(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 303 452**

(21) Número de solicitud: 200602761

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/18 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **30.10.2006**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2008**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **01.08.2008**

(71) Solicitante/s: **Universidad Complutense de Madrid**
Rectorado-Avda. de Séneca 2
28040 Madrid, ES

(72) Inventor/es: **Rodríguez Peña, José Manuel;**
Díez Muñiz, Sonia;
Nombela Cano, César y
Arroyo Nombela, Javier

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Estirpe de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y método para la detección de sustancias antifúngicas con actividad sobre la pared celular.**

(57) Resumen:
Estirpe de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y método para la detección de sustancias antifúngicas con actividad sobre la pared celular.
En la presente invención se presenta el desarrollo y utilización de una estirpe, genéticamente modificada, de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, como sistema biológico dirigido a la identificación de sustancias capaces de interferir con los procesos de construcción y/o mantenimiento de la integridad de la pared celular de dicho organismo. Así mismo, se presenta un método de screening/rastreo de dichas sustancias utilizando la citada estirpe testigo/indicadora.

ES 2 303 452 A1

DESCRIPCIÓN

Estirpe de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y método para la detección de sustancias antifúngicas con actividad sobre la pared celular.

Objeto de la invención

En la presente invención se presenta el desarrollo y utilización de una estirpe, genéticamente modificada, de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, como sistema biológico dirigido a la identificación de sustancias capaces de interferir con los procesos de construcción y/o mantenimiento de la integridad de la pared celular de dicho organismo. Así mismo, se presenta un método de screening/rastreo de dichas sustancias utilizando la citada estirpe testigo/indicadora.

La invención se encuadra en el sector técnico de procesos biotecnológicos, más concretamente en lo relativo al empleo de microoganismos modelo, genéticamente modificados, para su utilización como biosensores de diferentes procesos biológicos, y en este caso, específicamente en el campo de detección de sustancias con actividad antifúngica.

Estado de la técnica

Las infecciones fúngicas en humanos se han incrementado de forma significativa durante las últimas décadas, aumentando su prevalencia como causas de enfermedad y mortalidad (Sandven, 2000, Rev Iberoam Micol, 17:73-81; Bille, *et al*., 2005, Curr Opin Infect Dis, 18:314-9; Almirante, *et al*., 2005, J Clin Microbiol, 43:1829-35). El problema se ha agravado por el incremento de pacientes inmunocomprometidos, debido fundamentalmente a la pandemia del SIDA, el aumento en el número de trasplantes de órganos y el uso de terapias anticancerosas más agresivas (Sussman *et al*., 2004, Eukaryotic Cell, 3:932-43; Levin, 2005, Microbiol Mol Biol Rev, 69:262-91). El incremento en la morbilidad, junto con la pérdida de eficiencia de los fármacos disponibles así como los efectos adversos ocasionados por muchas de las moléculas integrantes del arsenal terapéutico actual (Prentice and Donnelly, 2001, Blood Rev, 15:1-8; Vicente *et al*., 2003, Clin Microbiol Infect, 9:15-32; Akins, 2005, Med Mycol, 43:285-318; Chandrasekar, 2005, Med Mycol, 43:S295-8) hacen muy necesario el desarrollo de nuevos fármacos antifúngicos.

El sistema tradicionalmente utilizado para el descubrimiento de nuevas sustancias antifúngicas potenciales se basa en utilizar métodos celulares, es decir, identificar nuevos compuestos activos frente a la propia célula fúngica (Willins *et al*., 2002, Curr Pharm Des, 8:1137-54) con capacidad para detener su crecimiento o producir su muerte. Con este sistema se tiene la seguridad de que las sustancias identificadas han sido capaces de penetrar en la célula para ejercer su acción, lo cual es ventajoso frente a otros sistemas de rastreo como los sistemas libres de células. Sin embargo, su principal inconveniente es que el método detecta productos que actúan sobre cualquier diana de la célula, sin que el procedimiento introduzca ninguna especificidad en el modo de acción. Con los referidos procedimientos inespecíficos, una vez detectado cualquier compuesto activo, es preciso continuar la búsqueda para la selección de aquellas sustancias que sean selectivas, es decir capaces de inhibir o afectar a funciones del patógeno que estén ausentes en el hospedador, o que, al menos, sean lo suficientemente distintas de modo que el metabolismo del hospedador se vea mínimamente afectado.

