



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 284 514**

⑤① Int. Cl.:  
**C12N 15/54** (2006.01)  
**C12N 9/12** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **00951744 .2**  
⑧⑥ Fecha de presentación : **15.08.2000**  
⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1212431**  
⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **12.06.2002**

⑤④ Título: **Gen ERG8 de fosfomevalonato-quinasa (PMK) de *Candida albicans*.**

③⑩ Prioridad: **21.08.1999 GB 9919766**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2007**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2007**

⑦③ Titular/es: **AstraZeneca AB.**  
**151 85 Södertälje, SE**

⑦② Inventor/es: **Rosamond, John, David, Charles y**  
**Schnell, Norbert, Friedemann**

⑦④ Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 284 514 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

Gen ERG8 de fosfomevalonato-quinasa (PMK) de *Candida albicans*.

5 Esta invención se refiere a polinucleótidos identificados recientemente, polipéptidos codificados por estos polinucleótidos, a la producción de tales polinucleótidos y polipéptidos, y a los usos de dichos polinucleótidos y polipéptidos. Más específicamente, la invención se refiere al gen de fosfomevalonato-quinasa (PMK) (gen ERG8) de *Candida albicans* (*C. albicans*), a métodos para su expresión que producen la proteína fosfomevalonato-quinasa, a nuevos organismos híbridos para uso en tales métodos de expresión, a métodos para purificación de la proteína, a métodos para diagnosticar infección por *C. albicans* y a ensayos para identificar inhibidores de la enzima, inhibidores que tienen potencial como agentes anti-fúngicos.

15 *C. albicans* es un patógeno fúngico humano importante y el organismo diana más importante para investigación antifúngica. PMK es una enzima requerida para la biosíntesis de las subunidades isopreno que se utilizan como precursores en la síntesis de esteroides, dolicoles y ubiquinonas. Dado que PMK es una enzima biosintética esencial, los inhibidores de PMK deberían encontrar aplicación como agentes antifúngicos. Todas las especies sintetizan una proteína con actividad PMK; sin embargo, a lo largo de las especies, las enzimas difieren considerablemente en su secuencia de aminoácidos. Debido a problemas de selectividad (por ejemplo fúngica *versus* humana) es extremadamente importante optimizar inhibidores potenciales específicamente contra las enzimas diana fúngicas (es decir *C. albicans* o *Aspergillus fumigatus*) y no contra la enzima humana. Tales inhibidores de especies fúngicas cruzadas poseen especificidad amplia. Alternativamente, puede ser deseable utilizar un inhibidor que sea más selectivo, por ejemplo, uno que inhiba la PMK de *C. albicans*, pero no una proteína PMK fúngica homóloga pero no idéntica, tal como la de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*).

25 Teniendo en cuenta la incidencia incrementada de resistencia de los hongos a los agentes anti-fúngicos existentes y habida cuenta del estímulo ocasionado por el número creciente de infecciones fúngicas particularmente en personas con trastornos de inmunodeficiencia, trasplantes de órganos y cáncer, existe necesidad de medios nuevos de identificación de agentes anti-fúngicos potenciales.

30 Los autores de la presente invención han clonado ahora con éxito el gen ERG8 de *C. albicans* (al que se hace referencia en lo sucesivo como gen ERG8) y determinado su secuencia de nucleótidos de longitud total y la secuencia del polipéptido correspondiente (PMK) (al que se hace referencia en lo sucesivo como proteína ERG8) como se indica en la Figura 1 y en SEQ ID NO. 7 de esta solicitud, respectivamente. La secuencia de DNA codificante (SEQ ID NO. 6) del gen ERG8 de *C. albicans* aislada tiene una longitud de 1299 nucleótidos y la secuencia de la proteína correspondiente tiene una longitud de 433 aminoácidos (SEQ ID NO. 7). La proteína exhibe aproximadamente 45% de homología con la proteína correspondiente de *S. cerevisiae* y sólo aproximadamente 10% de homología con la de la proteína humana equivalente. El término homología, tal como se utiliza en esta memoria, adquiere la definición conocida y utilizada habitualmente por los biólogos moleculares. Dicho término se refiere a la identidad de secuencia entre dos secuencias tal como se evalúa por análisis de alineación ajustada óptimamente por ordenador utilizando un soporte lógico adecuado tal como Blast, Blast2, NCBI Blast2, WashU Blast2, FastA, Fasta3 y PILEUP, utilizando una matriz de registro tal como Blosum62. Tales paquetes de soporte lógico procuran aproximarse estrechamente al algoritmo de alineación "patrón oro" de Smith-Waterman. Así pues, el programa soporte lógico/motor de investigación preferido para uso en la evaluación del porcentaje de identidad o semejanza, es decir del modo en que se alinean dos secuencias de polipéptidos primarias es Smith-Waterman. La identidad se refiere a coincidencias directas, y la semejanza permite sustituciones conservadoras.

45 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido aislado o purificado que es proteína ERG8, así como variantes de la misma. La secuencia de polipéptidos preferida es la que se indica en SEQ ID NO. 7. El polipéptido de la enzima fosfomevalonato-quinasa de *C. albicans* completo tiene la secuencia de aminoácidos que se representa en SEQ ID NO. 7 en esta memoria. Los polipéptidos de la presente invención incluyen el polipéptido de SEQ ID NO. 7 así como polipéptidos que tienen, por orden creciente de preferencia, al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99% de identidad con el polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se representa en SEQ ID NO. 7.

55 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "aislada" se refiere a moléculas, sean secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, que están separadas de su entorno natural y se purifican o separan de al menos otro componente con el cual están asociadas naturalmente. Este término abarca también moléculas que se sintetizan artificialmente y se separan luego por purificación de sus materiales de síntesis. Así, se dice que un polinucleótido se aísla cuando el mismo se separa sustancialmente de otros polinucleótidos o nucleótidos contaminantes.

60 Aunque el polipéptido natural de SEQ ID NO. 7 y un polipéptido variante pueden poseer únicamente por ejemplo 80% de identidad, es probable que los mismos posean realmente un grado mayor de semejanza, dependiendo del número de codones disimilares que son cambios conservadores. La semejanza entre dos secuencias incluye coincidencias directas así como sustitutos de aminoácidos conservados que poseen propiedades estructurales o químicas similares, v.g. carga similar. Ejemplos de cambios conservadores (sustitutos de aminoácidos conservados) son, *inter alia*: alanina a glicina, isoleucina, valina o leucina; tirosina a fenilalanina o triptófano; y lisina a arginina o histidina.

## ES 2 284 514 T3

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica y pueden producirse sin alterar la actividad biológica del polipéptido resultante, cualquiera que sea el método de síntesis elegido. La expresión "sustitución conservadora" incluye el uso de un residuo derivatizado químicamente en lugar de un residuo no derivatizado con tal que dicho polipéptido exhiba la actividad de fijación deseada. Isómeros D así como otros derivados conocidos pueden emplearse también en sustitución de los aminoácidos existentes naturalmente. Véase, v.g., la patente U.S. No. 5.652.369, *Amino Acid Derivatives*, expedido el 29 de Julio de 1997. Las sustituciones se hacen preferiblemente, aunque no con carácter exclusivo, de acuerdo con las expuestas en la Tabla 1 como sigue:

TABLA 1

<b>Residuo original</b>	<b>Sustitución conservadora ilustrativa</b>
Ala (A)	Gly; Ser; Val; Leu; Ile; Pro
Arg (R)	Lys; His; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln; Arg; Lys
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; His; Asn
Met (M)	Leu; Tyr; Ile; Phe
Phe (F)	Met; Leu; Tyr; Val; Ile; Ala
Pro (P)	Ala; Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala

Las secuencias de nucleótidos de la presente invención pueden modificarse también por ingeniería genética a fin de alterar una secuencia codificante por una diversidad de razones, que incluyen, pero sin carácter limitante, alteraciones que modifican la clonación, el procesamiento y/o la expresión del producto génico. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica, v.g. mutagénesis orientada para insertar nuevos sitios de restricción, alterar los patrones de glicosilación, cambiar la preferencia de codones, etc.

Dentro del alcance de la presente invención se incluyen alelos de la molécula ERG8 de la presente invención. Como se utiliza en esta memoria, un "alelo" o "secuencia alélica" es una forma alternativa de la molécula de quinasa descrita en esta memoria. Los alelos resultan de mutaciones de ácido nucleico y variantes de corte y empalme de mRNA que producen polipéptidos cuya estructura o función puede estar alterada o no. Cualquier gen dado puede tener ninguna, o una o muchas formas alélicas. Los cambios mutacionales comunes que dan lugar a alelos se adscriben generalmente a deleciones, adiciones o sustituciones naturales de aminoácidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede existir aisladamente, o en combinación con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

Así, de acuerdo con una realización preferida, se proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia representada en SEQ ID NO. 7 o una secuencia que posee al menos 80% de semejanza con ella. Realizaciones más preferidas son aquéllas que tienen, en orden creciente de preferencia, al menos 85, 90, 95, 96, 97, 98, y 99% de semejanza con la secuencia representada en SEQ ID NO. 7. Se prefieren variantes funcionales biológicamente activas.

