

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 434 116**

(51) Int. Cl.:  
**G01N 33/569** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2008 E 08707698 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 2240777**

---

(54) Título: **Una nueva y eficaz diana farmacológica para el tratamiento de la tuberculosis**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.12.2013**

(73) Titular/es:

**SENTINEL CH S.P.A. (100.0%)**  
Via Robert Koch, 2  
20152 Milano, IT

(72) Inventor/es:

**RICCARDI, GIOVANNA;**  
**MANINA, GIULIA y**  
**PASCA, MARIA ROSALIA**

(74) Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 434 116 T3

---

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Una nueva y eficaz diana farmacológica para el tratamiento de la tuberculosis.

5 **Campo de la invención**

La presente invención permite un método de cribado para la identificación de nuevos fármacos para el tratamiento de la tuberculosis, así como un método de diagnóstico para identificar cepas clínicas resistentes a estos nuevos fármacos.

10 **Técnica anterior**

La tuberculosis (TB) sigue siendo la principal causa de mortalidad debida a un solo agente infeccioso, *Mycobacterium tuberculosis*. Este patógeno ha infectado latentemente a un tercio de la población mundial.

15 Actualmente, la quimioterapia para la TB se compone de un cóctel de fármacos de primera y segunda línea. El tratamiento actual de la TB requiere de seis a nueve meses, lo que conlleva una toxicidad significativa, así como resistencia a los fármacos. Desde el momento de la introducción de los fármacos contra la TB, se han encontrado frecuentemente cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los mismos. De hecho, las micobacterias presentan resistencia natural frente a la mayoría de los antibióticos de uso común, debido a su poco corriente pared celular.

20 Además, se consideran cambios genéticos responsables de la resistencia adquirida a los fármacos. Las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a un número creciente de fármacos de segunda línea usados para el tratamiento de la tuberculosis resistente a múltiples fármacos (MDR-TB) se están convirtiendo en una amenaza para la salud pública mundial (1). En consecuencia, existe una necesidad urgente de nuevos fármacos para el tratamiento de la tuberculosis.

25 En particular, se necesitan nuevos fármacos con nuevos mecanismos de acción que sean activos contra cepas resistentes a los fármacos. Por consiguiente, también existe una necesidad acuciante de identificar nuevas dianas farmacológicas (2). El documento WO 2007/134625 desvela derivados de benzotiazina y su uso como agentes antibacterianos en enfermedades infecciosas causadas por bacterias, especialmente tuberculosis (TB) y lepra, causadas por micobacterias.

30 Brennan, Patrick J. y col. desvelan el núcleo de la pared celular de *M. tuberculosis* en el contexto del descubrimiento de fármacos, así como la ruta de biosíntesis del arabinogalactano micobacteriano.

El documento US 2002/151008 A1 describe un método de cribado para la identificación de fármacos contra *M. tuberculosis* que implica el uso del gen *iniB* como diana para el cribado.

35 El documento WO 01/35317 desvela una proteína idéntica a Rv3790 como potencial diana farmacológica en *M. tuberculosis*.

40 El documento US 2003/013090 A1 desvela un método de cribado para identificar si un paciente es portador de una cepa de *M. tuberculosis* resistente a etionamida mediante la determinación de la presencia de una mutación en el gen *etaA*.

45 Seidel Mathias y col. describen una nueva arabinofuranosil-transferasa AftB implicada en una etapa terminal de la biosíntesis del arabinano de la pared celular en *M. tuberculosis*.

45 Alderwick, Luke J. y col., desvelan la transferasa AftA que también podría representar una diana farmacológica atractiva.

50 **Sumario de la invención**

50 La presente invención se basa en el descubrimiento de que la proteína Rv3790 de *Mycobacterium tuberculosis*, cuya secuencia de ADN puede obtenerse en <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList> (TubercuList WorldWide Web Server, coordenadas del gen de Rv3790: de 4162306 a 4163718), es la diana para fármacos de benzotiazinona, una nueva clase de moléculas que parecen ser muy prometedoras en el tratamiento de la tuberculosis ("New thiazinone derivatives, their preparations and their use as antibacterials", solicitud de patente n° PCT/EP 2006/004942, a nombre del Instituto Leibniz para la Investigación de Productos Naturales y la Biología de la Infección, e. V., Instituto Hans Knöll (HKI)).

60 Se ha demostrado que las proteínas Rv3790 y Rv3791 trabajan concertadamente y están implicadas en la biosíntesis de arabinogalactano (3). El arabinogalactano es un componente fundamental de la pared celular micobacteriana que une covalentemente la capa exterior de ácidos micólicos al peptidoglucano. En particular, ambas proteínas Rv3790 y Rv3791 son importantes para llevar a cabo la transformación de decaprenil-P-ribosa en decaprenil-P-arabinosa (3). El descubrimiento sugiere que los fármacos de benzotiazinona interfieren con la biosíntesis de la pared celular micobacteriana. Es de señalar que ambos genes *rv3790* y *rv3791* han sido descritos como esenciales por mutagénesis con el transposón *Himar-1* en la cepa H37Rv (4).

Hemos encontrado que mutaciones en el extremo C de la proteína Rv3790, así como su expresión en exceso confieren un alto grado de resistencia a fármacos derivados de benzotiazinona en *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG y *Mycobacterium smegmatis*. Los genes *rv3790* naturales y mutados, así como *rv3791* han sido clonados y expresados en exceso en *Escherichia coli*.

5 Se han encontrado proteínas ortólogas de Rv3790 sensibles a los derivados de benzotiazinona en los géneros siguientes: *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium*.

10 Puede formularse la hipótesis de que los excelentes resultados obtenidos en la evaluación de laboratorio con los derivados de benzotiazinona se correlacionan con la acción inhibitoria de Rv3790 que se ha descubierto. Esta evidencia puede poner en marcha nuevas investigaciones sobre fármacos que actúen contra la proteína Rv3790. Por lo tanto, la proteína Rv3790 y proteínas homólogas relacionadas y especialmente ortólogas no solo son dianas óptimas para fármacos pertenecientes a la clase de las benzotiazinonas, sino también prometedoras dianas para el descubrimiento de nuevos fármacos para utilizar en la lucha contra infecciones causadas por *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium*.

15 Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un método para el cribado de fármacos candidatos para el tratamiento de la tuberculosis por interferencia con la biosíntesis de arabinogalactano, en que dicho método comprende una etapa de puesta en contacto de un cultivo celular de *Mycobacterium tuberculosis* que expresa en exceso una proteína que lleva a cabo la transformación de decaprenil-P-ribosa en decaprenil-P-arabinosa y que está codificada por el gen *rv3790* u homólogos del mismo o cualquier marco de lectura abierto artificial cuyo producto génico sea idéntico u homólogo a la proteína Rv3790 con un fármaco candidato y la posterior evaluación del porcentaje de inhibición causado por el fármaco candidato frente a un control (*M. tuberculosis* transformado solo con el vector pSODIT-2) en una prueba de ensayo.

20 25 Preferentemente, la prueba de ensayo es una prueba de ensayo *in vitro* de la actividad antibacteriana o una prueba enzimática.

30 35 Otro objeto de la presente invención es una preparación de un cultivo celular de cepas mutantes de *Mycobacterium tuberculosis* con el aminoácido cisteína de la posición 387 sustituido por una serina o una glicina para uso como herramienta de control en el método de la presente invención.

40 45 El descubrimiento de que proteínas del tipo de Rv3790 codificadas por genes mutados son responsables de la resistencia a los fármacos que interfieren con la biosíntesis de arabinogalactano, como los fármacos de benzotiazinona, tendrá importantes implicaciones en el diagnóstico y el tratamiento de cepas micobacterianas resistentes a los fármacos.

50 55 Por lo tanto, otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de diagnóstico rápido de cepas micobacterianas resistentes a los fármacos que implica la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (5) de una región interna que solapa con el codón 387 del gen *rv3790* de una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* aislada de un paciente de TB y el análisis de la secuencia de ADN para detectar la presencia de las mutaciones identificadas como responsables de la resistencia a los fármacos que interfieren con la biosíntesis de arabinogalactano, como las benzotiazinonas.