Otros métodos de rastreo de sustancias antifúngicas se han centrado en la inhibición de la expresión de genes esenciales de *Saccharomyces cerevisiae* (EP0972847) o en la modulación de la expresión de determinados genes potencialmente interesantes (US2006088859) (muchos de ellos de función no completamente caracterizada). En estos casos, el gen seleccionado se sustituye por un gen marcador, transformando la correspondiente estirpe con un plásmido que incluye el gen esencial bajo el control de un promotor regulable. Las células así modificadas se incuban en presencia de la sustancia cuya actividad se desea analizar y se determina el efecto inhibidor del crecimiento que ejerce dicha sustancia sobre la célula modificada dependiendo de los niveles de expresión del gen esencial.

De entre los blancos útiles para seleccionar sustancias selectivas, la pared celular fúngica se ha postulado como una diana ideal (más bien un conjunto de dianas) ya que no existe en las células de mamíferos y, por tanto, permite la deseada selectividad del efecto tóxico de los antifúngicos. Además, la pared celular constituye una estructura compleja, con múltiples funciones para su desarrollo, que tiene un papel fundamental en la estabilidad de la célula fúngica y la supervivencia del agente infeccioso en cualquier ambiente, siendo, por tanto, muy atractivo el descubrimiento de este tipo de antifúngicos para su uso futuro en clínica humana.

En este contexto, se han descrito métodos de rastreo de sustancias con posible actividad antifúngica sobre la pared celular de hongos filamentosos (WO03020922), aunque en cierto modo aún limitados por el incipiente nivel de conocimiento de los mecanismos implicados en la regulación de esta estructura en este tipo de organismos y por la consabida dificultad que conlleva la obtención de crecimientos reproducibles en medio líquido de hongos filamentosos.

Es importante remarcar que la levadura unicelular *Saccharomyces cerevisiae* constituye un organismo eucariótico modelo, por excelencia, para muchos estudios fundamentales. La información que aportan muchos de los trabajos realizados sobre la pared celular de esta especie es verdaderamente notable y han llevado a un nivel de conocimiento de esta estructura realmente significativo (Cid *et al*., 1995, Microbiol Rev, 59:345-86; Klis, *et al*., 2002, FEMS Microbiol Rev, 26:239-56; Lesage and Bussey, 2006, Microbiol Mol Biol Rev, 70:317-43), en contraposición con la información disponible en otros hongos patógenos donde en todo caso es mucho menor debido fundamentalmente a la carencia de

herramientas genéticas para la manipulación de estos microorganismos y a la patogenicidad inherente a los hongos de interés clínico que dificulta su manejo en laboratorios estándar. Por tanto, en muchos casos la información disponible en relación con la pared celular está supeditada a los datos previamente obtenidos utilizando *S. cerevisiae*. Esta estructura constituye un elemento esencial para la viabilidad del organismo. De hecho cuando se le enfrenta a sustancias que interfieren con la correcta formación de la pared celular la viabilidad de la levadura se afecta seriamente.

En los últimos años se ha identificado y caracterizado un mecanismo celular de respuesta a diferentes tipos de estreses que afectan a la estabilidad de la pared celular. Las funciones que se activan como consecuencia de este mecanismo, al que se ha denominado "mecanismo compensatorio", están controladas y moduladas por una ruta de transducción de señales denominada como "ruta de integridad celular". Esta respuesta se desencadena mediante la activación por fosforilación en cascada de un bloque de MAP quinasas, activando, mediante fosforilación y cuando procede, el factor de transcripción Rlm1p, responsable final del incremento en la expresión de un grupo específico de genes (revisado en Levin, 2005, Microbiol Mol Biol Rev, 69:262-91).

Es primordial destacar la semejanza estructural de la pared celular de *S. cerevisiae* con la de otros hongos, incluidos los patógenos con especial relevancia clínica como *Candida albicans* o *Aspergillus fumigatus* (Beauvais and Latge, 2001, Drug Resist Updat, 4:38-49; Klis, *et al*., 2002, FEMS Microbiol Rev, 26:239-56), por lo que cabe asumir que las sustancias activas frente a *S. cerevisiae*, también afecten a otros géneros y especies de hongos patógenos.

