



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 312 425**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/09 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **01925961 .3**
(96) Fecha de presentación : **26.04.2001**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1283261**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **12.02.2003**

(54) Título: **Procedimiento para cribar un medicamento que actúa sobre la pared celular.**

(30) Prioridad: **01.05.2000 JP 2000-132041**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

(73) Titular/es: **Daiichi Sankyo Company, Limited**
3-5-1, Nihonbashi Honcho
Chuo-ku, Tokyo 103-8426, JP

(72) Inventor/es: **Kitamura, Akihiro;**
Someya, Kazuhiko y
Nakajima, Ryohei

(74) Agente: **Ibáñez González, José Francisco**

ES 2 312 425 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para cribar un medicamento que actúa sobre la pared celular.

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a un microorganismo que posee una proteína indicadora tal como una proteína fluorescente, fijada sobre una pared celular o membrana celular como una proteína anclada vía GPI, y un procedimiento para cribar un agente que actúa sobre la pared celular utilizando el microorganismo antes mencionado.

10 **Antecedentes de la técnica**

Se ha observado una tendencia creciente sobre la incidencia de infecciones fúngicas severas según crecía el número de pacientes afectados y, por tanto, han resultado deseables agentes terapéuticos efectivos. En la actualidad, solamente cinco agentes antifúngicos para infecciones fúngicas severas se han lanzado al mercado en Japón. Entre ellos, tres agentes son agentes tipo azol (miconazol, fluconazol e itraconazol). El fluconazol, un agente muy típico, posee solamente una acción fungistática. Además, con el incremento de la cantidad de agente utilizado, aparece implicada una resistencia a los hongos. La anfotericina B, un antibiótico polieno que posee un efecto fungicida potente, es elevadamente tóxica, y el agente no puede ser siempre utilizado con seguridad. Por estas razones, el tratamiento antifúngico de pacientes con infecciones fúngicas severas resulta con frecuencia en un nivel poco satisfactorio, y por tanto la demanda de nuevos agentes fungicidas y fungiselectivos es urgente.

Una pared celular, que característicamente existe en las células fúngicas, es un objetivo atractivo desde el punto de vista de la selectividad. En las levaduras, por ejemplo, los polímeros de grandes sacáridos que constituyen la pared celular incluyen (1,3)- β -glucano, (1,6)- β -glucano, quitina y manano. Entre las vías sintéticas de estos polímeros sacáridos, la vía sintética del manano existe comúnmente en células animales y células fúngicas, y cada vía biosintética presenta elevada coincidencia, por lo que generalmente se considera difícil, aunque no absolutamente imposible, hallar un objetivo específico para los hongos. En las vías sintéticas del (1,3)- β -glucano y de la quitina, se ha determinado la existencia de enzimas específicos para los hongos y esenciales para su crecimiento, tal como el grupo de genes FKS y el grupo de genes CHS, y se está realizando investigación y desarrollo de agentes antifúngicos de acceso a los enzimas. La vía sintética del (1,6)- β -glucano es también considerada como específica para los hongos, y la existencia de enzimas que se juzgan esenciales para el crecimiento de hongos se ha determinado con base en los resultados de análisis genéticos. Sin embargo, no se ha establecido sistema de ensayo alguno a nivel enzimático, y por lo tanto, no se ha comunicado un inhibidor de estos enzimas. Por esta razón, ningún agente antifúngico que inhiba esta vía sintética es conocido hasta la fecha.

En general, las proteínas denominadas colectivamente como proteínas ancladas vía GPI existen extensivamente en células eucarióticas. Éstas se hallan fijadas sobre membranas celulares vía anclajes GPI (Ferguson, M. A., et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 57, pág. 285-320, 1988). Cada proteína anclada vía GPI presenta regiones relativamente hidrofóbicas de señal péptidica en ambos extremos de los N- y C-terminales. Estas señales son reunidas mediante modificación post-traducciona, y con adición de un anclaje GPI al C-terminal, la proteína se fija sobre la membrana ER (retículo endoplásmico rugoso). Luego, la proteína anclada vía GPI fijada sobre la membrana ER es transportada sobre la membrana, y entonces se fija además sobre la membrana celular (Ferguson, M. A., et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 57, pág. 285-320, 1988; Lu, C. F., et al., *Mol. Cell Biol.*, 14, pág. 4825-4833, 1994).

En la *Saccharomyces cerevisiae*, una parte del anclaje GPI está además unida por algunas de las proteínas ancladas vía GPI fijadas sobre la membrana celular, y entonces la proteína se fija adicionalmente sobre la pared celular vía (1,6)- β -glucano como un anclaje (Lu, C. F., et al., *Mol. Cell Biol.*, 14, pág. 4825-4833, 1994; Kollar, R., et al., *J. Biol. Chem.*, 272, pág. 17762-17775, 1997).

Esto significa que, en la *Saccharomyces cerevisiae*, existen dos clases de proteínas ancladas vía GPI; una fijada sobre la membrana celular y la otra en la pared celular. Esta diferencia de localización se espera que sea regulada por la diferencia en la señal peptídica en el C-terminal (Hamada, K., et al., *Mol. Gen. Genet.*, 258, pág. 53-59, 1998; Caro, L., *Yeast*, 13, pág. 1477-1489, 1997). Recientemente, se ha informado de la creación de una levadura que presenta una proteína exógena arbitraria fijada sobre la pared celular (levadura estructural) utilizando el mecanismo de localización de proteínas sobre las paredes celulares (Varrr, J. M. V. D., et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, pág. 615-620, 1997; Murai, T., et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, pág. 1362-1366, 1997).

Como se ha descrito anteriormente, el (1,6)- β -glucano presenta una función de anclaje para fijar las proteínas ancladas vía GPI sobre las paredes celulares, y los resultados analíticos obtenidos hasta ahora revelan que, cuando la biosíntesis de (1,6)- β -glucano está inhibida mediante disrupción genética, estas proteínas son liberadas extracelularmente (Lu, C. F., et al., *Mol. Cell Biol.*, 14, pág. 4825-4833, 1994; Lu, C. F., et al., *J. Cell. Biol.*, 128, pág. 333-340, 1995).

Recientemente, Tsuchiya et al. informaron de la construcción de un sistema de expresión de una proteína indicadora ligada con péptido glicano de la pared celular de staphylococcus (*The Pharmaceutical Society of Japan, The 120th Annual Meeting, Abstracts 2, pág. 153, Lecture n° 30 [PB] 15-71*). Este sistema comprende cefalosporinasa como una

proteína indicadora anclada sobre una pared celular de bacteria gram-positiva. Sin embargo, la aplicación de este sistema no ha sido clarificada, y la publicación ni sugiere ni enseña como puede ser utilizado el sistema para cribar un agente que actúa sobre la pared celular.

5 Descripción de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para cribar un agente que actúa sobre la pared celular, preferiblemente un procedimiento para cribar eficientemente un agente que presenta una acción inhibitoria selectiva sobre una pared celular, por ejemplo, una acción inhibitoria selectiva sobre un enzima biosintético de (1,6)- β -glucano que constituye una pared celular, utilizando microorganismos. Además, otro objetivo de la presente invención es proporcionar un microorganismo utilizado para el antes mencionado procedimiento de cribado

Los inventores de la presente invención emprendieron varias investigaciones para alcanzar los objetivos antes mencionados. Como resultado, hallaron que un agente que presenta una acción inhibitoria selectiva sobre una pared celular, por ejemplo, un agente que presenta una acción inhibitoria selectiva sobre un enzima de biosíntesis de (1,6)- β -glucano que constituye la pared celular, debería ser cribado con éxito preparando dos clases de levaduras, cada una presentando una proteína fácilmente detectable (proteína indicadora) fijada sobre la membrana celular o pared celular (designadas como “levadura estructural tipo membrana” y “levadura estructural tipo pared”, respectivamente), y utilizando un criterio de que una liberación de la proteína indicadora se produce substancialmente sólo desde la levadura estructural tipo pared. La presente invención se logró sobre la base de estos hallazgos.

La presente invención proporciona así un procedimiento para cribar un agente que actúa sobre la pared celular, que comprende las etapas de:

(1) cultivar cada uno de un microorganismo que posee una proteína indicadora fijada sobre una pared celular como una proteína anclada vía GPI y un microorganismo que posee una proteína indicadora fijada sobre una membrana celular como una proteína anclada vía GPI en presencia de un agente de ensayo;

(2) determinar la proteína indicadora liberada en cada fluido de cultivo del microorganismo cultivado; y

(3) valorar que el agente de ensayo es un agente que presenta una acción inhibitoria selectiva sobre la pared celular cuando la proteína indicadora es liberada desde el microorganismo que posee la proteína indicadora fijada sobre la pared celular en el fluido de cultivo y la proteína indicadora no es liberada sustancialmente desde el microorganismo que posee la proteína indicadora fijada sobre la membrana celular en el fluido de cultivo.

En los microorganismos antes mencionados, la proteína indicadora está fijada sobre la pared celular o membrana celular vía un anclaje GPI. Los antes mencionados microorganismos son así microorganismos que presentan una proteína anclada vía GPI fijada sobre la pared celular o membrana celular, en las cuales una proteína como una proteína anclada vía GPI se utiliza como una proteína indicadora. En otras palabras, el microorganismo antes mencionado presenta una proteína indicadora fijada sobre la pared celular o membrana celular vía el anclaje GPI. En la descripción, el término “proteína anclada vía GPI” no se utiliza para significar cualquier proteína específica y no debe entenderse en sentido limitativo.

Como realizaciones preferibles de la invención antes mencionada, se proporcionan el procedimiento antes mencionado, que utiliza un microorganismo que posee una proteína indicadora fijada a (1,6)- β -glucano de la pared celular; el procedimiento antes mencionado, en el cual el microorganismo es levadura; el procedimiento antes mencionado, en el cual la proteína indicadora es una proteína fluorescente; el procedimiento antes mencionado, en el cual la proteína fluorescente es una proteína fluorescente verde; el procedimiento antes mencionado, en el cual la acción inhibitoria sobre la pared celular es una acción inhibitoria en contra de un proceso biosintético y/o un enzima biosintético de la pared celular; y el procedimiento antes mencionado, en el cual el agente que actúa sobre la pared celular es un agente antifúngico.

Desde otro aspecto, la presente invención proporciona un microorganismo que posee una proteína indicadora fijada sobre una pared celular como una proteína anclada vía GPI. De acuerdo con una realización preferible del antes mencionado microorganismo, la proteína indicadora está fijada a (1,6)- β -glucano de la pared celular. La presente invención también proporciona un microorganismo que posee una proteína indicadora fijada sobre una membrana celular como una proteína anclada vía GPI. Estos microorganismos son levaduras preferiblemente y pueden ser utilizados para cribar un agente que actúa sobre una pared celular, preferiblemente un agente antifúngico. De acuerdo con un microorganismo más preferible, la proteína indicadora es una proteína fluorescente, y la proteína fluorescente es una proteína fluorescente verde. Como microorganismos particularmente preferibles, se proporcionan una levadura cepa AY-14 que posee una proteína fluorescente verde fijada sobre la pared celular como una proteína anclada vía GPI y una levadura cepa AY-15 que posee una proteína fluorescente verde fijada sobre la membrana celular como una proteína anclada vía GPI. La presente invención además proporciona el uso de los microorganismos para el cribado de un agente que actúa sobre una pared celular.

La presente invención proporciona, además, un conjunto de microorganismos utilizados para cribar un agente que actúa sobre una pared celular, que comprende:

(1) un microorganismo que posee una proteína indicadora fijada sobre una pared celular como una proteína anclada vía GPI, y

5 (2) un microorganismo que posee una proteína indicadora fijada sobre una membrana celular como una proteína anclada vía GPI.

