local. La mutación S54I se encuentra en un bucle expuesto, donde no se establecen más interacciones dentro de la proteína, aunque la

interacción con la prolina-68 vecina podría perderse. No se ganan o pierden interacciones en la mutación A135S. El cambio A67S crea nuevas interacciones dentro de las hojas, mientras que D162H está cambiando el sitio expuesto a un grupo reactivo. La mutación T168A ha perdido todas las interacciones con la hélice vecina R203, y la exposición también podría ser un objetivo para la fosforilación de Thr. K184E es un gran cambio en tamaño y carga y, dependiendo de la colocación espacial de E, las interacciones con Y126 podría perderse. Por último, el polimorfismo R144S podría producir pérdida de interacciones de mantenimiento de la estructura local.

2.5. Efecto de los polimorfismos de *nucS* de *M. tuberculosis* sobre la tasa de mutación.

La modelización *in silico* de la proteína *nucS* de *M. tuberculosis* sugiere posibles efectos de varios de los 10 polimorfismos que se encuentran en las secuencias de *M. tuberculosis* ensayadas. Por lo tanto, se decidió estudiar estos efectos sobre la actividad antimutadora de NucS, comprobando su efecto sobre la tasa de mutación, utilizando el sistema heterólogo de *M. smegmatis* mc²155 Δ *nucS*. En primer lugar, hemos probado la capacidad del gen silvestre MT_1321 de la cepa CDC1551 de *M. tuberculosis* (que contiene la secuencia *nucS* más común en las bases de datos de *M. tuberculosis*) para rescatar el fenotipo normo-mutador en la cepa *M. smegmatis* mc² 155 Δ *nucS*. El gen silvestre *nucS* de *M. tuberculosis* (*nucS*-TB) redujo la tasa de mutación de 2.36×10^{-7} a 4.17×10^{-9} (una reducción de más del 98% de la tasa de mutación de la *M. smegmatis* mc² 155 Δ *nucS*). Esto demuestra que tanto *nucS*-TB como *nucS*-Sm (procedente de *M. smegmatis*) son capaces de complementar la supresión de *nucS* de una manera similar. Por lo tanto, este sistema heterólogo se puede utilizar para estudiar el efecto de los polimorfismos de *nucS* de *M. tuberculosis* en la tasa de mutación.

Para caracterizar el efecto de cada polimorfismo, el gen *nucS* silvestre de *M. tuberculosis* (*nucS*-TB) y los 10 *nucS*-TB mutagenizados conteniendo cada uno de los polimorfismos se integraron en el cromosoma de *M. smegmatis* mc² 155 Δ *nucS* para medir el grado de complementación del fenotipo hipermutador. La Figura 2 muestra la variación de las tasas de mutación de resistencia a la rifampicina de las cepas complementadas relacionados con la *M. smegmatis* mc² 155 Δ *nucS* complementada con el gen silvestre MT_1321 de la cepa de control CDC1551. Los valores de tasa de mutación se pueden encontrar en la Tabla 1. Siete alelos aumentaron la tasa de mutación más de dos veces, siendo el alelo S39R el mutador más fuerte, con un aumento de 83,7 veces sobre la cepa *M. smegmatis* mc² 155 Δ *nucS* complementados con el silvestre *nucS*-TB. Los alelos A135S, T168A y K184E produjeron aumentos cerca de un orden de magnitud (8,6, 9,5 y 7,3, respectivamente). Sorprendentemente, el alelo R144S (presente en la cepa H37Rv) produce también un 7,6 veces mayor. Tres alelos, S54I, V69A, y D162H, produjeron bajos, pero estadísticamente

