



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 302 968**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/18 (2006.01)
C12Q 1/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03786098 .8**
86 Fecha de presentación : **09.12.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1573050**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

54 Título: **CGT1 como una diana antifúngica.**

30 Prioridad: **09.12.2002 GB 0228699**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2008

73 Titular/es: **UCB, S.A.**
Allée de la Recherche 60
1070 Bruxelles, BE

72 Inventor/es: **Vousden, Katherine, Ann**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

CGT1 como una diana antifúngica.

La presente invención se refiere a una nueva diana antifúngica, la guanililtransferasa CGT1 (CGT1), a métodos de cribado para inhibidores de la CGT1 y a su uso como compuestos antifúngicos, a composiciones farmacéuticas que los contienen y a su uso en medicina, específicamente en el tratamiento de un individuo susceptible a o que padece una infección fúngica. En particular, los compuestos encuentran uso en el tratamiento de infecciones fúngicas tópicas o mucosales (p.ej. afta y candidiasis vaginal), p.ej. causadas por un hongo de las especies de *Candida*, y para infecciones sistémicas, p.ej. causadas por hongos de especies de *Candida* y *Aspergillus*, tales como, pero no limitadas a, *C. albicans*, *Aspergillus flavus* o *Aspergillus fumigatus*.

Introducción

15 Patógenos fúngicos

Los dos patógenos fúngicos principales son los de las especies de *Candida*, tales como, pero no limitados a, *C. albicans*, y los de las especies de *Aspergillus*, tales como, pero no limitados a, *Aspergillus flavus* o *Aspergillus fumigatus*.

Las infecciones fúngicas pueden afectar a los seres humanos y los animales. De manera general, las infecciones fúngicas se producen como resultado de una infección oportunista de un individuo debilitado o inmunodeprimido, y éstas pueden incluir infecciones de las articulaciones y de la piel. La levadura *Candida albicans* (*C. albicans*) es uno de los patógenos fúngicos más generalizados en los seres humanos. Es la causa de una creciente carga financiera y logística sobre el sistema de asistencia sanitaria y sus proveedores. Aunque la *C. albicans* es un miembro de la flora normal de las membranas mucosas en los tractos respiratorio, gastrointestinal y genital femenino, puede ganar dominancia en tales localizaciones (p.ej. tras un tratamiento con antibióticos antibacterianos, en pacientes con diabetes o en pacientes que usan corticosteroides) y estar asociada con dolencias patológicas. Además, casi todos los individuos HIV positivos padecen una infección por *Candida* antes del comienzo del desarrollo completo del SIDA. La incidencia de infecciones fúngicas con riesgo para la vida se ha incrementado drásticamente al aumentar la población de individuos inmunocomprometidos (que incluyen pacientes con cáncer, con transplante de órganos y con SIDA). Las opciones terapéuticas actuales para el tratamiento de estas infecciones son limitadas, y por tanto hay una necesidad de nuevos compuestos antifúngicos con mecanismos de acción novedosos para el uso en el tratamiento o la prevención de tales infecciones fúngicas.

El desarrollo de fármacos antifúngicos se basa a menudo en el cribado o *screening* de un gran número de compuestos antes de encontrar uno o más compuestos principales que son eficaces contra los hongos diana. Por tanto, para el desarrollo de estos cribados es crítico definir las proteínas esenciales para la supervivencia o el crecimiento de los hongos diana, y descubrir medios de purificación o producción de tales proteínas. Por tanto, hay una necesidad en la técnica de identificar productos genéticos fúngicos esenciales, estructurales o funcionales, que puedan servir como dianas para la intervención de fármacos, y de métodos para identificar agentes antifúngicos útiles que perjudiquen la función de estos productos genéticos fúngicos esenciales, y de composiciones que puedan ser usadas para tratar las infecciones fúngicas impidiendo o inhibiendo el crecimiento de, y preferentemente matando, los hongos.

45 Identificación de genes "esenciales"

En la técnica se usan diversas definiciones para lo que constituye un gen esencial, pero el término se aplica de manera más frecuente a aquellos genes necesarios para el crecimiento en medio rico. Esta variación en la técnica puede ser desorientadora y restrictiva en términos de identificación de productos genéticos que constituyan buenas dianas antifúngicas. Está disponible una cantidad significativa de información sobre la secuencia genómica de la *C. albicans* en bases de datos tanto públicas (<http://www.sequence.stanford.edu/group/candida/>) como privadas (Incyte Genomics Inc.). Esto se puede combinar con datos de secuencia genómica de otros organismos (The yeast genome directory, 1997, Nature, 387(6632 Suppl):5; Wood V, *et al*, 2002, Nature, 415(6874):871-80) y con datos de apoyo tales como la caracterización funcional del genoma del *Saccharomyces cerevisiae* (Giaever G, *et al*, 2002, Nature, 418(6896):387-91). Este método dirigido por la bioinformática ha permitido la predicción de genes que pueden ser esenciales en la *C. albicans* (Spaltmann F, *et al.*, 1999, Drug Discovery Today, 4:17-26). Sin embargo, incluso para organismos relacionados de manera relativamente íntima, tales como el *Saccharomyces cerevisiae* y la *C. albicans*, hay diferencias significativas que hacen a tales predicciones realizadas por ordenador poco fiables. Por ejemplo, el CET1 y el CDC25 no son esenciales en la *C. albicans* a pesar de ser esenciales en el *Saccharomyces cerevisiae* (Enloe B, *et al*, 2000, J. Bacteriol., Oct, 182:20, 5730-6; Dunyak DS, *et al*, 2002, 6th ASM Conference on Candida and Candidiasis).

Hay varias estrategias para identificar genes esenciales en la *C. albicans* mediante la metodología práctica. Los métodos negativos se basan en la incapacidad de generar una cepa que contenga un gen diana funcional interrumpido. La mayoría de genes caracterizados de esta manera se basan en variaciones del método URA blaster (Fonzi WA & Irwin MY, 1993, Genetics, 134:717-728). Estas técnicas pueden ser muy eficaces para analizar genes individuales, pero pueden no ser completamente fiables. Se informó incorrectamente de que el CET1 era esencial en la *C. albicans* porque no se pudieron recuperar mutantes homocigotos viables usando el método URA blaster (Pei, *et al*, 2001). Sin embargo, se ha demostrado posteriormente que no es esencial (Dunyak *et al*, 2002). Los métodos positivos controlan

la expresión del gen diana bien indirectamente, tal como usando RNA antisentido (De Backer MD, *et al.*, 2001, Nat Biotechnol, Mar, 19:3, 235-41), o bien directamente, tal como por sustitución de promotores con promotores inducibles tales como MRP1 y Tet (Munro CA, *et al.*, 2001, Mol. Microbiol., Mar 39:5 1414-26; Nakayama H, *et al.*, 2000, Infect. Immun., Dec 68:12 6712-9).