De acuerdo con una realización preferible de la invención antes mencionada, se proporciona un conjunto que incluye microorganismos que presentan una proteína indicadora fijada a (1,6)- β -glucano de la pared celular. El agente que actúa sobre una pared celular es preferiblemente un agente antifúngico, y los microorganismos son preferiblemente levaduras. Además, la proteína indicadora es preferiblemente una proteína fluorescente, más preferiblemente una proteína fluorescente verde. Como un conjunto particularmente preferible, se proporciona un conjunto de la cepa AY-14 y la cepa AY-15.

Además, la presente invención proporciona un gen utilizado para fijar una proteína indicadora como una proteína anclada vía GPI sobre una pared celular o membrana celular de un microorganismo, preferiblemente una levadura. Los genes preferibles (oligonucleótidos o polinucleótidos) son descritos específicamente en el ejemplo de la presente descripción, y los ejemplos incluyen, por ejemplo, el gen especificado mediante la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N° 1 o 2 en el Listado de Secuencias o un gen que presenta una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la secuencia de ácido nucleico antes mencionada, incluyendo la sustitución, inserción y/o eliminación de varios residuos de ácido nucleico y presenta substancialmente la misma función que el gen especificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID N° 1 o 2 en el Listado de Secuencias. La presente invención proporciona además un vector recombinante que contiene cualquiera de esos genes y un microorganismo, preferiblemente una levadura, transformada con el vector recombinante.

25 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa las estructuras de los plásmidos principales (pEAC y pUAC) utilizados en el ejemplo.

La Figura 2 representa resultados de la medida a lo largo del tiempo de la liberación de GFP basada en la intensidad de la fluorescencia en el fluido de cultivo y los sobrenadantes del cultivo de la cepa AY-5 y la cepa AY-16, cultivadas en tubos de ensayo.

La Figura 3 representa los efectos de la liberación de GFP por los reactivos antifúngicos disponibles. Cada macromolécula principalmente inhibida se cita entre paréntesis. El gráfico superior representa los resultados obtenidos por la utilización de la cepa AY-2, y el gráfico inferior representa los resultados obtenidos por la utilización de la cepa AY-12. Los agentes representados desde la izquierda son: aculeacina A (AC), tunicamicina (TM), nicomicina Z (NM), blanco de calcofluor (CW), rojo Congo (CR), anfotericina B (AMPH), salinomicina (SM), fluconazol (FCZ), aureobasidina (AB), cerulenina (CE), flucitosina (5-FC), zeocina (ZE), netropsina (NE), cicloheximida (CH), azaserina (AS), bromoconduritil (BC) y cafeína (CA).

La Figura 4 representa la secuencia nucleotídica (número de nucleótidos: 1116) del gen introducido en la cepa AY-15, sitios de reconocimiento de los enzimas de restricción y secuencia aminoácida (código de una letra) codificada por el gen. La figura representa los nucleótidos hasta el ácido nucleico número 600.

La Figura 5 representa la secuencia nucleotídica (número de nucleótidos: 1116) del gen introducido en la cepa AY-15, sitios de reconocimiento de los enzimas de restricción y secuencia aminoácida (código de una letra) codificada por el gen. La figura representa los nucleótidos del ácido nucleico número 601 a 1116.

La Figura 6 representa la secuencia nucleotídica (número de nucleótidos: 1236) del gen introducido en la cepa AY-14, sitios de reconocimiento de los enzimas de restricción y secuencia aminoácida (código de una letra) codificada por el gen. La figura representa los nucleótidos hasta el ácido nucleico número 660.

La Figura 7 representa la secuencia nucleotídica (número de nucleótidos: 1236) del gen introducido en la cepa AY-14, sitios de reconocimiento de los enzimas de restricción y secuencia aminoácida (código de una letra) codificada por el gen. La figura representa los nucleótidos del ácido nucleico número 661 a 1236.

Forma idónea para realizar el procedimiento reivindicado

Seguidamente se describe un procedimiento para el cribado de un agente que actúa sobre la pared celular, que se caracteriza por comprender las etapas de:

(1) cultivar cada uno de un microorganismo que posee una proteína indicadora fijada sobre una pared celular como una proteína anclada vía GPI y un microorganismo que posee una proteína indicadora fijada sobre una membrana celular como una proteína anclada vía GPI en presencia de un agente de ensayo;

(2) determinar la proteína indicadora liberada en cada fluido de cultivo del microorganismo cultivado, y

(3) valorar que el agente de ensayo es un agente que presenta una acción inhibitoria selectiva sobre la pared celular cuando la proteína indicadora es liberada desde el microorganismo que posee la proteína indicadora fijada sobre la pared celular en el fluido de cultivo y la proteína indicadora no es liberada sustancialmente desde el microorganismo que posee la proteína indicadora fijada sobre la membrana celular en el fluido de cultivo.

El tipo del agente que actúa sobre la pared celular que es sometido a cribado según el procedimiento de la presente invención no está limitado particularmente. El procedimiento de la presente descripción puede ser utilizado para cribar un agente que presenta una acción inhibitoria selectiva sobre la pared celular, preferiblemente una acción inhibitoria selectiva sobre la biosíntesis (ej., un agente que presenta una acción inhibitoria sobre la biosíntesis de pared celular, pero no presenta sustancialmente una acción inhibitoria o una acción inhibitoria no específica sobre la biosíntesis de membrana celular (ej., la del detergente)). Por ejemplo, el procedimiento puede ser utilizado preferiblemente para el cribado de un agente que presenta una acción inhibitoria sobre la biosíntesis de (1,3)- β -glucano y/o (1,6)- β -glucano, que son polímeros sacáridos principales constitutivos de paredes celulares, o un agente que presenta una acción inhibitoria contra uno o más enzimas implicados en la biosíntesis de esos polímeros.

En la presente descripción, la expresión “que actúa sobre una pared celular” significa, por ejemplo, actuar sobre uno o más de los siguientes enzimas e interferir con acciones o funciones de los enzimas.

(a) enzimas para síntesis de componentes que constituyen la pared celular (polímeros sacáridos) de microorganismos;

(b) enzimas auxiliares de las acciones de enzimas para síntesis de componentes que constituyen las paredes celulares (polímeros sacáridos) de microorganismos;

(c) enzimas que inhiben las funciones de enzimas para síntesis de componentes que constituyen paredes celulares (polímeros sacáridos) de microorganismos;

(d) procesos requeridos por los enzimas pertenecientes a las clases (b) y (c) antes mencionadas para ayudar o inhibir las acciones del enzima para síntesis de los (a) antes mencionados, y enzimas implicados en los procesos;

(e) procesos que actúan en el entrelazado entre diferentes polímeros sacáridos y enzimas implicados en los procesos;

(f) procesos para anclar componentes que constituyen paredes celulares sobre las paredes celulares (por ejemplo, proteínas GPI presentes en paredes celulares) además de los polímeros sacáridos, y enzimas implicados en los procesos;

(g) procesos de construcción normal de polímeros sacáridos en paredes celulares y enzimas implicados en los procesos;

(h) procesos y vías para regular la síntesis de paredes celulares y enzimas implicados en los procesos;

(i) procesos que actúan en la división celular de células microbianas y enzimas implicados en los procesos;

(j) procesos de cambio de las formas de paredes celulares de células microbianas y enzimas implicados en los procesos;

(k) procesos de digestión de paredes celulares construidas de células microbianas y enzimas implicados en los procesos;

(l) procesos en los cuales los microorganismos cambian significativamente las composiciones de la pared celular en respuesta a los cambios en el ambiente externo y enzimas implicados en los procesos, y

(m) otros procesos de construcción y síntesis de paredes celulares microbianas y cambio de estructuras de la pared celular, además de los ejemplos antes mencionados, y enzimas implicados en los procesos.

Además, la expresión “que posee una acción inhibitoria selectiva sobre una pared celular” significa poseer una acción inhibitoria selectiva en los casos descritos en los apartados (a) a (m) antes mencionados, incluyendo síntesis, descomposición y similares de paredes celulares. En la descripción, el término “agente” se utiliza en el sentido de abarcar cualesquiera sustancias que presentan una acción biológica, incluyendo compuestos moleculares bajos hasta compuestos macromoleculares, así como sustancias naturales, proteínas o una parte de ellas, ácidos nucleicos tales como oligonucleótidos o polipéptidos, y similares. El término “agente” no debe entenderse en sentido limitativo, sino en su más amplio sentido.

El procedimiento reivindicado puede ser muy preferiblemente utilizado para cribar un agente que presenta una acción inhibitoria sobre la biosíntesis de (1,6)- β -glucano, o un agente que presenta una acción inhibitoria sobre uno o más enzimas implicados en la biosíntesis de (1,6)- β -glucano. Los ejemplos específicos del agente que actúa sobre una

pared celular incluyen agentes antifúngicos y similares. Sin embargo, los agentes que pueden ser cribados mediante el procedimiento de la presente invención no se limitan a agentes antifúngicos.

Las proteínas indicadoras fijadas sobre una pared celular o membrana celular de un microorganismo no están limitadas en particular, siempre que sean proteínas que pueden ser detectadas por medios ordinarios, por ejemplo, medios espectroscópicos tales como fluorometría, o medios bioquímicos tales como reacciones enzimáticas. Por ejemplo, puede ser utilizada preferiblemente una proteína fluorescente o similar. Por ejemplo, se utiliza preferiblemente una proteína fluorescente verde (GFP) o un mutante de ella (*EGFP: Dormack, B. P., et al., Gene, 173, pág. 33-38, etc.*). En la descripción, la expresión “proteína fluorescente verde” se utiliza en el sentido de abarcar GFP y sus mutantes. Los tipos de microorganismos no están particularmente limitados siempre que sean microorganismos celulares eucarióticos que presentan una proteína anclada vía GPI. Por ejemplo, son utilizadas preferiblemente levaduras tales como *S. cerevisiae*.

En las levaduras, es conocido que una parte de algunas de las proteínas ancladas vía GPI fijadas sobre la membrana celular está además fijada sobre la pared celular vía (1,6)- β -glucano como un anclaje (*Lu, C. F., et al., Mol. Cell Biol., 14, pág. 4825-4833, 1994; Kollar, R., et al., J. Biol. Chem., 272, pág. 17762-17775, 1997*). Además, es conocido un procedimiento para fijar un enzima sobre una pared celular de microorganismo mediante producción de una proteína de fusión (*Chris et. al, Publicación en japonés de la patente internacional sin examinar (KOHYO) n° 7-508652*). Con fundamento en estos hallazgos, se han desarrollado procedimientos para fijar una proteína exógena sobre una pared celular de una levadura (*Varrt, J. M. V. D., et al., Appl. Environ. Microbiol., 63, pág. 615-620, 1997; Murai, T., et al., Appl. Environ. Microbiol., 63, pág. 1362-1366, 1997*). La proteína anclada vía GPI también es denominada proteína tipo anclaje GPI, y también puede algunas veces denominarse proteína tipo anclaje glicosilfosfatidilinositol, proteína tipo anclaje fosfatidilinositol, proteína tipo anclaje PI, o similares.

Cuando se utilizan levaduras como microorganismos, una levadura en la cual una proteína indicadora está fijada sobre una pared celular o membrana celular como la proteína anclada vía GPI, puede ser preparada según los procedimientos descritos en las publicaciones antes mencionadas. Sus procesos específicos están descritos en el ejemplo de la presente descripción, y por tanto, los expertos en la materia pueden producir microorganismos deseables según los procedimientos descritos en las publicaciones antes mencionadas y los procesos específicamente descritos en la descripción.

