

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 292**

21 Número de solicitud: 201400935

51 Int. Cl.:

C12N 15/80 (2006.01)

C12Q 1/25 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

21.11.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.02.2015

Fecha de la concesión:

01.09.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

08.09.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(100.0%)**

**Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**MARTÍN BRIEVA, Humberto;
ALONSO RODRÍGUEZ, Esmeralda;
NOMBELA CANO, César y
MOLINA MARTÍN, María**

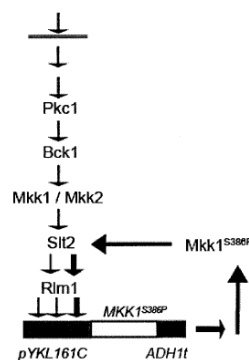
54 Título: **Construcción génica y métodos para detectar compuestos antifúngicos y antitumorales**

57 Resumen:

Construcción génica y métodos para detectar compuestos antifúngicos y antitumorales.

La presente invención se refiere a una construcción génica para la amplificación de la respuesta a señales que activan la ruta de integridad celular (CWI) en *Saccharomyces cerevisiae*. Comprende un alelo hiperactivo de la MAPKK de esta ruta, bajo el control del promotor de un gen inducible por Rlm1, que implica la creación de un circuito de retroalimentación positiva cuya estimulación conduce a la muerte celular. La invención también se refiere a los métodos para detectar agentes que alteren la pared celular o la función de componentes de la propia ruta, lo que permite la detección de compuestos farmacológicos antifúngicos y/o antitumorales.

Figura 1



ES 2 530 292 B2

DESCRIPCIÓN

Construcción génica y métodos para detectar compuestos antifúngicos y antitumorales

5 Sector de la Técnica

La presente invención se encuadra en el sector de la industria farmacéutica-biotecnológica y, más concretamente, en programas de cribado farmacológico para búsqueda de compuestos con actividad antifúngica o modificadora de la señalización mediada por MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*).

10

Estado de la técnica:

La epidemiología de la infección fúngica invasiva (IFI) ha cambiado en los últimos 20 años, por lo que hoy día las micosis se consideran enfermedades emergentes. Su incidencia ha aumentado significativamente y la población de riesgo se ha extendido incluyendo a pacientes con diferentes enfermedades de base tales como los que padecen un cáncer hematológico, los ingresados en unidades de cuidados intensivos, los trasplantados de órgano sólido o aquellos que reciben altas dosis de corticosteroides u otros inmunosupresores (García-Vidal et al., 2013. Pathogenesis of invasive fungal infections. Curr. Opin. Infect. Dis. 26, 270-276). Además, este aumento se ha observado también en otras poblaciones de pacientes mucho más numerosas como son los que sufren enfermedad pulmonar obstructiva crónica. También es relevante el hecho de que la etiología de las micosis invasivas está cambiando. Además de *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*, se están identificando como agentes causales de IFI otras especies como *Candida glabrata*, *Aspergillus terreus*, *Trichosporon asahii*, *Fusarium spp*, *Scedosporium spp*, *Mucorales* y dematiaceos. Todas estas especies emergentes tienen la característica común de ser mucho más resistentes a los antifúngicos que *C. albicans* y *A. fumigatus*, lo que aumenta la mortalidad ya de por sí elevada.

30

El número actual de antifúngicos efectivos es relativamente reducido y, contrariamente a lo que se podía esperar por analogía con lo que ocurre en el

caso de los fármacos antibacterianos que actúan sobre la pared celular, sólo se ha comercializado hasta el momento un tipo de compuestos antifúngicos que actúan sobre esta diana, inhibiendo la síntesis de β -glucano: las equinocandinas (Drew *et al.*, 2013. Recent advances in the treatment of life-threatening, invasive fungal infections. Expert. Opin. Pharmacother. 14, 2361-2374). Una de las razones de la escasez de fármacos antifúngicos de este tipo probablemente sea el limitado número de procedimientos de rastreo específicos dirigidos a esta diana, frente a la estrategia clásica de buscar inhibidores del crecimiento fúngico de una forma general. Se han propuesto algunas metodologías enfocadas a la búsqueda de antifúngicos que específicamente actúen sobre la pared celular, como son la búsqueda de compuestos inhibidores de GTPasas fúngicas que regulan el proceso de mantenimiento de la integridad de la pared celular (EP0892854B1), compuestos que puedan inhibir manosil-transferasas (N u O-glicosilaciones), que son enzimas ausentes en células de mamíferos y esenciales para el mantenimiento de la pared celular fúngica (US6153376A), o bien inhibidores específicos del producto de genes relacionados con esta estructura y que son esenciales para la viabilidad fúngica como CaKRE5, CaALR1 o CaCdc24 (WO0068420A2). Se han propuesto también estrategias orientadas a la valoración de la expresión de genes indicadores de la actividad de la vía de la glucán-sintasa, como son los genes *SKM1*, *YPS3*, *YKL161C (MLP1)*, *MET10*, etc. (WO2004057033A1). Asimismo, se ha propuesto una metodología para identificar compuestos que alteren la pared celular mediante la valoración de la expresión del promotor de uno de estos genes, *MLP1*, en virtud de que su expresión está regulada por la ruta de integridad de la pared celular (CWI, *Cell Wall Integrity*) de forma dependiente del factor de transcripción Rlm1, de manera que cuando se induce la ruta, consecuencia de una alteración significativa de la pared celular, este es el gen cuya expresión más se induce. La fusión de dicho promotor al gen de resistencia al antibiótico nurseotricina permite detectar la inducción de la ruta en función de la resistencia de la levadura a dicho antibiótico (ES2303452B1).

Otra de las razones que podrían explicar el bajo número de inhibidores de la biogénesis de la pared celular fúngica identificados hasta el momento, podría ser precisamente la existencia del eficaz mecanismo de salvamento inducido por la ruta CWI ante condiciones que hacen peligrar a esta estructura.

5

Todo tipo de células, desde las procarióticas más elementales hasta las eucarióticas más complejas, utilizan rutas de transducción de señales para reconocer el ambiente que las rodea y adaptarse a él, así como para comunicarse con otras células. De especial relevancia en organismos eucariotas son las rutas en las que intervienen MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*). Estas proteínas quinasas regulan procesos esenciales como son la expresión génica o la traducción, estabilidad y localización de proteínas. No es de extrañar, por tanto, que las MAPKs jueguen un papel esencial en procesos como la embriogénesis, la proliferación y diferenciación celular, la apoptosis, la respuesta a estrés, la movilidad celular, la homeostasis metabólica, la inmunidad o la función cardíaca, o que las anomalías en señalización por MAPKs se asocien con enfermedades humanas como la obesidad, diabetes, desórdenes neurodegenerativos, artritis reumatoide o cáncer (Kim and Choi, 2010. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1802, 396-405).

Estas rutas, conservadas evolutivamente en eucariotas, comparten una cascada de tres proteínas quinasas: una MAPK quinasa quinasa (MKKK o MEKK), una MAPK quinasa (MKK o MEK) y la propia MAPK, que se fosforilan y activan sucesivamente en condiciones de estimulación. Una vez activadas, las MAPKs fosforilan a su vez a proteínas efectoras, por ejemplo, factores de transcripción, regulando de esta manera la expresión génica (Yang et al., 2013. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene* 513, 1-13).

30

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, un organismo unicelular eucariótico, operan 5 MAPKs: Fus3, Kss1, Hog1, Smk1 y Slt2, que definen 5 rutas que

regulan el apareamiento, el crecimiento filamentoso, la respuesta a condiciones de estrés osmótico, la formación de las esporas y la integridad celular, respectivamente (Chen and Thorner, 2007. Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta. 1773, 1311-1340). En respuesta a una agresión a la pared celular de *S. cerevisiae*, una estructura esencial que la protege y da forma, se produce la estimulación de la ruta mediada por la MAPK Slt2, denominada ruta de integridad de la pared celular (CWI; revisado por Levin en 2005 -Levin, D.E., 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69, 262-291-). La activación de esta ruta dispara un mecanismo compensatorio dirigido a mantener la estabilidad de la pared celular mediante una remodelación de la misma, fundamentalmente a través de un cambio en el patrón de expresión génica, y con ello asegurar la viabilidad celular frente a dicha agresión. La MAPK Slt2 es activada por las MAPKKs redundantes Mkk1 y Mkk2 quienes a su vez son activadas por la MAPKKK Bck1. Bck1 recibe el estímulo de la proteína kinasa C Pkc1, a su vez activada por la GTPasa Rho1 en respuesta a la señal detectada por los mecanosensores de membrana Mid2 y Wsc1,2,3. Una vez activada, Slt2 fosforila y activa al factor de transcripción Rlm1, que promueve un incremento en la transcripción de una serie de genes, entre ellos *YKL161C (MLP1)*, *CRH1*, *CWP1*, *SLT2* o *RLM1*. Por otro lado, la pared celular no está presente en células de mamíferos, mientras que esta ruta también está conservada en hongos patógenos, como *Candida albicans* (Navarro-Garcia, F. et al., 2001. Signal transduction pathways and cell-wall construction in *Candida albicans*. Med. Mycol. 39 Suppl 1, 87-100), *Aspergillus fumigatus* (May, G.S et al., 2005. Mitogen activated protein kinases of *Aspergillus fumigatus*. Med. Mycol. 43 Suppl 1, S83-S86) o *Cryptococcus neoformans* (Kozubowski, L. et al., 2009. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. Cell Microbiol. 11, 370-380).