La identificación en todo el genoma de los genes esenciales no se ha aplicado con éxito a la *C. albicans* por varias razones. Estas incluyen que la *C. albicans* es un organismo diploide, no es capaz de aparearse en circunstancias normales, y que hay pocos elementos transponibles funcionales. Los intentos de vencer estos problemas usando RNA antisentido e interferencia de promotores han tenido un éxito limitado (De Backer, *et al.*, 2001). Por lo tanto, hay una necesidad en la técnica de genes esenciales validados de especies fúngicas, en particular las especies de *Candida*, que se puedan usar como dianas para el desarrollo de nuevos compuestos antifúngicos.

Guanililtransferasa CGT1

La guanililtransferasa CGT1 (CGT1) E.C. 2.7.7.50 es una enzima que tapona el mRNA (Yamada-Okabe, T, *et al.*, 1996, Microbiology, 142, 2515-2523). Casi todos los mRNAs eucarióticos están taponados en su término 5'. El taponamiento es crucial para la estabilidad, procesamiento, exportación nuclear y traducción eficaz del mRNA. La enzima CGT1 es codificada por el gen de la CGT1 (CEG1) y se proporcionan detalles para la enzima fúngica bajo los números de acceso: P78587, en la base de datos Swiss Prot (<http://ca.expasy.org>), y CA3459, en la base de datos de *Candida* del Instituto Pasteur (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>) que tiene referencias cruzadas con el marco de lectura abierta (ORF, siglas en inglés) de Stanford orf6.5728 (<http://www.sequence.stanford.edu/group/candida/>). Los sinónimos para la CGT1 incluyen GTP-RNA guanililtransferasa, Gtasa y mRNA guanililtransferasa.

La patente de EE.UU. 6.232.070 describe métodos para cribar compuestos que inhiben la formación de una estructura taponadora de mRNA en 5' de un organismo. La solicitud de patente internacional WO 02/053103 describe la búsqueda de dianas de la formación de tapones en el mRNA para el tratamiento de infecciones parasíticas. La solicitud de patente internacional WO 94/22488 describe oligos antisentido que interfieren con la actividad de taponamiento del mRNA.

La presente invención se basa en el hallazgo de que la CGT1 es una proteína esencial para las especies fúngicas de *Candida* y *Aspergillus*. Este hallazgo demuestra el potencial para desarrollar inhibidores selectivos de la CGT1 fúngica, que pueden matar los organismos fúngicos invasores a la vez que eximen al huésped de cualquier efecto perjudicial. Antes de esta invención, la CGT1 no ha sido considerada como diana diferencial para compuestos antifúngicos.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a la guanililtransferasa CGT1 fúngica (de aquí en adelante referida como "CGT1") como diana para la terapia antifúngica, en particular, para la terapia antifúngica contra las especies de *Candida* y *Aspergillus*. La invención también se refiere a un método para cribar o ensayar compuestos antifúngicos potenciales, p.ej. moléculas pequeñas, determinando si un agente candidato es capaz de inhibir de manera específica la actividad de la guanililtransferasa fúngica por medio de una interacción selectiva con la CGT1. La presente invención describe la naturaleza esencial de la CGT1 en la *C. albicans*. Describe además el uso de ensayos basados en mecanismos, con o sin el uso de un organismo eucariótico transformado con el gen de la CGT1 bajo el control de un promotor heterólogo, para facilitar el descubrimiento de fármacos.

Adicionalmente, la invención se refiere a composiciones de inhibidores de la CGT1 y a métodos para tratar infecciones fúngicas, p.ej. infecciones fúngicas por *Candida* y *Aspergillus*, mediante la administración, a un huésped que padece una infección fúngica, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la CGT1.

Definiciones

En el contexto de esta invención:

"Gen esencial" se define como un gen fúngico necesario para el crecimiento en medio rico.

"Inhibidor de la CGT1" se define como cualquier compuesto que perjudique la función de la CGT1 en el hongo. Un compuesto que perjudica la función de la GT1 puede ser uno que modula, p.ej. inhibe, la expresión o actividad de la CGT1, interactúa con la CGT1 o se une a la CGT1. Además, un compuesto que modula la expresión de la CGT1 puede interferir con la transcripción del gen que codifica la CGT1 o con la traducción del mRNA que codifica la CGT1 en los organismos diana. Es deseable que el compuesto muestre especificidad para la CGT1 fúngica sobre la del huésped. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la CGT1 es aquella que es suficiente para inhibir parcial o totalmente la actividad de la guanililtransferasa CGT1 de los hongos causativos.

"Fragmento" se define como un fragmento de un polipéptido de la CGT1, p.ej. como los provistos por los números de acceso P78587, CA3459 ó orf6.5728 de Stanford, que tiene al menos 70%, más preferiblemente tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% de identidad con el polipéptido nativo a lo largo de la longitud del fragmento, y que es al menos de diez aminoácidos de longitud. Un fragmento activo es uno que retiene la capacidad de llevar a cabo la función enzimática de la CGT1.

“Fragmento conservativo de la función” se define como una secuencia que codifica la CGT1 en la que un residuo de aminoácido dado en el polipéptido ha sido cambiado sin alterar la conformación global y la función del polipéptido nativo, lo que incluye, pero no se limita a, la sustitución de un aminoácido por uno que tiene propiedades físicas y/o químicas similares (tales como, por ejemplo, ácidas, básicas, hidrófobas, y similares) o polimorfismos.

“Proteína de fusión”, a menos que se especifique de otro modo, se define como un polipéptido de la CGT1, fragmento o fragmento conservativo de la función de la misma, fusionado por medio de un enlace covalente (p.ej. un enlace peptídico), en, opcionalmente, el término N o el término C, a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o porción de la misma; preferiblemente al menos una porción de 10, 20 ó 50 aminoácidos de la proteína). Preferiblemente el polipéptido, o fragmento del mismo, está enlazado a la otra proteína en el término N del dominio constante del polipéptido.