Fragmentos de tales polipéptidos que comprenden al menos 15, preferiblemente al menos 30 y más preferiblemente al menos 50 aminoácidos contiguos están abarcados también por la presente invención. Tales fragmentos pueden utilizarse como compuestos intermedios para generar fragmentos de polipéptidos más largos que incluyen preferible-

## ES 2 284 514 T3

mente la secuencia del polipéptido de longitud total que se representa en SEQ ID NO. 7, o una variante funcional de la misma. Tales fragmentos polipeptídicos pueden utilizarse también para generar anticuerpos contra o específicos para partes de la proteína ERG8.

5 La invención se refiere también a secuencias de polipéptidos variantes codificadas por un ácido nucleico capaz de hibridarse con el ácido nucleico codificante del polipéptido natural (SEQ ID NO. 6, o su cadena antisentido complementaria) (o podría hacerlo excepto por la degeneración del código genético), por ejemplo en condiciones severas (tales como a 35°C hasta 65°C en una solución salina de aproximadamente 0,9 M). Tales polinucleótidos hibridables forman también parte de la invención. La presente invención se refiere particularmente a polinucleótidos que se  
10 hibridan a la secuencia del polinucleótido ERG8 representada en SEQ ID NO. 6, su secuencia complementaria, o fragmento de la misma, en condiciones severas. Como se utiliza en esta memoria, condiciones severas son aquellas condiciones que permiten que secuencias que poseen al menos 80%, preferiblemente al menos 90% y más preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia se hibriden unas a otras. Así, ácidos nucleicos que pueden hibridarse selectivamente al ácido nucleico de SEQ ID NO. 6, o la cadena antisentido complementaria de la misma, incluyen  
15 ácidos nucleicos que tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, todavía más preferiblemente al menos 98% de identidad de secuencia y muy preferiblemente 100%, sobre al menos una porción del ácido nucleico codificante del gen ERG8 descrito en esta memoria. Hibridarse selectivamente significa que la molécula tiene que ser capaz de hibridarse específicamente con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO. 6 o su complemento, con exclusión de otras secuencias existentes naturalmente. Al igual que las secuencias génicas de longitud total, fragmentos de ácido nucleico más pequeños, por ejemplo iniciadores oligonucleotídicos que pueden utilizarse para amplificar el gen ERG8 utilizando cualquiera de los sistemas de amplificación bien conocidos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o fragmentos que pueden utilizarse como sondas de diagnóstico para identificar secuencias de ácido nucleico correspondientes, forma también parte de esta invención. La invención incluye por tanto polinucleótidos de longitud más corta que la secuencia del gen ERG8 de longitud total representada  
25 en SEQ ID NO. 6, que son capaces de hibridarse específicamente al ácido nucleico que codifica el gen ERG8 de *C. albicans* descrito en esta memoria. Tales polinucleótidos pueden tener una longitud de al menos 10 nucleótidos, con preferencia al menos 15, más preferiblemente al menos 20 y muy preferiblemente al menos 30 nucleótidos de longitud y pueden ser de cualquier tamaño hasta la secuencia nucleotídica de ERG8 de longitud total inclusive. La presencia de nucleótidos de desapareamiento en los polinucleótidos de hibridación no es perjudicial para la utilidad de tales polinucleótidos, con tal que los mismos sean capaces de hibridarse selectivamente a la secuencia nucleotídica ERG8  
30 diana.

Un ejemplo de una solución de hibridación adecuada cuando un ácido nucleico está inmovilizado sobre una membrana de nailon y el ácido nucleico sonda es mayor que 500 bases o pares de bases es; 6 x SSC (solución salina de citrato sódico), 0,5% SDS (dodecil-sulfato de sodio), 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón tratado por ultrasonidos y desnaturalizado); realizándose la hibridación a 68°C durante al menos una hora, y lavándose luego los filtros a 68°C en 1 x SSC, o para mayor severidad, 0,1 x SSC/0,1% SDS.  
35

Un ejemplo de una solución de hibridación adecuada cuando un ácido nucleico está inmovilizado sobre una membrana de nailon y la sonda es un oligonucleótido de una longitud comprendida entre 12 y 50 bases es; cloruro de trimetilamonio (TMACl) 3M, fosfato de sodio 0,01 M (pH 6,8), EDTA 1 mM (pH 7,6), 0,5% de SDS, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón tratado por ultrasonidos y desnaturalizado, y 0,1% de leche desnatada desecada. La temperatura óptima de hibridación (T<sub>m</sub>) se elige usualmente de modo que sea 5°C inferior al T<sub>i</sub> de la cadena híbrida. T<sub>i</sub> es la temperatura de fusión irreversible del híbrido formado entre la sonda y su diana. Si existen cualesquiera desapareamientos entre la sonda y la diana, la T<sub>m</sub> será menor. Como orientación general, la temperatura de hibridación recomendada para 17-meros en TMACl 3M es 48-50°C; para 19-meros, es 55-57°C; y para 20-meros, es 58-66°C.  
40  
45

Un protocolo de hibridación adecuado se describe en el Ejemplo 5 de esta memoria; sin embargo, variaciones operativas de este método serán evidentes para personas expertas en la técnica.  
50

Tal como se utiliza en esta memoria, el término “variante” incluye variantes alélicas existentes naturalmente así como variantes que no existen naturalmente, fragmentos y análogos de las secuencias representadas en SEQ ID Nos. 6 ó 7. Tales variantes incluyen variantes truncadas en C o en N, variantes de delección, variantes de sustitución así como variantes de adición e inserción. El término “análogo” hace referencia a proproteínas que pueden activarse por escisión de la porción proproteínica para liberar el polipéptido o la proteína biológicamente activo(a). El término “derivado” hace referencia a un polipéptido codificado por un gen ERG8 modificado químicamente, por ejemplo uno en el cual el hidrógeno se ha reemplazado por un grupo acilo o amino, así como polipéptidos que poseen uno o más aminoácidos no naturales. Cuando se hace referencia a una secuencia de polipéptido o proteína, una variante funcional es una que ha retenido al menos algo de la actividad enzimática de PMK. Los polipéptidos variantes de la presente invención pueden comprender secuencias flanqueantes internas, pero preferiblemente terminales (proteínas de fusión) para facilitar la purificación de la proteína. Tales secuencias de “dominios adicionales” (secuencias Bandera) pueden comprender por ejemplo, polipéptidos formadores de quelatos metálicos tales como módulos histidina-triptófano (con inclusión de marcadores 6-his) que permiten la purificación del polipéptido sobre metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación de inmunoglobulina inmovilizada, o dominios peptídicos que permiten la purificación sobre anticuerpos inmovilizados específicos para el péptido. Otros “dominios de purificación adicionales” adecuados serán conocidos por las personas expertas en la técnica.  
55  
60  
65

## ES 2 284 514 T3

De acuerdo con una realización preferida de la invención, la secuencia del polipéptido ERG8 nativa (que tiene la secuencia representada en SEQ ID NO. 7) está fusionada en su término amino a 6 residuos histidina que sirven para permitir que el polipéptido, una vez expresado por la célula hospedadora, se aísle y purifique por cromatografía de afinidad utilizando una resina de quelato de Ni.

Un dominio de purificación flanqueante puede estar separado del polipéptido ERG8 por una secuencia de escisión tal como la reconocida por trombina o Factor Xa a fin de facilitar la liberación del polipéptido de la secuencia flanqueante que puede estar unida o no a un soporte inmovilizado. Alternativamente, puede emplearse bromuro de cianógeno, que escinde en los residuos metionina para liberar el polipéptido deseado de su secuencia flanqueante.

Los polipéptidos de la invención pueden sintetizarse químicamente. Por ejemplo, por la técnica de Merryfield (J. Amer. Chem. Soc. **85**; 2149-2154, 1968). Numerosos sintetizadores automáticos de polipéptidos, tales como el Sintetizador de Péptidos Applied Biosystems 431A existen también actualmente. Alternativamente, y de modo preferible, los polipéptidos de la invención se producen a partir de una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido utilizando tecnología de expresión recombinante.

En un aspecto adicional de la invención, se proporcionan polinucleótidos aislados (con inclusión de DNA genómico, RNA genómico, cDNA y mRNA; tanto bicatenarios como cadenas +ve y -ve) que codifican los polipéptidos de la invención. Las moléculas de DNA monocatenarias de la totalidad o parte del gen ERG8, sean cadena +ve o -ve, encuentran utilidad, entre otras cosas, como sondas de hibridación o iniciadores de amplificación PCR. La cadena de sentido de la secuencia génica completa de ERG8 nativo se representa en la Figura 1 (SEQ ID NO. 5) más adelante en esta memoria. Se apreciará que un polinucleótido de la invención puede comprender cualquiera de los códigos degenerados para un aminoácido particular, con inclusión del uso de codones raros. De hecho, cuando se produce el polipéptido por expresión recombinante en cepas hospedadoras heterólogas, puede ser deseable adoptar el uso de codones (preferencia) del organismo hospedador (Murray, N.A.R. **17**; 477-508, 1989).