30

En conclusión, es necesario desarrollar nuevos sistemas de búsqueda y estrategias terapéuticas para solventar estos problemas. En esa línea de

actuaciones se incluye la invención aquí presentada, que se orienta a la utilización de cepas hipersensibles para el rastreo farmacológico de compuestos que específicamente dañen la pared celular fúngica, o inhiban el mecanismo compensatorio controlado por la ruta CWI.

5

Descripción detallada de la invención

Construcción génica y métodos para detectar compuestos antifúngicos y antitumorales.

10

Para obtener un sistema con el que rastrear nuevos fármacos con efecto potencialmente antifúngico, en la presente invención se ha realizado una construcción génica que incluye el gen *MKK1* de *Saccharomyces cerevisiae* modificado mediante una mutación que da lugar a un cambio en el aminoácido 386 de la proteína, de manera que la serina de la secuencia silvestre está sustituida por una prolina, lo que da lugar a una forma hiperactiva del gen (*MKK1*^{S386P}); en la construcción génica, además, dicho gen está precedido por una secuencia promotora inducible por el factor de transcripción Rlm1 de la ruta CWI y también se incluye una secuencia de terminación de la transcripción.

20

En la presente invención, por "secuencia promotora" se entiende la región de una molécula de ADN a la que se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción y por "secuencia de terminación de la transcripción" se entiende la secuencia de ADN localizada en el extremo de la porción transcrita, y que causa que la ARN polimerasa termine la transcripción.

25

Un aspecto de la presente invención se refiere a una construcción génica que comprende los siguientes componentes, en el orden que se indica en la dirección de transcripción de 5' a 3':

30

- la secuencia promotora de un gen inducible por el factor de transcripción Rlm1 de la ruta de integridad celular (CWI) de *Saccharomyces cerevisiae*,

- una secuencia de DNA cuya expresión da lugar a la proteína Mkk1 de *Saccharomyces cerevisiae* con una mutación que produce la modificación del aminoácido S386 por P386 en dicha proteína, denominada Mkk1^{S386P}, según se describe en SEQ ID NO: 3, y

5 - una secuencia de terminación de la transcripción.

En esta construcción génica la distancia entre el extremo 3' de la secuencia promotora y el extremo 5' de la secuencia de DNA cuya expresión da lugar a la proteína Mkk1^{S386P} es menor o igual a 18 nucleótidos y la distancia entre el extremo 3' de la secuencia de DNA cuya expresión da lugar a la proteína

10 Mkk1^{S386P} y el extremo 5' de la secuencia de terminación es menor o igual a 18 nucleótidos. De hecho, en la unión entre dos de los componentes de la construcción pueden quedar, por ejemplo, nucleótidos de secuencias diana de enzimas de restricción insertadas en la secuencia de uno o varios componentes para facilitar la unión de los distintos componentes de la construcción, o bien
15 otras secuencias de nucleótidos, siempre que no alteren la funcionalidad de la construcción.

En una realización preferida, la secuencia promotora pertenece al gen *YKL161C (MLP1)*, que se describe en SEQ ID NO:1. Por otro lado, como
20 secuencia de terminación de la transcripción, una realización preferida incluye la secuencia de terminación *ADHt*, descrita en SEQ ID NO:4. La realización más preferida de la invención, caracterizada por SEQ ID NO: 13, incluye *pYKL161C* y *ADHt*.

25 La sobreexpresión del alelo de *MKK1^{S386P}* que codifica una versión hiperactiva de esta MAPKK es letal para la célula. Se ha elaborado una construcción génica que da lugar a un circuito genético de retroalimentación positiva que conduce a una elevada amplificación de la señal que se transmite a través de la ruta CWI de la levadura *S. cerevisiae* y resulta en letalidad para las células.

30

La construcción génica objeto de esta invención conduce a una amplificación continua de la señal transmitida por la MAPK Slt2 a través del factor de

transcripción Rlm1. El esquema que incluye una realización preferida de la invención es: pYKL161C-MKK1^{S386P}-ADHt, y por tanto comprende los siguientes componentes:

5 pYKL161C- promotor del gen YKL161C (MLP1), caracterizado por SEQ ID NO: 1, que presenta una elevada inducción transcripcional en respuesta a daño en pared y a estímulos que activan la ruta CWI.

MKK1^{S386P}- caracterizado por SEQ ID NO: 2; alelo de MKK1 que codifica una versión hiperactiva de esta MAPKK, cuya sobreexpresión es letal para la célula.

10 ADHt- región de terminación transcripcional del gen ADH1, caracterizada por SEQ ID NO: 4.

Otro aspecto de la invención se refiere a vectores en los que se han insertado las posibles construcciones de la invención. Estos vectores, posteriormente,
15 pueden utilizarse para transformar células de *S. cerevisiae*. Además, las construcciones de la invención pueden integrarse directamente en el genoma de una cepa de *S. cerevisiae*.

La invención también incluye a la cepa de *S. cerevisiae* depositada con fecha
20 26 de septiembre de 2014 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), ubicada en el Parque Científico de la Universidad de Valencia, 46980 Paterna (Valencia), con número de acceso CECT13115 que, internamente, recibe la referencia yEA1.

25 Tal y como se indica en la figura 1, en una célula que incluye la construcción génica de la invención, se genera un circuito de amplificación, de retroalimentación positiva, y la estimulación de la ruta supone la activación de la cascada de quinasas hasta Slt2, la fosforilación y activación de Rlm1, la inducción del promotor YKL161C y la expresión del alelo hiperactivo
30 correspondiente. Su expresión conduce a una mayor activación de Slt2, por tanto de Rlm1, y por tanto una mayor expresión de YKL161C, generándose un bucle de activación que se retroalimenta positiva y continuamente mientras

se mantenga el estímulo. Ello conlleva una gran amplificación de la señal y, por tanto, una respuesta celular excesiva, lo que conduce a la muerte de la célula a bajas concentraciones de cualquier agente que altere la pared de *S. cerevisiae*. Por tanto, la construcción génica de la invención confiere a las células que la portan una hipersensibilidad a los estímulos que activan la ruta CWI.

Esta invención tiene aplicaciones como sistema biosensor de estímulos externos. Las cepas que incluyen la construcción génica pueden utilizarse para detectar con más facilidad estímulos débiles que activen naturalmente la ruta CWI, debido a su mayor sensibilidad.

La capacidad biosensora de las cepas fúngicas con la construcción génica que da lugar al circuito amplificador de señal permite su utilización como herramienta de cribado farmacológico para la identificación de diferentes tipos de fármacos:

i) Por una parte, para la búsqueda de antifúngicos.

Con una cepa de levadura que incluya la construcción génica de la invención, que da lugar al circuito de amplificación en la ruta CWI, podemos rastrear 2 tipos de compuestos con actividad antifúngica de una manera muy sencilla y sensible:

(A) compuestos que alteran procesos de la pared celular o dañan directamente dicha estructura. Estos compuestos provocan la muerte celular al estimular el circuito de amplificación de la ruta CWI, lo que se detecta mediante sistemas de rastreo HTS (*High throughput screening*). La cepa que contiene la construcción génica es hipersensible al daño en la pared, debido al efecto amplificador de la señal, por lo que puede permitir descubrir compuestos que, siendo activos sobre esa diana, estén en baja concentración o tengan una potencia reducida en la muestra a ensayar (productos naturales o de síntesis

química), por lo que no podrían ser detectados directamente como inhibidores del crecimiento fúngico en una cepa silvestre de *S. cerevisiae*.

(B) compuestos que inhiben a componentes de la ruta CWI y, por tanto,
 5 al mecanismo compensatorio que se dispara en condiciones de daño en la pared celular y que permite mantener la integridad de esta estructura esencial. Este segundo tipo de compuestos podría potenciar la acción de otros antifúngicos que actúen directamente sobre la pared celular en terapias combinadas. Estos compuestos se identifican por su capacidad de evitar la
 10 muerte celular de las cepas fúngicas que incluyen las construcciones génicas de la invención en condiciones de activación del circuito de amplificación por algún estímulo conocido de la ruta CWI. El hecho de que su forma de identificación en el rastreo sea por recuperación de la viabilidad celular, favorece el aislamiento de compuestos con poca toxicidad *per se* sobre la
 15 célula eucariótica.

ii) Por otra parte, este bioensayo se puede utilizar en el rastreo farmacológico para la búsqueda de antitumorales.