“Crecimiento” se define como el patrón de crecimiento normal de los hongos, es decir, el tiempo de duplicación celular durante la fase logarítmica del crecimiento. Por ejemplo, en medios ricos, la *C. albicans* de tipo silvestre tiene un tiempo de duplicación de aproximadamente 60 minutos. El crecimiento de las células se puede medir siguiendo la densidad óptica de las células en medios líquidos, donde una densidad óptica creciente indica crecimiento. Alternativamente, el crecimiento también se puede medir por la formación de colonias a partir de células únicas sobre placas con medios sólidos.

“Viabilidad” se define como la capacidad de las células fúngicas de reanudar el crecimiento después de un tratamiento de las células que da como resultado un cese del crecimiento. Un medio típico mediante el cual se mide la viabilidad es el ensayo de la capacidad de las células de formar colonias en placas con medios sólidos.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona CGT1 como diana específica para compuestos antifúngicos.

Los métodos de la invención proporcionan un ensayo fácil y específico para cribar compuestos como compuestos antifúngicos potenciales, en particular, como compuestos antifúngicos contra especies de *Candida* y *Aspergillus*.

Por tanto, la invención proporciona un método de cribado o ensayo de compuestos antifúngicos, p.ej., contra especies de *Candida* o *Aspergillus*, que perjudica la función enzimática de la guanililtransferasa CGT1 (CGT1), que comprende:

- a) proporcionar CGT1 fúngica, preferiblemente CGT1 de *Candida* o *Aspergillus*;
- b) proporcionar uno o más compuestos candidatos;
- c) poner en contacto dicha CGT1 con dichos uno o más compuestos candidatos; y
- d) determinar la interacción del compuesto candidato con dicha CGT1.

El método de cribado de la invención se puede llevar a cabo usando técnicas conocidas en la técnica, p.ej., el ensayo puede comprender un ensayo de inhibición del crecimiento, un ensayo de unión o un ensayo de inhibición de la traducción. Los ensayos de unión incluyen ensayos de unión competitiva, en los que la afinidad de unión del compuesto candidato por la CGT1 se compara con la de un sustrato enzimático conocido; un sustrato enzimático preferido es el trifosfato de guanosina (GTP).

En los métodos de cribado de la invención el compuesto candidato o el sustrato enzimático pueden ser marcados para permitir una fácil cuantificación de la interacción entre el compuesto candidato y la enzima. Preferiblemente, el sustrato se marca usando p.ej. una radiomarca, tal como, pero no limitada a, tritio, y el sustrato preferido es el trifosfato de guanosina (GTP), como se describe en el Ejemplo 3.

La CGT1 puede ser clonada o purificada a partir de hongos para el uso en ensayos de unión *in vitro*, unión con ligandos o inhibición de la traducción. Preferiblemente, la CGT1 es de patógenos fúngicos de seres humanos y animales, tales como especies de *Candida* o *Aspergillus*. En una realización particular, la CGT 1 puede comprender un fragmento, una variante conservativa de la función, un fragmento activo o una proteína de fusión de la CGT1.

La CGT1 puede ser purificada mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Los métodos para la purificación del polipéptido incluyen, sin limitación, electroforesis preparativa en gel de disco, focalización isoelectrica, HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución), HPLC de fase inversa, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y reparto, y distribución en contracorriente. Para algunos fines, es preferible producir el polipéptido en un sistema recombinante en el que la proteína contiene una etiqueta secuencial adicional que facilita la purificación, tal como, pero no limitada a, una secuencia de polihistidina. El polipéptido puede ser purificado después a partir de un lisado en bruto de la célula huésped por cromatografía sobre una matriz de fase sólida apropiada. Alternativamente, se pueden usar como reactivos de purificación anticuerpos producidos contra la proteína diana fúngica o contra péptidos derivados de la misma.

La CGT1 también puede ser proporcionada en un organismo eucariótico transformado bajo el control de un promotor heterólogo. Tales células se pueden usar en ensayos de inhibición del crecimiento. Preferiblemente, el organismo eucariótico es *C. albicans* o *S. cerevisiae*. Más preferiblemente, el organismo es *C. albicans*. Brevemente, se genera una cepa de *C. albicans* en la que la expresión del gen de la CGT1 pueda ser regulada de manera estricta. Para hacer esto, el alelo de tipo silvestre del gen de interés es sustituido por un alelo que puede ser regulado por un agente exógeno. En general, las manipulaciones de ácidos nucleicos y otras técnicas relacionadas usadas en la práctica de la presente invención emplean métodos que son bien conocidos en la técnica, como se describe en, p.ej., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2ª Ed., Sambrook, Fritsch y Maniatis, Cold Spring Harbor) y Current Protocols in Molecular Biology (Eds. Ausubel, Brent, Kingston, More, Feidman, Smith y Stuhl, Greene Publ. Assoc., Wiley Interscience, NY, NY, 1997).

Por tanto, la invención también proporciona una(s) célula(s) eucariótica(s) modificada(s) en donde la(s) célula(s) expresa(n) la CGT1 bajo el control de un promotor heterólogo. En una realización, la CGT1 puede ser heteróloga o homóloga. Preferiblemente, la CGT1 es homóloga.

La célula eucariótica es preferiblemente *C. albicans* o *S. cerevisiae*, más preferiblemente *C. albicans*.

En una realización específica, la CGT1 puede ser expresada en un sistema de expresión regulable por tetraciclina (como se describe en el Ejemplo 4). El sistema de expresión regulable por tetraciclina es una herramienta establecida para la expresión condicional de genes eucarióticos (Gossen MA, & H Bujard, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551; Nagahashi S, *et al*, 1997, Mol. Gen. Genet., 255:372-375; Nakayama H, *et al*, 1998, Microbiology, 144:2407-2415; Nakayama H, *et al*, 2000, Infect. Immun., Dec 68:12 6712-9). Tal sistema consiste en dos componentes derivados del transposón Tn10 de *Escherichia coli* (Hillen W, & A Wissmann, 1989, In Protein-nucleic acid interaction, vol. 10, Macmillan Press, Londres, Reino Unido, p. 143-162). El primer componente comprende un elemento promotor mínimo corriente abajo de una secuencia operadora de tetraciclina (tetO), que sustituye al promotor natural del gen diana. El segundo componente es un transactivador, esto es, una proteína de fusión que comprende un dominio de activación transcripcional y la proteína represora de tetraciclina (TetR).