En el procedimiento reivindicado, un microorganismo que posee una proteína indicadora fijada sobre una pared celular como una proteína anclada vía GPI y un microorganismo que posee una proteína indicadora fijada sobre una membrana celular como una proteína anclada vía GPI son ambos cultivados en presencia de un agente de ensayo, y se determinan las proteínas indicadoras liberadas en el fluido de cultivo. Las condiciones, incluyendo tipo de medio, temperatura, tiempo de cultivo y similares pueden ser elegidos apropiadamente dependiendo de los tipos de microorganismos utilizados. Un procedimiento de cultivo concreto está específicamente descrito en el ejemplo de la descripción, en el que se utiliza una levadura como microorganismo. Para la medida de la proteína indicadora, puede elegirse un procedimiento apropiado dependiendo del tipo y propiedades de la proteína indicadora. Por ejemplo, cuando una proteína fluorescente verde se utiliza como la proteína indicadora, la liberación de la proteína indicadora puede ser determinada midiendo el espectro fluorescente en el fluido de cultivo.

En la etapa de cultivo antes mencionada, cuando se observa la liberación de la sustancia derivada de una proteína indicadora en el fluido de cultivo, puede interpretarse que la pared celular o la membrana celular del microorganismo ha sido dañada por una acción del agente de ensayo, y se considera generalmente que la pared celular o membrana celular es dañada a causa de la inhibición de la biosíntesis de la pared celular o membrana celular, lo que se traduce en la liberación de la proteína indicadora (*Lu, C. F., et al., Mol. Cell Biol., 14, pág. 4825-4833, 1994; Lu, C. F., et al., J. Cell. Biol., 128, pág. 333-340, 1995*). Por ejemplo, cuando un agente que daña selectivamente una pared celular es cribado como un agente que presenta toxicidad selectiva para los hongos, el criterio es que la sustancia derivada de una proteína indicadora es liberada por el microorganismo que posee la proteína indicadora fijada sobre la pared celular en el fluido de cultivo, mientras que la sustancia derivada de una proteína indicadora no es liberada substancialmente por el microorganismo que presenta la proteína indicadora fijada sobre la membrana celular en el fluido de cultivo, y puede ser elegido un agente que satisface el criterio. Un agente determinado como positivo para el criterio puede ser estimado como un agente que posee una acción inhibitoria selectiva sobre la biosíntesis de la pared celular.

La presente invención se explicará más específicamente con referencia al ejemplo siguientes. Sin embargo, el objeto de la presente invención no queda limitado por este ejemplo.

Ejemplo

(1) Materiales y procedimientos

(A) Cepas utilizadas y transformación

Se utilizaron cepas *Escherichia coli* JM109, TOP10F' y DH5 α , y cepas *S. cerevisiae* YPH500 (MAT α ade2, his3, leu2, lis2, trp1, ura3), IFO 0565, IFO 1226 y cepa KRE6-fragmentada. La transformación se realizó según un procedimiento conocido o utilizando un kit de transformación de levadura (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo con el manual del envase.

(B) Agentes Utilizados

Se utilizaron los agentes que siguen.

TABLA 1

Agente	Acrónimo	Acción
Aculeacina A	AC	Inhibición de síntesis de la pared celular ((1,3)- β -glucano)
Tunicamicina	TM	Inhibición de síntesis de la pared celular (cadena sacárida N-tipo)
Nicomicina Z	NM	Inhibición de síntesis de la pared celular (quitina)
Blanco de calcofluor	CW	Adsorción física de la pared celular
Rojo Congo	CR	Adsorción física de la pared celular
Anfotericina B	AMPH	Daño de la membrana celular (enlace con ergosterol)
Fluconazol	FCZ	Inhibición de síntesis de la membrana celular (ergosterol)
Aureobasidina	AB	Inhibición de síntesis de la membrana celular (esfingolípido)
Cerulenina	CE	Inhibición de síntesis de la membrana celular (ácido graso)
Salinomycin	SM	Daño de la membrana celular (ionóforo)
Flucitosina	5-FC	Inhibición de síntesis de ácido nucleico
Zeocina	ZE	Enlace con ácido nucleico
Netropsina	NE	Inhibición de síntesis de ácido nucleico
Cicloheximida	CH	Inhibición de síntesis de proteína
Azaserina	AS	Inhibición de síntesis de proteína
Bromoconduritól	BC	Inhibición de manosidasa
Cafeína	CA	Inhibición de transmisión de información intracelular (c-AMP)

(C) Oligonucleótidos

Los siguientes oligonucleótidos fueron utilizados en el experimento. El M13 iniciador universal y M13 iniciador inverso se compraron a Pharmacia, y los otros oligonucleótidos fueron sintetizados para su utilización. Estos oligonucleótidos están comprendidos dentro del objetivo de los genes de la presente invención utilizados para fijar una proteína indicadora sobre una pared celular o una membrana celular de un microorganismo como una proteína anclada vía GPI.

GFP-SM2 (5'-GGCATGGATGAGATCTACAAATAATG-3')

GFP-SM3 (5'-CATGATTACGCCGAGCTCGCATGCCTG-3')

GFP-SM4 (5'-CAACACTTGTCACTACGTAACTTATGGTGTTCATG-3')

YEX-SM2 (5'-CCTGTGATTTCTCCAGCTCGAATTC-3')

YEX-SM3 (5'-GATTCATTAATGCATGCTGGCACGACAGG-3')

YEX-SM4 (5'-GATTCATTAATGCAGCTGGCACGAC-3')

YEX-SM5 (5'-CTCACGGTATCGCCCTCGAGATCTCTGAATCC-3')

YEX-SM6 (5'-GAGACCCTCTTCTGAGCTCTCTGAATCC-3')

5 YEX-SM7 (5'-AAACCAAAAGATCGACTAGTATAAAATGAATATA-3')

YEX-SM8 (5'-CATTAAATGCATGCTGGCACGAC-3')

10 YEX-SM9 (5'-CTTTAACGAGTCCGCGGATTTCTCCAGCTCG-3')

SUC2-sen1 (5'-GCACTAGTATGCTTTTGCAAGCTTTCCTTTTC-3')

SUC2-anti2 (5'-GCGAGCTCTTTGATGCAGATATTTTGGCTGCAA-3')

15 GAS1-sen1 (5'-GCAGATCTGTAGTGTTGATTTGGGTTCCGG-3')

GAS1-anti3 (5'-GCCCCGCGGCTTATCGAGTTATTATGTATGTGTGCAAGC-3'-)

20 CWP2-sen1 (5'-GCAGATCTACTTTGTTGCCGCTGAATCCG-3'-)

CWP2-anti1 (5'-GCGAATTCGAGAAATCACAGGACTCGTTAAA- G-3')

MEL1-sen1 (5'-GCGAATTCGAGAGCAACGGTAATAAAAGCAACGACG-3')

25 MEL1-sen3 (5'-CGGAGCTCGGTGTCTCCGAGTTACAATGGC-3')

MEL1-anti1 (5'-GCAGATCTAGAAGGCGATACCGTGAGCTGGAAC-3')

MEL1-anti2 (5'-CGGAGCTCCATCAATACTTCTCGCCCTGCT-3')

30 MEL1-anti3 (5'-GCAGATCTAAGAAGAGGGTCTCAACCTATAGAAG-3')

M13 iniciador universal y M13 iniciador inverso

(D) Plásmidos

Utilizando pUC19, YEp13, YEp24 (para éstos, ver *Pouwels, P. H. et al., Cloning vectors, Elsevier Science Publishers B. V., 1985*), pYPR2831 (*Horiuchi, H. et al., Agric. Biol. Chem., 54, 1771-1779, 1990*), pGFPuv (Clontech, Palo Alto, CA, USA) y pYEX-S1 (Amrad, Victoria, Australia), se prepararon y utilizaron los siguientes plásmidos. Estos plásmidos incluyen vectores recombinantes que contienen los genes de la presente invención utilizados para fijar una proteína indicadora sobre una pared celular o una membrana celular de un microorganismo como una proteína anclada vía GPI. Se utilizó pGEM-T Vector System (Promega, Madison, WI, USA) para subclonación de productos PCR, y se utilizó el kit Transformer Site-Directed Mutagenesis (Clontech) para introducción de mutaciones. Se realizaron según procedimientos convencionales la recuperación de fragmentos de ADN a partir de agarosa, defosforilación, enromado de extremos, ligazón y digestión con enzimas de restricción. Las estructuras de los plásmidos principales se representan en la Figura 1. En la figura, oriB representa el origen de replicación de *Escherichia coli*, oriY representa el origen de replicación de levadura de panadería, Amp^r representa un gen resistente a ampicilina, dLEU2 representa un marcador de LEU2 parcialmente deficiente, Pro representa un promotor de fosfoglicerato quinasa, SS representa una señal secretora, y Ter representa un exterminador fosfoglicerato quinasa.

pUXS1: Un fragmento obtenido mediante digestión de YEp24 con HindIII fue insertado en el sitio HindIII de pUC19.

pUXS2: Un fragmento obtenido mediante digestión de YEp13 con XhoI y SalI fue insertado en el sitio SalI de pUC19.

pUAC1: Una parte de CWP2 (*Varrrt, J. M. et al., J. Bacteriol., 177, 3104-3110, 1995*) fue amplificada mediante PCR (patrón: ADN cromosómico de cepa YPH500, iniciadores: CWP2-sen1 y CWP2-anti1) y subclonada en PGEM-T.

pUAC1 a: pUAC1 fue digerido con EcoRI y PstI y entonces auto-enlazado.

pUAC3: Una parte de MEL1 (*Liljestrom, P. L., Nucl. Acids. Res., 13, pág. 7257-7268, 1985*) fue amplificada mediante PCR (patrón: ADN cromosómico de cepa IFO 0565, iniciadores: MEL1-sen1 y MEL1-anti1) y subclonada en pGEM-T.

ES 2 312 425 T3

pUAC5a: Un fragmento obtenido mediante digestión de pUAC3 con *ScaI* y *BglII* fue insertado en los sitios *ScaI* y *BglII* de pUAC1a.

pUAC8: Una parte de MEL1 fue amplificada mediante PCR (patrón: ADN cromosómico de cepa IFO 1226, iniciadores: MEL1-sen3 y MEL1-anti1) y subclonada en pGEM-T.

pUAC12: Una parte de SUC2 (*Taussig, R. et al., Nucl. Acids Res., 11, pág. 1943-1954, 1983*) fue amplificada mediante PCR (patrón: ADN cromosómico de cepa YHP500, iniciadores: SUC2-sen1 y SUC2-anti2) y subclonada en pGEM-T.

pUAC13: Una parte de MEL1 fue amplificada mediante PCR (patrón: ADN cromosómico de cepa IFO 0565, iniciadores: MEL1-sen3 y MEL1-anti3) y subclonada en pGEM-T.

pUAC14: Se introdujo una mutación en pGFPuv (iniciadores: GFP-SM2 y GFP-SM3).

pUAC15: pEAC8a fue digerido con *StuI* y auto-enlazado.

pUAC15a: Se introdujo una mutación en pUAC15 (iniciadores: YEX-SM4 y YEX-SM7).

pUAC16: Un fragmento obtenido mediante digestión de pUAC12 con *NaeI* y *SpeI* fue insertado entre los sitios *SpeI* y *StuI* de pUAC15a.

pUAC19: Un fragmento obtenido mediante digestión de pUXS1 con *EcoRV* y *PvuII* fue insertado en el sitio *EcoRV* de pEAC12.

pUAC19a: Se introdujo una mutación en pUAC19 (iniciadores: GFP-SM4, YEX-SM8 y YEX-SM9).

pUAC20: Un fragmento obtenido mediante digestión de pUXS2 con *EcoRV* y *PvuII* fue insertado en el sitio *EcoRV* de pEAC12.

pUAC20a: Se introdujo una mutación en pUAC20 (iniciadores: GFP-SM4, YEX-SM8 y YEX-SM9).