20 Hay que tener en cuenta que tanto las proteínas que operan en las rutas mediadas por MAPKs en la levadura *S. cerevisiae*, como los mecanismos de activación, las interacciones moleculares que determinan el reconocimiento y la especificidad de sustratos o la localización subcelular de los componentes, son muy parecidos a los del resto de organismos eucarióticos, incluyendo los
 25 de eucariotas superiores. De hecho, esta conservación estructural y funcional ha hecho posible el uso de *S. cerevisiae* como modelo experimental de célula eucariótica para la clonación o caracterización de genes humanos que codifican proteínas de señalización. Por tanto, los posibles compuestos que se obtendrían en un cribado con el segundo bioensayo anteriormente descrito (B)
 30 como inhibidores de los componentes de la ruta CWI son, potencialmente, inhibidores de rutas de MAPKs similares en células de mamífero. Dado que, en este caso, la diana no es específica de hongos, los compuestos seleccionados

pueden tener efecto antitumoral ya que estas rutas de MAPKs son esenciales en la proliferación celular de células eucarióticas superiores, jugando un papel fundamental en algunos procesos oncológicos.

- 5 El desarrollo de bioensayos utilizando este sistema, ya sea mediante el uso de la construcción génica o mediante el uso de los vectores y/o células que la contienen, tiene una serie de ventajas destacables, como es su fácil adaptabilidad a la tecnología de alto rendimiento (HTS), ya que admite formatos de alta densidad, presenta un sistema de detección muy fácil (medida de
10 crecimiento por espectrometría, frente a otros sistemas basados en genes reporteros que implican medida de actividad enzimática), rapidez en la obtención de resultados, bajo coste (permite el uso de medios de cultivo sencillos no definidos, sin requerimientos nutritivos específicos), etc. Una innovación importante de este sistema es la combinación de una elevada
15 sensibilidad de las levaduras que portan la construcción génica de la invención con una gran selectividad de acción.

- Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para la detección de compuestos antifúngicos y/o antitumorales que incluye las construcciones génicas, los
20 vectores y/o las células eucariotas de la invención.

- En conclusión, las cepas de levaduras que incluyen esta construcción génica constituyen un sistema sencillo, fácil de manipular, sensible, específico, seguro y muy económico de búsqueda de compuestos tanto que alteren la pared
25 fúngica como que modifiquen la señalización a través de rutas de MAPKs, y por tanto con potencial actividad antifúngica o antitumoral.

Descripción de las figuras

- 30 **Figura 1:** Esquema ilustrativo de la forma de operar del circuito genético de amplificación y retroalimentación de la ruta CWI mediada por la MAPK Slt2 en la levadura *S. cerevisiae*. Se muestran los distintos componentes que

participan en esta ruta de respuesta a estrés sobre la pared celular y la composición de la construcción génica de la invención.

Figura 2: Ensayos de sensibilidad en medio líquido de la cepa yEA1 y las
5 isotónicas silvestre BY4741 y mutante Y00993 (*slt2Δ*), frente a rojo Congo (representado como "RC"), un compuesto alterante de la pared celular, utilizando un método de microdilución.

Figura 3: Ensayos de recuperación de la viabilidad en medio líquido en
10 presencia de rojo Congo de la cepa yEA1 y las isotónicas silvestre BY4741 y mutante *slt2Δ*, tras la adición de cercosporamida (representada como "C"), un agente que inhibe la señalización a través de la ruta CWI, utilizando un método de microdilución.

15 **Modo de realización de la invención**

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

20 **Ejemplo 1: Construcción del plásmido pEA1 que incluye la *cassette* de amplificación de la señal de la ruta CWI.**

Para construir el plásmido pEA1 con la *cassette* de amplificación de la señal de la ruta CWI, se amplificaron por separado y mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los tres módulos que incluye la construcción génica de la invención (los sitios de corte de las correspondientes enzimas de restricción se
25 indican mediante subrayado):

- Región promotora del gen *YKL161C*, utilizando los oligonucleótidos cebadores MLP1PR5 (CCCCGGAATTCTGGGCCCAACAACAAGAACGT
30 GGGCGATAC), caracterizado por SEQ ID NO: 5, que introduce puntos de corte *EcoRI* y *PspOMI*; y MLP1PR3 (CCCCCTCGAGCATTTAATTG
TGAATCTTTCTTCG), caracterizado por SEQ ID NO: 6, que introduce

un punto *XhoI*. Como molde se utilizó DNA genómico de la cepa S288C de *S. cerevisiae*.

- Amplificación de la versión hiperactiva del gen *MKK1^{S386P}*. Se utilizaron los oligonucleótidos cebadores MKK1-5 (CCCGTCTGACTCGAGATGGCTTCACTGTTTCAGACC), caracterizado por SEQ ID NO: 7, que introduce sitios de corte *Sall-XhoI* al comienzo de la secuencia amplificada y el oligonucleótido MKK1-3 (CCCGTCTGACTTAATCTTTCAGCACTTCC), caracterizado por SEQ ID NO:8, que introduce un sitio *Sall* al final de la secuencia amplificada. Como molde se utilizó el plásmido pNV7W-*MKK1^{S386P}* (Watanabe, Y. *et al.* 1995. Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. Mol. Cell Biol. 15, 5740-5749).
- Amplificación de la región terminadora del gen *ADH1*, con los oligonucleótidos ADHT5 (CCCCGGATCCGTCGACCCTGAGTAAATAGCG), caracterizado por SEQ ID NO: 9, que introduce sitios de corte *BamHI-Sall*, y ADHT3B (CCCCCGGATCCCGGTGGTGGTCAATAAG), caracterizado por SEQ ID NO: 10, que introduce un sitio de corte *BamHI*. Como molde se utilizó DNA genómico de la cepa S288C de *S. cerevisiae*.

A continuación, la construcción génica se ensambló subclonando en tándem los tres módulos indicados anteriormente, siguiendo la secuencia *EcoRI-pYKL161C-XhoI-MKK1^{S386P}-Sall-ADHt-BamHI*, y se introdujeron como un fragmento génico en el vector de integración M4366 HO-hisG-URA3-hisG-poly-HO (Voth *et al.* 2001. Yeast vectors for integration at the HO locus. Nucleic Acids Res. 29, E59) (número de acceso AF324729) entre los sitios *EcoRI* y *BamHI*, generándose el plásmido pEA1.

30 **Ejemplo 2: Construcción de la cepa recombinante yEA1 de *S. cerevisiae***

Para construir la cepa recombinante yEA1 de *S. cerevisiae*, se integró la construcción génica *pYKL161C-MKK1^{S386P}-ADHt* en el genoma de la cepa

silvestre BY4741 (colección EUROSCARF) mediante su transformación con el fragmento *NotI-NotI* procedente del plásmido pEA1, dirigiéndose por tanto la integración al locus HO de dicha cepa. Para la transformación, se siguió el método del acetato de litio seleccionando los transformantes en medio carente de uracilo. Se confirmó su integración en el locus HO mediante ensayos de amplificación por PCR, utilizándose los oligonucleótidos 5'-CTGATATGTCTGAGG-3', caracterizado por SEQ ID NO: 11, que hibrida en el gen HO, y 5'-CATTGGAAATTAGGGC'-3, caracterizado por SEQ ID NO: 12, que hibrida en la secuencia de la región promotora del gen *YKL161C*. Tras la verificación de su integración correcta, se forzó la pérdida del marcador de selección *URA3*, presente en la *cassette* de integración, mediante el cultivo en presencia de ácido 5-fluoroorótico, que resulta tóxico para aquellas células portadoras del gen *URA3*, obteniéndose la cepa yEA1.

