



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 299 250**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/569 (2006.01)
C07K 14/35 (2006.01)
C07K 14/01 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **99930078 .3**
(86) Fecha de presentación : **07.06.1999**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1086377**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2001**

(54) Título: **Método de identificación de ligandos para la subunidad sigma⁷⁰ de la RNA-polimerasa.**

(30) Prioridad: **09.06.1998 IN MA123998**
17.07.1998 SE 9802573

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

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

(72) Inventor/es: **Balganesh, Tanjore;**
Ramachandran, Vasanthi y
Sharma, Umender

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

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

Método de identificación de ligandos para la subunidad sigma⁷⁰ de la RNA-polimerasa.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de identificación de un ligando, en particular un inhibidor, de una subunidad sigma de RNA-polimerasa bacteriana.

10 **Antecedentes de la técnica***Subunidades sigma de RNA-polimerasa*

La transcripción de genes a las moléculas de RNA correspondientes es un proceso complejo que está catalizado por RNA-polimerasa dependiente de DNA, e implica muchos factores proteínicos diferentes. En las eubacterias, la RNA-polimerasa del núcleo está compuesta de subunidades α , β , y β' en la relación 2:1:1. Para dirigir la RNA-polimerasa a promotores de genes específicos para su transcripción, las bacterias producen una diversidad de proteínas, conocidas como factores sigma (σ) que interaccionan con la RNA-polimerasa para formar una holoenzima activa. Los complejos resultantes son capaces de reconocer y fijarse a secuencias nucleotídicas seleccionadas en los promotores.

Medidas físicas han demostrado que la subunidad sigma induce transición estructural cuando se fija a la RNA-polimerasa de núcleo. La fijación de la subunidad sigma a la enzima de núcleo aumenta la constante de fijación de la enzima de núcleo para DNA en varios órdenes de magnitud (Chamberlin, M.J. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43, 721-).

Los factores sigma bacterianos no tienen homología alguna con los factores de transcripción eucariotas, y son por tanto una diana potencial para compuestos antibacterianos.

Se sabe que las mutaciones en la subunidad sigma, que afectan a su asociación y capacidad de conferir especificidad de secuencia de DNA a la enzima son letales para la célula.

La caracterización de las subunidades sigma, identificadas y secuenciadas de diversos organismos, permite que las mismas se clasifiquen en tres grupos. El Grupo sigma I ha sido designado también como la clase sigma⁷⁰, o el Grupo sigma "interno" (para una revisión véase Lonetto *et al.* (1992) J. Bacteriol. 174, 3843-3849). Las subunidades sigma pertenecientes a este grupo reconocen secuencias promotoras similares en la célula. Estas propiedades se reflejan en ciertas reacciones de las proteínas que están fuertemente conservadas entre especies.

Otra característica importante de la transcripción dependiente de sigma es que la subunidad sigma se disocia de la enzima de núcleo durante el alargamiento del mRNA. Por consiguiente, las moléculas que estabilizan la interacción de la subunidad sigma con la enzima de núcleo deberían ser también capaces de desactivar la transcripción.

40 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis es un patógeno pulmonar importante que se caracteriza por su tasa de crecimiento muy lenta. Como patógeno, es capaz de acceder a los macrófagos alveolares, donde se multiplica en el interior del fagosoma, lisando finalmente las células y diseminándose a través del torrente sanguíneo, no sólo a otras áreas del pulmón, sino también a tejidos extrapulmonares.

El patógeno se multiplica por tanto en al menos dos ambientes totalmente diferentes, que implican la utilización de nutrientes diferentes y una diversidad de posibles factores hospedantes. Una infección con éxito implicaría por tanto la expresión coordinada de nuevas series de genes, transcritos por RNA-polimerasas asociadas con factores sigma diferentes. Esto abre la posibilidad de direccionar no sólo las subunidades sigma⁷⁰ de *M. tuberculosis*, sino también otras subunidades sigma específicas para las diferentes etapas de infección y diseminación.

La clonación y expresión de los genes *sigA* y *sigB* de *Mycobacterium tuberculosis* se describen en la Solicitud de Patente Internacional WO 96/38478 (Astra AB).

Factores anti-sigma

Se conocen en la técnica proteínas anti-sigma (Asi). Se ha comunicado que lisados del bacteriófago T₂ (Khesin *et al.* (1972) Mol. Gen. Genet. 119, 299) o del fago T₄ (Bogdanova *et al.* (1970) Mol. Biol. 4, 435; Stevens, A. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 603) inhiben la transcripción de genes bacterianos.

Ha quedado establecido que la actividad anti-sigma⁷⁰ dependiente de T₄ está soportada por una proteína de 10 kDa (Stevens, A. en: RNA Polymerase p. 617-627 (compiladores R. Losick & M. Chamberlin) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1976). Se demostró que una proteína de 10 kDa se purifica conjuntamente con RNA-polimerasa de células de *E. coli* infectadas con T₄ y se desprende junto con sigma⁷⁰ de la enzima de núcleo en columnas de fosfocelulosa.

Un gen denominado *asiA*, que codifica el factor anti-sigma⁷⁰ de 10 kDa del bacteriófago T₄, ha sido identificado por Orsini *et al.* (1993), J. Bacteriol. 175, 85-93. El marco de lectura abierto codificaba una proteína de 90 aminoácidos con la secuencia deducida MNKNIDTVRE IITVASILIK FSREDIVENR ANFIAFLNEI GVTHEGRKLN QNSFRKIVSE LTQEDKKTLL DEFNEGFEGV YRYLEMYTNK (SEQ ID NO: 5). La proteína codificada por *asiA* (a la que se hace referencia también en esta memoria como "AsiA") se produjo en gran cantidad en un sistema de expresión de fago T₇ y se purificó parcialmente. La misma exhibía una actividad inhibitora potente para la transcripción dirigida por sigma⁷⁰ por la holoenzima RNA-polimerasa de *E. coli*. La secuencia de nucleótidos del gen *asiA* ha sido depositada en la base de datos GenBank bajo el n° de Acceso M99441.

Ejemplos de proteínas que regulan la subunidad sigma de RNA-polimerasa se conocen también de otros sistemas. Un ejemplo es el sistema de regulación flagelar de *S. typhimurium*, que es un sistema complejo controlado por una serie de más de 50 genes agrupados en 13 operones flagelares. La expresión tardía de los operones está regulada positivamente por el gen *flhA* que codifica el factor sigma FliA (Suzuki *et al.* (1978) J. Bacteriol. 133, 904; Suzuki *et al.* (1981) J. Bacteriol. 145, 1036). Por otra parte, los operones tardíos están regulados negativamente por el gen *flgM*. Se ha identificado una proteína de 7,8 kDa como el producto del gen *flgM* y ha sido purificada (Ohnishi *et al.* (1992) Mol. Microbiol. 6, 3149-3157). Esta proteína FlgM se identificó como un factor anti-sigma, dado que era capaz de fijarse a la proteína FliA y perturbaba su capacidad para formar un complejo con la enzima de núcleo RNA-polimerasa.

Análogamente, en la expresión de genes de *B. subtilis*, se ha demostrado que el factor sigma^F está regulado por un factor anti-sigma de 14 kDa codificado por el gen *spoIIAB* (Duncan & Losick (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 2325-2329), mientras que el factor sigma^B está regulado por un factor anti-sigma de 16 kDa codificado por el gen *rsbW* (Benson & Haldenwang (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 2330-2334).