pUAC21: Un fragmento obtenido mediante digestión de pYPR2831 con *PstI* fue enromado en sus extremos e insertado en el sitio *EcoRV* de pEAC12.

pUAC21a: Un fragmento obtenido mediante digestión de pUAC19a con *SacI* y *BglII* fue insertado entre los sitios *SacI* y *BglII* de pUAC21.

pUAC28: Una parte de GAS1 (Vai, M., *et al., J. Biol. Chem., 266, 12242-12248, 1990*) fue amplificada mediante PCR (patrón: ADN cromosómico de cepa YPH500, iniciadores: GAS1-sen1 y GAS1-anti3) y subclonada en pGEM-T.

pUAC29b: Un fragmento obtenido mediante digestión de pUAC28 con *BglII* y *SacII* fue insertado entre los sitios *BglII* y *SacI* de pUAC20a.

pUAC30b: Un fragmento obtenido mediante digestión de pUAC29b con *BglII* y *BamHI* fue insertado en el sitio *BglII* de pUAC19a.

pUAC31b: Un fragmento obtenido mediante digestión de pUAC29b con *BglII* y *BamHI* fue insertado en el sitio *BglII* de pUAC21a.

pEAC3: Un fragmento obtenido mediante digestión de pUAC5a con *EcoRI* y *SalI* fue insertado entre los sitios *EcoRI* y *SalI* de pYPR2831.

pEAC6: Una parte de pEAC3 fue amplificada mediante PCR (patrón: pEAC3, iniciadores: MEL1-sen3 y MEL1-anti2) y subclonada en pGEM-T, y un fragmento obtenido mediante digestión del plásmido obtenido con *SacI* fue insertado en el sitio *SacI* de pYEX-S1.

pEAC6a: Se introdujo una mutación en pEAC6 (iniciadores: YEX-SM2 y YEX-SM3).

pEAC7: Un fragmento obtenido mediante digestión de pUAC8 con *SacI* y *BglII* fue insertado entre los sitios *SacI* y *BglII* de pEAC6a.

pEAC7a: Se introdujo una mutación en pEAC7 (iniciadores: YEX-SM4 y YEX-SM5).

pEAC8: Un fragmento obtenido mediante digestión de pUAC13 con *SacI* y *BglII* fue insertado entre los sitios *SacI* y *BglII* de pEAC6a.

ES 2 312 425 T3

pEAC8a: Se introdujo una mutación en pEAC8 (iniciador: YEX-SM6).

pEAC9: Un fragmento obtenido mediante digestión de pUAC14 con SacI y BglII fue insertado entre los sitios SacI y BglII de pEAC6a.

pEAC11: Un fragmento obtenido mediante digestión de pEAC7a con SacI y NdeI fue insertado entre los sitios SacI y NdeI de pUAC16.

pEAC12: Un fragmento obtenido mediante digestión de pEAC9 con SacI y BglII fue insertado en los sitios SacI y BglII de pEAC11.

En la Figura 1, para pEAC6a, el indicador es α -galactosidasa. Para pEAC8a, el indicador es GFPuv. Para pUAC19, el indicador es EGFP, el marcador es URA3, y AS es la señal de anclaje CWP2. Para pUAC19a, el indicador es EGFP, el marcador es URA3, y AS es la señal de anclaje CWP2. Para pUAC20a, el indicador es EGFP, el marcador es LEU2, y AS es la señal de anclaje CWP2. Para pUAC21a, el indicador es EGFP, el marcador es TRP1, y AS es la señal de anclaje CWP2. Para pUAC29b, el indicador es EGFP, el marcador es LEU2, y AS es la señal de anclaje GAS1. Para pUAC30b, el indicador es EGFP, el marcador es URA3, y AS es la señal de anclaje GAS1. Para pUAC31b, el indicador es EGFPuv, el marcador es TRP1, y AS es la señal de anclaje GAS1.

(E) Preparación de levadura estructural

Se eligió como una proteína indicadora, α -galactosidasa derivada de *S. cerevisiae* (Turakainen, H., et al., Appl. Environ. Microbiol., 59, 2622-2630, 1993; MEL1) o una proteína fluorescente verde (GFP). Como GFP, se utilizaron GFPuv y EGFPuv (Cormack, B. P., et al., Gene, 173, 33-38, 1996; obtenida introduciendo una mutación en GFPuv de forma que Phe64 y Ser65 sean reemplazadas con Leu y Thr, respectivamente). Se diseñó un gen que codifica una proteína de fusión que consta de cada una de las proteínas añadidas con una señal secretora de SUC2 en el N-terminal y una señal de anclaje vía GPI de CWP2 en el C-terminal, y el gen fue insertado entre el promotor y el exterminador del gen fosfoglicerato quinasa a fin de obtener una "casete de expresión". Se obtuvieron levaduras estructurales tipo pared mediante transformación utilizando un plásmido obtenido por la inserción de la casete de expresión en un vector tipo YEp (pEAC6a, pEAC8a o pEAC9) para cepas AYE1, AYE2 o AYE3, o por linearización de un plásmido obtenido mediante inserción de la casete de expresión en un vector tipo YIp (pUAC19a, pUAC20a o pUAC21a) e introducción entonces en ADN cromosómico de cada cepa (cepas AY-2, AY-5, AY-16, AY-14 o AY-17). La levadura estructural tipo membrana (cepas AY-12 o AY-15) se preparó reemplazando la señal de anclaje vía GPI con cualquiera de las derivadas de GAS1 (pUAC29b, pUAC30b o pUAC31b). Las cepas preparadas se exponen en la Tabla 2.

TABLA 2

Cepa levadura	Genotipo	Fenotipo	Manipulación genética
YPH500 (cepa madre)	MAT α ade2, his3, leu2, lis2, trp1, ura3		
AYE-1	MAT α YPH500 (pEAC6a)	Leu+, Ura+	
AYE-2	MAT α YPH500 (pEAC8a)	Leu+, Ura+	
AYE-3	MAT α YPH500 (pEAC9)	Leu+, Ura+	
AY-2	MAT α YPH500	Ura+	EGFPuv - CWP2 (pUAC19a)
AY-5	MAT α YPH500	Leu+, Ura+	EGFPuv - CWP2 x 2(pUAC19a, pUAC20a)
AY-10	MAT α YPH500	Leu+, Trp+	EGFPuv - CWP2(pUAC20a, pUAC21a)
AY-12	MAT α YPH500	Leu+, Ura+	EGFPuv - GAS1 x 2(pUAC29b, pUAC31b)
AY-14	MAT α YPH500	Leu+, Trp+, Ura+	EGFPuv - CWP2 x 3(pUAC19a, pUAC20a, pUAC21a)
AY-15	MAT α YPH500	Leu+, Trp+, Ura+	EGFPuv - GAS1 x 3(pUAC29b, pUAC30b, pUAC31b)
AY-16	MAT α YPH500 kre6 Δ ::URA3	Leu+, Trp+, Ura+	EGFPuv - CWP2 x 2(pUAC20a, pUAC21a)
AY-17	MAT α YPH500	Leu+, Ura+	GFPuv - CWP2 x 2(pUAC19, pUAC20)

(F) *Medios*

Se utilizaron apropiadamente YPAUD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa, 40 $\mu\text{g/ml}$ adenina, 20 $\mu\text{g/ml}$ uracilo), RPMIB (RPMI1640 (Sigma), 1 M sorbitol, 100 mM tampón fosfato potásico (pH 4,0-7,0), 2% glucosa, 40 $\mu\text{g/ml}$ adenina, 20 $\mu\text{g/ml}$ uracilo) e YNB (0,67% levadura base nitrógeno sin aminoácido (Difco), 2% glucosa, nutrientes adicionales (40 $\mu\text{g/ml}$ adenina, 20 $\mu\text{g/ml}$ histidina, 60 $\mu\text{g/ml}$ leucina, 30 $\mu\text{g/ml}$ lisina, 40 $\mu\text{g/ml}$ de triptófano, 20 $\mu\text{g/ml}$ uracilo)). Los medios agar fueron obtenidos añadiendo 1,5-2% de agarosa a los antes mencionados medios líquidos.

(G) *Determinación de la actividad de α -galactosidasa*

Se utilizó el procedimiento de Schreuder *et al.* (Schreuder, M. P., *et al.*, *Yeast*, 9, 399-409, 1993). Se añadieron 160 μl de un caldo de cultivo de una cepa levadura cultivada en YNB en la última fase de crecimiento logarítmico con 20 μl cada uno de 1 M tampón acetato (pH 4,5) y 0,1 M p-nitrofenil- α -galactopiranosida (Boehringer Mannheim) y se dejó reaccionar a 37°C o durante 5 minutos. La mezcla de reacción se añadió con 1 ml de carbonato sódico al 2%, y entonces se midió la absorbancia (OD_{410}).

(H) *Medida de la intensidad fluorescente de la cepa expresora de GFP*

Células de levadura cultivadas en RPMIB (pH 7,0) en la fase de crecimiento logarítmico se cosecharon y resuspendieron con agua a $\text{OD}_{595} = 1,0$, y se realizó la medición. La intensidad fluorescente y las longitudes de onda óptimas se midieron utilizando un fluorómetro (F-2000, Hitachi Koki Co., Ltd.). Además, se detectó la fluorescencia de cada célula utilizando un microscopio fluorescente (Axioplan, Zeiss).

(I) *Determinación del efecto de liberación de GFP por acción de la zimoliasa*

Células de levadura cultivadas en un medio líquido en la fase de crecimiento logarítmico 9 se cosecharon y resuspendieron con un tampón apropiado. La mezcla se añadió con 400-6,25 $\mu\text{g/ml}$ de Zymolyase 100T (Seikagaku Corporation) y agitada a 30°C durante 30 minutos. Después de la reacción, las células de levadura y el tampón se separaron mediante filtración por medio de un filtro, y la intensidad de fluorescencia en el tampón se midió por un fluorómetro (excitación = 487 nm, emisión = 513 nm).

(J) *Comparación de la localización de GFP*

Células de levadura (cepa AY-2) cultivadas en un medio líquido en la fase de crecimiento logarítmico fueron fragmentadas físicamente utilizando cuentas de vidrio, entonces se fraccionaron la pared celular, membrana celular y proteínas solubles, y cada fracción fue suspendida en un tampón apropiado. Se midió la intensidad de fluorescencia de cada fracción (excitación = 487 nm, emisión = 513 nm) y se representó en términos de una proporción basada en la intensidad total de fluorescencia del conjunto de células.

(K) *Determinación del efecto de liberación de GFP en cepa KRE6 fragmentada*

La cepa KRE6 fragmentada (cepa AY-16) se cultivó con agitación a 30°C. El fluido de cultivo se filtró mediante un filtro después de 3 y 6 horas, y se midió la intensidad de la fluorescencia en el medio.

(L) *Medida del efecto de liberación de GFP por agentes antifúngicos disponibles*

Se cosecharon las células de levadura cultivadas en la fase de crecimiento logarítmico (cepa AY-2 o cepa AY-12), y se dejaron actuar sobre las células de levadura varios agentes. Se midió la intensidad de fluorescencia del cultivo sobrenadante utilizando un fluorómetro Cytofluor 2300 (Millipore, excitación = 480 nm, emisión = 530 nm). La intensidad de fluorescencia bajo tratamiento con cada uno de varios agentes se mostró en términos de una diferencia de intensidad de fluorescencia comparada con la propia de un control en el que no se añadió agente.