significativo ($p < 0,05$), aumento alrededor de 2 veces. Por último, los alelos S39G y A67S no promovieron cambios aparentes en las tasas de mutación.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para la producción de cepas de microorganismos pertenecientes a los dominios Bacteria o Archaea hipermutables, que comprende:
 - a. Identificación de la existencia del gen o genes que codifican para la/s endonucleasa/s NucS (secuencia de referencia NCBI: NP_215837.1), o de un gen/es homólogo u ortólogo de *nucS* (secuencia de referencia MT_1321), en un microorganismo perteneciente a los dominios Bacteria o Archaea; y
 - b. inactivar dichos gen o genes;
- donde la inactivación de dicho gen/es hace que dicha cepa sea hipermutable en comparación con una cepa en la que no se ha realizado tal inactivación.
- El método según la reivindicación 1, donde el microorganismo es una actinobacteria o una arqueobacteria.
- El método según la reivindicación 2, donde la cepa es una actinobacteria.
- El método según la reivindicación 3, donde la cepa pertenece al genero *Mycobacterium*, preferiblemente al complejo *Mycobacterium tuberculosis*.
- El método según la reivindicación 4, donde la cepa se selecciona de la lista que consiste en: *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium tuberculosis*.
- El método según la reivindicación 5, donde dicha cepa es *Mycobacterium smegmatis* y el locus del inactivado de la etapa b) es MSMEG_4923.
- El método según la reivindicación 5, donde dicha cepa es *Mycobacterium tuberculosis* y el método comprende la inactivación del gen, según la etapa b), MT_1321.
- El método según la reivindicación 7, donde dicha inactivación consiste en la producción de cualquiera de los siguientes polimorfismos en la proteína NP_215837.1: S39R, A135S, R144S, T168A y K184E o cualquiera de sus combinaciones.
- El método según la reivindicación 3, donde dicha inactivación consiste en la delección total o parcial del gen *nucS*.

10. El método de la reivindicación 3, donde la cepa pertenece al género *Streptomyces*.
11. El método de la reivindicación 3, donde la cepa se selecciona de la lista que consiste en cualquiera de las siguientes especies bacterianas: *Streptomyces ssp*, *Bifidobacterium*,
5 *Nocardia* y *Rhodococcus*.
12. Una cepa obtenida u obtenible por medio del método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 10 13. Una cepa perteneciente a los dominios Bacteria o Archaea, caracterizado porque en dicha cepa el/los gen o genes capaces de codificar la endonucleasa NucS (NCBI secuencia de referencia: NP_215837.1), o un gen/es homólogos u ortólogos de *nucS*, están inactivados parcial o totalmente.
- 15 14. La cepa de la reivindicación 13, donde la cepa bacteriana es *Mycobacterium tuberculosis* y el método comprende la inactivación del gen *MT_1321*, según la etapa b).
- 20 15. La cepa bacteriana de la reivindicación 14, donde dicha inactivación consiste en la inducción de cualquiera de los siguientes polimorfismos en el gen *MT_1321*: *S39R*, *A135S*, *R144S*, *T168A* y *K184E*, o de cualquiera de sus combinaciones.
- 25 16. La cepa bacteriana de la reivindicación 13, donde dicha inactivación consiste en la delección total o parcial del gen *nucS*.
- 30 17. La cepa bacteriana de la reivindicación 13, donde la cepa bacteriana es *Mycobacterium smegmatis* y el gen inactivado es *MSMEG_4923*.
18. La cepa bacteriana de la reivindicación 17, donde la cepa bacteriana es *M. smegmatis* mc² 155.
19. La cepa bacteriana de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, donde la cepa bacteriana es *M. tuberculosis* H37Rv y CDC1551.
- 35 20. Una cepa bacteriana seleccionada de la lista que consiste en cualquiera de las especies bacterianas siguientes: *Streptomyces ssp*, *Bifidobacterium*, *Nocardia* o *Rhodococcus*, caracterizado porque en dicha cepa el gen o genes capaces de codificar la

endonucleasa NucS (NCBI secuencia de referencia: NP_215837.1), o un gen/es homólogo u ortólogo de *nucS* (secuencia de referencia MT_1321), están inactivados.

21. Una composición que comprende la cepa tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20.

22. Una cepa bacteriana tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, para su uso como medicamento, en particular como vacuna.

23. Uso de una cepa bacteriana tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, para su uso en la elaboración de una vacuna para la prevención de una infección con una bacteria de la misma especie que la cepa bacteriana utilizada como vacuna.

24. Una composición farmacéutica que comprende las cepas bacterianas tal y como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20.

25. Un método para la detección de resistencia a drogas, que comprende:

- a. Poner en contacto un fármaco, preferiblemente un antibiótico, con una cepa bacteriana obtenida u obtenible de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11;
- b. Determinar si este fármaco tiene un efecto bacteriostático o bactericida *in vitro* sobre la cepa bacteriana específica de la etapa a); y
- c. Determinar la probabilidad de la cepa hipermutable de desarrollar resistencia a los fármacos probados.
- d. Determinar las mutaciones que confieren resistencia, sensibilidad o tolerancia a un determinado fármaco.

26. Un kit para llevar a cabo el método de la reivindicación 25, que comprende:

- (i) una cepa bacteriana o una biblioteca de cepas obtenidas u obtenibles de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11; y
- (ii) opcionalmente un fármaco o una biblioteca de fármacos para la prueba.