Así pues, de acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO. 7 o una variante de la misma, tal como uno que posee al menos 80% de identidad con dicha secuencia.

La invención comprende adicionalmente fragmentos convenientes de una cualquiera de las secuencias polinucleótido/ácido nucleico anteriores. Fragmentos convenientes pueden definirse por materiales digeridos con endonucleasas de restricción de ácido nucleico que comprenden la secuencia del gen ERG8. Tales fragmentos son útiles entre otras cosas para expresar fragmentos de polipéptidos cortos de la proteína ERG8 de la invención así como para uso como sondas de hibridación. La presente invención proporciona también una sonda polinucleotídica que comprende una cualquiera de las secuencias o fragmentos anteriores junto con un identificador o marcador conveniente, preferiblemente un identificador o marcador no radiactivo. Siguiendo procedimientos bien conocidos en la técnica, las sondas pueden utilizarse para identificar y aislar no sólo secuencias de ácido nucleico correspondientes (es decir secuencias del ERG8 de *C. albicans*) sino que pueden utilizarse también, en caso de ser suficientemente homólogas, para identificar el gen análogo a partir de otros organismos utilizando métodos bien conocidos por las personas expertas en la técnica. Tales secuencias pueden estar incluidas en genotecas, tales como genotecas genómicas o genotecas de cDNA. La presente invención proporciona también transcritos de RNA correspondientes a cualquiera de las secuencias o fragmentos ERG8 de *C. albicans* anteriores. Pueden utilizarse transcritos de RNA para preparar un polipéptido de la invención por técnicas de traducción *in vitro* de acuerdo con métodos conocidos (Sambrook *et al.* "Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2ª edición, 1989"). La invención comprende adicionalmente la longitud total o longitudes de segmentos del gen ERG8 (secuencia codificante) flanqueadas por secuencia no codificante que puede incluir secuencias naturales o no naturales que contienen motivos de secuencias de reconocimiento por enzimas de restricción. La incorporación de sitios de reconocimiento por enzimas de restricción adecuadas a cualquier lado de la región codificante de ERG8, o de hecho cualquier secuencia polinucleotídica de ERG8, facilita la clonación del gen o secuencia polinucleotídica ERG8 en un vector adecuado. Un polinucleótido adecuado comprende un gen ERG8 de *C. albicans* de longitud total (codificante del polipéptido que comienza con metionina en la posición 1 y termina con la leucina que precede al codón TAA de parada en la posición 1299 de la Figura 1) flanqueado por sitios de restricción singulares HindIII (extremo 5')-XhoI (extremo 3'). Ejemplos de iniciadores oligonucleotídicos que son adecuados para uso en la amplificación de ERG8 por PCR, y que incorporan sitios de enzimas de restricción útiles para facilitar la clonación, se describen como SEQ ID Nos. 10 y 11. Pueden introducirse cambios o mutaciones de nucleótidos en una secuencia polinucleotídica por síntesis de polinucleótidos *de novo*, por mutagénesis orientada utilizando iniciadores polinucleotídicos diseñados adecuadamente o por cualquier otro medio conveniente conocido por las personas expertas en la técnica.

Para propósitos de expresión, puede ser ventajoso modificar por ingeniería genética un sitio de restricción en el extremo 5' que es también capaz de reconstituir la metionina amino-terminal nativa de la proteína. La secuencia de reconocimiento por escisión para la enzima de restricción NcoI incluye no sólo una secuencia que codifica metionina, sino también una que es capaz de retener una secuencia de consenso Kozak funcional, permitiendo que el gen ERG8 se clone en el extremo 3' de un elemento promotor adecuado en un vector de expresión.

Los polinucleótidos pueden sintetizarse químicamente, o aislarse por uno de varios métodos conocidos por las personas expertas en la técnica tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la reacción en cadena de la ligasa (LCR) o por clonación a partir de una genoteca genómica o genoteca de cDNA.

Una vez aisladas o sintetizadas, pueden utilizarse una diversidad de sistemas vector de expresión/hospedador pueden utilizarse para expresar secuencias codificantes de ERG8. Estas incluyen, pero sin carácter limitante, microorganismos tales como bacterias expresadas con plásmidos, cósmidos o bacteriófago; levaduras transformadas con vectores de expresión; sistemas de células de insecto transfectados con sistemas de expresión de baculovirus; sistemas de células vegetales transfectados con sistemas de expresión de virus de plantas, tales como el virus del mosaico de la coliflor; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo los transfectados con vectores de adenovirus); la selección del sistema más apropiado es una cuestión de elección.

Los vectores de expresión incluyen usualmente un origen de replicación, un promotor, un sitio de iniciación de la traducción, opcionalmente un péptido de señal, un sitio de poliadenilación, y un sitio de terminación de la transcripción. Estos vectores contienen también usualmente uno o más genes marcadores de resistencia a antibióticos para selección. Como se ha indicado arriba, vectores de expresión adecuados pueden ser plásmidos, cósmidos o virus tales como fago o retrovirus. La secuencia codificante del polipéptido se pone bajo el control de un promotor apropiado, elementos de control y terminador de la transcripción a fin de que la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido se transcriba en RNA en la célula hospedadora transformada o transfectada por el constructo del vector de expresión. La secuencia codificante puede contener o no un péptido de señal o secuencia conductora para secreción del polipéptido fuera de la célula hospedadora. La expresión y purificación de los polipéptidos de la invención puede realizarse fácilmente utilizando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo como se describe en Sambrook *et al.* "Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2ª edición, 1989").

Los vectores que contienen el DNA codificante de los polipéptidos ERG8 de la invención pueden introducirse (es decir transformarse o transfectarse) en *E. coli*, *S. cerevisiae*, *Pichia pastoris* o cualquier otro hospedador adecuado para facilitar su manipulación (es decir para mutagénesis, clonación o expresión). La eficiencia de la invención no depende de ni está limitada a ninguna cepa particular de célula hospedadora o vector. Los adecuados para uso en la invención serán evidentes para y cuestión de elección por la persona experta en la técnica.

Células hospedadoras transformadas o transfectadas con un vector que contiene una secuencia de nucleótidos de ERG8 pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de las proteínas codificadas a partir del cultivo de células. Tales proteínas/polipéptidos expresados pueden secretarse en el medio de cultivo o pueden estar contenidos intracelularmente dependiendo de las secuencias utilizadas, es decir de si estaban presentes o no secuencias de señal de secreción adecuadas.

La proteína ERG8 nativa de longitud total aislada de *C. albicans* (enzima PMK) de la presente invención, o una variante funcional de la misma, es útil como diana en ensayos bioquímicos, particularmente para uso en la identificación de inhibidores de la enzima. Sin embargo, para proporcionar enzima suficiente para ensayos bioquímicos (por ejemplo, para uso en una selección de alta potencia para inhibidores enzimáticos) la enzima tiene que expresarse a niveles altos y debe ser purificada. Dos limitaciones principales dificultan la expresión y purificación de ERG8; (i) ERG8 no es expresada a niveles altos por *C. albicans*, y (ii) la metodología de expresión y purificación de proteínas no está muy avanzada para *C. albicans*.

Los autores de la invención han conseguido ahora resolver estos problemas por una sobre-expresión controlada de la ERG8 de *C. albicans* en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* es un sistema modélico para expresión y purificación de proteínas recombinantes. El uso de *S. cerevisiae* para expresar ERG8 de *C. albicans* significa que la metodología de transformación, expresión y purificación utilizada para producir y aislar la proteína ERG8 puede seguir procedimientos publicados. Como se ha expuesto anteriormente, la invención no se limita al uso de *S. cerevisiae* como el hospedador para la expresión de ERG8 de *C. albicans*.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una célula hospedadora adaptada para expresar el polipéptido ERG8 de *C. albicans* o una variante del mismo. La levadura *S. cerevisiae* es la célula hospedadora de elección preferida. De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un nuevo sistema de expresión para la expresión del gen ERG8 de *C. albicans*, sistema que comprende una cepa hospedadora de *S. cerevisiae* que tiene el gen ERG8 de *C. albicans* en lugar del gen ERG8 nativo de *S. cerevisiae*, con lo cual se expresa el gen ERG8 de *C. albicans*. Cepas preferidas de *S. cerevisiae* incluyen JK9-3Dax y sus segregantes haploides.

El gen ERG8 de *C. albicans* se sobre-expresa preferiblemente con relación a la expresión derivada de su propio promotor. Esto se consigue convenientemente reemplazando el promotor de ERG8 de *C. albicans* por un promotor más fuerte y preferiblemente inducible tal como el promotor GAL1 de *S. cerevisiae*, factor alfa o alcohol-oxidasa (para revisiones, véase Ausubel *et al.* "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, Nueva York).

El nuevo sistema de expresión se prepara convenientemente por transformación de una cepa de delección heterocigótica de ERG8 de un hospedador *S. cerevisiae* conveniente por un plásmido adecuado que comprende el gen ERG8 de *C. albicans* utilizando métodos bien conocidos en la técnica (Ito *et al.* J. Bacteriol. **153**; 163-168, 1983; Schiestl y Grietz, Current Genetics **16**; 339-346, 1989).