Las secuencias de nucleótidos de los genes *flgM*, *spoIIAB* y *rsbW* están disponibles en la base de datos GenBank (Núms. de Acceso: FLGMST.PRO para *flgM*, SPOIIAB.PRO para *spoIIAB*, M34995.PRO para *rsbW*). Las secuencias no muestran semejanza evidente alguna con la secuencia de *asiA* descrita por Orsini *et al.*

El documento WO96/25170 describe métodos para tratar enfermedades causadas por patógenos bacterianos por administración de la proteína AsiA de T₄, proteína que se ha demostrado inhibe la actividad de RNA-polimerasa de *Bacillus subtilis* y *Mycobacterium smegmatis*.

Exposición de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método de identificación de un ligando de una subunidad sigma⁷⁰ bacteriana que comprende poner en contacto la subunidad sigma⁷⁰ o una porción de la misma que comprende la región de fijación anti-sigma, con un compuesto de ensayo y una proteína de fusión GST-AsiA producida en un sistema de expresión de levadura y determinar si el compuesto de ensayo se fija competitivamente con el factor anti-sigma⁷⁰ a la subunidad sigma⁷⁰ o porción de la misma.

Preferiblemente, el método comprende:

- (i) inmovilizar la subunidad sigma⁷⁰ o porción de la misma sobre una matriz o soporte sólido;
- (ii) añadir el compuesto de ensayo y la proteína de fusión;
- (iii) añadir un primer anticuerpo contra la proteína de fusión;
- (iv) añadir un segundo anticuerpo marcado contra el primer anticuerpo, y
- (v) determinar la cantidad de segundo anticuerpo fijada al complejo (primer anticuerpo-proteína de fusión-subunidad sigma⁷⁰ o porción de la misma) formado sobre la matriz o soporte sólido.

La invención proporciona un método o ensayo *in vitro* para cribar genotecas peptídicas o genotecas químicas respecto a compuestos (ligandos) que mimetizan el factor anti-sigma⁷⁰ y que tienen por tanto la capacidad de inhibir la interacción de la RNA-polimerasa de núcleo y las subunidades sigma⁷⁰. Tales compuestos inhibidores son potencialmente útiles en el tratamiento de infecciones bacterianas.

La capacidad de los ligandos identificados para inhibir la interacción entre una RNA-polimerasa de núcleo bacteriana y una subunidad sigma⁷⁰ puede ensayarse por métodos conocidos, en particular por un ensayo de RNA-polimerasa, tal como el descrito en Orsini *et al* (*supra*), en donde la transcripción de un molde de DNA, tal como DNA de timo de ternero, DNA T₄ o poli(dA-dT), se mide por la incorporación de un precursor de RNA marcado tal como [5-³H]UTP.

En el método de ensayo de acuerdo con la invención, la subunidad sigma⁷⁰ o porción de la misma se obtiene preferiblemente a partir de *Escherichia coli* (particularmente los 99 aminoácidos C-terminales de la subunidad sigma⁷⁰ que contienen la región de fijación anti-sigma) o *Salmonella typhimurium*.

ES 2 299 250 T3

En la proteína de fusión, el factor anti-sigma⁷⁰ del bacteriófago T₄ tendrá preferiblemente una secuencia de aminoácidos como la representada en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. La proteína de fusión comprende glutatión-S-transferasa (GST-AsiA) como el producto proteínico del gen marcador.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1: Mapa del vector plasmídico pARC 8112.

Fig. 2: Mapa del vector plasmídico pARC 8100.

Fig. 3: Mapa del vector plasmídico pARC 8115.

Fig. 4: Mapa del vector plasmídico pARC 8101.

Fig. 5: Mapa del vector plasmídico pARC 8114.

Fig. 6: Mapa del vector plasmídico pARC 8105.

Fig. 7: Mapa del vector plasmídico pARC 8180.

Fig. 8: Actividad de la proteína GST-AsiA sobre la transcripción dependiente de sigma⁷⁰. Ensayo: 0,5 µg de polimerasa de núcleo de *E. coli*, 2,5 µg de proteína sigma⁷⁰, 1,0 µg de DNA T₄ y NTPs. Se preincubaron concentraciones variables de GST-Asi con proteína sigma antes de la adición a la mezcla de reacción. La actividad específica de ³H-UTP era 2800-3000 cpm/nmol.

Ejemplos

A lo largo de esta descripción, cuando se utilizan los términos “protocolos estándar” y “procedimientos estándar” en el contexto de técnicas de clonación molecular, deben entenderse como protocolos y procedimientos encontrados en un manual ordinario de laboratorio tal como: Current Protocols in Molecular Biology, compiladores F. Ausubel *et al.*, John Wiley and Sons, Inc. 1994, o Sambrook, J. Fritsch, E.F. y Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 1989.

Ejemplo 1

Clonación, expresión y purificación de sigma⁷⁰ de E. coli

Se diseñaron iniciadores PCR correspondientes a los extremos 5' y 3' de las secuencias codificantes de sigma de *E. coli* en los cuales la secuencia 5' incluía un sitio para la enzima de restricción *EcoRI* y la secuencia 3' incluía un sitio para la enzima de restricción *SalI*. El fragmento de DNA amplificado por PCR se restringió con las enzimas de restricción arriba mencionadas y se clonó a los sitios *EcoRI-SalI* del vector de expresión pTrc99a (Amann *et al.* (1988) Gene 69, 301), después de lo cual la mezcla de ligación se transformó en *E. coli* DH5α. Se identificaron transformantes que albergaban el plásmido recombinante con el perfil de restricción esperado.

Las células *E. coli* DH5α que albergaban el plásmido recombinante, marcado como pARC 8112 (Fig. 1), se cultivaron a +37°C en LB hasta una DO (600 nm) de 0,4 y se indujeron con IPTG 1 mM. Más del 50% de la proteína sigma⁷⁰ de 90 kDa se encontraba como cuerpos de inclusión, como había sido comunicado anteriormente (Borukhov & Goldfarb (1993) Protein Expression and Purification 4, 503). La sigma⁷⁰ sobreexpresada se purificó y renaturalizó siguiendo protocolos estándar.

La actividad de la proteína sigma⁷⁰ purificada se confirmó por su capacidad para soportar la transcripción mediada por la enzima de núcleo RNA-polimerasa de *E. coli*. Se purificaron formas de núcleo y holoenzima de RNA-polimerasa de *E. coli* siguiendo el protocolo de Burgess y Jendriask (1975) Biochemistry 14, 4634-4638. La actividad de polimerasa se ensayó utilizando DNA T₄ como molde como ha sido descrito por Orsini *et al.* (1993) J. Bacteriol. 175, 85-93.

Ejemplo 2

Clonación, expresión y purificación de sigma⁷⁰ de Salmonella typhimurium

La secuencia codificante de la sigma⁷⁰ de *S. typhimurium* se amplificó utilizando el iniciador directo representado como SEQ ID NO: 3 y el iniciador inverso representado como SEQ ID NO: 4. El iniciador directo incluye el sitio para la enzima de restricción *EcoRI*, mientras que el iniciador inverso incluye la secuencia que codifica el codón de parada y un sitio para la enzima de restricción *SalI*. Se utilizó DNA de *S. typhimurium* como molde y el fragmento amplificado se digirió con enzimas apropiadas. Este fragmento se ligó luego a pTrc 99A digerido con *EcoRI-SalI* (Amann *et al.* (1988) Gene 69, 301) y se transformó en *E. coli* DH5α para obtener el plásmido recombinante pARC

8118. El DNA plasmídico de pARC 8118 se digirió con *EcoRI-HindIII* y el fragmento de DNA de 2,3 kb liberado que abarcaba la secuencia codificante entera de sigma⁷⁰ de *S. typhimurium* se clonó en el vector pRSET B digerido con *EcoRI-HindIII* (Kroll *et al.* (1993) DNA and Cell Biol. 12, 441) que tiene no sólo el promotor T₇ sino también secuencias que codifican un marcador his que está fusionado ahora al término C de sigma⁷⁰ de *S. typhimurium*. El plásmido recombinante que codifica la sigma⁷⁰ de *S. typhimurium* fusionada a un marcador His se designó pARC 8133.