60 65 En el contexto de la presente invención, el término "fármaco que interfiere con la biosíntesis de arabinogalactano" indica una molécula que impide la transformación de decaprenil-P-ribosa en decaprenil-P-arabinosa al bloquear o silenciar una proteína que lleva a cabo la transformación de decaprenil-P-ribosa en decaprenil-P-arabinosa y que está codificada por el gen *rv3790* u homólogos del mismo o por cualquier marco de lectura abierto artificial cuyo producto génico es idéntico u homólogo a la proteína Rv3790.

Otro objeto de la presente invención son inhibidores de la proteína Rv3790 obtenidos por el método de cribado de la invención según las reivindicaciones 18 a 20.

70 75 El uso de SEQ ID NO. 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la tuberculosis según la reivindicación 22 es otro objeto de la invención.

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un análisis de alineamiento múltiple con proteínas ortólogas de Rv3790 de varios géneros pertenecientes a las actinobacterias. La figura 2 muestra la secuencia de ADN del gen *rv3790*.

#### Descripción detallada de la invención

Un primer objeto de la presente invención es un método para el cribado de fármacos candidatos para el tratamiento de la tuberculosis por interferencia con la biosíntesis de arabinogalactano, en que dicho método comprende una etapa de puesta en contacto de cultivos celulares de *Mycobacterium tuberculosis* (transformados con pSODIT-

2/Rv3790) que expresan en exceso una proteína que lleva a cabo la transformación de decaprenil-P-ribosa en decaprenil-P-arabinosa y que está codificada por el gen *rv3790* u homólogos del mismo o por cualquier marco de lectura abierto artificial cuyo producto génico es idéntico u homólogo a la proteína Rv3790 con un fármaco candidato y la posterior evaluación del porcentaje de inhibición causado por el fármaco candidato frente a un control en una prueba de ensayo.

5 Preferentemente, dicha prueba de ensayo es una prueba *in vitro* de la actividad antibacteriana o una prueba enzimática.

10 En la prueba antibacteriana, la evaluación del porcentaje de inhibición se efectúa preferentemente mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM). La CIM se define como la concentración mínima de un agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de una incubación adecuada.

15 Todos los fármacos candidatos se prueban también en un cultivo celular de *M. tuberculosis* transformado solo con el vector pSODIT-2.

Como control, puede usarse isoniazida, que es el fármaco de referencia en el tratamiento de la tuberculosis.

20 Alternativa o adicionalmente, puede llevarse a cabo un experimento de control diferente, en el que no se efectúa ningún tratamiento con un fármaco candidato, de modo que se tiene una inhibición del 0%. Se evalúa el % de inhibición obtenido con el fármaco candidato con respecto a dicho control.

25 Dicha etapa de puesta en contacto de un cultivo celular de *Mycobacterium tuberculosis* con un fármaco candidato puede llevarse a cabo poniendo la preparación de células en una o más disoluciones del fármaco candidato con diferentes concentraciones del fármaco en un medio adecuado.

30 El fármaco candidato se prueba normalmente en una forma adecuada que permita un buen contacto entre la sustancia y el cultivo celular. Preferentemente, el fármaco candidato se utiliza en disolución o en suspensión. El fármaco candidato se usa en cantidades o concentraciones que dependen de varios factores, entre otros, el peso molecular de la sustancia, su solubilidad y demás.

35 Preferentemente, se usan dos o más concentraciones de los fármacos, con el fin de calcular la CIM (concentración inhibitoria mínima) para cada candidato.

40 Preferentemente, el medio adecuado es el medio sólido Middlebrook 7H11 (proveedor Difco). Con mayor preferencia, este medio se suministra con ácido oleico, albúmina de suero bovino, dextrosa y catalasa (OADC). Este medio es típico para las cepas micobacterianas.

45 La preparación de la proteína Rv3790 recombinante en las formas naturales y mutantes de células de *Escherichia coli* para el ensayo de la actividad enzimática se realiza de acuerdo con el método descrito en la referencia (3). La prueba de cribado enzimático de la invención puede llevarse a cabo con la enzima Rv3790 recombinante en una mezcla de reacción que contiene FAD, NAD<sup>+</sup>, NADPH y decaprenilfosforilribosa (DPR) radiomarcada que, por medio de la reacción enzimática se transforma en decaprenilfosforil-D-Araf (DPA). Este es el experimento de control. Se lleva a cabo otro experimento en el que se repite el procedimiento en presencia del fármaco candidato. La cantidad de la DPA así formada se detecta y se calcula el % de inhibición de la reacción enzimática causado por el fármaco candidato. La formación de DPA se monitoriza de acuerdo con procedimientos estándar bien conocidos por el experto en la técnica, como los descritos en la referencia (3).

50 Las aplicaciones de la invención incluyen que el método de cribado de la invención puede usarse para una evaluación *in vivo* de la actividad de los fármacos candidatos que pasan la etapa de cribado *in vitro*. Esta evaluación *in vivo* puede realizarse según se describe a continuación, en particular, mediante la administración de regímenes de dosificación preseleccionados del fármaco candidato a ratones con diseminación hemática de una cepa de tuberculosis, en comparación con un fármaco de control y con un placebo.

55 El fármaco de control es preferentemente isoniazida.

Preferentemente se usa la línea BALB/c de ratones.

60 Preferentemente, la cepa de tuberculosis es un cultivo virulento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, con mayor preferencia a una dosis de  $5 \times 10^6$  UFC (unidades formadoras de colonias) en tampón salino.

65 La dosis del fármaco candidato para el cribado puede variar en un amplio intervalo de dosis dependiendo de varios factores, como la CIM calculada a partir de los resultados de la prueba *in vitro* anterior o la DL<sub>50</sub> que puede determinarse para dicho compuesto. Generalmente, la dosis del fármaco candidato usada en dicho método de cribado *in vivo* será inferior a su DL<sub>50</sub>.

Preferentemente, los fármacos se introducen por vía oral como suspensión en un tampón adecuado.

Preferentemente, el tratamiento se administra diariamente, seis veces por semana.

5 Para determinar la eficacia de cada régimen de tratamiento, se registran los cambios macroscópicos en los órganos parenquimatosos del ratón, el crecimiento de micobacterias procedentes de material patológico en medio sólido, así como un índice bacterioscópico del daño orgánico. También se lleva a cabo un análisis cualitativo y cuantitativo de los cambios macroscópicos en el hígado, el bazo y los pulmones y se calcula un índice de daño (mediante una escala de cuatro puntos).

10 Como otro objeto más de la presente invención se proporciona también un método de diagnóstico de cepas micobacterianas resistentes a los fármacos. El método de diagnóstico implica la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (5) del gen *rv3790* de una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* aislada de un paciente de TB y el análisis de la secuencia de ADN para detectar la presencia de las mutaciones identificadas.

15 Preferentemente, el método comprende la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (5) de una región interna que solapa con el codón 387 del gen *rv3790* de una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* aislada de un paciente de TB y el análisis de la secuencia de ADN para detectar la presencia de las mutaciones identificadas (cisteína sustituida por glicina o cisteína sustituida por serina) como responsables de la resistencia a los fármacos que interfieren con la biosíntesis de arabinogalactano, como las benzotiazinonas.

20 Otro objeto de la presente invención son inhibidores de la proteína Rv3790 que pueden obtenerse por el método de cribado de la invención de acuerdo con las reivindicaciones 18 a 20.

25 Fármacos que interfieren con la biosíntesis de arabinogalactano

Los fármacos que pueden obtenerse por medio del método de cribado de la invención se seleccionan preferentemente entre anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína Rv3790 y secuencias no codificantes de ARNm del gen *rv3790*, en que dichos fármacos muestran un % de inhibición superior al 50% en la prueba de cribado *in vitro* y/o un % de inhibición superior al 50% en la prueba antibacteriana *in vivo* de la invención.

30 En la presente invención, dichos fármacos son anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína Rv3790. Tales anticuerpos pueden obtenerse de acuerdo con procedimientos convencionales descritos asimismo en la bibliografía (6, 7).

35 En otra realización de la presente invención, dichos fármacos son secuencias no codificantes del gen *rv3790*.

40 La presente invención, proporciona oligómeros no codificantes con una secuencia eficaz para inhibir o bloquear la expresión del gen o la secuencia de ARNm que codifican Rv3790. De acuerdo con la reivindicación 20, la secuencia para preparar las secuencias oligoméricas no codificantes de *rv3790* es una secuencia de 25-mer de la secuencia de ARNm de *rv3790*: AUG UUG AGC GUG GGA GCU ACC ACU A. La secuencia completa del gen *rv3790* está depositada en <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>, con el nombre de gen *rv3790*. La secuencia de ADN completa de *rv3790* se expone en la figura 2. Tales secuencias codificantes preferidas se usan para la construcción de agentes oligonucleotídicos no codificantes (y los controles adecuados) para una comparación *in vitro* como inhibidores de la proteína Rv3790. Estos datos *in vitro* son predictivos de la utilidad clínica en humanos del uso de agentes no codificantes de un diseño comparable.