En conclusión, es necesario descubrir nuevos agentes antifúngicos, para combatir la infecciones del hombre y los animales causadas por hongos, así como las contaminaciones por este tipo de organismos.

Descripción de la invención

Para dar respuesta a este problema, la presente invención incluye una nueva estirpe de levadura, modificada genéticamente, que permite identificar moléculas que interfieren con la biogénesis de la pared celular de los hongos, lo que facilita la identificación de un conjunto de dianas de acción farmacológica de gran relevancia, especificidad y selectividad.

La estirpe modificada genéticamente de la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae* (estirpe BY4741; Euroscarf, Alemania), ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (Burjassot, Valencia) donde ha recibido el número de depósito 12033. Esta estirpe permite la identificación de sustancias que interfieren, directa o indirectamente, con la generación fisiológica y el mantenimiento estable de la pared celular.

Para construir la estirpe CECT 12033 se realizó una construcción genética incluida en un vector plasmídico, preferentemente en un plásmido multicopia y, más preferentemente, en un plásmido bifuncional con capacidad para replicarse tanto en *Saccharomyces cerevisiae* como en *Escherichia coli*. Dicha construcción incluye la región promotora del gen YKL161C de *S. cerevisiae*, un gen marcador y la región terminadora del gen YKL161C de *S. cerevisiae*.

En una realización de la invención el gen marcador confiere resistencia a un antibiótico de manera que las sustancias que afectan a la pared celular de *S. cerevisiae* provocan una mayor capacidad de crecimiento de la levadura en presencia de ese antibiótico. Según una realización preferida de la invención ese antibiótico es la nourseotricina.

Un aspecto más de la invención se refiere a la inclusión en la construcción genética del gen *HIS5* que permite a la levadura crecer en ausencia del aminoácido histidina.

La invención incluye una construcción genética elaborada, siguiendo estrategias tradicionales de biología molecular, sobre un plásmido de alto número de copias de *S. cerevisiae*, YEp352 (Hill, *et al*., 1986, Yeast, 2:163-167). Como se describe en la Figura 1, en los extremos de la construcción se localizan 1189 pares de bases de la región promotora (corriente arriba del codón de iniciación) y 406 pares de bases de la región terminadora (corriente abajo del codón de terminación) del gen *YKL161C*, respectivamente. También se incluye la secuencia codificante del gen de resistencia al antibiótico aminoglucosidico nourseotricina (gen *nat1* (Goldstein and McCusker, 1999, Yeast, 15:1541-53), aislado de la especie *Streptomyces noursei*), seguido del módulo heterólogo de expresión constitutiva del gen *HIS5* de *Schizosaccharomyces pombe* procedente del plásmido pFA6a-HIS3MX6 (Wach *et. al*., 1997, Yeast, 13:1065-75) como marcador de selección.

Como consecuencia de todo ello, la expresión del gen de resistencia a nourseotricina queda bajo el control del promotor del gen *YKL161C*, mientras que la expresión constitutiva del gen *HIS5* permite el crecimiento de la levadura en medio de cultivo carente del aminoácido histidina. El crecimiento en medio sin histidina posibilita la selección de estirpes transformadas, que lleven esta construcción, las cuales se diferencian fácilmente de la estirpe silvestre (BY4741) portadora de una mutación en el gen *HIS3* e incapaz, por tanto, de crecer en ausencia del citado aminoácido.

Esta invención comprende la sustitución, en la levadura *S. cerevisiae*, del gen *YKL161C* por la construcción genética incluida en el plásmido descrito anteriormente. El hecho de incorporar en sus extremos la región promotora y la terminadora del gen, permite la integración de la citada construcción en el locus del gen *YKL161C* mediante recombinación homóloga.

En la estirpe CECT 12033, el gen *YKL161C* ha sido sustituido por la construcción genética aquí descrita lo que permite la identificación de sustancias que interfieren, directa o indirectamente, con la generación fisiológica y el mantenimiento estable de la pared celular en presencia del antibiótico nourseotricina.