15 **Ejemplo 3: Ensayo de la cepa yEA1 frente a agentes alterantes de la pared celular.**

A modo de ejemplo de la aplicabilidad de este sistema en la búsqueda de antifúngicos alterantes de la pared celular fúngica, se muestra la inhibición del crecimiento que provoca el rojo Congo, una sustancia que se une a la quitina de la pared celular e interfiere con la estabilidad de la pared celular de la levadura. Los ensayos se realizaron en la cepa yEA1, en comparación con la cepa silvestre BY4741 y con una cepa mutante *slt2Δ* isogénica (la cepa Y00993 de EUROSCARF). El ensayo se realizó mediante el cultivo de un preinóculo de cada cepa de levadura en medio YPD (*Yeast Extract-Peptone-Dextrose*, medio común de crecimiento de hongos) hasta una concentración de 2×10^7 células (equivalente a una DO_{600} entre 0,8 y 1,2), desde el cual se diluyó el cultivo hasta una DO estimada 0,01, inoculándose 75 µl de esta suspensión en cada pocillo de una placa multipocillo (96 pocillos), que contenía 75 µl de medio fresco YPD en cada pocillo, al que se añadió rojo Congo en una concentración comprendida entre 0,0029 y 1,5 µg/ml, tal y como se indica en la Figura 2. Las placas multipocillo se incubaron a 24°C durante 24 horas, valorándose el crecimiento de las tres cepas utilizadas en un lector de placas como

absorbancia a 600nm. En el gráfico de la Figura 2, se muestra el comportamiento en este ensayo de las tres cepas, con el crecimiento representado en ordenadas y las concentraciones de rojo Congo utilizadas en el eje de abscisas. Se puede observar cómo la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de este compuesto sobre la cepa yEA1 que incluye la construcción génica de la invención es menor que sobre la cepa silvestre BY4741 e, incluso, que sobre la cepa delecionada en el gen *SLT2*. Ello indica la elevada sensibilidad de la cepa yEA1, que porta la construcción génica aquí descrita.

Ejemplo 4: Ensayo de la cepa yEA1 frente a agentes inhibidores de la señalización a través de la ruta CWI. A modo de ejemplo de la aplicabilidad de este sistema en la búsqueda de compuestos inhibidores de la ruta CWI de hongos, se muestra un ensayo de recuperación del crecimiento por cercosporamida. La cercosporamida es un inhibidor comercial de la protein kinasa Pkc1, componente esencial en la señalización a través de la ruta CWI. El ensayo se realizó igual que en el ejemplo 3, con la excepción de que se añadió una concentración fija de 0,025µg/ml de rojo Congo a todos los pocillos para inducir el circuito genético de retroalimentación positiva a que da lugar la construcción génica de la invención y concentraciones variables de cercosporamida, en un rango que no resulta tóxico para la cepa silvestre (entre 2,5 y 40µg/ml); se utilizaron, además, las mismas tres cepas que en el ejemplo 3. En el gráfico de la Figura 3 se muestra, en ordenadas, el crecimiento en estas condiciones de las tres cepas ensayadas, tras 24 horas de incubación a 24°C, frente a las concentraciones de cercosporamida utilizadas, en el eje de abscisas. Se observa la recuperación del crecimiento que provocó la cercosporamida en la cepa yEA1 a partir de una concentración de 20µg/ml, mientras que la cepa mutante *slt2Δ* isogénica no creció a ninguna de las concentraciones ensayadas.

Texto libre de la lista de secuencias

El texto libre utilizado en la lista de secuencias se corresponde en español a las siguientes características:

SEQ ID NO: 5

- 5 Secuencia artificial de ADN; cebador basado en *YKL161C* de *Saccharomyces cerevisiae*.
Nucleótidos del 6 al 11: sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *EcoRI*.
Nucleótidos del 12 al 17: sitio de reconocimiento de la enzima de restricción
10 *PspOMI*.

SEQ ID NO: 6

- Secuencia artificial de ADN; cebador basado en *YKL161C* de *Saccharomyces cerevisiae*.
15 Nucleótidos del 5 al 10: sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *XhoI*

SEQ ID NO: 7

- Secuencia artificial de ADN; cebador basado en *MKK1* de *Saccharomyces cerevisiae*
20 Nucleótidos del 4 al 9: sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *Sall*.
Nucleótidos del 9 al 14: sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *XhoI*

SEQ ID NO: 8

- Secuencia artificial de ADN; cebador basado en *MKK1* de *Saccharomyces cerevisiae*.
25 Nucleótidos del 4 al 9: sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *Sall*.

SEQ ID NO: 9

- Secuencia artificial de ADN; cebador basado en *ADH1* de *Saccharomyces cerevisiae*.
30 Nucleótidos del 5 al 10: sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *BamHI*.

Nucleótidos del 11 al 16: sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *Sall*.

SEQ ID NO: 10

5 Secuencia artificial de ADN; cebador basado en *ADH1* de *Saccharomyces cerevisiae*.

Nucleótidos del 6 al 11: sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *BamHI*.

10 **SEQ ID NO: 11**

Cebador basado en el gen *HO* de *Saccharomyces cerevisiae*.

SEQ ID NO: 12

15 Cebador basado en la región promotora del gen *YKL161C* de *Saccharomyces cerevisiae*.

SEQ ID NO: 13

Secuencias artificial de ADN; construcción génica que comprende la región promotora del gen *YKL161C*, el gen *MKK1^{S386P}* y la región de terminación del gen *ADH1* de *Saccharomyces cerevisiae*.

20 Nucleótidos del 1 al 6: sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *EcoRI*.

Nucleótidos del 7 al 12: sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *PspOMI*.

25 Nucleótidos del 13 al 1204: promotor del gen *YKL161C* de *S. cerevisiae*.

Nucleótidos del 1205 al 1210: sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *XhoI*.

Nucleótidos del 1211 al 2737: gen *MKK1^{S386P}* de *S. cerevisiae*.

30 Nucleótidos del 2738 al 2743: sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *Sall*.

Nucleótidos del 2744 al 2938: región de terminación del gen *ADH1* de *S. cerevisiae*.

Nucleótidos del 2939 al 2944: sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *Bam*HI.

REIVINDICACIONES

1. Construcción génica que comprende los siguientes componentes, en el orden que se indica en la dirección de transcripción de 5' a 3':
 - 5 - la secuencia promotora de un gen inducible por el factor de transcripción Rlm1 de la ruta de integridad celular (CWI) de *Saccharomyces cerevisiae*,
 - una secuencia de DNA cuya expresión da lugar a la proteína Mkk1 de *Saccharomyces cerevisiae* con una mutación que produce la modificación del aminoácido S386 por P386 en dicha proteína, según se describe en SEQ ID NO: 3 y denominada Mkk1^{S386P}, y
 - 10 - una secuencia de terminación de la transcripción;
 en la que la distancia entre el extremo 3' de la secuencia promotora y el extremo 5' de la secuencia de DNA cuya expresión da lugar a la proteína Mkk1^{S386P} es menor o igual a 18 nucleótidos y la distancia entre el extremo 3' de la secuencia de DNA cuya expresión da lugar a la proteína Mkk1^{S386P} y el extremo 5' de la
 - 15 secuencia de terminación es menor o igual a 18 nucleótidos.
2. Construcción génica en la que la secuencia de DNA cuya expresión da lugar a la proteína Mkk1^{S386P} es el polinucleótido que se describe en SEQ ID NO: 2,
 - 20 denominado MKK1^{S386P}.
- 3.- Construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en la que la secuencia promotora es la región promotora del gen *YKL161c*, caracterizada por SEQ ID NO: 1.
 - 25
4. Construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en la que la secuencia de terminación de la transcripción es la secuencia de terminación de gen *ADH1* de *Saccharomyces cerevisiae*, caracterizada por SEQ ID NO: 4.
5. Construcción génica caracterizada por SEQ ID NO: 13.
 - 30

6. Vector que contiene cualquiera de las construcciones definidas en las reivindicaciones 1-5.

7. Célula de *S. cerevisiae* que contiene el vector definido en la reivindicación 6.

5

8. Célula recombinante de *S. cerevisiae* que incluye en su genoma cualquiera de las construcciones definidas en las reivindicaciones 1-5.

9. Cepa de *S. cerevisiae* depositada en la Colección de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT13115.

10

10. Método para detectar compuestos antifúngicos que alteran la pared celular fúngica que incluye los siguientes pasos:

a) inocular una cantidad suficiente de una cepa de *S. cerevisiae* según se define en cualquiera de las reivindicaciones 7-9 en medio de cultivo que contiene, en sucesivos tubos, microtubos o pocillos, concentraciones crecientes de los productos que se desea evaluar;

15

b) incubar el medio de cultivo inoculado del paso a);

c) determinar el crecimiento de la cepa inoculada en el paso a);

20

d) seleccionar el/los producto/s incluido/s en el medio de cultivo del paso a) en el que se detecte menor crecimiento de la cepa de *S. cerevisiae* definida en las reivindicaciones 7-9 con respecto a una cepa silvestre utilizada como control.

11. Método para detectar compuestos antitumorales o antifúngicos inhibidores de la señalización a través de la ruta CWI que incluye los siguientes pasos:

25

a) inocular una cantidad suficiente de una cepa de *S. cerevisiae* según se define en cualquiera de las reivindicaciones 7-9 en medio de cultivo que contiene un compuesto que estimula la ruta CWI y, en sucesivos tubos, microtubos o pocillos, concentraciones crecientes de los productos que se desea evaluar;

30

b) incubar el medio de cultivo inoculado del paso a);

c) determinar el crecimiento de la cepa inoculada en el paso a);

d) seleccionar el/los producto/s incluido/s en el medio de cultivo del paso a) en el que se detecte mayor crecimiento de la cepa de *S. cerevisiae* definida en las reivindicaciones 7-9 con respecto a una cepa silvestre utilizada como control.