Método de tratamiento

50 Un método de tratamiento de un paciente que padece tuberculosis puede incluir la administración a dicho paciente de una cantidad con eficacia antibacteriana de un fármaco que interfiere con la biosíntesis de arabinogalactano mediante el bloqueo o el silenciamiento de una proteína que lleva a cabo la transformación de decaprenil-P-ribosa en decaprenil-P-arabinosa.

55 Preferentemente, dicho fármaco es una molécula de benzotiazinona o anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína Rv3790 o secuencias no codificantes de ARNm del gen *rv3790*.

60 El método de tratamiento puede incluir además la administración de un fármaco antibacteriano contra *Mycobacterium tuberculosis* con un mecanismo de acción diferente, como isoniazida.

65 La dosis que se administra de dicho fármaco que interfiere con la síntesis de arabinogalactano puede variar en un amplio intervalo de dosis, dependiendo de la actividad del inhibidor, la gravedad de la enfermedad, las condiciones del paciente, su peso y edad, así como la vía de administración, según determinará el médico.

65 Generalmente, el fármaco puede usarse en dosis en el intervalo de 0,001 mg a 50 mg por kg de peso corporal, de una a cuatro veces al día.

El uso de SEQ ID NO. 1, que interfiere con la biosíntesis de arabinogalactano según se describe anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la tuberculosis también se reivindica según se expone en la reivindicación 22.

5

## Parte experimental

### Determinación de la actividad inhibitoria mínima (CIM) *in vitro* de un fármaco candidato contra micobacteria

10 Una colonia individual de una cepa de *M. tuberculosis* se usa para inocular el medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC al 10% y Tween 80 (Difco) al 0,05%. Este medio es típico para cepas micobacterianas.

El cultivo se incuba a 37°C hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial ( $DO_{600\text{ nm}} = 1 \rightarrow \sim 10^8 \text{ UFC/ml}$ ). Se preparan diluciones de dicho cultivo y se usan para sembrar en placa  $\sim 10^5 \text{ UFC}$ .

15

### EVALUACIONES DE LA CIM EN MEDIO SÓLIDO

Se preparan placas de medio Middlebrook 7H11 (Difco) con OADC al 10% mediante la adición de cantidades crecientes de los fármacos. Preferentemente, se usan varias concentraciones de los fármacos con el fin de calcular la CIM para cada candidato. Se siembran diluciones de los cultivos en placas de medio y estas se incuban a 37°C durante 21 días. La inhibición del crecimiento se evalúa visualmente.

### Determinación de la actividad inhibitoria *in vivo* de un fármaco candidato contra *Mycobacterium tuberculosis* en el modelo de TB murino

25

Para determinar la eficacia quimioterapéutica, puede usarse la línea BALB/c de ratones con tuberculosis experimental de diseminación hemática.

30 Los ratones se infectan con un cultivo virulento de dos semanas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv por inyección intravenosa (en la vena de la cola) de la suspensión micobacteriana a una dosis de  $5 \times 10^6 \text{ UFC}$  (unidades formadoras de colonias) en 0,5 ml de disolución salina. Todos los animales experimentales se dividen en grupos en función del régimen de tratamiento usado.

35 El tratamiento se inicia el día siguiente después de la infección. Los fármacos se introducen por vía oral como suspensión en carboximetilcelulosa/agua con una pequeña cantidad de PEG-400. La quimioterapia se administra diariamente, seis veces por semana.

40 Después, los animales se sacrifican. Para determinar la eficacia de cada régimen de tratamiento, se registran los cambios macroscópicos en los órganos parenquimatosos del ratón, el crecimiento de micobacterias procedentes de material patológico en medio sólido, así como un índice bacterioscópico del daño orgánico. También se lleva a cabo un análisis cualitativo y cuantitativo de los cambios macroscópicos en el hígado, el bazo y los pulmones y se calcula un índice de daño (mediante una escala de cuatro puntos).

45 La evaluación macroscópica de la eficacia de cada régimen de tratamiento se expresa en el índice de eficacia, calculado mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Índice de eficacia} = 100\% - \text{Índice de daño del grupo estudiado} / \text{Índice de daño del grupo de control} \times 100$$

50 El examen microbiológico incluye un cultivo para la determinación de las UFC en los órganos parenquimatosos. Para este fin, se homogeneizan el pulmón derecho y el bazo separadamente con ácido sulfúrico al 6%, se centrifugan y se lavan con agua y disolución salina. El producto (aproximadamente 0,5 ml) se diluye con 1,0 ml de disolución salina y se homogeneiza. Esta suspensión (0,5 ml) de los órganos de prueba se diluye 100 y 1.000 veces y se distribuye en medio sólido Finn-2. Los cultivos se incuban a 37°C durante un mes y se observan semanalmente, a partir del día 10. Después de 28 días se cuentan las UFC.

55

### Preparación de Rv3790 recombinante

60 Con el fin de obtener la expresión de la proteína en *E. coli*, se probaron varias condiciones de crecimiento, con o sin isopropil-β-tiogalactósido (IPTG) como inductor, a concentraciones en el intervalo de 0,125 mM a 1 mM. Todos los cultivos se incubaron a 37°C durante dos horas, a 27°C durante dos y cuatro horas y a 20°C durante dos y 20 horas. Las células se recogieron por centrifugación y los extractos de proteína derivados se analizaron por SDS-PAGE. Las proteínas recombinantes se purificaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen).

### Determinación de Rv3790 como diana para benzotiazinonas

65

Con el fin de identificar la diana molecular para las benzotiazinonas, se siguieron dos estrategias científicas/técnicas

diferentes:

a) la transformación de un banco de cósmidos de *Mycobacterium smegmatis* en *M. smegmatis* y la selección de resistencia a benzotiazinonas;

5 b) mutagénesis convencional: búsqueda de mutaciones espontáneas mediante la siembra en placa de cultivos micobacterianos en medios con benzotiazinonas.

10 La concentración inhibitoria mínima (CIM) de diferentes benzotiazinonas para *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* H37Rv se determinó, según se describe anteriormente, en medio Middlebrook 7H11 como medio sólido, enriquecido con ácido oleico, albúmina de suero bovino, dextrosa y catalasa (OADC).

15 La atención se centró en la benzotiazinona más activa: 10526038. La determinación de la CIM se llevó a cabo también para isoniazida como compuesto de control. Los valores de CIM de 10526038 e isoniazida se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. CIM de 10526038 e isoniazida para diferentes especies micobacterianas.

Cepas	Valores de CIM	
	10526038 [ng/ml]	Isoniazida [μg/ml]
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	4	16
<i>M. bovis</i> BCG	2	0,05
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	0,75	0,05

*Estrategia a)*

20 Se construyó un banco genómico de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 con el cósmido vector pYUB18 y se transformó en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155; los clones recombinantes se seleccionaron por siembra en placas con diferentes concentraciones de benzotiazinonas (en el intervalo de 16 ng/ml a 64 ng/ml). Se seleccionaron dos cósmidos responsables de la resistencia a las benzotiazinonas (8x CIM), que se secuenciaron parcialmente y se compararon con la secuencia genómica de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 ([www.tiger.org](http://www.tiger.org)). Estos cósmidos mostraron un inserto solapante de 22 kb. Mediante experimentos de subclonación de la región genómica común, se identificó un gen responsable de la resistencia a 10526038. Este gen de 1.383 pb codifica una hipotética oxidoreductasa (MSMEG\_6382) de gran homología con Rv3790 de *M. tuberculosis* (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>). Se ha demostrado que las proteínas Rv3790 y Rv3791 trabajan concertadamente y que están implicadas en la biosíntesis de arabinogalactano, un componente fundamental de la pared celular micobacteriana. Ambas proteínas son importantes para llevar a cabo la transformación de decaprenil-P-ribosa en decaprenil-P-arabinosa (3).