En ausencia de tetraciclina, TetR se une específicamente a tetO como un dímero, dando como resultado la activación de la transcripción reclutando el transactivador para el promotor. Cuando está presente la tetraciclina, se une al represor TetR con una alta afinidad e inhibe la dimerización, impidiendo de este modo la unión a tetO. Por lo tanto, la expresión genética de la CGT1 se activa en ausencia, y se reprime en presencia, de tetraciclina. Se puede usar un derivado sintético de la tetraciclina, tal como, pero no limitado a, doxiciclina, para controlar la expresión del gen de la CGT1 como se describe anteriormente.

El sistema de expresión regulable por tetraciclina tiene varias ventajas sobre los sistemas alternativos. Fue derivado a partir de un sistema procariótico, con lo que no se prevé que muestre efectos pleiotrópicos (Gossen y Bujard, 1992), se puede usar en un huésped animal (Nakayama H, *et al*, 1998, Microbiology, 144:2407-2415; Nakayama H, *et al*, 2000, Infect. Immun., Dec 68:12 6712-9), es altamente específico, y no es tóxico.

Tales células modificadas se pueden usar en métodos de cribado. Por tanto, la invención proporciona también un método de cribado o ensayo de compuestos antifúngicos candidatos, p.ej., contra las especies de *Candida* o *Aspergillus*, que perjudican la función enzimática de la guanililtransferasa CGT1 (CGT1), que comprende;

- (a) proporcionar CGT1 fúngica, preferiblemente CGT1 de *Candida* o *Aspergillus*, en una(s) célula(s) eucariótica(s) que expresa(n) la CGT1 bajo el control de un promotor heterólogo;
- (b) proporcionar uno o más compuestos candidatos;
- (c) poner en contacto dicha(s) célula(s) eucariótica(s) con dichos uno o más compuestos candidatos; y
- (d) determinar la interacción del compuesto candidato con dicha CGT1 evaluando el efecto sobre el crecimiento o la viabilidad de dichas células.

Los métodos de cribado de la invención incluyen tanto métodos *in vitro* como *in vivo*. Los compuestos candidatos que se pueden cribar según los métodos de la invención incluyen moléculas pequeñas y péptidos. Los compuestos candidatos pueden ser compuestos sintéticos, una mezcla de compuestos sintéticos, una preparación en bruto, una preparación purificada o un extracto inicial de un producto natural obtenido a partir de microorganismos, fuentes vegetales o animales.

La invención también proporciona un compuesto identificado por los métodos de cribado descritos anteriormente, que perjudica la función de la CGT1 y se denomina en la presente memoria un "inhibidor de la CGT1".

Los inhibidores de la CGT1 de la invención son útiles como compuestos antifúngicos. Por tanto, se pueden usar en el tratamiento y prevención de diversas infecciones fúngicas, tales como infecciones fúngicas tópicas o mucosales (p.ej. afta y candidiasis vaginal), causadas por, p.ej., especies de *Candida*, y para infecciones fúngicas sistémicas, causadas por, p.ej., especies de *Candida* y *Aspergillus*, tales como, pero no limitadas a, *C. albicans*, *Aspergillus flavus* o *Aspergillus fumigatus*.

Para los fines de esta invención, el medicamento se puede usar en el tratamiento curativo o profiláctico de infecciones fúngicas en seres humanos y animales, especialmente animales domésticos tales como perros, gatos, caballos, etc.

Además, los inhibidores de la CGT1 también encuentran uso en el tratamiento curativo o profiláctico de infecciones fúngicas en pacientes que están inmunodeprimidos, p.ej., como resultado de una terapia (p.ej. quimioterapia o radioterapia), un trasplante de órganos o una infección (p.ej. por HIV).

En realizaciones adicionales, por lo tanto, la presente invención proporciona:

- i) el uso de un inhibidor de la CGT1 como agente antifúngico.
- ii) el uso de un inhibidor de la CGT1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de infecciones fúngicas, tales como infecciones fúngicas tópicas o mucosales (p.ej. afta y candidiasis vaginal), p.ej. causadas por especies de *Candida*, y para infecciones fúngicas sistémicas, p.ej., causadas por especies de *Candida* y *Aspergillus*; tales como, pero no limitadas a, *C. albicans*, *Aspergillus flavus* o *Aspergillus fumigatus*.
- iii) el uso de un inhibidor de la CGT1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de infecciones fúngicas en un paciente que está inmuno-deprimido, por ejemplo, como resultado de una terapia (p.ej. quimioterapia o radioterapia), un trasplante de órganos o una infección (p.ej. por HIV).
- iv) un método para el tratamiento o prevención de infecciones fúngicas en un huésped, tales como infecciones fúngicas tópicas o mucosales (p.ej. afta y candidiasis vaginal), p.ej. causadas por especies de *Candida*, y para infecciones fúngicas sistémicas, p.ej. causadas por especies de *Candida* y *Aspergillus*, tales como, pero no limitadas a, *C. albicans*, *Aspergillus flavus* o *Aspergillus fumigatus*, que comprende administrar al huésped una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un inhibidor de la CGT1.
- v) un método para el tratamiento o prevención de infecciones fúngicas en un paciente que está inmunodeprimido, por ejemplo, como resultado de una terapia (p.ej. quimioterapia o radioterapia), un trasplante de órganos o una infección (p.ej. por HIV) que comprende la etapa de administrar al paciente una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un inhibidor de la CGT1.

Para usar los inhibidores de la CGT1 en terapia (humana o veterinaria), normalmente se formularán en una composición farmacéutica de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional, p.ej. mezclando el inhibidor de la CGT1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Por tanto, según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la CGT1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas son particularmente útiles en la prevención o tratamiento de infecciones fúngicas, preferiblemente, en el tratamiento de infecciones fúngicas por *Candida* o *Aspergillus*.

Los inhibidores de la CGT1 se pueden administrar a un huésped por cualquiera de las rutas usadas convencionalmente para la administración de fármacos, por ejemplo, se pueden administrar por vía parenteral, oral, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica) o por inhalación. La ruta más adecuada para la administración en cualquier caso dado dependerá del inhibidor de la CGT1 particular, el organismo infeccioso implicado, el huésped y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y la condición física del huésped.