Se utilizó luego el DNA plasmídico de pARC 8133 para transformar el hospedador de expresión *E. coli* BL21 (DE3) y se obtuvieron transformantes a +37°C. Las células que albergaban pARC 8133 se cultivaron en LB a +37°C hasta una DO de 0,4 a 600 nm y se indujeron con IPTG 1 mM durante 4 horas. Las células se redujeron a un sedimento, se suspendieron en tampón y se trataron por ultrasonidos, de acuerdo con métodos estándar. Las células lisadas se clarificaron por centrifugación a 45.000 rpm durante 60 min a +4°C, y el sobrenadante clarificado se cargó directamente en Ni-agarosa (Pharmacia) y se lavó con imidazol 50 mM. La proteína fijada se eluyó con imidazol 200 mM y se dializó durante una noche a +4°C contra Tris-Cl 50 mM, de pH 7,5. El producto eluido se concentró utilizando filtros de cono Amicon hasta 1/10 de su volumen. La proteína concentrada se escindió con enteroquinasa, utilizada a una relación de 1:50 de la enzima, a +25°C durante 14 horas. La mezcla escindida se pasó a través de una columna de agarosa Ni²⁺ y se recogió el material no fijado. La proteína escindida se analizó respecto a homogeneidad por SDS-PAGE.

Ejemplo 3

Toxicidad de la proteína anti-sigma

3.1. Clonación del gen *asiA*

La secuencia codificante para el gen *asiA* (Orsini *et al.*, *supra*) se amplificó a partir del DNA genómico del bacteriófago T₄ por PCR utilizando el iniciador directo representado como SEQ ID NO: 5 y el iniciador inverso representado como SEQ ID NO: 6.

El iniciador 5' incluía la secuencia de la enzima de restricción *NcoI*, mientras que el iniciador 3' incluía la secuencia de la enzima de restricción *BamHI*. La secuencia codificante se amplificó por PCR siguiendo protocolos estándar y el fragmento amplificado se ligó a pBR329 restringido con *NcoI-BamHI* y se transformó en células *E. coli* DH5α competentes. Se seleccionaron recombinantes a +37°C como transformantes sensibles a cloranfenicol y resistentes a ampicilina. Uno de los transformantes que tenía el patrón de restricción deseado se identificó como pARC 8100 (Fig. 2).

La inclusión de la secuencia codificante *NcoI* dio como resultado el cambio del segundo aminoácido de asparagina a glicina (SEQ ID NO: 2). La secuencia de nucleótidos del gen *asiA* clonada en pARC 8100 se verificó por secuenciación bicatenaria y se encontró que era idéntica a la secuencia *asiA* descrita por Orsini *et al.*, excepto por el cambio de codón esperado para el segundo aminoácido como resultado del protocolo de clonación PCR utilizado.

3.2. Toxicidad *in vivo* del producto *asiA* en *E. coli*

(A)

El fragmento de DNA *NcoI-BamHI* de pARC 8100 se ligó a pET 8c Km (Umender K. Sharma *et al.*, J. Bact., 177, 6745 (1996)) y se seleccionaron a +37°C transformantes resistentes a kanamicina con *E. coli* DH5α. Uno de los transformantes que albergaba un plásmido con el perfil de enzimas de restricción esperado se marcó pARC 8115 (Fig. 3). Se utilizó luego DNA plasmídico de pARC 8115 para transformar el hospedador de expresión *E. coli* BL21 (DE3) (Studier *et al.*, *supra*) y se seleccionaron transformantes a +37°C y a +30°C. Sin embargo, no pudo obtenerse transformante viable alguno a ninguna de las dos temperaturas. Al ser la expresión fugable del promotor T₇ en pET 8c mucho mayor que la de pET 11d (Km) (Studier *et al.*, *supra*), la toxicidad del producto *asiA* podría explicar la falta de transformabilidad.

Sin embargo, pudieron obtenerse transformantes utilizando *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS como hospedador, en el cual la expresión fugable está reprimida adicionalmente por la lisozima T₇ expresada por pLysS.

(B)

Se obtuvo el fragmento de DNA *NcoI-BamHI* de 284 pb a partir de pARC 8100 y se ligó a los sitios *NcoI-BamHI* de pET 11d Km (Umender K. Sharma *et al.*, J. Bact., 177, 6745 (1996)) y se transformó en *E. coli* DH5α. Se seleccionaron transformantes respecto a resistencia a la kanamicina. Las preparaciones de plásmidos a partir de transformantes individuales se digirieron con enzimas de restricción y el transformante correcto que liberaba el fragmento de 284 pb después de digestión con *NcoI-BamHI* se marcó como pARC 8101 (Fig. 4). Los transformantes se seleccionaron a +37°C y parecían normales.

Se utilizó luego DNA de pARC 8101 para transformar el hospedador de expresión *E. coli* BL26 (DE3). BL26 es una cepa isogénica lac Iq de BL21 (Studier *et al.*, *supra*). Se seleccionaron transformantes para kanamicina a +37°C y a +30°C. Los transformantes obtenidos a +37°C estaban morfológicamente dañados y no eran viables, lo que indicaba

la toxicidad alguna de la expresión fugable del gen *asiA*. En contraste, pudieron obtenerse colonias sanas cuando se seleccionaron los transformantes a +30°C, en cuyo caso puede esperarse que la expresión fugable a partir del promotor T₇ sea insignificante.

Las colonias BL26 (DE3)/pLysS estaban sanas a +37°C y a +30°C, lo que indica que la regulación estricta de la expresión en esta cepa hacía que el gen *asiA* no sea tóxico para el hospedador. Los transformantes obtenidos a partir de DH5α estaban también sanos a +37°C y a +30°C, indicando que el gen una vez transformado en un hospedador sin expresión carecía de toxicidad.

(C)

Se escindió el gen *asiA* a partir de pARC 8101 como un fragmento de DNA *XbaI-BamHI* para incluir la secuencia del sitio de fijación de ribosoma y se ligó al vector de bajo número de copias, pWKS129 escindido con *XbaI-BamHI* (Wang & Kushner (1991) Gene 100, 195) y la mezcla de ligación se transformó en *E. coli* DH5α. El plásmido recombinante que albergaba el gen *asiA* se identificó por perfil de restricción y se marcó como pARC 8114 (Fig. 5).

Cuando se transformó este DNA plasmídico en *E. coli* BL21 (DE3) proporcionó transformantes viables a +37°C y a +30°C, dado que el bajo número de copias del plásmido reducía el nivel de la proteína AsiA expresada por expresión fugable.

Ejemplo 4

Proteína de fusión glutation-S-transferasa-Anti-sigma

4.1. Clonación de la proteína de fusión en *E. coli*

La secuencia codificante para el gen *asiA* se escindió como un fragmento *NcoI-BamHI* de pARC 8100 y se ligó a pARC 0499 escindido con *NcoI-BamHI*. El plásmido pARC 0499 tiene un sitio *NcoI* en marco con la secuencia codificante de glutation-S-transferasa, permitiendo la fusión del término N de las secuencias *asiA*. La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* DH5α y se seleccionaron transformantes a +37°C y +30°C. Se obtuvieron colonias viables a ambas temperaturas, lo que indicaba que la fusión N-terminal reduce la toxicidad de la proteína. El plásmido recombinante obtenido con las secuencias codificantes de GST-AsiA se designó pARC 8105 (Fig. 6).