El plásmido que comprende el ERG8 de *C. albicans* representa un aspecto adicional de la invención. Plásmidos particularmente adecuados para expresión de ERG8 de *C. albicans* en *S. cerevisiae* incluyen pYES2 (Invitrogen) y plásmidos derivados de pYES2 que llevan un promotor de *S. cerevisiae* nativo tal como el promotor gliceraldehído-3-deshidrogenasa.

## ES 2 284 514 T3

La cepa de delección heterocigótica de ERG8 de un hospedador *S. cerevisiae* diploide se obtiene convenientemente por disgregación utilizando preferiblemente una casete de resistencia a antibióticos tal como la casete de resistencia a la kanamicina descrita por Wach *et al* (Yeast, **10**; 1793-1808, 1994).

5 Como se ha descrito anteriormente, la enzima ERG8 de *C. albicans* puede utilizarse en ensayos bioquímicos para identificar agentes que modulan la actividad de la enzima. El diseño y la implementación de tales ensayos será evidente para el bioquímico con experiencia ordinaria. La enzima puede utilizarse para renovar un sustrato conveniente incorporando/perdiendo al mismo tiempo un componente marcado que define un sistema de test. Los compuestos de test se introducen en el sistema de test y se realizan las medidas para determinar su efecto sobre la actividad de la  
10 enzima. Dichos ensayos son útiles para identificar inhibidores de la enzima que pueden resultar luego valiosos como agentes antifúngicos.

Así, en un aspecto adicional de la invención se proporciona el uso de un gen de ERG8 de *C. albicans* y/o enzima PMK de *C. albicans* en un ensayo para identificar inhibidores de la enzima. En particular. Se proporciona su uso en  
15 investigación farmacéutica o agroquímica.

Así, de acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método de identificar compuestos que modulan, preferiblemente inhiben, la actividad de fosfomevalonato-quinasa (PMK), que comprende poner en contacto un compuesto de test con un polipéptido de la invención y determinar el efecto que el compuesto de test tiene sobre la  
20 actividad del polipéptido.

La proteína PMK (ERG8) cataliza la conversión de fosfomevalonato + ATP en pirofosfomevalonato + ADP. A modo de ejemplo no limitante, la actividad de la enzima ERG8 puede determinarse por (i) medida del aumento en la producción de ADP, (ii) seguimiento de la pérdida de ATP, o (iii) monitorización de la transferencia del marcador radiactivo (a saber, H<sup>3</sup>, C<sup>14</sup>, P<sup>32</sup>) en fosfomevalonato.  
25

Un ensayo adecuado que mide la producción de ADP implica el acoplamiento del ADP producido por la acción de PMK sobre sustrato de fosfomevalonato + ATP con piruvato-quinasa y fosfoenolpiruvato para formar piruvato y ATP. El piruvato se reduce luego a lactato con lactato-deshidrogenasa, que convierte NADH en NAD. La producción  
30 de NAD (ligada directamente a la producción de ADP indicativa de la acción de PMK) se mide convenientemente por detección del cambio en absorbancia a 340 nm (producto de oxidación de NADH). En este ensayo, los compuestos de test que inhiben la actividad de PMK se identifican por determinación de la aptitud de un compuesto para inhibir la actividad de MPK como se evalúa por una reducción en la producción de ADP calibrada por una reducción en la producción de NAD a partir de NADH utilizando piruvato-quinasa y lactato-deshidrogenasa como enzimas de  
35 acoplamiento como se ha descrito arriba. La persona experta en la técnica será capaz de desarrollar otros ensayos para medir la actividad de PMK sin aporte de inventiva.

El ATP puede ser ensayado convenientemente utilizando kits disponibles comercialmente (a saber, de Boehringer Mannheim) para monitorizar la luminiscencia resultante de la oxidación de luciferina a luciferasa (Ford *et al.* J. Biolumin. Chemilumin. **11**; 149-167, 1996).  
40

Una reacción adecuada que mide la producción de fosfomevalonato marcado radiactivamente implica la incubación de la enzima PMK con cofactores, ATP sustrato y fosfomevalonato, uno de los cuales lleva un marcador radiactivo. Después de la reacción, el pirofosfomevalonato puede separarse del sustrato que no ha reaccionado por electroforesis  
45 de alto voltaje a pH 3,5 sobre papel 3MM y la cantidad de radiactividad incorporada en el pirofosfomevalonato puede medirse por recuento de centelleo (Lee y O'Sullivan, J. Biol. Chem. **260**; 13909-13915, 1985).

Cualquier compuesto de test conveniente o genoteca de compuestos de test puede ser utilizado(a) en asociación con el ensayo de test. En particular, compuestos de test incluyen compuestos químicos de peso molecular bajo (preferiblemente con un peso molecular menor que 1500 daltons) adecuados como agentes farmacéuticos o veterinarios para uso humano o animal, o compuestos para uso no administrado tales como agentes de limpieza/esterilización o para uso agrícola.  
50

La enzima ERG8 de la invención, y fragmentos convenientes de la misma puede(n) utilizarse para producir anticuerpos. Tales anticuerpos tienen numerosos usos que serán evidentes para el biólogo o inmunólogo molecular con experiencia ordinaria. Tales usos incluyen, pero sin carácter limitante, monitorización de la expresión enzimática, desarrollo de ensayos para medir actividad enzimática, precipitación o purificación de la enzima y como herramienta de diagnóstico para detectar *C. albicans*. Los ensayos de inmunosorbente unido a enzima (ELISAs) son bien conocidos en la técnica y podrían ser particularmente adecuados para detectar el polipéptido ERG8 o fragmentos del mismo. Los anticuerpos producidos contra los polipéptidos de la invención pueden ser policlonales, obtenidos por ejemplo por inyección del o de los polipéptidos en un mamífero seleccionado (a saber, conejo, ratón, cabra o caballo), y recogida posterior del suero inmunizado a partir del animal y tratamiento de éste de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Dependiendo de la especie hospedadora, pueden utilizarse diversos adyuvantes para mejorar la respuesta inmunológica contra el polipéptido inyectado. Adyuvantes adecuados incluyen, pero sin carácter limitante, Freud's, hidróxido de aluminio y SAF. Los anticuerpos pueden ser también anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma, genotecas de presentación de fago u otra metodología. Los anticuerpos monoclonales pueden derivarse, entre otros, de humano, rata o ratón. Para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, pueden prepararse células de hibridoma por fusión de células del bazo de un animal inmunizado, v.g. un ratón, con una célula tumoral.  
55  
60  
65

Células que secretan adecuadamente hibridoma pueden seleccionarse después (Koehler & Milstein, Nature, **256**; 495-497, 1975; Cole *et al.*, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss Inc, Nueva York, N.Y., pp 77-96). Los anticuerpos de roedor pueden estar humanizados utilizando tecnología de DNA recombinante de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Alternativamente, pueden desarrollarse también anticuerpos quiméricos, anticuerpos monocatenarios, o fragmentos Fab contra los polipéptidos de la invención (Huse *et al.*, Science, **256**; 1275-1281, 1989), utilizando métodos conocidos en la técnica.

Los polinucleótidos y anticuerpos de la invención pueden utilizarse en metodologías gen-sonda o proteína-sonda, con o sin amplificación (por ejemplo, por PCR o por detección de segundo anticuerpo) a fin de detectar o diagnosticar la presencia de *C. albicans*. Esto es particularmente valioso en el diagnóstico de infecciones clínicas. De acuerdo con ello, la invención proporciona kits de diagnóstico para detección de ERG8 de *C. albicans* o fragmentos del mismo, y proporciona el uso de proteína ERG8, fragmentos polipeptídicos de la misma y/o anticuerpos producidos contra ellos como control positivo. Los reactivos en el kit pueden estar compartimentados y el kit puede comprender también instrucciones para uso.

Los diagnósticos de DNA están basados en tecnología de hibridación DNA/RNA, es decir la fijación específica *in vitro* de ácido nucleico monocatenario complementario con la formación de ácido nucleico bicatenario. Las dobles cadenas DNA/DNA o DNA/RNA formadas se denominan híbridos. Para detectar la presencia de *C. albicans* en un fluido corporal tal como sangre, se aísla el ácido nucleico total de la muestra del fluido de test utilizando técnicas estándar y se detecta la presencia de ácido nucleico de ERG8 de *C. albicans* en la muestra utilizando por ejemplo sondas marcadas detectablemente que comprenden uno o más de los polinucleótidos de la invención. Las sondas pueden ser sondas cortas de oligonucleótidos sintetizados químicamente con una longitud de aproximadamente 10-50 nucleótidos, o pueden ser fragmentos expresados recombinantemente del gen ERG8 de 0,3-1,5 Kb de tamaño aproximado. Se prefieren sondas oligonucleotídicas monocatenarias que son específicas para *C. albicans*. La sonda puede estar provista de un marcador molecular informador detectable adecuado tal como un radioisótopo ( $P^{32}$ , tritio,  $C^{14}$  o  $S^{35}$ ), o un marcador no radiactivo tal como digoxigenina o biotina, utilizando métodos disponibles para las personas expertas en la técnica. Antes de la reacción de hibridación, la totalidad o alguna parte del DNA de ERG8 de *C. albicans* que contiene la secuencia a la que puede hibridarse la sonda, presente en la muestra de test, se amplifica utilizando por ejemplo PCR (reacción en cadena de la polimerasa) o LCR (reacción en cadena de la ligasa). Para la reacción de hibridación específica, el ácido nucleico de test y, en caso necesario, el DNA sonda se convierte en cadenas simples por desnaturalización (calor o álcali) y se hibridan luego de modo muy específico uno a otro en condiciones severas. En condiciones apropiadas, la sonda génica se hibrida únicamente a las secuencias complementarias del DNA o RNA a detectar. El ensayo de hibridación y detección puede llevarse a cabo en varios formatos diferentes conocidos por las personas expertas en la técnica, que incluyen hibridación en fase sólida del DNA o sonda diana acoplado(a) a un soporte sólido tal como nitrocelulosa o cuentas magnéticas. El complejo de hibridación puede determinarse luego cuantitativamente, después de la separación de la sonda sin marcar o el ácido nucleico de test, por la vía del marcador de molécula informadora (v.g. fluorescente o radiactivo) empleado.