Los inhibidores de la CGT1 se pueden administrar en combinación, p.ej., de manera simultánea, secuencial o separada, con uno o más otros compuestos terapéuticamente activos, p.ej. antifúngicos.

La dosificación a ser administrada de un inhibidor de la CGT1 variará según el inhibidor de la CGT1 particular, el organismo infeccioso implicado, el huésped, la gravedad de la enfermedad, la condición física del huésped y la ruta de administración seleccionada; la dosificación apropiada puede ser determinada fácilmente por una persona experta en la técnica. Para el tratamiento de enfermedades fúngicas en seres humanos y animales, la dosificación puede oscilar de 0,01 mg/kg a 750 mg/kg. Para el uso profiláctico en seres humanos y animales, la dosificación puede oscilar de 0,01 mg/kg a 100 mg/kg.

Las composiciones pueden contener desde 0,1% en peso, preferiblemente entre 10-60% en peso, del inhibidor de la CGT1, dependiendo del método de administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser presentadas convenientemente en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de inhibidor de la CGT1 por dosis. Tal unidad puede contener, por ejemplo, pero sin limitación, de 100 mg/kg a 0,1 mg/kg, dependiendo de la dolencia que se trata, la ruta de administración y la edad, peso y dolencia del huésped. Las composiciones de dosificación unitaria preferidas son las que contienen una dosis o subdosis diaria, como las citadas anteriormente, o una fracción apropiada de la misma, del ingrediente activo.

Un experto en la técnica reconocerá que la cantidad y espaciado óptimos de las dosificaciones individuales de un agente de la invención serán determinados por la naturaleza y extensión de la dolencia que se trata, la forma, ruta y sitio de administración, y el huésped particular que se trata, y que tales valores óptimos pueden ser determinados por técnicas convencionales. Un experto en la técnica también apreciará que el curso óptimo del tratamiento, es decir, el número de dosis de un agente de la invención dado por día durante un número definido de días, puede ser evaluado por los expertos en la técnica usando el curso convencional de ensayos de determinación de tratamientos.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada. Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis según indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables para el uso en la invención pueden adoptar una amplia variedad de formas, dependiendo, p.ej., de la ruta de administración.

Las composiciones para administración oral pueden ser líquidas o sólidas. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en la forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o se pueden presentar como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Las preparaciones líquidas orales pueden contener agentes de suspensión, por ejemplo sorbitol, metilcelulosa, jarabe de glucosa, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio o grasas comestibles hidrogenadas, agentes emulsionantes, por ejemplo lecitina, monooleato de sorbitán o goma arábiga; agua; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo aceite de almendra, ésteres oleosos tales como glicerina, propilenglicol o alcohol etílico; se pueden usar conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico; agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares.

En el caso de preparaciones sólidas orales tales como polvos, cápsulas y comprimidos, se pueden incluir vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan las formas de dosificación oral unitaria más ventajosas, en cuyo caso se emplean generalmente vehículos farmacéuticos sólidos. Además de las formas de dosificación comunes expuestas anteriormente, los inhibidores de la CGT1 también se pueden administrar por medios de liberación controlada y/o dispositivos de administración. Los comprimidos y cápsulas pueden comprender vehículos o excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, por ejemplo jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, goma tragacanto o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes para la formación de comprimidos, por ejemplo estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; desintegrantes, por ejemplo almidón de patata; o agentes humectantes aceptables, tales como laurilsulfato de sodio. Los comprimidos pueden ser revestidos por técnicas acuosas o no acuosas convencionales, acordes con métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas, tales como cápsulas, sellos o comprimidos, conteniendo cada una de ellas una cantidad predeterminada del ingrediente activo, como un polvo o gránulos, o como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso, un líquido no acuoso, una emulsión aceite en agua o una emulsión líquida agua en aceite. Tales composiciones se pueden preparar por cualquiera de los métodos de farmacia, pero todos los métodos incluyen la etapa de llevar a asociación el ingrediente activo con el vehículo, el cual se constituye de uno o más ingredientes necesarios. En general, las composiciones se preparan mezclando de manera uniforme e íntima el ingrediente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, si fuera necesario, dar forma al producto hasta la presentación deseada. Por ejemplo, se puede preparar un comprimido por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios.

Se pueden preparar comprimidos comprimiendo, en una máquina adecuada, el ingrediente activo en una forma de libre fluidez, tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, agente activo superficial o agente dispersante. Se pueden preparar comprimidos moldeados moldeando, en una máquina adecuada, una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Deseablemente, cada comprimido contiene de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo y cada sello o cápsula contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo.

Las composiciones que comprenden un inhibidor de la CGT1 también se pueden preparar en forma de polvo o concentrado líquido. Se pueden incorporar en los polvos excipientes solubles en agua convencionales, tales como lactosa o sacarosa, para mejorar sus propiedades físicas. Por tanto, los polvos de esta invención particularmente adecuados comprenden de 50 a 100% en peso, y preferiblemente de 60 a 80% en peso de la combinación y de 0 a 50% en peso y preferiblemente de 20 a 40% en peso de excipientes convencionales. Cuando se usa en un entorno veterinario, tales polvos se pueden añadir a alimentos para animales, por ejemplo por medio de una premezcla intermedia, o diluir en el agua de bebida de los animales.

Los concentrados líquidos de esta invención para la administración oral contienen adecuadamente una combinación de compuestos solubles en agua, y pueden incluir opcionalmente un disolvente miscible con el agua farmacéuticamente aceptable, por ejemplo polietilenglicol, propilenglicol, glicerol, glicerol formal, o tal disolvente mezclado con hasta 30% en volumen de etanol.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral se pueden preparar como disoluciones o suspensiones de los inhibidores de la CGT1 en agua, mezclados adecuadamente con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos en aceites. Bajo las condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones estériles acuosas y no acuosas para inyección, que pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos y solutos que hacen a la composición isotónica con la sangre del receptor destinado, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Se pueden preparar soluciones, dispersiones y suspensiones extemporáneas para inyección a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