25 30 35 Es de señalar que los dos genes *rv3790* y *rv3791* han sido descritos como esenciales para la vida de *M. tuberculosis* por mutagénesis con el transposón Himar-1 en la cepa H37Rv (4). El gen *rv3790* se clonó en el vector de expresión pSODIT-2 y se transformó en las especies siguientes: *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis*. Según se muestra en la tabla 2, la expresión en exceso de Rv3790 confiere un alto nivel de resistencia a 10526038 en las tres especies micobacterianas.

Tabla 2. CIM de 10526038 para diferentes especies micobacterianas que expresan Rv3790 en exceso.

Plásmido	CIM de 10526038 (nivel de resistencia)		
	<i>M. smegmatis</i> [ng/ml]	<i>M. bovis</i> BCG [ng/ml]	<i>M. tuberculosis</i> [ng/ml]
pSODIT-2	4	2	0,75
Rv3790/pSODIT-2	256 (32x CIM)	32 (8x CIM)	500 (333x CIM)

40 *Estrategia b)*

Se aislaron mutantes resistentes espontáneos, respectivamente, en *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis*.

45 Resultados obtenidos en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155

Con el fin de identificar la diana celular para las benzotiazinonas, se aislaron mutantes de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 resistentes a la benzotiazinona 10526038 por mutación convencional espontánea mediante la siembra en placa de ~10<sup>10</sup> células en medio sólido que contenía diferentes concentraciones del compuesto, en el intervalo de 10 a 30 veces la CIM para la cepa natural. Se aislaron mutantes resistentes con una frecuencia en el intervalo de 10<sup>-7</sup> a 10<sup>-9</sup>. Los resultados de esta selección se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Mutantes espontáneos de *M. smegmatis* resistentes a 10526038.

Mutantes de <i>M. smegmatis</i>	Concentración de 10526038 usada para el aislamiento	Frecuencia de aislamiento	Nivel de resistencia
MN47, 48	30x CIM	$5 \cdot 10^{-9}$	500x CIM
MN81, 84	30x CIM	$5 \cdot 10^{-9}$	$\geq 4.000$ x CIM

El gen MSMEG\_6382 y una región anterior de 200 pb se secuenciaron en los cuatro mutantes de *M. smegmatis* (MN47, MN48 y MN81, MN84 con un nivel diferente de resistencia a 10526038 (500/>4.000x CIM). Esta región nucleotídica se comparó con la secuencia natural ([www.tiger.org](http://www.tiger.org)). En las secuencias nucleotídicas de las cepas resistentes de *M. smegmatis* se identificaron dos mutaciones puntuales. Las dos mutaciones se localizan en el mismo codón, pero en diferentes nucleótidos, de acuerdo con el distinto nivel de resistencia, según se muestra en la tabla 4.

5 El gen MSMEG\_6382 y una región anterior de 200 pb se secuenciaron en los cuatro mutantes de *M. smegmatis* (MN47, MN48 y MN81, MN84 con un nivel diferente de resistencia a 10526038 (500/>4.000x CIM). Esta región nucleotídica se comparó con la secuencia natural ([www.tiger.org](http://www.tiger.org)). En las secuencias nucleotídicas de las cepas resistentes de *M. smegmatis* se identificaron dos mutaciones puntuales. Las dos mutaciones se localizan en el mismo codón, pero en diferentes nucleótidos, de acuerdo con el distinto nivel de resistencia, según se muestra en la tabla 4.

10 Tabla 4. Mutaciones identificadas en cepas resistentes de *M. smegmatis*. Se subraya el nucleótido mutado.

Cepas de <i>M. smegmatis</i>	CIM (nivel de resistencia)	Codón	Aminoácido (394)
Natural	4 ng/ml	tgc	Cisteína
Mutantes MN47, MN48	4 $\mu$ g/ml (500x CIM)	ggc	Glicina
Mutantes MN81, MN84	>16 $\mu$ g/ml ( $\geq 4.000$ x CIM)	tcc	Serina

#### Resultados obtenidos en *M. bovis* BCG Pasteur

15 Con el fin de identificar la diana celular para las benzotiazinonas, se aislaron mutantes de *M. bovis* BCG de gran resistencia mediante la siembra en placa de  $\sim 10^{10}$  células en medio sólido que contenía diferentes concentraciones de 10526038, en el intervalo de 5 a 40 veces la CIM para la cepa natural. Se obtuvieron mutantes resistentes con una frecuencia de  $10^{-8}$ . El resultado de esta selección se muestra en la tabla 5.

20 Tabla 5. Mutantes espontáneos de *M. bovis* resistentes a 10526038.

Mutantes de <i>M. bovis</i>	Concentración de 10526038 utilizada para el aislamiento	Frecuencia de aislamiento	Nivel de resistencia
BN1-8	40x CIM	$1,8 \cdot 10^{-8}$	$\geq 8.000$ x CIM

En los ocho mutantes de *M. bovis* se llevó a cabo la secuenciación del gen homólogo de *rv3790*. Se identificó una mutación puntual en el codón mutado correspondiente en *M. smegmatis*. En los ocho mutantes estaba mutado el segundo nucleótido, lo que causa un cambio de la cisteína natural a serina, según se muestra en la tabla 6.

25 Tabla 6. Mutaciones identificadas en cepas resistentes de *M. bovis*. Se subraya el nucleótido mutado.

Cepas de <i>M. bovis</i>	CIM (nivel de resistencia)	Codón	Aminoácido (387)
Natural	2 ng/ml	tgc	Cisteína
Mutantes BN1-8	>16 $\mu$ g/ml ( $\geq 8.000$ x CIM)	tcc	Serina

#### Resultados obtenidos en *M. tuberculosis* H37Rv

30 Con el fin de encontrar la diana para las benzotiazinonas en *M. tuberculosis* (*Mtb*) se aislaron algunos mutantes resistentes espontáneos de *Mtb*. El valor de la CIM de 10526038 para *Mtb* es muy bajo, 1,5 ng/ml (frente a 0,05  $\mu$ g/ml de isoniazida).

35 El aislamiento de los mutantes resistentes se llevó a cabo en el medio 7H11 (típico para micobacterias) con la adición del fármaco 10526038 en diferentes concentraciones. Se usaron cuatro cultivos independientes de *Mtb*, a una  $DO_{600} = 1$ . Se sembraron en placa alícuotas (250  $\mu$ l) de los cuatro cultivos en las siguientes concentraciones del fármaco: 10x CIM, 40x CIM, 70x CIM, 150x CIM y 300x CIM. Se obtuvieron mutantes resistentes espontáneos de *Mtb* para todas las concentraciones del fármaco, con la excepción de 10x CIM. En la tabla 7 se muestran los mutantes aislados, la frecuencia y los valores de la CIM.

40 Tabla 7. Mutantes espontáneos de *Mtb* resistentes a 10526038.

Mutantes de <i>Mtb</i>	Concentración de 10526038 utilizada para el aislamiento	Frecuencia de aislamiento	Nivel de resistencia
------------------------	---	---------------------------	----------------------

NTB1	150x CIM	$6,6 \cdot 10^{-7}$	$\geq 2.000x$ CIM
NTB2	300x CIM	$2 \cdot 10^{-8}$	$\geq 2.000x$ CIM
NTB3	300x CIM	$2 \cdot 10^{-8}$	$\geq 2.000x$ CIM
NTB4	300x CIM	$2 \cdot 10^{-8}$	$\geq 2.000x$ CIM
NTB5	300x CIM	$2 \cdot 10^{-8}$	$\geq 2.000x$ CIM
NTB6	300x CIM	$2 \cdot 10^{-8}$	$\geq 2.000x$ CIM
NTB7	300x CIM	$2 \cdot 10^{-8}$	$\geq 2.000x$ CIM
NTB8	40x CIM	$3,3 \cdot 10^{-7}$	$\geq 2.000x$ CIM
NTB9	70x CIM	$3,3 \cdot 10^{-7}$	166x CIM
NTB10	150x CIM	$6,6 \cdot 10^{-7}$	$\geq 2.000x$ CIM

Es importante subrayar que los mutantes se aislaron solo en altas concentraciones del fármaco y que los mutantes aislados mostraron dos niveles de resistencia. En particular, el mutante NTB9 es menos resistente y crece muy lentamente.

- 5 Para encontrar la mutación responsable de la resistencia, se secuenció el gen *rv3790* en todos los mutantes. Se encontraron dos mutaciones de aminoácido puntuales localizadas en el mismo codón del gen *rv3790* (tabla 8).