5 12. Método según la reivindicación 11 en el que el compuesto estimulador de la ruta CWI del paso a) es el Rojo Congo.

10 13. Uso de la construcción génica, los vectores y/o las células definidas en las reivindicaciones 1-9 en la detección de compuestos antifúngicos y/o de compuestos antitumorales.

14. Kit para la detección de compuestos antifúngicos y/o antitumorales que incluye las construcciones génicas, los vectores y/o las células eucariotas definidas en las reivindicaciones 1-9.

Figura 1

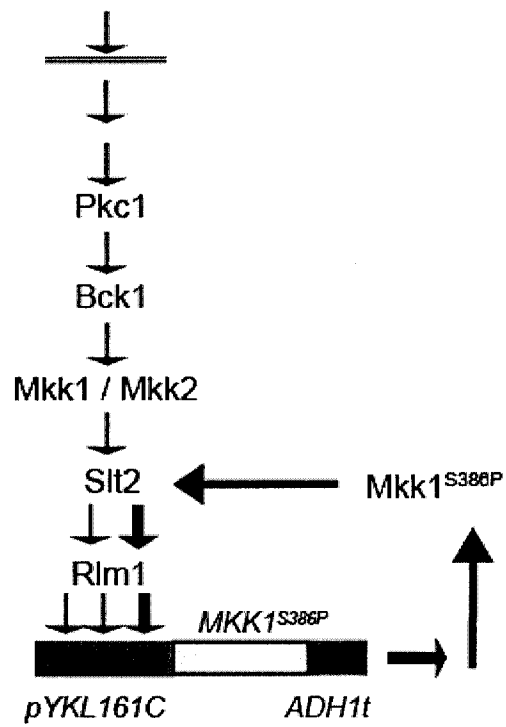


Figura 2

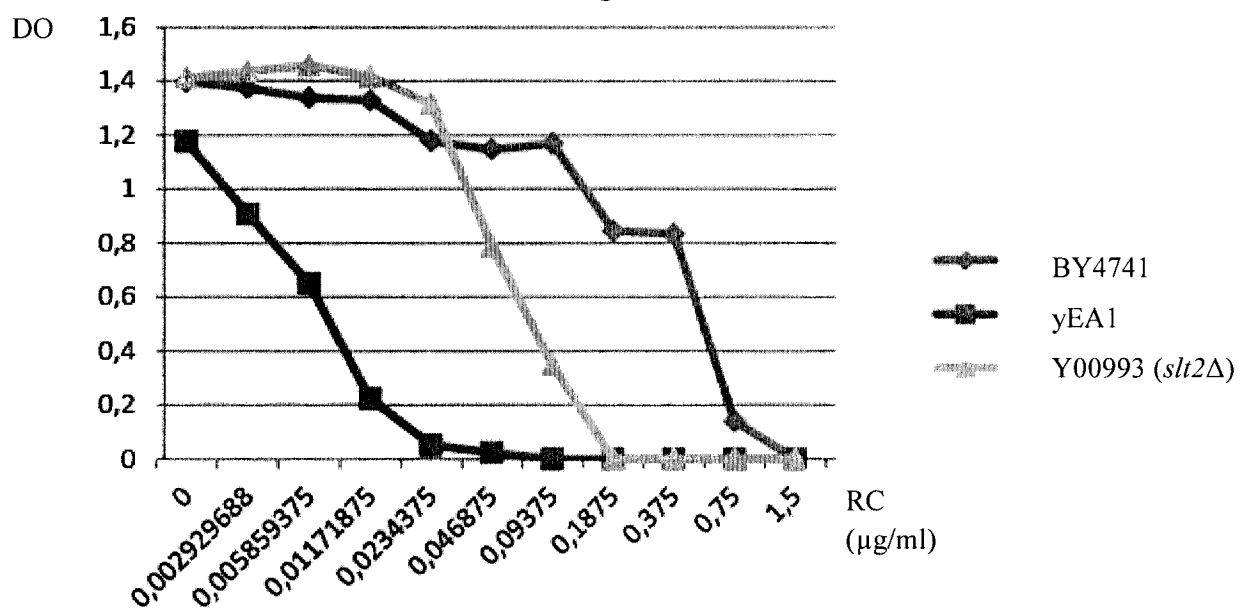
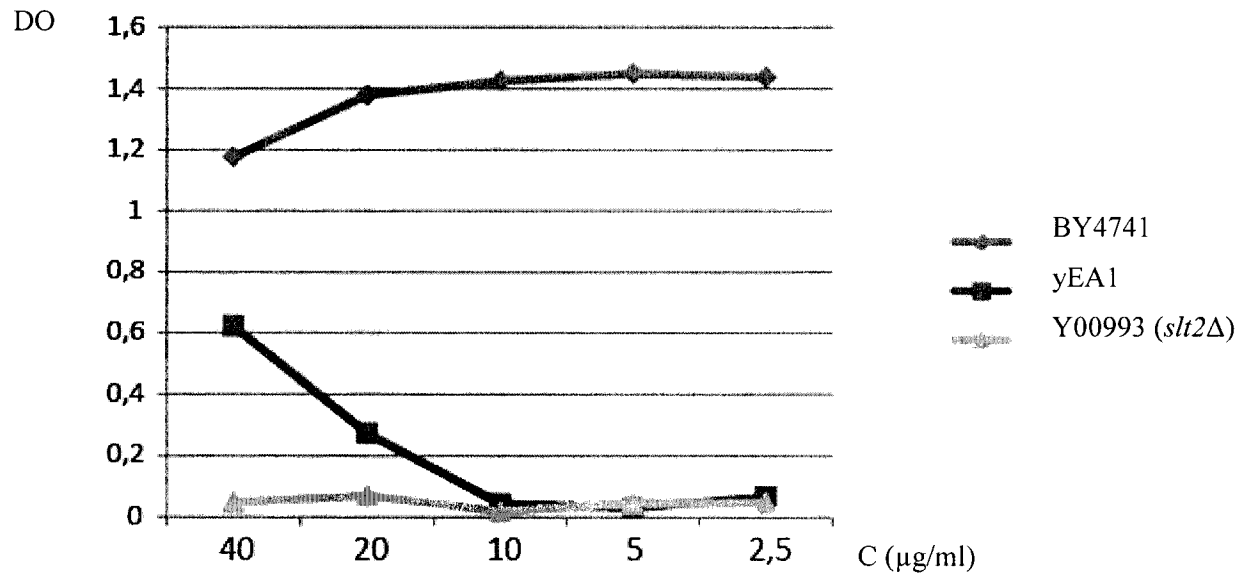


Figura 3



LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Complutense de Madrid

<120> Construcción génica y métodos para detectar compuestos antifúngicos y antitumorales

<130> 2014_09_01

<160> 13

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 1192

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> source

<222> 1..1192

<223> /mol_type="DNA"
/organism="Saccharomyces cerevisiae"

<400> 1

```

acaacaagaa cgtgggcgat acagcaaaaa atcacttgaa ataacagaat caagtttctt      60
atccgatttc ctacttttga gctccggcct atgttgaaga tgttactttt ctttgtctct      120
aagtgatctt tatttttctg gctccagtga aatttggtta tagcatagtc acttcaacta      180
aagtctgata gtaatacttg caaatattgc aaaacttgga agaattgtta tgaatcattt      240
cttgaccat tctttcaatc atctcaatct cctgctgtga tgtttaagta taacattgaa      300
gactatgccc taatttccaa tgttatntag ttttaagcat atctttgttt ctaacaggaa      360
actcaggccc acatccgcaa aaaaatatgt gccaaaaaac tttcaacact tcaaagatac      420
ttaccactgc aggaaaataa tctacgtgta acggtttgaa aataaatttg acttcataat      480
tggaacataa tactccatcg ccatcccttt ttaaagaagt ttccacaaga atgaatggct      540
aatcgcaact aaatcttttc cttgcaaacg taacacagta tcgacatttt cttactcaat      600
ccaacgaagg aataacctat ctaaaaaata aacgccgtag ttttcagccc acaagacgtc      660
attaaaagat ttgttaatta taaaaataga aatattttcta ccagcatgat tattcgttac      720
ttgaaagtcc ccaataaatt tcaactgttt cgtttaactgt tgtagttatt aaacgcagca      780
aacagattat tttgaacaac accggagaaa cacgcgcaga cccattcgag ttaaaaaatag      840
taactcgca tcaatcaatg caggaagcac cgtaggaatt agtaagaact cgtattttga      900
ttgaaaatgc catgaaagca attgacttgc tgcagtaaaa agcgctgcca caaactttgt      960
aattttcgac aatgacgttc ttttcagatg gttactgtct ttttttgga gaaacaaaag      1020
aaggtacttt tatgatgtta tactaggcaa aaagcctatt taatgtaagt cctaattgtc      1080
gtttgagact ggatgaaaag ggacaaaatg gaaggataac taaaggtgac ttaccgccag      1140
attaattcgg cctggaatag tttgatatcg aagaaagatt cacaattaa tg      1192