Las composiciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitaria o de dosis múltiple, por ejemplo en ampollas y viales sellados y, para mejorar la estabilidad, se pueden almacenar en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. El vehículo líquido estéril se puede suministrar en un vial o ampolla independiente, y puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (p.ej. glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Ventajosamente, en el vehículo líquido estéril se pueden incluir agentes tales como un anestésico local, agentes conservantes y amortiguadores.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica se pueden formular como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, vendas impregnadas, pulverizadores, aerosoles o aceites, dispositivos transdérmicos, polvos para empolver y similares. Estas composiciones se pueden preparar por medio de métodos convencionales que contienen el ingrediente activo. Por tanto, también pueden comprender vehículos y aditivos convencionales compatibles, tales como conservantes, disolventes para ayudar a la penetración del fármaco, emolientes en cremas o pomadas y etanol o alcohol oleílico para lociones. Tales vehículos pueden estar presentes como desde aproximadamente 1% hasta aproximadamente 98% de la composición. Más usualmente, formarán hasta aproximadamente el 80% de la composición. Sólo como ilustración, una crema o pomada se prepara mezclando cantidades suficientes de un material hidrófilo y agua, conteniendo entre aproximadamente 5-10% en peso del compuesto, en cantidades suficientes para producir una crema o pomada que tenga la consistencia deseada.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración transdérmica se pueden presentar como parches discretos destinados a permanecer en íntimo contacto con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Por ejemplo, el ingrediente activo puede ser administrado desde el parche por iontoforesis.

Para aplicaciones a tejidos externos, por ejemplo la boca y la piel, las composiciones se aplican preferiblemente como una pomada o crema tópica. Cuando se formula en una pomada, el ingrediente activo se puede emplear bien con una base de pomadas parafínica o bien con una base miscible con el agua. Alternativamente, el ingrediente activo se puede formular en una crema con una base de cremas aceite en agua o una base agua en aceite.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en la boca incluyen píldoras para chupar, pastillas y enjuagues bucales.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en el ojo incluyen gotas oculares, en las que el ingrediente activo está disuelto o suspendido en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso. También incluyen pomadas o cremas tópicas como anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración rectal en las que el vehículo es un sólido se presentan, lo más preferiblemente, como supositorios de dosis unitaria. Los vehículos adecuados incluyen manteca de cacao u otro glicérido o materiales usados comúnmente en la técnica, y los supositorios se pueden formar de manera conveniente mediante una mezcla de la combinación con el(los) vehículo(s) reblandecido(s) o fundido(s), seguido de un enfriamiento y conformación en moldes. También se pueden administrar como enemas.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración vaginal se pueden presentar como composiciones en pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o pulverizadores. Estas pueden comprender emolientes o bases como los usados comúnmente en la técnica.

Todas las publicaciones, incluyendo, pero sin estar limitadas a, las patentes y solicitudes de patente, citadas en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente memoria por referencia como si cada publicación individual estuviera específica e individualmente indicada para ser incorporada por referencia en la presente memoria como si estuviera totalmente expuesta.

Los siguientes ejemplos se han de interpretar como meramente ilustrativos, y no como una limitación del alcance de la invención en modo alguno. La memoria descriptiva se refiere a la figuras, en las que:

Figura 1: Esta muestra el crecimiento en fase sólida de una cepa de *C. albicans* recombinante en la que el gen de la CGT1 está bajo la regulación de un promotor reprimible por tetraciclina. Las imágenes representan un crecimiento de tres días a 30°C en placas SC-U, bien sin suplemento (-DOX), o bien suplementadas con 20 µg/ml del análogo de la

tetraciclina doxiciclina (+DOX). El efecto de inducción fuerte o represión estricta de la expresión del gen de la CGT1 sobre la formación de colonias se observa en ausencia y presencia de doxiciclina, respectivamente.

Figura 2: Esta muestra el crecimiento en fase líquida de una cepa de *C. albicans* recombinante en la que el gen de la CGT1 está bajo la regulación de un promotor reprimible por tetraciclina. Se tomaron medidas de densidad óptica después de agitar durante 16 h a 37°C, en medio YEPD más o menos doxiciclina (0,05, 0,1, 0,2, 2,0 y 20 µg/ml). El efecto de inducción fuerte o represión estricta de la expresión del gen de la CGT1 en el crecimiento se observa en ausencia y presencia de doxiciclina, respectivamente.

Figura 3: Esta muestra la tasa de supervivencia de ratones infectados con la cepa de *C. albicans* recombinante en la que el gen de la CGT1 está bajo la regulación de un promotor reprimible por tetraciclina. Donde se indica, se les administró a los ratones o bien agua (control ♦) o bien 2 mg/ml del análogo de la tetraciclina doxiciclina disuelta en una disolución de sacarosa al 5% (+DOX, □), como agua de bebida. Bajo las condiciones en las que el gen de la CGT1 se expresó (control) la *C. albicans* fue capaz de afectar a la tasa de supervivencia de los ratones, mientras que bajo las condiciones en las que la expresión de la CGT1 fue reprimida (es decir, en presencia de doxiciclina) la *C. albicans* fue incapaz de afectar a la tasa de supervivencia de los ratones.

Ejemplos

Ejemplo 1

Expresión de la CGT1

El ORF (marco de lectura abierta) de la CGT1 fue clonado en pGex-6P-1 (Pharmacia Biotech) para permitir la expresión como una proteína de fusión GST en 5'. El huésped de *E. coli* usado fue Tuner(DE3)pLysS (Novagen). Se cultivaron *E. coli* que albergaban el plásmido de expresión a 37°C hasta la fase semilogarítmica (OD600 = 0,6), después se enfriaron hasta 17°C y se añadió etanol hasta 2% en volumen y las células fueron inducidas con IPTG 0,3 mM durante aproximadamente 20 h.

Ejemplo 2

Purificación de la CGT1

Se recogieron células de *E. coli* de 4 l de cultivo por centrifugación a 6000 x g durante 10 min. Se congelaron los gránulos de células a -80°C, se descongelaron y se resuspendieron en 150 ml de un amortiguador A (Hepes 20 mM (pH 7,4), DTT 5 mM, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 10% (en volumen), azida de sodio al 0,02% (p/v); y un cóctel de inhibidores de proteasas que consistía en benzamidina 1 mM, 1 µg.ml⁻¹ cada una de pepstatina, antipaina y leupeptina, PMSF 0,2 mM, cóctel Completo (Roche) y general de inhibidores de proteasas (Sigma).