(2) *Resultados*(A) *Caracterización de diversas levaduras estructurales tipo pared*

Se produjeron diversas levaduras estructurales tipo pared, utilizando tres clases de proteínas indicadoras, α -galactosidasa, GFPuv y EGFPuv, y aplicando un método de utilizar un vector con alto número de copia o un método de inserción en el cromosoma como un procedimiento de expresión, y se comparó la actividad de α -galactosidasa e intensidad de fluorescencia prestada por estas cepas de levadura. Como resultado, solamente se observó una débil acti-

vidad en ambas de las cepas expresoras de α -galactosidasa (cepa AYE-1 y cepa AYE-2). Además, cuando se examinó una cepa de levadura (cepa AYE-3) en la cual se expresó GFPuv utilizando un vector con alto número de copia con un microscopio de fluorescencia, se observó una dispersión significativa en la intensidad de fluorescencia entre las células individuales, lo que sugería la existencia de un problema en la estabilidad del plásmido. Mientras que cuando se compararon (Tabla 3) intensidades de fluorescencia de las cepas obtenidas por inserción de casetes de expresión EGFPuv y GFPuv en el cromosoma (cepa AY-5 y cepa AY-17), la intensidad de fluorescencia de EGFPuv fue tres o más veces mayor que la de GFPuv. Con fundamento en estos resultados, se concluyó que el empleo de una proteína fluorescente como proteína indicadora era apropiado y que la cepa en la cual fue insertada EGFPuv en el cromosoma como la proteína indicadora era particularmente preferible. Cuando se midieron las longitudes de onda óptimas de la cepa, la excitación máx. apareció como 487 nm, y la emisión máx. como 513 nm.

TABLA 3

	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Fluorescencia
YPH500	487	513	260
AY-5	487	513	1260
YPH500	395	509	50
AY-17	395	509	350

La cepa en la fase de crecimiento logarítmico se suspendió en agua y se midió su intensidad de fluorescencia.

(B) Medida del efecto de liberación de GFP por la acción de la zimoliasa

La cepa AY-2 fue cultivada en un tubo de ensayo, y las células se cosecharon y se dejó actuar la zimoliasa sobre las células. Se midió la intensidad de fluorescencia en el cultivo sobrenadante después de esta acción. Cuando se dejó actuar la zimoliasa sobre la cepa AY-2 bajo protección de la presión osmótica, se incrementó la intensidad de fluorescencia en el tampón dependiendo de la concentración de la zimoliasa añadida (Tabla 4). Estos resultados sugerían que una gran cantidad de GFP estaba fijada sobre la pared celular.

TABLA 4

Zimoliasa (μ g/ml)	Intensidad de fluorescencia
400	2160
200	1240
100	1170
50	786
25	410
12,5	215
6,25	126
0	107

(C) Medida del efecto de liberación de GFP en cepa KRE6 fragmentada

Se estima que al menos 6 clases de enzimas están implicados en la biosíntesis de (1,6)- β -glucano en *Saccharomyces cerevisiae*. Entre estos enzimas, se ha revelado que al menos uno de un producto (una proteína) codificado por el gen KRE6 presente en el cuerpo de Golgi y un producto (una proteína) codificado por el gen SKN1, que es su homólogo, es esencial para el crecimiento (Gaughran, J. P. et al., *J. Bacteriol.*, 176, pág. 5857-5860, 1994). Además, se estima que existen también ampliamente homólogos de KRE6 en hongos, tal como *Candida albicans* (típico hongo patógeno). Con fundamento en los anteriores hallazgos, se espera que Kre6p (un producto del gen KRE6) sea un objetivo preferible para el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos.

Para verificar el efecto de la liberación de GFP por la disrupción de KRE6, las cepas AY-5 y AY-16 (KRE6 fragmentado) fueron cultivadas en tubos de ensayo, y la liberación de GFP se midió con el transcurso del tiempo (Figura 2). Como resultado, casi el mismo nivel de intensidades de fluorescencia se detectó en los fluidos de cultivo (bacteria+medio) para ambas cepas en cualquier tiempo durante el periodo de cultivo, mientras que la intensidad de

fluorescencia en el cultivo sobrenadante de la cepa AY-16 fue aparentemente más elevada que la de la cepa AY-5. Además, cuando estas dos cepas de levadura fueron cultivadas en tubos de ensayo y las células fueron examinadas en la fase de crecimiento logarítmico bajo un microscopio de fluorescencia (x400), la intensidad de fluorescencia de la cepa AY-16 se atenuó. Estos resultados sugieren que la disrupción de KRE6 acelera la liberación de GFP. Por lo tanto, estos resultados empíricos indican que un agente que inhibe el producto del gen KRE6 puede ser cribado con éxito utilizando los microorganismos preparados (levaduras estructurales).

(D) Comparación de la localización de GFP

La localización de GFP se comparó en la cepa AY-2 (levadura estructural tipo pared) y la cepa AY-12 (levadura estructural tipo membrana). Cada cepa levadura se cultivó en un tubo de ensayo, y las células fueron cosechadas y fraccionadas en pared celular, membrana celular y proteínas solubles. Las intensidades de fluorescencia de las fracciones resultantes fueron medidas y cada relación fue calculada (unidad: %) con fundamento en la intensidad de fluorescencia total. Los resultados se exponen en la Tabla 5. Se reveló que una gran cantidad respectiva de GFP estaba fijada sobre la pared celular de la levadura estructural tipo pared y la membrana celular de la levadura estructural tipo membrana.

TABLA 5

	AY-2	AY-12
Fracción pared celular	40	11
Fracción membrana celular	15	48
Fracción proteína soluble	45	41

(E) Medida del efecto de liberación de GFP por agentes antifúngicos disponibles

Para comprobar si el procedimiento antes mencionado puede ser utilizado o no para una criba de agentes con un sitio de acceso distinto del Kre6p, los efectos de la liberación de GFP en la cepa AY-2 (levadura estructural tipo pared) y la cepa AY-12 (levadura estructural tipo membrana) se compararon bajo la acción de agentes antifúngicos disponibles. Las células de cepa AY-2 y las células de cepa AY-12 cada una cultivada en un tubo de ensayo se suspendieron con un medio (RPMIB) protegido de presión osmótica, y se dejó actuar sobre las células a cada uno de los agentes. Después del cultivo, se midió la intensidad de fluorescencia del sobrenadante, y se calculó la diferencia con un control sin adición del agente. Los resultados se exponen en la Figura 3.

Un marcado efecto de liberación de GFP se observó en la cepa AY-2 tratada con aculeacina A (inhibidor de síntesis (1,3)- β -glucano) y tunicamicina (inhibidor de síntesis manano) actuando ambas sobre las paredes celulares, mientras que casi no se observó efecto de la liberación en la cepa AY-12. Ligero efecto de la liberación se observó en ambas cepas tratadas con anfotericina B, fluconazol y salinomicina las cuales actúan sobre la membrana celular. Los agentes distintos de los anteriores no proporcionaron un claro efecto de liberación de GFP solamente sobre la levadura estructural tipo pared (cepa AY-2). Estos resultados revelan que diversas clases de agentes que actúan sobre una pared celular pueden ser cribados con éxito mediante el procedimiento de cribado de la presente invención.

Los genes incorporados en la cepa AY-15 y la cepa AY-14, que son los microorganismos de la presente invención, se exponen en el siguiente listado de secuencias.

SEQ ID N°: 1 es el gen incorporado en la cepa AY-15, que es una levadura estructural tipo membrana, como un gen tipo genoma incorporado. El gen corresponde a una secuencia nucleotídica de SS (señal secretora)-EGFPuv-señal de anclaje de membrana (AS) y fue obtenido añadiendo mutaciones a un GFPuv disponible comercialmente (la posición 312 fue sustituida con "g", la posición 315 con "a", y la posición 316 con "a" para los nucleótidos que en el GFPuv original eran "t", "c" y "t", respectivamente).

SEQ ID N°: 2 es el gen incorporado en la cepa AY-14, que es una levadura estructural tipo pared, como un gen tipo genoma incorporado. El gen corresponde a una secuencia nucleotídica de SS (señal secretora)-EGFPuv-señal de anclaje de pared (AS) y fue obtenido añadiendo mutaciones a un GFPuv disponible comercialmente (la posición 312 fue reemplazada con "g", la posición 315 con "a", y la posición 316 con "a" para los nucleótidos que en el GFPuv original eran "t", "c" y "t", respectivamente).

Aplicación industrial

De acuerdo con la presente invención, pueden ser eficientemente cribados agentes que presentan una acción inhibitoria selectiva sobre paredes celulares, por ejemplo agentes que presentan una acción inhibitoria selectiva sobre un enzima para biosíntesis de (1,6)- β -glucano que constituye paredes celulares.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para cribar un agente que actúa sobre una pared celular, que comprende las etapas de:

(1) cultivar cada uno de un microorganismo que posee una proteína indicadora fijada sobre una pared celular como una proteína anclada vía GPI y un microorganismo que posee una proteína indicadora fijada sobre una membrana celular como una proteína anclada vía GPI en presencia de un agente de ensayo;

(2) determinar la proteína indicadora liberada en cada fluido de cultivo del microorganismo; y

(3) valorar que el agente de ensayo presenta una acción inhibitoria selectiva sobre la pared celular cuando la proteína indicadora es liberada desde el microorganismo que posee la proteína indicadora fijada sobre la pared celular en el fluido de cultivo y la proteína indicadora no es liberada sustancialmente desde el microorganismo que posee la proteína indicadora fijada sobre la membrana celular en el fluido de cultivo.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, que utiliza un microorganismo que posee la proteína indicadora fijada a (1,6)- β -glucano sobre la pared celular.

3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el cual el microorganismo es levadura.

4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual la proteína indicadora es una proteína fluorescente.

5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el cual la proteína fluorescente es una proteína fluorescente verde.

6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual la acción inhibitoria sobre la pared celular es una acción inhibitoria sobre un proceso biosintético y/o un enzima de biosíntesis de la pared celular.

7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual el agente que actúa sobre la pared celular es un agente antifúngico.

8. Uso de un microorganismo transformado que posee una proteína indicadora fijada sobre una pared celular como una proteína anclada vía GPI, cuya proteína indicadora comprendida en dicho microorganismo es recombinante, preferiblemente como proteína de fusión, en el procedimiento para cribar un agente que actúa sobre una pared celular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. El uso según la reivindicación 8, en el cual la proteína indicadora está fijada a (1,6)- β -glucano de la pared celular.

10. El uso según las reivindicaciones 8 o 9, que se destina a cribar un agente que actúa sobre una pared celular.

11. El uso según la reivindicación 10, en el cual el agente que actúa sobre una pared celular es un agente antifúngico.

12. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el cual el microorganismo es una levadura.

13. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el cual la proteína indicadora es una proteína fluorescente.

14. El uso según la reivindicación 13, en el cual la proteína fluorescente es una proteína fluorescente verde.

15. Uso de un conjunto de microorganismos en el procedimiento para cribar un agente que actúa sobre una pared celular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual el conjunto de microorganismos comprende:

(1) un microorganismo transformado que posee una proteína indicadora fijada sobre una pared celular como una proteína anclada vía GPI, cuya proteína indicadora comprendida en dicho microorganismo es recombinante, preferiblemente como proteína de fusión; y

(2) un microorganismo transformado que posee una proteína indicadora fijada sobre una membrana celular como una proteína anclada vía GPI, cuya proteína indicadora comprendida en dicho microorganismo es recombinante, preferiblemente como proteína de fusión.

16. El uso según la reivindicación 15, que comprende un microorganismo que posee una proteína indicadora fijada a (1,6)- β -glucano de la pared celular.

17. El uso según la reivindicación 15 o 16, en el cual el agente que actúa sobre una pared celular es un agente antifúngico.

18. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el cual los microorganismos son levaduras.

ES 2 312 425 T3

19. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en el cual la proteína indicadora es una proteína fluorescente.