La proteína de fusión GST-AsiA se purificó como sigue: se cultivó *E. coli* DH5α que albergaba pARC 8105 en LB hasta una DO a 600 nm de 0,6 a +37°C seguido por la adición de IPTG 1 mM, y se dejó crecer durante un periodo adicional de 2 horas. Las células se centrifugaron luego a 5000 rpm durante 10 minutos. Las células reducidas a un sedimento se suspendieron en Tampón A (solución salina tamponada con fosfato (PBS) de pH 7,5, 5 µg/ml de aprotinina, 5 µg/ml de leupeptina) y se trataron por ultrasonidos. El material tratado por ultrasonidos se clarificó a 45.000 rpm durante 10 minutos a +4°C y el sobrenadante se pasó a través de una columna Glutation-Sepharose 4B equilibrada previamente con PBS. La colonia se lavó con 5 volúmenes de lecho de urea 1 M una sola vez seguido por lavado con PBS (10 volúmenes de lecho). La proteína fijada se eluyó con glutation 10 mM y el material eluido se dializó durante una noche contra un tampón que contenía hidrocloreuro de Tris(hidroximetil)aminometano 50 mM (Tris-HCl), de pH 7,5. La proteína dializada se concentró luego a una décima parte de su volumen utilizando filtros de cono Amicon. La proteína concentrada se trató luego con una relación 1:50 de la proteasa Factor Xa en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, CaCl₂ 1 mM a +25°C durante 4 horas. El material eluido digerido se pasó luego a través de una columna Glutation-Sepharose y la fracción no fijada se recogió y se analizó en cuanto a la pureza de la proteína AsiA por SDS-PAGE.

4.2. Clonación de la proteína de fusión en levadura

La expresión y purificación de la proteína de fusión GST-AsiA en *E. coli* no permitía producción en gran escala debido a la toxicidad inherente de la proteína de fusión. Para obtener grandes cantidades de la proteína AsiA, se investigó la posibilidad de expresar la proteína de fusión GST-AsiA en un hospedador de levadura. Dado que las especies de *Saccharomyces* no tienen un homólogo de sigma⁷⁰, se esperaba que la proteína AsiA no tuviera efectos tóxicos sobre el aparato de transcripción del hospedador, y por ello se eligió para los experimentos iniciales un sistema de expresión de *Saccharomyces cerevisiae*.

El gen codificante de la proteína de fusión GST-AsiA en el plásmido pARC 8105 se amplificó utilizando el iniciador directo representado como SEQ ID NO: 7 y el iniciador inverso representado como SEQ ID NO: 8. El fragmento amplificado de 1,0 kb se restringió con *BglIII* y *HindIII* que son los sitios introducidos por la secuencia iniciadora en los extremos 5' y 3' del fragmento PCR amplificado. El fragmento restringido con *BglIII-HindIII* se ligó al vector de clonación pSW6 de *Saccharomyces cerevisiae* restringido con *BglIII-HindIII* (Pascall *et al.* (1991) J. Mol. Endocrinol. 6, 63-70). La mezcla de ligación se transformó en el hospedador CGY1585 de *Saccharomyces cerevisiae* y se seleccionaron los transformantes sobre leucina (3 µg/ml).

Los transformantes individuales de ambas mezclas de reacción se cribaron respecto a la presencia de plásmido con el perfil de restricción esperado. El plásmido recombinante obtenido con el vector pSW6 se identificó como pARC 8180 (Fig. 7). Cepas de *S. cerevisiae* CGY 1585 que albergaban pARC 8180 se cultivaron utilizando procedimientos

estándar y se lisaron por paso de la suspensión concentrada de células a través de una Prensa Francesa. El lisado se centrifugó luego a 10.000 rpm, se aplicó el sobrenadante a una columna Glutation-Sepharose (Pharmacia), y la proteína de fusión se purificó siguiendo protocolos estándar.

La proteína de fusión GST-AsiA purificada se escindió con factor Xa como se ha recomendado y se separó la proteína AsiA. El rendimiento de la proteína AsiA purificada fue 500 µg/ml. La actividad de la proteína GST-AsiA, expresada y purificada a partir de *Saccharomyces*, se comparó con la obtenida a partir de *E. coli* y se encontró que era idéntica en su capacidad para inhibir la transcripción mediada por sigma⁷⁰ del molde T₄ (Fig. 8). La proteína AsiA purificada a partir de GST-AsiA después de la escisión del Factor Xa inhibía también la transcripción dependiente de sigma⁷⁰ de *E. coli*.

La capacidad para sobreexpresar y purificar grandes cantidades de la proteína AsiA en *Saccharomyces* sin problemas de toxicidad para el hospedador indica también que la proteína AsiA no tiene un homólogo sigma⁷⁰ correspondiente en esta especie. Dado que la RNA-polimerasa de *Saccharomyces* es similar a la de eucariotas superiores, ello corrobora también el hecho de que la proteína AsiA es tóxica únicamente para el aparato de transcripción procariota.

Con objeto de ensayar la viabilidad de la expresión de AsiA en sistemas de expresión de levadura alternativos, se eligió el sistema de expresión de *Pichia pastoris*. El gen codificante de GST-AsiA se amplificó por PCR a partir de pARC 8105 y se clonó en pPIC9K (Invitrogen).

iniciador 5'(asi34) - TA TAC GTA TCC CCT ATA CTA GGT TAT TGG

iniciador 3'(asi35) - T TGC GGC CGC TTA TTT GTT CGT ATA CAT

Las condiciones de la PCR utilizadas fueron:		temperatura de fusión	94°C
		temperatura de reasociación	50°C
		temperatura de extensión	72°C

y se realizaron 30 ciclos.

Se clonó 1 kB de producto PCR como fragmento SnaBI-NotI en pPIC9K (pARC 8274). Se seleccionaron transformantes en *Pichia pastoris* de pARC 8274 sobre la base de la resistencia a G418. Los estudios de expresión indicaron que se secretaba GST-AsiA en el sobrenadante de cultivo. Se encontró que la GST-AsiA purificada a partir del sobrenadante de cultivo inhibía la transcripción *in vitro* tan eficientemente como la GST-AsiA de *E. coli* o de *Saccharomyces*.

Esto indica que es factible producir GST-AsiA recombinante en un sistema de expresión de levadura.

Ejemplo 5

Ensayos de interacción AsiA-sigma⁷⁰ *in vitro*

5.1. Ensayo de RNA-polimerasa

El ensayo de RNA-polimerasa de *E. coli* se estandarizó siguiendo el protocolo de Orsini *et al.* (J. Bacteriol. 175, 85-93, 1993) utilizando DNA del fago T₄ como molde para cuantificar la transcripción dependiente de sigma⁷⁰. Se purificó la enzima RNA-polimerasa de núcleo de *E. coli* siguiendo el protocolo de Burgess y Jendriask (1975) Biochemistry 14, 4634-4638.

5.2. Inhibición de la transcripción de *E. coli* por la proteína AsiA

Se añadieron a la mezcla de reacción concentraciones crecientes de proteína AsiA expresada en *S. cerevisiae*, y se cuantificó la transcripción mediada por la RNA-polimerasa de *E. coli*. Los resultados demostraron que concentraciones crecientes de proteína AsiA inhibían por completo la transcripción mediada por sigma⁷⁰ de *E. coli*.

5.3. Inhibición de la transcripción de *E. coli* por la proteína de fusión GST-AsiA

Se purificó la proteína de fusión GST-AsiA a partir de *S. cerevisiae* como se describe en la sección 5.2 y se utilizó a concentraciones diferentes en el ensayo de transcripción de RNA-polimerasa mediada por sigma⁷⁰ de *E. coli*, utilizando como molde DNA del fago T₄. La proteína de fusión GST-AsiA inhibía en más de un 80% la transcripción mediada por sigma⁷⁰ cuando la enzima de núcleo se reconstituyó con 2,5 µg de proteína sigma⁷⁰.