27. Uso *in vitro* del kit de la reivindicación 26 para llevar a cabo el método de la reivindicación 25.

28. Uso de la cepa tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20 para la fermentación de cualquier tipo de metabolito, incluido los antibióticos.

29. Uso de la cepa tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20 para bioremediación.
- 5 30. Uso in vitro de la cepa tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, para la fermentación o para mejorar las fermentaciones, la creación de rutas híbridas para obtener nuevos metabolitos, incluyendo antibióticos, aminoácidos, pesticidas, proteínas, etc., y para la biorremediación de productos recalcitrantes.

FIGURAS

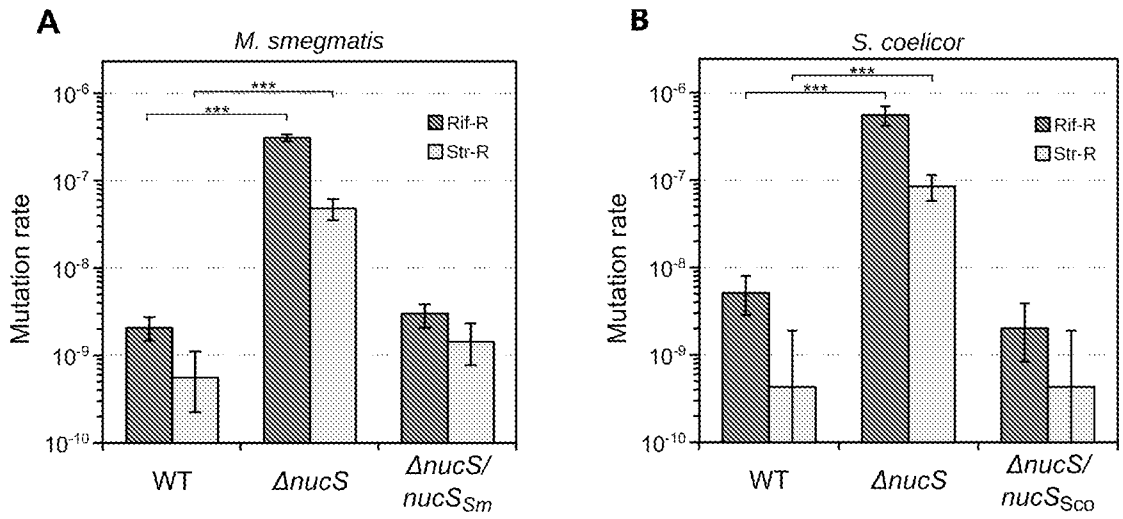