```

<210> 2

<211> 1527

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> source

<222> 1..1527

<223> /mol_type="DNA"
/organism="Saccharomyces cerevisiae"

<220>

<221> CDS

<222> 1..1527

<223> /translation="MASLFRPPESAKCNPNSPRLKLPLLRNNQVDENNIYLTSGNSSTTAYSSHT
PEPLTSSSTLFSQTRLHPSDSSMTLNTMKRPAPPSLP SLSINSQSKCKTLPELVPIADVSDGK
HDLGLKQRVIAENELSGNSDLTPSSMASPFSHTNTSSPYLRNDLSNSVGSDFSNLISAYEQSSSP
IKSSSQPKSSSESYIDLNSVRDQDLDENGWKYANLKDRIETLGILGEGAGGSVSKCKLKNGSKI
FALKVINTLNTDPEYQKQIFRELQFNRSFQSEYIVRYGMFTDDENSSIYIAMEYMGGRSLDAIY
KNLLERGGRISEKVLGKIAEAVLRGLSYLHEKKVIHRDIKPQNILLNENGQVKLCDFGVSGEAVN
SLATTTFTGTPFYMAPERIQQGPYSVTSDVWSLGLTILEVANGKFPCSSEKMAANIAPFELLMWIL
TFTPELKDEPESNIWSPSFKSFIDYCLKKDSRERPSRQMINHPWIKGMKKNVNMEKFVRKCW
KD"

<400> 2

atggcttcac tggtcagacc cccagaatct gcgaaatgca acccaaaactc tcctagactt	60
aaactgcccc tcttacgaaa taatcaggta gatgaaaata atatatactt gacgtcgaat	120
gggagttcca ccacagctta cagtagccac accccagaac cactgacctc ttccacatcg	180
acacttttct cccaaactcg acttcattct agcgactctt caatgacttt aaatacaatg	240
aagaagaggc ctgcaccgcc atctttacct tcgctcagca taaattcaca gtctaagtgc	300
aaaacactac ccgaactcgt acccatcgcc gatgtgtctg atggtaaaca tgatttagga	360
ttgaaacagc gtgtgatagc cgaaaatgag ttgtctggta atagtgactt aaccccttca	420
tcgatggcaa gccccctttc acatacaaac acctcttctc cctacctcag aaatgatctg	480
agcaattcag tgggatctga cttttcaaat ttgatatcgg catatgaaca aagttcaagt	540
cccatcaagt catcgcccc gcctaaatca tcttctgaat cgtacataga cttaaacagt	600
gtacgagatg ttgatcaatt ggatgaaaat ggttgaaaat atgcaaattt aaaagatagg	660
atcgagacat taggcattct aggagaagga gccggtggct ctgtttccaa gtgtaaattg	720
aaaaatggat caaaaatatt cgcttttaaaa gtgataaaca cattaaatac agatcccgag	780
tatcagaagc aaatattcag agaattacag tttaatagga gtttccaatc cgaatatatc	840
gtacgatatt atggaatggt tacggatgac gaaaactctt caatttatat tgctatggag	900
tacatgggtg ggcgatcgtt ggatgctatt tataaaaatt tgtagagcg tgggtgtagg	960
atcagtgaaa aagtcctggg gaagattgca gaagcgtac taagaggact atcatatttg	1020
catgaaaaaa aagttattca tagagatatt aagccccaga atattttact gaatgaaaat	1080
ggtcaggtga aactttgtga ttttggggtc agtggagaag ccgttaactc gctagccaca	1140
acattcacgg ggacgccatt ctatatggct ccagaaagga ttcaagggtca accatacagt	1200
gtcacatctg atgtatgggt acttggtatta acgattttgg aagtggcgaa cgggaaattt	1260
ccatgctctt ccgagaagat ggcagccaat atagctccct ttgaattggt aatgtggatt	1320
ttaacattta ctctgaatt aaaggatgaa cccgaatcta atatcatatg gagtccatca	1380

```

ttcaaatcct ttatcgacta ctgtctgaaa aaagatagtc gtgaacggcc atctccaaga 1440
caaatgatca atcatccttg gataaagggt caaatgaaaa aaaatgtcaa tatggaaaaa 1500
ttcgtgagga agtgctggaa agattaa 1527

```

```

<210> 3
<211> 508
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..508
<223> /mol_type="protein"
      /note="[CDS]:1..1527 from SEQ ID NO 2"
      /organism="Saccharomyces cerevisiae"

```

```

<400> 3
Met Ala Ser Leu Phe Arg Pro Pro Glu Ser Ala Lys Cys Asn Pro Asn
1      5      10      15
Ser Pro Arg Leu Lys Leu Pro Leu Leu Arg Asn Asn Gln Val Asp Glu
20     25     30
Asn Asn Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Gly Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Ser
35     40     45
Ser His Thr Pro Glu Pro Leu Thr Ser Ser Thr Ser Thr Leu Phe Ser
50     55     60
Gln Thr Arg Leu His Pro Ser Asp Ser Ser Met Thr Leu Asn Thr Met
65     70     75     80
Lys Lys Arg Pro Ala Pro Pro Ser Leu Pro Ser Leu Ser Ile Asn Ser
85     90     95
Gln Ser Lys Cys Lys Thr Leu Pro Glu Leu Val Pro Ile Ala Asp Val
100    105    110
Ser Asp Gly Lys His Asp Leu Gly Leu Lys Gln Arg Val Ile Ala Glu
115    120    125
Asn Glu Leu Ser Gly Asn Ser Asp Leu Thr Pro Ser Ser Met Ala Ser
130    135    140
Pro Phe Ser His Thr Asn Thr Ser Ser Pro Tyr Leu Arg Asn Asp Leu
145    150    155    160
Ser Asn Ser Val Gly Ser Asp Phe Ser Asn Leu Ile Ser Ala Tyr Glu
165    170    175
Gln Ser Ser Ser Pro Ile Lys Ser Ser Ser Gln Pro Lys Ser Ser Ser
180    185    190
Glu Ser Tyr Ile Asp Leu Asn Ser Val Arg Asp Val Asp Gln Leu Asp
195    200    205
Glu Asn Gly Trp Lys Tyr Ala Asn Leu Lys Asp Arg Ile Glu Thr Leu
210    215    220
Gly Ile Leu Gly Glu Gly Ala Gly Gly Ser Val Ser Lys Cys Lys Leu
225    230    235    240
Lys Asn Gly Ser Lys Ile Phe Ala Leu Lys Val Ile Asn Thr Leu Asn
245    250    255
Thr Asp Pro Glu Tyr Gln Lys Gln Ile Phe Arg Glu Leu Gln Phe Asn
260    265    270
Arg Ser Phe Gln Ser Glu Tyr Ile Val Arg Tyr Tyr Gly Met Phe Thr
275    280    285
Asp Asp Glu Asn Ser Ser Ile Tyr Ile Ala Met Glu Tyr Met Gly Gly
290    295    300
Arg Ser Leu Asp Ala Ile Tyr Lys Asn Leu Leu Glu Arg Gly Gly Arg
305    310    315    320
Ile Ser Glu Lys Val Leu Gly Lys Ile Ala Glu Ala Val Leu Arg Gly
325    330    335
Leu Ser Tyr Leu His Glu Lys Lys Val Ile His Arg Asp Ile Lys Pro
340    345    350
Gln Asn Ile Leu Leu Asn Glu Asn Gly Gln Val Lys Leu Cys Asp Phe
355    360    365
Gly Val Ser Gly Glu Ala Val Asn Ser Leu Ala Thr Thr Phe Thr Gly
370    375    380
Thr Pro Phe Tyr Met Ala Pro Glu Arg Ile Gln Gly Gln Pro Tyr Ser

```

385 Val Thr Ser Asp Val Trp Ser Leu Gly Leu Thr Ile Leu Glu Val Ala 400
 Asn Gly Lys Phe Pro Cys Ser Ser Glu Lys Met Ala Ala Asn Ile Ala 415
 Pro Phe Glu Leu Leu Met Trp Ile Leu Thr Phe Thr Pro Glu Leu Lys 430
 Asp Glu Pro Glu Ser Asn Ile Ile Trp Ser Pro Ser Phe Lys Ser Phe 445
 Ile Asp Tyr Cys Leu Lys Lys Asp Ser Arg Glu Arg Pro Ser Pro Arg 460
 Gln Met Ile Asn His Pro Trp Ile Lys Gly Gln Met Lys Lys Asn Val 480
 Asn Met Glu Lys Phe Val Arg Lys Cys Trp Lys Asp 495
 500 505