5.4. Reactivación de la transcripción de *E. coli* mediada por sigma⁷⁰

Se añadieron concentraciones crecientes de proteína sigma⁷⁰ de *E. coli* a la mezcla de reacción que contenía 0,1 µg de AsiA. Como se muestra en la Tabla 1, la adición de la proteína sigma⁷⁰ podía reactivar la transcripción mediada por la RNA-polimerasa de *E. coli*. Esta inversión de la inhibición demuestra la interacción específica de la proteína AsiA con sigma⁷⁰.

TABLA 1

	sigma ⁷⁰ de <i>E. coli</i>	sigma ⁷⁰ de <i>S. typhimurium</i>
	[³ H] UTP (nmol)	
RNA-polimerasa de <i>E. coli</i>	2,1	2,3
RNA-polimerasa de <i>E. coli</i> + 0,1 µg de AsiA	0,57	0,34
RNA-polimerasa de <i>E. coli</i> + 0,1 µg de AsiA + 4 µg de sigma ⁷⁰	2,3	3,0
RNA-polimerasa de <i>E. coli</i> + 0,1 µg de AsiA + 4 µg de sigma ⁷⁰ (preincubada con AsiA)	0,68	0,98

5.5. Efecto de sigma⁷⁰ de *Salmonella typhimurium* sobre la transcripción de *E. coli*

Como se describe en la Sección 5.1, el ensayo de actividad de RNA-polimerasa de *E. coli* se estandarizó con enzima purificada y DNA del fago T₄ como molde. La RNA-polimerasa podía inhibirse en una proporción > 80% por 0,07 µg de proteína AsiA purificada.

A una mezcla de reacción que contenía la RNA-polimerasa de *E. coli*, DNA T₄ y 0,1 µg de AsiA, se añadieron concentraciones crecientes de sigma⁷⁰ purificada de *Salmonella typhimurium* y se cuantificó la actividad de RNA-polimerasa. Como se muestra en la Tabla 1, la adición de 4 µg de sigma⁷⁰ de *S. typhimurium* podía restablecer la actividad de la RNA-polimerasa.

5.6. Preincubación de sigma⁷⁰ con AsiA

A una mezcla de reacción que contenía RNA-polimerasa de *E. coli* y molde de DNA T₄ se añadieron 0,1 µg de AsiA y 4 µg de sigma⁷⁰ de *E. coli* o *S. typhimurium*, preincubada a +37°C durante 10 min con 0,1 µg de AsiA. Como se muestra en la Tabla 1, la preincubación de la sigma⁷⁰ con AsiA anulaba la capacidad de la sigma⁷⁰, tanto de *E. coli* como de *S. typhimurium*, para activar la RNA-polimerasa de *E. coli*.

Ejemplo 6

ELISA competitivo para cuantificación de la interacción AsiA-sigma⁷⁰

Ensayos de cribado

Los principios anteriores proporcionan una base para un método de identificación de secuencias de oligonucleótidos que codifican péptidos, que pueden ser afines o no al péptido AsiA, y que pudieran fijarse eficientemente a subunidades sigma⁷⁰ de *E. coli*, *S. typhimurium* y/u otras unidades sigma internas o asociadas con virulencia de patógenos bacterianos.

La identificación de tales estructuras peptídicas podría permitir la identificación ulterior, por métodos conocidos, de peptoides, peptidomiméticos y moléculas orgánicas que puedan someterse a ensayos de transcripción para inhibición de la transcripción dependiente de sigma⁷⁰.

Sigma⁷⁰ truncada (los 99 aminoácidos del terminal C) que se ha demostrado es la región de fijación anti-sigma de sigma⁷⁰ de *E. coli* (Severinova *et al.*, J. Mol. Biol. (1996) 263(5) pp 637-647) se clonó y se expresó en un vector de expresión del marcador His dando como resultado un producto proteínico marcado con (His)₅.

Se preparó una solución del producto proteínico (200 pmoles/ml) en un tampón de pH 7,5 que comprendía Tris HCl (10 mM) y cloruro de sodio (50 mM) y se añadieron 200 µl de solución por pocillo de una placa de microtitulación recubierta de níquel, seguido por incubación a la temperatura ambiente durante un periodo de dos horas. La placa de microtitulación se lavó luego 5 veces con la solución tampón y se incubó después a 37°C durante una hora con una solución de seroalbúmina bovina (3% p/v) en el tampón anterior. Después de lavado 5 veces con solución salina

ES 2 299 250 T3

tamponada con fosfato (PBS) con “Tween” 20 (monolaurato de polioxietilen-(20)-sorbitán, 0,5% v/v), se añadió la proteína de fusión GST-AsiA preparada como se describe en el *Ejemplo 4.1.* anterior (100 ng) junto con una cantidad definida de un inhibidor supuesto de la proteína sigma⁷⁰ truncada (coralopironina, mixopironina o ripostatina) y se incubó a 37°C durante una hora. Se llevó a cabo un lavado ulterior (5 veces) con PBS-“Tween” 20 y se añadieron
 5 luego a los pocillos anticuerpos anti-GST (1:2000) producidos en conejos, con incubación a 37°C durante una hora. Se repitió el paso de lavado previo, se añadió después de ello conjugado IgG anticonejo - peroxidasa de rábano picante (HRP) (1:2000) y se incubó a 37°C durante una hora. Se llevó a cabo un lavado final con PBS-“Tween” 20, antes de añadir el sustrato de la enzima HRP, tetrametil-bencideno/H₂O₂. La reacción enzimática (que daba como resultado el desarrollo de color) se paró después de un periodo de tiempo adecuado por adición de H₂SO₄ 6N y la placa de
 10 microtitulación se “leyó” en un espectrofotómetro utilizando luz de longitud de onda (λ) 450 nm. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la Tabla 2.

TABLA 2

Ensayo	% Fijación a sigma ⁷⁰ truncada
GST-AsiA (500 ng/ml)	100
GST-AsiA + AsiA (7 µg/ml)	12
GST-AsiA + coralopironina (30 µg/ml)	69
GST-AsiA + mixopironina (30 µg/ml)	56
GST-AsiA + ripostatina (1 µg/ml)	100
GST-AsiA + ripostatina (10 µg/ml)	55
GST-AsiA + ripostatina (100 µg/ml)	1,5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de identificación de un ligando de una subunidad sigma⁷⁰ bacteriana que comprende poner en contacto la subunidad sigma⁷⁰ o una porción de la misma que comprende la región de fijación anti-sigma, con un compuesto de ensayo y una proteína de fusión GST-AsiA producida en un sistema de expresión de levadura, y determinar si el compuesto de ensayo se fija competitivamente con el factor anti-sigma⁷⁰ a la subunidad sigma⁷⁰ o porción de la misma.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:
 - (i) inmovilizar la subunidad sigma⁷⁰ o porción de la misma sobre una matriz o soporte sólido;
 - (ii) añadir el compuesto de ensayo y la proteína de fusión;
 - 15 (iii) añadir un primer anticuerpo contra la proteína de fusión;
 - (iv) añadir un segundo anticuerpo marcado contra el primer anticuerpo, y
 - 20 (v) determinar la cantidad de segundo anticuerpo fijada al complejo (primer anticuerpo - proteína de fusión - subunidad sigma⁷⁰ o porción de la misma) formado sobre la matriz o soporte sólido.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el cual la subunidad sigma⁷⁰ o porción de la misma se obtiene de *Escherichia coli* o *Salmonella typhimurium*.
- 25 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la proteína AsiA tiene una secuencia de aminoácidos como la representada en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el ligando es un inhibidor de una subunidad sigma⁷⁰ bacteriana.
- 30 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la proteína de fusión se produce en un sistema de expresión de *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*.