Tabla 8. Mutaciones identificadas en el gen *rv3790* de cepas resistentes de *Mtb*. Se subraya el nucleótido mutado.

Cepas de <i>Mtb</i>	Valores de la CIM	Codón	Aminoácido (posición 387)
<i>Mtb</i> natural	1,5 ng/ml	tgc	Cisteína
Mutantes NTB1-8, NTB10	$\geq 2.000x$ CIM	tcc	Serina
Mutante NTB9	166x CIM	ggc	Glicina

10 Los resultados anteriores señalan la proteína Rv3790 como diana para los fármacos de benzotiazinona.

Dado que dos mecanismos comunes de resistencia a antibióticos incluyen la amplificación de la diana o la modificación de la diana, con el primer método se aislaron cepas micobacterianas resistentes a las benzotiazinonas por medio del mecanismo de amplificación, mientras que con el segundo método se aislaron cepas micobacterianas resistentes a las benzotiazinonas a través de mutaciones en un codón específico del gen *rv3790*. Este codón está presente en la porción C-terminal de la proteína Rv3790; una cisteína en la proteína Rv3790 natural cambia a una glicina en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* (véanse los mutantes NTB9, MN47 y MN48) o una serina en *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG y *M. smegmatis* (véanse los mutantes NTB1-8, NTB10, BN1-8 y MN81 y MN84), lo que causa distintos niveles de resistencia. El mayor nivel de resistencia se observó con la sustitución por serina.

Ya que todas las mutaciones están presentes en el mismo codón, la cisteína podría ser el sitio activo para la unión del fármaco.

- 25 Por lo tanto, los mutantes seleccionados *in vitro* sugieren firmemente que los fármacos de benzotiazinona reconocen como diana la proteína Rv3790 y, de este modo, afectan a la síntesis de arabinogalactano.

#### Proteínas ortólogas de Rv3790

- 30 Por medio del programa BLAST ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom\\_table.cgi?organism=microb](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi?organism=microb)) se investigó la presencia de genes ortólogos de *rv3790* en microorganismos relacionados pertenecientes a la familia de los actinomicetos: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium aurum*, *Mycobacterium leprae*, otras especies micobacterianas, *Nocardia* spp., *Rhodococcus* spp. y *Corynebacterium* spp. Dado que la secuencia de ADN de *rv3790* no estaba disponible para algunos microorganismos, como *Mycobacterium aurum*, en nuestro laboratorio se clonó y secuenció el gen correspondiente. La proteína Rv3790 está bien conservada en todos los microorganismos examinados, según demuestra el análisis de alineamiento múltiple con el programa ClustalW ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_clustalw.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html)).

- 40 Es de señalar la conservación de la cisteína crítica en los microorganismos examinados. De hecho, se encontró una gran conservación de la cisteína en estos microorganismos, con la excepción de *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium avium paratuberculosis* y *Mycobacterium aurum*, en que la cisteína se sustituye por alanina y serina, respectivamente (figura 1).

Para verificar si la ausencia de la cisteína confiere resistencia a la benzotiazinona 10526038, se llevaron a cabo evaluaciones de la CIM para los microorganismos siguientes: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium aurum*, *Nocardia*, spp., *Rhodococcus* spp y *Corynebacterium* spp.

5 Para las especies micobacterianas, el experimento se llevó a cabo en el medio 7H11 con diferentes concentraciones del fármaco. Las CIM se determinaron con una dilución del cultivo de 0,5 unidades de McFarland.

10 Para los otros actinomicetos, *Nocardia* spp, *Rhodococcus* spp. y *Corynebacterium* spp., las diluciones de 0,5 unidades de McFarland se sembraron en agar de Mueller-Hinton con sangre y la adición de diferentes concentraciones del fármaco.

15 Según se muestra en la tabla 9, la benzotiazinona 10526038 es más activa contra las especies de actinomicetos. Sólo *M. avium* y *M. aurum* parecen ser naturalmente resistentes a benzotiazinonas; por lo tanto, se confirma nuestra hipótesis de que la cisteína desempeña un papel clave en la sensibilidad a la benzotiazinona 10526038.

Tabla 9. Evaluaciones de la CMI de la benzotiazinona 10526038 para especies de actinomicetos.

Microorganismos	Valor de la CIM de N386
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,75 ng/ml
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	1,5 ng/ml
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	4 ng/ml
<i>Mycobacterium aurum</i> DSM43999	> 50 µg/ml
<i>Mycobacterium aurum</i> DSM43536	> 50 µg/ml
<i>Mycobacterium aurum</i> SB66, aislamiento clínico	> 50 µg/ml
<i>Mycobacterium vaccae</i>	0,75 ng/ml
<i>Mycobacterium avium</i> , aislamiento clínico	> 25 µg/ml
<i>Nocardia</i> spp., aislamiento clínico	12 ng/ml
<i>Rhodococcus</i> spp., aislamiento clínico	6 ng/ml
<i>Corynebacterium</i> spp., aislamiento clínico	entre 200-500 ng/ml

#### Expresión heteróloga de Rv3790

20 Dado que la proteína Rv3790 trabaja concertadamente con Rv3791 (3), se construyeron los clones recombinantes siguientes:

1) La enzima Rv3790 natural se produjo en *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS mediante el vector pET32.

25 2) La enzima Rv3791 natural se produjo en *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS mediante el vector pET15.

3) La enzima Rv3790 mutada (Cys→Gly: de un mutante resistente de *M. tuberculosis*) se produjo en *E. coli* BL21(DE3)pLysS mediante el vector pET32.

30 4) La enzima Rv3790 mutada (Cys→Ser: de un mutante resistente de *M. tuberculosis*) se produjo en *E. coli* BL21(DE3)pLysS mediante el vector pET32.

35 Los genes *rv3790* y *rv3791* de cepas naturales y resistentes (NTB1 y NTB9) de *M. tuberculosis* se amplificaron a partir del genoma de *M. tuberculosis* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se clonaron en diferentes vectores de expresión. Las construcciones recombinantes se transformaron en células de *E. coli* BL21DE3/pLysS por electroporación. Con el fin de obtener la expresión de las proteínas en *E. coli*, se probaron varias condiciones de crecimiento, con o sin isopropil-β-D-1-tiogalactósido (IPTG) como inductor, a concentraciones en el intervalo de 0,125 mM a 1 mM. Todos los cultivos se incubaron a 37°C durante dos horas, a 27°C durante dos y cuatro horas y a 20°C durante dos y 20 horas. Las células se recogieron por centrifugación y los extractos de proteína derivados se analizaron por SDS-PAGE.

#### Referencias

- 45 1. Shah NS, Wright A, Bai GH y col. Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis. *Emerg. Infect. Dis.* 2007, 13: 380-387.

2. Williams KJ, Duncan K. Current strategies for identifying and validating targets for new treatment-shortening drugs for TB. *Curr. Mol. Med.* 2007, 7: 297-307
- 5 3. Mikusova K y col. Decaprenylphosphoryl arabinofuranose, the donor of the D-arabinofuranosyl residues of mycobacterial arabinan, is formed via a two-step epimerization of decaprenylphosphoryl ribose. *J. Bacteriol.* 2005, 187: 8020-8025.
- 10 4. Sassetti CM y col. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100: 12989-12994.
- 15 5. Mullis K y col. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1986, 51: 263-73.
6. Andersen P y col. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J. Immunol.* 1995, 154: 3359-3372.
7. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975, 256: 495-497.