La sensibilidad del test de este método de diagnóstico simple gen-sonda puede aumentarse por combinación con técnicas de amplificación de DNA o RNA tales como PCR o LCR. Utilizando dichas técnicas de amplificación, el DNA a detectar puede multiplicarse por hasta  $10^9$ .

Pueden existir solamente 100-1000 organismos por ml de sangre en asociación con infecciones de Candida. Dichos pequeños números de células son fácilmente detectables cuando se combinan las técnicas de amplificación y detección DNA-sonda ofreciendo la posibilidad de detección precoz de una infección.

Así, de acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método de diagnóstico de la presencia del gen ERG8 de *C. albicans* en una muestra de test, que comprende; poner en contacto una sonda polinucleotídica de al menos 15 nucleótidos de longitud, sonda que es capaz de hibridarse específicamente con la secuencia representada en SEQ ID NO. 6, con la muestra de test en condiciones que permiten la formación de dúplex entre dicha sonda polinucleotídica y el ácido nucleico contenido en la muestra de test; y detectar la formación de dúplex. En una realización preferida, la sonda polinucleotídica se marca detectablemente. En otra realización, la sonda polinucleotídica es monocatenaria. En otra realización, la sonda polinucleotídica es completamente complementaria a la secuencia diana a detectar. De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, la sonda polinucleotídica se sustituye por un par de iniciadores oligonucleotídicos capaces de amplificación específica por PCR de la totalidad o una parte del gen ERG8 en la muestra de test, con identificación subsiguiente del producto de amplificación.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un kit de diagnóstico para diagnosticar o detectar la presencia de *C. albicans*, que comprende una o más sondas de diagnóstico y/o iniciadores de diagnóstico y/o anticuerpos capaces de hibridarse selectivamente o fijarse al polinucleótido de SEQ ID NO. 6 o el polipéptido de SEQ ID NO. 7, o a secuencias variantes de los mismos como se definen en esta memoria.

En una realización preferida, las sondas de diagnóstico (detección) se proporcionan en una microrred.

Tales kits pueden comprender adicionalmente uno o más tampones y/o polimerasas apropiados(as) tales como polimerasas termoestables, por ejemplo la polimerasa taq. Aquéllos pueden comprender también iniciadores asociado/constantes y/o iniciadores de control o sondas. Un iniciador asociado/constante es uno que forma parte del par de iniciadores utilizados para realizar la PCR. Dicho iniciador complementa usualmente la cadena molde con precisión.

## ES 2 284 514 T3

En otra realización, el kit es un kit ELISA que comprende uno o más anticuerpos específicos para el polipéptido representado en SEQ ID NO. 7, o una variante del mismo como se define en esta memoria.

Los ejemplos y la figura siguientes describen e ilustran la invención. Los mismos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención en modo alguno;

La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos del gen de *C. albicans* codificante de fosfomevalonato-quinasa. Los codones de inicio de la traducción (ATG) y parada (TAA) están subrayados.

### 10 Ejemplos

#### 1. Clonación y determinación de la secuencia parcial de dos clones separados a partir de una genoteca genómica de *Candida albicans*

Se encontró que dos secuencias separadas de ácido nucleico clonadas y secuenciadas de una genoteca de *C. albicans* (SEQ ID Nos. 1 & 3) tenían homología con la del gen ERG8 de *S. cerevisiae*. Los complementos de regiones específicas en SEQ ID Nos. 1 y 3 se sintetizaron como oligonucleótidos (SEQ ID Nos. 2 & 4) para uso en el aislamiento de un clon que contenía el gen ERG8 de *C. albicans*.

#### 20 2. Clonación y determinación de la secuencia de ERG8 de *Candida albicans*

Utilizando los dos iniciadores oligonucleotídicos (SEQ ID Nos. 2 y 4) se aisló el gen ERG8 de *C. albicans* como clon plasmídico a partir de una genoteca de DNA genómico de *C. albicans* en el vector lanzadera de levadura YEp24 utilizando PCR. La genoteca de *C. albicans* se mantuvo en *E. coli* y se dejaron crecer colonias bacterianas independientes en pocillos individuales de cada una de 15 placas de microtitulación de 384 pocillos. Las propiedades de los plásmidos de la genoteca son tales que este sistema cuadrículado contiene aproximadamente 2,5 veces la cantidad de DNA en el genoma de *C. albicans*.

Se mezclaron pequeñas partes alícuotas de células de cada uno de los pocillos para producir una agrupación de células que se derivaban de la totalidad de los pocillos de una sola placa. Se prepararon agrupaciones similares para la totalidad de las filas y la totalidad de las columnas de cada una de las placas. Muestras de cada una de las agrupaciones de las células para cada placa completa se utilizaron en reacciones PCR con iniciadores oligonucleotídicos de SEQ ID Nos. 2 y 4 a fin de identificar la o las placas en la red que contenían ERG8 de *C. albicans*. Reacciones PCR subsiguientes con agrupaciones de células de filas de pocillos y columnas de pocillos definían el o los pocillos específicos que llevaban un clon de ERG8 de *C. albicans*.

Las reacciones PCR contenían en un volumen total de 0,05 ml; Tris-HCl 75 mM (pH 8,8 a 25°C), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 0,01% de Tween 20, 0,2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 1,25 unidades de DNA-polimerasa Taq, 100 picomoles de cada iniciador oligonucleotídico y 0,005 ml de suspensión de células de *E. coli*. Las reacciones PCR se incubaron a 94°C durante 1 minuto y luego durante 30 ciclos de lo siguiente; 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min, 72°C durante 1 min. Los productos PCR se analizaron por electroforesis en agarosa y se visualizaron bajo luz UV después de tinción con bromuro de etidio.

Clones que albergaban supuestamente el gen ERG8 se seleccionaron, se purificaron los DNAs plasmídicos en estos clones y se determinó la secuencia completa del gen ERG8 de *C. albicans* en ambas cadenas utilizando iniciadores oligonucleotídicos específicos de la secuencia flanqueante o la secuencia de inserción. La longitud total del gen ERG8 de *C. albicans*, con inclusión del ATG “de inicio” y el TAA “de parada” se muestra en la Figura 1. La traducción en proteínas del gen se representa en SEQ ID NO. 7.

#### 50 3. Generación de una cepa heterocigótica de delección de ERG8 de *S. cerevisiae*

Dado que PMK es una enzima esencial, únicamente un alelo de una célula diploide puede deleccionarse sin pérdida de viabilidad. Una cepa diploide del gen ERG8 de *S. cerevisiae* (JK9-3daa; Kunz *et al.*, Cell **73**; 585-596 (1993)) se disgregó utilizando una casete de resistencia a la kanamicina como ha sido descrito por Wach *et al.* (Yeast **10**; 1693-1808, 1994) utilizando el protocolo descrito en dicho lugar con los oligonucleótidos representados en SEQ ID Nos. 8 y 9. La esporulación del diploide heterocigótico (ERG8/erg8::KanMX) produce únicamente dos esporas viables que son sensibles ambas a la kanamicina, demostrando que ERG8 es esencial, y el fenotipo de parada característico para las dos esporas inviables.

#### 60 4. Complementación de una delección de ERG8 de *S. cerevisiae* con el ERG8 de *C. albicans* clonado

La cepa heterocigótica ERG8/erg8::KanMX se transformó con el plásmido que llevaba el gen ERG8 de *C. albicans* de longitud total dentro de un fragmento de DNA genómico de *C. albicans* de tal modo que la expresión del gen dependerá de la funcionalidad del promotor de *C. albicans* en el hospedador *S. cerevisiae* heterólogo. Sorprendentemente, el gen transportado en el plásmido fallaba en lo referente a complementar la delección del gen como se demostraba por un fallo en la recuperación de células haploides resistentes a la kanamicina después de la esporulación. Esto se debía probablemente a una expresión inadecuada de ERG8 de *C. albicans* en *S. cerevisiae*.