35

40

45

50

55

60

65

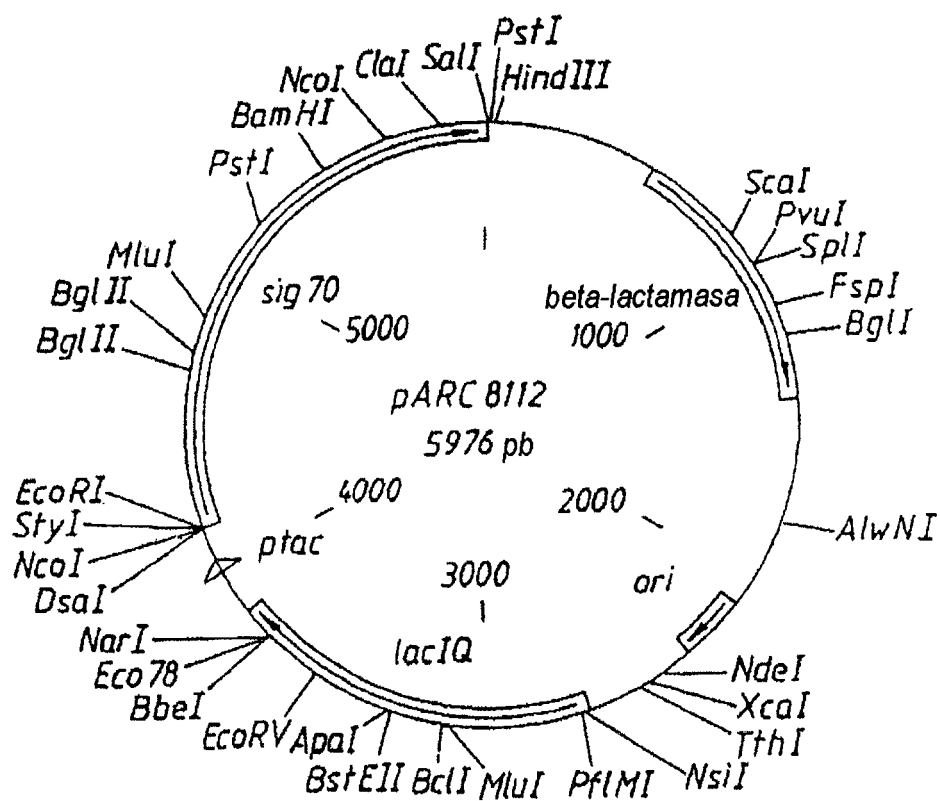


Fig. I

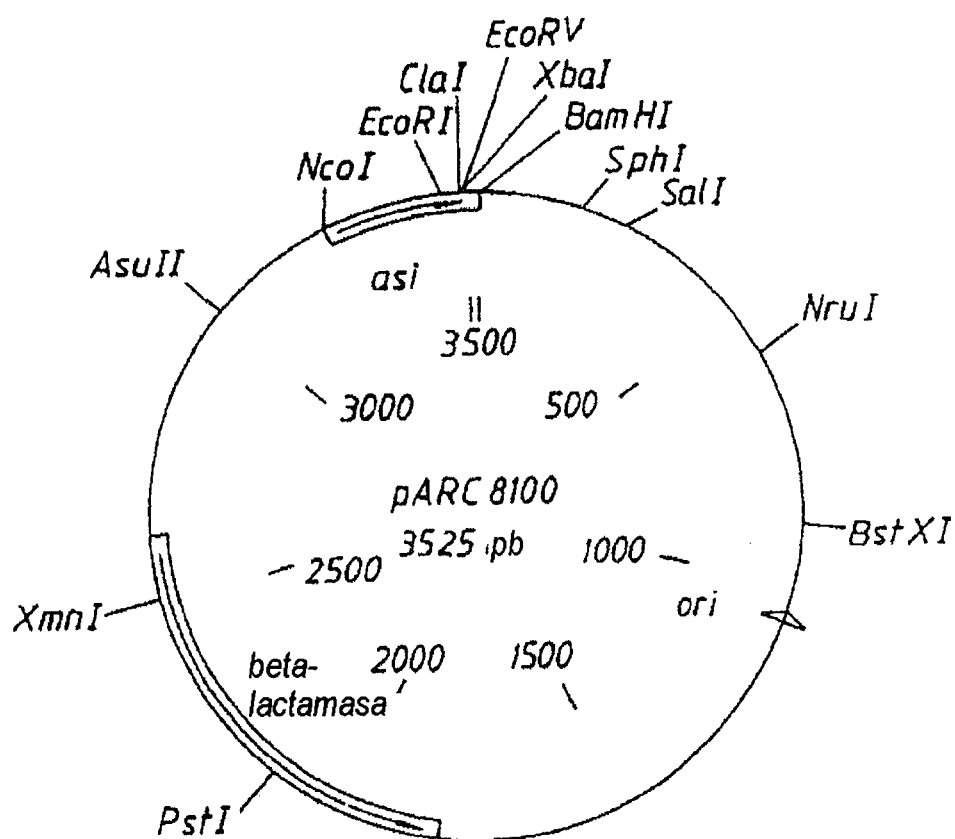


Fig. 2

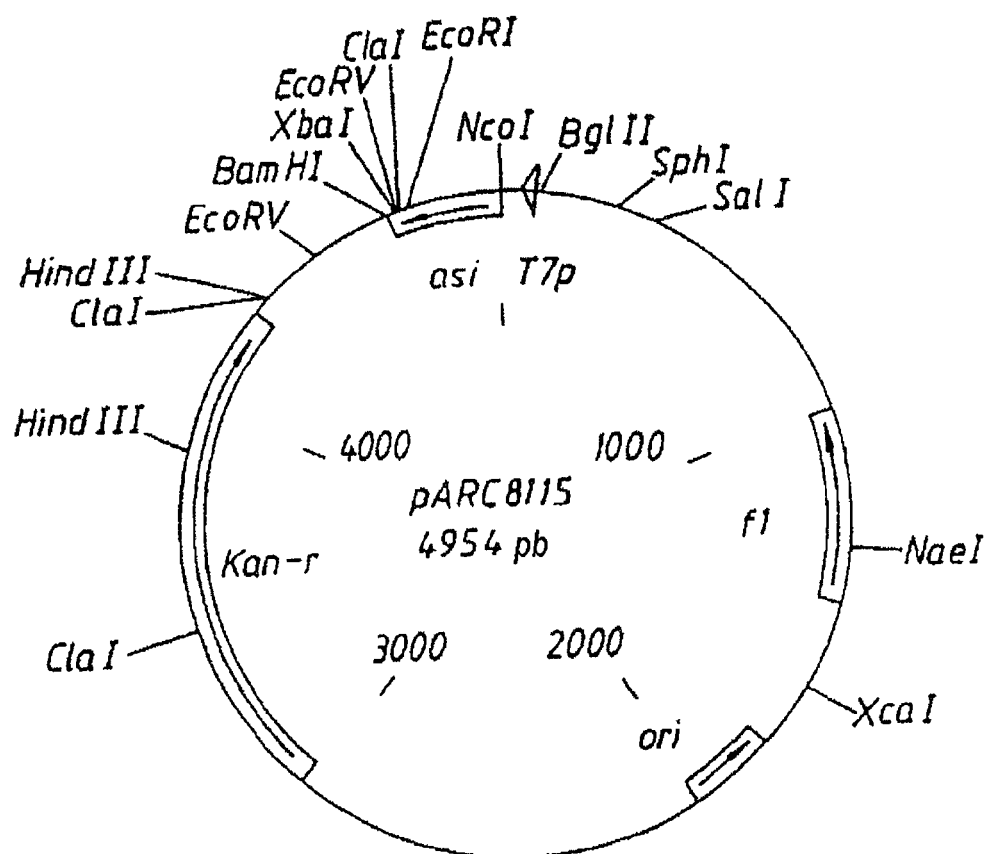


Fig. 3

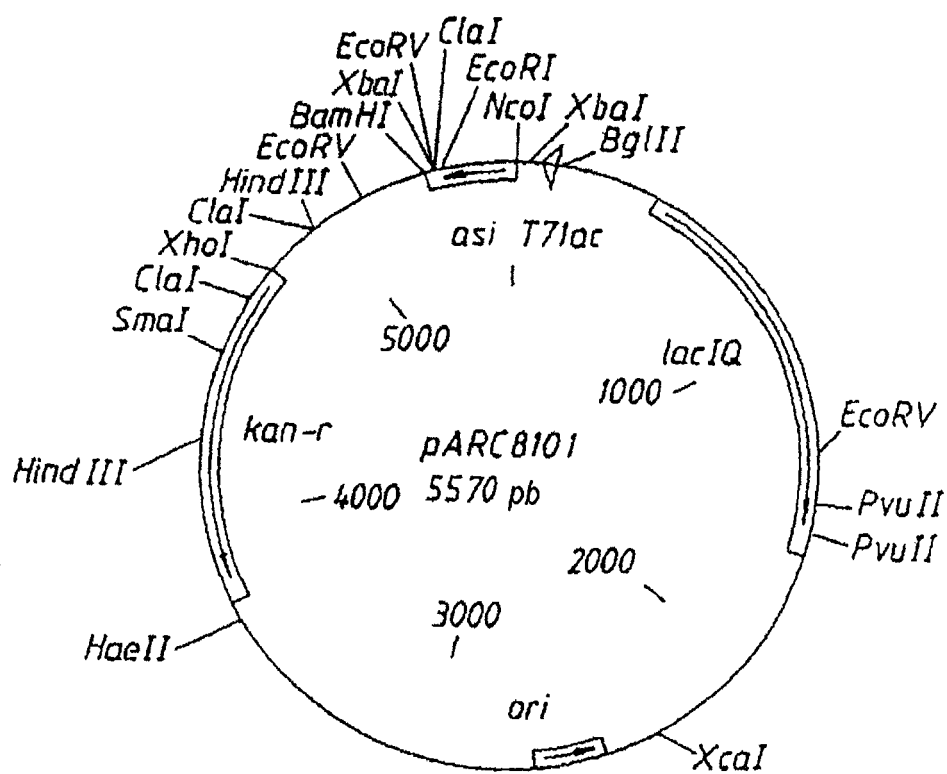


Fig. 4

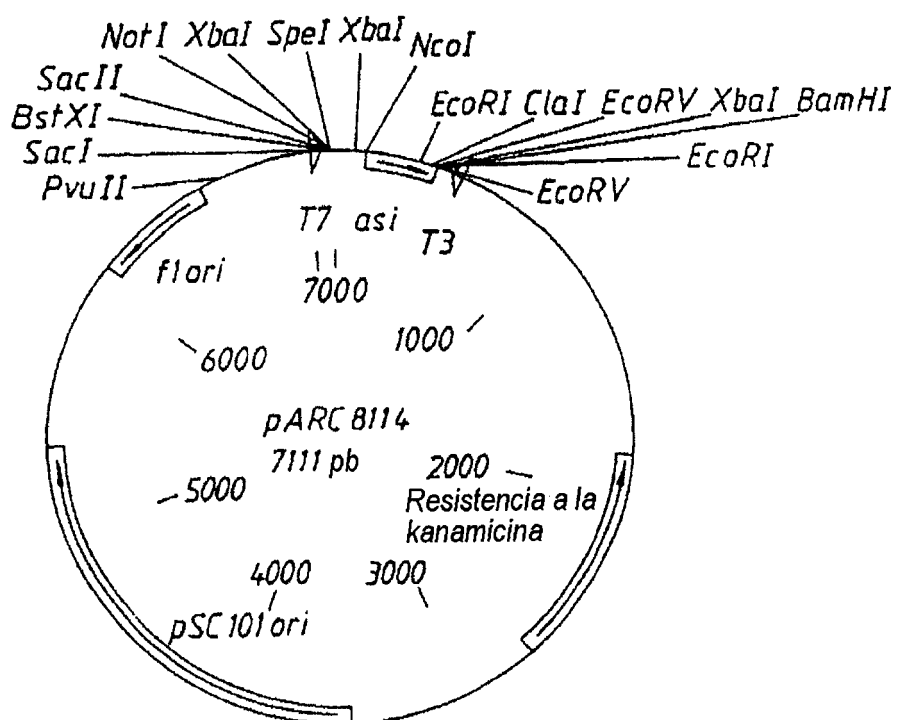


Fig. 5

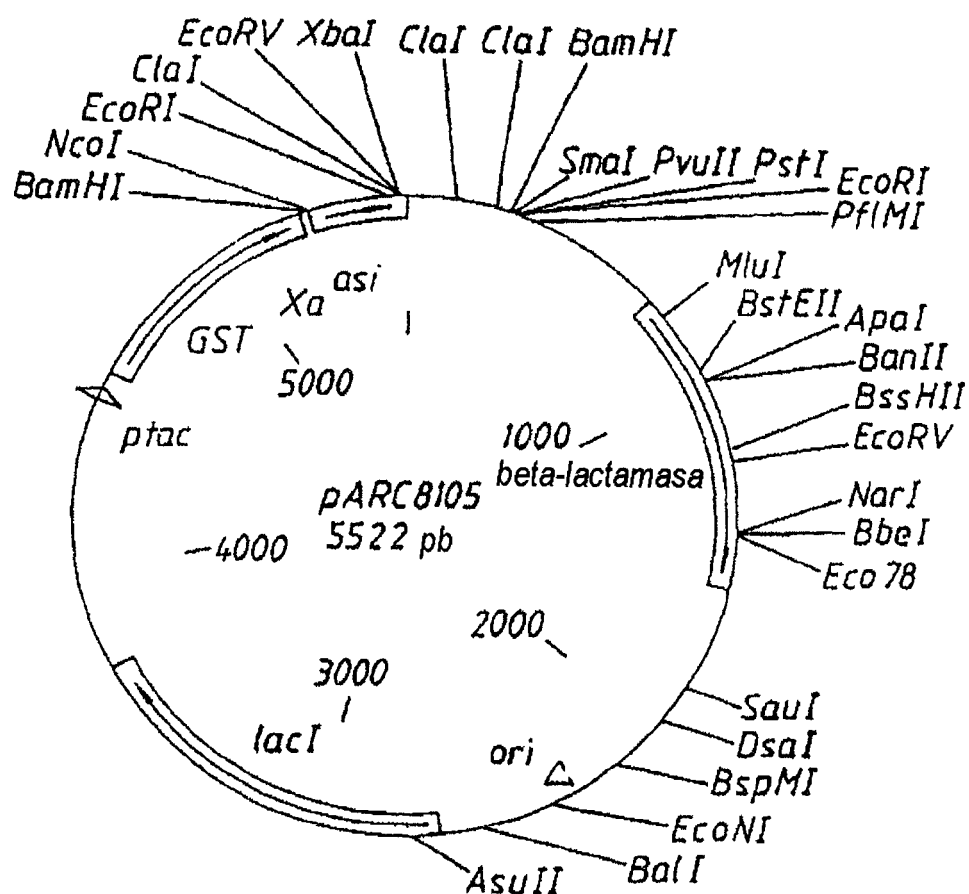


Fig. 6

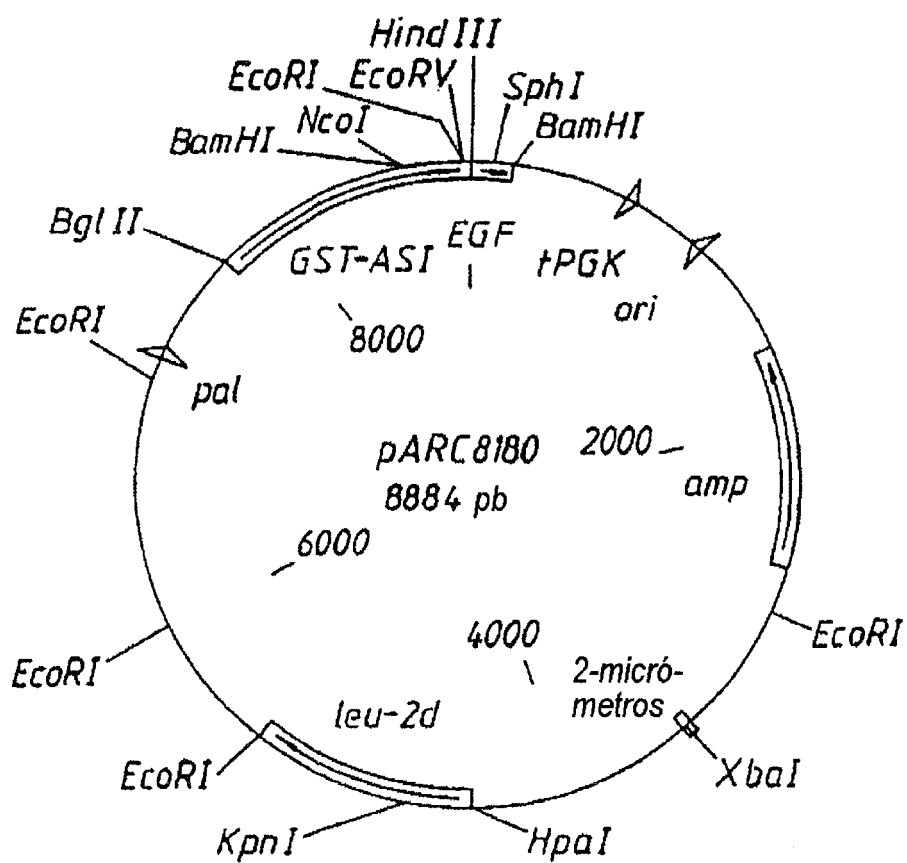


Fig. 7

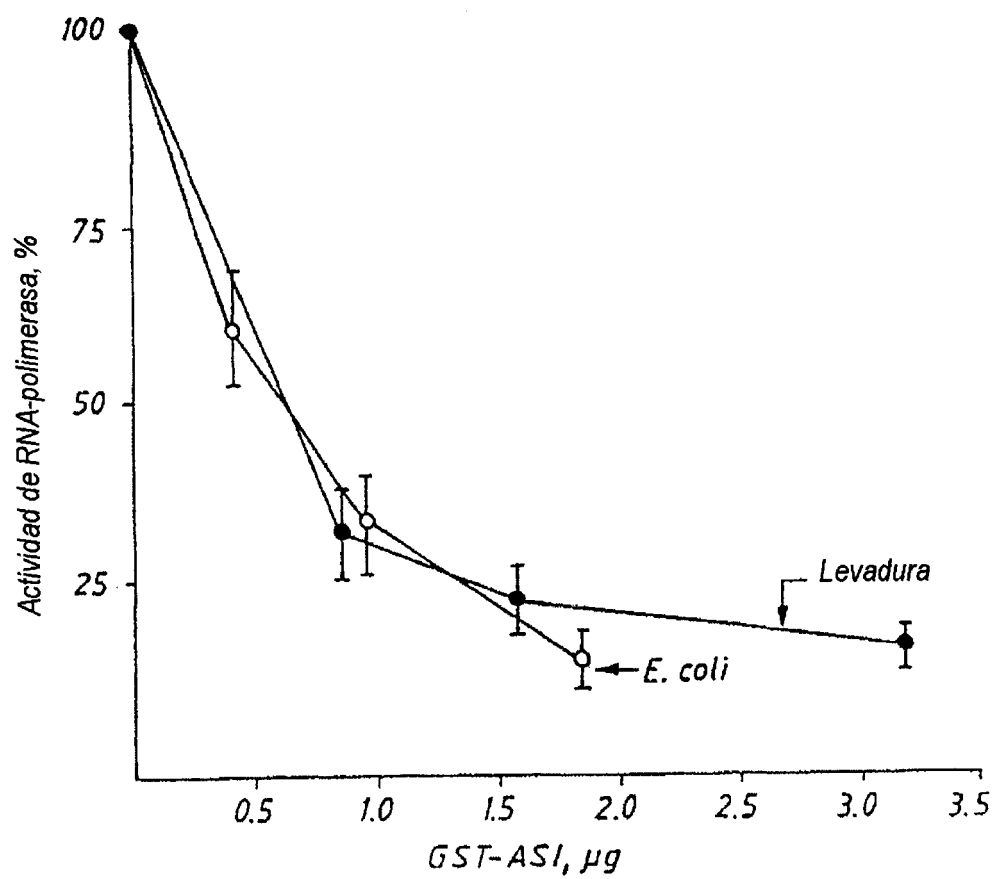


Fig. B

ES 2 299 250 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ASTRA AKTIEBOLAG

5 <120>

<130> R 1765

10 <140> Ensayo de RNA-polimerasa
<141>

<160> 8

15 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

20 <211> 90

<212> PRT

<213> Bacteriófago T4

25 <400> 1

Met Asn Lys Asn Ile Asp Thr Val Arg Glu Ile Ile Thr Val Ala Ser
1 5 10 15

30