20 **Listado de secuencias**

<110> UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PAVIA  
<120> UNA NUEVA Y EFICAZ DIANA FARMACOLÓGICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS  
<130> E068907-GL  
25 <160> 19  
<170> PatentIn, versión 3.3  
<210> 1  
<211> 25  
<212> ARN  
30 <213> *Mycobacterium tuberculosis*  
<400> 1  
auguugagcg ugggagcuac cacua 25  
<210> 2  
<211> 1.386  
35 <212> ADN  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*  
<400> 2

atgttgagcg tgggagctac cactaccgcc accccggctga ccgggtgggg ccgcacagcg 60  
 ccgtcggtgg cgaatgtgct tcgcacccca gatgccgaga tgatcgtcaa ggcgggtggct 120  
 cgggtcgccg agtcgggggg cggccggggt gctatcgccg gcgggctggg ccgccttat 180  
 ggggacaacg cccaaaacgg cggtggggtt gatcgaca tgacgcccgt gaacactatc 240  
 cactccattg acgcccacac caagctggtc gacatcgacg ccgggtcaa cctcgaccaa 300  
 ctgatgaaag ccgcctgcc gttcgggctg tgggtcccgg tgctgccggg aaccggcag 360  
 gtcaccgtcg gcggggcgat cgcctgcgat atccacggca agaaccatca cagcgctggc 420  
 agcttcggta accacgtgcg cagcatggac ctgctgaccg ccgacggcga gatccgtcat 480  
 ctcactccga ccggcgagga cggcgaactg ttctggcca ccgtcggggg caacggtctc 540  
 accggcatca tcatgcggc caccatcgag atgacgccc cttcgacggc gtacttcatc 600  
 gcccacggcg acgtcaccgc cagcctcgac gagaccatcg ccctgcacag cgacggcagc 660  
 gaagcgcgct acacctattc cagtgcctgg ttgcacgcga tcagcgctcc cccgaagctg 720  
 ggcgcgcgg cggatcgcg tggccgcctg gccaccgtcg agcaattgcc tgcaaaactg 780  
 cggagcgaac cttgaaatt cgatgcgcca cagctactta cggtgcccga cgtgtttccc 840  
 aacgggctgg ccaacaaata tacttcgcc ccgatcgccg aactgtggta cggcaaatcc 900  
 ggcacctatc gggcaaggt ccagaacctc acgcagttct accatccgt ggacatgttc 960  
 ggcgaatgga accgcgccta cggcccagcg ggcttcgtc aatatcgat cgtgatcccc 1020  
 acagaggcgg ttgatgagtt caagaagatc atcggcgta ttcaagcctc gggtcactac 1080  
 tcgtttctca acgtgttcaa gctgttcggc ccccgcaacc aggccgcgt cagttcccc 1140  
 atcccggtt ggaacatctg cgtcgacttc cccatcaagg acgggctggg gaagttcgtc 1200  
 agcgaactcg accgcccgggt actggaattc ggcggccggc tctacaccgc caaagactcc 1260  
  
 cgtaccaccg cggaaacctt tcatgccatg tatccgcgcg tcgacgaatg gatctccgtg 1320  
 cggcccaagg tcgatccgt ggcgttattc gcctccgaca tggccgcacg cttggagctg 1380  
 ctgttag 1386

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; Proteína

5 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

&lt;400&gt; 3

Ser Phe Leu Asn Val Phe Lys Leu Phe Gly Pro Arg Asn Gln Ala Pro  
 1 5 10 15

Leu Ser Phe Pro Ile Pro Gly Trp Asn Ile Cys Val Asp Phe Pro Ile  
 20 25 30

Lys Asp Gly Leu Gly Lys Phe Val Ser Glu Leu Asp Arg Arg Val Leu  
 35 40 45

Glu Phe Gly Gly Arg Leu Tyr Thr Ala Lys Asp Ser  
 50 55 60

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; Proteína

<213> *Mycobacterium bovis* BCG

&lt;400&gt; 4

Ser Phe Leu Asn Val Phe Lys Leu Phe Gly Pro Arg Asn Gln Ala Pro  
 1                   5                   10                   15

Leu Ser Phe Pro Ile Pro Gly Trp Asn Ile Cys Val Asp Phe Pro Ile  
 20               25                   30

Lys Asp Gly Leu Gly Lys Phe Val Ser Glu Leu Asp Arg Arg Val Leu  
 35               40                   45

Glu Phe Gly Gly Arg Leu Tyr Thr Ala Lys Asp Ser  
 50               55                   60

5 &lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; Proteína

<213> *Mycobacterium bovis*

10 &lt;400&gt; 5

Ser Phe Leu Asn Val Phe Lys Leu Phe Gly Pro Arg Asn Gln Ala Pro  
 1               5                   10                   15

Leu Ser Phe Pro Ile Pro Gly Trp Asn Ile Cys Val Asp Phe Pro Ile  
 20               25                   30

Lys Asp Gly Leu Gly Lys Phe Val Ser Glu Leu Asp Arg Arg Val Leu  
 35               40                   45

Glu Phe Gly Gly Arg Leu Tyr Thr Ala Lys Asp Ser  
 50               55                   60

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; Proteína

15 <213> *Mycobacterium leprae*

&lt;400&gt; 6

Ser Phe Leu Asn Val Phe Lys Leu Phe Gly Pro Gly Asn Gln Ala Pro  
 1               5                   10                   15

Leu Ser Phe Pro Ile Pro Gly Trp Asn Ile Cys Val Asp Phe Pro Ile  
 20               25                   30

Lys Ser Gly Leu Asn Glu Phe Val Asn Lys Leu Asp Arg Arg Val Met  
 35               40                   45

Glu Leu Gly Gly Arg Leu Tyr Thr Ala Lys Asp Ser  
 50               55                   60

20 &lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; Proteína

<213> *Mycobacterium avium*

&lt;400&gt; 7

Ser Ala Leu Asn Val Phe Lys Leu Phe Gly Pro Gly Asn Arg Ala Pro  
 1 5 10 15

Leu Ser Phe Pro Met Ala Gly Trp Asn Val Ala Met Asp Phe Pro Asn  
 20 25 30

Lys Pro Gly Val Asn Glu Phe Leu Asn Glu Leu Asp Arg Arg Val Leu  
 35 40 45

Gln Phe Gly Gly Arg Val Tyr Thr Ala Lys Asp Ser  
 50 55 60

<210> 8

<211> 60

<212> Proteína

5 <213> *Mycobacterium avium paratuberculosis*

<400> 8

Ser Ala Leu Asn Val Phe Lys Leu Phe Gly Pro Gly Asn Arg Ala Pro  
 1 5 10 15

Leu Ser Phe Pro Met Ala Gly Trp Asn Val Ala Met Asp Phe Pro Asn  
 20 25 30

Lys Pro Gly Val Asn Glu Phe Leu Asn Glu Leu Asp Arg Arg Val Leu  
 35 40 45

Gln Phe Gly Gly Arg Val Tyr Thr Ala Lys Asp Ser  
 50 55 60

<210> 9

10 <211> 60

<212> Proteína

<213> *Mycobacterium smegmatis*

<400> 9

Ser Phe Leu Asn Val Phe Lys Leu Phe Gly Pro Gly Asn Gln Ala Pro  
 1 5 10 15

Leu Ser Phe Pro Ile Pro Gly Trp Asn Val Cys Val Asp Phe Pro Ile  
 20 25 30

Lys Ala Gly Leu His Glu Phe Val Thr Glu Leu Asp Arg Arg Val Leu  
 35 40 45

Glu Phe Gly Gly Arg Leu Tyr Thr Ala Lys Asp Ser  
 50 55 60

15 <210> 10

<211> 60

<212> Proteína

<213> *Mycobacterium aurum*

<400> 10

Ser Phe Leu Asn Val Phe Lys Leu Phe Gly Pro Arg Asn Gln Ala Pro  
1 5 10 15

Leu Ser Phe Pro Ile Pro Gly Trp Asn Ile Ser Val Asp Phe Pro Ile  
20 25 30

Lys Asp Gly Leu Gly Lys Phe Val Ser Glu Leu Asp Arg Arg Val Leu  
35 40 45

Glu Phe Gly Gly Arg Leu Tyr Thr Ala Lys Asp Ser  
50 55 60

<210> 11

<211> 60

<212> Proteína

5 <213> *Mycobacterium gilvum*  
<400> 11

Ser Phe Leu Asn Val Phe Lys Leu Phe Gly Pro Gly Asn Gln Ala Pro  
1 5 10 15

Leu Ser Phe Pro Ile Pro Gly Trp Asn Val Cys Val Asp Phe Pro Ile

20

25

30

Thr Ala Gly Leu Asn Glu Phe Leu Asn Gly Leu Asp Lys Arg Val Leu  
35 40 45

Gln Phe Gly Gly Arg Leu Tyr Thr Ala Lys Asp Ser  
50 55 60

-210- 12

<210> 12

10 <212> Proteína

<212> Protein  
<213> *Mycobacterium vanbaalenii*

<215> Mj  
<400> 12

Ser Phe Leu Asn Val Phe Lys Leu Phe Gly Pro Gly Asn Asp Ala Pro  
1 5 10 15

Leu Ser Phe Pro Ile Pro Gly Trp Asn Val Cys Val Asp Phe Gln Ile  
20 25 30

Asn Pro Gly Leu Asn Glu Phe Leu Asn Gly Leu Asp Lys Arg Val Leu  
35 40 45

Glu Phe Gly Gly Arg Leu Tyr Thr Ala Lys Asp Ser  
50 55 60

<210> 13

<210> 10

<212> Proteína

<213> *Mycobacterium ulcerans*

<400> 13

Ser Phe Leu Asn Val Phe Lys Leu Phe Gly Ala Gly Asn Gln Ala Pro  
 1 5 10 15

Leu Ser Phe Pro Ile Pro Gly Trp Asn Ile Cys Val Asp Phe Pro Ile  
 20 25 30

Lys Ala Gly Leu Asn Glu Phe Val Ser Glu Leu Asp Arg Arg Val Met  
 35 40 45

Glu Phe Gly Gly Arg Leu Tyr Thr Ala Lys Asp Ser  
 50 55 60

<210> 14

<211> 60

<212> Proteína

5 <213> *Rhodococcus* spp.