## ES 2 284 514 T3

Para hacer posible la expresión de ERG8 de *C. albicans* en *S. cerevisiae* y facilitar la purificación de la proteína ERG8 como resultado de la sobre-expresión en un hospedador adecuado, se reemplazó el promotor de *C. albicans* por el promotor eficiente e inducible GAL1 de *S. cerevisiae*. La secuencia codificante de ERG8 de *C. albicans* se amplificó por PCR utilizando los polinucleótidos que se muestran en SEQ ID Nos. 10 y 11, que contienen sitios convenientes de enzimas de restricción para clonación del producto de PCR en un vector de expresión apropiado tal como pYES2 (Invitrogen). La identidad del gen amplificado por PCR clonado en pYES2 se confirmó por secuenciación del DNA. Después de transformación para la cepa heterocigótica ERG8/ergB::KanMX, el plásmido era capaz de complementar el alelo *erg8::KanMX* en *S. cerevisiae*, dado que las esporas haploides resistentes a la kanamicina era viables en medio que contenía galactosa pero no glucosa. Esta cepa de *S. cerevisiae* es una fuente útil de la proteína ERG8 de *C. albicans* biológicamente activa para ensayos *in vitro*.

Puede sobreexpresarse también convenientemente ERG8 de *C. albicans* en bacterias tales como *E. coli*. La secuencia codificante de ERG8 de *C. albicans* se amplifica por PCR utilizando oligonucleótidos que contienen sitios de restricción convenientes para clonación en vectores de expresión tales como pT7#3.3. Es particularmente conveniente que se incorpore el codón de iniciación para ERG8 en uno de los sitios de restricción. Oligonucleótidos adecuados para esto se muestran en SEQ ID Nos. 12 y 13. Los oligonucleótidos pueden incorporar también secuencias extra que codifican una pequeña "etiqueta" que ayuda a la purificación subsiguiente de la proteína. Etiquetas de este tipo incluyen por ejemplo las etiquetas "His<sub>6</sub>" que pueden incorporarse en el término N o C de ERG8 utilizando los oligonucleótidos representados en SEQ ID Nos. 14 y 15. La proteína ERG8 etiquetada expresada recombinantemente puede purificarse convenientemente por metodología de purificación por cromatografía de afinidad utilizando kits de purificación disponibles comercialmente (a saber, de Qiagen) (Borsig *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 240; 586-589, 1997).

### 5. Tests de hibridación de variantes de ácido nucleico de secuencias de nucleótidos específicas

#### 5.1 Test de Hibridación

Se describe un método para detección de ácidos nucleicos variantes que contienen secuencias afines a secuencias específicas de ERG8 tales como alelos naturales. Estos ácidos nucleicos variantes pueden estar presentes en una diversidad de formas tales como en plásmidos u otros vehículos similares que pueden fijarse a una membrana de hibridación, tal como un filtro de nitrocelulosa o nailon listo para detección utilizando una sonda marcada. Pueden realizarse también ensayos de hibridación para identificar secuencias variantes dentro de genotecas genómicas o genotecas de DNA. La tecnología de hibridación está muy avanzada. Será evidente para las personas expertas en la técnica que el protocolo descrito a continuación es solamente un ejemplo de un protocolo de hibridación adecuado para identificar secuencias variantes de ERG8.

#### 5.2 Sonda de Hibridación

Pueden generarse sondas de hibridación a partir de cualquier fragmento de DNA o RNA que codifique la secuencia nucleica específica de ERG8 de interés. Tales fragmentos pueden ser, por ejemplo, fragmentos de restricción aislados después de digestión con enzimas de restricción de ácido nucleico que contenga la secuencia de nucleótidos de ERG8 u oligonucleótidos sintéticos específicos para una región del gen ERG8 o una secuencia complementaria del mismos.

Puede generarse una sonda de hibridación a partir de un oligonucleótido sintético o una secuencia de un fragmento de restricción desfosforilado por adición de un grupo radiactivo 5'-fosfato a partir de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP por la acción de polinucleótido-quinasa T4. Se añaden 20 picomoles del oligonucleótido a una reacción de 20  $\mu$ l que contiene Tris 100 mM, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, espermidina 0,1 mM, ditioneitol (DTT) 20 mM, ATP 7,55  $\mu$ M, 55  $\mu$ Ci [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP y 2,5 u de polinucleótido-quinasa T4 (Pharmacia Biotechnology Ltd., Uppsala, Suecia). La reacción se incuba durante 30 minutos a 37°C y luego durante 10 minutos a 70°C antes de utilizarla en hibridación. Métodos para la generación de sondas de hibridación a partir de oligonucleótidos o de fragmentos de DNA y RNA (Capítulos 11 y 10 respectivamente en Sambrook *et al. ibid*). Cierta número de kits patentados están disponibles también para estos procedimientos.

#### 5.3 Condiciones de Hibridación

Filtros que contienen el ácido nucleico se pre-hibridan en 100 ml de una solución que contiene 6 x SSC, 0,1% de SDS y 0,25% de leche desnatada seca (Marvel<sup>TM</sup>) a 65°C durante un mínimo de una hora en un recipiente cerrado adecuado. Un aparato de hibridación patentado tal como el modelo HB-1 (Techne Ltd) proporciona condiciones reproducibles para el experimento.

La solución de pre-hibridación se reemplaza luego por 10 ml de una solución sonda que contiene 6 x SSC, 0,1% SDS, 0,25% de leche desnatada seca (v.g. Marvel<sup>TM</sup>) y la sonda oligonucleotídica generada anteriormente. Los filtros se incuban en esta solución durante 5 minutos a 65°C antes de dejar que la temperatura descienda gradualmente hasta por debajo de 30°C. La solución sonda se desecha luego y los filtros se lavan en 100 ml de 6 x SSC, 0,1% SDS a la temperatura ambiente durante 5 minutos. Se realizan luego lavados adicionales en lotes nuevos de la misma solución a 30°C y después en incrementos de 10°C hasta 60°C durante 5 minutos por lavado.

Después del lavado, se secan los filtros y se utilizan para exponer una película de rayos X tal como Hyperfilm<sup>TM</sup> MP (Amersham International) a -70°C en una casete de película resistente a la luz utilizando un filtro de intensificación rápido de wolframato para mejorar la imagen fotográfica. La película se expone durante un periodo adecuado

## ES 2 284 514 T3

(normalmente una noche) antes del desarrollo para revelar la imagen fotográfica de las áreas radiactivas en los filtros. Las secuencias de ácido nucleico afines se identifican por la presencia de una imagen fotográfica comparada con las secuencias totalmente no afines que no deben producir imagen alguna. Generalmente, las secuencias afines aparecerán positivas a la temperatura de lavado más alta (60°C). Sin embargo, las secuencias afines pueden resultar únicamente  
5 positivas a las temperaturas de lavado más bajas (50, 40 ó 30°C).

Estos resultados dependerán también de la naturaleza de la sonda utilizada. Las sondas de fragmentos de ácido nucleico más largas precisarán ser hibridadas durante periodos más largos a temperatura elevada, pero pueden quedar fijadas a secuencias afines a temperaturas de lavado más altas y/o a concentraciones menores de sal. Las sondas  
10 oligonucleotídicas más cortas, mixtas o degeneradas pueden requerir condiciones de lavado menos severas tales como temperaturas inferiores y/o concentraciones más altas de Na<sup>+</sup>. Una exposición de las consideraciones para protocolos de hibridación se proporciona en Sambrook *et al.* (Capítulo 11).