Como se comentó en el apartado sobre el estado de la técnica de la presente memoria, la transcripción del gen *YKL161C* se induce por parte de agentes capaces de activar la respuesta de la célula fúngica frente a perturbaciones que afectan a la estabilidad de su envoltura externa, que constituye la pared celular. Los agentes indicados pueden ser de diversos tipos, incluyendo los que perturban la estructura, degradan componentes de la misma o inhiben la biosíntesis de algunos de ellos. La principal ventaja de esta invención, frente a otros sistemas desarrollados anteriormente, es la posibilidad de rastrear, de forma específica y dirigida, en busca de sustancias con actividad antifúngica que actúan frente a la pared celular, utilizando métodos de rastreo tradicionales (*a priori* inespecíficos), cuya puesta a punto resulta sencilla. Además, el método de rastreo se encuentra enormemente facilitado al utilizar un organismo absolutamente carente de patogenicidad y con métodos y características de crecimiento perfectamente establecidos y caracterizados. Eventualmente, otra ventaja de utilizar *S. cerevisiae* consiste en que, debido a que es el organismo donde los procesos de homeostasis de la pared celular están mejor definidos y caracterizados, la información obtenida de los rastreos planteados podrá ser más fácilmente asociada a dianas específicas en la célula que faciliten en mayor medida su posible aplicación en terapéutica.

El efecto detectado es la inducción de la expresión del gen *YKL161C* en presencia de agentes que perturban la pared celular. En la estirpe CECT 12033, dado que el gen *YKL161C* está sustituido por un gen marcador, para detectar sustancias antifúngicas con actividad sobre la pared celular se realiza la detección de la expresión de ese marcador. Con el sistema utilizado, esto se traduce en un incremento de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el antibiótico nourseotricina. Es decir, la estirpe recombinante CECT 12033 es incapaz de crecer en un medio de cultivo al que se le añada una determinada cantidad del antibiótico nourseotricina (ligeramente superior a la CMI en las condiciones particulares que se establezcan). Sin embargo, en presencia de una sustancia capaz de alterar la pared celular de la levadura, a una concentración subletal, la levadura crece como consecuencia de la activación del citado gen *YKL161C* en esta estirpe recombinante, produciéndose también la inducción de la resistencia a nourseotricina (Figura 2) debida a la expresión del gen de resistencia a este antibiótico bajo el promotor del gen *YKL161C*.

Descripción de los dibujos

Figura 1. Esquema de los diferentes fragmentos genéticos que forman parte del módulo integrado en *S. cerevisiae* para obtener la estirpe recombinante CECT 12033.

Figura 2. Niveles de crecimiento e incremento de la CMI de la estirpe CECT 12033 frente al antibiótico nourseotricina cuando se cultiva en presencia de Zimoliasa utilizando un método de microdilución.

Figura 3. Ausencia de efecto en los niveles de sensibilidad/resistencia de la estirpe CECT 12033 en presencia de sustancias sin actividad sobre la estabilidad de la pared celular, utilizando metodología idéntica a la descrita en la Figura 2.

Modo de realización

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no son limitativos de su alcance, que viene definido exclusivamente por la nota reivindicatoria adjunta.

Ejemplo 1

Construcción del plásmido pJS04

En primer lugar se realizó, en un plásmido, la construcción que contenía la región promotora del gen *YKLI61C*, el gen de resistencia a nourseotricina, el módulo del gen *HIS5* y la región terminadora del gen *YKL161C*.

Inicialmente se procedió a amplificar la región promotora del gen *YKL161C* desde la posición -1189 hasta la posición -1 con respecto al inicio de la secuencia codificante de dicho gen, mediante el uso de la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando una Taq DNA polimerasa con baja tasa de error. Se emplearon a tal efecto los cebadores descritos en SEQ ID NO: 1 y 2 que llevaban incluido en su extremo 5' los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción EcoRI y *Bam*HI, respectivamente. Como molde de la reacción se utilizó DNA genómico procedente de la estirpe de levadura BY4741.