20. El uso según la reivindicación 19, en el cual la proteína fluorescente es una proteína fluorescente verde.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

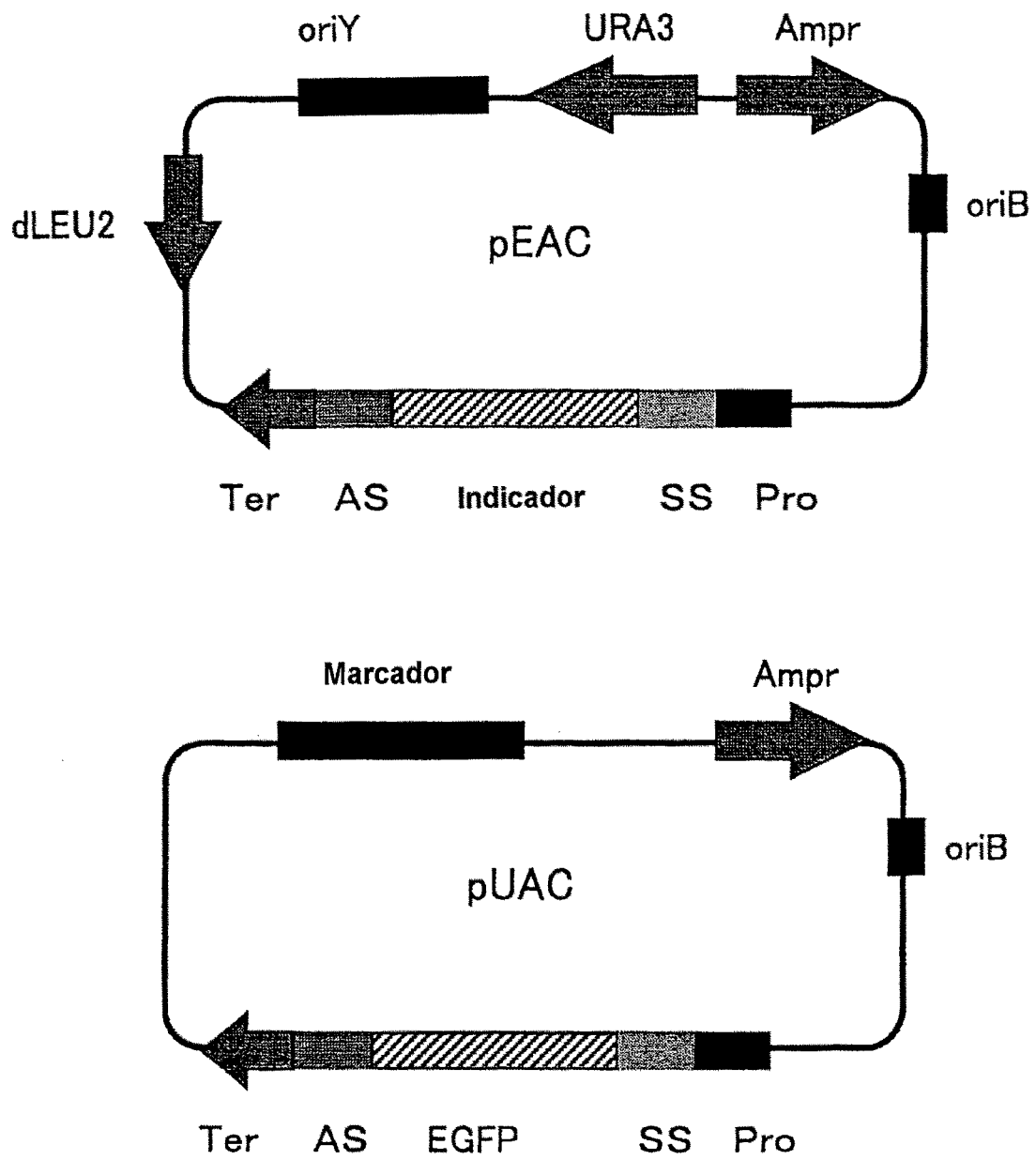


Fig. 2

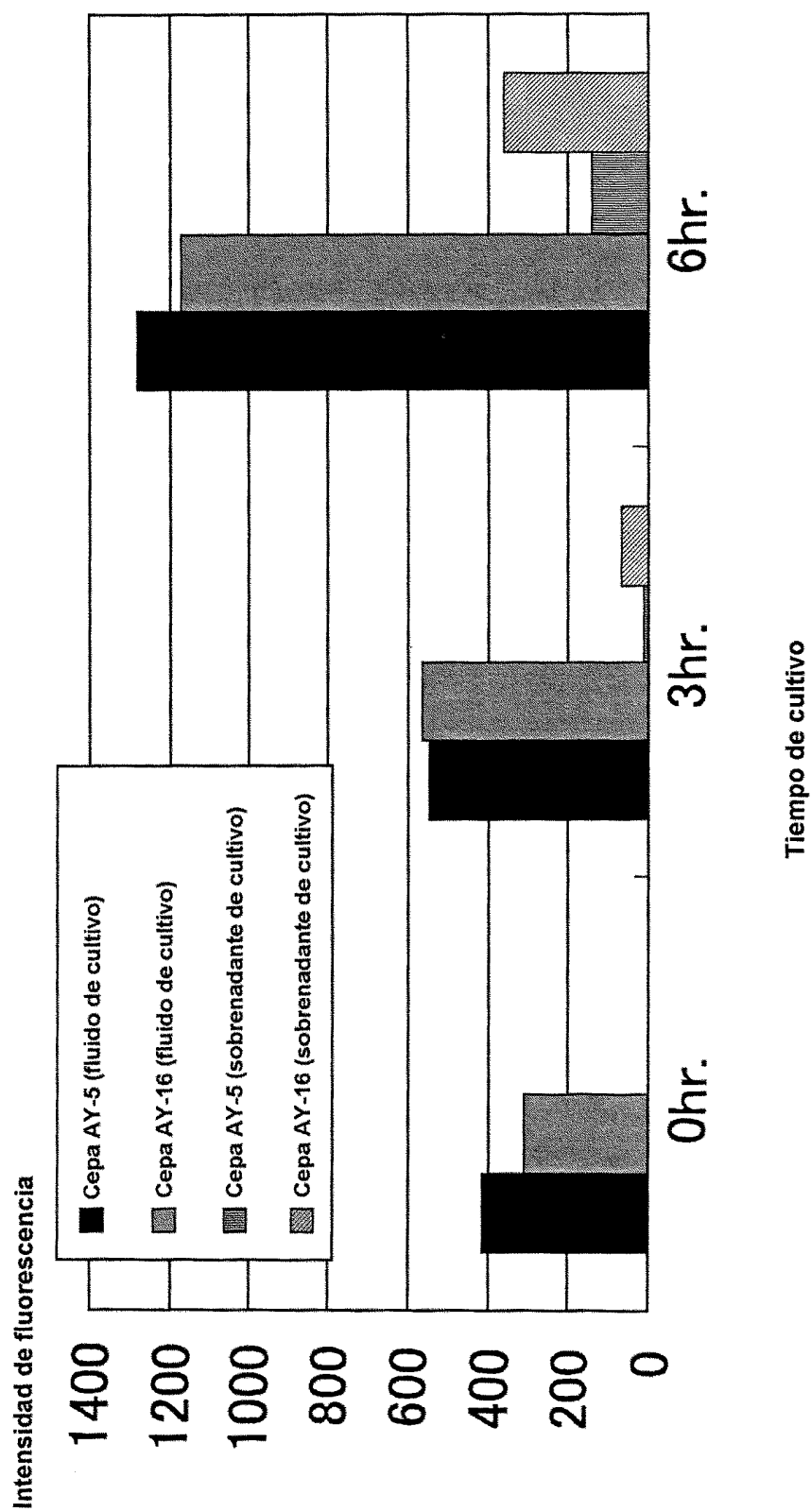


Fig. 3

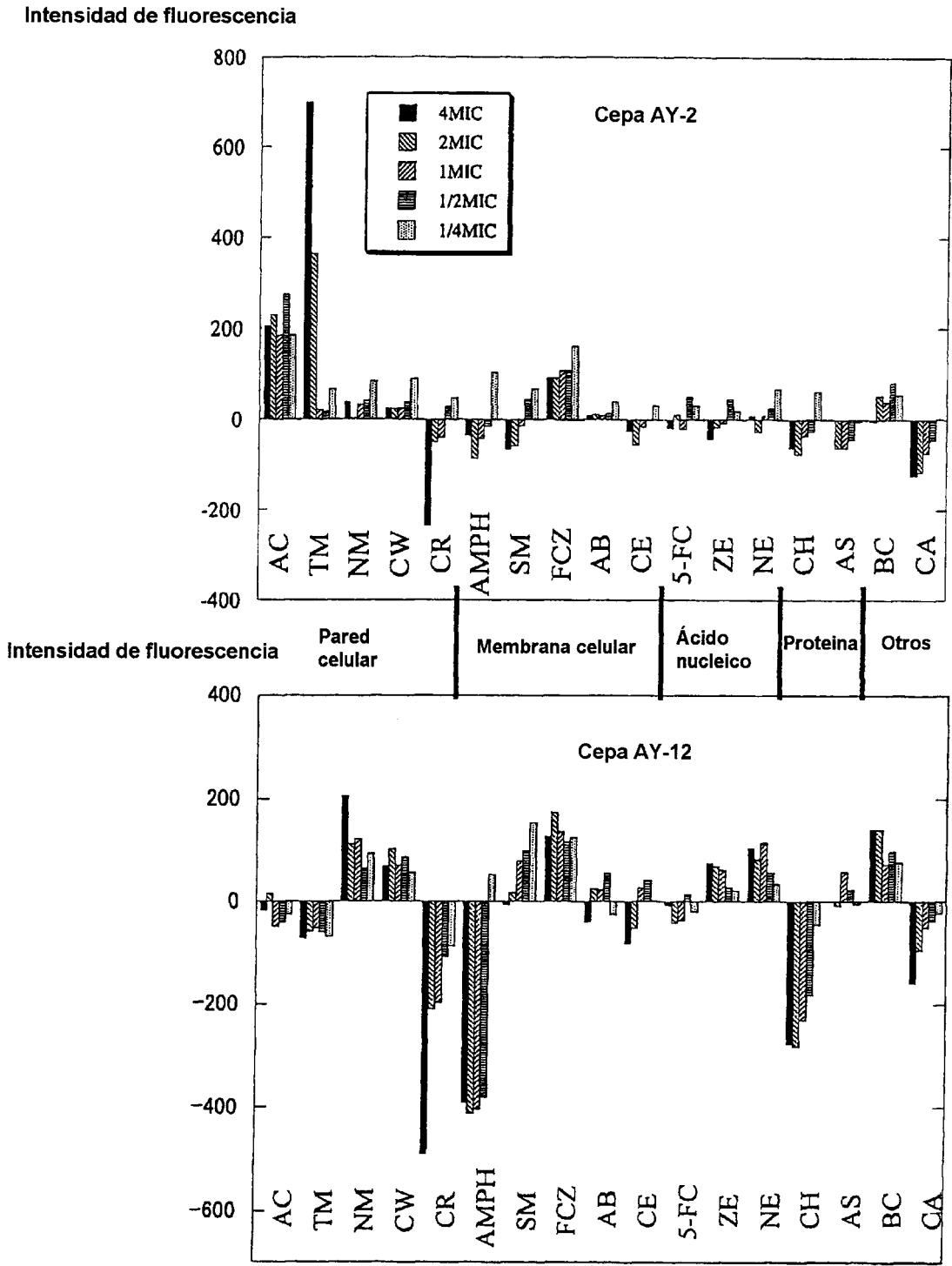


Fig. 4

```

ACTAGTATGCTTTTGCAAGCTTTCTTTTCTTTTGGCTGGTTTTGCAGCCAAAATATCT
      M L L Q A F L F L L A G F A A K I S
/
SpeI

      70      80      90      100     110     120
GCATCAAAGAGCTCGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGGTAGAA
A S K S S H A C R S T L E D P R V P V E
/
SacI

      130     140     150     160     170     180
AAAATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGAT
K M S K G E E L F T G V V P I L V E L D

      190     200     210     220     230     240
GGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATAC
G D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y

      250     260     270     280     290     300
GGAAAACCTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACA
G K L T L K F I C T T G K L P V P W P T

      310     320     330     340     350     360
CTTGTCACGTAACTTATGGTGTTCATGCTTTTCCCGTTATCCGGATCATATGAAA
L V T T L T Y G V Q C F S R Y P D H M K

      370     380     390     400     410     420
CGGCATGACTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAACGCACTATATCT
R H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I S

      430     440     450     460     470     480
TTCAAAGATGACGGGAAC TACAAGACGCGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCCTT
F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L

      490     500     510     520     530     540
GTTAATCGTATCGAGTTAAAGGTTATTGATTTTAAAGAGATGGAACATTCTCGGACAC
V N R I E L K G I D F K E D G N I L G H

      550     560     570     580     590     600
AAACTCGAGTACAAC TATAACTCACACAATGTATACATCAGGCAGACAAACAAAAGAT
K L E Y N Y N S H N V Y I T A D K Q K N