Para preparar 20 x SSC, se disuelven 175,3 g de NaCl y 88,2 g de citrato de sodio en aproximadamente 800 ml  
15 de agua, se ajusta el pH a 7,0 utilizando solución 10 N de NaOH y se ajusta el volumen a 1 litro con agua, antes de tratamiento en autoclave.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido purificado que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO. 7, o una secuencia que posee al menos 80% de identidad total de secuencia con ella, polipéptido que posee actividad de fosfo-mevalonato-quinasa (PMK).
2. Un polipéptido aislado de al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido de la reivindicación 1.
- 10 3. Un anticuerpo específico para el polipéptido de la reivindicación 1 ó 2.
4. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, que es un anticuerpo monoclonal.
- 15 5. Un polinucleótido purificado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido re-presentado en SEQ ID NO. 7 o una secuencia que posee al menos 80% de identidad total de secuencia con ella, polipéptido que posee actividad de fosfomevalonato-quinasa (PMK).
6. Un polinucleótido purificado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2.
- 20 7. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 5.
8. Una célula hospedadora que contiene un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 7.
- 25 9. Un método para producir el polipéptido de la reivindicación 1, que comprende;
- (a) cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 8 en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido, y
- 30 (b) recuperar dicho polipéptido de la célula hospedadora o cultivo de células.
10. Uso del polipéptido de la reivindicación 1 en un ensayo para identificar compuestos que inhiben la actividad de fosfomevalonato-quinasa (PMK).
- 35 11. Un método de identificación de compuestos que modulan la actividad de PMK, que comprende;
- (a) poner en contacto un compuesto de test con un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, y
- (b) determinar el efecto que el compuesto de test tiene sobre la actividad del polipéptido.
- 40 12. Un método para detectar o diagnosticar la presencia de *Candida albicans* en una muestra de test, que comprende poner en contacto la muestra con una fuente capaz de detectar un polipéptido que posee la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO. 7 o una secuencia que posee al menos 80% de identidad total de secuencia con ella, o una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido representado en SEQ ID NO. 7 o una secuencia que posee al menos 80% de identidad total de secuencia con ella.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

```

GTGAAAAAAAAAGACAGAACAGTAGATTCCAACCTCAGAATATTCATTCAGATCTGAACATTT
CTTTTTCTCCGATCATCAATTGGCAATGTCAAAGCATTTAGTGCACCTGGAAAAGCATTCTC
TGCTGGTGGATATTTGGTTCTTGAGCCAATTTATGATGCTTATGTGACAGCATTGTCATCACG
AATGCATGCAGTTATAACACCAAAGGAACCAGTTTGAAGAATCTAGAATCAAATTTCTTC
ACCCCAATTTGCAAACGGAGAATGGGAATATCACATATCATCAAATACAGAGAAGCCCAGAGA
AGTTCAGTCACGCATAAAATCCATTTTTAGAGGCAACTATATTCATCGTTTTAGCTTATATTCA
ACCGACCGAAGCATTGTGATCTTGAAATCATCATTTACTCAGACCCTGGATATCATTACAAGA
AGATACTGAAACCAAGACATCCTCGAATGGAGAAAAACATTTCTTTACCATTCTCGTGCCAT
TACCGAAGTGGAAAAGACCGGATTAGGTTTCATCGGCAGGATTAGTGTGAGTTGTTGCCACAAG
TTTATTATCCCATTTTATCCCAATGTTATCAGTACGAATAAAGATATTTTGACAACGTTGC
ACAGATTGCACATTGTTATGCCAAAAAAGATAGGATCTGGGTTTGATGTTGCAACTGCAAT
TTATGGTCTGATTGTATATAGAAGATTTAGCCAGCTTTGATAAATGACGTGTTTCAGGTTCT
AGAAAGTGATCCTGAGAAGTTCCCCACAGAGTTGAAAAAATGATTGAAAGTAACTGGGAATT
CAAACATGAAAGATGTACATTACCATACGGAATCAAGTTATTAATGGGTGACGTCAAGGGTGG
CTCAGAAACACCCAAATTGGTATCACGAGTACTCCAATGAAAAAGGAAAAGCCAGAAGAAAG
CTCTGTTGTGTATGACCAGCTTAATAGTGCCAATTTACAGTTTATGAAGGAATTGAGGGAAAT
GCGTGAAAAATACGACTCAGACCCAGAGACTTATATTAAGAGTTAGATCATTCTGTTGAGCC
TTTGACTGTTGCGATTAAGAACATCAGAAAAGGGTTACAAGCATTAAACAAAAATCAGAGGT
TCCAATTGAACCTGATGTCCAAACCCAGTTGTTGGACCGTTGTCAAGAGATTCTGGTTGTGT
TGGTGGTGTGGTTCCAGGTGCTGGTGGATACGATGCAATAGCTGTATTAGTGTGGAAAATCA
AGTGGGAAATTTAAGCAGAAAACCTTTGAAAATCCAGATTATTTTCATAATGTTTACTGGGT
TGATTTGGAAGAGCAAACAGAAGGTGTACTTGAAGAAAAACCAGAAGACTATATAGGTTTATA
AAATATCACTGGGATATGTCTACAAGGTGTTTTCGATTAGAGTTTTTGATCCCCATTTTAACA
TATTTTACTTCAATCTTACACTTTATCCTTTAAGTAGGTATGTGTAGGGAAAGAGCCTGATC
TTCATAAACCGTTGCAAACCTAATTGATTATATTTCTATTGIAAATTTTCATATGCAGGAAATA
GCTTATTTCGACAAATATTTATTTTCGTCTCGTTCTGGTCCAAGTACCCAGAGACGAAATAA
CTGACAACACGCAGGGCTGGGTTGGCATTTCGTACACAGATTATTATTAATGGTAACAAAAA
AAGGGGRKATGCCCGTGGTCGATACACAAATATTTATGATATACTTTCCATATTTTTTTTT
    
```

FIGURA 1

# ES 2 284 514 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> ASTRAZENECA AB
- 5 <120> PROTEÍNA
- <130> LDSG/PHM70579/WO
- 10 <140>  
<141>
- <150> GB 9919766.7
- 15 <151> 1999-08-21
- <160> 11
- 20 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 547
- 25 <212> DNA
- <213> *Candida albicans*
- 30 <400> 1
- ```
ccaatggaaa aaggaaaagc cagaagaaag ctcrgttgtg tatgaccagc ttaatagtgc 60
caatttacag tttatgaagg aattgagggg aatgcgtgaa aaatacgact cagacccaga 120
gacctatatt aaagagttag atcattctgt tgagcccttg actgttgcga ttaagaacat 180
cagaaaaggg ttacaagcat taacacaaaa atcagagggt ccaattgaac ctgatgtcca 240
aaccagttg tggaccgtt gccaagagat tcctggttgt gttggcgggt tggttccagg 300
tgctggtaga tacgatgcaa lagctgtatt agtggtagaa aatcaagtgg gaaattttaa 360
gcagaaaact cttgaaaac cagattattt tcataatgtt tactgggttg atttgggaaga 420
gcaaacagaa ggtgtacttg aagaaaaacc agaagactat ataggtttat aaaatatcac 480
taggacatgt ctacaagggt atctcgatta gatctctctg taccggtttt aacatatatt 540
acttcaa                                     547
```
- 45 <210> 2
- <211> 21
- 50 <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 55 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido monocatenario
- <400> 2
- 60 gctggtgat acgatgcaat a
- <210> 3
- <211> 577
- 65 <212> DNA
- <213> *Candida albicans*

## ES 2 284 514 T3

<400> 3

```

5      atgtacatct ttcattgttg aattcccagt tacttgcaat caattttttc aactctgtgg 60
      ggaacttttc aggatcactt tctagaacct gaaacacgtc atttatcaaa gctggctgaa 120
      atcttccata tacaatcaga ccataaattg cagttgcaac atcaaaccca gatectatct 180
      ttttttgggc ataacaatgt gcaatctgtg caacgttggc caaaatctct ttattcgtac 240
      tgataacatt ggggataaaa tgggataata aacttgtggc aacaactgac actaatcctg 300
10     ccgatgaacc taatccggtc tttcccactt cggtaatggc acgagaatgg taaagaaaag 360
      ttttttctcc actcaggat gtcttgggtt cagtatcttc ttgtgaatga tatccagggt 420
      ccgagtaaat aatgatctca agatcaaatg ctccggtcgg ttgaatataa gctaaaaacc 480
15     gatggatata gttgctctca aaaatgggat tcatgctgga ctgnacttct ttgggttttc 540
      ngtaatcgat gatatgtgat antcccattc cccgggtt 577
  
```

<210> 4

20 <211> 25

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido monocatenario

<400> 4

30

ggggataaaa tgggataata aactt

25

<210> 5

35 <211> 1763

<212> DNA

<213> *Candida albicans*

40 <400> 5

```

45     gtggaaaaaa aagacagaac agtagattcc aactccagaa tattcattca gatctgaaca 60
      tttctttttc tccgatcatc aattggcaat gtcaaaagca tttagtgcac ctggaaaagc 120
      atctcttgct ggtggatatt tggttcttga gccaatatat gatgcttatg tgacagcatt 180
      gtcatcacga atgcatgcag ttataacacc aaaaggaaac agtttgaaag aatctagaat 240
      caaaatctct tcaccccaat ttgcaaacgg agaatgggaa taccacatat catcaaatat 300
50     agagaagccc agagaagttc agtcacgcat aaatccattt tttagaggca ctatattcat 360
      cgttttagct tatattcaac cgaccgaagc atttgatctt gaaatcatca tttactcaga 420
      ccctggatat cattcacaag aagatactga aaccaagaca tcctcgaatg gagaaaaaac 480
      atttctttac cattctcgtg ccattaccga agtggaaaag accggattag gttcatcggc 540
55     aggattagtg tcagttgttg ccacaagttt attatcccat tttatcccca atggttatcag 600
      tacgaataaa gatattttgc acaacggttc acagattgca cattgttatg cccaaaaaaa 660
      gataggatct gggtttgatg ttgcaactgc aatttatggt ctgattgtat atagaagatt 720
  