El producto de PCR generado fue digerido con las enzimas de restricción anteriormente referidas y clonado en el sitio de clonación múltiple del plásmido YEp352 previamente digerido con las mismas enzimas. Este plásmido es capaz de replicarse tanto en *Escherichia coli* como en *Saccharomyces cerevisiae*, y además porta como marcadores de selección los genes de resistencia a ampicilina (para *E. coli*) y *URA3* (*S. cerevisiae*). De esta forma se obtuvo el plásmido pJS01.

A continuación, y siguiendo una estrategia idéntica a la descrita previamente, se procedió a amplificar mediante PCR el fragmento de 406 pb situado entre las posiciones +3 y +409 a partir del codón de terminación del gen *YKL161C*.

Los cebadores utilizados fueron los descritos en SEQ ID NO: 3 y 4 que presentaban incorporados en sus extremos 5' los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Xba*I y *Hind*III, respectivamente. El producto de PCR obtenido fue clonado en los sitios *Xba*I y *Hind*III presentes en el plásmido pJS01 dando lugar al plásmido pJS02, de tal forma que en dicho plásmido se encontraban las secuencias correspondientes al promotor y al terminador del gen *YKL161C* de forma contigua en ausencia de la secuencia que codifica dicho gen.

Posteriormente, entre ambas secuencias correspondientes a las regiones reguladoras del gen *YKL161C*, y utilizando un sitio *Bam*HI, se procedió a donar un fragmento *Nco*I/*Sca*I de 583 pb procedente del plásmido pAG25 (Goldstein and McCusker, 1999, Yeast, 15:1541-15) que contiene el marco abierto de lectura de 573 pb correspondiente al gen de resistencia a nourseotricina (*nat*1). Para llevar a cabo esta clonación, al tratarse de enzimas de restricción que dejan extremos tras la digestión no compatibles, se procedió, previamente a la etapa de ligación, a la generación de extremos romos (y por tanto compatibles) utilizando la enzima Klenow tanto para el tratamiento de la digestión con *Bam*HI como la de *Nco*I (téngase en cuenta que la digestión con *Sca*I genera extremos romos directamente). En síntesis, el plásmido obtenido (denominado pJS03) contiene la siguiente secuencia de fragmentos: región promotora del gen *YKL161C*-secuencia codificante del gen nat1-región terminadora de *YKL161C*. Es importante destacar que todas las construcciones descritas fueron verificadas mediante secuenciación automática.

A continuación se digirió el plásmido pJS03 con la enzima *Xba*I (sitio único de corte situado entre *nat*1 y la región terminadora de *YKL161C*) para proceder, tras el correspondiente tratamiento con la enzima Klenow, a la donación del fragmento *Sma*I/*Pme*I procedente del plásmido pFA6a-HIS3MX6 que contiene el módulo heterólogo de expresión constitutiva del gen *HIS5* de *Schizosaccharomyces pombe* (Wach *et. al*., 1997, Yeast, 13:1065-75) como marcador de selección. En dicho módulo la secuencia codificante del gen *HIS5* se encuentra flanqueada por las secuencias reguladoras del gen TEF del hongo filamentoso *Ashbya gossypii* permitiendo crecer a estirpes mutantes de *S. cerevisiae* delecionadas en el gen HIS3 (como es el caso de la estirpe BY4741 utilizada en esta invención) en medios de cultivo carentes del aminoácido histidina como se ha descrito anteriormente en esta memoria. El plásmido así obtenido se denominó pJS04.

Ejemplo 2

Construcción de la estirpe recombinante CECT 12033

Para obtener la estirpe recombinante CECT 12033, el inserto *Eco*RI/*Hind*III del plásmido pJS04 se introdujo mediante transformación, siguiendo el método del acetato de litio (Gietz and Woods, 1994, Molecular genetics of yeast: a practical approach, pp. 121-134, UK IRL Press), en la cepa silvestre BY4741. Los transformantes con el gen *YKLI61C* sustituido por la construcción genética, debido a la elevada eficacia en el proceso de recombinación homóloga en *S. cerevisiae*, se seleccionaron por su capacidad para crecer en medio de cultivo carente del aminoácido histidina.