El extracto fue sonificado en pulsos de 3 x 10 s para reducir la viscosidad. Se añadió Triton X-100 hasta 1% seguido de una centrifugación a 75 000 x g durante 10 min. El sobrenadante se cargó por lotes sobre 5 ml de glutatión Sefarosa (Amersham Biosciences) a 4°C. La resina se lavó extensamente por lotes con un amortiguador de fosfato que contenía NaCl 0,5 M, después con un amortiguador B (Hepes 20 mM (pH 7,4), DTT 1 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, glicerol al 10%, azida de sodio al 0,02%). Después se rellenó una columna PD-10 desechable con la resina. La CGT-1 fue escindida de la GST mediante una incubación de las perlas de glutatión Sefarosa con 1 volumen de columna de amortiguador B que contenía 300 U de proteasa PreScission (Amersham Biosciences) durante una noche a 4°C con volteo constante. La CGT-1 fue recuperada por centrifugación de la columna PD-10 (500 x g) seguido de un lavado de la columna con el amortiguador B. Las fracciones que contenían CGT-1 fueron reunidas y aplicadas a una columna Mono Q (HR5/5) conectada a un sistema de FPLC (Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas) AKTA (Amersham Biosciences). Se eluyó la CGT-1 usando un gradiente lineal de NaCl de 0-500 mM, y la CGT-1 se eluyó a aproximadamente 300 mM de NaCl.

Ejemplo 3

Ensayo de la CGT1

El ensayo de la guanililtransferasa está basado en el método de Yamada-Okabe T, *et al*, (1998, FEBS Lett, 435 (1):49-54). La reacción se inicia añadiendo 0,5 µg de la enzima CGT1 a la mezcla de reacción (100 µl de volumen final en placas de 96 pocillos) que contiene Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), ditiotretitol 5 mM, MgCl₂ 5 mM, 10 µg/ml de poli(A)+ RNA (Sigma), [³H]-GTP 1 µM (74 TBq/mmol, Amersham), DMSO al 1%, y los compuestos de ensayo que se requieran. Después de una incubación a 30°C durante 1 hora, los productos son capturados filtrando a través de placas GF/B de 96 pocillos (Packard Unifilter 96). Después, los pocillos se lavan tres veces con 200 µl de etanol. Cuando la placa está seca, se añaden 50 µl de fluido de escintilación Microscint 20 (Packard) a cada pocillo. El tritio incorporado se mide entonces usando un Packard TopCount.

Ejemplo 4

CGT1 como producto genético esencial

4.1 Construcción del sistema de expresión regulable por tetraciclina

Se usó *C. albicans* CAI8 como cepa parental para todas las manipulaciones. La cepa parental fue construida para expresar constitutivamente un transactivador de tetraciclina de codones optimizados, que consistía en TetR fusionado al dominio de activación transcripcional VP16 viral (Gari E, *et al*, 1997, *Yeast*, 13:837-848), del promotor de enolasa cromosómico (Mason AB, *et al*, 1993, *J. Bacteriol.*, 175: 2632-2639). Una copia del gen diana, CGT1, fue interrumpida en la cepa que expresaba el transactivador usando el método estándar *URA*-blaster (Fonzi WA & Irwin MY, 1993, *Genetics*, 134: 717-728). La región promotora del otro alelo de la CGT1 fue sustituida después con el elemento promotor mínimo que contenía la secuencia operadora de tetraciclina tetO. Tanto *in vivo* como *in vitro*, este sistema permite una inducción fuerte y una represión estricta de la expresión del gen de la CGT1 en ausencia y presencia, respectivamente, del análogo de la tetraciclina doxiciclina.

4.2 Experimentos de validación *in vitro*

La naturaleza esencial de la CGT1 fue determinada evaluando el crecimiento y viabilidad de la cepa de *C. albicans* modificada para incluir un sistema de expresión de CGT1 regulable por tetraciclina como el descrito anteriormente (sección 4.1). Se usó una única colonia reciente (cultivada a 30°C en medio rico en ausencia de tetraciclina) para sembrar placas nuevas que contenían medio completo sintético menos uracilo (SC-U) (Qbiogene), más agar al 2%, más o menos 20 µg/ml de doxiciclina como se indicó. El crecimiento fue puntuado después de 3 días a 30°C (Figura 1). Se observaron pocas colonias bajo las condiciones en las que la expresión de la CGT1 estaba reprimida (es decir, en presencia de doxiciclina).

También se evaluó el crecimiento de la cepa de *C. albicans* con sistema de expresión de la CGT1 regulable por tetraciclina en medio YEPD líquido (Qbiogene). El inóculo fue una dilución 1:100 de un cultivo cultivado durante una noche, ajustado con PBS hasta una densidad óptica a 600 nm = 1 y almacenado a 4°C. Se midió el crecimiento, después de agitar durante 16 h a 37°C, en medio YEPD más o menos doxiciclina (0,05, 0,1, 0,2, 2,0 y 20 µg/ml). (Figura 2). De nuevo, se observó una reducción significativa en el crecimiento bajo las condiciones en las que la expresión de la CGT1 estaba reprimida (es decir, en presencia de doxiciclina).

Ejemplo 5

CGT1 como producto genético esencial: Experimento de validación in vivo - Modelo murino de infección sistémica con mutantes condicionales de C. albicans

Se han descrito varios modelos animales reproducibles, que incluyen los de la Candidiasis oral y vaginal en la rata (Calderone RA & Braun PC, 1991, *Microbiol. Rev.*, 55:1-20). Sin embargo, el modelo usado más comúnmente es el modelo murino de Candidiasis diseminada inoculada hematógicamente (Ghannoum MA, *et al*, 1995, *Infect. Immun*, 63:4528-4530). En el modelo murino diseminado, se inocula una única dosis del organismo por la vena de la cola. Los puntos finales para este modelo son la supervivencia de los animales y los recuentos de *C. albicans* en tejidos (generalmente los riñones).

Para validar adicionalmente la naturaleza esencial del gen de la CGT1, los mutantes condicionales de las cepas de *C. albicans* (descritos en el Ejemplo 4, sección 4.1), en los que el gen de la CGT1 está bajo el control de un promotor reprimible por tetraciclina, se ensayaron para determinar si se atenuaban en un modelo murino inmunocompetente de infección (Ghannoum *et al*, 1995) como sigue:

Inicialmente, los organismos se cultivaron en ausencia de DOX, dado que bajo estas condiciones expresarían el gen de la CGT1. Después estos organismos se usaron para inocular dos grupos de 12 de ratones. Un grupo fue tratado con DOX, en el cual la expresión del gen de la CGT1 fue reprimida, y el segundo grupo de ratones fue tratado con agua (control), en el que el gen continuó siendo expresado. Los ratones usados fueron ratones BALB/c de un solo sexo, Harlan, de 4 semanas de edad y que pesaban entre 19-22 g.