```

60

65

# ES 2 284 514 T3

tcagccagct tggataaatg acgtgttcca ggttctagaa agtgatcctg agaagttccc 780  
 cacagagttg aaaaaattga ttgaaagtaa ctgggaattc aaacatgaaa gatgtacatt 840  
 accatcacgga atcaagttat taatgggtga cgtcaagggt ggctcagaaa cacccaaatt 900  
 5 ggtatcacga gctactccaat ggaaaaagga aaagccagaa gaaagctctg ttgtgcatga 960  
 ccagcttaat agtgccaatt tacagtttat gaaggaattg agggaaatgc gtgaaaaata 1020  
 cgactcagac ccagagactt atattaaaga gttagatcat tctgttgagc ctttgactgt 1080  
 10 tgcgattaaag aacatcagaa aagggttaca agcattaaca caaaaatcag aggttccaat 1140  
 tgaacctgat gtccaaaacc agttgttggg ccgttgtcaa gagattcctg gttgtgttgg 1200  
 tgggtgtgggt ccagggtgctg gtggatacga tgcaatagct gtattagtgt tggaaaatca 1260  
 agtgggaaat ttaagcaga aaactcttga aaatccagat tattttcata atgtttactg 1320  
 15 ggttgatttg gaagagcaaa cagaaggtgt acttgaagaa aaaccagaag actatatagg 1380  
 tttataaaat atcactggga tatgtctaca aggtgttttc gattagagtt tttgatcccc 1440  
 attttaacat attttacttc aatcttacac tttatccttc taagtaggta tgtgtaggga 1500  
 aagagcctga tcttcataaa ccgttgcaaa ctaattgatt atattttcta ttgtaaatcc 1560  
 20 cacatgcagg aaatagctta ttcgacaaat tatttatttt cgtctcgttc tggccaagt 1620  
 accccagaga cgaaataact gacaacacgc agggctgggt tggcattttc gtcacacgat 1680  
 tattattaat ggtaacaaaa aaaggggrka tgcccgctgt cgatacacia atatttatga 1740  
 tatactttcc atattttttt ttt 1763

25

<210> 6

<211> 1299

30

<212> DNA

<213> *Candida albicans*

<400> 6

35

argtcaaaag cttttagtgc acctggaaaa gcatttcttg ctgggtggata tttggtrctt 60  
 gagccaattt atgatgctta tgtgacagca ttgtcatcac gaatgcatgc agttataaca 120  
 ccaaaaaggaa ccagtttgaa agaatctaga atcaaaattt cttcacccca atttgcbaac 180  
 40 ggagaatggg aatatcacat atcatcaaat acagagaagc ccagagaagt tcagtcacgc 240  
 ataaatccat ttttagaggc aactatattc atcgttttag cttatattca accgaccgaa 300  
 gcatttgatc ttgaaatcat cttttactca gaccttggat atcattcaca agaagatact 360  
 gaaaccaaga catcctcgaa tggagaaaaa acatttcttt accattctcg tgccattacc 420  
 45 gaagtggaaa agaccggatt aggttcatcg gcaggattag tgtcagttgt tggcacaagt 480  
 ttattatccc attttatccc caatgttacc agtacgaata aagatatttt gcacaacggt 540  
 gcacagattg cacattgtta tgcaccaaaa aagataggat ctgggtttga tgttgcaact 600  
 gcaatttatg gtctgattgt atatagaaga tttcagccag ctttgataaa tgacgtgttt 660  
 50 caggttcttag aaagtgatcc tgagaagttc cccacagagt tgaaaaaatt gattgaaagt 720  
 aactgggaat tcaaacatga aagatgtaca ttaccatcgc gaatcaagtt attaatgggt 780  
 gacgtcaagg gtggctcaga aacacccaaa ttgggtatcac gagtactcca atggaaaaag 840  
 gaaaagccag aagaaagctc tgttgtgtat gaccagctta atagtgccaa tttacagttt 900  
 55 atgaagggaat tgagggaat gcgtgaaaaa tacgactcag acccagagac ttatattaaa 960  
 gagttagatc attctgttga gcctttgact gttgcgatta agaacatcag aaaagggtta 1020  
 caagcattaa cacaaaaatc agaggttcca attgaacctg atgtccaaac ccagttgttg 1080  
 gaccgttgtc aagagattcc tgggtgtgtt ggtgggtgtg ttccagggtgc tgggtggatc 1140  
 60 gatgcaatag ctgtattagt gttggaaaaa caagtgggaa attttaagca gaaaactctt 1200  
 gaaaatccag attattttca taatgtttac tgggttgatt tggaaagagca aacagaaggt 1260  
 gtacttgaag aaaaaccaga agactatata ggtttataa 1299

65

<210> 7

<211> 432

ES 2 284 514 T3

<212> PRT

<213> *Candida albicans*

5 <400> 7

```

Met Ser Lys Ala Phe Ser Ala Pro Gly Lys Ala Phe Leu Ala Gly Gly
  1           5           10           15
Tyr Leu Val Leu Glu Pro Ile Tyr Asp Ala Tyr Val Thr Ala Leu Ser
      20           25           30
Ser Arg Met His Ala Val Ile Thr Pro Lys Gly Thr Ser Leu Lys Glu
      35           40           45
Ser Arg Ile Lys Ile Ser Ser Pro Gln Phe Ala Asn Gly Glu Trp Glu
      50           55           60
Tyr His Ile Ser Ser Asn Thr Glu Lys Pro Arg Glu Val Gln Ser Arg
      65           70           75           80
Ile Asn Pro Phe Leu Glu Ala Thr Ile Phe Ile Val Leu Ala Tyr Ile
      85           90           95
Gln Pro Thr Glu Ala Phe Asp Leu Glu Ile Ile Ile Tyr Ser Asp Pro
      100          105          110
Gly Tyr His Ser Gln Glu Asp Thr Glu Thr Lys Thr Ser Ser Asn Gly
      115          120          125
Glu Lys Thr Phe Leu Tyr His Ser Arg Ala Ile Thr Glu Val Glu Lys
      130          135          140
Thr Gly Leu Gly Ser Ser Ala Gly Leu Val Ser Val Val Ala Thr Ser
      145          150          155          160
Leu Leu Ser His Phe Ile Pro Asn Val Ile Ser Thr Asn Lys Asp Ile
      165          170          175
Leu His Asn Val Ala Gln Ile Ala His Cys Tyr Ala Gln Lys Lys Ile
      180          185          190
Gly Ser Gly Phe Asp Val Ala Thr Ala Ile Tyr Gly Leu Ile Val Tyr
      195          200          205
Arg Arg Phe Gln Pro Ala Leu Ile Asn Asp Val Phe Gln Val Leu Glu

```

65

# ES 2 284 514 T3

|    | 210                                                                    | 215 | 220     |
|----|------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| 5  | Ser Asp Pro Glu Lys Phe Pro Thr Glu Leu Lys Lys Leu Ile Glu Ser<br>225 | 230 | 235 240 |
| 10 | Asn Trp Glu Glu Lys His Glu Arg Cys Thr Leu Pro Tyr Gly Ile Lys<br>245 | 250 | 255     |
| 15 | Leu Leu Met Gly Asp Val Lys Gly Gly Ser Glu Thr Pro Lys Leu Val<br>260 | 265 | 270     |
| 20 | Ser Arg Val Leu Gln Trp Lys Lys Glu Lys Pro Glu Glu Ser Ser Val<br>275 | 280 | 285     |
| 25 | Val Tyr Asp Gln Leu Asn Ser Ala Asn Leu Gln Phe Met Lys Glu Leu<br>290 | 295 | 300     |
| 30 | Arg Glu Met Arg Glu Lys Tyr Asp Ser Asp Pro Glu Thr Tyr Ile Lys<br>305 | 310 | 315 320 |
| 35 | Glu Leu Asp His Ser Val Glu Pro Leu Thr Val Ala Ile Lys Asn Ile<br>325 | 330 | 335     |
| 40 | Arg Lys Gly Leu Gln Ala Leu Thr Gln Lys Ser Glu Val Pro Ile Glu<br>340 | 345 | 350     |
| 45 | Pro Asp Val Gln Thr Gln Leu Leu Asp Arg Cys Gln Glu Ile Pro Gly<br>355 | 360 | 365     |
| 50 | Cys Val Gly Gly Val Val Pro Gly Ala Gly Gly Tyr Asp Ala Ile Ala<br>370 | 375 | 380     |
| 55 | Val Leu Val Leu Glu Asn Gln Val Gly Asn Phe Lys Gln Lys Thr Leu<br>385 | 390 | 395 400 |
| 60 | Glu Asn Pro Asp Tyr Phe His Asn Val Tyr Trp Val Asp Leu Glu Glu<br>405 | 410 | 415     |
| 65 | Gln Thr Glu Gly Val Leu Glu Glu Lys Pro Glu Asp Tyr Ile Gly Leu<br>420 | 425 | 430     |

<210> 8

<211> 70

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido monocatenario

## ES 2 284 514 T3

<400> 8

```
5      aaatgtcaga gttgagagcc ttcagtgcc cagggaaagc gttactagct gcagctgaag 60  
      cttcgtacgc                                     70
```

<210> 9

<211> 73

10 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido monocatenario

<400> 9

```
20      agctacttat caagataagt ctcaggatct tttctttcc taacacccca ggcataggcc 60  
      actagtggat ctg                                     73
```

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido monocatenario

35 <400> 10

```
      cccaagcttg gcaatgtcaa aagcatttag tgc
```

33

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido monocatenario

50 <400> 11

```
      cgctcgaga tttataaac ctatatagtc ttctgg
```

36

55

60

65