Ejemplo 3

Tratamiento de la estirpe CECT 12033 con Zimoliasa

A modo de ejemplo de la aplicabilidad de la presente invención, a continuación se muestran los resultados de crecimiento celular (es decir de la determinación de la concentración mínima inhibitoria o CMI) obtenidos tras el tratamiento de la estirpe CECT 12033 con un agente de efecto conocido sobre la pared celular (Figura 2) y que, por tanto, constituye un control positivo del funcionamiento del sistema.

El ejemplo que se muestra en la Figura 2 corresponde al tratamiento con Zimoliasa, una mezcla compleja de enzimas en la que la actividad β-1,3-Glucanásica es mayoritaria (MP Biomedicals, Inc.) y que por tanto produce daño en la pared celular al actuar sobre su armazón polisacaridico. En la Figura 2 se representa en el eje de ordenadas la densidad óptica alcanzada por el cultivo presente en cada pocillo de la placa multipocillo medida a una longitud de onda de 655 nm. En el eje de abscisas se indica de forma creciente la concentración de nourseotricina presente en cada pocillo en microgramos por mililitro. Los cuadrados corresponden a la estirpe CECT 12033 creciendo en medio YEDP (un medio de cultivo estándar para *S. cerevisiae* (Guthrie and Fink, 1991, Methods in Enzimology, 194:13, Academic Press Inc.), en presencia de Zimoliasa 20T a una concentración final de 5 Unidades por mililitro. Los asteriscos corresponden a los datos de crecimiento de la misma estirpe en idénticas condiciones de cultivo pero en ausencia de Zimoliasa. Los resultados demuestran que la CMI frente a nourseotricina de la estirpe CECT 12033 se incrementa aproximadamente 16 veces en presencia de este compuesto.

Ejemplo 4

Tratamiento de la estirpe CECT 12033 con Peróxido de Hidrógeno

Con este ejemplo se muestra la especificidad del sistema, ya que en presencia de un agente químico cuyo mecanismo de acción sobre la célula fúngica no afecta a la pared celular, como es el peróxido de hidrógeno, no hay efecto alguno sobre la CMI dado que la capacidad de crecimiento de la estirpe CECT 12033 es la misma en presencia o ausencia de esta sustancia (Figura 3). En la Figura 3 se representa en el eje de ordenadas la densidad óptica alcanzada por el cultivo presente en cada pocillo de la placa multipocillo medida a una longitud de onda de 655 nm. En el eje de

abscisas se indica de forma creciente la concentración de nourseotricina presente en cada pocillo en microgramos por mililitro. Los cuadrados corresponden a la estirpe CECT 12033 creciendo en medio YEDP en presencia de peróxido de hidrógeno (Panreac) a una concentración final de 0,5 mM. Los asteriscos corresponden a los datos de crecimiento de la misma estirpe en ausencia de peróxido de hidrógeno.

En síntesis, como se puede observar en los ejemplos 3 y 4, la estirpe CECT 12033 es capaz de crecer en presencia de concentraciones superiores de nourseotricina cuando se añaden al medio sustancias que alteran la pared celular, un efecto que no se aprecia cuando la sustancia ensayada no presenta esta actividad específica de alteración de dicha pared que rodea a la célula fúngíca.

Ejemplo 5

Rastreo de sustancias antifúngicas

-- Preparación del cultivo de *S. cerevisiae* CECT 12033:

a) Inicialmente se procedió a cultivar la estirpe CECT 12033 en medio líquido YEPD, en agitación a 24ºC durante 16-18 horas.

b) Posteriormente, con el fin de conseguir células en fase exponencial de crecimiento, se procedió a diluir el cultivo anterior en medio fresco a una densidad óptica de 0,2-0,4, medida a 600 nm en un espectrofotómetro, para proseguir con el cultivo incubando durante 2 horas en las condiciones anteriormente descritas.

c) Finalmente se preparó una suspensión celular, en agua destilada estéril, a una densidad óptica de 600 nm de 0,13, que equivale a una concentración de $2x10^6$ células/ml.