<400> 14

Ser Phe Leu Asn Val Phe Lys Leu Phe Gly Glu Gly Asn Gln Ala Pro  
 1 5 10 15

Leu Ser Phe Pro Ile Pro Gly Trp Asn Ile Cys Val Asp Phe Arg Ile  
 20 25 30

Lys Pro Gly Leu Asn Glu Phe Val Thr Glu Leu Asp Lys Arg Val Leu  
 35 40 45

Lys Phe Gly Gly Arg Leu Tyr Thr Ala Lys Asp Ser  
 50 55 60

<210> 15

<211> 60

10 <212> Proteína

<213> *Nocardia farcinica*

<400> 15

Ser Phe Leu Asn Val Phe Lys Tyr Phe Gly Gln Gly Asn Gln Ala Pro  
 1 5 10 15

Leu Ser Phe Pro Met Pro Gly Trp Asn Val Cys Leu Asp Phe Pro Ile  
 20 25 30

Lys Pro Gly Leu Asn Glu Phe Val Thr Glu Leu Asp Ser Arg Val Leu  
 35 40 45

Glu Phe Gly Gly Arg Leu Tyr Thr Gly Lys Asp Ser  
 50 55 60

15 <210> 16

<211> 60

<212> Proteína

<213> *Corynebacterium jeikeium*

<400> 16

Ser Ala Leu Asn Val Phe Lys Leu Phe Gly Glu Gly Asn Lys Ala Pro  
 1 5 10 15

Leu Ser Tyr Pro Met Pro Gly Trp Asn Val Cys Val Asp Leu Pro Ile  
 20 25 30

Lys Pro Gly Leu Gly Ala Phe Leu Asp Asp Leu Asp Arg Arg Val Met  
 35 40 45

Glu Phe Gly Gly Arg Leu Tyr Leu Ala Lys Glu Ser  
 50 55 60

<210> 17

<211> 60

<212> Proteína

5 <213> *Corynebacterium diphtheriae*

<400> 17

Ser Ala Leu Asn Val Phe Lys Leu Phe Gly Glu Gly Asn Lys Ala Pro  
 1 5 10 15

Leu Ser Tyr Pro Met Pro Gly Trp Asn Val Cys Val Asp Phe Pro Ile  
 20 25 30

Lys Pro Gly Leu Gly Ala Phe Leu Asp Asp Leu Asp Lys Arg Val Met  
 35 40 45

Glu Phe Gly Gly Arg Leu Tyr Leu Ala Lys Glu Ser  
 50 55 60

<210> 18

<211> 60

10 <212> Proteína

<213> *Corynebacterium efficiens*

<400> 18

Ser Ala Leu Asn Val Phe Lys Leu Phe Gly Pro Gly Asn Arg Ala Pro  
 1 5 10 15

Leu Ser Tyr Pro Met Pro Gly Trp Asn Val Cys Val Asp Phe Pro Ile  
 20 25 30

Arg Arg Gly Leu Gly Ala Phe Leu Asp Glu Leu Asp Glu Arg Val Met  
 35 40 45

Glu Phe Gly Gly Arg Leu Tyr Leu Ala Lys Glu Ser  
 50 55 60

<210> 19

<211> 60

<212> Proteína

15 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 19

Ser Ala Leu Asn Val Phe Lys Leu Phe Gly Pro Gly Asn Arg Ala Pro  
1 5 10 15

Leu Ser Tyr Pro Met Pro Gly Trp Asn Val Cys Val Asp Phe Pro Ile  
20 25 30

Arg Pro Gly Leu Gly Ala Phe Leu Asp Asp Leu Asp Lys Arg Val Met  
35 40 45

Glu Phe Gly Gly Arg Leu Tyr Leu Ala Lys Glu Ser  
50 55 60

## REIVINDICACIONES

1. Método para el cribado *in vitro* de fármacos candidatos para el tratamiento de la tuberculosis por interferencia con la biosíntesis de arabinogalactano, en que dicho método comprende una etapa de puesta en contacto de un cultivo celular de *Mycobacterium tuberculosis* que expresa en exceso una proteína que lleva a cabo la transformación de decaprenil-P-ribosa en decaprenil-P-arabinosa y que está codificada por el gen *rv3790* u homólogos del mismo o cualquier marco de lectura abierto artificial cuyo producto génico sea idéntico u homólogo a la proteína Rv3790 con un fármaco candidato y la posterior evaluación del porcentaje de inhibición causado por el fármaco candidato frente a un control en una prueba de ensayo.
- 5
2. Método de cribado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha prueba de ensayo es una prueba antibacteriana *in vitro* o una prueba enzimática.
- 10
3. Método de cribado de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el cultivo celular de *Mycobacterium tuberculosis* que expresa Rv3790 en exceso se obtiene por transformación de un cultivo celular de *Mycobacterium tuberculosis* con pSODIT-2/Rv3790.
- 15
4. Método de cribado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la evaluación del porcentaje de inhibición se realiza mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del fármaco candidato.
- 20
5. Método de cribado de acuerdo con la reivindicación 4, en el que se usan dos o más concentraciones de los fármacos con el fin de calcular dicha CIM para cada fármaco candidato.
- 25
6. Método de cribado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que cada fármaco candidato se prueba también en un cultivo celular de *M. tuberculosis* transformado solo con el vector pSODIT-2.
- 30
7. Método de cribado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6, en el que dicho control es isoniazida.
- 35
8. Método de cribado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que se lleva a cabo un experimento de control adicional en que no se administra ningún tratamiento con un fármaco candidato de modo que se tiene un 0% de inhibición y en el que el % de inhibición obtenido con el fármaco candidato se evalúa con respecto a tal control adicional.
- 40
9. Método de cribado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha etapa de puesta en contacto de un cultivo celular de *Mycobacterium tuberculosis* que expresa Rv3790 en exceso con un fármaco candidato puede llevarse a cabo por siembra en placa de la preparación celular en un medio adecuado que contiene diferentes concentraciones del fármaco candidato.
- 45
10. Método de cribado de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho medio es el medio sólido Middlebrook 7H11 (proveedor Difco).
11. Método de cribado de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho medio se suministra con ácido oleico, albúmina de suero bovino, dextrosa y catalasa (OADC).
- 50
12. Método de cribado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha prueba de ensayo es una prueba enzimática que comprende una etapa de puesta en contacto de un fármaco candidato con una enzima Rv3790 recombinante en una mezcla de reacción que contiene FAD, NAD<sup>+</sup>, NADPH y decaprenilfosforilribosa (DPR) radiomarcada y la posterior evaluación, frente a un control, del porcentaje de inhibición de la reacción enzimática para obtener decaprenilfosforil-D-Araf (DPA) causado por el fármaco candidato.
- 55
13. Método de cribado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además una evaluación por cribado *in vivo* de los fármacos candidatos que pasan la prueba *in vitro*, en que dicha evaluación *in vivo* comprende la administración de regímenes de dosificación preseleccionados del fármaco candidato a ratones con diseminación hemática de una cepa de tuberculosis, en comparación con un fármaco de control y con un placebo.
- 60
14. Método de cribado de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el fármaco de control es isoniazida.
15. Método de cribado de acuerdo con la reivindicación 13 ó 14, en el que se usan ratones BALB/C.
- 65
16. Método de cribado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que la cepa de tuberculosis es un cultivo virulento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.
17. Método de diagnóstico para la identificación de cepas micobacterianas resistentes a los fármacos en un

paciente, en que el método implica la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa del gen *rv3790* de una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* aislada de un paciente de TB y el análisis de la secuencia de ADN para detectar la presencia de un cambio de cisteína a glicina o de cisteína a serina en el codón 387 como responsable de la resistencia a las benzotiazinonas.