<210> 4
 <211> 195
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
 <221> source
 <222> 1..195
 <223> /mol_type="DNA"
 /organism="Saccharomyces cerevisiae"

<400> 4
 cctgagtaaa taagcgaatt tcttatgatt tatgattttt attattaaat aagttataaa 60
 aaaaataagt gtatacaaat tttaaagtga ctcttaggtt ttaaacgaa aattcttatt 120
 cttgagtaac tctttcctgt aggtcaggtt gctttctcag gtatagcatg aggtcgctct 180
 tattgaccac caccg 195

<210> 5
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> artificial sequences

<220>
 <221> source
 <222> 1..39
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Primer based on YKL161C from *Saccharomyces cerevisiae*"
 /organism="artificial sequences"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 6..11
 <223> /note="EcoRI restriction enzyme recognition site"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 12..17
 <223> /note="PspOMI restriction enzyme recognition site"

<400> 5
 ccccggaatt cgggcccaaca acaagaacgt gggcgatac 39

<210> 6
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> artificial sequences

<220>

```

<221> source
<222> 1..34
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Primer based on YKL161C from Saccharomyces cerevisiae"
      /organism="artificial sequences"

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> 5..10
<223> /note="XhoI restriction enzyme recognition site"

```

```

<400> 6
ccccctcgag catttaattg tgaatctttc ttcg

```

34

```

<210> 7
<211> 34
<212> DNA
<213> artificial sequences

```

```

<220>
<221> source
<222> 1..34
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Primer based on MKK1 from S. cerevisiae"
      /organism="artificial sequences"

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> 4..9
<223> /note="SalI restriction enzyme recognition site"

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> 9..14
<223> /note="XhoI restriction enzyme recognition site"

```

```

<400> 7
cccgtcgact cgagatggct tcactgttca gacc

```

34

```

<210> 8
<211> 29
<212> DNA
<213> artificial sequences

```

```

<220>
<221> source
<222> 1..29
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Primer based on MKK1 from S. cerevisiae"
      /organism="artificial sequences"

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> 4..9
<223> /note="SalI restriction enzyme recognitions site"

```

```

<400> 8
cccgtcgact taatctttcc agcacttcc

```

29

```

<210> 9
<211> 32
<212> DNA
<213> artificial sequences

```

```

<220>
<221> source

```

```

<222> 1..32
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Primer based on ADH1 from Saccharomyces cerevisiae"
      /organism="artificial sequences"

<220>
<221> misc_feature
<222> 5..10
<223> /note="BamHI restriction enzyme recognition site"

<220>
<221> misc_feature
<222> 11..16
<223> /note="SalI restriction enzyme recognition site"

<400> 9
ccccg gatcc gtcgaccctg agtaaataag cg
32

<210> 10
<211> 28
<212> DNA
<213> artificial sequences

<220>
<221> source
<222> 1..28
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Primer based on ADH1 from Saccharomyces cerevisiae"
      /organism="artificial sequences"

<220>
<221> misc_feature
<222> 6..11
<223> /note="BamHI restriction enzyme recognition site"

<400> 10
cccccg gatc ccggtggtgg tcaataag
28

<210> 11
<211> 15
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>
<221> source
<222> 1..15
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Primer based on HO gene"
      /organism="Saccharomyces cerevisiae"

<400> 11
ctgatatgtc tgagg
15

<210> 12
<211> 16
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>
<221> source
<222> 1..16
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Primer based on YKL161C gene promotor region"
      /organism="Saccharomyces cerevisiae"

<400> 12

```

cattggaaat tagggc

16

<210> 13
 <211> 2944
 <212> DNA
 <213> artificial sequences

<220>
 <221> source
 <222> 1..2944
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="Genetic construction comprising YKL161C gene promoter region, MKK1S386P gene and ADH1 gene terminator region from *S. cerevisiae*"
 /organism="artificial sequences"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 1..6
 <223> /note="EcoRI restriction enzyme recognition site"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 7..12
 <223> /note="PspOMI restriction enzyme recognition site"

<220>
 <221> promoter
 <222> 13..1204
 <223> /note="from *S. cerevisiae* YKL161C gene"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 1205..1210
 <223> /note="XhoI restriction enzyme recognition site"

<220>
 <221> gene
 <222> 1211..2737
 <223> /standard_name="MKK1S386P from *S. cerevisiae*"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 2738..2743
 <223> /note="SalI restriction enzyme recognition site"

<220>
 <221> terminator
 <222> 2744..2938
 <223> /note="From *S. cerevisiae* ADH1 gene"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 2939..2944
 <223> /note="BamHI restriction enzyme recognition site"

<400> 13	
gaattcgggc ccacaacaag aacgtgggcg atacagcaaa aaatcacttg aaataacaga	60
atcaagtttc ttatccgatt tcctactttt gagctccggc ttatgttgaa gatgttactt	120
ttctttgtct ctaagtgatc tttatttttc tggctccagt gaaatttggt aatagcatag	180
tcacttcaac taaagtctga tagtaatact tgcaaattatt gcaaaacttg gaagaatggt	240
aatgaatcat ttcttgacc attctttcaa tcatctcaat ctctgctgt gatgtttaag	300
tataacattg aagactatgc cctaatttcc aatgttattt agttttaagc atatctttgt	360

ttctaacagg aaactcaggc ccacatccgc aaaaaaatat gtgccaaaaa actttcaaca	420
cttcaaagat acttaccact gcaggaaaat aatctacgtg taacggtttg aaaataaatt	480
tgacttcata attggacata agtactccat cgccatccct ttttaaagaa gtttccacaa	540
gaatgaatgg ctaatcgcaa ctaaattctt tccttgcaaa cgtaacacag tatcgacatt	600
ttcttactca atccaacgaa ggaataacct atctaaaaa taaacgccgt agttttcagc	660
ccacaagacg tcattaaaag atttggttaat tataaaaaa gaaatatttc taccagcatg	720
attattcggt acttgaaagt ccccaataaa tttcactggt tccgttaact gttgtagtta	780
ttaaacgcag caaacagatt attttgaaca acaccggaga aacacgcgca gaccattcg	840
agttaaaaat agtaactcgc gatcaatcaa tgcaggaagc accgtaggaa ttagtaagaa	900
ctcgtatttt gattgaaaat gccatgaaag caattgactt gctgcagtaa aaagcgctgc	960
cacaaacttt gtaattttcg acaatgacgt tcttttcaga tggttactgt ctttttttgg	1020
aagaaacaaa agaaggtact tttatgatgt tatactaggc aaaaagccta tttaatgtaa	1080
gtcctaattg tcgtttgaga ctggatgaaa agggacaaaa tggaaggata actaaagggtg	1140
acttaccgcc agattaattc ggcctggaat agtttgatat cgaagaaaga ttcacaatta	1200
aatgctcgag atggcctcac tggtcagacc cccagaatct gcgaaatgca acccaaactc	1260
tcctagactt aaactgcccc tcttacgaaa taatcaggta gatgaaaata atatatactt	1320
gacgtcgaat gggagttcca ccacagctta cagtagccac accccagaac cactgacctc	1380
ttccacatcg acacttttct cccaaactcg acttcacct agcgactctt caatgacttt	1440
aaatacaatg aagaagaggc ctgcaccgcc atctttacct tcgctcagca taaattcaca	1500
gtctaagtgc aaaacactac ccgaactcgt acccatcgcc gatgtgtctg atggtaaaca	1560
tgatttagga ttgaaacagc gtgtgatagc cgaaaatgag ttgtctggta atagtgactt	1620
aacccttca tcgatggcaa gccccttttc acatacaaac acctcttctc cctacctcag	1680
aaatgatctg agcaattcag tgggatctga cttttcaaat ttgatatcgg catatgaaca	1740
aagttcaagt cccatcaagt catcgtccca gcctaaatca tcttctgaat cgtacataga	1800
cttaaacagt gtacgagatg ttgatcaatt ggatgaaaat ggttggaat atgcaaattt	1860
aaaagatagg atcgagacat taggcattct aggagaagga gccggtggct ctgtttccaa	1920
gtgtaaattg aaaaatggat caaaaatatt cgctttaaaa gtgataaaca cattaaatac	1980
agatcccag tatcagaagc aaatattcag agaattacag tttaatagga gttccaatc	2040
cgaatatatc gtacgatatt atggaatgtt tacggatgac gaaaactctt caatttatat	2100
tgctatggag tacatgggtg ggcgatcgtt ggatgctatt tataaaaatt tgtagagcg	2160
tggtggtagg atcagtgaaa aagtcctggg gaagattgca gaagcggtag taagaggact	2220
atcatatttg catgaaaaaa aagttattca tagagatatt aagccccaga atattttact	2280
gaatgaaaat ggtcagggtg aactttgtga ttttggggtc agtgaggag ccgtaactc	2340
gctagccaca acattcacgg ggacgccatt ctatatggct ccagaaagga ttcaagggtca	2400