-- Ensayo de resistencia en placa multipocillo: Para determinar el efecto de la Zimoliasa sobre la pared celular se procedió a realizar dicha determinación en placas multipocillo formato 96 (NUNCLON™). Este formato, por tanto, permitiria el ensayo de 96 sustancias diferentes de forma simultánea. En el ejemplo concreto que se describe se utilizó 100 μl de medio de cultivo YEPD en el pocillo, incluyendo 5U por mililitro de Zimoliasa 20T, además de una concentración de nourseotricina (6,25 microgramos por mililitro), previamente observada como inhibidora del crecimiento de la estirpe CECT 12033 (CMI) creciendo en YEPD. Por último, se inocularon en el volumen de medio anteriormente citado aproximadamente 10000 células (5 μl de la suspensión final citada en el punto anterior).

-- Lectura de resultados: después de 28 horas de incubación en estufa a 30ºC, sin agitación, se procedió a la cuantificación del crecimiento mediante lectura de la absorbancia (λ = 655 nm) en lector de placas (Model 680, BioRad). Se pudo observar que la estirpe CECT 12033 creciendo en presencia de Zimoliasa presentaba un crecimiento significativo a 6,25 microgramos por mililitro de nourseotricina (es decir un incremento de la CMI en estas condiciones), indicando por tanto la actividad de dicha sustancia a nivel de la integridad de la pared celular.

REIVINDICACIONES

1. Estirpe de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la detección de sustancias antifúngicas con actividad directa o indirecta sobre la pared celular **caracterizada** porque el gen YKL161C está reemplazado por un gen marcador que queda bajo el control del promotor del gen YKL161C que ha sido sustituido.

2. Estirpe de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la detección de sustancias antifúngicas, según la reivindicación 1, **caracterizada** porque el gen marcador que reemplaza al gen YKL161C confiere resistencia a un antibiótico.

3. Estirpe de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la detección de sustancias antifúngicas, según la reivindicación 2, **caracterizada** porque el gen marcador confiere resistencia al antibiótico nourseotricina.

4. Estirpe de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la detección de sustancias antifúngicas, según cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, **caracterizada** porque, en medios de cultivo que incluyen el antibiótico marcador, aumenta su capacidad de crecimiento en presencia de agentes que perturban la estabilidad de la pared celular de la levadura incluyendo los agentes que alteran la estructura de la pared, los que degradan sus componentes y/o los que inhiben la síntesis de alguno de dichos componentes.

5. Estirpe de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la detección de sustancias antifúngicas, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque expresa de forma constitutiva un gen que permite la diferenciación entre la estirpe modificada genéticamente y la estirpe silvestre de la que deriva.

6. Estirpe de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la detección de sustancias antifúngicas, según reivindicación 5, **caracterizada** porque el gen cuya expresión constitutiva permite la diferenciación entre la estirpe modificada genéticamente y la estirpe silvestre de la que deriva es el gen HISS de *Schizosaccharomyces pombe*.

7. Cultivo biológicamente puro de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* CECT 12033.

8. Vector plasmídico para la detección de sustancias antifúngicas con actividad directa o indirecta sobre la pared celular **caracterizado** porque contiene un gen marcador de resistencia a un antibiótico bajo el control del promotor del gen YKL161C de *Saccharomyces cerevisiae*, y el gen HIS5 de *Schizosaccharomyces pombe* situado a continuación del gen marcador.

9. Vector plasmídico para la detección de sustancias antifúngicas con actividad directa o indirecta sobre la pared celular, según la reivindicación 8, **caracterizado** porque el gen marcador que contiene confiere resistencia al antibiótico nourseotricina.

10. Método para la detección de sustancias antifúngicas con actividad directa o indirecta sobre la pared celular que comprende:

a. una estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* donde el gen YKL161C está reemplazado por un gen marcador que queda bajo el control del promotor del gen YKL161C que ha sido sustituido;

b. la incubación de la estirpe en presencia de concentraciones subletales de una sustancia con potencial para afectar a la pared celular de la levadura;

c. la medición de la expresión del gen marcador.

11. Método para la detección de sustancias antifúngicas, según la reivindicación 10, que incluye en el paso b. la presencia del sustrato del gen marcador.

12. Método para la detección de sustancias antifúngicas, según la reivindicación 11, que incluye en el paso b. concentraciones del antibiótico marcador superiores a la concentración mínima inhibitoria.