- 5 18. Fármacos inhibidores de la proteína Rv3790 que pueden obtenerse por el método de cribado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en los que dichos fármacos inhibidores se seleccionan entre anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína Rv3790 y secuencias no codificantes de ARN del gen *rv3790*.
- 10 19. Inhibidores de acuerdo con la reivindicación 18, en los que dichos inhibidores son secuencias no codificantes de ARN que pueden obtenerse a partir de una secuencia de 25-mer de la secuencia de ARNm del gen *rv3790*.
- 20 20. Inhibidores de acuerdo con la reivindicación 19, en los que dicha secuencia es SEQ ID NO. 1: AUG UUG AGC GUG GGA GCU ACC ACU A.
- 15 21. Preparación de cultivos celulares de cepas mutantes de *Mycobacterium tuberculosis* con el aminoácido cisteína de la posición 387 del gen *rv3790* sustituido por serina o glicina como herramienta de control.
22. Uso de SEQ ID NO. 1: AUG UUG AGC GUG GGA GCU ACC ACU A para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la tuberculosis.

Figura 1. Análisis de alineamiento múltiple con proteínas ortólogas de Rv3790

	161	381	401	421
Rv3790 ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> )	SFLNVFKLFGPRNQAPLSPPIPGWN	VDPPPIKDGGLGFVSELDRRVLEPGGRLYTAKDS		
BCG_3852 ( <i>Mycobacterium bovis</i> BCG)	SFLNVFKLFGPRNQAPLSPPIPGWN	VDPPPIKDGGLGFVSELDRRVLEPGGRLYTAKDS		
Ms3819 ( <i>Mycobacterium bovis</i> )	SFLNVFKLFGPRNQAPLSPPIPGWN	VDPPPIKDGGLGFVSELDRRVLEPGGRLYTAKDS		
ML0109 ( <i>Mycobacterium leprae</i> )	SFLNVFKLFGPGNQAPLSPPIPGWN	VDPPPIKSGLNEFVNKLDRRVMEFGGRLYTAKDS		
MAV_0232 ( <i>Mycobacterium avium</i> )	SALNVFKLFGPGNQAPLSPPIPGWN	VDPPPIKSGLNEFVNKLDRRVMEFGGRLYTAKDS		
MAP0235c ( <i>M. avium paratuberculosis</i> )	SALNVFKLFGPGNQAPLSPPIPGWN	VDPPPIKSGLNEFVNKLDRRVLEPGGRLYTAKDS		
MSMIGR 6382 ( <i>Mycobacterium smegmatis</i> )	SFLNVFKLFGPGNQAPLSPPIPGWN	VDPPPIKAGLHEFTVTELDRRVLEPGGRLYTAKDS		
<i>Mycobacterium aurum</i>	SFLNVFKLFGPGNQAPLSPPIPGWN	VDPPPIKAGLHEFTVTELDRRVLEPGGRLYTAKDS		
<i>Mycobacterium gilvus</i>	SFLNVFKLFGPGNQAPLSPPIPGWN	VDPPPIKAGLHEFTVTELDRRVLEPGGRLYTAKDS		
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	SFLNVFKLFGPGNQAPLSPPIPGWN	VDPPPIKAGLHEFTVTELDRRVLEPGGRLYTAKDS		
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	SFLNVFKLFGAGNQAPLSPPIPGWN	VDPPPIKAGLNEFVNKLDRRVMEFGGRLYTAKDS		
<i>Rhodococcus</i> spp.	SFLNVFKLFGEGNQAPLSPPIPGWN	VDPPPIKAGLNEFVNKLDRRVLEPGGRLYTAKDS		
<i>Nocardia farcinica</i>	SFLNVFKYFGQGQAPLSPPMPGWN	VDPPPIKPGLEFVTELDRSVLEPGGRLYTAKDS		
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	SALNVFKLFGEGNQAPLSYPMPGWN	VDPPPIKPGLGAFLDDDLDRVMEFGGRLYLAKES		
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	SALNVFKLFGEGNQAPLSYPMPGWN	VDPPPIKPGLGAFLDDDLDRVMEFGGRLYLAKES		
<i>Corynebacterium efficiens</i>	SALNVFKLFGPGNQAPLSYPMPGWN	VDPPPIRGGLGAFLDDDLDRVMEFGGRLYLAKES		
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	SALNVFKLFGPGNQAPLSYPMPGWN	VDPPPIRGGLGAFLDDDLDRVMEFGGRLYLAKES		

**Figura 2. Secuencia de ADN del gen rv3790 (tomada de <http://genolist.pasteur.fr/Tuberculist/>).**

```

1 - atg ttg agc gtg gga gct acc act acc gcc
31 - acc cgg ctg acc ggg tgg ggc cgc aca gcg
61 - cgg tcg gtg gcg aat gtg ctt cgc acc cca
91 - gat gcc gag atg atc gtc aag gcg gtg gct
121 - cgg gtc gcc gag tcg ggg ggc ggc cgg ggt
151 - gct atc gcg cgc ggg ctg ggc cgc tcc tat
181 - ggg gac aac gcc caa aac ggc ggt ggg ttg
211 - gtg atc gac atg acg cgc ctg aac act atc
241 - cac tcc att gac gcc gac acc aag ctg gtc
271 - gac atc gac gcc ggg gtc aac ctc gac caa
301 - ctg atg aaa gcc gcc ctg cgg ttc ggg ctg
331 - tgg gtc ccg gtg ctg cgg gga acc cgg cag
361 - gtc acc gtc ggc ggg gcg atc gcc tgc gat
391 - atc cac ggc aag aac cat cac agc gct ggc
421 - agc ttc ggt aac cac gtg cgc agc atg gac
451 - ctg ctg acc gcc gac ggc gag atc cgt cat
481 - ctc act ccg acc ggc gag gac gcc gaa ctg
511 - ttc tgg gcc acc gtc ggg ggc aac ggt ctc
541 - acc ggc atc atc atg cgg gcc acc atc gag
571 - atg acg ccc act tcg acg gcg tac ttc atc
601 - gcc gac ggc gac gtc acc gcc agc ctc gac
631 - gag acc atc gcc ctg cac agc gac ggc agc
661 - gaa gcg cgc tac acc tat tcc agt gcc tgg
691 - ttc gac gcg atc agc gct ccc ccg aag ctg
721 - ggc cgc gcg gcg gta tcg cgt ggc cgc ctg
751 - gcc acc gtc gag caa ttg cct gcg aaa ctg
781 - cgg agc gaa cct ttg aaa ttc gat gcg cca
811 - cag cta ctt acg ttg ccc gac gtg ttt ccc
841 - aac ggg ctg gcc aac aaa tat acc ttc ggc
871 - ccg atc ggc gaa ctg tgg tac cgc aaa tcc
901 - ggc acc tat cgc ggc aag gtc cag aac ctc
931 - acg cag ttc tac cat ccc ctg gac atg ttc
961 - ggc gaa tgg aac cgc gcc tac ggc cca gcg
991 - ggc ttc ctg caa tat cag ttc gtg atc ccc
1021 - aca gag gcg gtt gat gag ttc aag aag atc
1051 - atc ggc gtt att caa gcc tcc ggt cac tac
1081 - tcg ttt ctc aac gtg ttc aag ctg ttc ggc
1111 - ccc cgc aac cag gcg ccg ctc agc ttc ccc
1141 - atc ccg ggc tgg aac atc tcc gtc gac ttc
1171 - ccc atc aag gac ggg ctg ggg aag ttc gtc
1201 - agc gaa ctc gac cgc cgg gta ctg gaa ttc
1231 - ggc ggc cgg ctc tac acc gcc aaa gac tcc
1261 - cgt acc acc gcc gaa acc ttt cat gcc atg
1291 - tat ccc cgc gtc gac gaa tgg atc tcc gtg
1321 - cgc cgc aag gtc gat ccg ctg cgc gta ttc
1351 - gcc tcc gac atg gcc cgg cgc ttg gag ctg
1381 - ctg tag

```