Fig. 1

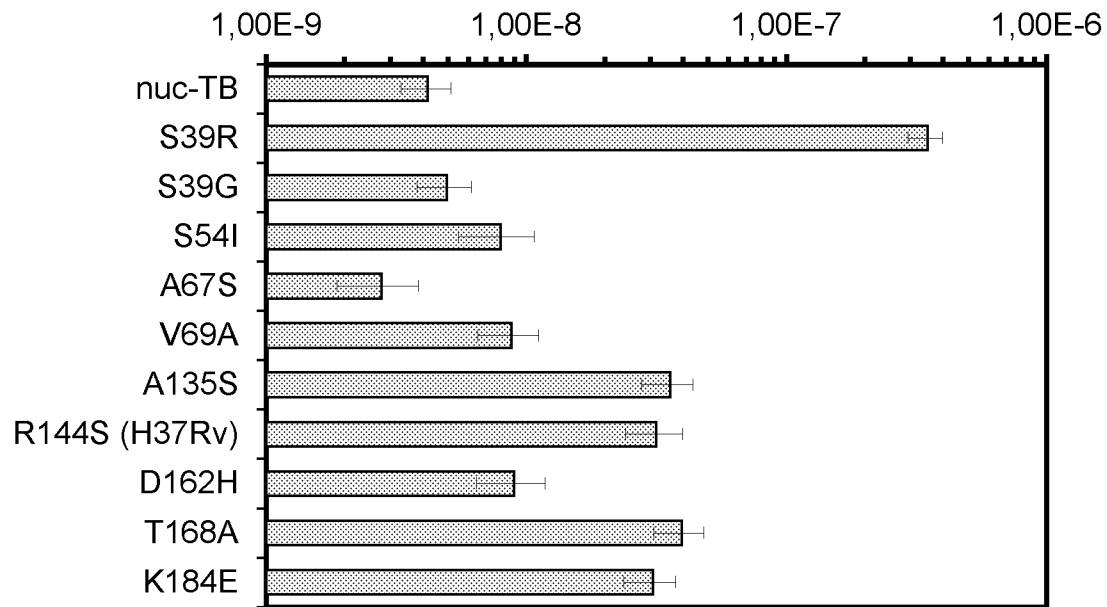


Fig. 2

A

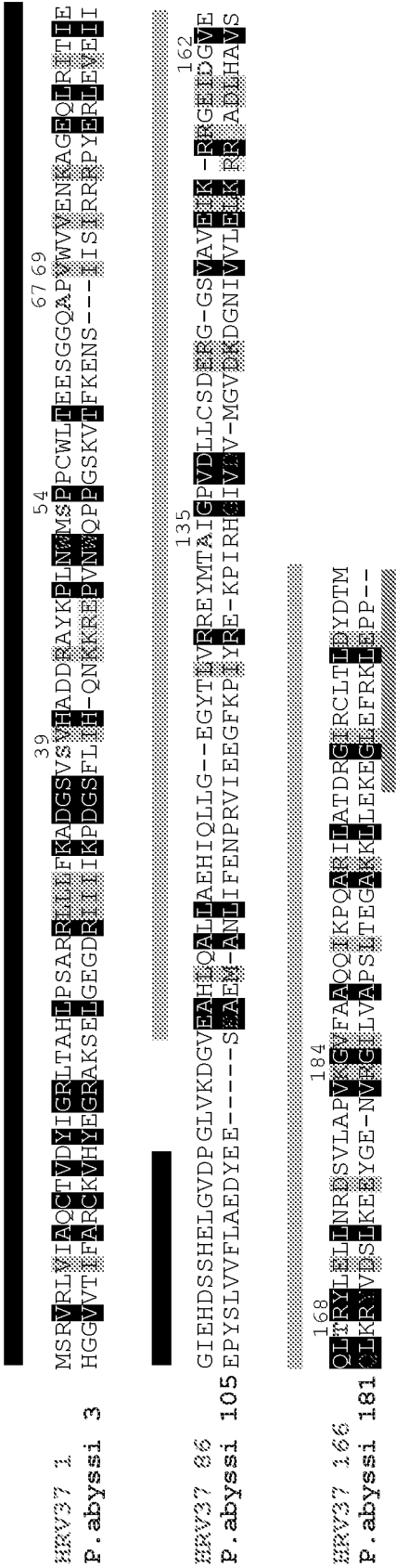


Fig. 3

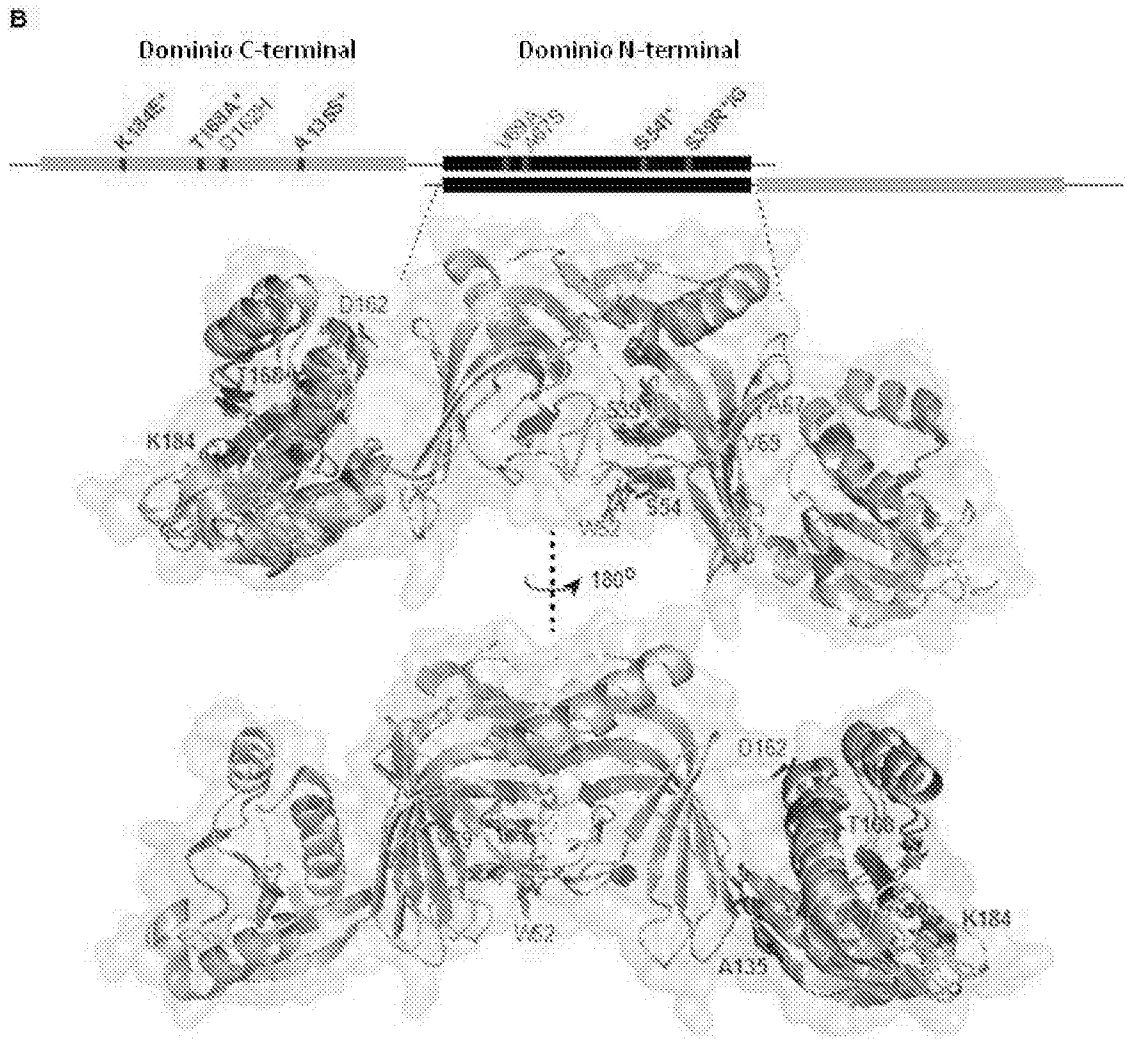


Fig. 3 (cont.)

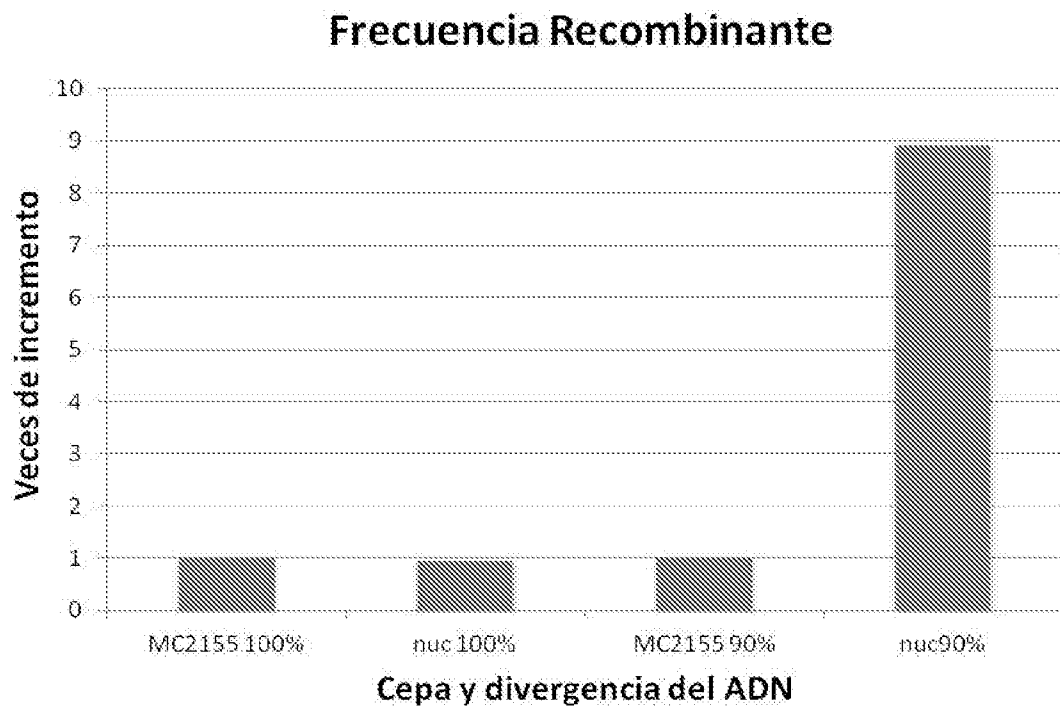


Fig. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2017/070002

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)