13. Método para la detección de sustancias antifúngicas, según la reivindicación 12, donde el antibiótico marcador es la nourseotricina.

14. Método según la reivindicación 13 donde la estirpe utilizada es *Saccharomyces cerevisiae* CECT 12033.

Fig. 1

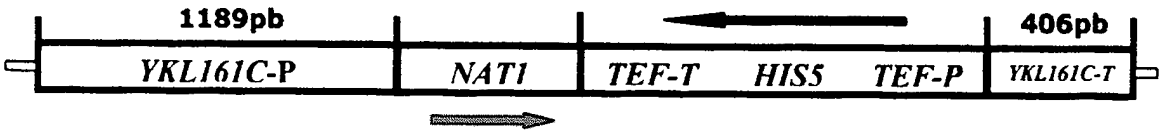
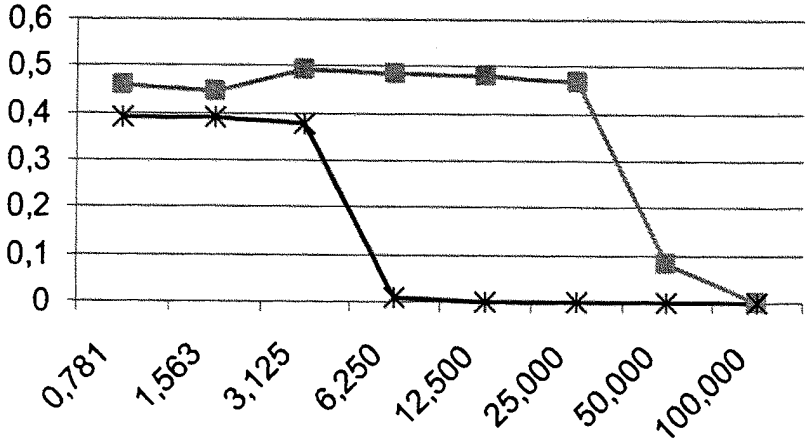

1189pb
406pb
YKL161C-P
NAT1
TEF-T
HIS5
TEF-P
YKL161C-T

Fig. 2


0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0,781
1,563
3,125
6,250
12,500
25,000
50,000
100,000

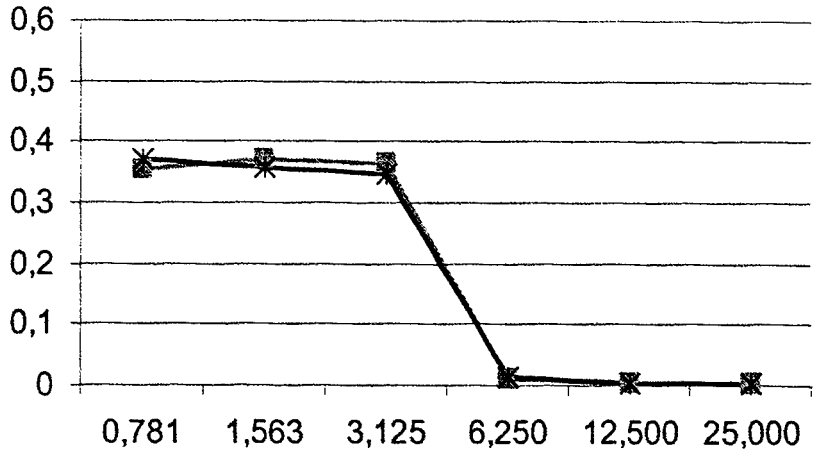


Fig.3

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 303 452

(21) Nº de solicitud: 200602761

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **30.10.2006**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** ***C12Q 1/18*** (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2004057033 A1 (ROSETTA INPHARMATICS LLC) 08.07.2004, página 7, líneas 15-32.	1,7,10,11
Y		2-6,8,9, 12-14
Y	EP 0972847 A2 (HOECHST MARION ROUSSEL) 19.01.2000, página 3, líneas 1-5.	2-4,12-14
Y	WACH, A. et al. Heterologous HIS3 Marker and GFP Reporter Modules for PCR - Targeting in Saccharomyces cerevisiae. Yeast. 1997, Vol. 13, página 1066.	5,6,8,9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
30.06.2008	I.Rueda Molins	1/1