```

Fig. 5

```

      610      620      630      640      650      660
GGAATCAAAGCTAACTTCAAAATTCGCCACAACATTGAAGATGGATCGGTTCAACTAGCA
G I K A N F K I R H N I E D G S V Q L A

      670      680      690      700      710      720
GACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCAT
D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H

      730      740      750      760      770      780
TAGCTGTGACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGCGTGACCACATGGTC
Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M V

      790      800      810      820      830      840
CTTCTTGAGTTTGAACTGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAGATCTGTAGTGTT
L L E F V T A A G I T H G M D E I C S V
/
Bgl II

      850      860      870      880      890      900
GATTTGGGTTCCGGAAGTGAATCCAGTACTGCCTCTTCTAAGGCTTCGGGGTCTTCTTCC
D L G S G T E S S T A S S N A S G S S S

      910      920      930      940      950      960
AAGTCTAACTCCGGCTCTTCTGGTTCTTCCAGTTCTTCTTCTTCTTCCAGCTTCATCT
K S N S G S S G S S S S S S S S S A S S

      970      980      990      1000      1010      1020
TCATCTTCTAGCAAGAAGAATGCTGCCACCAACGTTAAAGCTAACTTAGCACAAGTGGTC
S S S S K K N A A T N V K A N L A Q V V

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
TTTACCTCCATCATTTCCITATCCATTGCCGCTGGTGTGCGGTTTGTCTTGGTTTAAAAA
F T S I I S L S I A A G V G F A L V *

      1090      1100      1110      1120
GCTTCGACACATACATAATAACTCGATAAGCCGCGG
/
SacI I

```

Fig. 6

```

      10      20      30      40      50      60
ACTAGTATGCTTTTGCAAGCTTTCCTTTTCCTTTGGCTGGTTTTGCAGCCAAAATATCT
  M L L Q A F L F L L A G F A A K I S
/
SpeI

      70      80      90      100     110     120
GCATCAAAGAGCTCGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGGTAGAA
A S K S S H A C R S T L E D P R V P V E
/
SacI

      130     140     150     160     170     180
AAAATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCCTGTTGAATTAGAT
K M S K G E E L F T G V V P I L V E L D

      190     200     210     220     230     240
GGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATAC
G D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y

      250     260     270     280     290     300
GGAAAACTTACCCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACTACCTGTTCCATGGCCAACA
G K L T L K F I C T T G K L P V P W P T

      310     320     330     340     350     360
CTTGTCACTACGTTAACTTATGGTGTTCATGCTTTTCCCGTTATCCGGATCATATGAAA
L V T T L T Y G V Q C F S R Y P D H M K

      370     380     390     400     410     420
CGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCGGAAGGTTATGTACAGGAACGCACTATATCT
R H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I S

      430     440     450     460     470     480
TTCAAAGATGACGGGAAGTACAAGACGCGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCGTT
F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L

      490     500     510     520     530     540
GTTAATCGTATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTCGGACAC
V N R I E L K G I D F K E D G N I L G H

      550     560     570     580     590     600
AAACTCGAGTACAACTATAACTCACACAATGTATACATCACGGCAGACAAACAAAAGAAT
K L E Y N Y N S H N V Y I T A D K Q K N

      610     620     630     640     650     660
GGAATCAAAGCTAAGTTCAAAATTCGCCACAACATTGAAGATGGATCCGTTCAACTAGCA
G I K A N F K I R H N I E D G S V Q L A

```

Fig. 7

```

        670      680      690      700      710      720
GACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCAT
D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H

        730      740      750      760      770      780
TACCTGTGACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGCGTGACCACATGGTC
Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M V

        790      800      810      820      830      840
CTTCTTGAGTTTGTAACGCTGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAGATCTCTGAATCC
L L E F V T A A G I T H G M D E I S E S
/
Bgl II

        850      860      870      880      890      900
GCTGCGGCCATTTCTGAAATCACTGACGGTCAAATCCAAGCTACTACCACTGCTACCACC
A A A I S Q I T D G Q I Q A T T T A T T

        910      920      930      940      950      960
GAAGCTACCACCACTGCTGCCCATCTTCCACCGTTGAAACTGTTTCTCCATCCAGCACC
E A T T T A A P S S T V E T V S P S S T

        970      980      990      1000      1010      1020
GAACTATCTCTCAACAACTGAAATGGTGCTGCTAAGGCCGCTGTCGGTATGGGTGCC
E T I S Q Q T E N G A A K A A V G M G A

        1030      1040      1050      1060      1070      1080
GGTGCTCTAGCTGCTGCTGCTATGTTGTTATAAGAAATCTCTGATTTTTTATAATATCTA
G A L A A A A M L L *

        1090      1100      1110      1120      1130      1140
TATGGCTTTTTTCAAAATTTTCGGTTTTACTAGGTAAGTGTGTTGATTCTTTTCTTTTCGT

        1150      1160      1170      1180      1190      1200
TAATATATTTTTACACATAATTTTAAATAATTTTGTATTTTGAATAGGTAGATACCAT

        1210      1220      1230      1240
AAAAATAAAACACTTTTTACTTTAACGAGTCCGCGG
/
SacII

```

ES 2 312 425 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Procedimiento para cribar un agente que actúa sobre la pared celular

<130> A11039M

<160> 2

<210> 1

<211> 1116

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

```
actagtatgc tttgcaagc tttcctttc ctttggctg gtttgcagc caaaatatct 60
gcatcaaaga gctcgcatgc ctgcaggctg actctagagg atccccgggt accggtagaa 120
aaaatgagta aaggagaaga acttttact ggagttgtcc caattcttgt tgaattagat 180
gggtgatgta atgggcacaa attttctgtc agtggagagg gtgaagggtga tgcaacatac 240
ggaaaactta cccttaaatt tatttgcact actggaaaac tacctgttcc atggccaaca 300
ctgtcacta cgtaactta tgggtgtcaa tgctttccc gttatccgga tcatatgaaa 360
cggcatgact tttcaagag tgccatgccc gaaggttatg tacaggaacg cactatatct 420
ttcaaagatg acgggaacta caagacgctg gctgaagtca agttgaagg tgataccctt 480
gttaatcgta tcgagttaaa aggtattgat tttaaagaag atggaaacat tctcggacac 540
aaactcgagt acaactataa ctacacaaat gtatacatca cggcagacaa acaaaagaat 600
ggaatcaaag ctaactcaa aattcgccac aacattgaag atggatccgt tcaactagca 660
gaccattatc aacaaaatac tccaattggc gatggccctg tcctttacc agacaaccat 720
tacctgtcga cacaatctgc ctttcgaaa gatcccaacg aaaagcgtga ccacatggtc 780
cttctgagt ttgtaactgc tgctgggatt acacatggca tggatgagat ctgtagtgtt 840
gatttgggtt ccggaactga atccagtact gcctcttcta acgcttcggg gtcttcttcc 900
aagtctaact ccggctcttc tgggtcttcc agttcttctt cttcttcttc agcttcatct 960
tcatottcta gcaagaagaa tgctgccacc aacgttaaag ctaacttagc acaagtggtc 1020
ttacctcca tcatttcctt atccattgcc gctgggtgcg gtttgcttt ggtttaaaaa 1080
gcttcgacac atacataata actcgataag ccgcgg 1116
```

<210> 2

<211> 1236

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

ES 2 312 425 T3

<400> 2

actagtatgc ttgtcaagc ttctcttc ctttggctg gtttgcagc caaaatatct 60
 5 gcatcaaaga gctgcgatgc ctgcaggctg actctagagg atccccgggt accggtagaa 120
 aaaatgagta aaggagaaga acttttact ggagttgtcc caattctgt tgaattagat 180
 10 ggtgatgta atgggcacaa atttctgtc agtggagagg gtgaaggta tgcaacatac 240
 ggaaaactta cccttaaatt tatttgcact actggaaaac tacctgttcc atggccaaca 300
 cttgtcacta cgtaactta tgggtgtcaa tgctttccc gttatccgga tcatatgaaa 360
 15 cggcatgact tttaagag tgccatgccc gaaggttatg tacaggaacg cactatatct 420
 ttcaaagatg acgggaacta caagacgctg gctgaagtca agttgaagg tgataccctt 480
 20 gtaatcgta tcgagttaa aggtattgat tttaaagaag atggaaacat tctcggaac 540
 aaactcgagt acaactataa ctacacaat gtatacatca cggcagacaa acaaaagaat 600
 ggaatcaaag ctaactcaa aattcgccac aacattgaag atggatccgt tcaactagca 660
 25 gaccattatc aacaaaatac tccaattggc gatggccctg tccttttacc agacaacat 720
 tacctgtcga cacaatctgc ccttcgaaa gatcccaacg aaaagcgtga ccacatggtc 780
 cttcttgagt ttgtaactgc tgctgggatt acacatggca tggatgagat ctctgaatcc 840
 30 gctgccgcca ttctcaaact cactgacggt caaatccaag ctactaccac tgctaccacc 900
 gaagctacca ccactgtgc cccatcttcc accgttgaaa ctgtttctcc atccagcacc 960
 35 gaaactatct ctcaacaaac tgaaaatggt gctgctaagg ccgctgtcgg tatgggtgcc 1020
 ggtgctctag ctgctgtgc tatgtgtta taagaaatct ctgattttt ataatatcta 1080
 tatggctttt ttcaaaattt tcggtttac taggtaagtg ttgattctt ttctttcgt 1140
 40 taatatattt ttacacataa tttaataa ttttgttat ttgaaatagg tagataccat 1200
 aaaaataaaa cactttttac tttaacgagt ccgcgg 1236

45

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.
 50 <120> Procedimiento para cribar agente que actúa sobre la pared celular
 <130> P20599EP
 <140> EP 01 925 961.3
 55 <141> 2001-04-26
 <150> JP 132041/2000
 <151> 2000-05-01
 <160> 24
 60 <170> PatentIn Ver.2.1
 <210> 1
 <211> 1116
 <212> DNA
 65 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