C12Q, C12N

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, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE, XPESP/Elsevier, COMPENDEX/EI y bases de datos de texto completo

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	REN BIN et al. "Structure and function of a novel endonuclease acting on branched DNA substrates." EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal AUG 19 2009. 31/07/2009, Vol. 28, N° 16, Pages 2479-2489, ISSN 0261-4189, <DOI: doi:10.1038/emboj.2009.192> paragraphs "results" and "discussion"	1-21 y 25
A	CREZE C et al. "Modulation of the <i>Pyrococcus abyssi</i> NucS endonuclease activity by replication clamp at functional and structural levels." Journal of Biological Chemistry 20120504 American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. usa. 04/05/2012, Vol. 287, N° 19, Pages 15648 - 15660, ISSN 0021-9258 (print) ISSN 1083-351X (electronic), <DOI: doi:10.1074/jbc.M112.346361> paragraphs "results" and "discussion"	1-21 y 25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"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
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12/05/2017

Date of mailing of the international search report
(12/05/2017)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
M. García Coca

Telephone No. 91 3493411

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2017/070002

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.: **22-30**
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:

see extra sheet

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:

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.:

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/ES2017/070002

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DOS VULTOS T et al. "Identification of nudix hydrolase family members with an antimutator role in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> and <i>Mycobacterium smegmatis</i> ." Journal of Bacteriology APR 2006. 31/03/2006, Vol. 188, N° 8, Pages 3159-3161, ISSN 0021-9193 the whole document.	1-21 y 25

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68 (2006.01)

C12N1/21 (2006.01)

C12N15/01 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2017/070002

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)
C12Q, C12N

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, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE, XPESP/Elsevier, COMPENDEX/EI y bases de datos de texto completo

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	REN BIN et al. "Structure and function of a novel endonuclease acting on branched DNA substrates." EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal AUG 19 2009. 31/07/2009, Vol. 28, Nº 16, Páginas 2479-2489, ISSN 0261-4189, <DOI: doi:10.1038/emboj.2009.192> apartados "resultados" y "discusión"	1-21 y 25
A	CREZE C et al. "Modulation of the <i>Pyrococcus abyssi</i> NucS endonuclease activity by replication clamp at functional and structural levels." Journal of Biological Chemistry 20120504 American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. usa. 04/05/2012, Vol. 287, Nº 19, Páginas 15648 - 15660, ISSN 0021-9258 (print) ISSN 1083-351X (electronic), <DOI: doi:10.1074/jbc.M112.346361> apartados "resultados" y "discusión"	1-21 y 25

☒ 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:	"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.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"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.
"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).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"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.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
12/05/2017

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
12 de mayo de 2017 (12/05/2017)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. García Coca
Nº de teléfono 91 3493411

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2017/070002

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	DOS VULTOS T et al.. "Identification of nudix hydrolase family members with an antimutator role in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> and <i>Mycobacterium smegmatis</i> ." Journal of Bacteriology APR 2006. 31/03/2006, Vol. 188, Nº 8, Páginas 3159-3161, ISSN 0021-9193 todo el documento.	1-21 y 25

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2017/070002

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 según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n^{os}:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☒ Las reivindicaciones n^{os}: **22-30**
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:

Las reivindicaciones 22-30 no están basadas en la descripción (art. 6 PCT).

Ver Recuadro Suplementario.

3. ☐ Las reivindicaciones n^{os}:
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:

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 n^{os}:
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 n^{os}:

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 establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C12Q1/68 (2006.01)

C12N1/21 (2006.01)

C12N15/01 (2006.01)

SUPLEMENTARIO DE RECUADRO II

En la memoria únicamente se describe un método para la obtención de cepas hipermutables de microorganismos que contienen el gen/es que codifican para la/s endonucleasa/s NucS o un gen/es homólogos u ortólogos de nucS. En ningún momento se describe un método para la detección de resistencia a drogas (fármacos) ni un uso médico de las cepas hipermutables obtenidas mediante el método de la invención, ni ninguno de los otros usos reivindicados. Por lo tanto, las reivindicaciones 22-30 no están basadas en la descripción (art. 6 PCT).

Sin embargo, en cuanto la reivindicación 25, aunque no se ha buscado un método para la detección de resistencia a drogas (fármacos), sí se ha buscado el uso de las cepas obtenidas por medio del método de la invención (el método reivindicado en la reivindicación 1) en métodos de detección de resistencia a fármacos.