Ile Leu Ile Lys Phe Ser Arg Glu Asp Ile Val Glu Asn Arg Ala Asn
20 25 30

35

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

40

Leu Asn Gln Asn Ser Phe Arg Lys Ile Val Ser Glu Leu Thr Gln Glu
50 55 60

45

Asp Lys Lys Thr Leu Ile Asp Glu Phe Asn Glu Gly Phe Glu Gly Val
65 70 75 80

Tyr Arg Tyr Leu Glu Met Tyr Thr Asn Lys
85 90

50

<210> 2

<211> 90

<212> PRT

55 <213> Bacteriófago T4

60

65

ES 2 299 250 T3

<400> 2

Met Gly Lys Asn Ile Asp Thr Val Arg Glu Ile Ile Thr Val Ala Ser
 1 5 10 15
 5 Ile Leu Ile Lys Phe Ser Arg Glu Asp Ile Val Glu Asn Arg Ala Asn
 20 25 30
 10 Phe Ile Ala Phe Leu Asn Glu Ile Gly Val Thr His Glu Gly Arg Lys
 35 40 45
 15 Leu Asn Gln Asn Ser Phe Arg Lys Ile Val Ser Glu Leu Thr Gln Glu
 50 55 60
 20 Asp Lys Lys Thr Leu Ile Asp Glu Phe Asn Glu Gly Phe Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Tyr Arg Tyr Leu Glu Met Tyr Thr Asn Lys
 85 90

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador PCR

<400> 3

atggaattca acccgagtc acagctg

27

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador PCR

<400> 4

tgagtcgact taatcgtcga ggaagct

27

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador PCR

65

ES 2 299 250 T3

<400> 5

ggccatgggc aataaaaaca ttgat

25

5

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador PCR

15

<400> 6

ggggatcctt attgttcgt atacat

26

20

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador PCR

30

<400> 7

gaaagatctc atatgtcccc tatactaggt

30

35

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador PCR

45

<400> 8

ctaagctttt attgttcgt atacatctc

29

50

55

60

65