ES 2 312 425 T3

<400> 1

actagtatgc ttgtcaagc ttctcttc ctttggctg gtttgcagc caaaatatct 60
 5 gcatcaaaga gctcgcatgc ctgcaggctg actctagagg atccccgggt accggtagaa 120
 aaaatgagta aaggagaaga acttttact ggagttgtcc caattctgt tgaattagat 180
 10 ggtgatgta atgggcacaa atttctgtc agtggagagg gtgaaggta tgcaacatac 240
 ggaaaactta cctttaaatt tattgcact actggaaaac tacctgttcc atggccaaca 300
 ctgtcacta cgtaactta tgggtgtcaa tgctttccc gttatccgga tcatatgaaa 360
 15 cggcatgact tttcaagag tgccatgccc gaaggttatg tacaggaacg cactatatct 420
 ttcaaatgac acgggaacta caagacgctg gctgaagtca agttgaagg tgataccctt 480
 gtaaatgta tcgagtaaa aggtattgat tttaagaag atggaaacat tctcgacac 540
 20 aaactcgagt acaactataa ctacacaaat gtatacatca cggcagacaa acaaaagaat 600
 ggaatcaaag ctaactcaa aattcgccac aacattgaag atggatccgt tcaactagca 660
 25 gaccattatc acaaaaatac tcaattggc gatggccctg tcttttacc agacaacat 720
 tacctgtcga cacaatctgc ctttcgaaa gatcccaacg aaaagcgtga ccacatggc 780
 ctcttgagt ttgtaactgc tgctgggatt acacatggca tggatgagat ctgtagtgtt 840
 30 gatttgggtt ccggaactga atccagtact gcctcttcta acgcttcggg gtcttctcc 900
 aagtctaact ccggctcttc tggttctcc agttcttctt ctcttcttc agcttcatct 960
 35 tcattctcta gcaagaagaa tgctgccacc aacgttaaag ctaacttagc acaagtggc 1020
 ttacctcca tcatttctt atccattgcc gctggtgtcg gtttgctt gggttaaaaa 1080
 gcttcgacac atacataata actcgataag ccgcgg 1116

<210> 2

<211> 1236

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

ES 2 312 425 T3

<400> 2

actagtagtc tttgcaagc tttcctttc ctttggctg gtttgcagc caaaatatct 60
 5 gcatcaaaga gctcgcatgc ctgcaggctg actctagagg atccccgggt accggtagaa 120
 aaaatgagta aaggagaaga acttttact ggagttgtcc caattctgt tgaattagat 180
 10 ggtgatgtta atgggcacaa atttctgtc agtggagagg gtgaagggtga tgcaacatac 240
 ggaaaactta cccttaaatt tatttgcact actggaaaac tacctgttcc atggccaaca 300
 ctgtcacta cgtaactta tgggtgtcaa tgctttccc gttatccgga tcatatgaaa 360
 15 cggcatgact tttcaagag tgccatgcc gaaggttatg tacaggaacg cactatatct 420
 ttcaaagatg acgggaacta caagacgct gctgaagtca agttgaagg tgataccctt 480
 gttaatcgta tcgagttaa aggtattgat tttaaagaag atggaaacat tctcggaac 540
 20 aaactcgagt acaactataa ctacacaaat gtatacatca cggcagacaa aaaaaagaat 600
 ggaatcaaag ctaactcaa aattcgccac aacattgaag atggatccgt tcaactagca 660
 25 gaccattatc aacaaaatac tccaattggc gatggccctg tcttttacc agacaacat 720
 tacctgtcga cacaatctgc ctttcgaaa gatcccaacg aaaagcgtga ccacatggc 780
 cttcttgagt ttgtaactgc tgctgggatt acacatggca tggatgagat ctctgaatcc 840
 30 gctgccgcca tttctaaat cactgacggt caaatccaag ctactaccac tgctaccacc 900
 gaagctacca ccactgtgc ccactctcc accgttgaaa ctgtttctcc atccagcacc 960
 35 gaaactatct ctcaacaaac tgaaaatggt gctgctaagg ccgctgtcgg tatgggtgcc 1020
 ggtgctctag ctgctgtgc tatgtgtta taagaaatct ctgattttt ataatatcta 1080
 tatggctttt ttcaaaattt tcggttttac taggtaagtg ttgattctt ttctttcgt 1140
 40 taatatattt ttacacataa ttttaaataa ttttgttat tttgaatagg tagataccat 1200
 aaaaataaaa cactttttac tttaacgagt ccgcgg 1236

45 <210> 3

<211> 26

<212> DNA

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador

55 <400> 3

ggcatggatg agatctacaa ataatg

26

60 <210> 4

<211> 27

<212> DNA

65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador

ES 2 312 425 T3

	<400> 4	
	catgattacg ccgagctcgc atgcctg	27
5	<210> 5	
	<211> 37	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador	
15	<400> 5	
	caacacttgt cactacgtta acttatgggtg tcaatg	37
20	<210> 6	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador	
30	<400> 6	
	cctgtgattt ctccagctgc aattc	25
35	<210> 7	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador	
45	<400> 7	
	gattcattaa tgcagtctgg cagcacagg	29
50	<210> 8	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador	
60	<400> 8	
	gattcattaa tgcagctggc acgac	25
65	<210> 9	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 312 425 T3

	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador		
5	<400> 9		
	ctcacggtat cgcctcgag atctctgaat cc		32
10	<210> 10		
	<211> 28		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador		
	<400> 10		
20			
	gagacctct tctgactct ctgaatcc		28
	<210> 11		
25	<211> 34		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador		
	<400> 11		
35			
	aaacaaaag atcgactagt ataaaatgaa tata		34
	<210> 12		
40	<211> 22		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador		
	<400> 12		
50			
	cattaatgca tgctggcag ac		22
	<210> 13		
	<211> 31		
55	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador		
60			
	<400> 13		
65			
	ctttaacgag tccgcggatt tctccagctc g		31
	<210> 14		
	<211> 32		

ES 2 312 425 T3

	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador	
	<400> 14	
10	gcactagtat gcttttgcaa gctttcctt	32
	<210> 15	
	<211> 33	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador	
	<400> 15	
25	gcgagctctt tgatgcagat atttggtg caa	33
	<210> 16	
	<211> 30	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador	
35	<400> 16	
40	gcagatctgt agtggtgatt tgggtccgg	30
	<210> 17	
	<211> 38	
	<212> DNA	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador	
50	<400> 17	
	gcccgcggct tatcgagtta ttaatgtatgt gtcgaagc	38
55	<210> 18	
	<211> 29	
	<212> DNA	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador	
65	<400> 18	
	gcagatctac ttgttgccg ctgaatccg	29

ES 2 312 425 T3

	<210> 19	
	<211> 32	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador	
10	<400> 19	
	gcgaattcga gaaatcacag gactcgtaa ag	32
15	<210> 20	
	<211> 36	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador	
25	<400> 20	
	gcgaattcga gagcaacggt aataaaagca acgacg	36
30	<210> 21	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador	
40	<400> 21	
	cggagctcgg tgtctccgag ttacaatggc	30
45	<210> 22	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador	
55	<400> 22	
	gcagatctag aaggcgatac cgtgagctgg aac	33
60	<210> 23	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador	

ES 2 312 425 T3

<400> 23

cggagctcca tcaatacttc tcgccctgct

30

5

<210> 24

<211> 34

<212> DNA

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Iniciador

15 <400> 24

gcagatctaa gaagagggtc tcaacctata gaag

34

20

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.

25 <120> Procedimiento para cribar agente que actúa sobre la pared celular

<130> P20599EP

<140> 01 925 961.3

30 <141> 2001-04-26

<150> JP 132041/2000

<151> 2000-05-01

<160> 2

35 <170> PatentIn Ver.2.1

<210> 1

<211> 1116

<212> DNA

40 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

45

actagtatgc tttgcaagc tttcctttc cttttggctg gttttgcagc caaaatatct 60

gcatcaaaga gctcgcatgc ctgcaggctg actctagagg atccccgggt accggtagaa 120

50

aaaatgagta aaggagaaga acttttact ggagttgtcc caattctgt tgaattagat 180

ggtgatgta atgggcacaa attttctgtc agtggagagg gtgaaggta tgcaacatac 240

ggaaaactta cccttaaatt tatttgcact actggaaaac tacctgttcc atggccaaca 300

55

cttgtcacta cgtaactta tgggtgtcaa tgctttccc gttatccgga tcatatgaaa 360

cggcatgact tttcaagag tgccatgccc gaaggttatg tacaggaacg cactatatct 420

60

ttcaaagatg acgggaacta caagacgcgt gctgaagtca agtttgaagg tgataccctt 480

65

ES 2 312 425 T3

gttaatcgta tcgagttaaa aggtattgat tttaaagaag atggaaacat tctcggacac 540
 aaactcgagt acaactataa ctacacaaat gtatacatca cggcagacaa acaaaagaat 600
 5 ggaatcaaag ctaacttcaa aattcgccac aacattgaag atggatccgt tcaactagca 660
 gaccattatc aacaaaatac tccaattggc gatggccctg tccttttacc agacaacat 720
 tacctgtcga cacaatctgc ctttcgaaa gatcccaacg aaaagcgtga ccacatggtc 780
 10 cttottgagt ttgtaactgc tgctgggatt acacatggca tggatgagat ctgtagtgtt 840
 gatttgggtt ccggaactga atccagtact gcctcttcta acgcttcggg gtcttctcc 900
 aagtctaaact ccggctcttc tggttcttcc agttcttctt cttctcttc agcttcatt 960
 15 tcatcttcta gcaagaagaa tgctgccacc aacgttaaag ctaacttagc acaagtggtc 1020
 ttacctcca tcatttcctt atccattgcc gctgggtcgc gtttgcttt ggtttaaaaa 1080
 gcttcgacac atacataata actcgataag ccgcgg 1116
 20 <210> 2
 <211> 1236
 <212> DNA
 25 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 2
 30 actagtatgc tttgcaagc tttcctttc ctttggctg gtttgcagc caaaatatct 60
 gcatcaaaga gctcgcagtc ctgcaggtgc actctagagg atccccgggt accggtagaa 120
 aaaatgagta aaggagaaga acttttact ggagttgtcc caattctgt tgaattagat 180
 35 ggtgatgta atgggcacaa atttctgtc agtggagagg gtgaagggtga tgcaacatac 240
 ggaaaactta ccctaaatt tatttgact actggaaaac tacctgttcc atggccaaca 300
 cttgtcacta cgtaactta tgggtgtcaa tgctttccc gttatccgga tcatatgaaa 360
 40 cggcatgact tttcaagag tgccatgcc gaaggttatg tacaggaacg cactatatct 420
 ttcaaagatg acgggaacta caagacgct gctgaagtca agttgaagg tgataccctt 480
 45 gttaatcgta tcgagttaaa aggtattgat tttaaagaag atggaaacat tctcggacac 540
 aaactcgagt acaactataa ctacacaaat gtatacatca cggcagacaa acaaaagaat 600
 ggaatcaaag ctaacttcaa aattcgccac aacattgaag atggatccgt tcaactagca 660
 50 gaccattatc aacaaaatac tccaattggc gatggccctg tccttttacc agacaacat 720
 tacctgtcga cacaatctgc ctttcgaaa gatcccaacg aaaagcgtga ccacatggtc 780
 cttottgagt ttgtaactgc tgctgggatt acacatggca tggatgagat ctctgaatcc 840
 55 gctgccgcca tttctaaat cactgacggt caaatccaag ctactaccac tgctaccacc 900
 gaagctacca ccactgctgc cccatcttcc accgttgaac ctgtttctcc atccagcacc 960
 gaaactatct ctcaacaaac tgaaaatggt gctgctaagg ccgctgtcgg tatgggtgcc 1020
 60 ggtgctctag ctgctgctgc tatgttga taagaaatct ctgattttt ataatatcta 1080
 tatggctttt ttcaaaattt tcggttttac taggtaagt tttgattctt ttctttcgt 1140
 taatatattt ttacacataa tttaaataa ttttgttat ttgaatagg tagataccat 1200
 65 aaaaataaaa cactttttac tttaacgagt ccgcgg 1236