Se inyectaron dosis infectivas de *C. albicans* en la vena de la cola. Los inóculos fueron de cultivos recientes de fase estacionaria, lavados con suero salino, cultivados en medio NGY [neopeptona al 0,1%, glucosa al 0,4%, extracto de levadura al 0,1%] durante 18-24 h a 30°C. Las levaduras cultivadas de esta manera tienen un recuento de viables de 2×10^7 CFU/ml $\pm$ $0,3 \times 10^7$ CFU/ml y se pueden ajustar fácilmente a la concentración deseada con suero salino. La concentración fue comprobada por espectrofotometría y verificada por recuentos de viables. El volumen inyectado fue el mismo en todas las dosis. Se usó una dosis infectiva de 1×10^6 CFU/ratón. Se ha mostrado previamente que esta dosis infectiva da un tiempo medio de supervivencia de 5-7 días en ratones BALB/c.

Se alimentaron los animales con comida y agua *ad libitum* durante todo el curso del experimento. En el grupo tratado con DOX (+DOX), se les administró a los ratones DOX (2 mg/ml) disuelta en una disolución de sacarosa al 5% como agua de bebida desde 2 días antes de la inoculación de las células de *C. albicans*. Se sabe que los ratones beben aproximadamente 5 ml de disolución de sacarosa cada día. Bajo este régimen, las concentraciones de DOX en

ES 2 302 968 T3

suero, hígado y riñón se mantienen a más que 2 mg/ml de suero, 8 mg/g de hígado y 10 mg/g de riñón, respectivamente (Nakayama H, *et al*, 1998, Microbiology, 144:2407-2415.) El tanto por ciento de supervivencia fue seguido a lo largo de 28 días, con un seguimiento diario del peso corporal. Las diferencias entre los efectos de la *C. albicans* con el gen de la CGT1 activo (-DOX) o reprimido (+DOX) *in vivo* fueron seguidas mediante la supervivencia de los ratones (véase la Figura 3), las cargas en el riñón de hongos viables, y los cambios en el peso corporal en relación a la línea de base.

Los recuentos del riñón (recuentos de unidades formadoras de colonias por gramo de tejido renal) para el grupo (+DOX) fueron significativamente reducidos comparados con el grupo de control (-DOX) y estos ratones (con la excepción de dos que no sobrevivieron) también mantuvieron su peso a lo largo de todo el curso del estudio.

REIVINDICACIONES

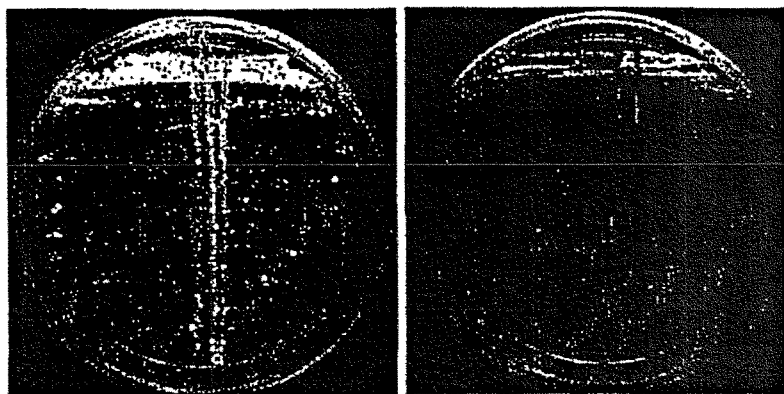
1. Un método de cribado o ensayo para compuestos antifúngicos candidatos que perjudican la función de la guaniltransferasa CGT1 (CGT1) de la *C. Albicans*, que comprende:

- (a) proporcionar una(s) célula(s) de *C. Albicans* modificada(s) que expresa(n) CGT1 de *C. Albicans* bajo el control de un promotor heterólogo;
- (b) proporcionar uno o más compuestos candidatos;
- (c) poner en contacto dicha(s) célula(s) de *C. Albicans* con dichos uno o más compuestos candidatos; y
- (d) determinar la interacción del compuesto candidato con dicha CGT1 evaluando el efecto sobre el crecimiento o la viabilidad de dichas células.

2. El método según la reivindicación 1, en el que la CGT1 es homóloga.

3. El método según la reivindicación 1, en el que la CGT1 es una variante conservativa de la función, un fragmento activo o una proteína de fusión de la CGT1.

Figura 1



-DOX

+DOX

Figura 2

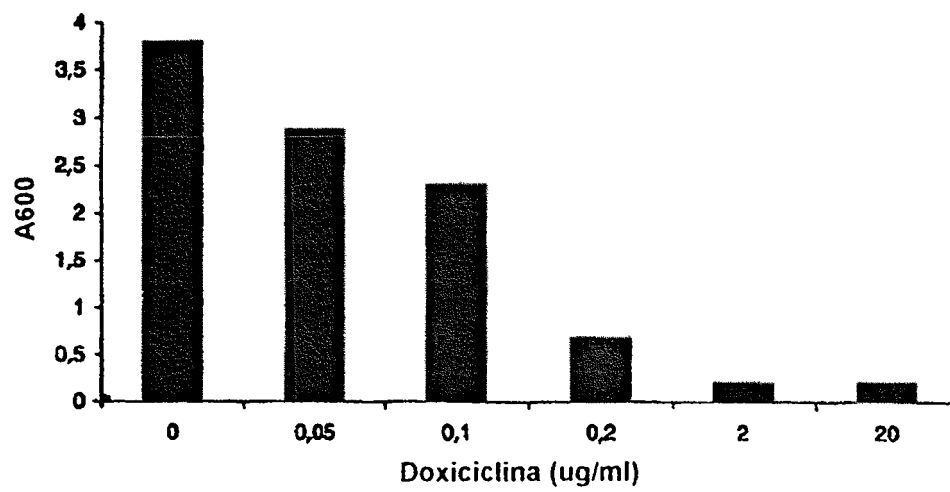


Figura 3