ES 2 530 292 B2

accatacagt gtcacatctg atgtatggc acttggatta acgatttttg aagtggcgaa	2460
cgggaaatth ccatgctctt ccgagaagat ggcagccaat atagctccct ttgaattgtt	2520
aatgtggatt ttaacattta ctctgaatt aaaggatgaa cccgaatcta atatcatatg	2580
gagtccatca ttcaaactct ttatcgacta ctgtctgaaa aaagatagtc gtgaacggcc	2640
atctccaaga caaatgatca atcatccttg gataaagggt caaatgaaaa aaaatgtcaa	2700
tatggaaaaa ttcgtgagga agtgctggaa agattaagtc gaccctgagt aaataagcga	2760
atttcttatg atttatgatt ttattatta aataagttat aaaaaaata agtgtataca	2820
aattttaag tgactcttag gttttaaac gaaaattctt attcttgagt aactctttcc	2880
tgtaggtcag gttgctttct caggatatagc atgaggctgc tcttattgac caccaccggg	2940
atcc	2944



- ②① N.º solicitud: 201400935
②② Fecha de presentación de la solicitud: 21.11.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/80** (2006.01)
C12Q1/25 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	ES 2303452 A1 (UNIV. MADRID COMPLUTENSE) 01.08.2008, página 3, líneas 35-38; página 4, líneas 5-17; ejemplo 1; figura 1; reivindicaciones 1,10.	1-14
Y	RODRIGUEZ-PEÑA, J.M. et al., 'A yeast strain biosensor to detect cell wall-perturbing agents', JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, 2008, Vol. 133, No. 3, Páginas 311-317, ISSN: 0168-1656 (Print), Resultados y Discusión, Figuras 1 y 2.	1-14
Y	WATANABE, Y. et al., 'Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway', MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 1995, Vol. 15, No. 10, Páginas 5740-5749, ISSN: 0270-7306 (Print), Materiales y Métodos; Resultados, Figura 1.	1-14
A	YASHAR, B. et al., 'Yeast MEK-dependent signal transduction: response thresholds and parameters affecting fidelity', MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 1995, Vol. 15, No. 12, Páginas 6545-6553, ISSN: 0270-7306 (Print), todo el documento.	1-14
A	STRAEDE, A. et al., 'The effect of tea tree oil and antifungal agents on a reporter for yeast cell integrity signalling', YEAST, 2007, Vol. 24, No. 4, Páginas 321-334, ISSN: 0749-503X (print), ISSN: 1097-0061 (electronic), todo el documento.	1-14
A	JUNG, U.S. et al., 'Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase', MOLECULAR MICROBIOLOGY, 2002, Vol. 46, No. 3, Páginas 781-789, ISSN: 0950-382X, todo el documento.	1-14
A	WO 2004057033 A1 (ROSETTA INPHARMATICS LLC.) 08.07.2004, todo el documento.	1-14

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
10.02.2015

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/5

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

C12N, C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.02.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-14	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2303452 A1 (UNIV. MADRID COMPLUTENSE)	01.08.2008
D02	RODRIGUEZ-PÉÑA, J.M. et al., <i>J. Biotechnol.</i> , (2008), 133(3): 311-7.	2008
D03	WATANABE, Y. et al., <i>Mol. Cell. Biol.</i> , (1995), 15(10): 5740-9.	1995
D04	YASHAR, B. et al., <i>Mol. Cell. Biol.</i> , (1995), 15(12): 6545-53.	1995
D05	STRAEDE, A. et al., <i>Yeast</i> , (2007), 24(4): 321-34.	2007
D06	JUNG, U.S. et al., <i>Mol. Microbiol.</i> , (2002), 46(3):781-9.	2002
D07	WO 2004057033 A1 (ROSETTA INPHARMATICS LLC.)	08.07.2004

En D01, D02, D05 - D07 se divulgan diferentes construcciones génicas para la detección de sustancias antifúngicas con actividad directa o indirecta sobre la pared celular.

En D03 y D04 se describe el mutante de la MAPK kinasa, MMK1, caracterizado por el cambio Ser386Pro (MKK1^{S386P}).

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).****1.1 Reivindicaciones independientes 1, 10 y 14.**

1.1.1. El objeto de las reivindicación 1 consiste en una construcción génica que comprende (1) una secuencia promotora de un gen inducible por el factor de transcripción Rlm1 de la ruta de integridad celular de *Saccharomyces cerevisiae*, en particular la región promotora del gen *YKL161c*, (2) una secuencia de ADN cuya expresión da lugar a la proteína mutante MKK1^{S386P} y (3) una secuencia de terminación de la transcripción. La reivindicación 10 trata de un método para detectar compuestos antifúngicos que alteran la pared celular fúngica basado en la utilización de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* portadoras de la construcción génica de la reivindicación 1. También se reivindica un kit para llevar a cabo dicho método que comprende las construcciones génicas de la reivindicación 1 (Reivindicación 14).

En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D01-D07, no se ha divulgado ninguna construcción génica ni método para la detección de sustancias antifúngicas con actividad sobre la pared celular con las características técnicas referidas.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-14 es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).**2.1. Reivindicaciones independientes 1, 10 y 14.**

2.1.1. Los documentos D01-D03 constituyen el estado de la técnica más próximo. En D01-D02 se describe una construcción génica y un método para la detección de sustancias antifúngicas con actividad sobre la pared celular. En D03 se describen las propiedades fenotípicas de la mutación hiperactiva de MKK1, MKK1^{S386P}, que consiste en el cambio de Ser a Pro en la posición 386.

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de las reivindicaciones 1, 10 y 14 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de nuevas construcciones génicas y nuevos métodos y kits para la detección de sustancias antifúngicas.

2.1.3. El objeto de las reivindicación 1 consiste en una construcción génica que comprende (1) una secuencia promotora de un gen inducible por el factor Rlm1 de *Saccharomyces cerevisiae*, en particular, la del gen *YKL161c*, (2) la secuencia de ADN codificante de la proteína mutante MKK1^{S386P} y (3) una secuencia de terminación de la transcripción. La reivindicación 10 trata de un método para la detección de sustancias antifúngicas con actividad sobre la pared celular basado en la aplicación de la construcción génica de la reivindicación 1. Además, se reivindica un kit que comprende la construcción génica de la reivindicación 1 (reivindicación 14).

En los documentos D01-D02 se ha descrito y reivindicado una construcción génica caracterizada porque contiene un gen marcador cuya expresión está controlada por el promotor del gen *YKL161c* de *Saccharomyces cerevisiae*, en particular, dicho gen marcador es un gen de resistencia a un antibiótico. Además, en estos documentos se divulga un método de detección de sustancias antifúngicas con actividad sobre la pared celular basado en la sobreexpresión del gen marcador de dicha construcción génica inducida por una sustancia antifúngica (cf. D01: página 3, líneas 35 - 38; página 4, líneas 5 - 17; ejemplo 1, figura 1, reivindicaciones 1 y 10. D02: Resultados y Discusión, Figuras 1 y 2).

La diferencia técnica entre la construcción génica de la invención y la descrita en D01-D02 radica básicamente en el gen marcador empleado para la detección de sustancias antifúngicas. El uso del alelo *MKK1^{S386P}* en la invención se fundamenta en que la sobreexpresión de dicho alelo hiperactivo es letal para la célula (cf. página 6, líneas 25-29). Sin embargo, en D03 se describe la construcción plasmídica [*GAL1p-MKK1^{S386P}*] caracterizada porque la secuencia codificante del alelo *MKK1^{S386P}* está fusionada a la secuencia del promotor *GAL1p* inducible por galactosa. Dicha construcción plasmídica permite demostrar la fuerte inhibición del crecimiento celular causada por la sobreexpresión de *MKK1^{S386P}* (cf. D03: Materiales y Métodos; Resultados, Figura 1).

Por consiguiente, se estima que, ante el problema técnico planteado, el experto en la materia combinaría las enseñanzas divulgadas en D01-D02 y D03 llegando como resultado a la solución propuesta en las reivindicaciones 1, 10 y 14 o a una equivalente. Por todo ello, se considera que las reivindicaciones 1, 10 y 14, y las reivindicaciones dependientes 2-9, 11-13 no son inventivas sobre la base de los documentos D01-D03.

- 2.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-14 no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.